

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Osteologie und Biomechanik

Prof. Dr. med. Michael Amling

**POTENTIAL ALIMENTÄRER BEEINFLUSSBARKEIT DER AKTIVITÄT DER
ALKALISCHEN PHOSPHATASE BEI HYPOPHOSPHATASIE-ASSOZIIERTEN
MUTATIONEN IM *ALPL*-GEN**

Dissertation

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

vorgelegt von:

Philip Wiedemann
aus Marktoberdorf

Hamburg 2023

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 26.06.2024**

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

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:
Prof. Dr. Florian Grahammer**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:
PD Dr. Timur Alexander Yorgan**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hypophosphatasie	1
1.2	Alkalische Phosphatase	4
1.3	Zielsetzung	7
2	Material und Methoden	10
2.1	Material	10
2.1.1	Geräte	10
2.1.2	Verbrauchsmaterial	12
2.1.3	Reaktionssätze	13
2.1.4	Chemische Substanzen	14
2.1.4.1	Chemikalien	14
2.1.4.2	Fertiglösungen und Pulver	16
2.1.4.3	Enzyme	17
2.1.5	Kultivierte Zellen	17
2.1.6	Puffer, Lösungen, Medien, Gele	18
2.1.7	Oligonukleotidprimer	21
2.1.7.1	Mutageneseprimer	21
2.1.7.2	Genotypisierungsprimer	22
2.1.7.3	Sequenzierungsprimer	22
2.1.7.4	TaqMan®-Sonden	22
2.1.8	PCR-Bedingungen	22
2.1.8.1	PCR-Programme	22
2.1.8.2	PCR-Reaktionsansätze	24
2.1.9	Software	25
2.2	Methoden	26
2.2.1	Erfassung der AP-Enzymaktivität in vitro	26

2.2.1.1	Mutagenese.....	27
2.2.1.2	Transformation	28
2.2.1.3	Plasmidaufreinigung.....	29
2.2.1.4	Zellkultur.....	31
2.2.1.5	AP-Aktivitätsassay mit pNPP als Substrat.....	32
2.2.1.6	qRT-PCR.....	33
2.2.2	Tierversuche	34
2.2.2.1	Genotypisierung	35
2.2.2.2	Präparation der Versuchstiere.....	37
2.2.2.3	Radiographische Untersuchungen	38
2.2.2.4	Histologie.....	41
2.2.2.5	Histomorphometrie	42
2.2.3	Statistische Auswertung und Ergebnisdarstellung	42
3	Ergebnisse.....	44
3.1	Erfassung der AP-Enzymaktivität in vitro	44
3.1.1	Verhalten von pCMV6-ALPL und pCMV6-Entry.....	44
3.1.2	Nativaktivität.....	46
3.1.3	Aktivitätssteigerung durch MgCl ₂	48
3.1.4	Aktivitätsreduktion durch ZnCl ₂	52
3.1.5	Auswirkung von Strontiumranelat	55
3.1.6	Nicht responsive Mutationen.....	58
3.2	Tierexperimentelle Ergebnisse.....	60
4	Diskussion	68
5	Sicherheit und Entsorgung.....	75
5.1	H- und P-Sätze der eingesetzten Substanzen	76
5.2	Schlüssel für H-Sätze.....	78
5.3	Schlüssel für P-Sätze.....	79
6	Zusammenfassung / Abstract	81

7	Abkürzungsverzeichnis	83
8	Literaturverzeichnis.....	85
9	Abbildungsverzeichnis	95
10	Tabellenverzeichnis	98
11	Danksagung.....	100
12	Lebenslauf	102
13	Eidesstattliche Versicherung.....	103

1 Einleitung

1.1 Hypophosphatasie

Die Hypophosphatasie (HPP) stellt eine heterogene Gruppe von genetischen Erkrankungen des Phosphatstoffwechsels dar, deren gemeinsames Merkmal eine Mutation im für die gewebeunspezifische Alkalische Phosphatase (TNSALP, AP) kodierenden Gen *ALPL* ist und die häufig skelettale Dysplasien zur Folge hat. Tabelle 1 fasst relevante klassifikatorische Merkmale der Erkrankung zusammen.

Tabelle 1: Überblick über Merkmale der Hypophosphatasie

Synonyme	HPP
	HOPS
	Phosphoethanolaminurie
	Rathbun-Syndrom
OMIM-Nummer	146300, 241500, 241510
ICD-10	E83.3
ICD-11	5C64.3
Erbgang	Autosomal-dominant oder autosomal-rezessiv
Genlocus	1p36.12

Die Hypophosphatasie wurde anhand klinischer Merkmale lange Zeit in sechs Subgruppen unterteilt (Whyte 2016):

- perinatal tödlich (Hyperkalzämie und respiratorische Insuffizienz)
- pränatal benigne (Skelettmanifestationen mit potentieller Rückbildung)
- kindlich (Rachitis)
- HPP im Kindesalter (syn.: infantile HPP; Kontinuum von Mineralisationsstörung bis Rachitis)
- HPP im Erwachsenenalter (syn.: adulte HPP; früher Zahnausfall, Stressfrakturen)
- Odonto-HPP (isolierter Zahnbefall, früher Verlust der Milchzähne und/oder schwere Karies)

In neueren Veröffentlichungen zeichnet sich mehrheitlich eine Abkehr von dieser überwiegend altersbezogenen Klassifikation zu einer auf dem klinischen Schweregrad basierenden Dreiteilung in leichte, mittelschwere und schwere

Hypophosphatasie ab (Fenn et al. 2021). Prävalenzschätzungen variieren je nach Publikation. So kommt die schwere Form mit einer Häufigkeit von zwischen 1/100.000 und 1/300.000 vor (Fraser 1957; Mornet et al. 2011). Milde Verlaufsformen scheinen hingegen mit einer Prävalenz von 1/508 deutlich häufiger zu sein (Mornet et al. 2011). Damit wird die definitionsgemäße Höchstprävalenz für seltene Erkrankungen in der Europäischen Union deutlich überschritten (European Commission Directorate-General for Research and Innovation 2017). Aufgrund der unspezifischen Symptomatik erscheint es zudem nicht abwegig, dass ein relevanter Anteil mild Erkrankter nie formell diagnostiziert wird und die reale Prävalenz milder Hypophosphatasie somit noch höher ist (vgl. Schmidt et al. 2021).

Krankheitszeichen sind abhängig von der zugrunde liegenden Mutation hochgradig variabel und reichen von Totgeburt mit nahezu unkalzifiziertem Knochen bis zu klinisch inapparenten Verläufen (Mornet 2008). Insbesondere bei mittelschweren und milden Verläufen ist die Heterogenität der Symptome stark ausgeprägt. Betroffene Patientinnen und Patienten berichten über schlecht verheilende Frakturen, Verlust des Milch- sowie des bleibenden Gebisses, muskuloskeletale Schmerzen und Fehlhaltungen, Stressfrakturen der Metatarsalia oder Femora und zentralnervöser Beschwerden wie Migräne, Depression und Epilepsie (Jandl et al. 2021; Fenn et al. 2021).

Diagnostiziert wird die Erkrankung in Zusammenschau typischer anamnestischer Beschwerden und Befunden der körperlichen Untersuchung, radiologischer Bildgebung sowie relevanten laborchemischen Biomarkern (Bangura et al. 2020). Hochsuggestiv ist hier die laborchemische Kombination aus erniedrigter Alkalischer Phosphatase bei gleichzeitiger Erhöhung von Pyrophosphat (PPi), Pyridoxal-5'-phosphat (PLP) und Phosphatidylethanolamin (PEA) (Mornet 2008, vgl. Tabelle 2).

Einleitung

Tabelle 2: diagnostische Charakteristika der Hypophosphatasie (AP: Alkalische Phosphatase; PPI: Pyrophosphat; PLP: Pyridoxal-5'-phosphat; PEA: Phosphatidylethanolamin)

Anamnese	Frakturen, Zahnprobleme, muskuloskelettale Schmerzen, Familienanamnese
Körperliche Untersuchung	Zeichen der Rachitis
Radiographische Befunde	Mineralisationsstörungen, Rachitis-Zeichen, Knochen deformitäten, Achsabweichung der langen Röhrenknochen, epiphysäre Hypodensitäten, Osteophyten, Craniosynostosen, Frakturen und Pseudofrakturen
Laborbefunde	AP im Serum ↓ PPI im Serum ↑ PLP im Serum ↑ PEA im Serum ↑

Therapeutisch steht seit 2015 mit Asfotase alfa (Strensiq®, Alexion Pharma Germany GmbH) eine Enzymersatztherapie mit Zulassung für Patientinnen und Patienten mit Manifestation der Erkrankung im Kindes- und Jugendalter zur Verfügung. Diese rekombinante TNSALP konnte in der Zulassungsstudie bei schwer erkrankten Kindern den Gesundheitszustand signifikant verbessern und zeigte auch in der Langzeitanwendung gute Ergebnisse (Millán et al. 2008; Whyte et al. 2012; Whyte et al. 2016; Hofmann et al. 2019). Asfotase alfa konnte auch bei erwachsenen Patienten, deren HPP im Kindesalter aufgetreten war und die mit schwer heilenden Frakturen vorstellig wurden, erfolgreich eingesetzt werden (Stürznickel et al. 2021). Versuche einer vektorbasierten Gentherapie zur Reduktion der Nebenwirkungen und Steigerung der Lebensqualität der Betroffenen durch Elimination der regelmäßigen Injektionen befinden sich aktuell noch in der vorklinischen Phase (Kinoshita et al. 2021). Obwohl der Fortschritt der therapeutischen Optionen bei Hypophosphatasie insgesamt erfreulich ist stellt sich in Anbetracht der vergleichsweise hohen Prävalenz milder Formen, bei denen ebenfalls pathologische Frakturen, Skelettdeformitäten und muskuloskelettale Schmerzen auftreten und für welche die Enzymersatztherapie nicht zugelassen ist, die Frage nach Möglichkeiten, auch solchen Patientinnen und Patienten mit milder Krankheitsform Linderung zu verschaffen.

1.2 Alkalische Phosphatase

Im Zentrum der Pathogenese der Hypophosphatasie steht die Aktivität der gewebeunspezifischen Alkalischen Phosphatase¹ (TNSALP, EC 3.1.3.1, NM_000478), einem im Gegensatz zu den gewebespezifischen Alkalischen Phosphatasen (PLAP im Syncytiotrophoblasten, GCAP im Hoden und IAP in der intestinalen Mukosa) vorwiegend in Leber, Knochen und Nieren sowie dem sich entwickelnden Nervensystem exprimierten Enzym mit vielfältiger biologischer Wirkung (Millán 2006). Im Knochen wird die TNSALP primär von Osteoblasten exprimiert. Diese differenzieren aus mesenchymalen Stammzellen und sind im Rahmen der Knochenbildung verantwortlich für die Bildung von Osteoid, der kollagenösen und noch weichen Knochengrundsubstanz, und deren anschließender Mineralisation (Hadjidakis und Androulakis 2006). Mechanistisch wird für den Differenzierungsprozess neben einer Regulation des Phosphatangebots durch die direkte Wirkung der TNSALP eine Induktion des Transkriptionsfaktors RUNX2 diskutiert (Nakamura et al. 2020). Etwa 15 % der Osteoblasten differenzieren schließlich zu in die Knochenmatrix eingeschlossenen Osteozyten, welche wiederum aufgrund ihrer primären Funktion der Zell-Zell-Kommunikation signifikant weniger Alkalische Phosphatase exprimieren (Bonewald 2011). Im Gegensatz zu den knochenabbauenden Osteoklasten sind Osteoblasten für den Aufbau der Knochenmatrix verantwortlich. Hierzu können Osteoblasten zum einen den organischen Anteil der Knochenmatrix, der größtenteils aus Typ I Kollagenfasern besteht, synthetisieren und zum anderen die Mineralisation der organischen Matrix durch die Einlagerung von Calciumphosphat in Form von Hydroxyapatit-Kristallen regulieren. Hierzu können Osteoblasten Vesikel mit Mineralisationskeimen sezernieren und den Mineralisationsprozess durch Konditionierung der lokalen Umgebung begünstigen. Einer dieser Mechanismen basiert auf der Aktivität der TNSALP, die den Mineralisationsinhibitor Pyrophosphat spaltet und daraus einzelne Phosphat-Ionen generiert, wodurch lokal die Phosphatkonzentration weiter steigt und die Mineralisation begünstigt wird. Bei der TNSALP handelt es sich um ein obligates Homodimer mit je einem katalytischen Zentrum und drei metallbindenden Domänen (M1-3, vgl. Abbildung 1), welches über

¹ Im weiteren Textverlauf wird zur einfacheren Lesbarkeit, falls nicht anders vermerkt, mit Alkalischer Phosphatase stets die gewebeunspezifische Alkalische Phosphatase gemeint.

GPI-Anker an der Extrazellulärmembran haftet. Cofaktoren sind jeweils zwei Zink-Ionen sowie ein Magnesium-Ion, welche die Hydrolyse von Phosphateestern ermöglichen. Substitution anderer Kationen an die Zink-bindenden Domänen M1 und M2 reduzieren mit Ausnahme von Co^{2+} die katalytische Aktivität. M3 kann neben Mg^{2+} auch von Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} und Ca^{2+} allosterisch aktiviert werden (Hoylaerts et al. 2015). Eine vierte metallbindende Domäne M4 ist physiologisch mit Ca^{2+} besetzt und hat nur geringen Einfluss auf die Enzymaktivität (Hoylaerts et al. 2015). Hohe Kalziumkonzentrationen, beispielsweise in der Spätphase des Mineralisierungsvorgangs am Knochen, führen durch Verdrängung von Zn^{2+} von M1 und M2 zu einer Reduktion der katalytischen Leistung (Genge et al. 1988). Es konnte experimentell gezeigt werden, dass Zn^{2+} , Mg^{2+} und Sr^{2+} (in Form von Strontiumranelat) die Aktivität der Alkalischen Phosphatase steigern können (Fernández et al. 2014). Strontiumranelat hat darüber hinaus multifaktorielle Wirkung am Knochenstoffwechsel (Kołodziejaska et al. 2021; Llinas et al. 2006).

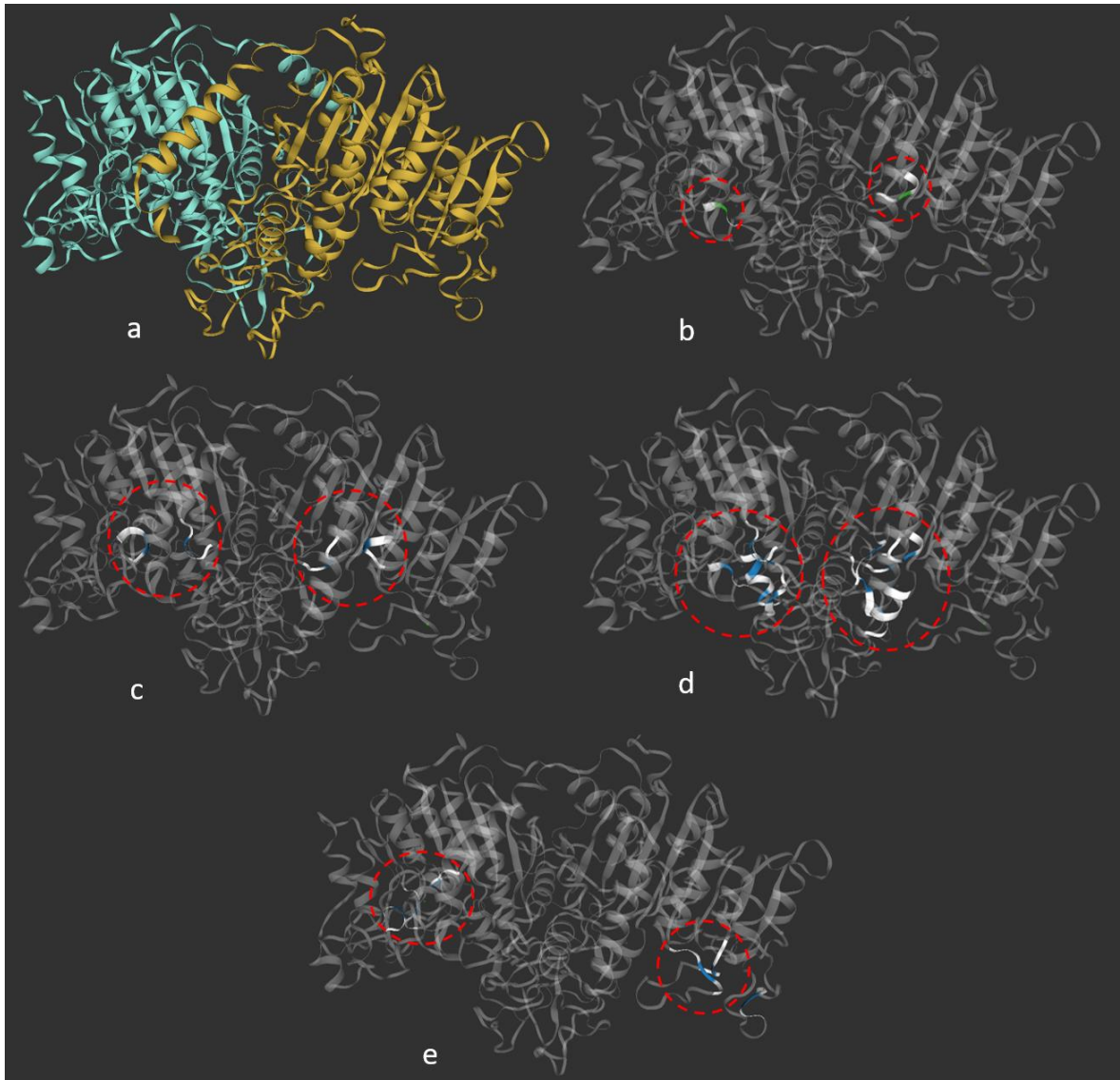


Abbildung 1: Quartärstruktur der gewebeunspezifischen Alkalischen Phosphatase im SWISS-Model, Repository Code P05186. a) Farbliche Kennzeichnung der Monomere. b) Hervorhebung des aktiven Zentrums (rote Markierung). c) Hervorhebung der Magnesium-Bindungsstellen (rote Markierung). d) Hervorhebung der Zink-Bindungsstellen (rote Markierung). e) Hervorhebung der Calcium-Bindungsstellen (rote Markierung).

Bildquelle: verändert nach <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P05186>, zuletzt abgerufen am 10.06.2023; Waterhouse et al. 2018

Die Alkalische Phosphatase zeichnet sich durch eine breite Substratspezifität aus, wobei die relevantesten physiologischen Substrate im menschlichen Körper anorganisches Phosphat (P_i), Pyridoxal-5'-phosphat (PLP) sowie Phosphatidylethanolamin (PEA) sind (Martland und Robison 1929; Eaton und Moss 1967; Fernley und Walker 1967). Anorganisches Pyrophosphat (PP_i) wird physiologisch von der Alkalischen Phosphatase in anorganisches Phosphat (P_i) gespalten, welches mit Calcium den anorganischen Teil der Knochenmatrix in Form

von Hydroxylapatit bildet (Orimo 2010; Vimalraj 2020). In hohen Konzentrationen, beispielsweise bei Funktionsminderung der Alkalischen Phosphatase, hat es hingegen eine inhibitorische Wirkung auf die Knochenmineralisation, indem es die Kristallstruktur unterbricht (Fleisch et al. 1966; Orriss et al. 2016).

1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, für bestimmte, im Patientenkollektiv des Instituts für Osteologie und Biomechanik des UKE nachgewiesene Hypophosphatasie-assoziierte Mutationen das Potential der Beeinflussbarkeit der enzymatischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase zu bestimmen. Dabei stand die Überlegung im Mittelpunkt, Patientinnen und Patienten mit milder Hypophosphatasie eine niedrigschwellige therapeutische Option anbieten zu können, mit deren Hilfe möglicherweise Krankheitszeichen reduziert und die Lebensqualität verbessert werden können. Beachtenswert ist hierbei, dass eine Vielzahl der nach aktueller Klassifikation leichtgradig Betroffenen einen relevanten symptombedingten Leidensdruck aufweist, welcher bis dato lediglich mit supportiven und rein symptomatischen Therapieversuchen adressiert wird (Lefever et al. 2020; Schmidt et al. 2017). Zu diesem Zweck wurde die Aktivität der Alkalischen Phosphatase bei Vorliegen definierter Mutationen (Tabelle 3) *in vitro* nativ und nach Zugabe der Additive Magnesium, Zink und Strontiumranelat gemessen.

Einleitung

Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten ALPL-Mutationen

ALPL-Mutation	Aminosäureaustausch	Klinische Form
c.119C>T	p.Ala40Val	perinatal, infantil
c.212G>A	p.Arg71His	perinatal, infantil, odonto
c.299C>T	p.Thr100Met	infantil, adult, perinatal
c.340G>A	p.Ala114Thr	infantile, adult
c.346G>T	p.Ala116Ser	adult
c.394G>A	p.Ala132Thr	adult, odonto
c.406C>T	p.Arg136Cys	adult, odonto
c.407G>A	p.Arg136His	infantil, odonto, adult
c.422C>A	p.Thr141Asn	infantil
c.500C>T	p.Thr167Met	infantil, adult
c.526G>A	p.Ala176Thr	infantil, perinatal, odonto, adult
c.535G>A	p.Ala179Thr	perinatal
c.542C>T	p.Ser181Leu	infantil, perinatal, odonto, adult
c.571G>A	p.Glu191Lys	infantil, perinatal, odonto, adult
c.661G>T	p.Gly221Arg	perinatal
c.738G>T	p.Arg246Ser	infantil
c.746G>T	p.Gly249Val	perinatal
c.976G>C	p.Gly326Arg	perinatal
c.1228T>C	p.Phe410Leu	infantil
c.1250A>G	p.Asn417Ser	perinatal, odonto, adult

Zusätzlich sollte ein Mausmodell zur Untersuchung möglicher Effekte *in vivo* etabliert werden. Als Mutation wurde hierfür c.571G>A gewählt. Dieser Entscheidung zugrunde lag die Beobachtung, dass bei den routinemäßig genetisch getesteten Patienten der Ambulanz des Instituts für Osteologie und Biomechanik des UKE diese Mutation eine vergleichsweise hohe Prävalenz aufweist (Jandl et al. 2021). Außerdem wurde die Tatsache berücksichtigt, dass compound heterozygote Patientinnen und Patienten einen schweren Krankheitsverlauf entwickeln und daher die Annahme bestand, dass homozygote Mäuse ebenfalls schwer erkranken würden. Zudem konnte in institutsinternen, bislang nicht veröffentlichten und nicht als Bestandteil dieser Arbeit durchgeführten Versuchen gezeigt werden, dass sie sowohl eine relevante Residualaktivität von 4,4 % verglichen mit der Aktivität der Wildtyp-AP, insbesondere aber eine Aktivitätssteigerung um das etwa 5,5-fache auf 24 % nach Zugabe von 1 mM MgCl₂ aufweist (s. Abbildung 2).

Einleitung

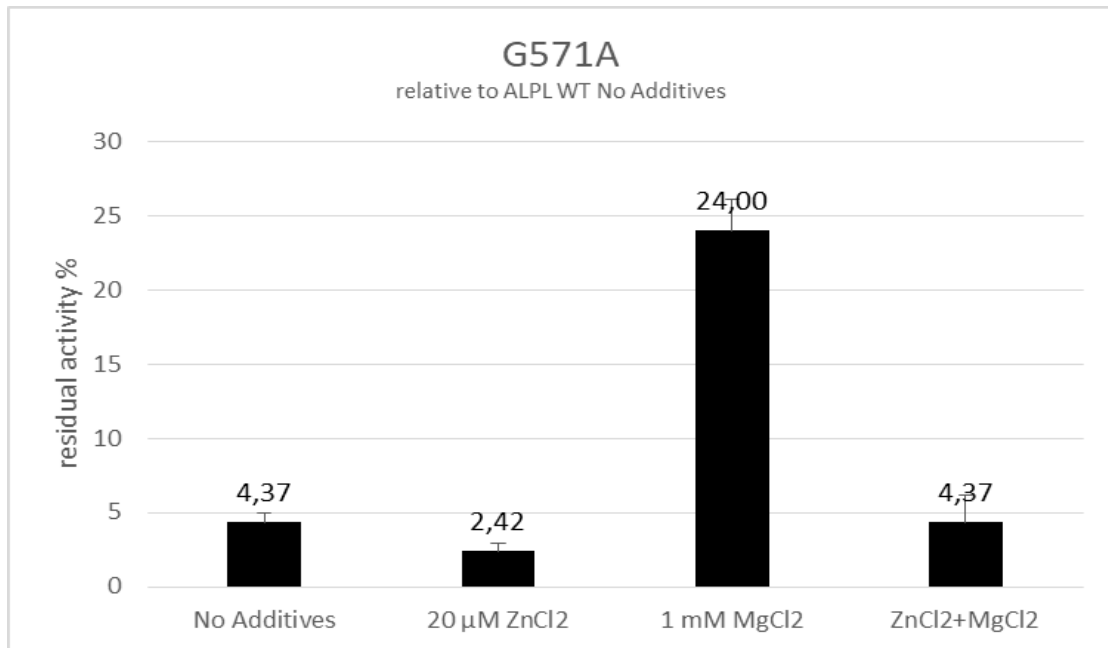


Abbildung 2: *in-vitro* Aktivitätsverhalten der AP bei Vorliegen der Mutation c.571G>A in Relation zur Wildtyp-AP nativ sowie nach Zugabe von 20 µM ZnCl₂, 1 mM MgCl₂ sowie beiden Additiven

Bildquelle: Tabea Neumann, Institut für Osteologie und Biomechanik 2020

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 4: im Rahmen dieser Arbeit verwendete Geräte und Ausrüstungsgegenstände

Bezeichnung	Hersteller	Funktion
1012	LAUDA-GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Lauda-Königshofen, Deutschland	Wasserbad
2050	Bavimed Laborgeräte GmbH, Birkenau, Deutschland	Gewebeinfiltrationsautomat
µCT 40	Scanco Medical AG, Wangen-Brüttisellen, Schweiz	Röntgen-Mikrocomputertomograph
50mm F2.8 Macro	Sigma Corporation, Kawasaki (Kanagawa), Japan	Objektiv
Axio Scope A.1	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland	Mikroskop
Axiocam	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland	Mikroskopkamera
Axioskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland	Mikroskop
BBD 6220	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland	CO ₂ -Inkubator
BBD 6220 CO ₂ Incubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA	CO ₂ -Inkubator
Beckman GS-6 Centrifuge	Beckman Coulter Inc., Brea, CA/USA	Zentrifuge
BX50	Olympus K.K., Shinjuku (Tokio), Japan	Mikroskop
Centrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland AG, Hamburg, Deutschland	Zentrifuge
Centrifuge 5425	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Zentrifuge
Centrifuge 5430 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Zentrifuge
Certomat MV	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland	Vortexer
CintiqPro24P	Wacom K.K., Kazo (Saitama), Japan	Stiftdisplay
CPA 2245	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland	Feinwaage
DPU-414	Seiko Instruments K.K., Ginza (Tokio), Japan	Thermodrucker
E-Box VX2	VILBER LOURMAT Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland	Geldokumentationsgerät
Emission Filter 460nm	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA	Fluoreszenzfilter
Emission Filter 538nm	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA	Fluoreszenzfilter
Emission Filter 590nm	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA	Fluoreszenzfilter
EOS 200D	Canon Inc., Ota (Tokio), Japan	Spiegelreflexkamera
Excitation Filter 355nm	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA	Fluoreszenzfilter
Excitation Filter 485nm	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA	Fluoreszenzfilter
Excitation Filter 530nm	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA	Fluoreszenzfilter
Fluoroscan Ascent	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA	Fluoreszenz-Platereader
FM-120DE	Hoshizaki Denki K.K., Toyoake (Aichi), Japan	Eisbereiter
HBO 50/AC	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland	Fluoreszenzlichtquelle
HERAsafe	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland	Sterilwerkbank
innova 4000 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Edison, NJ/USA	Inkubator
IX50	Olympus K.K., Shinjuku (Tokio), Japan	Mikroskop
Komet Variomag Mono	HP Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland	Magnetrührgerät

Material und Methoden

Tabelle 4 (fortgesetzt)

LX-60	Faxitron X-Ray LLC, Lincolnshire, IL/USA	digitales Röntgenkabinett
Mamoray EU cassette	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien	Röntgenfilmkassette
MasterCycler eppgradient S	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	PCR-Cycler
MasterCycler S	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	PCR-Cycler
Mini Centrifuge ROTILABO®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Zentrifuge
Model 1004 Hybridization Oven	Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR/USA	Ofen
Model 200/2.0 Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA/USA	Elektrophoresenetzeil
MSC-ADVANTAGE	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA	Sterilwerkbank
Multipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Serienpipette
NanoDrop® ND-1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA	Spektralphotometer
Optimax 1170-1-0000	Protec GmbH & Co. KG, Oberstenfeld, Deutschland	Filmentwickler
pH Meter pH538	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland	pH-Meter
Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz	Pipettierhilfe
Pipetman L P1000L, 100- 1000µl	Gilson Inc., Middleton, WI/USA	Pipette
Pipetman L P20L, 2-20µl	Gilson Inc., Middleton, WI/USA	Pipette
R-223	Sharp K.K., Osaka, Japan	Mikrowelle
RCT basic	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland	Magnetrührgerät
Reax tap	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland	Vortexer
Research 10µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Pipette
Research 100µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Pipette
Research 1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Pipette
Research 20µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Pipette
Research 200µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Pipette
Scanjet G4050	HP Inc., Palo Alto, CA/USA	Scanner
StepOnePlus Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Waltham, MA/USA	RT-qPCR-Cycler
TE 2101	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland	Waage
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Heizblock
Thermomixer comfort 1,5ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Heizblock
ThermoStat plus 1,5ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Heizblock
Ultra-Turrax T25	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland	Dispergiergerät
Ultrospec 2100 pro	Biochrom Ltd., Cambridge, UK	Spektralphotometer
U-RFL-T	Olympus K.K., Shinjuku (Tokio), Japan	Fluoreszenzlichtquelle
VersaMax tunable Microplate Reader	Molecular Devices LLC, San José, CA/USA	Microplate Reader
Wide Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA/USA	Gelelektrophorese-kammer
Xray Sterile	Faxitron X-Ray LLC, Lincolnshire, IL/USA	Röntgenkabinett

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 5: im Rahmen dieser Arbeit verwendetes Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller	Referenznummer	Funktion
100 Sterican® Gr. 16	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland	4657667	Spritzenkanüle
14ml PP Tube sterile	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich	187261	Rundbodenröhrchen
Belüftungsstopfen für Röhrchen 12mm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	65.722	Stopfen
Bemis™ Curwood Parafilm™ M Labor-Verpackungsfolie	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA	12613586	Verpackungsfolie
Biosphere® Filter Tips 10	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	70.760.210	Pipettenspitze
Biosphere® Filter Tips 100	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	70.760.212	Pipettenspitze
Biosphere® Filter Tips 1000	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	70.762.211	Pipettenspitze
Biosphere® Filter Tips 20	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	70.760.213	Pipettenspitze
Biosphere® Filter Tips 200	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	70.760.211	Pipettenspitze
Cell Scraper M	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	833.951	Zellschaber
Cellstar® Tubes 15ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich	188271-N	Reagiergefäß
Cellstar® Tubes 50ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich	227261	Reagiergefäß
Combitips® 5ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	30089456	Pipettenspitze
Combitips® advanced 25ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	30089685	Pipettenspitze
Dermatril® P	KCL GmbH, Eichenzell, Deutschland	743	Chemikalienschutzhandschuhe
ELISA-Platte, 96 Well, Flachboden, schwarz	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	821.581.220	ELISA-Platte
Inject®-F 1ml	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland	9166017V	Spritze
LABSOLUTE® Vernichtungsbeutel 2,5L	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland	7696994	Vernichtungsbeutel
Mamoray HDR-C Plus 18x24cm	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien	n/a	Röntgenfilm
Millex®-FG Vent Filter	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	SLFG05010	Ablufffilter
Nitra-Tex™ Micro-Touch	Ansell Ltd., Yarra City, Australien	700114	Einmalhandschuhe
Pasteurpipette Glas 230m	Anders+Redelfs GmbH, Weißenburg in Bayern, Deutschland	1100802	Pasteurpipette
PCR-8er-Kette Multiply-µStrip	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	77.991.992	Reagiergefäß
Reagiergefäß 1,5ml SafeSeal	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	72.706.400	Reagiergefäß
Reagiergefäß 2ml SafeSeal	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	72.695.400	Reagiergefäß

Material und Methoden

Tabelle 5 (fortgesetzt)

Röhre 50ml, 115x28mm, PP	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	62.559.001	Reagiergefäß
Röhre 5ml, 75x12mm, PS	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	55.476.005	Rundbodenröhrchen
Rotilabo®-Einbettkassetten, POM, grün	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	K116.1	Einbettkassette
SafeSeal Gefäß 5ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	72.701.400	Reagiergefäß
Sarstedt Serological Pipette 10ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	861.254.001	Serologische Pipette
Sarstedt Serological Pipette 25ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	861.685.001	Serologische Pipette
Sarstedt Serological Pipette 5ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	861.253.001	Serologische Pipette
Skalpellklinge Nr. 23	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland	323	Skalpellklinge
Syringe Filter 25mm, sterile	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland	7699822	Spritzenvorsatzfilter
TC-Platte 12 Well, Standard	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	833.921	Zellkulturplatte
TC-Schale 100, Standard	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	833.902	Zellkulturplatte
Tissue Culture Plate 96 Well	Corning Inc., Corning, NY/USA	353072	Zellkulturplatte
UVette® 220-1600nm	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	30.106.300	UV-Küvette
Wägeschalen, quadratisch, PS	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland	7696257	Wägeschale
Zählkammer nach Neubauer	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland	9161086	Zellzählkammer
Zellkulturflasche T-75	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	83.3911.02	Zellkulturflasche

2.1.3 Reaktionssätze

Tabelle 6: im Rahmen dieser Arbeit verwendete Reaktionssätze

Bezeichnung	Hersteller	Referenznummer	Funktion
EndoFree® Plasmid Maxi Kit 10	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande	12391	Plasmid-Aufreinigung
Lipofectamine® LTX & PLUS Reagent	Life Technologies, Carlsbad, CA/USA	15338-030	Transfektion
NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland	740.609.200	PCR-Produkt-Aufreinigung
NucleoSpin® RNA/Protein	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland	740.933.250	RNA-Aufreinigung
Phire Animal Tissue Direct PCR Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA	F140WH	Genotypisierung

Material und Methoden

Tabelle 6 (fortgesetzt)

Phosphatidylethanolamine Assay Kit (Fluorometric)	BioVision Inc., Milpitas, CA/USA	K499-100	Phosphatidylethanolaminnachweis
PhosphoWorks® Fluorometric Pyrophosphate Assay Kit *Enhanced Selectivity*	AAT Bioquest Inc., Sunnyvale, CA/USA	21614	Pyrophosphatnachweis
Pyridoxal-5'-phosphate (Vit B6) Fluorometric Assay Kit	BioVision Inc., Milpitas, CA/USA	K2009-100	Pyridoxal-5'-phosphatnachweis
QIAprep® Spin Miniprep Kit 250	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande	27104	Plasmid-Aufreinigung
QuikChange II XL Site-directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA/USA	200521	Plasmid-Mutagenese
QuikChange Lightning Site-directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA/USA	210518	Plasmid-Mutagenese
Stanbio Phosphorus Liqui-UV®	Stanbio Laboratory L.P., Boerne, TX/USA	0830-125	Phosphatnachweis
Verso cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA	AB-1453/B	cDNA-Synthese

2.1.4 Chemische Substanzen

2.1.4.1 Chemikalien

Tabelle 7: im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien, sofern diese nicht Bestandteil eines Reaktionssatzes sind

Bezeichnung	Hersteller	Referenznummer	Summenformel
(+)-Natrium-L-Ascorbat	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO/USA	A4034	C ₆ H ₇ NaO ₆
2-Propanol ROTIPURAN® ≥99,8%, p.a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	6752	C ₃ H ₈ O
4-(2-Aminoethyl)benzolsulfonylfluorid (cComplete™ Tablets, EDTA-free)	Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Schweiz	04693132001	C ₈ H ₁₀ FNO ₂ S.CIH
4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO/USA	N2640-50TAB	C ₆ H ₆ NO ₆ P
β-Glycerophosphat Dinatriumsalz Pentahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	6847.1	C ₃ H ₇ Na ₂ O ₆ P * 5 H ₂ O
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO/USA	M3148	HSCH ₂ CH ₂ OH
Diethanolamin	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO/USA	31589	C ₄ H ₁₁ NO ₂
Dimethylsulfoxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.029.521.000	C ₂ H ₆ OS
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	3738	C ₂ H ₄ O ₂
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	107017	C ₂ H ₆ O

Material und Methoden

Tabelle 7 (fortgesetzt)

Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO/USA	1.08454	$C_{10}H_{16}N_2O_8 \cdot 2H_2O \cdot 2Na$
Glycerin ROTIPURAN® ≥99,5%, p.a., wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	3783.2	$C_3H_8O_3$
Kanamycinsulfat	Gibco, Carlsbad, CA/USA	154705940	$C_{18}H_{36}N_4O_{11} \cdot H_2O_4S$
L-alpha-Phosphatidylethanolamin	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO/USA-Aldrich	P7943	n/a
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland	840004	$C_{12}H_{18}O_9$
Magnesiumchlorid, anhydrous	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO/USA	M8266	$MgCl_2$
Magnesiumchlorid-Hexyhydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.05833	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO/USA	S7653	$NaCl$
Natriumhydroxid, 98%	J.T.Baker, Waltham, MA/USA	402	$HNaO$
Natriumphosphat, dibasisch	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO/USA	S3264	$H_3O_4P \cdot 2Na$
Natriumpyrophosphat dibasisch	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO/USA-Aldrich	P8135	$Na_2H_2P_2O_7$
Pyridoxal-5'-phosphat	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO/USA-Aldrich	P9255	$C_8H_{10}NO_6P \cdot xH_2O$
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	K025	HCl
SDS 20% (Natriumlaurylsulfat)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO/USA	05030	$C_{12}H_{26}O_4S \cdot Na$
Spermidin	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO/USA	S0266-1G	$NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$
Spermin	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO/USA	S4264-1G	$NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$
Strontiumranelat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	SML0596	$C_{12}H_6N_2O_8SSr_2$
Titriplex III	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.08418	$C_{10}H_{16}N_2O_8 \cdot 2H_2O \cdot 2Na$
TRIS HCL (Trizma® hydrochlorid)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO/USA	T5941	$C_4H_{11}NO_3 \cdot ClH$
TRIS-Base (Trizma®-Base)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO/USA	T1503	$C_4H_{11}NO_3$
Triton™ X-100	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.08603	$(C_2H_4O)_n C_{14}H_{22}O$
Wasser, for molecular biology, sterile filtered	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO/USA	95284	H_2O
Zinkchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	208086	$ZnCl_2$

Material und Methoden

2.1.4.2 Fertiglösungen und Pulver

Tabelle 8: im Rahmen dieser Arbeit verwendete Fertiglösungen und Pulver, sofern diese nicht Bestandteil eines Reaktionssatzes sind

Bezeichnung	Hersteller	Referenznummer
10x DreamTag Green Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA	B71
Adefofix Fixierkonzentrat	Adefo-Chemie GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland	REF 00061
Alizarinrot S	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO/USA	A5533
Alpha MEM Eagle, w: L-Glutamine, w: Ribonucleosides, w: Desoxyribonucleosides, w: 2,2g/L NaHCO ₃	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland	P04-21500
Antarctic Phosphatase Reaction Buffer	NewEngland BioLabs Inc., Ipswich, MA/USA	B0289S
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO/USA	A7030
Buffer Solution pH 10,01	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhrungen, Deutschland	HI5010
Buffer Solution pH 4,01	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhrungen, Deutschland	HI5004
Buffer Solution pH 7,01	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhrungen, Deutschland	HI5007
Calcein	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO/USA	C0875
Citroline 2000 Entwicklerkonzentrat	Adefo-Chemie GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland	REF 00023
Cleaning Solution pH-Elektrode	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhrungen, Deutschland	HI7061
DNA-Gel-Ladefarbstoff (6x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA	R0611
dNTP Mix	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA	R0192
DPBS (1x), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Solution	Gibco, Carlsbad, CA/USA	14190-094
Ethanol 80% MEK vergällt	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland	2203
Ethidiumbromid-Lösung	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO/USA	E1510
Formaldehydlösung Formafix® 3,5%, phosphatgepuffert	Grimm med. Logistik GmbH, Torgelow, Deutschland	70002-10-10
GeneRuler 1kb+ DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA	SM1333
HBSS, Hank's Buffered Saline Solution	Gibco, Carlsbad, CA/USA	14175-095
HyClone™ Fetal Bovine Serum, South American Origin	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA	SV30160.03, LOT TYL3591
Lennox L Agar, powder	Invitrogen AG, Waltham, MA/USA	22700-025
Lennox L Broth Base, powder	Invitrogen AG, Waltham, MA/USA	12780-052

Material und Methoden

Tabelle 8 (fortgesetzt)

Penicillin-Streptomycin 10000 U/ml	Gibco, Carlsbad, CA/USA	15140148
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA/USA	500-0006
ROTI® Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	A156.2
S.O.C. Medium	Invitrogen AG, Waltham, MA/USA	15544-034
Storage Solution pH-Elektrode	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhrungen, Deutschland	HI70300
TaqMan™ Gene Expression Master Mix	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA	4369510
Terrific Broth	Invitrogen AG, Waltham, MA/USA	22711022
Trypsin/EDTA 0,05% 1x, Phenolrot	Gibco, Carlsbad, CA/USA	25300096

2.1.4.3 Enzyme

Tabelle 9: im Rahmen dieser Arbeit verwendete Enzyme, sofern diese nicht Bestandteil eines Reaktionssatzes sind. Die jeweilige Aktivität entspricht der Herstellerangabe

Bezeichnung	Hersteller	Referenznummer	Aktivität
Alkalische Phosphatase grade I from calf intestine	Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Schweiz	1,0108E+10	2000U/mg
Antarktische Phosphatase	NewEngland BioLabs Inc., Ipswich, MA/USA	M0289S	5000U/ml
DreamTaq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA/USA	EP0702	5U/µl
Human Alkaline Phosphatase /ALPL Protein (His Tag)	Sino Biological Europe GmbH, Eschborn, Deutschland	10440-H08H	50U/µg
Pfu Turbo DNA Polymerase	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA/USA	600250	2,5U/µl
Proteinkinase K, rekombinant	Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Schweiz	3115852001	2U/mg
Pyrophosphatase, inorganic from yeast	Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Schweiz	1,0109E+10	200U/mg

2.1.5 Kultivierte Zellen

Tabelle 10: im Rahmen dieser Arbeit verwendete Zelllinie

Bezeichnung	Hersteller	Referenznummer	Beschreibung
MC3T3-E1 Subclone 4	American Type Culture Collection, Manassas, VA/USA	CRL-2593	Präosteoblasten, isoliert aus murinen Calvaria

2.1.6 Puffer, Lösungen, Medien, Gele

Die verwendeten Reagenzien sind in Abschnitt 2.1.4 aufgeführt. Sofern nicht anders angegeben erfolgte die Lagerung bei Raumtemperatur.

<u>Alizarinrot-Lösung</u>	Alizarinrot S ad H ₂ O pH 4,2 Lagerung bei 4 °C	40 mM
<u>α-MEM +/-</u>	Penicillin/Streptomycin fetales Kälberserum Obl ad Alpha-MEM Eagle Lagerung bei 4 °C	1 % (v/v) 10 % (v/v)
<u>Agarosegel:</u>	Agarose ad TAE-Puffer (1x) Aufkochen in Mikrowelle Ethidiumbromidlösung zum sofortigen Gebrauch	0,7 – 1 % (w/v) 5µl
<u>AP-Puffer</u>	Diethanolamin Triton X-100 ad H ₂ O pH 9,8 Lagerung bei 4 °C	1 % (v/v) 0,01 % (v/v)
<u>Ascorbat-Stammlösung</u>	(+)-Natrium-L-Ascorbat ad H ₂ O Lagerung bei -20 °C	10 mg/ml
<u>β-Glycerophosphat-Stammlösung</u>	β-Glycerophosphat ad H ₂ O Lagerung bei -20 °C	2 M

Material und Methoden

<u>Biopsie-Lyse-Puffer</u>	TRIS HCl	50 mM
	EDTA	1,5 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	NaCl	100 mM
	ad H ₂ O	
	pH 8,6	
	Lagerung bei 4 °C	
<u>Calcein-Injektionslösung</u>	Calcein	16 mM
	NaCl	150 mM
	NaHCO ₃	238 mM
	ad H ₂ O	
	pH 7,4	
	Lagerung bei 4 °C	
<u>LB-Medium</u>	Lennox L Broth Base	32 g/l
	ad H ₂ O	
	Autoklavieren 15 min bei 121 °C	
	Lagerung bei 4 °C	
<u>MgCl₂-Stammlösung</u>	Magnesiumchlorid	100 mM
	ad H ₂ O	
<u>Osteoblasten- Differenzierungsmedium</u>	Ascorbat	50 µg/ml
	β-Glycerophosphat	10 mM
	ad α-MEM +/-	
	zum sofortigen Gebrauch	
<u>pNPP-Substratlösung</u>	4-Nitrophenylphosphat	1,67 % (w/v)
	ad AP-Puffer	
	zum sofortigen Gebrauch	

Material und Methoden

<u>Proteaseinhibitor-</u>	cOmplete™	1 Tablette
<u>Stammlösung</u>	PBS	2 ml
	Lagerung bei -20 °C	
<u>Proteinkinase-K-</u>	Proteinkinase K	1 % (w/v)
<u>Stammlösung</u>	ad H ₂ O	
	Lagerung bei -20 °C	
<u>Strontiumranelat-</u>	Strontiumranelat	5 mM
<u>Stammlösung</u>	ad H ₂ O	
<u>TAE-Puffer (50x)</u>	TRIS HCl	2 M
	EDTA	50 mM
	ad H ₂ O	
	pH 7,8	
<u>TB-Medium</u>	Terrific Broth	47 g/l
	ad H ₂ O	
	Autoklavieren 15 min bei 121 °C	
	Lagerung bei 4 °C	
<u>TE-Puffer (10x)</u>	TRIS-Base	10 mM
	EDTA	1 mM
	ad H ₂ O	
	pH 8,0	
<u>Übernachtskultur E. coli</u>	TB-Medium	250 ml
	Kanamycin (100mg/dl)	62,5 µl
<u>Vorkultur E. coli</u>	TB-Medium	5 ml
	Kanamycin (100mg/dl)	1,25 µl
<u>ZnCl₂-Stammlösung</u>	Zinkchlorid	2 mM
	ad H ₂ O	

2.1.7 Oligonukleotidprimer

Alle verwendeten Oligonukleotidprimer wurden von der Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die Konzentration der Stammlösung, gelöst in H₂O, betrug für Mutageneseprimer 100 µM, für Genotypisierungsprimer 200 µM.

2.1.7.1 Mutageneseprimer

ALPL_C119T F	5' CTTCTGAAGCTCCAGGACATATTTTCAGTGTCTCTT 3'
ALPL_C119T R	5' AAGAGACACTGAAATATGTCCTGGAGCTTCAGAAG 3'
ALPL_G212A F	5' ACCCTTGAGGATGTGGGCAGCCGTCAC 3'
ALPL_G212A R	5' GTGACGGCTGCCACATCCTCAAGGGT 3'
ALPL_C299T F	5' GGCATTGGTGTGTACATCTTGAGAGGGCCAC 3'
ALPL_C299T R	5' GTGGCCCTCTCCAAGATGTACAACACCAATGCC 3'
ALPL_G340A F	5' GTAGGCGGTGGTGGTGCCGGCGC 3'
ALPL_G340A R	5' GCGCCGGCACCACCACCGCCTAC 3'
ALPL_G346T F	5' CACACAGGTAGGAGGTGGCGGTGCC 3'
ALPL_G346T R	5' GGCACGCCACCTCTACCTGTGTG 3'
ALPL_G394A F	5' CGCTCAGTGGCTGTGTGCTTACCCCCACG 3'
ALPL_G394A R	5' CGTGGGGGTAAGCACAGCCACTGAGCG 3'
ALPL_C406T F	5' TTGCACCGGGAACACTCAGTGGCTGCG 3'
ALPL_C406T R	5' CGCAGCCACTGAGTGTCCCGGTGCAA 3'
ALPL_G407A F	5' GTTGACCCGGAATGCTCAGTGGCTGC 3'
ALPL_G407A R	5' GCAGCCACTGAGCATTCCCGGTGCAAC 3'
ALPL_C422A F	5' GTTCCCCTGGGTGTTGTTGCACCGGGA 3'
ALPL_C422A R	5' TCCCGGTGCAACAACACCCAGGGGAAC 3'
ALPL_C500T F	5' GGCATGGTTCCTCTCATGGTGGTCACAATGCC 3'
ALPL_C500T R	5' GGCATTGTGACCACCATGAGAGTGAACCATGCC 3'
ALPL_G535A F	5' AGCCGAGTGGGTGTAGGCGGCGC 3'
ALPL_G535A R	5' GCGCCGCCTACCCCACTCGGCT 3'
ALPL_G542T F	5' GGTCAGCCAAGTGGGCGTAGGCGG 3'
ALPL_G542T R	5' CCGCCTACGCCCCTTGGCTGACC 3'
ALPL_G526A F	5' GCGTAGGCGGTGCTGGGGTGG 3'
ALPL_G526A R	5' CCACCCCCAGCACCGCCTACGCC 3'
ALPL_G661T F	5' TGTATTTCCGGCCACACCCCATGATCACGTC 3'
ALPL_G661T R	5' GACGTGATCATGGGGTGTGGCCGGAAATACA 3'
ALPL_G738T F	5' CAGGCCGTCCAGACTCGTGCCCCTG 3'
ALPL_G738T R	5' CAGGGGCACGAGTCTGGACGGCCTG 3'
ALPL_G746T F	5' ACGAGGTCCAGGACGTCCAGCCTCG 3'
ALPL_G746T R	5' CGAGGCTGGACGTCCTGGACCTCGT 3'
ALPL_G976C F	5' CAGCAAGAAGAAGCGTTTGGGGTTCTTCCGCA 3'
ALPL_G976C R	5' TGCGGAAGAACCCCAAACGCTTCTTCTTGCTG 3'
ALPL_T1228C F	5' TACAGGATGGCAGTGAGGGCTTCTTGTCTGTG 3'
ALPL_T1228C R	5' CACAGACAAGAAGCCCCTCACTGCCATCCTGTA 3'
ALPL_A1250G F	5' GCCAGGCCCACTGCCATACAGGATGGCAGT 3'
ALPL_A1250G R	5' ACTGCCATCCTGTATGGCAGTGGGCCTGGC 3'

2.1.7.2 Genotypisierungsprimer

ALPL-F1 5' GCGTTCAGCTGCATCTGTCTTCATG 3'
ALPL-rev516 5' CTTGACCTCATAGCTCCACTGCAGAG 3'

2.1.7.3 Sequenzierungsprimer

Die folgenden Oligonukleotidprimer wurden den eingesendeten Proben von der Micosynth Seqlab GmbH (Göttingen, Deutschland) im Rahmen der Sanger-Sequenzierung zugesetzt.

M13 Reverse 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'
T7 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

2.1.7.4 TaqMan®-Sonden

Alpl Mm00475834_m1
Gapdh 4308313

2.1.8 PCR-Bedingungen

2.1.8.1 PCR-Programme

Tabelle 11: Agilent QuikChange II XL Mutagenese PCR-Programm

95 °C	1 min	
95 °C	50 s	
60 °C	50 s	18 Zyklen
68 °C	8 min	
68 °C	7 min	
4 °C	∞	

Material und Methoden

Tabelle 12: Agilent QuikChange Lightning Kit Mutagenese PCR-Programm

95 °C	2 min	
95 °C	60 s	
55 °C	50 s	18 Zyklen
68 °C	4 min	
68 °C	10 min	
4 °C	∞	

Tabelle 13: Agilent QuikChange Lightning Kit Mutagenese PCR-Programm, optimiert für die Mutationen c.738G>T, c.976G>C und c.1228T>C

95 °C	2 min	
95 °C	60 s	
65 °C	50 s	18 Zyklen
68 °C	4 min	
68 °C	10 min	
4 °C	∞	

Tabelle 14: PCR-Programm für die Genotypisierung der ALPL-KI-Mäuse

94 °C	4 min	
94 °C	30 s	
58 °C	30 s	40 Zyklen
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

2.1.8.2 PCR-Reaktionsansätze

Tabelle 15: Agilent QuikChange Lightning Kit Mutagenese PCR-Reaktionsansatz (x = spezifische Mutation)

Reagenz	Volumen für 1 Ansatz [µl]
10x Reaction Buffer	3
QuikSolution Reagent	2
Primer 1 ALPL_x F	1,25
Primer 2: ALPL_x R	1,25
dNTP Mix 10mM	1
QuikChange Lightning Enzyme	1
dsDNA Template pCMV6-ALPL	0,5
ddH ₂ O	36,5

Tabelle 16: Agilent QuikChange II XL Mutagenese PCR-Reaktionsansatz (x = spezifische Mutation)

Reagenz	Volumen für 1 Probe [µl]
10x Reaction Buffer	5
QuikSolution	3
Primer 1: ALPL_x F	1,25
Primer 2: ALPL_x R	1,25
dNTP Mix 10mM	1
PfuUltra HF DNA Polymerase	1
dsDNA Template pCMV6-ALPL	0,5
ddH ₂ O	37

Tabelle 17: PCR-Reaktionsansatz für die Genotypisierung der ALPL-KI-Mäuse

Reagenz	Volumen für 1 Probe [µl]
10x DreamTaq Buffer Green	2,5
DMSO	0,5
Primer 1: ALPL-F1	1
Primer 2: ALPL-rev516	1
dNTP Mix 10mM	0,5
DreamTaq Polymerase	0,5
genomische DNA	1
ddH ₂ O	13

2.1.9 Software

Tabelle 18: im Rahmen dieser Arbeit verwendete Software

Bezeichnung	Versionsnummer	Lizenzgeber
µCT 40	6.1	Scanco Medical, Wangen-Brüttisellen, Schweiz
Ascent Software™	2.6	Thermo LabSystems, Helsinki/Finland
AxioCam HR	5.07.03	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
AxioVision	3.1.2.1	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
BioEdit Sequence Alignment Editor	7.2.5	Tom Hall
BIOQUANT OSTEO 2020	20.8.60 ME	BIOQUANT Image Analysis Corp., Nashville, TN/USA
Citavi	6.10	Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz
FileZilla	3.54.1	Tim Kosse
GraphPad Prism®	7.04	GraphPad Software Inc., San Diego, CA/USA
Microsoft® Excel® 2013 MSO	Build 15.0.5353.1000	Microsoft Corporation, Redmond, WA/USA
Microsoft® Excel® 2016 MSO	Build 16.0.4266.1001	Microsoft Corporation, Redmond, WA/USA
Microsoft® PowerPoint® 2013 MSO	Build 15.0.5345.1000	Microsoft Corporation, Redmond, WA/USA
Microsoft® PowerPoint® 2016 MSO	Build 16.0.4266.1001	Microsoft Corporation, Redmond, WA/USA
Microsoft® Word 2013 MSO	Build 15.0.5357.1000	Microsoft Corporation, Redmond, WA/USA
Microsoft® Word 2016 MSO	Build 16.0.4266.1001	Microsoft Corporation, Redmond, WA/USA
NanoDrop ND-1000	3.5.2	Coleman Technologies Inc. for NanoDrop Technologies, Wilmington, DE/USA
OsteoMeasure64	1.0.3.0	Osteometrics Inc., Decatur, GA/USA
PuTTY	0.75	S. Tatham/A. Lanes/B. Harris/J. Nevins, Cambridge, England
Serial Cloner	2.6.1	SerialBasics
SoftMax Pro	7.1, Build 246936	Molecular Devices LLC, San José, CA/USA
StepOne™ Software	2.3	life Technologies, Karlsbad, CA/USA
Xming	6.9.0.31	Colin Harrison

2.2 Methoden

2.2.1 Erfassung der AP-Enzymaktivität in vitro

Für die Quantifizierung der nativen und durch Additive beeinflussten Aktivität der Wildtyp- sowie mutierten Alkalischen Phosphatase wurden die im Folgenden beschriebenen Schritte für jede untersuchte Mutation sequentiell durchlaufen.

Die Plasmid-DNA von pCMV6-Entry und pCMV6-ALPL (s. Abbildung 3) wurden aus laborinternen Vorversuchen übernommen. Das Vektorplasmid pCMV6-Entry wurde dabei von der OriGene Technologies Inc. (Rockville, MD/USA) unter der Referenznummer PS100001, pCMV6-ALPL unter der Referenznummer RC205692 bezogen.

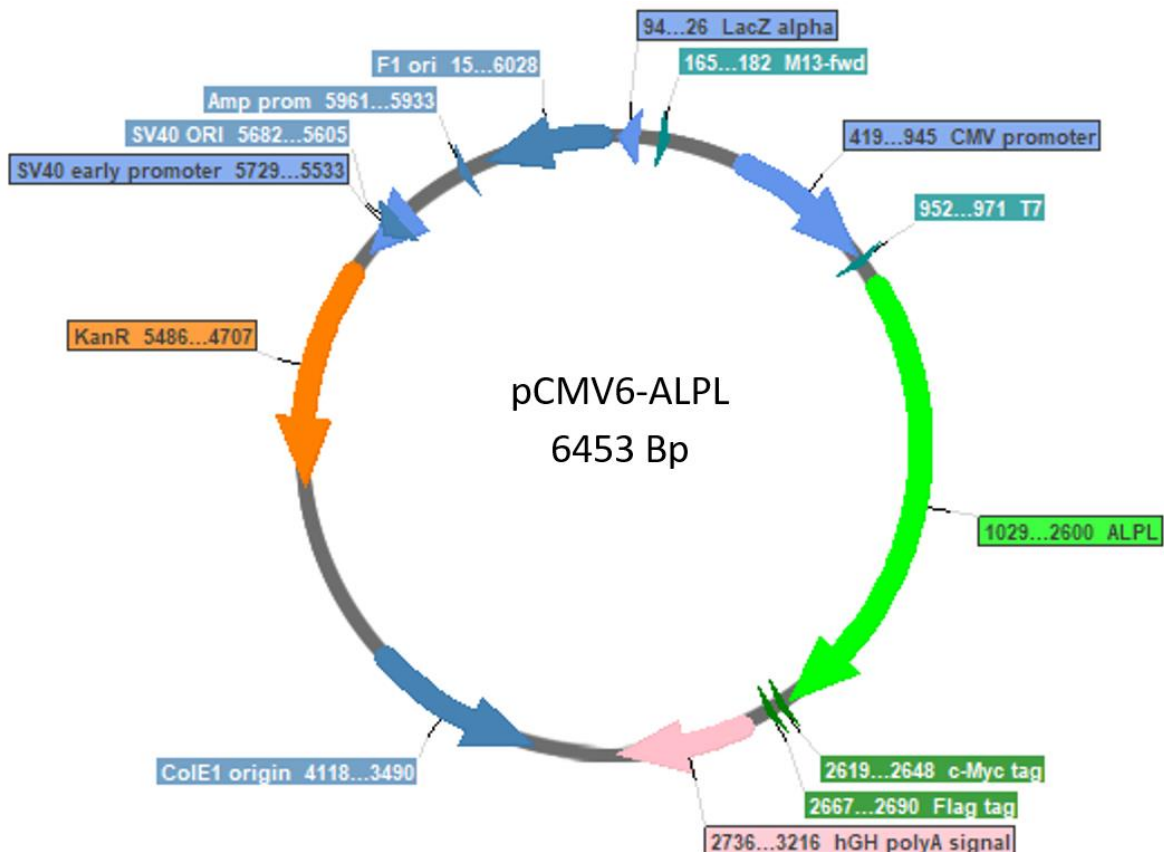


Abbildung 3: zirkuläre Darstellung von pCMV6-ALPL in SerialCloner. Projektrelevant sind neben dem ALPL-Gen (hellgrün gefärbt) u.a. die Kanamycin-Resistenz (KanR, orange gefärbt) und die Loci für die Primer T7 und M13 Reverse (im LacZ-Gen).

2.2.1.1 Mutagenese

Die Mutagenese von pCMV6-ALPL mit den in Tabelle 3 beschriebenen Mutationen erfolgte ortsspezifisch nach dem Ligation-During-Amplification-Verfahren (Shenoy und Visweswariah 2003) mithilfe der Reaktionsätze QuikChange II XL sowie QuikChange Lightning (vgl. Abschnitt 2.1.3) nach Herstellerangaben. Die eingesetzten Oligonukleotidprimer sind in Abschnitt 2.1.7.1 aufgeführt, für die PCR-Programme sowie -reaktionsansätze siehe Abschnitt 2.1.8. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen, insbesondere der Hybridisierungstemperatur, wurde am PCR-Cycler ein Temperaturgradient von 50 – 65 °C eingestellt.

Zur Erfolgskontrolle der Mutagenese wurden 0,7 % Agarosegele mit 5 µl GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder sowie je 20 µl PCR-Produkt (nach Zusatz von 6x DNA-Gel-Ladefarbstoff im Verhältnis 5:1) beladen und die Proben 20 Minuten bei 100 V aufgetrennt. Anschließend wurden die resultierenden Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert (vgl. beispielhaft Abbildung 4).

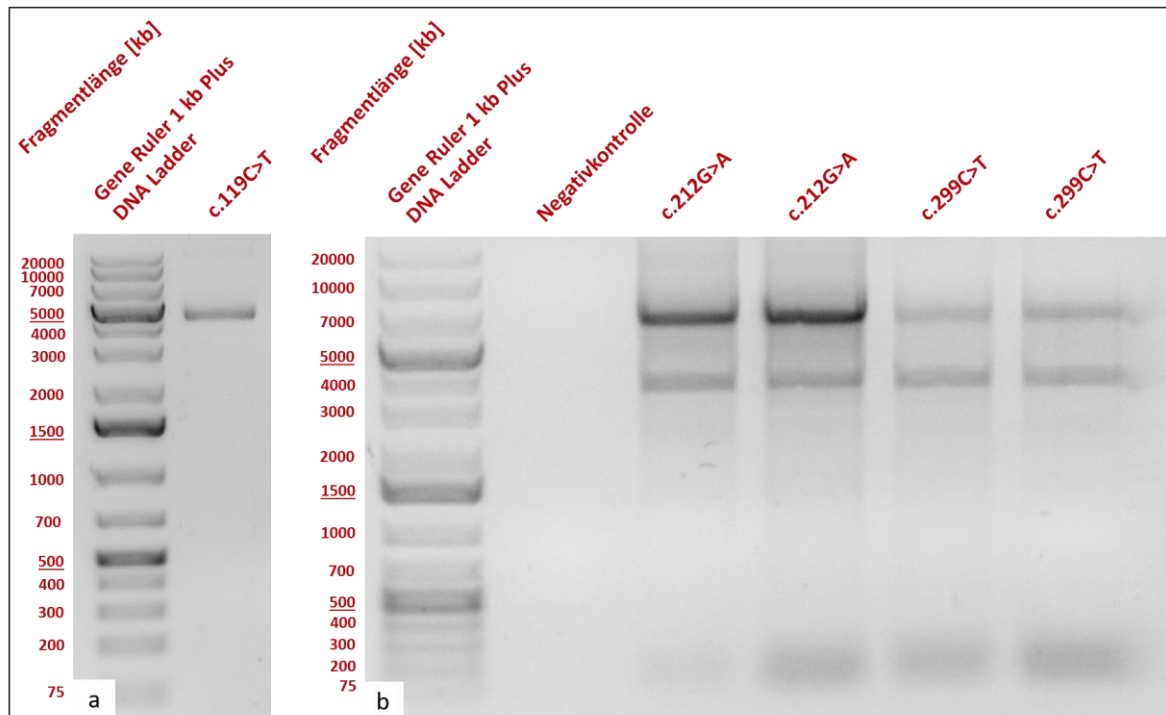


Abbildung 4: Gelelektrophorese zur Beurteilung der vorausgegangenen PCR. a) Links GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, rechts PCR-Produkt der Mutagenese von c.119C>T mit deutlicher Bande bei etwa 5 kBp. Dies entspricht dem als Supercoil vorliegenden Plasmid. b) Von links: GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, Negativkontrolle mit dH₂O zum Ausschluss von Verunreinigungen, PCR-Produkt von c.212G>A mit technischem Replikat, PCR-Produkt von c.299C>T mit technischem Replikat. Die zweite Bande bei ca. 7 kBp lässt sich durch den hier noch nicht erfolgten DpnI-Verdau mit Vorliegen von linearisiertem und als Supercoil vorliegendem Plasmid erklären.

2.2.1.2 Transformation

Im Anschluss an die erfolgreiche PCR wurden die in den QuikChange Kits enthaltenen XL10 Ultrakompetenten Zellen nach Herstellerangaben transformiert. Dabei wurde im letzten Schritt ein Volumen von 200 µl auf drei Agarplatten je Mutation ausgebracht und diese über Nacht, jedoch mindestens 16 Stunden, bei 37 °C inkubiert. Als Selektionsantibiotikum kam Kanamycin zum Einsatz. Bei makroskopisch sichtbarem Wachstum von Kolonien (vgl. beispielhaft Abbildung 5) am Folgetag wurden je Platte drei Kolonien mit 1000 µl Pipettenspitzen gepickt und in einem 14 ml Bakterienkulturröhrchen in Vorkultur E. coli (s. Abschnitt 2.1.6) erneut über Nacht, jedoch mindestens 16 Stunden, bei 37 °C und bei 245 rpm horizontal schüttelnd inkubiert. Die Agarplatten wurden mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C gelagert.

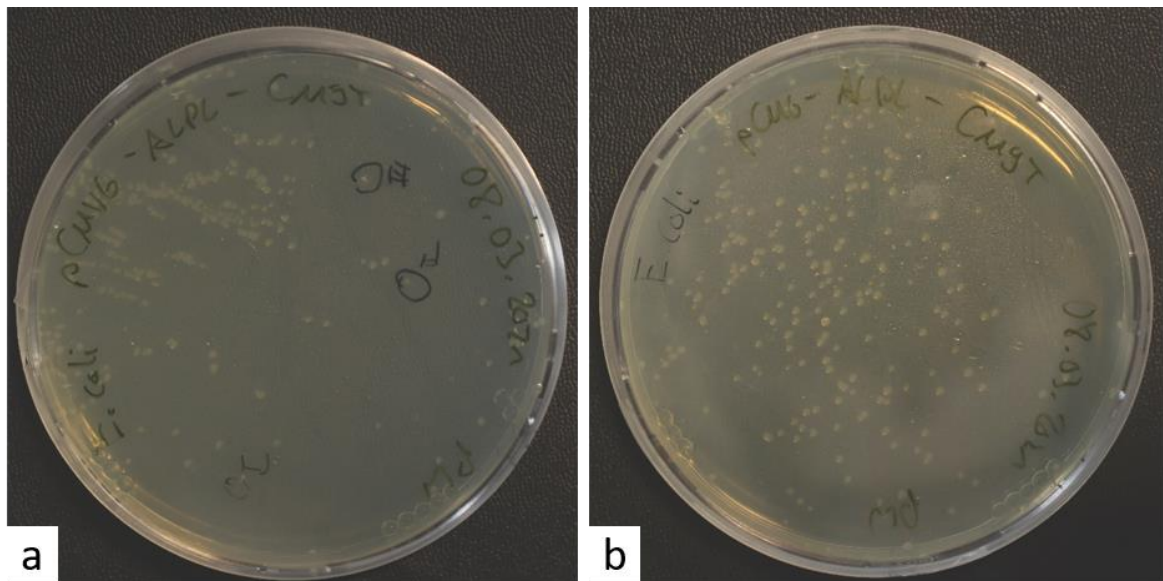


Abbildung 5: Bakterienkultur auf Kanamycin-Agarplatten. a) Kultur von *c.119C>T* mit Markierungen der gepickten Kolonien. b) Zweite Kultur von *c.119C>T*, noch ohne Markierungen

2.2.1.3 Plasmidaufreinigung

Die Aufreinigung und Präparation der Plasmide erfolgte in zwei Arbeitsschritten. Zunächst wurde aus der in Abschnitt 2.2.1.2 beschriebenen Vorkultur 625 μl gut angewachsene Bakterienkultur abgenommen, mit 375 μl 80 % steriltfiltrierter Glycerollösung vermischt und als Kryostock bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Mit der übrigen Vorkultur erfolgte eine Aufreinigung mithilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kits nach Herstellerangaben. Die Konzentrationsbestimmung aller in dieser Arbeit generierten Produkte erfolgte mit dem NanoDrop™ ND-1000 Spektralphotometer; als Leerwert diente hier der im Miniprep Kit enthaltene Buffer EB.

Zum Nachweis der gewünschten Mutation wurden 15 μl der so gewonnenen DNA mit ddH_2O auf eine Endkonzentration von 80 – 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ verdünnt und von der Microsynth SeqLab GmbH (Göttingen, Deutschland) mit der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger et al. 1977) sequenziert. Für bis zu 746 Positionen vom Beginn des offenen Leserahmens entfernte Mutationen wurde durch den Dienstleister der Primer T7, ab 976 Positionen der Primer M13 Reverse zugesetzt. Die Ergebnisse wurden in SerialCloner und BioEdit mit der Sequenz von pCMV6-ALPL verglichen (vgl. beispielhaft Abbildung 6).

Material und Methoden

```
c.119C>T    137    AATATGTCCTGGAGCTTCAGAAGCTCAACACCAACGTGGCTAAGAATGTCATCATGTTCC    196
            ||||| # |||||
pCMV6-ALPL  1141    AATATGCCCTGGAGCTTCAGAAGCTCAACACCAACGTGGCTAAGAATGTCATCATGTTCC    1200
```

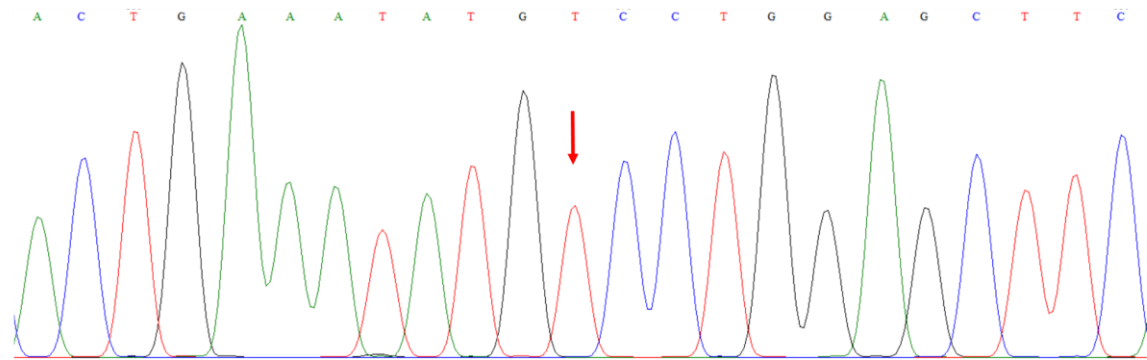


Abbildung 6: Ergebnis der Sequenzierung für c.119C>T. Oben ist der direkte Sequenzvergleich abgebildet (pCMV6-ALPL in grün als Seq_2). Die Veränderung der DNA-Sequenz von Cystein zu Threonin ist damit bestätigt. Unten ist das Ergebnis der Sanger-Sequenzierung abgebildet. Der rote Pfeil markiert das mutationsbedingte Threonin.

Bei positivem Sequenzierungsergebnis wurden aus den zuvor eingelagerten Kryostocks 40 µl E. coli Suspension für eine Kultur mit 5 ml Vorkultur (s. Abschnitt 2.1.6) entnommen und in einem 14 ml-Bakterienkulturröhrchen für 6 – 8 Stunden bei 37 °C und bei 245 rpm horizontal schüttelnd inkubiert. Die eigentliche Bakterienkultur erfolgte durch Zugabe dieser Vorkultur zur Übernachtskultur E. coli (s. Abschnitt 2.1.6) für mindestens 16 Stunden, bei schwer zu kultivierenden Mutationen bis zu 26 Stunden, bei 37 °C und bei 245 rpm horizontal schüttelnd in 500 ml Erlenmeyerkolben. Die endotoxinfreie Aufreinigung der DNA zur endgültigen Verwendung fand unter Anwendung des EndoFree® Plasmid Maxi Kits statt, wobei im letzten Schritt das Plasmid-Pellet in 200 µl im Kit enthaltenem Buffer TE gelöst wurde, der auch als Leerwert für die Konzentrationsbestimmung diente. Die Produkte wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert; die Konzentrationen sowie das im Rahmen der Transfektion für 1 µg DNA benötigte Volumen sind in Tabelle 19 wiedergegeben.

Material und Methoden

Tabelle 19: Konzentrationen und benötigte Volumina für 1µg DNA der untersuchten Mutationen sowie pCMV6-Entry und pCMV6-ALPL nach DNA-Präparation

Mutation	Konzentration [ng/µl]	Benötigtes Volumen für 1µg DNA [µl]
pCMV6-Entry	857,2	1,17
pCMV6-ALPL	876,8	1,14
C119T	642,2	1,56
G212A	402,8	2,48
C299T	118,4	8,45
G340A	615,4	1,62
G346T	547,5	1,83
G394A	270,7	3,69
C406T	294,7	3,39
G407A	504,9	1,98
C422A	268,7	3,72
C500T	322,5	3,10
G526A	290,3	3,44
G535A	391,5	2,55
C542T	448,0	2,23
G661T	614,9	1,63
G738T	320,6	3,12
G746T	252,5	3,96
G976C	405,5	2,47
T1228C	405,9	2,46
A1250G	359,8	2,78

2.2.1.4 Zellkultur

Als Grundlage der Zellkultur dienten MC3T3-E1-Zellen, eine Präosteoblasten-Zelllinie murinen Ursprungs (Kodama et al. 1981). In der Erhaltungskultur erfolgte ein Mediumwechsel mit α -MEM +/- (s. Abschnitt 2.1.6) nach mikroskopischer Wachstumskontrolle in Intervallen von 48 – 72 Stunden und ein Aufteilen der kultivierten Zellen im Verhältnis 1:8 nach jeweils 7 Tagen bei stets 95 – 100 % Konfluenz.

Für die osteoblastäre Differenzierung wurden in 12-Well-Zellkulturplatten je Well $2 \cdot 10^5$ Zellen mit α -MEM +/- ausgebracht und ab dem ersten Mediumwechsel nach 48 Stunden mit Osteoblasten-Differenzierungsmedium (s. Abschnitt 2.1.6) versorgt (Franceschi et al. 1994; Franceschi und Iyer 1992).

Die transiente Transfektion der MC3T3-Zellen erfolgte mittels Lipofektion (Felgner et al. 1987) mit Lipofectamine® LTX und PLUS Reagenz nach Herstellerangaben in 12-Well-Zellkulturplatten mit $3 \cdot 10^5$ Zellen je Well. Die eingesetzten DNA-Mengen

sind Tabelle 19 zu entnehmen. Für jede Mutation sowie pCMV6-Entry und pCMV6-ALPL wurden 4 Wells im Sinne biologischer Replikate angesetzt. Auf eine dedizierte Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde aufgrund der fehlenden Konsequenz für das weitere Vorgehen verzichtet.

2.2.1.5 AP-Aktivitätsassay mit pNPP als Substrat

24 – 48 Stunden nach Transfektion wurden die MC3T3-Zellen für die Aktivitätsmessung präpariert. Dafür wurde nach Absaugen des Mediums und zweimaligem Waschen mit PBS jedem Well 1 ml PBS sowie 40 µl Proteaseinhibitor-Stammlösung (s. Abschnitt 2.1.6) zugegeben, die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt, in 5 ml Rundbodenröhrchen überführt und von hieran auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen mechanisch lysiert und 100 µl des Zelllysats für mögliche spätere Diagnostik bei -80 °C gelagert.

Für jede Mutation sowie pCMV6-Entry und pCMV6-ALPL erfolgten jeweils 4 Messungen mit den folgenden Konditionen:

1. Natives Zelllysats (d.h. ohne Zugabe von Additiven)
2. MgCl₂ [1mM]
3. ZnCl₂ [20µM]
4. Strontiumranelat [50µM]

Das Assaysystem war dabei gemäß Herstellerangaben frei von Magnesium, Zink und Strontiumranelat. pCMV6-Entry und pCMV6-ALPL wurden dabei sowohl in ihrer jeweiligen Aktivität untersucht, als auch als Negativ- bzw. Positivkontrolle zur Beurteilung der internen Validität des Versuches eingesetzt.

Für jede Kondition wurden 200 µl Zelllysats nativ belassen oder mit 7 µl der jeweiligen Stammlösungen (s. Abschnitt 2.1.6) versehen, um die gewünschte Endkonzentration zu erreichen, und mit 500 µl pNPP-Substratlösung (s. Abschnitt 2.1.6) gemischt. Die Inkubationsdauer bei Raumtemperatur wurde in jedem Versuch in Abhängigkeit von der geschätzten Transfektionseffizienz nach augenscheinlicher Gelbfärbung der pCMV6-ALPL-Proben gewählt und lag in der Regel zwischen 15 und 45 Minuten. Für die folgenden Reaktionen nach Zugabe von Additiven wurde die nativ bestimmte Inkubationszeit streng repliziert, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Der enzymatische Umsatz von pNPP wurde durch Zugabe von 200 µl 2,5 M NaOH, bei späteren Versuchen durch thermische

Inaktivierung bei 95 °C für 2 Minuten, beendet. Anschließend erfolgte der Transfer von je 200 µl jeder Probe in Wells einer transparenten 96-Well-Mikrotiterplatte und Messung der Extinktion bei 405 nm im Microplate Reader. Zur Auswertung wurden die Extinktionswerte der jeweiligen Proben in Verhältnis zum Mittelwert der Extinktionswerte von pCMV6-ALPL gesetzt:

$$\text{Aktivität [\%]} = \frac{E_{405nm}(\text{Probe})}{\bar{\emptyset} E_{405nm}(\text{pCMV6 - ALPL})} \cdot 100$$

Zusätzlich sollte die Proteinkonzentration der Proben mittels Bradford-Assays bestimmt werden (Bradford 1976). Hierzu wurden 50 µl Zellsuspension mit 750 µl dH₂O sowie 200 µl Protein Assay Dye Reagent Concentrate gemischt, 100 µl des Gemisches in Wells einer transparenten 96-Well-Zellkulturplatte überführt und die Extinktion bei 595 nm gemessen. Für die Eichreihe wurde BSA (2mg/ml) 1:9 vorverdünnt und anschließend eine Verdünnungsreihe entsprechend Tabelle 20 erstellt und nach demselben Prinzip wie die Proben gemessen. Die Ermittlung der Proteinkonzentration in den Proben erfolgte automatisch in der Ascent™ Software.

Tabelle 20: Verdünnungsreihe für BSA zur Konzentrationsbestimmung im Bradford-Assay.

µg BSA in Lösung	µl BSA-Lösung (1:9)	µl H ₂ O
0	0	800
5	25	775
10	50	750
15	75	725
20	100	700

2.2.1.6 qRT-PCR

Die Transkriptionsanalyse erfolgte nach am Institut für Osteologie und Biomechanik des UKE etablierten Methoden (Zhao et al. 2021). Es wurde aus kultivierten MC3T3-Zellen RNA mithilfe des NucleoSpin® RNA/Protein Reaktionssatzes isoliert. Dies erfolgte nach Herstellerangaben, nachdem die Zellen mit dem im Kit enthaltenen Lysepuffer sowie 10 µl/ml β-Mercaptoethanol lysiert und mit einem Zellschaber abgelöst wurden. Die Elution erfolgte in 50 µl ddH₂O.

Die so gewonnene RNA wurde mit dem Verso cDNA Synthesis Kit mit integriertem DNase-Verdau entsprechend den Herstellerangaben unter Verwendung der oligo-dT Primer in cDNA umgeschrieben. Als Template kamen dabei 500 ng RNA zum Einsatz.

Zur quantitativen Analyse der Genexpression von ALPL wurde eine quantitative Reverse Transkriptase Real Time PCR (qRT-PCR) durchgeführt (Higuchi et al. 1992; Holland et al. 1991). Hierzu wurde auf das TaqMan-System zurückgegriffen, für die verwendeten Sonden siehe Abschnitt 2.1.6.4. Ein Reaktionsansatz bestand aus 7 µl ddH₂O, 10 µl TaqMan-Mastermix, 2 µl cDNA sowie 1 µl Primer. Als PCR-Cycler wurde das StepOnePlus Real-Time PCR System verwendet; die StepOne™-Software ermittelte automatisch die Schwellenwerte der Fluoreszenzintensität der Proben (C_T-Wert). Für die Berechnung der relativen Genexpression von ALPL wurde GAPDH als interne Referenz verwendet und die $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewandt:

$$\begin{aligned}\Delta C_T &= C_T(ALPL) - C_T(GAPDH) \\ \Delta\Delta C_T &= \Delta C_T(ALPL) - C_T(GAPDH) \\ \text{Relative Expression} &= 2^{-\Delta\Delta C_T}\end{aligned}$$

2.2.2 Tierversuche

Alle Tierversuche wurden von der Tierschutzkommission des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf sowie der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen, begutachtet und genehmigt (G73/19, Org869) und unter Berücksichtigung der Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere durchgeführt. Der Umgang mit Versuchstieren erfolgte stets unter Aufsicht und Anleitung von nach FELASA-Kriterien geschulten Wissenschaftlern. Alle vom Autor dieser Arbeit durchgeführten Tätigkeiten im Rahmen der Tierversuche beschränkten sich auf den Zeitraum nach deren Tötung.

Die Tiere wurden in den Räumlichkeiten der Zentralen Forschungstierhaltung (FTH) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf in einer spezifisch pathogenfreien Umgebung mit 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus, 45 – 65 % relativer Luftfeuchtigkeit und 20 – 24 °C Raumtemperatur gehalten und von den Tierpflegern

der FTH mit Leitungswasser und Trockenfutter (1328P, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) *ad libitum* versorgt. Das Ansetzen der Verpaarung wurde ebenfalls von Mitarbeitern der FTH übernommen.

Als murines Modell der Hypophosphatasie wurde vor dem in Abschnitt 1.3 dargestellten Hintergrund ein Knockin der Mutation c.571G>A (p.Glu191Lys bzw. p.E191K) in das ALPL-Gen von C57BL/6-Mäusen gewählt.

Die Erschaffung der Mauslinie erfolgte in Zusammenarbeit mit der Transgene Maus Core Facility des UKE (Leitung: PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer / PD Dr. Uwe Borgmeyer) durch CRISPR/Cas9 Genome Editing (Ochiai 2015) und trägt die Bezeichnung B6-Alpl^{em1HHtg/Uke}. Für die Zwecke dieser Arbeit erfolgt die Benennung wie folgt:

Wildtyp	Alpl ^{+/+}
Heterozyot	Alpl ^{+/d}
Homozygot	Alpl ^{d/d}

2.2.2.1 Genotypisierung

Die Genotypisierung neugeborener Mäuse erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al. 1988). Hierfür wurde aus Biopsien der Schwanzspitze oder des Ohres mithilfe des Phire Animal Tissue Direct PCR Kits nach Herstellerangaben DNA gewonnen. Diese wurde als DNA-Template für die in Abschnitt 2.1.8 dargestellten PCR-Läufe eingesetzt.

Bei Versagen des o.g. Kits wurde die zu untersuchende DNA mit Phenol/Chloroform isoliert. Hierzu wurden zunächst die Biopsien in 325 µl Biopsie-Lyse-Puffer und 25 µl Proteinkinase K (s. Abschnitt 2.1.6) für 120 Minuten bei 55 °C und horizontal schüttelnd mit 900 rpm lysiert und die darin enthaltene DNA in die Pufferlösung freigesetzt. Anschließend wurden 350 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung zugegeben und nach gründlichem Schütteln für 10 Minuten bei 21300 rcf und Raumtemperatur zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde in neue 1,5ml-Reagiergefäße überführt, mit 500 µl Isopropanol vermischt und erneut für 10 Minuten bei 21300 rcf und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und für 7 Minuten bei 21300 rcf und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das entstandene DNA-Pellet in 50 µl TE-Puffer gelöst und zur Verwendung am selben

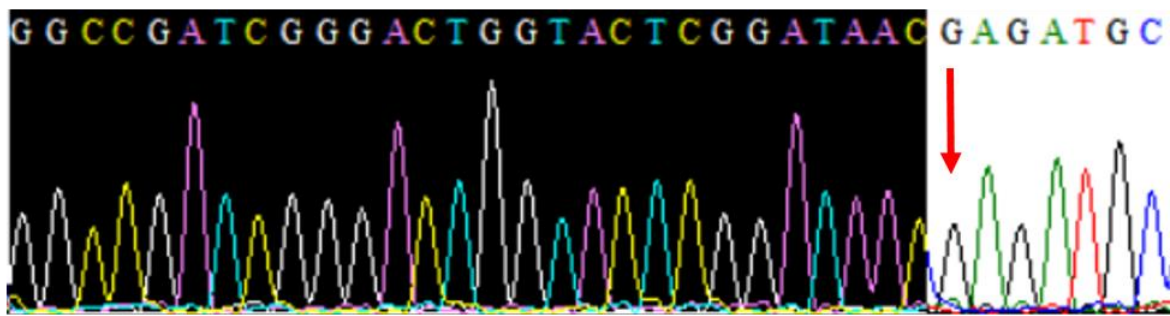
Tag 30 Minuten bei 37 °C und horizontal schüttelnd mit 300 rpm inkubiert. Bei Verwendung am Folgetag oder später entfiel dieser Inkubationsschritt unter Lagerung bei Raumtemperatur.

Die resultierenden PCR-Produkte wurden mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Elution erfolgte in 20 µl im Kit enthaltenem Buffer NE, welcher auch als Leerwert für die Konzentrationsbestimmung diente. Die so gewonnene DNA wurde in 15 µl-Ansätzen mit 1,5 µl Primer (ALPL-F1, Konzentration 20 µM) und ddH₂O auf eine Endkonzentration von 15 ng/µl verdünnt und der Micosynth SeqLab GmbH (Göttingen, Deutschland) zur Sequenzierung übersandt.

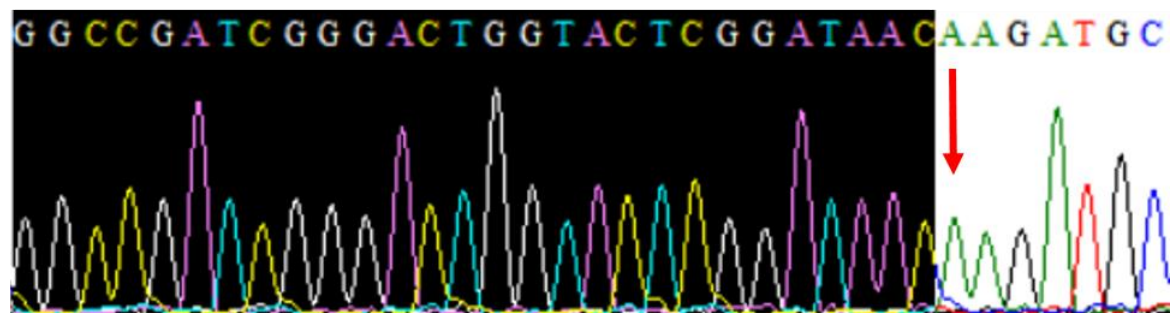
Die Auswertung der Genotypisierung der ALPL-Mäuse erfolgte durch Analyse der folgenden Zielsequenzen in den Chromatogrammen mithilfe der BioEdit Software (vgl. Abbildung 7):

WT	5' GGCCGATCGGGACTGGTACTCGGATAACG 3'
KI	5' GGCCGATCGGGACTGGTACTCGGATAACA 3'

Wildtyp ($Alpl^{+/+}$)



homozygoter Knockin ($Alpl^{d/d}$, c.571G>A)



heterozygoter Knockin ($Alpl^{+/d}$, c.571G>A)

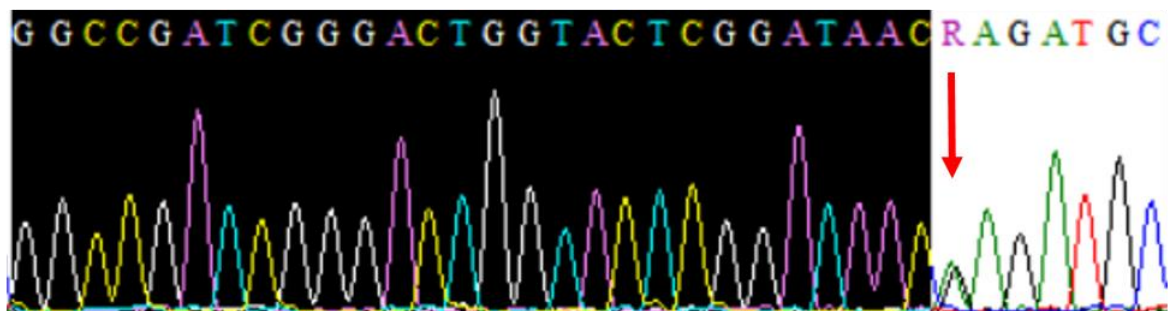


Abbildung 7: Auswertung der Genotypisierung der $Alpl$ -Mäuse in der BioEdit-Software. Schwarz hinterlegt ist die 5'-3'-Sequenz mit Ende vor der für die Mutation verantwortlichen Aminosäure. Die darauf folgende Aminosäure zeigt das Ergebnis der Genotypisierung an: Glycin bei Wildtyp-Tieren, Alanin bei homozygoten und ein übereinander liegendes Signal für sowohl Glycin als auch Alanin (in der Software dargestellt als R) bei heterozygoten Tieren.

2.2.2.2 Präparation der Versuchstiere

Die Präparation der Versuchstiere folgte am Institut für Osteologie und Biomechanik des UKE etablierten und mehrfach publizierten Standardverfahren (Zhao et al. 2021; Rolvien et al. 2020; Luther et al. 2018). Für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen erfolgte die Tötung der Mäuse im Alter von 12 Wochen durch Betäubung mit 80 % CO_2 / 20 % O_2 Mischgas und anschließender Asphyxie mit 100 % CO_2 . Der sichere Tod wurde durch Fehlen des Zwischenzehenreflexes

überprüft und die Tiere anschließend gewogen. Um insbesondere Haarflug zu reduzieren wurden die Kadaver vor der weiteren Präparation mit 80 % Ethanol besprüht. Anschließend erfolgte eine transkutane transapikale Aspiration von Vollblut aus den Herzhöhlen. Das so gewonnene Blut wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur in einem 1,5 ml Reagiergefäß belassen, um die Gerinnung vollständig ablaufen zu lassen. Es folgte eine Zentrifugation bei 3300 rcf für 6 Minuten, um die korpuskulären Blutbestandteile zu sedimentieren. Das sich nun im Überstand befindliche Serum wurde in frische 1,5 ml Reagiergefäße überführt und bei -80 °C für zukünftige Untersuchungen gelagert.

Die weitere Präparation der Mäuse erfolgte durch Entfernen von Fell sowie thorakalen und abdominellen Organen und Fixieren der Kadaver in longitudinal gestreckter Position auf Korkplatten. Zur Fixierung des Gewebes wurden die Präparate 24 – 48 Stunden in 3,5 % Formafix-Lösung gehalten und anschließend in 80 % Ethanol gelagert.

2.2.2.3 Radiographische Untersuchungen

Von den fixierten Kadavern der Versuchstiere wurden nach Abschluss der Fixierung Kontaktröntgenaufnahmen in Röntgenkabinetten der Firma Faxitron X-Ray LLC (Lincolnshire, IL/USA) gefertigt. Bei dem analogen Gerät Xray sterile wurde dabei eine Röhrenspannung von 35 kV für 2 Sekunden eingestellt. Die belichteten Röntgenfilme wurden mit dem Filmentwickler Optimax 1170-1-0000 und Entwickler- und Fixierkonzentraten der Firma Adefo-Chemie GmbH (Neu-Isenburg, Deutschland) entwickelt und anschließend mit einem Flachbettscanner digitalisiert (vgl. beispielhaft Abbildung 8). Die digitalisierten Röntgenaufnahmen dienen zur radiologischen Beurteilung des Gesamtskeletts und insbesondere zur Detektion von frischen oder kallösen Frakturen als Krankheitszeichen.

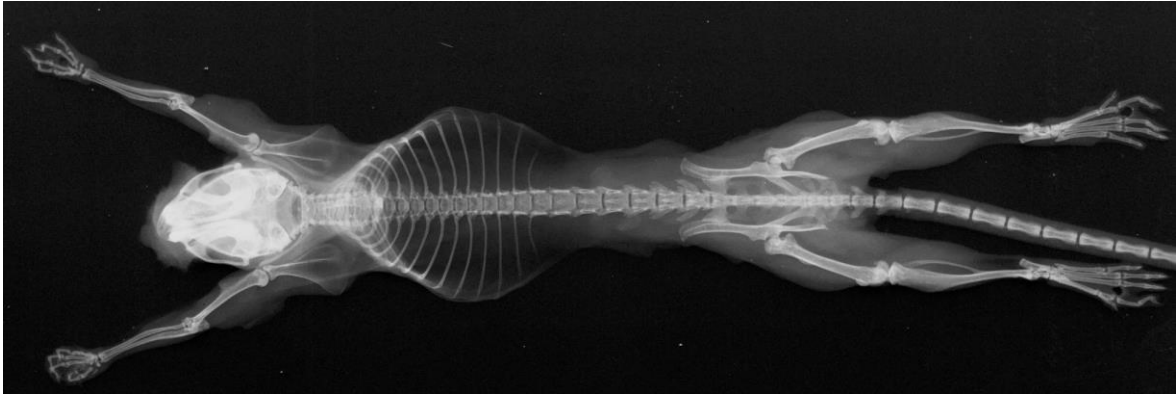


Abbildung 8: beispielhafte Kontaktströmungsaufnahme einer ALPL-KI-Maus

Nach Anfertigung der Röntgenaufnahmen wurde jeweils ein Femur freipräpariert und in einem speziell dafür am Institut für Osteologie und Biomechanik des UKE gefertigten Probenhalter per Mikro-Computertomographie (μ CT) untersucht. Der Probenhalter wurde im μ CT 40 (Scanco Medical AG, Wangen-Brüttisellen, Schweiz) mit der Längsachse orthogonal zur Strahlrichtung der Röntgenröhre platziert und mit einer Voxelgröße von 10 μ m gescannt. Das Gerät nahm 1000 Projektionen pro Schicht mit 2048 Abtastungen und 200 Millisekunden Abtastungszeit auf, die Röhrenenergie betrug 55 kVp und die Intensität 145 μ A. Die Schichten wurden von der zugehörigen Software rekonstruiert und damit untersucht. Ebenfalls in dieser Software wurden 3D-Modelle der untersuchten Knochen erstellt. Dazu wurde das herstellerseitig vorgegebene Skript „UCT_EVALUATION6“ verwendet. Es wurden manuell Bereiche der Femora für die Auswertung des trabekulären und des kortikalen Knochens festgelegt; die Auswertung im Folgenden weiter definierter Strukturparameter erfolgte automatisch.

Für den trabekulären Knochen wurde in der distalen Metaphyse ein Volumen, welches sich 2500 μ m bis 500 μ m proximal der Wachstumsfuge befand, mit den Skripten

„UCT_EVALUATION6_MULTIAUTO“

sowie

„IPLV6_AUTOCONTOUR_DUALTH_GAUSS_SLIMIRR“

analysiert. Die Analyseparameter waren dabei:

Seg: 0.8|1|250|1000|6|0.8|1|250|1000|6|0.8|2|300|1000|6
Misc: 25|30|10|2|3|1

Dieselben Skripte kamen zur Analyse des kortikalen Knochens zum Einsatz. Das untersuchte Volumen wurde hierfür entlang einer Strecke von 1000 µm in der Mitte der Diaphyse definiert. Es wurden folgende Analyseparameter angewandt:

Seg: 0.8|1|300|1000|6|0.8|1|300|1000|6|0.8|2|350|1000|6|0.8|2|350|1000|6
 Misc: 10|20|1|1|0|

Entsprechend der standardisierten Nomenklatur der American Society for Bone Mineral Research (ASBMR) konnten so die in Tabelle 21 dargestellten dreidimensionalen histomorphometrischen Parameter erhoben werden (Dempster et al. 2013).

Tabelle 21: Histomorphometrieparameter nach Richtlinien der ASBMR im µCT

Bezeichnung	Abkürzung	Einheit
Bone Volume	BV	mm ³
Bone Volume Fraction	BV/TV	%
Cortical Porosity	Ct.Por	%
Cortical Thickness	Ct.Th	mm
Cortical Tissue Mineral Density	Ct.TMD	mg HA/cm ³
Tissue Volume	TV	mm ³
Trabecular Number	Tb.N	1/mm
Trabecular Separation	Tb.Sp	mm
Trabecular Thickness	Tb.Th	mm
Trabecular Tissue Mineral Density	Tb.TMD	mg HA/cm ³

Die Maße der Mineralisierungsdichte Tb.TMD und Ct.TMD wurden automatisch entsprechend des softwareeigenen Algorithmus aus den Strahlenabsorptionswerten des untersuchten Knochengewebes ermittelt (Bouxsein et al. 2010). Auch die übrigen abgeleiteten Messwerte wurden automatisch von der Analysesoftware auf Basis der folgenden allgemeinen Formeln ermittelt:

$$Ct.Por = BV/TV^{-1}$$

$$Tb.N = \frac{BV/TV}{Tb.Th}$$

$$Tb.Sp = \frac{1}{Tb.N} - Tb.Th$$

2.2.2.4 Histologie

Für die histologische Aufarbeitung wurden den fixierten Kadavern nach Fertigung der Röntgenaufnahmen die zusammenhängenden Wirbelkörper L1 bis L4 sowie jeweils eine Tibia, idealerweise mit Fibula, entnommen. Fixierung, Färbung und Schnitt der Proben wurden von den technischen Assistentinnen des Instituts für Osteologie und Biomechanik in standardisierter Vorgehensweise durchgeführt und die fertigen Schnitte freundlicherweise zur Analyse zur Verfügung gestellt. Es wurden für jede Probe von Wirbelkörpern und Tibia jeweils zwei Präparate mit je 2 Schnitten und einer Schichtdicke von je 4 μm sowie ein Präparat mit je 2 Schnitten und einer Schichtdicke von je 12 μm angefertigt.

Die Färbung der 4 μm dicken Schnitte entsprach der Von Kossa/Van Gieson-Färbung, einer Versilberungsfärbung, bei der mineralisierter Knochen schwarz, Osteoid und Bindegewebe rot und Muskeln und Erythrozyten gelb zur Darstellung kommen (Bonewald et al. 2003; Tripp und Mackay 1972), und erlaubte die Ermittlung struktureller Histomorphometrieparameter. Alle in diesem Verfahren angefertigten Schnitte wurden mithilfe der Axiocam montiert auf einem Axioscope Mikroskop mit 1,25x Objektiv (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einer Auflösung von 3200 x 2030 Pixel für die weitere Auswertung digitalisiert.

Die 12 μm dicken Schnitte wurden nicht gefärbt, da die Beurteilung kinetischer Histomorphometrieparameter, insbesondere der Knochenformationsrate, durch den vitalen Mäusen injizierten und sich folglich am wachsenden Knochen anlagernden Fluoreszenzfarbstoff Calcein ohne weitere Aufbereitung möglich war (Porter et al. 2017). Aufgrund der Lichtsensibilität der Schnitte erfolgte die Lagerung lichtgeschützt.

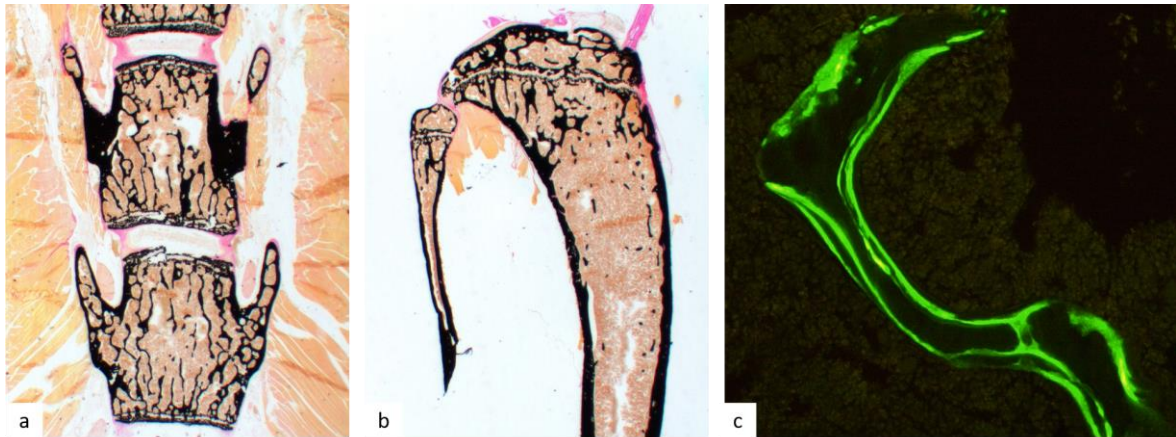


Abbildung 9: beispielhafte Histologische Schnitte. a) Lendenwirbelkörper, gefärbt nach Von Kossa/Van Gieson, 1,25x Vergrößerung. b) Tibia und Fibulafragment, gefärbt nach Von Kossa/Van Gieson, 1,25x Vergrößerung. c) Calceineinlagerungen in neu formiertem Knochen unter Fluoreszenzlicht (Ex 495 nm, Em 515 nm), 10x Vergrößerung

2.2.2.5 Histomorphometrie

Allgemein wird zwischen struktureller, zellulärer und kinetischer Histomorphometrie unterschieden (Malhan et al. 2018; Revell 1983). Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Ergebnisse struktureller Histomorphometrie ausgewertet; die zelluläre und kinetische Histomorphometrie soll im Rahmen von Nachfolgearbeiten erfolgen und wurde entsprechend Abschnitt 2.2.2.6 vorbereitet.

Die strukturelle Histomorphometrie erfolgte einerseits durch Auswertung der μ CT wie in Abschnitt 2.2.2.5 beschrieben, andererseits durch semiautomatische Analyse der nach Von Kossa/Van Gieson gefärbten histologischen Schnitte. Hierzu wurden die Wirbelkörper L3 und L4 in diesen Schnitten in der BIOQUANT OSTEO 2020 Software mit einem Schwellenwert zur Erkennung von Knochengewebe von 110 im Rot-Kanal vermessen. Diese Analyse ergab die Parameter BV/TV, Tb.Th, Tb.N sowie Tb.Sp (s. Tabelle 21).

2.2.3 Statistische Auswertung und Ergebnisdarstellung

Die statistische Auswertung aller Ergebnisse erfolgte in der GraphPad Prism® Software nach vorausgegangener Beratung durch das Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie des UKE (Leitung: Prof. Dr. Heiko Becher). Für Vergleiche von zwei Gruppen wurde nach einem orientierenden Varianzvergleich ein zweiseitiger Student's t-Test durchgeführt. Vergleiche von mehr als zwei

Gruppen wurden bei nicht gepaarten Proben als One-way ANOVA, bei gepaarten Proben als Repeated-Measure One-Way ANOVA durchgeführt. Dabei wurde eine Normalverteilung der Messwerte angenommen. Die Korrektur für Mehrfachtestung erfolgte durch Dunnett's Test.

Als α -Niveau für statistische Signifikanz wurde 5 % (entsprechend $p = 0,05$) festgelegt. Alle angegebenen p -Werte sind für Mehrfachtestung adjustiert. Die Abstufungen der Signifikanzniveaus können Tabelle 22 entnommen werden.

Tabelle 22: Signifikanzniveaus in dieser Arbeit und deren Darstellung in Graphiken.

p-Wert	Zeichenkodierung
< 0,05	*
< 0,005	**
< 0,0005	***
< 0,0001	****

Sofern nicht anders angegeben sind in den Abbildungen alle Ergebnisse als Mittelwert und 95 % Konfidenzintervall dargestellt. Die Darstellung der Ergebnisse in Tabellen und Abbildungen erfolgte immer im vollständigen Kontext der jeweiligen Mutation mit Hervorhebung der für den entsprechenden Abschnitt relevanten Teilergebnisse.

Für tabellarische Übersichten werden Messwerte mit zwei Dezimalstellen angegeben. Rohdaten mit mehr als zwei Dezimalstellen wurden durch Abschneiden gerundet.

Sind Aktivitätsveränderungen in % angegeben, so ist damit ohne weitere Angabe die absolute Differenz der Verhältnisse in Prozentpunkten gemeint.

3 Ergebnisse

3.1 Erfassung der AP-Enzymaktivität in vitro

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase aus MC3T3-E1-Zellen für ausgewählte ALPL-Varianten sowie pCMV6-Entry wurde wie in Abschnitt 2.2.1.5 beschrieben untersucht. Aufgrund der nach dreimaliger Durchführung konsistent nicht verwertbaren Ergebnisse der Proteinkonzentrationsbestimmung, a.e. zurückzuführen auf insgesamt niedrige Proteinbiosynthese der MC3T3-E1-Zellen, und der geringen Relevanz für die Auswertung der Ergebnisse der Aktivitätsassays, wurde diese für spätere Versuche nicht mehr durchgeführt.

3.1.1 Verhalten von pCMV6-ALPL und pCMV6-Entry

Das Verhalten der AP-Varianten pCMV6-ALPL, entsprechend der Alkalischen Phosphatase vom Wildtyp, und pCMV6-Entry, entsprechend der inhärenten Alkalischen Phosphatase der MC3T3-E1-Zellen, wurde über alle durchgeführten Versuche aufgezeichnet und gepoolt ausgewertet (siehe Abbildung 10).

Für pCMV6-ALPL ergab sich eine hochsignifikante und mit 20,97 % relevante Erhöhung der Enzymaktivität nach Zugabe von Magnesiumchlorid, während hierunter bei pCMV6-Entry keine signifikante Aktivitätsänderung zu beobachten war. Die Zugabe von Zinkchlorid hatte ebenfalls keinen Einfluss auf pCMV6-Entry, hatte jedoch für pCMV6-ALPL eine hochsignifikante Aktivitätsreduktion um 66,84 % zur Folge. Die Zugabe von Strontiumranelat hatte keinen Einfluss auf die Enzymaktivität beider Varianten, wobei die statistische Signifikanz bei pCMV6-ALPL mit einem adjustierten p-Wert von 0,08 knapp verfehlt wurde. Für die statistische Zusammenfassung der Aktivitäten von pCMV6-ALPL und pCMV6-Entry siehe Tabelle 23.

Ergebnisse

Tabelle 23: Aktivitätsverhalten von pCMV6-ALPL und pCMV6-Entry

	Mittlere Differenz [%]	95%-CI [%]	Signifikanzniveau	p-Wert
pCMV6-ALPL				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	20,97	29,65 – 12,3	****	<0,0001
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-66,84	-59,39 – -74,29	****	<0,0001
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	10,66	22,5 – -1,18	ns	0,0847
pCMV6-Entry				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	1,27	4,04 – -1,50	ns	0,5347
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	0,65	2,92 – -1,62	ns	0,8192
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	-0,48	1,17 – -2,13	ns	0,8104

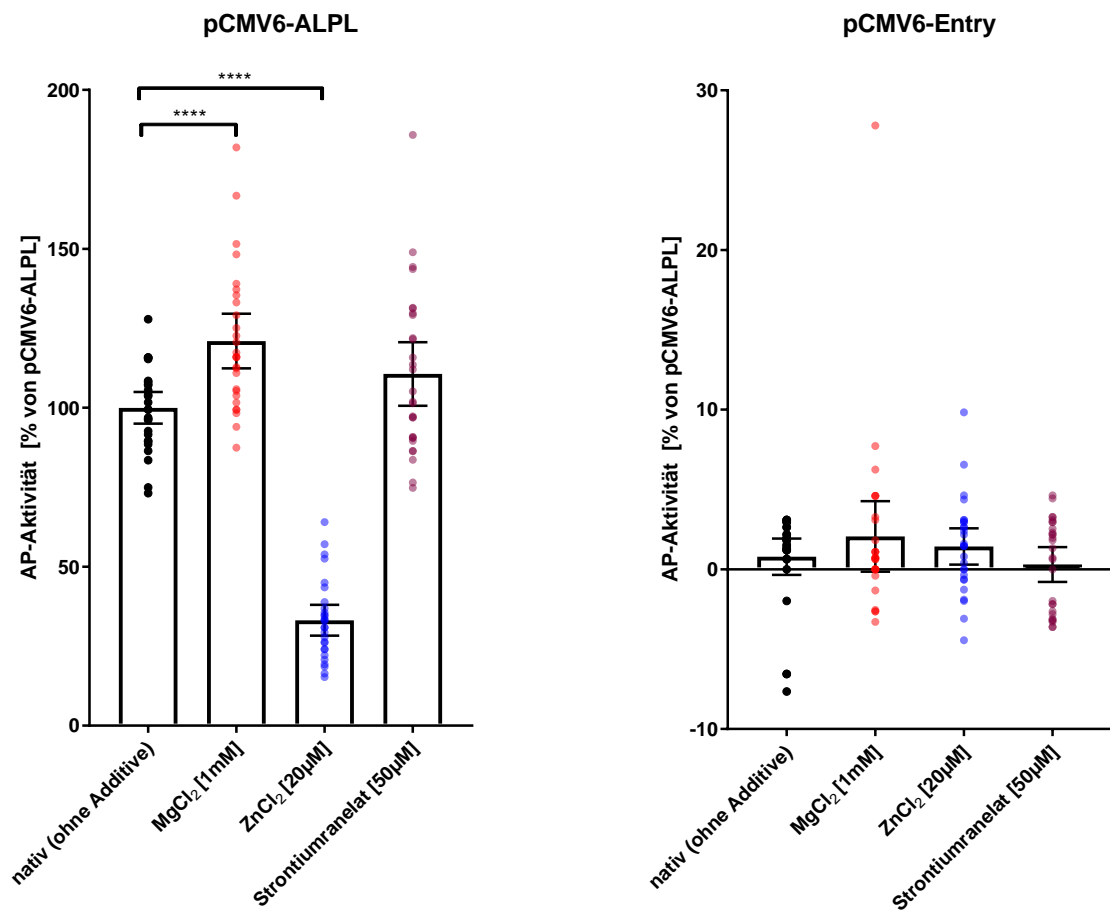


Abbildung 10: gepoolte Aktivität von pCMV6-ALPL und pCMV6-Entry über alle Versuche

3.1.2 Nativaktivität

Der nativen, also ohne Zusatz von Additiven, gemessenen Enzymaktivität kommt aus zweierlei Gründen besondere Bedeutung zu. Zum einen stellt diese die Grundaktivität der Alkalischen Phosphatase in unbehandelten Patienten mit Hypophosphatasie und damit einen – zumindest mechanistisch plausiblen – Marker für die Krankheitsschwere dar, andererseits bildet sie die rechnerische Grundlage für die Beeinflussbarkeit der Aktivität durch Additive. Die jeweiligen prozentualen Aktivitäten in Relation zur Wildtyp-AP pCMV6-ALPL sind in Tabelle 24 aufgelistet und in Abbildung 11 dargestellt.

Tabelle 24: native Aktivität der untersuchten ALPL-Varianten und pCMV6-Entry.

ALPL-Variante	Aktivität (% von pCMV6-ALPL)
pCMV6-ALPL	100,00
pCMV6-Entry	1,20
c.119C>T	3,55
c.212G>A	11,47
c.299C>T	3,94
c.340G>A	10,25
c.346G>T	7,97
c.394G>A	43,17
c.406C>T	3,70
c.407G>A	8,07
c.422C>A	23,39
c.500C>T	2,46
c.526G>A	18,24
c.535G>A	5,74
c.542C>T	2,46
c.661G>T	1,21
c.738G>T	1,90
c.746G>T	17,99
c.976G>C	1,58
c.1228T>C	3,96
c.1250A>G	0,60

Ergebnisse

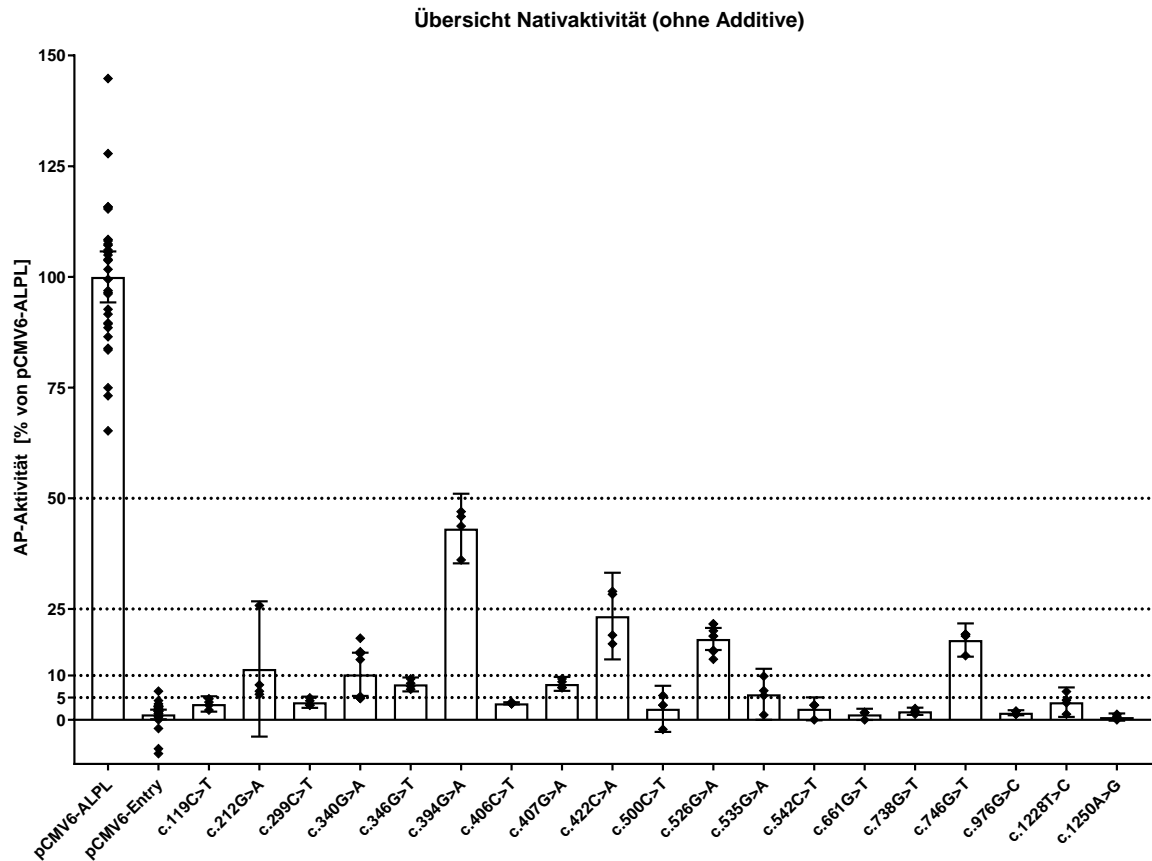


Abbildung 11: Übersicht aller untersuchten ALPL-Varianten sowie pCMV6-Entry hinsichtlich ihrer nativen Aktivität. Für pCMV6-ALPL und pCMV6-Entry sind die gepoolten Ergebnisse aller Versuche dargestellt.

Die Aktivität von pCMV6-Entry als Marker der inhärenten AP-Aktivität der MC3T3-E1-Zellen betrug 1,2 %. Die Spannweite der residuellen Aktivität der untersuchten Mutationen lag zwischen 0,6 und 43,17 %. Dabei wiesen sechs Varianten eine Aktivität von mehr als 10 % der Wildtypaktivität auf; die enzymatisch aktivste HPP-assoziierte Variante war c.394G>A.

3.1.3 Aktivitätssteigerung durch MgCl₂

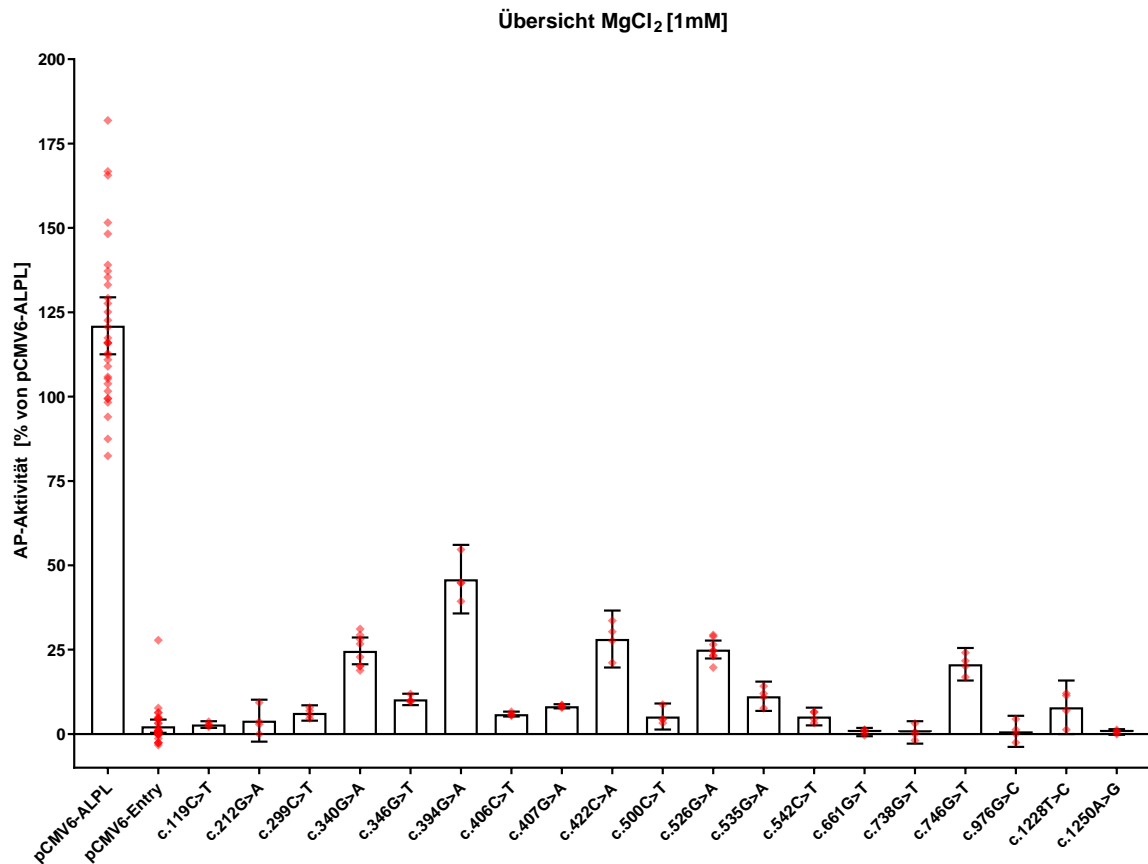


Abbildung 12: Übersicht der Aktivität aller untersuchten Mutationen sowie pCMV6-ALPL und pCMV6-Entry nach Zugabe von 1 mM MgCl₂. Für pCMV6-ALPL und pCMV6-Entry ist die gepoolte Aktivität über alle Versuche dargestellt.

Einen Überblick über alle untersuchten Varianten und deren Aktivität nach Zugabe von 1 mM MgCl₂ gibt Abbildung 12.

Im Rahmen der Aktivitätsassays konnte bei fünf Mutationen eine Steigerung der AP-Aktivität nach Zugabe von 1 mM MgCl₂ zum Reaktionsansatz nachgewiesen werden. Die entsprechenden Varianten waren (vgl. Tabelle 25 und Abbildung 13):

- c.340G>A (nativ 10,25 %, nach MgCl₂ 24,67 %, 2,4-fache Steigerung)
- c.346G>T (nativ 7,97 %, nach MgCl₂ 10,27 %, 1,3-fache Steigerung)
- c.406C>T (nativ 3,67 %, nach MgCl₂ 5,92 %, 1,6-fache Steigerung)
- c.526G>A (nativ 18,24 %, nach MgCl₂ 25,05 %, 1,4-fache Steigerung)
- c.542C>T (nativ 2,46 %, nach MgCl₂ 5,19 %, 2,1-fache Steigerung)

Ergebnisse

Tabelle 25: Aktivitätsverhalten derjenigen Mutationen, welche nach Zugabe von MgCl₂ mit einer Aktivitätssteigerung reagieren. Die Aktivitätsveränderung nach MgCl₂ in Relation zur Nativaktivität ist grau hinterlegt.

	Mittlere Differenz [%]	95%-CI [%]	Signifikanzniveau	p-Wert
c.340G>A				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	14,42	24,32 – 4,52	**	0,0087
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-1,31	9,19 – -11,82	ns	0,9646
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	12,77	23,81 – 1,73	*	0,0267
c.346G>T				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	2,30	3,58 – 1,02	**	0,0099
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-2,62	-0,13 – -5,12	*	0,0435
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	1,15	3,54 – -1,24	ns	0,263
c.406C>T				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	2,21	2,88 – 1,54	**	0,0017
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	2,87	7,01 – -1,26	ns	0,1227
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	0,49	2,16 – -1,17	ns	0,5371
c.526G>A				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	6,81	10,96 – 2,66	**	0,0045
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-9,27	-6,10 – -12,44	***	0,0002
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	-7,76	-3,43 – -12,09	**	0,0028
c.542C>T				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	2,73	5,06 – 0,40	*	0,0327
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-2,18	3,19 – -7,56	ns	0,3504
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	1,63	6,10 – -2,82	ns	0,4076

Ergebnisse

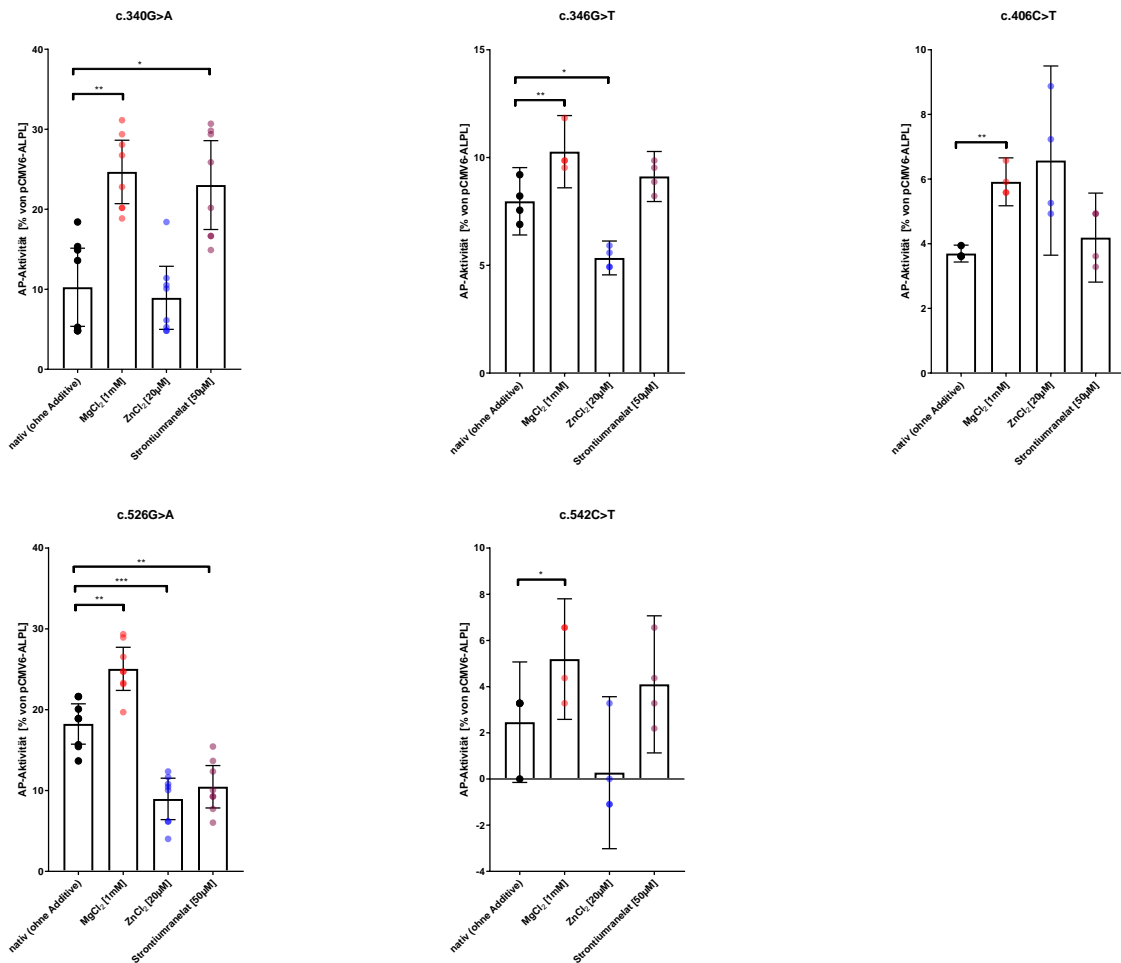


Abbildung 13: Aktivitätsverhalten der auf MgCl₂ mit Aktivitätssteigerung reagierenden Mutationen.

Aufgrund der ausgeprägten und damit möglicherweise klinisch relevanten 2,4-fachen Aktivitätssteigerung der Variante c.340G>A wurde ein Dosisfindungsversuch mit MgCl₂-Konzentrationen zwischen 0,01 und 3 mM unternommen. Als Referenz erfolgte der gleiche Versuch mit Zelllysat von pCMV6-ALPL-transfizierten Zellen. Das Ergebnis ist in Abbildung 14 dargestellt. Auffallend ist, dass die Aktivität von c.340G>A bei Magnesiumkonzentrationen von weniger als 0,1 mM unter die Nativaktivität abfällt und die initial beschriebene Aktivitätssteigerung nicht reproduzierbar war. Die stärkste Aktivitätssteigerung erfährt diese Variante zwischen 0,3 und 1 mM MgCl₂; für die Wildtyp-AP liegt der Bereich des stärksten Aktivitätsanstiegs zwischen 0,03 und 0,3 mM.

Ergebnisse

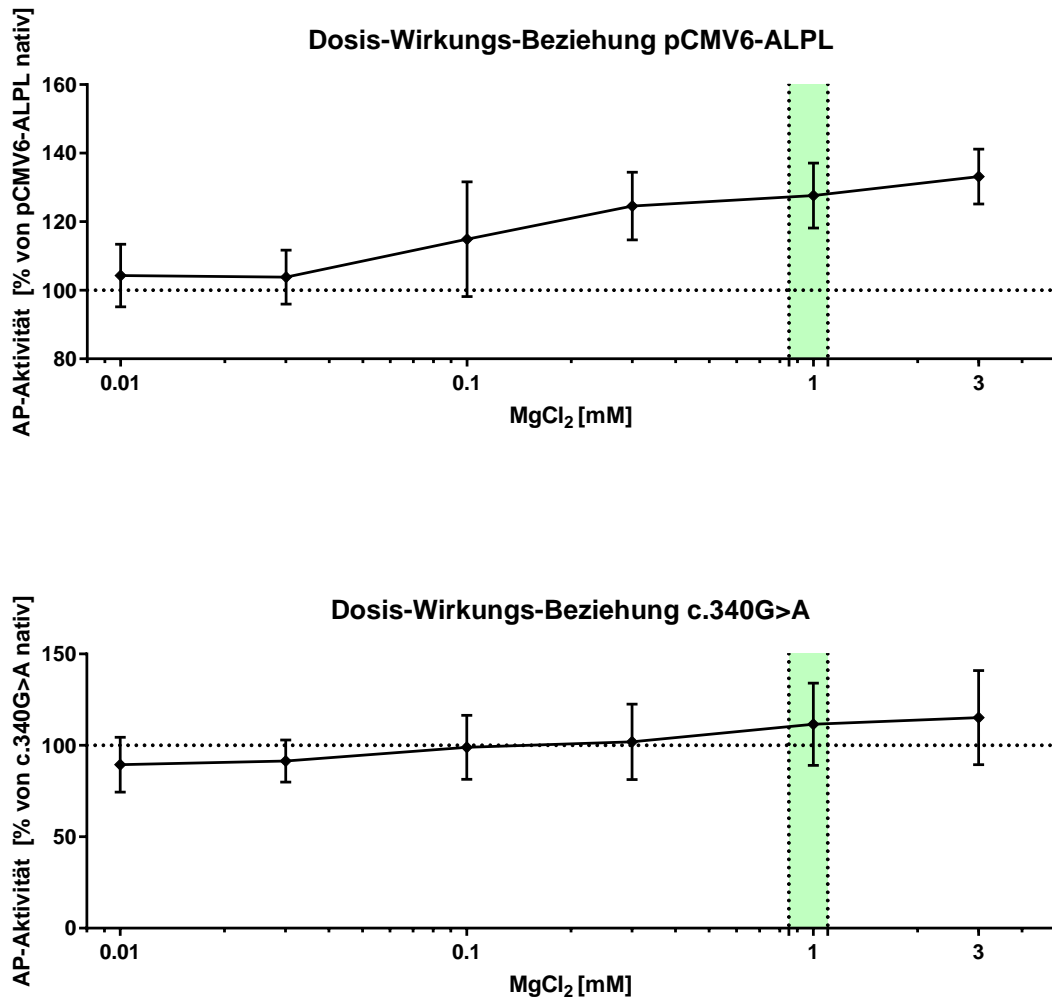


Abbildung 14: Dosis-Wirkungs-Beziehung für pCMV6-ALPL und c.340G>A nach Zugabe von MgCl₂. Der grün markierte Bereich entspricht dem physiologischen Magnesiumspiegel in humanem Serum (0,85 - 1,1 mM; Referenzbereich des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

3.1.4 Aktivitätsreduktion durch ZnCl_2

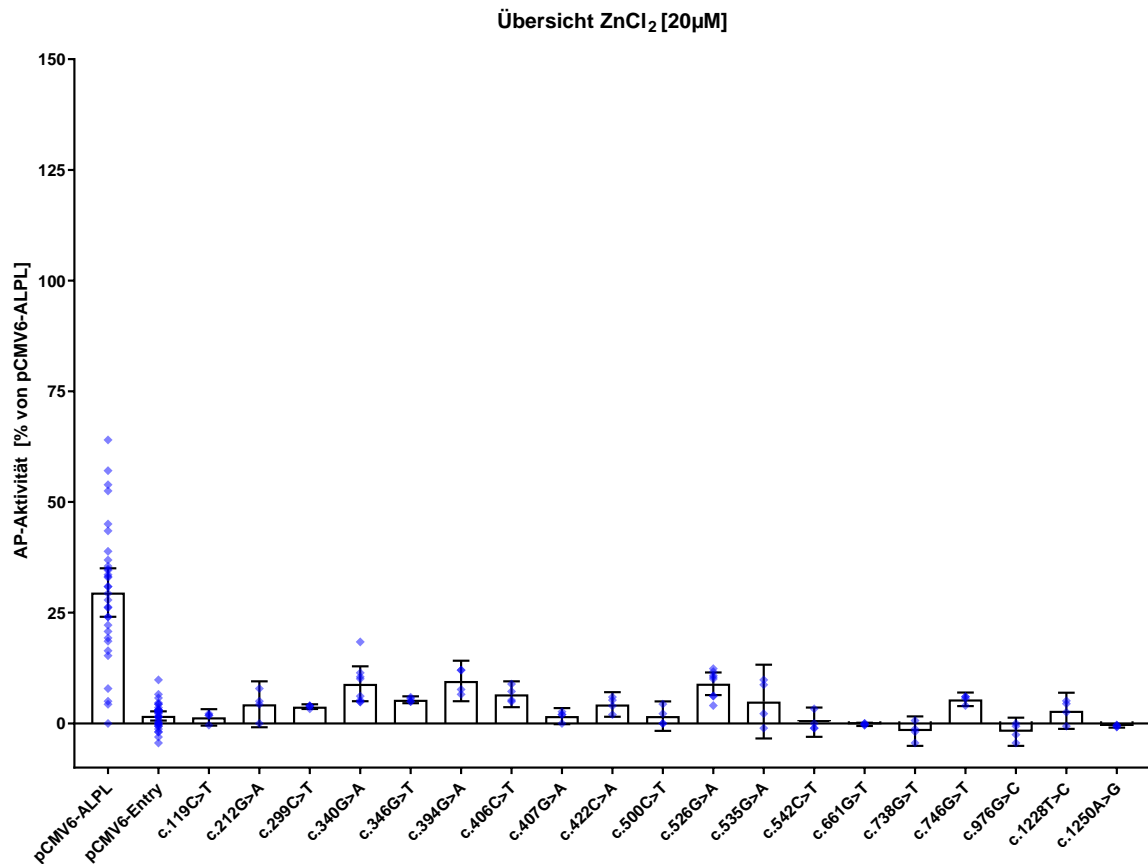


Abbildung 15: Übersicht der Aktivität aller untersuchten Mutationen sowie pCMV6-ALPL und pCMV6-Entry nach Zugabe von 20 μM ZnCl_2 . Für pCMV6-ALPL und pCMV6-Entry ist die gepoolte Aktivität über alle Versuche dargestellt.

Einen Überblick über die Aktivität aller untersuchten Varianten nach Zugabe von 20 μM ZnCl_2 bietet Abbildung 15.

Bei allen Varianten, bei denen eine statistisch signifikante Veränderung der Enzymaktivität zu beobachten war, kam es zu einer Aktivitätsreduktion um zwischen 1,80 % und 33,61 %. Am stärksten ausgeprägt fiel diese Absenkung der Aktivität bei der Mutation c.394G>A aus, welche gleichzeitig die höchste Nativaktivität aller untersuchten Mutationen aufwies (vgl. Abschnitt 3.1.2). Hier kam es zu einer etwa 4,5-fachen Verminderung des enzymkatalysierten Substratumsatzes von nativ 43,17 % auf 9,56 % nach Zugabe von ZnCl_2 . Ebenfalls relevant war die Reaktion von c.422C>A (23,39 % auf 4,28 %, etwa 5,4-fache Reduktion) und c.746G>T (17,99 % auf 5,42 %, etwa 3,3-fache Reduktion).

Ergebnisse

Tabelle 26: Aktivitätsverhalten derjenigen Mutationen, welche nach Zugabe von ZnCl₂ mit einer Aktivitätsreduktion reagieren. Die Aktivitätsveränderung nach ZnCl₂ in Relation zur Nativaktivität ist grau hinterlegt.

	Mittlere Differenz [%]	95%-CI [%]	Signifikanzniveau	p-Wert
c.119C>T				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	-0,72	0,94 – -2,40	ns	0,3142
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-2,18	-0,76 – -3,60	*	0,0154
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	-0,09	2,90 – -3,08	ns	0,9981
c.346G>T				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	2,30	3,58 – 1,02	**	0,0099
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-2,62	-0,13 – -5,12	*	0,0435
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	1,15	3,54 – -1,24	ns	0,263
c.394G>A				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	2,73	10,69 – -5,22	ns	0,4475
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-33,61	-23,66 – -43,56	**	0,0016
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	-3,00	12,25 – -18,27	ns	0,7557
c.407G>A				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	0,16	2,27 – -1,94	ns	0,9721
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-6,42	-3,76 – -9,08	**	0,0042
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	1,31	7,05 – -4,41	ns	0,6799
c.422C>A				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	4,77	13,39 – -3,83	ns	0,1995
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-19,11	-9,37 – -28,84	**	0,0077
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	-0,49	9,91 – -10,90	ns	0,9932
c.526G>A				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	6,81	10,96 – 2,66	**	0,0045
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-9,27	-6,10 – -12,44	***	0,0002
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	-7,76	-3,43 – -12,09	**	0,0028
c.746G>T				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	2,71	6,23 – -0,81	ns	0,0964
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-12,56	-6,82 – -18,31	**	0,0056
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	-6,43	-3,07 – -9,78	**	0,0082
c.1250A>G				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	-0,60	0,50 – -1,70	ns	0,2067
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-1,80	-0,16 – -3,45	*	0,0386
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	-3,92	-1,66 – -6,17	*	0,0109

Für eine graphische Darstellung der acht Mutationen, welche nach ZnCl₂-Zugabe eine signifikante Aktivitätsreduktion zeigten, siehe Abbildung 16. Für die Mutationen c.119C>T, c.407G>A und c.1250A>G kommen hierbei Aktivitätswerte unter 0 % zur Darstellung. Dies ist auf die Berechnungsmethode der Enzymaktivität im

Ergebnisse

eingesetzten Assay zurück zu führen (vgl. Abschnitt 2.2.1.5) und kein Ausdruck einer tatsächlichen Umkehr der enzymatischen Reaktion.

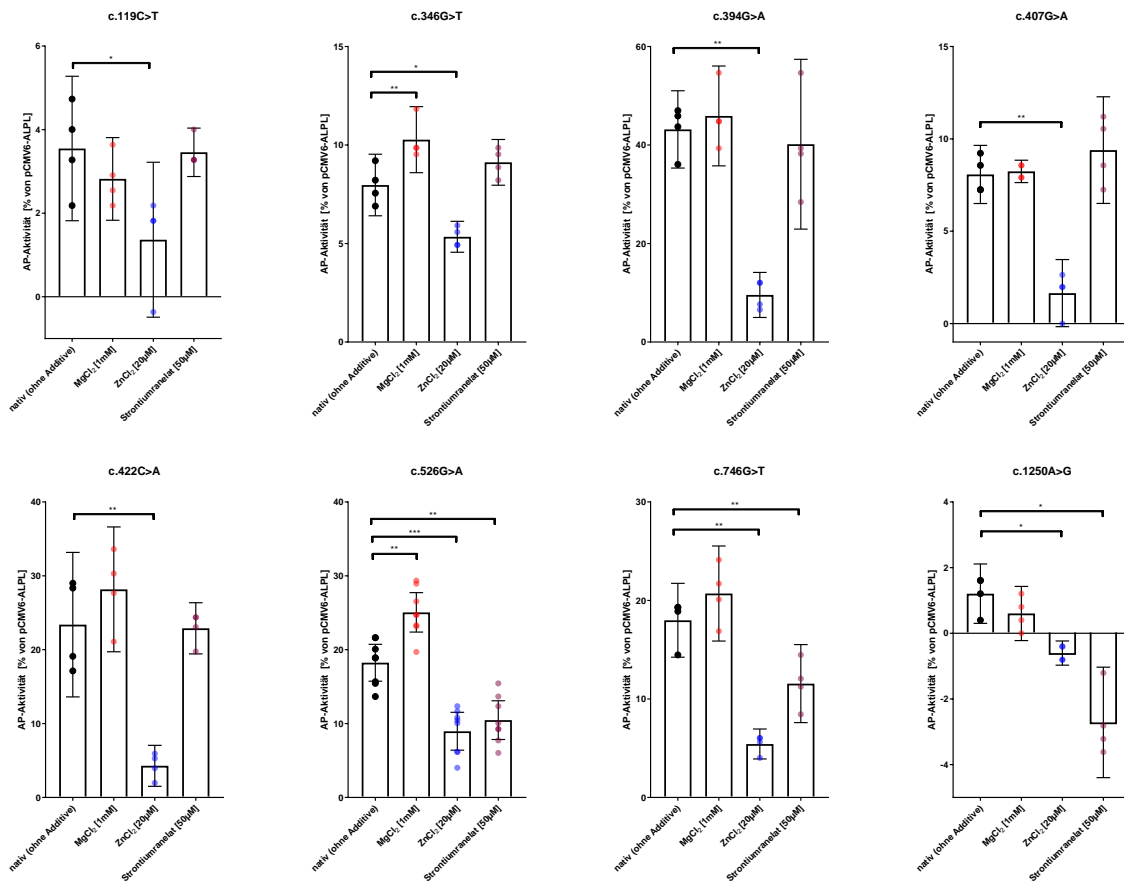


Abbildung 16: Aktivitätsverhalten der auf ZnCl₂ mit Aktivitätsreduktion reagierenden Mutationen.

3.1.5 Auswirkung von Strontiumranelat

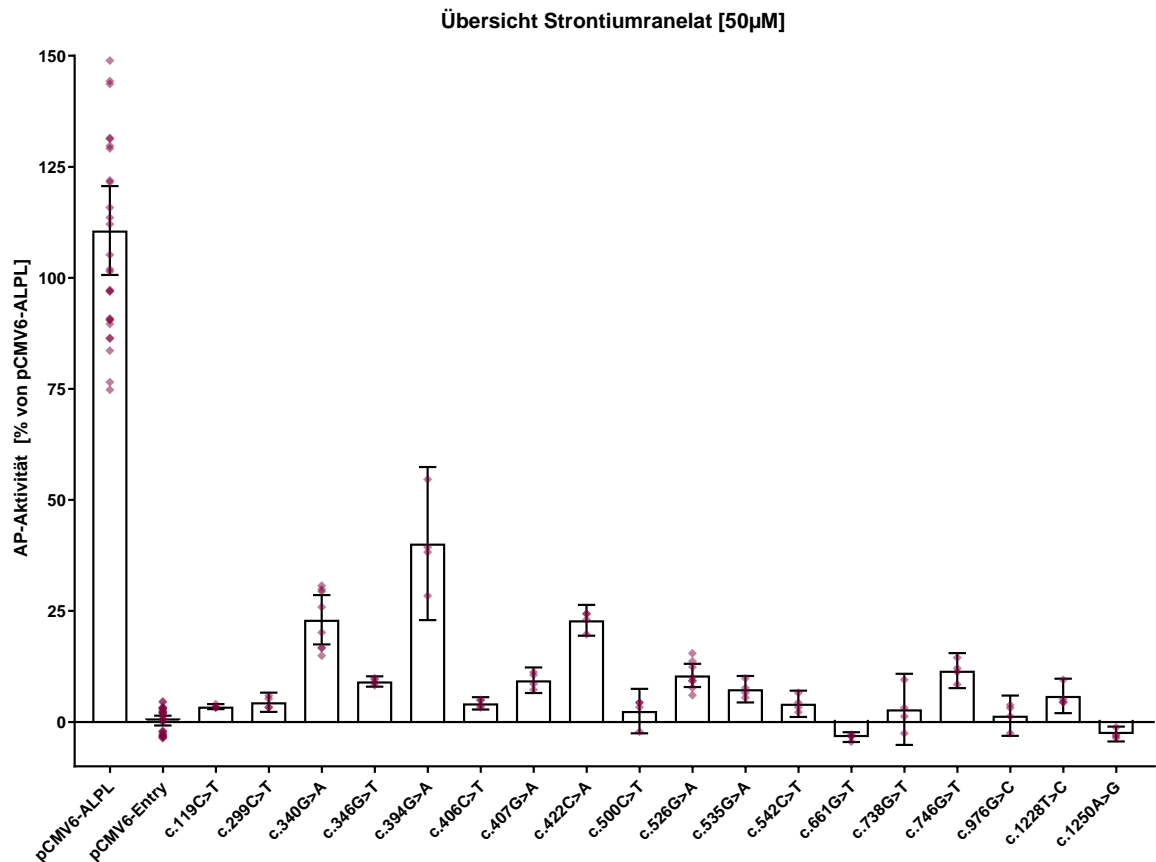


Abbildung 17: Übersicht der Aktivität aller untersuchten Mutationen sowie pCMV6-ALPL und pCMV6-Entry nach Zugabe von 50 µM Strontiumranelat. Für pCMV6-ALPL und pCMV6-Entry ist die gepoolte Aktivität über alle Versuche dargestellt.

Einen Überblick über die Aktivität aller untersuchten Varianten nach Zugabe von 50 µM Strontiumranelat bietet Abbildung 17.

Strontiumranelat als Additiv zum Reaktionsansatz führte bei lediglich einer Mutation, c.340G>A, zu einer Steigerung der Enzymaktivität von nativ 10,25 % auf 24,67 % (etwa 2,4-fache Steigerung).

Bei den Mutationen c.526G>A, c.661G>T, c.746G>T sowie c.1250A>G kam es zu einem Absinken der AP-Aktivität um zwischen 1,4 % und 12,56 %. Von relevantem Ausmaß ist dieser Effekt bei c.526G>A (von nativ 18,24 % auf 8,97 %, etwa 2-fache Reduktion) und c.746G>T (von nativ 17,99 % auf 11,56 %, etwa 1,5-fache Reduktion).

Ergebnisse

Tabelle 27: Aktivitätsverhalten derjenigen Mutationen, welche nach Zugabe von Strontiumranelat mit einer Aktivitätsveränderung reagieren. Die Aktivitätsveränderung nach ZnCl₂ in Relation zur Nativaktivität ist grau hinterlegt.

	Mittlere Differenz [%]	95%-CI [%]	Signifikanzniveau	p-Wert
c.340G>A				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	14,42	24,32 – 4,52	**	0,0087
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-1,31	9,19 – -11,82	ns	0,9646
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	12,77	23,81 – 1,73	*	0,0267
c.526G>A				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	6,81	10,96 – 2,66	**	0,0045
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-9,27	-6,10 – -12,44	***	0,0002
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	-7,76	-3,43 – -12,09	**	0,0028
c.661G>T				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	-0,60	0,25 – -1,46	ns	0,1191
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-1,40	0,07 – -2,89	ns	0,0574
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	-4,62	-4,12 – -5,11	****	<0,0001
c.746G>T				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	2,71	6,23 – -0,81	ns	0,0964
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-12,56	-6,82 – -18,31	**	0,0056
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	-6,43	-3,07 – -9,78	**	0,0082
c.1250A>G				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	-0,60	0,50 – -1,70	ns	0,2067
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-1,80	-0,16 – -3,45	*	0,0386
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	-3,92	-1,66 – -6,17	*	0,0109

In Abbildung 18 sind die fünf Mutationen dargestellt, welche nach Addition von Strontiumranelat eine Aktivitätsveränderung zeigten. Für die Mutationen c.661C>T und c.1250A>G kommen hierbei Aktivitätswerte unter 0 % zur Darstellung. Dies ist wie in Abschnitt 3.1.4 auf die Berechnungsmethode der Enzymaktivität im eingesetzten Assay zurück zu führen (vgl. Abschnitt 2.2.1.5) und zeigt keine tatsächliche Umkehr der enzymatischen Reaktion an.

Ergebnisse

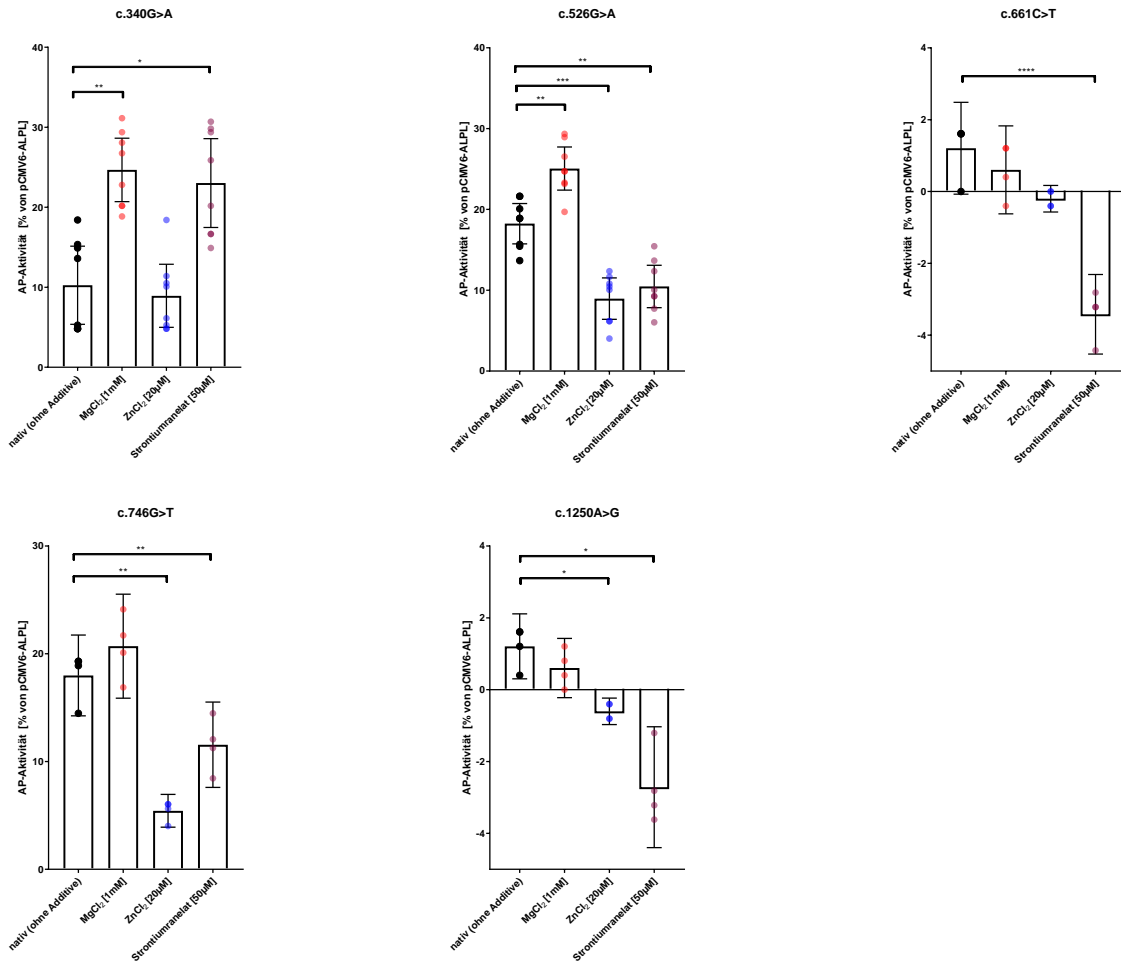


Abbildung 18: Aktivitätsverhalten der auf Strontiummanganat mit einer Aktivitätsveränderung reagierenden Mutationen.

3.1.6 Nicht responsive Mutationen

Für sieben der untersuchten Mutationen konnte keine Veränderung der AP-Aktivität durch eines der zugegebenen Additive beobachtet werden. Bei den entsprechenden Varianten handelt es sich um:

- c.212G>A
- c.299G>T
- c.500C>T
- c.535G>A
- c.738G>T
- c.976G>C
- c.1228T>C

Bemerkenswert ist, dass bei den Versuchen mit allen o.g. Mutationen eine vergleichsweise hohe Varianz der Einzelmesswerte auftrat.

Die statistische Übersicht des Aktivitätsverhaltens der o.g. AP-Varianten findet sich in Tabelle 28; für die graphische Darstellung siehe Abbildung 19.

Tabelle 28: Aktivitätsverhalten der nicht additivresponsiven Mutationen. Für c.212G>A konnte die Beeinflussbarkeit durch Strontiumranelat wegen methodischer Fehler nicht ausgewertet werden.

	Mittlere Differenz [%]	95%-CI [%]	Signifikanzniveau	p-Wert
c.212G>A				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	-7,52	16,36 – -31,41	ns	0,4634
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-7,16	16,92 – -31,25	ns	0,494
c.299C>T				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	2,30	5,63 – -1,03	ns	0,1247
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-0,16	2,15 – -2,48	ns	0,9788
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	0,49	1,70 – -0,72	ns	0,3504
c.500C>T				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	2,73	9,72 – -4,25	ns	0,372
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-0,81	10,33 – -11,97	ns	0,9764
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	2,5·10 ⁻⁹	1,90 – -1,90	ns	>0,9999
c.535G>A				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	5,46	18,91 – -7,98	ns	0,3504
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-0,81	16,65 – -18,29	ns	0,9934
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	1,63	8,62 – -5,34	ns	0,669

Ergebnisse

Tabelle 28 (fortgesetzt)

c.738G>T				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	-1,42	3,67 – -6,52	ns	0,5699
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-3,64	0,23 – -7,52	ns	0,0588
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	0,95	12,23 – -10,33	ns	0,9658
c.976G>C				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	-0,79	4,98 – -6,56	ns	0,8845
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-3,48	0,56 – -7,54	ns	0,0735
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	-0,15	5,61 – -5,93	ns	0,9986
c.1228T>C				
nativ vs. MgCl ₂ [1mM]	3,96	16,22 – -8,29	ns	0,4835
nativ vs. ZnCl ₂ [20µM]	-1,10	8,40 – -10,62	ns	0,9215
nativ vs. Strontiumranelat [50µM]	1,90	5,87 – -2,07	ns	0,2657

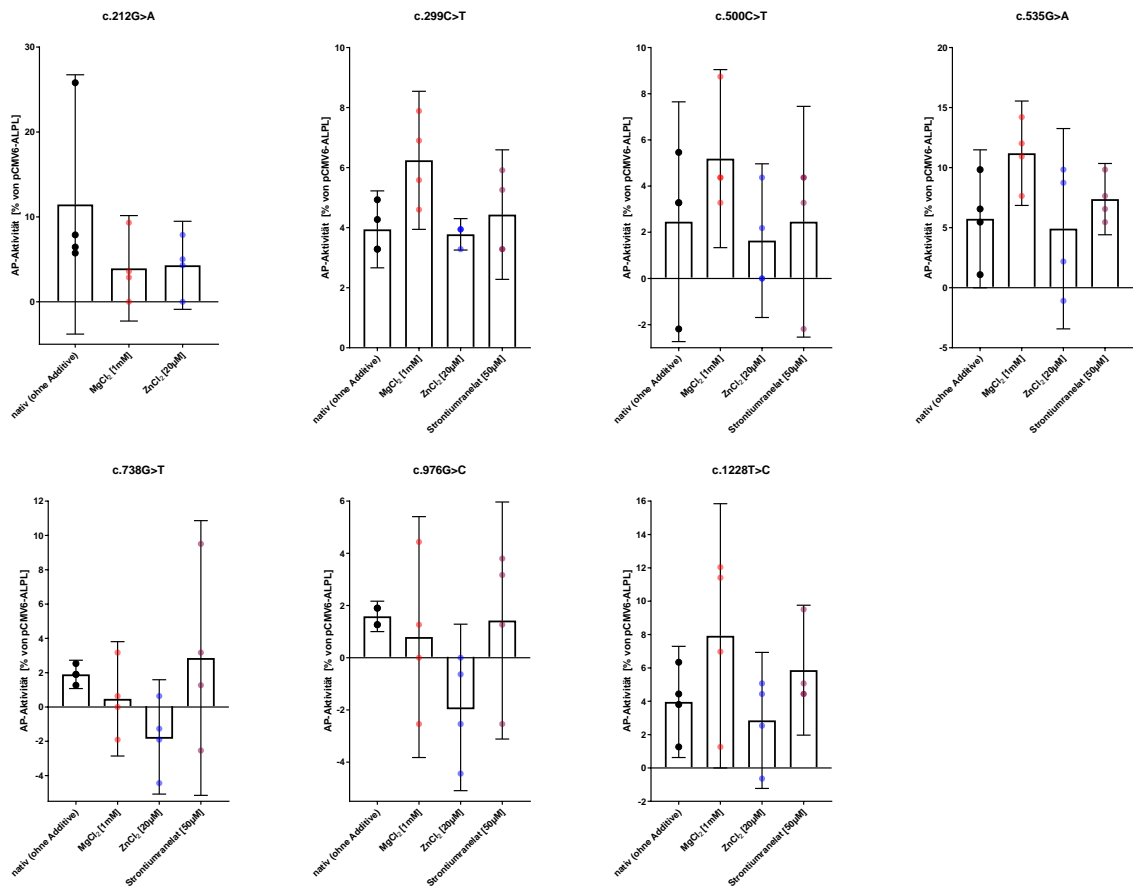


Abbildung 19: Aktivitätsverhalten der auf keines der zugegebenen Additive responsiven Mutationen. Für c.212G>A konnte die Beeinflussbarkeit durch Strontiumranelat wegen methodischer Fehler nicht ausgewertet werden.

3.2 Tierexperimentelle Ergebnisse

Die nach 12 Lebenswochen untersuchten $ALPL^{E191K}$ -Knockin-Tiere wurden entsprechend ihres *Alpl*-Genotyps in die drei Gruppen Wildtyp sowie für die Mutation E191K heterozygot und homozygot aufgeteilt und nach Geschlecht getrennt miteinander verglichen. Alle Tiere wiesen ein vergleichbares Körpergewicht auf, die Femurlänge wich in der heterozygoten Gruppe männlicher Tiere geringfügig nach unten ab (s. Abbildung 20). Bei den weiblichen Tieren war diese in allen Gruppen vergleichbar (s. Abbildung 21).

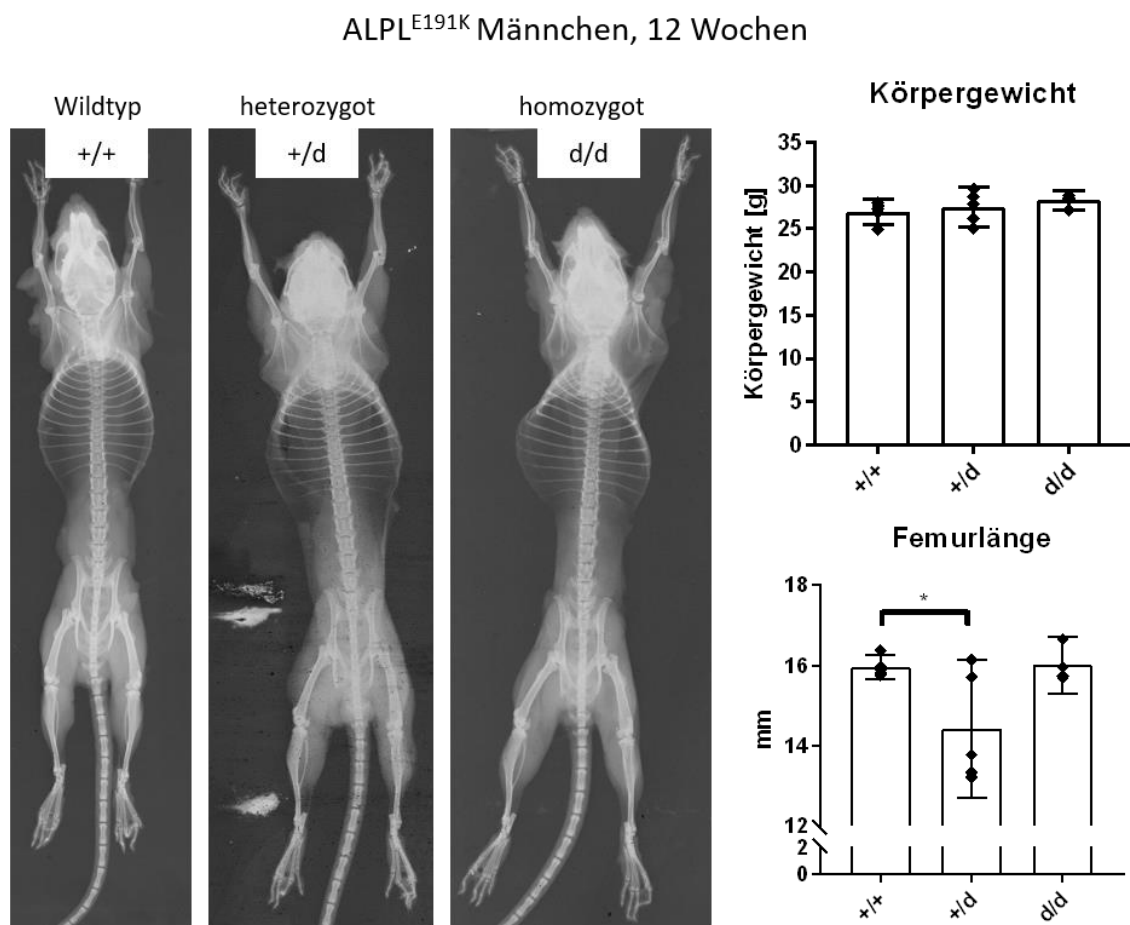


Abbildung 20: exemplarische radiographische Gegenüberstellung von männlichen Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten (v.l.) $ALPL^{E191K}$ -Mäusen im Alter von 12 Wochen (links) sowie Vergleich von Körpergewicht und Femurlänge der untersuchten Gruppen (rechts).

Radiographisch zeigten sich keine rachitischen Zeichen, insbesondere keine Achsabweichung der langen Röhrenknochen oder metaphysäre Auffälligkeiten (s. Abbildung 20, Abbildung 21).

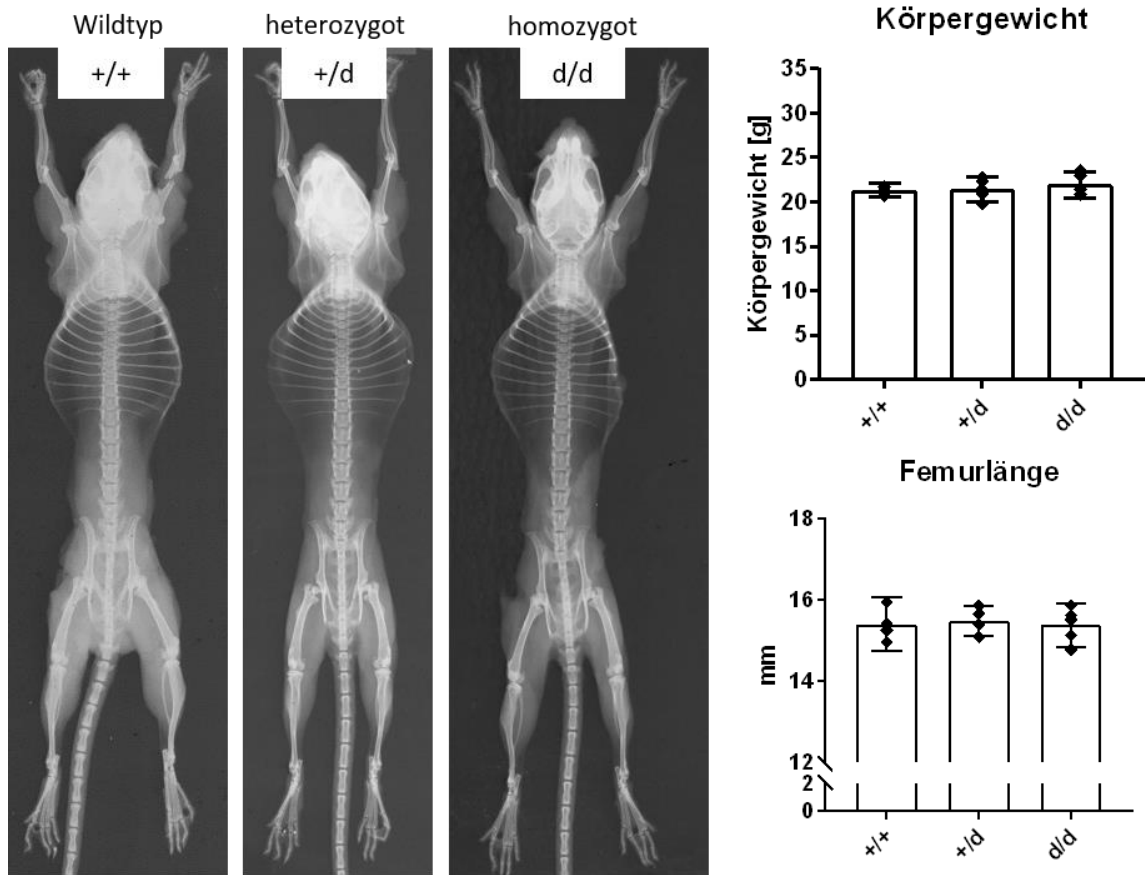
ALPL^{E191K} Weibchen, 12 Wochen

Abbildung 21: exemplarische radiographische Gegenüberstellung von weiblichen Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten (v.l.) ALPL^{E191K}-Mäusen im Alter von 12 Wochen (links) sowie Vergleich von Körpergewicht und Femurlänge der untersuchten Gruppen (rechts).

In der lumbalen und femoralen Histologie konnten für keine Gruppe Zeichen kortikaler oder trabekulärer Strukturminderung oder Mineralisationsdefekte nachgewiesen werden. In der semiautomatischen Auswertung der histomorphometrischen Parameter nach ASBMR zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Eine angedeutete Steigerung der Knochen-Gewebe-Ratio sowie der trabekulären Dicke und Anzahl bei Reduktion des trabekulären Abstandes bei männlichen heterozygoten Tieren konnte keine statistische Signifikanz erreichen. (s. Abbildung 22).

ALPL^{E191K} Männchen, 12 Wochen

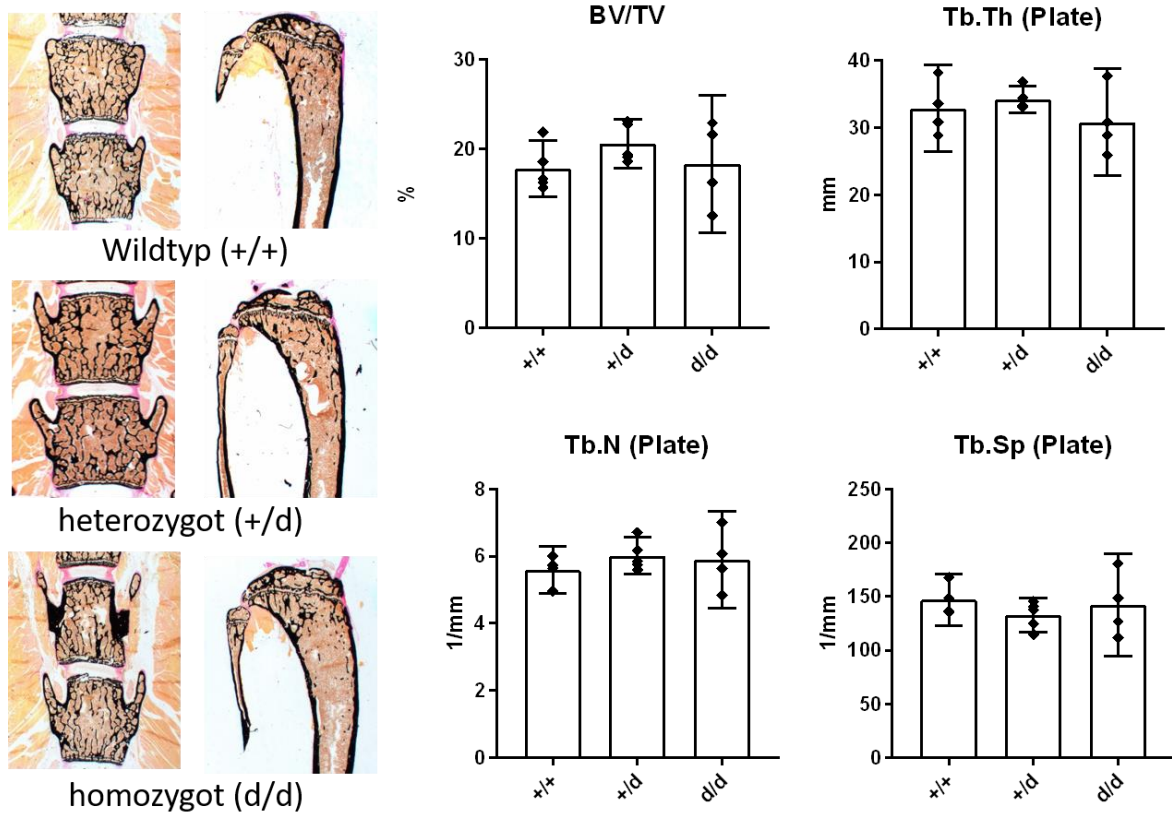


Abbildung 22: exemplarische histologische Gegenüberstellung von männlichen Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten (v.o.) ALPL^{E191K}-Mäusen im Alter von 12 Wochen (links) sowie statistische Darstellung der relevanten histomorphometrischen Parameter der untersuchten Gruppen (rechts).

Bei den weiblichen Tieren stellten sich alle drei Gruppen vergleichbar dar (s. Abbildung 23).

ALPL^{E191K} Weibchen, 12 Wochen

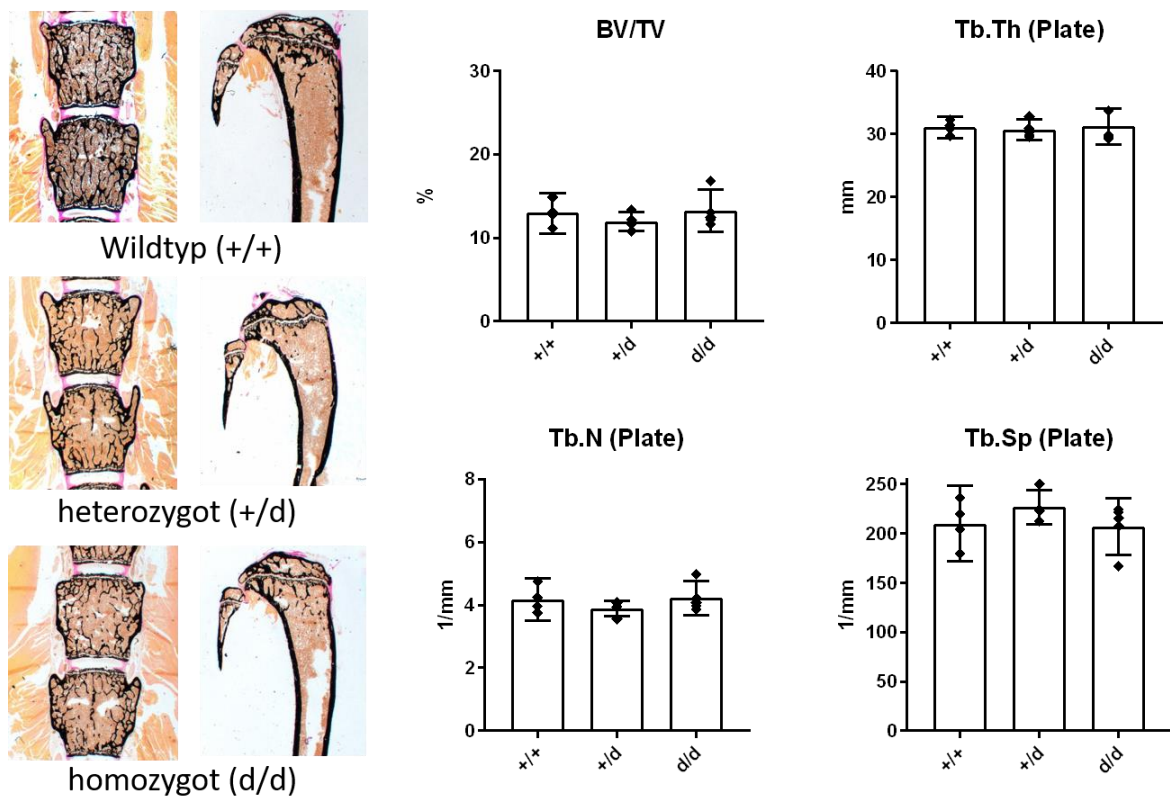


Abbildung 23: exemplarische histologische Gegenüberstellung von weiblichen Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten (v.o.) ALPL^{E191K}-Mäusen im Alter von 12 Wochen (links) sowie statistische Darstellung der relevanten histomorphometrischen Parameter der untersuchten Gruppen (rechts).

Die Serumaktivität der Alkalischen Phosphatase war in den mutationstragenden Tieren signifikant reduziert, mit stärkerem Effekt in der homozygoten Gruppe (s. Abbildung 24).

Ergebnisse

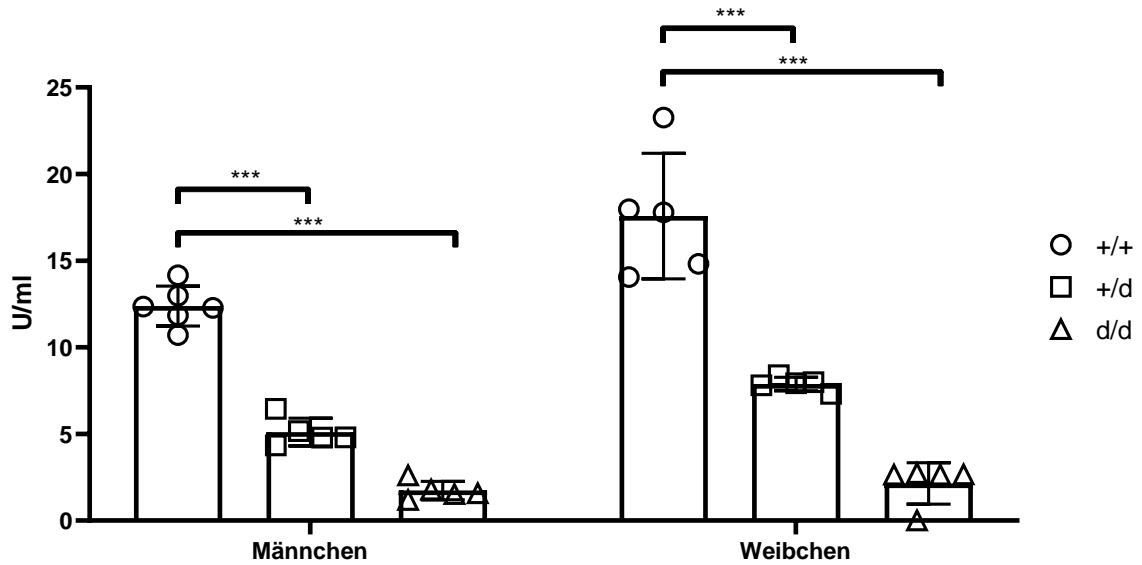


Abbildung 24: Serumaktivität der Alkalischen Phosphatase bei den untersuchten Tieren.

In der computertomographischen Untersuchung der Femora ergaben sich keine relevanten Unterschiede zwischen Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Tieren. Ein Trend zu erniedrigter kortikaler Dicke und Mineraleichte sowie trabekulärer Mineraleichte bei heterozygoten männlichen Mäusen erreichte bei starker Streuung der Einzelwerte keine statistische Signifikanz (s. Abbildung 25).

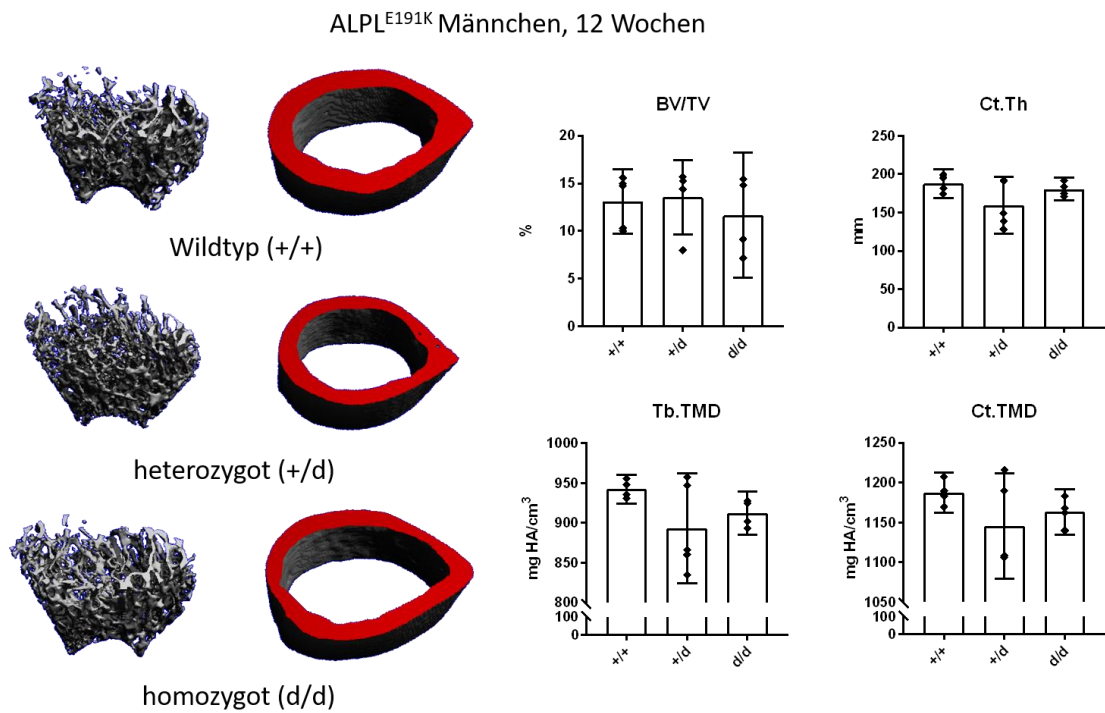


Abbildung 25: exemplarische computertomographische Gegenüberstellung von männlichen Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten (v.o.) ALPL^{E191K}-Mäusen im Alter von 12 Wochen (links) sowie statistische Darstellung der relevanten histomorphometrischen Parameter der untersuchten Gruppen (rechts).

Bei den weiblichen Tieren war dieser Trend nicht sichtbar (s. Abbildung 26).

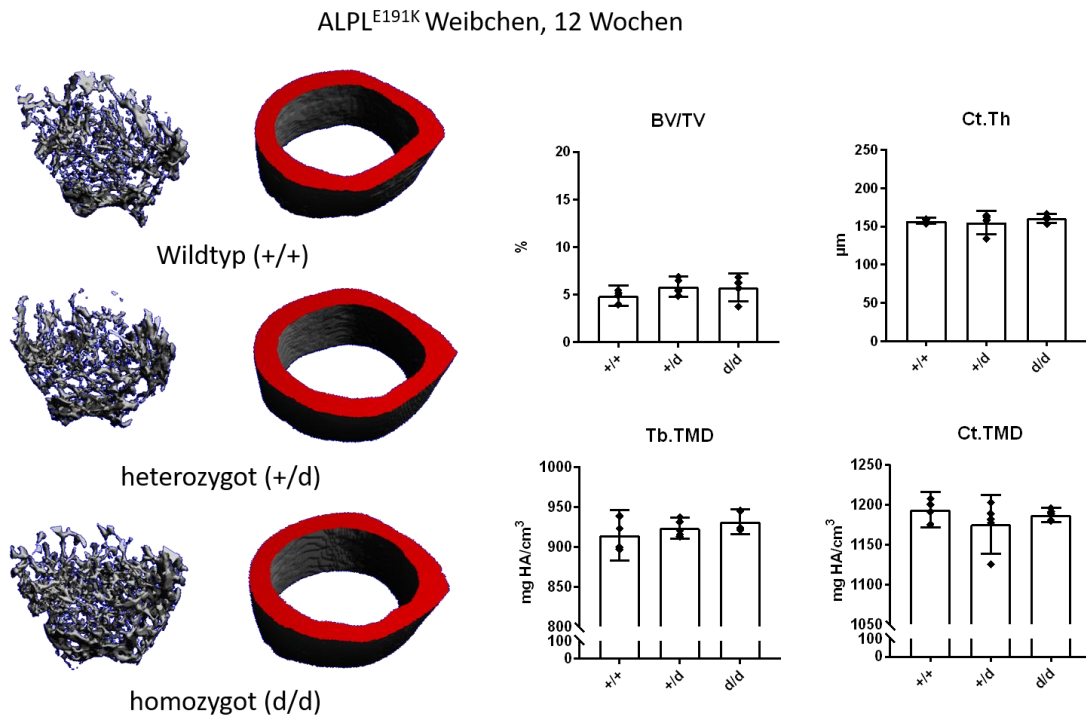


Abbildung 26: exemplarische computertomographische Gegenüberstellung von weiblichen Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten (v.o.) ALPLE191K-Mäusen im Alter von 12 Wochen (links) sowie statistische Darstellung der relevanten histomorphometrischen Parameter der untersuchten Gruppen (rechts).

Anekdotisch fielen in der radiographischen Untersuchung bei zwei homozygoten männlichen Tieren im Rahmen des standardisierten Präparationsverfahrens artifizielle knöcherne Ausrisse der Deckplatten thorakaler und lumbaler Wirbelkörper sowie kallöse Verdickungen der proximalen Rippen am ehesten als Ausdruck ausgeheilter Frakturen auf (s. Abbildung 27). Die histomorphometrische Untersuchung war für beide Tiere hinsichtlich der erhobenen Messwerte unauffällig.

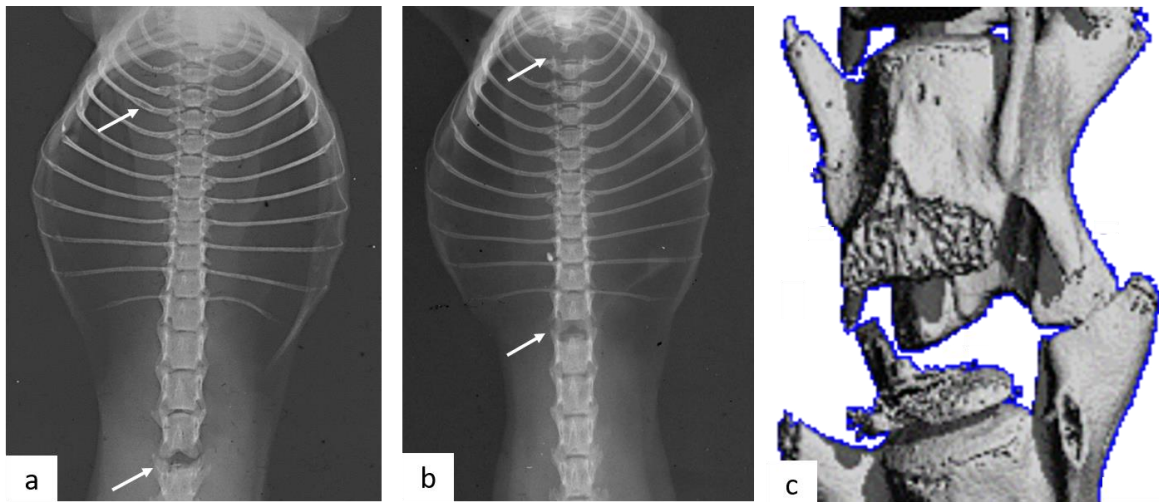


Abbildung 27: artifizielle Knochenveränderungen bei homozygoten $ALPL^{E191K}$ -Mäusen. a) Deckplattenausriss bei LWK 4 sowie kallöse Verdickung der proximalen vierten Rippe. b) Deckplattenausrisse bei BWK 2 und LWK 1. c) Computertomographische Rekonstruktion des knöchernen Ausrisses bei LWK 4.

4 Diskussion

Für erwachsene Patienten mit milder Hypophosphatasie stehen im klinischen Alltag bislang keine kausal ansetzenden Therapieoptionen zur Verfügung. Ziel dieser Arbeit war es, das Potential der Beeinflussbarkeit der AP-Aktivität für in Patienten des IOBM am UK-Eppendorf nachgewiesene HPP-assoziierte Mutationen im *ALPL*-Gen *in vitro* und *in vivo* im Mausmodell zu untersuchen. Hierzu wurde zellkulturell mutierte Alkalische Phosphatase gewonnen und mithilfe etablierter Assaysysteme untersucht. Ein Mausmodell als Träger der *Alpl*-Mutation c.571G>A wurde histomorphometrisch auf Zeichen skelettaler Anomalien untersucht.

Die Ergebnisse zur Magnesiumsubstitution insbesondere bei Vorhandensein der Mutationen c.340G>A und c.526G>A sind bemerkenswert. Hier konnte für beide Mutationen eine Steigerung der Enzymaktivität um mehr als das Doppelte gezeigt werden. Ein möglicher Mechanismus dieses Effekts ist der Austausch von Glycin zu Alanin in unmittelbarer Nähe des katalytischen Zentrums respektive der metallbindenden Domäne. Insgesamt zeigt sich bei den positiven Ergebnissen ein tendenzielles Muster bezüglich der Bindungsstellen der Alkalischen Phosphatase (vgl. Abbildung 28).

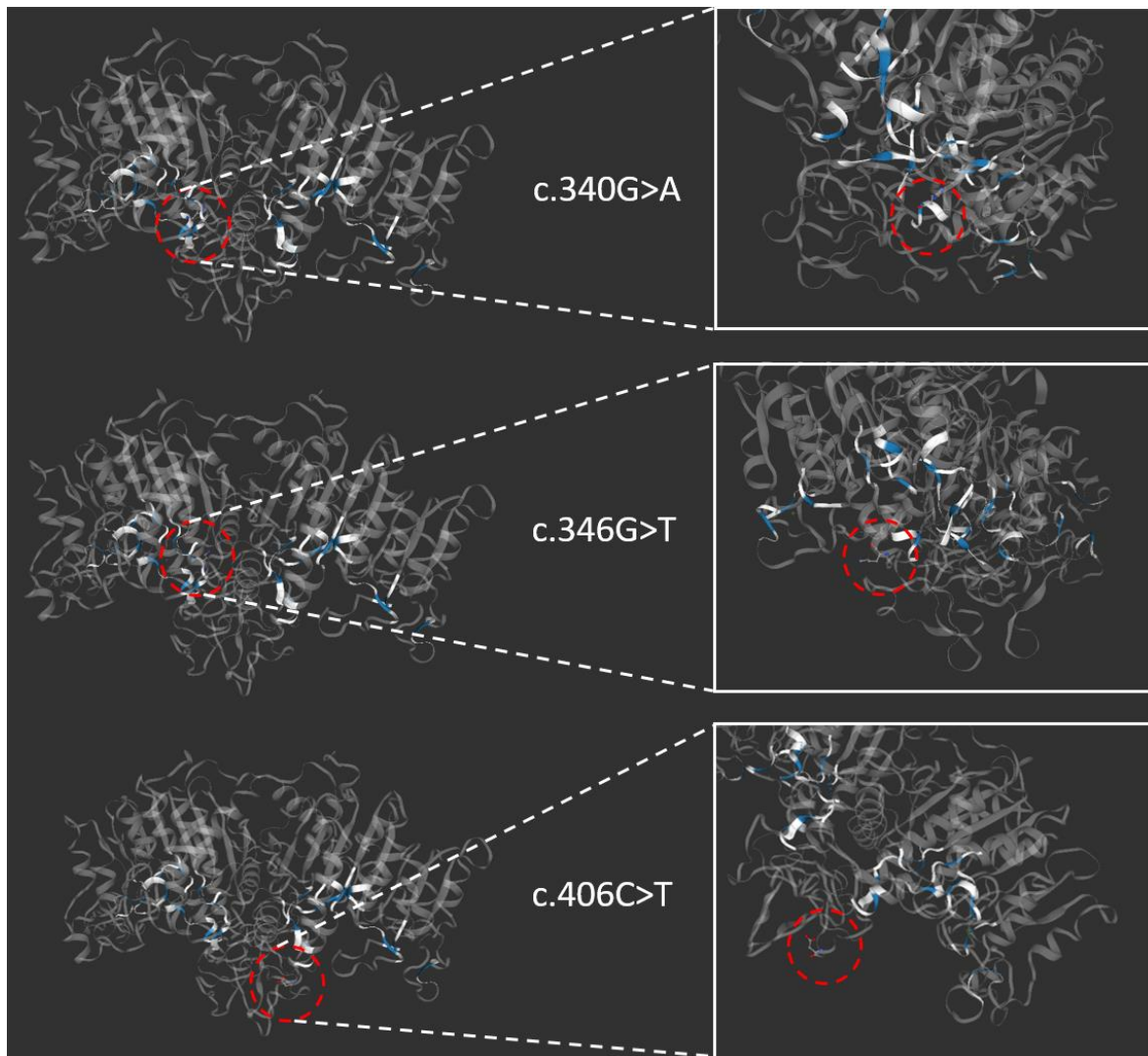


Abbildung 28: räumliche Anordnung der Mutationen c.340G>A, c.346G>T und c.406C>T (von oben nach unten) in Relation zu den metallbindenden Domänen und dem aktiven Zentrum (vgl. auch Abbildung 1).

Bildquelle: verändert nach <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P05186>, zuletzt abgerufen am 10.06.2023; Waterhouse et al. 2018

Eine relevante Limitation dieses Ergebnisses ist allerdings die fehlende Reproduzierbarkeit der Aktivitätssteigerung in der Dosis-Wirkungs-Messung für die Mutation c.340G>A. Auch der Verlauf der Aktivitätssteigerung über die steigende Magnesiumkonzentration schränkt den Nutzen der Ergebnisse ein. Der physiologische Bereich der Serum-Magnesiumkonzentration koinzidiert bei der Mutation c.340G>A bereits mit einer gesteigerten Enzymaktivität. Eine weitere Konzentrationssteigerung von Magnesium führte im Experiment nicht mehr zu einer relevanten Aktivitätssteigerung, im erniedrigten Konzentrationsbereich kam es sogar zu einer Reduktion der Aktivität. Unter Berücksichtigung der Limitationen von

in-vitro-Versuchen würde dies am ehesten zu der Empfehlung führen, betroffene Patientinnen und Patienten mit Magnesiummangel bis zum Erreichen laborchemischer Normwerte zu substituieren. Eine supraphysiologische Magnesiumsupplementation erscheint auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse möglicherweise mit einem geringen Nutzen verbunden. Deren Effektivität und Sicherheit müssen jedoch durch weitere, insbesondere *in vivo* durchgeführte Studien separat beurteilt werden, da eine möglicherweise resultierende Hypermagnesiämie wiederum eigene adverse gesundheitliche Effekte begründen kann (Aal-Hamad et al. 2023).

Für die Mutationen c.394G>A, c.422C>A und c.746G>T suggerieren die experimentellen Ergebnisse, dass eine Zinksubstitution zu einer aufgrund der gemessenen Effektstärke relevanten Aktivitätsreduktion führen könnte. Sollte diese Einschränkung der Enzymaktivität *in vivo* in vergleichbarem Ausmaß eintreten, so wäre bei diese Mutationen tragenden Patientinnen und Patienten von einer Verschlechterung des Krankheitsbildes auszugehen. Folglich wäre bei diesen Personen eine Ernährung mit niedrigem Zinkgehalt angezeigt. Einschränkend gilt zu bemerken, dass diese Folgerung allein aufgrund der vorliegenden Daten nicht getroffen werden kann. Es wäre zuvor notwendig einerseits zu überprüfen, ob der aktivitätseinschränkende Effekt von Zink bei den vorliegenden Mutationen auch *in vivo* zustande kommt. Andererseits bräuchte man für zielgerichtete Empfehlungen verlässliche Informationen darüber, welcher Zinkspiegel im Serum zur Optimierung der Enzymaktivität bei o.g. Mutationen beitragen würde. In eigenen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass bei 23,9 % der HPP-Patienten, die sich im IOBM in Behandlung befinden, ein Zinkmangel vorliegt, welcher im Rahmen der Therapie standardmäßig entsprechend aktueller Leitlinien substituiert wird (Berger et al. 2022; Wiedemann et al. 2023). Diese Praxis wäre vor dem Hintergrund der vorausgehend beschriebenen Überlegungen kritisch zu hinterfragen.

In Zusammenschau der in Abschnitt 3.1 dargestellten molekularbiologischen Ergebnisse ergibt sich in Summe ein sehr variables Verhalten verschiedener Hypophosphatasie-assoziiierter Mutationen in Anwesenheit der untersuchten Stoffe. Für den Großteil der Mutationen konnte keine relevante Beeinflussbarkeit der enzymatischen Aktivität gezeigt werden. Insbesondere Strontiumranelat scheint keine positive Auswirkung auf die Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Rahmen der Hypophosphatasie zu haben, obwohl in vorausgegangenen Untersuchungen

positive Effekte beschrieben wurden (Fernández et al. 2014; Llinas et al. 2006). Somit ergeben sich keine relevanten Argumente für eine erneute Bewertung des Risiko-Nutzen-Profiles, welche im Jahr 2017 wegen schwerer Nebenwirkungen und zugelassener Therapiealternativen mit vergleichbarer Wirksamkeit zur Rücknahme der Zulassung des osteoanabolen Pharmakons geführt hat (Rika Rausch 2017; a-t 2004).

Zusammenfassend ist die Aussagekraft der durchgeführten *in-vitro*-Experimente naturgemäß beschränkt. So können auf Grundlage der erhobenen Daten beispielsweise Interaktionen zwischen Zellsystemen oder Verteilungseffekte von Stoffen wie Magnesium, Zink oder Strontiumranelat in Organkompartimenten nicht beurteilt werden. Auch homöostatische Veränderungen im Rahmen pathologischer Prozesse oder mögliche epigenetische Effekte im Verlauf des Krankheitsgeschehens sind im Zellmodell nicht abgebildet. Da die Untersuchungen nicht an vitalen Zellen, sondern an Zelllysaten durchgeführt wurden, erlauben sie keinen Rückschluss über Effekte jenseits der isolierten Enzymwirkung. Pathophysiologisch ist diese Einschränkung jedoch nur von begrenzter Relevanz, da die Alkalische Phosphatase extrazellulär vorkommt und durch zellbiologische Vorgänge nicht relevant beeinflusst wird (Millán und Whyte 2016).

Des Weiteren beschränkten sich die vorliegenden Untersuchungen mit dem Knochen lediglich auf ein einziges Organsystem. Es ist in Kenntnis des Pathomechanismus der Hypophosphatasie zunächst plausibel, dass von anderen Organsystemen ausgehende Symptome durch Korrektur der defizienten Alkalische-Phosphatase-Aktivität ebenfalls gemindert werden. So konnte im Mausmodell durch Enzymersatztherapie das Auftreten epileptischer Anfälle vermieden werden (Oikawa et al. 2014). Eine experimentelle Überprüfung dieser Annahme im Kontext von Mikronährstoffsupplementation ist jedoch schon aus Gründen der Patientensicherheit unumgänglich.

Allen Einschränkungen zum Trotz geben die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse jedoch wertvolle Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen, in deren Rahmen die *in-vivo*-Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie die klinische Relevanz für Patientinnen und Patienten mit Hypophosphatasie evaluiert werden kann. So sollte zunächst die Replikation der Ergebnisse mit physiologischen Substraten der Alkalischen Phosphatase wie Pyridoxal-5'-phosphat oder

Phosphatidylethanolamin erfolgen. Erste Vorbereitungen hierfür erfolgten bereits im Rahmen dieser Arbeit.

Einen essenziellen Beitrag auf dem Weg zu belastbaren Empfehlungen für Patientinnen und Patienten mit spezifischen Hypophosphatasie-assoziierten Mutationen der Alkalischen Phosphatase muss an nächster Stelle ein *in-vivo*-Modell leisten. Aus den vorangehend beschriebenen Ergebnissen zum untersuchten Mausmodell mit Trägern der Mutation c.571G>A wird ersichtlich, dass nach 12 Wochen Lebenszeit der Tiere kein statistisch signifikanter und klinisch relevanter Phänotyp generiert werden konnte, wobei die Validität des Modells durch die signifikant reduzierte Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Serum der hetero- und homozygoten Tiere gesichert ist. Es zeigten sich lediglich Tendenzen in den Datenpunkten sowie anekdotische Skelettpathologien. Bemerkenswert ist, dass die histomorphometrischen Trends bei heterozygoten Mutationsträgern, die Skelettpathologien jedoch bei homozygoten Tieren vorkommen. Zudem betreffen beide Phänomene lediglich männliche Tiere. Aufgrund der geringen Gruppengrößen von lediglich vier oder fünf Tieren lässt sich hier keine belastbare Aussage über Zufälligkeit der Messwerte treffen. Zum Versuch der Präzisierung der Ergebnisse wäre eine Erhöhung der Gruppengrößen zur Steigerung der statistischen Power notwendig.

Im Ganzen ist die Aussagekraft der Tierexperimente zusätzlich zu den kleinen Fallzahlen je Gruppe möglicherweise durch die ideale alimentäre Versorgung der Tiere mit relevanten Mikronährstoffen, in diesem Fall insbesondere Magnesium, eingeschränkt. Die heterozygote Mutation c.571G>A verursacht in menschlichen Patientinnen und Patienten vergleichsweise milde Symptome (Jandl et al. 2021) und ist *in-vitro*-experimentell stark magnesiumabhängig. Das verwendete Trockenfutter der Versuchstiere enthält laut Herstellerangabe 0,2 % (entsprechend 20g/kg) Magnesium (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG 2023). Dies entspricht dem 28- bis 40-fachen Mineralstoffbedarf von Labormäusen (National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition 1995, S. 89). Demgegenüber erreichen in der deutschen Bevölkerung 26 % der Männer und 29 % der Frauen die von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung empfohlenen Referenzwerte der täglichen Magnesiumzufuhr nicht (Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung, Schweizerische Vereinigung für Ernährung (Hg.) 2021; Max-

Rubner-Institut (Hg.) 2008). Folglich ist nicht auszuschließen, dass die basale Magnesiumversorgung des Organismus einen relevanten Beitrag zum Phänotyp bei Trägern der *ALPL*-Mutation c.571G>A beiträgt und die signifikante Überversorgung der Versuchstiere im vorliegenden Experiment ein Auftreten von Krankheitszeichen verhindert hat. Ein dedizierter Fütterungsversuch mit magnesiumarmen Futtermitteln könnte hierüber Klarheit schaffen. Hierfür sollte idealerweise eine alimentäre Magnesiumkonzentration angestrebt werden, welche nicht zu weit unter dem empfohlenen Tagesbedarf liegt. Bei zu starker Magnesiumdefizienz wäre einerseits eine realistische Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Patientinnen und Patienten nicht mehr zu gewährleisten. Zudem sind in der Literatur unter anderem neurokognitive und intestinale Komplikationen von ausgeprägtem Magnesiummangel bei Labormäusen beschrieben, wodurch ein auffälliger Phänotyp nicht mehr zweifelsfrei der *ALPL*-Mutation zugeschrieben werden könnte (Kantak 1988; Singewald et al. 2004; Pyndt Jørgensen et al. 2015).

Anzumerken ist außerdem, dass der skelettale Phänotyp der Hypophosphatasie in Mäusen auch in vorangegangenen Experimenten in milden Formen zur Ausprägung kam (Salles 2015). So zeigte das erste Mausmodell eines *Alpl*-Knockouts zwar eine hohe Rate an zentralnervösen Effekten, jedoch ohne nachweisbare Knochenmineralisierungsstörungen (Waymire et al. 1995). Dieses Ergebnis wurde prinzipiell durch andere Knockout-Modelle bestätigt, und auch im Knockin-Modell konnte kein der menschlichen Erkrankung vergleichbarer skelettaler Phänotyp erreicht werden (Fedde et al. 1999; Foster et al. 2015). Es stellt sich also zusätzlich zu den bereits diskutierten Faktoren der statistischen Unschärfe und möglicher nutritiver Confounder die Frage, ob das murine Skelett intrinsische Resistenzmechanismen gegen einen Verlust der TNSALP und die daraus resultierenden Stoffwechselveränderungen aufweist. Eine Möglichkeit wäre hierbei eine gesteigerte Aktivität anderer Phosphatasen (Millán 2012). Letztlich besteht unabhängig des kausalen Mechanismus das Problem, dass die Übertragbarkeit vom murinen auf das humane Modell eingeschränkt bleibt.

Zusammenfassend bieten die hier dargestellten Ergebnisse Grundlage für weitere Untersuchungen, an deren Ende eine niedrighwellige und kostengünstige Therapiealternative für erwachsene Patientinnen und Patienten mit Hypophosphatasie etabliert werden könnte. Da die durchgeführten Untersuchungen

gewisse methodische Schwächen aufweisen, sind weiterführende Studien notwendig. Hierzu sollten idealerweise zunächst weitere Tierexperimente unter Bedingungen stattfinden, welche die Versorgungsrealität von Patientinnen und Patienten besser reflektieren. Sollten sich hier positive Ergebnisse zeigen, welche die *in-vitro* Ergebnisse bestätigen, sind humanexperimentelle Studien angezeigt. Bis zum Vorliegen der daraus gewonnenen Ergebnisse sollte sich die medizinische Versorgung von Patientinnen und Patienten mit milden Verlaufsformen der Hypophosphatasie an den Leitlinien der Fachgesellschaften und am aktuellen Stand der medizinischen Wissenschaft orientieren.

5 Sicherheit und Entsorgung

Alle für die Tätigkeit in einem Labor der Schutzstufe 2, Sicherheitsstufe 1 notwendigen Unterweisungen und Belehrungen gemäß den Richtlinien des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurden vor Beginn der praktischen Tätigkeit durchgeführt. Die Handhabung chemischer Substanzen erfolgte stets unter Berücksichtigung der zugehörigen, aktuellen Sicherheitsdatenblätter. Chemikalien, deren gesundheitsschädigendes Potential nicht bekannt ist, wurden – insbesondere in Hinblick auf die persönliche Schutzausrüstung sowie Entsorgung – analog zu gesundheitsschädlichen Substanzen behandelt. Die persönliche Schutzausrüstung, mindestens bestehend aus einem geschlossenen Laborkittel und Einmalhandschuhen, wurde jederzeit in den Laboren getragen und bei Bedarf um eine Schutzbrille oder Chemikalienschutzhandschuhe erweitert. Der Umgang mit Tieren erfolgte unter Aufsicht von nach FELASA-Kriterien geschulten Wissenschaftlern unter Einhaltung der gültigen Sicherheitsrichtlinien des UKE. Die Entsorgung sämtlicher aus der Laborarbeit resultierender Abfälle erfolgte in Einklang mit den Entsorgungsrichtlinien des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Insbesondere wurden alle mit Zellen oder Bakterien kontaminierten Medien und Materialien der Autoclaving Core Facility zum Autoklavieren und anschließenden Entsorgen zugeführt.

5.1 H- und P-Sätze der eingesetzten Substanzen

Tabelle 29: CAS- und EG-Nummern sowie H- und P-Sätze der eingesetzten chemischen Substanzen (vgl. Abschnitt 2.1.4). Aufgeführt sind nur diejenigen Substanzen, deren Sicherheitsdatenblätter H- und P-Sätze ausweisen. Bei Gemischen sind CAS- und EG-Nummern aller relevanten Inhaltstoffe angegeben.

Bezeichnung	CAS-Nummer	EG-Nummer	H-Sätze	P-Sätze
2-Propanol ROTIPURAN® ≥99,8%, p.a., ACS, ISO	67-63-0	200-661-7	225, 319, 336	210, 233, 305+351+338
4-(2-Aminoethyl)benzolsulfonylfluorid	30827-99-7	608-547-2	314	260, 280, 301+330+331, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
4-Nitrophenylphosphate disodium salt hexahydrate	333338-18-4	224-246-5	315, 318, 373	280, 305+351+338
β-Mercaptoethanol	60-24-2	200-464-6	301+331, 310, 315, 317, 318, 361d, 373, 410	273, 280, 301+310, 302+352+310, 304+340+311, 305+351+338
Citroline 2000 Entwicklerkonzentrat	584-08-7, 6381-77-7, 111-46-6, 13047-13-7	209-529-3, 228-973-9, 203-872-2, 235-920-3	315, 319, 335	280, 332+313, 337+313, 501
Diethanolamin	111-42-2	203-868-0	302, 315, 318, 373, 412	273, 280, 301+312, 302+352, 305+351+338, 314
Essigsäure	64-19-7	200-580-7	226, 314	210, 280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 310
Ethanol 80% MEK vergällt	64-17-5, 78-93-3	200-578-6, 201-159-0	225, 319	210, 233, 241, 243, 305+361+353, 337+313, 403+235
Ethanol absolut	64-17-5	200-578-6	225, 319	210, 240, 305+351+338, 403+233
Ethidiumbromid-Lösung	1239-45-8	214-984-6	331, 341	201, 304+340+311, 308+313
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat	6381-92-6	205-358-3	332, 373, 412	260, 271, 273, 304+340+312, 314, 501
Formaldehydlösung Formafix® 3,5%, phosphatgepuffert	50-00-0	200-001-8	317, 341, 350, 208	261, 280, 302+352, 308+313, 333+313, 403+233
Kanamycinsulfat	25389-94-0	246-933-9	360, 372	201, 260, 280, 264, 202, 308+313, 314, 501
Natriumhydroxid, 98%	1310-73-2	215-185-5	233, 280	303+361+353, 305+351+338, 310
Natriumpyrophosphat dibasisch	7758-16-9	231-835-0	319	305+351+338

Tabelle 29 (fortgesetzt)

Sicherheit und Entsorgung

Penicillin-Streptomycin 10000 U/ml	3810-74-0, 61-33-6	223-286-0, 200-710-2	361	201, 202, 280, 308+313, 501
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	7664-38-2, 67-56-1	231-633-2, 200-659-6	302, 312, 314, 332, 370, 290, 226	210, 303+361+353, 403+235, 501, 234, 406, 370+378, 301+330+331, 305+351+338
Proteinkinase K, rekombinant	39450-01-6	254-457-8	315, 317, 319, 334, 335	261, 280, 285, 333+313, 337+313, 342+311
ROTI® Phenol/Chloroform/Is-oamylalkohol	67-66-3, 108-95-2, 123-51-3, 7647-01-0	200-663-8, 203-632-7, 204-633-5, 231-595-7	302, 314, 331, 341, 351, 361d, 372, 412	201, 270, 280, 304+340, 305+351+338, 308+313
Salzsäure	7647-01-0	231-595-7	290, 314, 335	234, 280, 303+361+353, 305+351+338+310, 390
SDS 20%	151-21-3	205-788-1	315, 318	264, 280, 302+352, 305+351+338, 332+313, 362+364
Spermidin	124-20-9	204-689-0	314	280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338+310
Spermin	71-44-3	200-754-2	314	280, 305+351+338, 310
Strontiumranelat	135459-87-9	n/a	302+312+332	280, 301+312+330, 302+352+312, 304+340+312
Titriplex III	6381-92-6	205-358-3	332, 373, 412	260, 271, 273, 304+340+312, 314, 501
TRIS HCL (Trizma® hydrochlorid)	1185-53-1	214-684-5	315, 319, 335	261, 305+351+338
Tris-Base (Trizma®-Base)	77-86-1	201-064-4	315, 319, 335	261, 305+351+338
Triton™ X-100	9036-19-5	n/a	302, 315, 318, 410	264, 273, 280, 301+312+302, 352, 305+351+338
Zinkchlorid	7646-85-7	231-592-0	302, 314, 410	260, 273, 280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338

5.2 Schlüssel für H-Sätze

Tabelle 30: H-Sätze der unter 5.1 aufgeführten Substanzen entsprechend Verordnung (EG) Nr. 1272/2008, Art. 21, Anhang III

H200-Reihe: Physikalische Gefahren	
208	Gefahr durch Feuer; erhöhte Explosionsgefahr, wenn das Desensibilisierungsmittel reduziert wird.
225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
280	Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.
290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H300-Reihe: Gesundheitsgefahren	
302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
312	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
315	Verursacht Hautreizungen.
317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
318	Verursacht schwere Augenschäden.
319	Verursacht schwere Augenreizung.
331	Giftig bei Einatmen.
332	Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
334	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
335	Kann die Atemwege reizen.
336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
341	Kann vermutlich genetische Defekte verursachen.
350	Kann Krebs erzeugen.
351	Kann vermutlich Krebs erzeugen.
360	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.
361	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.
361d	Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
302+312+332	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
370	Schädigt die Organe.
372	Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition.
373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.
H400-Reihe: Umweltgefahren	
410	Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
412	Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

5.3 Schlüssel für P-Sätze

Tabelle 31: P-Sätze der unter 5.1 aufgeführten Substanzen entsprechend Verordnung (EG) Nr. 1272/2008, Art. 22, Anhang IV

P200-Reihe: Prävention	
201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
210	Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Nicht rauchen.
233	Behälter dicht verschlossen halten.
234	Nur in Originalverpackung aufbewahren.
240	Behälter und zu befüllende Anlage erden.
241	Explosionssgeschützte Geräte verwenden.
243	Maßnahmen gegen elektrostatische Entladungen treffen.
260	Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen.
261	Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.
264	Nach Gebrauch ... gründlich waschen.
270	Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
271	Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.
273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
280	Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.
285	Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen.
P300-Reihe: Reaktion	
301+312	Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum/Arzt anrufen.
301+330+331	Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen.
302+352	Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser waschen.
302+352+312	Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser waschen. Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum/Arzt anrufen. (n. offi)
303+361+353	Bei Berührung mit der Haut oder dem Haar: Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen oder duschen.
304+340	Bei Einatmen: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.
304+340+310	Bei Einatmen: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
304+340+311	Bei Einatmen: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. Giftinformationszentrum/Arzt anrufen. (n. offi)
305+351+338	Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
305+351+338+310	Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
308+313	Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
310	Sofort Giftinformationszentrum/Arzt anrufen.
314	Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
332+313	Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
333+313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
337+313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Sicherheit und Entsorgung

Tabelle 31 (fortgesetzt)

342+311	Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum/Arzt anrufen.
352	Mit viel Wasser waschen.
362+364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
370+378	Bei Brand: Trockenen Sand, Trockenlöschpulver oder alkoholbeständigen Schaum zum Löschen verwenden.
390	Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.
P400-Reihe: Aufbewahrung	
403+233	An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Behälter dicht verschlossen halten.
403+235	An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Kühl halten.
406	In korrosionsbeständigem Behälter aufbewahren.
P500-Reihe: Entsorgung	
501	Inhalt/Behälter einer zugelassenen Einrichtung zur Abfallentsorgung zuführen.

6 Zusammenfassung / Abstract

Einleitung: Patienten mit Hypophosphatasie, einer genetischen Erkrankung mit funktionsmindernder Mutation im *ALPL*-Gen, stehen nur begrenzte therapeutische Optionen zur Verfügung. Ziel dieser Arbeit war es, die Beeinflussbarkeit der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) bei bestimmten Mutationen durch Magnesium, Zink und Strontiumranelat zu untersuchen und deren potentiellen Nutzen als Therapeutika zu beurteilen.

Methoden: Für die ausgewählten Mutationen wurden in MC3T3-E1-Zellen Enzyme generiert und deren Aktivität mit und ohne Additive bestimmt. Zusätzlich wurde im Mausmodell die Auswirkung von Mutationen in *Alpl* histomorphometrisch untersucht.

Ergebnisse: Für die *ALPL*-Mutationen c.340G>A und c.526G>A stieg die Enzymaktivität nach Zugabe von Magnesium relevant an. Für c.340G>A war die stärkste Steigerung bereits bei physiologischen Serum-Magnesiumkonzentrationen erreicht. Zink und Strontiumranelat hatten keinen relevanten positiven Effekt, für die Mutationen c.394G>A, c.422C>A und c.746G>T zeigte sich nach Zinkzugabe eine Reduktion der Aktivität. Im Tierversuch zeigte sich kein eindeutiger skelettaler Phänotyp.

Diskussion: Die Möglichkeit der Nutzung alimentären Magnesiums zur Behandlung von Patienten mit Hypophosphatasie und Vorhandensein der Mutationen c.340G>A und c.526G>A muss in weiteren, insbesondere *in-vivo*-Experimenten validiert werden. Es zeigten sich Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Lage der Mutation und Bindungsstellen des Enzyms. Hierdurch könnte eine niedrigschwellige und kostengünstige Therapiealternative für erwachsene Patientinnen und Patienten mit Hypophosphatasie etabliert werden.

Introduction: Hypophosphatasia is a genetic disorder characterised by loss-of-function mutations in the *ALPL* gene for which few therapeutic options exist. This project aimed at determining whether Alkaline Phosphatase (AP) activity could be influenced by magnesium, zinc and strontium ranelate to potentially use them in a therapeutic context.

Methods: Selected mutations were introduced into MC3T3-E1 cells to determine the activity of the produced enzymes with and without additives. Additionally, the effects of *Alpl* mutations were studied by means of histomorphometry in a murine model.

Results: ALPL mutations c.340G>A and c.526G>A showed a relevant increase in enzymatic activity after addition of magnesium. The highest increase for c.340G>A was found within physiological serum magnesium levels. Zinc and strontium ranelate did not show relevant increases in activity, c.394G>A, c.422C>A and c.746G>T showed decreased activity after addition of zinc. The murine model did not yield a distinct skeletal phenotype.

Discussion: Alimentary use of magnesium in treating patients suffering from Hypophosphatasia with the mutations c.340G>A and c.526G>A needs further evaluation *in vivo*. There appears to be a connection between the location of the mutation and the enzymatic binding sites. These results hint at a low cost, low risk therapeutic option for adult patients with Hypophosphatasia.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
μCT	Mikro-Computertomographie bzw. Mikro-Computertomogramm
<i>ALPL</i>	humanes Gen, welches für die Alkalische Phosphatase kodiert
<i>Alpl</i>	murines Gen, welches für die Alkalische Phosphatase kodiert
ANOVA	engl.: Analysis of Variance (dt.: Varianzanalyse)
AP	Alkalische Phosphatase
ASBMR	American Society for Bone and Mineral Research
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	engl.: complementary DNA (dt.: komplementäre DNA)
CI	engl. Confidence Interval (dt.: Konfidenzintervall)
C _T	engl.: Cycle Threshold (dt.: Zyklus-Schwellenwert)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	engl.: deoxyribonucleic acid (dt.: Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (Kolibakterium)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Emission
EtOH	Ethanol
Ex	engl.: Excitation (dt. Anregung)
GCAP	germ cell Alkaline Phosphatase (dt. Keimzell Alkalische Phosphatase)
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
H ₂ O	Wasser
HPP	Hypophosphatasie
IAP	intestinal Alkaline Phosphatase (dt. intestinale Alkalische Phosphatase)
IOBM	Institut für Osteologie und Biomechanik am UKE
KI	Knockin
KO	Knockout
LB	Lysogeny Broth
M	Stoffmengenkonzentration [mol/l]
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumbicarbonat
Obl	Osteoblast(en)
Ocl	Osteoklast(en)
OD	Optische Dichte
PBS	engl.: phosphate buffered saline (dt.: Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	engl.: polymerase chain reaction (dt.: Polymerase-Kettenreaktion)
PEA	Phosphatidylethanolamin
P _i	anorganisches Phosphat
PLAP	placental Alkaline Phosphatase (dt. plazentale Alkalische Phosphatase)
PLP	Pyridoxal-5'-phosphat

Abkürzungsverzeichnis

pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PP _i	anorganisches Pyrophosphat
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkriptase-PCR
rcf	engl.: relative centrifugal force (dt.: relative Zentrifugalkraft)
RNA	engl.: ribonucleic acid (dt.: Ribonukleinsäure)
rpm	engl.: revolutions per minute (dt.: Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
SDS	engl.: Sodium dodecyl sulfate (dt.: Natriumdodecylsulfat, auch Natriumlaurylsulfat)
SPD	Spermidin
SPM	Spermin
TAE	TRIS-/Acetat-/EDTA
TB	Terrific Broth
TE	TRIS-/EDTA
TNSALP	tissue non specific alkaline phosphatase (dt.: gewebeunspezifische Alkalische Phosphatase)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
ZnCl ₂	Zinkchlorid

8 Literaturverzeichnis

- Aal-Hamad, Aya Hasan; Al-Alawi, Abdullah M.; Kashoub, Masoud Salim; Falhammar, Henrik (2023): Hypermagnesemia in Clinical Practice. In: *Medicina* 59 (7). DOI: 10.3390/medicina59071190.
- Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG (2023): Altromin 1328 HP Produktinformation. Online verfügbar unter https://altromin.de/produkte/standarddiaeten/maeuse/1320#produkt_1328, zuletzt geprüft am 03.02.2023.
- a-t (2004): Strontiumranelat (Protelos) bei Osteoporose? In: *Arznei-Telegramm* 2004 (35), S. 137–138. Online verfügbar unter https://www.arznei-telegramm.de/html/2004_12/0412137_01.html, zuletzt geprüft am 03.02.2023.
- Bangura, Abdulai; Wright, Lisa; Shuler, Thomas (2020): Hypophosphatasia: Current Literature for Pathophysiology, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment. In: *Cureus* 12 (6), e8594. DOI: 10.7759/cureus.8594.
- Berger, Mette M.; Shenkin, Alan; Schweinlin, Anna; Amrein, Karin; Augsburg, Marc; Biesalski, Hans-Konrad et al. (2022): ESPEN micronutrient guideline. In: *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 41 (6), S. 1357–1424. DOI: 10.1016/j.clnu.2022.02.015.
- Bonewald, L. F.; Harris, S. E.; Rosser, J.; Dallas, M. R.; Dallas, S. L.; Camacho, N. P. et al. (2003): von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. In: *Calcified tissue international* 72 (5), S. 537–547. DOI: 10.1007/s00223-002-1057-y.
- Bonewald, Lynda F. (2011): The amazing osteocyte. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 26 (2), S. 229–238. DOI: 10.1002/jbmr.320.
- Bouxein, Mary L.; Boyd, Stephen K.; Christiansen, Blaine A.; Guldberg, Robert E.; Jepsen, Karl J.; Müller, Ralph (2010): Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 25 (7), S. 1468–1486. DOI: 10.1002/jbmr.141.

- Bradford, Marion M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1-2), S. 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Dempster, David W.; Compston, Juliet E.; Drezner, Marc K.; Glorieux, Francis H.; Kanis, John A.; Malluche, Hartmut et al. (2013): Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 28 (1), S. 2–17. DOI: 10.1002/jbmr.1805.
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung, Schweizerische Vereinigung für Ernährung (Hg.) (2021): Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. 2. Auflage, 7. aktualisierte Ausgabe. Bonn.
- Eaton, R. H.; Moss, D. W. (1967): Organic pyrophosphates as substrates for human alkaline phosphatases. In: *The Biochemical journal* 105 (3), S. 1307–1312. DOI: 10.1042/bj1051307.
- European Commission Directorate-General for Research and Innovation (2017): Rare diseases: a major unmet medical need: Publications Office. Online verfügbar unter <https://data.europa.eu/doi/10.2777/749056>, zuletzt geprüft am 06.02.2023.
- Fedde, K. N.; Blair, L.; Silverstein, J.; Coburn, S. P.; Ryan, L. M.; Weinstein, R. S. et al. (1999): Alkaline phosphatase knock-out mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia. In: *J Bone Miner Res* 14 (12), S. 2015–2026. DOI: 10.1359/jbmr.1999.14.12.2015.
- Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M. et al. (1987): Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (21), S. 7413–7417. DOI: 10.1073/pnas.84.21.7413.
- Fenn, Jonathan Samuel; Lorde, Nathan; Ward, John Martin; Borovickova, Ingrid (2021): Hypophosphatasia. In: *Journal of clinical pathology*. DOI: 10.1136/jclinpath-2021-207426.

- Fernández, Juan Manuel; Molinuevo, Maria Silvina; McCarthy, Antonio Desmond; Cortizo, Ana Maria (2014): Strontium ranelate stimulates the activity of bone-specific alkaline phosphatase: interaction with Zn(2+) and Mg (2+). In: *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 27 (3), S. 601–607. DOI: 10.1007/s10534-014-9733-8.
- Fernley, H. N.; Walker, P. G. (1967): Studies on alkaline phosphatase. Inhibition by phosphate derivatives and the substrate specificity. In: *The Biochemical journal* 104 (3), S. 1011–1018. DOI: 10.1042/bj1041011.
- Fleisch, H.; Russell, R. G.; Straumann, F. (1966): Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. In: *Nature* 212 (5065), S. 901–903. DOI: 10.1038/212901a0.
- Foster, B. L.; Sheen, C. R.; Hatch, N. E.; Liu, J.; Cory, E.; Narisawa, S. et al. (2015): Periodontal Defects in the A116T Knock-in Murine Model of Odontohypophosphatasia. In: *Journal of dental research* 94 (5), S. 706–714. DOI: 10.1177/0022034515573273.
- Franceschi, R. T.; Iyer, B. S. (1992): Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. In: *J Bone Miner Res* 7 (2), S. 235–246. DOI: 10.1002/jbmr.5650070216.
- Franceschi, R. T.; Iyer, B. S.; Cui, Y. (1994): Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells. In: *J Bone Miner Res* 9 (6), S. 843–854. DOI: 10.1002/jbmr.5650090610.
- Fraser, Donald (1957): Hypophosphatasia. In: *The American journal of medicine* 22 (5), S. 730–746. DOI: 10.1016/0002-9343(57)90124-9.
- Genge, B. R.; Sauer, G. R.; Wu, L. N.; McLean, F. M.; Wuthier, R. E. (1988): Correlation between loss of alkaline phosphatase activity and accumulation of calcium during matrix vesicle-mediated mineralization. In: *The Journal of biological chemistry* 263 (34), S. 18513–18519.
- Hadjidakis, Dimitrios J.; Androulakis, Ioannis I. (2006): Bone remodeling. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1092, S. 385–396. DOI: 10.1196/annals.1365.035.

- Higuchi, R.; Dollinger, G.; Walsh, P. S.; Griffith, R. (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. In: *Nat Biotechnol* 10 (4), S. 413–417. DOI: 10.1038/nbt0492-413.
- Hofmann, Christine E.; Harmatz, Paul; Vockley, Jerry; Högl, Wolfgang; Nakayama, Hideki; Bishop, Nick et al. (2019): Efficacy and Safety of Asfotase Alfa in Infants and Young Children With Hypophosphatasia: A Phase 2 Open-Label Study. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 104 (7), S. 2735–2747. DOI: 10.1210/jc.2018-02335.
- Holland, P. M.; Abramson, R. D.; Watson, R.; Gelfand, D. H. (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (16), S. 7276–7280. DOI: 10.1073/pnas.88.16.7276.
- Hoylaerts, Marc F.; van Kerckhoven, Soetkin; Kiffer-Moreira, Tina; Sheen, Campbell; Narisawa, Sonoko; Millán, José Luis (2015): Functional significance of calcium binding to tissue-nonspecific alkaline phosphatase. In: *PloS one* 10 (3), e0119874. DOI: 10.1371/journal.pone.0119874.
- Jandl, Nico Maximilian; Schmidt, Tobias; Rolvien, Tim; Stürznickel, Julian; Chrysostomou, Konstantin; Vopelius, Emil von et al. (2021): Genotype-Phenotype Associations in 72 Adults with Suspected ALPL-Associated Hypophosphatasia. In: *Calcified tissue international* 108 (3), S. 288–301. DOI: 10.1007/s00223-020-00771-7.
- Kantak, K. M. (1988): Magnesium deficiency alters aggressive behavior and catecholamine function. In: *Behavioral neuroscience* 102 (2), S. 304–311. DOI: 10.1037//0735-7044.102.2.304.
- Kinoshita, Yuka; Mohamed, Fatma F.; Amadeu de Oliveira, Flavia; Narisawa, Sonoko; Miyake, Koichi; Foster, Brian L.; Millán, José Luis (2021): Gene therapy using adeno-associated virus serotype 8 encoding TNAP-D10 improves the skeletal and dentoalveolar phenotypes in *Alpl*^{-/-} mice. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. DOI: 10.1002/jbmr.4382.
- Kodama, Hiro-aki; Amagai, Yuji; Sudo, Hiroko; Kasai, Shiro; Yamamoto, Shigehisa (1981): Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse

calvaria. In: *Jpn J Oral Biol* 23 (4), S. 899–901. DOI:
10.2330/joralbiosci1965.23.899.

Kołodziejska, Barbara; Stępień, Natalia; Kolmas, Joanna (2021): The Influence of Strontium on Bone Tissue Metabolism and Its Application in Osteoporosis Treatment. In: *International journal of molecular sciences* 22 (12). DOI: 10.3390/ijms22126564.

Lefever, Eveline; Witters, Peter; Gielen, Evelien; Vanclooster, Annick; Meersseman, Wouter; Morava, Eva et al. (2020): Hypophosphatasia in Adults: Clinical Spectrum and Its Association With Genetics and Metabolic Substrates. In: *Journal of clinical densitometry : the official journal of the International Society for Clinical Densitometry* 23 (3), S. 340–348. DOI: 10.1016/j.jocd.2018.12.006.

Llinas, Paola; Masella, Michel; Stigbrand, Torgny; Ménez, André; Stura, Enrico A.; Le Du, Marie Hélène (2006): Structural studies of human alkaline phosphatase in complex with strontium: implication for its secondary effect in bones. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 15 (7), S. 1691–1700. DOI: 10.1110/ps.062123806.

Luther, Julia; Yorgan, Timur Alexander; Rolvien, Tim; Ulsamer, Lorenz; Koehne, Till; Liao, Nannan et al. (2018): Wnt1 is an Lrp5-independent bone-anabolic Wnt ligand. In: *Sci. Transl. Med.* 10 (466), Artikel eaau7137. DOI: 10.1126/scitranslmed.aau7137.

Malhan, Deeksha; Muelke, Matthias; Rosch, Sebastian; Schaefer, Annemarie B.; Merboth, Felix; Weisweiler, David et al. (2018): An Optimized Approach to Perform Bone Histomorphometry. In: *Front. Endocrinol.* 9, Artikel 666, S. 666. DOI: 10.3389/fendo.2018.00666.

Martland, M.; Robison, R. (1929): The preparation and use of the bone phosphatase. In: *The Biochemical journal* 23 (2), S. 237–242. DOI: 10.1042/bj0230237.

Max-Rubner-Institut (Hg.) (2008): Nationale Verzehrsstudie II. Ergebnisbericht, Teil 2. Die bundesweite Befragung zur Ernährung von Jugendlichen und Erwachsenen. Online verfügbar unter <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:gbv:ka51-2008080507.>, zuletzt geprüft am 03.02.2023.

- Millán, José Luis (2006): Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. In: *Purinergic Signalling* 2 (2), S. 335–341. DOI: 10.1007/s11302-005-5435-6.
- Millán, José Luis (2012): The Role of Phosphatases in the Initiation of Skeletal Mineralization. In: *Calcified tissue international* 93 (4), S. 299–306. DOI: 10.1007/s00223-012-9672-8.
- Millán, José Luis; Narisawa, Sonoko; Lemire, Isabelle; Loisel, Thomas P.; Boileau, Guy; Leonard, Pierre et al. (2008): Enzyme replacement therapy for murine hypophosphatasia. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 23 (6), S. 777–787. DOI: 10.1359/jbmr.071213.
- Millán, José Luis; Whyte, Michael P. (2016): Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia. In: *Calcified tissue international* 98 (4), S. 398–416. DOI: 10.1007/s00223-015-0079-1.
- Mornet, Etienne (2008): Hypophosphatasia. In: *Best practice & research. Clinical rheumatology* 22 (1), S. 113–127. DOI: 10.1016/j.berh.2007.11.003.
- Mornet, Etienne; Yvard, Alice; Taillandier, Agnes; Fauvert, Delphine; Simon-Bouy, Brigitte (2011): A molecular-based estimation of the prevalence of hypophosphatasia in the European population. In: *Annals of human genetics* 75 (3), S. 439–445. DOI: 10.1111/j.1469-1809.2011.00642.x.
- Nakamura, Takashi; Nakamura-Takahashi, Aki; Kasahara, Masataka; Yamaguchi, Akira; Azuma, Toshifumi (2020): Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the osteogenic differentiation of osteoprogenitor cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 524 (3), S. 702–709. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.01.136.
- National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition (1995): Nutrient Requirements of Laboratory Animals. Nutrient Requirements of the Mouse. Unter Mitarbeit von Committee on Animal, National Research Council Board on Agriculture, Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council und National Academy of Sciences. Fourth revised Edition. Washington (DC): National Academies Press. Online

verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK231918/>, zuletzt geprüft am 03.02.2023.

- Ochiai, Hiroshi (2015): Single-Base Pair Genome Editing in Human Cells by Using Site-Specific Endonucleases. In: *IJMS* 16 (9), S. 21128–21137. DOI: 10.3390/ijms160921128.
- Oikawa, Hirotaka; Tomatsu, Shunji; Haupt, Bisong; Montaña, Adriana M.; Shimada, Tsutomu; Sly, William S. (2014): Enzyme replacement therapy on hypophosphatasia mouse model. In: *Journal of inherited metabolic disease* 37 (2), S. 309–317. DOI: 10.1007/s10545-013-9646-7.
- Orimo, Hideo (2010): The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. In: *J Nippon Med Sch* 77 (1), S. 4–12. DOI: 10.1272/jnms.77.4.
- Orriss, Isabel R.; Arnett, Timothy R.; Russell, R. Graham G. (2016): Pyrophosphate: a key inhibitor of mineralisation. In: *Current opinion in pharmacology* 28, S. 57–68. DOI: 10.1016/j.coph.2016.03.003.
- Porter, Amy; Irwin, Regina; Miller, Josselyn; Horan, Daniel J.; Robling, Alexander G.; McCabe, Laura R. (2017): Quick and inexpensive paraffin-embedding method for dynamic bone formation analyses. In: *Sci Rep* 7 (1), S. 42505. DOI: 10.1038/srep42505.
- Pyndt Jørgensen, Bettina; Winther, Gudrun; Kihl, Pernille; Nielsen, Dennis S.; Wegener, Gregers; Hansen, Axel K.; Sørensen, Dorte B. (2015): Dietary magnesium deficiency affects gut microbiota and anxiety-like behaviour in C57BL/6N mice. In: *Acta neuropsychiatrica* 27 (5), S. 307–311. DOI: 10.1017/neu.2015.10.
- Revell, P. A. (1983): Histomorphometry of bone. In: *Journal of clinical pathology* 36 (12), S. 1323–1331. DOI: 10.1136/jcp.36.12.1323.
- Rika Rausch (2017): Nachruf auf Protelos. Warum musste das Osteoporose-Mittel so früh von uns gehen? In: *Deutsche Apotheker Zeitung* 2017 (48). Online verfügbar unter <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/daz-az/2017/daz-48-2017/nachruf-auf-protelos>, zuletzt geprüft am 03.02.2023.
- Rolvien, T.; Yorgan, T. A.; Kornak, U.; Hermans-Borgmeyer, I.; Mundlos, S.; Schmidt, T. et al. (2020): Skeletal deterioration in COL2A1-related

- spondyloepiphyseal dysplasia occurs prior to osteoarthritis. In: *Osteoarthritis and Cartilage* 28 (3), S. 334–343. DOI: 10.1016/j.joca.2019.12.011.
- Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T. et al. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. In: *Science* 239 (4839), S. 487–491. DOI: 10.1126/science.2448875.
- Salles, Jean Pierre (2015): Clinical Forms and Animal Models of Hypophosphatasia. In: *Sub-cellular biochemistry* 76, S. 3–24. DOI: 10.1007/978-94-017-7197-9_1.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (12), S. 5463–5467. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.
- Schmidt, T.; Mussawy, H.; Rolvien, T.; Hawellek, T.; Hubert, J.; Rütger, W. et al. (2017): Clinical, radiographic and biochemical characteristics of adult hypophosphatasia. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 28 (9), S. 2653–2662. DOI: 10.1007/s00198-017-4087-z.
- Schmidt, Tobias; Schmidt, Constantin; Amling, Michael; Kramer, Jan; Barvencik, Florian (2021): Prevalence of low alkaline phosphatase activity in laboratory assessment: Is hypophosphatasia an underdiagnosed disease? In: *Orphanet journal of rare diseases* 16 (1), S. 452. DOI: 10.1186/s13023-021-02084-w.
- Shenoy, Avinash R.; Visweswariah, Sandhya S. (2003): Site-directed mutagenesis using a single mutagenic oligonucleotide and DpnI digestion of template DNA. In: *Analytical Biochemistry* 319 (2), S. 335–336. DOI: 10.1016/S0003-2697(03)00286-0.
- Singewald, Nicolas; Sinner, Catrin; Hetzenauer, Alfred; Sartori, Simone B.; Murck, Harald (2004): Magnesium-deficient diet alters depression- and anxiety-related behavior in mice--influence of desipramine and Hypericum perforatum extract. In: *Neuropharmacology* 47 (8), S. 1189–1197. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2004.08.010.
- Stürznickel, Julian; Schmidt, Felix N.; Vopelius, Emil von; Delsmann, Maximilian M.; Schmidt, Constantin; Jandl, Nico Maximilian et al. (2021): Bone healing

- and reactivation of remodeling under asfotase alfa therapy in adult patients with pediatric-onset hypophosphatasia. In: *Bone* 143, S. 115794. DOI: 10.1016/j.bone.2020.115794.
- Tripp, E. J.; Mackay, E. H. (1972): Silver staining of bone prior to decalcification for quantitative determination of osteoid in sections. In: *Stain Technology* 47 (3), S. 129–136. DOI: 10.3109/10520297209116467.
- Vimalraj, Selvaraj (2020): Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. In: *Gene* 754, S. 144855. DOI: 10.1016/j.gene.2020.144855.
- Waterhouse, Andrew; Bertoni, Martino; Bienert, Stefan; Studer, Gabriel; Tauriello, Gerardo; Gumienny, Rafal et al. (2018): SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. In: *Nucleic acids research* 46 (W1), W296-W303. DOI: 10.1093/nar/gky427.
- Waymire, K. G.; Mahuren, J. D.; Jaje, J. M.; Guilarte, T. R.; Coburn, S. P.; MacGregor, G. R. (1995): Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. In: *Nature genetics* 11 (1), S. 45–51. DOI: 10.1038/ng0995-45.
- Whyte, Michael P. (2016): Hypophosphatasia - aetiology, nosology, pathogenesis, diagnosis and treatment. In: *Nature reviews. Endocrinology* 12 (4), S. 233–246. DOI: 10.1038/nrendo.2016.14.
- Whyte, Michael P.; Greenberg, Cheryl R.; Salman, Nada J.; Bober, Michael B.; McAlister, William H.; Wenkert, Deborah et al. (2012): Enzyme-replacement therapy in life-threatening hypophosphatasia. In: *The New England journal of medicine* 366 (10), S. 904–913. DOI: 10.1056/NEJMoa1106173.
- Whyte, Michael P.; Madson, Katherine L.; Phillips, Dawn; Reeves, Amy L.; McAlister, William H.; Yakimoski, Amy et al. (2016): Asfotase alfa therapy for children with hypophosphatasia. In: *JCI insight* 1 (9), e85971. DOI: 10.1172/jci.insight.85971.
- Wiedemann, Philip; Schmidt, Felix N.; Amling, Michael; Yorgan, Timur A.; Barvencik, Florian (2023): Zinc and vitamin D deficiency and supplementation in hypophosphatasia patients - A retrospective study. In: *Bone* 175, S. 116849. DOI: 10.1016/j.bone.2023.116849.

Zhao, Wenbo; Wiedemann, Philip; Wölfel, Eva Maria; Neven, Mona; Peters, Stephanie; Imhof, Thomas et al. (2021): Decreased Trabecular Bone Mass in Col22a1-Deficient Mice. In: *Cells* 10 (11), S. 3020. DOI: 10.3390/cells10113020.

9 Abbildungsverzeichnis

Quellenangaben zu Abbildungen befinden sich im Text unterhalb der zugehörigen Graphik. Abbildungen ohne Quellenangabe wurden vom Autor für den Zweck dieser Arbeit eigens angefertigt.

Abbildung 1: Quartärstruktur der gewebeunspezifischen Alkalischen Phosphatase im SWISS-Model, Repository Code P05186.	6
Abbildung 2: in-vitro Aktivitätsverhalten der AP bei Vorliegen der Mutation c.571G>A	9
Abbildung 3: zirkuläre Darstellung von pCMV6-ALPL in SerialCloner.....	26
Abbildung 4: Gelelektrophorese zur Beurteilung der vorausgegangenen PCR.....	28
Abbildung 5: Bakterienkultur auf Kanamycin-Agarplatten.	29
Abbildung 6: Ergebnis der Sequenzierung für c.119C>T.	30
Abbildung 7: Auswertung der Genotypisierung der Alpl-Mäuse in der BioEdit-Software.....	37
Abbildung 8: beispielhafte Kontaktröntgenaufnahme einer ALPL-KI-Maus	39
Abbildung 9: beispielhafte Histologische Schnitte.	42
Abbildung 10: gepoolte Aktivität von pCMV6-ALPL und pCMV6-Entry über alle Versuche	45
Abbildung 11: Übersicht aller untersuchten ALPL-Varianten sowie pCMV6-Entry hinsichtlich ihrer nativen Aktivität.....	47
Abbildung 12: Übersicht der Aktivität aller untersuchten Mutationen sowie pCMV6-ALPL und pCMV6-Entry nach Zugabe von 1 mM MgCl ₂	48
Abbildung 13: Aktivitätsverhalten der auf MgCl ₂ mit Aktivitätssteigerung reagierenden Mutationen.	50
Abbildung 14: Dosis-Wirkungs-Beziehung für pCMV6-ALPL und c.340G>A nach Zugabe von MgCl ₂	51
Abbildung 15: Übersicht der Aktivität aller untersuchten Mutationen sowie pCMV6-ALPL und pCMV6-Entry nach Zugabe von 20 µM ZnCl ₂	52
Abbildung 16: Aktivitätsverhalten der auf ZnCl ₂ mit Aktivitätsreduktion reagierenden Mutationen.....	54
Abbildung 17: Übersicht der Aktivität aller untersuchten Mutationen sowie pCMV6-ALPL und pCMV6-Entry nach Zugabe von 50 µM Strontiumranelat.	55

Abbildung 18: Aktivitätsverhalten der auf Strontiumranelat mit einer Aktivitätsveränderung reagierenden Mutationen.	57
Abbildung 19: Aktivitätsverhalten der auf keines der zugegebenen Additive responsiven Mutationen.	59
Abbildung 20: exemplarische radiographische Gegenüberstellung von männlichen Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten (v.l.) ALPL ^{E191K} -Mäusen im Alter von 12 Wochen (links) sowie Vergleich von Körpergewicht und Femurlänge der untersuchten Gruppen (rechts).....	60
Abbildung 21: exemplarische radiographische Gegenüberstellung von weiblichen Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten (v.l.) ALPLE191K-Mäusen im Alter von 12 Wochen (links) sowie Vergleich von Körpergewicht und Femurlänge der untersuchten Gruppen (rechts).....	61
Abbildung 22: exemplarische histologische Gegenüberstellung von männlichen Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten (v.o.) ALPL ^{E191K} -Mäusen im Alter von 12 Wochen (links) sowie statistische Darstellung der relevanten histomorphometrischen Parameter der untersuchten Gruppen (rechts).....	62
Abbildung 23: exemplarische histologische Gegenüberstellung von weiblichen Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten (v.o.) ALPL ^{E191K} -Mäusen im Alter von 12 Wochen (links) sowie statistische Darstellung der relevanten histomorphometrischen Parameter der untersuchten Gruppen (rechts).....	63
Abbildung 24: Serumaktivität der Alkalischen Phosphatase bei den untersuchten Tieren.	64
Abbildung 25: exemplarische computertomographische Gegenüberstellung von männlichen Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten (v.o.) ALPL ^{E191K} -Mäusen im Alter von 12 Wochen (links) sowie statistische Darstellung der relevanten histomorphometrischen Parameter der untersuchten Gruppen (rechts).....	65
Abbildung 26: exemplarische computertomographische Gegenüberstellung von weiblichen Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten (v.o.) ALPLE191K-Mäusen im Alter von 12 Wochen (links) sowie statistische Darstellung der relevanten histomorphometrischen Parameter der untersuchten Gruppen (rechts).....	66
Abbildung 27: artifizielle Knochenveränderungen bei homozygoten ALPL ^{E191K} -Mäusen.	67

Abbildung 28: räumliche Anordnung der Mutationen c.340G>A, c.346G>T und c.406C>T (von oben nach unten) in Relation zu den metallbindenden Domänen und dem aktiven Zentrum (vgl. auch Abbildung 1). 69

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über Merkmale der Hypophosphatasie	1
Tabelle 2: diagnostische Charakteristika der Hypophosphatasie	3
Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten ALPL-Mutationen	8
Tabelle 4: im Rahmen dieser Arbeit verwendete Geräte und Ausrüstungsgegenstände.....	10
Tabelle 5: im Rahmen dieser Arbeit verwendetes Verbrauchsmaterial	12
Tabelle 6: im Rahmen dieser Arbeit verwendete Reaktionssätze	13
Tabelle 7: im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien	14
Tabelle 8: im Rahmen dieser Arbeit verwendete Fertiglösungen und Pulver	16
Tabelle 9: im Rahmen dieser Arbeit verwendete Enzyme	17
Tabelle 10: im Rahmen dieser Arbeit verwendete Zelllinie.....	17
Tabelle 11: Agilent QuikChange II XL Mutagenese PCR-Programm	22
Tabelle 12: Agilent QuikChange Lightning Kit Mutagenese PCR-Programm	23
Tabelle 13: Agilent QuikChange Lightning Kit Mutagenese PCR-Programm, optimiert für die Mutationen c.738G>T, c.976G>C und c.1228T>C	23
Tabelle 14: PCR-Programm für die Genotypisierung der ALPL-KI-Mäuse.....	23
Tabelle 15: Agilent QuikChange Lightning Kit Mutagenese PCR-Reaktionsansatz	24
Tabelle 16: Agilent QuikChange II XL Mutagenese PCR-Reaktionsansatz.....	24
Tabelle 17: PCR-Reaktionsansatz für die Genotypisierung der ALPL-KI-Mäuse .	24
Tabelle 18: im Rahmen dieser Arbeit verwendete Software.....	25
Tabelle 19: Konzentrationen und benötigte Volumina für 1µg DNA der untersuchten Mutationen sowie pCMV6-Entry und pCMV6-ALPL nach DNA-Präparation	31
Tabelle 20: Verdünnungsreihe für BSA zur Konzentrationsbestimmung im Bradford-Assay.	33
Tabelle 21: Histomorphometrieparameter nach Richtlinien der ASBMR im µCT .	40
Tabelle 22: Signifikanzniveaus in dieser Arbeit und deren Darstellung in Graphiken.	43
Tabelle 23: Aktivitätsverhalten von pCMV6-ALPL und pCMV6-Entry.....	45
Tabelle 24: native Aktivität der untersuchten ALPL-Varianten und pCMV6-Entry.	46
Tabelle 25: Aktivitätsverhalten derjenigen Mutationen, welche nach Zugabe von MgCl ₂ mit einer Aktivitätssteigerung reagieren.....	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 26: Aktivitätsverhalten derjenigen Mutationen, welche nach Zugabe von ZnCl ₂ mit einer Aktivitätsreduktion reagieren.....	53
Tabelle 27: Aktivitätsverhalten derjenigen Mutationen, welche nach Zugabe von Strontiumranelat mit einer Aktivitätsveränderung reagieren.....	56
Tabelle 28: Aktivitätsverhalten der nicht additivresponsiven Mutationen.....	58
Tabelle 29: CAS- und EG-Nummern sowie H- und P-Sätze der eingesetzten chemischen Substanzen (vgl. Abschnitt 2.1.4).....	76
Tabelle 30: H-Sätze der unter 5.1 aufgeführten Substanzen entsprechend Verordnung (EG) Nr. 1272/2008, Art. 21, Anhang III.....	78
Tabelle 31: P-Sätze der unter 5.1 aufgeführten Substanzen entsprechend Verordnung (EG) Nr. 1272/2008, Art. 22, Anhang IV	79

11 Danksagung

Wie jede wissenschaftliche Arbeit ist auch die hier vorliegende nicht als alleiniges Werk meiner Person zu sehen. Auf dem Weg zur fertigen Dissertationsschrift habe ich von unzähligen Seiten Unterstützung erfahren, sowohl im akademischen Umfeld als auch im Privaten. Ich bin ewig dankbar für jedes Wort der Ermutigung und jede Geste der Hilfestellung, und diese waren im Laufe meines Lebens so zahlreich, dass ich an dieser Stelle nicht jede wohlwollende Person namentlich aufzuführen vermag. Nichtsdestoweniger sollen in den folgenden Absätzen einige wichtige Einflüsse auf diese Arbeit ehrend hervorgehoben werden.

Danken möchte ich zunächst Prof. Dr. Michael Amling und Prof. Dr. Thorsten Schinke für die Möglichkeit der Mitarbeit an ihrem Institut. Allem voran gilt mein Dank insbesondere PD Dr. Timur Alexander Yorgan für die hervorragende Betreuung, geduldige Anleitung und ständige Ermutigung. Von dir habe ich in einem halben Jahr mehr über Wissenschaft gelernt als in sechs Jahren Studium. Für Tipps, Tricks und Unterstützung danke ich dem Team des IOBM und der AG Histomorphometrie und Phänotypisierung, namentlich insbesondere Dr. Anke Baranowsky, Dr. Laura Brylka, Armelle Carreau, Dr. Julia Luther, Mona Neven, Claudia Reymers und Dr. Wenbo Zhao.

Nachdem die Fertigstellung dieser Arbeit nach meinem Berufsbeginn fiel, gilt mein Dank ebenfalls allen Kolleginnen und Kollegen der IV. Medizinischen Klinik und Zentralen Notaufnahme am Universitätsklinikum Augsburg, die mich dazu motivierten, die Arbeit nicht zu lange unberührt ruhen zu lassen.

Des Weiteren wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen ohne Beitrag der folgenden Personen, denen ich ebenfalls meinen Dank aussprechen möchte:

Sybille und Harald Allnoch für die viel zu lange notwendige und nahezu grenzenlose Unterstützung

Dr.-Ing. des. Jakob Breiner für gegenseitige Motivation und absolut nicht standesgemäße Blödelei

Deborah Dillmann für linguistische Korrektur und Käsekuchen

Danksagung

Hartmut und Renate Egle für unerschütterlichen Glauben

Dr. Nele Groß für wissenschaftlichen Austausch, Relativieren des Stellvertreter-Syndroms und freundschaftlichen Aufbau auf und neben der Matte

Johannes Seiderer für fachlichen Austausch, gegenseitige Motivation und Unmengen blauer Flecken

Barbara Wiedemann für Perspektivwechsel und ständigen Realitätsabgleich

Eric Wiedemann für moralische Unterstützung in schweren Lebenslagen und gut gemeintes Genörgel

Franz Joseph und Sophie Wiedemann für das familiäre Fundament meiner Leistungen

Norbert Wiedemann für anhaltende Ermutigung

Abschließend möchte ich mich bei Dr. des. Paula Schäfer bedanken für unermüdlichen seelischen Aufbau und Motivation, fachlich-wissenschaftliche Expertise und liebevolle Begleitung meines Lebens.

12 Lebenslauf

Ausbildung und Studium

seit März 2021	Universität Hamburg , Institut für Osteologie und Biomechanik (Direktor Prof. Dr. med. Michael Amling), Promotionsverfahren
seit Dez. 2020	FernUniversität in Hagen , Institut für Philosophie (Prof. Dr. med. Dr. phil. Orsolya Friedrich) Weiterbildendes Studium Medizinethik
Okt. 2016 – Dez. 2022	Universität Hamburg , Medizinische Fakultät Integrierter Modellstudiengang Medizin (iMed) Ärztliche Prüfung, Approbation als Arzt Dez. 2022
Sep. 2009 – Aug. 2010	Paramed Rettungsdienstschule , Kempten/Allgäu Staatliche Prüfung zum Rettungsassistenten
Sep. 2000 – Mai 2009	Gymnasium Marktoberdorf Allgemeine Hochschulreife

Berufstätigkeit

seit Aug. 2023	Universitätsklinikum Augsburg , Klinik für Urologie (Direktorin Prof. Dr. med. Dorothea Weckermann) Arzt in Weiterbildung
Feb. 2023 – Aug. 2023	Universitätsklinikum Augsburg , IV. Medizinische Klinik und Zentrale Notaufnahme (Direktor: PD Dr. med. Markus Wehler) Arzt in Weiterbildung
Dez. 2012 – Nov. 2014	Freie und Hansestadt Hamburg, Behörde für Inneres und Sport, Berufsfeuerwehr Rettungsassistent
März 2012 – Nov. 2012	DRK Fahrdienste und Service GmbH , Frankfurt am Main Rettungsassistent
Jan. 2011 – Jan. 2012	Bäuerle Ambulanz OHG , Augsburg Rettungsassistent im Praktikum

Publikationen

Wiedemann P, Schmidt FN, Amling M, Yorgan TA, Barvencik F. Zinc and vitamin D deficiency and supplementation in hypophosphatasia patients - A retrospective study. *Bone*. 2023 Jul 22;175:116849. doi: 10.1016/j.bone.2023.116849

Zhao W, **Wiedemann P**, Wölfel EM, Neven M, Peters S, Imhof T, Koch M, Busse B, Amling M, Schinke T, Yorgan TA. Decreased Trabecular Bone Mass in *Col22a1*-Deficient Mice. *Cells*. 2021; 10(11):3020.
<https://doi.org/10.3390/cells10113020>

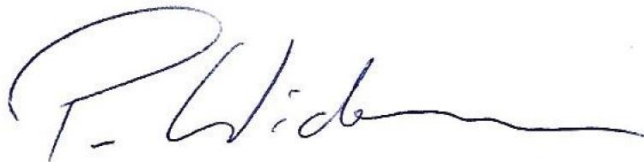
13 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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.

Unterschrift:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'T. Widen', with a long horizontal flourish extending to the right.