

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Osteologie und Biomechanik

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Amling

Klinisches Spektrum bei Patienten mit Verdacht auf adulte Hypophosphatasie in Abhängigkeit von spezifischen Mutationen im *ALPL*-Gen

Dissertation

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

vorgelegt von:

Konstantin Chrysostomou

aus Leer

Hamburg 2021

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 15.02.2022

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Kerstin Kutsche

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Florian Barvencik

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	4
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung.....	8
1.1 Klinisches Erscheinungsbild.....	9
1.2 Formen der Hypophosphatasie.....	11
1.3 Pathophysiologie.....	13
1.4 Diagnostik	14
1.5 Enzyersatztherapie	15
1.6 Arbeitshypothesen und Fragestellungen.....	15
2 Material und Methodik	17
2.1 Studiendesign	17
2.2 Patienten und Einschlusskriterien	19
2.3 Laborchemische Analysen	20
2.3.1 Aktivität der Serum-AP	20
2.3.2 Pyridoxal-5-Phosphat	21
2.3.3 Parameter des Knochenmetabolismus.....	22
2.4 Handkraftmessung	22
2.5 Knochendichtemessung.....	23
2.6 Humangentische Analyse des <i>ALPL</i> Gens	24
2.7 Genmutationsdatenbanken	25
2.8 Fragebogen: Brief Pain Inventory	26
2.9 Statistische Auswertung.....	26
2.10 Literaturrecherche.....	27
3 Ergebnisse	28
3.1 Darstellung und Einteilung der Vergleichsgruppen	28
3.1.1 Darstellung der pathogenen <i>ALPL</i> -Varianten	28

3.1.2 Darstellung der fraglich pathogenen <i>ALPL</i> -Varianten.....	30
3.1.3 Darstellung der neutralen <i>ALPL</i> -Varianten	31
3.2 Klinische Charakterisierung seltener Varianten	31
3.2.1 Symptomatik.....	34
3.2.2 Laborchemie.....	35
3.2.3 Knochendichte.....	38
3.2.4 Humangenetische Befunde	38
3.3 Subjektive Wahrnehmung der Erkrankung durch Patienten.....	41
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	49
4 Diskussion.....	50
4.1 Klassifikation der fraglich pathogenen <i>ALPL</i> -Varianten	51
4.2 HPP-typische Laborkonstellation	55
4.3 Brief Pain Inventory als universelles Schmerzerfassungsinstrument.....	55
4.4 Humangenetische Analysen als notwendiges Diagnosekriterium	56
4.5 Limitationen.....	57
4.6 Fazit.....	58
5 Zusammenfassung.....	60
5.1 Summary.....	61
6 Literaturverzeichnis	62
7 Anmerkungen	69
8 Anhang.....	70
9 Danksagung	75
10 Lebenslauf.....	76
11 Eidesstattliche Versicherung	77

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen:

Abbildung 1: MRT-Aufnahme des Kniegelenks	9
Abbildung 2: Pathologischer Zahnstatus eines HPP-Patienten	10
Abbildung 3: Mineralisationsstörung des mineralisierten Knochengewebes	10
Abbildung 4: Schema der HPP-Pathophysiologie	14
Abbildung 5: Schema zur Identifikation und Klassifikation	18
Abbildung 6: Mechanograph GK® von Novotec	23
Abbildung 7: Darstellung der PLP, AP und bAP	36
Abbildung 8: Korrelation zwischen AP zu bAP und PLP	37
Abbildung 9: Zusammenfassende Darstellung	40
Abbildung 10: BPI-Kategorien – Darstellung im Median.....	44

Tabellen

Tabelle 1: HPP-Einteilung nach Manifestationsalter.....	11
Tabelle 2: AP-Referenzbereiche	21
Tabelle 3: Referenzbereich Pyridoxal-5-Phosphat	21
Tabelle 4: Referenzbereiche Knochenmetabolismus	22
Tabelle 5: T-Wert-Referenzbereiche zur Knochendichte.....	23
Tabelle 6: Nachweis pathologischer <i>ALPL</i> -Varianten.....	29
Tabelle 7: Nachweis fraglich pathogener <i>ALPL</i> -Varianten	30
Tabelle 8: Nachweis neutraler <i>ALPL</i> -Varianten.....	31
Tabelle 9: Einordnung fraglich pathogener <i>ALPL</i> -Varianten	32
Tabelle 10: Auswertung der Knochenmetabolismusparameter	37
Tabelle 11: Darstellung BMD fraglich pathogener Varianten.....	38
Tabelle 12: BPI-Werte fraglich pathogener Varianten	45
Tabelle 13: BPI-Werte pathogener Varianten.....	46
Tabelle 14: BPI-Werte neutraler Varianten.....	48

Abkürzungsverzeichnis

AP	=	Alkalische Phosphatase
bAP	=	bone-specific/ knochenspezifische AP
BPI	=	Brief Pain Inventory
Ca	=	Calcium
DPD	=	Desoxypyridinolin
DXA	=	Dual-x-ray-absorptiometry
HPP	=	Hypophosphatasie
IOBM	=	Institut für Osteologie und Biomechanik
MRT	=	Magnetresonanztomographie
PEA	=	Phosphoethanolamin
PLP	=	Pyridoxal-5-phosphat
Red. GK	=	reduzierte Griffkraft
TNSALP	=	tissue-non-specific/ gewebsunspezifische AP
UKE	=	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
25-OH-D3	=	25-Hydroxyvitamin D3

Abkürzungen der Humangenetik

del	=	Deletion
dup	=	Duplikation

Abkürzungstabelle der Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1 Einleitung

Die Hypophosphatasie (HPP) wurde erstmals 1948 von Rathbun als eigenständiges und seltenes Krankheitsbild beschrieben (Rathbun, 1948). Heutzutage ist bekannt, dass sie sich als erbliche und metabolische Multisystemerkrankung darstellt, die sich vor allem negativ auf die Knochen- und Zahnmineralisation auswirkt (Mornet, 2018), sich aber häufig auch in Form von Arthralgien, muskulären und neuropsychiatrischen Symptomen äußert (Schmidt et al., 2017). Schwere Verlaufsformen weisen eine Prävalenz von 1/100.000 bis 1/300.000 auf, während milde Krankheitsverläufe weitaus häufiger mit einer Prävalenz von 1/500 auftreten (Fraser, 1957, Mornet et al., 2011, Mornet et al., 2021).

Ursächlich für das Auftreten dieser Erkrankung ist eine loss-of-function-Mutation im *ALPL*-Gen, welches zu einer Dysfunktion der gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase führt (TNSALP) (Bianchi, 2015). Das klinische Bild variiert stark und schlägt sich in milden bis hin zu tödlichen Verläufen nieder. In der Vergangenheit hatte sich eine Unterteilung der HPP anhand von Erkrankungsbeginn und spezifischer Symptomatik in 6 Untergruppen durchgesetzt, wobei die Übergänge kritisch betrachtet als fließend einzustufen sind. Man unterscheidet die perinatal letale, pränatal benigne, infantile, kindliche, adulte und Odonto-HPP (Khan et al., 2019). Aktuell geht die Entwicklung in Richtung einer genetischen Einteilung, welche die HPP in eine schwere, eine moderate und eine milde Verlaufsform unterteilt (Mornet et al., 2021).

Laborchemisch imponieren eine niedrige Serumaktivität der alkalischen Phosphatase (AP) (Schmidt et al., 2017) sowie erhöhte Pyridoxal-5-Phosphatwerte, aufgrund einer Anhäufung der Substrate der AP (Wilson et al., 2019). Humangenetische Untersuchungen konnten über 400 verschiedene krankheitsverursachende Genvarianten im *ALPL*-Gen aufdecken (Mornet et al., 2021). Diese Arbeit wird nach Einführung in das Thema, Zusammenhänge zwischen klinischen Symptomen und Befunden, laborchemischen Parametern und Genbefunden darstellen, statistisch vergleichen und diskutieren.

1.1 Klinisches Erscheinungsbild

Das klinische Erscheinungsbild variiert stark. Zu typischen Symptomen zählen v.a. Knochen- und Zahnmineralisationsstörungen, allerdings konnten auch unspezifische Symptome, wie z.B. Muskelschmerz, Muskelschwäche, neurologische und psychiatrische Beschwerden identifiziert werden (Mornet, 2018, Lefever et al., 2018).

Eine Störung der Knochenmineralisation kann sich in Form von Stressfrakturen, Frakturen ohne adäquates Trauma, Frakturheilungsstörungen, Knochenmarködem oder Osteomalazie äußern (Schmidt et al., 2017).

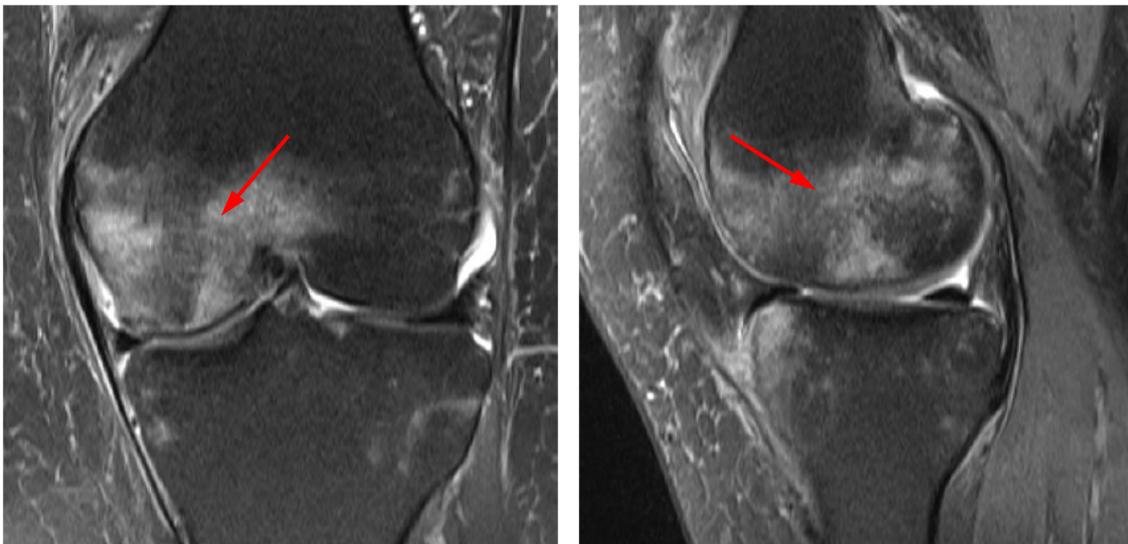


Abbildung 1: MRT-Aufnahme coronar/sagittal des Kniegelenks in PD-Wichtung

Die Abbildung zeigt das Kniegelenk einer 30-jährigen HPP-Patientin mit der pathogenen Mutation „c.571G>A (p.E191K)“. Die hyperintense Region im distalen Femur entspricht einem Knochenmarködem (rote Pfeile).

(bereitgestellt vom IOBM des UKE Hamburg)

Zahnmineralisationsstörungen gehen oft mit frühem Zahnverlust der Milchzähne vor dem fünften Lebensjahr oder der bleibenden Zähne, schlechtem Zahnstatus sowie gehäuften Zahnextraktionen einher (Schmidt et al., 2017).



Abbildung 2: Pathologischer Zahnstatus einer HPP-Patientin

Hypomineralisation der Schneidezähne und Zahnfehlstellung einer 41-jährigen HPP-Patientin mit der pathogenen Mutation „c.406C>T (p.R136C)“ dargestellt.

(bereitgestellt vom IOBM des UKE Hamburg)

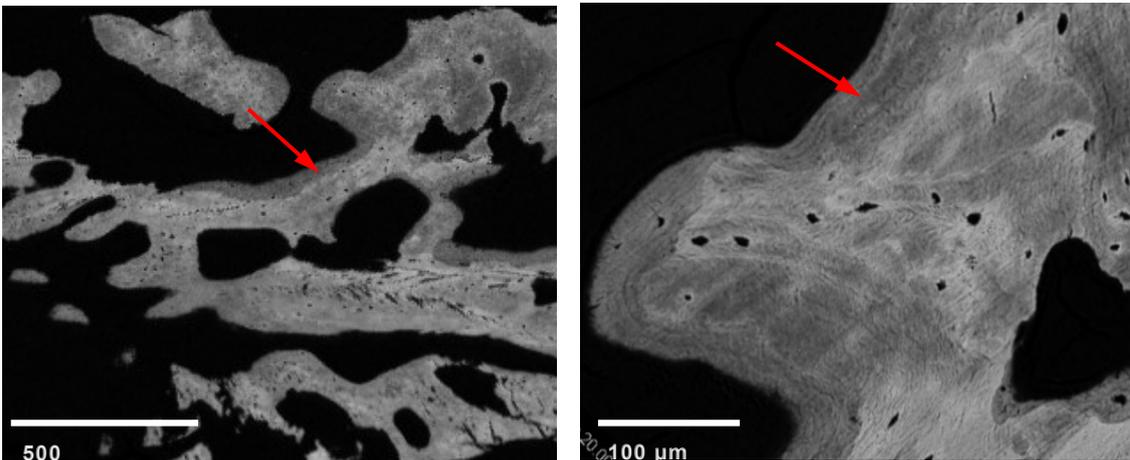


Abbildung 3: Mineralisationsstörung des mineralisierten Knochengewebes

Rasterelektronenmikroskopie einer Beckenkammbiopsie einer 30-jährigen HPP-Patientin mit der pathogenen Mutation „c.571G>A (p.E191K)“: Dunkelgrau, durch rote Pfeile markiert, sind hypomineralisierte Knochenanteile dargestellt.

(bereitgestellt vom IOBM des UKE Hamburg)

Eine muskuläre Beteiligung manifestiert sich häufig in Muskelschmerzen, Muskelschwäche und Sehnenkalzifikationen, während sich neuropsychiatrische Symptome in Migräne, Cephalgien, Epilepsien, Fatigue sowie Depressionen äußern können (Schmidt et al., 2017, Colazo et al., 2019).

1.2 Formen der Hypophosphatasie

Wie einleitend bereits beschrieben lässt sich die Hypophosphatasie in 6 klinische Formen unterteilen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: HPP-Einteilung nach Manifestationsalter

HPP-Einteilung	Erstmanifestation	Symptomatik
Perinatale HPP	in utero	Thoraxdeformitäten, Lungenhypoplasie, Störung der Knochenmineralisation, häufig letal
Pränatal, benigne HPP	in utero	Gebogene Röhrenknochen ohne Frakturen (meist rückläufig im 3. Trimester)
Infantile HPP	< 6 Monate	Rachitis, Knochenschmerz, Frakturen, respiratorische Defizite, Hyperkalzämie, Zahnverlust, Kleinwuchs
Kindliche HPP	6 Monate bis 18 Jahre	früher Milchzahnverlust, Kleinwuchs, Frakturen, muskuloskeletale Schmerzen, Muskelschwäche, vergrößerte Gelenke
Adulte HPP	> 18 Jahre	geringe Knochendichte, Frakturheilungsstörungen, Schmerz, Osteoporose, Osteomalazie, pathologischer Zahnstatus, früher Zahnverlust
Odonto-HPP	> 6 Monate	früher Milchzahnverlust, Zahnverlust bleibender Zähne, schwerer Karies, gestörte Zahnmineralisation

(Quellen: Mornet, 2018, Wenkert et al., 2011, Briot and Roux, 2016, Bianchi, 2015, Bloch-Zupan, 2016.)

Die schwere perinatale Form der HPP, gilt als der Typ mit dem fulminantesten Krankheitsverlauf und endet ohne Enzyersatztherapie meist tödlich. Neugeborene sterben entweder unter der Geburt oder wenige Tage danach. Thoraxdeformitäten und Lungenhypoplasien durch unzureichende Knochenmineralisation in der Schwangerschaft zeichnen diese Unterform aus. Diese Defizite sind bereits im Mutterleib radiologisch nachweisbar (Mornet, 2018).

Die pränatale benigne Form hat keine letale Konsequenz. Bereits im Mutterleib imponieren gebogene Röhrenknochen ohne Frakturen, meist mit Rückbildung im dritten Schwangerschaftstrimester. Im Verlauf können sich oft Knochen und Zahnmanifestationen zeigen (Wenkert et al., 2011).

Die infantile HPP manifestiert sich innerhalb der ersten sechs Lebensmonate. Neben Rachitis, Knochenschmerz und Frakturen finden sich auch hier respiratorische Defizite durch Thoraxdeformitäten. Weitere Symptome aufgrund einer Hypercalciämie sind v.a. Mangelernährung durch Appetitlosigkeit und Polydipsie sowie Polyurie mit einhergehender Dehydratation. Als Spätfolgen zeigen sich Zahnverluste und Kleinwuchs (Mornet, 2018).

Bei einer Manifestation zwischen dem sechsten Lebensmonat und 18. Lebensjahr spricht man von der kindlichen HPP. Als Kardinalsymptom stellt sich hierbei der frühe Milchzahnverlust dar, v.a. vor dem fünften Lebensjahr. Auch diese Form geht sowohl mit Kleinwuchs, gehäuften Frakturen, muskuloskelettalen Schmerzen und Muskelschwäche als auch mit rachitischen Veränderungen von Gelenken einher (Mornet, 2018).

Die adulte HPP, oft milder als pädiatrische Formen, tritt häufig im mittleren Lebensalter auf. Sie ist mit Stressfrakturen, Frakturheilungsstörungen, Schmerz, Osteomalazie und selten Skoliosen assoziiert. Ebenso zeigen sich oft ein pathologischer Zahnstatus und/oder früher Zahnverlust (Briot and Roux, 2016, Bianchi, 2015, Mornet, 2018).

Die mildeste Form der HPP ist die auf Zahnmineralisationsstörungen beschränkte Odonto-HPP, die charakterisiert ist durch einen pathologischen Zahnstatus und frühen Milchzahn- und permanenten Zahnverlust sowie schweren Karies.

Es imponieren eine abnormale Zahnfarbe, defekte Zahnstruktur und reduzierte Größe einzelner Zähne (Bloch-Zupan, 2016, Mornet, 2018).

1.3 Pathophysiologie

Die Pathogenese der HPP im Allgemeinen beruht auf einer loss-of-function Mutation im *ALPL*-Gen auf Chromosom 1, allerdings mit inkompletter Penetranz. Das *ALPL*-Gen besteht aus über 69 Kilobasen und enthält 12 Exone. Dieses Gen kodiert für die gewebsunspezifische alkalische Phosphatase (TNSALP), welche neben Leber und (Neben-)Nieren auch im Knochen und sich entwickelnden Zähnen exprimiert wird (Berkseth et al., 2013).

Durch die fehlende Aktivität der TNSALP entstehen Defizite in der Mineralisation von Knochen und Zähnen. Außerdem ist ein Bezug zu der Neurotransmittersynthese im zentralen Nervensystem hergestellt, was neurologische Symptomatiken erklärt (Orimo, 2016).

Die AP wird von Osteoblasten für den Knochenaufbau genutzt. Sie synthetisieren diese zum einen selbst, zum anderen entnehmen sie diese aus dem Blutkreislauf. Das Produkt Phosphat, welches aus der Spaltung von anorganischem Pyrophosphat durch die AP gewonnen wird, ist wesentlicher Bestandteil der mineralisierten Knochenmatrix. Es dient unter Mitwirkung von Calcium der Bildung von Hydroxylapatit.

Durch die reduzierte oder ausbleibende Aktivität der AP bleibt die oben genannte Reaktion aus, welches unter anderem zur Akkumulation von anorganischem Pyrophosphat führt, welches die Mineralisierung des Knochens inhibiert, wodurch ein höherer Anteil an Osteoid (nichtmineralisierte Knochensubstanz) resultiert (siehe Abbildung 4).

Das nun überschüssige Calcium bildet in der extrazellulären Matrix zusammen mit Phosphat Kristalle, die sich im Gewebe ablagern können. Eine Autoimmunreaktion bezogen auf diese Kristalle löst des Weiteren im Knochen, Gelenken und Muskulatur eine Entzündungsreaktion aus und führt zu Schmerzen (Whyte, 2016).

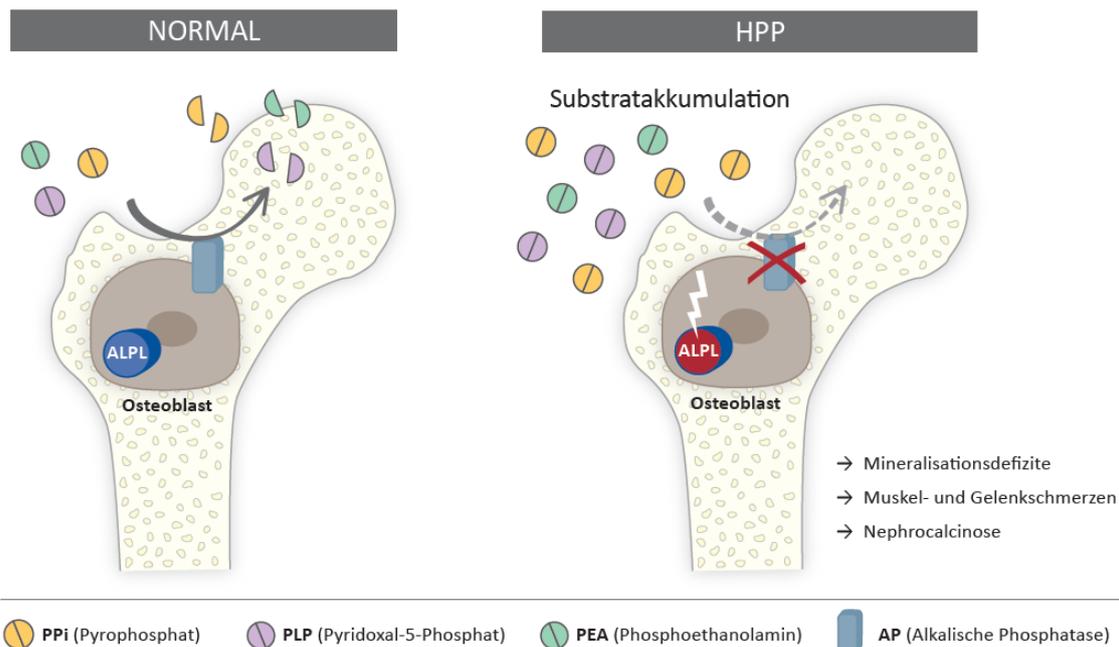


Abbildung 4: Schema der HPP-Pathophysiologie

(Quelle: Jandl et al. 2019)

1.4 Diagnostik

Die Diagnose der HPP wird durch die Zusammenschau aus Klinik, laborchemischer Konstellation und radiologischen Befunden gestellt und kann durch humangenetische Analyse zusätzlich bestätigt werden.

Als laborchemische Parameter dienen in erster Linie die Serumaktivität der alkalischen Phosphatase, da diese - wie pathophysiologisch bereits beschrieben – reduziert ist sowie erhöhtes Pyridoxal-5-phosphat, welches durch die Substratakkumulation der TNSALP ansteigt.

Zur radiologischen Bildgebung wird neben der Röntgendiagnostik, die zur Aufdeckung von Skelettdeformitäten und Frakturheilungsstörungen genutzt wird, auch die Magnetresonanztomographie angewandt, um Pathologien, wie z.B. Stressfrakturen und Knochenmarködeme frühzeitig zu identifizieren. Des Weiteren kann die Knochendichtemessung auf Mineralisationsstörungen im Knochen hinweisen, ist jedoch kein Verfahren, welches krankheitsspezifische Veränderungen erkennen lässt (Schmidt et al., 2017, Whyte, 2017).

Additiv zur klinischen Einordnung konnte durch humangenetische Sequenzanalysen der pathogene Charakter einzelner *ALPL*-Varianten anhand von Gen-Mutationstestprogrammen prognostiziert werden. Der Ausschluss bestimmter Differentialdiagnosen sowie die Einschätzung eines möglichen Vererbungsrisikos stellen einen weiteren Vorteil humangenetischer Analysen dar (Mornet, 2018).

1.5 Enzymersatztherapie

Die bisher einzig kausale Therapie bildet eine Enzymersatztherapie mittels Asfotase alfa (Handelsname: Strensiq®). Dieser Wirkstoff enthält das katalytische Zentrum der TNSALP, gekoppelt an eine menschliche IgG1-Fc-Domäne und einer Deca-Aspartat-Domäne. Es entfaltet seine Wirkung v.a. im Knochengewebe, aber auch in anderen Organen. Heutzutage findet es in vielen Ländern Anwendung zu Behandlung der von schwerst betroffenen HPP-Patienten, wenn Symptome vor dem 18. Lebensjahr aufgetreten sind (Mornet, 2018).

Des Weiteren wird Physiotherapie in jeder Altersgruppe empfohlen, um durch Muskelarbeit den Knochenmineralsalzgehalt und die Knochenqualität zu unterstützen. Supportiv können nicht-steroidale antiinflammatorische Analgetika (NSAID) über kurze Intervalle (Tage bis Wochen) genutzt werden, um Schmerzen und die inflammatorische Komponente einzudämmen, welches eine Funktionssteigerung zur Folge haben kann. Außerdem wird ein niedrig-normaler Vitamin-D3-Spiegel angestrebt, um eine Aggravation einer Hyperkalzämie zu vermeiden. Aufgrund der Substratakkumulation der AP, sollte eine phosphatarme Diät erwogen werden, vor allem wenn der Serumphosphatspiegel erhöht ist (Bianchi, 2015).

1.6 Arbeitshypothesen und Fragestellungen

Die Heterogenität der Hypophosphatasie und deren genetische Varianz sollen in dieser Arbeit durch folgende Arbeitshypothesen und Fragestellungen genauer untersucht und eingeteilt werden.

1. Welche klinischen Symptome und Befunde weisen Patienten mit seltenen *ALPL*-Varianten auf?

2. Gibt es Unterschiede in der subjektiven Krankheitsempfindung zwischen unterschiedlich klassifizierten Varianten?

3. Sind humangenetische Befunde allein ausreichend, um eine HPP zu diagnostizieren und spezifische Befunde zu prognostizieren?

Des Weiteren soll abschließend eine Bewertung der Genotyp-Phänotyp-Beziehung sowie die Einteilung fraglich pathogener Varianten gemäß internationaler Standardkriterien im wissenschaftlichen Kontext erfolgen.

2 Material und Methodik

Das folgende Kapitel dient der Darstellung des Studiendesigns sowie der Sichtung und Selektion der Patientenkohorte.

Zuerst wird eine Aufteilung in Patientengruppen in Abhängigkeit der Pathogenität ihrer nachgewiesenen *ALPL*-Genvarianten vorgenommen. Im Vordergrund dieser Studie steht die Einordnung von bislang noch nicht sicher als pathogen eingestuften *ALPL*-Varianten.

Retrospektiv erhobene laborchemische Parameter, Knochendichtemessung via dual-energy X-ray absorptiometry (DXA), Handkraftmessung und klinische Befunde werden aufgezeigt und erläutert. Außerdem wurde über eine modulierte Form des Brief Pain Inventory Fragebogen (siehe Anhang) eine subjektive Einschätzung der Patienten von Schmerzintensität und hierdurch bedingte Beeinträchtigungen im Leben erfasst (Cleeland and Ryan, 1994).

2.1 Studiendesign

Das Institut für Osteologie und Biomechanik (IOBM) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf behandelte in den Jahren 2009 bis 2019 insgesamt 140 Patienten im Rahmen der Hypophosphatasie-Spezialsprechstunde unter der Leitung von Prof. Dr. med. Florian Barvencik.

In einem retrospektiven Ansatz wurden humangenetische, laborchemische, klinische und radiologische Befunde von diesen Patienten gesichtet und bewertet, so dass 90 Patienten der Studie zugeführt werden konnten. Diese ließen sich in 49 Patienten mit gesichert pathogenen, 24 mit neutralen und 17 mit fraglich pathogenen genetischen *ALPL*-Varianten unterteilen.

Erste Patienten mit pathogenen Varianten wurden bereits 2016 vom IOBM publiziert (Schmidt et al., 2017). Diese Patientengruppe wurde fortlaufend erweitert und soll im Rahmen dieser Arbeit mit Patienten mit fraglich pathogenen Varianten verglichen werden.

Zur retrospektiven Auswertung wurden die klinischen Daten in anonymisierter Form in einer Datentabelle aufgenommen und auf einem internen passwortgeschützten

Rechner des Instituts ausgewertet. Eine Rückverfolgung der Patienten ist nicht möglich, da keine Schlüsselliste geführt wurde. Alle durchgeführten Maßnahmen dieser Studie stehen im Einklang mit der Deklaration von Helsinki und dem zuständigen Ethikkomitee (WF-055/19).

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in „*Jandl NM, Schmidt T, Rolvien T, Stürznickel J, Chrysostomou K, von Vopelius E, Volk AE, Schinke T, Kubisch C, Amling M, Barvencik F (2021) Genotype-Phenotype Associations in 72 Adults with Suspected ALPL-Associated Hypophosphatasia. Calcif Tissue Int.;108(3):288-301*“ publiziert. (siehe Kapitel 7. Anmerkungen)

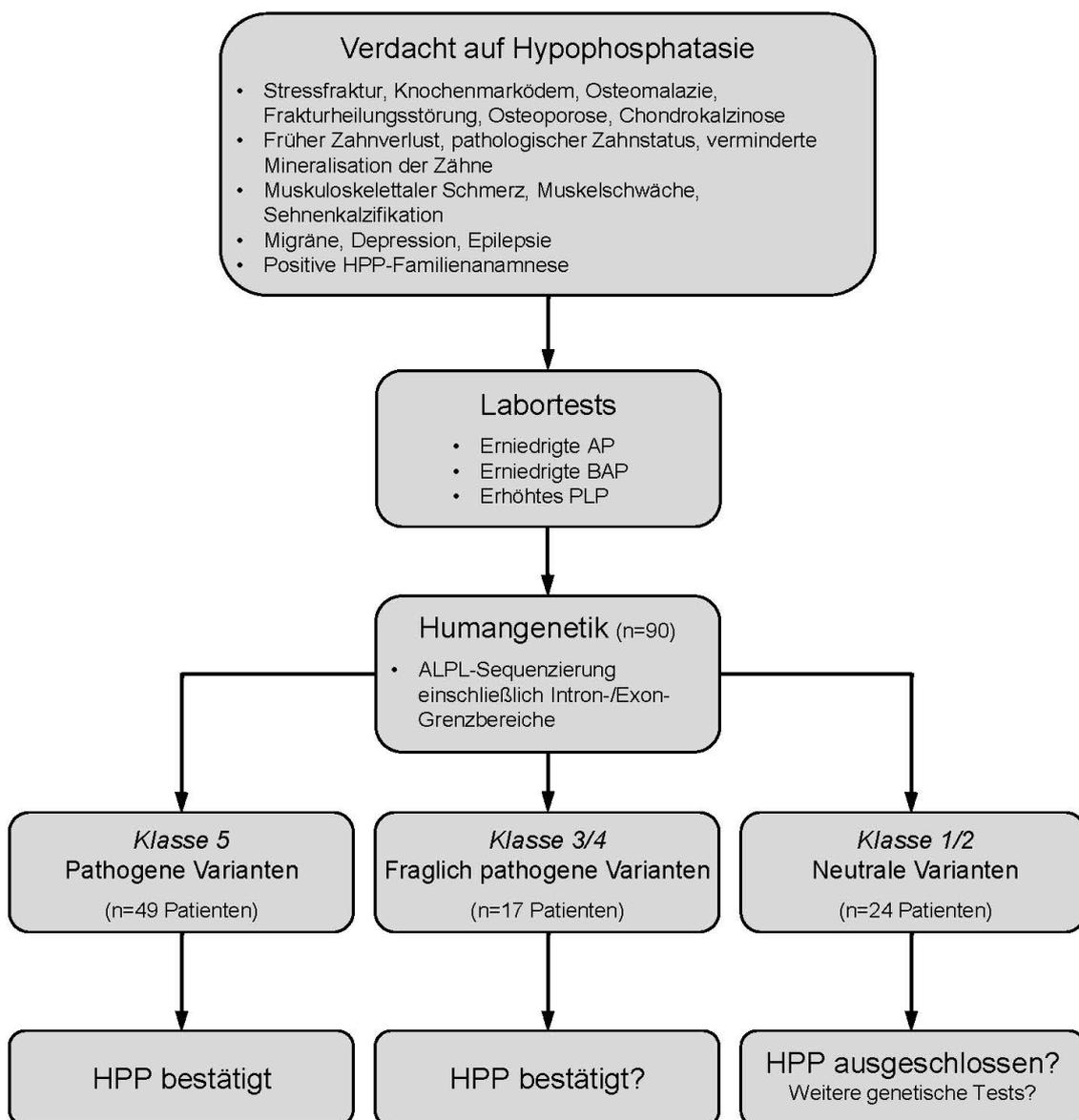


Abbildung 5: Schema zur Identifikation und Klassifikation

(Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis)

2.2 Patienten und Einschlusskriterien

Die Daten der oben genannten 140 Patienten wurden, wie im Folgenden erläutert, gesichtet und bewertet. Es wurden schließlich 90 Patienten nach folgenden Kriterien inkludiert (siehe Abb. 5):

1. Alter >18 Jahre
2. Klinische Symptome im Bereich des Skeletts, der Zähne, der Muskulatur sowie neuropsychologische Symptome
3. Wiederholter laborchemischer Nachweis einer verminderten Aktivität der AP und/oder knochenspezifischen alkalischen Phosphatase (bAP) unterhalb bekannter Referenzwerte oder im Bereich des unteren Viertels des Referenzbereichs.
4. Wiederholter laborchemischer Nachweis eines erhöhten Pyridoxalphosphates oberhalb des Referenzwertes

Die klinische Symptomatik im Bereich des Skeletts umfasste Stressfrakturen, Knochenmarködeme, Osteomalazie, Frakturheilungsstörungen, Osteoporose sowie Chondrocalcinose. Des Weiteren wurden ein pathologischer Zahnstatus, früher Zahnverlust, Zahnextraktionen und verminderte Zahnmineralisation erfasst. Ebenfalls wurde das Auftreten muskuloskelettalen Schmerzes und Muskelschwäche sowie Migräne, Depression und Epilepsie im Zusammenhang mit adulter Hypophosphatasie beachtet.

Zur Exklusion führten Differentialdiagnosen einer verminderten alkalischen Phosphatase, wie Osteogenesis imperfecta, renale Osteopathie (CKD-MBD, engl. Chronic kidney disease - mineral bone disorder), multiples Myelom, Zinkmangel, Magnesiummangel sowie Hypothyreose (Khan et al., 2019, Whyte, 2016). Weiterhin exkludiert wurden alle Patienten, die einer antiresorptiven Therapie, Steroidtherapie oder Vitamin B6-Einnahme unterlagen.

Eine humangenetische Untersuchung des *ALPL*-Gens erlaubte eine Einteilung in die bereits erwähnten Kohorten:

- Fraglich pathogene *ALPL*-Varianten (n=17)
- Neutrale *ALPL*-Varianten (n=24)
- Pathogene *ALPL*-Varianten (n=49)

Zur klinischen Charakterisierung der fraglich-pathogenen *ALPL*-Varianten wurden im Rahmen osteologischer Routineuntersuchungen sowohl dual-energy X-ray absorptiometry (DXA), Handkraftmessung, als auch Parameter des Knochenmetabolismus, wie AP sowie bAP im Serum, PLP, 25-OH-D₃, Parathormon, Osteocalcin, Calcium, Phosphat und Deoxypyridinolin im Urin erhoben.

2.3 Laborchemische Analysen

Alle, der Studie zugeführten laborchemischen Messungen AP, bAP, 25-OH-D₃, Calcium, Phosphat und Deoxypyridinolin-Crosslinks im Urin wurden durch das Institut der klinischen Chemie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bereitgestellt.

2.3.1 Aktivität der Serum-AP

Zur Aktivitätsmessung der alkalischen Phosphatase im Serum wurden ein Dimension Vista 1500 (Siemens, Erlangen, Germany) genutzt. Die Bestimmung erfolgt durch eine enzymkinetische Methode, bei der als Substrat ein farbloses organisches Phosphatester (p-Nitrophenylphosphat) durch die alkalische Phosphatase hydrolysiert wird. Durch diesen Prozess entsteht das Produkt Phosphat und p-Nitrophenol, welches eine gelbe Farbe aufweist. Durch eine photometrische Bestimmung bei 410 nm können Veränderungen in der Absorption proportional mit der Enzymaktivität in Verbindung gesetzt werden. Der Referenzbereich erstreckte sich von 35 bis 135 IU/l und ist alters- und geschlechtsspezifisch (siehe Tabelle 2) (Thomas et. al, 2005).

Tabelle 2: AP-Referenzbereiche alters- und geschlechtsspezifisch

knochenspezifische alkalische Phosphatase (bAP)		
Alter [Jahre]	Geschlecht	Referenzbereich [$\mu\text{g/l}$]
≤ 45	weiblich	4,9 – 26,6
	männlich	5,2 – 24,4
> 45	weiblich	5,5 – 22,9
	männlich	5,2 – 24,4
Alkalische Phosphatase (AP)		
Alter [Jahre]	Geschlecht	Referenzbereich [U/l]
> 18	weiblich	35 - 104
	männlich	40 - 129

(Quelle: Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des UKE)

2.3.2 Pyridoxal-5-Phosphat

Pyridoxal-5-Phosphat wurde durch das Lademannbogen Labor in Hamburg anhand eines lichtgeschützten Serum-Röhrchens nach Transport auf Eis bestimmt bereitgestellt. Die Messung wurde mittels einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high-performance liquid chromatography) durchgeführt. Als Messgerät diente ein Lithograph Merck Hitachi Fluoreszenzdetektor. Der obere Grenzwert wurde auf 18,5 $\mu\text{g/l}$ festgelegt (David A. Sampson, 1989).

Tabelle 3: Referenzbereich Pyridoxal-5-Phosphat

PLP	7,5-18,5 $\mu\text{g/l}$
Pyridoxin	<2 $\mu\text{g/l}$

(Quelle: Lademannbogen Labor Hamburg)

2.3.3 Parameter des Knochenmetabolismus

Des Weiteren stellte das Institut für klinische Chemie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf die Parameter knochenspezifische alkalische Phosphatase, Parathormon, 25-OH-D3, Calcium, Phosphat, Desoxypyridinolin im Urin zur Verfügung (siehe Tabelle 3).

Tabelle 4: Referenzbereiche Knochenmetabolismus

bAP	4,9-26,6 / 5,2-24,4 µg/l
Osteocalcin	5,4-59,1 µg/l
Calcium	2,13-2,63 mmol/l
Phosphat	0,77-1,50 mmol/l
25-OH-D3	30-60 µg/l
Parathormon	17-84 µg/l
DPD	Männer: 3 - 7,4 nmol/mmol Frauen: 2,3 - 5 nmol/mmol

(Quelle: Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des UKE)

2.4 Handkraftmessung

Die Handkraftmessung dient zur Objektivierung der Muskelkraft. Hierzu wurde ein Leonardo Mechanograph GK® von Novotec Medical GmbH, Pforzheim, Deutschland angewandt. Die Patienten unterzogen sich je drei Messungen sowohl der rechten als auch der linken Hand und der je höchste Wert der Testreihen wurde in Bezug auf die Standardabweichung mit alters- und geschlechtsspezifischen Referenzen verglichen (siehe Abbildung 6) (Massy-Westropp et al., 2011).

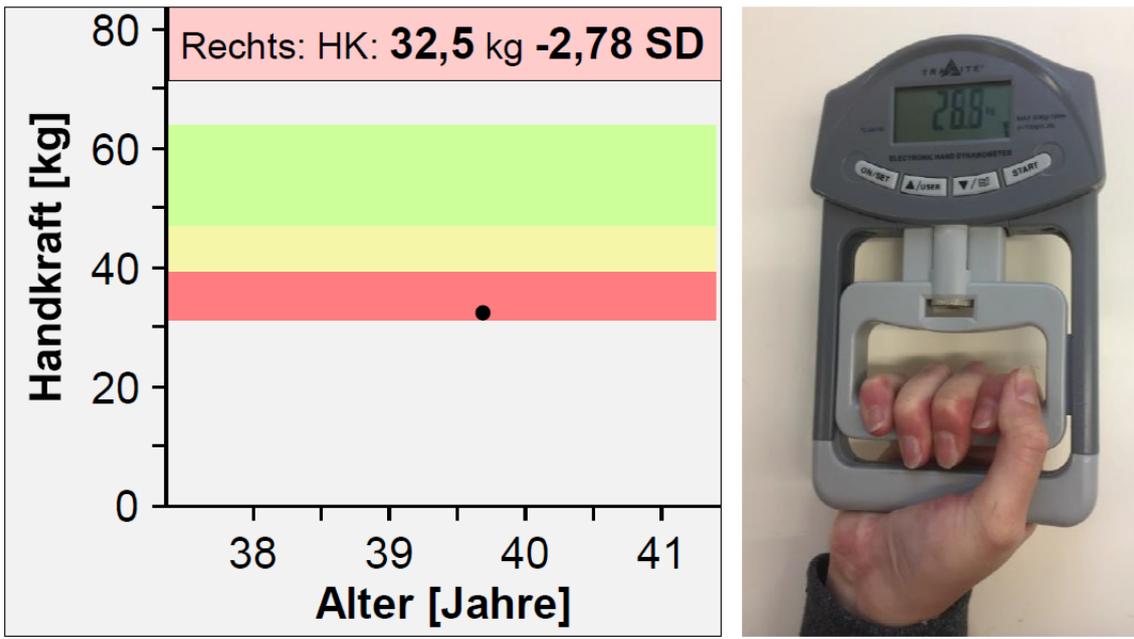


Abbildung 6: Mechanograph GK® von Novotec und Darstellungsbeispiel der zugehörigen Software

(bereitgestellt vom IOBM des UKE Hamburg)

2.5 Knochendichtemessung

Zur Bestimmung der Knochendichte wurde die Methode der Dual-energy X-ray absorptiometrie genutzt. Die Durchführung erfolgte über ein Lunar iDXA der GE Healthcare, Madison, WI, USA.

Das proximale Femur (sog. Femur gesamt) und die Lendenwirbelsäule (L1-L4) wurden begutachtet. Die Messwerte wurden in Gramm pro Quadratzentimeter dargestellt und der zugehörige T-Wert und Z-Wert errechnet.

Tabelle 5: T-Wert-Referenzbereiche zur Knochendichte

T-Wert (Standardabweichungen)	Knochendichte
> -1	Normaler Knochen
< -1- aber > -2,5	Osteopenie
< -2,5	Osteoporose

(Quelle: World Health Organization (WHO))

2.6 Humangentische Analyse des *ALPL* Gens

Die Humangenetischen Analysen wurden durch das Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bereitgestellt.

Nach DNA-Gewinnung aus EDTA-Blut und darauffolgender Polymerasekettenreaktion der Exons 1-12 (5'-UTR and gesamte Kodierungsregion) auf Chromosom 1 und flankierender Bereiche konnte eine Sequenzierung über einen automatischen Sequenzierer, ABI3500, erfolgen. Eine Bewertung der Sequenzen führte eine Sequence Pilot Software der Firma JSI Medical Systems aus Ettenheim, Deutschland in Bezug auf die Referenzsequenz NM_000478.4 durch.

Die Varianten wurden gemäß der Klassifikation der „Arbeitsgruppe für unklassifizierte genetische Varianten“ des American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) zur Interpretation verschiedener Sequenzen, angelehnt an die Klassifikation der internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) in fünf Gruppen unterteilt:

- Klasse 1: Neutral (Pathogenitätswahrscheinlichkeit bis 0,1%)
- Klasse 2: Wahrscheinlich nicht pathogen
(Pathogenitätswahrscheinlichkeit 0,1 – 5%)
- Klasse 3: Unklar (Pathogenitätswahrscheinlichkeit 5 – 95%)
- Klasse 4: Wahrscheinlich pathogen
(Pathogenitätswahrscheinlichkeit 95 – 99%)
- Klasse 5: Pathogen (Pathogenitätswahrscheinlichkeit über 99%)

(Plon et al., 2008, Richards et al., 2015).

Zur weiteren Einschätzung wurde Software eingesetzt, die klinische Prognostik aufgrund vorliegender genetischer Veränderungen erlaubten. Außerdem kann eine Prädiktion über Auswirkung auf benachbarte Genabschnitte und von dem Gen beeinflusste Prozesse vorgenommen werden.

Diese Software beinhaltet Programme wie CADD (Kircher M, 2014), InterVar (Richards et al., 2015), MutationTaster (Schwarz et al., 2014), PROVEAN (Choi Y, 2012), REVEL (Ioannidis et al., 2016) und Polyphen-2 (Adzhubei et al., 2010).

2.7 Genmutationsdatenbanken

Nach Entdeckung fraglich pathogener *ALPL*-Genvarianten, erfolgte eine Recherche auf verschiedenen Genmutationsdatenbanken, um eine bereits erfolgte klinische Einordnung ausschließen zu können.

Die TNSALP-Datenbank unterstützt die Beschreibung und Aktualisierung Hypophosphatasie auslösender *ALPL*-Genvarianten und wurde von dem SESEP Labor und der Unit of Cell and Genetics Pathology (EA2493) der Universität von Versailles-Saint Quentin en Yvelines, Frankreich aufgebaut.

Die Human Gene Mutation Database (HGMD®) bietet eine Sammlung von Keimbahn-Mutationen, die Krankheiten verursachen oder damit assoziiert und in der Literatur publiziert sind. Herausgeber dieser Datenbank ist das Institut für Humangenetik in Cardiff, Wales.

Exome Aggregation Consortium (ExAC) stellt eine Sammlung aus Exomsequenzen großer Sequenzierungsprojekte dar.

ClinVar ist ein digitales Archiv für Berichte über genetische Varianten mit klinischer Signifikanz.

Die Datenbank dbSNP des National Center for Biotechnology Information (NCBI) integriert Daten mehrerer Datenbanken u.a. alle mit Pubmed zusammenhängenden Dienste.

Der Zugriff auf diese Datenbanken erfolgte zwischen Mai und Oktober 2019. Der letzte Zugriff erfolgte am 25.04.2021 um 19:45 auf folgenden Webseiten:

<http://exac.broadinstitute.org/about>

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/introduction.php?lang=german>

<http://alplmutationdatabase.hypophosphatasie.com>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/intro>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC29783>

2.8 Fragebogen: Brief Pain Inventory

Zur Erfassung des subjektiven Krankheitserlebens der Patienten wurde der Fragebogen Brief Pain Inventory in Version des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf genutzt, der ursprünglich zur Erfassung von Tumorschmerzen entwickelt wurde (Cleeland, 1994). Dieser Bogen erfasst zum einen persönliche Daten (Alter, Beruf, etc), zum anderen Schmerzen und Beeinträchtigungen in unterschiedlichen Lebenssituationen in Bezug auf soziale Einschränkungen und Verlust der Lebensfreude. 42 der 90 Patienten haben diesen Bogen vollständig ausgefüllt. 23 dieser Patienten trugen pathogene, 12 fraglich pathogene und 7 neutrale Varianten. Folgende Fragen des BPI (vollständig siehe Anhang) wurden zur Auswertung genutzt:

Alle Fragen konnten mit 0 für „nein/ gar nicht“ bis 10 für „ja/ sehr stark“ beantwortet werden.

1. Wie war der durchschnittliche Schmerz in den letzten Wochen?
2. Wie bewerten Sie Ihre Beeinträchtigung bei allgemeiner Aktivität?
3. Wie bewerten Sie die Beeinträchtigung Ihrer Stimmung?
4. Wie bewerten Sie Ihre Beeinträchtigung bezüglich des Gehvermögens?
5. Wie bewerten Sie Ihre Beeinträchtigung bei normaler Arbeit?
6. Wie bewerten Sie die Beeinträchtigung sozialer Beziehungen?
7. Leiden Sie unter Schlafstörungen?
8. Wie bewerten Sie die Beeinträchtigung Ihrer Lebensfreude?

2.9 Statistische Auswertung

Es wird der Median und das 95%-Konfidenzintervall angegeben, sofern nicht anders vermerkt. Die Normalverteilung wurde anhand des Kolmogorow-Smirnov-Tests geprüft. Zusammenhänge zwischen AP, bAP und PLP wurden aufgrund einer nicht erfüllten Normalverteilung mit der Spearman-Rangkorrelation untersucht. Die statistische Signifikanz ist auf $p < 0.05$ festgelegt. Es wurden multivariante

Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe von Microsoft Excel, GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) sowie SPSS 22.0 Software (IBM, Armonk, NY, USA) ausgewertet.

2.10 Literaturrecherche

Die Literaturrecherche erfolgte über Pubmed vom National Center for Biotechnology Information der USA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Der letzte Zugriff erfolgte am 25. April 2021 um 17:05.

3 Ergebnisse

Das folgende Kapitel dient der deskriptiven Darstellung klinischer, laborchemischer, humangenetischer, und radiologischer Ergebnisdaten der drei bereits beschriebenen Patientengruppen. Außerdem werden Ergebnisse statistischer Auswertung und subjektiver Daten bezogen auf Schmerzempfinden und Auswirkungen auf das Alltagsleben basierend auf dem Fragebogen „Brief Pain Inventory“ (BPI) aufgezeigt. Ergebnisse werden sowohl auf einzelne Kohorten als auch vergleichend präsentiert.

3.1 Darstellung und Einteilung der Vergleichsgruppen

Die untersuchten *ALPL*-Genvarianten wurden in drei Gruppen unterteilt:

1. Pathogene *ALPL*-Genvarianten
2. Fraglich pathogene *ALPL*-Genvarianten
3. Neutrale *ALPL*-Genvarianten

Aufgrund humangenetischer Befunde und detaillierter Recherche mit Hilfe von Mutations- und Gendatenbanken konnten die einzelnen Genvarianten den Gruppen pathogen, fraglich pathogen und neutral zugeordnet werden, die im Folgenden aufgezeigt werden.

Referenzen – durch Literaturrecherche und Recherche auf Genmutationsdatenbanken gewonnen – werden ebenfalls dargestellt. Die Gruppen der neutralen und pathogenen *ALPL*-Varianten dienen als Vergleich zu den klinisch einzuordnenden fraglich pathogenen (teilweise noch nicht beschriebenen) Varianten.

3.1.1 Darstellung der pathogenen *ALPL*-Varianten

Die Gruppe der Patienten mit pathogener *ALPL*-Variante wurde 2016, wie bereits erwähnt, von Schmidt und Kollegen (Schmidt et al., 2017) beschrieben und in dieser Studie erweitert, um einen Bezug zwischen klinischer Symptomatik und Genvariation herstellen zu können. Die Kohorte konnte von 32 auf insgesamt 90 Patienten erweitert werden, von denen 49 Patienten pathogene *ALPL*-Varianten trugen. Es konnten 30 verschiedene Varianten identifiziert werden (siehe Tabelle 4).

Tabelle 6: Nachweis pathologischer *ALPL*-Varianten

Genvariante	Häufigkeit (n)	ACMG-Klasse
c.119C>T (p.Ala40Val/p.A40V)	1	Klasse 5
c.211C>A (p.R71S)	5	Klasse 5
c.212G>A (p.R71H)	2	Klasse 5
c.299C>T (p.Thr100Met)	1	Klasse 5
c.340G>A (p.A114T)	1	Klasse 5
c.346G>T p.(Ala116Ser)	1	Klasse 5
c.394G>A (p.Ala132Thr)	2	Klasse 5
c.406C>T (p.R136C)	2	Klasse 5
c.407G>A (p.R136H)	1	Klasse 5
c.422C>A (p.Thr141Asn)	1	Klasse 5
c.500C>T (p.T167M)	1	Klasse 5
c.526G>A (p.A176T)	3	Klasse 5
c.535G>A (p.A179T)	1	Klasse 5
c.542C>T (p.Ser181Leu)	1	Klasse 5
c.571G>A (p.E191K)	4	Klasse 5
c.571G>A (p.Glu191Lys)	5	Klasse 5
c.571G>A [p.(Glu191Lys)]	1	Klasse 5
c.661G>C (p.G221R)	1	Klasse 5
c.662delG (p.Gly221Valfs*56)	1	Klasse 5
c.738G>T (p.Arg246Ser)	2	Klasse 5
c.746G>T (p.Gly249Val)	1	Klasse 5
c.875_881delCAGGGGAinsT	1	Klasse 5
c.976G>C p.(Gly326Arg)	1	Klasse 5
c.997+2T>A (p.Cys489Ser)	1	Klasse 5
c.1001G>A (p.G334A)	1	Klasse 5
c.1001G>A (p.G334D)	2	Klasse 5
c.1132G>T (p.Asp378Tyr)	2	Klasse 5
c.1171delC (p.R391Vfs*12)	1	Klasse 5
c.1228T>C (p.F410L)	1	Klasse 5
c.1250A>G (p.N417S)	1	Klasse 5
Gesamtergebnis	49	

Die Pathogenität dieser Varianten wurde in der TNSALP-Datenbank festgelegt (<http://alplmutationdatabase.hypophosphatasie.com>). Die Pathogenität wird durch Missense-, Nonsense- und Splicingmutation sowie durch Deletionen oder Insertionen begründet (Mornet et al., 1998, Orimo et al., 2001, Taillandier et al., 2001, Mornet et al., 2001, Mumm et al., 2001, Taillandier et al., 1999, Whyte et al., 2015, Braunstein, 2016, Taillandier et al., 2000, Weiss et al., 1988, Lia-Baldini et al., 2001, Henthorn et al., 1992, Spentchian et al., 2003a, Fedde et al., 1996, Belachew et al., 2013, Litmanovitz et al., 2002, Sergi et al., 2001, Schmidt et al., 2017).

3.1.2 Darstellung der fraglich pathogenen *ALPL*-Varianten

Im Rahmen dieser Studie konnten 17 Patienten mit fraglich pathogenen heterozygoten *ALPL*-Varianten identifiziert werden. In diesem Abschnitt erfolgt eine Darstellung der 13 verschiedenen Genotypen. Des Weiteren wird aufgezeigt, ob einzelne Varianten bereits beschrieben wurden.

Tabelle 7: Nachweis fraglich pathogener *ALPL*-Varianten

Genvariante	Häufigkeit (n)	ACMG-Klasse
c.-81G>A	1	Klasse 3
c.286G>C (p.Ala96Pro)	1	Klasse 3
c.436G>A (p.Glu146Lys)	1	Klasse 3
c.565_575delinsAG (p.Asp189_Met192delinsArg)	4	Klasse 3
c.625A>T (p.M209L)	1	Klasse 3
c.661G>T (p.G221C)	1	Klasse 4
c.818C>T (p.T273M)	1	Klasse 3
c.876_882delinsT (p.Gly293_Asp294del)	1	Klasse 4
c.1004G>C (p.Arg335Thr)	1	Klasse 4
c.1023T>A (p.H341Q)	2	Klasse 4
c.1171dupC (p.Arg391Profs*14)	1	Klasse 4
c.1310-544_1548del (p.His438Leufs)	1	Klasse 4
c.1558-1559del (p.Leu520fs)	1	Klasse 4
Gesamtergebnis	17	

3.1.3 Darstellung der neutralen *ALPL*-Varianten

Unter Patienten mit neutralen *ALPL*-Varianten (n=24) konnten 13 verschiedene Genveränderungen in nicht kodierenden Introns oder als stumme Mutationen, durch humangenetische Befunde als nicht krankheitsverursachend gesichert, gefunden werden (siehe Tabelle 6).

Tabelle 8: Nachweis neutraler *ALPL*-Varianten

Genvariante	Häufigkeit (n)	ACMG-Klasse
c.181+52C>A	1	-
c.330T>C (p.S110=)	14	Klasse 1
c.472+12delG	7	Klasse 2
c.787T>C (p.Y263H)	2	Klasse 1
c.793-31C>T	4	Klasse 1
c.862+20G>T	1	Klasse 1
c.863-7T>C	1	Klasse 1
c.863-12C>G	1	Klasse 1
c.876A>G (p.292=)	2	Klasse 1
c.1189+19G>T	1	Klasse 2
c.1542G>T (p.(A514=)	2	Klasse 2
c.1565T>C (p.V522A)	3	Klasse 2
IVS5+8delG	1	-
Gesamtergebnis	40	

3.2 Klinische Charakterisierung seltener Varianten

Dieser Abschnitt dient der Charakterisierung der fraglich pathogenen *ALPL*-Varianten. Nach einem kurzen Überblick folgen detaillierte Präsentationen klinischer Symptomatik, Laborchemie, Knochendichte, radiologische sowie humangenetische Befunde und Einordnungen (siehe Tabelle 7).

Tabelle 9a: Einordnung fraglich pathogener *ALPL*-Varianten

Variante	Alter	Sex	Symptome	AP [U/l]	bAP [µg/l]	PLP [µg/l]
c.-81G>A	46	M	Osteoporose, trabekuläres und kortikales Knochenstrukturverlustsyndrom, Mineralisationsstörungen, Stressfraktur des OS sacrum, Depression	62	12,3	55,7
c.286G>C (p.Ala96Pro)	64	M	Osteonekrose	19	3,1	51,5
c.436G>A (p.Glu146Lys)	75	F	Osteoporose, niedrig traumatische Handgelenkfraktur	43	8,2	107,2
c.565_575delinsAG (p.Asp189_Met192delinsArg)	54	F	Parodontose, Zahnextraktionen, Hypomineralisation der Schneidezähne, Kieferenge, Muskelschmerz	30	4,8	19,0
c.565_575delinsAG (p.Asp189_Met192delinsArg)	54	F	extremer Karies, Migräne, Depression, Tendinopathie	32	2,8	15,8
c.565_575delinsAG (p.Asp189_Met192delinsArg)	27	F	Kopfschmerz, red. GK	30	4,7	12,6
c.565_575delinsAG (p.Asp189_Met192delinsArg)	48	M	Knochenmarködem Th 8, Migräne, red. GK	23	2,7	40,3
c.625A>T (p.M209L)	43	F	Zahnextraktion, Skoliose, Achylydynie	25	2,6	34,7
c.661G>T (p.G221C)	65	F	Osteoporose, Muskelschmerzen, red. GK	41	4,7	30,1
c.818C>T (p.T273M)	37	F	Periodontitis, Depression, Migräne, Fatigue, Muskelschmerz	30	6,5	42,1
c.876_882delinsT (p.Gly293_Asp294del)	56	F	metatarsale Stressfraktur, Pseudarthrose, Muskelschmerz, Tendinosis calcarea, extremer Karies, Migäne, Depression	38	4,2	19,2

Tabelle 9b: Einordnung fraglich pathogener ALPL-Varianten

c.1004G>C (p.Arg335Thr)	49	F	Stressfrakturen, Periodontitis, Kopfschmerz, Depression, Muskelschmerz, Fatigue, red. GK	25	4,5	49,4
c.1023T>A (p.H341Q)	57	F	Osteoporose, red. GK, Muskelschmerz Tendinosis calcarea	23	4,2	39,6
c.1023T>A (p.H341Q)	61	F	Osteoporose, schlechter Zahnstatus, red.GK, Muskelschmerz	20	2,5	50,9
c.1171dupC (p.Arg391Profs*14)	58	F	Pseudarthrose Hypomineralisation der Zähne, Migräne, red GK, Muskelschmerz, Tendinosis calcarea	20	1,9	37,4
c.1310-544_1548del (p.His438Leufs)	35	M	atraumatische Tibiafraktur Osteoporose, Depression, extremer Karies Zahnfehlstellung, Depression, red. GK	45	5,5	22,1
c.1558-1559del (p.Leu520fs)	69	F	Museklschmerz, red. GK, Migräne	40	3,2	32,2

3.2.1 Symptomatik

71% der Patienten mit seltener / fraglich pathogener *ALPL*-Variante litten unter einer muskulären Symptomatik (Muskelschmerz, Tendinopathie, Muskelschwäche/ reduzierte Griffkraft und Kalzifikation der Sehnen, siehe Kapitel 2.4), 53% unter neuropsychiatrischen Symptomen (Migräne, Epilepsie, Fatigue, Schwindel und Depression), 76% unter skelettalen Komplikationen (Stressfrakturen, Knochenmarködeme, Osteomalazie, Frakturheilungsstörungen, Osteoporose sowie Chondrokalzinose) und 47% unter dentalen Komplikationen (pathologischer Zahnstatus, früher Zahnverlust, Zahnextraktionen und verminderte Zahnmineralisation).

64% der Patienten fielen durch eine typische klinische Symptomatik auf, während 24% primär durch eine passende Laborkonstellation und 12% durch eine positive HPP-Familienanamnese in unserer Spezialsprechstunde vorstellig wurden.

„c.565_575delinsAG (p.Asp189_Met192delinsArg)“ wurde in vier Patienten nachgewiesen, wobei alle sowohl neuropsychiatrische Symptome (v.a. Migräne / Kopfschmerz) als auch muskuläre Manifestationen (siehe reduzierte Handkraftmessung) zeigten. Ein Patient wies ein Knochenmarködem auf, ein weiterer litt unter extremer Karies.

„c.1023T>A (p.H341Q)“ konnte in zwei Patienten gezeigt werden und zeichnete sich durch Osteoporose, Muskelschmerz und Muskelschwäche aus.

Alle weiteren nachgewiesenen Varianten wurden durch je einen Patienten repräsentiert:

- c.-81G>A
- c.286G>C (p.Ala96Pro)
- c.436G>A (p.Glu146Lys)
- c.625A>T (p.M209L)
- c.661G>T (p.G221C)
- c.818C>T (p.T273M)
- c.876_882delinsT (p.Gly293_Asp294del)
- c.1004G>C (p.Arg335Thr)
- c.1171dupC (p.Arg391Profs*14)
- c.1310-544_1548del (p.His438Leufs)
- c.1558-1559del (p.Leu520fs)

3.2.2 Laborchemie

Neben dem laborchemischen Screening von AP, bAP und PLP wurden auch weitere Parameter des Knochenmetabolismus bestimmt.

15 Patienten wiesen erhöhte PLP-Spiegel auf. Zwei Patienten in Assoziation mit der Variante „c.565_575delinsAG“ zeigten Werte im Referenzbereich. AP und bAP waren bei allen Patienten erniedrigt, allerdings lag bei sechs Patienten die AP und bei vier Patienten die bAP im alters- und geschlechtsspezifischen Referenzbereich.

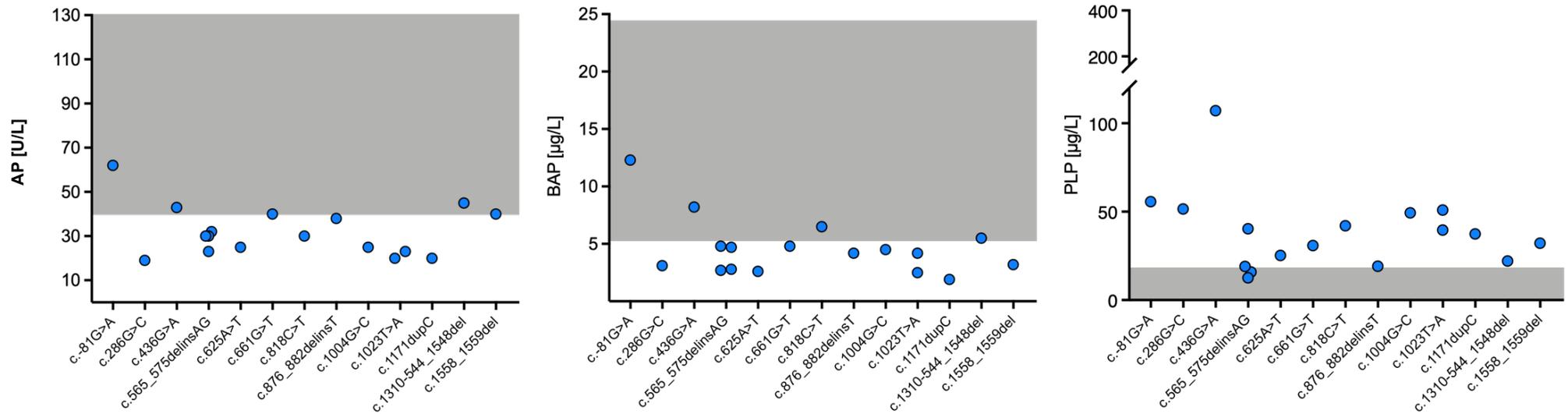


Abbildung 7: Darstellung von PLP, AP und bAP von Patienten mit fraglich pathogenen ALPL-Varianten

Legende y-Achse: Werte Alkalische Phosphatase (AP) in U/l, knochenspezifische alkalische Phosphatase (BAP) in µg/l, Pyridoxal-5-Phosphat (PLP) in µg/l, X-Achse: fraglich pathogene ALPL-Varianten, grau hinterlegt ist der Referenzbereich der Parameter

AP korrelierte signifikant mit BAP ($r=0,73$; $p<0,001$) aber nicht mit PLP-Werten ($r=0,16$; $p=0,552$) (siehe Abbildung 8).

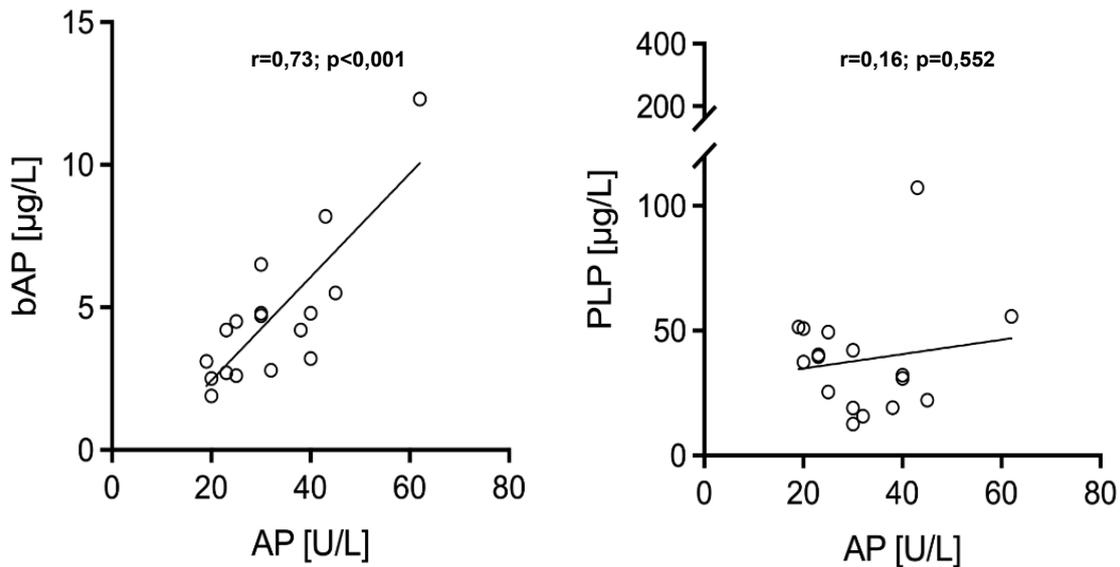


Abbildung 8: Korrelation zwischen AP und bAP bzw. PLP

Legende links: y-Achse: Knochenspezifische alkalische Phosphatase (bAP) in µg/l, rechts: y-Achse: Pyridoxal-5-Phosphat (PLP) in µg/l, x-Achse beide Graphen: alkalische Phosphatase (AP) in U/l

Die weiteren Parameter des Knochenmetabolismus zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen und lagen im Referenzbereich.

Tabelle 10: Auswertung der Knochenmetabolismusparameter

	Referenzbereich	Median	IQR
Osteocalcin	5,4-59,1 µg/l	13,3	9,9-17,4
Ca	2,13-2,63 mmol/l	2,25	2,23-2,35
Phosphat	0,77-1,50 mmol/l	1,08	0,9-1,13
25-OH-D3	30-60 µg/l	27,0	23,0-34,0
Parathormon	17-84 µg/l	65,0	45,0-76,0
DPD	3-7 nmol/mmol	6,0	3,5-8,0

3.2.3 Knochendichte

Die Knochendichte war im Median leicht reduziert und lag im Bereich der Osteopenie gemäß Definition der WHO.

Tabelle 11: Darstellung BMD fraglich pathogener Varianten

	Median	IQR
Alter	53,0	44,0-62,5
BMI [kg/m²]	21,5	20,7-24,7
Z-Score Lendenwirbelsäule	-0,9	-1,9-0,6
Z-Score linkes Femur gesamt	-1,4	-1,9-(-0,3)
T-Score Lendenwirbelsäule	-1,6	-2,6-0,0
T-Score linkes Femur gesamt	-1,9	-2,9-(-1,0)

Eine Osteoporose konnte bei 6 Patienten festgestellt werden. Eine Assoziation in Bezug auf Osteoporose konnte zu den Varianten „c.-81G>A“, „c.436G>A(p.Glu146Lys)“, „c.661G>T(p.G221C)“, „c.1023T>A(p.H341Q)“ und „c.1310-544_1548del(p.His438Leufs)“ gewonnen werden.

3.2.4 Humangenetische Befunde

In Zusammenschau der humangenetischen Befunde, der in Kapitel 2.7 und 2.8 erläuterten Prognosesoftware sowie der Genmutationsdatenbanken, konnten die fraglich pathogenen, zum Teil noch nicht beschriebenen, Varianten nach ACMG-Kriterien (siehe Kapitel 2.7) eingeteilt werden.

Die *ALPL*-Varianten „c.-81G>A“, „c.286G>C (p.Ala96Pro)“, „c.436G>A (p.Glu146Lys)“, „c.565_575delinsAG (p.Asp189_Met192delinsArg)“, „c.625A>T (p.M209L)“ und „c.818C>T (p.T273M)“ wurden als unklar klassifiziert. Diese Klassifikation entspricht der Zuordnung zur Klasse 3 der ACMG mit einer Pathogenitätswahrscheinlichkeit von 5 - 95%.

Als wahrscheinlich pathogen konnten „c.661G>T (p.G221C)“, „c.876_882delinsT (p.Gly293_Asp294del)“, „c.1004G>C (p.Arg335Thr)“, „c.1023T>A (p.H341Q)“, „c.1171dupC (p.Arg391Profs*14)“, „c.1310-544_1548del (p.His438Leufs)“ und „c.1558-1559del (p.Leu520fs)“ identifiziert werden. Die Klasse 4 der ACMG zeichnet sich durch eine Pathogenitätswahrscheinlichkeit von 95 – 99% aus.

Seltene Varianten	N	AF gnomAD	CADD	REVEL	Knochen	Zähne	Muskel	Neuro-Psych	AP	BAP	PLP	ACMG	HPP bestätigt	
c.-81G>A	1	0,000065	17,03	-								Klasse 3	?	
c.286G>C (p.Ala96Pro)	1	0	27,7	0,957								Klasse 3	?	
c.436G>A (p.Glu146Lys)	1	0,0002339	25,7	0,855								Klasse 3	?	
c.565_575delinsAG (p.Asp189_Met192delinsArg)	4	0	-	-								Klasse 3	?	
c.625A>T (p.Met209Leu)	1	0	13,98	0,378								Klasse 3	?	
c.661G>T (p.Gly221Cys)	1	0,000008791	31	0,988								Klasse 4	Ja	
c.818C>T (p.Thr273Met)	1	0,0003486	22,6	0,325								Klasse 3	?	
c.876_882delinsT (p.Gly293_Asp294del)	1	0,000007759	-	-								Klasse 4	Ja	
c.1004G>C (p.Arg335Thr)	1	0	24,3	0,873								Klasse 4	Ja	
c.1023T>A (p.His341Gln)	2	0,000008800	16,09	0,745									Klasse 4	Ja
c.1171dupC (p.Arg391Profs*14)	1	0	-	-								Klasse 4	Ja	
c.1310-544_1548del (p.His438Leufs)	1	-	-	-								Klasse 4	Ja	
c.1558-1559del (p.Leu520fs)	1	-	-	-								Klasse 4	Ja	

Abbildung 9: Zusammenfassende Darstellung der fraglich pathogenen ALPL-Varianten: klinische Symptombereiche, Laborparameter, humangenetische Befunde und ACMG-Klassifikation

Legende: von links ALPL-Varianten mit Anzahl, Farbliche Kennzeichnung gibt prozentuellen Anteil der Symptomatik im Knochen, Zähnen, Muskeln und Neuro-psychiatrisch, grüne Kreise: ALP, bAP und PLP im Referenzbereich, rote Kreise auffällige Werte, Klassifikationen nach Genprognostik in ACMG-Gruppen.

(Quelle: Jandl et al, 2021)

3.3 Subjektive Wahrnehmung der Erkrankung durch Patienten im Vergleich der Gruppen mit pathogenen, fraglich pathogenen und neutralen Varianten

77 der 90 Patienten gaben Schmerzen im Krankheitsverlauf an. 42 Patienten wurden, wie in Abschnitt 2.9. beschrieben, im BPI erfasst und bezogen auf durchschnittlichen Schmerz, Beeinträchtigung der allgemeinen Aktivität, Beeinträchtigung der Stimmung, Beeinträchtigung des Gehvermögens, Beeinträchtigung normaler Arbeit, Beeinträchtigung sozialer Beziehungen, Schlafstörungen und Beeinträchtigung der Lebensfreude analysiert. sieben dieser Patienten trugen neutrale, 23 pathogene und 12 fraglich pathogene Varianten.

Die Punktwerte der drei Gruppen wurden für die einzelnen Kategorien miteinander verglichen. Die univariate Varianzanalyse (ANOVA) zeigte in keiner Kategorie einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mit neutralen, fraglich pathogenen und pathogenen *ALPL*-Varianten.

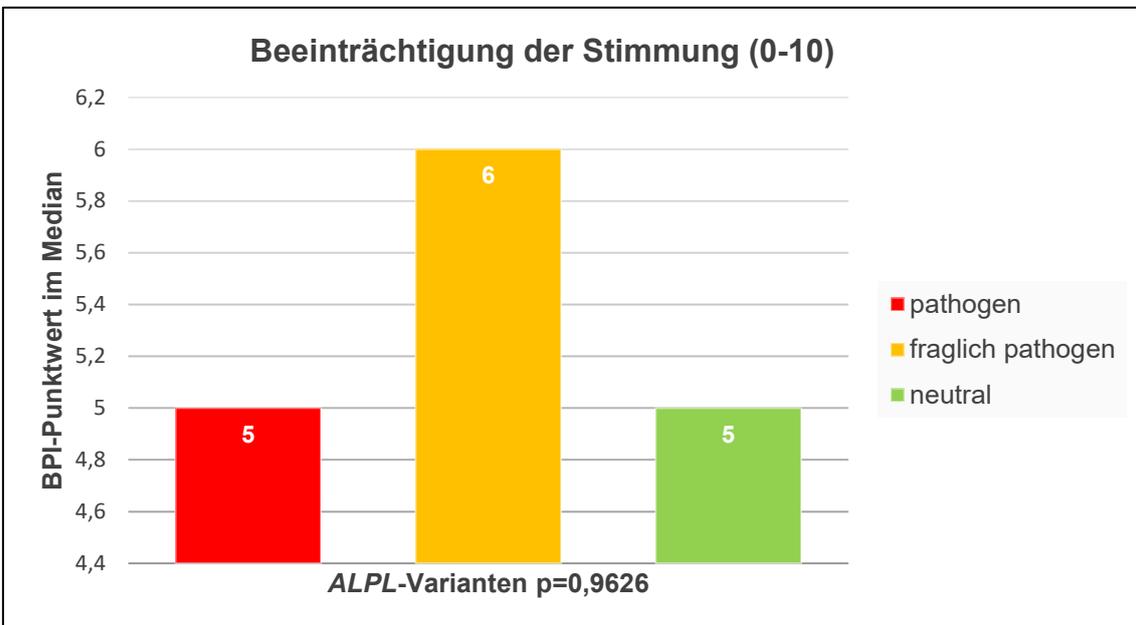
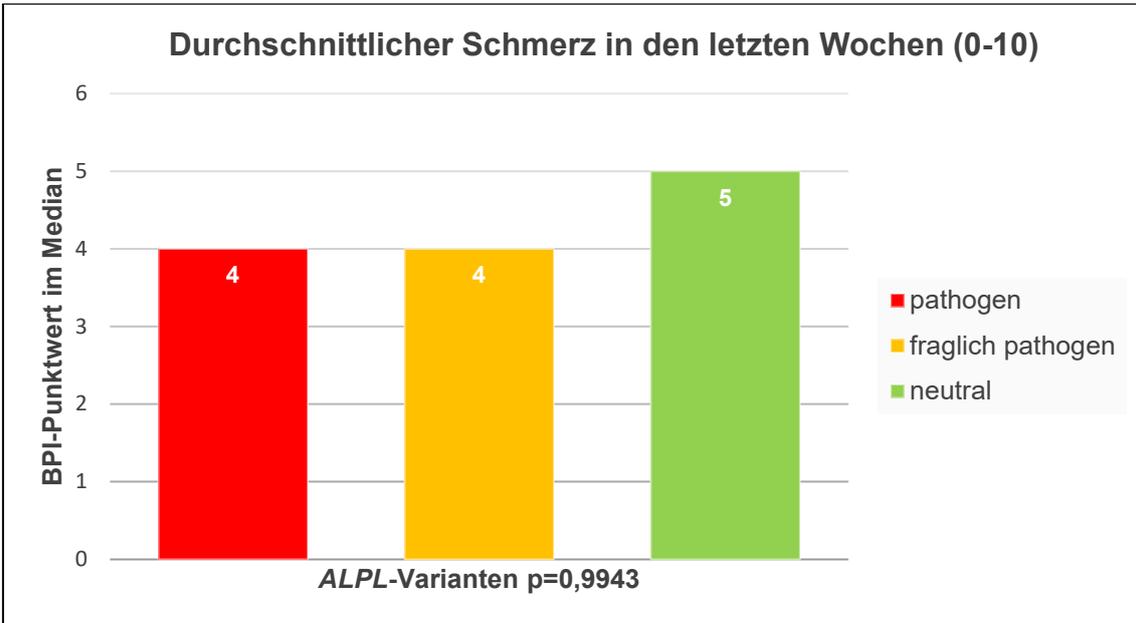


Abbildung 10a: BPI-Kategorien – Darstellung im Median

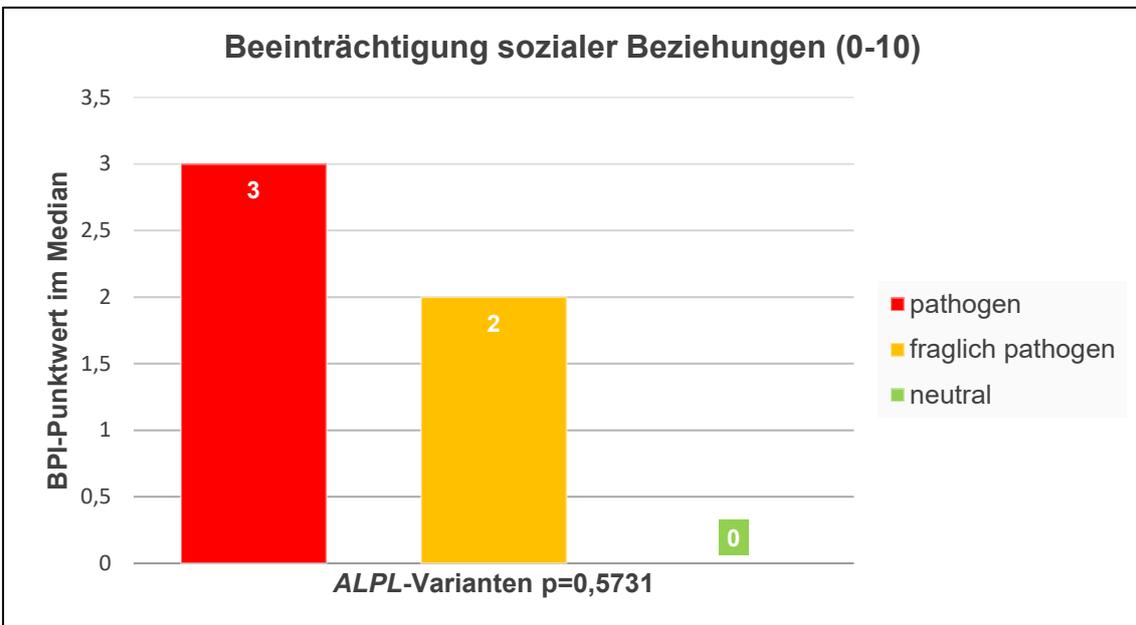
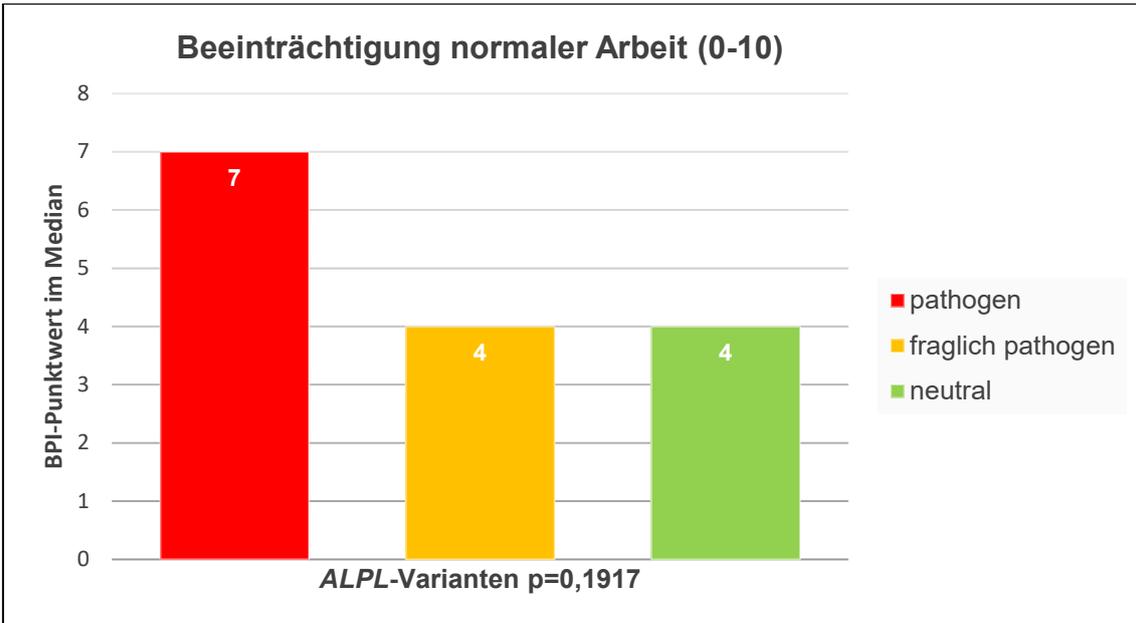


Abbildung 10b: BPI-Kategorien – Darstellung im Median

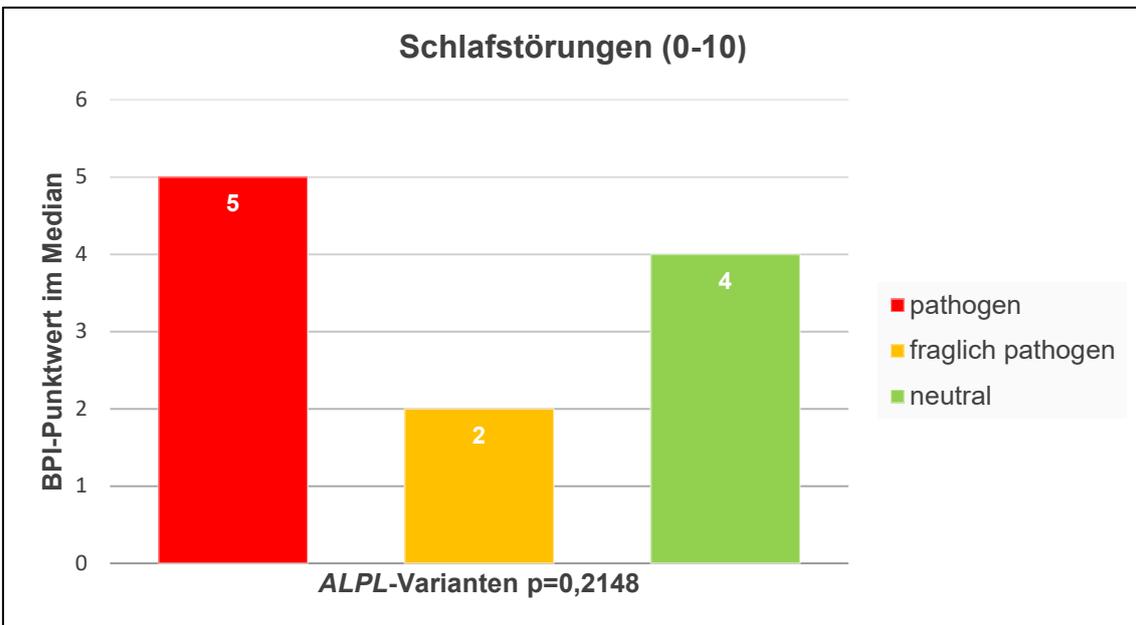
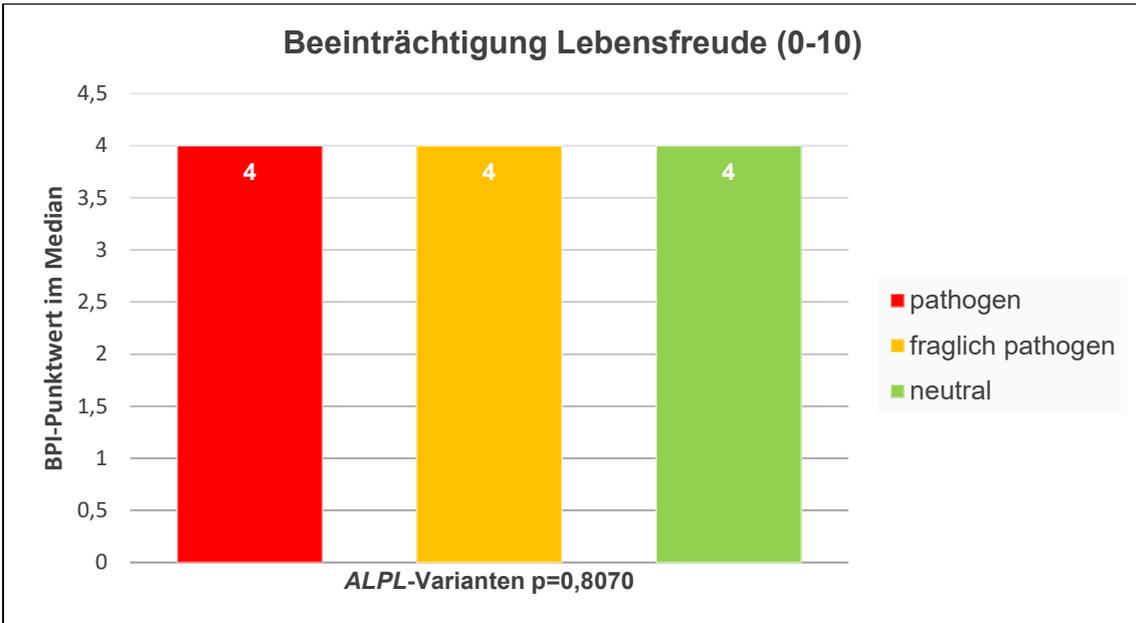


Abbildung 10c: BPI-Kategorien – Darstellung im Median

Die einzelnen Werte der fraglich pathogenen Varianten werden zur besseren Übersicht im Folgenden tabellarisch dargestellt (siehe Tabelle 10).

Tabelle 12: BPI-Werte fraglich pathogener Varianten

Variante	Alter	Sex	Schmerz	Aktivität	Stimmung	Gehvermögen	Arbeit	Beziehungen	Schlaf	Lebensfreude
c.436G>A (p.Glu146Lys)	76	F	4	1	7	0	4	2	1	4
c.565_575delinsAG (p.Asp189_Met192delinsArg)	53	F	5	5	5	7	5	0	0	3
c.565_575delinsAG (p.Asp189_Met192delinsArg)	27	F	4	4	7	6	4	3	4	7
c.565_575delinsAG (p.Asp189_Met192delinsArg)	48	M	4	3	5	3	3	1	2	4
c.625A>T (p.M209L)	43	F	6	7	8	9	8	5	7	2
c.818C>T (p.T273M)	37	F	3	5	7	0	0	0	8	6
c.876_882delinsT (p.Gly293_Asp294d)	55	F	7	9	8	2	8	5	3	6
c.1004G>C (p.Arg335Thr)	49	F	3	3	3	1	1	0	0	5
c.1023T>A (p.H341Q)	61	F	3	4	5	3	4	2	0	4
c.1171dupC (p.Arg391Profs*14)	58	F	6	0	1	1	3	1	2	2
c.1310-544_1548del (p.His438Leufs)	35	M	4	5	7	9	7	0	4	4
c.1558-1559del (p.Leu520fs)	69	F	5	7	7	5	0	0	8	5

Tabelle 13a: BPI-Werte pathogener Varianten

Variante	Alter	Sex	Schmerz	Aktivität	Stimmung	Gehvermögen	Arbeit	Beziehungen	Schlaf	Lebensfreude
c.211C>A (p.R71S)	40	M	5	2	8	4	4	1	8	6
c.211C>A (p.R71S)	48	M	2	3	7	2	2	1	2	3
c.211C>A (p.R71S)	60	F	5	9	10	3	7	10	10	10
c.212G>A (p.R71H)	49	F	5	4	4	1	7	7	7	7
c.340G>A (p.A114T)	29	F	4	3	4	5	3	4	0	3
c.394G>A (p.Ala132Thr)	32	M	3	4	6	5	3	3	4	5
c.406C>T (p.R136C)	65	F	4	4	8	8	8	4	4	8
c.407G>A (p.R136H)	31	F	5	8	5	8	8	4	5	6
c.422C>A (p.Thr141Asn)	54	M	8	7	3	6	7	1	6	2
c.500C>T (p.T167M)	57	F	4	6	6	7	8	4	5	6
c.571G>A (p.E191K)	58	M	7	8	9	9	8	9	10	10
c.571G>A (p.E191K)	59	F	5	8	6	8	7	3	6	4
c.571G>A (p.E191K)	32	F	4	6	4	4	3	0	2	1
c.571G>A (p.E191K)	54	F	7	8	9	9	9	0	6	9
c.571G>A (p.E191K)	53	F	7	8	9	9	8	7	8	9
c.571G>A (p.E191K)	60	F	8	8	1	9	10	2	7	1
c.661G>C (p.G221R)	33	M	0	0	0	0	0	1	0	0
c.738G>T (p.Arg246Ser)	49	M	3	8	8	7	8	1	4	2
c.746G>T (p.Gly249Val)	51	M	3	6	0	5	3	0	0	2
c.1001G>A (p.G334A)	58	F	4	5	3	5	7	4	3	3
c.1001G>A (p.G334A)	57	M	5	6	5	4	5	6	8	7

Tabelle 13b: BPI-Werte pathogener Varianten

Variante	Alter	Sex	Schmerz	Aktivität	Stimmung	Gehvermögen	Arbeit	Beziehungen	Schlaf	Lebensfreude
c.1132G>T (p.Asp378Tyr)	56	F	2	3	1	3	3	0	2	2
c.1228T>C (p.F410L)	83	F	3	4	3	2	3	2	6	4

Tabelle 14: BPI-Werte neutraler Varianten

Variante	Alter	Sex	Schmerz	Aktivität	Stimmung	Gehvermögen	Arbeit	Beziehungen	Schlaf	Lebensfreude
c.330T>C (p.S110=)	46	F	3	0	0	0	0	0	0	0
c.330T>C (p.S110=)	77	F	5	1	1	1	1	0	6	2
c.330T>C (p.S110=)	24	M	1	3	1	0	1	0	1	4
c.330T>C (p.S110=)	33	F	9	9	9	8	9	8	8	10
c.330T>C (p.S110=)	80	F	6	8	9	8	9	8	9	10
c.330T>C (p.S110=)	30	F	3	3	5	5	5	0	3	3
c.472+12delG	35	F	4	8	7	3	4	4	4	4

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Nun folgt eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse in Bezug auf die Fragestellungen und Arbeitshypothesen dieser Arbeit.

1. Welche klinischen Symptome und Befunde weisen HPP-Patienten mit seltenen Varianten auf?

76% der Patienten mit seltener / fraglich pathogener *ALPL*- Variante leiden unter skelettalen Komplikationen, 71% der Patienten unter einer muskulären Symptomatik, 53% unter neuropsychiatrischen Symptomen und 47% unter dentaler Manifestation. 88% Patienten wiesen erhöhte PLP-Spiegel auf. 65% Patienten zeigten AP-Werte und 76% Patienten zeigten bAP-Werte unterhalb des altersspezifischen Referenzbereichs. Bei 35% Patienten konnte eine Osteoporose mittels Knochendichtemessung nachgewiesen werden.

2. Gibt es Unterschiede in der subjektiven Krankheitsempfindung zwischen unterschiedlich klassifizierten Varianten?

Nach Auswertung der erhobenen Daten aus dem BPI konnten keine signifikanten Unterschiede im subjektiven Krankheitsempfinden zwischen den unterschiedlich klassifizierten Varianten nachgewiesen werden. Es zeigten sich jedoch in allen drei Gruppen im Median mittelschwere Beeinträchtigungen im Alltagsleben in Zusammenhang mit einer HPP-Erkrankung.

3. Sind humangenetische Befunde allein ausreichend, um eine HPP zu diagnostizieren und spezifische Befunde zu prognostizieren?

Sechs Varianten aus der Gruppe der fraglich pathogenen Varianten konnten mittels humangenetischer Diagnostik in die ACMG-Klasse 3 und sieben Varianten in die ACMG-Klasse 4 eingeordnet werden. Es zeigten sich jedoch auch in der Gruppe neutraler Varianten mit dem Verdacht auf HPP typische Symptome, wie Knochen- und Zahnmineralisationsstörungen sowie unspezifische Symptome, wie Muskelschmerz, Muskelschwäche, neurologische und psychiatrische Beschwerden der Erkrankung. Somit kann eine humangenetische Diagnostik bei schwacher Genotyp-Phänotyp-Beziehung klinische und laborchemische sowie bildgebende Verfahren nicht ersetzen, doch in Kombinationen mit diesen wichtigen zusätzlichen Informationen zum Vererbungsgang und der Wiederholungswahrscheinlichkeit liefern.

4 Diskussion

Die adulte HPP manifestiert sich symptomatisch häufig im mittleren Alter und verläuft meist milder als pädiatrische Formen. Sie ist mit Stressfrakturen durch die Mineralisationsstörung der Knochen sowie folgenden Frakturheilungsstörungen, Schmerz, Osteomalazie, Myalgien und Arthralgien charakterisiert. Ebenso zeigt sich oft ein pathologischer Zahnstatus, gekennzeichnet durch Mineralisationsstörung der Zähne, schweren Karies sowie frühen Milchzahnverlust und Verlust bleibender Zähne (Briot and Roux, 2016, Bianchi, 2015, Mornet, 2018).

Unspezifische Symptome, wie Muskelschmerz, Muskelschwäche, neurologische und psychiatrische Beschwerden sind ebenfalls häufig zu finden und Teil eines insgesamt breiten Symptomspektrums (Lefever et al., 2018). Humangenetische Analysen sind neben laborchemischen und radiologischen Untersuchungen ein Hauptbestandteil der Diagnostik (Mornet, 2018). Während meist schwerere Krankheitsverläufe in aufgrund einer kombinierten Heterozygotie auftreten (Whyte et al., 2015), sind mildere Verläufe auch durch einen dominant-negativen Effekt bei heterozygoten Mutationen zu erklären (Henthorn et al., 1992). Die Schwere des Krankheitsverlaufes steht in Zusammenhang mit Stärke der Inhibition der enzymatischen Aktivität (Lia-Baldini et al., 2001).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, seltene *ALPL*-Genvarianten, die möglicherweise pathogen sind, genauer zu charakterisieren und zu klassifizieren und klinische Befunde diesen *ALPL*-Genvarianten zuzuordnen, um ein besseres Verständnis der Effekte von ACMG-Klasse 3 und 4 *ALPL*-Varianten auf den Bewegungsapparat und die Lebensqualität der Patienten zu erlangen.

Die Patienten mit seltenen *ALPL*-Genvarianten wurden in Bezug auf Laborchemie, Knochendichte, Handkraftmessung und humangenetischer Analytik erfasst und unter Hinzunahme des BPI auch das subjektive Krankheitsempfinden mit Patienten mit häufigen neutralen und pathogenen Genvarianten verglichen. Die beschriebene Kohorte von 90 Patienten wies 24 Patienten mit neutralen Varianten, 17 Patienten mit seltenen Varianten sowie 49 Patienten mit gesichert pathogenen Varianten auf. Insgesamt konnten 14 verschiedene neutrale, 14 seltene und 32 gesichert pathogene *ALPL*-Genvarianten identifiziert werden.

Der Altersmedian der Kohorte mit fraglich pathogenen/seltenen *ALPL*-Varianten war mit 51 Jahren im Vergleich zu anderen Studien mit Patienten mit adulter HPP um 2 bis 5 Jahre höher (Schmidt et al., 2019, Berkseth et al., 2013). Die klinische Einordnung der dargestellten Kohorte umfasste typische HPP-Symptome, wie niedrig-traumatische Frakturen, Stressfrakturen, Pseudoarthrose (Berkseth et al., 2013, Briot and Roux, 2016), Osteoporose, Knochenmarködeme (Schmidt et al., 2017), schweren Karies, Hypomineralisation der Zähne sowie früher Zahnverlust (Bloch-Zupan, 2016). Auch untypische Symptome, wie Muskelschmerzen und Muskelschwäche (durch Handkraftmessung bestimmt) konnten analog zu vergleichbaren Studien (Weber et al., 2016, Fonta and Salles, 2017, Berkseth et al., 2013) aufgezeigt werden. Ein hoher Anteil der Patienten wies regelmäßige Cephalgien (35%) und Depressionen (41%) auf; eine ähnliche Beobachtung konnte bereits in vorangegangenen Studien präsentiert werden (Schmidt et al., 2017). Des Weiteren konnte eine erhöhte Prävalenz neurologischer und psychiatrischer Symptome dargestellt werden; verglichen zur Allgemeinbevölkerung treten Kopfschmerzen 10mal häufiger und Depressionen 3mal häufiger auf (Colazo et al., 2019).

4.1 Klassifikation der fraglich pathogenen *ALPL*-Varianten

Mit Hilfe der Klassifikation der „Arbeitsgruppe für unklassifizierte genetische Varianten“ der internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) und ACMG konnten die Varianten „c.661G>T, c.876_882delinsT“, „c.1004G>C“, „c.1023T>A“, „c.1171dupC“, „c.1310-544_1548del“ und „c.1558-1559del (p.Leu520fs)“ als wahrscheinlich pathogen (Klasse 4) mit einer Pathogenitätswahrscheinlichkeit zwischen 95% und 99% eingeordnet werden. Diese Einordnung steht mit der klinischen Symptomatik, subjektivem Empfinden (BPI) und den laborchemischen Ergebnissen im Einklang.

Die Variante „c.661G>T (p.Gly221Cys)“ wurden in der Literatur noch nicht beschrieben, dennoch sind andere Mutationen in diesem Bereich (p.Gly221Arg, p.Gly221Val) bereits im Beisein weiterer Mutationen in Fällen einer perinatalen HPP als pathogen beschrieben (<http://alplmutationdatabase.hypophosphatasie.com>). Die humangenetische Prognosesoftware CADD bestätigte die Pathogenität dieser Variante. Der assoziierte Patient zeigte klinisch Zeichen einer Osteoporose, eine niedrig-traumatische

Fraktur im Krankheitsverlauf, Arthralgien sowie Myalgien, während laborchemisch hohe PLP-Werte und erniedrigte Serumaktivität der AP und bAP nachgewiesen werden konnten. Gemäß der Interpretation nach ACMG wurde diese Variante als wahrscheinlich pathogen (Klasse 4) eingeordnet. Außerdem konnte von Del Angel et al. in einer aktuellen Studie gezeigt werden, dass eine geringe Serumaktivität in vitro in Zusammenhang mit „c.661G>C (p.Gly221Arg)“ besteht (Del Angel et al., 2020).

Die Variante „c.876_882delinsT“ wurde im Zusammenhang mit einer zweiten Variante „c.962delG“ bezogen auf schwere Verläufe einer perinatalen HPP beschrieben (Spentchian et al., 2003b). In dem dargestellten Patienten wurde die Variante „c.876_882delinsT“ heterozygot nachgewiesen und die Symptomatik begann erst im Erwachsenenalter. Durch einen schweren klinischen Verlauf mit metatarsalen Stressfrakturen, Zahnverlust, Muskelschwäche sowie Muskelschmerz, Depression und Migräne kann von einem dominant-negativen Effekt ausgegangen werden. Durch starke Schmerzen und starke Beeinträchtigung ist von einem hohen Leidensdruck auszugehen. Der Patient mit dieser Variante zeigte im BPI starke Belastungen vor allem durch Beeinträchtigung normaler Arbeit (8/10), allgemeiner Aktivität (9/10) und regelmäßigen Schmerz (7/10), welches sich in der Beeinträchtigung der Lebensfreude (6/10) widerspiegelt. Im Einklang mit humangenetischer Prognostik lässt sich diese Variante als wahrscheinlich pathogen klassifizieren (Klasse 4).

Die Variante „c.1171dupC“ führt aufgrund einer Basen Duplikation zu einem frame shift. Dies hat ein frühes Stopcodon in der mRNA zur Folge, welches zu einem Funktionsverlust führt. Frame shift Mutationen wurden bereits in der Literatur im Zusammenhang mit einer Basenpaardeletion (c.1171delC) beschrieben, allerdings bei einer infantilen Hypophosphatasie (Taillandier et al., 1999). In der dargestellten Kohorte führte dies unter anderem zu Pseudoarthrose, Mineralisationsstörung der Zähne und Tendinitis calcarea, aber auch zu Migräne und Muskelschmerz sowie reduzierter Muskelkraft. Der Verdacht einer Hypophosphatasie erhärtete sich durch eine passende laborchemische Konstellation. Eine Beeinträchtigung im Alltag konnte auch hier durch den BPI aufgezeigt werden.

Der Patient mit der Variante “c.1023T>A (p.His341Arg)” wies eine Myalgie mit reduzierter Handkraft auf, zusätzlich fanden sich Hinweise auf eine Osteoporose in der Knochendichtemessung bei zwei Geschwistern des Patienten. Auch bei diesem

Patienten konnte durch die klinische Symptomatik und laborchemische Diagnostik eine HPP gesichert werden. Eine niedrige AP-Aktivität von 5% wurde bereits durch Del Angel et al., 2020 beschrieben.

Der Patient mit der Variante „c.1310-544_1548del“ fiel klinisch durch eine atraumatische Tibiaschaftfraktur auf. Anamnestisch konnten schwerer Karies, Malposition der Zähne und eine Depression erhoben werden. In der weiteren Diagnostik imponierten eine reduzierte Knochendichte sowie reduzierte Muskelkraft in der Handkraftmessung. Laborchemisch fielen neben erhöhten PLP-Werten auch niedrig-normale AP-Werte auf. Nach einer Genomsequenzierung demaskierte sich diese Mutation im Exon 12, welches durch einen Defekt des Splice-Akzeptors zu einer großen Deletion im Bereich dieses Exons führt. Diese Variante wurde bereits im Beisein einer zweiten Mutation beschrieben (Spentchian et al., 2006). Während sich laborchemisch der Verdacht einer HPP nicht bestätigen ließ, ist aufgrund der Klinik und dem Nachweis der oben genannten Mutation von einer HPP auszugehen.

Die Variante „c.1558_1559del (p.Leu520fs)“ ist eine Frameshift-Mutation und wurde noch nicht in Datenbanken oder der Literatur erfasst. Klinisch zeigten sich Knochenmarködeme, Osteopose Tendinopathie, gehäuft Kopfschmerzen und Myalgie sowie reduzierte Muskelkraft in der Handkraftmessung. Eine reduzierte AP-Serumaktivität und erhöhte PLP-Werte bestätigten den Verdacht einer HPP. Ein ähnlicher Frameshift wurde im Zusammenhang mit Odonto-HPP, perinataler HPP, infantiler und pränatal benigner HPP beschrieben, schwere Verläufe jedoch nur bei Homozygotie (Goseki-Sone et al., 1998, Michigami et al., 2020, Yokoi et al., 2019).

Die Varianten „c.-81G>A“, „c.286G>C“, „c.436G>A“, „c.565_575delinsAG“, „c.625A>T“ und „c.818C>T“ konnten der Klasse 3 nach ACMG zugeordnet werden. Diese Klasse ist als unklar definiert und bietet eine weite Pathogenitätswahrscheinlichkeit zwischen 5-95%. Es ist unklar, ob die Variante selbst oder andere unbekannte Gene oder gar Umweltfaktoren das klinische Bild einer adulten HPP auslösen können. Es ist bekannt, dass auch andere Gene auf anderen Chromosomen Einfluss auf die AP-Serumaktivität haben, zum Beispiel *GPLD1* auf Chromosom 6 und *JMJD1C-REEP3* auf Chromosom 10 (Kamatani et al., 2010, Yuan et al., 2008). Auch diese Beispiele lösen HPP nicht allein aus, doch ein Triggermechanismus oder eine krankheitsverursachende Kombination mehrerer Faktoren könnte dafür ursächlich sein.

Die Variante „c.286G>C“ wurde bislang in keiner Datenbank erfasst. Der Patient in der dargestellten Kohorte zeigte bei suspekter Laborkonstellation, außer einer Osteoporose, keine klinischen Auffälligkeiten. Da diese Variante nur in einem Patienten repräsentiert ist und zu wenige Kriterien für eine sichere Klassifikation bestehen, bleibt eine klinische Einordnung in diesem Kontext unmöglich.

Die Variante „c.436G>A“ ist in der Literatur mit geringer Knochendichte und typischen HPP-Symptomen assoziiert (Nielson et al., 2012). Hier zeigte sich neben einer geringen Knochendichte nur eine niedrig-traumatische Handgelenkfraktur. Laborchemisch konnte der Verdacht auf eine HPP durch niedrige AP-Serumaktivität und erhöhte PLP-Werte gestellt werden. Auch hier stellt sich eine klinische Einordnung durch geringe Symptomlast als schwierig dar. Dennoch ist zu erwähnen, dass im BPI Schmerzen im Zusammenhang mit der vorhandenen Osteoporose zu verzeichnen sind. Vor allem die Stimmung der Patientin ist stark beeinträchtigt (7/10) und mündet in einer Einschränkung der Lebensqualität/ Lebensfreude (4/10). Aufgrund der subjektiven Beeinträchtigung des hier dargestellten Falls, sollte diese Variante in weiteren Studien Beachtung finden.

Die Variante „c.625A>T“ wurde bereits in Kombination mit „c.746G>T“ als kombiniert heterozygot mit schwerer Knochenmanifestation und Nephrokalzinose beschrieben (Schmidt et al., 2017). Die Schwester dieses Patienten wurde in diese Studie inkludiert und wies „c.625A>T“ heterozygot auf. Sie zeigte neben pathologischen Laborwerten, verhältnismäßig milde Symptome, wie Zahnextraktionen bei schlechtem Zahnstatus, chronische Schmerzen, leichte Skoliose und gehäuft Kopfschmerzen. Das Ausbleiben schwerster Symptome weist auf eine krankheitsmodifizierende Eigenschaft dieser Variante hin. Dennoch zeigt sich nach Auswertung de BPI eine starke Beeinträchtigung im Alltag. Starke Schmerzen (6/10) und eine außerordentliche Beeinträchtigung des Gehvermögens (9/10) münden in einer Suppression der Stimmung (8/10) und geben Hinweise auf einen erheblichen Leidensdruck. Eine krankheitsverursachende Eigenschaft bleibt weiterhin unklar.

Die Variante „c.818C>T“ wurde in dbSNP bereits registriert. Hier konnten neben untypischer Zahnmanifestation, unspezifische Symptome, wie Depression und Muskelschmerz erfasst werden. Der Verdacht einer HPP konnte im Beisein pathologischer Laborchemie gestellt werden.

Bei diesem Patienten ist ebenfalls von einem hohen Leidensdruck durch Schmerzen (3/10) in Kombination einer supprimierten Lebensfreude (6/10) auszugehen. Da sich diese Veränderung im Vergleich zu anderen Varianten sehr hoch in der Sequenz befindet, kann eine krankheitsverursachende Eigenschaft nicht eindeutig bewiesen werden.

4.2 HPP-typische Laborkonstellation

Nicht alle Patienten dieser Studie, aber auch in vergleichbaren Studien (Schmidt et al., 2017) zeigten HPP-typische Laborkonstellationen zusammen mit typischer und /oder unspezifischer HPP-Symptomatik sowie humangenetischen Hinweisen auf eine Pathogenität bestimmter Varianten. Die AP und PLP-Normwerte könnten eventuell zu konservativ sein und sollten alters- und geschlechtsspezifisch betrachtet werden. Auch eine Erweiterung des Wertespektrum in Kombination mit HPP-Symptomen oder auf Pathogenität hinweisende humangenetische Prognostik scheint denkbar. Dahir et al. konnten zeigen, dass bei mehr als 40% der Patienten mit seltenen *ALPL* Varianten über dem Referenzwert der AP von 40U/l, aber nur knapp 20% über 50U/l lagen (Dahir et al., 2018). Umgekehrt ist das Problem einer zu liberalen Schwelle unter Umständen unnötige Überdiagnostik bis hin zur erhöhten Wahrscheinlichkeit einer Fehldiagnose.

Eine HPP-typische Laborkonstellation kann somit zwar einen Hinweis auf das Vorliegen einer HPP geben und als Diagnose- und Screeninginstrument genutzt werden, sollte allerdings nur im klinischen Kontext zur Diagnose HPP führen.

4.3 Brief Pain Inventory als universelles Schmerz erfassungsinstrument

Dieser Fragebogen wurde ursprünglich zur Bewertung von Tumorschmerzen entwickelt (Cleeland, 1994) und konnte sich im Verlauf hunderter Studien als Messinstrument verschiedenster Schmerzproblematiken sowie damit einhergehender Beeinträchtigung etablieren. Auch für die HPP scheint dieser Fragebogen geeignet. In dieser Arbeit konnte zwar kein signifikanter Unterschied zwischen Gruppen aus pathogenen, fraglich pathogenen und neutralen *ALPL*-Varianten erhoben werden, dennoch spiegelt er das subjektive Krankheitsempfinden bei HPP-Patienten, unabhängig von humangenetischer Diagnostik, wider. Neben subjektiven Eindrücken der Individuen, könnte

dieser Fragebogen genutzt werden, um Schmerzen in bestimmten Körperregionen zu klassifizieren und objektivieren. Der abschätzbare Leidensdruck durch Erkrankungen, hier HPP, bietet behandelnden Ärzten, die Möglichkeit in interdisziplinärer Zusammenarbeit, eine mögliche Notwendigkeit psychologischer, psychosomatischer oder psychiatrischer Betreuung situationsgerecht abzuschätzen zu können und diese gegebenenfalls zu etablieren.

Da sich der BPI bereits im Bereich der Tumorschmerzen als adäquates Instrument etablieren konnte (Cleeland, 1994), sollte er auch für weitere Erkrankungen, wie in dieser Arbeit dargestellt, benutzt werden, um das subjektive Erleben einer Krankheit besser verstehen zu können.

4.4 Humangenetische Analysen als notwendiges Diagnosekriterium

Humangenetische Untersuchungen gehen generell und speziell bei der HPP mit einigen Einschränkungen einher. So können zwar aktuell 95% aller Mutationen durch konventionelle *ALPL*-Gensequenzierung identifiziert werden, dennoch bleibt eine kleine diagnostische Lücke, wie der Fall der Variante „c.1310-544_1548del“ zeigt. Hier konnten zwar klinische Hinweise für eine HPP gefunden werden, jedoch keine HPP-typische Laborkonstellation. Des Weiteren wurde diese Variante in der Literatur nur in Beisein einer weiteren Mutation beschrieben (Spentchian et al., 2006).

Da bereits bewiesen werden konnte, dass nicht nur Defekte auf Chromosom 1, sondern auch Genloci auf anderen Chromosomen, wie *GPLD1* auf Chromosom 6 und *JMJD1C-REEP3* auf Chromosom 10 (Kamatani et al., 2010, Yuan et al., 2008), Einfluss auf die AP-Serumaktivität haben, sollte nach einer Sequenzierung des *ALPL*-Gens und weiterhin hochgradigem Verdacht auf eine Hypophosphatasie, eine erweiterte Gendiagnostik in Betracht gezogen werden.

Ebenfalls sollten Umweltfaktoren und Epigenetik in diesem Kontext weiter erforscht werden. Die humangenetischen Ergebnisse sollten immer in Zusammenhang mit pathologischen Laborparametern und klinischer Manifestation interpretiert werden.

Ein weiteres Problem ergibt sich aus dem Vorhandensein mehrerer Genvarianten bei einem Patienten. 30% der Patienten der dargestellten Kohorte trugen additiv neutrale Varianten. Hier kann einer Variante gegebenenfalls keine eigenständige Eigenschaft

zugeordnet werden, da unklar ist, ob weitere Genveränderungen bestimmte Symptome modifizieren.

Da es sich empfiehlt die Diagnose HPP nur dann zu stellen, wenn eine HPP-typische Laborkonstellation in Kombination mit mindestens zwei klinischen krankheitsspezifischen Symptomen und humangenetischem Nachweis vorhanden ist, dienen humangenetische Analysen als notwendiges Diagnosekriterium, sind jedoch alleinstehend nicht als Beweis für eine HPP-Erkrankung zu verstehen.

4.5 Limitationen

Ein Defizit dieser Arbeit ist in der geringen Anzahl der Patienten mit fraglich pathogenen *ALPL*-Varianten (n=17) aufgrund der Seltenheit der HPP-Erkrankung zu sehen. Es konnten 13 verschiedene Varianten identifiziert werden, von denen sieben in die Klasse 4 und sechs in die Klasse 3 nach ACMG eingeteilt werden konnten. Durch die oben genannte geringe Fallzahl konnten elf Varianten je durch einen Patienten repräsentiert werden. Lediglich die Varianten „c.565_575delinsAG (p.Asp189_Met192delinsArg)“ waren durch vier Patienten und die Variante „c.1023T>A (p.H341Q)“ durch zwei Patienten vertreten.

In Einklang mit klinischer Symptomatik und laborchemischer Konstellation konnte der Verdacht auf eine HPP bei den der ACMG-Klasse 4 zugeordneten Varianten bestätigt werden. Die Varianten der Klasse 3 konnten Hinweise auf eine HPP aufzeigen, ließen aber bei unklarer humangenetischer Beurteilung sowie bei nicht eindeutigen klinischen und laborchemischen Kriterien keine sichere Diagnosestellung zu. Es bedarf weiterer Studien unter Berücksichtigung erweiterter humangenetischer Analysen, um die Diagnose HPP im Beisein einer ACMG-Klasse 3 Variante erheben zu können oder eine solche sicher auszuschließen.

Eine weitere Schwäche stellt der fehlende klinische und laborchemische Vergleich zu Patienten mit pathogenen oder neutralen *ALPL*-Genvariante dar, da als Ziel dieser Arbeit eine Einordnung der 13 beschriebenen fraglich pathogenen Varianten in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext zu verstehen ist.

Des Weiteren ist zu erwähnen, dass nicht alle Patienten mit fraglich pathogenen Varianten an einer Befragung mittels BPI teilgenommen haben. Es konnte dennoch

anhand von Patienten mit pathogenen Varianten und/oder Patienten mit gesicherter HPP-Diagnose gezeigt werden, dass eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität zu verzeichnen ist.

4.6 Fazit

In dieser Arbeit wurde die Klassifikation 13 seltener fraglich pathogener *ALPL*-Varianten entwickelt. Laborchemie, klinische und apparative Diagnostik, wie die Knochendichtemessung, konnten im Zusammenhang mit humangenetischen Befunden genutzt werden, um die dargestellten Varianten eindeutiger zu klassifizieren.

Muskuläre Symptome (71%) und knöcherne Komplikationen (76%) ließen sich in der Gesamtheit am häufigsten finden. 6 Varianten aus der Gruppe der fraglich pathogenen Varianten konnten mittels humangenetischer Diagnostik in die ACMG-Klasse 3 und 7 Varianten in die ACMG-Klasse 4 eingeordnet werden. Analog zu dem weiten klinischen Spektrum an Beschwerden und der schwachen Genotyp-Phänotyp-Korrelation, zeigten sich auch in der subjektiven Wahrnehmung der Erkrankung gemessen anhand des BPI keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit pathogenen, fraglich pathogenen und neutralen *ALPL*-Varianten.

Da sich die humangenetischen Befunde durch schwache Genotyp-Phänotyp-Beziehung nicht immer in HPP-spezifischer klinischer Symptomatik und laborchemischen Ergebnissen widerspiegeln, aber die Kombinationen aus klinischen und genetischen Befunden das Erkenntnisspektrum klar erweitern, ist die Gendiagnostik integrativer Bestandteil der HPP-Diagnostik und sollte im Falle einer negativen *ALPL*-Gensequenzierung bei hochgradigem Verdacht auf HPP gegebenenfalls schrittweise (auf das gesamte Genom) ausgeweitet werden.

Die retrospektive Auswertung der genetischen Daten legte den Schluss nahe, dass die Diagnose HPP nur dann gestellt werden sollte, wenn humangenetisch von einer (wahrscheinlichen) Pathogenität (Klasse 4 und höher nach ACMG) ausgegangen wird, sofern wiederholt erniedrigte AP-Serumaktivität sowie erhöhte PLP-Werte gemessen werden konnten und klinisch mindestens zwei verschiedene Organsysteme (Knochen, Muskel, Zähne, Neurologie/ Psychiatrie) betroffen sind.

Durch diese Kriterien lässt sich eine adulte HPP bei mehr als der Hälfte der betrachteten Patienten mit fraglich pathogener *ALPL*-Variante, bei welchen eine HPP vorher nicht klar nachgewiesen werden konnte, diagnostizieren. Zur besseren Abschätzung des Leidensdruckes einzelner Patienten sollte der BPI fester Bestandteil im diagnostischen Prozess sein, um eine multimodale Therapie zu initiieren.

Für die genauere Einordnung der pathogenen Bedeutung sowie die Beeinflussung der klinischen Symptome bei HPP-Patienten durch fraglich pathogene Varianten (ACMG-Klasse 3 und 4) sind weiterführende Studien notwendig und sinnvoll, um auch diese Gruppen von HPP-Patienten besser zu verstehen und den Effekt im Verlauf abschätzen zu können.

5 Zusammenfassung

Die Hypophosphatasie (HPP) ist eine seltene metabolische Multisystemerkrankung ausgelöst durch eine geringe Aktivität der gewebsunspezifischen alkalischen Phosphatase (TNSALP, gebräuchlich außerdem AP). Das Erstauftreten und das Spektrum der klinischen Symptome sind heterogen, was das Verständnis des Zusammenhangs von bestimmten *ALPL*-Genvarianten und dem klinischen Bild zusätzlich erschwert. Ziel dieser Arbeit war es, seltene, fraglich pathogene *ALPL*-Varianten durch laborchemische, klinische und humangenetische Befunde besser einzuordnen und genauer zu klassifizieren und um eine Genotyp-Phänotyp-Beziehung besser beurteilen zu können. 90 Patienten wurden retrospektiv anhand typischer HPP-Symptomatik, positiver Familienanamnese sowie erniedrigter Werte der alkalischen Phosphatase (AP) kombiniert mit erhöhten Werten des Pyridoxal-5-Phosphats (PLP) in die Analyse inkludiert und die humangenetische Sequenzierung des *ALPL*-Gens in Bezug zur Klinik ausgewertet. Die Patienten wurden in drei Gruppen anhand der Pathogenität ihrer Genbefunde gemäß Klassifikation des „American College of Medical Genetics“ (ACMG) aufgeteilt und analysiert. Die Kohorte konnte in Patienten mit pathogenen *ALPL*-Varianten (n=49), seltenen/fraglich pathogenen Varianten (n=17) und neutralen Varianten (n=24) unterteilt werden. Muskuläre Symptome (71%) und knöcherner Komplikationen (z.B. Frakturen, Stressfrakturen, Knochenödeme) (76%) ließen sich in der Gesamtheit am häufigsten finden. Sieben Varianten wurden als wahrscheinlich pathogen (ACMG-Klasse 4) und sechs weitere als Varianten unklarer Signifikanz (ACMG-Klasse 3) klassifiziert. Bei 42 Patienten erfolgte die Auswertung des „Brief Pain Inventory“ (BPI), um Schmerzen und Beeinträchtigungen im Alltag beurteilen zu können. Analog zu dem weiten klinischen Spektrum an Beschwerden und der schwachen Genotyp-Phänotyp-Korrelation, zeigten sich auch in der subjektiven Wahrnehmung der Erkrankung gemessen anhand des BPI keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit pathogenen, fraglich pathogenen und neutralen *ALPL*-Varianten. Die retrospektive Auswertung der genetischen Daten in Bezug zu den Ergebnissen der Untersuchungen des Bewegungsapparates und anderen Organsystemen legte den Schluss nahe, dass die Diagnose HPP nur dann gestellt werden sollte, wenn humangenetisch mind. eine (wahrscheinlich) pathogene *ALPL*-Variante vorliegt (Klasse 4 und höher nach ACMG), wiederholt erniedrigte AP-Serumaktivität kombiniert mit erhöhten PLP-Werten gemessen werden können und klinisch mindestens eine typische Komplikation des

Skelettsystems und eine weitere Komplikation aus dem Bereich Muskulatur, Zähne, zentrales Nervensystem oder Psyche auftreten.

5.1 Summary

Hypophosphatasia (HPP) is a rare metabolic multisystem disease caused by decreased activity of the tissue non-specific alkaline phosphatase (TNSALP). The onset of the disease and the spectrum of clinical signs and symptoms are heterogeneous, leading to difficulties in understanding the relationship between certain *ALPL* gene variants and the clinical presentation. The aim of this thesis was to classify rare, potentially pathogenic *ALPL* variants based on laboratory, clinical and human genetic findings. 90 patients with typical HPP symptoms, a positive family history or low alkaline phosphatase (AP) combined with increased pyridoxal-5-phosphate (PLP), were included and underwent *ALPL* gene sequencing. The patients were divided into 3 groups based on the pathogenicity of their genetic findings according to the classification of the American College of Medical Genetics (ACMG) resulting in patients with pathogenic *ALPL* variants (n=49), rare / potentially pathogenic variants (n=17) and neutral variants (n=24). Muscular symptoms (71%) and skeletal complications (e.g. fractures, bone marrow edema) (76%) appeared to be the most common. Seven variants were classified as likely pathogenic (ACMG class 4) and six others as variants of unclear significance (ACMG class 3). 42 patients were evaluated using the Brief Pain Inventory (BPI) to assess pain and activity. Consistent with a wide clinical spectrum of complaints and a weak genotype-phenotype correlation, the subjective perception of the disease measured by the BPI did not show significant differences between patients with pathogenic, potentially pathogenic and neutral *ALPL* variants. The retrospective analysis of the clinical and genetic data shows, that the diagnosis of HPP should only be made if at least one (likely) pathogenic *ALPL* variant is present (class 4 or higher), if repeatedly reduced AP serum activity combined with elevated PLP levels can be measured, and if at least one typical clinical complication of the bone and one further complication of the muscles, teeth, central nervous or mental system occur.

6 Literaturverzeichnis

- Abouelhoda M, Faquih T, El-Kalioby M, Alkuraya FS (2016) Revisiting the morbid genome of Mendelian disorders. *Genome Biol.* 17:235.
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7:248-249.
- Aeby M, Wyss T, Mentrup B, Kunstmann E, Jakob F, Aeberli D (2016) Low-energy trauma-induced intercondylar femoral fracture. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 13:151-153.
- Belachew D, Kazmerski T, Libman I, Goldstein AC, Stevens ST, Deward S, Vockley J, Sperling MA, Balest AL (2013) Infantile hypophosphatasia secondary to a novel compound heterozygous mutation presenting with pyridoxine-responsive seizures. *JIMD Rep.* 11:17-24.
- Bell CJ, Dinwiddie DL, Miller NA, Hateley SL, Ganusova EE, Mudge J, Langley RJ, Zhang L, Lee CC, Schilkey FD, Sheth V, Woodward JE, Peckham HE, Schroth GP, Kim RW, Kingsmore SF (2011) Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next-generation sequencing. *Sci Transl Med.* 3:65ra4.
- Berg JS, Adams M, Nassar N, Bizon C, Lee K, Schmitt CP, Wilhelmsen KC, Evans JP (2013) An informatics approach to analyzing the incidentalome. *Genet Med.* 15:36-44.
- Berkseth KE, Tebben PJ, Drake MT, Hefferan TE, Jewison DE, Wermers RA (2013) Clinical spectrum of hypophosphatasia diagnosed in adults. *Bone.* 54:21-27.
- Bianchi ML (2015) Hypophosphatasia: an overview of the disease and its treatment. *Osteoporosis Int.* 26:2743-2757.
- Bloch-Zupan A (2016) Hypophosphatasia: diagnosis and clinical signs - a dental surgeon perspective. *Int J Paediatr Dent.* 26:426-438.
- Braunstein NA (2016) Multiple fractures, pain, and severe disability in a patient with adult-onset hypophosphatasia. *Bone Rep.* 4:1-4.
- Briot K, Roux C (2016) Adult hypophosphatasia. *Curr Opin Rheumatol.* 28:448-451.
- Choi YSG, Murphy S, Miller JR, Chan AP (2012) Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS ONE.* 7(10):e46688.
- Cleeland CS, Ryan KM (1994) Pain assessment: Global use of the Brief Pain Inventory. *Annals, Academy of Medicine Singapore.* 23:129-138.
- Colazo JM, Hu JR, Dahir KM, Simmons JH (2019) Neurological symptoms in Hypophosphatasia. *Osteoporosis Int.* 30:469-480.

- Dahir KM, Tilden DR, Warner JL, Bastarache L, Smith DK, Gifford A., Ramirez AH, Simmons JS, Black MM, Newman JH, Denny JC (2018) Rare variants in the gene *ALPL* that cause Hypophosphatasia are strongly associated with ovarian and uterine disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* 103:2234-2243.
- David A, Sampson DKOC (1989) Analysis of B-6 vitamers and pyridoxic acid in plasma, tissues and urine using high performance liquid chromatography. *Nutr Res.* 9:259-272.
- Del Angel G, Reynders J, Negron C, Steinbrecher T, Mornet E (2020) Large-scale in vitro functional testing and novel variant scoring via protein modeling provide insights into alkaline phosphatase activity in hypophosphatasia. *Hum Mutat.* 41(7):1250-1262.
- Fedde KN, Michell MP, Henthorn PS, Whyte MP (1996). Aberrant properties of alkaline phosphatase in patient fibroblasts correlate with clinical expressivity in severe forms of hypophosphatasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 81:2587-2594.
- Fonta C, Salles JP (2017) Neuromuscular features of hypophosphatasia. *Arch Pediatr.* 24:5s85-5s88.
- Fraser D (1957) Hypophosphatasia. *Am J Med.* 22:730-746.
- Goseki-Sone M, Orimo H, Iimura T, Miyazaki H, Oda K, Shibata H, Yanagishita M, Takagi Y, Watanabe H, Shimada T, Oida, S (1998) Expression of the mutant (1735T-DEL) tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene from hypophosphatasia patients. *J Bone Miner Res.* 13:1827-1834.
- Henthorn PS, Raducha M, Fedde KN, Lafferty MA, Whyte MP (1992) Different missense mutations at the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene locus in autosomal recessively inherited forms of mild and severe hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:9924-9928.
- Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, Musolf A, Li Q, Holzinger E, Karyadi D, Cannon-Albright LA, Teerlink CC, Stanford JL, Isaacs WB, Xu J, Cooney KA, Lange EM, Schleutker J, Carpten J., Powell IJ, Cussenot O, Cancel-Tassin G, Giles GG, Macinnis RJ, Maier C., Hsieh CL, Wiklund F, Catalona WJ, Foulkes WD, Mandal D, Eeles RA, Kote-Jarai Z, Bustamante CD, Schaid DJ, Hastie T, Ostrander EA, Bailey-Wilson JE, Radivojac P, Thibodeau SN, Whittemore AS, SIEH W (2016) REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet.* 99:877-885.
- Jandl NM, Schmidt T, Rolvien T, Stürznickel J, Chrysostomou K, von Vopelius E, Volk AE, Schinke T, Kubisch C, Amling M, Barvencik F (2021) Genotype-Phenotype Associations in 72 Adults with Suspected *ALPL*-Associated Hypophosphatasia. *Calcif Tissue Int.* 108:288-301.

- Kamatani Y, Matsuda K, Okada Y, Kubo M, Hosono N, Daigo Y, Nakamura Y, Kamatani N (2010) Genome-wide association study of hematological and biochemical traits in a Japanese population. *Nat Genet.* 42:210-215.
- Khan AA, Josse R, Kannu P, Villeneuve J, Paul T, Van Uum S, Greenberg CR (2019) Hypophosphatasia: Canadian update on diagnosis and management. *Osteoporos Int.* 30:1713-1722.
- Khandwala HM, Mumm S, Whyte MP (2006) Low serum alkaline phosphatase activity and pathologic fracture: case report and brief review of hypophosphatasia diagnosed in adulthood. *Endocr Pract.* 12:676-681.
- Kircher M, Jain P, O'Roak BJ, Cooper GM, Shendure J (2014) A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet.* 46:310-315.
- Lefever E, Witters P, Gielen E, Vanclooster A, Meersseman W, Morava E, Cassiman D, Laurent MR (2018) Hypophosphatasia in Adults: Clinical Spectrum and Its Association With Genetics and Metabolic Substrates. *J Clin Densitom.* 23:340-348.
- Lia-Baldini AS, Muller F, Taillandier A, Gibrat JF, Mouchard M, Robin B, Simon-Bouy B, Serre JL, Aylsworth AS, Bieth E, Delanote S, Freisinger P, Hu JC, Krohn HP, Nunes ME, Mornet E (2001) A molecular approach to dominance in hypophosphatasia. *Hum Genet.* 109:99-108.
- Litmanovitz, Reish O, Dolfin T, Arnon S, Regev R, Grinshpan G, Yamazaki M, Ozono K (2002) Glu274Lys/Gly309Arg mutation of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene in neonatal hypophosphatasia associated with convulsions. *J Inherit Metab Dis.* 25:35-40.
- Massy-Westropp NM, Gill TK, Taylor AW, Bohannon RW, Hill CL (2011) Hand Grip Strength: age and gender stratified normative data in a population-based study. *BMC Res Notes.* 4:127.
- Michigami T, Tachikawa K, Yamazaki M, Kawai M, Kubota T, Ozono K (2020) Hypophosphatasia in Japan: *ALPL* Mutation Analysis in 98 Unrelated Patients. *Calcif Tissue Int.* 106:221-231.
- Mornet E, Taillandier A, Domingues C, Dufour A, Benaloun E, Lavaud N, Wallon F, Rousseau N, Charle C, Guberto M, Muti C, Simon-Bouy B. (2021) Hypophosphatasia: a genetic-based nosology and new insights in genotype-phenotype correlation. *Eur J Hum Genet.* 29:289-299.
- Mornet E (2018) Hypophosphatasia. *Metabolism.* 82:142-155.
- Mornet E, Stura E, Lia-Baldini AS, Stigbrand T, Menez A, Le Du MH (2001) Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. *J Biol Chem.* 276:31171-31178.

- Mornet E, Taillandier A, Peyramaure S, Kaper F, Muller F, Brenner R, Bussiere P, Freisinger P, Godard J, Le Merrer M, Oury JF, Plauchu H, Puddu R, Rival JM, Superti-Furga A, Touraine RL, Serre JL, Simon-Bouy B (1998) Identification of fifteen novel mutations in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNSALP) gene in European patients with severe hypophosphatasia. *Eur J Hum Genet.* 6:308-314.
- Mornet E, Yvard A, Taillandier A, Fauvert D, Simon-Bouy B (2011) A molecular-based estimation of the prevalence of hypophosphatasia in the European population. *Ann Hum Genet.* 75:439-445.
- Mumm S, Jones J, Finnegan P, Henthorn PS, Podgornik MN, Whyte MP (2002) Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the tissue nonspecific alkaline phosphatase isoenzyme gene in hypophosphatasia. *Mol Genet Metab.* 75:143-153.
- Mumm S, Jones J, Finnegan P, Whyte MP (2001) Hypophosphatasia: molecular diagnosis of Rathbun's original case. *J Bone Miner Res.* 16:1724-1727.
- Nielson CM, Zmuda JM, Carlos AS, Wagoner WJ, Larson EA, Orwoll ES, Klein RF (2012) Rare coding variants in *ALPL* are associated with low serum alkaline phosphatase and low bone mineral density. *J Bone Miner Res.* 27:93-103.
- Oddsson A, Sulem P, Helgason H, Edvardsson VO, Thorleifsson G, Sveinbjornsson G, Haraldsdottir E, Eyjolfsson GI, Sigurdardottir O, Olafsson I, Masson G, Holm H, Gudbjartsson DF, Thorsteinsdottir U, Indridason OS, Palsson R, Stefansson K (2015) Common and rare variants associated with kidney stones and biochemical traits. *Nat Commun.* 6:7975.
- Orimo H (2016) Pathophysiology of hypophosphatasia and the potential role of asfotase alfa. *Ther Clin Risk Manag.* 12:777-86.
- Orimo H, Girschick HJ, Goseki-Sone M, Ito M, Oda K, Shimada T (2001) Mutational analysis and functional correlation with phenotype in German patients with childhood-type hypophosphatasia. *J Bone Miner Res.* 16:2313-2319.
- Plon SE, Eccles DM, Easton D, Foulkes WD, Genuardi M, Greenblatt MS, Hogervorst FB, Hoogerbrugge N, Spurdle AB, Tavtigian SV (2008) Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat.* 29:1282-1291.
- Rathbun JC (1948) Hypophosphatasia; a new developmental anomaly. *Am J Dis Child.* 75:822-831.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL (2015) Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 17:405-424.

- Sallevelt S, De Koning B, Szklarczyk R, Paulussen ADC, De Die-Smulders CEM, Smeets HJM (2017) A comprehensive strategy for exome-based preconception carrier screening. *Genet Med.* 19:583-592.
- Schmidt T, Mussawy H, Rolvien T, Hawellek T, Hubert J, R  ther W, Amling M, Barvencik F (2017) Clinical, radiographic and biochemical characteristics of adult hypophosphatasia. *Osteoporos Int.* 28:2653-2662.
- Schmidt T, Rolvien T, Linke C, Jandl NM, Oheim R, Amling M, Barvencik F (2019) Outcome of Teriparatide Treatment on Fracture Healing Complications and Symptomatic Bone Marrow Edema in Four Adult Patients With Hypophosphatasia. *JBMR Plus.* 3:e10215.
- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D (2014) MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature Methods.* 11:361-362.
- Sergi C, Mornet E, Troeger J, Voigtlaender T (2001) Perinatal hypophosphatasia: radiology, pathology and molecular biology studies in a family harboring a splicing mutation (648+1A) and a novel missense mutation (N400S) in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNSALP) gene. *Am J Med Genet.* 103:235-240.
- Silvent J, Gasse B, Mornet E, Sire JY (2014) Molecular evolution of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase allows prediction and validation of missense mutations responsible for hypophosphatasia. *J Biol Chem.* 289:24168-24179.
- Spentchian M, Brun-Heath I, Taillandier A, Fauvert D, Serre JL, Simon-Bouy B, Carvalho F, Grochova I, Mehta SG, M  ller G, Oberstein SL, Ogur G, Sharif S, Mornet E (2006) Characterization of missense mutations and large deletions in the *ALPL* gene by sequencing and quantitative multiplex PCR of short fragments. *Genet Test.* 10:252-257.
- Spentchian M, Merrien Y, Herasse M, Dobbie Z, Glaser D, Holder SE, Ivarsson SA, Kostiner D, Mansour S, Norman A, Roth J, Stipoljev F, Taillemite JL, Van Der Smagt JJ, Serre JL, Simon-Bouy B, Taillandier A, Mornet E (2003) Severe hypophosphatasia: characterization of fifteen novel mutations in the *ALPL* gene. *Hum Mutat.* 22:105-106.
- Taillandier A, Cozien E, Muller F, Merrien Y, Bonnin E, Fribourg C, Simon-Bouy B, Serre JL, Bieth E, Brenner R, Cordier MP, De Bie S, Fellmann F, Freisinger P, Hesse V, Hennekam RC, Josifova D, Kerzin-Storarr L, Leporrier N, Zobot MT, Mornet E (2000) Fifteen new mutations (195C>T, L-12X, 298-2A>G, T117N, A159T, R229S, 997+2T>A, E274X, A331T, H364R, D389G, 1256delC, R433H, N461I, C472S) in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNSALP) gene in patients with hypophosphatasia. *Hum Mutat.* 15:293.

- Taillandier A, Lia-Baldini AS, Mouchard M, Robin B, Muller F, Simon-Bouy B, Serre JL, Bera-Louville A, Bonduelle M, Eckhardt J, Gaillard D, Myhre AG, Kortge-Jung S, Larget-Piet L, Malou E, Sillence D, Temple IK, Viot G, Mornet E (2001) Twelve novel mutations in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene (*ALPL*) in patients with various forms of hypophosphatasia. *Hum Mutat.* 18:83-84.
- Taillandier A, Zurutuza L, Muller F, Simon-Bouy B, Serre JL, Bird L, Brenner R, Boute O, Cousin J, Gaillard D, Heidemann PH, Steinmann B, Wallot M, Mornet E (1999) Characterization of eleven novel mutations (M45L, R119H, 544delG, G145V, H154Y, C184Y, D289V, 862+5A, 1172delC, R411X, E459K) in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase (*TNSALP*) gene in patients with severe hypophosphatasia. *Hum Mutat.* 13:171-172.
- Thomas L, Müller M, Schumann G, Weidemann G, Klein G (2005) Consensus of DGKL and VDPGH for interim reference intervals on enzymes in serum. *J Lab Med.* 29:301-308.
- Weber TJ, Sawyer EK, Moseley S, Odrliin T, Kishnani PS (2016) Burden of disease in adult patients with hypophosphatasia: Results from two patient-reported surveys. *Metabolism.* 65:1522-1530.
- Weiss MJ, Cole DE, Ray K, Whyte MP, Lafferty MA, Mulivor RA, Harris H (1988) A missense mutation in the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene causing a lethal form of hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:7666-7669.
- Wenkert D, Mcalister WH, Coburn SP, Zerega JA, Ryan LM, Ericson KL, Hersh JH, Mumm S, Whyte MP (2011) Hypophosphatasia: nonlethal disease despite skeletal presentation in utero (17 new cases and literature review). *J Bone Miner Res.* 26:2389-2398.
- Whyte MP (2016) Hypophosphatasia - aetiology, nosology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 12:233-246.
- Whyte MP (2017) Hypophosphatasia: An overview For 2017. *Bone.* 102:15-25.
- Whyte MP, Zhang F, Wenkert D, Mcalister WH, Mack KE, Benigno MC, Coburn SP, Wagy S, Griffin DM, Ericson KL, Mumm S (2015) Hypophosphatasia: validation and expansion of the clinical nosology for children from 25 years experience with 173 pediatric patients. *Bone.* 75:229-239.
- Wilson MP, Plecko B, Mills PB, Clayton PT (2019) Disorders affecting vitamin B6 metabolism. *Inherit Metab Dis.* 42:629-646.
- Yokoi K, Nakajima Y, Shinkai Y, Sano Y, Imamura M, Akiyama T, Yoshikawa T, Ito T, Kurahashi H (2019) Clinical and genetic aspects of mild hypophosphatasia in Japanese patients. *Mol Genet Metab Rep.* 21:100515.

Yuan X, Waterworth D, Perry JR, Lim N, Song K, Chambers JC, Zhang W, Vollenweider P, Stirnadel H, Johnson T, Bergmann S, Beckmann ND, Li Y, Ferrucci L, Melzer D, Hernandez D, Singleton A, Scott J, Elliott P, Waeber G, Cardon L, Frayling TM, Kooner JS, Mooser V (2008) Population-based genome-wide association studies reveal six loci influencing plasma levels of liver enzymes. *Am J Hum Genet.* 83:520-528.

Internetquellen

<http://exac.broadinstitute.org/about> (Zugriff: 25.04.2021 um 19:45)

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/introduction.php?lang=german>

(Zugriff: 25.04.2021 um 19:45)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/intro> (Zugriff: 25.04.2021 um 19:45)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC29783>

(Zugriff: 25.04.2021 um 19:45)

<http://alplmutationdatabase.hypophosphatasie.com>

(Zugriff: 25.04.2021 um 19:45)

7 Anmerkungen

Anteile dieser Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit Dr. med. Nico Maximilian Jandl und dem Institut für Osteologie und Biomechanik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Univ.-Prof. Dr. med. Michael Amling, leitender Oberarzt Univ.-Prof. Dr. med. Florian Barvencik) im Rahmen eines wissenschaftlichen Artikels publiziert (*Jandl NM, Schmidt T, Rolvien T, Stürznickel J, Chrysostomou K, von Vopelius E, Volk AE, Schinke T, Kubisch C, Amling M, Barvencik F (2021) Genotype-Phenotype Associations in 72 Adults with Suspected ALPL-Associated Hypophosphatasia. Calcif Tissue Int.;108(3):288-301.*)

Da die Ergebnisse dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit weiteren Forschern entstanden sind und teilweise in der oben genannten Publikation veröffentlicht wurden, befindet sich im Anhang, gemäß Promotionsordnung für die Medizinische Fakultät der Universität Hamburg §7, ein Manuskript über die Eigenleistungen.

Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Arbeit das generische Maskulinum verwendet und inkludiert beide Geschlechter.

8 Anhang



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

Institut für Osteologie & Biomechanik



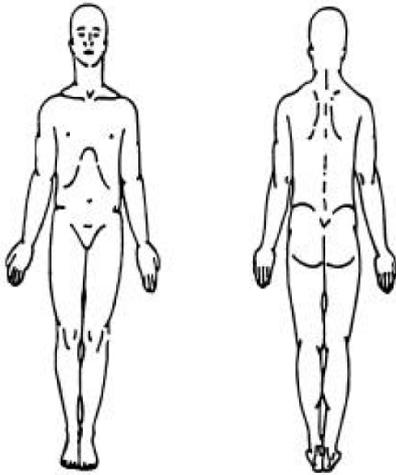
Brief Pain Inventory

Patienten Name:

Geb:

1. Familienstand: alleinstehend verheiratet verwitwet getrennt/ geschieden
2. Berufsausbildung:
3. Derzeitige Beschäftigung:
4. Frühere Beschäftigungen:
5. Wie ist ihre jetzige Beschäftigungsart am besten zu beschreiben?
 beschäftigt, Vollzeit beschäftigt, Teilzeit Hausfrau/Hausmann Berentet
 nicht beschäftigt Anderes
6. Wie lange ist es her, dass Ihnen ihre Diagnose bekannt wurde? Monate/ Jahre
7. Welche Therapie haben sie in den letzten Jahren erhalten:
—
—
—
8. Hatten Sie jemals Schmerzen, die auf Ihre jetzige Erkrankung zurückzuführen sind?
9. Als Sie das erste Mal ihre Diagnose erfuhren, war Schmerz eines der Symptome?

10. Bitte schraffieren Sie in der nachstehenden Zeichnung die Gebiete, in denen Sie Schmerzen haben.



11. Kreise Sie die Zahl ein, die ihre stärksten Schmerzen in der letzten Wochen am besten beschreibt:

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kein Schmerz							stärkste vorstellbare Schmerzen			

12. Kreise Sie die Zahl ein, die ihre geringsten Schmerzen in der letzten Wochen am besten beschreibt:

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kein Schmerz							stärkste vorstellbare Schmerzen			

13. Kreise Sie die Zahl ein, die ihre durchschnittlichen Schmerzen in der letzten Wochen am besten beschreibt:

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kein Schmerz							stärkste vorstellbare Schmerzen			

14. Kreise Sie die Zahl ein, die ihre Schmerzen im diesem Moment am besten beschreibt:

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kein Schmerz							stärkste vorstellbare Schmerzen			

15. Welche Dinge und Tätigkeiten lindern Ihre Schmerzen (z.B. Wärme, Medikamente, Ausruhen)?

16. Welche Dinge und Tätigkeiten verstärken Ihre Schmerzen (Z.B. Gehen, Stehen, Heben)?

17. Welche Medikamente erhalten Sie gegen Ihre Schmerzen?

18. Bitte denken Sie an die letzte Woche. Wieviel Schmerzlinderung haben Sie durch Behandlungen oder Medikamente erfahren? Bitte kreisen Sie die Prozentzahl ein, die am besten die Schmerzlinderung beschreibt:

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Keine Linderung								vollständige Linderung		

19. Falls Sie Schmerzmedikamente einnehmen: Wie viele Stunden dauert es, bis Ihre Schmerzen wieder auftreten?

20. Schmerzempfindung: Bitte geben sie für jeden der nachstehenden Wörter an, ob es für ihre Schmerzen zutrifft:

dumpf, drückend	gar nicht	0	1	2	3	extrem
pochend, klopfend	gar nicht	0	1	2	3	extrem
brennend, heiß	gar nicht	0	1	2	3	extrem
elektrisierend, einschließend	gar nicht	0	1	2	3	extrem
stechend, bohrend	gar nicht	0	1	2	3	extrem
krampfartig, kolikartig	gar nicht	0	1	2	3	extrem
ziehend, reißend	gar nicht	0	1	2	3	extrem
Schmerz bei leichter Berührung	gar nicht	0	1	2	3	extrem
Unerträglich	gar nicht	0	1	2	3	extrem
erschöpfend, ermüdend	gar nicht	0	1	2	3	extrem
schrecklich	gar nicht	0	1	2	3	extrem

21. Bitte kreisen Sie die Zahl ein, die angibt, wie stark ihre Schmerzen Sie in der letzten Woche beeinträchtigt haben:

Allgemeine Aktivität:

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Keine Beeinträchtigung								Stärkste Beeinträchtigung		

Stimmung:

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Keine Beeinträchtigung								Stärkste Beeinträchtigung		

Gehvermögen:

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Keine Beeinträchtigung								Stärkste Beeinträchtigung		

Normale Arbeit (sowohl außerhalb und Haushalt):

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Keine Beeinträchtigung								Stärkste Beeinträchtigung		

Beziehung zu anderen Menschen:

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Keine Beeinträchtigung								Stärkste Beeinträchtigung		

Schlaf:

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Keine Beeinträchtigung								Stärkste Beeinträchtigung		

Lebensfreunde

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Keine Beeinträchtigung								Stärkste Beeinträchtigung		

Eigenleistung im Forschungsprozess mit weiteren Wissenschaftlern

Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise im Forschungsprozess mit weiteren Wissenschaftlern erarbeitet und in „Jandl NM, Schmidt T, Rolvien T, Stürznickel J, Chrysostomou K, von Vopelius E, Volk AE, Schinke T, Kubisch C, Amling M, Barvencik F (2021) Genotype-Phenotype Associations in 72 Adults with Suspected ALPL-Associated Hypophosphatasia. *Calcif Tissue Int.*;108:288-301“ publiziert.

Gemäß §7 der Promotionsordnung für die Medizinische Fakultät der Universität Hamburg dient dieses Manuskript zur Dokumentation der Eigenleistung im Forschungsprozess:

1. Patientendatenerfassung und Erweiterung der Kohorte auf 90 inkludierte Patienten
2. Analyse und Bewertung sämtlicher klinischer, laborchemischer und bildgebender Befunde sowie Erstellung der dazugehörigen Tabellen
3. Datenerhebung sowie statistische Auswertung der Parameter aus dem Brief Pain Inventory Fragebogen sowie die dazugehörige graphische Darstellung
4. Einordnung und Diskussion in Bezug auf den aktuellen wissenschaftlichen Kontext
5. Eigenständige Verfassung der vorliegenden Arbeit

9 Danksagung

Zuerst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Michael Amling, dem Direktor des Instituts für Osteologie und Biomechanik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf und meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Florian Barvencik, leitender Oberarzt am selben Institut, für die Möglichkeit zur Promotion und die hervorragende Betreuung.

Ein besonderer Dank gilt Dr. med. Nico Maximilian Jandl, der im Rahmen der Betreuung dieser Arbeit mir immer unterstützend zur Seite stand.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Osteologie und Biomechanik für die Aufnahme in ein äußerst angenehmes Arbeitsumfeld bedanken.

Des Weiteren gilt dem Institut für Humangenetik ein besonderer Dank, für die zuverlässige Bereitstellung humangenetischer Befunde.

Zu guter Letzt danke ich meiner Frau, meinen Eltern, meiner Schwester, Großmutter und allen guten Freunden für ihre große emotionale Unterstützung während des Studiums – auf euch ist immer Verlass.

10 Lebenslauf

Konstantin Chrysostomou

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

11 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: 