

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Humangenetik

Institutsdirektor: Prof. Dr. med. Andreas Gal

## **Analyse von Kandidatengenien bei Patienten mit Osteopetrose**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:  
Janine Linette de Menezes Finck  
aus Goa, Indien

Hamburg 2013

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 22.07.2014**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. A Gal**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. I. Kurth**

**Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: PD Dr. F. Barvencik**

## **Inhalt**

1	Einleitung.....	5
1.1	Fragestellung.....	5
1.2	Osteopetrose, Klinisches Bild und Diagnostik.....	6
1.3	Aufbau des Knochens.....	7
1.3.1	Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten.....	9
1.3.2	Umbauvorgänge am Knochen.....	10
1.3.3	Knochenresorption durch Osteoklasten.....	11
1.4	Kandidatengene.....	12
1.5	Bisherige Forschungsergebnisse zur Osteopetrose.....	14
2	Material, Methoden und Durchführung.....	17
2.1	Materialien.....	17
2.1.1	DNA Proben.....	18
2.1.2	Sequenzierprimer.....	18
2.2	Methoden und Durchführung.....	23
2.2.1	Amplifikation genomischer DNA.....	23
2.2.2	Polymerase Kettenreaktion.....	23
2.2.3	Produktprüfung durch Agarosegelelektrophores.....	25
2.2.4	Segregationssanalyse.....	25
2.2.5	Sequenzierung.....	27
2.2.6	Restriktionsenzymverdau.....	29
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Stammbaum der Familie F1.....	31
3.2	Stammbaum der Familie F2.....	31

3.3	Ausgewählte Kandidatengene.....	32
3.4	Untersuchung bereits bekannter Osteopetrose-Loci.....	40
3.5	Untersuchung der weiteren Kandidatenloci.....	42
3.6	Segregationssanalyse der restlichen Kandidatengenen.....	44
3.7	Gene mit nachgewiesener Segregation.....	48
3.8	Mutationssuche bei Familie F1.....	49
3.9	Untersuchung des Osteopetrose-Patientenkollektivs auf <i>RANKL</i> -Mutationen.....	51
3.10	Mutationssuche bei Familie F2.....	52
4	Diskussion.....	54
4.1	Einleitung.....	54
4.2	Kandidatengenansatz zur Identifikation von Genmutationen.....	55
4.3	Ergebnisse in der <i>CLCN7</i> -Familie.....	55
4.4	Ergebnisse in der <i>RANKL</i> -Familie.....	56
5	Zusammenfassung.....	57
6	Abkürzungsverzeichnis.....	59
7	Literaturverzeichnis.....	60
8	Danksagung.....	65
9	Lebenslauf.....	66
10	Eidesstattliche Erklärung.....	67

## **1. Einleitung**

### **1.1. Fragestellung**

Die Osteopetrose ist eine genetisch bedingte Erkrankung, die mit einer gesteigerten Knochendichte einhergeht. Klinisch weisen Betroffene ein variables Krankheitsbild auf, das mit einer Panzytopenie, Hepatosplenomegalie sowie Taubheit und Erblindung verbunden sein kann. Pathophysiologisch resultiert die Erkrankung oft aus einem Defekt der Osteoklasten, die am Abbau des Knochengewebes beteiligt sind. Es wurden bereits Mutationen in Genen identifiziert, die zu einer Osteopetrose führen und dessen Produkt eine Rolle in der Funktion der Osteoklasten spielen. Bei einer großen Anzahl von Patienten finden sich jedoch keine Mutationen in den bekannten Osteopetrose-Genen, was die Beteiligung weiterer Gene nahe legt. Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung ausgewählter Familien und Einzelpersonen aus einem uns vorliegenden Patientenkollektiv mit Osteopetrose bzgl. Veränderungen in den bekannten Osteopetrose-Genen sowie bei fehlendem Mutationsnachweis die molekulargenetische Analyse von ausgewählten Kandidatengenen.

Ausgangspunkt der Untersuchung sind zwei Familien, bei denen die DNA gesunder sowie an Osteopetrose erkrankter Familienmitglieder vorlag. Zudem steht ein Patientenkollektiv weiterer an Osteopetrose erkrankten Personen zur Verfügung, bei denen es sich um isolierte Fälle innerhalb der Familie handelt, anhand derer potenziell pathogene Genvarianten verifiziert werden können.

Zunächst sollten die beiden Familien bzgl. Mutationen in den bekannten Osteopetrose-assoziierten Genen untersucht werden. Bei fehlendem Nachweis krankheitsrelevanter Veränderungen sollte eine der Familien, die sich für Segregationsanalyse eignete, auf eine Anzahl von Kandidatengenen, die eine wichtige Rolle im Stoffwechsel und/oder der Differenzierung von Osteoklasten spielen, mittels Mikrosatellitenanalyse auf Segregation untersucht werden. Die durch die Segregationsanalyse in Frage kommenden Gene sollen durch anschließende direkte Sequenzierung der kodierenden Exons auf Mutationen geprüft werden. Identifizierte Varianten sollten anhand von

Kontrollkollektiven entweder als Polymorphismen oder als möglicherweise pathogen eingeschätzt werden.

Die Sequenzierung eines sich ergebenden Kandidatengens kann im Idealfall auf das vorhandene Osteopetrosekollektiv ausgeweitet werden.

## **1.2 Osteopetrose, Klinisches Bild und Diagnostik**

Die Osteopetrose ist eine genetische Erkrankung, die in vielen Fällen mit einer defekten Knochen-Resorption durch Osteoklasten einhergeht. Hier ist die Knochenresorption vermindert, obwohl bei den meisten Fällen Osteoklasten in normaler oder sogar erhöhter Zahl vorhanden sind. Es liegt also kein Defekt der Osteoklastendifferenzierung vor, sondern eine intrinsisch verminderte Resorptionsleistung<sup>1</sup>

Die Osteopetrose lässt sich in 3 Hauptformen unterteilen:

Bei der infantilen malignen Form der autosomal rezessiven Osteopetrose werden die Symptome bereits in den ersten Lebensmonaten manifest oder bestehen bereits kongenital. Die Inzidenz wird auf ca. 1:300000 geschätzt<sup>1</sup>. Die Röhrenknochen der Betroffenen sind verkürzt und spröde und besitzen weder eine Markhöhle noch eine regelrechte Kortikalis. Daraus folgt eine ungenügende Blutbildung mit einer Thrombozytopenie, Anämie und Granulozytopenie sowie extramedullärer Blutbildung mit Hepatosplenomegalie. Durch die osteopetrotische Verengung der Foramina der Schädelbasis kommt es zur Kompression von Hirnnerven, was u.a. zu Erblindung, Taubheit und Fazialislähmung führen kann. Die Lebenserwartung ist u.a. wegen hämatologischer Komplikationen deutlich herabgesetzt, wobei eine diesbezügliche Symptomatik innerhalb der ersten drei Lebensmonate als prognostisch ungünstig angesehen werden kann<sup>2</sup>. Insgesamt wird die Überlebenschance bis zum sechsten Lebensjahr mit 30 Prozent angegeben<sup>3</sup>. Todesursachen sind Blutungen und Infektionen als Folge des Knochenmarkversagens.

Die Verdachtsdiagnose kann z.B. röntgenologisch, anhand einer für das Lebensalter abnorm hohen Knochendichte, bestätigt werden. Eine Knochenmarkpunktion gelingt oft nicht. In der Knochenstanzbiopsie findet man eine Knochenmarksklerosierung bei normaler oder auch erhöhter Osteoklastenzahl<sup>2</sup>.

Die etwas mildere Variante der autosomal rezessiven Osteopetrose mit späterem Beginn ist häufig mit renal-tubulärer Azidose und zerebralen Verkalkungen sowie mentaler Retardierung verbunden<sup>4</sup>. Als Erstsymptome können Frakturen auftreten. Die hämatologischen Symptome sind milder ausgeprägt als bei der autosomal rezessiven malignen infantilen Osteopetrose und bei den Patienten findet sich häufig lediglich eine Anämie.

Eine weitere Form der Osteopetrose wird autosomal dominant vererbt, wird meist im Erwachsenenalter manifest und kann zu ähnlich schweren Symptomen führen wie die infantilen Osteopetrose. Röntgenologisch können 2 Subtypen unterschieden werden. Typ 1 zeigt eine generalisierte, diffuse Osteosklerosierung, insbesondere im Bereich des Hirnschädels<sup>5</sup>. Im Jahre 1904 beschrieb Albers-Schönberg erstmalig die Typ2-Osteopetrose<sup>6</sup>. Mit einer Prävalenz von 5.5:100000 kommt die Albers-Schönberg-Osteopetrose häufiger vor als die autosomal rezessiv vererbte Osteopetrose. Zu den klinischen Symptomen gehören Spontanfrakturen der langen Röhrenknochen, Arthritiden der Hüftgelenke und eine mandibuläre Osteomyelitis<sup>7</sup>. Das markanteste radiologische Kennzeichen ist die so genannten Sandwich-Wirbel, die durch eine Sklerosierung im Bereich der Deckplatten zu erklären sind. Ebenfalls lässt sich röntgenologisch das charakteristische Knochen-im-Knochen-Phänomen beobachten, da man innerhalb des Wirbels die Umrisse kleinerer Wirbel zu erkennen meint. Typisch ist auch die Sklerosierung im Bereich der Schädelbasis im Vergleich zum Hirnschädel<sup>8</sup>.

### **1.3 Aufbau des Knochens**

Ein typischer Röhrenknochen besteht aus zwei Knochenenden (Epiphysen) und einem Knochenschaft (Diaphyse). Der Abschnitt zwischen Epiphyse und Diaphyse heißt Metaphyse. Die Epiphysen bestehen aus einem feinen Geflecht von Knochenbälkchen, die in der Gesamtheit die Substantia Spongiosa bilden. Zwischen den Knochenbälkchen liegen Hohlräume, in denen sich Knochenmark befindet. Die Substantia spongiosa wird außen von einer dünnen Schicht kompakter Knochensubstanz, Substantia kortikalis, überzogen. Zwischen der jeweiligen Epiphyse und der Diaphyse befindet sich in der Wachstumsphase die Epiphysenfuge. In der Epiphysenfuge befindet sich die Zone, in der Knorpelzellen proliferieren und sich Trabekel aus verkalktem Knorpel

ausbilden, die in mehreren Schritten von den Osteoklasten und den Osteoblasten in reifes, kalzifiziertes Knochengewebe überführt werden. Nach dem Wachstumsabschluss verknöchert die Epiphysenfuge und bleibt als Epiphysenlinie sichtbar. Der gesamte Knochen ist von der Außenseite von Periost, von der Innenseite mit Endost ausgekleidet.

Der Knochen besteht zu 30% aus organischem Material und zu 70% aus anorganischen Stoffen. Der anorganische Anteil besteht aus Hydroxylapatit und anderen Mineralien. Die organische Matrix setzt sich zusammen aus exogenen Anteilen, die passiv aus dem Blut aufgenommen werden, wie z.B. Proteine (Albumin, IgG, Transferrin), die an Hydroxylapatit binden, und Knochenzellen (Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten) und von den Osteoblasten gebildeten endogenen Bestandteilen, wie Kollagen, Osteocalcin, Osteopontin und zahlreichen weiteren Stoffen. Das Kollagen sorgt für die Elastizität, die Mineralien für die Festigkeit und Rigidität des Knochens.

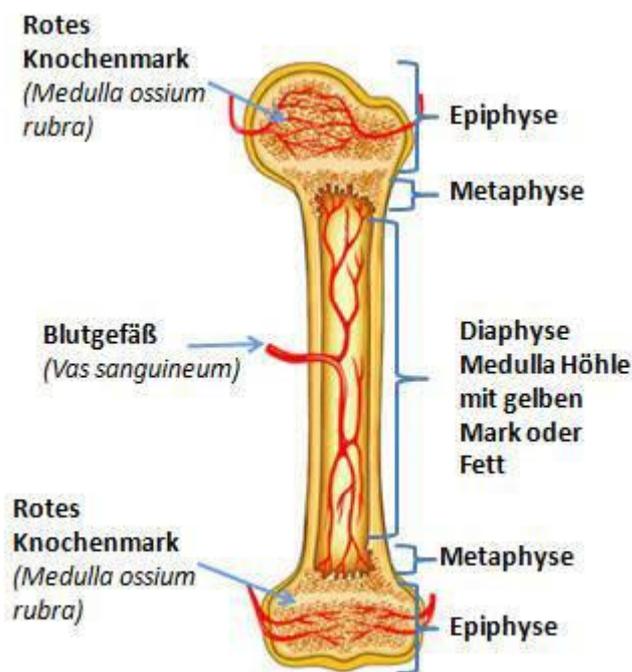


Abbildung 1: Aufbau des Knochens

### 1.3.1 Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten

Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die in einer Reifungskette aus einzelligen Vorläufern entstehen. Sie sind Abkömmlinge des hämatopoetischen Systems. Die Hauptaufgabe der Osteoklasten besteht in der Knochenresorption.

Dahingegen sind die Osteoblasten mesenchymaler Herkunft und unterliegen ebenfalls einem Reifungsprozess. Die Osteoblasten finden sich in 3 Funktionszuständen:

- als Osteoblast produzieren sie Knochengrundsubstanz,
- als Osteozyt werden sie zum Teil in den neu gebildeten Knochen eingemauert und tragen zu seinem Stoffwechsel bei,
- im Ruhezustand bedecken sie die Oberfläche fertigen Knochengewebes, um bei Bedarf aktiviert zu werden.

Die Funktion von Osteoklasten und Osteoblasten ist vielfach miteinander verknüpft. Über das RANKL/RANK/Osteoprotegerin-System werden das Heranreifen und die Aktivität der Osteoklasten durch die Osteoblasten wesentlich gesteuert. Sinkt beispielsweise der Calciumspiegel des Serums, so wird von der Nebenschilddrüse vermehrt Parathormon (PTH) ausgeschüttet. Dieses wirkt aber nicht direkt stimulierend auf die Osteoklasten, die selbst keinen PTH-Rezeptor besitzen, sondern auf die Osteoblasten. Die Osteoblasten produzieren daraufhin RANKL (receptor-activator of NF- $\kappa$ B-ligand), der an seinen Rezeptor RANK (receptor-activator of NF- $\kappa$ B) auf der Zelloberfläche von Osteoklasten und ihren Vorläufern bindet. Durch die verstärkte Entstehung und Aktivierung der Osteoklasten kommt es zu vermehrter Resorption und damit zur Anhebung des Calciumspiegels<sup>9</sup>. Aber die Osteoblasten können auch unter dem Einfluss von Estradiol das gegenteilig wirkende Osteoprotegerin (OPG) herstellen, einen so genannten Decoy-Rezeptor (Täuschungsrezeptor) für RANK. OPG-RANK Komplex bindet zwar an den Liganden RANKL, ruft aber keine Signaltansduktion hervor, so dass die Aktivität der Osteoklasten und damit die Osteolyse gehemmt wird.

Der ebenfalls von Osteoblasten sezernierte „macrophage-colony stimulating factor“ (M-CSF) fördert die Entstehung von Osteoklasten. Seine Produktion wird durch Interleukin-1 und den Tumornekrosefaktor (TNF) angeregt und durch Estradiol gehemmt<sup>10</sup>.

Der Dialog zwischen Osteoklasten und Osteoblasten ist nicht unidirektional, sondern verläuft in beiden Richtungen. Über Rückkopplungs-Mechanismen meldet der aktive Osteoklast den Knochenabbau an den Osteoblasten zurück. Durch die Resorptionstätigkeit wird u.a. TGF- $\beta$  im Bereich der Knochenmatrix freigesetzt, welches die Osteoblasten dazu anregt, vermehrt OPG und Knochenmatrix zu produzieren, um den entstandenen Defekt wieder auszugleichen.

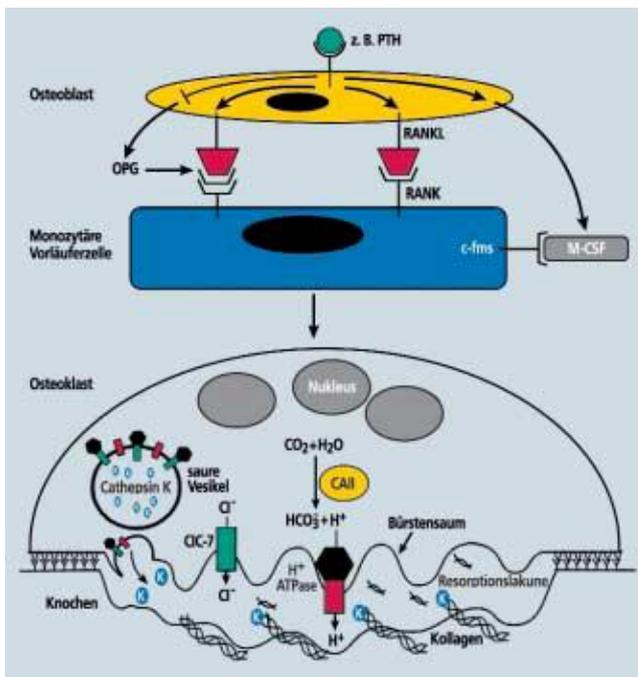


Abbildung 2 : Das RANKL/RANK/Osteoprotegerin-System. Durch die Botenstoffe RANKL, RANK, OPG und M-CSF steuert der Osteoblast die Reifung und Aktivität der Osteoklasten

### 1.3.2 Umbauvorgänge am Knochen

Während des Wachstums sind die Knorpelzellen der Wachstumsfuge für das Längenwachstum der Röhrenknochen verantwortlich. So wird der von der Wachstumsfuge gebildete Knorpel in die differenzierte Struktur des Röhrenknochens umgebaut. Durch Knochenneubildung wird eine stabile Röhrenwand (Cortikalis) und Trabekelstruktur (Spongiosa) erzeugt. Durch die enchondrale Ossifikation vergrößert sich im Laufe des Wachstums nicht nur die Länge, sondern auch der diaphysäre Durchmesser des Knochens. Dieses wird durch fortgesetzte Resorption an der

Innenseite der Cortikalis und den subperiostalen Knochenanbau an der Außenseite erreicht. Bei der desmalen Ossifikation hingegen wird der Knochen ohne Bildung von knorpeligen Vorstufen erzeugt.

Das Skelettsystem ist auch nach dem Wachstum einem ständigen Auf- und Abbau unterworfen, um die Knochen den mechanischen Erfordernissen anzupassen. Dies geschieht durch drei verschiedene Mechanismen:

1. Remodeling - die von den Osteoklasten resorbierte Menge mineralisierten Knochens wird durch die nachfolgende Bautätigkeit der Osteoblasten wieder hergestellt. Durch das Remodeling werden pro Jahr etwa zehn Prozent der gesamten Knochenmasse erneuert<sup>11</sup>

2. Perforationen - kleine Defekte in tragenden Strukturen der Spongiosa werden von bestimmten Osteoklasten resorbiert, ohne dass diese anschließend von Osteoblasten repariert werden. Eine kleine Menge Knochen geht dadurch unwiederbringlich verloren.

3. Mikrokallusformation - Schwachstellen der Spongiosa frakturieren, worauf die Osteoblasten mit Kallusbildung reagieren.

Ein Ungleichgewicht zwischen der Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten im Rahmen des Remodeling führt entweder zu einer Akkumulation von Knochenmaterial (Osteosklerose/Osteopetrose) oder zu einem Knochenverlust (Osteoporose)<sup>12</sup>.

### **1.3.3 Knochenresorption durch Osteoklasten**

Der erste Schritt der Knochenresorption besteht in einem festen Anheften der reifen Osteoklasten an die Knochenoberfläche. Das Anheften wird durch Podosome, die Actin Filamente und Integrine beinhalten, erleichtert. Diese Moleküle assoziieren mit den Matrix-Proteinen Osteopontin und Vitronectin, die sich auf der Knochenoberfläche befinden und gehen eine feste Verbindung ein<sup>13,14</sup>. Es werden 2 funktionelle Bereiche unterschieden, die resorptive Oberfläche und die basolaterale Membran. Durch die massenhafte Fusion von sauren Vesikeln mit der Zellmembran im Bereich der Anheftungsstelle faltet sich diese zum so genannten „Bürstensaum“ (ruffled membrane) auf und bildet die resorptive Oberfläche und die Resorptionslakune. Die Freisetzung der Calciumionen aus dem Hydroxylapatit des Knochens erfordert die Sekretion großer Mengen Säure. Vieles spricht dafür, dass die Bürstensaummembran für die Ansäuerung

der Resorptionslakune auf einen pH-Wert um 4,5 zuständig ist<sup>15</sup>. Im Zytoplasma des Osteoklasten werden durch die Carboanhydrase-2, aus Kohlenstoffdioxid und Wasser, Bicarbonat und Protonen gebildet. Die Protonen werden durch die Bürstensaummembran über Protonenpumpen, die so genannten H<sup>+</sup>-ATPasen, in die Resorptionslakune transportiert. So wird ein pH-Wert zwischen 4-5 generiert<sup>16</sup>. Die Elektroneutralität der Bürstensaummembran wird durch einen mit dem H<sup>+</sup>-ATPase gekoppelten Chlorid-Kanal aufrechterhalten, über den negative geladene Chlorid-Ionen in die Resorptionslakune transportiert werden<sup>17</sup>. Die Ansäuerung initialisiert das Auflösen des Mineralanteils des Knochens, das Hydroxylapatit. In Anwesenheit von Protonen wird das Hydroxylapatit zu Calciumionen, anorganischen Phosphaten und Wasser abgebaut<sup>18</sup>.

Die basolaterale Membran spielt eine Rolle bei der Exozytose, ein Prozess des Stofftransports aus der Zelle heraus, in dem die im Cytosol liegenden Vesikel mit der Zellmembran fusionieren und so die in ihnen gespeicherten Stoffe freigeben<sup>19</sup>. Die organischen Komponenten des Knochens werden durch Cathepsin K, eine Protease, abgebaut. Die Abbauprodukte werden in Vesikel transportiert und an der baso-lateralen Membran freigegeben<sup>20</sup>. Diese Vesikel enthalten das Enzym TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase). Mithilfe der reaktiven Sauerstoffradikale, die von TRAP gebildet werden, wird letztendlich auch das Kollagen abgebaut<sup>21</sup>.

#### **1.4 Kandidatengene**

Ein Schritt auf dem Weg zur Identifizierung von Krankheitsgenen ist neben genomweiten Ansätzen wie der positionellen Klonierung z.B. mittels Kopplungsanalysen, die Suche nach Mutationen in funktionellen Kandidatengenen. Aufgrund der fundierten Kenntnisse über die Funktion von Osteoklasten ist die hereditäre Osteopetrose eine geeignete genetische Erkrankung, durch einen Kandidatengenansatz weitere in die Pathogenese involvierte Gene zu identifizieren.

Als funktionelle Kandidatengene bezeichnet man die Gene, die aufgrund der Funktion ihrer Produkte als potentiell krankheitsverursachendes Gen besonders in Frage kommen. Ein Kriterium hierfür kann z.B. ein entsprechendes Expressionsmuster sein oder aber das Krankheitsgen eines Tiermodells, bei dem ein ähnlicher Phänotyp

beobachtet wurde. Weitere Kriterien sind z.B. eine funktionelle Ähnlichkeit von Proteinen oder Interaktionspartner von Proteinen, die bereits mit der Erkrankung assoziiert werden konnten. Alle auf dieser Basis ausgewählten Kandidatengene der Osteopetrose wurden mittels Segregationsanalyse in einer konsanguinen Familie mit autosomal-rezessiver Osteopetrose überprüft.

Die Homozygotiekartierung ist eine effiziente Methode, die z.B. bei autosomal-rezessiven Erberkrankungen in konsanguinen Familien angewendet werden kann, um die Allelverteilung zu untersuchen. Hierbei geht das Krankheitsallel auf dasselbe Allel der Vorfahren (z.B. Elterngeneration) zurück und liegt bei der betroffenen Person homozygot vor. Man spricht hierbei auch von „identity by descent“.

Für eine entsprechende Untersuchung können Marker eingesetzt werden, die in Nachbarschaft zum eigentlichen Kandidatengen liegen, das untersucht werden soll.

Geeignete Marker sind z.B. hochpolymorphe Mikrosatellitenmarker, die repetitive di-, tri- oder tetranukleotide Sequenzen enthalten. Befindet sich ein Mikrosatellitenmarkerloкус in der Nähe des Kandidatengenloкус, so ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass er mit dem Gen gemeinsam vererbt wird und in homozygoten Zustand bleibt. Die Erstellung von Haplotypen dient dazu, die Segregation des Markers anzugeben.

Wir gehen bei den konsanguinen Familien mit Osteopetrose entsprechend von dem Vorliegen eines autosomal rezessiven Vererbungsmuster aus. Zeigen die betroffenen Kinder der Familie eine homozygote Allel-Verteilung für den in der Nähe des zu untersuchenden Kandidatengens liegenden Mikrosatellitenmarker, die gesunden Eltern eine Heterozygotie und die gesunden Geschwister eines Betroffenen eine andere als die homozygote Konstellation für den Marker, so kommt dieses Gen als krankheitsursächlich in Frage.

Mit dieser Methode wurde die Familie F1 auf mögliche Homozygotie untersucht. Die Kandidatengene, die eine Segregation aufwiesen, wurden im Anschluss direkt sequenziert.

## 1.5 Bisherige Forschungsergebnisse zur Osteopetrose

### CA2-Gen (Carboanhydrase-2)

Die molekulare Ursache der autosomal rezessiven, intermediären Osteopetrose, bei der eine renale tubuläre Azidose auftritt, konnte als Erstes aufgeklärt werden. 1972 wurde erstmalig über 3 unabhängige Fälle von Osteopetrose mit renaler tubulärer Azidose berichtet. Die Familien wurden näher untersucht und ein autosomal rezessives Vererbungsmuster konnte ermittelt werden<sup>22,23,24</sup>. Im Jahre 1980 wurde erneut über drei konsanguine arabische Paare berichtet, die an Osteopetrose erkrankte Kinder bekamen. Zu den Symptomen kamen noch die zerebralen Kalzifizierungen hinzu<sup>25</sup>. Die Arbeitsgruppe von Sly et al. postulierte 1983, dass ein Defekt eines Isoenzym aus der Gruppe der Carboanhydrasen, die die Reaktion von Kohlendioxid und Wasser zu Protonen und Bikarbonat katalysieren, für dieses Krankheitsbild zuständig sein musste, und konnte tatsächlich durch immunologische und biochemische Untersuchungen eine defekte Funktion der Carboanhydrase 2 (CA2) nachweisen. Nachfolgend wurden auch Mutationen im CA2-Gen identifiziert<sup>26,27,28,29,30,31,32</sup>.

### ATP6i (TCIRG)

Es konnte gezeigt werden, dass die Ansäuerung von aus Osteoklasten isolierten Vesikeln durch eine ATP-abhängige Protonenpumpe hervorgerufen wird<sup>33</sup>.

Protonenpumpen sind große Proteinkomplexe aus vielen Untereinheiten, die unter ATP-Verbrauch Protonen über biologische Membranen transportieren<sup>34</sup>. Das Protein OC-116 ist eine Untereinheit der Osteoklasten Protonenpumpe und versprach eine Rolle bei der Säuresekretion der Bürstensaummembran<sup>35</sup>. Es wurde in der Maus das entsprechende *ATP6i*-Gen ausgeschaltet. Diese Knockout-Mäuse zeigten eine schwere, unmittelbar nach der Geburt beginnende Osteopetrose ohne renal-tubuläre Azidose<sup>36</sup>. Bei den Tieren waren zwar Osteoklasten auf der Oberfläche zahlreich vorhanden aber aufgrund der unzureichenden Ansäuerung der Resorptionslakune nicht fähig den Knochen zu resorbieren. Durch Kopplungsanalysen in zwei großen Beduinen-Familien konnte die Arbeitsgruppe den Genlokus auf Chromosom 11q13 eingrenzen<sup>37</sup>. 1998 gelang einer Arbeitsgruppe die Identifikation des Genlokus für die autosomal-rezessive Osteopetrose, die eine Übereinstimmung mit dem *ATP6i*-Gen zeigte. Des Weiteren

konnte gezeigt werden, dass Mutationen in diesem Gen tatsächlich zu einer autosomalen rezessiven Osteopetrose führen<sup>38,39</sup>.

### ***CLCN7***

Bei vielen Patienten zeigte sich weder eine Mutation im *CA2*-Gen noch im *ATP6i*-Gen, was auf weitere genetische Heterogenität schliessen ließ. Das Ausschalten des Gens *CLCN7* in der Maus, das für den Chloridtransporter *CIC-7* kodiert, führte zu einem osteopetrotischen Phänotyp<sup>40</sup>. *CIC-7* gehört zur Familie der spannungsgesteuerten *CLC*-Chloridkanäle und ist in sauren Vesikeln des Zytoplasmas und in der Bürstensaummembran der aktiven Osteoklasten vorhanden<sup>41</sup>. Der Protonentransport in der Bürstensaummembran führt zur Ansäuerung der Resorptionslakune, jedoch durch die Verschiebung des elektrochemischen Gradienten durch die positiv geladenen H<sup>+</sup>-Ionen auch zu einem Erliegen des Ansäuerungsprozesses. Um eine Elektroneutralität zu bewahren, werden durch *CLC-7* negativ geladene Chloridionen in die Resorptionslakune geleitet, was zu einer Aufrechterhaltung der physiologischen Demineralisation durch den Ladungsausgleich führt. Compound heterozygote bzw. homozygote Mutationen im *CLCN7*-Gen führen zu einem Funktionsverlust des Chloridkanals und verursachen die autosomal rezessive, infantile maligne Osteopetrose. Es zeigte sich aber, dass bestimmte heterozygote Mutationen in diesem Gen auch zu der milderen autosomal-dominanten Osteopetrose (Albers-Schönberg) führen, die sich in der Regel erst im späten Jugendalter oder Erwachsenenalter manifestiert<sup>42</sup>. Die dominanten Mutationen in *CLCN7* setzen anscheinend die Osteoklastenaktivität lediglich herab, während sie durch die rezessiven Mutationen gänzlich blockiert wird<sup>43</sup>.

### ***OSTM1***

Die spontane *gl*-Mutation (Grey Lethal) in der Maus führt zu einer grauen Fellfarbe und zu schwerwiegender Osteopetrose.

Chalhoub et al. identifizierten mittels positioneller Klonierung das krankheitsverursachende *gl*-Gen in der Maus. Das humane Ortholog des *gl*-Gens (*OSTM1*) weist eine 83%ige Homologie zum murinen *gl*-Gen auf<sup>44</sup>. Lange et al. konnten zeigen, dass *OSTM1* in Lysosomen der Osteoklasten zu finden ist und als  $\beta$ -Untereinheit des *CLC-7*

fungiert. Die CLC-7-OSTM1-Interaktion scheint für die Stabilität und subzelluläre Lokalisation des CLC-7-Proteins wichtig zu sein<sup>45</sup>.

Es konnte dann gezeigt werden, dass Mutationen im *OSTM1*- Gen (Osteopetrosis-Associated Transmembran Protein) beim Menschen zu einer autosomal-rezessiven Osteopetrose führen<sup>46,47</sup>.

Generelle klinische Manifestationen			
-Osteosklerose, Verkleinerung des Markraums			
-Multiple Frakturen, zum Teil nach Bagateltrauma			
Spezielle Kennzeichen der einzelnen Formen			
Erkrankung	Manifestations -alter	Vererbung/Gen (Chromosom)	Charakteristische Symptome
Infantil maligne Osteopetrose	1. LJ	rezessiv/ <i>ATP6i</i> (11q13) rezessiv/ <i>CLCN7</i> (16p13) rezessiv/ <i>OSTM1</i> (6q21)	- Kleinwuchs - Hypokalzämie - Extramedulläre Blutbildung - Kompression von Hirnnerven - Stark eingeschränkte Lebenserwartung
Intermediäre Osteopetrose	1.-2. LJ	rezessiv/ <i>CA2</i> (8q22)	- Renale tubuläre Azidose - Zerebrale Kalzifizierungen - Mentale Retardierung - Kleinwuchs - Hypokalzämie - Extramedulläre Blutbildung - Kompression von Hirnnerven
Albers- Schönberg Osteopetrose	10.-40. LJ	dominant/ <i>CLCN</i> 7 (16p13)	- Sandwich-Wirbel - Skoliose - Arthritis des Hüftgelenks - Osteomyelitis

Tabelle 1: Formen der Osteopetrose: eine Übersicht basierend auf Kornak et al.

## 2. Materialien, Methoden und Durchführung

### 2.1 Materialien

In Tabelle 2 finden sich in alphabetischer Reihenfolge die verwendeten Materialien und die Hersteller:

Substanz	Hersteller
Agarose	Invitrogen, Carlsbad, USA
Big Dye	Applied Biosystems
Borsäure	MERCK, E. Merck
Bromphenol-Blau	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Buffer 1	New England Biolabs, Ipswich, USA
dNTP (10 mM)	Invitrogen, Carlsbad, USA
EDTA 10mM	MERCK, E. Merck
EDTA 2mM (pH 8,0)	MERCK, E. Merck
Enhancer Lösung (PCRx)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ethanol (100%, unvergällt)	MERCK, E. Merck
Ethidiumbromid	MERCK, E. Merck
ExoSAP-IT Enzym von USB	USB
Ficoll	MERCK, E. Merck
Formamid	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
GeneScan Längenstandard Tamra	Perkin Elmer
GeneScan Längenstandard Rox	Perkin Elmer
Genomi Phi Kit	Amersham Biosciences Piscataway, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Glyzerin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
HPLC-H <sub>2</sub> O	MERCK, E. Merck
Magnesium Sulfat (50 mM)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Natriumacetat (3M, pH 5,2)	MERCK, E. Merck
PCR Puffer (10x mit MgCl <sub>2</sub> 15mM)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PCRx Puffer (10x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Platinum® Taq Polymerase (5U/μl)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Primer	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Primer (fluoreszierend markiert)	ABI Prism Linkage Mapping Set
Standard 100bp	Invitrogen, Carlsbad, USA

Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
-------------	---------------------------------

Tabelle 2: Materialien

### 2.1.1 DNA-Proben

Die DNA-Proben der untersuchten Patienten sowie von 100 Kontrollpersonen wurden vom Institut für Humangenetik, UKE, zur Verfügung gestellt.

### 2.1.2 Sequenzierprimer

Auflistung der verwendeten Primer für die Sequenzierung von *ATP6VIC2*, *ATP6VIG1*, *ATP6V0A2*, *RANKL* und *CLCN7*.

ATP6VIC2_E2_F	gtgatgtttgtcctggttctggg
ATP6VIC2_E2_R	ccctctcctgtctccccctgacc
ATP6VIC2_E3_F	gtgttgttgagatggcatcatgc
ATP6VIC2_E3_R	cctctgacaacaatgtcaaattc
ATP6VIC2_E4_F	gacagtattttgaggacagcttcc
ATP6VIC2_E4_R	gactctggtctagaggagcggg
ATP6VIC2_E5_F	gtctcaatcatggatgcagagcg
ATP6VIC2_E5_R	caggctctgccccgctgacc
ATP6VIC2_E6_F	caaaaagtcagccaactcttc
ATP6VIC2_E6_R	caggcaagcgttaagccccgcc
ATP6VIC2_E7_F	ggcactgtgtccctttctgctc
ATP6VIC2_E7_R	gggtccacctctctccactg
ATP6VIC2_E8_F	ctcaggacaccacgagccttttc
ATP6VIC2_E8_R	ggttgggtgccctgaagcaccac
ATP6VIC2_E9_F	gccccactcccgcacaaggcctag
ATP6VIC2_E9_R	gaagcttccagaggggcagag
ATP6VIC2_E10_F	ggttcactctcccgtcgggg
ATP6VIC2_E10_R	gaggactcttctatccccaggcc
ATP6VIC2_E11A_F	aggcgatgagaatgattatttg
ATP6VIC2_E11A_R	cagaaggcgcctgagctggcgag
ATP6VIC2_E11B_F	ggctctgtgcaggcggggtg

ATP6V1C2_E11B_R	gagagaaggcaggagctggggtg
ATP6V1C2_E13_F	ggcaggttccttctatccgtg
ATP6V1C2_E13_R	gtaagatgctgagcttactgtag
ATP6V1C2_E14_F	gcgagcttcctcaaaactaaaag
ATP6V1C2_E14_R	cattctctggctaaggaagagg

Tabelle 3: Sequenzierprimer *ATP6V1C2*

ATP6V1G1_E1_F	caagcgcagattgtggcgcg
ATP6V1G1_E1_R	gcctaactaccaccacctg
ATP6V1G1_E2_F	ccatctgtctctgcttgc
ATP6V1G1_E2_R	cgaccaggatctctgagctatgc
ATP6V1G1_E3_F	gataggtgagcctgggttctgc
ATP6V1G1_E3_R	ctagagctgtgctaagcttc

Tabelle 4: Sequenzierprimer *ATP6V1G1*

ATP6V0A2_E1_F	cgggttcgcgctggtggccctg
ATP6V0A2_E1_R	ccgcgggagggccccagcgatgc
ATP6V0A2_E2_F	gagtgatcacccccaaactttg
ATP6V0A2_E2_R	catgcctacataactgtgattac
ATP6V0A2_E3_F	ccagtaagtcaagttggacaagc
ATP6V0A2_E3_R	gcctagagagatcaccatcttc
ATP6V0A2_E4_F	cagcctgggagacagaggagac
ATP6V0A2_E4_R	acacagcctatgggaatgag
ATP6V0A2_E5_F	ctaagttagtagtaggatgc
ATP6V0A2_E5_R	cttctatggagctcatctgcc
ATP6V0A2_E6_F	ctctcaggatgtcttcaccactg
ATP6V0A2_E6_R	ctaccatatctccaactctgc
ATP6V0A2_E7_F	gacagtgttgagctgccgaag
ATP6V0A2_E7_R	caacatccctctggagtcag
ATP6V0A2_E8_F	gactgcatctgcaccgtgctc

ATP6V0A2_E8_R	ccaatctcactagaacatcttg
ATP6V0A2_E9_F	ccaggataggcaggtgcctgg
ATP6V0A2_E9_R	gagtcaacacactgcattctc
ATP6V0A2_E10_F	gcagtaaccagattcgttg
ATP6V0A2_E10_R	caagataggattgtgtggttac
ATP6V0A2_E11_F	gtaaccacacaatcctatcttg
ATP6V0A2_E11_R	cctgccagcacagccgcagcc
ATP6V0A2_E12_F	ggctgcggctgtgctggcagg
ATP6V0A2_E12_R	ctgggaggagggaaggtctagg
ATP6V0A2_E13_F	cctagacctctctcccag
ATP6V0A2_E13_R	cacctccgctcagggcagc
ATP6V0A2_E14_F	gtctgtggccctggttaagg
ATP6V0A2_E14_R	catattggctccccttacc
ATP6V0A2_E15_F	ctggacactcagatgtatctgg
ATP6V0A2_E15_R	caggctcctgtggagatcac
ATP6V0A2_E16_F	ccgctggcaagtgtagctgg
ATP6V0A2_E16_R	gagacagggaccctccaggagg
ATP6V0A2_E17_F	gtgtgagccactgtgcctagcc
ATP6V0A2_E17_R	gttgtggaggctggaagtccc
ATP6V0A2_E18_F	ccagcatccagccggcagctc
ATP6V0A2_E18_R	cccacagtgcccccctgagtctg
ATP6V0A2_E19_F	ctcagtcaggtagctcacag
ATP6V0A2_E19_R	Gatatgaacacagatccaaggg
ATP6V0A2_E20_F	Ggaatgtgattcataatctcc
ATP6V0A2_E20_R	Cctatcataaatctgacataag

Tabelle 5: Sequenzierprimer *ATP6V0A2*

RANKL_E4_F	Cttcagtgacagagattgag
RANKL_E4.1_F	Gacccaaagccgggetccaag
RANKL_E4.2_F	Gcgccctgcccgetcgcgccg
RANKL_E4_R	Tgagattcaaaccatcgtc
RANKL_E4.1_R	Cttccggaatatgcaagctc

RANKL_E4.2_R	Cagccctgcgccaggtgtcc
RANKL_E5_F	Ccatcttgagggttcattgtatt
RANKL_E5_R	Ctgattgccataatcaatcac
RANKL_E6;7_F	Cacctaatacatataggaatttc
RANKL_E6;7.1_F	Gttactatggcacctttggaag
RANKL_E6;7.2_F	Ggggaactccattgatag
RANKL_E6;7_R	Gagaatcacagttccagga
RANKL_E6;7.1_R	Ctttggctttgaagtaagggc
RANKL_E6;7.2_R	Caggatgtgaatcatcacc
RANKL_E8_F	Ctgtgcctaacagaatgcac
RANKL_E8_R	Ctagtagtctcacacacctat

Tabelle 6: Sequenzierprimer *RANKL*

CLCN7_E1_FB	Tcggtggttgcctgtgcaggtc
CLCN7_E1_RB	Tagttgctcgtgtaggatgc
CLCN7_E2_F	Gagtgagaatccacggagcag
CLCN7_E2_R	Tgtcacctctgctaagatgc
CLCN7_E34_F	Tggcctcgtgtgtgagctgag
CLCN7_JF_E3_R	Aggccgggtctcagggtc
CLCN7_JF_E4_F	Cagagcgtgggttcggtgc
CLCN7_E34_R	Cagacgaaccacaggcctcag
CLCN7_E5_F	Ctgccagagtgactgcgccag
CLCN7_E5_R	Cacctgcactggaacacgctg
CLCN7_E6_F	catctgccaggctggtctgtg
CLCN7_JF_E6_R	Cgcccattcaccaagacc
CLCN7_E7_F	Ggctgcatctgtctcagcctg
CLCN7_E7_R	Ccaagagagctgctcctg
CLCN7_E8_F	Gctcaggtccaagacagcgc
CLCN7_JF_E8_R	Cctcaggctccagctggag
CLCN7_JF_E9_F2	Gtcacgcgtgtctctgagcatc
CLCN7_E9_R	Ggaagcccatctcctgagtg
CLCN7_E1011_F	Tcagagctgctgactcggttg

CLCN7_JF_E10_R	Gaccgttcctccaacacacag
CLCN7_JF_E11_F	Cctgtgtccagctggcacc
CLCN7_E1011_R	Ggaaatgagagcgcagcatgc
CLCN7_JF_E12_F	Tgggagcgtggctctgag
CLCN7_E12_R	Gctctcagctccacagctatc
CLCN7_E13_F	Tggacttccgcagcctgcgtg
CLCN7_E13_R	Tatggccacgtcacagctgag
CLCN7_E14_F	Gtggagggaagcatcttacca
CLCN7_JF_E14_R	Cgcctgccaacgcgatatg
CLCN7_JF_E15_F	Cgtcctgcctgccatgcag
CLCN7_E15_R	Tectcccgtagcctaagcgag
CLCN7_E16_F	Cacggcgacaccaggtttgtg
CLCN7_E16_R	Gacactcagccagaaggcatc
CLCN7_JF_E17_F	Gaggcgggagtcgtggag
CLCN7_JF_E17_R	Caagacctggctcagctgcag
CLCN7_JF_E18_F	Ctgccaccacactgacacctc
CLCN7_E18_R	Ggccactgccttctctgcagc
CLCN7_E1920_F	Ggtgctgcagagaaggcagtg
CLCN7_JF_E19_R	Cagcaccacgctctcagg
CLCN7_JF_E20_F	Ggtgtggactcctcaagcc
CLCN7_E1920_R	Aggtgtgaagccgctggacag
CLCN7_E21_F	Cgttctctgtccagcggcttcaca
CLCN7_E21_R	Cctgcaaaccttgccgtgtgc
CLCN7_E2223_F	Cgacacagcattccagcgcag
CLCN7_JF_E22_R	Ggcagagccctgtgtcagg
CLCN7_JF_E23_F	Aaggtgcgtgccaggctcc
CLCN7_E2223_R	Agacagagtcaccgagtctctc
CLCN7_JF_E23_R	Cacgcccattgccatgcc
CLCN7_E24_F	Agaggactcgggtgactctgtc
CLCN7_JF_E24_R	Cctgcacggcatgcctgc
CLCN7_JF_E25_F	Cgacctgtgtcactgtg
CLCN7_E25_R	Gggccgagaaccagtgactc

Tabelle 7: Sequenzierprimer *CLCN7*

## **2.2 Methoden und Durchführung**

### **2.2.1 Amplifikation genomischer DNA**

Da nur begrenzt genomische DNA der Patienten zur Verfügung stand, wurde die DNA des Patientenkollektivs mit dem Genomi Phi DNA Amplification Kit von Amersham Biosciences amplifiziert. Dabei wird die DNA-Polymerase des Bakteriophagen Phi29 für die exponentielle Amplifikation von einzel- oder doppelsträngiger genomischer DNA eingesetzt.

#### **Durchführung**

Die Reaktion lief nach folgendem Schema ab:

##### 1. Hitzedenaturierung

- 1 µl Ausgangs-DNA wurden mit 9 µl „Sample Puffer“ gemischt
- 3 Min Inkubation bei 95°C
- Sofortige Abkühlung auf Eis

##### 2. Vorbereitung der Amplifikationsreaktion

- auf Eis wurden 9 µl Reaktions-Puffer mit 1 µl Enzymmix gemischt
- das Gemisch zur gekühlten Probe gegeben
- 16-18 h Inkubation bei 30°C

##### 3. Hitzeinaktivierung

10 Min Inkubation bei 65°C

Darauf folgte eine photometrische Konzentrationsmessung und Verdünnung der DNA auf 200 ng/ml. Die amplifizierte DNA wurde bei 4°C gelagert.

### **2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion**

Für den PCR-Ansatz wurde ein Mastermix aus Primern, dNTP, Puffern, H<sub>2</sub>O und Taq-Polymerase hergestellt (s. Tabelle 8). Diese wurde dann auf die verschiedenen Tubes, in die die gewünschten DNA-Proben vorgelegt wurden, verteilt. Die Proben wurden dann im Thermocycler amplifiziert (s. Tabelle 9).

Die Empfindlichkeit der Methode bedingt aber eine hohe Anfälligkeit für Kontamination mit fremder DNA. Deshalb musste immer eine Negativprobe ohne DNA als

Kontrolle durchgeführt und strenge Hygiene eingehalten werden, um dieses Risiko zu minimieren.

Die PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Amplifikation von Mikrosatelliten und von Exons der Gene eingesetzt und bildete damit die Grundlage für weitere Untersuchungen.

PCR- Reaktionsgemisch
1 µl DNA (100ng/µl)
1 µl Primer F
1 µl Primer R
1 µl dNTP
2,5µl PCR-Reaktionspuffer
0.3µl Taq-Polymerase
18.2µl H2O ad 25 µl

Tabelle 8: PCR-Ansatz zur Herstellung des Mastermix

PCR-Reaktionszyklen	Temperatur	Zeit	Funktion
1	1x 95°C	5 Min	Initiale Denaturierung
2	95°C	1 Min	Denaturierung
30x	50-60°C	1 Min	Annealing Temperatur abhängig von Primerpaaren
	72°C	1 Min	Elongation, optimale Temperatur für Taq-Polymerase
3	1x 72°C	10 Min	

Tabelle 9: Verwendetes PCR-Programm das je nach Primerkombination optimiert wurde

### **2.2.3 Produktprüfung durch Agarosegelelektrophorese**

Die elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes auf Agarosegelen erfolgt zu Kontrollzwecken und Größenbestimmung. Ihr Prinzip beruht auf der Beweglichkeit der geladenen Produkte im elektrischen Feld. Die negativ geladene DNA wandert vom negativen zum positiven Pol, wobei ihre Beweglichkeit größenabhängig ist, d.h. große Fragmente wandern langsamer im elektrischen Feld durch die Poren des Gels als kleine Fragmente.

#### **Durchführung**

Es wurden 2%ige Agarosegele verwendet. 5g Agarosepulver wurden in 250 ml 1xTAE aufgekocht, mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt und dann in die mit Kämmen bestückten Gelschlitten gegossen. Das fertige Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingebracht und mit 1%igem TAE überschichtet.

Für die Durchführung der Elektrophorese wurden 5µl des PCR-Produktes mit 1µl 6x Ladepuffer versetzt und dann vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese der amplifizierten PCR-Produkte erfolgte bei einer Spannung von 100 Volt für ca. 1 Stunde, die der Restriktions-Fragmente bei einer Spannung von 80 Volt für 3-4 Stunden. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht untersucht. Hierbei stellten sich die DNA-Proben durch Interkalation des Ethidiumbromids als leuchtende Banden dar. Im Vergleich zu einem Größenstandard, der ebenfalls aufgetragen wurde, konnten auch die Fragmentgrößen abgeschätzt werden. Die Dokumentation erfolgte fotografisch mit dem Computer-programm „DIGI CAM Digital Camera Control“.

### **2.2.4 Segregationssanalyse**

Mikrosatelliten sind kurze repetitive DNA-Sequenzen, die sich meist als Dinukleotide (am häufigsten als CA-Repeat), maximal als Hexanukleotide darstellen. Diese in der Bevölkerung hochpolymorphen Sequenzen lassen sich mit Hilfe flankierender Primer amplifizieren, so dass bei homozygoten Merkmalsträgern eine und bei heterozygoten Merkmalsträgern zwei unterschiedlich große Allele gut darstellbar sind. Durch die hohe Variabilität sind diese Marker häufig informativ.

Durch eine geeignete Methode wie z. B. die Kapillarelektrophorese erfolgt dann eine Größenauftrennung der Allele entsprechend ihrer Länge.

Der Reaktionsansatz für die Mikrosatelliten-PCR (s. Tab. 10) entspricht dem einer konventionellen PCR. Eines der Oligonukleotiden des Primerpaares ist dabei am 5`-Ende mit einem von vier verschiedenen verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen (FAM, TET, HEX oder NED) markiert. Die benutzten Primer entstammen dem „ABI Prism Linkage Mapping Set Version 1 und 2“.

1 µl DNA (100ng/µl)
1 µl Primer F
1 µl Primer R
1 µl dNTP
2,5µl PCR-Reaktionspuffer
0.3µl Taq-Polymerase
18.2µl H2O ad 25 µl

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die Mikrosatelliten-PCR

Bei einer Annealingtemperatur zwischen 50-60°C erfolgte die PCR in einem automatischen Thermocycler (s. Tab. 11)

PCR-Reaktionszyklen	Temperatur	Zeit
1	1x 95°C	5 Min
2  30x	95°C	1 Min
	50-60°C	1 Min
	72°C	1 Min
3	1x 72°C	10 Min

Tabelle 11: PCR-Programm

Der Erfolg der PCR wurde mittels Gelelektrophorese kontrolliert.

## **Durchführung**

Nach der Gelelektrophorese wurden jeweils 0,5µl des PCR-Produktes mit 20µl Formamid und, je nach Fluoreszenzfarbstoff, mit 2,5µl TAMRA500 oder ROX500 Längenstandard (Applied Biosystems) versetzt und bei 95°C für 3 Min. denaturiert. Das Formamid verhindert die Doppelstrangbildung. Die fluoreszenz-markierten Amplikons wurden anschließend auf 4°C abgekühlt und im Genetic Analyzer ABI 310 (Applied Biosystems) analysiert. Nach Kalibrierung des Gerätes erfolgte der automatische Transfer der Proben durch den Autoloader zu den Kapillaren in der Elektrophoresekammer. Unter gerätespezifischer Spannung und definierter Injektionszeit wurden nun die einzelnen Proben in je eine polymergefüllte Kapillare aufgenommen. Die einzelsträngigen DNA-Fragmente wanderten nun aufgrund ihrer negativen Ladung und der angelegten Spannung in Richtung der Anode, die sich am Ende der Kapillare befindet. Kurze Fragmente wanderten hierbei schneller als lange Fragmente. Dort wurden sie durch eine Küvette geleitet und dabei von dem Argonlaser erfasst, der die gebundenen Farbstoffe zum Fluoreszieren anregte.

Dabei zeigte die ABI 310 Collection Software einen Ausschlag in Form eines Peaks für jedes Signal, der in Abhängigkeit von der Art der verwendeten Fluoreszenz-Farbstoffe unterschiedliche Farben besitzt. Die Fläche und die Höhe jedes Peaks sind abhängig von der Intensität des Signals und wurden durch die GeneScan Software errechnet und in Form eines Elektropherograms dargestellt. Die Kandidatengene, die eine Kopplung in der Familie gezeigt haben, wurden dann mittels Sequenzierung weiter analysiert.

### **2.2.5 Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung beruht auf einer von F. Sanger entwickelten enzymatischen Methode. Das zu sequenzierende DNA-Fragment muss als Einzelstrang vorliegen. Benötigt werden ein Primer, DNA-Polymerase, Nukleotide und fluoreszenz-markierte Didesoxynukleotide. Diese Methode beruht auf dem Prinzip, dass durch den Einbau eines Didesoxy-nukleotids (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) anstelle eines Desoxynukleotid (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), eingebaut wird, ein Abbruch der DNA-Synthese erfolgt. Einem Didesonukleotid fehlt eine Hydroxyl-gruppe am 3`-Kohlenstoffatom. Dadurch ist keine Bindung zwischen dem 3`-Kohlenstoffatom und

dem nächsten Nukleotid möglich. Die Synthese des neuen Strangs bricht an dieser Stelle ab. Der Einbau der ddNTPs und damit der Kettenabbruch ist zufällig. Für die Sequenzierungs-PCR wird das Big Dye von ABI verwendet, in dem unterschiedlich fluoreszenz-markierte ddNTPs enthalten sind. Aufgrund des zufälligen Kettenabbruchs entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, bei denen jeweils die letzte Base fluoresziert. Diese Fragmente werden anschließend mittels Elektrophorese der Länge nach getrennt. Ein Laserstrahl wird während der Elektrophorese konstant auf eine bestimmte Stelle des Gels fokussiert. Wenn die markierten DNA-Fragmente diese Stelle passieren, regt der Laserstrahl die Farbstoffe zur Fluoreszenz an. Diese Fluoreszenzsignale werden automatisch detektiert und die DNA-Sequenz wird aus den Fluoreszenzdaten ermittelt und als Chromatogramm dargestellt.

Die DNA-Sequenzierung erfolgt automatisiert mit Hilfe eines Sequenziergeräts.

### **Durchführung**

Amplikons der Exons von Kandidatengenomen wurden zunächst mit dem Enzym ExoSAP-IT von USB von einzelsträngiger DNA bereinigt. Die Aufreinigung lief wie folgt ab:

1. 5µl PCR-Produkt, 0,2µl ExoSAP-IT und 1,8µl wurden in einer PCR-Tube pipettiert.
2. 15 Min. bei 37°C, danach 15 Min. bei 80°C inkubiert.

Für die zyklische Sequenzierung wurde folgender Ansatz pipettiert:

5 µl	Aufgereinigtes PCR-Produkt
1 µl	Primer (Vorwärts- oder Rückwärts-Primer)
2 µl	Big Dye
2 µl	HPLC-H2O

Tabelle 12: PCR-Ansatz bei der Sequenzierung

Danach wurde ein Sequenzier-PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

PCR-Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1x 96°C	5 Min.
2	96°C	20 Sek.
25x	50°C	5 Sek.
	60°C	4 Min.
3	1x 4°C	∞

Tabelle 13: Sequenzier-PCR-Programm

Es erfolgte eine anschließende Aufreinigung des PCR-Produktes. Dazu wurden 30µl HPLC- H<sub>2</sub>O, 5µl Natrium-Acetat (pH 5,2) und 100µl Ethanol (100%, unvergällt) hinzugefügt und dieses Gemisch für 20 Min. bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 100µl Ethanol(70%, unvergällt) zum Waschen hinzugefügt. Danach wurde für 10 Min. bei 14.000 rpm ein weiteres Mal zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut entfernt und das Pellet bei 37°C getrocknet.

Die so gewonnenen Proben wurden dann in 3 µl Ladepuffer aufgenommen, 15 Min. bei 37°C gelöst und anschließend eine Minute bei 90°C denaturiert. Die Proben wurden auf Eis gestellt, auf das Gel des ABI 377 Sequenziergerätes geladen und aufgetrennt.

Als Sequenzierprogramm wurde „ABI Prism 377XL Collection“ von Applied Biosystems genutzt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm „ABIPrism Sequenzing Analysis“, ebenfalls von Applied Biosystems.

### 2.2.6 Restriktionsenzymverdau

Restriktionsenzyme sind Enzyme, die aus Bakterien isoliert werden. Sie spalten DNA innerhalb einer Sequenz an einer für jedes Enzym spezifischen Stelle. Dies ist eine kurze, meist palindromische Sequenz von mehreren Basenpaaren. Die Erkennungssequenzen werden immer in 5`-3`-Richtung angegeben. Sequenzspezifische DNAsen schneiden DNA nur bei einer bestimmten Nukleotidabfolge. Diese Fähigkeit macht man sich bei der Erkennung von Mutationen durch Restriktionsenzymverdau zu Nutze. Wird bei einer Mutation die Erkennungsstelle für ein Restrik-

tionsenzym durch Austausch eines Nukleotids verändert, kommt es zum Verlust oder Zugewinn einer Schnittstelle. Mithilfe von DNA-Kontrollen kann zudem einfach überprüft werden, ob es sich tatsächlich um eine pathogene Mutation handeln könnte, oder ob ein Polymorphismus vorliegt. In der vorliegenden Arbeit wurden jene Mutationen, die durch Sequenzierung der Exons identifiziert wurden, mittels Restriktionsenzymanalyse bestätigt, wenn ein informatives Restriktionsenzym für die gesuchte Erkennungssequenz zur Verfügung stand.

### Durchführung

Analyse der Mutation G240R in Exon 13, *CLCN7* mit Restriktionsenzym *BstnI*

Die PCR-Probe wurde mit Enzym, Puffer und Wasser zusammen pipettiert und bei für das jeweilige Enzym geeigneter Temperatur inkubiert (s. Tab. 14 und 15)

Reaktionsbedingungen: Inkubation bei 60°C für 3 Stunden

PCR-Probe	10µl
BsnI	0,5µl
NEBuffer P2	1,2µl
BSA	0,12µl

Tabelle 14: Reaktionsansatz (*CLCN7*, Restriktionsenzym *BstnI*)

Analyse der Mutation in Exon 13, *RANKL* mit Restriktionsenzym *BssSI*

Reaktionsbedingungen: Inkubation bei 37°C für 12 Stunden

PCR-Probe	8,5µl
BssSI	0,5µl
NEBuffer	1µl

Tabelle 15: Reaktionsansatz (*RANKL*, Restriktionsenzym *BssSI*)

Die Darstellung und anschließende Auswertung des Restriktionsverdaus wurde mithilfe einer Gelelektrophorese durchgeführt. Die Fragmente wurden hier auf 2,5%ige Agarosegele aufgetragen und analysiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Stammbaum der Familie F1

Die zu untersuchende Familie, hier Familie F1, stammt aus Pakistan. Aus der konsanguinen Verbindung der Eltern gingen 5 Kinder hervor, von denen eins Symptome einer Osteopetrose zeigt.

Anamnestisch wurde der in der Abbildung 1 dargestellte Stammbaum erhoben.

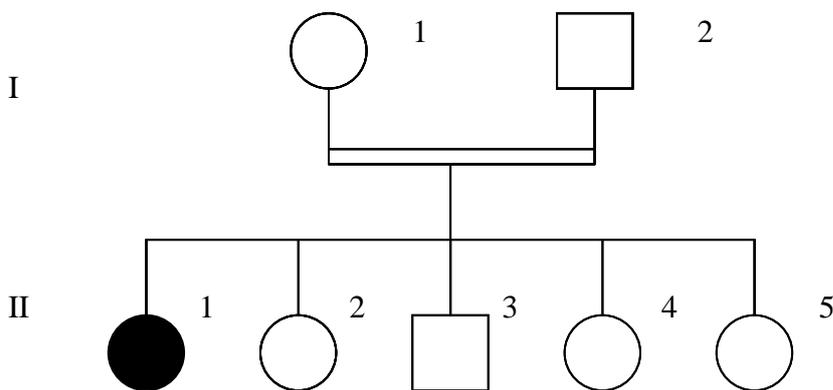


Abbildung 3: Stammbaum der Familie F1

#### 3.2 Stammbaum der Familie F2

Bei der zweiten Familie handelt es sich um eine chinesische Familie. Eine Konsanguinität ist bisher nicht bestätigt. Aus der Verbindung der Eltern ging ein Kind mit Symptomen einer Osteopetrose hervor. Anamnestisch wurde der in Abbildung 2 dargestellte Stammbaum erhoben.

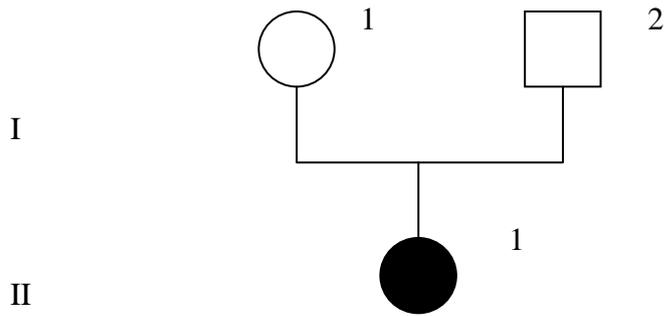


Abbildung 4 : Stammbaum der Familie F2

### 3.3 Ausgewählte Kandidatengene

Die hier dargestellten Kandidatengene wurden nach funktionellen Gesichtspunkten ausgesucht, die zusammenfassend dargestellt werden sollen. Es wurden Gene, die im Knochenstoffwechselweg eine Rolle spielen, durch Literaturrecherchen ausfindig gemacht und in die Mutationssuche eingeschlossen:

Das Enzym V-Typ  $H^+$ ATPase ist in der Plasmamembran von Osteoklasten lokalisiert und ist für die Ansäuerung der Resorptionslakune zwischen Knochen und Osteoklasten verantwortlich<sup>48</sup>. Das Enzym spaltet ATP zu ADP und Phosphat. Durch die Hydrolyse wird Energie freigesetzt und der aktive Transport der Protonen über eine biologische Membran gegen einen elektrochemischen Gradienten ermöglicht. So wird für das saure Milieu in der Resorptions-Lakune gesorgt, was den Knochenabbau durch Osteoklasten erst möglich macht. Diese V-Typ  $H^+$ ATPase wird aus Untereinheiten aufgebaut, bestehend aus dem V0 und V1 Komplex<sup>49</sup>. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Veränderung des Gens *ATP6i*, das für eine Untereinheit der Protonenpumpe kodiert, zu einer schwerwiegenden Osteopetrose führt. So erweisen sich weitere Untereinheiten der Protonenpumpe als gute Kandidatengene und wurden deshalb in der Mutationssuche eingeschlossen.

Der Cl-/HCO<sub>3</sub>. Austauscher AE2, kodiert durch das *SLC4A2*-Gen, wird in zahlreichen Zelltypen exprimiert, darunter auch in der Niere, in Atmungsorganen und im Verdauungstrakt. AE2<sup>-/-</sup> Knockout-Mäuse zeigen neben einer Zahnlosigkeit, Taubheit und Achlorhydrie eine Wachstumsretardierung und defekte Knochenentwicklung im Sinne einer Osteopetrose<sup>50</sup>. Das *SLC4A2* könnte aufgrund seiner Transporteigenschaften bei der Ansäuerung der Resorptionslakune des Knochens eine Rolle spielen.

*RAC1* und *RAC2* gehören zu der Rho-related small GTPase Familie und spielen eine wichtige Rolle in diversen Signalwegen unter anderem im Zellzyklus, bei der Proliferation der Zelle und bei der Regulation der Transkription der Gene<sup>51</sup>. *RAC1* wird in verschiedene Zelltypen, *RAC2* aber nur in hämatopoetische Zellen exprimiert<sup>52</sup>. Rac-Proteine werden auch in Osteoklasten der Ratte exprimiert und sind in die Organisation des Actin-Zytoskeletts und in die Regulation der Knochenresorption involviert<sup>53</sup>. Maus-Modelle konnten zeigen, dass *Rac1*-null und *Rac1/2*-null Mutanten einen milden osteopetrotischen Phänotyp aufwiesen. *Rac1* und *Rac2* spielen unterschiedliche, sich nicht überschneidende Rollen in der Differenzierung von Osteoklasten<sup>54</sup>.

*RAB3D* gehört zu der Familie der RAB-Proteine (Ras-related in Brain-Proteine) und spielt eine Rolle bei der Exozytose. *RAB3D* wird unter anderem in Osteoklasten exprimiert. Mäuse bei denen das *RAB3D* ausgeschaltet wurde, zeigten einen osteopetrotischen Phänotyp<sup>55</sup>.

Osteoklastische Knochenresorption benötigt Zelladhäsions-Moleküle, wie z.B. Integrine, die den Kontakt zwischen Knochenmatrix und resorptiver Zelle ermöglicht. Besonders wichtig ist das *β3-Integrin*. Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von *β3-Integrin* zu einer Dysfunktion der Osteoklasten führt und damit zu einer Osteosklerose<sup>56</sup>. Die zytoplasmatische Domäne des *β3-Integrins* aktiviert spezifische intrazelluläre Signale, die Rac-abhängig zur Zytoskelett-Reorganisation führen, und erweist sich als sehr wichtig für die Funktion der Osteoklasten<sup>57</sup>.

*TRAF6* gehört zu der Gruppe der TNF-Rezeptor-assoziierten Faktoren. Es bindet an die zytoplasmatische RANK-Domäne (receptor-activator of NF- $\kappa$ B-Domäne) und spielt eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Osteoklasten. In seiner Abwesenheit werden die entsprechenden Mäuse ebenfalls osteopetrotisch<sup>58,59,60</sup>.

*C-Src* (zusammengesetztes Akronym aus cellular und sarcoma) gehört zu der Familie der Tyrosinkinasen. Soriano et al konnten zeigen, dass *C-Src* Knockout-Mäuse eine Osteopetrose entwickelten<sup>61</sup>. Des Weiteren konnte gezeigt werden dass eine erhöhte Anzahl von inaktiven Osteoklasten an der Knochenoberfläche bei *Src*- KO-Mäusen nachweisbar waren<sup>62,63,64</sup>.

Cathepsin K wird in Osteoklasten hoch exprimiert und hat eine wichtige Funktion bei der Knochenresorption<sup>65,66,67</sup>. Bei Cathepsin K-defizienten Mäusen wird eine ausgeprägte Osteopetrose beobachtet, die durch die fehlende Osteoklasten-Aktivität verursacht wird<sup>68,69</sup>.

Für die Differenzierung der Osteoklasten wird *c-Fos* als weiterer Transkriptionsfaktor benötigt. Das Fehlen des Faktors bei Mäusen führt zu einem Mangel an Osteoklasten und in dessen Folge zu Osteopetrose<sup>70</sup>.

Der Kollagenabbau des Knochens erfolgt durch Kollagenasen, die aufgrund ihres Zink-Bestandteiles auch als Matrix-Metalloproteinasen (MMP) bezeichnet werden. Normale Osteoklasten produzieren eine hohe Menge an Metalloproteinasen insbesondere *MMP-9*<sup>71</sup>. Die genaue Funktion von *MMP-9* in Osteoklasten ist unbekannt. Es ist aber möglich, dass ein Defekt der Proteinasen den Knochen- oder Knorpel-Abbau durch Osteoklasten behindern könnte<sup>72</sup>.

CSF-1 reguliert die Produktion, das Überleben, die Proliferation und Differenzierung von phagozytierenden mononukleären Zellen<sup>73</sup>. Eine Arbeitsgruppe konnte ein Fehlen von CSF-1 in osteopetrotischen, „makrophage deficient“ (op/op) Mäusen nachweisen<sup>74</sup>.

DC-Stamp (Dendritic cell-specific transmembrane protein) ist ein 7-transmembran Protein, das ursprünglich in dendritischen Zellen oder IL-4 stimulierten Makrophagen identifiziert wurde<sup>75,76</sup>. *DC-Stamp* ist in Osteoklasten hoch exprimiert und spielt, RANKL-vermittelt, eine wesentliche Rolle bei der Differenzierung von Osteoklasten<sup>77</sup>. DC-Stamp-defiziente Mäuse zeigten eine erhöhte Knochenmasse, ein Hinweis darauf, dass eine fehlerhafte osteoklastische Zellfusion vorliegt<sup>78</sup>.

*OSCAR* (Osteoclast associated receptor), ein Mitglied der LRC-Familie (leukocyte receptor complex), wird in reifen Osteoklasten exprimiert, sein Ligand (*OSCAR-L*) in Osteoblasten/Bindegewebszellen. Die Gabe einer löslichen Form von *OSCAR* in Anwesenheit von knochenresorbierenden Faktoren in Co-Kultur mit Osteoblasten inhibiert die Osteoklastenformation aus Knochenmarkvorläuferzellen, was dafür spricht, dass *OSCAR* bei der Differenzierung von Osteoklasten eine Rolle spielen könnte<sup>79</sup>.

*GAB-2* (Grb-2-associated binder-2) interagiert unter anderem mit *RANK* und spielt eine wesentliche Rolle bei der Osteoklastogenese. Das Ausschalten des Gens in der Maus führt zu einer Osteopetrose aufgrund der verminderten Knochenresorption<sup>80</sup>.

Die Arbeitsgruppe Sheng et al. demonstrierte, dass eine erhebliche Menge von *Gpnmb* (Osteoaktivin) in Osteoklasten exprimiert wird und dass *Gpnmb* funktionell eine wichtige Rolle in der Regulation von Osteoklastenformation und/oder Osteoklastenaktivität spielt. Die Forschung lieferte zudem die Erkenntnis, dass eine *Gpnmb*/Integrin Interaktion bei der *RANKL*-induzierten Osteoklastendifferenzierung und Knochenresorption möglicherweise eine Rolle spielt<sup>81</sup>.

*VAV3*, ein Rho-Guaninnukleotid-Austauschfaktor, wird in Osteoklasten und reifen Osteoblasten exprimiert und ist notwendig für die Aktivierung der Osteoklasten und Knochendichte *in vivo*. *VAV3*-Knockout-Mäuse zeigten eine erhöhte Knochendichte und zudem keinen Knochenverlust auf Knochenabbaustimuli wie das Parathormon oder *RANKL*<sup>82</sup>.

*Npt2* kodiert für einen Typ2 Na-abhängigen Pi-Transporter und wird sowohl in Osteoklasten als auch in der proximalen Tubuli der Niere exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Pi-Limitierung zu einer Minderung der Knochenresorption durch Osteoklasten führt. Es konnte eine altersabhängige Verbindung zwischen Osteoklasten und trabekuläre Entwicklung in *NPT2*-Knockoutmäuse gezeigt werden<sup>83</sup>.

*SLC39A1* kodiert den Zink-Transporter-1 (ZIP1). Zinkmangel ist mit Knochenwachstumsretardierung und der Entwicklung von Osteoporose assoziiert<sup>84,85</sup>. Kürzlich zeigten Untersuchungen, dass *SLC39A1* in Osteoklasten exprimiert wird und die Funktion der Osteoklasten durch Zinkaufnahme inhibieren könne<sup>86</sup>.

*DCIR* wird hauptsächlich in myelomonocytyären Zellen und nicht aktivierten B-Zellen exprimiert<sup>87</sup>. *KCNN4* wird in verschiedenen Geweben exprimiert, ist aber zahlreicher in aktivierten als in ruhenden T-Zellen vorhanden und scheint für den prädominierenden Kaliumkanal in T-Zellen zu kodieren<sup>88</sup>. Beide, *DCIR* und *KCNN4* zeigten bei den osteolytischen Riesenzelltumoren des Knochens (Osteoklastome) eine erhöhte Genexpression<sup>89</sup>.

Die Arbeitsgruppe Rho et al identifizierte diverse Gene wie z.B *Arginase* und *p21-ARC* die in reifen Osteoklasten hoch exprimiert sind und somit funktionell relevant sein könnten<sup>90</sup>.

*LRP5* (LDL receptor-related protein 5) wird in Osteoblasten exprimiert und fungiert als Co-Rezeptor für Proteine der Wnt-Familie. Es konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung von Osteoblasten durch den Wnt-Signalweg stimuliert wird<sup>91</sup>. Mutationen im *LRP5* Gen wurden zuerst im Zusammenhang mit dem rezessiven Osteoporose-Pseudogliom-Syndrom entdeckt, einer Erkrankung, die skeletale und Anomalien der Augen verursacht<sup>92</sup>. Bei Familien mit erhöhter Knochendichte konnten weitere Mutationen im *LRP5* dargestellt werden<sup>93</sup>.

Bereits 1941 wurde über die spontanen Mutationen in „*Inscisors absent*“ (*ia*) Ratten berichtet. Die „*ia*“ Ratten zeigten eine generalisierte skeletale Sklerose und einen verspäteten Zahndurchbruch<sup>94</sup>. Histologische Analysen zeigten, dass die „*ia*“ Mutanten 2-3 mal mehr Osteoklasten aufwiesen als ihre normalen Wurfgeschwister. Zudem zeigten „*ia*“ Osteoklasten einen Mangel der „ruffled border“ (Bürstensaum)<sup>95</sup>. Um das veränderte Gen bei der Mutante zu identifizieren, wurde eine Kopplungsanalyse durchgeführt und so erstmal eine 4.7-cM Region auf Chromosom 10q32.1 bei der Ratte isoliert. Mithilfe der Sequenzierung gelang es der Arbeitsgruppe Van Wesenbeeck et al, die „*ia*“ Mutation, eine homozygote Deletion im Exon 4 des *PLEKHMI*-Gens (pleckstrin homology domain-containing family M (with RUN domain) member1), zu identifizieren<sup>96</sup>. Des Weiteren konnte bei einer unter autosomal rezessiver Osteopetrose leidenden Patientin eine homozygote Mutation im Intron 3 des *PLEKHMI*-Gens nachgewiesen werden<sup>97</sup>.

*PLEKHMI* scheint auch eine wichtige Rolle bei der Knochenresorption zu spielen. Elektronen- und konfokalmikroskopische Analysen zeigten, dass Monozyten, die von einem Patienten mit einer homozygoten Frameshiftmutation gewonnen wurden, zu normalen Osteoklasten differenzieren. Wurden die Monozyten aber auf Kulturplatten mit Dentin gezüchtet, bildeten die Osteoklasten keinen Bürstensaum (ruffled border) und zeigten keinen Hinweis auf Knochenresorption. Das Plekhm1-Protein besitzt unter anderem eine RUN-Domäne, die schon in Proteinen identifiziert worden war, die mit kleinen GTPasen der Rab Familie interagieren. Rab GTPasen spielen eine kritische Rolle in der Regulation der Osteoklastenaktivität<sup>98</sup>.

*TNFSF11(RANKL)* spielt zusammen mit *M-CSF* (macrophage colony-stimulating factor) eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der Osteoklasten<sup>99</sup>.

Mutationen im *TNFRSF11a* Gen wurden mit diversen skeletalen Anomalien assoziiert, unter anderem mit familiärer expansiler Osteolyse, skeletaler Hyperphosphatämie und early-onset Paget-Krankheit<sup>100,101,102</sup>.

Durch Knockout-Mäuse konnte dargestellt werden, dass die RANKL/RANK-Interaktion für die Reifung der Osteoklasten wichtig ist. In der Tat zeigten *Tnfrsf11a* <sup>-/-</sup> (*rank* knockout) und *Tnfrsf11* <sup>-/-</sup> (*rankl* knockout) Mäuse einen Phänotyp mit schwerwiegender Osteopetrose, verursacht durch einen Mangel an reifen Osteoklasten. Zusätzlich zeigten die Mäuse eine Immunschwäche mit fehlenden Lymphknoten<sup>103,104,105</sup>.

Die Arbeitsgruppe Guerinni et al analysierte bei Betroffenen, deren Knochenbiopsien einen Mangel an Osteoklasten zeigten, Gene, die in der Differenzierung von Osteoklasten im *RANKL/RANK* Signalweg eine Rolle spielen. Es konnten jüngst mittels Sequenzierung Mutationen im *TNFRSF11a* (*RANK*) Gen in 7 nicht verwandten Familien nachgewiesen werden<sup>106</sup>.

Gen	Beschreibung
<i>LRP5</i>	low density lipoprotein receptor-related protein 5
<i>SLC4A2</i>	solute carrier family 4, anion exchanger, member 2 (erythrocyte membrane protein band 3-like 1) SLC4A2
<i>PLEKHM1</i>	pleckstrin homology domain containing, family M (with RUN domain) member 1
<i>ATP6V1B1</i>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B1
<i>ATP6V1B2</i>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B2
<i>ATP6V1C1</i>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C1
<i>ATP6V1C2</i>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C2
<i>ATP6V1E1</i>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit E1
<i>ATP6V1E2</i>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit E2
<i>ATP6V1G1</i>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G1
<i>ATP6V1G2</i>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G2
<i>ATP6V1G3</i>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G3
<i>ATP6V1H</i>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 50/57kDa, V1 subunit H
<i>ATP6VOA1</i>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal V0 subunit a1
<i>ATP6VOA2</i>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal V0 subunit a2
<i>ATP6VOD1</i>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d1
<i>ATP6VOD2</i>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d2
<i>ATP6VOC</i>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 16kDa, V0 subunit c

<i>ATP6VOB</i>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 21kDa, V0 subunit b
<i>ATP6VOE</i>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 9kDa, V0 subunit e1
<i>ATP6VOE2L</i>	ATPase, H <sup>+</sup> transporting V0 subunit e2
<i>BIRC2</i>	baculoviral IAP repeat-containing 2 (BIRC2)
<i>RAC1</i>	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)
<i>RAC2</i>	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)
<i>MMP9</i>	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
<i>ARG1</i>	arginase, liver
<i>ARG2</i>	arginase, type II
<i>STXBP3</i>	syntaxin binding protein 3 ( <i>Munc 18-3</i> )
<i>TM7SF4</i>	transmembrane 7 superfamily member 4
<i>SLC15A3</i>	solute carrier family 15, member 3
<i>KCNN4</i>	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4
<i>MMP13</i>	matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)
<i>DCIR</i>	C-type lectin domain family 4, member A (CLEC4A)
<i>GPNMB</i>	glycoprotein (transmembrane) nmb
<i>SLC37A2</i>	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 2
<i>SLC39A1</i>	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 1
<i>DPP3</i>	dipeptidyl-peptidase 3
<i>SLC15A4</i>	solute carrier family 15, member 4
<i>OSCAR</i>	osteoclast associated, immunoglobulin-like receptor
<i>RAB3D</i>	RAB3D, member RAS oncogene family
<i>CALCR</i>	calcitonin receptor
<i>ITGA3</i>	integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)
<i>DCST1</i>	DC-STAMP domain containing 1
<i>CSF1</i>	colony stimulating factor 1 (macrophage)
<i>C-SRC</i>	c-src tyrosine kinase
<i>RANK</i>	receptor activator of nuclear factor-kappa B
<i>RANKL</i>	receptor activator of nuclear factor kappa B ligand
<i>CFOS/FRA1</i>	FOS-like antigen 1
<i>TRAF6</i>	TNF receptor-associated factor 6

<i>VAV3</i>	vav 3 guanine nucleotide exchange factor
<i>GAB2</i>	GRB2-associated binding protein 2
<i>CTSK</i>	Cathepsin K
<i>NPT2</i>	solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 1

Tabelle 16: Liste der ausgewählten Kandidatengene

### 3.4 Untersuchung bereits bekannter Osteopetrose-Loci

Die vier bekannten Osteopetrose-assoziierten Gene *ATP6i*, *CLCN7*, *OSTM1* und *CA2* wurden mittels Segregationsanalyse in der Familie F1 untersucht. Eine Segregation zu den bekannten Genen konnte hierbei nicht nachgewiesen werden (Tabelle 17). Es wurde aufgrund der Konsanguinität von einer homozygoten Veränderung als Ursache der Erkrankung ausgegangen.

Kandidatengen	Chromosomale Lokalisation	Physikalische Position des Gens	Marker	Physikalische Position des Markers	Segregation
<i>ATP6i</i>	11q13.2	67,563,059-67,574,941	<i>D11S1314</i>  <i>D11S987</i>	69,627,796-69,627,945  65,227,362-65,227,471	Keine Segregation
<i>CLCN7</i>	16p13	1,435,346-1,465,582	<i>D16S423</i>	6,252,911-6,253,035	Keine Segregation
<i>OSTM1</i>	6q21	108,470,717-108,502,628	<i>D6S287</i>  <i>D6S434</i>	120,297,882-120,298,186  103,081,372-103,081,569	Keine Segregation
<i>CA 2</i>	8q22	86,376,131-86,393,721	<i>D8S270</i>	89,206,857-89,207,043	Keine Segregation

Tabelle 17: Ausschluss der bereits bekannten Gene

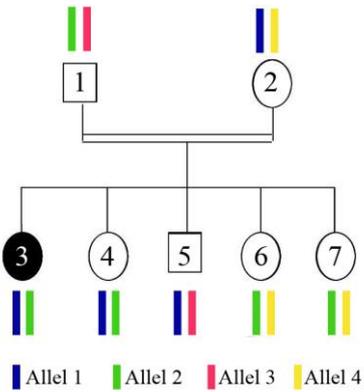


Abbildung 5: Allelverteilung im Bereich des *ATP6i*-Locus. Hier zeigt sich eine Heterozygotie bei dem Betroffenen.

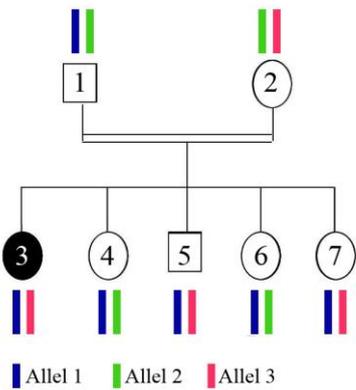


Abbildung 6: Allelverteilung im Bereich des *CLCN7*-Locus. Hier zeigt sich eine Heterozygotie bei dem Betroffenen.

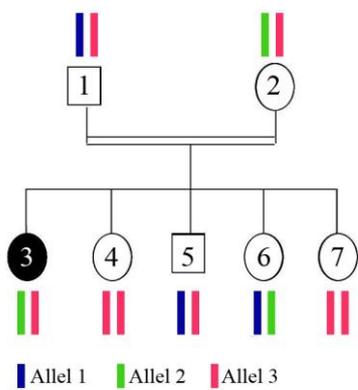


Abbildung 7: Allelverteilung im Bereich des *OSTM1*-Locus. Hier zeigt sich eine Heterozygotie bei dem Betroffenen.

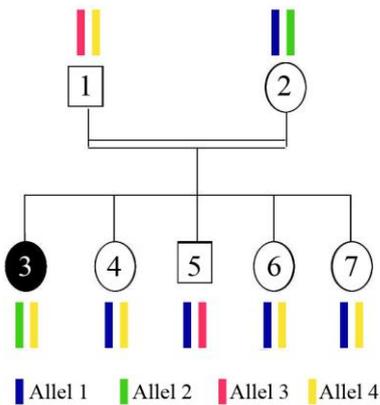


Abbildung 8: Allelverteilung im Bereich des CA2-Locus. Hier zeigt sich eine Heterozygotie bei dem Betroffenen.

### 3.5 Untersuchung der weiteren Kandidatenloci

Grundsätzlich sind drei Ergebnismöglichkeiten denkbar: Segregation zum Kandidatengenlocus, keine Segregation oder eine fehlende Informativität des Markers.

1. Im Falle einer Segregation (Abbildung 9) zeigt sich eine Heterozygotie der Eltern sowie eine Homozygotie der Betroffenen für den entsprechenden Marker. Hierbei ist es wesentlich, dass nicht betroffene Geschwister für den gleichen Marker eine Heterozygotie oder Homozygotie für das andere Allel aufweisen.

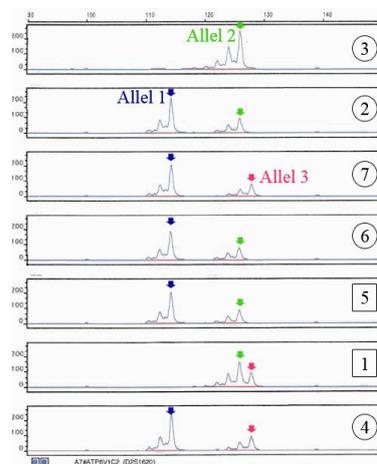
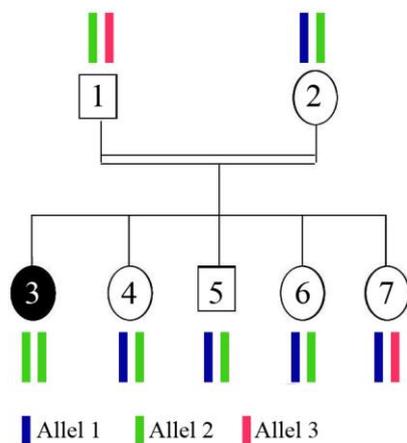


Abbildung 9: Darstellung der Allele eines Markers bei der Familie F1 bei einer Segregation am Beispiel des ATP6VIC2-Gens. Hier zeigt sich eine Heterozygotie der Eltern sowie eine

Homozygotie bei dem Betroffenen. Nicht betroffene Geschwister zeigen ebenfalls eine Heterozygotie.

2. Bei fehlender Segregation zeigte das betroffene Kind aus der konsanguinen Partnerschaft keine Homozygotie. Abbildung 10 zeigt ein Beispiel einer fehlenden Segregation für das *ATPCV1E1*-Gen.

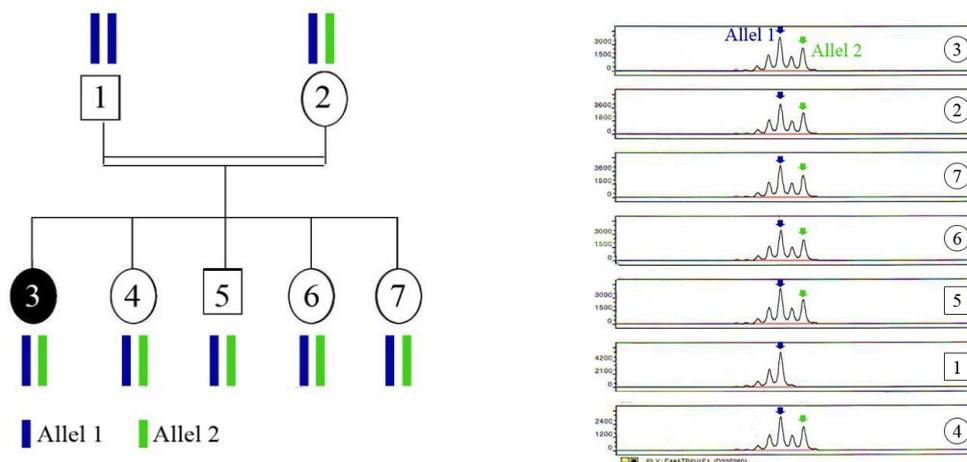


Abbildung 10: Darstellung der Allele eines Markers bei der Familie F1 bei fehlender Segregation am Beispiel des *ATP6V1E1*-Gens. Hier zeigt der Betroffene eine Heterozygotie.

3. Wenn eine Homozygotie für einen bestimmten Marker bei den Eltern vorkommt, wird der Marker als nicht informativ bezeichnet. Der Marker liefert keine ausreichende Information über die Segregation (Abbildung 11).

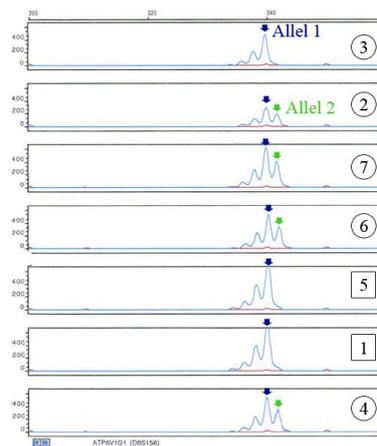
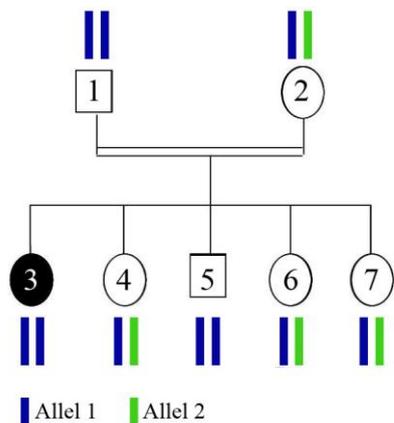


Abbildung 11: Darstellung eines nicht informativen Markers bei der Familie F1 am Beispiel des *ATP6V1G1*-Gens. Hier zeigt der Vater, die Betroffene und 1 Bruder eine Homozygotie.

### 3.6. Segregationsanalyse der restlichen Kandidatengenen

Wie oben erwähnt, wurden alle Kandidatengene auf Segregation überprüft. Die Resultate sind tabellarisch in der Tabelle 18 zusammengefasst.

Kandidatengen	Chromosomale Lokalisation	Physikalische Lokalisation des Gens	Marker	Physikalische Lokalisation des Markers	Segregation
<i>LRP5</i>	11q13.4	67,836,677-67,973,301	<i>D11S1314</i> <i>D11S987</i>	69,627,796-69,627,945 65,227,362-65,227,471	Keine Segregation
<i>SLC4A2</i>	7q35-q36	150,755,299-150,773,614	<i>D7S2465</i> <i>D7S636</i>	150,542,180-150,542,259 145,256,777-145,256,934	Keine Segregation
<i>PLEKHM1</i>	17q21.31	43,513,266-43,568,146	<i>D17S791</i> <i>D17S810</i>	41,305,869-41,306,045	Keine Segregation
<i>ATP6V1B1</i>	2p13.1	71,074,676-71,104,210	<i>D2S139</i> <i>D2S286</i>	79,592,327-75,592,501 75,173,415-75,173,550	Keine Segregation

<i>ATP6V1B2</i>	8p22-p21	20,098,984- 20,123,485	<i>D8S1771</i>  <i>D8S258</i>	24,402,722- 24,402,947  19,329,805- 19,329,954	Keine Segregation
<i>ATP6V1C1</i>	8q22.3	104,102,467- 104,154,453	<i>D8S514</i>  <i>D8S1784</i>	119,931,321- 119,931,539  102,290,353- 102,290,513	Keine Segregation
<i>ATP6V1C2</i>	2p25.1	10,813,545- 10,875,826	<i>D2S305</i>  <i>D2S162</i>	19,280,909- 19,281,181  8,774,895- 8,775,034	Segregation
<i>ATP6V1E1</i>	22pter-q11.2	16,449,479- 16,486,089	<i>D22S280</i>	17,011,585- 17,011,804	Keine Segregation
<i>ATP6V1E2</i>	2p21	46,650,639- 46,658,747	<i>D2S391</i>	46,249,843- 46,249,998	Keine Segregation
<i>ATP6V1G1</i>	9q33.1	114,429,580- 114,440,206	<i>D9S158</i>	109,617,434- 109,617,652	Nicht Informativ
<i>ATP6V1G2</i>	6p21.3	31,605,979- 31,622,606	<i>D6S276</i>	25,419,170- 25,419,312	Keine Segregation
<i>ATP6V1G3</i>	1q32.2	195,224,011- 195,241,732	<i>DIS213</i>	196,973,125- 196,973,232	Keine Segregation
<i>ATP6V1H</i>	8p22-q22.3	54,790,669- 54,918,403	<i>D8S285</i>	53,057,832- 53,057,939	Keine Segregation
<i>ATP6VOA1</i>	17q21	37,864,388- 37,928,122	<i>D17S791</i>	41,305,869- 41,306,045	Keine Segregation
<i>ATP6VOA2</i>	12q24.31	122,721,745- 122,769,321	<i>D12S86</i>	118,803,426- 118,803,577	Segregation
<i>ATP6VOD1</i>	16q22	66,029,426- 66,072,589	<i>D16S3091</i>  <i>D16S516</i>	67,278,607- 67,278,723  63,423,876- 63,424,015	Keine Segregation
<i>ATP6VOD2</i>	8q21.13	87,180,249- 87,235,573	<i>D8S270</i>	89,206,857- 89,207,043	Keine Segregation
<i>ATP6VOC</i>	16p13.3	2,503,954- 2,510,219	<i>D16S423</i>	6,252,911- 6,253,035	Keine Segregation

<i>ATP6VOB</i>	1p32.3	44,109,704- 44,113,059	<i>DIS197</i>	49,036,435- 49,036,560	Keine Segregation
<i>ATP6VOE</i>	5q35.2	172,343,369- 172,394,506	<i>D5S408</i>	175,610,017- 175,611,273	Keine Segregation
<i>ATP6VOE2L</i>	7q36.1	149,007,705- 149,015,434	<i>D7S2465</i>	150,542,180- 150,542,259	Keine Segregation
<i>BIRC-2</i>	11q22	101,693,404- 101,713,674	<i>D11S908</i>  <i>D11S898</i>	112,442,687- 112,442,831 98,226,096- 98,226,238	Nicht Informativ
<i>RAC 1</i>	7p22	6,187,366- 6,216,837	<i>D7S517</i>	4,466,916- 4,467,180	Keine Segregation
<i>RAC 2</i>	22q12-q13.2	35,945,812- 35,964,810	<i>D22S274</i>	29,181,081- 29,181,288	Keine Segregation
<i>MMP9</i>	20q12-q13	44,070,954- 44,078,606	<i>D20S196</i>	46,266,016- 46,266,181	Keine Segregation
<i>ARG1</i>	6q23	131,939,058- 131,947,161	<i>D6S262</i>	132,477,329- 132,477,500	Keine Segregation
<i>ARG2</i>	14q24.1-q24.3	67,156,332- 67,188,187	<i>D14S68</i>	68,673,461- 68,673,618	Keine Segregation
<i>STXP3</i>	1p13.3	109,001,350- 109,064,190	<i>DIS502</i>	110,754,611- 110,754,745	Keine Segregation
<i>TM7SF4</i>	8q23	105,421,228- 105,438,092	<i>D8S1784</i>	102,290,353- 102,290,513	Keine Segregation
<i>SLC15A3</i>	11q12.1	60,461,134- 60,475,853	<i>D11S987</i>	65,227,362- 65,227,471	Keine Segregation
<i>KCNN4</i>	19q13.2	48,962,525- 48,977,249	<i>D19S418</i>	52,585,775- 52,585,869	Keine Segregation
<i>MMP13</i>	11q22.3	102,318,940- 102,331,672	<i>D11S908</i>	112,442,687- 112,442,831	Nicht Informativ
<i>DCIR</i>	12p13	8,167,793- 8,182,470	<i>D12S99</i>	7,185,492- 7,185,711	Keine Segregation
<i>GPNMB</i>	7p15	23,059,626- 23,087,963	<i>D7S516</i>	28,187,703- 28,187,956	Keine Segregation

<i>SLC37A2</i>	11q24.1	124,438,223- 124,469,985	<i>DI1S4151</i>	123,458,278- 123,458,427	Keine Segregation
<i>SLC39A1</i>	1q21	150,774,651- 150,827,666	<i>DIS238</i>	161,255,015- 161,255,184	Keine Segregation
<i>DPP3</i>	11q12-q13.1	66,004,456- 66,057,660	<i>DI1S987</i>	65,227,362- 65,227,471	Keine Segregation
<i>SLC15A4</i>	12q24.33	127,802,645- 127,833,421	<i>DI2S324</i>	126,231,828	Keine Segregation
<i>OSCAR</i>	19q13.32	59,289,745- 59,297,812	<i>DI9S210</i>	54,062,565- 54,062,739	Keine Segregation
<i>RAB3D</i>	19p13.2	11,296,094- 11,311,321	<i>DI9S221</i>	12,602,516- 12,602,714	Keine Segregation
<i>CALCR</i>	7q21.3	92,698,450- 92,848,687	<i>D7S657</i>	87,51,748- 87,510,901	Nicht Informativ
<i>ITGA3</i>	17q21.32	42,686,207- 42,745,076	<i>DI7S787</i>	49,744,347- 49,744,488	Nicht Informativ
<i>DCST1</i>	1q12	151,804,078- 151,819,330	<i>DIS238</i>  <i>DIS218</i>	161,255,015- 161,255,184  147,612,599- 147,612,802	Keine Segregation
<i>CSF1</i>	1p21-p13	110,254,778 - 110,275,144	<i>DIS502</i>	110,754,611- 110,754,745	Keine Segregation
<i>C-SRC</i>	15q23-q25	72,861,768- 72,882,565	<i>DI5S130</i>	76,008,060- 76,008,192	Keine Segregation
<i>RANK</i>	18q22.1	58,143,566- 58,204,482	<i>DI8S68</i>	58,258,283- 58,258,439	Keine Segregation
<i>RANKL</i>	13q14	43,034,872- 43,080,148	<i>DI3S156</i>	55,556,192- 55,556,431	Nicht informativ
<i>CFOS/FRA1</i>	11q13	65,416,268- 65,424,573	<i>DI1S1314</i>  <i>DI1S987</i>	69,627,796- 69,627,945  65,227,362- 65,227,471	Keine Segregation
<i>TRAF6</i>	11p12	36,467,299- 36,488,398	<i>DI1S905</i>	41,128,100- 41,128,323	Keine Segregation

<i>VAV3</i>	1p13.3	107,825,832-108,219,580	<i>DIS502</i> <i>DIS206</i>	110,754,611-110,754,745 99,947,037-99,947,243	Keine Segregation
<i>GAB2</i>	11q13.5	77,603,990-77,806,414	<i>DIIS937</i>	75,162,781-75,163,024	Keine Segregation
<i>CTSK</i>	1q21	147,581,760-147,593,885	<i>DIS218</i> <i>DIS238</i>	147,612,599-147,612,802 133,836,242-133,836,379	Keine Segregation
<i>NPT2</i>	5q35	176,744,051-176,758,454	<i>D5S408</i>	175,611,017-175,611,273	Keine Segregation

Tabelle 18: Segregationsmuster der Kandidatengene

### 3.7: Gene mit nachgewiesener Segregation

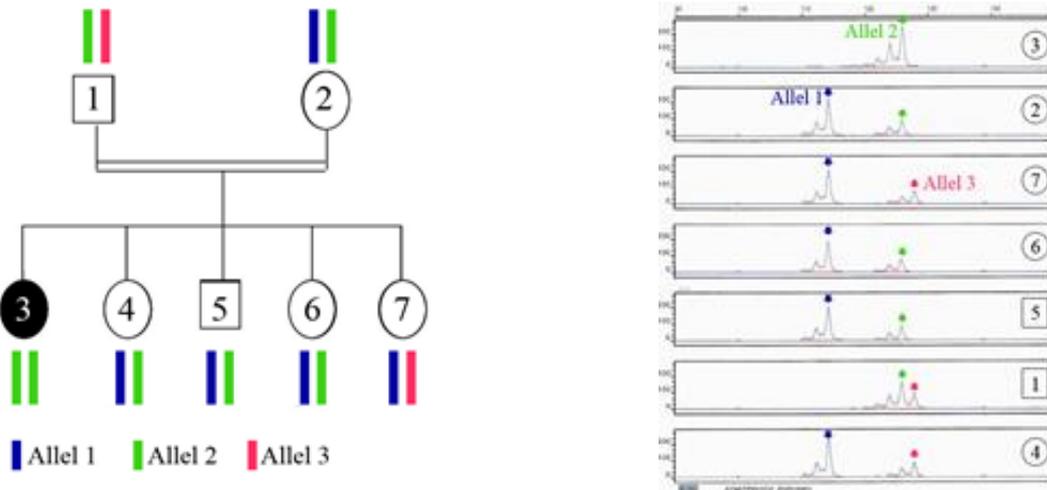


Abbildung 12: Allelverteilung im Bereich des *ATP6VIC2*-Locus. Hier zeigt sich eine Heterozygotie der Eltern sowie eine Homozygotie bei dem Betroffenen. Nicht betroffene Geschwister zeigen ebenfalls eine Heterozygotie

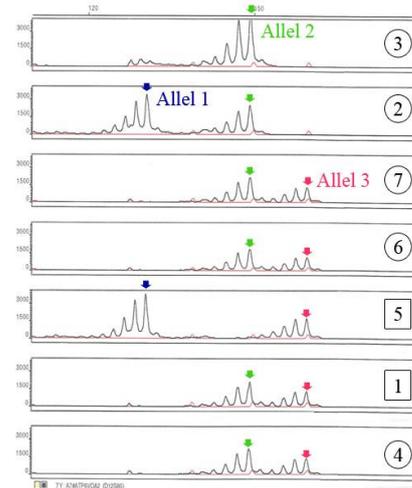
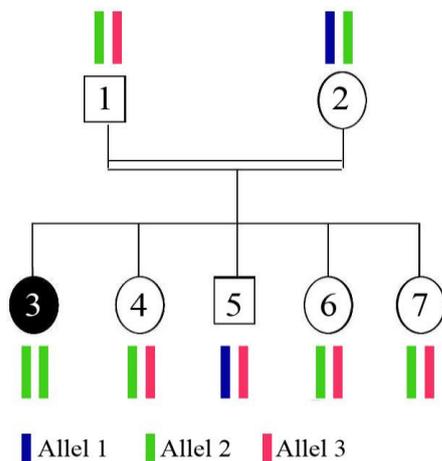


Abbildung 13: Allelverteilung im Bereich des *ATP6VOA2*-Locus. Hier zeigt sich eine Heterozygotie der Eltern sowie eine Homozygotie bei dem Betroffenen. Nicht betroffene Geschwister zeigen ebenfalls eine Heterozygotie

### 3.8 Mutationssuche bei Familie F1

Entsprechend der Segregationsanalyse wurde damit begonnen, die kodierenden Exons der Kandidatengene, die eine Segregation gezeigt haben, aus genomischer DNA des Indexpatienten zu amplifizieren und anschließend zu sequenzieren.

*RANKL*, *CALCR*, *ITGA3*, *BIRC2*, *MMP13* und *ATP6V1G1* erwiesen sich als nicht informativ. Davon wurden *RANKL*, *BIRC2* und *ATP6V1G1* ebenfalls sequenziert.

Dabei konnte im Gen *TNFSF11* (*RANKL*) bei dem Indexpatienten ein homozygoter T zu A Austausch im Exon 8 identifiziert werden (c.596T>A), die Eltern zeigten eine Heterozygotie T/A. Der Basenaustausch führt zu einer Aminosäuresequenzänderung von Methionin zu Lysin (p.M199K, Missense-Mutation). Bei den gesunden Geschwistern konnte ein Wildtyp dargestellt werden.

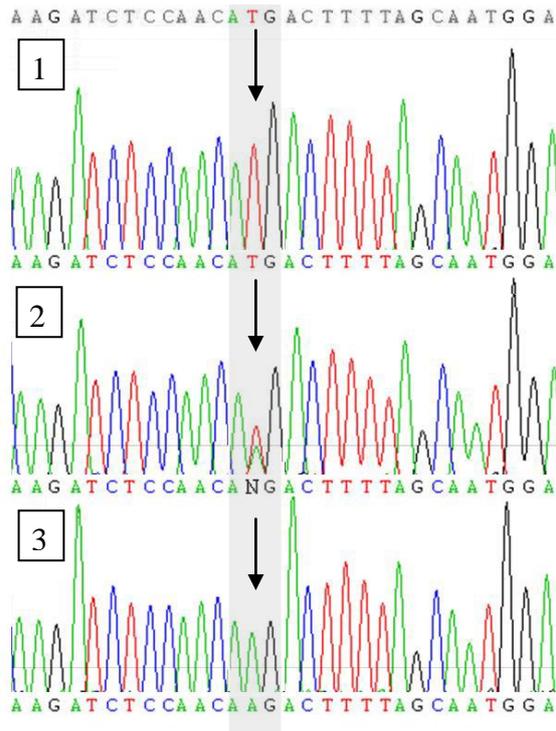


Abbildung 14: Chromatogramm Mutation c.596T>A (p.M199K), Exon 8 des *RANKL*-Gens

1. WT: Wildtyp-Sequenz
2. Heterozygotes Elternteil T/A (Hier: Darstellung des Elektropherogramms des Vaters)
3. Indexpatient mit homozygotem T zu A Austausch im Exon 8 (c.596T>A)

Das Sequenz-Alignment des humanen *RANKL* mit anderen Spezies zeigte, dass diese Aminosäure Methionin an dieser Position evolutionär hoch konserviert ist.

Aufgrund der Funktion von *RANKL* sowie der evolutionären Konservierung wurde die Mutation als sehr wahrscheinlich pathogen eingeschätzt. Parallel zu der hier erfolgten Untersuchung wurde eben diese Veränderung in der Erstbeschreibung von *RANKL*-Mutationen bei Osteopetrose gefunden.

I	S	N	M	T	F	S	N	Bos taurus (Hausrind)
L	S	N	M	T	F	S	D	Gallus gallus (Bankivahuhn)
I	S	N	M	T	F	S	N	H. sapiens (Mensch)
I	S	N	M	T	L	S	N	M. Musculus (Hausmaus)
I	S	N	M	T	L	S	N	Rattus norvegicus
I	S	N	M	T	F	S	N	Canis Lupus (Wolf)
L	S	N	M	T	F	S	N	Pan troglodytes (Schimpanse)
I	S	N	M	T	F	S	N	Macaca mulatta (Rhesusaffe)

Abbildung 15: Alignment des RANKL-Protein Sequenz mit anderen Spezies

Diese Ergebnisse machten *RANKL* zu einem sehr guten Kandidatengen. Aus diesem Grund wurde das zur Verfügung stehende Patientenkollektiv mit Osteopetrose auf Veränderungen im *RANKL*-Gen untersucht.

### 3.9 Untersuchung des Osteopetrose-Patientenkollektivs auf *RANKL*-Mutationen

Bei Patient K des Kollektivs (insgesamt standen 19 Proben aus dem Kollektiv mit einem vergleichbaren klinischen Bild zur Verfügung) wurde im Exon 4 eine heterozygote Veränderung A/G (c.80A>G, (p.E27G)) identifiziert. Die Sequenzierung der restlichen Exons ergab keine zweite Veränderung. Der fehlende Nachweis einer zweiten Mutation im Gen bei autosomal-rezessivem Erbgang führte zu der Einschätzung, dass es sich höchstwahrscheinlich um einen Polymorphismus handelte.

Bei Vorhandensein des A-Allels liegt eine *BssSI* Schnittstelle vor (CACGAG), die bei Vorliegen des G-Allels an dieser Stelle nicht vorhanden ist. Es wurde zur besseren Einschätzung der Veränderung das Amplikon von 100 Kontrollpersonen (entsprechend 200 Kontrollallelen) des entsprechenden Exons mittels *BssSI*-Restriktionsverdau auf die Veränderung getestet. Der Nachweis der Veränderung in heterozygoten Zustand bei einer Kontrollperson unterstützte die Annahme eines Polymorphismus (Abbildung 17), wobei eine Anlageträgerschaft dieser Person für die *RANKL*-assoziierte Osteopetrose natürlich nicht mit letzter Sicherheit auszuschliessen ist.

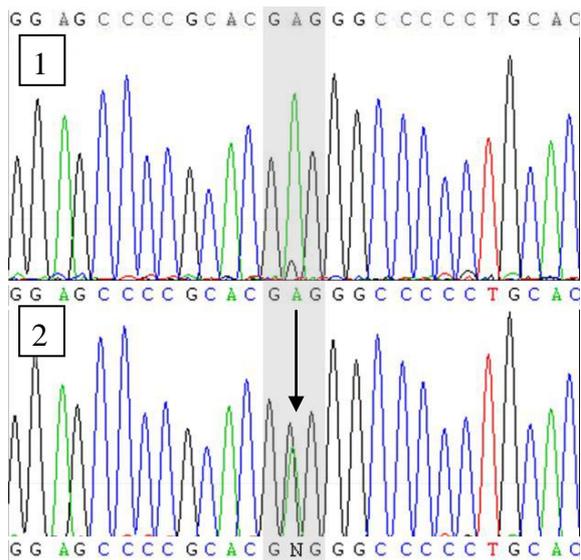
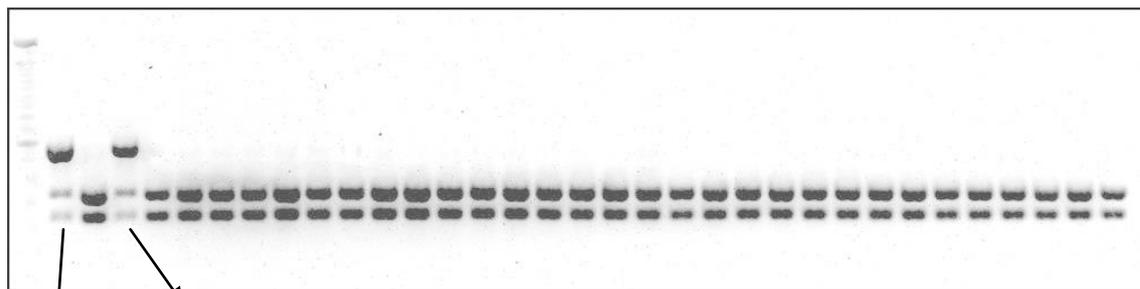


Abbildung 16: Chromatograph Polymorphismus c.80A>G, (p.E27G) Exon 4 des *RANKL*-Gens  
 1: WT: Wildtyp-Sequenz  
 2: K: Heterozygote Veränderung c.80A>G (p.E27G) bei Betroffenen



Betroffene Kontroll DNA mit der Mutation

Abbildung 17: Restriktionsverdau *BssSI*. Der Nachweis der Veränderung in heterozygoten Zustand bei einer Kontrollperson unterstützte die Annahme eines Polymorphismus

### 3.10 Mutationssuche bei Familie F2

Bei der Familie F2 wurde zunächst mit der Direktsequenzierung der bekannten Osteopetrose-Gene begonnen. So konnte zunächst die Mutation c.718G>A (p.G240R) im Exon 8 des *CLCN7* Gens in heterozygoter Ausprägung beim Indexpatienten

identifiziert werden. Die Mutation konnte auch bei der Mutter, nicht aber beim Vater nachgewiesen werden.

Da wir aufgrund der klinischen Symptomatik des Indexpatienten von einer rezessiven Vererbung ausgingen, wurde weiter nach einer zweiten Mutation gesucht. Mithilfe der Sequenzierung gelang es, bei dem Indexpatienten eine zweite Mutation c.1127T>C, p.P376L im Exon 13 ausfindig zu machen, die dann auch bei dem Vater nachzuweisen war. Die Mutation war in der Literatur bislang nicht bei Patienten mit Osteopetrose beschrieben.

Bei Vorhandensein des C-Allels im Amplikon 13 des *CLCN7*-Gens liegt keine *Bst*NI Schnittstelle vor (CCTGG). Bei Vorhandensein des T-Allels liegt eine Schnittstelle für *Bst*NI vor. So wurden die Eltern und 100 Kontrollen mittels Restriktionsverdau des entsprechenden Amplikons auf diese Veränderung geprüft. Keine der Kontrollen wies die Veränderung auf, was gegen einen Polymorphismus spricht. In Kombination mit der bekannten zweiten Mutation ist somit von einer *CLCN7*-assoziierten Mutation mit compound-Heterozygotie auszugehen.

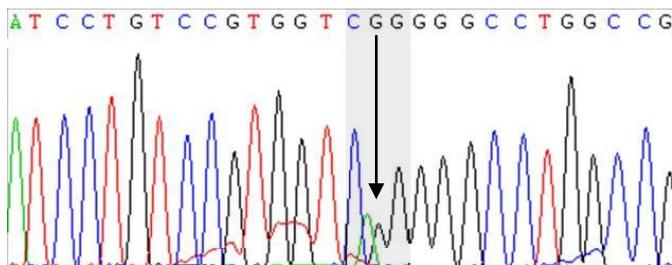


Abbildung 18: Heterozygote Veränderung c.718G>A (p.G240R) Exon 8 (*CLCN7*) in der Familie F2

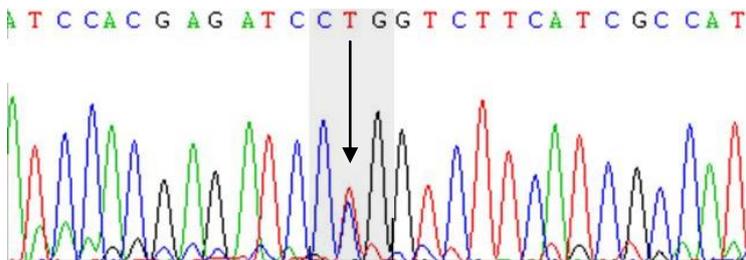


Abbildung 19: Mutation c.1127T>C (p.P376L), Exon 13 (*CLCN7*) in der Familie F2

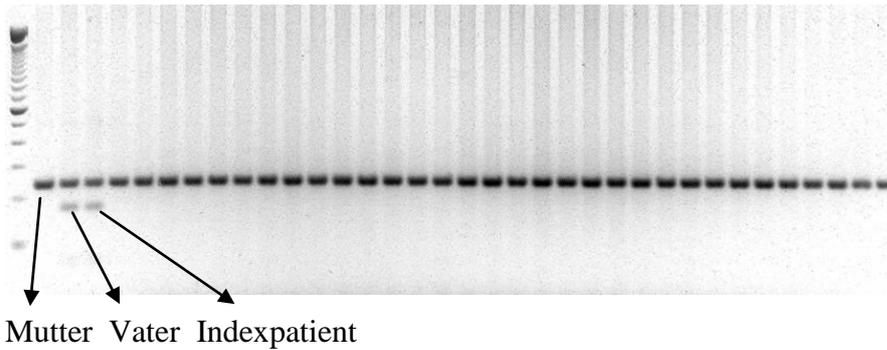


Abbildung 20: Restriktionsverdau *Bst*NI. Bei dem Vater und Indexpatienten liegt eine Schnittstelle für *Bst*NI vor

Das Sequenz-Alignment des humanen *CLCN7* mit anderen Spezies zeigte, dass diese Aminosäure Prolin an dieser Position evolutionär hoch konserviert ist.

```

377 H E I P I F I A Bos taurus ClC-7.PRO
360 Y E I P L F I I Danio rerio.PRO
369 Q E I P I F I F Gallus gallus ClC-7.PRO
373 H E I P V F I A hClC-7.PRO
371 H E I P V F I A mClC-7.PRO
371 H E I P V F I A rat ClC-7.PRO
364 F E L P I F M F Xenopus ClC-7.PRO

```

Abbildung 21: Alignment des CLC-7-Protein Sequenz mit anderen Spezies

## 4 Diskussion

### 4.1 Einleitung

Mit zunehmendem Wissen um die genetischen Grundlagen der Osteopetrose wächst auch die Kenntnis über Therapie und Verlauf der Krankheit. Deshalb ist die Klassifizierung der Osteopetrose nach genetischen Gesichtspunkten unabdingbar. Mit der Identifizierung des zugrundeliegenden Gendefekts in einer Familie kann Familienangehörigen von erkrankten Personen mitgeteilt werden, wie ihr genetischer Status bzgl. der familiären Mutation ist. Je mehr Gene für diese Erkrankung identifiziert werden, desto häufiger kann man möglicherweise Patienten über eine genetische Risikokonstellation und Wiederholungswahrscheinlichkeit aufklären. Im Rahmen einer

pränatalen Diagnostik könnte die Osteopetrose frühzeitig erkannt werden. Für die betroffenen Personen ist die genetische Untersuchung wichtig, um weiter zwischen den Unterformen der Osteopetrose zu differenzieren, nicht zuletzt, da sich hieraus unterschiedliche Therapieoptionen ergeben können. Ein Beispiel wären *RANKL*-Mutationen und der fehlender Erfolg einer Stammzelltransplantation im Gegensatz zu anderen Formen der Osteopetrose.

#### **4.2 Kandidatengenansatz zur Identifikation von Genmutationen**

Kandidatengene für die Osteopetrose sind Gene, die für Proteine kodieren, die im Knochen eine wichtige Funktion ausüben. Der Kandidatengenansatz zur Identifizierung neuer, Osteopetrose-relevanter Gene ist bei diesem Formenkreis von Erkrankungen besonders geeignet, da die bislang identifizierten relevanten Gene funktionell besonders gut dem Osteoklasten zuzuordnen waren. Der Nachteil dieser Herangehensweise liegt darin, dass krankheitsverursachende Gene, die nicht unmittelbar funktionell relevant erscheinen, nicht erfasst werden.

Bei der klassischen Kopplungsanalyse ist die Aussagekraft der Analyse umso höher, je mehr Familienangehörige/Betroffene in die Analyse mit einbezogen werden können. Bei der Osteopetrose besteht aufgrund der schweren Erkrankung häufig kein weiterer Kinderwunsch und die Familien sind häufig klein und für eine klassische Kopplungsanalyse ungeeignet. Zudem versterben die Betroffenen oft früh, ohne das Material für weitere Analysen zur Verfügung steht. Auch die klinische Diagnostik ist häufig nicht abgeschlossen. So war z.B. im Falle der hier analysierten Familie F1 keine Information vorhanden, dass es sich um eine Osteoklasten-arme Osteopetrose handelt.

#### **4.3 Ergebnisse in der Familie F2**

Bei der Familie F2 wurde die heterozygote Mutation c.718G>A (p.G240R) im Exon 8 des *CLCN7* Gens bei einer betroffenen Patientin identifiziert. Mithilfe der Sequenzierung konnte auch eine zweite, bisher nicht beschriebene Mutation c.1127C>T (p.P376L) im Exon 13 ausfindig gemacht werden.

Die Mutation konnte in der DNA von 100 gesunden Kontrollpersonen nicht nachgewiesen werden, so dass der Phänotyp mit hoher Wahrscheinlichkeit auf diese

Mutation in Kombination mit der bereits bei Osteopetrose-Patienten beschriebenen c.718G>A (p.G240R)-Mutation zurückzuführen ist. Zudem ist die Aminosäure 376 des CLC-7 Proteins evolutionär hoch konserviert.

Die bekannten krankheitsassoziierten Mutationen bei *CLCN7*-assoziierter Osteopetrose sind zumeist Missense-Mutationen. In diesem Fall handelt es sich ebenfalls um eine Missense-Mutation mit der Folge eines Aminosäureaustausches von Prolin zu Leucin. Innerhalb von Proteinen kommt Prolin sowohl in *cis*- als auch in *trans*-gebundener Konfiguration vor. L-Prolin hat erheblichen Einfluss auf die Faltung von Proteinen, da es aufgrund der häufig vorkommenden *cis*-Amidbindung  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter unterbrechen kann. Es kann auch eigene Motive bilden, die häufig als Signalsequenz für andere Proteine wirken. Leucin besitzt eine primäre Aminogruppe. Somit weisen die beiden Aminosäuren sehr unterschiedliche physikochemische Eigenschaften auf. Folglich könnte der Austausch von Prolin zu Leucin zu einer erheblichen Veränderung der Proteinstruktur führen, die eine Funktionseinschränkung bewirkt.

#### **4.4 Ergebnisse in der Familie F1**

Der Kandidatengenansatz zeigte sich in diesem Fall erfolgreich. In der Familie F1 konnte eine Missense-Mutation in homozygoter Form (c.596T>A) im Exon 8 des *RANKL* Gens, die zu einem Aminosäureaustausch p.M199K führt, auffindig gemacht werden. Parallel zu der hier entstandenen Arbeit wurden Mutationen im *RANKL*-Gen mit Osteopetrose assoziiert<sup>107</sup>.

Die autosomal rezessive Osteopetrose (ARO) ist meist mit einer normalen oder erhöhten Anzahl von Osteoklasten assoziiert. Einige Patienten mit ARO zeigen jedoch einen Mangel an Osteoklasten, was weniger für einen unmittelbaren Funktionsverlust des Osteoklasten als vielmehr für einen molekularen Defekt in der Differenzierung von Osteoklasten spricht. Die molekularen Analysen in der Studie von Sobacchi et al. ermöglichten die Identifikation von *RANKL*-Mutationen bei Betroffenen, deren Knochenbiopsien durch ein Fehlen von Osteoklasten gekennzeichnet waren. Drei Betroffene unterzogen sich bereits einer Stammzelltransplantation, zeigten aber einen fortgesetzten Mangel an Osteoklasten und keine Verbesserung des Knochenremodelings. Folglich wurde angenommen dass der Defekt nicht intrinsisch in

den Osteoklasten liegt und dass diese Individuen wahrscheinlich Defekte in Genen aufweisen, die zuständig für die osteoklastische Differenzierung sind.

Unter anderem konnte in dieser Studie dieselbe Missense-Mutation wie in unserer Familie F1 (c.596T>A) im Exon 8 nachgewiesen werden. Um nachzuweisen, dass die Mutationen im *RANKL* für den klinischen Phänotyp verantwortlich sind, wurde durch Sobacchi et al. die Fähigkeit von peripheren Blut-Monozyten der Betroffenen, *in vitro* in reife Osteoklasten zu differenzieren, zusammen mit rekombinantem *RANKL* und *M-CSF* überprüft. Sowohl die Betroffenen, die eine Stammzelltransplantation erhielten als auch die, die keine bekamen, zeigten eine normale Osteoklasten Bildung und resorptive Aktivität.

Mutationen im *RANKL*-Gen führen somit zu einer Osteoklasten-armen Osteopetrose in Menschen. Die Patienten sind schwer betroffen, zeigen aber eine geringere Krankheitsprogression im Vergleich zu den klassischen ARO. Therapeutisch relevant ist die Tatsache, dass eine Stammzelltransplantation bei dieser Form der Osteopetrose nicht das adäquate Therapieregime darstellt, da der Defekt nicht intrinsisch im Osteoklasten sitzt. Vielmehr könnten die Betroffenen möglicherweise von einer frühen Applikation von rekombinantem *RANKL* profitieren<sup>107</sup>. Die Gabe von löslichem *RANKL* bei Mäusen die Anzahl von Osteoklasten erhöhte und die Resorption des Knochens stimulierte<sup>108,109</sup>.

## 5 Zusammenfassung

Die Osteopetrose ist eine seltene genetische Erkrankung, die mit einer gesteigerten Knochendichte einhergeht. Klinisch weisen Betroffene ein variables Krankheitsbild auf, das mit einer Panzytopenie, Hepatosplenomegalie sowie Taubheit und Erblindung verbunden sein kann. Pathogenetisch resultiert die Erkrankung oft aus einem Differenzierungs- oder Funktionsdefekt der Osteoklasten, die am Abbau des Knochengewebes beteiligt sind. Das Ziel dieser Arbeit war die molekulargenetische Charakterisierung von Familien mit Osteopetrose bzgl. Veränderungen in den bekannten Osteopetrose-assoziierten Genen sowie die Überprüfung von Kandidatengenen bei fehlendem Nachweis einer pathogenen Mutation in den bekannten Osteopetrose-Genen. Die Kandidatengene wurden aufgrund der aus der Literatur bekannten Funktion im Osteoklasten ausgewählt. Ausgangspunkt der Untersuchung waren zwei Familien, bei denen die DNA gesunder sowie an Osteopetrose erkrankter Familienmitglieder vorliegt.

In der Familie F1 wurde keine Mutation in den bekannten Osteopetrose-Genen gefunden. Hier wurden systematisch 53 Kandidatengene nach dem Prinzip der Homozygotie Kartierung in der Familie untersucht. Gene die eine Segregation aufwiesen wurden anschließend sequenziert. Interessanterweise zeigte sich in dieser konsanguinen Familie bei dem betroffenen Kind eine Missensemutation, c.596T>A (p.M199K), im Exon 8 des *RANKL*-Gens. Diese Mutation wurde parallel zu dieser Arbeit durch die Arbeitsgruppe Fratinni et al beschrieben, in der *RANKL* als Osteopetrose-assoziiertes Gen bestätigt wird.

In der Familie F2 konnte eine Compound-Heterozygotie für zwei Mutationen im *CLCN7*-Gen identifiziert werden. Es handelte sich um eine bereits bekannte heterozygote Mutation, c.718G>A (p.G240R) sowie eine zweite, bislang nicht beschriebene heterozygote Mutation, c.1127T>C (p.P376L). Weitere Untersuchungen machten eine Krankheitsursächlichkeit der zweitgenannte Mutation wahrscheinlich.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Identifizierung von krankheitsrelevanten Genen über den Kandidatengenansatz erfolgreich eingesetzt werden kann.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

APS.....	Ammoniumpersulfat
Bp.....	Basenpaare
cGMP.....	zyklisches Guanosinmonophosphat
ddNTP.....	Didesoxynukleosidtriphosphate
dH <sub>2</sub> O.....	destilliertes Wasser
DNA.....	Desoxyribonucleic acid
dNTP.....	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA.....	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
GTP.....	Guanosintriphosphat
HPLC.....	High Performance Liquid Chromatography
H <sub>2</sub> O.....	Wasser
Kb.....	Kilobasen
Lsg.....	Lösung
M.....	molar
ml.....	Milliliter
mM.....	Millimol
NCBI.....	National Center for Biotechnology Information
NTP.....	Nukleosidtriphosphat
ORF.....	Open Reading Frame
PAA.....	Polyacrylamid
PCR.....	Polymerase-chain-reaction
Rpm.....	revolutions per minute; Umdrehung pro Minute
TBE.....	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED...	Tetramethylethylendiamin
TRKA.....	Tyrosinkinase A Rezeptor
U.....	Units
UV.....	ultraviolett
µl.....	Mikroliter

## 7 Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> Kornak U, Delling G, Mundlos S: Molekulare Mechanismen der Regulation der Knochendichte durch Osteoklasten 2003. Deutsches Ärzteblatt, Jg.100, Heft 19.
- <sup>2</sup> Fasth A, Porras O. Human Malignant Osteopetrosis: Pathophysiology, Management and the Role of Bone marrow Transplantation. *Pediatr. Transplant*1999; Suppl 1:102-7.
- <sup>3</sup> Schulz A., Classen C. F: Infantile maligne Osteopetrose; Deutsches Ärzteblatt, Jg.100, Heft 21, Mai 2003.
- <sup>4</sup> Sly W.S., Hewett-Emmett D, Whyte MP, Yu YS, Tashian RE: Carbonic anhydrase II Deficiency identified as the Primary Defect in the Autosomal Recessive Syndrome of Osteopetrosis with Renal Tubular Acidosis and Cerebral Calcification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983; 80: 2752–2756.
- <sup>5</sup> Bollerslev J., Mosekilde L.: Autosomal Dominant Osteopetrosis. *Clin. Orthop.* 1993; 294: 45–51.
- <sup>6</sup> Bollerslev J. and Andersen P.E., Jr. (1988) Radiological, Biochemical and Hereditary Evidence of Two Types of Autosomal Dominant Osteopetrosis. *Bone*, 91, 7–13.
- <sup>7</sup> Albers-Schönberg, H.E. (1904). Röntgenbilder einer seltenen Knochenkrankung. *Munch. Med. Wochenschr.*, 51, 365–368.
- <sup>8</sup> Bollerslev J. (1987) Osteopetrosis. A Genetic and Epidemiological Study. *Clin. Genet.*, 31, 86–90.
- <sup>9</sup> Teitelbaum S.L.: Bone Resorption by Osteoclasts. *Science* 2000; 289: 1504–1508.
- <sup>10</sup> Kimble R.B., Srivastava S., Ross F.P., Matayoshi A., Pacifici R.: Estrogen Deficiency Increases the Ability of Stromal Cells to support Murine Osteoclastogenesis via an Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor- Mediated Stimulation of Macrophage Colony-stimulating Factor Production. *J Biol. Chem.* 1996; 271: 28890–28897.
- <sup>11</sup> Russell G., Mueller G., Shipman C., Croucher P.: Clinical Disorders of Bone Resorption. *Novartis Found Symp.* 2001; 232: 251–267.
- <sup>12</sup> Lazner F., Gowen M., Pavasovic D., Kola I.: Osteopetrosis and Osteoporosis: Two Sides of the Same Coin. *Hum. Mol. Genet.* 1999; 8: 1839–1846.
- <sup>13</sup> Duong L.T., Lakkakorpi P.. Integrins and Signalling in Osteoclast Function. *Matrix Biol.* 2000; 19:97-105.
- <sup>14</sup> Miyauchi A., Alvarez J.. Recognition of Osteopontin and Related Peptides by an Alpha v. Beta 3 Integrin stimulates immediate Cell Signals in Osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 1991; 266:20369-74.
- <sup>15</sup> Teitelbaum S.L.: Bone Resorption by Osteoclasts. *Science* 2000; 289: 1504–1508.
- <sup>16</sup> Silver I.A., Murrilis R.J.. Mikroelektrode Studies on the Acid Microenvironment beneath adherent Macrophages and Osteoclasts. *Exp. Cell Res.* 1988; 175:266-76.
- <sup>17</sup> Schlesinger P.H., Blair H.C.. Characterization of the Osteoclast ruffled border Chloride Channel and its Role in Bone Resorption. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:18636-43.
- <sup>18</sup> Blair H.C.. How the Osteoclast degrades Bone. *Bioessays* 1998; 20:837-46.
- <sup>19</sup> Salo J., Lehenkari P.. Removal of Osteoclast Bone Resorption Products by Transcytosis. *Science* 1997; 276:270-03.
- <sup>20</sup> Nesbitt S.A., Horton M.A.. Trafficking of Matrix Collagens through Bone-resorbing Osteoclasts. *Science* 1997; 276:266-9.
- <sup>21</sup> Kaija H., Alatalo S.L.. Phosphatase and Oxygen radical-generating Activities of Mammalian purple Acid Phosphatase are functionally independent. *Biochem. Biophys. Commun.* 2002; 292:128-32.
- <sup>22</sup> Guibaud P., Larbre, F., (1972) *arch. Fr. Pediatr.* 29, 269-286.
- <sup>23</sup> Sly W.S., Lang R., (1972) *Am. J. Hum. Genet.* 24,34 (abstr.).
- <sup>24</sup> Vainsel M., Fondu P., Cadranel S., C. & Gepts W., (1972) *Acta Paediatr. Scand.* 61,429-434.
- <sup>25</sup> Ohlsson A., Stark G. & Sakati N. (1980) *Dev. Med. Child Neurol.* 22,72-96.
- <sup>26</sup> Venta P.J., Welty R.J.. (1991) Carbonic anhydrase 2 Deficiency in a Belgian Family is caused by a Point Mutation at an invariant Histidin Residue (107 His->Tyr): Complete Structure of the normal Human CA2 Gene. *Am. J. Hum. Genet.* 49:1082-1090.
- <sup>27</sup> Roth D.E., Venta P.J.. (1992) Molecular basis of human Carbonic anhydrase Deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1804-1808.
- <sup>28</sup> Hu P.Y., Roth D.E., Skaggs L.A.. (1992) A Splice junction Mutation in Intron 2 of the Carbonic Anhydrase Gene of Osteopetrosis Patients of Arabic Countries. *Hum. Mutat.* 1:288-292.
- <sup>29</sup> Soda H., Yukizane S., Yoshida I. (1995). Carbonic anhydrase II Deficiency in a Japanese Patient

- produced by a Nonsense Mutation (TAT-->TAG) at Tyr-40 in Exon 2, (Y40X). *Hum. Mutat.* 5:348-350.
- <sup>30</sup> Soda H., Yukizane S., Yoshida I. . (1996). A Point Mutation in Exon 3 (His 107-->Tyr) in two unrelated Japanese Patients with Carbonic anhydrase II Deficiency with Central Nervous System involvement. *Hum. Genet.* 97:435-437.
- <sup>31</sup> Hu P.Y., Lim E.J., Ciccolella J.. (1997). Seven novel Mutations in Carbonic anhydrase II Deficiency Syndrome identified by SSCP and direct Sequencing Analysis. *Hum. Mutat.* 9:383-387.
- <sup>32</sup> Gul N., Shah I., Giuseppe Bonapace I., Peiyi Y. (2004). Carbonic Anhydrase II Deficiency Syndrome (Osteopetrosis with Renal Tubular Acidosis and Brain Calcification): Novel Mutations in CA2 Identified by Direct Sequencing Expand the Opportunity for Genotype-Phenotype Correlation: Mutation in Brief 737 (2004) Online.
- <sup>33</sup> Blair H.C., Teitelbaum S.L., Ghiselli R.: Osteoclastic Bone Resorption by a polarized Vacuolar Proton Pump. *Science* 1989; 245: 855-857.
- <sup>34</sup> Forgac M.: Structure, Function and Regulation of the Vacuolar (H<sup>+</sup>)ATPases. *FEBS. Lett.* 1998; 440: 258-263.
- <sup>35</sup> Li Y.P., Chen W., Stashenko P.: Molecular Cloning and Characterization of a Putative Novel Human Osteoclast-Specific 116-kDa Vacuolar Proton Pump subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 218: 813-821.
- <sup>36</sup> Li Y.P., Chen W., Liang Y., Li E., Stashenko P.: Atp6i-Deficient Mice exhibit severe Osteopetrosis due to Loss of Osteoclast-mediated Extracellular Acidification. *Nat. Genet.* 1999; 23: 447-451.
- <sup>37</sup> Heaney C., Shalev H., Elbedour K. et al.: Human Autosomal Recessive Osteopetrosis Maps to 11q13, a Position predicted by Comparative Mapping of the Murine Osteosclerosis (oc) Mutation. *Hum. Mol. Genet.* 1998; 7: 1407-1410.
- <sup>38</sup> Frattini A., Orchard P.J., Sobacchi C. et al.: Defects in TCIRG1 Subunit of the Vacuolar Proton Pump are responsible for a Subset of Human Autosomal Recessive Osteopetrosis. *Nat. Genet.* 2000; 25: 343-346.
- <sup>39</sup> Kornak U., Schulz A., Friedrich W. et al.: Mutations in the  $\alpha 3$  Subunit of the Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase cause Infantile Malignant Osteopetrosis. *Hum. Mol. Genet.* 2000; 9: 2059-2063.
- <sup>40</sup> Kornak U., Kasper D., Bosl M.R. et al.: Loss of the ClC-7 Chloride Channel leads to Osteopetrosis in Mice and Man. *Cell* 2001; 104: 205-215.
- <sup>41</sup> Jentsch T.J., Friedrich T., Schriever A., Yamada H.: The CLC Chloride Channel Family. *Pflugers Arch* 1999; 437: 783-795.
- <sup>42</sup> Cleiren E., Benichou O., Van Hul E. et al.: Albers-Schonberg Disease (Autosomal Dominant Osteopetrosis, Type II) results from Mutations in the ClCN7 Chloride Channel Gene. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10: 2861-2867.
- <sup>43</sup> Kornak U., Delling G., Mundlos S.: Molekulare Mechanismen der Regulation der Knochendichte durch Osteoklasten 2003. *Deutsches Ärzteblatt*, Jg.100, Heft 19.
- <sup>44</sup> Chalhoub N.; Benachou N.; Rajapurohitam V.; Pata M.; Ferron M.; Frattini A.; Villa A.; Vacher J.: Grey-lethal Mutation induces Severe Malignant Autosomal recessive Osteopetrosis in Mouse and Human. *Nature Med.* 9: 399-406, 2003.
- <sup>45</sup> Lange P. F.; Wartosch L.; Jentsch T. J.; Fuhrmann J. C.: ClC-7 requires Ostm1 as a Beta-Subunit to support Bone Resorption and Lysosomal Function. *Nature* 440: 220-223, 2006.
- <sup>46</sup> Ramirez A.; Faupel, J.; Goebel, I.; Stiller, A.; Beyer, S.; Stockle, C : Identification of a novel Mutation in the coding region of the grey-lethal gene OSTM1 in Human Malignant infantile Osteopetrosis. *Hum. Mutat.* 23: 471-476, 2004.
- <sup>47</sup> Pangrazio A.; Poliani P. L.; Megarbane A.; Lefranc : Mutations in OSTM1 (grey lethal) define a particularly severe form of autosomal recessive Osteopetrosis with neural involvement. *J. Bone Miner. Res.* 21: 1098-1105, 2006.
- <sup>48</sup> Toyomura T., Murata Y., Oka T., Yamamoto A., Sun-Wada G. H., Wada Y., and Futai M. (in press). *J. Biol. Chem.*
- <sup>49</sup> Beyenbach.K; Wieczorek.H; The V-type H<sup>+</sup>ATPase: molecular structure and Funktion, physiological roles and regulation. *The Journal of Experimental Biology* 209, 577-589.
- <sup>50</sup> Lara R. Gawenis, Clara Ledoussal et al. Mice with a targeted Disruption of the AE2 Exchanger are Achlorhydric. *J. Biol. Chem.* Vol 279, Issue 29, 30531-30539, July 16, 2004.
- <sup>51</sup> Etienne-Manneville S, Hall A: Rho-GTPases in cell biology. *Nature* 420: 629-635, 2002.

- <sup>52</sup> I. Gu, Byrne MC., Paronavitana NC., Aronow B., Siefiring JE., D'Souza M., Horton HF., Quilliam LA., Williams DA.: Rac2, a Hematopoiesisspecific Rho GTPase, specifically regulates mast cell Protease Gene Expression in Bone marrow-derived mast cells. *Mol Cell Biol* 22:7645-7657, 2002.
- <sup>53</sup> Razzouk S., Lieberherr M., Cournot G.: Rac-GTPase, Osteoclast Cytoskeleton and Bone Resorption. *Eur J Cell Biol* 78: 249–255, 1999.
- <sup>54</sup> Yongqiang Wang, Dina Lebowitz: Identifying the Relative Contributions of Rac1 and Rac2 to Osteoclastogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research* February 2008:23:260-270.
- <sup>55</sup> Nathan J., Pavlos, Jiake Xu: Rab3D Regulates a Novel Vesicular Trafficking Pathway That Is Required for Osteoclastic Bone Resorption molecular and cellular biology, June 2005, p. 5253–5269.
- <sup>56</sup> McHugh K.P., K. Hodivala-Dilke, 2000.: Mice lacking 3 Integrins are Osteosclerotic because of Dysfunctional Osteoclasts. *J. Clin. Invest.* 105:433–440.
- <sup>57</sup> Faccio R., Novack DV., Zallone A.: Dynamic changes in the Osteoclast Cytoskeleton in response to Growth Factors and Cell Attachment are controlled by  $\beta$ 3 Integrin. *J Cell Biol* 162: 499–509, 2003.
- <sup>58</sup> Naito A., SAzuma S., Tanaka T., Miyazaki S., Takaki, K., Takatsu, K., Nakao, K., Nakamura M., Katsuki T. 1999. Severe Osteopetrosis, Defective Interleukin-1 Signalling and Lymphnode Organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes Cells.* 4:353–362.
- <sup>59</sup> Lomaga M.A., W.C. Yeh, I. Sarosi, G.S. Duncan, C. Furlonger, A. Ho, S. Morony, C. Capparelli, G. Van, Kaufman, et al. 1999: TRAF6 Deficiency results in Osteopetrosis and defective Interleukin-1, CD40, and LPS Signaling. *Genes Dev.* 13:1015–1024.
- <sup>60</sup> Kobayashi T., P.T. Walsh M.C., Walsh K.M., Speirs E., Chiffolleau C., G. King, W.W. Hancock, J.H. Caamano, C.A. Hunter, P. Scott et al. 2003. TRAF6 is a critical factor for dendritic cell maturation and development. *Immunity.* 19:353–363.
- <sup>61</sup> Soriano P., C. Montgomery, R. Geske, and A. Bradley. 1991a. Targeted Disruption of the c-src Proto-Oncogene leads to Osteopetrosis in Mice. *Cell.* 64:693–702.
- <sup>62</sup> Boyce B.F., T. Yoneda, C. Lowe, P. Soriano, and G.R. Mundy.: 1992. Requirement of pp60c-src Expression for Osteoclasts to form ruffled borders and resorb Bone in Mice. *J. Clin. Invest.* 90: 1622–1627.
- <sup>63</sup> Horne W.C., L. Neff, D. Chatterjee, A. Lomri, J.B. Levy, and R. Baron. 1992. Osteoclasts express high levels of pp60c-src in Association with Intracellular Membranes. *J. Cell Biol.* 119:1003–1013.
- <sup>64</sup> Lowe, C., T. Yoneda, B.F. Boyce, H. Chen, G.R. Mundy and P. Soriano. 1993. Osteopetrosis in Src-deficient Mice is due to an autonomous defect of Osteoclasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 4485–4489.
- <sup>65</sup> Mary J. Bossard , Thaddeus A. Tomaszek: Proteolytic Activity of Human Osteoclast Cathepsin K Expression, Purification, Activation and Substrate Identification Volume 271, Number 21, Issue of May 24, 1996 pp. 12517-12524 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
- <sup>66</sup> Fred H. Drake, Robert A. Dodds: Cathepsin K, but Not Cathepsins B, L, or S, Is Abundantly Expressed in Human Osteoclasts. Volume 271, Number 21, Issue of May 24, 1996 pp. 12511-12516.
- <sup>67</sup> Xia L., Kilb J.: Localization of Rat Cathepsin K in Osteoclasts and Resorption Pits: Inhibition of Bone Resorption and Cathepsin K-Activity by Peptidyl Vinyl Sulfones; *Biological Chemistry* 380(6): Seiten 679–687.
- <sup>68</sup> Maxine Gowen, Francesca Lazner: Cathepsin K Knockout Mice Develop Osteopetrosis Due to a Deficit in Matrix Degradation but not Demineralization. *Journal of Bone and Mineral Research* October 1999:14:1654-1663 (doi: 10.1359/jbmr.1999.14.10.1654).
- <sup>69</sup> Saftig P., Hunziker E.: Impaired Osteoclastic Bone Resorption leads to Osteopetrosis in Cathepsin-K-deficient Mice.
- <sup>70</sup> A.E. Grigoriadis, Z.Q. Wang.: c-Fos: A Key Regulator of Osteoclast-Macrophage lineage Determination and Bone Remodeling. *Science* 21 October 1994: Vol. 266. no. 5184, pp. 443 – 448 DOI: 10.1126/science.7939685.
- <sup>71</sup> Hentunen T.A., Jackson S.H.: 1999 Characterization of Immortalized Osteoclast Precursors developed from Mice Transgenic for both bcl-X(L) and Simian Virus 40 large T Antigen. *Endocrinology* 140: 2954–2961

- <sup>72</sup> Dallas S.L., Rosser J.L., 2002 Proteolysis of latent Transforming Growth Factor-Beta (TGF-)-Binding Protein-1 by Osteoclasts. A cellular Mechanism for Release of TGF- from Bone Matrix. *J Biol Chem* 277:21352–21360
- <sup>73</sup> Stanley E.R., CSF-1. In: Oppenheim J.J., Feldmann M., eds.: *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defence*. London, United Kingdom: Academic Press; 2000: 911-934.
- <sup>74</sup> Wieslaw Wiktor Jedrzejczak, Anna Bartocclt.: Total Absence of Colony-Stimulating Factor 1 in the Macrophage-Deficient Osteopetrotic (op/op) Mouse Proc.. *Nad. Acad. Sci. USA* Vol. 87, pp. 4828-4832, June 1990 *Medical Science*.
- <sup>75</sup> Hartgers F.C., J.L. Vissers, M.W. Looman, C. van Zoelen, C. Hufine, C.G. Figdor and G.J. Adema.: 2000. DC-STAMP a novel Multimembrane-Spanning Molecule Preferentially expressed by Dendritic Cells. *Eur. J. Immunol.* 30:3585–3590. August 1, 2005 *EM VOL.* 202, August 1, 2005 351 f.
- <sup>76</sup> Staeger H., A. Brauchlin G. Schoedon and A. Schaffner.: 2001. Two novel Genes FIND and LIND differentially expressed in deactivated and Listeria-infected Human Macrophages. *Immunogenetics*. 53:105–113.
- <sup>77</sup> Kukita T., N. Wada, A. Kukita, T. Kakimoto, F. Sandra, K. Toh, K. Nagata, T. Iijima, M. Horiuchi, H. Matsusaki et al. 2004: RANKL-induced DC-STAMP is essential for Osteoclastogenesis. *J. Exp. Med.* 200:941–946.
- <sup>78</sup> Mitsuru Yagi, Takeshi Miyamoto: DC-STAMP is essential for Cell–Cell Fusion in Osteoclasts and Foreign Body giant Cells *JEM* © The Rockefeller University Press Vol. 202, No. 3, August 1, 2005 345–351.
- <sup>79</sup> Nacksung Kim, Masamichi Takami: A Novel Member of the Leukocyte Receptor Complex Regulates Osteoclast Differentiation. *J. Exp. Med.* The Rockefeller University Press • 0022-1007/2002/01/201/09 Volume 195, Number 2, January 21, 2002 201–209.
- <sup>80</sup> Teiji Wada, Tomoki Nakashima: The Molecular Scaffold Gab2 is a Crucial Component of RANK Signaling and Osteoclastogenesis. Volume 11 | Number 4 | April 2005 *Nature Medicine*.
- <sup>81</sup> Matilda H, C. Sheng, Jon E. Wergedal: Osteoactivin is a novel Osteoclastic Protein and plays a Key Role in Osteoclast Differentiation and Activity. *FEBS Letters* 582 (2008) 1451–1458.
- <sup>82</sup> R.Faccio, S. Teitelbaum; VAV3 regulate Osteoclast Function and Bone mass. *Nature Medicine* Volume 11, Number 3, March 2005.
- <sup>83</sup> H. Gupta; H. Tenenhouse: Identification of the Type II Na<sub>+</sub>-Pi Cotransporter (Npt2) in the Osteoclast and the Skeletal Phenotype of Npt2<sup>-/-</sup> Mice; *Bone* 29, Volume 5:467– 476; Nov 2001.
- <sup>84</sup> Eberle J., Schmidmayer S., Erben R.G., Stangassinger M., Roth H.P. 1999 Skeletal Effects of Zinc Deficiency in growing Rats. *J Trace Elem Med Biol* 13:21–26.
- <sup>85</sup> Nishi Y. 1996 Zinc and Growth. *J. Am Coll. Nutr.* 15:340–344.
- <sup>86</sup> Khadeer M.A., Sahu S.N., Bai G., Abdulla S., Gupta A.: 2005 Expression of the Zinc Transporter ZIP1 in Osteoclasts. *Bone* 37:296–304.
- <sup>87</sup> Bates E.E., Fournier N., Garcia E., Valladeao J., Durand I., Pin J.J. et al.: APCs express DCIR, a Novel C-type Lectin Surface Receptor Containing an Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory motif. *J Immunol* 1999;163:1973– 83.
- <sup>88</sup> McKusick V.A.: Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD), 2002.
- <sup>89</sup> K. Skubitz, E. Cheng: Gene Expression in Giant cell Tumors; *J Lab Clin Med* 2004.
- <sup>90</sup> J. Rho; C. Altmann; Gene Expression Profiling of Osteoclast Differentiation by Combined Suppression Subtractive Hybridization (SSH) and cDNA Microarray Analysis; *DNA and Cell Biology* Volume 21, Number 8, 2002.
- <sup>91</sup> M. Kato, M.S. Patel, R. Lévassieur et al. Cbfa1-Independent Decrease in Osteoblast Proliferation, Osteopenia and Persistent Embryonic Eye Vascularization in Mice Deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* 157 (2002), pp. 303–314.
- <sup>92</sup> Gong M., Vikkula L., Boon et al.: Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome, a Disorder affecting Skeletal Strength and Vision, is assigned to Chromosome Region 11q12–13. *Am J Hum Genet* 59 (1996), pp. 146–151.

- <sup>93</sup> Liesbeth Van Wesenbeck, Emy Cleiren et al.: Six Novel Missense Mutations in the LDL Receptor Related Protein 5 (LRP5), Gene in different Conditions with an increased Bone Density. *AJHG*, Volume 72 Issue 3, March 2003, Pages 763-771.
- <sup>94</sup> Greep R.O.: 1941. An Hereditary Absence of the Incisors Teeth. *J. Hered.* 32:397-398.
- <sup>95</sup> Reinholt F.P. et al. 1999.: Extensive clear zone and Defective Ruffled Border Formation in Osteoclasts of Osteopetrosis (ia/ia) rats: Implication for Secretory Functions. *Am. J. Anat.* 151:119-129.
- <sup>96</sup> Van Wesenbeck L., Odgren P.R.: 2004. Lokalisation of the Gene causing the Osteopetrotic Phenotype in the Incisors Absent(ia) Rat on Chromosome 10q32.1. *J. Bone Miner. Res.* 19:183-189.
- <sup>97</sup> Van Wesenbeck L., Odgren P.: 2007. Involvement of PLEKHM1 in Osteoclastic Vesicular Transport and Osteopetrosis in Incisors Absent Rats and Humans. *J. Clin. Invest.* 117:919-930 (2007).
- <sup>98</sup> Coxon F.P. and Rogers M.J.: 2003. The Role of Prenylated small GTP-binding Proteins in the Regulation of Osteoclast Function. *Calcif. Tissue Int.* 72:80-84.
- <sup>99</sup> Kong Y., Y. et al: OPGL is a Key Regulator of Osteoclastogenesis, Lymphocyte Development and Lymphnode Organogenesis. *Nature* 397, 315-323 (1999).
- <sup>100</sup> Hughes A.E. et al. (2000) Mutations in TNFRSF11A, Affecting the Signal Peptide of RANK, cause expansile Osteolysis. *Nat. Genet.* 24, 45-48.
- <sup>101</sup> Whyte M.P. and Hughes A.E. (2002). Expansile Skeletal Hyperphosphatasia is caused by a 15-Base pair Tandem Duplication in TNFRSF11A encoding RANK and is Allelic to Familial Expansile osteolysis. *J. Bone Miner. Res.* 17, 26-29.
- <sup>102</sup> Nakatsuka K., Nishizawa Y. (2003). Phenotypic Characterization of Early onset Pagets Disease of Bone caused by a 27-bp Duplication in the TNFRSF11A Gene. *J. Bone Miner. Res.* 18, 1381-1385.
- <sup>103</sup> Dougall W.C. et al. RANK is essential for Osteoclast and Lymphnode development. *Genes Dev.* 13, 2412-2414
- <sup>104</sup> Kim N. et al. Diverse Roles of the Tumor Necrosis Family Member TRANCE in Skeletal Physiology revealed by TRANCE Deficiency and partial Rescue by a Lymphocyte-expressed TRANCE transgene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10905-10910.
- <sup>105</sup> Kim D. et al. (2000). Regulation of Peripheral Lymphnode Genesis by the Tumor Necrosis Factor Family Member TRANCE. *J. Exp. Med.* 192, 1467-1478.
- <sup>106</sup> Guerrini M.M., Sobacchi C.: (2008) Human Osteoclast-Poor Osteopetrosis with Hypogammaglobulinemia due to TNFRSF11A (RANK) Mutations. *The American journal of Human Genetics* 83, 64-76, July 2008.
- <sup>107</sup> Sobacchi C. et al, Volume 39, Number 8, August 2007 *Nature Genetics*.
- <sup>108</sup> Mizuno A. et al. *J. Bone Miner. Metab.* 20, 337-344 (2002).
- <sup>109</sup> Kostenuik P.J.: *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 618-625 (2005).

## **8 Danksagung**

Recht herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Andreas Gal für die freundliche Aufnahme an sein Institut, für die große Hilfsbereitschaft und die fortwährende Unterstützung bedanken.

Für die Überlassung des Themas und intensive Betreuung möchte ich Herrn PD Dr. Hübner danken.

Danke auch an allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, ganz besonders an die Mitglieder meiner Arbeitsgruppe und Frau Désirée Hecking, die mit großer Hilfsbereitschaft und einem hervorragenden Arbeitsklima dafür gesorgt haben, dass mir die Arbeit viel Freude bereitet hat.

Frau Jana Schroth und Herrn Christopher Hennings danke ich für die geduldige Einführung in die verschiedenen Arbeitstechniken und die vielen hilfreichen Ratschläge.

Frau Marion Finck danke ich herzlich für die Durchsicht meiner Arbeit.

Besonderer Dank gilt meinem Mann Sebastian Finck und meiner Familie die mich immer unterstützt haben und mir von großer Bedeutung sind.

Großer Dank gebührt meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Ingo Kurth, dessen Engagiertheit, Geduld und ständige Diskussionsbereitschaft entscheidend zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Vielen Dank für die wertvolle Betreuung und die Korrektur dieser Arbeit.

## **10 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.