

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

DISSERTATION

**Hochdurchsatz- und Kandidatengensequenzierung von
Erkrankungen mit erniedrigter Knochenmasse**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julia Mrosk

aus Spremberg

Datum der Promotion: 01.03.2019

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Julia Mrosk, Gandham SriLakshmi Bhavani, Hitesh Shah, Jochen Hecht, Ulrike Krüger, Anju Shukla, Uwe Kornak, Katta Mohan Girisha. *“Diagnostic strategies and genotype-phenotype correlation in a large Indian cohort of osteogenesis imperfecta.”* Bone, Volume 110, 2018, Pages 368-377, ISSN 8756-3282, <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.02.029>.

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt	1
Abstract	3
1. Einleitung	4
1.1. Störungen im Knochenstoffwechsel	4
1.2. Skelettdysplasien	5
1.3. Osteoporose	5
1.4. Osteogenesis imperfecta	7
1.4.1. Klinische Einteilung der Osteogenesis imperfecta	8
1.4.2. Molekulargenetische Pathogenese der Osteogenesis imperfecta.....	9
1.4.3. Grundlagen der Kollagensynthese und Fibrillenbildung	9
1.4.4. Autosomal-dominant vererbte OI	10
1.4.5. Autosomal-rezessive Formen der OI	12
1.5. X-chromosomal vererbte OI und juvenile Osteoporose durch <i>PLS3</i> -Mutationen	15
1.6. Next-Generation Sequencing	17
1.6.1. Funktionsweise.....	17
1.6.2. NSG-Technologien	19
1.7. Zielsetzung der Arbeit	21
2. Methoden und Materialien	22
2.1. Probenvorbereitung	22
2.2. Bone Mass Gen-Panel.....	22
2.3. Auswertung der Next-Generation-Sequencing-Daten	22
2.3.1. GeneTalk.....	22
2.3.2. PhenIX	23
2.3.3. MutationTaster	24
2.3.4. Integrative Genomics Viewer	24
2.3.5. Human Splicing Finder	25
2.3.6. Datenbankrecherche und klinische Beurteilung	25
2.4. Validierung der NGS-Varianten im Labor und <i>PLS3</i> -Gensequenzierung.....	26
2.4.1. Primer-Design	26
2.4.2. DNA-Aufbereitung mit Salz-Ethanol-Fällung.....	26
2.4.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	27
2.4.4. Gelelektrophorese	28
2.4.5. Reinigung der PCR-Produkte mit EXOI-SAP	28
2.4.6. Sequenzierung nach Sanger	29
2.4.7. Fällung und Sequenzierung im Sequencer	29
2.5. Auswertung gefundener <i>PLS3</i> -Varianten	30

2.6. Chemikalien und Reagenzien	31
2.7. Geräte.....	31
2.8. Datenbanken und Software.....	32
2.9. Primer	32
2.10. Gene im Bone Mass Panel	34
3. Ergebnisse.....	36
3.1. Ergebnisse der Osteogenesis imperfecta Fälle und des Next-Generation Sequencing ..	36
3.1.1. Detektierte Mutationen für autosomal-dominante Osteogenesis imperfecta.....	44
3.1.2. Detektierte autosomal-rezessive OI-Mutationen mit Patientenbeschreibung.....	51
3.2. Ergebnisse der <i>PLS3</i> -Untersuchung und Sequenzierung	59
3.2.1. Etablierung der PCR-Bedingungen.....	59
3.2.2. Polymorphismen.....	60
3.2.3. Potenziell pathogene Varianten	60
4. Diskussion.....	64
4.1. NGS als diagnostisches Verfahren zur Identifizierung des Krankheitsgens.....	64
4.2. Beurteilung der gefundenen <i>COL1A1/A2</i> -Varianten und <i>IFITM5</i> -Mutation	67
4.3. Gefundene Mutationen für autosomal-rezessive Osteogenesis imperfecta	71
4.4. Beurteilung der <i>PLS3</i> -Sequenzierung	78
5. Literaturverzeichnis	86
6. Abkürzungsverzeichnis	91
7. Abbildungsverzeichnis	92
8. Tabellenverzeichnis	93
Eidesstattliche Versicherung	94
Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	95
Lebenslauf	96
Publikationsliste	96
Danksagung.....	98

Abstrakt

Einleitung: Vererbte Störungen mit erniedrigter Knochenmasse umfassen eine große Anzahl an verschiedenen Erkrankungen, darunter Formen der allgemein bekannten Osteoporose oder auch seltenere Skelettdysplasien wie Osteogenesis imperfecta (OI). OI beschreibt eine Gruppe von erblichen Erkrankungen des Bindegewebes, die vorwiegend durch eine erhöhte Frakturneigung charakterisiert sind. Der Großteil wird durch autosomal-dominant vererbte Mutationen in den Genen *COL1A1* oder *COL1A2* verursacht. Andere dominant oder rezessiv vererbte Formen der OI kommen deutlich seltener vor und basieren auf aktuell mehr als 17 bekannten ursächlichen Genen. Während der letzten Jahre wurde die konventionelle Sanger-Sequenzierung zur Identifikation ursächlicher Mutationen verwendet, aber die steigende Anzahl ursächlicher Gene macht diesen Prozess zunehmend kosten- und arbeitsintensiver. Hochdurchsatzsequenzierung, auch Next-Generation-Sequencing (NGS) genannt, erlaubt eine parallele Analyse beliebig vieler Krankheitsgene zu erheblich niedrigeren Kosten. Das Verfahren erlaubt damit eine direktere Einbindung molekulargenetischer Testung im klinischen Alltag.

Materialien und Methoden: In dieser Arbeit wurden 31 indische OI-Patienten, davon 12 mit bekannter Konsanguinität in der Familie, mithilfe eines NGS-basierten Gen-Panels untersucht, das 71 bekannte Gene für Erkrankungen mit veränderter Knochenmasse enthält. Unter Verwendung verschiedener Datenbanken und bioinformatischen Programmen wie PhenIX, GeneTalk oder MutationTaster wurden potentiell pathogene Varianten identifiziert. Anschließend wurden mögliche krankheitsverursachende Varianten mittels konventioneller Sanger-Sequenzierung bestätigt und es erfolgte ein Vergleich mit bereits beschriebenen Mutationen. Zusätzlich wurde bei 37 Patienten mit verminderter Knochenmasse, bei denen eine NGS-Untersuchung kein Ergebnis erbrachte, das *PLS3*-Gen sequenziert, das kurz zuvor als ursächlich für X-chromosomal vererbte Osteoporose und OI entdeckt wurde.

Ergebnisse: Für die durch das Gen-Panel angereicherten Regionen konnte eine durchschnittliche Abdeckung von 97,7 % erreicht werden. Dabei wurden bei 61,3 % der untersuchten Patienten Mutationen für autosomal-dominant vererbte OI in den Genen *COL1A1*, *COL1A2* und *IFITM5* nachgewiesen. 35,5 % der untersuchten Patienten wiesen Mutationen für eine autosomal-rezessiv vererbte Osteogenesis imperfecta in den Genen *FKBP10*, *WNT1*, *LEPRE1*, *SERPINF1* oder *BMP1* auf. Mithilfe klinischer Merkmale konnte ein Punktesystem entwickelt werden, das eine Schweregradeinteilung ermöglichte. Dabei waren 6 Patienten schwer, 14 moderat und 11 mild vom OI-Phänotyp betroffen. Weiterhin konnte eine Korrelation zwischen quantitativen und qualitativen *COL1A1/2*-Mutationen und dem Schweregrad gezeigt werden. Bei der Sequenzierung des *PLS3*-Gens konnten 3 möglicherweise ursächliche Varianten identifiziert werden.

Schlussfolgerung: Mit einer Erfolgsrate von 96,8 % an detektierten potentiell pathogenen Varianten, erscheint die gezielte Anwendung von NGS bei der Suche nach ursächlichen Genveränderungen erfolgsversprechend und bestätigt das Potential in der routinemäßigen Anwendung in der molekulargenetischen Diagnostik. Weiterhin konnte in der Arbeit das bisher kleine Spektrum an identifizierten potentiell pathogenen *PLS3*-Mutationen erweitert werden.

Abstract

Introduction: Hereditary disorders with low bone mass comprise a large number of different diseases including common osteoporosis and rare skeletal dysplasias such as osteogenesis imperfecta (OI). OI is a heritable connective tissue disorder mainly characterized by increased bone fragility. The majority of OI cases are caused by autosomal-dominantly inherited mutations in either of the genes *COL1A1* or *COL1A2*, encoding for type I collagen. Other dominantly and recessively inherited forms of OI are very rare and are secondary to mutations in more than 17 known causative genes. Until recently conventional Sanger sequencing was the standard method used to detect causative mutations. However, the increasing number of genes made this approach very time-consuming and expensive. High-throughput or Next-Generation Sequencing (NGS) allows for parallel analysis of a flexible number of genes and is a promising method for the detection of causative gene mutations in clinical practice.

Material and methods: In this work 31 OI patients of Indian origin, 12 with known consanguinity in the family, were examined using a NGS-based gene panel comprising 71 genes known for disorders with abnormal bone mass to identify potentially causative mutations. Using different databases and bioinformatics software, such as PhenIX, GeneTalk and MutationTaster, potential pathogen variants were identified. Thereafter, possibly disease-causing variants were confirmed by conventional Sanger sequencing and compared to the known mutation spectrum. Furthermore, in 37 patients with decreased bone mass in which NGS analysis was negative, Sanger sequencing of *PLS3*-gene was performed to identify pathogenic variants. Shortly before this study the *PLS3*-gene had been identified to cause X-linked Osteoporosis and OI.

Results: NGS of the genomic regions enriched by the gene panel resulted in an average coverage of 97,7 %. In 61,3 % of the examined Indian patients mutations in genes *COL1A1*, *COL1A2* and *IFITM5* leading to autosomal-dominantly inherited OI were found. In 35,5 % of examined patients mutations in genes *FKBP10*, *WNT1*, *LEPRE1*, *SERPINF1* and *BMP1* causing autosomal-recessive OI were identified. An overall scoring taking into account clinical characteristics allowed to categorize 6 patients as severely, 14 as moderately, and 11 as mildly affected. Furthermore a correlation between quantitative and qualitative *COL1A1/2* mutations and disease severity was found. Using Sanger sequencing in *PLS3*-gene 3 possibly damaging variants were identified.

Conclusion: With a detection rate of 96,8 % this work underlines the extreme utility of targeted NGS for the identification of disease-causing mutations thus justifying its routine use in molecular diagnostics. Furthermore, this work expands the small spectrum of identified *PLS3*-mutations.

1. Einleitung

1.1. Störungen im Knochenstoffwechsel

Das menschliche Skelett setzt sich aus etwa 206 Knochen zusammen, die keinesfalls starre Gebilde darstellen. Stattdessen befinden sie sich in einem physiologischen und dynamischen Auf-, Ab- und Umbau. Hiermit wird eine kontinuierliche Anpassung an Umweltgegebenheiten gewährleistet [1, 2]. Dabei erfüllen sie mechanische Funktionen als Stütze für Weichteilgewebe und als Ansatzpunkte für die Muskulatur bei der Fortbewegung. Außerdem haben die Knochen eine Schutzfunktion für lebenswichtige Organe wie Gehirn und Knochenmark und fungieren zusätzlich als Stoffwechselorgan durch große Reserven an Calcium und Phosphat sowie bei der Hämatopoese [1, 3].

Biochemisch bestehen Knochen zu einem großen Anteil aus extrazellulärer Matrix. Diese wird zu etwa 60 % aus anorganischen Komponenten gebildet, vorwiegend aus den für die Stabilität wesentlichen Calciumverbindungen wie Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) und Wasser. Etwa 30 % sind organischen Bestandteile, darunter hauptsächlich Kollagen I, Proteoglykane, andere nicht-kollagenen Proteine und Fette [3]. Lediglich zu 10 % bestehen unsere Knochen aus zellulären Elementen. Die Umbauprozesse der Knochenmatrix unterliegen einer Reihe von Kontrollmechanismen. Lokale Signal- und Entzündungsstoffe sowie Hormone regulieren im Wesentlichen die Aktivität von zwei stark miteinander interagierenden Zelltypen, die Osteoklasten und Osteoblasten.

Osteoblasten sind spezialisierte, knochenbildende Zellen, die sich aus pluripotenten mesenchymalen Stammzellen entwickeln. Sie sezernieren die Bestandteile der Knochenmatrix wie Kollagen, Apatit und weitere Begleitstoffe [4, 5]. Zusätzlich exprimieren Osteoblasten unter anderem den Nebenschilddrüsenhormonrezeptor (PTH-Rezeptor) und sind damit indirekt in der Lage die Osteoklastenfunktion mittels RANK-Ligand zu stimulieren und durch Osteoprotegerin (OPG) zu inhibieren. In der terminalen Differenzierung entwickeln sie sich zu nicht mehr teilungsfähigen mechanosensitiven Osteozyten, die in die Knochensubstanz eingebaut werden und mittels Gap Junctions untereinander in Verbindung stehen [5].

Die für die Knochenresorption verantwortlichen Osteoklasten sind mehrkernige, aus mononukleären Vorläuferzellen der Monozyten-Makrophagen-Familie entstandene Zellen, deren Differenzierung, Expansion und Überleben hauptsächlich über die von den Osteoblasten sezernierten Faktoren „Monocyte/macrophage colony-stimulating factor“ (M-CSF), „Receptor Activator of NF- κ B Ligand“ (RANKL) und Osteoprotegerin (OPG) reguliert wird [4, 6, 7]. Aber auch viele weitere Faktoren und Hormone wie beispielsweise Glukokortikoide, Östrogen, Parathormon (PTH), Calcitonin, Follikel-stimulierendes Hormon (FSH), „Vascular endothelial growth factor“ (VEGF), verschiedene Interleukine und Tumornekrosefaktoren (TNF) greifen in die Osteoklastenaktivität, Kommunikation und Differenzierung ein [6, 8]. Osteoklasten lagern sich

mithilfe von Adhäsionsmolekülen an die Knochenmatrix an und bauen in einem speziellen Resorptionsraum mithilfe eines aktiven Protonentransports ein saures Milieu auf. Weiterhin sekretieren sie proteolytische Enzyme mit denen sie in der Lage sind die mineralisierte Knochenmatrix zu entfernen und können ferner als Immunzellen fungieren [8, 9].

Eine Verschiebung des komplexen und multifaktoriell regulierten Gleichgewichts zwischen Knochenresorption und Knochenbildung resultiert in Skeletterkrankungen mit abnormer Knochenmasse und -stabilität.

1.2. Skelettdysplasien

Die große heterogene Gruppe der Skelettdysplasien umfasst mittlerweile mehr als 450 beschriebene und meistens monogenetisch vererbte Erkrankungen [10]. Eingeteilt werden diese basierend auf radiologischen, molekularen und biochemischen Kriterien und weisen unterschiedlich stark ausgeprägte Abnormitäten des Skeletts auf [10, 11]. Das breite klinische Spektrum mit Beteiligung weiterer Organe und unterschiedlich ausgeprägten Schweregraden erschwert oft eine korrekte diagnostische Einordnung, die für das weitere therapeutische Vorgehen von entscheidender Bedeutung ist. Dabei liegen allen Skelettdysplasien Störungen zugrunde, welche Embryologie, Wachstum, Entwicklung, Differenzierung und/oder Stoffwechsel von Knochen, Knorpel und weiteren Bindegewebsbestandteilen beeinflussen [12]. Auch wenn jede einzelne Untergruppe sehr selten vorkommt, ergibt sich dennoch eine gemeinsame Inzidenz für alle Skelettdysplasien von fast 1:5000, was ihre klinische Bedeutsamkeit unterstreicht [11, 13].

1.3. Osteoporose

Die weltweit wohl bekannteste und mit über 200 Millionen betroffenen Menschen am häufigsten vorkommende Skeletterkrankung mit erniedrigter Knochenmasse ist die Osteoporose [14]. Sie wurde u.a. durch den generellen Anstieg des Lebensalters der Gesamtbevölkerung zu einem wachsenden medizinischen und sozioökonomischen Problem [15]. Allein in Europa verursacht sie jährlich etwa 2,2 Millionen Frakturen mit geschätzten Kosten von 36 Milliarden Euro [14]. Den größten Anteil der Osteoporose-Patienten bilden dabei postmenopausale Frauen und ältere Männer. Weltweit leidet etwa jede zehnte Frau über 60 Jahren an einer Osteoporose [15]. Die Erkrankung ist neben der erniedrigten Knochenmasse durch eine gestörte Mikroarchitektur des Knochens mit der Folge einer erhöhten Knochenbrüchigkeit gekennzeichnet [16]. Dabei setzt der Knochenmasseverlust vorwiegend zuerst im stoffwechselaktiveren trabekulären Anteil des Knochens ein [17]. Diese stellen ein komplexes dreidimensionales Netzwerk im Knocheninneren dar. Die Volumenabnahme der äußeren Knochenkortikalis beginnt zu einem späteren Zeitpunkt und verläuft langsamer [17-19]. Die Folgen sind neben Frakturen, die häufig die Wirbelsäule, Hüfte oder das Handgelenk betreffen, auch Schmerzen, der Verlust von Mobilität und Autonomie

und damit starke Einbußen der Lebensqualität des einzelnen Betroffenen [20]. Zusätzlich sind osteoporotische Frakturen mit erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsraten assoziiert [2, 16]. Da der Knochenverlust meistens schleichend und unbemerkt fortschreitet, wird die Osteoporose im höheren Alter oft erst nach dem Auftreten der ersten klinischen Fraktur diagnostiziert [20]. Die Diagnostik der Osteoporose umfasst neben der Familienanamnese, Laboruntersuchungen und bildgebenden Verfahren, eine gezielte Anamnese bezüglich bisher aufgetretener Frakturen einschließlich individueller Risikofaktoren, wie Lebensalter, Geschlecht, Immobilität, Ernährungsmangelzustände, Rauchen, spezielle Grunderkrankungen und Medikamente [14]. Das derzeit am häufigsten angewendete bildgebende Standarddiagnostikverfahren zur Messung einer verringerten Knochendichte ist aufgrund seiner weiten Verfügbarkeit die Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DXA). Mit dieser Methode kann durch Verwendung von zwei energetisch unterschiedlichen Röntgenstrahlen der Knochenmineralgehalt in Gramm (BMC) bzw. die Knochenmineraldichte pro Fläche (BMD) an der Lendenwirbelsäule (L1-L4), dem proximalen Femur oder am ganzen Körper gemessen werden [19, 21]. Die BMD macht in etwa 60-70 % der Knochenstärke aus und wird zur Frakturvorhersage genutzt [19]. Das Ergebnis wird nicht als absolute Dichte angegeben, sondern als statistische Größe, dem sogenannten T-Wert. Dieser entspricht der Standardabweichung (SD) von einem mittleren Normwert der Knochendichte eines Kollektivs von jungen gesunden Erwachsenen [20]. Laut WHO-Definition liegt bei einem T-Wert von ≥ -1 ein Normalwert vor, zwischen -1 und $-2,5$ eine Osteopenie und ab $\leq -2,5$ spricht man von Osteoporose. Bei einem T-Wert von $\leq -2,5$ mit dem Vorliegen von mehreren Frakturen nach inadäquatem Trauma werden die Termini schwere oder auch manifeste Osteoporose angewendet [14, 19]. Bei Patienten unter 19 Jahren, bei denen die maximale Knochenmasse noch nicht erreicht ist, wird der alters- und geschlechtsbezogene sogenannte Z-Wert verwendet, der ab ≥ -1 einen Normalwert widerspiegelt [22]. Weitere Möglichkeiten der Bildgebung sind die quantitative Computertomografie (qCT) sowie die quantitative Sonografie und andere moderne hochauflösende CT- und MRT-Verfahren [19, 23].

Die Osteoporose des Kindes- und Jugendalters wurde erst in den letzten Jahren mit zunehmendem physiologischem Verständnis über den Knochenstoffwechsel in den Forschungsfokus gerückt. Dies lässt sich eventuell zusätzlich auf die statistisch generell erhöhte Frakturhäufigkeit im Kindesalter zurückführen [24]. Im Alter von 16 Jahren hat fast die Hälfte aller Jungen und ein Drittel aller Mädchen bereits eine Fraktur erlitten. Allerdings gibt es spezielle Frakturen, die bei Kindern sehr selten vorkommen, darunter Hüft- und Wirbelkörperfrakturen, ebenso Frakturen nach minimalen Traumata. Diese Frakturarten sollten stets an eine Osteoporose des Kindesalters oder Kindesmisshandlung denken lassen [24, 25].

Die Grundlage für ein starkes Skelett bildet sich schon während der skelettalen Entwicklung in der Kindheit. Spätestens mit dem Eintritt in das junge Erwachsenenalter ist die maximale

Knochenmasse, auch als *peak bone mass* bezeichnet, erreicht [26]. Sie unterliegt starken äußeren und inneren Einflussfaktoren. Durch eine entsprechende erbliche Veranlagung, kalziumarme Ernährung und mangelnde Bewegung kann beispielsweise weniger Knochenmasse aufgebaut werden. Dementsprechend haben diese Kinder für ihr gesamtes späteres Leben ein höheres Risiko an Osteoporose zu erkranken, da ein geringerer Knochenmasseverlust ausreicht, um einen kritischen Schwellenwert zu unterschreiten [24].

Alles deutet auf eine multifaktorielle Genese der Osteoporose hin, die durch zahlreiche Umweltfaktoren, die persönliche Lebensweise und den Hormonstatus beeinflusst wird. Zusätzlich ist mittlerweile bekannt, dass etwa 70-85 % der Knochenmineraldichte der Wirbelsäule und der Hüfte genetisch determiniert sind [27]. In zahlreichen Zwillings- und Familienuntersuchungen, Genom-weiten Assoziationsstudien und Mutter-Tochter-Studien wurde der genetische Einfluss bei der Osteoporose-Entstehung nachgewiesen. Dabei wurden zahlreiche Polymorphismen in Genen mit entscheidender Rolle bei der Entstehung der Osteoporose detektiert. Diese Studien legen nahe, dass es sich in den meisten Fällen um eine polygenetische Erkrankung handelt [28, 29]. Nur in den seltensten Fällen liegen monogenetische Erkrankungen, wie Osteogenesis imperfecta, Ehlers-Danlos- oder Bruck-Syndrom, vor, die sich in der Regel klinisch früher und stärker manifestieren. [30].

1.4. Osteogenesis imperfecta

Osteogenesis imperfecta (OI), im Volksmund auch „Glasknochenkrankheit“ genannt, bezeichnet eine Gruppe von erblichen Erkrankungen des Bindegewebes, die vorwiegend durch eine erhöhte Knochenbrüchigkeit, Deformierung der Knochen, Kleinwuchs und in den meisten Fällen eine geringe Knochenmasse charakterisiert sind [31]. Die Diagnose wird vor allem klinisch gestellt unter Einbeziehung radiologischer und ggf. histologischer Auffälligkeiten, der Familienanamnese, der genetischen Grundlage und dem eventuellen Vorliegen von typischen extraskelettalen Manifestationen. Dazu zählen u.a. eine blaue Verfärbung der Skleren, eine Hypermobilität von Haut, Bändern und Gelenken, ein Hörverlust, und eine Dentinogenesis imperfecta (DI). Die DI ist gekennzeichnet durch eine abnormale Dentinstruktur mit der Folge einer Zahnbildungsstörung, opaleszierenden Verfärbungen und starken Abrasionen der Zähne [32-34]. Generell ist das Krankheitsbild der Osteogenesis imperfecta sehr vielfältig hinsichtlich des Beginns, der Schwere und der Ausprägung spezieller klinischer Merkmale. Es reicht von sehr milden Verlaufsformen mit gelegentlich auftretenden Frakturen, normaler Körpergröße und sehr später Erstmanifestation, bis hin zu sehr schweren Formen, die sich durch zahlreiche Frakturen, deutlichen Kleinwuchs, einen sehr frühen Krankheitsbeginn oder sogar perinatale Letalität auszeichnen [35]. Selbst innerhalb einer Familie gibt es große individuelle Unterschiede zwischen der Merkmalsausprägung bei einzelnen Trägern einer als ursächlich detektierten Mutation [36].

1.4.1. Klinische Einteilung der Osteogenesis imperfecta

Nach der lange Zeit gängigen Sillence-Klassifikation von 1979 wurden die Patienten anhand ihrer klinischen Auffälligkeiten und des Schweregrades der Erkrankung in vier Gruppen (OI Typ I-IV) unterteilt [32, 37]. Sie wurde vier Jahre vor der Entdeckung einer genetischen Ursache der Erkrankung eingeführt [38]. Die rasante Entdeckung zahlreicher neuer OI-Gene in den letzten Jahren hat dazu geführt, dass diese Klassifikation mehrfach revidiert und angepasst werden musste, zuletzt 2014 von Van Dijk und Sillence [39]. Sie enthält nun folgende fünf klinische OI-Typen, denen die jeweiligen Genveränderungen zugeordnet werden (Tabelle 1). Zusätzlich wurde eine Reihe von Syndromen mit überlappenden Phänotypen, wie das Bruck-Syndrom, Cole-Carpenter-Syndrom und die primäre Osteoporose, ergänzt.

Tabelle 1: Einteilung der verschiedenen OI-Typen nach Van Dijk und Sillence 2014 [40]

OI-Typ	Gen	Protein	Erbgang	Klinische Merkmale
I	<i>COL1A1/ COL1A2</i>	$\alpha 1(I)/\alpha 2(I)$ -Kollagen	AD	Milder Verlauf, Gesteigerte Knochenbrüchigkeit, blaue Skleren, selten Deformitäten der langen Röhrenknochen, Körpergröße häufig normal oder nur leicht verringert, Schwerhörigkeit beginnend in der Jugend/ im jungen Erwachsenenalter, DI möglich
II	<i>COL1A1/ COL1A2</i> <i>CRTAP</i> <i>LEPRE1</i> <i>PPIB</i>	$\alpha 1(I)/\alpha 2(I)$ -Kollagen CRTAP P3H1 CyPB	AD AR AR AR	Sehr schwere Form, schon intrauterine Frakturen der Rippen und Extremitäten und Verbiegungen des Skeletts, verbreiterte und verkürzte Knochen, häufig schon im Mutterleib letal oder in den ersten Lebenswochen, verminderte Verknöcherung der Schädelknochen, häufig dunkle Skleren
III	<i>COL1A1/ COL1A2</i> <i>BMP1</i> <i>CRTAP</i> <i>FKBP10</i> <i>LEPRE1</i> <i>PLOD2</i> <i>PPIB</i> <i>SERPINF1</i> <i>SERPINH1</i> <i>TMEM38B</i> <i>WNT1</i> <i>CREB3L1</i>	$\alpha 1(I)/\alpha 2(I)$ -Kollagen BMP1/mTLD CRTAP FKBP65 P3H1 LH2 CyPB PEDF HSP47 TRIC-B WNT1 OASIS	AD AR AR AR AR AR AR AR AR AR AR AR	Frakturen häufig schon im Säuglings- und Kindesalter, progressiv deformierende Form von Wirbelsäule und Extremitäten, Kyphoskoliose, deutlicher Kleinwuchs, häufig dreieckige Gesichtsform, eventuell blaue Skleren in der Kindheit, DI möglich, „Popkom“-artige metaphysäre Veränderungen bei einigen Kindern, dünne Rippen, evtl. Wormsche Knochenveränderungen der Schädelkalotte, aufgrund von Fortschritten in der medizinischen Versorgung Überleben bis in das Erwachsenenalter möglich
IV	<i>COL1A1/ COL1A2</i> <i>WNT1</i> <i>CRTAP</i> <i>PPIB</i> <i>SP7/OSX</i> <i>PLS3</i>	$\alpha 1(I)/\alpha 2(I)$ -Kollagen WNT1 CRTAP CyPB SP7/OSTERIX Plastin 3	AD AD AR AR AR X	Wiederkehrende Frakturen, Osteoporose, mittlere bis schwere Deformitäten der langen Röhrenknochen und der Wirbelsäule, normale Skleren
V	<i>IFITM5</i>	BRIL	AD	Milder bis schwerer Phänotyp, mineralisierte interossäre Membranen, hyperplastischen Kallus, Dislokation des Radiusköpfchen möglich, moderate Deformitäten, weiße Skleren

AD = autosomal-dominant, AR = autosomal-rezessiv, X = X-chromosomal

1.4.2. Molekulargenetische Pathogenese der Osteogenesis imperfecta

Mit einem Auftreten von 1 pro 15000-20000 Geburten zählt OI zu den seltenen Erkrankungen, wobei in ca. 85-90 % ein autosomal-dominanter Erbgang mit Mutationen in den Genen *COL1A1* und *COL1A2*, die für Kollagen I kodieren, zugrunde liegt [31, 40]. Die selteneren autosomal-rezessiven und X-chromosomalen Formen sind erst in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Aufmerksamkeit gerückt und beruhen vorwiegend auf Defekten in Genen, deren Proteinprodukte auf verschiedenste Weise an der Bildung der Kollagenfasern der extrazellulären Matrix des Knochen beteiligt sind [31, 38]. Bisher sind mehr als 17 verschiedene ursächliche Gene für das Krankheitsbild und mit ihm überlappende Syndrome bekannt [39]. Für den Pathomechanismus der Erkrankung und sich daraus entwickelnde Therapieoptionen ist ein Verständnis über die biochemischen Vorgänge des Knochenstoffwechsels und der Kollagenbiosynthese unabdingbar.

1.4.3. Grundlagen der Kollagensynthese und Fibrillenbildung

Das dominierende Protein in unseren Knochen, Kollagen Typ I, macht in etwa ein Viertel des gesamten menschlichen Proteingehalts im Körper aus. Es kommt nicht nur in Knochen, sondern auch in Sehnen, Ligamenten, Zähnen, Haut und Augen vor [41], was die typischen extraskelettalen Manifestationen der OI erklärt. Das Vorläufermolekül Prokollagen I besteht aus zwei pro- α (I)-Ketten und einer pro- α 2(I)-Kette, die durch die Gene *COL1A1* und *COL1A2* kodiert werden. Sie setzen sich aus langen Polypeptidketten mit einer spezifischen sich wiederholenden Triplet-Aminosäuresequenz, Glycin-X-Y, zusammen, wobei X oft die Aminosäure Prolin enthält und Y häufig Hydroxyprolin [41]. Kurze N- und C-Propeptidsequenzdomänen befinden sich an den Enden der jeweiligen Ketten, die am rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert werden und dort und im Golgi-Apparat der Zellen zahlreichen posttranslationalen Modifizierungen unterliegen, wie beispielsweise Vitamin-C-abhängigen Hydroxylierungen oder Glykosylierungen [41, 42]. Anschließend winden sich je drei Ketten ausgehend vom C-terminalen Ende umeinander und bilden eine rechtsgewundene Dreifachhelix, auch Prokollagen-Triple-Helix bezeichnet. Diese wird anschließend in den extrazellulären Raum sekretiert, wo es zu einer Abspaltung der terminalen N- und C-Propeptide durch die Enzyme Aminopropeptidase und Carboxypropeptidase und somit zur Bildung vom Tropokollagen kommt. Durch dessen um ca. 67 nm versetzt parallele Anordnung bildet sich die typische fibrillenartige Struktur des Kollagen I aus [43]. Für das korrekte Assembling der Kollagenmoleküle ist die charakteristische Verteilung der miteinander wechselwirkenden hydrophoben und polar geladenen Aminosäuren essentiell. In einem letzten Schritt werden die Kollagenfibrillen zur Stabilisierung miteinander quervernetzt [43]. Eine Übersicht der weiter unten aufgeführten Gene und deren Beteiligung an diesem Prozess zeigt Abbildung 1.

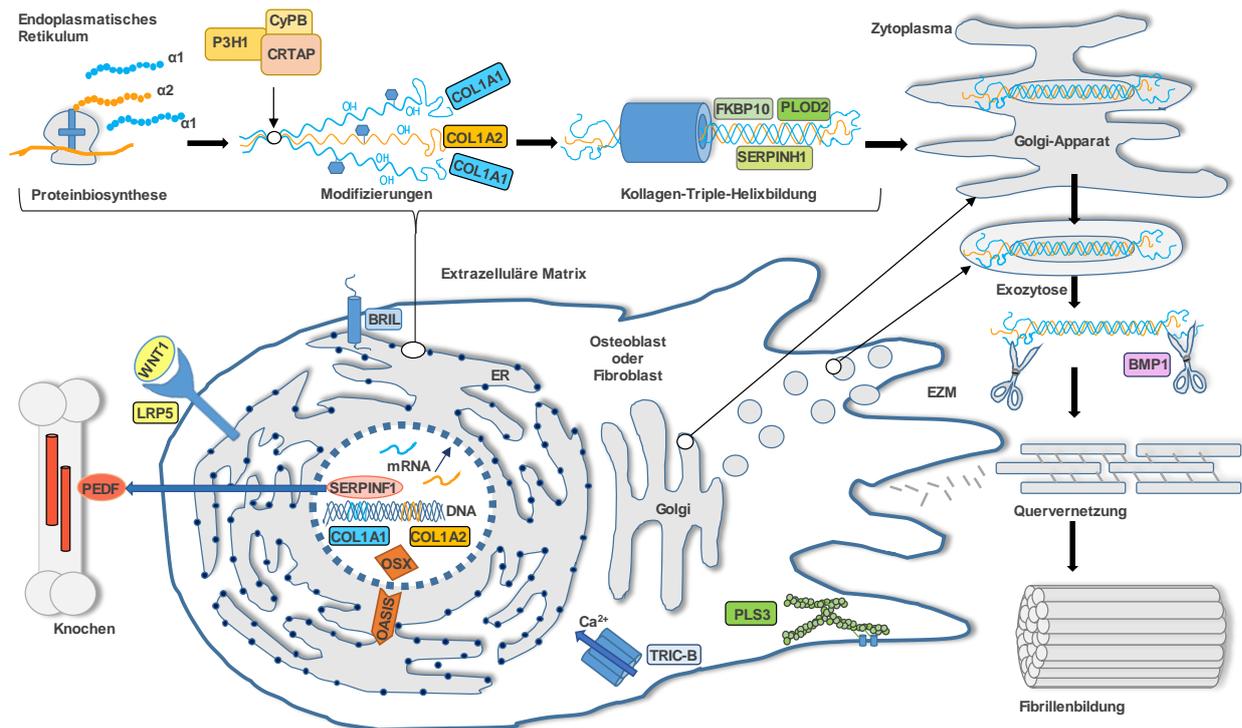


Abbildung 1: Osteoblast mit bisher bekannten Genen für Osteogenese imperfecta und deren Funktion bei der Kollagensynthese und im Knochenstoffwechsel. Modifiziert nach Van Dijk et al. 2014 [39] und Marini et al. 2014 [31]

1.4.4. Autosomal-dominant vererbte OI

Generell lassen sich die häufigsten ursächlichen Defekte für die OI, welche die auf den Chromosomen 7 und 17 liegenden Gene *COL1A1* und *COL1A2* betreffen, in zwei grundlegende Gruppen einteilen: quantitative und qualitative Kollagen-I-Defekte.

Bei den quantitativen Defekten, beispielsweise durch eine heterozygote Stoppmutation (Nonsense-Mutation) oder Leserasterverschiebung (Frameshift-Mutation) verursacht, kommt es durch einen vorzeitigen Abbruch der Polypeptidkette oder durch die Bildung eines instabilen Genprodukts zu einer Halbierung der Kollagenmenge. Kollagen wird ausschließlich durch das verbleibende normale Allel gebildet und ist qualitativ normal. Da das zweite Allel den Funktionsverlust des mutierten Gens dennoch nicht gänzlich kompensieren kann (Haploinsuffizienz), kommt es zu dem am häufigsten vorkommenden Phänotyp der OI mit relativ milder Ausprägung, der dem OI-Typ I zugeordnet werden kann [41, 44]. Homozygote Nullmutationen im *COL1A2* führen dagegen nicht zu einer Osteogenese imperfecta, sondern zu dem Krankheitsbild des Ehlers-Danlos-Syndroms mit deutlicher Hypermobilität der Gelenke und kardialer Beteiligung [42].

Qualitative Defekte umfassen Gen-Veränderungen, welche die Kollagenstruktur betreffen und können ursächlich für die OI-Typen II bis IV sein. Die qualitativen Defekte sind in über 80 % der

Fälle durch Einzelbasenaustausche verursacht, die als sogenannte Missense-Mutationen zu einer Änderung der Aminosäure Glycin in eine andere Aminosäure führen. Dies kann sich bei der Helixfaltung und Modifizierung der $\alpha 1(I)$ oder $\alpha 2(I)$ -Ketten problematisch auswirken [45]. Je nach Lokalisation im späteren Protein und den chemischen Eigenschaften der ausgetauschten Aminosäure kommt es zu einem unterschiedlich stark ausgeprägten Phänotyp der OI. Dieses Spektrum reicht von relativ mild bis letal. Dabei können einige Missense-Mutationen im *COL1A1* und *COL1A2*-Gen ebenfalls das Krankheitsbild eines Ehlers-Danlos-Syndroms hervorrufen [42]. Am zweithäufigsten kommen Mutationen, die den Spleiß-Vorgang betreffen (Splice-Site-Mutationen), im Kollagen I vor. Nach Transkription der DNA im Zellkern unterliegt die entstandene prä-mRNA, die noch Exons und Introns enthält, einer Reihe von Modifikationen, auch RNA-Prozessierung genannt, bevor es zur Translation der mRNA am Ribosom und dem Entstehen der Polypeptidkette kommt. Teil dieser RNA-Prozessierung ist das alternative Spleißen, bei dem es zur Entfernung der nicht-proteinkodierenden Introns der prä-mRNA durch das Spliceosom, einen großen RNA-Protein-Komplex, kommt. Dabei werden die intronischen Sequenzen am 5'-Ende, auch Spleiß-Donorstelle bezeichnet, und am 3'-Ende (Spleiß-Akzeptorstelle) abgeschnitten und verbleibende Exons werden an ihren Enden miteinander verknüpft. An der Bildung des Spliceosoms und dem Spleiß-Vorgang sind viele Proteine und Faktoren beteiligt. Diese binden u.a. an spezifische regulatorische Regionen, wie aktivierende Spleiß-Enhancer-Sequenzen (*exonic splicing enhancer* - ESE) oder hemmende Spleiß-Silencer-Sequenzen (*exonic splicing silencer* - ESS) [46, 47]. Dortige Mutationen können z.B. zu einem Überspringen von Exons (*Exon-Skipping*), dem Beibehalten von Introns (*Intron-Retention*) oder verschiedenen veränderten transkribierten Bereichen führen. Da viele Splice-Site-Mutationen zu einer Frameshift-Mutation führen und in unterschiedlichem Ausmaß auch noch das normale Splice-Produkt entstehen kann, haben betroffene Patienten häufig einen mildereren Phänotyp.

Bei den Patienten mit OI-Typ V fanden sich autosomal-dominant wirkende Mutationen im *IFITM5*-Gen (*interferon-induced transmembran protein 5*), welches für das Protein BRIL (*bone-restricted ifitm-like protein*) kodiert, ein Transmembranprotein, das vorwiegend in der frühen Mineralisationsphase des Knochens exprimiert wird [42]. Bisher sind zwei pathogene Mutationen, c.-14C>T und c.119C>T, im *IFITM5*-Gen in der OI-Datenbank beschrieben [48]. Das Gen scheint bei der Knochenmineralisierung und Osteoblastenentwicklung eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Patienten weisen spezielle histologische, radiologische und klinische Auffälligkeiten auf: Fast immer zeigen sie eine Ossifikation der interossären Membran mit resultierender Ellenbogendeformität und häufig eine hyperelastische Kallusbildung. Es sind in der Literatur Patienten mit Mutationen im *IFITM5*-Gen mit milder bis schwerer OI beschrieben [49].

1.4.5. Autosomal-rezessive Formen der OI

Homozygote Mutationen im Gen *SERPINF1* (*serpin peptidas inhibitor clade F*), welches für den starken Inhibitor der Angiogenese PEDF (*pigment epithelium-derived factor*) kodiert, wurden bei einigen OI-Patienten beschrieben. PEDF weist eine hohe Affinität zum Kollagen der extrazellulären Matrix auf [50]. Allerdings ist der genaue molekulare Pathomechanismus, wie eine Abwesenheit von PEDF zu OI führt, noch weitgehend unklar. Aktuelle Daten suggerieren, dass PEDF die Osteoblastendifferenzierung und eine Reihe von Matrixproteinen beeinflusst und somit vorwiegend in der frühen Matrixmineralisation des Knochens eine entscheidende Rolle spielt [51]. Die exogene Supplementation von PEDF zu kultivierten Osteoblasten führte zu einer gesteigerten Mineralisation und zu einer Unterdrückung der von Osteozyten gebildeten Proteine, die hemmend auf die Mineralisation wirken [52]. Patienten mit Mutationen im Gen *SERPINF1* zeigten in der Knochenhistologie neben Bereichen mit hoch mineralisierter Matrix breite Banden von unmineralisiertem Osteoid, einen Verlust der normalen Orientierung der Knochenlamellen, was als fischartige (engl. *fish scale*) Lamellen bezeichnet wird. Klinisch zeigten sich meistens keine Frakturen zur Geburt, später dann aber gehäuft auftretende Frakturen, eine fortschreitende Verbiegung der Knochen, Wirbelkörperfrakturen, Skoliose und eine moderate bis schwere Wachstumsbeeinträchtigung [51].

Autosomal-rezessive Mutationen in den Genen *CRTAP*, *LEPRE1* und *PPIB* scheinen durch Defekte bei der posttranslationalen Modifizierung von Kollagen I, speziell beim 3-Hydroxylaseprozess, Osteogenesis imperfecta zu verursachen [31]. Die Proteine *CRTAP* (*cartilage-associated protein*), *P3H1* (*prolyl 3-hydroxylase 1*) und *CyPB* (*cyclophilin B*) lagern sich im endoplasmatischen Retikulum der Zelle zu einem Prolyl-3-Hydroxylationskomplex zusammen (siehe Abbildung 1). Dieser Komplex modifiziert die Prolin-Reste Pro986 an der $\alpha 1(I)$ -Kette und Pro707 an der $\alpha 2(I)$ -Kette der noch ungefalteten Kollagenketten [31]. Diese Modifizierung erleichtert physiologisch die spätere Faltung und Stabilisierung der Kollagen-Helix. Ein Defekt dieses Modifikationsprozesses führt zu einer verzögerten Faltung der Kollagen-Helix und einer vermehrten Kollagenmodifizierung durch die nicht betroffenen und damit funktionierenden Proteine Lysyl-Hydroxylase und Prolyl-4-Hydroxylase, was die Helixbildung zusätzlich erheblich verzögert. Patienten mit Mutationen im *CRTAP*-Gen weisen eine schwere bis letale Form der Osteogenesis imperfecta mit Rhizomelie (Verkürzung der proximalen Anteile einer Extremität), neonatalen Frakturen, gebogenen Knochen, Rippenfrakturen, Wachstumsverzögerung und „popkornartigen“ Kalzifikationen der Epiphysen auf. Patienten mit Mutationen im *LEPRE1*-Gen (*proline enriched proteoglycan 1*), das für *P3H1* kodiert, zeigen eine ähnliche klinische Symptomatik [31, 53]. Defekte in dem *CyPB*-kodierenden Gen *PPIB* (*peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*) führen im Gegensatz zu den Mutationen im *LEPRE1*- und *CRTAP*-Gen nur zu einer moderaten OI ohne Rhizomelie mit normaler Kollagenmodifikation [54]. Dessen Peptidyl-Prolyl-

cis-trans-Isomerase-Aktivität scheint als geschwindigkeitsbestimmender Schritt bei der Einleitung der Kollagenfaltung zu fungieren, obwohl es Teil des Hydroxylasekomplexes ist [54, 55].

Die Gene *SERPINH1* und *FKBP10*, bzw. deren Proteine HSP47 und FKBP65, spielen eine wichtige Rolle bei der Bildung der Kollagen-Triple-Helix und deren Transport in den Golgi-Apparat. Als sogenannte Chaperone, das sind katalytisch wirkenden Proteine, unterstützen sie die korrekte Faltung von Proteinen, indem sie beispielsweise die Ausbildung von Aggregaten verhindern oder fehlgefaltete Proteine wieder entfalten [31, 56]. Bisher sind zwei Mutationen im *SERPINH1*-Gen in der Literatur beschrieben, eine davon in einem menschlichen Fall mit schwerer OI mit Deformitäten [56]. Mutationen in *FKBP10* können zu zwei verschiedenen Phänotypen führen: zu moderater bis schwerer OI oder zum Bruck-Syndrom (OI mit kongenitalen Kontrakturen). Für das Bruck-Syndrom Typ 1 sind weiterhin ursächliche Mutationen im *PLOD2*-Gen bekannt, ein für eine Lysyl-2-Hydroxylase kodierendes Gen [31, 56].

Patienten mit homozygoten oder compound-heterozygoten Mutationen im Gen *BMP1*, welches für das *metalloproteases bone morphogenetic protein-1* (*BMP1*) und seine längere Isoform *mammalian Tolloid* (mTLD) kodiert, zeigten Störungen bei der Prozessierung von Kollagenen. Die stark konservierte Metalloprotease ist an der Organisation und Bildung der extrazellulären Matrix beteiligt [57]. Bei den Betroffenen sind multiple Frakturen, Kleinwuchs und Deformitäten der Extremitäten beschrieben. Sie zeigten eine verringerte Abspaltung der C-Propeptide des Kollagen I und eine anormale Organisation der Kollagenfibrillen in der EZM. Eine reduzierte C-Propeptidabspaltung könnte zu einer vermehrten Anlagerung von unreifem Kollagen in die Kollagen-I-Fibrillen führen. Die daraus folgende Funktionseinschränkung der Kollagen-Fibrillen könnte den entsprechenden Phänotyp verursachen [57, 58].

Es wurden einige Fälle autosomal-rezessiver Osteogenesis imperfecta oder frühzeitiger Osteoporose, auch early-onset Osteoporosis genannt, mit Mutationen im *WNT1*-Gen beschrieben [59]. Bereits seit einigen Jahren ist bekannt, dass die Wnt-Proteine und die damit verbundene WNT- β -Catenin-Signalkette für eine normale Skelettentwicklung und Knochenhomöostase essenziell sind, da sie mit dem *LRP5*-Rezeptor interagieren und die Knochenformation aktivieren [60]. In Abwesenheit von *WNT1* ist die Menge an intrazellulärem β -Catenin gering, da dieses durch einen „Vernichtungskomplex“ aus einigen Proteinen phosphoryliert und anschließend ubiquitiniert wird, was letztendlich zu einem proteasomalen Abbau führt. Wenn es zu einer Bindung vom WNT-Ligand an einen dualen Rezeptorkomplex mit frizzled (FZD) und entweder *LRP5* oder *LRP6* kommt, resultiert das in einer Inaktivierung des β -Catenin-Vernichtungskomplexes, so dass dieses im Zytoplasma nicht abgebaut wird und akkumuliert. Es gelangt in den Zellkern, wo es die Transkription eines der beiden am

Knochenstoffwechsel beteiligten Gene ansteuert, und dort vorwiegend aktivierende Funktionen initiiert. Damit beeinflusst die WNT- β -Catenin-Signalkette die gesamte skelettale Entwicklung von der Schädelbildung bis zu den Extremitäten. Demzufolge können Mutationen in beteiligten Interaktionspartnern zu skelettalen Malformationen führen. Eine Aktivierung der WNT- β -Catenin-Signalkette führt durch eine vermehrte Knochenformation im Vergleich zu der Knochenresorption zu einer erhöhten Knochenmasse. Eine Beeinträchtigung der WNT- β -Catenin-Signalkette induziert hingegen eine verringerte Knochenmasse, da die Knochenresorption dominiert. Beispielsweise können Mutationen in dem Korezeptor vom WNT1-Liganden, LRP5 (*low-density lipoprotein-related protein 5*), zu Krankheiten mit erhöhter Knochenmasse, wie Osteopetrose, Hyperostose oder Van-Buchem-Krankheit führen. Gleichzeitig sind Fälle bekannt, in denen LRP5-Mutationen eine Osteoporose verursachen [61].

Seit 2012 reiht sich *TMEM38B* in die Liste neuer potentiell krankheitsverursachender Gene, sogenannte Kandidatengene, für die rezessive Form der OI ein. Das Gen kodiert für einen intrazellulären Kationen-Kalzium-Kanal (TRIC-B) und soll an der Zelldifferenzierung beteiligt sein [62]. Es ist weitreichend bekannt, dass eine optimale Kalziumkonzentration für die Proliferation, Differenzierung und zelluläre Funktion von vielen Zelltypen notwendig ist. TRIC-B wird in vielen Zellen exprimiert. Im Mausmodell zeigte sich eine neonatale Letalität und alveoläre Hypoplasie, jedoch hatten die Mäuse keine OI-ähnlichen Symptome [62, 63]. Die OI-Patienten, bei denen bisher Mutationen im *TMEM38*-Gen gefunden wurden, hatten hingegen eine sehr stark variierende Frakturrate, die sich nach der Pubertät deutlich verbesserte [64].

In den letzten Jahren fanden sich zahlreiche ursächliche Gene für autosomal-rezessive OI, die scheinbar über einen Einfluss auf die Osteoblastendifferenzierung zu dem entsprechenden Phänotyp führen [31]. Zu dieser Gruppe zählt das Gen *SP7/OSTERIX* (*OSX*) ein Zinkfingertranskriptionsfaktor, dessen Abwesenheit im Mausmodell zu einer reduzierten Osteoblastendifferenzierung und Knochendeformitäten führte [65]. Es scheint zudem bei der Expression vieler Gene involviert zu sein, die an der Knochenformation und der BRIL-Regulation beteiligt sind [66].

Das kürzlich in einer Familie mit schwerer OI entdeckte Gen *CREB3L1*, was für *OASIS* (*old astrocyte specifically induced substance*) kodiert, scheint an der Stressverarbeitung im endoplasmatischen Retikulum beteiligt zu sein. Zusätzlich ist eine regulierende Funktion auf Gene, die für die Entwicklung, Differenzierung und Reifung verantwortlich sind, beschrieben. *CREB3L1*-knock-out Mäuse zeigten eine schwere Osteopenie und spontane Frakturen. Weiterhin ist eine Aktivierung der Transkription von *COL1A1* durch *OASIS* beschrieben [31, 67].

Bei zwei nicht verwandten Mädchen mit klinisch diagnostizierter OI-Typ IV fanden sich zwei verschiedene homozygote Mutationen im Gen *SPARC* (*Secreted protein, acidic, cysteine-rich*). *SPARC* ist ein Glykoprotein, welches an Kollagen I und andere extrazelluläre Matrixproteine bindet. Bei Untersuchungen der Hautfibroblasten der beiden betroffenen Patientinnen zeigte sich eine milde Verzögerung der Kollagen-Typ-I-Sekretion [68].

Zusätzlich wurden noch weitere Gene in die Osteogenesis imperfecta Datenbank (<https://oi.gene.le.ac.uk>) aufgenommen, die bei Patienten mit überlappendem Phänotyp gefunden wurden. Darunter fallen Mutation im *P4HB* und *SEC24D*-Gen, die bei Patienten mit dem klinischen Bild des Cole-Carpenter-Syndroms gefunden wurden. Dieses Syndrom zeichnet sich durch erhöhte Knochenbrüchigkeit, Kraniosynostose, vorstehende Augen (okuläre Proptose), Hydrozephalus und charakteristische faziale Anomalien aus [69, 70].

1.5. X-chromosomal vererbte OI und juvenile Osteoporose durch *PLS3*-Mutationen

Bei Kindern und Jugendlichen ist die diagnostische Zuordnung bei mildereren Formen der Osteogenesis imperfecta mit fehlender extraskelettalen Manifestationen oft nicht einfach von der idiopathischen juvenilen Osteoporose abzugrenzen [71-73]. Seit 2013 rückt in diesem Zusammenhang zunehmend ein weiteres Gen, Plastin 3 (*PLS3*), in den Fokus mit erhöhter Knochenfragilität einherzugehen. In dem auf dem X-Chromosom lokalisierten Gen wurden Mutationen bei Patienten mit klinisch milder OI und negativen Screening auf *COL1A1/2*-Mutationen detektiert [74]. Einige betroffene hemizygoten Männer mit Mutationen im *PLS3*-Gen zeigten eine signifikant erhöhte Knochenbrüchigkeit mit einer schlechteren Mineralisierung der Metaphysen der langen Röhrenknochen bei jedoch normaler Knochenlamellierung. Bei einigen traten milde Wirbelkompressionsfrakturen und Frakturen der langen Röhrenknochen auf, während das Längenwachstum vorwiegend unauffällig erschien [72, 75]. Heterozygote Frauen zeigten hingegen einen mildereren Phänotyp oder waren klinisch vollkommen unauffällig, was sich durch die mögliche Kompensation des Funktionsverlustes durch das nicht betroffene Plastin 3 auf dem zweiten X-Chromosom bei weiblichen Individuen erklären lässt [72, 74].

In-Vivo-Untersuchungen bei Zebrafischen, bei denen das *PLS3*-Gen ausgeschaltet wurde (knockdown), zeigten eine skelettale Beteiligung. Die Zebrafische entwickelten mittlere bis schwere Malformationen der kraniofazialen Knochenstruktur, der Körperachse, der Schwanzflosse und des Muskelgewebes. Durch die Gabe von menschlicher *PLS3*-mRNA war diese Entwicklung dosisabhängig teilweise reversibel [74].

Durch alternatives Splicing sind vom *PLS3*-Gen aktuell 10 verschiedene Transkripte bekannt, wobei das hauptsächlich im menschlichen Organismus vorkommende Transkript für 630 Aminosäuren kodiert und 16 Exons enthält (<http://www.ensembl.org>).

Bereits gefundene Mutationen im *PLS3*-Gen, die als krankheitsursächlich eingeschätzt werden, sind vorwiegend in für die Funktion des Proteins essenziellen Bereichen lokalisiert. Dazu zählen zwei N-terminalen Kalzium-EF-Hand-Bindungsdomänen, Helix-Loop-Helix-Motive mit geladenen Aminosäuren zur Calciumbindung und jeweils vier Aktinbindungs- oder Calponin-Homologie-Domänen (siehe Abbildung 2) [75].

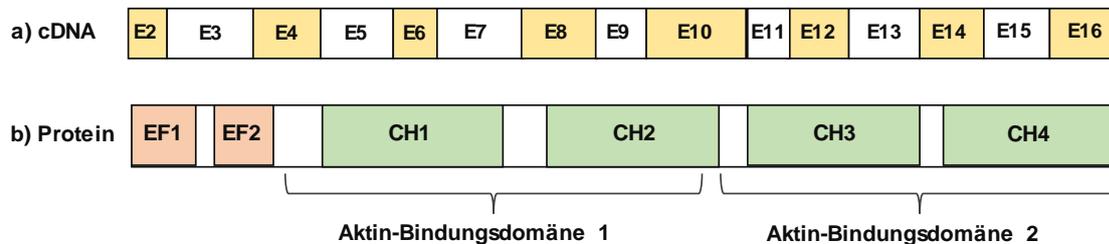


Abbildung 2: a) kodierenden Exons des *PLS3*-Gens und b) entsprechende Domänen auf Proteinebene (E = Exon; EF = Kalzium-EF-Hand-Bindungsdomäne, CH = Calponin-Homologie-Domäne)

Generell gehören Plastine zur Gruppe der Aktinbindungsproteine und scheinen am dynamischen Auf- und Abbau des dreidimensionalen Zytoskelettes durch die Bildung und Anordnung von Aktinfilamenten beteiligt zu sein. Damit spielen sie eine wichtige Rolle für die Zellfunktion und Zell-Zell-Kommunikation. Im Menschen wurden zwei ubiquitäre Plastin-Isoformen, L- und T-Plastin, entdeckt. Während die L-Isoform in hämatopoetischen Zelllinien vorkommt, wird T-Plastin in fast allen anderen Zellen des festen Bindegewebes wie Fibroblasten, Endothelzellen, aber auch in den Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten des Knochens exprimiert [72, 76-79]. Wie *PLS3* genau in den Knochenstoffwechsel eingreift, ist noch unklar und Gegenstand aktueller Forschungen. Da die Aktinfilamente in den osteozytären Dendriten von wesentlicher Bedeutung für die Informationsübermittlung mechanischer Belastung sind, wird vermutet, dass es bei einer fehlerhaften Funktion dieses Netzwerks zu einer verminderten Mechanosensitivität mit anschließender Dysregulation im Knochenstoffwechsel kommt [74, 80]. Auch knochenhistomorphologische Untersuchungen, die u.a. Hinweise auf nur spärlich ausgeprägte Osteoidsäume mit einer geringeren Gesamtmenge an Osteoid zeigten, bestärken die Annahme, dass *PLS3* bei der Knochenformation eine nicht vollständig erklärte Funktion einnimmt [75].

Bisher wurde nur eine sehr geringe Anzahl an wahrscheinlich pathogenen Mutationen im *PLS3*-Gen detektiert. In vielen Diagnostik-Panels ist es erst seit geraumer Zeit enthalten. Das und der noch weitgehend ungeklärte Pathomechanismus verdeutlichen die Notwendigkeit des weiteren Forschungsbedarfes.

1.6. Next-Generation Sequencing

Die vollständige Sequenzierung des ersten menschlichen Genoms nach etwa 15 Jahren internationaler Forschungsarbeit und mit Investitionen von ca. 3 Billionen Dollar im humanen Genomprojekt von 2001 wird als eine der bedeutendsten Errungenschaften in der modernen Wissenschaft bezeichnet [81]. Erst 48 Jahre zuvor, 1953, entschlüsselten James Watson und Francis Crick die spezifische Doppelhelixstruktur der DNA als biologischen Informationsträger der Erbinformation. Lange Zeit war die 1978 entdeckte Didesoxy-Methode nach Sanger das Standardverfahren zum Sichtbarmachen der Abfolge der vier enthaltenen Nukleotidbasen [82]. Trotz der hohen Genauigkeit und stetigen Verbesserungen dieser Sequenzierungsmethode der ersten Generation, durch Fluoreszenzfarbstoffe oder die Verwendung halbautomatisierter Kapillarsequenziergeräte, bleibt das Verfahren, mit dem nur vorher definierte Sequenzen von bis zu 1000 Basenpaaren sequenziert werden können, gerade bei langen Sequenzen, multiplen Genen und vielen Exons mühsam, enorm zeitaufwendig und störanfällig durch die zahlreichen manuellen Labortätigkeitsschritte [83]. Dennoch war erst mithilfe der Sanger-Methode und der Shotgun-Klonierung in bakteriellen Vektoren das Erstellen der ersten menschlichen Karte eines gesamten menschlichen Genoms möglich. Mit der Fertigstellung dieses menschlichen Referenzgenoms war der Grundstein für die Entwicklung der Sequenzierungsmethoden der nächsten Generation – *engl. Next-Generation Sequencing (NGS)* – gelegt, die in den letzten Jahren bei der Suche nach Krankheitsgenen in Forschungsprojekten zahlreiche Anwendung fanden und immer mehr in der molekulargenetischen Diagnostik zum Einsatz kommen [83].

1.6.1. Funktionsweise

Mittlerweile gibt es eine große Anzahl verschiedener auf dem Markt erhältlicher NGS-Plattformen mit unterschiedlichen Vor- und Nachteilen, die sich verschiedener Sequenzierungstechnologien bedienen. Allen gemeinsam ist jedoch das gleichzeitige parallele Ablaufen von Millionen von Sequenzierungsreaktionen [84]. Dabei kann NGS genutzt werden, um völlig unselektiert das ganze menschliche Genom mit seinen 3,2 Billionen Nukleotiden zu sequenzieren (*whole genome sequencing - WGS*). Weiterhin können lediglich alle ca. 23.500 Protein-kodierenden Gene, die etwa 1 % des Genoms ausmachen, auch *whole exome sequencing (WES)* genannt, sequenziert werden [85, 86]. Je nach Fragestellung und Kosten-Nutzen-Bilanzierung ist die alleinige Sequenzierung spezieller Bereiche (*targeted sequencing*) in Form von sogenannten Gen-Panels nützlich, wenn beispielsweise für eine Erkrankung oder einen Phänotyp eine Reihe von Genen in Frage kommen [84]. Für das Anreichern, beispielsweise eines Exoms oder spezieller Gen-Panels, steht von den Herstellern unterschiedliches Zubehör, sogenannte *Kits*, zur Verfügung. Häufig kann die Anreicherung gemeinsam mit der DNA-Bibliothek-Vorbereitung erfolgen.

Bei den Sequenzierungsmethoden der zweiten Generation wird zunächst eine DNA-Bibliothek hergestellt, indem die zu sequenzierende DNA in kleine Fragmente unterschiedlicher Größe zerlegt wird. In einem anschließenden Schritt binden an beide Enden dieser entstandenen Bruchstücke speziell synthetisierte Adaptersequenzen, die an eine feste Matrix gekoppelt werden. Jedes räumlich separiert gebundene DNA-Fragment wird in einem nachfolgenden Schritt mittels Polymerase-Kettenreaktion kloniert, indem spezielle Primer an die Adaptersequenzen binden und es zu einer Kettenverlängerung kommt. Die entstandenen kleinen DNA-Stücke (*engl. Reads*) sind je nach verwendeter NGS-Plattform zwischen 25 und 700 Basenpaare lang [83]. Es kann je nach verwendeter Methode nur ein Strang der untersuchten DNA sequenziert werden, auch als *single-end* bezeichnet oder mittels *paired-end sequencing* die Sequenzierung des gegenläufigen DNA-Stranges erfolgen. Mithilfe von beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffen können die eingebauten Nukleotide oder Oligonukleotide detektiert werden. Anschließend lassen sich die so detektierten Millionen von kleinen DNA-Stücke mittels aufwendiger bioinformatischer Software sortieren und entsprechend des Referenzgenoms anordnen (*engl. mapping und alignment*) [84]. Dabei entstehen je nach verwendeter NGS-Plattform große Datenvolumina, die enorme Rechenleistungen und Speicherkapazitäten erfordern. Idealerweise wird bei dem Verfahren die gesamte zu untersuchende Region sequenziert, was sich als Qualitätsparameter in der Abdeckung (*engl. Coverage*) wiedergespiegelt. Das Qualitätsmerkmal der Tiefe (*engl. Depth*) wird durch die randomisierte Entstehung unterschiedlich großer DNA-Fragmente im oben erläuterten ersten Schritt möglich, da es zu überlappenden *Sequenz-Reads* der gleichen Region gekommen sein sollte, wodurch eine geringere Fehlerrate und beispielsweise das Detektieren heterozygoter Varianten möglich wird [84, 85]. Anschließend kann mittels bioinformatischer Datenanalyse, beispielsweise unter Verwendung von PhenIX oder GeneTalk, nach ursächlichen Varianten gesucht und deren Krankheitspotential eingeschätzt werden (Abbildung 3).

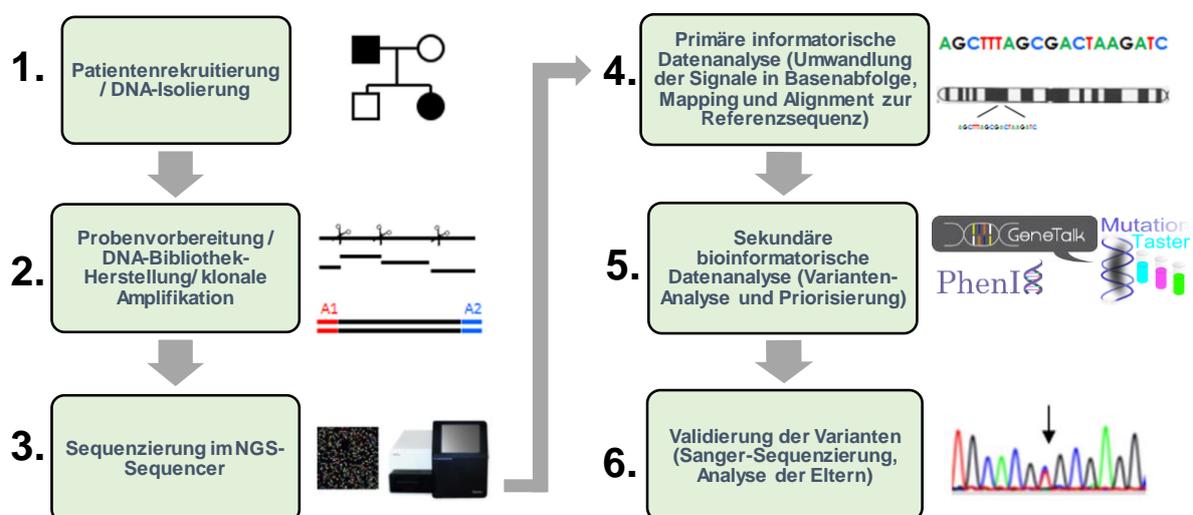


Abbildung 3: Schematischer Ablauf der NGS-Diagnostik von der Patientenrekrutierung (1) bis zur Validierung der detektierten Variante im Labor (6). Modifiziert nach Lohmann et al. 2014 [87]

1.6.2. NSG-Technologien

Die zuerst kommerziell erhältliche NGS-Plattform der *zweiten Generation* war der 454-Pyrosequenzer von Roche, der für die klonale Amplifikation der Probe die Emulsion-PCR verwendet. Dabei binden die DNA-Fragmente in einer Wasser-Öl-Emulsion über Adapter an kleine Kügelchen, sogenannte *Beads*, von wo es zur Amplifikation kommt. Angereicherte *Beads* werden auf eine PicoTiter-Platte übertragen, wo es durch sequentielle Zugabe von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Nukleotiden und anderen Reagenzien zur eigentlichen Sequenzierung durch Strangsynthese mit wiederholten Reinigungsschritten kommt. Bei Einbau des passenden Nukleotids wird Pyrophosphat erzeugt (PPi), was eine Reihe von Reaktionen initiiert, bei denen es zur Freisetzung unterschiedlich intensiver Lichtsignale kommt. Diese werden anschließend mithilfe einer lichtempfindlichen CCD-Kamera aufgezeichnet [83, 88]. Eine große Limitation dieser Technologie besteht darin, dass Homopolymere, lange Abschnitte von Sequenzen einer einzelnen Base (wie z.B. AAAAAA) aufgrund fehlender Termination während eines Zyklus hintereinander eingebaut werden können und die Lichtintensität außerhalb des messbaren Bereichs liegt, was zu einer erhöhten Fehlerrate von Insertionen und Duplikationen führt [88].

Die in dieser Arbeit verwendete NGS-Sequenzierungsmethode von Illumina basiert auf dem *sequencing-by-synthesis-Prinzip*, wobei die DNA-Bibliothek nicht in einer Emulsions-PCR, sondern an einem festen Träger generiert wird. Die fragmentierte Template-DNA wird dazu mittels Adapter an eine FlowCell gebunden, wo es zur Hybridisierung mit den komplementären Primern und einer brückenartigen Amplifikation (*bridge PCR*) kommt. An den entstandenen Einzelstrang-DNA's wird der komplementäre Strang mithilfe von reversiblen farbstoffmarkierten Terminator-Nukleotiden synthetisiert. Nach dem Synthesestopp mit Detektion der Fluoreszenzmarkierung werden die Terminator-Nukleotide in einem Waschschrift entfernt und eine neue Synthese- und Sequenzierungsrunde beginnt mit dem Einbringen des nächsten farbstoffmarkierten Terminator-Nukleotids [88, 89]. Die Limitation dieser Methode besteht vorwiegend in den vergleichsweise geringeren Leseweiten als bei der Roche Pyrosequenzierung, welche durch eine ineffiziente oder erhöhte Bindung beim Nukleotideinbau entsteht. Damit kann es zu Fehlern beim Herauswaschen der Terminations-Nukleotide kommen und zu einer Verlängerung bzw. Phasenverschiebung beim Zerfall des Fluoreszenzmarkers mit der Folge erhöhter Basensubstitutionsfehlerraten. Zudem weist das Verfahren ein Ungleichgewicht bei der Abdeckung AT- und GC-reicher Regionen, mit schlechterer Abdeckung der GC-reichen Regionen, auf [88, 90].

Illumina bietet Modelle der HiSeq-Serie mit einem hohen Durchsatz bei guter Kosteneffizienz und bis zu 600 Gigabyte Datenausgabe an, bei einer sehr langen Laufzeit von 11 Tagen und einer Leselänge von maximal 2x100 bp (HiSeq2000). Obwohl es zusätzlich ein Kurzprogramm gibt, bietet sich der HiSeq folglich eher für WGS, WES, RNA-Sequenzierungen und Methylierungsuntersuchungen an. Die kleinere und schnellere Variante, der MiSeq von Illumina, schafft Leselängen von bis zu 150 bp bei einer Laufzeit von 27 h mit einer Datenausgabe von 1,5 bis 2 Gigabyte und eignet sich vorwiegend für kleine Gen-Panels [83, 91].

Weitere NGS-Methoden der *zweiten Generation* sind u.a. das von Life Technologies™ entwickelte SOLiD™-Verfahren, das durch die klonale Amplifikation mittels Emulsions-PCR an kleinen magnetischen Beads und den Einsatz einer Ligase für den Sequenziervorgang gekennzeichnet ist und neuere von Life Technologies entwickelte Ionen-Halbleiter-Sequenzierungssysteme [83].

Moderne Verfahren der *dritten Generation*, wie beispielsweise die Nanoporen-Sequenzierung, haben den großen Vorteil, dass sie in der Lage sind, ganze DNA-Moleküle zu sequenzieren. Dabei entfällt der Schritt der klonalen DNA-Bruchstück-Amplifikation. Dementsprechend stellen sie möglicherweise aufgrund ihrer Schnelligkeit und weiteren Vorteilen die Methode der personalisierten Medizin der Zukunft dar, wenn sozio-ökonomische Hindernisse überwunden sind [83, 92].

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Bei den meisten OI-Patienten liegen Mutationen in den aus je 52 Exons bestehenden Genen *COL1A1* und *COL1A2* vor [93]. Der aktuelle Standard in der Diagnostik ist deren aufwendige Stufenanalyse mittels Sanger-Sequenzierung, gefolgt von einer anschließenden Deletions- und Duplikationssuche [94]. Diese Vorgehensweise nimmt meistens mehrere Wochen bis Monate Zeit in Anspruch. Bei negativem Testergebnis erfolgt die Untersuchung der zahlreichen weiteren bekannten OI-verursachenden Gene [38]. Es erscheint plausibel, dass sich mit der Einführung der NGS-Technologie ein entscheidender Fortschritt für eine effizientere und umfassendere Suche nach den ursächlichen Genmutation für die Erkrankung OI, aber auch weiterer monogenetisch und polygenetisch vererbter Krankheiten, ergeben hat. Zudem eröffnen sich, neben neuen therapeutischen Ansatzpunkten und einer besseren Beratung betroffener Familien hinsichtlich des Wiederholungsrisikos, bessere Möglichkeiten zur Prognoseabschätzung und Durchführung einer gezielten pränatalen Diagnostik [38]. Wenngleich die Auswertung der NGS-Daten gegenwärtig eine Herausforderung im klinischen Alltag darstellt und die Anschaffungskosten der NGS-Plattformen hoch sind, erscheint es sinnvoll, dass diese Methode in Zukunft routinemäßige Anwendung in der molekulargenetischen Diagnostik finden wird.

Unter diesem Gesichtspunkt wurden 31 indische Patienten mit klinisch gesicherter Osteogenesis imperfecta, davon 3 mit Bruck-Syndrom, mittels NGS (HiSeq1500 der Firma Illumina) sequenziert, um unter Nutzung derzeitig verfügbarer bioinformatischer Software, die ursächlichen Mutationen zu identifizieren. Da gegenwärtig die Datenlage zu indischen OI-Fällen im Vergleich zu einigen europäischen Ländern spärlich und der Anteil an Konsanguinität deutlich höher ist, wurde versucht, eine Analyse des Mutationsspektrums indischer Osteogenesis imperfecta-Fälle vorzunehmen und diese in den Kontext bereits publizierter Daten einzuordnen [95]. Es wurde mithilfe eines entwickelten Scoring-Systems versucht eine klinische Schweregradeinteilung vorzunehmen. Die detektierten Varianten wurden mittels Sanger-Sequenzierung als bisherige Goldstandardmethode validiert. Wenn möglich, wurden zur besseren Interpretation weitere Familienmitglieder sequenziert.

Der zweite Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf dem erstmals 2013 im Zusammenhang mit erniedrigter Knochenmasse beschriebenen *PLS3*-Gen [74]. Bisher wurden nur wenige Patienten mit Mutationen im *PLS3*-Gen beschrieben und es liegen lediglich Hypothesen über dessen pathophysiologischen Eingriff in den Knochenstoffwechsel vor [96]. Bei 37 Patienten mit erniedrigter Knochenmasse bzw. frühzeitiger Osteoporose, bei denen mittels NGS mit dem Bone Mass Panel keine ursächliche Mutation gefunden werden konnte, wurde das noch nicht im verwendeten Panel enthaltene *PLS3*-Gen mit der Sanger-Methode sequenziert. Ziel war es, eventuell krankheitsverursachender Veränderungen im *PLS3*-Gen zu detektieren, die den Phänotyp der erniedrigten Knochenmasse erklären könnten.

2. Methoden und Materialien

2.1. Probenvorbereitung

Für die Bestimmung der DNA-Konzentrationen der Patientenproben wurden diese mit dem Implen NanoPhotometer (TM 7122, V.1.5, Lid factor 10) bestimmt. Dazu wurden je 3 µl einer Probe auf eine Küvette pipettiert und die Extinktion der DNA-Probe bei dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm gegen einen Leerwert mit doppelt destilliertem Wasser gemessen. Von jeder Patientenprobe wurden 500-1000 ng für das NGS abgefüllt. Da je nach verwendeter DNA-Isolierungsmethode die Proben mit Proteinen, Salzen, Phenol, EDTA und weiteren Substanzen verunreinigt sein konnten, wurden die Verhältnisse aus den Nukleinsäure-Absorptionskoeffizienten bei 260 nm zu den Protein-Absorptionskoeffizienten bei 280 nm und 230 nm berechnet. Als Herstellerrichtlinien wurden dabei folgende optimale Endwerte angegeben: 260/280 bei ~1,8 und 260/230 > 1,5. Bei großen Abweichungen wurden die jeweiligen Proben für die anschließende Polymerase-Kettenreaktion (PCR) entsprechend des unten aufgeführten Protokolls mittels Salz-Ethanol-Fällung gereinigt.

2.2. Bone Mass Gen-Panel

Bei der Hochdurchsatzsequenzierung wurde ein Bone Mass Gen-Panel verwendet, welches bekannte Gene für monogenetische Erkrankungen mit veränderter Knochenmasse enthält. Zusätzlich einbezogen wurden weitere Kandidatengene, beispielsweise aus genomweiten Osteoporose-Assoziationsstudien und solche mit offensichtlicher Beteiligung im Knochenstoffwechsel und in eventuell beteiligten Signalwegen. Alle enthaltenen Gene sind in Tabelle 11 und 12 aufgeführt. Für das NGS wurden die kodierenden Abschnitte von diesen 70 Genen, einschließlich regulatorischer Bereiche des SOST-Gens, nach den Herstellerangaben der Firma Illumina mittels NEBNext DNA Library Prep Master Mix Set angereichert. Das Next-Generation Sequencing erfolgte mit dem HiSeq1500 der Firma Illumina.

2.3. Auswertung der Next-Generation-Sequencing-Daten

Die Auswertung und Filterung der detektierten Sequenzvarianten erfolgte parallel mithilfe der an der Charité erstellten Plattformen GeneTalk und PhenIX.

2.3.1. GeneTalk

Die webbasierte Plattform GeneTalk dient der Filterung, Reduktion und Priorisierung von genetischen Varianten und Mutationen von NGS-Projekten. Für dieses Prozedere wurden die Sequenzvarianten im Variant-Call-Format (VCF) verwendet und mittels definierter Filtereinstellungen (Funktionalität, Frequenz, Vererbungsmodus, Gen-Panel und X-linked) konnte die Liste der Varianten reduziert werden [97]. Gleichzeitig fungiert GeneTalk als Experten-

Austauschnetzwerk für die Beurteilung potentiell krankheitsrelevanter Sequenzvarianten und ist direkt mit weiteren Analyseprogrammen, wie beispielsweise MutationTaster, verknüpft.

Für die Reduzierung der Sequenzvarianten wurden folgende Filtereinstellungen verwendet: Es wurden alle Genvarianten, die sich auf Proteinebene wahrscheinlich stärker auswirken, mittels funktionellem Filter ausgewählt. Dazu zählen alle Nicht-synonymen-, Frameshift-, Nonframeshift und Splice-Site-Mutationen. Zusätzlich wurden Veränderungen in intronischen Bereichen und an den Randbereichen vor bzw. nach den kodierenden Abschnitten (UTR3, UTR5) mit einbezogen, da diese wichtige regulatorische Funktionen bei der Translation erfüllen können. Als Frequenzfilter wurde 5 % für den heterozygoten Allelstatus benutzt, um sicherzustellen, dass bereits bekannte und für den Knochenstoffwechsel relevante Polymorphismen erfasst werden. Es wurden lediglich im Bone Mass Panel enthaltene Gene eingeschlossen und die Varianten mussten eine Mindestabdeckung von 20 Reads aufweisen. Einträge aus der Datenbank „Einzelnukleotidsequenzveränderungen der Genome verschiedener Spezies (dbSNP)“ wurden berücksichtigt, unter der Annahme, dass bei einigen Patienten bereits bekannte Mutationen vorliegen. Da sowohl autosomal-rezessive, autosomal-dominante und X-gebundene Erbgänge für Osteogenesis imperfecta und Osteoporose bekannt sind, wurde keine Filterung des Vererbungsmodus vorgenommen.

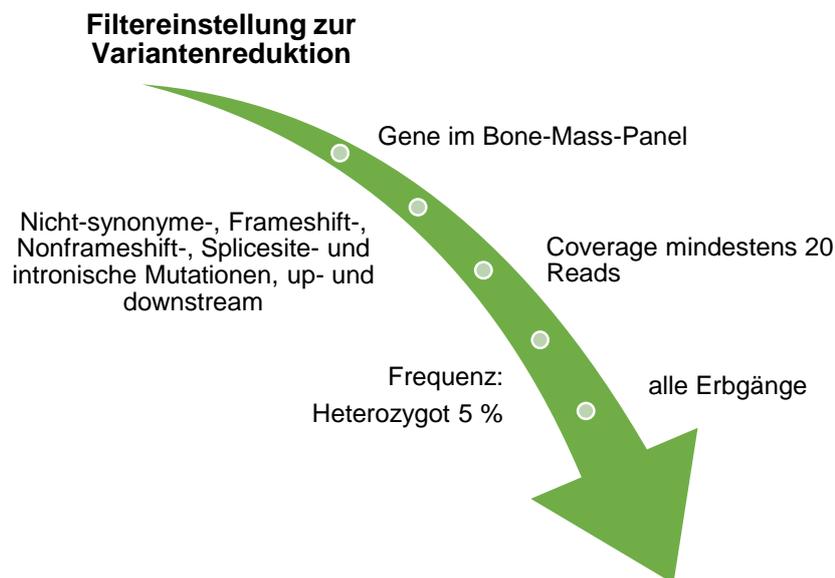


Abbildung 4: Filtereinstellungen zur Variantenreduktion bei der Plattform GeneTalk

2.3.2. PhenIX

Die verwendete Plattform PhenIX kombiniert die Analyse der Varianten mit den klinischen Merkmalen des Patienten. Dazu werden die Varianten der VCF-Datei anhand des eingegebenen Vererbungsmodus, der Frequenz in der Bevölkerung sowie der Qualität der Daten bewertet und deren Pathogenität mittels verschiedener Datenbanken (z.B. ClinVar, OMIM) und Analyseprogrammen (z.B. MutationTaster, SIFT und Polyphen-2) beurteilt.

Weiterhin werden die gefundenen Veränderungen auf ihre Übereinstimmung mit klinischen Auffälligkeiten des Patienten geprüft, was durch das benutzergesteuerte Eintragen bestimmter Schlagwörter aus der Human Phenotype Ontology (HPO) möglich ist. Dazu greift PhenIX direkt auf HPO zurück, in der zahlreiche phänotypische Merkmale, die bei hereditären Erkrankungen des Menschen auftreten können, enthalten sind [98]. Die Reihenfolge der anschließend aufgelisteten Kandidatengene ergibt sich aus einer berechneten Punktzahl beider Analysen. Automatisch setzt PhenIX einen Qualitätsfilter, die sogenannte *PHRED-Qualität*, mit einem Q-Wert von ≥ 30.0 . Diese *PHRED-Qualität* lässt sich durch die folgende Formel berechnen [99]: $Q_{PHRED} = -10 \log_{10}P$. Dabei bezeichnet P die Wahrscheinlichkeit, dass die angegebene Base falsch ist. Ein Wert von 30 gibt an, dass diese Base mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,9 % korrekt ist. Für die Auswertung der Osteogenesis imperfecta Fälle wurden in PhenIX folgende Einstellungen eingegeben:

- Vererbungsmodus: unbekannt
- Frequenzfilter: 0,1 %
- Angezeigte Kandidatengene: alle
- HPO-Begriff: erhöhte Neigung zu Frakturen (HP:0002659)

2.3.3. MutationTaster

Generell wurde bei allen detektierten Varianten das webbasierte Programm MutationTaster benutzt, welches eine schnelle Untersuchung des krankheitsauslösenden Potentials von Sequenzveränderungen ermöglicht. Das Programm verwendet biomedizinische Datenbanken und analysiert u.a. die Lage und den Konservierungsgrad der Mutationen auf Proteinebene [100]. Oftmals sind bei Proteinen die essentiellen funktionalen Bereiche (Substratbindung, katalytische Region) konserviert, weshalb sich eine Mutation in einem dieser Bereiche i.d.R. stärker auf die Proteinfunktion und damit den Phänotyp auswirkt. Zusätzlich untersucht MutationTaster die Sequenzvarianten in Hinblick auf die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der ausgetauschten Aminosäuren bei Punktmutationen, was mit einem Wert, dem *AA changes score* (*amino acid changing score*), angegeben wird.

Neben MutationTaster wurden die in den Materialien aufgelisteten Programme verwendet, die ähnliche Algorithmen benutzen (siehe 2.8.).

2.3.4. Integrative Genomics Viewer

Für die Visualisierung der NGS-Daten wurde der Integrative Genomics Viewer (IGV) verwendet. Es wurde darauf geachtet, dass mehr als 20 Reads der entsprechenden Varianten vorlagen und diese möglichst nicht am Anfang oder am Ende einer Readsequenz vorkamen, um eine entsprechende Qualitätssicherung zu ermöglichen.

2.3.5. Human Splicing Finder

Für die Analyse detektierter Mutationen, welche das alternative Spleißen beeinträchtigen könnten, wurde die bioinformatische Plattform Human Splicing Finder (HSF) verwendet. Sie liefert Vorhersagewerte des Effekts einer Mutation auf verschiedene beim Spleißen beteiligte Signale und Motive [101]. Für die Auswertung ist besonders der HSF-Schwellenwert von Bedeutung. Bei einem HSF-Schwellenwert von über 65 wird angenommen, dass es sich bei der betroffenen Region um einen Spleiß-Akzeptor oder Spleiß-Donor handelt. Weiterhin wird eine Abweichung zwischen der Wildtypsequenz und der mutierten Sequenz in % ermittelt. Wenn dieser Wert unter -10 % ist, wird davon ausgegangen, dass es zu einem Verlust der Spleiß-Stelle kommt. Bei Werten über +10 % wird angenommen, dass sich durch die Mutation eine neue Spleiß-Stelle bildet. Zusätzlich schätzt das Programm Veränderungen in regulatorisch bedeutsamen Regionen (ESE, ESS) ein. Bei den Einstellungen wurden 300 Nukleotide vor und nach jedem Exon angegeben. Abbildungen von der Internetseite Human Splicing Finder wurden proportions- und farbtechnisch auf die Arbeit angepasst, inhaltliche Veränderungen wurden nicht vorgenommen.

2.3.6. Datenbankrecherche und klinische Beurteilung

Für die weitere Analyse wurde in den unter Materialien (vgl. Abschnitt 2.8.) aufgelisteten Datenbanken (v.a. Osteogenesis Imperfecta Variant Database, Pubmed und ClinVar) recherchiert, ob die gefundenen Sequenzvarianten bereits beschrieben wurden. Wenn die Mutationen vermerkt waren, wurde zur besseren Beurteilung geprüft, ob zusätzlich Informationen in den Publikationen über den klinischen Phänotyp der dort beschriebenen Patienten vorlagen und bereits biochemische Analysen durchgeführt wurden.

Zusätzlich wurden zur Einschätzung der gefundenen Varianten die unter 3.1. aufgeführten Tabellen mit klinischen Merkmalen der 31 Patienten erstellt und von Dr. Girisha KM aus dem Manipal Krankenhaus in Indien ausgefüllt und ergänzt. Für die bessere Beurteilung der Ausprägung des klinischen Schweregrades wurde ein Scoring-System entwickelt:

Scoring-System zur Schweregradeinteilung

beinhaltet:

- Frakturfrequenz-Kriterium (1-3 Punkte) +
- Wirbelkörperfrakturen (0-1 Punkte) +
- Deformierungen (0-4 Punkte) +
- Skoliose (0-1 Punkte) +
- Frakturanzahl-Kriterium (1-3 Punkte)

=> 2-12 Punkte möglich (2-4 = mild, 5-8 = moderat, 9-12 = schwer)

Frakturfrequenz-Kriterium:

- Frakturfrequenz (in einem Jahr) ≤ 1 = 1 Punkt;
- Frakturfrequenz (in einem Jahr) 2-3 = 2 Punkte;
- Frakturfrequenz (in einem Jahr) >3 = 3 Punkte;

Frakturanzahl-Kriterium:

- ≤ 10 Frakturen = 1 Punkt;
- zwischen 10 - 30 = 2 Punkte;
- ≥ 30 Frakturen = 3 Punkte;

Für die Berechnungen wurde bei der Angabe „multiple Frakturen“ von 30 Frakturen ausgegangen. Bei zwei angegebenen Werten wurde der Mittelwert berechnet. Für die Beurteilung des Schweregrades der Deformierungen wurde pro betroffener Region (ganzer Arm, Unterarm, gesamtes Bein, Oberschenkel) je ein Punkt gegeben, unabhängig von der Symmetrie. Ein Patient konnte somit bei diesem Kriterium maximal 4 Punkte erreichen.

2.4. Validierung der NGS-Varianten im Labor und PLS3-Gensequenzierung**2.4.1. Primer-Design**

Für die Primer-Generierung wurden auf der bioinformatischen Plattform Ensemble die im menschlichen Organismus hauptsächlich vorkommenden Transkripte ausgewählt. Die entsprechenden Exons und das jeweilige vor- und nachfolgende Intron wurden in das Online-Programm Primer3 eingefügt und für jedes Exon jeweils ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer generiert. Diese wurden auf der UCSC Genome Browser Internetseite auf die spezifische Bindung am jeweilig gewünschten Exon geprüft. Die Primerpaare wurden entsprechend ausgewählt, dass die Schmelztemperaturen (T_m) zwischen 55 und 65 °C lagen und möglichst nur minimal voneinander abwichen. Für die Polymerase-Kettenreaktion wurden die Primer im Labor in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) gelöst und anschließend 1:10 verdünnt.

Bei der Validierungen der *COL1A1*- und *COL1A2*-Mutationen sowie *WNT1*-Varianten wurden bereits im Labor vorhandene Diagnostik-Primer verwendet.

2.4.2. DNA-Aufbereitung mit Salz-Ethanol-Fällung

Zur Aufreinigung der DNA-Proben wurde die Methode der Salz-Ethanol-Fällung verwendet. Dabei wurde die DNA durch Aussalzen mit hohen Salzkonzentrationen und Ethanol präzipitiert und das DNA-Pellet anschließend mit 70-prozentigem Ethanol gewaschen und getrocknet. Dazu wurden, je nach vorhandener DNA-Menge, 50-70 µl Patientenprobe auf 300 µl ddH₂O aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Natriumchlorid (5 Molar) und 1000 µl von 100-prozentigem Ethanol mit nachfolgender Zentrifugation für 5 min bei >10.000 rpm (Umdrehungen pro Minute). Der entstandene Überstand wurde verworfen und für den Waschvorgang wurden 500 µl von 70-prozentigem Ethanol verwendet. Erneut erfolgte eine Zentrifugation für 5min bei >10.000 rpm. Abermals wurde der Überstand verworfen und der Rest mittels Vakuumzentrifuge

für 15 min getrocknet. In einem letzten Schritt wurde die gereinigte DNA in 15 µl ddH₂O gelöst und photometrisch gemessen.

2.4.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion werden bestimmte DNA-Abschnitte enzymatisch vervielfältigt, wobei die zu amplifizierende Nukleotidsequenz durch die erstellten Gen-spezifischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer festgelegt wird. Die Polymerase-Kettenreaktion beginnt im ersten Schritt mit der thermischen Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppel-Stranges bei 95 °C. Dabei kommt es zur Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren. Bei Temperaturen über 50 °C erfolgt anschließend die Primer-Anlagerung an die entstandenen DNA-Einzelstränge. Die spezielle Bindungstemperatur, auch Annealing-Temperatur (T_a) genannt, sollte dabei in der Regel 3-5 °C unter der jeweiligen Primer-Schmelztemperatur liegen. Während zu niedrige Annealing-Temperaturen eine unspezifische Primer-Bindung an der Template-DNA begünstigen, verhindert eine zu hohe Annealing-Temperatur eine Anlagerung der Primer. In dem verwendeten PCR-Programm wurden deshalb die Annealing-Temperaturen sukzessiv in den einzelnen PCR-Zyklen geringer, um möglichst eine optimale Bindung für alle verwendeten Primer zu gewährleisten. Im nächsten Schritt bindet das hitzestabile Enzym DNA-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*, kurz Taq-Polymerase) an die entstandenen kurzen DNA-Abschnitte. Die Taq-Polymerase hat bei 72 °C ihr Temperaturoptimum und synthetisiert von dem jeweiligen 3'Ende der Primer ausgehend den neuen DNA-Doppelstrang der jeweiligen Sequenz, was als Elongation bezeichnet wird. Durch das zyklische Wiederholen dieser einzelnen Reaktionsschritte wird die exponentielle Vervielfältigung der DNA-Abschnitte ermöglicht.

Tabelle 2: Verwendeter PCR-Ansatz

Substrat	Menge pro Ansatz
Firepol Mix	4 µl
Vorwärtsprimer	0,4 µl
Rückwärtsprimer	0,4 µl
ddH ₂ O	14,2 µl

Für die Inkubation in dem Cycler Gene Amp® PCR System 9700 wurde der in Tabelle 2 verwendete Ansatz benutzt. Dabei wurden in einen Ansatz jeweils 14,2 µl doppelt destilliertes Wasser, 4 µl Firepol-Mix, jeweils 0,4 µl Vor- und Rückwärtsprimer und 1 µl DNA pipettiert. Falls sich bei einer Patientenprobe in der Gelelektrophorese keine entsprechende Bande zeigte, wurden 2 µl ddH₂O durch Zusätze wie beispielsweise DMSO oder Q-Solution ersetzt. Die Ansätze wurden anschließend im Thermocycler mit dem Programm aus Tabelle 3 inkubiert.

Tabelle 3: Verwendetes Thermocycler-Programm

Anzahl der Zyklen	Temperatur in °C	Zeit in Sekunden
1	95	180
3	95	30
	61	45
	72	90
3	95	30
	59	45
	72	90
3	95	30
	57	45
	72	90
33	95	30
	55	45
	72	90
1	72	300
	16	∞

2.4.4. Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde 1,5-prozentiges Agarosegel mit TAE-Puffer (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Acetat-EDTA-Puffer) hergestellt. Dem Agarosegel wurden 5 µl 1-prozentiges Ethidiumbromid pro 100 ml zugesetzt. Als DNA-Leiter wurde der GeneRuler DNA-Ladder 1kb (Fermentas) verwendet. Es wurden immer 4µl GeneRuler DNA-Ladder in die äußeren Kammern pipettiert. Von den entsprechenden PCR-Produkten wurden jeweils 10 µl auf das Gel aufgetragen. Anschließend wurde für 20-30 min eine Spannung zwischen 120-140 mV angelegt. Im elektrischen Feld wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente durch die Poren des hergestellten Agarose-Gels zur positiv geladenen Anode. Da die Wanderungsgeschwindigkeit von den jeweiligen DNA-Fragmenten umgekehrt proportional dem log₁₀ der enthaltenen Basenpaare ist, war eine Auftrennung der DNA-Molekül-Größe möglich. Kleinere DNA-Fragmente bewegen sich schneller durch die Poren des Gels als große. Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren mit der DNA und fluoreszieren in ultraviolettem Licht, weshalb das Gel anschließend unter einer UV-Lampe (G:BOX) betrachtet und fotografiert werden konnte.

2.4.5. Reinigung der PCR-Produkte mit EXOI-SAP

Die PCR-Produkte wurden von den Primerresten und übrig gebliebenen dNTPs enzymatisch gereinigt. Dafür wurde das Enzym Exonuklease I (EXO1) verwendet, das die Entfernung der dNTPs und Primer katalysiert und die Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), welche die DNA dephosphoryliert. Es wurde der in Tabelle 4 verwendete Ansatz benutzt. Nachfolgend wurden die Reaktionsansätze 30 Minuten bei 37 °C zur Aktivierung der Enzyme im Thermocycler inkubiert und anschließend wurden die Enzyme bei 75 °C für 15 Minuten wieder deaktiviert.

Tabelle 4: Standardansatz für die Aufreinigung der PCR-Produkte

Reagenz	Volumen in [µl]
H ₂ O	2,59
SAP	0,32
EXO1	0,09
PCR-Produkt	7

2.4.6. Sequenzierung nach Sanger

Bei der Sequenzierung nach Sanger werden neben den Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) auch mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) dem Reaktionsansatz zugefügt. Da den ddNTPs das 3'-OH-Ende fehlt, kann die Taq-DNA-Polymerase nicht mehr binden und es kommt nach Einbau eines ddNTP an unterschiedlichen Stellen der DNA-Sequenz zu einem Kettenabbruch. In die Reaktionsansätze wurden 5,5 µl ddH₂O, 0,5 µl BigDye®, 2 µl Sequenzing Buffer, je 0,5 µl vom entsprechenden Vorwärts- und Rückwärtsprimer und 1 µl oder 1,5 µl des entsprechenden gereinigten SAP/EXO-Produktes pipettiert. Die Ansätze wurden bei dem in Tabelle 5 verzeichneten Programm im Cycler Gene Amp® PCR System 9700 inkubiert. Bei den *COL1A1*- und *COL1A2*-Ansätzen wurden im Labor vorhandene M13-Vorwärtsprimer und M13-Rückwärtsprimer verwendet.

Tabelle 5: Thermocyclerprogramm für die Sequenzierung

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

2.4.7. Fällung und Sequenzierung im Sequencer

In dem nächsten Schritt wurden die Proben mithilfe von Ethanol präzipitiert und mit dem Biomek NXP Fällungsroboter voll automatisch isoliert. Dazu wurde die DNA mittels „Magnetic Beads System“ sedimentiert und überschüssige ddNTPs, dNTPs, Primer, Enzyme und vorher zugegebene Lösungen wurden in mehreren Schritten herausgewaschen. Anschließend wurde der 3730 DNA Analyzer (Firma Applied Biosystems) mit den gereinigten Sequenz-PCR-Produkten beladen. Dieser trennt die Kettenabbruchprodukte durch Kapillargelelektrophorese der Größe nach. Ein Laser regt dabei die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten ddNTPs an. Da jedes der 4 ddNTPs (für Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin) mit einer anderen Farbe markiert ist, können diese vom Detektor erkannt werden und es wird ein Peak-Diagramm mit der Nukleotidsequenz erstellt. Diese Sequenzen wurden mit der Software DNASTAR bearbeitet,

wobei zu große Start- oder Schlusspeaks für eine bessere anschließende Erkennung im Programm SeqMan mit der Software DNA Analysis Version 3.1 herausgeschnitten wurden. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden von SeqMan gelb markierte Bereiche entfernt. Anschließend wurden die Sequenzen mit der Referenzsequenzen des Transkripts aus Ensemble abgeglichen.

2.5. Auswertung gefundener *PLS3*-Varianten

Die Auswertung der detektierten Varianten im *PLS3*-Gen erfolgte nach einem ähnlichen Schema wie oben bereits bei der NGS-Auswertung beschrieben. Dazu wurden die Plattformen MutationTaster und Human Splicing Finder verwendet. Anschließend erfolgte eine Recherche nach bereits beschriebenen Mutationen in Datenbanken wie ExAC-Browser, 1000-Genome-Projekt, Pubmed, OMIM und der Osteogenesis Imperfecta Variant Database.



Abbildung 5: Vorgehen bei dem Auftreten einer Sequenzvariante im *PLS3*-Gen

2.6. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
5X FIREPol® with 12,5 mM MgCl ₂	Solis Biodyne
Beads Agentcourt® CleanSEQ®	Beckman Coulter
0,1 mM EDTA, pH 0,8	GIBCO
reinst. Ethanol	J. T. Baker
BigDye® Terminator v. 3.1. Cycle	Applied Biosystems
BigDye® Terminator v. 3.1.. 5 x Sequencing Buffer	Applied Biosystems
GeneRuler DNA Ladder Mix 0,5 µg / µL	Thermo Scientific
1 X DNA Loading Dye [5x]	Thermo Scientific
Agarose 1,5% NEEO Ultra Qualität	Carl Roth
Shrimp-Alkaline-Phosphatase (SAP)	usb®
Exonuklease 1 (EXO 1)	New England BioLabs
Ethidiumbromid Lösung (1%)	Merck
Reinst. Ethanol	J. T. Baker
HPLC-H ₂ O	J. T. Baker
NaCl	-
Primer	s. Tabelle
TAE Puffer (400mM Tris, 10 mM EDTA)	-
NEBNext® DNA Library Prep Master Mix Set	Illumina

2.7. Geräte

Tabelle 7: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
HighSeq1500	Illumina
GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler	Applied Biosystems
Electrophoresis Power Supply ST 606T Gibco BRL	Life Technologies
G – Box	SynGene
Biomek® NXP Laboratory Automation Workstation	Beckman Coulter
Sequenzier Applied Biosystems® 3730 DNA Analyzer	Applied Biosystems
NanoPhotometer (TM 7122 V.1.5)	Implen
Gelkammer inkl. Kämme	biostep
PerfectSpin 24 R, refrigerated Microcentrifuge	peqlab
Heraeus Sepatech Centrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatech
Heraeus Labofuge 400R	Heraeus instruments
Vakuumpumpe LABOPORT®	KNFLab
HighSeq1500	Illumina

2.8. Datenbanken und Software

Tabelle 8: Verwendete Datenbanken und Software

Datenbanken und Software (Stand 20.09.15)	URL/Quelle
Ensemble Genome Browser	http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/
UCSC Genome Bioinformatics	http://genome.ucsc.edu/
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
The Human Gene Mutation Database	http://www.hgmd.cf.ac.uk/
Online Mendelian Inheritance in Man	https://omim.org/
Osteogenesis Imperfecta Variant Database	https://oi.gene.le.ac.uk/
ClinVar	www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
Human Phenotype Ontology (HPO)	http://www.human-phenotype-ontology.org
ExAC-Browser	http://exac.broadinstitute.org/
Primer 3	http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/
Integrative Genomics Viewer (IGV)	http://www.broadinstitute.org/software/igv/
MutationTaster	http://www.mutationtaster.org/
Polyphen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2
SIFT	http://sift.jcvi.org/
Human Splicing Finder	http://www.umd.be/HSF/
PhenIX	http://compbio.charite.de/PhenIX/
Nucleotide Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Software GeneSnap 7.12	SynGene
SeqMan	DNASTAR
Sequencing Analysis 5.1.3	Applied Biosystems

2.9. Primer

Tabelle 9: Primer für die PLS3-Sequenzierung

Gen	Exon	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
PLS3	1	gttgatgtgacaggctcgtg	gctgagcttaaccgagatgc
	2	agagacatggaacctattcagattg	ttaagtatagctccaaaactttatcc
	3	tccattcccttcaaaaa	gggcaggatgacagaaatgt
	4	tttgatcttttaacatcagctatgga	tctcaagcctaaatacatgtcaca
	5	ccaagtgtctgggttccac	cttgaggatgaacctgtcaagc
	6	gacatcagccaccacatcag	aaagaacatgggctttgaa
	7	cagggtattaatttctcattgaa	accaccatttaacacctcca
	8	tgcatagtagttttgcacctct	cttcaggccaagagacaac
	9	tccaatgcaaatagccttcc	ttgccaactctacttcatacgatt
	10	ccagactatgacagtgaggaaa	ctcagcatctgccatctacttc
	11	agaagaatgcttgaaactcg	gatgatggaaatcaccacttga
	12	cttggttgacaatgtagtgtactg	caagaagctcagcgtcaaga
	13	acgctgagcttcttgaggac	tcgacatatccacttattaacaca
	14	tctgatgttgcatcttctc	gtgccattagcccaacactaa
	15	gctttgttttggcacttgat	ccactctaaatggcagaacct
	16	ggaaatagatgtcttacgtggtgc	GACTATGGGAAAGAGGAGTTGTTT

Tabelle 10: Primer für die PCR der NGS-Validierungen

Gen	Exon	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
BMP1	1	agaggggaaggggaagaggtc	ccttgcaggggtctttgtag
FKBP10	5	ggcttgctccccaatttat	cagcttcgtccacgtttcac
	9	gctccttaaacatcccattgc	cgcttcttctcctgatgctt
	10	aagcactcactggcctccac	catctagggtgggggaaca
IFITM5	1	cgcaggctgtaattgtgtt	ttcaggtagagggtgctgaa
LEPRE1	1	cggttccgtaggtctgagg	actccagctccatctctcg
	9+10	gacgaggaggcaatatccaa	cactctagaatcccagtggtg
	15	cctgggaagtagcagctgag	ctgacctggacgctgtcata
M13		tgtaaaacgacggccagt	caggaaacagctatgacc
SERPINF1	3	tccctgaactcaaaccaag	ccctcgctgaactgaatgt
	6	gtctcctgggctcagacta	ctctatcctctccctccatcc
WNT1	3	aggactcaaagtgcggagtc	cttgcttatctcaccgacc
	4	agagggcagtgctgggag	agtgctagcagctctgtttgg

Tabelle 11: Verwendete Primer für das COL1A1-Gen

Gen	Exon	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
COL1A1	2	tgtaaaacgacggccagtcgggaagtgaaaaatccaag	caggaaacagctatgaccgagccaaggttgctaatgc
	8	tgtaaaacgacggccagttggagaaggtgacagggac	caggaaacagctatgaccaggcctgggagttcttcta
	17	tgtaaaacgacggccagtagaggcaaggttggtttc	caggaaacagctatgaccacagagaaggaggtgcagca
	32	cacatagggtgatgctggg	aaaggggaagaaggaggat
	33	tgtaaaacgacggccagtggaaccagacacaagcag	caggaaacagctatgaccaggacctgctctccaac
	36	tgtaaaacgacggccagtaatgaggacaaagcgtcag	caggaaacagctatgaccagagcacagaggcatcaagc
	37	tgtaaaacgacggccagtctctgtgccacagaggc	caggaaacagctatgaccgaaaccagtagcaccctgga
	42	tgtaaaacgacggccagtggtgaatctggacgtgaggt	caggaaacagctatgaccgggtctaccacggctcac
	43	tgtaaaacgacggccagtcaactcctatgaccacagc	caggaaacagctatgaccgaggcctgaagagtcctctg
	47	tgtaaaacgacggccagtctccagagctggggtgttc	caggaaacagctatgaccggaagcctgaagtcgaaacca

Tabelle 12: Verwendete Primer für das COL1A2-Gen

Gen	Exon	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
COL1A2	12	tgtaaaacgacggccagttcagctgttcatagctacaaa	caggaaacagctatgaccagaggaggaaaggaaatgga
	17	tgtaaaacgacggccagtgatggcagaatcaagcaag	caggaaacagctatgaccacaacaagtcctctggcacc
	20	tgtaaaacgacggccagtaccacctctgccatatttc	caggaaacagctatgacccttagggcctctctttcc
	23	tgtaaaacgacggccagttcctggttctctgtggtctc	caggaaacagctatgaccaaaaatgcaactgtcagcaa
	34	tgtaaaacgacggccagtctccaaattctgacctgc	caggaaacagctatgaccttaatgcgcaacatggagag
	38	tgtaaaacgacggccagttcaagtgcctgctatgcaac	caggaaacagctatgaccagaaggacatggtcaggcag
	40	tgtaaaacgacggccagtccaatggccagggtattatt	caggaaacagctatgaccgcctgcaatactcatcaaaaa
	42	tgtaaaacgacggccagtttacagagcaacatcccgtg	caggaaacagctatgaccgtactgacctgtgtccggg
	44	tgtaaaacgacggccagtttgcttaggcaaaagaatgg	caggaaacagctatgaccaggaccaacaggaccagaag
	49	tgtaaaacgacggccagttgggctgttaagtccatcc	caggaaacagctatgaccgtgggagaagatgacgctc

2.10. Gene im Bone Mass Panel

Tabelle 13: Enthaltene Gene für Erkrankungen mit erhöhter Knochenmasse im Bone Mass Panel

Genname	Lokalisation	Phänotyp
<i>ACP5</i>	19p13.2	Roifman-Melamed-Syndrom
<i>ANKH</i>	5p15.2	artikuläre familiäre Chondrokalzinose, kranio-metaphysäre Dysplasie
<i>BMP1</i>	8p21.3	Osteogenesis imperfecta Typ XIII
<i>CA2</i>	8q21.2	Guibaud-Vainsel-Syndrom
<i>CLCN7</i>	16p13.3	autosomal-rezessive Osteopetrose, autosomal-dominante Osteopetrose
<i>COL1A1</i>	17q21.33	Caffey-Krankheit, klassisches EDS, EDS Typ VIIA, OI Typ I - IV , Osteoporose
<i>CTSK</i>	1q21.3	Pyknodysostose
<i>DLX3</i>	17q21.33	Amelogenesis imperfecta, Tricho-dento-ossäres Syndrom
<i>FAM123B</i>	Xq11.2	Osteopathia striata - kraniale Sklerose
<i>FAM20C</i>	7p22.3	Raine-Syndrom
<i>FERMT3</i>	11q13.1	Leukozyten-Adhäsions-Defizienz
<i>GJA1</i>	6q22.31	kranio-metaphysäre Dysplasie, Darier-Gottron-Krankheit, okulo-dento-ossäre Dysplasie, Syndaktylie Typ 3
<i>HPGD</i>	4q34.1	Kranio-Osteoarthropathie, isolierte kongenitale Trommelschlägelfinger
<i>IKBKKG</i>	Xq28	ektodermale hypohidrotische Dysplasie
<i>LEMD3</i>	12q14.3	Buschke-Ollendorff-Syndrom, Melorheostose
<i>LRP5</i>	11q13.2	endosteale Hyperostose, autosomal-dominante Osteopetrose Typ 1, Osteosklerose, Van-Buchen-Krankheit Typ 2, Osteoporose
<i>OSTM1</i>	6q21	Osteopetrose mit neuroaxonomer Dysplasie
<i>PLEKHM1</i>	17q21.31	autosomal-rezessive Osteopetrose (OPTB6)
<i>PTH1R</i>	3p21.31	Chondrodysplasie Typ Blomstrand, Eiken-Syndrom, metaphysäre Chondrodysplasie
<i>RASGRP2</i>	11q13.1	
<i>SLC29A3</i>	10q22.1	Rosai-Dorfman-Krankheit, H-Syndrom
<i>SNX10</i>	7p15.2	infantile maligne Osteopetrose (OPTB6)
<i>SOST</i>	17q21.31	kraniodiaphysäre Dysplasie, Sklerosteose, Van Buchem-Syndrom
<i>TBXAS1</i>	7q34	Ghosal-Syndrom
<i>TCIRG1</i>	11q13.2	infantile maligne Osteopetrose (OPTB1)
<i>TGFB1</i>	19q13.2	Camurati-Engelmann-Syndrom, Zystische Fibrose
<i>TNFRSF11A</i>	18q21.33	expansile familiäre Osteolyse, autosomal-rezessive Osteopetrose Typ 7
<i>TNFRSF11B</i>	8q24.12	juveniles Paget-Syndrom
<i>TNFRSF11</i>	13q14.11	autosomal-rezessive Osteopetrose Typ 2

Tabelle 14: Enthaltene Gene für Erkrankungen mit erniedrigter Knochenmasse im Bone Mass Panel

Genname	Lokalisation	Phänotyp
<i>ADAMTS2</i>	5q35.3	Ehlers-Danlos-Syndrom Typ VIIC
<i>ALPL</i>	1p36.12	Hypophosphatasie, Odontohypophosphatasie
<i>ATP6V0A2</i>	12q24.31	Cutis laxa Typ IIA , Wrinkly-Skin-Syndrom
<i>BMP1</i>	8p21.3	Osteogenesis imperfecta Typ XIII
<i>BMP2</i>	20p12.3	Brachydaktylie Typ A2
<i>CASR</i>	3q21.1	hypo-/hypokalziurische Hyperkalzämie, Hyperparathyreodismus, Hypokalzämie
<i>COL1A1</i>	17q21.33	Caffey-Krankheit, klassisches EDS, EDS Typ VIIA, OI Typ I - IV, Osteoporose
<i>COL1A2</i>	7q21.3	EDS kardial-valvulärer Typ, EDS Typ VIIB, OI Typ II-IV, postmenopausale Osteoporose
<i>CRTAP</i>	3p22.3	Osteogenesis imperfecta Typ VII
<i>DMP1</i>	4q22.1	hypophosphatämische Rachitis
<i>EFEMP2</i>	11q13.1	Cutis laxa Typ IB
<i>ENPP1</i>	6q23.2	Arterienkalkifizierung, Cole-Krankheit, hypophosphatämische Rachitis
<i>ESR1</i>	6q25.1	Östrogen-Resistenz-Syndrom
<i>FBLN5</i>	14q32.12	autosomal-dominante Cutis laxa (ADCL) , Cutis laxa Typ IA
<i>FGF23</i>	12p13.32	hypophosphatämische Rachitis, familiäre tumorale Kalzinose
<i>FKBP10</i>	17q21.2	Bruck-Syndrom Typ 1, Osteogenesis imperfecta Typ XI
<i>GORAB</i>	1q24.2	Geroderma osteodysplasticum
<i>IFITM5</i>	11p15.5	Osteogenesis imperfecta Typ V
<i>LEPRE1</i>	1p34.2	Osteogenesis imperfecta Typ VIII
<i>LMNA</i>	1q22	mandibulo-akrale-Dysplasie, Carcot-Marie-Tooth, Herz-Hand-Syndrom, Hutchinson-Gilford-Syndrom, Malouf-Syndrom
<i>LRP4</i>	11p11.2	Kongenitales myasthenes Syndrom, Cenani-Lenz-Syndrom, Sklerosteose
<i>LRP5</i>	11q13.2	endostale Hyperostose, AD Osteopetrose Typ 1, Osteosklerose, Van-Buchen-Krankheit Typ 2, Osteoporose
<i>LRP6</i>	12p13.2	Koronare Herzkrankheit mit Hyperlipidämie, Hypertension, Diabetes und Osteoporose
<i>MAFB</i>	20q12	Multizentrische karpotarsale Osteolyse mit oder ohne Nephropathie
<i>MMP2</i>	16q12.2	Multizentrische Osteolyse-Nodulose-Arthropathie-Spektrum
<i>PHEX</i>	Xp22.11	X-chromosomale Hypophosphatämie
<i>PLOD1</i>	1p36.22	Ehlers-Danlos-Syndrom Typ VI
<i>PLOD2</i>	3q24	Bruck-Syndrom Typ 2
<i>PPIB</i>	15q22.31	Osteogenesis imperfecta Typ IX
<i>PYCR1</i>	17q25.3	Cutis laxa Typ IIB, Cutis laxa Typ IIIB
<i>RUNX2</i>	6p21.1	kleidokraniale Dysplasie , metaphysäre Dysplasie
<i>SERPINF1</i>	17p13.3	Osteogenesis imperfecta Typ VI
<i>SERPINH1</i>	11q13.5	Osteogenesis imperfecta Typ X
<i>SLC34A3</i>	9q34.3	hypophosphatämische Rachitis mit Hyperkalziurie
<i>SLC39A13</i>	11p11.2	Ehlers-Danlos-Syndrom (spondylo-cheiro dysplastische Form)
<i>SP7</i>	12q13.13	Osteogenesis imperfecta Typ XII
<i>SPP1</i>	4q22.1	kodiert für Osteopontin
<i>TMEM38B</i>	9q31.2	Osteogenesis imperfecta Typ XIV
<i>TNFRSF11B</i>	8q24.12	juveniles Paget-Syndrom
<i>TREM2</i>	6p21.1	Nasu-Hakola-Krankheit
<i>TYROBP</i>	19q13.12	Nasu-Hakola-Krankheit
<i>VDR</i>	12q13.11	Vitamin D-abhängige Rachitis Typ II, Osteoporosis
<i>WNT1</i>	12q13.12	Osteogenesis imperfecta Typ XV, juvenile ideopathische Osteoporose
<i>WNT16</i>	7q31.31	
<i>ZMPSTE24</i>	1p34.2	mandibulo-akrale Dysplasie, letale restriktive Dermopathie

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Osteogenesis imperfecta Fälle und des Next-Generation Sequencing

Eine Zusammenschau der klinischen Daten der 31 indischen Patienten mit Osteogenesis imperfecta bzw. Bruck-Syndrom ist den unten angeführten Tabellen 13 bis 15 zu entnehmen.

Tabelle 15: Indische Patienten für das NGS mit einigen klinischen Angaben (NA- nicht angegeben, DI – Dentinogenesis imperfecta)

Patient	Sex	Alter bei letzten Vorstellung	Familienanamnese	Blaue Skleren oder DI
P1	m	8 Jahre	konsanguin	nein
P2	w	12 Jahre	konsanguin, mütterliche Tante betroffen	nein
P3	m	5 Jahre	konsanguin, Bruder und Schwester betroffen	nein
P4	m	6 Jahre + 6 Monate	nicht konsanguin	beides
P5	w	7 Jahre	konsanguin	nein
P6	m	8 Jahre	konsanguin	blaue Skleren
P7	w	6 Jahre + 9 Monate	nicht konsanguin, mütterlicher Cousin schwere OI	blaue Skleren
P8	m	3 Jahre + 6 Monate	konsanguin	nein
P9	m	5 Jahre	nicht konsanguin	blaue Skleren
P10	m	10 Jahre	nicht konsanguin	beides
P11	m	17 Jahre	nicht konsanguin	nein
P12	w	11 Jahre	nicht konsanguin	blaue Skleren
P13	w	5 Jahre	nicht konsanguin, Mutter und mütterliche Großmutter betroffen	blaue Skleren
P14	w	9 Jahre	nicht konsanguin	beides mild
P15	m	8 Jahre	nicht konsanguin, Mutter hat blaue Skleren und Größe -3SD	beides
P16	w	5 Jahre + 10 Monate	nicht konsanguin	blaue Skleren
P17	m	7 Jahre	Vater und väterliche Tante betroffen	beides
P18	w	8 Monate	konsanguin	nein
P19	m	1 Jahr+ 7 Monate	nicht konsanguin	blaue Skleren
P20	w	12 Jahre	nicht konsanguin	blaue Skleren
P21	w	12 Jahre	nicht konsanguin	beides
P22	m	17 Jahre + 2 Monate	nicht konsanguin	milde blaue Skleren
P23	m	12 Jahre	konsanguin	nein
P24	m	12 Jahre	nicht konsanguin, Schwester hat OI	blaue Skleren
P25	m	5 Jahre	nicht konsanguin	blaue Skleren
P26	w	7 Jahre + 7 Monate	konsanguin, Mutter 6 Aborte + Fraktur	bläuliche Verfärbung
P27	w	10 Jahre	nicht konsanguin	DI
P28	m	10 Jahre + 6 Monate	konsanguin	milde blaue Skleren
P29	m	10 Jahre + 9 Monate	nicht konsanguin	blaue Skleren
P30	w	13 Jahre+ 4 Monate	konsanguin	blaue Skleren
P31	w	7 Jahre	konsanguin, Bruder betroffen	blaue Skleren

Tabelle 16: Indische Patienten für das NGS mit einigen klinischen Angaben (NA- nicht angegeben)

Patient	Alter bei ersten Fraktur	Anzahl klinischer Frakturen	Frakurfrequenz pro Jahr	Wirbelkörperfrakturen	Größe (Z-Score)
P1	Geburt	8 bis 9	1	nein	126.5 cm (-1)
P2	1,5 Jahre	10 bis 11	1	nein	NA
P3	NA	2	2	nein	NA
P4	19. Lebensstag	5	1	nein	89.5 cm (-6)
P5	6 Monate	ca. 15	3	ja	92 cm (-5)
P6	2 Monate	8	1	ja	97 cm (-4)
P7	1 Jahr	multiple	1	nein	110 cm (0)
P8	frühe Kindheit	10 bis 15	4 bis 5	nein	NA
P9	Neonatal	4 bis 5	1	nein	93.5 cm (-3)
P10	Geburt	>5	1	ja	97 cm (-6)
P11	1 Monat	über 30	2	ja	129 cm (-7)
P12	2,5 Jahre	multipel	1	nein	108 cm (-5)
P13	1 Jahr	3	1	nein	NA
P14	1,5 Jahre	multipel	1	nein	NA
P15	2,5 Jahre	multipel	< 1	nein	107 cm (-4)
P16	4,5 Jahre	2	<1	nein	113 cm (0)
P17	6 Monate	über 30	>4	nein	100 cm (-4)
P18	11. Lebensstag	4	4	nein	59 cm (-6)
P19	1 Monat	4	1	nein	76 cm (-3)
P20	Geburt	multipel	1	ja	123 cm (-3)
P21	28. Lebensstag	multipel	1	nein	asym. Kleinwuchs
P22	Geburt	50	2	ja	NA
P23	9 Monate	8 bis 10	1	nein	135 cm (-1)
P24	3 Jahre	7 bis 8	1	nein	126.5 cm (-3)
P25	2,5 Jahre	5	1	nein	94 cm (-3)
P26	6,5 Jahre	4 bis 5	1	nein	118 cm (0)
P27	Geburt	5 bis 6	1	ja	95 cm (-6)
P28	3 Monate	4	1	nein	129.5 cm (-1)
P29	1 Jahr	multipel	1	nein	123 cm (-2)
P30	2 Monate	> 20	2	ja	93 cm (-9)
P31	8 Monate	ca. 7	1	ja	92 cm (-5)

Tabelle 17: Indische Patienten für das NGS mit einigen klinischen Angaben (NA- nicht angegeben)

Patient	Deformierungen der Extremitäten				Gelenk- hypermobilität	Weitere Merkmale
	Arm	Unterarm	Oberschenkel	Bein		
P1	nein	nein	ja	ja	nein	vereinzelt metaphysäre Dichtebande, Kontrakturen an Knie und Ellenbogen
P2	nein	nein	ja	nein	nein	links Klumpfuß, rechts Kniekontraktur
P3	nein	nein	ja	nein	ja	Kontrakturen an Hüfte, Knie, Fußknöchel
P4	nein	nein	ja	nein	ja	metaphysäre Dichtebande
P5	ja	ja	ja	ja	ja	motorisch verzögert, schwere Osteopenie, Skoliose, popkornartige Kalzifikationen
P6	ja	ja	ja	ja	ja	Deformierungen der Rippen, rechtes Auge schielt, schwere Osteopenie, metaphysäre Dichtebande
P7	nein	nein	ja	ja	ja	metaphysäre Dichtebande, milde Osteopenie
P8	ja	ja	ja	ja	ja	NA
P9	nein	nein	ja	nein	ja	metaphysäre Dichtebande
P10	ja	ja	ja	ja	ja	metaphysäre Dichtebande, milde Skoliose
P11	ja	ja	ja	ja	ja	Ulna + Radiusdeformität, links schwerere Deformierung und Verkürzung
P12	nein	nein	ja	ja	ja	metaphysäre Dichtebande
P13	nein	nein	ja	nein	ja	NA
P14	ja	ja	ja	ja	ja	metaphysäre Dichtebande, hyperplastischer Kallus
P15	nein	nein	ja	ja	ja	metaphysäre Dichtebande, Phänotyp mild
P16	nein	nein	ja	nein	ja	metaphysäre Dichtebande, Phänotyp mild
P17	nein	nein	schwer	ja	ja	Skoliose, popkornartige Kalzifikationen, metaphysäre Dichtebande
P18	nein	nein	ja	ja	ja	Erlenmeyerartige Verformung, Hydrozephalus
P19	nein	nein	ja	ja	ja	milder Phänotyp
P20	nein	ja	ja	ja	ja	verzögertes Knochenalter, metaphysäre Dichtebande
P21	nein	nein	ja	ja	ja	metaphysäre Dichtebande
P22	ja	ja	ja	ja	ja	schwerer Phänotyp, Skoliose, popkornartige Kalzifikation, metaphysäre Dichtebande
P23	ja	nein	nein	ja	ja	postaxiale Polydaktylie, metaphysäre Dichtebande
P24	nein	nein	ja	ja	ja	NA
P25	ja	ja	ja	ja	ja	weiche Haut mit erhöhter Elastizität
P26	nein	nein	ja	ja	ja	schwere Osteopenie
P27	ja	ja	ja	ja	ja	schwerer Phänotyp, Skoliose, metaphysäre Dichtebande
P28	ja	ja	ja	ja	ja	schwerer Phänotyp, metaphysäre Dichtebande, dreieckiges Gesicht
P29	nein	nein	ja	ja	ja	metaphysäre Dichtebande
P30	ja	ja	ja	ja	ja	Radiuskopfdislokation, Skoliose, hyperplastischer Kallus, popkornartige Kalzifikation, metaphysäre Dichtebande
P31	ja	ja	ja	ja	ja	Skoliose, metaphysäre Dichtebande

Von den 31 Patienten mit klinisch gesicherter Osteogenesis imperfecta, davon 3 mit Bruck-Syndrom (P1, P2 und P3), waren 17 männlich und 14 weiblich. Bei der letzten klinischen Vorstellung in Indien waren sie im Durchschnitt 8,6 Jahre alt. Der jüngste Patient war 8 Monate alt und der älteste 17 Jahre. 12 Patienten kamen aus konsanguinen Familien, während 18 aus nicht-konsanguinen Familien stammten. Bei einem Patienten war keine entsprechende Angabe vorhanden. Bei 9 von 31 Patienten war ein weiteres Familienmitglied ebenfalls betroffen, darunter kamen 4 von diesen aus konsanguinen Familien.

Von den in der Osteogenesis imperfecta Datenbank gelisteten 19 krankheitsverursachenden Genen waren 14 im verwendeten Bone Mass Panel enthalten. 5 Gene fehlten, darunter die erst kürzlich veröffentlichten Gene *CREB3L1*, *P4HB*, *SEC24D*, *SPARC* und *PLS3*. Mithilfe des NGS und der anschließenden bioinformatischen Auswertung konnte bei 30 von 31 Patienten mindestens eine potentiell ursächliche Mutation für das klinische Bild der Osteogenesis imperfecta detektiert werden, was einer Erfolgsrate von 96,8 % entspricht. Bei 61,3 % fanden sich Mutationen, die mit einer autosomal-dominant vererbten Osteogenesis imperfecta vereinbar sind, darunter 11 Patienten mit potentiell ursächlichen Mutationen im Gen *COL1A1*, 6 im Gen *COL1A2* und 2 Patienten mit einer Veränderung im Gen *IFITM5*. 11 Patienten, das entspricht 35,5 %, wiesen Mutationen für eine autosomal-rezessiv vererbte Osteogenesis imperfecta in einem der Gene *FKBP10*, *WNT1*, *LEPRE1*, *SERPINF1* oder *BMP1* auf. Bei einem Patienten (P28) ohne eine detektierte Mutation in einem für das Krankheitsbild beschriebenen Gen, fanden sich lediglich zwei heterozygote und von MutationTaster als krankheitsverursachend eingeschätzte Mutationen im *FBLN5*-Gen. Dieses Gen wird eigentlich mit autosomal-dominanter Cutis laxa Typ 2 oder autosomal-rezessiver Cutis laxa Typ IA in Zusammenhang gebracht, die ebenfalls mit erhöhter Knochenfragilität einhergeht.

Die Schweregradeinteilung mithilfe des im Methodik-Teil beschriebenen Scoring-Systems erbrachte die Einteilung in 11 Patienten mit milden-, 14 Patienten mit moderaten- und 6 Patienten mit schweren Phänotyp (siehe Tabellen 18 und 19). Dabei ist P28 nicht in den Tabellen aufgeführt, dieser hatte laut dem Punktesystem einen moderaten Phänotyp mit 6 Gesamtpunkten. Auffällig war, dass v.a. die Patienten mit *LEPRE1*-, *IFITM5*- und qualitativen *COL1A1*-Mutationen im Mittel am schwersten betroffen waren, während Patienten mit *FKBP10*- und quantitativen *COL1A1/2*-Mutationen die mildeste Ausprägung zeigten.

Tabelle 18: Ergebnis des Scoring-Systems aufgeschlüsselt nach den wahrscheinlich pathogenen Genmutationen zur klinischen Schweregradeinteilung (2 bis 12 Punkte möglich, -L = qualitative Defekte, -N = Quantitative Defekte)

Gen	Mittelwert	Minimum	Maximum	Patienten- gesamtzahl
BMP1	6,0	6,0	6,0	1
COL1A1-L	8,3	6,0	11,0	6
COL1A1-N	4,0	3,0	6,0	5
COL1A2-N	3,0	3,0	3,0	1
COL1A2-L	5,0	3,0	6,0	5
FKBP10	4,0	4,0	4,0	3
IFITM5	9,0	8,0	10,0	2
LEPRE1	9,5	9,0	10,0	2
SERPINF1	7,0	4,0	10,0	2
WNT1	7,0	6,0	8,0	3

Tabelle 19: Anzahl an Patienten mit milden-, moderaten- oder schweren Phänotyp anhand des Scoring-Systems (-L = qualitative Defekte, -N = Quantitative Defekte)

Gen	Schweregrad			Patienten- gesamtzahl
	mild	moderat	schwer	
BMP1	0	1	0	1
COL1A1-L	0	4	2	6
COL1A1-N	4	1	0	5
COL1A2-L	2	3	0	5
COL1A2-N	1	0	0	1
FKBP10	3	0	0	3
IFITM5	0	1	1	2
LEPRE1	0	0	2	2
SERPINF1	1	0	1	2
WNT1	0	3	0	3

Im Durchschnitt ergab sich bei der Hochdurchsatzsequenzierung der 70 im Bone Mass Panel enthaltenen Gene eine durchschnittliche Gesamtabdeckung von 97,7 %. Die geringste Abdeckung zeigte Patient 28 mit 94,13 %, der auch gleichzeitig die wenigsten Varianten aufwies. Patientin 13 mit der höchsten Gesamtabdeckung von 99,5 % hatte dagegen die meisten Varianten. In Abbildung 6 ist die jeweilige Abdeckung der einzelnen Patienten mit der Zahl der Varianten im VCF-File dargestellt. Es zeigte sich die Tendenz, dass es mit steigender Abdeckung der angereicherten Gene im NGS zu einer höheren Variantenanzahl kommt und umgekehrt bei einer prozentual geringeren Abdeckung zu einer niedrigeren Anzahl.

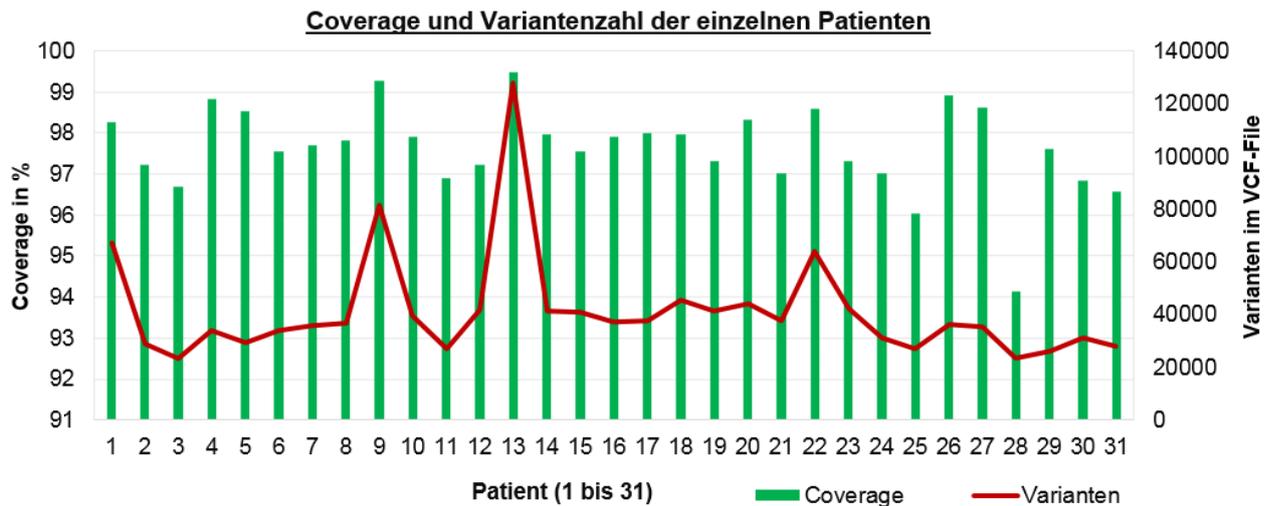


Abbildung 6: Übersicht über die Gesamt-Next-Generation-Sequencing-Abdeckung (Coverage) der einzelnen Patienten (linke Y-Achse) und die Gesamtanzahl der Varianten in der VCF-Datei von PhenIX (rechte Y-Achse)

Es lagen vor der Filterung mit PhenIX pro VCF-Datei durchschnittlich 41297 Varianten vor. Diese Anzahl wich geringfügig mit der Menge der bei GeneTalk aufgeführten Varianten ab (siehe Tabelle 20). Ein Großteil dieser detektierten Veränderungen befand sich in den intronischen und 3'UTR-Bereichen, gefolgt von Missense-Varianten und Veränderungen im 5'UTR-Bereich. Frameshift-, Splicing-, und Stoppmutationen wurden deutlich weniger detektiert (Tabelle 21).

Tabelle 20: Vergleich der Ergebnisse von PhenIX und GeneTalk (DC = krankheitsverursachend)

	PhenIX	GeneTalk
Varianten vor Filterung	41297	41374
- Minimum	23427	23388
- Maximum	127975	127932
Varianten nach Filterung	76	94
- Minimum	55	65
- Maximum	156	137
Patienten mit wahrscheinlich ursächlich identifizierter Mutation (von 31)	26	30
weitere als DC-eingestufte detektierte Varianten	30	72

Nach der Filterung reduzierte sich die Zahl an Varianten auf durchschnittlich 76 bei PhenIX und 94 bei GeneTalk. Bei den durch PhenIX entdeckten Varianten war die potentiell krankheitsverursachende Mutation am häufigsten an erster Stelle aufgeführt. Unter Verwendung von GeneTalk wurden bei 30 Patienten die wahrscheinlich ursächlichen Varianten detektiert, während sich mittels PhenIX lediglich bei 26 Patienten die potentiell pathogene Veränderung fand. Die Mutationen im 5'UTR-Bereich des *IFITM5*-Gens bei P14 und P30 sowie eine weit

intronische Mutation im *COL1A1*-Gen bei P16 wurden durch die PhenIX-Plattform nicht erfasst. Weiterhin wurde die potentiell ursächliche Mutation von Patientin 7, p.Gly12Arg im *BMP1*-Gen, von PhenIX nicht auf den oberen Rängen eingeordnet. Mittels GeneTalk wurde diese Mutation zwar gefunden, allerdings von MutationTaster als Polymorphismus eingeschätzt. Erst eine Datenbankrecherche ergab nachfolgend Publikationen, bei denen diese Veränderung als ursächlich für die autosomal-rezessiv vererbte Osteogenesis imperfecta eingestuft wurde [58]. Zusätzlich detektierte GeneTalk mittels der verwendeten Filtereinstellungen 72 weitere Genveränderungen, die von MutationTaster als potentiell krankheitsverursachend eingeschätzt wurden und den Phänotyp möglicherweise beeinflussen könnten. Bei PhenIX waren es lediglich 30 (siehe Tabelle 20). Einige dieser zusätzlich detektierten Varianten, vor allem die in den Protein-kodierenden- sowie 3'UTR- und 5'UTR-Bereichen gelegenen, sind in Abbildung 7 aufgeführt.

Tabelle 21: Anzahl der vorkommenden Mutationsarten im VCF-File (PhenIX)

Mutationsart	Minimum	Maximum	Durchschnitt
Missense	267	1213	456
Stopgain	5	19	10
Splicing	4	21	10
Frameshift	19	58	31
3'UTR	379	2016	694
5'UTR	161	989	331
intronic	9689	52891	17303

Neben der Abdeckung und der Lesetiefe der untersuchten Region sind für die Beurteilung von NGS-Daten u.a. die Qualität der einzelnen Sequenzen und ihre Zuordnung zum Referenzgenom als Parameter von Bedeutung. Der von PhenIX angegebene Wert zur „NGS-Phred-Qualität“ der einzelnen als ursächlich klassifizierten Varianten lag im Durchschnitt bei 7483, die Lesetiefe bei 372. Insgesamt waren die Werte bei den Mutationen für die autosomal-rezessive OI durchschnittlich höher, als die Werte der gefundenen autosomal-dominanten OI-Fälle (siehe Tabelle 22). Dabei wurden lediglich die 26 Mutationen, die mittels PhenIX gefunden und wahrscheinlich für den Phänotyp ursächlichen waren, in die Auswertung einbezogen.

Tabelle 22: Vergleich der durch PhenIX angegebenen Qualität und Lesetiefe bei den gefundenen ursächlichen Varianten für autosomal-rezessive OI (AR OI) und autosomal-dominante OI (AD OI)

	AD OI	AR OI	Beides
Phred Varianten Qualität	5067	11752	7639
- Minimum	2116	2584	2116
- Maximum	6592	17913	17913
Variant Read Depth	363	394	375
- Minimum	220	295	220
- Maximum	422	482	482

Tabelle 23: Zusammenfassung des Qualitätsberichtes für alle Patienten (ohne P2 und P22)

	Minimum	Maximum	Durchschnitt
Mapped Reads (%)	91,92	98,85	98,06
Unmapped Reads (%)	0,15	8,08	1,93
Länge der Sequenzen (bp)	30	101	100,88

Generell zeigte sich in den aufgearbeiteten NGS-Rohdaten, dass im Durchschnitt 98,1 % aller mittels HiSeq erzeugten Sequenzen dem Referenzgenom zugeordnet werden konnten, was als „*mapped reads*“ bezeichnet wird. Den maximalen Prozentsatz an zuordenbaren Sequenzen wies Patient 8 auf. Lediglich 1,9 % erbrachten im Mittel keine Zuordnung zum Referenzgenom, auch „*unmapped reads*“ genannt. (siehe Tabelle 23). Dabei gilt es zu beachten, dass keine Rohdaten von P2 und P22 für die entsprechende Analyse vorlagen. Den größten Anteil an Sequenzen, die nicht dem menschlichen Referenzgenom zugeordnet werden konnte, wiesen P24, P30 und P28 mit mehr als 8 % auf. Die durchschnittliche Länge der einzelnen mittels HiSeq1500 erzeugten Sequenzen betrug 100,88 Basenpaare.

Patient	Gen	c.DNA oder Protein
P1	ATP6V0A2	p.Thr464Ser
	TBXAS1	p.Arg412Gln
P3	LRP5	p.Arg1556His
P5	LEPRE1	p.Pro506Arg
	LEMD3	p.Arg898His
	FBLN5	c.-152C>T
	FERMT3	p.Glu465Lys
P6	LRP5	p.Leu1163Phe
P8	PLOD2	p.Arg123Cys
P9	BMP1	p.Tyr591*
	LRP4	p.Val865Met
	ALPL	c.*122delC
P10	LRP5	p.Leu1163Phe
P11	SP7	c.*59A>T
P12	PLOD1	p.Glu170Val
	FERMT3	p.Glu465Lys + p.Lys48Asn
P13	CRTAP	p.V2al14Ala
	ALPL	c.*122delC
	FERMT3	p.Glu465Lys
P14	PLOD2	p.Arg123Cys
P15	LRP4	p.Leu640Pro
	MAFB	c.*38C>T
P16	TBXAS1	p.Glu495Lys
	WNT1	p.Arg230His
P17	SP7	c.-62C>A
	FBLN5	c.-152C>T
	ALPL	p.Arg373His

Patient	Gen	c.DNA oder Protein
P18	TNFRSF11B	p.Val281Met
	SLC34A3	p.Gly180Ala
	CASR	p.Asp217Asn
P19	PLOD2	p.Val78Glu
	SLC34A3	p.Arg485Cys
P20	PLOD2	p.Arg123Cys
	TMEM38B	p.Met17Leu
	TBXAS1	p.Arg412Gln
	ACP5	p.Val106Met
	CLCN7	p.Thr117Met
P21	SP7	p.Ala23Val
P22	PLOD2	p.Arg123Cys
P23	ENPP1	c.240+4G>T
P24	CRTAP	p.Val214Ala
P25	LRP4	p.Leu1722His
	MMP2	p.Lys25Met
P26	LRP6	p.Val1374Ile
P27	LRP6	p.Val1374Ile
	FBLN5	c.-152C>T
P28	FBLN5	p.Arg438Gln + c.423_423delG
P29	LRP5	p.Ala400Val
	TBXAS1	p.Glu496Lys
P30	CRTAP	p.Val214Ala
	LRP6	p.Val1374Ile
P31	SERPINF1	p.Pro132Arg
	TCIRG1	p.Glu357Gly

Abbildung 7: Zusätzlich detektierte heterozygote Varianten, die mit den GeneTalk-Filtereinstellungen gefunden und von MT als potentiell pathogen eingeschätzt wurden (P = Patient; c = Veränderung auf c.DNA-Ebene, p = auf Proteinebene)

3.1.1. Detektierte Mutationen für autosomal-dominante Osteogenesis imperfecta

Insgesamt wurden 25 Varianten in Genen für autosomal-dominant vererbte OI, die mittels MutationTaster als potentiell pathogen eingeschätzt wurden, detektiert (siehe Abbildung 8). Davon fanden sich 11 Varianten im Gen *COL1A1* (Tabelle 24), 12 Varianten im Gen *COL1A2* (Tabelle 26) und 2 Varianten im Gen *IFITM5*. Nur 2 Patienten stammten aus konsanguinen Familien. Beide waren weiblich, darunter eine Patientin mit einer Mutation in *COL1A1* (P26) und eine Patientin (P30) mit einer *IFITM5*-Mutation. Bei einem weiteren Patienten mit wahrscheinlich ursächlicher Mutation im *COL1A1*-Gen, P17, war keine entsprechende Angabe zur Konsanguinität in der Familie vorhanden. Insgesamt konnte bei 17 Patienten eine wahrscheinlich ursächliche Mutation in den Genen *COL1A1* und *COL1A2* gefunden werden. Es ergibt sich in der vorliegenden Arbeit eine Detektionsrate von *COL1A1/A2*-Mutationen bei Patienten aus nicht-konsanguinen Familien von 83,3 %. Unter der Annahme, dass bei Patient 17, ohne Angaben zur Blutsverwandtschaft, keine Konsanguinität vorliegt, würde sich die Detektionsrate von *COL1A1/2*-Mutationen aus nicht-konsanguinen Familien bei den untersuchten Patienten folglich auf 84,2 % erhöhen. Im Umkehrschluss betrug die Detektionsrate von *COL1A1*- und *COL1A2*-Mutationen bei konsanguinen Familien lediglich 16,7 %, bzw. 15,8%. Bei allen 19 detektierten autosomal-dominant vererbten Mutationen, die wahrscheinlich ursächlich für den OI-Phänotyp waren, lag dementsprechend nur bei 10,5 % eine angegebene Blutsverwandtschaft in der Familie vor.

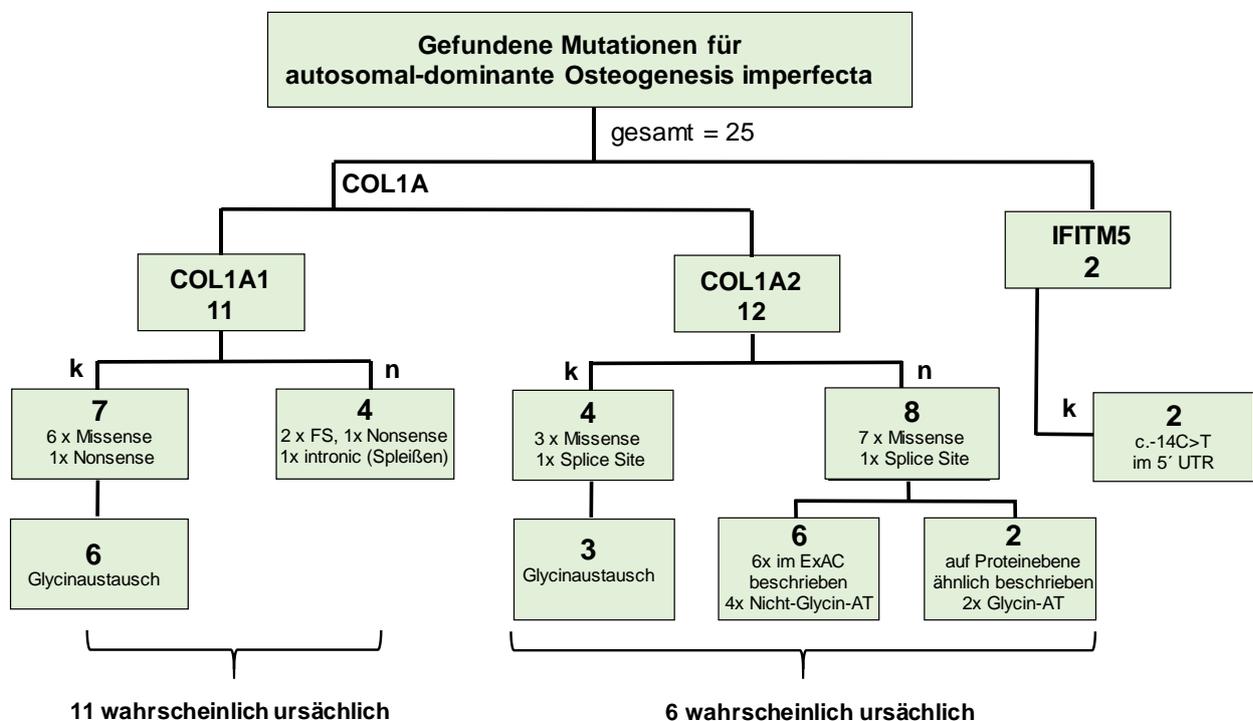


Abbildung 8: Gefundene und mittels MutationTaster als pathogen eingeschätzte Mutationen für autosomal-dominante OI (k = bekannte Mutationen, n = neue Mutationen)

Tabelle 24: Gefundene Varianten der Patienten im *COL1A1*-Gen (als pathogen von MutationTaster eingeschätzt)

Patient	c.DNA	Protein	Exon	Mutation	Quelle	Validierung Familienmitglieder
P10	c.2569G>T	p.Gly857Cys	37	Missense	Marini et al. 2007	Eltern tragen Veränderung nicht
P12	c.608G>T	p.Gly203Val	8	Missense	Cabral et al. 2011	Eltern tragen Veränderung nicht
P13	c.3076C>T	p.Arg1026*	42	Nonsense	Hartikka et al. 2004	betroffene Mutter trägt Mutation ebenfalls heterozygot, Vater trägt
P16	c.2128-14T>A	g.10129T>A	32	Splice Site	-	Mutter trägt Veränderung nicht, DNA vom Vater nicht vorhanden
P17	c.1084G>A	p.Gly362Ser	17	Missense	Belgium/Ghent (Symoens)	betroffener Vater trägt Mutation ebenfalls, Mutter trägt Veränderung
P19	c.3178del	p.Ala1060fs	43	Frameshift	-	nicht betroffener Vater trägt Veränderung ebenfalls, Mutter trägt
P20	c.2461G>A	p.Gly821Ser	36	Missense	Fuccio et al. 2011	Eltern tragen Veränderung nicht
P22	c.3118G>A	p.Gly1040Ser	43	Missense	Sule et al. 2013	Eltern tragen Veränderung nicht
P26	c.3450_3451insT	p.Gly1151fs	47	Frameshift	-	Mutter trägt die Variante, bei ihr 6 Aborte und 1 Fraktur bekannt; Vater trägt die Variante nicht
P27	c.2299G>A	p.Gly767Ser	33	Missense	Marini et al. 2007	Eltern tragen Veränderung nicht
P29	c.253G>T	p.Glu85*	2	Nonsense	-	Eltern tragen Veränderung nicht

Von den 11 Varianten im *COL1A1*-Gen wurden 7 bereits in der Osteogenesis imperfecta Datenbank vermerkt oder in Publikationen beschrieben. Darunter befanden sich 6 Missense-Mutationen, die zu einem Glycinaustausch führen und 1 Nonsense-Mutation, die zu einem vorzeitigen Stoppcodon führt (siehe Abbildung 8). Bei den 6 Missense-Mutationen wurde die unpolare Aminosäure Glycin viermal durch die neutrale, aber polare Aminosäure Serin ausgetauscht (AA-Score 56), einmal durch die polare Aminosäure Cystein (AA-Score 159) und einmal durch die unpolare Aminosäure Valin (AA-Score 109). Alle detektierten Missense-Varianten wurden zusätzlich durch die Datenbank Polyphen2 als wahrscheinlich krankheitsverursachend eingestuft. Die 11 mittels NGS-detektierten Varianten im *COL1A1*-Gen konnten mittels konventioneller Sanger-Sequenzierung bei den Patienten bestätigt werden. Zusätzlich erfolgte, soweit DNA vorhanden war, die Sequenzierung der Eltern. Bei 5 der 7 Patienten (P10, P12, P20, P22, P27) mit bereits beschriebenen Mutationen im *COL1A1*-Gen konnte bei den Eltern die jeweilige Veränderung mittels Sanger-Sequenzierung nicht nachgewiesen werden. Diese sind folglich bei den Patienten höchstwahrscheinlich de novo entstanden. Bei den anderen 2 Patienten mit bereits beschriebenen Mutationen im *COL1A1*-Gen, P13 und P17, zeigte sich jeweils bei einem Elternteil, bei dem ebenfalls das klinische Bild einer Osteogenesis imperfecta imponierte, die detektierte Veränderung in heterozygoter Form.

Die 4 neuen Mutationen wurden bisher weder in der Osteogenesis imperfecta Datenbank beschrieben, noch im 1000-Genome-Projekt oder im ExAC-Browser vermerkt. Unter ihnen befanden sich 2 Frameshift-Mutationen, darunter eine 1bp-große Deletion der Base Guanin an Position 3178 (c.3178delG) in Exon 43 und eine 1bp-große Insertion der Base Thymin an Stelle 3450 (c.3450_3451insT) in Exon 47. Beide konnten mittels Sanger-Sequenzierung bei den Patienten, P19 bzw. P26, bestätigt werden. Die Frameshift-Mutation in Exon 47 wurde bei der

Mutter von P26 mittels Sanger-Sequenzierung ebenfalls nachgewiesen. Bei ihr sind 6 Aborte und eine Fraktur bekannt. In der Familie von P19 mit der Frameshift-Mutation in Exon 43 wurden keine Auffälligkeiten beschrieben. Die Sequenzierung der Eltern erbrachte, dass der Vater die Frameshift-Variante ebenfalls heterozygot aufweist. Obwohl die Frameshift-Variante bisher nicht in Datenbanken aufgeführt wurde, schätzt MutationTaster die Variante als pathogen ein. Bei 3 Patienten mit Osteogenesis imperfecta ist in der OI-Datenbank bereits eine wahrscheinlich ursächliche Missense-Mutation an der gleichen Aminosäurestelle 3451 vermerkt.

Die mittels NGS detektierte und nur mit GeneTalk gefundene intronische Substitution von Thymin zu Adenin 12 Basen vor Exon 32 (c.2128-14T>A) im *COL1A1*-Gen wurde bisher in keiner verwendeten Datenbank beschrieben. Sie konnte mittels Sanger-Sequenzierung bei Patientin 16 bestätigt werden. MutationTaster schätzte die Variante als potentiell pathogen ein und sagte einen Splice-Site-Effekt voraus. Ebenfalls prognostizierte die Software Human Splicing Finder, statt einem HSF-Wert von 52,71 des Wildtyps, einen neuen HSF-Wert der mutierten Region von 81,66. Dementsprechend wurden ein neuer Spleiß-Akzeptor und der Verlust einer ursprünglichen Wildtyp-Akzeptor-Spleiß-Stelle vorhergesagt (siehe Abbildung 9). Bei der Mutter konnte die Veränderung mittels Sequenzierung nicht nachgewiesen werden. DNA vom Vater lag zur entsprechenden Untersuchung nicht vor.

Ebenfalls wurde die bei P29 mittels NGS detektierte Nonsense-Variante p.Glu85* bisher nicht in den verwendeten Datenbanken beschrieben und führt bereits in Exon 2 zu einem vorzeitigem Stopp der Translation. Während sich die Variante im NGS mit 156-mal T zu 166-mal G von insgesamt 322 Reads eindeutig heterozygot präsentierte, zeigte sich bei der Sanger-Sequenzierung lediglich eine schwache ursprüngliche G-Base, die erst mithilfe des Programms Sequencing Analysis sichtbar wurde (Abbildung 10). Die Variante konnte folglich mittels Sanger-Methode validiert werden und bei beiden Eltern des Patienten konnte eine Trägerschaft der Veränderung ausgeschlossen werden.

Predicted signal	Prediction algorithm	cDNA Position	Interpretation
New Acceptor Site	1 - HSF Matrices		Activation of an intronic cryptic acceptor site. Potential alteration of splicing.
	2 - MaxEnt		
Broken WT Acceptor Site	1 - MaxEnt		Alteration of the WT acceptor site, most probably affecting splicing.

Abbildung 9: Analyse der Variante von P16 durch die Software Human Splicing Finder: Es wird mittels der zwei verwendeten Algorithmen (HSF-Matrizes und MaxEnt) die Bildung einer neuen Spleiß-Akzeptorstelle und der Verlust der Wildtyp-Spleiß-Akzeptorstelle vorhergesagt

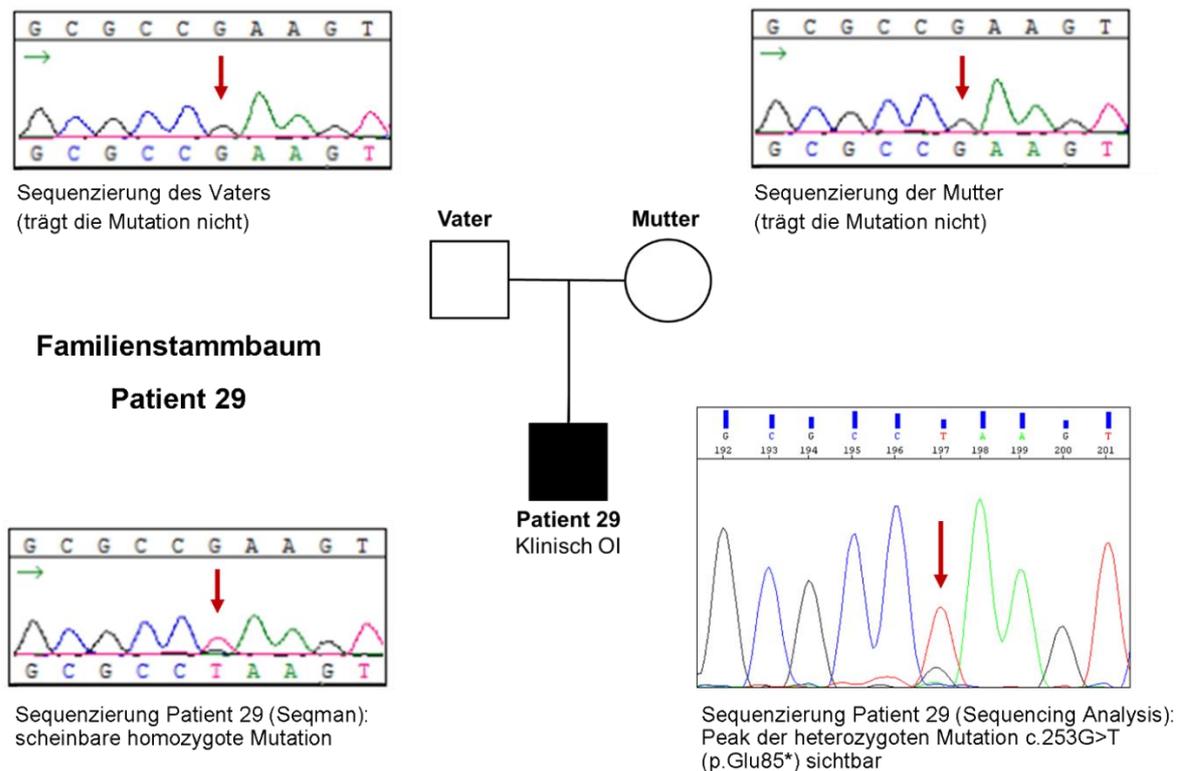


Abbildung 7: Stammbaum von Patient 29 mit Ergebnis der Sanger- Sequenzierung. Während NGS die eindeutig heterozygote Mutation c.253G>T (p.Glu85*) zeigte, war der ursprüngliche G-Peak bei der Sanger-Sequenzierung lediglich schwach ausgeprägt

Da sich auf den ersten Blick eine starke Divergenz in der Ausprägung des Schweregrades bei den Patienten mit detektierten qualitativen- und quantitativen Mutationen im *COL1A1*-Gen zeigte, wurde ein Vergleich der zwei Patientengruppen durchgeführt (siehe Tabelle 25). Von den 11 Patienten mit ursächlichen *COL1A1*-Mutationen wiesen 5 Patienten Mutationen auf, die theoretisch zu quantitativen Kollagendefekten führen. Darunter befanden sich 2 Nonsense-, 2 Frameshift- und 1 Splice-Site-Mutationen. Bei 6 Patienten wurden Missense-Mutationen detektiert, welche qualitative Defekte verursachen könnten.

Die Patienten mit den quantitativen Kollagenmutationen waren im Durchschnitt bei der letzten klinischen Vorstellung 6,15 Jahre alt. Bei der ersten bemerkten Fraktur waren sie im Mittel 31,4 Monate alt, wobei der früheste Beginn mit einem Monat bei Patient 19 angegeben wurde. Die späteste Erstmanifestation wurde bei Patientin 26 mit 6,5 Jahren vermerkt. Die Patienten mit quantitativen Defekten wiesen keine Wirbelkörperfrakturen auf und die Frakturfrequenz pro Jahr betrug gemittelt 1. Durchschnittlich hatten sie bisher 8,7 Frakturen erlitten. Patientin 16 hatte mit 2 Frakturen die bisher geringste Anzahl an Frakturen erlebt und Patient 19 die höchste Anzahl. Alle 5 Patienten mit quantitativen Kollagendefekten hatten blau verfärbte Skleren, keiner wies eine Dentinogenesis imperfecta auf. Die Patienten mit den detektierten quantitativen Defekten erreichten im Durchschnitt bei der Schweregrad-Angabe der Deformierung 1,6 von 4 Punkten. Auffällig war, dass jeweils nur die untere Extremität von den Verformungen betroffen war.

Tabelle 25: Vergleich der klinischen Merkmale bei Patienten mit quantitativen und qualitativen *COL1A1*-Defekten
(n = Anzahl der Patienten pro Gruppe)

Klinische Merkmale	Quantitative Defekte (n =5)	Qualitative Defekte (n = 6)
Alter bei letzten Vorstellung (in Jahre)	6,15	11,19
Alter bei ersten Fraktur (in Monaten)	31,4	6
Frakturfrequenz pro Jahr	1	1,67
Anzahl bisheriger Frakturen	8,7	25,08
Schweregrad der Verbiegungen (0-4 Punkte möglich)	1,6	3,2
Patienten mit blauen Skleren (in %)	100	83,3
Patienten mit DI (in %)	0	50
Patienten mit Wirbelkörperfrakturen (in %)	0	66,67

Im Vergleich dazu wiesen die 6 Patienten mit den wahrscheinlich ursächlichen qualitativen Kollagendefekten einen schwereren Phänotyp der Osteogenesis imperfecta auf. Sie waren im Schnitt mit 11,19 Jahren bei der letzten klinischen Vorstellung 5 Jahre älter als die Patienten mit den quantitativen Defekten, zeigten aber mit 25,1 Frakturen eine deutlich höhere Frakturanzahl, wobei die geringste Anzahl P10 mit 5 Frakturen und die höchste P22 mit 50 Frakturen aufwies. Durchschnittlich waren sie bei der ersten Fraktur mit 6 Monaten deutlich jünger als die Patienten mit den quantitativen Defekten mit 31,4 Jahren. Bereits bei der Geburt präsentierte sich bei 4 von den 6 Patienten die erste Fraktur (P20, P22, P27 und P10). Die 6 Patienten mit den qualitativen Defekten im *COL1A1*-Gen hatten im Durchschnitt schwerere Verbiegungen der Röhrenknochen mit 3,2 von 4 Punkten (+1,6 Punkte mehr als die Gruppe mit den quantitativen Defekten) und 4 von 6 Patienten wiesen auch Verformungen an den oberen Extremitäten auf. Es hatten 5 von 6 blaue Skleren und 3 Patienten zeigten eine Dentinogenesis imperfecta. Zwei Drittel der Patienten zeigten Wirbelkörperfrakturen. Alle entsprechenden Daten sind in den Tabellen 15 bis 17 aufgeführt. In beiden Gruppen, den der qualitativen und der quantitativen Defekte, war je ein Patient mit noch einer weiteren von MutationTaster als pathogen eingeschätzten Mutation im *COL1A2*-Gen vorhanden (P19 und P27), die jedoch bereits im ExAC-Browser beschrieben wurden, aber dennoch den Phänotyp beeinflussen könnten.

Von den 12 detektierten Varianten im *COL1A2*-Gen waren 4 bereits in der Osteogenesis imperfecta Datenbank und Publikationen bekannt. Darunter befanden sich 3 Missense-Mutationen, die alle zu einem Glycinaustausch führten und eine Mutation, welche das alternative Spleißen beeinflusste. Sie sind daher sehr wahrscheinlich für den OI-Phänotyp bei den betreffenden Patienten ursächlich. Von den 8 neu gefundenen Varianten, die noch nicht in der OI-Datenbank vermerkt sind, waren 6 bereits im ExAC-Browser und 1000-Genome-Projekt aufgeführt. Dennoch wurden sie von MutationTaster als potentiell pathogen eingestuft. 4 der 6 Varianten waren Missense-Varianten, die zu einem Nicht-Glycinaustausch führten, sondern die

Tabelle 26: Gefundene Varianten bei einzelnen Patienten im *COL1A2*-Gen (als pathogen eingeschätzt durch MT)

Patient	c.DNA	Protein	Exon	Mutation	Quelle/n	Validierung Familienmitglieder
P1	Exon 12+5T>A	g.11748A>T	12	Splice Site	ExAC Browser	Eltern tragen Veränderung heterozygot
P4	c.2565+1G>A	g.28559G>A	40	Splice Site	Lee et al. 2006	Eltern tragen Veränderung nicht
P9	c.2918G>A	p.Gly973Asp	44	Missense	Stephen et al. 2014	Vater trägt die Veränderung heterozygot, Mutter trägt die Veränderung nicht
P11	c.1285G>C	p.Ala429Pro	23	Missense	2xExAC, 1x1000 Genom	Eltern tragen die Veränderung nicht
P14	c.2563G>A	p.Ala855Thr	40	Missense	8x 1000 Genom, 38x ExAC-Browser	Mutter trägt die Veränderung heterozygot, Vater trägt die Veränderung nicht
P15	c.2563G>A, c.1045G>T	p.Ala855Thr, p.Gly349Cys	40 20	Missense	Wenstrup et al. 1991	Eltern tragen die Veränderung nicht
P19	c.2777G>A	p.Arg926His	42	Missense	5x im Exac Browser	Mutter trägt Veränderung ebenfalls, Vater trägt die Veränderung nicht
P21	c.875G>A	p.Gly292Asp	17	Missense	c.874G>A (p.Gly929Asp) beschrieben	Schwester und Mutter tragen die Veränderung nicht, DNA vom Vater nicht vorhanden
P24	c.2314G>A	p.Gly772Ser	38	Missense	Marini et al. 2007	betroffene Schwester trägt Veränderung, Vater trägt sie nicht, DNA der Mutter nicht vorhanden
P25	c.577G>T	p.Gly193Cys	12	Missense	p.Gly193Ser und p.Gly193Arg bekannt	Eltern tragen die Veränderung nicht
P27	c.3313G>A	p.Gly1105Ser	49	Missense	7x 1000Genom, 118x ExAC	Vater trägt die Veränderung homozygot, Mutter nicht Trägerin

stark basische Aminosäure Arginin durch die schwach basische Aminosäure Histidin austauschten bzw. die unpolare Aminosäure Alanin durch Prolin oder Threonin ersetzten. Sie wurden bei den Patienten mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt. Da diese Varianten bereits im ExAC-Browser oder 1000-Genome-Projekt vermerkt waren, wurden sie als wahrscheinlich nicht primär ursächlich für den Phänotyp der OI bei den Patienten angesehen. Zusätzlich bestätigte sich diese Annahme bei einigen Patienten, als mittels Sequenzierung der nicht betroffenen Eltern bei diesen die Veränderung ebenfalls nachgewiesen werden konnte. Gleiches gilt beispielsweise für die bereits im ExAC-Browser vermerkte Splice-Site Mutation bei Patient 1. Da der Patient eine wahrscheinlich ursächliche Mutation im Gen *FKBP10* aufwies und die Eltern ebenfalls die *COL1A2*-Variante 5 Basen nach Exon 12 heterozygot zeigten, wurde die Variante als nicht krankheitsverursachend eingeschätzt. Zusätzlich sagte die Datenbank Human Splicing Finder im Vergleich zu MutationTaster keine Beeinträchtigung des alternativen Spleißens voraus. Die detektierten Mutationen von P21 und P25 sind auf cDNA-Ebene bisher nicht bekannt, jedoch auf Proteinebene bereits ähnlich oder gleich in der Osteogenesis imperfecta Datenbank beschrieben (siehe Tabelle 26). Sie führen jeweils zu einem Austausch der Aminosäure Glycin. Mithilfe der Sanger-Sequenzierung konnten beide Varianten bei den Patienten validiert werden. Die untersuchten Familienmitglieder zeigten die Veränderung in der Sequenzierung nicht.

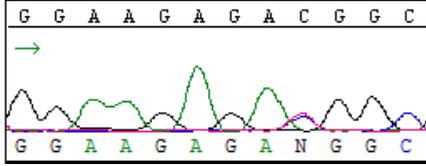
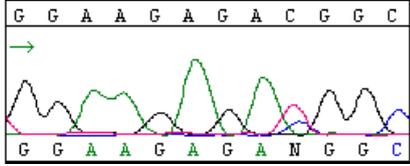
Eine Phänotyp-Genotyp-Korrelationsanalyse erschien aufgrund der geringen Anzahl der wahrscheinlich tatsächlich ursächlichen Veränderungen im *COL1A2*-Gen bei 6 Patienten nicht sinnvoll und wurde aus diesem Grund unterlassen.

Zusätzlich wurden bei P28 und 29 in Exon 34 des *COL1A2*-Gens jeweils längere Insertionen, beginnend auf cDNA-Ebene an Position 2063 bis 2069, detektiert, die ebenfalls von PhenIX und GeneTalk aufgeführt wurden. Auffällig war, dass sich die Varianten im Programm IGV lediglich als kurze Sequenzen mit kaum bis keinen Überlappungen der übrigen Sequenz-Reads präsentierten und besonders häufig abgedeckt wurden. Mit einer durchschnittlichen von PhenIX angegebenen „*Variant read depth*“ von 451 waren sie zusätzlich deutlich über dem Durchschnitt der anderen 26 gefundenen pathogenen Varianten mit 372 (+79). Die angegebene „*Phred variant quality*“ von PhenIX war mit durchschnittlich 1945 jedoch deutlich geringer als die der anderen gefundenen pathogenen Varianten. Diese Insertionen konnten mittels Sanger-Sequenzierung nicht bestätigt werden. Die Analyse mit der Nucleotide BLAST-Datenbank ergab eine größere Übereinstimmung mit verschiedenen Bakterienstämmen.

Die beiden Patientinnen, bei denen mittels NGS die bereits in der Literatur bekannte Variante c.-14C>T im 5'UTR-Bereich des *IFITM5*-Gens detektiert wurde, waren bei der klinischen Vorstellung in Indien 9 (P14) bzw. 13 Jahre alt (P30). Beide hatten bereits eine große Anzahl an Frakturen, wobei Patientin 14 ihre erste Fraktur erstmalig mit 1,5 Jahre erlitt und eine Frakturfrequenz von 1 Fraktur pro Jahr zeigte. Patientin 30 erschien mit durchschnittlich 2 Frakturen pro Jahr und der ersten vermerkten Fraktur bereits im Alter von 2 Monaten stärker betroffen zu sein. Zudem zeigte sie vertebrale Kompressionsfrakturen und eine stark ausgeprägte Skoliose/Kyphoskoliose. Beide Patientinnen wiesen starke Deformierungen und Verkürzungen der langen Röhrenknochen mit 4 von 4 Punkten bei der Schweregrad-Einschätzung auf. Zusätzlich hatten sie blaue Skleren und die für beschriebene *IFITM5*-Mutationen typische hyperplastische Kallusbildung. Bei Patientin 30 war zudem eine Radiuskopfdisklokation vermerkt.

Die Sanger-Sequenzierung bestätigte die Mutation c.-14C>T bei beiden Patientinnen (siehe Tabelle 27). Da bei beiden Patientinnen die Eltern die *IFITM5*-Variante nicht aufwiesen, liegt eine mögliche de novo Entstehung nahe. Mithilfe des NGS wurde bei Patientin 14 zusätzlich die oben aufgeführte Mutation heterozygot im *COL1A2*-Gen, p.Ala855Thr, und die Variante p.Arg123Cys im *PLOD2*-Gen detektiert. Bei Patientin 30 fand sich ergänzend heterozygot die Mutation p.Val214Ala im *CRTAP*-Gen. Alle 3 Varianten wurden von MutationTaster als potentiell pathogen klassifiziert und könnten folglich den Phänotyp beeinflussen.

Tabelle 27: Übersicht über die beiden Patientinnen, bei denen die *IFITM5*-Mutation im 5'UTR-Bereich für autosomal-dominant vererbte OI detektiert wurde (DI = Dentinogenesis imperfecta)

	Patient 14	Patient 30
Alter bei erster Fraktur	1,5 Jahre	2 Monate
Anzahl Frakturen	multiple Frakturen	über 20 Frakturen
Klinische Auffälligkeiten	Deformierungen und Verkürzungen der Extremitäten, Hypermobilität der Gelenke, Hyperplastische Kallusbildung, leichte blaue Skleren, milde DI	vertebrale Kompressionsfrakturen, Deformierungen und Verkürzungen der Extremitäten, schwere Skoliose/Kyphoskoliose, hyperplastische Kallusbildung, radiografisch sichtbare Popkorn-Kalzifikationen, Z-Score -9, blaue Skleren, Radiuskopfdislokation
Validierung im Labor	 <p>IFITM5-Mutation c.-14C>T</p>	 <p>IFITM5-Mutation c.-14C>T</p>

3.1.2. Detektierte autosomal-rezessive OI-Mutationen mit Patientenbeschreibung

Mittels NGS wurden bei 11 Patienten Mutationen in bekannten Genen für autosomal-rezessive Osteogenesis imperfecta detektiert. Von diesen 11 Patienten stammte der Großteil mit 9 Patienten aus konsanguinen Familien, was 81,8 % entspricht (siehe Tabelle 28). Bei den beiden verbliebenen Patienten aus nicht-konsanguinen Familienverhältnissen wies einer, Patient 11, eine compound-heterozygote Variante auf. Die andere Patientin, P7, stammte aus einer Familie, in der ein weiteres betroffenes Familienmitglied vermerkt war, obwohl keine Konsanguinität beschrieben wurde. Insgesamt waren bei 4 von 11 Patienten mit detektierter autosomal-rezessiv-vererbter OI weitere Familienangehörige vom Krankheitsbild betroffen. Es fanden sich bei jeweils 3 Patienten wahrscheinlich ursächliche Mutationen in den Genen *FKBP10* und *WNT1*, bei 2 Patienten potentiell pathogene Varianten in den Genen *SERPINF1* und *LEPRE1* und bei einem Patienten eine eventuell krankheitsverursachende Mutation im Gen *BMP1* (siehe Abbildung 11). Bei 6 von 11 Patienten wurden neue Varianten, die noch nicht in der Osteogenesis imperfecta Datenbank aufgeführt wurden, entdeckt. Allerdings war bei einem Patienten die Variante heterozygot im ExAC-Browser aufgeführt und eine andere Variante war zumindest auf Proteinebene bereits bekannt. 6 von 11 Patienten hatten Mutationen mit kleinen Insertionen oder Deletionen von Basen (Frameshift- und Nonframeshift-Varianten), die wahrscheinlich zu dem Phänotyp führen. Es fand sich lediglich bei einem Patienten eine homozygote Missense-Variante, ebenso bei einem Patienten eine homozygote Splice-Site-Variante. Bei einem Patient wurde eine compound-heterozygote Splice-Site- und Nonsense-Variante detektiert. Bei 2 Patienten fanden sich homozygote Varianten, die zu einem vorzeitigen Stoppcodon führen.

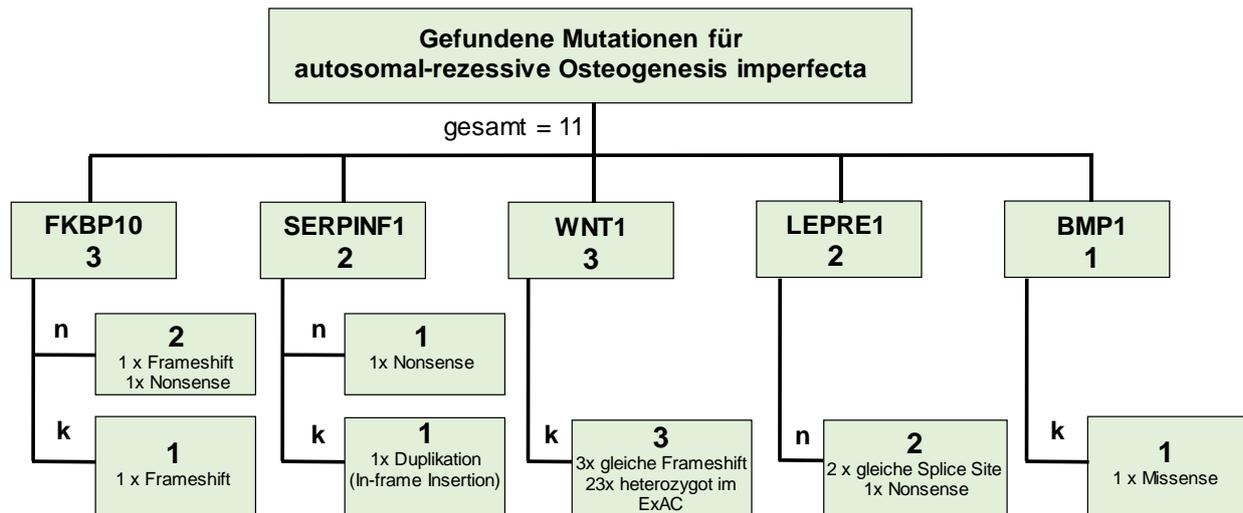


Abbildung 8: Gefundene Mutationen für autosomal-rezessive Osteogenesis imperfecta
(Compound-heterozygote Mutation gilt als 1 Mutation, n =neu, k = bekannt)

Die 3 Patienten mit wahrscheinlich ursächlichen Mutationen im *FKBP10*-Gen wurden in Indien klinisch dem Bruck-Syndrom zugeordnet. Sie stammten aus konsanguinen Familien und bei 2 von 3 war ein weiteres Familienmitglied zusätzlich betroffen. Das Erscheinungsbild war geprägt durch Gelenkkontrakturen, Deformierung der Femora und Verkürzung der Extremitäten. Es waren keine extraskeletalen OI-Manifestationen wie Dentinogenesis imperfecta, blaue Skleren oder eine Beeinträchtigung des Gehörs vermerkt. Bei Patient 1 wurden die Mutationen c.1479_1480delCC und c.1481_1482insCAG homozygot in Exon 9 detektiert. Sie wurden bei der Auswertung als eine Frameshift-Mutation zusammengefasst und sind bisher weder im ExAC-Browser noch im 1000-Genome-Projekt vermerkt. Die Variante wurde von MutationTaster als krankheitsverursachend eingeschätzt und befindet sich in einer konservierten Region. Bei der Sanger-Sequenzierung konnte die Variante bestätigt werden. Beide Eltern waren heterozygote Anlageträger (siehe Abbildung 13).

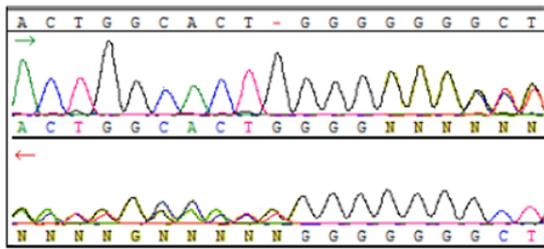
Bei Patientin 2 fand sich mittels NGS die noch nicht beschriebene homozygote Nonsense-Mutation c.1672C>T (p.Gln558*) in einem konservierten Bereich von Exon 10, die mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt werden konnte. Die Mutter ist heterozygote Trägerin der Variante, DNA des Vaters oder weiterer Familienangehöriger lag nicht vor. Jedoch war bekannt, dass eine mütterliche Tante ebenfalls vom Krankheitsbild der Osteogenesis imperfecta betroffen ist.

Die bereits in der Literatur beschriebene Variante c.824_825insC, die bei Patient 3 detektiert werden konnte, wurde ebenfalls mittels Sanger-Sequenzierung validiert. Beide Eltern sind heterozygote Anlageträger. Aus der weiteren Familienanamnese geht hervor, dass ein Bruder und eine Schwester des Patienten ebenfalls von einer OI betroffen sind.

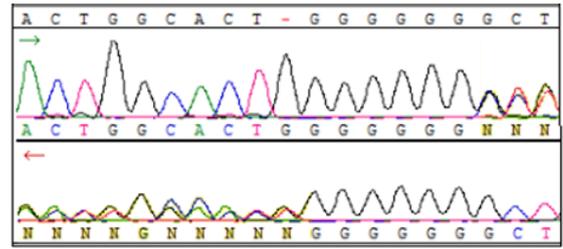
Die beiden OI-Patienten mit Mutationsfunden im *SERPINF1*-Gen unterschieden sich im Schweregrad der Krankheitsausprägung, obgleich beide aus konsanguinen Familien stammten und keine weiteren betroffenen Familienmitglieder vermerkt wurden. Patient 23 hatte mit 12 Jahren bisher 8-10 Frakturen erlitten (im Schnitt 1 Fraktur pro Jahr), einen Z-Wert von -1 und zeigte keine Wirbelkörperfrakturen und keine Skoliose. Neben Verbiegungen der Femora und Humeri (2 von 4 Punkten bei der Schweregradeinteilung), wies er eine bilaterale postaxiale Hexadaktylie auf. In den bildgebenden Verfahren zeigte sich eine metaphysäre Dichtebande. Patient 23 war homozygoter Träger der bereits in der Literatur beschriebenen Variante c.271_279dupGCCCTCTCG. Diese wurde von MT im Transkript ENST00000572916 intronisch als pathogen eingeschätzt. Im häufiger vorkommenden Transkript ENST00000254722 liegt sie im Exon 3 und wird als Polymorphismus klassifiziert. Human Splicing Finder sagte an der Stelle der Insertion mit mehreren verwendeten Algorithmen einen ursprünglichen Exonic Splicing Enhancer voraus, der durch die Mutation verloren geht und prognostizierte an einer neuen Stelle die Entstehung eines Exonic Splicing Enhancers, was den Splicing Prozess beeinträchtigen könnte. Die Variante ließ sich mittels Sanger-Sequenzierung bestätigen und beide nicht betroffenen Eltern waren heterozygote Anlageträger der Veränderung (siehe Abbildung 13).

Patientin 5, bei der ebenfalls eine *SERPINF1*-Mutation detektiert werden konnte, hatte mit 7 Jahren bereits an die 15 Frakturen erlitten, davon durchschnittlich 3 Frakturen pro Jahr. Sie zeigte Verbiegungen der Ober- und Unterschenkel sowie der Ober- und Unterarme (4 von 4 Punkte der Schweregradeinteilung). Zusätzlich wurde eine sehr schwere Osteopenie und ein Z-Wert von -5 vermerkt. Die Patientin hatte weiterhin Wirbelkörperfrakturen, eine Skoliose und popkornartige Kalzifikationen. Die bei ihr detektierte Mutation in Exon 6 des *SERPINF1*-Gens, c.648_651insC, führt zu einem vorzeitigen Stoppcodon an Aminosäureposition 217 (p.Trp217*). Auch wenn die Veränderung auf c.DNA-Ebene neu ist und noch keine Dateneinträge im 1000-Genome-Projekt oder ExAC-Browser vorhanden sind, wurde die Variante auf Proteinebene aufgrund einer Basensubstitution, die ebenfalls zu dem vorzeitigen Stoppcodon führt, bereits in der OI-Datenbank als ursächlich aufgeführt. Die Validierung mittels Sanger-Sequenzierung erfolgte und beide Eltern konnten als heterozygote Anlageträger identifiziert werden. Zusätzlich wurden mittels NGS und der anschließenden bioinformatischen Auswertung heterozygote Veränderungen bei der Patientin im *LEPRE1*-Gen gefunden. Darunter befand sich die mittlerweile von MutationTaster als Polymorphismus eingeschätzte Variante p.Glu27Lys und die Variante p.Pro506Arg heterozygot in Exon 9, die obwohl sie bereits 50-mal im ExAC-Browser beschrieben ist, von MT als potentiell pathogen eingestuft wird. Beide Varianten wurden mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt und werden ebenfalls vom Vater getragen, der zusätzlich noch heterozygoter Träger der Variante c.1346-1G>C ist.

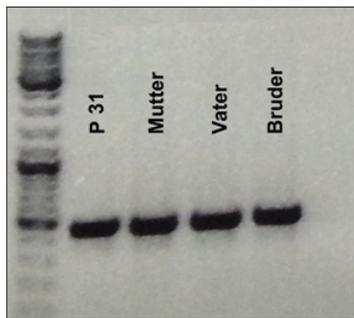
Bei den 3 Patienten (P6, P18 und P31) mit detektierten homozygoten Veränderungen im *WNT1*-Gen, fand sich jeweils die gleiche Variante c.499_500insG, die zu einer Frameshift-Mutation ab Aminosäureposition 170 führt. Die Veränderung wird in der Literatur auch als c.506dupG beschrieben. Alle 3 Patienten stammten aus konsanguinen Familien und die Sanger-Sequenzierung im Labor bestätigte die Mutationen sowie eine Anlageträgerschaft der Eltern bei P31 und P18. Bei P6 konnte lediglich die Mutter zusätzlich sequenziert werden und es zeigte sich bei ihr die Variante heterozygot, DNA des Vaters war nicht vorhanden. In der Familie von P31 ließ sich zusätzlich bei dem betroffenen Bruder die gleiche Mutation mittels Sequenzierung homozygot nachweisen (siehe Abbildung 12). Patient 6 war bei der Vorstellung in Indien 8 Jahre alt und zeichnete sich durch eine sehr schwere Osteopenie, starke Verformungen der Extremitäten (4 von 4 Punkte), gebogene Rippen sowie einen Z-Wert von -4 aus. Es lagen Wirbelkörperfrakturen und blaue Skleren vor. Die erste Fraktur erlitt er mit 2 Monaten, bisher wurden insgesamt 8 Frakturen vermerkt. Zusätzlich zu der homozygoten Veränderung im *WNT1*-Gen, fand sich eine heterozygote Missense-Variante im *LRP5*-Gen, die ebenfalls als potentiell pathogen von MT eingeschätzt wurde. Ebenso wie bei P31, zeigte sich bei P8 eine metaphysäre Dichtebande. Zudem war der Phänotyp der 7-jährigen Patientin 31 durch eine progressive Verformung und Verkürzungen der Extremitäten (4 von 4 Punkten), eine starke Skoliose, blaue Skleren, bisher ca. 7 Frakturen (im Schnitt 1 pro Jahr) und einen Z-Wert von -5 charakterisiert. Mittels NGS und GeneTalk wurde zusätzlich zu der *WNT1*-Mutation noch die Variante p.Pro132Arg im *SERPINF1*-Gen heterozygot detektiert. P18 war zum Zeitpunkt der Vorstellung in Indien der jüngste der drei Patienten mit 8 Monaten und hatte bereits am 11. Lebensstag die erste Fraktur erlitten. Die langen Röhrenknochen zeigten eine Erlenmeyer-artige Verformung an den Oberschenkel und Oberarmen. Der Z-Wert lag bei -6 und die Patientin hatte keine blauen Skleren.



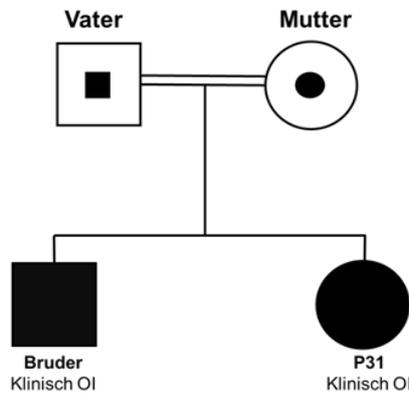
Sequenzierung Vater (heterozygoter Anlageträger)



Sequenzierung Mutter (heterozygote Anlageträgerin)

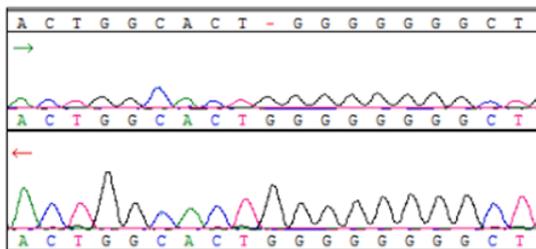


Gelelektrophorese



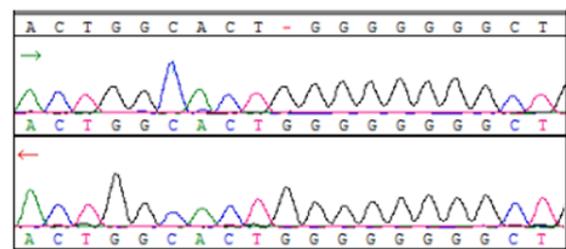
Familienstammbaum

P31



Sequenzierung Bruder

(homozygote Mutation c.499_500insG)



Sequenzierung P31

(homozygote Mutation c.499_500insG)

Abbildung 9: Familienstammbaum von Patientin 31 mit Validierung der gefundenen Frameshift-Mutation im WNT1-Gen und entsprechender Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Die beiden detektierten Varianten im *LEPRE1*-Gen waren weder im 1000-Genome-Projekt noch im ExAC-Browser vermerkt. Da sie keinen Eintrag in der OI-Datenbank hatten, wurden sie als neu klassifiziert. Bei Patient 8 fand sich die homozygote Variante c.1346-1G>C, die von MT als pathogen eingestuft wurde. Human Splicing Finder prognostizierte einen Spleiß-Akzeptorverlust. Zusätzlich wurden noch Enhancer- und Silencer-Motive durch einige Algorithmen in der Region vermutet. Der 3,5-jährige Patient stammt aus einer konsanguinen Familie und zeigte schwere Deformierungen der Extremitäten (4 von 4 Punkte) mit einer Frakturfrequenz von 4-5 Frakturen pro Jahr. Es wurden keine Wirbelkörperfrakturen vermerkt. Mittels Sanger-Sequenzierung konnte die Variante bei ihm validiert werden. Die Eltern sind heterozygote Anlageträger. Bei Patient 11 fanden sich die compound-heterozygoten Varianten c.2143C>T, die an Aminosäureposition 715 zu einem Stoppcodon führt, und die bereits oben genannte Splice-Site-Variante c.1346-1G>C. Beide Eltern, nicht konsanguin, zeigten in der Sequenzierung jeweils eine der Varianten (siehe

Abbildung 13). Der 17 Jahre alte Patient hatte mittlerweile mehr als 30 Frakturen erlitten mit einer Frequenz von etwa 2 Frakturen pro Jahr. Vermerkt waren unter anderem starke Deformierungen und Verkürzungen der Extremitäten (4 von 4 Punkte) mit stärkerer Beteiligung der linken Seite, Wirbelkörperfrakturen, ein Z-Score von -7 (Größe) und die Auffälligkeit, dass Ulna und Radius nicht miteinander verbunden waren mit einer resultierenden Radiusdislokation.

Die detektierte homozygote Variante c.34G>C (p.Gly12Arg) im *BMP1*-Gen konnte mit den im Methodikteil verwendeten Suchkriterien anfänglich nicht als mögliche Ursache für den OI-Phänotyp identifiziert werden. Sie wurde zwar in GeneTalk aufgeführt, jedoch als Polymorphismus durch MutationTaster und Polyphen2 klassifiziert. Da die Variante aber in der Osteogenesis imperfecta Datenbank bei mehr als 4 Patienten mit OI beschrieben wurde, konnte sie dennoch als wahrscheinlich ursächlich für den hier vorliegenden Phänotyp angesehen werden. Die betroffene Patientin, P7, war 6,75 Jahre alt und zeigte eine relativ milde Osteopenie. Die erste Fraktur erlitt sie im Alter von einem Jahr. Sie zeigte blaue Skleren und radiologisch wurde eine metaphysäre Dichtebande beschrieben. Der Z-Wert lag im Normalbereich und es wurde eine Alendronat-Therapie angegeben. Verformungen der Knochen beschränkten sich auf die untere Extremität. Die Variante konnte mittels Sanger-Sequenzierung validiert werden und beide nicht-konsanguinen Eltern waren heterozygote Anlageträger. Ein Cousin sei ebenfalls von einer schwerer Osteogenesis imperfecta betroffen.

Tabelle 28: Übersicht der Patienten mit gefundenen wahrscheinlich ursächlichen Mutationen in Genen für autosomal-rezessive Osteogenesis imperfecta

	P1	P2	P3	P5	P6	P7	P8	P11	P18	P23	P31
Klinisches Bild	Bruck-Syndrom	Bruck-Syndrom	Bruck-Syndrom	OI	OI	OI	OI	OI	OI	OI	OI
Alter	8 Jahre	12 Jahre	5 Jahre	7 Jahre	8 Jahre	6,25 Jahre	3,5 Jahre	17 Jahre	8 Monate	12 Jahre	7 Jahre
Anzahl klinischer Frakturen	8 bis 9	10 bis 11	ca. 2	ca. 15	ca. 8	multiple	ca. 10 bis 16	über 30	ca. 4	8 bis 10	ca. 7
Alter bei ersten Fraktur	Geburt	1,5 Jahre	NA	6 Monate	2 Monate	1 Jahr	frühe Kindheit	1 Monat	11. Lebensstag	9 Monate	8 Monate
Frakturen pro Jahr	1	1	2	3	1	1	4 bis 5	2	4	1	1
sonstige Auffälligkeiten	Gelenkkontrakturen	Gelenkkontrakturen	Gelenkkontrakturen	schwere Osteopenie, Verbiegungen der Extremitäten	schwere Osteopenie, Verbiegungen der Extremitäten, Rippen, blaue Skleren	relativ milde Osteopenie, blaue Skleren	Verbiegungen der Extremitäten	schwere Verbiegung und Verkürzung der Extremitäten	milder obstruktiver Hydrozephalus, Erlenmeyerverformung der langen Röhrenknochen	bilaterale postaxiale Polydaktylie, Zahnengstand bei bleibenden Milchzähnen	Verbiegungen der Extremitäten, Skoliose, blaue Skleren
Familienanamnese	konsanguin	konsanguin, mütterliche Tante betroffen	konsanguin, Bruder+Schwester betroffen	konsanguin	konsanguin	nicht konsanguin, Cousin betroffen	konsanguin	nicht konsanguin	konsanguin	konsanguin	konsanguin, Bruder betroffen
ursächliches Gen	FKBP10	FKBP10	FKBP10	SERPINF1	WNT1	BMP1	LEPRE1	LEPRE1	WNT1	SERPINF1	WNT1
c.DNA	c.1479_1480delCC+ c.1481_1482insCAG	c.1672C>T	c.824_825insC	c.648_651delGTGG	c.499_500insG	c.34G>C	c.1346-1G>C	c.1346-1G>C+ c.2143C>T	c.499_500insG	c.271_279dupGCC CTCTCG	c.499_500insG
Proteinebene	p.Leu494Valfs*13	p.Gln558*	p.Gly278Argfs*95	p.Trp217*	p.Cys170Leufs*6	p.Gly12A>g	-	p.Gln715*	p.Cys170Leufs*6	p.Ala91_Ser93dup	p.Cys170Lysis*6
Mutations-effekt	Frameshift	Nonsense	Frameshift	Nonsense	Frameshift	Missense	Splice Site	Splice Site + Nonsense	Frameshift	In-Frame-Duplikation	Frameshift
Quelle	-	-	Kelley et al. 2011	-	Pyott et al.2013	Asharani et al. 2012	-	-	Pyott et al.2013	Tucker et al. 2012; Rauch et al. 2012	Pyott et al.2013
Segregation	Eltern heterozygot	Mutter heterozygot, Vater fehlt	Eltern heterozygot	Eltern heterozygot	Mutter heterozygot, Vater fehlt	Eltern heterozygot	Eltern heterozygot	Eltern heterozygot	Eltern heterozygot	Eltern heterozygot	Eltern heterozygot, betroffener Bruder auch homozygot

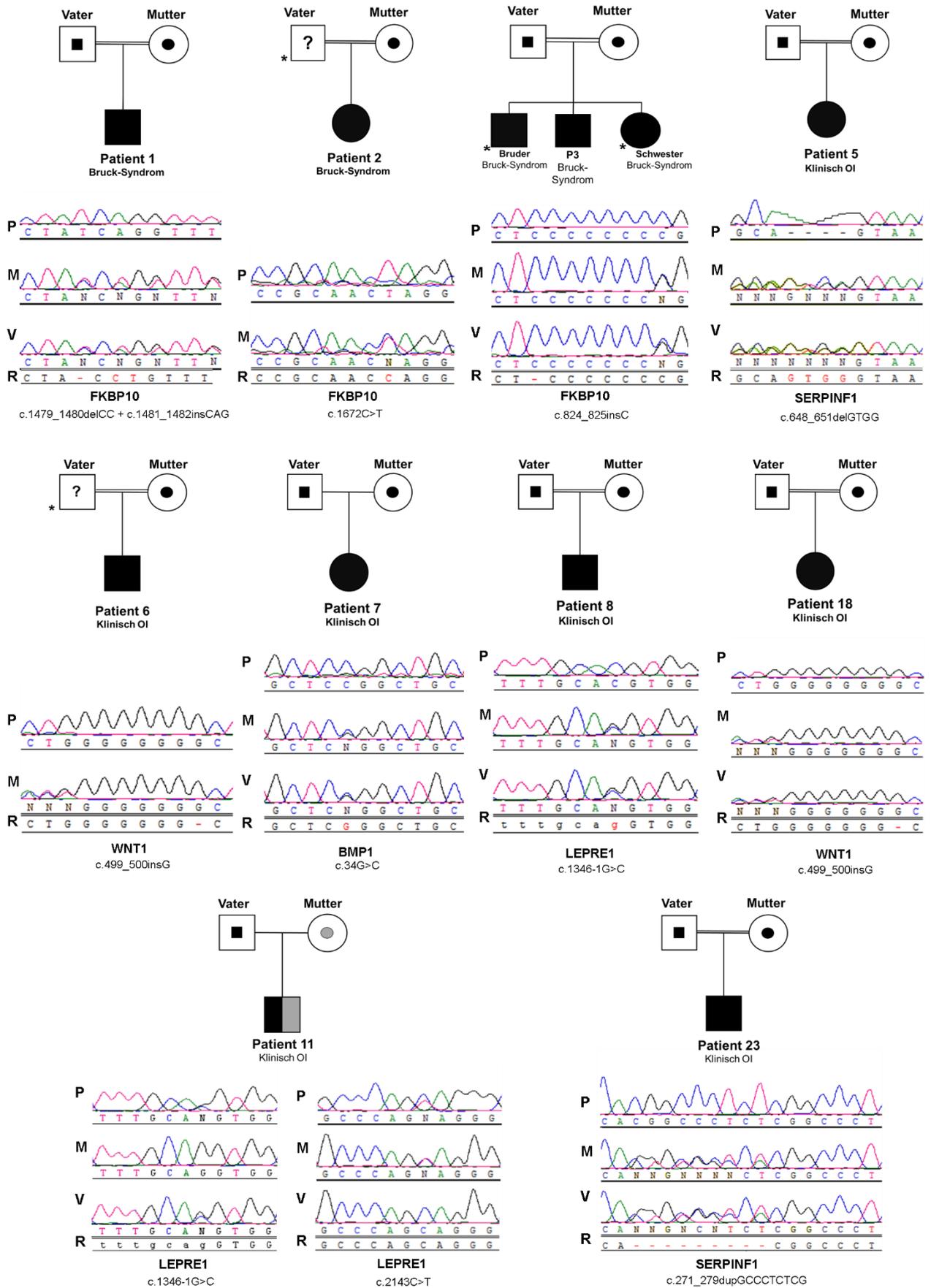


Abbildung 10: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierungen der autosomal-rezessiven OI-Fälle mit Eltern (P = Patient, M = Mutter, V = Vater, R = Referenz, * = DNA nicht vorhanden)

3.2. Ergebnisse der *PLS3*-Untersuchung und Sequenzierung

Bei den 37 Patienten mit juveniler oder frühmanifestester Osteoporose, bei denen die Hochdurchsatzsequenzierung mit dem Bone Mass Panel keine ausreichend ursächliche Genveränderungen für den Phänotyp der erniedrigten Knochenmineraldichte erbrachte, erfolgte die Nachsequenzierung des im Panel noch nicht enthaltenen *PLS3*-Gens. Die Patientenproben wurden von mehreren deutschen Instituten zur Verfügung gestellt. Unter den 37 Patienten waren 25 männlichen und 12 weiblichen Geschlechtes. Diese waren bei der Diagnostik durchschnittlich 37 Jahre alt (Stand vom 22.08.2015). Die männlichen Patienten hatten im Mittel ein Alter von 35 Jahren, wobei der jüngste Patient ein Alter von 2 Jahren aufwies und der älteste Patient 56 Jahre alt war. Bei den Frauen war das durchschnittliche Alter mit 42 Jahren im Vergleich zu den männlichen Patienten um etwa +7 Jahre höher.

3.2.1. Etablierung der PCR-Bedingungen

Nachdem der unter 2.4. beschriebene PCR-Ansatz mit den entsprechenden Primerpaaren die zuverlässigsten Banden mit den erwarteten Basenpaarlängen bei der Agarose-Gelelektrophorese und die saubersten Sequenzergebnisse präsentierte, wurde dieser standardmäßig weiter verwendet.

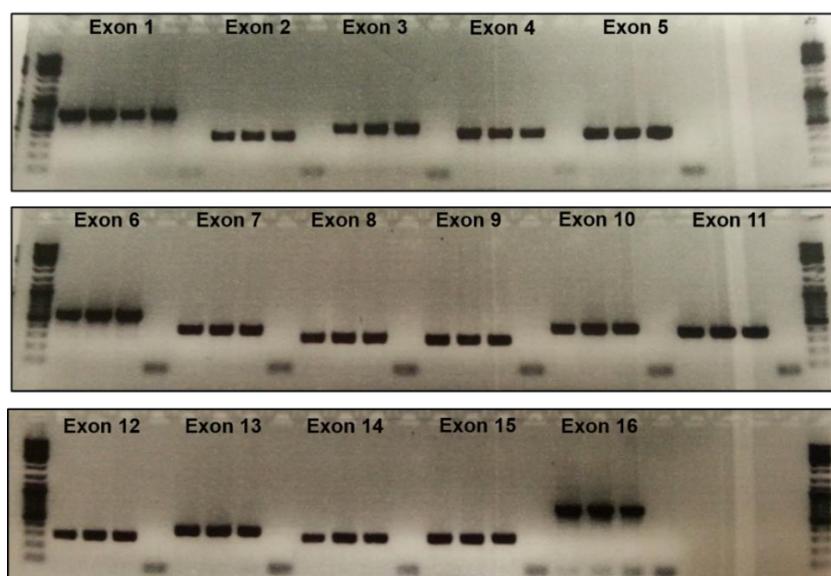


Abbildung 11: Gelelektrophorese aller 16 Exons des *PLS3*-Gens (mehrere Patienten abgebildet und jedes Exon jeweils mit einer Positiv- und Negativkontrolle)

3.2.2. Polymorphismen

Bei 48,6 % fand sich der häufige Polymorphismus c.33G>C im 5'UTR-Bereich von Exon 1 des *PLS3*-Gens. Das Auftreten dieses Polymorphismus im 5'UTR-Bereich von Exon 1 des *PLS3*-Gens bei 18 von 37 Patienten spiegelte ungefähr den Wert des internationalen HapMap-Projekts wider, eine genomweite Datenbank mit unzähligen menschlichen Sequenzvarianten. Dort wurde diese Variante bei 50 % aller Personen mit nord- und westeuropäischen Vorfahren identifiziert (Stand www.ensembl.org/ vom 22.08.2015). Die Variante ist in der dbSNP-Datenbank unter rs757124 zu finden und es wird eine Allelfrequenz (MAF) von 36,2 % angegeben. Ein Patient wies zusätzlich zu diesem Polymorphismus in Exon 1 noch die weiteren Polymorphismen c.1242T>C (rs2108099, MAF 14,2 %) in Exon 11, c.1294T>C (rs871774, MAF 12,2 %) in Exon 12 und c.1377+17C>T (rs871773, MAF 17,1 %) in Intron 12-13 des *PLS3*-Gens auf. Alle Varianten wurden von MutationTaster als Polymorphismus klassifiziert und haben ebenfalls einen Eintrag in der Datenbank dbSNP (Short Genetic Variations) mit jeweils einer MAF (Minor Allel Frequency), und folglich dem Auftreten der Variante im 1000-Genome-Projekt von mindestens 10 %. Abbildung 15 enthält eine Übersicht aller gefundenen Varianten im *PLS3*-Gen.

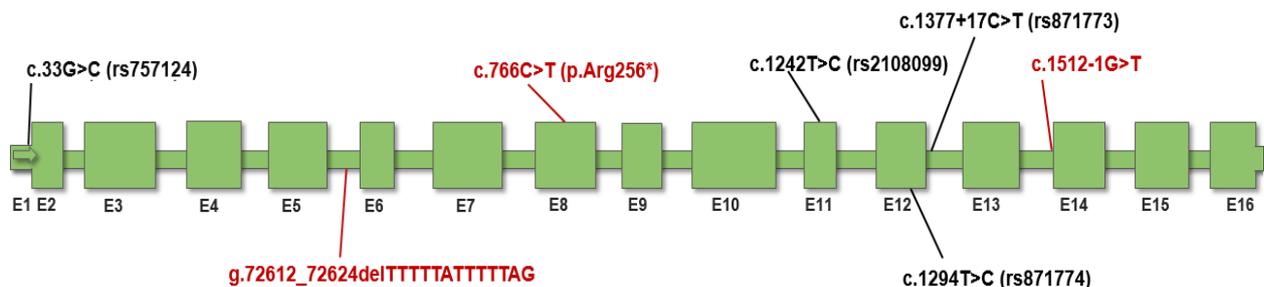


Abbildung 12: Übersicht des *PLS3*-Gens mit Exon 1 bis Exon 16 (E1-E16) mit den gefundenen Varianten (Polymorphismus = schwarz, potentiell pathogene Variante = rot)

3.2.3. Potenziell pathogene Varianten

Mittels Sanger-Sequenzierung wurden bei drei Patienten potentiell pathogene Varianten identifiziert, d.h. bei 8,1 % der untersuchten 37 Patienten mit Verdacht auf primäre Osteoporose fand sich eine eventuell ursächliche Mutation im *PLS3*-Gen.

Variante 1

Bei einem 22 Jahre alten männlichen Patienten fand sich hemizygot eine Base vor Exon 14 die Mutation c.1512-1G>T. Diese wurde weder im ExAC-Browser, noch im 1000-Genome-Projekt aufgeführt und wurde von MutationTaster als pathogen eingestuft. Die Analyse mit dem Human Splicing Finder ergab, dass es sich bei der betroffenen Region im Wildtypzustand mit einem HSF-Wert von 80,82 sehr wahrscheinlich um einen Spleiß-Akzeptor handelt. Für die mutierte Region

ergab sich lediglich ein HSF-Wert von 51,87. Die von der Software berechnete Abweichung war mit -35,82 % unter -10 % und folglich wird ein Verlust der entsprechenden Spleiß-Stelle vorhergesagt (siehe Abbildung 16a). Somit könnte die Variante zu einem veränderten Spleiß-Prozess und folglich zu einem veränderten Protein führen. Die Region um Exon 14 ist an der Bildung der zweiten Aktinbindungsdomäne im Plastin 3 beteiligt. Bei vorhandener DNA von weiteren Familienmitgliedern wurde zur zusätzlichen Einschätzung der Variante eine Sequenzierung der Mutter und des Bruders durchgeführt. Diese ergab, dass die Mutter des Patienten, bei der eine Osteoporose-Vorgeschichte bekannt ist, heterozygote Trägerin der Variante ist. Der nicht betroffene Bruder trug die Variante nicht (Abbildung 16b). Da der Indexpatient männlich und folglich nur in Besitz eines X-Chromosoms ist, liegt eine hemizygot Mutation bei ihm vor und eine Kompensation durch ein zweites Allel ist nicht möglich.

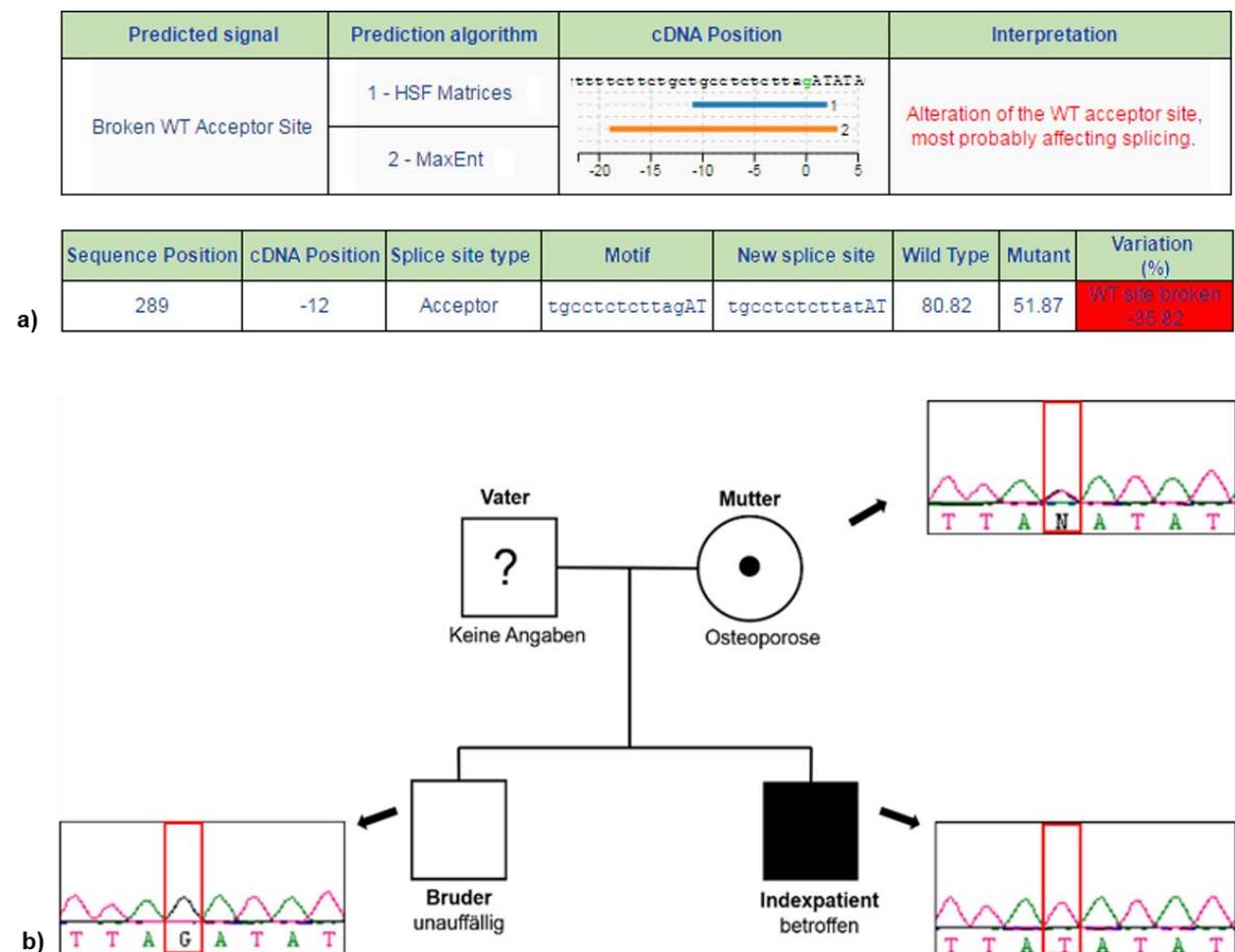


Abbildung 13: a) Human Splicing Finger: Vorhersage eines Spleiß-Akzeptors durch die detektierte Mutation
b) Sequenzierung des Patienten und seiner Familie mit Nachweis der Mutation c.1512-1G>T bei ihm hemizygot, während die Mutter heterozygote Trägerin ist und der Bruder die Veränderung nicht trägt.

Variante 2

Es fand sich bei einer 61-jährigen weiblichen Patientin in Exon 8 des *PLS3*-Gens heterozygot die Basensubstitution c.766C>T, die auf Proteinebene zu einer Stoppmutation, anstatt der Aminosäure Arginin (R) an Position 256 im Protein, führt (p.Arg256*). Die Mutation wird von MutationTaster als potentiell pathogen eingestuft. Die Region ist teilweise konserviert (siehe Abbildung 18) und Teil der Aktinbindungsdomäne 1 des Proteins. Diese Stoppmutation führt durch den sogenannten *Nonsense-mediated-decay* (NMD) schon während der Translation zu einem vorzeitigen Abbau der mRNA und der bis dahin bereits erfolgreich translatierten Polypeptidkette. Als Konsequenz ergibt sich damit sehr wahrscheinlich eine Verminderung von intaktem Plastin 3 in den Zellen. Da die Patientin heterozygote Trägerin ist und dennoch eine verringerte Knochenmasse aufweist, könnte davon ausgegangen werden, dass eine vollständige Kompensation durch das nicht-mutierte Allel nicht möglich ist. Das Ergebnis der Sequenzierung ist in Abbildung 17 dargestellt.

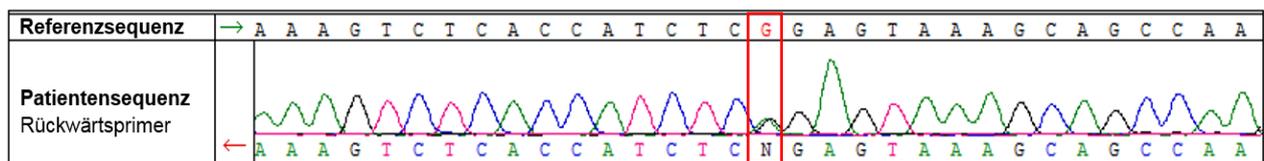


Abbildung 14: Nachweis einer heterozygoten Nonsense-Mutation c.766C>T (p.Arg256*)

Spezies	AS-Sequenz
H. sapiens	LSRNEALAALLR D GETLEELMKLSPEELLLRWANFHLENSG
M. mulatta	LSRNEALAALLR D GETLEELMKLSPEELLLRWANFHLENSG
F. catus	LSRNEALAALLR D GETLEELMKLSPEELLLRWANFHLENSG
M. musculus	LSRNEALAALLR D GETLEELMKLSPEELLLRWANFHLENSG
G. gallus	LSRNEALAALLR D GETLEDLMKLSPEELLLRWANFHLENAG
T. rubripes	NEALAALLR E GETLADLMKLSPEELLLRWANFHLENAG
D. rerio	NEALAALLR D GETLEDLMKLSPEELLLRWANFHLENAG
D. melanogaster	LDSCPGLAGLL F DNERLEDLMKMSPEAILLRWVNHHLERAG
C. elegans	SEN PQISRLLR D GETLEDLRRLSPEEILMRWVNYHLERAG
X. tropicalis	SRNEALAALLR D GETLEDLMKLSPEELLLRWANFHLENAG

Abbildung 15: Teilweise evolutionäre Konservierung über verschiedene Spezies im *PLS3*-Gen an der Aminosäurestelle 256 (orange vorgehoben, R = Aminosäure Arginin)

Variante 3

Bei einem 55 Jahre alten männlichen Patienten fand sich mittels Sanger-Sequenzierung eine Deletion von 13 Basen im Intron 5 des *PLS3*-Gens. Sie weist die Lokalisation und den Verlust folgender Basen auf: chr23:114868112_114868124delTTTTTATTTTATAG. Diese Variante, in dbSNP unter rs201765481 zu finden, wurde bisher bei unter 1 % der Bevölkerung nachgewiesen (MAF = 0,9 %) und wird von MutationTaster als potentiell pathogen eingeschätzt. Die Analyse mit

dem Human Splicing Finder ergab, dass es sich bei der betroffenen Region im Wildtypzustand mit einem HSF-Wert von 83,69 sehr wahrscheinlich um einen Spleiß-Akzeptor handelt, während das für die mutierte Region mit einen HSF-Wert von 26,8 nicht mehr zutrifft. Da die Abweichung demzufolge laut Software -67,98 % ist und deutlich unter -10 %, wird ein Verlust der Spleiß-Stelle vorhergesagt. Zusätzlich sagt das Programm voraus, dass es wahrscheinlich zu einem Bruch eines Exonic-Spleißing-Silencer (ESS) kommt. Das darauffolgende Exon 6 ist entscheidend bei der Bildung der Aktinbindungsdomäne 1 im Plastin 3-Protein. Ein Fehlen, selbst in einem nicht degradierten Protein, könnte dessen Funktion dennoch stark beeinträchtigen. Da der Patient männlich ist und folglich nur ein X-Chromosom aufweist, ist die Mutation hemizygot. Eine eventuelle Kompensation durch ein zweites Allel ist demnach nicht möglich. Gleichwohl die Deletion 187 Basen upstream im intronischen Bereich vor Exon 6 und nicht im translatierten Bereich liegt, könnte die Variante zusammengefasst als ursächlich für den Phänotyp des Patienten in Frage kommen, da ein alternatives Spleißen wahrscheinlich scheint, welches zu einem veränderten oder sogar degradierten Protein führen könnte.

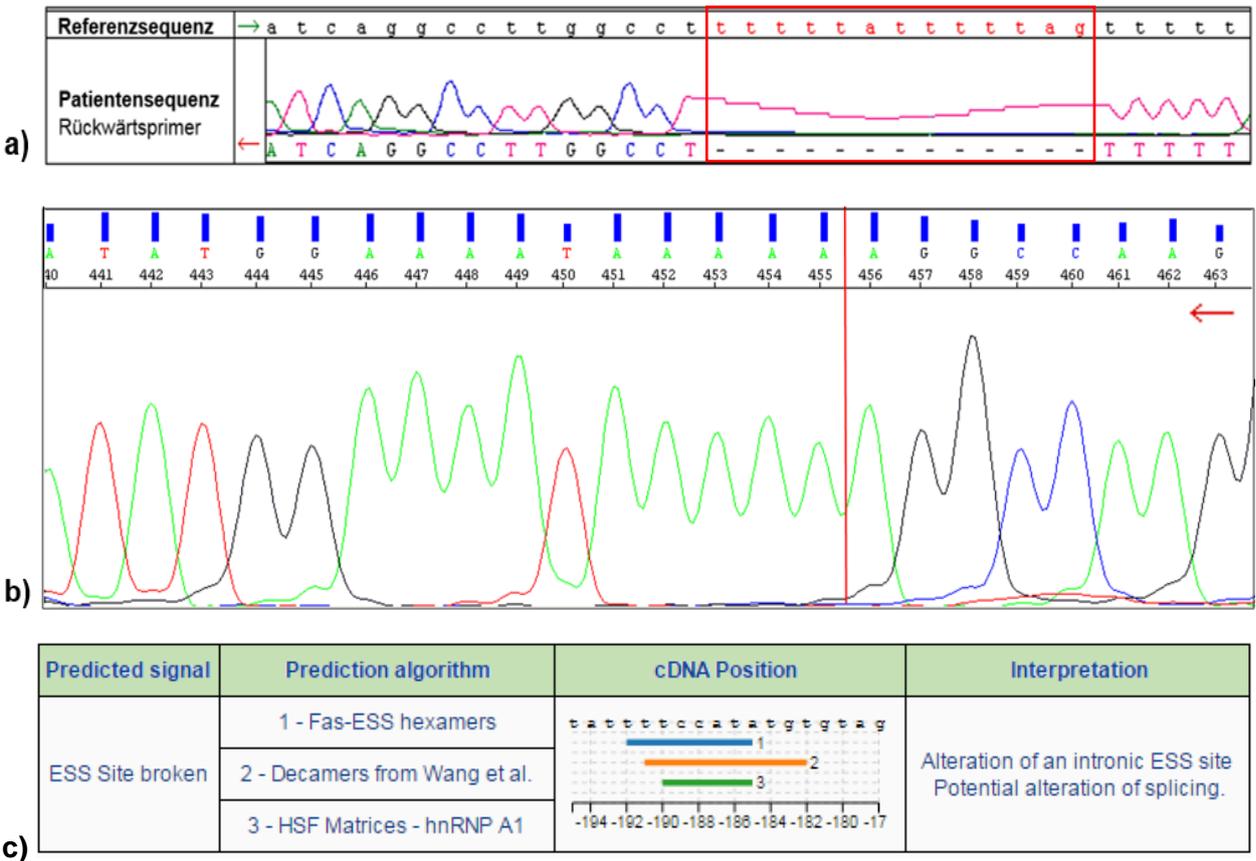


Abbildung 19: Hemizygoter Deletion von 13 Basenpaaren im Intron 5 des *PLS3*-Gens mit dem Programm
a) SeqMan (Vorwärtssequenz) b) Sequencing Analysis (Rückwärtssequenz) c) Human Splicing Finder

4. Diskussion

4.1. NGS als diagnostisches Verfahren zur Identifizierung des Krankheitsgens

Osteogenesis imperfecta umfasst eine Gruppe von erblichen Erkrankungen des Bindegewebes, die sich neben einer vermehrten Frakturrate und Verformungen der Extremitäten durch extraskelettale Manifestationen wie blaue Skleren, Gehörbeeinträchtigung oder DI auszeichnen [95]. In den letzten Jahren wurde zur Identifizierung der für die Erkrankung ursächlichen Gen-Mutationen als häufigstes Verfahren die konventionelle Sanger-Sequenzierung verwendet, die jedoch trotz hoher Genauigkeit teuer und zeitaufwendig ist. Einige Mutationsarten, wie größere Deletionen oder Duplikationen, können durch die konventionelle Methode der Detektion entgehen. Ebenfalls problematisch erscheint die Limitation des Verfahrens bei der Identifizierung möglicher neuer Kandidatengene [102]. In den letzten Jahren hat der rasante Fortschritt der Hochdurchsatzsequenzierungsverfahren zu einem Umbruch bei der Suche nach Krankheitsgenen in zahlreichen Forschungsprojekten geführt und findet mit sinkenden Kosten zunehmend Verwendung in der molekulargenetischen Diagnostik [83, 102]. In dieser Arbeit war es durch die gezielte Anreicherung und Sequenzierung von 70 Genen mit bekannter Beeinflussung der Knochenmasse mittels NGS-Technologie der Firma Illumina möglich bei 30 von 31 untersuchten indischen Patienten mit klinisch gesicherter OI eine wahrscheinlich ursächliche Genmutation innerhalb weniger Wochen zu identifizieren. Im Vergleich dazu nahm die anschließende Bestätigung der Mutationen mittels Sanger-Sequenzierung bei den Patienten und deren Eltern mehrere Monate Zeit in Anspruch.

Dabei zeigte die Verwendung der bioinformatischen Plattform GeneTalk eine höhere Erfolgsrate bei der Identifizierung des ursächlichen Gens mit 96,8 % im Vergleich zu PhenIX mit 83,9 %, welches einige ursächliche Varianten herausfilterte. Darunter befand sich die Variante im 5'UTR-Bereich des *IFITM5*-Gens. Allerdings war die Benutzung von PhenIX aufgrund der Priorisierung und Filterung der Kandidatengene wesentlich zeiteffizienter, was bei der molekulargenetischen Diagnostik im klinischen Alltag einen entscheidenden Vorteil darstellt. Künftig könnte dies durch Weiterentwicklung der Plattform PhenIX verbessert werden. Solange erscheint ein schrittweises Vorgehen bei entsprechender zeitlicher Limitation in der Routineanwendung effizienter, indem erst bei nicht-Identifikation der ursächlichen Variante mittels PhenIX eine weitere Analyse mit GeneTalk durchgeführt wird. Nichtsdestotrotz bleibt bei der Entdeckung einer eventuell ursächlichen Variante die Recherche in Datenbanken unabdingbar, da selbst Mutationsvorhersageprogramme wie MutationTaster oder Human Splicing Finder eine gewisse Fehlerrate aufweisen können, wenn gefundene Mutationen durch den verwendeten Algorithmus als benigne eingestuft werden [100]. In dieser Arbeit traf das auf die detektierten Varianten im *BMP1*- und *SERPINF1*-Gen bei P7 bzw. P23 zu. Zudem finden sich aktuelle Spleiß-

Mutationsvorhersageprogramme noch in der Anfangsphase der Entwicklung, da erst seit einigen Jahren die enorme Bedeutung auch tief intronischer Bereiche für den Spleiß-Prozess in der Genetik bekannt ist [101].

Generell wurde mithilfe des hier verwendeten NGS-Verfahrens eine hohe durchschnittliche Gesamtabdeckung der Target-Region von 97,65 % erreicht. Ähnlich gute Abdeckungsraten zeigten sich in einer 2013 von Sule et al. veröffentlichten Arbeit, in der für eine effizientere molekulare Diagnostik der Erkrankungen Osteogenesis imperfecta, Ehlers-Danlos-Syndrom und Osteopetrose eine NGS-Plattform mit 34 Genen für erhöhte und erniedrigte Knochenmasse verwendet wurde [103]. Bei der dort verwendeten NGS-Methode mit dem Illumina HiSeq2000 zeigte sich eine schlechtere Abdeckung von Genen mit homologen Sequenzen und von solchen mit mehreren Paralogen. Gleiches galt für Bereiche mit einem hohen GC-Gehalt und Pseudogenen. Als Pseudogene werden Abschnitte auf der DNA bezeichnet, die an anderer Stelle vorhandenen funktionellen Genen stark ähneln, aber nicht für ein funktionelles Protein kodieren. Eine Begründung für eine schlechtere Abdeckung GC-haltiger Regionen könnten erschwerte Hybridisierungs- und Alignmentschritte darstellen [103]. Beispielsweise zeigte sich in der dortigen Arbeit eine insuffiziente Abdeckung für das Gen *FAM20C*, wahrscheinlich da dieses Gen zwei paraloge Gene, *FAM10A* und *FAM20B*, besitzt und eine eindeutige Unterscheidung dieser drei Gene bei der Anreicherung und späteren Zuordnung zum Referenzgenom nicht immer zweifelsfrei gelingt [103]. Ebenfalls zeigte sich eine geringere Abdeckung von Exon 1 des *CRTAP*-Gens. Dieses weist einen hohen GC-Gehalt von 72 % auf [103]. Ähnliches stellte sich in der hier vorliegenden Arbeit für Exon 1 des *CRTAP*-Gens, ebenfalls zusätzlich bei anderen Genen, dar, die erhöhte GC-Gehalte aufwiesen. Eine Begründung dafür könnte in dem stärkeren Bindungs- und Schmelztemperaturverhalten GC-reicher Abschnitte zu finden sein. Dabei kommt es zu einer Ausbildung von 3 Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen Guanin und Cytosin im Vergleich zu 2 Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Adenin und Thymin. Die Schwierigkeit der Abdeckung GC-reicher Regionen wurde bereits als Nachteil des Illumina-Sequenzierverfahrens beschrieben [90]. Für solche Bereiche könnte zukünftig noch die konventionelle Sanger-Sequenzierung notwendig sein. Auffällig war ebenfalls, dass es sich bei den neu detektierten Varianten, die bisher in keiner Datenbank oder Publikation vermerkt waren, großteils um Frameshift- oder Splice-Site-Mutationen handelte. Grundlegend zeigte sich die naheliegende Tendenz, dass es mit steigender Abdeckung der angereicherten Gene im NGS zu einer höheren Variantenanzahl kam und umgekehrt bei einer prozentual geringeren Coverage zu einer niedrigeren Anzahl, was durch eine geringere Erfassungsrate erklärt werden könnte. Der von PhenIX angegebene Wert zur NGS-Phred-Qualität war durchschnittlich bei den Mutationen für die autosomal-rezessiv vererbten OI-Formen höher, als die der gefundenen autosomal-dominanten OI-Fälle. Dies erscheint insofern schlüssig, dass bei rezessiven Erbgängen,

zumindest im Falle einer Konsanguinität, zwei Mal die gleiche Base aufgrund des homozygoten Status detektiert wird.

Weiterhin wurden mittels NGS eine Reihe von heterozygoten Mutationen in den Genen des Bone Mass Panel detektiert, die von den Mutationsvorhersageprogrammen als potentiell pathogen eingestuft, aber für den Phänotyp nicht primär als ausschlaggebend eingeschätzt wurden (siehe Abbildung 7). Nichtsdestotrotz könnten sie den Phänotyp der Patienten beeinflussen. Wenngleich die Annahme besteht, dass die meisten Skelettdysplasien monogenetischen Erbgängen folgen und entsprechende Klassifikationen neben den klinischen Charakteristiken auf den ursächlichen Genveränderungen beruhen, ist es ebenfalls möglich, dass mehr als ein Gen für den OI-Phänotyp verantwortlich ist [85]. Denkbar wäre folglich, dass Patienten mit mehreren potentiell pathogenen Mutationen einen stärker ausgeprägten OI-Phänotyp aufweisen. Für die Bestätigung dieser Hypothese wären beispielsweise statistische Untersuchungen notwendig. Aufgrund der geringen Fallzahl in dieser Arbeit erscheint es allerdings schwierig, statistisch signifikante Aussagen zu erlangen.

Obwohl mittels der Illumina-Methode eine höhere Fehlerrate an Substitutionsmutationen beschrieben wurde, konnten von den wahrscheinlich ursächlichen Basensubstitutionsmutationen alle mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt werden [88, 90]. Der Grund für die bei 2 Patienten detektierte Insertions-Mutation, die sich mittels Sanger-Sequenzierung nicht bestätigen ließ, könnte eine Kontamination in der entsprechenden DNA-Probe oder in entsprechenden Arbeitsschritten vor der Hochdurchsatzsequenzierung sein. In den Patientenproben vorkommende Bakterien-DNA könnten mittels Hochdurchsatzsequenzierung sequenziert und anschließend fälschlicherweise der entsprechenden Stelle im Exon 34 des *COL1A2*-Gens im menschlichen Referenzgenom zugeordnet worden sein. Das würde erklären, warum die Sequenz-Reads lediglich sehr kurz und ohne entsprechende Überlappungen waren. Bei der Verwendung der Pyrosequenzierung oder eines anderen Verfahrens mit einer längeren Leseweite, wäre es möglicherweise nicht zu einer fälschlichen Zuordnung gekommen.

4.2 Beurteilung der gefundenen *COL1A1/A2*-Varianten und *IFITM5*-Mutation

Das dominierende extrazelluläre Matrixprotein unserer Knochen, Kollagen-Typ-I, wird durch die beiden Gene *COL1A1* und *COL1A2* kodiert. Veränderungen in diesen Genen sind seit vielen Jahren als Ursache für die Erkrankung der Osteogenesis imperfecta, und damit den Großteil der autosomal-dominanten Fälle, bekannt. In dieser Arbeit wurden insgesamt 23 Mutationen in den Genen *COL1A1* und *COL1A2* gefunden, die mittels bioinformatischer Vorhersageprogramme als potentiell pathogen klassifiziert wurden. Darunter befanden sich 11 Varianten im Gen *COL1A1* und 12 im Gen *COL1A2*. Allerdings wurden einige bereits in Datenbanken bei scheinbar nicht-betroffenen Personen vermerkt. Nach dieser weiteren Analyse wurden bei lediglich 17 von 31 Patienten die wahrscheinlich für die Osteogenesis imperfecta ursächlichen Veränderungen in einem dieser beiden Gene identifiziert, davon 11 im Gen *COL1A1* und 6 im Gen *COL1A2*. Folglich fanden sich bei der untersuchten Patientenkohorte lediglich bei 54,8 % ursächliche Mutationen im *COL1A1*- und *COL1A2*-Gen, welche eigentlich mit 85-90 % den Großteil der weltweiten Osteogenesis imperfecta Fälle ausmachen [31]. Allerdings stammte ein großer Anteil der Patienten dieser Arbeit mit 38,7 % aus konsanguinen Familien. Es ist bekannt, dass Konsanguinität in einigen Regionen Indiens sehr häufig vorkommt, da das allgemeine Verständnis für deren Auswirkungen in der Bevölkerung oft fehlt [93]. Grundsätzlich wird angenommen, dass ein Kind aus einer Cousinen-Ehe ersten Grades ein zusätzliches Risiko von 1,7-2,8 % aufweist, an einer autosomal-rezessiven Erkrankung zu leiden [104]. Betrachtet man einzeln die Patienten aus nicht-konsanguinen Familienverhältnissen, fanden sich in dieser Arbeit bei 83,3 % Mutationen in den Genen *COL1A1* und *COL1A2*, was eher diesen weltweiten Literatur-Angaben entspricht. Vergleichbar ist dieser Wert zusätzlich mit dem Bericht des Mutationsspektrums indischer Patienten in der Publikation von Stephen et al. 2014, in der eine sehr ähnliche Detektionsrate von *COL1A1/2*-Mutationen mit 86 % beschrieben wurde [95]. Bei den dort gefundenen 25 ursächlichen Varianten befanden sich 56 % der detektierten Mutationen im *COL1A1*-Gen und 44 % im *COL1A2*-Gen, was mit dem hier gefundenen Verhältnis bei 17 Patienten mit 65 % für Mutationen im *COL1A1*-Gen zu 35 % für Mutationen im *COL1A2*-Gen und entsprechenden 60:40 Angaben der Literatur vergleichbar ist [95]. Der beschriebene „hot spot“, mit der Mehrzahl der dort detektierten Mutationen in Exon 16 und 17 des *COL1A1*-Gens und in Exon 19 und 37 des *COL1A2*-Gens bei indischen Patienten, konnte allerdings in der hier vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Lediglich eine bereits bekannte pathogene Variante ließ sich in Exon 17 des *COL1A1*-Gens bei einem Patienten nachweisen. Da in der Publikation von Stephen et al. 2014 lediglich 25 Patienten mit ursächlichen Varianten im *COL1A1/COL1A2*-Gen von indischen Patienten beschrieben wurden, ist hier bisher insgesamt eine sehr geringe Datenmenge vorhanden [95]. Die gemeinsame Bildung dieses „hot spots“ für Exons, die mittels PCR vielleicht zuerst analysiert werden sollten, aus den dortigen 25 Patienten und den 17 Patienten der hier vorliegenden Arbeit, erscheint daher angesichts der ansonsten zu

untersuchenden 52 Exons für jedes der beiden Gene und den damit verbundenen Zeit- und Arbeitsaufwand, plausibel. Für das Gen *COL1A1* würde das die Exons 8, 16, 17, 32, 33 und 43 umfassen und damit bereits 56 % der detektierten Mutationen im *COL1A1*-Gen umfassen. Da sich in dieser Arbeit keine ursächliche Mutation in Exon 19 und 37 des *COL1A2*-Gens fanden und generell nur eine Übereinstimmung in Exon 44 mit den Fällen von Stephen zu vernehmen war, ist die Bildung eines gemeinsamen „hot spots“ für das *COL1A2*-Gen schwieriger übertragbar. Das wird zusätzlich begünstigt durch die in dieser Arbeit geringere Fallzahl an detektierten wahrscheinlich ursächlichen Varianten im Gen *COL1A2*.

Insgesamt fanden sich im *COL1A1* und *COL1A2*-Gen 6 Varianten, die noch nicht beschrieben und wahrscheinlich für den Phänotyp der Patienten verantwortlich sind. 2 davon wurden allerdings auf Proteinebene bereits ähnlich beschrieben. Darunter die detektierte Variante c.577G>T (p.Gly193Cys) von P25, bei der an der entsprechenden Proteinstelle bereits die Varianten p.Gly193Ser und p.Gly193Arg bekannt sind. Ebenfalls ist zwar die detektierte Variante c.875G>A bei P21 auf c.DNA-Ebene noch nicht beschrieben, aber in der OI- Datenbank ist die entsprechende Variante c.874G>A aufgeführt, die zu der gleichen Veränderung auf Proteinebene p.Gly292Asp führt. 11 detektierte Varianten in den Genen *COL1A1* und *COL1A2* wurden bereits in der Literatur als ursächlich bei OI-Patienten identifiziert.

Im *COL1A1*-Gen fanden sich insgesamt 4 noch nicht beschriebene Varianten, die weder in der Osteogenesis imperfecta Datenbank, noch im 1000-Genome-Projekt oder im ExAC-Browser vermerkt waren. Darunter waren Frameshift-, Splice-Site- und Nonsense-Varianten. Alle sind mit einem quantitativen Kollagendefekt verbunden, bei dem es eher zu der Ausprägung eines mildereren Phänotyps kommt [45]. Dies konnte auch in der Genotyp-Phänotyp-Korrelationsanalyse der gefundenen Varianten im *COL1A1*-Gen bestätigt werden, bei dem die Patienten mit detektierten Mutationen, die zu qualitativen Defekten führen, durchschnittlich schwerer betroffen waren. Dass einzelne Patienten aus den Gruppen von diesem Durchschnitt abweichen, lässt sich eventuell auf die Lage der mutierten Region oder die tatsächliche Konsequenz auf Proteinebene zurückführen. Zusätzlich ist auf die große Heterogenität des Krankheitsbildes selbst bei Trägern der gleichen Mutation innerhalb einer Familie zu verweisen [35]. Die mittels NGS gefundenen Varianten im *COL1A1*-Gen ließen sich mittels Sanger-Sequenzierung validieren. Die Sequenzierung der Eltern erbrachte, dass bei 6 von 11 Patienten beide Eltern die Variante nicht aufwiesen, so dass hier eine de novo Entstehung möglich erscheint. Bei einem Patienten war keine DNA vom Vater vorhanden und bei 2 Patienten war ein betroffenes Elternteil jeweils ebenfalls heterozygoter Träger der Mutation. Bei P19 wies der anamnestisch nicht betroffene Vater die als ursächlich klassifizierte Frameshift-Mutation, p.Ala1060fs, ebenfalls heterozygot auf. Aufgrund der hohen Heterogenität in der Merkmalsausprägung ist es dennoch sehr

wahrscheinlich, dass die Variante ursächlich ist. Im Allgemeinen erscheint es wahrscheinlich, dass die 11 gefundenen Varianten im *COL1A1*-Gen für das Krankheitsbild der OI bei den Patienten verantwortlich sind. Die bereits beschriebenen Varianten im *COL1A1*-Gen können mit großer Wahrscheinlichkeit für den Phänotyp der Patienten angesehen werden, da mehrere Einträge in der Osteogenesis imperfecta Datenbank vorhanden sind. Beispielsweise wurde die bei Patient 13 detektierte Variante, p.Arg1026*, bei mehr als 10 Patienten mit OI Typ I in der OI-Datenbank vermerkt [105, 106]. Aus den klinischen Beschreibungen lässt sich ein ähnlich milder Phänotyp bei P13 herauslesen. Dass die betroffene Mutter ebenfalls die Mutation trägt, untermauert zusätzlich ihren wahrscheinlichen Krankheitswert. Als prägnantes Beispiel für die große Heterogenität bezüglich einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation, lässt sich die detektierte Variante p.Gly821Ser bei P20 anführen, die bei über 24 Patienten mit OI-Typ I, II, III und IV aufgeführt wurde [107]. Wenngleich bei 5 bereits beschriebenen Varianten die Eltern in der Sanger-Sequenzierung keine Träger der Veränderung waren, lässt sich eine de novo Entstehung nicht mit vollständiger Sicherheit vorhersagen. Beispielsweise könnten Keimzellmosaikmutationen bei den Eltern vorliegen, bei denen entsprechende Mosaikträger keine oder lediglich milde klinische Zeichen aufweisen können [44]. Empirischen Schätzungen zufolge liegen solchen vererbten Keimzellmosaik-Mutationen 5-7 % der OI-Fälle von Typ II und III zugrunde [44].

Im *COL1A2*-Gen wurden 8 neue Mutationen detektiert, die noch nicht in der OI-Datenbank vermerkt sind. Allerdings waren 6 Varianten, darunter Missense- und Splice-Site-Mutationen, im ExAC-Browser mit einer Frequenz von unter 1% (0,00002735 bis 0,003606) aufgeführt und führten zu einem Nicht-Glycinaustausch oder einem vermuteten Splice-Site-Effekt. Im Allgemeinen sind die klassischen OI-Missense-Mutationen Glycinsubstitutionen. Nicht-Glycinsubstitutionen sind eher mit einem milderem Phänotyp verbunden [45]. Da die detektierten Varianten bereits in Datenbanken genannt sind, könnte es sich auch um Polymorphismen handeln. Mithilfe von Segregationsuntersuchungen in den betreffenden Familien und Untersuchungen auf Proteinebene könnte zur Einstufung dieser Varianten eine bessere Aussage getroffen werden. Die bereits häufiger im ExAC-Browser- und 1000-Genome-Projekt vermerkten Varianten wurden daher als nicht primär für den Phänotyp der OI der Patienten ausschlaggebend eingestuft, obwohl sie nichtsdestotrotz diesen beeinflussen könnten.

Von den 23 gefundenen Varianten in den *COL1A1/2*-Genen waren 56,5 % Glycinsubstitutionen. Davon befanden sich 54,5 % im *COL1A1*- und 50 % im *COL1A2*-Gen. Von den 17 Varianten, die als sehr wahrscheinlich ursächlich für den Phänotyp der Patienten angesehen wurden, waren 11 durch Glycinsubstitutionen verursacht. Mit 64,7% ist der Anteil an hier gefundenen ursächlichen Glycinsubstitutionen für die OI-Fälle deutlich geringer im Vergleich zu den bisher beschriebenen

indischen OI-Fälle von Stephen et al. 2014, wo 80 % der gefundenen ursächlichen Mutationen einen Austausch der Aminosäure Glycin zeigten [95]. Jedoch ist der hier detektierte Anteil vergleichbar mit einer 2006 erstellten Arbeit, die 67 OI-Fällen einschließt, bei denen 58,2 % aller detektierten ursächlichen Mutationen Glycinsubstitutionen waren [107].

6 der 17 Patienten mit ursächlichen Mutationen in *COL1A2/A1* zeigten als extraskelettale Manifestation eine Dentinogenesis imperfecta. Insgesamt betrachtet waren 7 der 31 Patienten von einer DI betroffen, alle mit Mutationsfunden in autosomal-dominanten OI-Formen. Damit scheint DI vorwiegend ein Charakteristikum der autosomal-dominanten Osteogenesis imperfecta zu sein, was sich in den bisherigen Daten zu indischen OI-Fällen widerspiegeln lässt [93]. Bei keinem der hier untersuchten Patienten zeigte sich eine Beeinträchtigung des Gehörs, wohingegen sich bei 94 % (16 der 17 Patienten) mit Mutationen in *COL1A1/A2* eine blaue Verfärbung der Skleren mit verschieden starker Ausprägung zeigte. Von allen 31 betrachteten Patienten, zeigten sich bei 22 der 31 untersuchten Patienten blaue Skleren. Damit wurde im Umkehrschluss bei 71 % der Patienten mit blauen Skleren eine ursächliche Mutation im *COL1A1*- oder *COL1A2*-Gen gefunden. Obwohl Hörverlust oder Schwerhörigkeit als eine extraskelettale Manifestation der OI beschrieben wird, zeigte keiner der 31 Patienten dieses Charakteristikum.

Mutationen im Gen *IFITM5*, welches vorwiegend im initialen Stadium der Osteoblastendifferenzierung exprimiert wird, wurden bei 2 der hier untersuchten 31 Patienten gefunden. Das entspricht in etwa 6,5 %. Generell ist in der Literatur vermerkt, dass sich bei weniger als 5 % der Patienten mit Osteogenesis imperfecta eine durch *IFITM5*-Mutation verursachte OI vom Typ V diagnostizieren lässt, was vergleichbar mit den hier erhobenen Daten ist [48]. Bei diesen 2 Patienten mit der bekannten detektierten Mutation c.-14C>T im 5'UTR-Bereich des *IFITM5*-Gens, zeigte sich ein moderater bis schwerer klinischer Phänotyp im Scoring-System, jedoch mit unterschiedlicher Ausprägung. Obwohl beide eine bereits größere Anzahl an Frakturen erlitten hatten, war bei P14 die erste Fraktur erst mit 1,5 Jahren vermerkt, wohingegen P30 diese mit 2 Monaten erlebte. Beiden gemeinsam war die Ausprägung an Deformierungen der Extremitäten und das Auftreten von blauen Skleren. Zudem zeigte P14 eine milde Dentinogenesis imperfecta, was gemeinsam mit den entsprechenden blauen Skleren gegensätzlich zu der von Van Dijk und Silence 2014 beschriebenen klinischen Beschreibung von OI-Typ V ist [39]. Allerdings wurden ähnliche Merkmale bei Patienten mit der Mutation c.119C>T im kodierenden Bereich des *IFITM5*-Gens beschrieben [108]. Beide Patienten zeigten die hyperplastische Kallusbildung, die als typisches Charakteristikum beschrieben wird, ebenso wie P30 eine bereits bei OI-Typ V beschriebene Radiuskopfdisklokation aufwies [109]. Jedoch zeigten beide Patientinnen keine vermehrte Kalzifikation der interossären Membran am Unterarm, die sich normalerweise vor dem 2. Lebensjahr bei den in der Literatur beschriebenen Patienten mit

OI-Typ V präsentiert [48]. Die bereits mehrfach detektierte Mutation im 5'UTR-Bereich führt wahrscheinlich zur Bildung eines neuen Startcodons mit zusätzlichen 5 Aminosäuren (MALEP) im N-terminus des *IFITM5*-Proteins. Dieses längere *IFITM5*-Transkript konnte anhand von Knochenuntersuchungen nachgewiesen werden. Ein kürzlich beschriebenes Maus-Modell mit der entsprechenden Mutation zeigte bei den entsprechenden mutationstragenden Mäusen eine verlangsamte Mineralisationsrate und Deformierungen der langen Röhrenknochen mit Frakturen und einer generellen Reduzierung des Mineralisierungsgrades [48, 110].

Da die Mutation im 5'UTR-Bereich bei der Whole-Exome-Sequenzierung in zahlreichen Fällen scheinbar aufgrund einer schlechten Abdeckung der betroffenen Region oder unzureichender Anreicherung nicht erkannt wurde, scheint bei entsprechend klinischer Präsentation die gezielte Suche lohnend zu sein [85]. Mithilfe des hier verwendeten Gen-Panels zeigte sich eine gute Anreicherung der Region, obgleich die Mutation in dem Auswertprogramm PhenIX nicht aufgeführt war. Kosteneffizient erscheint daher zusätzlich eventuell eine vorherige Sanger-Sequenzierung bei dem entsprechend kurzen *IFITM5*-Gen, wenn die OI-Patienten etwaige markante klinische Auffälligkeiten wie hyperplastische Kallusbildung und Röntgenkopfdisklokationen präsentieren, bevor eine eventuelle NGS-Diagnostik initiiert wird.

4.3. Gefundene Mutationen für autosomal-rezessive Osteogenesis imperfecta

Entdeckte Gene für autosomal-rezessive Formen der Osteogenesis imperfecta zeigten eine Beteiligung an der Bildung und Interaktion von Kollagen-Typ-I sowie bei der Mineralisierung und Aktivität der beteiligten Zellreihen im Knochenstoffwechsel, wenngleich bei vielen der genaue molekulare Mechanismus noch unbekannt ist [31]. Durch die NGS-Technologien sind bereits zahlreiche neue ursächliche Gene in den letzten Jahren hinzugekommen. Insgesamt fanden sich bei der untersuchten Patientenkohorte von 31 Patienten bei 35,5 % von diesen ursächlichen Mutationen in Genen für autosomal-rezessiv vererbte Osteogenesis imperfecta. Von den 11 betroffenen Patienten stammten 9 aus konsanguinen Familien, was die deutlich erhöhte Detektionsrate von autosomal-rezessiven OI-Mutationen erklären könnte. Bei einem nicht-konsanguinen Patienten, P11, waren beide Eltern heterozygote Träger jeweils einer Veränderung, was zu einer Compound-Heterozygotie bei dem entsprechenden Patienten führte. Bei einer zweiten Patientin, P7, aus einer anamnestisch nicht-konsanguinen Familie war ein Cousin ebenfalls von einer OI betroffen, was auf eine versteckte Konsanguinität hindeuten könnte [93]. Bekräftigt werden konnte diese Hypothese durch die Analyse der Eltern, bei denen sich eine heterozygote Anlageträgerschaft in der PCR zeigte.

Bei 3 Patienten mit klinischem Bruck-Syndrom, welches als OI-ähnliches Syndrom mit Osteopenie, häufigen Frakturen und Gelenkkontrakturen beschrieben wird, fanden sich in der vorliegenden Arbeit ursächliche homozygote Mutationen im Gen *FKBP10* [111]. In der Literatur

werden bei Patienten mit Bruck-Syndrom häufig eine stärkere Knochenfragilität und Osteoporose als bei Patienten mit OI-Typ I angegeben, eher vergleichbar mit dem moderat schweren OI-Typ III [111]. Die Patienten mit Bruck-Syndrom zeigten dabei vorwiegend keine Dentinogenesis imperfecta sowie keine Beeinträchtigung des Gehörs, was ebenfalls auf die Patienten mit hier detektierten *FKBP10*-Mutationen zutrifft. Jedoch zeigte keiner der 3 Patienten vertebrale Kompressionsfrakturen. Ebenfalls zeigten in dem vorgenommenen Scoring-System alle 3 Patienten in dieser Arbeit einen milden Phänotyp. Die Deformierungen der langen Röhrenknochen beschränkten sich lediglich auf die Oberschenkel und bei einem Patienten auf die gesamte untere Extremität. Gleichermaßen waren die bei OI-Typ III beschriebene Verkrümmung der Wirbelsäule, in Form einer Skoliose oder Kyphoskoliose, bei keinem der hier untersuchten Patienten vorliegend [39]. Allerdings beschreibt eine 2011 veröffentlichte Publikation den OI-Phänotyp bei den dort untersuchten Patienten mit gefundenen Mutationen im *FKBP10*-Gen, die das Erwachsenenalter erreicht haben, als milder im Vergleich zu den klassischen, durch *COL1A1*- und *COL1A2*-Mutationen verursachten, OI-Typ III-Patienten. Diese Hypothese ließ sich in dieser Arbeit bestätigen. Zusätzlich wurde berichtet, dass der durch *FKBP10*-Mutationen verursachte Phänotyp milder ausfällt, als durch Mutationen in den Genen *CRTAP*, *LEPRE1* und *PPIB*, bei denen die Patienten deutlich schwerer betroffen waren [111]. Bezogen auf die Anzahl der Frakturen, die Frakturfrequenz pro Jahr und den Schweregrad der Deformierungen, konnte diese Aussage bei den hier gefundenen Patienten mit ursächlichen *FKBP10*-Mutationen im Vergleich zu den Patienten mit *LEPRE1*-Mutationen bestätigt werden, was deutlich in Tabelle 18 und 19 ersichtlich ist. Die gefundene ursächliche Variante c.824_825insC (p.Gly278Argfs*95) bei Patient 3 wurde bereits mehrmals in der Literatur beschrieben und verdeutlicht die vermehrte Fehleranfälligkeit während der Replikation bei einer Sequenz, die viele sich wiederholende Cytosinbasen hintereinander enthält [111]. Die anderen beiden Varianten, die bei den Patienten hier entdeckt wurden, waren noch nicht in der Literatur beschrieben. Im Vergleich zu den in der Osteogenesis imperfecta Datenbank gelisteten Mutationen lagen diese beiden neu detektierten Varianten in Regionen, in denen bisher wenige Varianten beschrieben wurden und die sich relativ weit im 3'-Bereich des Gens befinden. Die Sequenzierung der Eltern bestätigte bei 2 von 3 Patienten die heterozygote Anlageträgerschaft beider Elternteile. Wenngleich bei P2 die DNA des Vaters für eine Trägerschaftsuntersuchung fehlte, legt die Familienanamnese nahe, dass dieser wie die Mutter heterozygoter Mutationsträger ist. Das bestärkt die Annahme, dass es sich bei den gefundenen Varianten um die für den Phänotyp ursächlichen Mutationen handelt.

Bei zwei Patienten fanden sich wahrscheinlich ursächliche Mutationen im Gen *SERPINF1*, welches bei der frühen Matrixmineralisierung entscheidend beteiligt sein soll, da es die Osteoblastendifferenzierung und eine Reihe von Matrixproteinen beeinflusst [31]. Es fand sich

eine noch nicht beschriebene Frameshift-Mutation, die zu einem vorzeitigen Stoppcodon in Exon 6 des *SERPINF1*-Gens führt, sowie eine Duplikation in Exon 3. Beide Varianten konnten mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt werden und die heterozygoten Anlageträgerschaften der Eltern befürworteten eine Pathogenität der detektierten Varianten. Die In-Frame-Duplikation von 9 Basen bei Patient 23 wird von MutationTaster als Polymorphismus in dem im menschlichen Organismus hauptsächlich vorkommenden Transkript eingeschätzt. Dennoch ist sie sehr wahrscheinlich für den Phänotyp des Patienten verantwortlich, da sie in der Literatur bereits bei Osteogenesis imperfecta-Patienten aufgeführt wurde [112, 113]. Die eingefügten Sequenzen wiederholen sich bei der ursprünglichen Referenzsequenz 2-mal (siehe Abbildung 20), während sie bei den hier untersuchten Patienten und bei den in der Literatur von Tucker et al. 2012 sowie Rauch et al. 2012 aufgeführten Patienten 3-mal vorkommen [112, 113]. Der bei Tucker et al. 2012 beschriebene Patient hatte in der Real-Time-PCR von Hautfibroblasten deutlich reduzierte Level des *SERPINF1*-Transkripts. Zudem zeigte eine Western-Blot-Analyse sehr wenig PEDF-Protein-Expression im Vergleich zu den Kontrollen. Zusätzlich befindet sich die Mutation in einer sehr sauren Region des PEDF-Proteins mit einer vergleichsweise hohen Konzentration der Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure. Dort wird eine bedeutende Rolle bei der Bindung weiterer Kofaktoren und damit der allgemeinen PEDF-Funktion vermutet [112]. Der Phänotyp des bei Tucker et al. 2012. beschriebenen Patienten unterscheidet sich von dem der bei Becker et al. 2011 beschriebenen Patienten mit anderen *SERPINF1*-Mutationen, da der Patient mit 19 Jahren trotz Kleinwuchs und progressiver Skoliose noch mobil ist [50, 112]. Die dort aufgeführte Hypothese besagt, dass der mildere Phänotyp in einer lediglich reduzierten PEDF-Expression durch die Mutation begründet ist. Währenddessen kommt es bei den von Becker et al. 2011 beschriebenen Patienten durch einen vorzeitigen Stopp bei der Translation zu keiner Expression von PEDF, resultierend in einen schwereren Phänotyp. Diese Annahme lässt sich weitgehend mit den klinischen Merkmalen der Patienten in dieser Arbeit, bei denen Mutationen im *SERPINF1*-Gen gefunden wurden, untermauern. Während P5 mit einer resultierenden Stoppmutation schwerer betroffen ist und sich klinisch eher bei den von Becker et al. 2011 beschriebenen Patienten einordnen lässt, ist P23 mit der In-Frame-Duplikation ähnlich wie der von Tucker et al. 2012 beschriebene Patient milder betroffen [50, 112]. Bei Patientin 5 wurden zusätzlich die beschriebenen „popkornartigen“ Epiphysen vermerkt [39]. In einem Bericht des Mutationsspektrums indischer Patienten aus konsanguinen Familien von Stephen et al. 2015 wurden bei 2 von insgesamt 7 Patienten ebenfalls ursächliche Mutationen im *SERPINF1*-Gen detektiert. Eine Veränderung befand sich ebenfalls in Exon 6. Der Patient mit der Mutation in Exon 6 zeigte ebenfalls wie P5 eine starke motorische Entwicklungsverzögerung, normale Skleren, popkornartige Epiphysen und die Abwesenheit von einer Dentinogenesis imperfecta [93]. Der Frakturbeginn wurde, wie bei den in dieser beschriebenen Patienten, ebenfalls bei 6 und 9 Monaten angegeben [93].

Referenzsequenz

```
aaacccaagacttctgtctcctgccagGGCTCCCCAGACCCCGACAGCACAGGGGGCGCTGGTGGAGGAG  
GAGGATCCTTTCTTCAAAGTCCCCGTGAACAAGCTGGCAGCGGCTGTCTCCAACCTTCGGGCTAT  
GACCTGTACCGGGTGCATCCAGCACGAGCCCCACGACCAACGTGCTCCTGTCTCCTCTCAG  
TGTGGCCACGGCCCTCTCGGCCCTCTCGCTGGgtgagtgctcagatgcaggaagccccag
```



Patient 23: c.271_279dupGCCCTCTCG

```
aaacccaagacttctgtctcctgccagGGCTCCCCAGACCCCGACAGCACAGGGGGCGCTGGTGGAGGAG  
GAGGATCCTTTCTTCAAAGTCCCCGTGAACAAGCTGGCAGCGGCTGTCTCCAACCTTCGGGCTAT  
GACCTGTACCGGGTGCATCCAGCACGAGCCCCACGACCAACGTGCTCCTGTCTCCTCTCAG  
TGTGGCCACGGCCCTCTCGGCCCTCTCGGCCCTCTCGCTGGgtgagtgctcagatgcaggaagccccag
```

Abbildung 16: Referenzsequenz von Exon 3 des SERPINF1-Gens mit vergleichender Sequenz von Patient 23, ebenfalls beschrieben bei Tucker/Rauch et al. 2012 [112, 113] (grau = Intron, rot = mutierte eingefügte Sequenz, grün = normal vorkommende sich wiederholende Sequenzeinheit)

Bei 3 Patienten aus konsanguinen Familien fand sich die homozygote Veränderung c.499_500insG im *WNT1*-Gen, die zu einer Frameshift-Mutation ab Aminosäureposition 170 führt. Mutationen im *WNT1*-Gen gehören noch zu den nicht klassifizierten Formen der OI und führen über die Beeinträchtigung der kanonischen WNT-Signalübertragung durch β -Catenin zu einer veränderten Knochenmasse und Skelettentwicklung [59, 61]. Durch diese Schlüsselrolle bei der Regulierung der Knochenmasse bieten sie Ansatzpunkte für neuere Osteoporose-Medikamente. In der Literatur wurde die hier detektierte Veränderung bereits bei einem Patienten heterozygot mit einer weiteren heterozygoten Variante, c.259C>T, als ursächlich für den Phänotyp beschrieben [114]. Beide heterozygoten Varianten führten zu einem instabilen mRNA-Produkt. Der betroffene Patient in der 2013 veröffentlichten Publikation zeichnete sich durch einen schweren OI-Phänotyp aus [114]. Ähnlich präsentierten sich die 3 Patienten mit den gefundenen *WNT1*-Mutationen der hier vorliegenden Arbeit mit der ersten Fraktur bereits vor dem ersten Lebensjahr, progressiven Deformierungen der Extremitäten und einem deutlichen Kleinwuchs bei Z-Werten zwischen -4 und -6. Interessanterweise zeigte sich bei P18 zusätzlich ein milder obstruktiver Hydrozephalus und die Patientin erlitt eine frühe subakute Subarachnoidalblutung, was eventuell im Zusammenhang mit der detektierten *WNT1*-Mutation stehen könnte. Im *WNT1*-Knock-out-Mausmodell zeigte sich eine frühe postnatale Letalität der Mäuse durch Beteiligung des zentralen Nervensystems. Ebenfalls zeigte ein weiterer in der Literatur beschriebener 3-jähriger Patient mit einer Nonsense-Mutation (p.Cys330*), neben einem klassischen OI-Phänotyp, eine ZNS-Beteiligung in Form einer schweren globalen Entwicklungsverzögerung [115]. Im CT präsentierten sich bei ihm dilatierte Ventrikel und atrophische Veränderungen des Gehirns [115]. Bei zwei von Laine et al. 2013 beschriebenen OI betroffenen Schwestern mit einer ähnlichen Veränderung im *WNT1*-Gen an Position c.884C>A

(p.Ser295*), zeigte sich bei einer Schwester im MRT zusätzlich eine schwere Hypoplasie des linken Zerebellums mit einem kurzen Mittelhirn [116]. Da es unzählige weitere Gründe für diese klinischen Auffälligkeiten geben könnte, ist es derzeit unklar, ob ein Zusammenhang mit den detektierten *WNT1*-Mutationen besteht. Dazu sind weitere Analysen und Fallberichte notwendig. Die gefundene Variante führt zusammenfassend jeweils mit großer Wahrscheinlichkeit zu dem OI-Phänotyp der Patienten. Bei P31 wurde dies durch den homozygoten Nachweis der Mutation bei dem ebenfalls betroffenen Bruder untermauert. Die Eltern bei Patient 18 und 31 wurden als heterozygote Anlageträger bestätigt und zeigten scheinbar keine Auffälligkeiten im Sinne einer bei einigen heterozygoten *WNT1*-Mutationen beschriebenen early-onset Osteoporose [60, 114]. In der klinischen Anwendung wurde bisher festgestellt, dass die intravenöse Gabe von Bisphosphonaten wenig therapeutischen Effekt bei Kindern mit *WNT1*-Mutationen hat [117].

Bei 2 Patienten dieser Arbeit wurden wahrscheinlich ursächliche und noch nicht bekannte Mutationen im *LEPRE1*-Gen detektiert. Die meisten bereits beschriebenen ursächlichen Mutationen im *LEPRE1*-Gen sind Frameshift-, Nonsense oder Splice-Site-Varianten, die zu einem vorzeitigen Stoppcodon und dem Kontrollmechanismus des Nonsense-mediated-decay führen und damit zu einem fehlenden oder stark verringertem funktionellen Proteinprodukt [118, 119].

Der OI-Phänotyp der Patienten mit *LEPRE1*-Mutationen wird in der Literatur mit einem schweren bis intrauterin letalen Verlauf, Rhizomelie, Kleinwuchs und starke Deformierungen beschrieben. Im Jahr 2009 war der am längsten überlebende Patient mit einer *LEPRE1*-Mutation etwas mehr als 17 Jahre alt. Er zeigte eine compound-heterozygote Splice-Site-Variante (c.2055+18G>A) und eine Nonsense-Variante (c.1102C>T), ähnlich wie P11 in dieser Arbeit. Dieser erreichte ebenfalls das 17. Lebensjahr. Bei einem in der Literatur beschriebenen Patienten konnte eine stark reduzierte Prolyl-3-Hydroxylation der $\alpha 1(I)$ Kette nachgewiesen werden [120]. Ebenso wurde dort ein Patient einer konsanguinen Familie vorgestellt, der eine Splice-Site-Veränderung (c.2055+18G>A) homozygot trägt und starke Verkürzungen und Verbiegungen der Extremitäten, eine Kyphoskoliose und bläuliche Skleren aufweist. P8 mit der homozygoten Splice-Site-Mutation c.1346-1G>C scheint mit 4 bis 5 Frakturen pro Jahr und starken Verbiegungen und Verkürzungen der Extremitäten, trotz des Fehlens von Rhizomelie, blauer Skleren und einer Kyphoskoliose, ähnlich stark betroffen zu sein. Es erscheint daher aufgrund des klinischen Erscheinungsbildes zusätzlich zu den benutzen Pathogenitätsvorhersageprogrammen plausibel, dass die detektierten Varianten für den Phänotyp der Patienten verantwortlich sind, was durch die heterozygote Anlageträgerschaft der Eltern bekräftigt werden konnte.

Bei einem Patienten wurde die bereits bekannte homozygote Mutation c.34G>C (p.Gly12Arg) im *BMP1*-Gen detektiert, dessen Metalloproteaseaktivität u.a. bei der Organisation und Bildung der EZM und Prozessierung von Kollagen Typ I relevant ist. Die identifizierte Mutation führt zu einer

Substitution von Glycin zu Arginin in Exon 1 des *BMP1*-Gens. Dort befindet sich das Signalpeptid des *BMP1*-Proteins, das für den Transport in das endoplasmatische Retikulum und die dort stattfindende posttranslationale Glykosylierung und Sekretion entscheidend ist [58]. In Experimenten auf Zellebene und in Zebrafischen präsentierte sich für die p.Gly12Arg-Mutation eine drastisch geringere Menge an sekretiertem *BMP1*, eine verringerte posttranslationale N-Glykosylierung und zusätzlich geringere Banden des Molekulargewichts im Immunblot [58]. Es zeigte sich bei den Patienten der Mutation eine normale bis erhöhte Knochenmineraldichte, während eine in der Protease-Domäne des Proteins liegende beschriebene homozygote Missense-Mutation sich eher mit klassischen OI-Symptomen präsentierte [58, 121]. Die drei in der Literatur beschriebenen Patienten mit der p.Gly12Arg-Mutation hatten weiße Skleren und zeigten zusätzlich einen milderen Phänotyp mit einem durchschnittlichen Alter bei der ersten Fraktur von 13,6 Monaten [122]. Dieser Phänotyp scheint bis auf die Farbe der Skleren mit den klinischen Merkmalen der Patientin hier vergleichbar zu sein, die eine relativ milde Osteopenie und einen normalen Z-Wert präsentierte, wenngleich die Schweregradeinteilung mit dem Scoring-System einen moderaten Phänotyp mit 6 Punkten erbrachte. Obwohl die Eltern nicht konsanguin waren, wurde ein weiteres betroffenes Familienmitglied angegeben, was beispielsweise für eine verdeckte Konsanguinität sprechen könnte. Beide Eltern konnten jeweils als heterozygote Anlageträger der Variante mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt werden. Wenngleich die Variante von MutationTaster und Polyphen2 als Polymorphismus eingeschätzt wurde, wahrscheinlich da die Region dort als nicht konserviert angegeben wird, erscheint sie nichtsdestotrotz aufgrund der Datenlage ursächlich für den Phänotyp der Patientin zu sein.

Auffällig war, dass bei Patient 28 mit einer der niedrigsten Gesamtabdeckungen im NGS keine ursächliche Variante in einem bereits für OI beschriebenen Gen gefunden wurde. Entsprechend wenig abgedeckte Exons im NGS könnten nochmals mit der Sanger-Methode nachfolgend sequenziert werden. Eventuell könnten mit alternativen Methoden, wie einer MLPA-Untersuchung (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) oder einer Array-CGH-Untersuchung (*Array-based Comparative Genomic Hybridization*), ganze Exon- oder Gen-Deletionen/Duplikationen als ursächlich identifizieren werden, die sich mittels Sanger-Sequenzierung und NGS nicht erfassen ließen. Ebenfalls erscheint die Durchführung von einer WES bzw. WGS zur Identifikation der ursächlichen Variante geeignet. Bei Patient 28 wäre eine Mutation in einem noch nicht entdeckten Gen, das den Knochenstoffwechsel beeinflusst, möglich. Ebenfalls wäre eine ursächliche Mutation in einem der 5 für OI bekannten, aber nicht im verwendeten Gen-Panel abgedeckten Gene, darunter *CREB3L1*, *P4HB*, *SEC24D*, *SPARC* und *PLS3*, möglich. Allerdings sind bei dem Patienten die klinischen Merkmale, die bei den bisher beschriebenen Patienten mit Mutationen in *P4HB*- und *SEC24D*-Gen beschrieben wurden und typisch für ein Cole-Carpenter-Syndrom wären, nicht vorhanden. Dazu zählen eine Kraniosynostose, okuläre Proptose,

Hydrozephalus und spezifische Gesichtsmerkmale [69]. Die zwei in der Literatur beschriebenen Patienten mit *SPARC*-Mutationen zeigten mit Wirbelkörperfrakturen, Skoliose, weiße Skleren und lediglich bei einem Patienten Deformierungen der oberen Extremitäten, ebenfalls scheinbar einen anderen Phänotyp als P28 [68]. Eine Mutation im *CREB3L1*-Gen, was für OASIS kodiert und die Transkription von *COL1A1* aktiviert sowie die Sekretion von bestimmten Matrixproteinen erleichtert, zeigte bei Mäusen mit dem ausgeschalteten Gen eine sehr schwere Osteopenie mit spontanen Frakturen. Da bei P28 ebenfalls ein sehr schwerer OI-Phänotyp beschrieben wurde, wäre eine Mutation im *CREB3L1* rein von phänotypischen Gesichtspunkten denkbar. Allerdings zeigten die heterozygoten Eltern in der Publikation mit den *CREB3L1*-Patienten klinische Merkmale, was hier nicht vermerkt wurde. Eventuell könnten die heterozygot detektierten Varianten im *FBLN5*-Gen, c.1313G>A (p.Arg438Gln) in Exon 11 bzw. c.-172delG im 5'UTR-Bereich, für den Phänotyp verantwortlich sein, wenngleich Genveränderungen im *FBLN5*-Gen bisher lediglich bei Patienten mit Cutis laxa beschrieben wurden [123]. Patienten mit biallelischen *FBLN5* Mutationen zeigen außer dem Hautphänotyp jedoch auch erhöhte Knochenbrüchigkeit.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Vorteile der Anwendung der Hochdurchsatzsequenzierung in der molekulargenetischen Diagnostik von Erkrankungen mit zahlreichen bekannten Genen wie Osteogenesis imperfecta, neben der hohen Effektivität mit einer Erfolgsrate in dieser Arbeit von 96,8 %, vorwiegend in einem Zeit- und Kostenersparnis liegen. Für die Entdeckung neuer Kandidatengene einer Erkrankung erscheint die Verwendung von Gene-Panels weniger geeignet, da lediglich eine ausgewählte Anzahl bereits beschriebener Gene angereichert werden. Dafür wäre die Durchführung von WES oder WGS möglich. Dort ergeben sich allerdings zunehmend ethische Konflikte, wenn Mutationen in Genen gefunden werden, die nicht mit dem zu untersuchenden Phänotyp in Verbindung stehen und eventuell mit einer anderen, bisher nicht in Erscheinung getretenen, Erkrankung assoziiert werden. Mit einer Panel-Diagnostik, in der nur für den zu untersuchenden Phänotyp in Zusammenhang gebrachte Gene enthalten sind, umgeht man diese Problematik. Theoretisch könnte sich zukünftig die Rolle der PCR als Goldstandard-Methode für die Validierung der Variante mit weiterem Fortschritt der NGS-Technologien dahingehend verschieben, dass sie lediglich für ausgewählte Gene oder Exons, die sich mittels NGS schlecht anreichern lassen, verwendet wird oder bei spezifischem Verdacht auf Mutationen in einem Gen anhand klinischer Charakteristiken. Dementsprechend erscheint die konventionelle Sequenzierung bei kurzen Genen und dem klinischen Verdacht auf das Vorliegen einer Mutation in einem bestimmten Gen, wie beispielsweise die hyperplastische Kallusbildung bei Trägern der 5'UTR-Mutation im *IFITM5*-Gens, schneller und günstiger als die Durchführung einer Panel-Diagnostik. Bei elterlicher Konsanguinität und der damit erhöhten Wahrscheinlichkeit einer autosomal-rezessiv vererbten OI-Form, mit mehr als 17 in Frage kommenden Genen und dem Fehlen von spezifischen auf ein Gen hinweisenden klinischen

Charakteristiken, erscheint die Panel-Diagnostik günstiger. Ebenso zeigte sich in diesem Fall die Verwendung von SNP-Mikroarray als geeignetes diagnostisches Verfahren mit einer hohen Erfolgsrate [93]. Bei der gezielten Diagnostik einer familiär bekannten Mutation wird die konventionelle Sanger-Sequenzierung als Goldstandard-Methode wahrscheinlich erhalten bleiben. In dieser Arbeit konnte mit der Identifizierung von 7 noch nicht auf c.DNA-Ebene beschriebenen wahrscheinlich ursächlichen Mutationen das Spektrum an bereits entdeckten Mutationen für Patienten mit Osteogenesis imperfecta erweitert werden, deren weitere biochemische Analysen in einem nächsten Schritt angeschlossen werden könnten. Ebenso konnte die bisher spärliche Datenlage zum Mutationsspektrum indischer OI-Fälle vergrößert werden. Mit zunehmender Entdeckung der ursächlichen Genveränderungen und pathophysiologischer Zusammenhänge im Knochenstoffwechsel, ergeben sich eventuell zukünftig neue therapeutische Möglichkeiten und Hoffnungen für Familien mit seltenen Skelettdysplasien [85].

4.4. Beurteilung der *PLS3*-Sequenzierung

Die exakte Diagnose der Osteoporose ist schwierig zu stellen, aufgrund der vielen Einflussfaktoren, die zu der Pathogenese beitragen können [124]. Generell ist sie charakterisiert durch eine verminderte Knochenmasse und eine erhöhte Neigung zu Frakturen. Eine aktuelle Definition für Diagnose-Kriterien der Osteoporose im Kindesalter setzt sich aus den zwei Hauptkriterien einer klinisch signifikanten Frakturanamnese sowie einem BMD Z-Wert ≤ -2 zusammen. Dabei kann die Diagnose im Kindesalter häufig allein bei dem Vorliegen von einer oder mehreren vertebrealen Kompressionsfrakturen gestellt werden [96, 124]. Mit zunehmendem Fortschritt der Hochdurchsatzsequenzierung rücken potenziell genetische Ursachen von vorzeitiger Osteoporose in den Interessensschwerpunkt und es wurden bereits zahlreiche ursächliche Varianten in Genen für dominante, rezessive und X-chromosomal-rezessive Vererbungsmuster der Osteoporose identifiziert. Aktuelle Strategien in der genetischen Diagnostik umfassen die gezielte Suche von Genveränderungen, welche mit Osteogenesis imperfecta in Verbindung stehen sowie u.a. *LRP5*, *WNT1* und *PLS3* [124].

Bei den 37 sequenzierten Patienten mit frühzeitiger Osteoporose wurden insgesamt 4 bekannte Polymorphismen detektiert. Diese waren allesamt bereits in Datenbanken vertreten. Es fanden sich lediglich bei 3 Patienten potenziell pathogene Veränderungen im *PLS3*-Gen, wovon eine bisher noch nicht in der Literatur beschrieben wurde. Unter den potentiell krankheitsverursachenden Mutationen befand sich eine, welche zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinkette führt, und zwei Mutationen, die den Spleiß-Vorgang beeinträchtigen könnten. Zunehmend rückt in der Genetik die Hypothese in den Vordergrund, dass ein Großteil aller

menschlichen genetischen Erkrankungen auf Defekte beim Spleiß-Vorgang zurückzuführen sind [125]. Dass damit die jahrzehntelange 1-Gen-1-Enzym-Hypothese und Annahme, dass die nicht kodierenden Bereiche der DNA keine funktionelle Bedeutung haben und fälschlicherweise deswegen auch als *junk DNA* bezeichnet wurden, überholt ist, wurde spätestens mit den enormen Fortschritten der Molekularbiologie und Biotechnologie in den letzten Jahren deutlich. Erst so lässt sich erklären, warum im Vergleich zu einer relativ geringen Anzahl an Genen eine wesentlich höhere Proteindiversität im Genom existiert [126, 127].

Bei dem 22-jährigen Patienten mit der detektierten Variante 1 (c.1512-1G>A) standen Familienangehörige für die Segregation sowie ärztliche Epikrisen aus den Jahren 2011 und 2012 zur Verfügung. Bei dem Patienten wurde nach einer Wirbelkörperfraktur und rezidivierenden Rückenschmerzen eine Knochendichtemessung initiiert, die einen Z-Wert der Lendenwirbelsäule von -3,4 ergab. Eine histologische Beckenkammbiopsie zeigte eine fortgeschrittene Osteopenie mit stark verschmälerten Knochenbalken, fokal aufgehobene Verknüpfungspunkte bei erhaltener Lamellenstruktur, leicht vermehrte oberflächliche Resorptionslakunen und mäßig vergrößerte osteoklastäre Riesenzellen. Zusätzlich fanden sich bei dem Patienten erhöhte Resorptionsparameter und eine unklare alkalische Phosphatase- und Osteocalcin-Erhöhung. Die Mutter des Patienten, die bei der Sequenzierung die gefundene Variante c.1512G>A heterozygot aufwies, zeigte keine signifikant auffälligen DXA-Werte mit einem T-Wert von -0,6. Bei der Großmutter mütterlicherseits des Patienten sei anamnestisch eine Osteoporose bekannt gewesen. Es lässt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen den vermerkten klinischen Auffälligkeiten des Patienten mit den bisher gefundenen Charakteristiken bei Patienten mit *PLS3*-Mutationen in der Literatur finden, wie beispielsweise die verringerte Trabekelzahl und das reduzierte trabekuläre Volumen bei normaler Lamellenstruktur des Knochens [72, 75]. Weiterhin wurde bei einigen Patienten ebenfalls eine verringerte Menge an Osteoid und eine erhöhte Osteoklastenoberfläche bei gesteigerten Resorptionsparametern bemerkt [75]. Bei anderen in der Literatur beschriebenen Patienten mit *PLS3*-Mutationen waren die Resorptionsparameter und Osteoklastenoberfläche im Normalbereich [72]. Einige Patienten mit *PLS3*-Mutationen zeigten Erhöhungen der alkalischen Phosphatase und von Osteocalcin, ähnlich wie dem Patienten in dieser Arbeit [74]. In der kürzlich veröffentlichten Publikation von Kämpe et al. 2017 zeigten die dort beschriebenen *PLS3*-Mutationsträger dahingegen eine erhöhte Osteoidbildung mit begleitender Hypomineralisation der Knochenmatrix. Das trabekuläre Volumen und die trabekuläre Dicke waren dabei ebenfalls stark vermindert [128]. Andere beschriebene knochenhistomorphometrischen Analysen bei Patienten mit *PLS3*-Mutationen bestätigten ebenfalls, dass die Menge an Trabekeln stark reduziert war und vergleichbar im Bereich von OI-Patienten lag. Im Gegensatz zu OI-Knochen waren jedoch alle Parameter von Knochenbildung und Knochenresorption ebenfalls deutlich verringert. Der Prozentsatz an Trabekelflächen, die

entweder von Osteoblasten oder Osteoklasten bedeckt waren, waren um ca. 80% bis 90% reduziert [124].

Wie bereits in Kapitel 3.2.3 beschrieben, wirkt sich die gefundene Sequenzveränderung c.1512-1G>T vor Exon 14 nach Analyse mit MutationTaster und dem Human Splicing Finder hochwahrscheinlich durch einen Verlust der ursprünglichen Spleiß-Akzeptor-Stelle pathogen aus und könnte folglich zu einem veränderten Protein oder einem vorzeitigen Abbau der Polypeptidkette führen. Es wurden bereits in der Literatur bei Patienten mit idiopathischer Osteoporose weitere Splice-Site-Mutationen im *PLS3*-Gen detektiert [74, 75]. Bei einem 2013 beschriebenen Patienten mit der Mutation c.748+1G>A wurde nachgewiesen, dass diese Veränderung zu der Bildung einer neuen Spleiß-Stelle und einem Überspringen von Teilen des Exons 7 führt. Klinisch präsentierten sich bei dem Patienten, ähnlich wie bei dem Patienten in der vorliegenden Arbeit, Wirbelkörperkompressionsfrakturen und periphere Frakturen. Bei der Knochendichtemessung ergab sich ein LS-aBMD Z-Wert von -3,75, trotz bereits laufender Bisphosphonat-Therapie. Eine Western-Blot-Analyse bei diesem Patienten zum Nachweis von Proteinprodukten zeigte eine vorhandene, aber dennoch verminderte *PLS3*-Bildung [74]. Wenn man bei der in dieser Arbeit detektierten Variante c.1512-1G>T einen ähnlichen Effekt suggeriert, könnte das erklären, warum die Mutter, welche die Variante lediglich heterozygot trägt, milde bis gar nicht betroffen ist und sich Spleiß-Mutationen milder als beispielsweise Nonsense-Mutationen auswirken können. Fahiminiya et al. haben 2014 zwei 6-jährige Brüder beschrieben, die eine Mutation c.1433T>C (p.Leu478Pro) in Exon 13, in relativer Nähe zu der in dieser Arbeit detektierten Veränderung, aufwiesen [72]. Die beiden Brüder wiesen LS-aBMD Z-Werte von -3,3 bzw. -3,4 auf. Weiterhin traten Wirbelkörperkompressionsfrakturen auf, während das Radius-Trabekelvolumen im unteren Normbereich lag. Deren Mutter, mit unbekanntem, aber wahrscheinlich heterozygotem Allelstatus, wies ebenfalls einen im Normalbereich liegenden LS-aBMD Z-Wert von -0,4 auf [72]. Zusammenfassend scheint es daher klinisch und molekulargenetisch wahrscheinlich, dass die detektierte Mutation c.1512-1G>A im *PLS3*-Gen für die idiopathische Osteoporose des 22-jährigen Patienten verantwortlich ist.

Bei der 61-jährigen weiblichen Patientin mit der gefundenen Nonsense-Mutation p.Arg256* lagen keine klinischen Daten für eine weitere Beurteilung vor. Dennoch führt die von MutationTaster als pathogen eingestufte Stoppmutation durch die interne Qualitätskontrolle der Zelle, den sogenannten *Nonsense-mediated-decay* (NMD), wahrscheinlich bereits während der Translation zu einem vorzeitigen zytoplasmatischen Abbau der mRNA. Folglich hätte die Patientin nur die durch das nicht betroffene Allel gebildete Menge an Plastin 3. Diese verringerte Menge an Plastin 3 könnte für dessen Funktionsaufrechterhaltung möglicherweise nicht ausreichend sein. Es wurden bereits wenige weitere Nonsense-Mutationen im *PLS3*-Gen beschrieben, darunter die

Variante c.1471C>T bei Patienten mit early-onset-Osteoporose [74]. Diese führt auf Proteinebene zu einem Stopp an Aminosäurestelle 491 (p.Gln491*). Die beiden männlichen Mutationsträger zeigten niedrige lumbale Knochendichtewerte mit Z-Werten von -2,8 und -3,4. Währenddessen waren die heterozygoten Frauen mit der Mutation, die zwischen 55 und 65 Jahre alt waren, mit LS-aBMD T-Werten von -0,6 bis -3,4 milder betroffen. Sie erhielten teilweise eine Bisphosphonat-Therapie und Vitamin-D-Supplementation, ebenso wie die hemizygoten männlichen Betroffenen [74]. Bei zwei männlichen jungen Osteoporose-Patienten mit der Mutation c.994_995delGA, die in der Literatur beschrieben sind, führt diese Veränderung zu einem Stoppsignal an der Stelle p.Asp332*. Diese ist ebenso wie die in dieser Arbeit detektierte Variante, p.Arg256*, Teil der Aktinbindungsdomäne 1. Die teilweise konservierte Region scheint für die direkte Funktion des Proteins essentiell zu sein [72].

Die in dieser Arbeit detektierte Variante c.766C>T (p.Arg256*) wurde kürzlich in einer Arbeit von Kämpe et al. 2017, in der bei 95 Probanden mit frühzeitiger Osteoporose oder multiplen Frakturen das *PLS3*-Gen sequenziert wurde, erstmals in der Literatur beschrieben [129]. Sie wurde bei einem 30-jährigen Finnen detektiert, der multiple Frakturen seit der frühen Kindheit erlitt, darunter zwischen 9 und 10 Jahren Frakturen in beiden Femora nach geringem Trauma und mit 13 Jahren zwei Oberarmfrakturen. Mit 10 Jahren wurden bei ihm multiple vertebrale Kompressionsfrakturen diagnostiziert. Eine Knochenbiopsie mit 11 Jahren bestätigte die Diagnose einer trabekulären Osteoporose mit geringem Knochenumsatz bei normaler Mineralisierung. Die DXA-Messwerte waren ebenfalls mit 18 Jahren deutlich verringert (Z-Wert der Lendenwirbelsäule -4,1 und Z-Wert am Oberschenkelhals -3,3). Die biochemischen Parameter waren normwertig, es lag lediglich ein sehr geringer Vitamin-D-Mangel vor (Serum 25-OH-Vitamin-D 35nmol/l). Interessanterweise wurden bei ihm einige extraskelettale Merkmale auffällig, darunter leicht bläuliche Skleren, leicht gelblich verfärbte Zähne sowie der Verlust von Zahnschmelz, eine generalisierte Gelenkhypermobilität, weiche Haut, eine leichte Aortenklappeninsuffizienz sowie Asthma bronchiale. Bei seiner Mutter konnte die Variante heterozygot nachgewiesen werden. Sie hatte eine Osteopenie, mit 46 Jahren einen Gesamtkörper-Z-Wert von -1,4, eine milde Gelenkhypermobilität, ebenfalls gering blaue Skleren und eine Radiusfraktur mit 35 Jahren nach einem Sturz erlitten [129].

Zusammenfassend ist es damit sehr wahrscheinlich, dass die detektierte Nonsense-Mutation für den Phänotyp der Patientin verantwortlich ist. Nach den Richtlinien des "American Collage of Medical Genetics and Genomic" zur Interpretation von Sequenzvarianten wird diese ebenfalls als eindeutig pathogen klassifiziert [129]. Weitere klinische Angaben, Informationen zur Familienanamnese sowie eine Knochenbiopsie bei der Patientin wären für eine weitere Beurteilung der Variante und zur Beschreibung verschiedener Genotyp-Phänotyp-Ausprägungsformen in Zusammenschau der Befunde der bereits beschriebenen Patienten mit der Mutation wegweisend. Die gefundene Variante untermauert die Hypothese, dass ebenfalls

Frauen mit einer heterozygoten pathogenen Variante eine frühzeitige Osteoporose entwickeln können [129].

Die dritte potenziell pathogene Variante im *PLS3*-Gen, die in dieser Arbeit detektiert wurde, umfasst die Deletion von 13 Basen im Intron 5, welches sich vor Exon 6 befindet. Dieses ist entscheidend an der Bildung der Aktinbindungsdomäne 1 im Plastin 3 Protein beteiligt. Die Software Human Splicing Finder prognostizierte, wie im Ergebnisteil berichtet, einen Verlust der Spleiß-Stelle und zusätzlich der Exonic-Spleißing-Silencer-Region (ESS). Exonic-Spleißing-Silencer verhindern ein Anlagern von regulatorischen Elementen beim Spleiß-Prozess und damit die Bildung des Protein-Spleiß-Komplex, indem sie beispielsweise Proteine der *hnRNP*-Familie (*heterogenous nuclear ribonucleoprotein family*) binden [130]. Sie sind als Gegenspieler der Enhancer für ein ausgewogenes Zusammenspiel beim Spleiß-Vorgang essentiell. Bisher ist vergleichsweise wenig über eventuell krankheitsverursachende Mutationen in tiefen intronischen Sequenzen und dort ablaufende Mechanismen bekannt, da diese stark unterrepräsentiert sind [131]. Eine Hypothese für diese Unterrepräsentation wäre die nicht routinemäßige Sequenzierung intronischer Sequenzen in Laboratorien, aufgrund der entsprechenden Länge intronischer Sequenzen und eine unkalkulierbare Kosten-Nutzen-Effektivität [131]. Dementsprechend könnte die hier detektierte Deletion eventuell wesentlich häufiger vorkommen und sogar einen Polymorphismus darstellen, wenn sie der herkömmlichen Sanger-Sequenzierungen und dem NGS bei dichter ans Exon ragenden Primer entgeht. Zusätzlich befindet sich die Forschung bei Splice-Site-Vorhersageprogrammen an den Anfängen und Genauigkeitsangaben fehlen. Beispielsweise wurden in dieser Arbeit im Human Splicing Finder lediglich 300 Basen vor und nach der entsprechenden Veränderung für die Analyse mit einbezogen. In der Standardeinstellung der Internetseite analysiert Human Splicing Finder 100 Basen vor und nach der entsprechenden Mutation, obwohl bis zu maximal 1000 Basen bei den verwendeten Algorithmen möglich wären. Fehlerquellen könnten ebenso in dem verwendeten Vorhersageprogramm MutationTaster liegen, welches bis vor kurzem eine Beschränkung auf Vorhersagen bis maximal 12 Basenpaardeletionen hatte [100, 101]. Durch die Verbesserung zu MutationTaster2, welches auch Daten zu regulatorischen Bereichen aus dem ENCODE-Projekt und JASPAR7 bezieht und genauere Aussagen zu Exon-Intron-Übergängen und Spleiß-Mutationen trifft, hat sich dessen Spezifität und Sensitivität allerdings erhöht [132].

Allerdings wurde die Variante in der oben bereits beschriebenen Publikation von Kämpe et al. 2017 bereits detektiert mit einer deutlich höheren Allelfrequenz in der dort untersuchten Kohorte im Vergleich zu dbSNP (0,043 vs. 0,009) [129]. Es wurden 96 gesunde finnische Kontrollprobanden auf die Variante untersucht, wobei sich eine ähnliche Häufigkeit zeigte. Es ist schlussfolgernd dennoch denkbar, dass sich die in der vorliegenden Arbeit gefundene weit intronische Mutation auf die regulatorischen Bereiche und den vorhergesagten Spleiß-Akzeptor

sowie die Exonic-Splicing-Silencer-Region auswirkt und zu der idiopathischen Osteoporose des Patienten beiträgt, obwohl es die Ergebnisse von Kämpe et al. 2017 unwahrscheinlicher machen und eher von einer bisherigen Unterrepräsentation dieser Variante in dbSNP auszugehen ist.

Generell lässt sich feststellen, dass die hier untersuchten männlichen Patienten bei der *PLS3*-Sequenzierung im Schnitt jünger und zahlenmäßig höher vertreten waren. Dies könnte mit dem X-chromosomalen Erbgang in Einklang gebracht werden mit der Schlussfolgerung, dass es bei Frauen durch die Kompensation des zweiten X-Chromosoms zu einem milden oder gar keinem auffälligen Phänotyp kommt oder sich die Osteoporose möglicherweise später manifestiert und als postmenopausal eingeordnet wird. [74]. Eine weitere Hypothese könnte eine dominant negative Wirkung des mutierten Allels auf das andere Allel sein. Da eine variable Ausprägung allerdings auch innerhalb einer Familie gesehen werden kann, in der alle Betroffenen die gleiche genetische Variante aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass weitere Einflussfaktoren mit betrachtet werden müssen [129]. Da jedoch keine weiteren klinischen Angaben zum eventuellen Schweregrad und Manifestationsalter vorliegen, lässt sich die Theorie anhand der in der Dissertation bearbeiteten Fälle nicht weiter untermauern. In den aktuellen Publikationen wurde bemerkt, dass das klinische Bild von heterozygoten Frauen von normaler Knochendichte mit einer Abwesenheit von Frakturen bis hin zu einer schweren early-onset-Osteoporose erheblich variiert. Dabei könnte neben exogenen Faktoren, wie Vitamin-D-Mangel, Immobilität der Betroffenen und Hormonstatus, zusätzlich eine X-Inaktivierung von Bedeutung sein. Eine X-Inaktivierung könnte folglich erklären, warum weibliche Patienten mit identischem Genotyp unterschiedliche phänotypische Schweregrade zeigen [129].

Weiterhin könnte sich der zu anderen OI-Formen vergleichsweise mildere Phänotyp durch eine mögliche funktionelle Redundanz durch ein anderes Aktin-Bindungsprotein erklären, was als Biodiversität bezeichnet wird. Gleiches gilt, falls ein anderes, eventuell noch nicht bekanntes, Gen am gleichen Vorgang wie Plastin 3 beteiligt ist und dessen Aktivität ausreicht, um eine nahezu normale Funktion aufrecht zu erhalten. In der Genetik wird das als genetische Redundanz beschrieben [72].

Die lokal aufgehobenen Verknüpfungspunkte bei den histologischen Untersuchungen und die erhöhten Resorptionsparameter des Patienten mit der hier detektierten Variante, c.1512-1G>A, scheinen mit der Hypothese vereinbar, dass *PLS3*-Mutationen über ein vermindertes „Mechanosensing“ der Osteozyten zu einer anschließender Dysregulation im Knochenauf- und abbau führen, resultierend als Osteoporose und mit vermehrten Knochenbrüchen [74]. Grundlegend wären folglich Untersuchungen am Knochen von Mausmodellen notwendig, um eine Mechanosensitivität in vivo besser bewerten zu können. Zwar lieferten die Untersuchungen

an Zebrafischen wichtige Informationen über die Beteiligung von *PLS3* am skelettalen Aufbau, jedoch könnte der Einfluss mechanischer Reize durch weitere in vivo-Untersuchungen untermauert werden [72].

Kürzlich wurde eine weitere mögliche Hypothese über den molekularen Mechanismus der *PLS3*-assoziierten Osteoporose beschrieben. Dabei wurde *LCP1*, *Lymphocyte cytosolic protein 1*, welches während der Osteoblastendifferenzierung hochreguliert wird und ein ähnliches Expressionsmuster aufweist wie *PLS3*, als ein potenzieller *PLS3*-Interaktionspartner beschrieben. Die dort untersuchte Mutation p.Ala253_Leu254insAsn befand sich ebenfalls in der ersten EF-Hand-Domäne von *PLS3* und scheint die Bindung zu *LCP1* schwächen. Zusammen scheinen sie eine mögliche Rolle bei der Calciumregulation einzunehmen [133].

Weiterhin muss als potentielle Fehlerquelle abermals die in der Arbeit verwendete Polymerase-Kettenreaktion erwähnt werden, da sie zwar für den Nachweis von Punktmutationen und kleiner Deletionen/Insertionen gut geeignet ist, aber größere Deletionen und Duplikationen der Methode entgehen können. Mithilfe des NGS und einer entsprechend ausreichenden Abdeckung der einzelnen Exons des *PLS3*-Gens, könnte diese Problematik eventuell künftig umgangen werden. In der Arbeit von Kämpe et al. 2017 wurde bei einem betroffenen Jungen eine Gen-Panel-Testung mit 18 enthaltenen Genen für Bindegewebserkrankungen durchgeführt, die keine pathologischen Sequenzvarianten ergab. Allerdings war die Lesetiefe für nahezu alle Exons des *PLS3*-Gens 0, so dass eine Array-CGH-Untersuchung durchgeführt wurde, welche eine Deletion des gesamten *PLS3*-Gens erbrachte [128]. Dementsprechend sind NGS-Daten kritisch auszuwerten.

Allein anhand der klinischen Auffälligkeiten scheint eine eindeutige Zuordnung zu den entsprechenden Genen und damit assoziierten Krankheitsbildern, in dem Fall der frühzeitigen Osteoporose oder Osteogenesis imperfecta, nicht möglich, sondern liefert lediglich Anhaltspunkte. Beispielsweise waren in der oben genannten und erst kürzlich veröffentlichten Arbeit von Kämpe et al. 2017 leicht bläuliche Skleren sowie leicht gelblich verfärbte Zähne und ein Zahnschmelzdefekt beobachtet worden und in einer 2016 veröffentlichten Publikation von Nishi et al. wurde mittels Exom-Sequenzierung bei zwei Brüdern eine sehr wahrscheinlich pathogene Veränderung im *PLS3*-Gen identifiziert (c.1103C>A, p.Ala368Asp), bei denen u.a. blaue Skleren und eine angeborene Schwerhörigkeit beidseits beschrieben wurde [129, 134]. Diese extraskelettale Auffälligkeiten wurden bisher klassischerweise mit OI assoziiert. Bei den 6 und 11 Jahre alten Brüdern waren neben der Frakturanamnese und einer verminderten Knochenmineraldichte (Z-Werten von -4,2 und -5,6), eine leichte Entwicklungsverzögerung, eine leichte Gelenkhypermobilität und faziale Dysmorphien auffällig (Hypertelorismus, breite

Nasenspitze, schräge Lidspalten). Die vermehrt in anderen Publikationen bei Patienten mit *PLS3*-Mutationen beschriebenen vertebrealen Kompressionsfrakturen wurden bei den beiden Brüdern nicht beschrieben [134]. Weiterhin wird das ubiquitär exprimierte *PLS3*-Gen als Modulator bei der spinalen Muskelatrophie beschrieben. Es wäre daher denkbar, dass es ebenfalls eine bisher noch nicht vollständig entschlüsselte Funktion beim neuronalen Wachstum einnimmt und die milde Entwicklungsverzögerung der Patienten mit der Genveränderung in einem kausalen Zusammenhang zu sehen ist [134]. Generell scheinen Patienten mit *PLS3*-Mutationen ebenfalls extraskelletalen Manifestationen aufweisen zu können, wenngleich bisher nur wenige in der Literatur beschrieben sind. Bisher wurde nur eine sehr geringe Anzahl an hochwahrscheinlich krankheitsverursachenden Mutationen im *PLS3*-Gen gefunden. Mit dem Nachweis einer eventuell ursächlichen Veränderung bei 8,1 % der untersuchten Patienten in dieser Dissertation, erscheinen *PLS3*-Mutationen bei lediglich wenigen Patienten vorzukommen.

Zusammenfassend sind neben klinischen Angaben zusätzlich weitere Untersuchungen, wie beispielsweise histomorphometrische Untersuchungen und Genexpressionsanalysen auf Proteinebene notwendig, um die detektierten Varianten in ihrer Pathogenität besser zu beurteilen. Die geringe Anzahl an bisher beschriebenen Varianten und der noch weitgehend ungeklärte Pathomechanismus verdeutlichen die Notwendigkeit des weiteren Forschungsbedarfes. Die molekulare Diagnose ist wichtig für das richtige Patientenmanagement und die genetische Beratung, wenngleich eine spezifische Behandlung für *PLS3*-verursachte Osteoporose noch nicht verfügbar ist [129]. In den meisten veröffentlichten Publikationen profitierten die Patienten dennoch von einer Bisphosphonat-Therapie [72, 135]. In einer sehr kleinen Studie von 2017 zeigte sich ebenfalls ein Ansprechen auf eine Teriparatid-Therapie [136]. Die Klärung des Pathomechanismus eröffnet daher vielleicht weitere Forschungsfelder im therapeutischen Bereich, beispielsweise den Bereich der Gentherapie. Die Aufnahme von *PLS3* in zahlreiche Gen-Panels zur Untersuchung bei Patienten mit veränderter Knochenmasse, wie Osteoporose, Osteogenesis imperfecta oder auch Osteopetrose, erscheint folglich einen wichtigen Schritt darzustellen, um die spärliche Datenlage an bisher detektierten Varianten zu erweitern. Mit sinkenden Kosten und der steigenden Anzahl potentiell beteiligter Gene könnte die Exom-/Genomsequenzierung die gezielte Gen-Panel-Untersuchung in den nächsten Jahren allerdings bereits ersetzen [124]. Zusätzlich bieten einige diagnostische Genetik-Laboratorien, ebenso wie in der vorliegenden Arbeit, eine konventionelle Sanger-Sequenzierung an. Bei klinischem Verdacht, negativem Screening weiterer bekannter Gene und einer eventuell auffälligen Familienanamnese, die einen X-chromosomal erblichen Erbgang vermuten lässt, sollte folglich an eine ursächliche Veränderung im *PLS3*-Gen bei beiden Geschlechtern gedacht werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Krakow D, Rimoin DL. The skeletal dysplasias. *Genet Med*. 2010;12(6):327-41.
2. Mitchell BD, Streeten EA. Clinical impact of recent genetic discoveries in osteoporosis. *Appl Clin Genet*. 2013;6:75-85.
3. Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:121-45.
4. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem*. 2010;285(33):25103-8.
5. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. 2003;423(6937):349-55.
6. Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep*. 2014;3:481.
7. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337-42.
8. Jin Z, Li X, Wan Y. Minireview: nuclear receptor regulation of osteoclast and bone remodeling. *Mol Endocrinol*. 2015;29(2):172-86.
9. Boyce BF, Yao Z, Zhang Q, Guo R, Lu Y, Schwarz EM, Xing L. New roles for osteoclasts in bone. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1116:245-54.
10. Panda A, Gamanagatti S, Jana M, Gupta AK. Skeletal dysplasias: A radiographic approach and review of common non-lethal skeletal dysplasias. *World J Radiol*. 2014;6(10):808-25.
11. Ikegawa S. Genetic analysis of skeletal dysplasia: recent advances and perspectives in the post-genome-sequence era. *J Hum Genet*. 2006;51(7):581-6.
12. Kornak U, Mundlos S. Genetic Disorders of the Skeleton: A Developmental Approach. *American Journal of Human Genetics*. 2003;73(3):447-74.
13. Krakow D. Skeletal dysplasias. *Clin Perinatol*. 2015;42(2):301-19, viii.
14. Holzer G. [The significance of osteoporosis for orthopaedic and trauma surgeons]. *Z Orthop Unfall*. 2013;151(1):93-104; quiz 5-6.
15. Shah AD, Shoback D, Lewiecki EM. Sclerostin inhibition: a novel therapeutic approach in the treatment of osteoporosis. *Int J Womens Health*. 2015;7:565-80.
16. Urano T, Inoue S. Genetics of osteoporosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014;452(2):287-93.
17. Heine H. *Lehrbuch der biologischen Medizin - Grundregulation und Extrazelluläre Matrix* Karl F Haug Verlag Stuttgart 2014;4., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage 91.
18. Drake MT, Clarke BL, Lewiecki EM. The Pathophysiology and Treatment of Osteoporosis. *Clin Ther*. 2015.
19. Adams JE. Advances in bone imaging for osteoporosis. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(1):28-42.
20. Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future. *Lancet*. 2011;377(9773):1276-87.
21. Lorente-Ramos R, Azpeitia-Arman J, Munoz-Hernandez A, Garcia-Gomez JM, Diez-Martinez P, Grande-Barez M. Dual-energy x-ray absorptiometry in the diagnosis of osteoporosis: a practical guide. *AJR Am J Roentgenol*. 2011;196(4):897-904.
22. Baim S, Leonard MB, Bianchi ML, Hans DB, Kalkwarf HJ, Langman CB, Rauch F. Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry and executive summary of the 2007 ISCD Pediatric Position Development Conference. *J Clin Densitom*. 2008;11(1):6-21.
23. Bachrach LK. Diagnosis and treatment of pediatric osteoporosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2014;21(6):454-60.
24. Ma NS, Gordon CM. Pediatric osteoporosis: where are we now? *J Pediatr*. 2012;161(6):983-90.
25. Bianchi ML. Osteoporosis in children and adolescents. *Bone*. 2007;41(4):486-95.
26. Heaney RP, Abrams S, Dawson-Hughes B, Looker A, Marcus R, Matkovic V, Weaver C. Peak bone mass. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2000;11(12):985-1009.
27. Schutze N, Ebert R, Paunescu K, Jakob F. [Genetics of osteoporosis]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2003;128(30):1609-14.
28. Ralston SH. Genetics of osteoporosis. *Proc Nutr Soc*. 2007;66(2):158-65.
29. Ralston SH. Genetics of osteoporosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1192:181-9.
30. Stewart TL, Ralston SH. Role of genetic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *J Endocrinol*. 2000;166(2):235-45.
31. Marini JC, Reich A, Smith SM. Osteogenesis imperfecta due to mutations in non-collagenous genes: lessons in the biology of bone formation. *Curr Opin Pediatr*. 2014;26(4):500-7.
32. Valadares ER, Carneiro TB, Santos PM, Oliveira AC, Zabel B. What is new in genetics and osteogenesis imperfecta classification? *J Pediatr (Rio J)*. 2014.
33. Rauch F, Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta. *Lancet (London, England)*. 2004;363(9418):1377-85.
34. Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2008;22(1):85-100.
35. Rauch F, Lalic L, Roughley P, Glorieux FH. Genotype-phenotype correlations in nonlethal osteogenesis imperfecta caused by mutations in the helical domain of collagen type I. *Eur J Hum Genet*. 2010;18(6):642-7.
36. Biggin A, Munns CF. Osteogenesis imperfecta: diagnosis and treatment. *Curr Osteoporos Rep*. 2014;12(3):279-88.
37. Silience DO, Senn A, Danks DM. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *J Med Genet*. 1979;16(2):101-16.

38. Fratzl-Zelman N, Misof BM, Roschger P, Klaushofer K. Classification of osteogenesis imperfecta. *Wien Med Wochenschr.* 2015;165(13-14):264-70.
39. Van Dijk FS, Sillence DO. Osteogenesis imperfecta: clinical diagnosis, nomenclature and severity assessment. *American journal of medical genetics Part A.* 2014;164a(6):1470-81.
40. Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, Marini JC. New perspectives on osteogenesis imperfecta. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7(9):540-57.
41. Schaaf C, Zschocke J. *Basiswissen Humangenetik Springer-Lehrbuch.* 2013 (2. Auflage).
42. Marini JC, Blissett AR. New genes in bone development: what's new in osteogenesis imperfecta. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2013;98(8):3095-103.
43. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie.* 9., vollständig überarbeitete Auflage ed. Berlin: Springer; 2014.
44. Venturi G, Tedeschi E, Mottes M, Valli M, Camilot M, Viglio S, Antoniazzi F, Tato L. Osteogenesis imperfecta: clinical, biochemical and molecular findings. *Clinical genetics.* 2006;70(2):131-9.
45. Marini JC, Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, San Antonio JD, Milgrom S, Hyland JC, Korkko J, Prockop DJ, De Paepe A, Coucke P, Symoens S, Glorieux FH, Roughley PJ, Lund AM, Kuurila-Svahn K, Hartikka H, Cohn DH, Krakow D, Mottes M, Schwarze U, Chen D, Yang K, Kuslich C, Troendle J, Dalgleish R, Byers PH. Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Hum Mutat.* 2007;28(3):209-21.
46. Campbell NA, Reece JB. *Biologie.* München [u.a.]: Pearson Studium; 2006.
47. Lareau LF, Green RE, Bhatnagar RS, Brenner SE. The evolving roles of alternative splicing. *Curr Opin Struct Biol.* 2004;14(3):273-82.
48. Hanagata N. IFITM5 mutations and osteogenesis imperfecta. *J Bone Miner Metab.* 2015.
49. Lazarus S, McInerney-Leo AM, McKenzie FA, Baynam G, Broley S, Cavan BV, Munns CF, Puijts JE, Sillence D, Terhal PA, Pryce K, Brown MA, Zankl A, Thomas G, Duncan EL. The IFITM5 mutation c.-14C > T results in an elongated transcript expressed in human bone; and causes varying phenotypic severity of osteogenesis imperfecta type V. *BMC Musculoskelet Disord.* 2014;15:107.
50. Becker J, Semler O, Gilissen C, Li Y, Bolz HJ, Giunta C, Bergmann C, Rohrbach M, Koerber F, Zimmermann K, de Vries P, Wirth B, Schoenau E, Wollnik B, Veltman JA, Hoischen A, Netzer C. Exome sequencing identifies truncating mutations in human SERPINF1 in autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet.* 2011;88(3):362-71.
51. Fratzl-Zelman N, Schmidt I, Roschger P, Roschger A, Glorieux FH, Klaushofer K, Wagermaier W, Rauch F, Fratzl P. Unique micro- and nano-scale mineralization pattern of human osteogenesis imperfecta type VI bone. *Bone.* 2015;73:233-41.
52. Li F, Song N, Tombran-Tink J, Niyibizi C. Pigment epithelium derived factor suppresses expression of Sost/Sclerostin by osteocytes: implication for its role in bone matrix mineralization. *J Cell Physiol.* 2015;230(6):1243-9.
53. Valli M, Barnes AM, Gallanti A, Cabral WA, Viglio S, Weis MA, Makareeva E, Eyre D, Leikin S, Antoniazzi F, Marini JC, Mottes M. Deficiency of CRTAP in non-lethal recessive osteogenesis imperfecta reduces collagen deposition into matrix. *Clinical genetics.* 2012;82(5):453-9.
54. Barnes AM, Carter EM, Cabral WA, Weis M, Chang W, Makareeva E, Leikin S, Rotimi CN, Eyre DR, Raggio CL, Marini JC. Lack of cyclophilin B in osteogenesis imperfecta with normal collagen folding. *N Engl J Med.* 2010;362(6):521-8.
55. Cabral WA, Perdivara I, Weis M, Terajima M, Blissett AR, Chang W, Perosky JE, Makareeva EN, Mertz EL, Leikin S, Tomer KB, Kozloff KM, Eyre DR, Yamauchi M, Marini JC. Abnormal type I collagen post-translational modification and crosslinking in a cyclophilin B KO mouse model of recessive osteogenesis imperfecta. *PLoS Genet.* 2014;10(6):e1004465.
56. Duran I, Nevarez L, Sarukhanov A, Wu S, Lee K, Krejci P, Weis M, Eyre D, Krakow D, Cohn DH. HSP47 and FKBP65 cooperate in the synthesis of type I procollagen. *Hum Mol Genet.* 2015;24(7):1918-28.
57. Syx D, Guillemyn B, Symoens S, Sousa AB, Medeira A, Whiteford M, Hermanns-Le T, Coucke PJ, De Paepe A, Malfait F. Defective Proteolytic Processing of Fibrillar Procollagens and Prodecorin Due to Biallelic BMP1 Mutations Results in a Severe, Progressive Form of Osteogenesis Imperfecta. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2015;30(8):1445-56.
58. Asharani PV, Keupp K, Semler O, Wang W, Li Y, Thiele H, Yigit G, Pohl E, Becker J, Frommolt P, Sonntag C, Altmüller J, Zimmermann K, Greenspan DS, Akarsu NA, Netzer C, Schonau E, Wirth R, Hammerschmidt M, Nurnberg P, Wollnik B, Carney TJ. Attenuated BMP1 function compromises osteogenesis, leading to bone fragility in humans and zebrafish. *Am J Hum Genet.* 2012;90(4):661-74.
59. Joeng KS, Lee YC, Jiang MM, Bertin TK, Chen Y, Abraham AM, Ding H, Bi X, Ambrose CG, Lee BH. The swaying mouse as a model of osteogenesis imperfecta caused by WNT1 mutations. *Hum Mol Genet.* 2014;23(15):4035-42.
60. Keupp K, Beleggia F, Kayserili H, Barnes AM, Steiner M, Semler O, Fischer B, Yigit G, Janda CY, Becker J, Breer S, Altunoglu U, Grunhagen J, Krawitz P, Hecht J, Schinke T, Makareeva E, Lausch E, Cankaya T, Caparros-Martin JA, Lapunzina P, Temtamy S, Aglan M, Zabel B, Eysel P, Koerber F, Leikin S, Garcia KC, Netzer C, Schonau E, Ruiz-Perez VL, Mundlos S, Amling M, Kornak U, Marini J, Wollnik B. Mutations in WNT1 cause different forms of bone fragility. *Am J Hum Genet.* 2013;92(4):565-74.
61. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med.* 2013;19(2):179-92.

62. Volodarsky M, Markus B, Cohen I, Staretz-Chacham O, Flusser H, Landau D, Shelef I, Langer Y, Birk OS. A deletion mutation in TMEM38B associated with autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat.* 2013;34(4):582-6.
63. Yamazaki D, Komazaki S, Nakanishi H, Mishima A, Nishi M, Yazawa M, Yamazaki T, Taguchi R, Takeshima H. Essential role of the TRIC-B channel in Ca²⁺ handling of alveolar epithelial cells and in perinatal lung maturation. *Development.* 2009;136(14):2355-61.
64. Shaheen R, Alazami AM, Alshammari MJ, Faqeh E, Alhashmi N, Mousa N, Alsinani A, Ansari S, Alzahrani F, Al-Owain M, Alzayed ZS, Alkuraya FS. Study of autosomal recessive osteogenesis imperfecta in Arabia reveals a novel locus defined by TMEM38B mutation. *J Med Genet.* 2012;49(10):630-5.
65. Zhu F, Friedman MS, Luo W, Woolf P, Hankenson KD. The transcription factor osterix (SP7) regulates BMP6-induced human osteoblast differentiation. *J Cell Physiol.* 2012;227(6):2677-85.
66. Kasaaï B, Gaumond MH, Moffatt P. Regulation of the bone-restricted IFITM-like (Bril) gene transcription by Sp and Gli family members and CpG methylation. *J Biol Chem.* 2013;288(19):13278-94.
67. Symoens S, Malfait F, D'Hondt S, Callewaert B, Dheedene A, Steyaert W, Bachinger HP, De Paepe A, Kayserili H, Coucke PJ. Deficiency for the ER-stress transducer OASIS causes severe recessive osteogenesis imperfecta in humans. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8:154.
68. Mendoza-Londono R, Fahiminiya S, Majewski J, Tetreault M, Nadaf J, Kannu P, Sochett E, Howard A, Stimec J, Dupuis L, Roschger P, Klaushofer K, Palomo T, Ouellet J, Al-Jallad H, Mort JS, Moffatt P, Boudko S, Bachinger HP, Rauch F. Recessive osteogenesis imperfecta caused by missense mutations in SPARC. *Am J Hum Genet.* 2015;96(6):979-85.
69. Garbes L, Kim K, Rieß A, Hoyer-Kuhn H, Beleggia F, Bevot A, Kim Mi J, Huh Yang H, Kweon H-S, Savarirayan R, Amor D, Kakadia Purvi M, Lindig T, Kagan Karl O, Becker J, Boyadjiev Simeon A, Wollnik B, Semler O, Bohlander Stefan K, Kim J, Netzer C. Mutations in SEC24D, Encoding a Component of the COPII Machinery, Cause a Syndromic Form of Osteogenesis Imperfecta. *The American Journal of Human Genetics.* 2015;96(3):432-9.
70. Rauch F, Fahiminiya S, Majewski J, Carrot-Zhang J, Boudko S, Glorieux F, Mort JS, Bachinger HP, Moffatt P. Cole-Carpenter syndrome is caused by a heterozygous missense mutation in P4HB. *Am J Hum Genet.* 2015;96(3):425-31.
71. Arundel P, Bishop N. Primary Osteoporosis. *Endocr Dev.* 2015;28:162-75.
72. Fahiminiya S, Majewski J, Al-Jallad H, Moffatt P, Mort J, Glorieux FH, Roschger P, Klaushofer K, Rauch F. Osteoporosis caused by mutations in PLS3: clinical and bone tissue characteristics. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2014;29(8):1805-14.
73. Wright NM. Just taller or more bone? The impact of growth hormone on osteogenesis imperfecta and idiopathic juvenile osteoporosis. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2000;13 Suppl 2:999-1002.
74. van Dijk FS, Zillikens MC, Micha D, Riessland M, Marcelis CL, de Die-Smulders CE, Milbradt J, Franken AA, Harsevoort AJ, Lichtenbelt KD, Pruijs HE, Rubio-Gozalbo ME, Zwertbroek R, Moutaouakil Y, Egthuijsen J, Hammerschmidt M, Bijman R, Semeins CM, Bakker AD, Everts V, Klein-Nulend J, Campos-Obando N, Hofman A, te Meerman GJ, Verkerk AJ, Uitterlinden AG, Maugeri A, Stermans EA, Waisfisz Q, Meijers-Heijboer H, Wirth B, Simon ME, Pals G. PLS3 mutations in X-linked osteoporosis with fractures. *N Engl J Med.* 2013;369(16):1529-36.
75. Laine CM, Wessman M, Toiviainen-Salo S, Kaunisto MA, Mayranpaa MK, Laine T, Pekkinen M, Kroger H, Valimaki VV, Valimaki MJ, Lehesjoki AE, Makitie O. A novel splice mutation in PLS3 causes X-linked early onset low-turnover osteoporosis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2015;30(3):510-8.
76. Shinomiya H. Platin family of actin-bundling proteins: its functions in leukocytes, neurons, intestines, and cancer. *Int J Cell Biol.* 2012;2012:213492.
77. Kamioka H, Sugawara Y, Honjo T, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T. Terminal differentiation of osteoblasts to osteocytes is accompanied by dramatic changes in the distribution of actin-binding proteins. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2004;19(3):471-8.
78. Babb SG, Matsudaira P, Sato M, Correia I, Lim SS. Fimbrin in podosomes of monocyte-derived osteoclasts. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1997;37(4):308-25.
79. Kim JM, Kim J, Kim YH, Kim KT, Ryu SH, Lee TG, Suh PG. Comparative secretome analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenesis. *J Cell Physiol.* 2013;228(1):216-24.
80. Weinbaum S, Duan Y, Thi MM, You L. An Integrative Review of Mechanotransduction in Endothelial, Epithelial (Renal) and Dendritic Cells (Osteocytes). *Cell Mol Bioeng.* 2011;4(4):510-37.
81. Hood L, Rowen L. The Human Genome Project: big science transforms biology and medicine. *Genome Med.* 2013;5(9):79.
82. Gould Rothberg BE, Rothberg JM. Massively Parallel ("Next-Generation") DNA Sequencing. *Clin Chem.* 2015;61(7):997-8.
83. Jessri M, Farah CS. Next generation sequencing and its application in deciphering head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2014;50(4):247-53.
84. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2013;98(6):236-8.
85. 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.
86. Marian AJ. Sequencing your genome: what does it mean? *Methodist Debaque Cardiovasc J.* 2014;10(1):3-6.
87. Lohmann K, Klein C. Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis. *Neurotherapeutics.* 2014;11(4):699-707.

88. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* 2008;26(10):1135-45.
89. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010;11(1):31-46.
90. Xuan J, Yu Y, Qing T, Guo L, Shi L. Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. *Cancer Lett.* 2013;340(2):284-95.
91. Matullo G, Di Gaetano C, Guarrera S. Next generation sequencing and rare genetic variants: from human population studies to medical genetics. *Environ Mol Mutagen.* 2013;54(7):518-32.
92. Wang Y, Yang Q, Wang Z. The evolution of nanopore sequencing. *Front Genet.* 2014;5:449.
93. Stephen J, Girisha KM, Dalal A, Shukla A, Shah H, Srivastava P, Kornak U, Phadke SR. Mutations in patients with osteogenesis imperfecta from consanguineous Indian families. *Eur J Med Genet.* 2015;58(1):21-7.
94. Gentile FV, Zuntini M, Parra A, Battistelli L, Pandolfi M, Pals G, Sangiorgi L. Validation of a quantitative PCR-high-resolution melting protocol for simultaneous screening of COL1A1 and COL1A2 point mutations and large rearrangements: application for diagnosis of osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat.* 2012;33(12):1697-707.
95. Stephen J, Shukla A, Dalal A, Girisha KM, Shah H, Gupta N, Kabra M, Dabadghao P, Phadke SR. Mutation spectrum of COL1A1 and COL1A2 genes in Indian patients with osteogenesis imperfecta. *American journal of medical genetics Part A.* 2014;164a(6):1482-9.
96. Kampe AJ, Makitie RE, Makitie O. New Genetic Forms of Childhood-Onset Primary Osteoporosis. *Hormone research in paediatrics.* 2015;84(6):361-9.
97. Kamphans T, Krawitz PM. GeneTalk: an expert exchange platform for assessing rare sequence variants in personal genomes. *Bioinformatics.* 2012;28(19):2515-6.
98. Zemojtel T, Köhler S, Mackenroth L, Jäger M, Hecht J, Krawitz P, Graul-Neumann L, Doelken S, Ehmke N, Spielmann M, Øien 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):252ra123-252ra123.
99. Cock PJ, Fields CJ, Goto N, Heuer ML, Rice PM. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(6):1767-71.
100. Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Meth.* 2010;7(8):575-6.
101. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(9):e67.
102. 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.
103. Sule G, Campeau PM, Zhang VW, Nagamani SC, Dawson BC, Grover M, Bacino CA, Sutton VR, Brunetti-Pierri N, Lu JT, Lemire E, Gibbs RA, Cohn DH, Cui H, Wong LJ, Lee BH. Next-generation sequencing for disorders of low and high bone mineral density. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA.* 2013;24(8):2253-9.
104. Teeuw ME, Loukili G, Bartels EAC, ten Kate LP, Cornel MC, Henneman L. Consanguineous marriage and reproductive risk: attitudes and understanding of ethnic groups practising consanguinity in Western society. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(4):452-7.
105. Ries L, Frydman M, Barkai G, Goldman B, Friedman E. Prenatal diagnosis of a novel COL1A1 mutation in osteogenesis imperfecta type I carried through full term pregnancy. *Prenat Diagn.* 2000;20(11):876-80.
106. Hartikka H, Kuurila K, Korkko J, Kaitila I, Grenman R, Pynnonen S, Hyland JC, Ala-Kokko L. Lack of correlation between the type of COL1A1 or COL1A2 mutation and hearing loss in osteogenesis imperfecta patients. *Hum Mutat.* 2004;24(2):147-54.
107. Lee KS, Song HR, Cho TJ, Kim HJ, Lee TM, Jin HS, Park HY, Kang S, Jung SC, Koo SK. Mutational spectrum of type I collagen genes in Korean patients with osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat.* 2006;27(6):599.
108. Farber CR, Reich A, Barnes AM, Becerra P, Rauch F, Cabral WA, Bae A, Quinlan A, Glorieux FH, Clemens TL, Marini JC. A novel IFITM5 mutation in severe atypical osteogenesis imperfecta type VI impairs osteoblast production of pigment epithelium-derived factor. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2014;29(6):1402-11.
109. Cho TJ, Lee KE, Lee SK, Song SJ, Kim KJ, Jeon D, Lee G, Kim HN, Lee HR, Eom HH, Lee ZH, Kim OH, Park WY, Park SS, Ikegawa S, Yoo WJ, Choi IH, Kim JW. A single recurrent mutation in the 5'-UTR of IFITM5 causes osteogenesis imperfecta type V. *Am J Hum Genet.* 2012;91(2):343-8.
110. Lietman CD, Marom R, Munivez E, Bertin TK, Jiang MM, Chen Y, Dawson B, Weis MA, Eyre D, Lee B. A transgenic mouse model of OI type V supports a neomorphic mechanism of the IFITM5 mutation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2015;30(3):489-98.
111. Kelley BP, Malfait F, Bonafe L, Baldrige D, Homan E, Symoens S, Willaert A, Elcioglu N, Van Maldergem L, Verellen-Dumoulin C, Gillerot Y, Napierala D, Krakow D, Beighton P, Superti-Furga A, De Paepe A, Lee B. Mutations in FKBP10 cause recessive osteogenesis imperfecta and Bruck syndrome. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2011;26(3):666-72.
112. Tucker T, Nelson T, Sirrs S, Roughley P, Glorieux FH, Moffatt P, Schlade-Bartusiak K, Brown L, Rauch F. A co-occurrence of osteogenesis imperfecta type VI and cystinosis. *American journal of medical genetics Part A.* 2012;158A(6):1422-6.
113. Rauch F, Hussein A, Roughley P, Glorieux FH, Moffatt P. Lack of circulating pigment epithelium-derived factor is a marker of osteogenesis imperfecta type VI. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2012;97(8):E1550-6.

114. Pyott SM, Tran TT, Leistriz DF, Pepin MG, Mendelsohn NJ, Temme RT, Fernandez BA, Elsayed SM, Elsobky E, Verma I, Nair S, Turner EH, Smith JD, Jarvik GP, Byers PH. WNT1 mutations in families affected by moderately severe and progressive recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet.* 2013;92(4):590-7.
115. Faqeih E, Shaheen R, Alkuraya FS. WNT1 mutation with recessive osteogenesis imperfecta and profound neurological phenotype. *J Med Genet.* 2013;50(7):491-2.
116. Laine CM, Joeng KS, Campeau PM, Kiviranta R, Tarkkonen K, Grover M, Lu JT, Pekkinen M, Wessman M, Heino TJ, Nieminen-Pihala V, Aronen M, Laine T, Kroger H, Cole WG, Lehesjoki AE, Nevarez L, Krakow D, Curry CJ, Cohn DH, Gibbs RA, Lee BH, Makitie O. WNT1 mutations in early-onset osteoporosis and osteogenesis imperfecta. *N Engl J Med.* 2013;368(19):1809-16.
117. Fahiminiya S, Majewski J, Mort J, Moffatt P, Glorieux FH, Rauch F. Mutations in WNT1 are a cause of osteogenesis imperfecta. *J Med Genet.* 2013;50(5):345-8.
118. Marini JC, Cabral WA, Barnes AM. Null mutations in LEPRE1 and CRTAP cause severe recessive osteogenesis imperfecta. *Cell Tissue Res.* 2010;339(1):59-70.
119. Baldrige D, Schwarze U, Morello R, Lenington J, Bertin TK, Pace JM, Pepin MG, Weis M, Eyre DR, Walsh J, Lambert D, Green A, Robinson H, Michelson M, Houge G, Lindman C, Martin J, Ward J, Lemyre E, Mitchell JJ, Krakow D, Rimoin DL, Cohn DH, Byers PH, Lee B. CRTAP and LEPRE1 mutations in recessive osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat.* 2008;29(12):1435-42.
120. Willaert A, Malfait F, Symoens S, Gevaert K, Kayserili H, Megarbane A, Mortier G, Leroy JG, Coucke PJ, De Paepe A. Recessive osteogenesis imperfecta caused by LEPRE1 mutations: clinical documentation and identification of the splice form responsible for prolyl 3-hydroxylation. *J Med Genet.* 2009;46(4):233-41.
121. Martinez-Glez V, Valencia M, Caparros-Martin JA, Aglan M, Temtamy S, Tenorio J, Pulido V, Lindert U, Rohrbach M, Eyre D, Giunta C, Lapunzina P, Ruiz-Perez VL. Identification of a mutation causing deficient BMP1/mTLD proteolytic activity in autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat.* 2012;33(2):343-50.
122. Valencia M, Caparros-Martin JA, Sirerol-Piquer MS, Garcia-Verdugo JM, Martinez-Glez V, Lapunzina P, Temtamy S, Aglan M, Lund AM, Nikkels PG, Ruiz-Perez VL, Ostergaard E. Report of a newly identified patient with mutations in BMP1 and underlying pathogenetic aspects. *American journal of medical genetics Part A.* 2014;164a(5):1143-50.
123. Hu Q, Loeys BL, Coucke PJ, De Paepe A, Mecham RP, Choi J, Davis EC, Urban Z. Fibulin-5 mutations: mechanisms of impaired elastic fiber formation in recessive cutis laxa. *Hum Mol Genet.* 2006;15(23):3379-86.
124. Balasubramanian M, Fratzi-Zelman N, O'Sullivan R, Bull M, Fa Peel N, Pollitt RC, Jones R, Milne E, Smith K, Roschger P, Klaushofer K, Bishop NJ. Novel PLS3 variants in X-linked osteoporosis: Exploring bone material properties. *American journal of medical genetics Part A.* 2018.
125. De Conti L, Baralle M, Buratti E. Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2013;4(1):49-60.
126. Ling H, Vincent K, Pichler M, Fodde R, Berindan-Neagoe I, Slack FJ, Calin GA. Junk DNA and the long non-coding RNA twist in cancer genetics. *Oncogene.* 2015.
127. Graveley BR. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet.* 2001;17(2):100-7.
128. Kampe AJ, Costantini A, Levy-Shraga Y, Zeitlin L, Roschger P, Taylan F, Lindstrand A, Paschalis EP, Gamsjaeger S, Raas-Rothschild A, Hovel M, Jiao H, Klaushofer K, Grasmann C, Makitie O. PLS3 Deletions Lead to Severe Spinal Osteoporosis and Disturbed Bone Matrix Mineralization. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2017;32(12):2394-404.
129. Kampe AJ, Costantini A, Makitie RE, Jantti N, Valta H, Mayranpaa M, Kroger H, Pekkinen M, Taylan F, Jiao H, Makitie O. PLS3 sequencing in childhood-onset primary osteoporosis identifies two novel disease-causing variants. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA.* 2017;28(10):3023-32.
130. Dobrowolski SF, Andersen HS, Doktor TK, Andresen BS. The phenylalanine hydroxylase c.30C>G synonymous variation (p.G10G) creates a common exonic splicing silencer. *Molecular genetics and metabolism.* 2010;100(4):316-23.
131. Homolova K, Zavadakova P, Doktor TK, Schroeder LD, Kozich V, Andresen BS. The deep intronic c.903+469T>C mutation in the MTRR gene creates an SF2/ASF binding exonic splicing enhancer, which leads to pseudoexon activation and causes the cbIE type of homocystinuria. *Hum Mutat.* 2010;31(4):437-44.
132. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Meth.* 2014;11(4):361-2.
133. Wang L, Zhai Q, Zhao P, Xiang X, Zhang X, Tian W, Li T. Functional analysis of p.Ala253_Leu254insAsn mutation in PLS3 responsible for X-linked osteoporosis. *Clinical genetics.* 2018;93(1):178-81.
134. Nishi E, Masuda K, Arakawa M, Kawame H, Kosho T, Kitahara M, Kubota N, Hidaka E, Katoh Y, Shirahige K, Izumi K. Exome sequencing-based identification of mutations in non-syndromic genes among individuals with apparently syndromic features. *American journal of medical genetics Part A.* 2016;170(11):2889-94.
135. Kannu P, Mahjoub A, Babul-Hirji R, Carter MT, Harrington J. PLS3 Mutations in X-Linked Osteoporosis: Clinical and Bone Characteristics of Two Novel Mutations. *Hormone research in paediatrics.* 2017;88(3-4):298-304.
136. Valimaki VV, Makitie O, Pereira R, Laine C, Wesseling-Perry K, Maatta J, Kirjavainen M, Viljakainen H, Valimaki MJ. Teriparatid Treatment in Patients With WNT1 or PLS3 Mutation-Related Early-Onset Osteoporosis: A Pilot Study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2017;102(2):535-44.

6. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	MRT	Magnetresonanztomographie
AD	autosomal-dominant	MT	MutationTaster
AP	alkalische Phosphatase	ng	Nanogramm
AR	autosomal-rezessiv	NGS	Next-Generation Sequencing
BMC	bone mineral content	nm	Nanometer
BMD	bone mineral density	NMD	Nonsense-mediated-decay
bp	Basenpaare	OI	Osteogenesis imperfecta
C	Cytosin	OPG	Osteoprotegerin
cDNA	komplementäre DNA	P	Patient
CT	Computertomographie	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DC	disease causing	PPi	Pyrophosphat
ddH2O	doppelt destilliertes Wasser	PTH	Parathormon
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphate	qCT	quantitative Computertomographie
DI	Dentinogenesis imperfecta	RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNA	Ribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphate	rpm	Umdrehungen pro Minute
DXA	Dual-Röntgen-Absorptiometrie	s.o.	siehe oben
EDS	Ehlers-Danlos-Syndrom	SD	Standardabweichung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SNP	single nucleotide polymorphism
ESE	exonic splicing enhancer	T	Thymin
ESS	exonic splicing silencer	Tm	Schmelztemperatur
EZM	Extrazelluläre Matrix	TNF	Tumornekrosefaktor
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon	u.a.	unter anderem
G	Guanin	UTR	untranslatierter Bereich
h	Stunden (engl. hours)	VCF	Variant-Call-format
HPO	Human Phenotype Ontology	VEGF	Vascular endothelial growth factor
HSF	Human Splicing Finder	WES	whole exome sequencing
IGV	Integrative Genomics Viewer	WGS	whole genome sequencing
MAF	minor allele frequency	WHO	Weltgesundheitsorganisation
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor	µl	Mikroliter

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Osteoblast mit bisher bekannten Genen für Osteogenesis imperfecta und deren Funktion bei der Kollagensynthese und im Knochenstoffwechsel. Modifiziert nach Van Dijk et al. 2014 [39] und Marini et al. 2014 [31]	10
Abbildung 2: a) kodierenden Exons des PLS3-Gens und b) entsprechende Domänen auf Proteinebene	16
Abbildung 3: Schematischer Ablauf der NGS-Diagnostik von der Patientenrekrutierung (1) bis zur Validierung der detektierten Variante im Labor (6). Modifiziert nach Lohmann et al. 2014 [87]	18
Abbildung 4: Filtereinstellungen zur Variantenreduktion bei der Plattform GeneTalk	23
Abbildung 5: Vorgehen bei dem Auftreten einer Sequenzvariante im PLS3-Gen.....	30
Abbildung 6: Übersicht über die Gesamt-Next-Generation-Sequencing-Abdeckung (Coverage) der einzelnen Patienten (linke Y-Achse) und die Gesamtanzahl der Varianten in der VCF-Datei von PhenIX (rechte Y-Achse)	41
Abbildung 7: Stammbaum von Patient 29 mit Ergebnis der Sanger- Sequenzierung. Während NGS die eindeutig heterozygote Mutation c.253G>T (p.Glu85*) zeigte, war der ursprüngliche G-Peak bei der Sanger-Sequenzierung lediglich schwach ausgeprägt.....	47
Abbildung 8: Gefundene Mutationen für autosomal-rezessive Osteogenesis imperfecta.....	52
Abbildung 9: Familienstammbaum von Patientin 31 mit Validierung der gefundenen Frameshift-Mutation im WNT1-Gen und entsprechender Gelelektrophorese der PCR-Produkte.....	55
Abbildung 10: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierungen der autosomal-rezessiven OI-Fälle mit Eltern	58
Abbildung 11: Gelelektrophorese aller 16 Exons des PLS3-Gens (mehrere Patienten abgebildet und jedes Exon jeweils mit einer Positiv- und Negativkontrolle).....	59
Abbildung 12: Übersicht des PLS3-Gens mit Exon 1 bis Exon 16 (E1-E16) mit den gefundenen Varianten.....	60
Abbildung 13: a) Human Splicing Finger: Vorhersage eines Spleiß-Akzeptors durch die detektierte Mutation b) Sequenzierung des Patienten und seiner Familie mit Nachweis der Mutation c.1512-1G>T bei ihm hemizygot, während die Mutter heterozygote Trägerin ist und der Bruder die Veränderung nicht trägt.....	61
Abbildung 14: Nachweis einer heterozygoten Nonsense-Mutation c.766C>T (p.Arg256*)	62
Abbildung 15: Teilweise evolutionäre Konservierung über verschiedene Spezies im PLS3-Gen an der Aminosäurestelle 256	62
Abbildung 16: Referenzsequenz von Exon 3 des SERPINF1-Gens mit vergleichender Sequenz von Patient 23, ebenfalls beschrieben bei Tucker/Rauch et al. 2012 [112, 113]	74

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der verschiedenen OI-Typen nach Van Dijk und Sillence 2014 [40].....	8
Tabelle 2: Verwendeter PCR-Ansatz	27
Tabelle 3: Verwendetes Thermocycler-Programm	28
Tabelle 4: Standardansatz für die Aufreinigung der PCR-Produkte.....	29
Tabelle 5: Thermocyclerprogramm für die Sequenzierung.....	29
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	31
Tabelle 7: Verwendete Geräte	31
Tabelle 8: Verwendete Datenbanken und Software	32
Tabelle 9: Primer für die PLS3-Sequenzierung.....	32
Tabelle 10: Primer für die PCR der NGS-Validierungen.....	33
Tabelle 11: Verwendete Primer für das COL1A1-Gen	33
Tabelle 12: Verwendete Primer für das COL1A2-Gen	33
Tabelle 13: Enthaltene Gene für Erkrankungen mit erhöhter Knochenmasse im Bone Mass Panel	34
Tabelle 14: Enthaltene Gene für Erkrankungen mit erniedrigter Knochenmasse im Bone Mass Panel.....	35
Tabelle 15: Indische Patienten für das NGS mit einigen klinischen Angaben.....	36
Tabelle 16: Indische Patienten für das NGS mit einigen klinischen Angaben.....	37
Tabelle 17: Indische Patienten für das NGS mit einigen klinischen Angaben.....	38
Tabelle 18: Ergebnis des Scoring-Systems aufgeschlüsselt nach den wahrscheinlich pathogenen Genmutationen zur klinischen Schweregradeinteilung	40
Tabelle 19: Anzahl an Patienten mit milden-, moderaten- oder schweren Phänotyp anhand des Scoring-Systems	40
Tabelle 20: Vergleich der Ergebnisse von PhenIX und GeneTalk.....	41
Tabelle 21: Anzahl der vorkommenden Mutationsarten im VCF-File (PhenIX).....	42
Tabelle 22: Vergleich der durch PhenIX angegebenen Qualität und Lesetiefe bei den gefundenen ursächlichen Varianten für autosomal-rezessive OI (AR OI) und autosomal-dominante OI (AD OI)	42
Tabelle 23: Zusammenfassung des Qualitätberichtes für alle Patienten (ohne P2 und P22) ...	43
Tabelle 24: Gefundene Varianten der Patienten im COL1A1-Gen (als pathogen von MutationTaster eingeschätzt)	45
Tabelle 25: Vergleich der klinischen Merkmale bei Patienten mit quantitativen und qualitativen COL1A1-Defekten	48
Tabelle 26: Gefundene Varianten bei einzelnen Patienten im COL1A2-Gen (als pathogen eingeschätzt durch MT)	49
Tabelle 27: Übersicht über die beiden Patientinnen, bei denen die IFITM5-Mutation im 5'UTR-Bereich für autosomal-dominant vererbte OI detektiert wurde	51
Tabelle 28: Übersicht der Patienten mit gefundenen wahrscheinlich ursächlichen Mutationen in Genen für autosomal-rezessive Osteogenesis imperfecta.....	57

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Julia Mrosk, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Hochdurchsatz- und Kandidatengensequenzierung von Erkrankungen mit erniedrigter 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) entsprechen 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

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Julia Mrosk hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Julia Mrosk, Gandham SriLakshmi Bhavani, Hitesh Shah, Jochen Hecht, Ulrike Krüger, Anju Shukla, Uwe Kornak, Katta Mohan Girisha. “*Diagnostic strategies and genotype-phenotype correlation in a large Indian cohort of osteogenesis imperfecta.*” Bone, Volume 110, 2018, Pages 368-377, ISSN 8756-3282, <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.02.029>.

Beitrag im Einzelnen: Erstautor (Erheben und Analysieren der Daten im Labor, Arbeit am Manuskript, Erstellen von Abbildungen und Tabellen)

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Julia Mrosk, Gandham SriLakshmi Bhavani, Hitesh Shah, Jochen Hecht, Ulrike Krüger, Anju Shukla, Uwe Kornak, Katta Mohan Girisha. “*Diagnostic strategies and genotype-phenotype correlation in a large Indian cohort of osteogenesis imperfecta.*” Bone, Volume 110, 2018, Pages 368-377, ISSN 8756-3282, <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.02.029>.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich hiermit bei Herrn Prof. Uwe Kornak für die kontinuierliche Betreuung mit Anregungen, tatkräftiger Unterstützung und Geduld über den gesamten Zeitraum bedanken.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin der gesamten Arbeitsgruppe „AG Kornak“, darunter Anja Lekaj, Claire Schlack, Lisa Quell, Björn Fischer, Alexej Knaus und vielen weiteren Mitarbeitern des Berlin-Brandenburger Centrums für Regenerative Therapien (BCRT) für die Hilfe im Labor, die wertvollen Tipps im Umgang mit der verwendeten Software und bei aufgetretenen Problemen. Dank der stets freundlichen sowie produktiven Arbeitsatmosphäre hat die Arbeit im Labor stets Freude bereitet.

Zu guter Letzt möchte ich noch meiner Familie und meinen Freunden für die stetige Motivation und moralische Unterstützung danken.