

Universitätsklinikum Ulm
Abteilung Humangenetik
Ärztlicher Leiter: Prof. Dr. W. Vogel

**Molekulargenetische Untersuchungen zur Heterogenität
der Osteogenesis imperfecta**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie (Dr. biol. hum.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
TATJANA TRUMMER
aus Berlin

Ulm, 2001

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. P. Gierschik
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. I. Kennerknecht
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. R. Brenner
Tag der Promotion:	09. Februar 2001

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.2.1 Genomische Struktur des *COL1A1* Gens
- Abb. 1.2.2 Intra- und extrazelluläre Prozessierung von Typ I Kollagen
- Abb. 2.8.1 Darstellung der fluoreszierenden EGFP-Vektoren
- Abb. 2.8.2 Darstellung der Luziferase-Reportergenvektoren
- Abb. 3.1.1.1 Ergebnisse des Mutationsscreenings bei OI Patienten in den Kollagen Typ I Genen
- Abb. 3.1.1.2 CSGE-Mutationsscreening auf einem ALF express™ Sequencer zum Vergleich zwischen klassischer und automatischer CSGE-Methode
- Abb. 3.1.2.1 p.G880S Substitution (*COL1A1*)
- Abb. 3.1.2.2 p.G886A Substitution (*COL1A1*)
- Abb. 3.1.2.3 p.G523S Substitution (*COL1A1*)
- Abb. 3.1.3.1 Schematische Darstellung der Zusammensetzung der verschiedenen Deletions-allele im *COL1A2* Gen bei Patientin K60
- Abb. 3.1.3.2 Sequenzvergleich ausgewählter Sequenzen des klonierten cDNA-Abschnitts der Patientin K60
- Abb. 3.1.3.3 Konsensussequenz eukaryontischer Spleißstellen
- Abb. 3.1.4.1 Sequenzanalyse im *COL1A1* Gen bei Patient K4
- Abb. 3.1.4.2 Ein Vergleich der Sequenzen der klonierten PCR-Produkte des Patienten K4 zeigen die deletierten Basen in einem roten Kasten.
- Abb. 3.1.4.3 Übersicht der rekurrierenden Deletionen in der Tripelhelix im *COL1A1* Gen im Bereich der Aminosäuren 867-875
- Abb. 3.1.4.4 p.G238C Substitution (*COL1A2*) bei Patientin K11
- Abb. 3.1.5.1 Nachweis der Nullmutation bei Patient K73 durch Sequenzieren der cDNA Klone
- Abb. 3.1.5.2 Stammbaum einer Familie mit OI Typ I und intrafamiliärer Variabilität
- Abb. 3.2.2.1 Mikrosatellitenanalyse einer Familie mit Brucksyndrom
- Abb. 3.2.2.2 Stammbaum der Familie mit Brucksyndrom mit Darstellung der Segregation der untersuchten polymorphen Marker in der Chromosomenregion 17p12
- Abb. 3.3.1.1 Darstellung der zur Kollagenstabilität beitragenden Aminosäure-Triplets mit den Glyzinsubstituenten aus der Kollagenmutationsdatenbank (Dalglish, 1997)
- Abb. 3.3.2.1 Frequenzkorrelation des *COL1A1* Sp1 Polymorphismus in Intron 1 und die Klassen der mild/moderaten und schweren Osteogenesis imperfecta
- Abb. 3.3.3.1 Expression des pGL3-Kontroll- und pGL3-Promotorvektors mit den verschiedenen Sp1 Transkriptionsfaktor Polymorphismusallelen von *COL1A1*
- Abb. 3.3.3.1.1 Allelspezifische RT-PCR mit Hilfe des LightCyclers (Realtime PCR) zur quantitativen Messung der Transkriptmenge der Allele des Sp1 SNP in Intron 1 des *COL1A1* Gens
- Abb. 3.3.3.2 Kotransfektion von 293 Zellen mit dem pEGFP-N1 Vektor und dem pGL3 Promotor- bzw. Kontroll-Vektor, welche die 'firefly'-Luziferase als Reportergen enthalten
- Abb. 4.3.2.1 Die Promotorregion des *COL1A1* Gens
- Abb. 4.3.2.2 Veränderungen in der Konsensussequenz des Transkriptionsfaktors Sp1 haben Einfluß auf die Affinität
- Abb. 4.3.2.3 Modell über die Modifikation des Osteogenesis imperfecta Phänotyps im Falle einer erhöhten Expression des *COL1A1* Gens durch das 'T'-Allel
- Abb. 4.3.5.1 Übersicht der polymorphen Vitamin-D-Rezeptor (VDR) Positionen, die in dieser Studie verwendet wurden

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
APS	Ammoniumpersulfat
ADP/ATP	Adenosindiphosphat/Adenosintriphosphat
Amp	Ampicillin, Antibiotikum
<i>ApaI</i>	Restriktionsendonuklease
AS	Aminosäure
<i>BaII</i>	Restriktionsendonuklease
bp	Basenpaare
BMD	<u>b</u> one <u>m</u> ineral <u>d</u> ensity
<i>BsmI</i>	Restriktionsendonuklease
<i>BGN</i>	Biglykan Gen
Bq	Bequerel
BSA	bovine serum albumin
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure (complementary DNA)
CNBr	Cyanbromid
C	Cytosin
Ci	Curie
cM	centi Morgan
<i>COL1A1/COL1A2</i>	Kollagen-TypI Gene
CY5	Fluoreszenzfarbstoff
CSGE	conformation sensitive gel electrophoresis
<i>DCN</i>	Dekoron Gen
ddNTP	ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP = Dideoxynukleotide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	dATP, dTTP, dCTP, dGTP = Desoxynukleotide
DTT	Threo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol (Dithiothreitol)
ECM	extrazelluläre Matrix
EDS VII	Ehlers-Danlos-Syndrom Typ VII
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E.coli	Escherichia coli
FKS	Fetales Kälberserum
<i>FokI</i>	Restriktionsendonuklease
G	Guanin
<i>IGF-I</i>	insulin-like growth factor I
kb	Kilobasenpaare
MEM	Minimal essential medium
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger)
NaCl	Natriumchlorid
<i>NlaIII</i>	Restriktionsendonuklease
OD	optische Dichte
OI	Osteogenesis imperfecta
Oligo(dT)	Oligomer, aus dTTP bestehend
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
poly(A) ⁺ -RNA	siehe mRNA
RFLP	<u>R</u> estriktions <u>f</u> ragment- <u>L</u> ängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm (Upm)	Umdrehungen pro Minute
RT	bei Raumtemperatur
RT-PCR	<u>R</u> everse <u>T</u> ranskriptase PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SE	<u>S</u> odium- <u>E</u> DTA

SNP	single nucleotide polymorphism
SOB	Sophisticated Broth
SSC	standard-saline-citrate
T	Thymin
<i>TaqI</i>	Restriktionsendonuklease
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<i>TGF-β</i>	transforming growth factor β1
TRIS	Hydroxymethylaminomethan
UV	ultraviolettes Licht
ÜN	über Nacht
VDR	Vitamin-D-Rezeptor Gen
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

**Keine große Entdeckung wurde je gemacht,
ohne zuerst eine kühne Vermutung aufzustellen.**

Isaac Newton

1 Einleitung

Die Internationale Nomenklatur konstitutioneller Erkrankungen der Knochen unterteilt die Osteochondroplasien in 32 Gruppen, wobei die OI der Gruppe 23 den Dysplasien mit erniedrigter Knochendichte zugeordnet wird (Skeletal Dysplasia Registry). In vielen Publikationen wurde die OI als „Typ I Kollagenopathie“ bezeichnet (z.B. Rowe und Shapiro 1998); diese Zuordnung ist durch die steigende Zahl von OI Patienten, bei denen man keine Mutation in den Kollagen Typ I Genen findet, nicht mehr so gebräuchlich. Ungeachtet dessen, daß inzwischen mehr als 200 Mutationen in den Typ I Kollagengenen gefunden worden sind, welche zum Osteogenesis imperfecta (OI) Phänotyp führen, bleibt das Verständnis, wie diese Mutationen zu dem sehr variablen Phänotyp führen, bis heute eine Herausforderung. Die Inzidenz wird nach neueren Angaben auf 1:5.000 bis 1:10.000 (bezogen auf alle ethnische Gruppen) geschätzt (Byers und Steiner, 1992). Durch die Sequenzierung des humanen Genoms gelangt die Erforschung menschlicher Erbkrankheiten in ein neues Zeitalter, wodurch sicherlich auch die Patienten mit OI ihren Nutzen haben werden.

1.1 Osteogenesis imperfecta

Klinische Hauptmerkmale einer OI sind gehäufte Knochenbrüche, Skelettdeformierungen, blaue Skleren, Wachstumsretardierung, Wormian bones; Hörverlust und Dentinogenesis imperfecta kommen bei einigen Fällen hinzu. Zunächst gab es nur die Beschreibung einer milden Verlaufsform von Lobstein (1835), die auch als OI tarda bekannt wurde, sowie einer schwer verlaufenden Form bei einem Neugeborenen (Vrolik 1849), welche auch als OI congenita geführt wurde. Auch Skelettfunde aus Ägypten dokumentieren den OI Phänotyp (Gray 1969). In der Online Mendelian Inheritance of Man-Datenbank (OMIM, McKusick) finden sich zahlreiche Einträge für OI (#166200, #166210, #166220, 166230, 166240, 166260, 259410, #259420, 259440).

Klassifizierung nach Sillence (1978):

Bei der OI handelt es sich um eine autosomal dominante Erkrankung, die insbesondere bei den klinisch schweren Formen der OI durch spontane Neumutationen hervorgerufen wird. Autosomal rezessive Erbgänge sind vereinzelt beschrieben, jedoch in keinem Fall molekulargenetisch belegt (Wallis et al., 1993) und bei den dominant vererbten OI Fällen konnte man eine Kopplung zu den Kollagen Typ I Genen demonstrieren (Sykes et al., 1990). Bei sporadischen Fällen wird aufgrund der Möglichkeit einer Keimbahnmosaikbildung ein Wiederholungsrisiko von 7% angegeben (Cole und Dalgleish, 1995). Bisher wurden die OI Patienten in vier Gruppen eingeteilt (Tab.1.1.1). Es gibt jedoch starke Hinweise darauf, daß bei Patienten eines neuklassifizierten Typ V der genetische

Defekt nicht mit Kollagen Typ I Mutationen assoziiert ist wie bei den anderen Formen der OI (Glorieux et al., 2000).

Form	Fraktur-inzidenz	Skelettdeformierung	Skleren	Klinischer Verlauf
I	niedrig	fehlend oder gering	deutlich blau	normales Wachstum, Hörverlust bei 50%, (Typ I B: Dentinogenesis imperfecta)
II	multiple intra-uterine Frakturen	stark ausgeprägt, Femurknochen gestaucht, aufgetriebene Rippen, Platyspondylie	blau	letal, kleinwüchsig
III	hoch	stark ausgeprägt, progressive Deformierung, z.T. popcornartig aufgetriebene Femuren, Epiphysen-cysten	blau bei Geburt, später weiß	Wachstumsretardierung, pulmonale Komplikationen, oft: Dentinogenesis imperfecta und Hörverlust
IV	variabel	variabel	weiß	variabel, oft Dentinogenesis imperfecta, z.T. Hörverlust, dünne Knochen
V	variabel	variabel	weiß	hyperplastische Kallusbildung, irregulärer Kollagenfibrillendurchmesser, Kalzifizierung der interossären Membran, überstreckbare Gelenke wie bei Typ IV, Wachstumsretardierung

Tab. 1.1.1 Die Klassifikation der Osteogenesis imperfecta nach Silience und Rimoin (1978)

Die Einteilung wurde nach Pope et al., 1985; Vetter et al., 1989; Byers, 1990; Byers et al., 1991; Byers and Steiner, 1992; Byers, 1993 und Glorieux et al., 2000 modifiziert. Die Tabelle zeigt zum einfacheren Verständnis eine gekürzte Übersicht.

Eine Mutation in den Kollagen Typ I Genen (*COL1A1* und *COL1A2*) führt meist zum phänotypischen Erscheinungsbild der OI oder z.T. auch der Osteoporose, es kann aber auch ein Ehlers-Danlos-Syndrom Typ VII resultieren. Andererseits können phänotypisch gleiche Erbkrankheiten durch verschiedene Gene verursacht werden (genetische Heterogenität).

Im Laufe der Zeit sind immer mehr Untergruppen der Osteogenesis imperfecta zur besseren Klassifizierung eingeführt worden, weil das phänotypische Erscheinungsbild der OI Patienten sehr heterogen ist (Tsipouras et al., 1984, Willing et al., 1993, Constantinou et al., 1993) und sich die Zuordnung der Patienten oft als schwierig erweist. Die weitere Automatisierung der

Mutationskartierung und die Verbesserung der Methoden der Molekularbiologie wird zeigen, ob eine bessere Klassifikation der OI möglich sein wird.

1.1.1 Molekulare Pathogenese von Osteogenesis imperfecta

OI Typ I resultiert fast ausschließlich aus Mutationen, die zum Verlust der Boten-RNA (mRNA) von einem *COL1A1* Allel führen, was u.a. auch als sogenanntes Nullallel bezeichnet wird. Frameshift und nonsense Mutationen führen zu vorzeitigem Kettenabbruch (engl. protein truncation) durch das Generieren von Stoppcodons (UAG, UAA) (Willing et al., 1996), die die mRNA destabilisieren. Da nur die Hälfte der üblichen Kollagen Typ I Menge hergestellt wird, verändert sich das Verhältnis der Makromoleküle in der Knochenmatrix zueinander, es kann zur Veränderung in der Fibrillenformation kommen und letztendlich wird die Stabilität der kortikalen und trabekulären Knochenanteile gestört. Die physikalischen Eigenschaften solcher Knochen sind verändert, der Gesamtaufbau der Knochen jedoch nicht wesentlich. Es gibt auch Glyzinsubstitutionen bei OI Typ I Patienten.

Andere Mutationen führen zu den OI Typen II bis IV, bei denen die Knochen stark deformiert sind. Im Gegensatz zu den quantitativen Veränderungen bei OI Typ I führen die genetischen Veränderungen bei den anderen OI Typen zu qualitativen und quantitativen Veränderungen des Typ I Kollagens. So können z.B. Mutationen im C-terminalen Ende des Propeptids die Sequenz derart ändern, daß die Kettenzusammenführung (engl. assembly) gestört wird. Finden diese Veränderungen jedoch im tripelhelikalen Teil statt, so wird die Helixfaltung behindert und das wiederum beeinflusst die intra- und extrazelluläre Prozessierung und beeinträchtigt die intermolekularen Interaktionen in der extrazellulären Matrix (ECM). Es wurde weiterhin festgestellt, daß bestimmte Mutationen Stressantworten der Zellen unter Mitwirkung von Chaperonen aktivieren können, was zum Degradieren der abnormalen Proteine durch proteosomale Enzyme führt, die sich in der Zelle angehäuft haben (Satoh et al., 1996, Wilson et al., 1998). Durch solche Selektionsprozesse wird die Fibrillogenese und die Mineralisation der Knochen nachhaltig beeinflusst. Nicht nur die Morphologie und das Wachstum der Knochen sind verändert, sondern auch die Integrität der Knochen.

OI Patienten haben eine Knochenmatrix, die morphologisch unreif erscheint und eine erhöhte Zellzahl aufweist (Smith et al., 1983). Es konnte in einer immunohistochemischen Untersuchung gezeigt werden, daß die verschiedenen Typen der OI eine ähnliche Verteilung aber einen unterschiedlichen Gehalt an interstitiellen Kollagenen in der Knochenmatrix besitzen (Nerlich et al., 1993). So haben Patienten mit OI Typ II Knorpelnester mit Typ II Kollagen und einen signifikant erhöhten Anteil an Typ III Kollagen in der Knochenmatrix. Typ II Kollagen befindet sich

normalerweise nur im Knorpel. Bei OI Typ III und IV fand sich Typ II Kollagen nur in epiphysärem Knorpel, aber Typ III Kollagen befand sich auch in den Knochen, welches sich in der Regel in der Haut oder in fetalen Knochen befindet. Typ V Kollagen befindet sich normalerweise nur perizellulär, aber nicht in der Knochenmatrix selbst. Bei OI Patienten findet es sich sowohl im fetalen als auch im adulten Status, nur bei OI Typ II findet man es fokal. Diese Verteilungsmuster entsprechen denen von fetalen, sich entwickelnden Knochen und demonstrieren die „unreife“ Natur der OI Knochen. Diese Untersuchungen werden interessant bei der Betrachtung von Patienten mit hyperplastischer Kallusbildung (siehe Kap. 4.2.1).

1.2 Kollagen

Kollagen ist das Hauptstrukturprotein der extrazellulären Matrix des Bindegewebes. Die helikalen Domänen der Polypeptidketten der Kollagene besitzen alle ein Gly-X-Y Wiederholungsmotiv. Jeweils drei α -helikale, linkshändige Polypeptidketten falten sich zu einer rechtshändigen Tripelhelix. Neben Einzelkopiegenen, die nur einmal im Genom vorkommen, gibt es Genfamilien, die durch Genverdopplung aus einem Ursprungsgen hervorgegangen sind. Die Kollagengenfamilie umfaßt derzeit 19 Kollagentypen mit 36 bekannten Genen, die über das gesamte Genom verteilt sind (Vuorio und De Crombrughe 1990). Es handelt sich hierbei um eine Multigenfamilie, die durch ihre ausgeprägten Sequenzhomologie definiert wurde. Ein besonderes Merkmal der Kollagene besteht darin, daß die Exons meist aus Einheiten von 54 bp oder einem Vielfachen (108 bp) davon bestehen, seltener 45 bzw. 99 bp (Chu und Prockop, 1993).

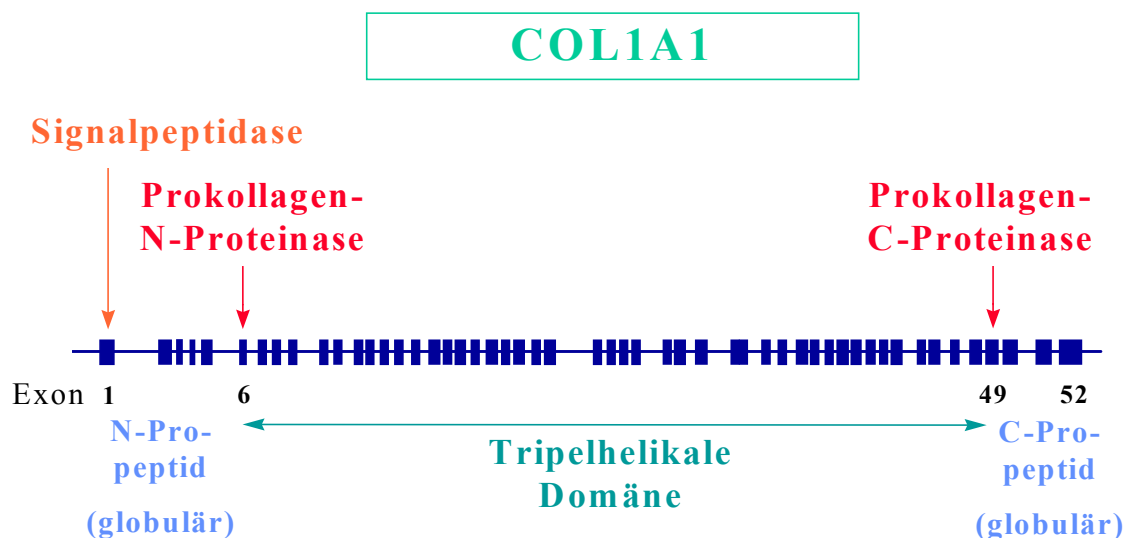


Abb. 1.2.1 Genomische Struktur des *COL1A1* Gens

Während die Exongröße konserviert ist, ist die Größe der Introns sehr variabel (Chu et al., 1984). Das *COL7A1* Gen enthält die größte Anzahl an Exons, die bisher in einem Gen gefunden worden

sind: 118 Exons (Christiano et al., 1994). In Intron 25 von *COL1A1* befindet sich eine Alu-Sequenz, die zirka alle 4 kb im Genom vorkommt und deren genaue Funktion bis heute noch unbekannt ist. Alu-Sequenzen gehören zu den SINEs (short interspersed nuclear elements) und sind kurze hochrepetitive Elemente, die für die Primaten spezifisch sind. Es gibt die Spekulation, daß sie durch ihre hohe Frequenz ungleiche Rekombinationsereignisse fördern und möglicherweise zu phänotypischen Auffälligkeiten führen. Allerdings können dadurch auch Genverdopplungen gefördert werden, was zu dem Konzept führt, daß die Kollagengene durch „exon shuffling“, d.h. durch Vervielfältigung des ursprünglichen Gens und anschließender divergenter Entwicklung, entstanden sind (Li und Graur 1997). Die Kollagenfamilie wird in verschiedene Klassen anhand ihrer Gen- und Proteinstruktur zum einen und ihrer Funktion zum anderen unterteilt: Fibrilläre Kollagene (Typ I, II, III, V und XI), netzwerkbildende Kollagene (Typ IV, VIII und X), FACIT-Kollagene, d.h. Fibrillen-assoziierte Kollagene (fibril-associated collagenes with interrupted triple helices, Typ IX, XII, XIV, XVI, XIX), Kollagene, die perlschnurartige Fibrillen bilden (Typ VI), Kollagene, die Ankerfibrillen zur Basalmembran bilden (Typ VII), Kollagene mit Transmembrandomäne (Typ XIII und XVII) (Prockop und Kivirikko 1995) und weitere Kollagene. Die hohe Ordnungsstruktur der Kollagene ist elektronenmikroskopisch an einem regelmäßigen Bandenmuster sichtbar, das sich alle 67 nm wiederholt (Ramachandran 1988). Das Bandenmuster besteht durch die versetzte Anordnung der Fibrillenmonomere (Tropokollagen) aus Lücken- („gap“) und Überlappungs- („overlap“) Zonen. Betrachtet man diese stark konservierten und hochgeordneten Strukturen, so wird verständlich, daß kleinste Veränderungen wie Punktmutationen zu z.T. schweren phänotypischen Veränderungen führen.

Die Kollagenbiosynthese ist ein sehr komplizierter Prozeß, der in vielen Einzelschritten abläuft (Abb. 1.2.2, Prockop et al., 1990 und Byers 1990). Wichtige modifizierende Enzyme des Translationsprozesses sollen in diesem Zusammenhang kurz erwähnt werden, da sie bei der Betrachtung der bisher ungeklärten, atypischen OI Erkrankungen, wie Patienten mit hyperplastischer Kallusbildung und Brucksyndrom, mitdiskutiert werden. Die Hydroxylierung der Prolinreste in X-Pro-Gly-Positionen erfolgt durch die Prolyl-4-Hydroxylase (EC 1.14.11.2). Die Prolyl-3-Hydroxylase (EC 1.14.11.7) ist für die Hydroxylierung von Pro-4Hyp-Gly-Sequenzfolgen zuständig. 4-Hydroxyprolin hat eine besondere Bedeutung bei der Faltung (engl. assembly) und dem Zusammenhalt der Tripelhelix. Lysylreste werden durch die Lysylhydroxylase (EC 1.14.11.4) mit Hydroxygruppen versehen. Hydroxyllysylreste werden anschließend durch die Enzyme Hydroxyllysyl-Galaktosyltransferase (EC 2.4.1.50) und Hydroxyllysyl-Glukosyltransferase (EC 2.4.1.66) (übertragen die Zucker Galaktose bzw. Glukose) glykosyliert (Kielty et al., 1993).

Während in weichem Bindegewebe Glukosyl-Galaktosyl Hydroxylysin vorherrscht, kommt in Knochen mehr Galaktosyl Hydroxylysin vor.



Abb. 1.2.2 Intra- und extrazelluläre Prozessierung von Typ I Kollagen

Die Quervernetzung der Kollagenfibrillen (Abb. 1.2.2) erfolgt über die Lysyl- und Hydroxylylsylreste durch das Enzym Lysyloxidase (*LOX*, Protein-Lysin 6-oxidase, EC 1.4.3.13), wobei dadurch mechanische Stabilität und Zugfestigkeit erreicht wird. Für die Ausbildung der Tripelhelix sind nicht nur sogenannte Selbstfaltungs-Prozesse (engl. self-assembly) verantwortlich. Der Zusammenbau der Helix erfolgt vom C-terminalen Abschnitt aus, wobei mehrere aufeinanderfolgende Gly-Pro-Hyp-Triplets (Abb. 3.3.1.1) am Ende der Tripelhelix zur Kettenanlagerung und Stabilisierung neben Erkennungsmotiven im globulären C-Terminus beitragen (Kielty et al., 1993).

Kollagen Typ I:

Das Gen *COL1A1* (GenBank NM_000088, OMIM *120150) für die α1-Kette des Kollagen Typ I ist 18 kb lang und liegt in der Chromosomenregion 17q21-q22. Mit seinen 38 kb ist das Gen *COL1A2* (GenBank NM_000089, OMIM *120160), das für die α2(I)-Kette kodiert, wesentlich länger und liegt in der Chromosomenregion 7q21-q22. Die Länge der mRNAs beträgt 6728 bp für *COL1A1* und 5086 bp für *COL1A2*. Beide Gene besitzen 52 Exons, welche durch teilweise sehr große Introns voneinander abgegrenzt sind. Der tripelhelikale Abschnitt wird durch die Exons 6 bis 49 kodiert und umfaßt 1014 Aminosäuren (Tab. 1.2.1, Byers und Steiner, 1992). Es gibt N- und C-terminale globuläre Abschnitte, die durch die Metalloproteasen Prokollagen-N-Proteinase (EC 3.4.24.14) und Prokollagen-C-Proteinase (EC 3.4.24.x) (die Schnittstellen befinden sich jeweils in Exon 6 bzw. 49)

während des Reifungsprozesses extrazellulär abgetrennt werden (Tab. 1.2.1, Chu und Prockop, 1993). Die globulären Propeptide sind für eine erhöhte Löslichkeit des Proteins unter physiologischen Bedingungen verantwortlich. Bei dem Ehlers-Danlos-Syndrom Typ VII kommt es durch Mutation an den Spleißerkennungsstellen in Intron 6 von *COL1A1* oder *COL1A2* dazu, daß der N-terminale Abschnitt in der Polypeptidkette verbleibt und somit der Zusammenbau der Fibrillen in der Zelle erschwert wird (Kielty et al., 1993 und Kuivaniemi et al., 1991). Durch das Aminosäure Motiv KGEAGPQGPRGSE (Positionen 174 bis 186 der Tripel-helix/ Exon 16/17 in *COL1A1*) wird die Dekorinanbindungsstelle vermittelt (Weber et al., 1996). In Exon 27 gibt es ein Element, kodiert von den AS DGEA, an welchem Integrin anbinden kann, das zwischen Actin und *COL1A1* vermittelt (Nishiyama et al., 1994). Solche funktionellen Abschnitte können auch eine Rolle spielen bei bisher ungeklärten Kollagenopathien, bei denen der extrazelluläre Matrixzusammenhalt gestört ist. Nicht nur Kollagen Typ I, sondern alle fibrillenformenden Kollagene haben das konservierte AS Motiv GPVCF in der C-terminalen Domäne (Lui et al., 1996) und das konservierte AS Motiv NIT als Glykosilierungsstelle, wo sich eine β -Faltblattstruktur befindet (Dion et al., 1987). Es gibt acht konservierte Cysteinpositionen im C-terminalen Abschnitt, die durch Disulfidbrückenbildung stabilisierende Funktion einnehmen.

Anzahl der Aminosäuren		
Domäne	pro $\alpha 1(I)$-Kette	pro $\alpha 2(I)$-Kette
N-terminal	161	79
Signalpeptid	22	22
N-Propeptid	139	57
Cysteine im N-Propeptid	10	2
Tripelhelix im N-Propeptid	48	42
Kollagendomäne	1057	1039
N-Telopeptid	17	11
Tripelhelix	1014	1014
C-Telopeptid	26	15
C-terminal		
C-Propeptid	246	247
Kohlenhydratanbindungs- stelle (Exon 51, Asn-Ile-Tyr)	1	1

Tab. 1.2.1 Funktionelle Domänen des humanen Prokollagen Typ I (Bernard et al., 1983, Kuivaniemi et al., 1988 und Tromp et al., 1988)

Regulatorische Elemente:

Die Kollagenexpression und deren Elemente wurden von vielen Arbeitsgruppen bisher eingehend untersucht (Bornstein et al., 1987, Bornstein und McKay 1988, und Rossouw et al., 1987). In der Region zwischen -350 bp bis -300 bp stromaufwärts ist die Konsensussequenz für die

Bindungsstelle des Transkriptionsfaktor NF1 (nuclear factor 1) enthalten (Rossi et al., 1988). Dadurch wird die transkriptionelle Aktivierung des Kollagen Typ I Promotors durch TGF- β gefördert. C-Krox (Kollagen Krox Protein) ist ein Transkriptionsfaktor, der auch im Kollagen Typ I Promotor bindet (Galéra et al., 1994). Ein 41 bp langes Vitamin D response Element (VDRE) befindet sich in *COL1A1* zwischen den Nukleotidpositionen -2256 bp bis -2216 bp (Pavlin et al., 1994). Stromaufwärts (-29 bp) befindet sich im *COL1A1* Gen die TATA Box, das *COL1A2* Gen besitzt keine. Beide Gene haben eine CCAAT Box, in den Positionen -100 bp in *COL1A1* und -82 bp in *COL1A2* beginnend, sowie CT reiche Sequenzen, was ihnen S1 Nuklease und DNase Hypersensitivität verleiht. *COL1A1* wird im folgenden Abschnitt AT reich, möglich ist eine Änderung der Tertiärstruktur durch Basenpaarung zwischen den zwei Regionen. In Intron 1 sind einige Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Sp1, sowie stimulatorische und inhibitorische Elemente gefunden worden. Beide Kollagen Typ I Gene haben einen Enhancer im ersten Intron. Die doppelte mRNA Menge von *COL1A1* Transkript zu *COL1A2* Transkript (Vuust et al., 1985) wird durch bestimmte Faktoren gesteuert, wobei vermutet wird, daß Ascorbinsäure bei der Koordination der Transkriptionskontrolle mitwirkt.

Genregulation

Die Kollagen Typ I Gene gehören zu den Einzelkopiegenen und ihre Expression unterscheidet sich in weichem Bindegewebe von Knochenbindegewebe. Eine unterschiedliche Expression der Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Typ I Kollagen produzierenden Zellen wurde gefunden (Bedalov et al., 1995 und Rossert et al., 1995). In Zellkulturexperimenten hat man herausgefunden, daß die Kollagensynthese z.B. erhöht wird durch Heparin, organisches Phosphat und Interleukin-4, während eine Erniedrigung der Kollagen Typ I Produktion durch Prostaglandin E_2 , 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 , Kortisol, Para-thyroidhormon (PTH), epidermalem Wachstumsfaktor (EGF), dem Basis-Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) und IL-10 stattfand. Das Anbinden des VDR inhibiert die Expression. Die Herausnahme des VDRE (engl. vitamin D response element) aus dem Promotor konnte den inhibierenden Effekt nicht vollständig stoppen, es müssen also weitere in *cis* und/oder in *trans* wirkende Faktoren beteiligt sein. Je nachdem, in welcher Konzentration und zu welchem Zellkulturstadium Dexamethason zugegeben wird, erhöht oder erniedrigt es die Kollagenproduktion und die Menge anderer Gene.

Es gibt eine transgene MOV-13 Maus, bei der durch Insertion viraler DNA in das erste Intron das *COL1A1* Gen stillgelegt wurde (Bonadio et al., 1990). Die verbleibenden $\alpha 2(I)$ -Ketten sind nicht in der Lage, eine stabile Tripelhelix zu bilden, während $\alpha 1(I)$ -Ketten Homotrimere bilden können. Diese Mäuse sterben in der Schwangerschaft. Transgene Mäuse wurden entwickelt durch Einführen

von Mutationen (z.B. Knock in Maus mit p.G349C mit OI Typ IV, Forlino et al., 1999) bzw. Ausschalten des *COL1A2* Gens, um Modellorganismen zu haben, an denen Kollagen Typ I und Osteogenesis imperfecta besser untersucht werden können. Es zeigte sich, daß die Mäuse ein dem Menschen sehr ähnliches klinisches Erscheinungsbild zeigen.

1.3 Sonderformen der OI: Brucksyndrom und hyperplastischer Kallus

Bisher ging man davon aus, daß das Brucksyndrom und die Erkrankung bei Patienten mit hyperplastischer Kallusbildung ebenfalls zur Osteogenesis imperfecta allelisch sind. Das Brucksyndrom ist in der Mendelian Inheritance of Man-Datenbank unter dem Stichwort: Osteogenesis imperfecta mit kongenitalen Gelenkkontrakturen (MIM 259450) zu finden.

Brucksyndrom:

Zur klinischen Synopsis ist zu bemerken, daß die Patienten kongenitale Kontrakturen an den Knie-, Knöchel- und Fußgelenken aufweisen, Pterygia an Ellbogen- und Kniegelenken, Klumpfußbildung, Arthrogryposis (Versteifung eines Gelenks in Beugestellung), starke Frakturneigung schon bei minimalen Traumata, Wormian bones (multiple, unvollständig mineralisierte Schaltknochen im Schädelbereich, benannt nach Olaf Worm), meist weiße Skleren und normale Zahnbildung, postnatalen Kleinwuchs und progressive Kyphoskoliose zeigen. Die Intelligenz ist normal und die Hörfähigkeit ist nicht beeinträchtigt. Es liegen keine Hautveränderungen oder Beeinträchtigungen an inneren Organen vor (McPherson und Clemens 1997).

Hyperplastischer Kallus:

Nach detaillierter Analyse der Knochenhistologie und Histomorphometrie wurde die Sillence Klassifikation (1978) erweitert, indem Patienten mit hyperplastischer Kallusbildung als OI Typ V klassifiziert werden, statt wie früher dem sehr variablen OI Typ IV zugeordnet zu werden. Durch das Auftreten eines hypertrophen Kallus, einer frühen Verknöcherung der interossären Membran der Vorderarme, sowie durch die Tatsache, daß keine Mutation in den Kollagen Typ I Genen gefunden werden konnte, wurde die Bildung dieser neuen Untergruppe veranlaßt. Als Hyperplastischer Kallus wird ein überschießendes Wachstum von neuer Knochensubstanz bezeichnet. Bei einem in dieser Arbeit untersuchten Patienten (K23) mit hyperplastischer Kallusbildung fand sich elektronenmikroskopisch ein verändertes Kollagen Typ I (Stöss 1993), was eine Mutation in den Kollagen Typ I Genen nahelegte. Das Auftreten einer hypertrophen Kallusbildung kann ein- oder mehr-malig erfolgen, was die Klassifizierung der Patienten erschwert.

1.4 Determinanten der Knochenmasse

Bisher ist keine eindeutige Genotyp-Phänotyp-Korrelationen gelungen, welche prog-nostische Aussagen über den Krankheitsverlauf erlauben. Die OI ist eine heterogene Erkrankung, die sowohl intrafamiliäre Variabilität, als auch unterschiedliche Phänotypen bei nicht verwandten Individuen mit gleicher Mutation zeigt. Ein besonderes Augenmerk ist also auf den genetischen Hintergrund zu werfen, was im Zuge der DNA-Chiptechnologie in Zukunft begünstigt wird. Es stellt sich die Frage, ob es genetische Faktoren und/oder Umweltfaktoren gibt, die das Krankheitsbild beeinflussen. Daher ist es naheliegend, genetische Marker zu untersuchen, bei denen z.B. ein Zusammenhang mit Osteoporose anzunehmen ist und die mit einem OI-Phänotyp mit klinisch schwerer Ausprägung assoziiert sein könnten. Bei OI Patienten ist nicht nur der Stoffwechsel von Typ I Kollagen, sondern auch von weiteren Matrixglykoproteinen (Biglykan, Dekorin, Osteonektin) beeinträchtigt (Fedarko et al., 1992).

Die Knochenmasse (engl. peak bone mass) ist zu einem hohen Anteil ($\geq 80\%$) genetisch determiniert (Krall und Dawson-Hughes et al., 1993 und Jouanny et al., 1995). Die Knochen unterliegen einem ständigen Umbau (engl. remodeling). Beim gesunden Knochen halten sich dabei Proliferation und Resorption die Waage. Wichtige Regulatoren des Knochenaufbaus und -abbaus sind Zytokine, die mit Hormonen, wie z.B. Geschlechtshormonen (Östrogenen, Progesteronen, Androgenen) und Parathormon (PTH), sowie Vitaminen wie z.B. 1α -25 Dihydroxy-Vitamin D3 im Zusammenspiel stehen. Osteoblastenproliferation fördernd wirken beispielsweise die Wachstumsfaktoren TGF- β (Robey et al., 1987), IGF und PDGF. Die Osteoklastenaktivität stimulierend sind z.B. die Interleukine IL-1 (Jimi et al., 1995) und IL-6 (Roodman 1995) sowie TNF- β . Neben Vitamin D und A, PTH, Calcitonin, Sexsteroidhormone, Glucocorticoide, Thyroidhormone, Insulin und insulinähnliche Wachstumsfaktoren, die systemisch auf die Knochenbildung und den Knochenstoffwechsel wirken, gibt es eine Reihe von lokal wirkenden Faktoren, wie z.B. Prostaglandine, Wachstumsfaktoren, wie IGF-I und IGF-II, TNF- α und TNF- β (Tumornekrosefaktoren), EGF (Epidermal Growth Factor), TGF- α und TGF- β (Transforming Growth Factor), die Interleukine IL-1, IL-3 und IL-6, PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), β 2-Mikroglobulin (Bone Derived Growth Factor: BDGF) und CSFs (Colony-Stimulating Factors) sowie Gamma Interferon (IFN- γ). Die Knochenhomöostase ist ein sehr komplizierter Prozeß, deshalb sollten in vitro Untersuchungen sehr kritisch betrachtet werden. So wirkt INF- γ (Interferon- γ) in vivo resorptionsfördernd, in vitro dagegen den Knochenaufbau stimulierend.

In der Literatur werden eine ganze Reihe von Kandidatengenen diskutiert, welche die Osteoporose beeinflussen können (VDR: Arai et al., 1997, Eisman 1995, Cooper und Umbach 1996, Gross et al., 1996, Fleet et al., 1995, Harris et al., 1997, Kiel et al., 1997, McClure et al., 1997, Morrison et al., 1992 und 1994, Riggs et al., 1995, Sainz et al., 1997, Ferrari et al., 1998, Gennari et al., 1999, IL-6: Murray et al., 1997, IL-1R Antagonist: Langdahl et al., 2000, Osteokalzin: Dohi et al., 1998, ER: Deng et al., 1999, TGF- β 1: Grainger et al., 1999 APOE: Cauley et al., 1999, IGF-I: Rosen et al., 1998, TNFR2: Spotila et al., 2000, PTH: Hosoi et al., 1999, COL1A1: Garnero et al., 1998, Hustmyer et al., 1999, Uitterlinden et al., 1998, Langdahl et al., 1998).

Genbezeichnung	Gen	Osteoblasten Proliferation	Osteoblasten Differenzierung	Matrix Synthese	Knochen-resorption
Insulin-like growth factor-I	<i>IGF-I</i>	↑	↑	↑	
Transforming growth factor-β1, β2	<i>TGFB1, TGFB2</i>	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓

Tab. 1.4.1 Differenzierte Darstellung der Wirkweise von IGF-I, IL-1 und TGF- β
(Dickson 1993)

IGF-I (12q22-q24.1, OMIM *147440, Tab. 1.4.1) stimuliert die Kollagensynthese in Knochen und Periosteum, wobei Cortisol diesen Effekt noch potenzieren kann (Canalis 1980). IGF-I stimuliert die Knochenzellmitogenese sowie die Kollagensynthese in Knochenkulturen (Canalis 1980). IGF-I wird von den Knochenzellen selbst produziert und in Gegenwart von Wachstumshormonen wird die Syntheserate noch erhöht (Stracke et al., 1984).

TGF- β (*TGFB1*, 19q13.1, OMIM *190180, Tab. 1.4.1) kann sowohl die Knochensynthese als auch die -resorption fördern, je nachdem, welche Faktoren überwiegend vorkommen. So wird bei Ratten die Kollagensynthese und die Alkalische Phosphatase stimuliert (Pfeilschifter et al., 1987), bei Mäusen die Alkalische Phosphatase jedoch gehemmt (Elford 1987). Die endogene TGF- β Bildung scheint die Knochenresorption bei Mäusen und Ratten zu fördern. Knochenresorbierende Agenzien, wie PTH, Vitamin D und IL-1 stimulieren die TGF- β Produktion, während Calcitonin, das die Knochenresorption inhibiert, die TGF- β Spiegel von Mauszellen in Kultur erniedrigt (Pfeilschifter und Mundy 1987). Dagegen kann exogenes TGF- β die zelluläre Antwort auf andere Agonisten verändern (Harris et al., 1994).

Biglykan (*BGN*, Xq28, OMIM *301870): Bis zu einem Drittel bestehen Knochen aus organischer Substanz, wobei Kollagen mit über 90% überwiegt. Der verbleibende Anteil (10%) setzt sich aus verschiedenen nicht-kollagenen Proteinen, Proteoglykanen - zu denen auch das *BGN* Gen gehört - Phospholipiden, Zitraten u.a. zusammen. Nicht-kollagene Proteine beeinflussen die lokalen Mechanismen der Knochenkalzifizierung (Boskey 1989). Bei Mäusen mit Biglykandefizienz konnte eine verminderte Wachstumsrate festgestellt werden (Xu et al., 1998). Die Proteoglykane Dekorin (*DCN*, 12q23, OMIM *125255) und Biglykan zeichnen sich durch große genomische Sequenzhomologie und einer sehr ähnlichen Proteinstruktur aus. In weichem Bindegewebe und in Knochenzellkulturen haben Dekorin und Biglykan Dermatan-sulfatseitenketten, während beide in Knochen Chondroitin-sulfatseitenketten tragen. Dekorin bindet an das d-Band der Kollagen-Tripelhelix (Scott et al., 1981). Die Kollagenfibrillogenese wird durch die Oberflächenbindung des Dekorin beeinflusst, indem die Verbreiterung der Fibrillen begrenzt wird (Vogel et al., 1984 und Schönherr et al., 1995). Eine Interaktion mit TGF- β wurde gezeigt. Auch Biglykan bindet TGF- β und Kollagen Typ I Fibrillen (Schönherr et al., 1995). Durch die strukturellen und funktionellen Eigenschaften von Biglykan und Dekorin läßt sich eine ähnliche Rolle der Proteoglykane vermuten, gesicherte Erkenntnisse über die genaue Funktion von Biglykan gibt es allerdings noch nicht. Es wurden transgene Mäuse hergestellt um mehr über die Funktion von Dekorin und Biglykan herauszufinden. Dabei zeigte die *DCN*-Knock out-Maus eine normale Knochenmassebildung, die *BGN*-Knock out-Maus einen Knochenmasseverlust und die Doppel-Knock out-Maus einen größeren Knochenmasseverlust, was darauf schließen läßt, daß sich die Proteoglykane gegenseitig auch ersetzen können und was ihre weitere Funktionsuntersuchung erschwert.

COL1A1: Nach aktuellen Literaturdaten ist der derzeit beste Kandidat für die Untersuchung der Beeinflussung der Heterogenität bei OI ein Polymorphismus in Intron 1 vom *COL1A1* Gen, der sich in der Konsensussequenz für die Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors Sp1 befindet. Zwillingsstudien zeigen, daß der Typ I Kollagen Metabolismus mit der genetischen Regulation der Knochendichte korreliert (Tokita et al., 1994). Bei postmenopausalen Frauen wurde in einer Studie ein G→T Polymorphismus in der oben beschriebenen Region gefunden, der signifikant mit der Knochendichte und osteoporotischen Frakturen korreliert ist (Grant et al., 1996). G/T Heterozygote haben eine signifikant niedrigere Knochendichte als G/G Homozygote. Am niedrigsten ist die Knochendichte bei den T/T Homozygoten. Dieser Polymorphismus wird als klinisch relevanter prognostischer Marker für Osteoporose angesehen. Die genaue Ursache dieser Assoziation ist nicht geklärt, es gibt aber eine Studie, die erste Hinweise auf den Wirkmechanismus geliefert hat. Mit Hilfe der Gel-shift-assay-Analyse wurde eine 1,8 fache Erhöhung der Transkriptionsaktivität des 'T'-Allels im Vergleich zum 'G'-Allel gefunden und mit allel-spezifischer RT-PCR eine dreifache

Erhöhung der Transkripte des 'T'-Allels aus Knochengewebe (Hobson 1998). Das Verhältnis der Kollagenketten $\alpha 1(I) : \alpha 2(I)$ befand sich beim 'T'-Allel in einem 2,4:1 stöchiometrischen Verhältnis (im Vergleich 'G'-Allel 1,99:1, Hobson 1998). Dies könnte einen Teil der intrafamiliären Variabilität bei Osteogenesis imperfecta erklären.

VDR: Im Promotorbereich von *COL1A1* befindet sich ein VDRE (Vitamin D response element) und da Typ I Kollagen das Hauptstrukturprotein im Knochen ist wurden Polymorphismen im Vitamin D Rezeptor Gen (*VDR*) bisher gut untersucht. In manchen Studiengruppen sind diverse *VDR* Polymorphismen assoziiert mit bedeutenden Unterschieden in der Knochenmineraldichte (engl. bone mineral density: BMD). Das *VDR* Gen hat einen großen Einfluß auf den Knochenstoffwechsel wegen der Steuerung der Kalziumhomöostase, die entscheidenden Einfluß auf die Mineralisation und somit auf die Festigkeit der Knochen hat. Bei den untersuchten RFLPs (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen) war z.B. das 'B'-Allel mit einer niedrigeren Knochendichte assoziiert (Morrison et al., 1994). Die auf diesem Gebiet publizierten Arbeiten sind jedoch nicht kongruent (Peacock 1995, Garnero et al., 1996, Hustmyer et al., 1994 und Lim et al., 1995) und es stellt sich die Frage, inwieweit Assoziationsstudien solche Fragestellungen hinreichend klären können. Probleme in diesem Zusammenhang sind die Auswahl der Kontrollgruppe, die Gruppengröße, etc. So lassen sich die Arbeiten nur schwer miteinander vergleichen. Neben technischen Problemen wie einer akkuraten Meßtechnik der Knochendichte gibt es auch genetische Ursachen, z.B. die ethnische Zusammensetzung des untersuchten Kollektivs, welche die Signifikanz einer Korrelation beeinflussen (Ingles et al., 1997).

1.4.1 Modifizierende Gene beim Menschen: Strategien zu ihrer Identifizierung

Was ist ein Modifikator Locus bzw. modifizierendes Gen? Man kann ihn als vererbte genetische Variation definieren, die einem Mendelschen Erbgang folgt und zu qualitativen oder quantitativen Unterschieden des Phänotyps führt (Houlston et al., 1998). Diese Definition schließt auch Gene ein, bei denen die Expression des Krankheitsallels nicht zu einer Manifestation im Krankheitsbild führt. Für komplexe genetische Erkrankungen gilt dieselbe Definition, allerdings sollten Gene, die zu einer Risikoerhöhung für das Auftreten einer Krankheit beitragen, besser als Krankheits-Prädispositionsloci anstatt als Modifikatoren bezeichnet werden, auch wenn sie einen zusätzlichen additiven Effekt auf den Phänotyp haben. Modifikatoren haben bei komplexen Erkrankungen keinen qualitativen Effekt auf den grundsätzlichen Krankheitsphänotyp, wohl aber auf Subphänotypen, wie z.B. die Entwicklung einer Nephropathie bei IDDM (insulin dependent diabetes mellitus).

Eine ganze Reihe von genetischen Erkrankungen zeigen eine inter- und intrafamiliäre Variabilität. Unterschiedliche exogene und endogene Ursachen werden diskutiert, wie z.B.: Umweltfaktoren, modifizierende Gene und genetisches Imprinting. Eine signifikante Variation des Phänotyps hat man bei Inzuchtstämmen transgener Mäuse gefunden (Pereira et al., 1994), was auch einen Hinweis auf die Bedeutung des genetischen Hintergrunds liefert. Es gibt Hinweise, daß die Expression bestimmter Gene unter der Kontrolle von modifizierenden Genen (z.B. *BRCA1* und *H-ras*) steht. Solche Modifikations-Loci können z.B. durch Mausmodelle charakterisiert werden. Alternative Methoden um Modifikatoren zu identifizieren sind die LOH-Methode (engl. loss of heterozygosity), die sib pair-Methode und die Kopplungsanalyse (engl. linkage analysis). Die mögliche Rolle und der resultierende Effekt auf die Variation eines modifizierenden Gens kann entweder in einer kontrollierten Fallstudie (engl. case-control) oder, wenn elterliche DNA verfügbar ist, mit dem Transmissions-Disequilibrium-Test (Ewens et al., 1995) geprüft werden. Wenn die Ursachen der Erkrankung jedoch nicht klar sind, ist dieser Test nicht anwendbar. Da für die vorliegende Dissertation nur die DNA der betroffenen OI Kinder zur Verfügung stand, wurde die Methode der kontrollierten Fallstudie verwendet.

Modifizierende Gene können auf sehr verschiedenem Wege wirken:

1. zell-, gewebespezifisch oder systemisch
2. qualitativ oder quantitativ auf Proteinebene oder der klinischen Phänotypebene
3. spezifisch oder unspezifisch auf die Pathogenese
4. direkte Wirkung oder eine Aktivierung erfordernd z.B. durch eine somatische Mutation oder noch unbekannte Umweltbedingungen

1.5 Fragestellung

Trotz intensiver Bemühungen, die molekulare Pathogenese der Osteogenesis imperfecta vollständig aufzuklären, ist man bei dem Verständnis der Erkrankung zwar weiter gekommen, aber genaue Genotyp-Phänotyp-Korrelationen sind nach wie vor nicht möglich. Mit dieser Dissertation soll ein Beitrag zur Untersuchung der molekulargenetischen Ursachen für die klinische Heterogenität der Osteogenesis imperfecta geleistet werden.

Die Etablierung eines sensitiven und effizienten Mutationsscreeningverfahrens ist notwendig, da die Kenntnis der Mutation eines Patienten eine wichtige Voraussetzung für die weitere Erforschung der großen Heterogenität der Erkrankung oder bei der Entwicklung gentherapeutischer Ansätze darstellt. Die klinische Heterogenität variiert von intrauterinem Fruchttod bis zu lebenslanger milder

Knochenbrüchigkeit. Bei einem bereits klinisch und biochemisch gut untersuchten Patientenkollektiv sollen die Mutationen durch automatische Sequenzierung erfaßt werden. Die Etablierung des Systems soll in der Weise vonstatten gehen, daß eine spätere Übernahme in eine routinemäßige Diagnostik möglich ist. Bisher ging man davon aus, daß *COL1A1* und *COL1A2* die Hauptkandidatengene für die Mutationssuche darstellen (Sykes et al., 1986), da man bisher bei zirka 82% der Patienten mit OI in einem der beiden Gene eine Mutation gefunden hat (Prockop 1999). Fast jeder Patient hat seine „private“ Mutation, deshalb müssen beide Gene molekularbiologisch untersucht werden.

Aufgrund der klinischen Symptomatik und bei einigen Patienten auch aufgrund der proteinchemischen Daten war zu erwarten, daß Patienten mit Brucksyndrom oder Osteogenesis imperfecta (OI) Typ V mit hypertropher Kallusbildung auch Mutationen in den Kollagen Typ I Genen tragen. Die Sequenzierung der *COL1A1* und *COL1A2* Gene soll weiteren Aufschluß über die molekularen Grundlagen aufzeigen. Weiterhin gibt es Hinweise, daß bei Patienten mit OI Typ V eine Veränderung an Komponenten der extrazellulären Matrix stattgefunden hat, die die Organisation der Kollagenfibrillen mitbeeinflussen (Glorieux et al., 2000). Aus diesem Grund ist auch eine Untersuchung des Dekorings bei Patienten mit hypertropher Kallusbildung wichtig.

Zum einen gibt es intrafamiliäre Variabilität und andererseits existieren nicht-verwandte Patienten mit identischen Mutationen aber mit unterschiedlichem Phänotyp. Diese Tatsache führt zur Postulierung von Umwelt- und/oder anderen modifizierenden genetischen Faktoren der OI. Die Untersuchung von einigen, den Knochenstoffwechsel beeinflussenden Genen, soll Informationen über einen möglichen modifizierenden Einfluß auf die OI liefern. Dies soll im Rahmen des in dieser Arbeit möglichen Umfangs mit Hilfe von Assoziationsstudien geschehen. Mögliche Kandidaten für modifizierende Gene bei der OI werden in funktionellen Untersuchungen anschließend in vitro getestet durch die Klonierung des relevanten Abschnitts des Kandidatengens in ein eukaryontisches Expressionsplasmid und anschließender Quantifizierung der Expression dieses Konstruktes in humanen Zellen.

Schon lange ist u.a. durch elektronenmikroskopische Aufnahmen die hohe Ordnungsstruktur der Kollagene bekannt. Nicht nur ihr tripelhelikaler Aufbau verleiht ihnen hohe mechanische Stabilität, es ist vor allem das einfache, sich periodisch wiederholende Aminosäuresequenzmotiv Gly-X-Y. Dabei sind die Positionen X und Y häufig durch zum einen Prolin bzw. Hydroxyprolin und weiterhin oft durch die Aminosäuren Lysin bzw. Hydroxylysin besetzt. Der Aminosäure Glyzin, die als einzige Aminosäure keine Seitenkette besitzt, kommt eine Schlüsselfunktion zu. Da sie an jeder

dritten Position in der Tripelhelix vorkommt, erlaubt sie die engst mögliche Windung der Kollagenhelices. Die theoretische Beurteilung der Molekülstabilitäten der $\alpha 1(I)$ - und $\alpha 2(I)$ -Ketten und deren Beziehung zur Lokalisation aller bisher beschriebenen Mutationen (Kollagen-Mutationsdatenbank, Dalglish 1997, 1998) soll weitere Informationen über die molekulare Pathogenese und die Heterogenität der OI liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patienten

- **Patienten für das OI Mutationsscreening (Typ I-V):**

K3, K4, K5, K6, K11, K15, K32, K27, K29, K31, K46, K50, K51, K52, K53, K54, K55, K56, K58, K60, K66

Aus der Ulmer OI-Zellbank standen außer Zellen von OI Patienten mit Typ I bis IV auch Zellen von OI Typ V Patienten mit hyperplastischer Kallusbildung (K23 und K24) sowie Zellen von Patienten mit Brucksyndrom (K21 und K22) und Osteoporose zur Verfügung. Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen der Patienten, deren Mutationen im Rahmen dieser Arbeit gefunden und erörtert werden, sind bereits publiziert worden (Brenner et al., 1990).

- **OI Typ I Patienten für das Nullmutationsscreening (n=22):**

K5, K7, K8, K9, K20, K29, K31, K33, K36, K37, K42, K44, K45, K57, K65, K70, K71, K72, K73, K75, K89, K91

- **Assoziationsstudien:**

Zellen von 72 nicht verwandten OI Patienten aus der Ulmer Zellbank und Zellen einer Kontrollgruppe von 100 ebenfalls nicht verwandter Probanden kaukasischer Herkunft wurden verwendet.

- **Untersuchung der Expression der Heterozygoten des Sp1 Transkriptionsfaktor-bindungsstellenpolymorphismus in Intron 1 vom *COL1A1* Gen:**

K30 (Kontrolle für die Standardmeßreihe), K20, K21, K24, K29, K37, K46, K50, K54, K58, K60, K66, K75

2.1.2 Chemikalien

Acrylamide/Bis 30% (19:1, 5% C)	Biorad, Hercules, München
Acrylamide/Bis 30% (29:1)	Biorad, Hercules, München
Agarose MEE0 (Standardanwendung)	Roth, Karlsruhe
Agarose Nu Sieve (3:1)	FMC Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumpersulfat	Fluka, Buchs
Ampicillin	Sigma, München
Bacto-Agar	Difco, Augsburg
Bacto-Tryptone	Difco, Augsburg
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bindesilan plus one	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Borsäure	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL

Bromphenolblau	Sigma, München
DEAE Sephacel	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
7-Deaza-GTP (c ⁷ dGTP)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
DEPC-H ₂ O (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, München
Dimethylformamid	Fluka, Buchs
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, München
DOTAP	Roche, Mannheim
dNTP Polymerization Mix	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Boehringer, Mannheim
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ethylene glycol	Sigma, St. Louis, MO, USA
Formamid	Fluka, Buchs
Geneticin (G418, Neomycin)	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethane sulfonic acid])	Sigma, München
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactosid)	Boehringer, Mannheim
Kanamycin	Biochrom, Berlin
LongRanger™	FMC, Rockland, ME, USA
NF-Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Radionuklid α ³² P-dATP (3000 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Taurin	USB, Cleveland, Ohio, USA
TEMED (plus one™)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
TMAC (Tetramethylammoniumchloride)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Tween 20	Sigma, München
Xylencyanol FF	Serva, Heidelberg
Yeast-Extract	Difco, Augsburg
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid)	Roth, Karlsruhe

2.1.3 Primer, PCR-Bedingungen und Hybridisierungs sonden

Primer	Verwen- dungszweck	Länge	Bemerkung zur Verwendung	Modifi- kation	PCR- Reaktions- bedingungen	Sequenz
11F14901I 11R18461I	COL1A1 Intron 1	18 mer 26 mer			2 mM MgCl ₂ 65°C	5' GGG AAG GGG GTG CGG AGC 3' 5' CAA TGC CTC CAG ATC ACT TTT AGC CA 3'
11F17671I 11R21201I	COL1A1 Intron 1	23 mer 20 mer			2 mM MgCl ₂ 71°C	5' TTG CTT AGC GTT GCC CGA CAC CT 3' 5' ATC GGG AGG GCA GGC TCG TG 3'
11F15021IS	COL1A1 Intron 1	17 mer	Sequenzierung	CY5	64°C	5' GGA GCG TGG GCG GGT GG 3'
11F17781IS	COL1A1 Intron 1	19 mer	Sequenzierung	CY5	61°C	5' CGA CAC CTA GTG GCC GTC T 3'
11R18371IS	COL1A1 Intron 1	23 mer	Sequenzierung	CY5	61°C	5' ATC ACT TTT AGC CAA AGA ACC AA 3'
11R21101IS	COL1A1 Intron 1	18 mer	Sequenzierung	CY5	64°C	5' GGC TCG TGG GGA GTG GCT 3'
12F14112Cy5 12F14112NM13opt 12R14745NM13optrev (Pepe 1993)	(ACT) _n VNTR COL1A2	18 mer 37 mer 41 mer	Segregationsanalyse	CY5	1,5 mM MgCl ₂ 59°C	5' CTT GCC CAA AGT CAC ACA 3' 5' GGT AAC GCC AGG GTT TTC CCT TGC CCA AAG TCA CAC A 3' 5' GAA ACA GCT ATG ACC ATG CCA ATC TAT ATT CTT ATC CTG AG 3'
12FPvu 12RPvu (Kuivaniemi et al., 1988)	COL1A2 RFLP	27 mer 30 mer	Segregationsanalyse		1,5 mM MgCl ₂ 64°C	5' GGG ATC CTC GGC CCC GCT GGA AAA GAA 3' 5' CCG AAT TCA CCT TTA TCA CCG TTT TTG CCA 3'
11F3UTR 11R3UTR (Nuytinck et al., 1998)	COL1A1 4 bp In- sertion 3'UTR	20 mer 20 mer	Nullmutations- screening	CY5	1,5 mM MgCl ₂ 60°C	5' CCT TTC TGC TCC TTT CTC CA 3' 5' AGC AAC ACA GTT ACA CAA GG 3'
11FMnl 11RMnl (Sokolov et al., 1991)	COL1A1/RFLP	20 mer 28 mer	Nullmutations- screening		1,5 mM MgCl ₂ 55°C	5' AGA CCA GGA ATT CGG CTT CG 3' 5' TTG GAT CCA AGG TTG AAT GCA CTT TTG G 3'
11FRsa 11RRsa (Cohn und Zhang, 1990)	COL1A1/RFLP	25 mer 25 mer	Segregationsanalyse		1,5 mM MgCl ₂ 60°C	5' GAA ACT CTC ACA TAC CCT TCA CAG T 3' 5' ACT AGA GAC ATG ATG ATT AAA TGC A 3'
11FP1841Sp1KpnI 11RP2047Sp1BgIII	COL1A1 Intron1	40 mer 30 mer	Klonierung, KpnI und BgIII Restriktion		1,5 mM MgCl ₂ 62°C	5' GGG GTA CCC CTA ACT TCT GGA CTA TTT GCG GAC TTT TTG G 3' 5' GAA GAT CTT CGT CCA GCC CTC ATC CTG GCC 3'

Primer	Verwendungs- zweck	Länge	Bemerkung zur Verwendung	Modifi- kation	PCR- Reaktions- bedingungen	Sequenz
11FP1841Sp1 11RP2047Sp1 (Grant et al., 1996)	COL1A1 Intron1	30 mer 20 mer	<i>Bal</i> I Restriktion, mismatch PCR		1,5 mM MgCl ₂ 62°C	5' TAA CTT CTG GAC TAT TTG CGG ACT TTT TGG 3' 5' GTCCAGCCCTCATCCTTGGCC 3'
11FSp1G/T 11RSp1G-Allel	COL1A1 Intron1 Sp1 G-Allel	26 mer 21 mer	allelspezif. PCR Lightcycler		4 mM MgCl ₂ 65°C	5' TAA AAG TGA CCT GGA GGC ATT GGC TG 3' 5' GTC CAT CCC TCA TCC CGC CCC 3'
11FSp1G/T 11RSp1T-Allel	COL1A1 Intron1 Sp1 T-Allel	26 mer 21 mer	allelspezif. PCR Lightcycler		4 mM MgCl ₂ 65°C	5' TAA AAG TGA CCT GGA GGC ATT GGC TG 3' 5' GTC CAT CCC TCA TCC CGC CCA 3'
COL1A1forw COL1A1rew	COL1A1 5'UTR bis 3'UTR	24 mer 25 mer	gesamtes Gen			5' CCT ACC CAC TGG TTA GCC CAC GCC 3' 5' GGG AAA GGG CAG GAA TGG AAG GCA A 3'
D17S122for D17S122rev	Chromosom 17p12	25 mer 22 mer	Mikrosatellitenmarker Dinukleotidrepeat		1,5 mM MgCl ₂ 63°C	5' CAG AAC CAC AAA ATG TCT TGC ATT C 3' 5' GGC CAG ACA GAC CAG GCT CTG C 3'
D17S1294forCY5 D17S1294rev	Chromosom 17p12	20 mer 25 mer	Mikrosatellitenmarker Tetranukleotidrepeat	CY5	1,5 mM MgCl ₂ 58°C	5' TGG CAT GCA ATT GTA GTC TC 3' 5' TTC TTT CCT TAC TAA GTT GAG AAC G 3'
D17S1843for D17S1843rev	Chromosom 17p12	22 mer 18 mer	Mikrosatellitenmarker Dinukleotidrepeat		1,5 mM MgCl ₂ 57°C	5' AAT TCA AAG GCT AAA AGC AAA C 3' 5' GAG AAT CAC CTG AAC CCG 3'
D17S1857for D17S1857rev	Chromosom 17p12	20 mer 23 mer	Mikrosatellitenmarker Dinukleotidrepeat		1,5 mM MgCl ₂ 60°C	5' TGC ACA GGC CAA TTC CTT AC 3' 5' TGC CTA AAC TGC TTT CAG GTG AG 3'
D17S2196for D17S2196revCY5	Chromosom 17p12	25 mer 25 mer	Mikrosatellitenmarker Tetranukleotidrepeat	CY5	1,5 mM MgCl ₂ 54°C	5' CCA ACA TCT AGA ATT AAT CAG AAT C 3' 5' ATA TTT CAA TAT TGT AAC CAG TCC C 3'
D17S783for D17S783rev	Chromosom 17p12	20 mer 20 mer	Mikrosatellitenmarker Dinukleotidrepeat		1,5 mM MgCl ₂ 55°C	5' AGG ACT CGA AAT GCT TTC AT 3' 5' TAA CAG AAA ACT TGG AGC CG 3'
D17S799for D17S799rev	Chromosom 17p12	17 mer 25 mer	Mikrosatellitenmarker Dinukleotidrepeat		1,5 mM MgCl ₂ 57°C	5' ATT GCC AGC CGT CAG TT 3' 5' GAC CAG CAT ATC ATT ATA GAC AAG C 3'
D17S921for D17S921rev	Chromosom 17p12	24 mer 25 mer	Mikrosatellitenmarker Dinukleotidrepeat		1,5 mM MgCl ₂ 62°C	5' CTT GGA CTC CTA CAA ATC CTG GCA 3' 5' GGC CAC CAT AAT CAT GTC AGA CAA T 3'

Primer	Verwendungs- zweck	Länge	Bemerkung zur Verwendung	Modifi- kation	PCR- Reaktions- bedingungen	Sequenz
D17S953for D17S953rev	Chromosom 17p12	17 mer 16 mer	Mikrosatellitenmarker Dinukleotidrepeat		2 mM MgCl ₂ 52°C	5' ACT ATC CGC CCA ATA CA 3' 5' AAG GGC TTG CTT TGA C 3'
D17S969for D17S969revCY5	Chromosom 17p12	25 mer 20 mer	Mikrosatellitenmarker Tetranukleotidrepeat	CY5	2,5 mM MgCl ₂ 56°C	5' ATC TAA TCT GTC ATT CAT CTA TCC A 3' 5' AAC TGC AGT GCT GCA TCA TA 3'
hBGNCAF hBGNCAR (Just et al., 1994)	Biglykan (CA) _n 3'UTR	21 mer 21 mer	Biglykan VNTR	CY5	2 mM MgCl ₂ 66°C	5' CCT TCG ACC AGT CCT CCC TTC 3' 5' GGG ACA GGC GAA GCC AGG TTC 3'
universal M13		18 mer	Sequenzierung	CY5	60°C	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3'
univM13opt		19 mer	Sequenzierung	CY5	60°C	5' GGT AAC GCC AGG GTT TTC C 3'
reverse M13		18 mer	Sequenzierung	CY5	60°C	5' CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3'
revM13opt		18 mer	Sequenzierung	CY5	60°C	5' GAA ACA GCT ATG ACC ATG 3'
RVprimer3	Luziferase Repor- tergen Vektoren	20 mer	Sequenzierung pGL 3 Plasmide	CY5	60°C	5' CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC 3'
TGFB1I4 TGFB1I5 (Langdahl et al., 1997)	TGFβ1 Rezeptor Gen	22 mer 21 mer	Variante 713-8delC, Intron 4, Osteoporose- marker		1,5 mM MgCl ₂ 67°C	5' CGC CCC ACT TAT CTA TCC CTC T 3' 5' CCA TCC AGG CTA CAA GGC TCA 3'
TGFB1I4CY5 TGFB1I5NM13optrev	TGFβ1 Rezeptor Gen	22 mer 39 mer	Osteoporosemarker, s.o., Sequenzierung/ Fragmentanalyse	CY5	1,5 mM MgCl ₂ 67°C	5' CGC CCC ACT TAT CTA TCC CTC T 3' 5' GAA ACA GCT ATG ACC ATG CCA TCC AGG CTA CAA GGC TCA 3'
VitDF VitDRapaTaq	VDR Gen RFLP	30 mer 25 mer	Vitamin D Rezeptor, Restriktion jeweils mit <i>ApaI</i> oder <i>TaqI</i>		1,5 mM MgCl ₂ 65°C	5' CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA 3' 5' CAC TTC GAG CAC AAG GGG CGT TAG C 3'
VitDF VitDRBsm	VDR Gen RFLP	30 mer 23 mer	Vitamin D Rezeptor, Restriktion mit <i>BsmI</i>		1,5 mM MgCl ₂ 72°C	5' CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA 3' 5' AAC CAG CGG GAA GAG GTC AAG GG 3'
VDR2a VDR2b (Gross et al., 1996)	VDR Gen RFLP	27 mer 27 mer	Vitamin D Rezeptor, Exon 2, Restriktion mit <i>FokI</i>		1,5 mM MgCl ₂ 60°C	5' AGC TGG CCC TGG CAC TGA CTC TGC TCT 3' 5' ATG GAA ACA CCT TGC TTC TTC TCC CTC 3'
IGF-IA IGF-IB, (Chan et al., 1998)	IGF-I Gen Promotor	20 mer 20 mer	(CA) _n Mikrosatellit	CY5	1,5 mM MgCl ₂ 53°C	5' GCT AGC CAG CTG GTG TTA TT 3' 5' ACC ACT CTG GGA GAA GGG TA 3'

Primer	Verwendungs- zweck	Länge	Bemerkung zur Verwendung	Modifi- -kation	PCR- Reaktions- bedingunge n	Sequenz
VDR1 VDR2 (Ingles et al., 1997)	VDR Gen 3' UTR	22 mer 20 mer	Vitamin D Rezeptor, Poly A Mikrosatellit		1,5 mM MgCl ₂ 60°C	5' GTG TAG TGA AAA GGA CAC CGG A 3' 5' GAC AGA GGA GGG CGT GAC TC 3'
11FpromS	COL1A1 Promotor	19 mer	Sequenzierung	CY5	60°C	5' CAA TCC CCA CCT CTG TGT C 3'
11RpromS	COL1A1 Promotor	18 mer	Sequenzierung	CY5	60°C	5' ATG GAG TGG GGA GGC TGA 3'
11Fprom 11Rprom	COL1A1 Promotor	23 mer 20 mer	Vervollständigung der Promotorsequenz (GenBank AF034478)		1,5 mM MgCl ₂ 62°C	5' CAA AAC TCT TCT CTA AGT CAC CA 3' 5' TCA ATT CTT CTG CTG TGC TC 3'

Die Primer für die Mikrosatelliten auf Chromosom 17p12 zur Untersuchung des Brucksyndroms wurden mit Hilfe der GenBank gefunden (<http://www.gdb.org>).

Übersicht über die Exonprimer von COL1A1

*für Universalprimer zum Sequenzieren

Exon	Primer	5'tail*	Primer- länge	Primersequenz	Annealing Temp. u. Magnesiumkonz.	Kommentar	Größe des Prod.
6	11F03871	M13opt	20 mer	5' TTC TGC CTT TCA ATT CAC TG 3'	59°C	N-Proteinase- Schnittstelle	156+37= 193 bp
	11R03989	M13optrev	19 mer	5' CTT CTG TCA TCC ATG CTC C 3'	1,5 mM MgCl ₂		
7	11F04186	M13opt	21 mer	5' TAC AGA GGG ATC ACC ATG ACC 3'	64°C		129+37= 166 bp
	11R04276	M13optrev	19 mer	5' CAA AGC CCA AGG AGG CAT A 3'	1,5 mM MgCl ₂		
8	11F03598	M13opt	19 mer	5'CTT CTA ACC CAT CTT TTT C 3'	51°C		129+37= 166 bp
	11R03688	M13optrev	21 mer	5'GTG TGT TTG TAG AAG GAG TAT 3'	2,5 mM MgCl ₂		
9	11F04601	M13opt	23 mer	5' TCT TAT CCA TAT TCT AAC CAC CT 3'	56°C		131+37= 168 bp
	11R04690	M13optrev	20 mer	5' ATG GGG TCA GAT GGT ATC TT 3'	1,5 mM MgCl ₂		
10	11F05113	M13opt	17 mer	5' ACT TTT CCA GCC CCC TA 3'	52°C		171+37= 208 bp
	11R05250	M13optrev	18 mer	5' ATG AAG CCC AAG TGC AGT 3'	1,5 mM MgCl ₂		
11	11F05312	M13opt	19 mer	5' TTC TAA TGG CCC TTC CTT G 3'	59°C		129+37= 166 bp
	11R04619	M13optrev	21 mer	5' GAC TTG GGG AGC TTA AAT GAC 3'	1,5 mM MgCl ₂		

Exon	Primer	5'tail*	Primer-länge	Primersequenz	Annealing Temp. u. Magnesiumkonz.	Kommentar	Größe des Prod.
12	11F04918	M13opt	21 mer	5' CAC AGG TTC TTA CCT TCT ACC 3'	54°C		124+37=
	11R05004	M13optrev	18 mer	5' TGT GGA GGA CCA TGA TGT 3'	1,5 mM MgCl ₂		161 bp
13 u. 14	11F05057	M13opt	19 mer	5' TGA ATG AAT TTC TCA CTC A 3'	52°C		344+37=
	11R05366	M13optrev	17 mer	5' CGT TAA GTC CAC TGA GC 3'	1,5 mM MgCl ₂		381 bp
15	11F06093	M13opt	19 mer	5' GCT CAG TGG ACT TAA CGG G 3'	59°C		156+37=
	11R06232	M13optrev	17 mer	5' TGT CAG CCC CAA GAG CA 3'	1,5 mM MgCl ₂		193 bp
16	11F06317	M13opt	20 mer	5' ATC TCT TCC TTC TCG CTG AC 3'	60°C		131+37=
	11R05700	M13optrev	20 mer	5' CAT GAG GGT CAT GCT TAG AG 3'	1,5 mM MgCl ₂		168 bp
17	11F05924	M13opt	21 mer	5' GGG TGG CTT CTG ATA TGT CCT 3'	65°C		186+37=
	11R06067	M13optrev	23 mer	5' GGA CTC TGA GGT TAG AAA GTG GC 3'	1,5 mM MgCl ₂		223 bp
18	11F06105	M13opt	21 mer	5' AGT CCT TGC CTG TTG CTG ACA 3'	69°C		123+37=
	11R06190	M13optrev	18 mer	5' CGG CAG GAG TGG GAC TGA 3'	1,5 mM MgCl ₂		160 bp
19	11F06260	M13opt	21 mer	5' CTA GGC TCA CGC CCT GGC TGT 3'	72°C		196+37=
	11R06415	NM13optrev	21 mer	5' CCA GAT GAG AGC CGC ACT GGA 3'	1,5 mM MgCl ₂		233 bp
20	11F06483	NM13opt	19 mer	5' CCC CCG ACT CTG AGC TCA T 3'	64°C		141+37=
	11R06589	NM13optrev	17 mer	5' CTA GGG CAG GGT GGG CT 3'	1,5 mM MgCl ₂		178 bp
21	11F06756	M13opt	18 mer	5' TCA CCA CAG GCC GCC TCC 3'	72°C		199+37=
	11R06918	M13optrev	21 mer	5' GGC ACC AGC CAG GCA ATG AG 3'	1,5 mM MgCl ₂		236 bp
22	11F06951	M13opt	18 mer	5' GCC TGT GTG TCG CGG AG T 3'	65°C		164+37=
	11R07078	M13optrev	21 mer	5' GGC CAA AAG AGG AAG AAG ATG 3'	1,5 mM MgCl ₂		201 bp
23	11F07136	M13opt	19 mer	5' CTT GAG ACC CTA ACT GTT C 3'	56°C		192+37=
	11R07293	M13optrev	17 mer	5' CTA CAC GGG ATG GTC AG 3'	1,5 mM MgCl ₂		229 bp
24	11F07397	M13opt	19 mer	5' CTT GAG ACC CTA ACT GTT C 3'	67°C		141+37=
	11R07501	M13optrev	19 mer	5' CTA CAC GGG ATG GTC AG 3'	1,5 mM MgCl ₂		178 bp
25	11F07551	M13opt	18 mer	5' ACT GCT GCT TTC GTG CCT 3'	65°C		158+37=
	11R07671	M13optrev	21 mer	5' GCT CTT CAT GGA TCC TCA CTT 3'	1,5 mM MgCl ₂		195 bp
26	11F08537	M13opt	19 mer	5' CAC TCC AGC CCC CTC AAC C 3'	67°C		135+37=
	11R08634	M13optrev	20 mer	5' GCA GCA ATG GGA AGG AGG TA 3'	2,0 mM MgCl ₂		172 bp
27	11F08727	M13opt	17 mer	5' CGG GGC CTC CTA ACC CT 3'	66°C		160+37=
	11R08853	M13optrev	18 mer	5' ACG AGG GGC TGA GGG TGT 3'	2,0 mM MgCl ₂		197 bp

Exon	Primer	5'tail*	Primer-länge	Primersequenz	Annealing Temp. u. Magnesiumkonz.	Kommentar	Größe des Prod.
28	11F08882 11R08983	M13opt M13optrev	18 mer 20 mer	5' CCT CGT CTC CTC GGC CTC 3' 5' CCT ACC TCC CAG CAT CCT GA 3'	67°C 1,5 mM MgCl ₂		138+37= 175 bp
29	11F09041 11R09171	M13opt M13optrev	22 mer 18 mer	5' TGG TCT CTT CCA GAT TCT AAA C 3' 5' GCC TGT CCC TCT GGA TTC 3'	62°C 1,5 mM MgCl ₂		169+37= 200 bp
30	11F10262 11R10342	M13opt M13optrev	25 mer 20 mer	5' AGG TTT TGC TCA CTG TCT GTT CCT C 3' 5' ACG CAC CTT GAC GGA TGC AG 3'	72°C 2,5 mM MgCl ₂		124+37= 161 bp
31	11F09704 11R09830	M13opt M13optrev	22 mer 21 mer	5' CAG AGC AGC CTT CAC ATG CCC T 3' 5' ACT TGC CAG AGC CCC TTC CAC 3'	72°C 1,5 mM MgCl ₂		168+37= 205 bp
32	11F10065 11R10272	M13opt M13optrev	17 mer 18 mer	5' GGG CTT AGG GCT GTG AC 3' 5' AGA GAT TCA AAG CAG GCA 3'	58°C 1,5 mM MgCl ₂		241+37= 278 bp
33/ 34	11F11358 11R11503	M13uni M13rev	20 mer 20 mer	5' CCC CAC ACT GGA AAT CTC AA 3' 5' TGT GTT AGG GCC AGA AGG TG 3'	55°C 2,0 mM MgCl ₂		184+36= 220 bp
35	11F10966 11R11081	M13opt M13optrev	20 mer 17 mer	5' GGT CAT CTA CTA GGA GTA TT 3' 5' AAG TAT GGG GTC TTA AC 3'	48°C 2,5 mM MgCl ₂		151+37= 188 bp
36	11F11906 11R11994	M13uni M13rev	20 mer 20 mer	5' AGA CGC ATC TCT CCA ATC TG 3' 5' GTC GGT GAT GAA AAA TGA TG 3'	52°C 2,0 mM MgCl ₂		127+37= 164 bp
37	11F11488 11R11614	M13opt M13optrev	18 mer 18 mer	5' CCA TTC ACC GCC CTG CTT 3' 5' GGG CAC AGA GGG CCA AGC 3'	69°C 1,5 mM MgCl ₂		161+37= 198 bp
38	11F12375 11R12492	M13opt, M13optrev	21 mer 19 mer	5' AGG ACG GGT CCA GGC TTG ATG 3' 5' TCA CCT GCC ACC GCT GCC T 3'	72° 1,5 mM MgCl ₂		161+37= 198 bp
39	11F12553 11R12646	M13opt, M13optrev	19 mer 19 mer	5' CTG TTC TCC CTC TGA CTG T 3' 5' CAA CCT AGA GCA GTG GAC T 3'	60°C 1,5 mM MgCl ₂		130+37= 167 bp
40	11F11904 11R12163	M13uni M13rev	21 mer 20 mer	5' GAA GGA TGG TGG GGC TGA CTG 3' 5' ACC CCT CCC CAG CTC TGC AC 3'	72°C 1 mM MgCl ₂		299+36 = 335 bp
41	11Fex41we 11Rex41we2	-	18 mer 21 mer	5' GCA CCT CAC CCC TGT TTG 5' AGT CCT GTG ATG GTT TTT CTC 3'	60°C 3,0 mM MgCl ₂	Sequenzieren: 11R12360WeS 11F12221WeS	186 bp
42	11Fex42we 11Rex42we2	-	20 mer 18 mer	5' GCC TGA CTC TTT CTT CTC CC 3' 5' GTA CTG GCA TGG GGG CTG 3'	62°C 2,5 mM MgCl ₂	Sequenzieren: 11R12602WeS 11F12487WeS	162 bp

Exon	Primer	5'tail*	Primer- länge	Primersequenz	Annealing Temp. u. Magnesiumkonz.	Kommentar	Größe des Prod.
43	11F12685 11R12766	M13opt, M13optrev	18 mer 17 mer	5' CGG CTG ACT CTC ACT TCT 3' 5' TGG TCA TGG AGT GTT GC 3'	64°C 3,0 mM MgCl ₂		115+37= 152 bp
44	11F12946 11R13137	M13opt M13optrev	17 mer 21 mer	5' CAC CCG GGG CTG ACC CA 3' 5' CAC CCA TCC CCA GGC CTC TAA 3'	72°C 2,5 mM MgCl ₂		228+37= 265 bp
45	11F13521 11R14031	-	22 mer 22 mer	5' GAT GTC AGG GCC TTA ATC CAA A 3' 5' GGA GGG GCT GAG CAT ACT TAC A 3'	62° 1,5 mM MgCl ₂	C Sequenzieren: 11F13342WeS 11R13403WeS	553 bp
46	11Fex46we 11Rex46we2	-	18 mer 18 mer	5' CCC CAC TCG ATG CCA ATG 3' 5' GAC TGG GGA GGG GCT GAG 3'	64° 2,5 mM MgCl ₂	C Sequenzieren: 11R13626WeS2 11F13508WeS	192 bp
47	11F14052 11R14172	M13opt M13optrev	19 mer 17 mer	5' ACT GGG CCT GAA CTG CCT T 3' 5' GCA AGG GTC CCC GAG GT 3'	60°C 1,5 mM MgCl ₂		155+37= 192 bp
48	11F15128 11R15322	M13opt M13optrev	18 mer 18 mer	5' CTC CAG AGC TGG GGT TGT 3' 5' GCA TCC AAG TGC TAT GGG 3'	58°C 1,5 mM MgCl ₂		229+37= 266 bp
49	11F14652 11R14995	M13opt M13optrev	19 mer 20 mer	5' CCA TAG CAC TTG GAT GCC G 3' 5' CTG GCA TGG CAG GAG TAG GA 3'	65°C 1,5 mM MgCl ₂	C-Proteinase- Schnittstelle	381+37= 418 bp

Die Primersuche erfolgte auf der Grundlage der GenBank AF017178 Sequenz mit der Oligo 4.0 Primer Analysis Software.

Übersicht über die Exonprimer von COL1A2

*für Universalprimer zum Sequenzieren

Exon	Primer	5'tail*	Primer- länge	Primersequenz	Annealing Temp. u. Magnesiumkonz. (Mg)	Kommentar	Größe des Prod.
6	12F08830 12R09041	M13opt M13optrev	21 mer 18 mer	5' TGC CCT CTT TTA AAT AAC AAC 3' 5' GGC CTG GTA AAA TGT GAC 3'	56°C 1,5 mM Mg Cl ₂	N-Proteinase- Schnittstelle	248+37= 285 bp
7	12F11908 12R11977	M13opt M13optrev	21 mer 17 mer	5' CTA ACT GTT GAT ATA TCT GCT 3' 5' TAA GAG GCA TTA CAA GC 3'	52°C 1,5 mM Mg Cl ₂		106+37= 143 bp
8	12F12037 12R12147	M13opt M13optrev	18 mer 20 mer	5' AAA GGC TTG GAG TAT GAC 3' 5' TAT ATT CAT AAA CTT CCT GG 3'	52°C 1,5 mM Mg Cl ₂		147+37= 184 bp

9	12F12187 12R12293	M13opt M13optrev	20 mer 21 mer	5' CCT TAG TGA AAT GAT GGG TC 3' 5' TTG TTG AGG CAA GAG TAT TTA 3'	56°C 1,5 mM Mg Cl ₂		146+37= 183 bp
Exon	Primer	5'tail*	Primer- länge	Primersequenz	Annealing Temp. u. Magnesiumkonz.	Kommentar	Größe des Prod.
10	12F12529 12R12640	M13opt M13optrev	19 mer 17 mer	5' GTC TGA TAG TTT ACC AAG A 3' 5' CCT ATG ATG TTT GTG CT 3'	52°C 2,0 mM Mg Cl ₂		146+37= 183 bp
11	12F13010 12R13150	M13opt M13optrev	18 mer 18 mer	5' TAT GGT AAA ACA TTA TTC 3' 5' CCA AGA TTT TAA ACA TAC 3'	59°C 2,0 mM Mg Cl ₂		175+37= 212 bp
12	12F13585 12R13687	M13opt M13optrev	18 mer 18 mer	5' AAC ACT ATC ATG GAA CAG 3' 5' CAA GTG CTT AAA AAC AGT 3'	49°C 2,0 mM Mg Cl ₂		137+37= 174 bp
13	12F15131 12R15304	M13opt M13optrev	17 mer 17 mer	5' GTA TAT GAA TGG TTC AA 3' 5' AGT TCC ATC TCA TAA AG 3'	49°C 2,5 mM Mg Cl ₂		206+37= 243 bp
14	12F15501 12R15660	M13opt M13optrev	17 mer 20 mer	5' GCA AAT GAT GCC TGT GA 3' 5' GGT GGA AAC TTA AAT GAC AG 3'	56°C 1,5 mM Mg Cl ₂		195+37= 232 bp
15	12F15679 12R15781	M13opt M13optrev	20 mer 18 mer	5' CTG TCA TTT AAG TTT CCA CC 3' 5' CAC CCC ACA TTC TCA ACT 3'	58°C 1,5 mM MgCl ₂		139+37= 176 bp
16	12F16076 12R16226	M13opt M13optrev	18 mer 22 mer	5' CAA CTT CAA TCT TCT GCC 3' 5' ACA TCA CAG TAA AAA GTT TAT C 3'	51°C 2,5 mM MgCl ₂		189+37= 226 bp
17	12F16674 12R16823	M13opt M13optrev	17 mer 18 mer	5' CTG GTT AAT TCC TTG GT 3' 5' CAC CTT TGT TTT CTT TTA 3'	50°C 2,0 mM MgCl ₂		183+37= 220 bp
18	12F16910 12R16993	M13opt M13optrev	18 mer 17 mer	5' TCC AAT TAA CTG ATA TCC 3' 5' CAG CAC ATT TTA GCT AC 3'	48°C 1,5 mM MgCl ₂		117+37= 154 bp
19	12F17056 12R17215	M13opt M13optrev	17 mer 20 mer	5' GCC TCT ACA GCC CAT CA 3' 5' GTG GTA TTT CAG GAT GAT GA 3'	59°C 1,5 mM MgCl ₂		195+37= 232 bp
20	12F17571 12R17711	M13opt M13optrev	18 mer 18 mer	5' TGC AAG AGA GTT TCA ACA 3' 5' CTG GAG AAA CTG GAA TGA 3'	56°C 1,5 mM MgCl ₂		175+37= 212 bp
21	12F17728 12R17912	M13opt M13optrev	18 mer 17 mer	5' TCA TTC CAG TTT CTC CAG 3' 5' GTT AGG GTG TTG GGA GC 3'	55°C 1,5 mM MgCl ₂		218 +37= 255 bp
22	12F18229 12R18356	M13opt M13optrev	20 mer 17 mer	5' AAG CCA AGA GAT TTC TTT AA 3' 5' ACA CAC CCA CCA CCA GA 3'	57°C 2,0 mM MgCl ₂		163+37= 200 bp
23	12F18396 12R18542	M13opt M13optrev	18 mer 18 mer	5' CCT TAG CAT CCT CCT CCT 3' 5' AGG TGT GAT TTG CTC AGA 3'	57°C 1,5 mM MgCl ₂		181+37= 218 bp
24	12F19407 12R19510	M13opt M13optrev	19 mer 20 mer	5' GTA TGT AAG TTA AAG TGC C 3' 5' GTG TCC TTG AAA ATA TAA TG 3'	52°C 1,5 mM MgCl ₂		141+37= 178 bp
25	12F19936 12R20065	M13opt M13optrev	19 mer 17 mer	5' GAC ACT GAG TAA ACT TGA A 3' 5' TGA GGG TAA GAA AGT TG 3'	48°C 1,5 mM MgCl ₂		164+37= 201 bp

Exon	Primer	5'tail*	Primer- länge	Primersequenz	Annealing Temp. u. Magnesiumkonz.	Kommentar	Größe des Prod.
26	12F20382	M13opt	18 mer	5' ACC GTG GTT AAT TTG ACA 3'	56°C		193+37=
	12R20536	M13optrev	22 mer	5' GAA TGC TAT GTG AAT AGA TCT G 3'	1,5 mM MgCl ₂		230 bp
27	12F21042	M13opt	18 mer	5' GCT AAC CAT CAG CCT TTC 3'	57°C		117+37=
	12R21125	M13optrev	17 mer	5' AAG AGC ACA AGA GTG GG 3'	1,5 mM MgCl ₂		154 bp
28	12F21244	M13opt	19 mer	5' ACG TTG CTA TTT ATG CTC T3'	55°C		141+37=
	12R21350	M13optrev	17 mer	5' GCT CAA TAG GCT GAC CA 3'	1,5 mM MgCl ₂		178 bp
29	12F21574	M13opt	17 mer	5' GGA TTG AGA TTT GTA TT 3'	47°C		132+37=
	12R21671	M13optrev	19 mer	5' TTC TCA AGT TTA GTA GTT A 3'	2,5 mM MgCl ₂		169 bp
30	12F22569	M13opt	19 mer	5' CAG ATC ACA CAC AGA TTT C 3'	51°C		130+37=
	12R22664	M13optrev	17 mer	5' CAT TGC CAG AGT TTA TG 3'	2,5 mM MgCl ₂		167 bp
31	12F23751	M13opt	18 mer	5' GAT GAA TGG TGC AAC ACT 3'	57°C		173+37=
	12R23889	M13optrev	18 mer	5' GCC AAA CCA GCA ATA TAG 3'	1,5 mM MgCl ₂		210 bp
32	12F25071	M13opt	18 mer	5' TCC ACT AAA ATT GAT TTC 3'	48°C		187+37=
	12R25221	M13optrev	20 mer	5' TAC TAG AGT TCA TCA ACA AT 3'	2,0 mM MgCl ₂		224 bp
33	12F25819	M13opt	21 mer	5' CTT CAT ATT AAT TTC GAT TCA 3'	53°C		161+37=
	12R25940	M13optrev	20 mer	5' TCC AAG TAC GAA GAA ACA TA 3'	2,5 mM MgCl ₂		198 bp
34	12F26820	M13opt	18 mer	5' TTT GAT GAT ACG GGG TGT 3'	59°C		139+37=
	12R26923	M13optrev	19 mer	5' TAT TGC TGT TGG CTT AGT G 3'	1,5 mM MgCl ₂		176 bp
35	12F27537	M13opt	17 mer	5' TGA GCA TCT ATG TCA GG 3'	52°C		159+37=
	12R27677	M13optrev	19 mer	5' ATG TCT AAA CAT TGT GAG G 3'	1,5 mM MgCl ₂		196 bp
36	12F27710	M13opt	18 mer	5' CAT TGA TGA ACC TAG GAT 3'	51°C		150+37=
	12R27823	M13optrev	20 mer	5' ACT TAG GAT GTT TTC AGA TT 3'	2,0 mM MgCl ₂		187 bp
37	12F27880	M13opt	21 mer	5' CGG AAT ACC AGA GCT GTA ACT 3'	61°C		183+37=
	12R28025	M13optrev	18 mer	5' GGG TAG CTG CTG TGT GGA 3'	2,0 mM MgCl ₂		220 bp
38	12F28321	M13opt	18 mer	5' AAG AGT AGC ATT TAC AAG 3'	47°C		173+37=
	12R28458	M13optrev	19 mer	5' GTG TCC TTA ATA GAT TCT G 3'	2,0 mM MgCl ₂		210 bp
39	12F29190	M13opt	17 mer	5' GAG TTG ATG TTG ACT GT 3'	49°C		137+37=
	12R29293	M13optrev	18 mer	5' GCT AGA GTA AAT GAA GAC 3'	1,5 mM MgCl ₂		174 bp
40	12F30246	M13opt	19 mer	5' TTG GTG ATT AAC AGA AAG G 3'	54°C		251+37=
	12R30458	M13optrev	21 mer	5' ATT CAG CAT AAG GTA TTA AGA 3'	2,0 mM MgCl ₂		288 bp

Exon	Primer	5'tail*	Primerlänge	Primersequenz	Annealing Temp. u. Magnesiumkonz.	Kommentar	Größe des Prod.
41	12F31613 12R31802	M13opt M13optrev	19 mer 17 mer	5' TGT TAT CAC CTA GGG TCT T 3' 5' TGA AGT GGC AGC TTT TA 3'	53°C 1,5 mM MgCl ₂		224+37= 251 bp
42	12F32411 12R32560	M13opt M13optrev	19 mer 20 mer	5' GGG GAA TGT CAT TTT ATC T 3' 5' GAA ATC CTG CTC AGT TTT AT 3'	54°C 2,0 mM MgCl ₂		187+37= 224 bp
43	12F32903 12R33005	M13opt M13optrev	19 mer 20 mer	5' ACC AAC AGC CTT AAT TTG T 3' 5' GGT TGC ATT TTA ATC ACT TT 3'	58°C 2,5 mM MgCl ₂		139+37= 176 bp
44	12F33036 12R33187	M13opt M13optrev	19 mer 18 mer	5' TGC AAC CCA GAT TGA TGC T 3' 5' GAA TGC TGC ACT GAG GGA 3'	62°C 1,5 mM MgCl ₂		187+37= 224 bp
45	12F33284 12R33378	M13opt M13optrev	18 mer 21 mer	5' TTG GGC CTA GCT AAG TTG 3' 5' TGT TAG TGT TGC AAA GAA ATC 3'	54°C 3,5 mM MgCl ₂		132+37= 169 bp
46	12F33717 12R33863	M13opt M13optrev	18 mer 17 mer	5' GTA AGT CTT ATC CAT CCT 3' 5' AGG ATC AGT TTA TGT GC 3'	49°C 1,5 mM MgCl ₂		180+37= 217 bp
47	12F34293 12R34405	M13opt M13optrev	18 mer 18 mer	5' TGT GCT CTG AAA GTG TGA 3' 5' CTC GCT TTA GCC TCT ATT 3'	54°C 1,5 mM MgCl ₂		147+37= 184 bp
48	12F34477 12R34631	M13opt M13optrev	18 mer 18 mer	5' ACC AGC TCA CAT GTA CCT 3' 5' CTT AGG TCC GTG ATC TTC 3'	54°C 2,0 mM MgCl ₂		189+37= 226 bp
49	12F34890 12R35213	M13opt M13optrev	19 mer 20 mer	5' GCC ATG GAT GTC TCT CAC T 3' 5' GTG AGA AGG GTC AGT CTG GT 3'	61°C 1,5 mM MgCl ₂	C-Proteinase-Schnittstelle	361+37= 398 bp

Die Primersuche erfolgte auf der Grundlage der GenBank AF004877 Sequenz (1.1.1998) mit der Oligo 4.0 Primer Analysis Software.

Die Primer wurden über die Firmen MWG, Ebersberg oder Interactiva, Ulm, bezogen.

Primer für die RT-PCR für das COL1A1 Gen

*Das Sequenzieren der RT-PCRs des COL1A1 Gens hat sich nicht bewährt, deshalb wurden sie hauptsächlich ohne tail für das Screening verwendet.

Re-gion	Primer	tail	Primerlänge	Primersequenz	Annealing Temp. u. Magnesiumkonz.	Kommentar	Größe des Prod.
14*	11F0300C 11R0680C		18 mer 17 mer	5' TGC GTC TGC GAC AAC GGC 3' 5' GGG GGC CAG GGA GAC CA 3'	72°C 1,5 mM MgCl ₂	N-Terminus	397 bp

Re- gion	Primer	tail	Primer- länge	Primersequenz	Annealing Temp. u. Magnesiumkonz.	Kommentar	Größe des Prod.
13*	11F0610C 11R0878C		17 mer 17 mer	5' TTT GCT CCC CAG CTG TC 3' 5' CTG TTC CGG GCA ATC CT 3'	63°C 2 mM MgCl ₂	Q-Solution (Qiagen)	301 bp
12*	11F0822C 11R1089C		17 mer 19 mer	5' TGG AGA TGA TGG GGA AG 3' 5' CAC CAG TAG CAC CAT CAT T 3'	56°C 2 mM MgCl ₂		302 bp
11	11F1031C 11R1289C	M13opt M13optrev	17 mer 21 mer	5' GTC AGA TGG GCC CCC GT 3' 5' TTA GCA CCA GGC TGT CCA TCA 3'	71°C 2 mM MgCl ₂		295+37= 332 bp
10	11F1224C 11R1518C	M13opt M13optrev	17 mer 17 mer	5' TGA AGG TCC CCA GGG TG 3' 5' CGA GCT CCT CGC TTT CC 3'	61°C 2 mM MgCl ₂		327+37= 364 bp
9	11F1454C 11R1763C	M13opt M13optrev	18 mer 18 mer	5' GGC AGC AAA GGA GAC ACT 3' 5' CCA GTT TTG CCA TCA GGA 3'	60°C 2 mM MgCl ₂		344+37 = 831 bp
8	11F1718C 11R2074C	M13opt M13optrev	17 mer 18 mer	5' GTC CCG GTG AAG CTG GT 3' 5' GTT TGC CTG CTT CAC CTG 3'	63°C 2 mM MgCl ₂		390+37= 427 bp
7	11F1954C 11R2354C	M13opt M13optrev	18 mer 20 mer	5' TGT CGG TCC TGC TGG CAA 3' 5' CTT TGG GAC CAG CAT CAC CT 3'	67°C 2 mM MgCl ₂		437+37= 474 bp
6	11F2265C 11R2681C	M13opt M13optrev	17 mer 18 mer	5' AAT GCC TGG TGA ACG TG 5' 5' CCA GGG AAA CCA GTA GCA 3'	60°C 2 mM MgCl ₂		450+37= 487 bp
5	11F2639C 11R3035C	M13opt M13optrev	18 mer 17 mer	5' ATT GGT AAT GTT GGT GCT 3' 5' GAC CAC GTT CAC CAC TT 3'	52°C 3 mM MgCl ₂		430+37= 467 bp
4	11F3074C 11R3457C	M13opt M13optrev	21 mer 19 mer	5' TCT GGT GAA CCT GGC AAA CAA 3' 5' GGA CCC TGG AGG CCA GAG A 3'	68°C 2 mM MgCl ₂		422+37= 459 bp
3	11F3441C 11R3816C	M13opt M13optrev	17 mer 18 mer	5' GGG CGA CAG AGG CAT AA 3' 5' CAG GCT CTT GAG GGT GGT 3'	62°C 2 mM MgCl ₂		409+37= 446 bp
2	11F3776C 11R4161C	M13opt M13optrev	18 mer 17 mer	5' CGC TAC TAC CGG GCT GAT 3' 5' GTC AGC TGG ATG GCC AC 3'	61°C 2 mM MgCl ₂		419+37= 456 bp
1	11F4139C 11R4545C	M13opt M13optrev	17 mer 17 mer	5' AGT TCG AGT ATG GCG GC 3' 5' GGG AAA GTT GGT TGG GT 3'	60°C 2 mM MgCl ₂	C-Terminus	439+37= 476 bp

Primer für die RT-PCR für das COL1A2 Gen

Re- gion	Primer	tail	Primer- länge	Primersequenz	Annealing Temp. u. Magnesiumkonz.	Kommentar	Größe des Prod.
12	12F0000C	M13opt	22 mer	5' ACA AGG AGT CTG CAT GTC TAA G 3'	59°C		427+37=
	12R0381C	M13optrev	17 mer	5' CAC CAG CAC CTG CAG GA 3'	2 mM MgCl ₂		464 bp
11	12F0350C	M13opt	20 mer	5' CAA GGT TTC CAA GGA CCT GC 3'	66°C		432+37=
	12R0746C	M13optrev	17 mer	5' AGG GCC AGC AGA CCC AA 3'	2 mM MgCl ₂		469 bp
10	12F0732C	M13opt	17 mer	5' GTG TGG GTC CCG TGG GT 3'	66°C		393+37=
	12R1092C	M13optrev	17 mer	5' CTT GGG GCC CAG CAG AG 3'	2 mM MgCl ₂		430 bp
9	12F1069C	M13opt	19 mer	5' GCT GGC TCC AAA GGA GAG A 3'	59°C		403+37=
	12R1437C	M13optrev	17 mer	5' CTC CAA CGG GGC CAA TT 3'	2 mM MgCl ₂		440 bp
8	12F1414C	M13opt	17 mer	5' TCC TGT CGG CCT CCC TG 3'	69°C		391+37=
	12R1772C	M13optrev	17 mer	5' CTC ACC TGG GGG ACC GC 3'	2 mM MgCl ₂		428 bp
7	12F1749C	M13opt	18 mer	5' GAG TTT GGT CTC CCT GGT 3'	60°C		411+37=
	12R2126C	M13optrev	17 mer	5' ACG TTC ACC AGG GCT TC 3'	2 mM MgCl ₂		448 bp
6	12F2106C	M13opt	17 mer	5' GGG CTG CTG GTC CTG CT 3'	67°C		403+37=
	12R2475C	M13optrev	18 mer	5' GTT CGG CCA ACT GGA CCT 3'	2 mM MgCl ₂		440 bp
5	12F2456C	M13opt	18 mer	5' TGG GAA AGA AGG GCT TCG 3'	65°C		387+37=
	12R2808C	M13optrev	18 mer	5' GGT TGA CCA TCG CGA CCT 3'	2 mM MgCl ₂		424 bp
4	12F2790C	M13opt	17 mer	5' GTC GTG ATG GCA ACC CT 3'	61°C		363+37=
	12R3119C	M13optrev	18 mer	5' AGC CAG GAG CAC CTT GAT 3'	2 mM MgCl ₂		400 bp
3	12F3103C	M13opt	17 mer	5' AGG TCT GCC TGG TAT CG 3'	56°C		425+37=
	12R3494C	M13optrev	18 mer	5' GGT GGC TGA GTC TCA AGT 3'	2 mM MgCl ₂		462 bp
2	12F3469C	M13opt	18 mer	5' CTC CTG AAG GCT CTA GAA 3'	54°C		411+37=
	12R3846C	M13optrev	17 mer	5' TTT TCA GGT TGC CAG TC 3'	2 mM MgCl ₂		448 bp
1	12F3821C	M13opt	18 mer	5' CAC CTA CCA CTG CAA GAA 3'	55°C		394+37=
	12R4180C	M13optrev	18 mer	5' GGA AGG ATT CAG CTT TCA 3'	2 mM MgCl ₂		431 bp

2.1.4 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Bakterienkultur:

Ampicillin-Stammlösung (50mg/ml) in H₂O, sterilfiltrieren, 0,2 µm Filter

IPTG 100 mM in H₂O, sterilfiltrieren

SOB-Medium	10 mM NaCl 2% Bacto-Trypton 0,5% Bacto-Yeast-Extract autoklavieren, sterile Zugabe von 20 mM MgSO ₄ /MgCl ₂ , Zugabe erst kurz vor Gebrauch
SOB _{Amp} -Medium	50 mg/l Ampicillin in SOB-Medium
SOC-Medium	20 mM Glucose in SOB-Medium
X-Gal (20 mg/ml) in Dimethylformamid	

Zellkultur:

DMEM	Biochrom, Berlin
1% EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin
FKS	Biochrom, Berlin
Gentamycin	Biochrom, Berlin
Hank's Lösung	Biochrom, Berlin
MEM	Biochrom, Berlin
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin
Glutamin	Biochrom, Berlin

MEM:	500 ml 1x MEM
(Minimal essential medium	50 ml FKS (10%)
mit Earle's Salzen)	14,6 ml 7.5% NaHCO ₃ 5 ml 200 mM Glutamin 3 ml 10 mg/ml Gentamycin

DMEM:	500 ml 1x DMEM
(Dulbecco's MEM)	70 ml FKS (12%) 25 ml 7.5% NaHCO ₃ 10 ml 200mM Glutamin 3 ml 10 mg/ml Gentamycin

Hank's Lösung:	50 ml 10x Hank's Konzentrat 2,4 ml 7.5% NaHCO ₃ ad 500 ml H ₂ O
----------------	---

Trypsin: 0.3% Trypsin/ 0.08% EDTA
7.5 ml 7.5% NaHCO₃
ad 500 ml PBS

10x PBS (ohne Ca²⁺, Mg²⁺) 49,22 g PBS ad 1l Aqua bidest
G418 (Geneticin, Neomycin) 10 mg/ml in 1xPBS, sterilfiltrieren

Transfektion:

Transfektionspuffer für DOTAP: 20 mM HEPES
150 mM NaCl
pH 7,4; sterilfiltrieren

Transfektionspuffer für die Elektroporation: 272 mM D(+)-Saccharose)
7 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-Puffer
pH 7,4; sterilfiltrieren
1:1 mit 1x PBS (Dulbecco) mischen

Herstellung des Natrium Phosphat Puffers: Sambrook et al., 1989 Band 3, Anhang

Transfektionspuffer für die Kalziumphosphat-
methode: 137 mM NaCl
4,96 mM KCl
0,7 mM Na₂HPO₄
5,5 mM Dextrose
21 mM HEPES
pH 7,03; sterilfiltrieren

Zusätzlich für die Kristallbildung:
(Rozenblatt et al., 1979) 1 mM CaCl₂

PCR:

10x Puffer 100 mM Tris-HCl pH 8,3
500 mM KCl
MgCl₂ Stammlösung 25 mM
DNA Polymerization Mix (20 mM/dNTP) AP Biotech, Freiburg
Taq StartTM Antibody Clontech, Palo Alto, CA, USA

Gelelektrophorese:

TBE-Puffer (5x)

0,4 M TRIS pH 8,3
0,4 M Borsäure
10 mM Na₂EDTA x 2 H₂O

Lademix für Agarosegele (Sambrock et al., 1989)

50% (w/v) Saccharose
0,1% Bromphenolblau
0,1% Xylencyanol
in Tris/HCl, pH 7,6

Ethidiumbromid 10 mg/ml

Sequenzierung:

Sequenziergel 6%:

Acrylamidlösung (19:1)
7 M NF-Harnstoff (nicht fluoreszierend)
6% (w/v) 10x TBE

Bindesilan 0,75 % in Ethanol (10% Essigsäure)

10x TBE für ALFexpress™

0,8 M Tris pH 8,3
0,8 M Borsäure
20 mM EDTA

CSGE-Mutationsscreening:

Lademix

20% (v/v) Ethylenglycol
30% (w/v) Formamid
0,025% Xylene Cyanol FF
0,025% Bromphenolblau

Acrylamidgel 6%

Acrylamide/Bis (29:1)
10% (v/v) Ethylenglycol
15% (w/v) Formamid
in 0,5x TTE-Puffer

1x TTE

89 mM Tris
15 mM Taurin
0,5 mM EDTA
pH 9,0

TE Puffer

10 mM Tris/HCl pH 8,0
1 mM EDTA pH 7,6

Lysepuffer (Blut)	50 mM KCl 10 mM Tris, pH 8,3 2,5 mM MgCl ₂ 0,5% Tween 20 100 µg/ml Proteinase K
Prähybridisierungslösung (Oligo)	5x SSPE 3% (v/v) SDS
Waschpuffer für Oligomarkierung	6x SSC 1% SDS
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M NaCitrat-Dihydrat mit HCl pH 7,0 einstellen
20x SSPE	3 M NaCl 0,6 M NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 0,02 M EDTA-Na ₂ mit NaOH pH 7,4 einstellen

2.1.5 Reagenziensysteme (Kits)

Dynabeads [®] mRNA DIRECT Kit	Dynal, Hamburg
Quick Prep [®] mRNA Purification Kit	AP Biotech, Freiburg
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Gene Amp [®] RNA PCR Core Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
GC-RICH PCR System	Roche, Mannheim
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	AP Biotech, Freiburg ALFexpress [™]
AutoRead [™] sequencing Kit	AP Biotech, Freiburg
FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
GFX [™] Micro Plasmid Purification Kit	AP Biotech, Freiburg
GFX [™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit	AP Biotech, Freiburg
Qiagen Plasmid Mini-, Midi- und Maxi-Kit	Qiagen, Hilden
FuGene [™] 6 Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
Effectene [™]	Qiagen, Hilden
Topo [™] TA Cloning [®] Kit Version E	Invitrogen, NV Leek, NL
Steady-Glo [™] Luciferase Assay System	Promega, Madison, WI, USA
Luciferase Reporter Gene Assay high sensitivity	Roche, Mannheim
DC Protein Assay	BioRad, München

2.1.6 Enzyme

AmpliTaq [®] DNA Polymerase (5U/μl)	Perkin Elmer, Weiterstadt
Collagenase	Sigma, St.Louis, MO, USA
Proteinase K (10 mg/ml)	Sigma, München
T4 Polynukleotid Kinase (10U/μl)	AP Biotech, Freiburg
T4 DNA Ligase (2000 U/μl)	New England Biolabs (NEB)
	Schwalbach/Taunus
Pfu DNA Polymerase, high fidelity	Stratagene, Heidelberg
Qiagen Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
2,5% Trypsin	Biochrom, Berlin

Restriktionsenzyme:

<i>ApaI, BsmI, FokI, MnlI, NlaIII, PvuII, RsaI, TaqI</i>	New England Biolabs (NEB)
	Schwalbach/Taunus
<i>BalI</i>	Promega, Mannheim
<i>BglII, KpnI</i>	AP Biotech, Freiburg

2.1.7 DNA-Längenstandards

50 Base-Pair Ladder	AP Biotech, Freiburg
100 Base-Pair Ladder	AP Biotech, Freiburg
pBR 322 DNA- <i>MspI</i> Digest	New England Biolabs (NEB), Schwalbach/Taunus
PhiX174 DNA/ <i>HaeIII</i>	Promega, Madison, WI, USA
Lambda DNA/ <i>HindIII</i>	Promega, Madison, WI, USA
ALFexpress [™] Sizer [®] 50-500	AP Biotech, Freiburg
weitere Sizer z.T. erworben, z.T. hergestellt	

2.1.8 Vektoren

pGL3 Luciferase Reporter Vectors:	Promega, Mannheim
pGL3 Promoter Vector (5010 bp)	
pGL3 Control Vector (5256 bp)	
pIRES2-EGFP Vector	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pEGFP-N1 und pEGFP-C1	Clontech, Palo Alto, CA, USA

Electrophoresis Power Supply PS 3002	GibcoBRL, Life Technologies, Karlsruhe
Elektrophoresekammer GNA 200	AP Biotech, Freiburg
Elektrophoresekammer LKB Macrophor	AP Biotech, Freiburg
Elektroporationsgerät Electro Cell Manipulator® 600	(BTX), Angew. Gentechnol. Syst. GmbH, (AGS), Heidelberg
FACSort (fluorescence-activated cell sorting system)	Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA
Geldokumentationssystem	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Hybridisierungssofen	Bachofer, Reutlingen
Kamera Basler A113 digital monochrom	Basler, Ahrensburg
Mikroskop Nikon Eclipse TE 300	Nikon GmbH, Düsseldorf
PCR-Maschinen	
Gene Amp PCR System 9600	Perkin Elmer, Weiterstadt
RoboCycler® Gradient 96	Stratagene, Heidelberg
LightCycler	Roche, Mannheim
Photometer	
Gene Quant	AP Biotech, Freiburg
Shimadzu UV-210 A	Shimadzu, Stuttgart
Pipetten	Gilson, Abimed, Langenfeld Eppendorf, Hamburg
Rotoren für Sorvall Zentrifuge	
GSA (Festwinkelrotor)	DuPont, Bad Homburg
HB-6 (Swing out rotor)	DuPont, Bad Homburg
SS34 (Festwinkelrotor)	DuPont, Bad Homburg
Scintillationszähler LKB Wallac 1209 Rackbeta	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator (UV, 302 nm)	Bachofer, Reutlingen
Vakuumkonzentrator	
Speedvac® SC 110	Bachofer, Reutlingen
Vapor Trap	BioRad, München
Pumpe	Emerson, St. Louis, MO, USA
Zentrifugen	
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Megafuge 1.0RS	Heraeus, Hanau
Sorvall RC 5B	DuPont, Bad Homburg
Hettich Rotanta IS	Hettich, Tuttlingen

2.1.11 Sonstige Hilfsmittel

Cronex Verstärkerfolie	Du Pont, Bad Homburg
Elektroporationsküvetten Gene Pulser®	
0,2 mm Spaltbreite für Prokaryonten	BioRad, München
0,4 mm Spaltbreite für Eukaryonten	BioRad, München
Hybond N ⁺ -Nylonmembran	AP Biotech, Freiburg
MicroSpin™ Columns S-400 HR	AP Biotech, Freiburg
Reaktionsgefäße verschiedener Größen	Perkin Elmer, Weiterstadt
Röntgenfilme Fuji-RX	Fuji, Düsseldorf
Einfrierampullen (1,8 ml)	NUNC, Wiesbaden-Biebrich
Einmal-Filterhalter 0,2µm FP 030/3	Schleicher & Schuell, Dassel
Filtrierkarton (Blot)	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebekulturröhrchen (12 ml)	Greiner, Nürtingen
LightCycler-Kapillare	Roche, Mannheim
Microlance® 3 Kanülen, diverse Größen	Becton Dickinson, Heidelberg
Petrischalen (Zellkultur)	Becton Dickinson, Heidelberg
Qia shredder	Qiagen, Hilden
Rundboden Röhrchen 12x75 mm (Polystyrol)	Becton Dickinson, Heidelberg
6 well tissue culturing plate	Greiner, Nürtingen
Zählkammer, Typ Neubauer	Merck, Darmstadt
Zellkulturflaschen	NUNC, Wiesbaden-Biebrich
Disposable Cell Scraper, 25 cm	Sarstedt, Ulm

2.1.12 Software

Cell Quest™	Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA
Cyrillic	Cherwell Scientific Publishing, Frankfurt
Fragment Manager	AP Biotech, Freiburg
GCG-Programmpaket (The Wisconsin Sequence Analysis Package, 1994)	Genetics Computer Group, Madison, USA
LightCycler Software Version 3.39	Roche, Mannheim
Lucia 32 G on MV 1500 Version 4.21	Nikon GmbH, Düsseldorf
Oligo™ 4.0 Primer Analysis Software	Medprobe, Oslo, Norwegen
Sequence Analyzer	AP Biotech, Freiburg
StatView™	SAS Institute Inc., Carey, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fibroblasten stammen ausschließlich aus einer von Prof. R. Brenner (Abt. Orthopädie, Universität Ulm) initiierten, von Dr. J. Seidel (Universitäts-Kinderklinik Jena) ergänzten und von der Arbeitsgruppe Osteogenesis imperfecta (OI) (Abt. Humangenetik, Universität Ulm) weitergeführten Zellbank für OI-Patienten. Dadurch konnte auf ein klinisch und biochemisch gut charakterisiertes Patientenkollektiv zurückgegriffen werden. Mittlerweile dürfte sich die Anzahl der Patienten auf über 200 belaufen, was angesichts der Seltenheit der Erkrankung doch sehr beachtlich ist (Inzidenz 1:10.000-30.000 je nach Autor) und zumindest im europäischen Raum unvergleichliche Möglichkeiten zur weiteren Erforschung der Krankheit bietet.

Die Lagerung der Zellen (zwischen 3×10^5 und $1,5 \times 10^6$ Zellen) erfolgte in Kulturmedium mit 7,5% DMSO in Stickstofftanks mit flüssigem Stickstoff, nachdem eine mindestens 2-3 stündige Aufbewahrung in der Gasphase vorausgegangen war.

2.2.1.1 Kultivierung von Fibroblasten/Osteoblasten

Bei Fibroblasten handelt es sich um adhärente Zellen, bei deren Kultivierung darauf geachtet werden muß, daß ein ausreichender Zellkontakt besteht. Bei einer gut wachsenden Kultur kann meist einmal wöchentlich subkultiviert werden. Ansonsten sollte zirka alle 3 Tage ein Mediumwechsel erfolgen. Bei schlechtem Wachstum können dem Medium noch essentielle Aminosäuren zugesetzt werden. Fibroblastenkulturen wurden aus Hautbiopsien und Osteoblastenkulturen wurden aus Knochengewebe im Rahmen von Osteotomien der Patienten angelegt. Die Zellen wurden bei 5% CO₂ in DMEM, supplementiert mit 10% FKS, kultiviert.

2.2.1.2 Kultivierung von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen sind eine adhärente Zelllinie, welche von einem Zervixkarzinom abstammt und die bei 37°C, 5% CO₂ und 1x MEM-Vollmedium im Brutschrank kultiviert wurde. Die konfluenten Kulturen wurden subkultiviert (i.d.R. alle 2-3 Tage). Dafür wurden zunächst mit 1x Hanks-Lösung die FKS-Reste sowie tote Zellen/Zelltrümmer entfernt und mit 0,15% Trypsin/EDTA für zirka 2 Minuten im Brutschrank inkubiert. Durch leichtes Klopfen ließen sich die Zellen vom Kulturflaschenboden ablösen und durch die Zugabe von Vollmedium (enthält FKS) wurde Trypsin inaktiviert. Abschließend wurden die Zellen 8 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und der

Überstand wurde mit Hilfe einer Pumpe abgesaugt. Die Zellen wurden in maximal 1 ml Vollmedium gut resuspendiert und auf neue Kulturflaschen verteilt. HeLa-Zellen besitzen einen hypotetraploiden Karyotyp mit einem Polyploidiegrad von 15% (DMSZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

2.2.1.3 Kultivierung von 293 Zellen

Auch bei dieser Zelllinie handelt es sich um adhärenente Zellen, die von der embryonalen Niere abstammen und mit Adenovirus 5 DNA transformiert und somit permanent gemacht worden sind. Es sind epitheliale Zellen, die nach Festlegung der ZKBS (Zentrales Komitee für Biologische Sicherheit, Berlin) auch unter S1-Bedingungen kultiviert werden dürfen, obwohl sie das transformierende Gen des Adenovirus 5 exprimieren. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, 7,5% CO₂-Partialspeannung und 1x DMEM-Vollmedium im Brutschrank (10% FKS, fötales Kälberserum). Die 293 Zellen lösten sich leicht vom Untergrund der Zellkulturflasche durch die Zugabe von 1x PBS (Dulbecco) und leichtes Klopfen ab, so daß keine Trypsinierung notwendig war. Die Zelllinie 293 hat einen hypotriploiden Karyotyp mit Polyploidiegrad von 6% (DMSZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

2.2.1.4 Kultivierung von Saos-2 Zellen

Saos-2 Zellen sind adhärenente, epitheliale Knochenzellen, die von einem humanen Osteosarkom stammen. Das Wachstum der Zellen erfolgte bei 37°C im Brutschrank mit 7,5% CO₂ und 1x DMEM-Vollmedium und 15% FKS (fötales Kälberserum). Das Abtrypsinieren erfolgt wie unter 2.2.1.2 beschrieben. Diese Zellen haben einen hypotriploiden Chromosomensatz mit 56 Chromosomen (ATCC) bzw. einen hochgradig rearrangierten hyperdiploiden Karyotyp mit einem Polyploidiegrad von 16% (DMSZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

2.2.1.5 Einfrieren von Zellen zur RNA-Extraktion

Um genügend Zellmaterial für die Isolation von RNA zu erhalten ist es notwendig mehrere Kulturflaschen (175 cm²) mit Zellen heranzuziehen. Zunächst wurde der Indikatorfarbstoff Phenolrot aus den Kulturen entfernt, indem die Zellen abwechselnd mit 1x PBS gespült und pelletiert wurden. Dieser Vorgang wurde dreimal durchgeführt und die Zellen wurden anschließend mit einer Zellzahl von 5×10^6 - 1×10^7 Zellen (je nach Kit ist eine unterschiedliche Zellzahl erforderlich) auf mehrere Einfrierampullen aufgeteilt, da bei jeder RNA Isolierung eine Ampulle gebraucht wurde. Die Zellpellets wurden ohne weitere Zusätze bei -70°C aufbewahrt.

2.2.2 Isolierung von DNA

2.2.2.1 Isolierung von DNA aus EDTA-Blut (nach Miller et al. 1988)

Proteolyse:

Zunächst wurde die 10 ml Blutprobe mit 30 ml Lysepuffer versetzt und 30 min. auf Eis inkubiert. 5 ml steriler SE-Puffer diente zum Resuspendieren des Zellpellets, danach erfolgte eine Proteinase K-Behandlung (50 µg Enzym/ml Puffer) mit anschließender Zugabe einer SDS-Lösung (Endkonzentration 1%). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 55°C.

DNA-Extraktion:

Von einer gesättigten sterilen 6 M NaCl-Lösung wurden 1,5 ml zum Lysat dazugegeben und 15 Sekunden gut gemischt; anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt (15 Minuten mit 4500 U/min bei Raumtemperatur).

Die DNA wurde aus dem Überstand mit 100%igem Ethanol präzipitiert (20 ml) und zirka 3 Minuten langsam hin und her gewippt, bis die DNA ausfiel. Mit einem sterilen Spatel konnte die DNA herausgefischt und mit 70%igem Ethanol gewaschen werden. Anschließend wurde sie in TE-Puffer (1 Stunde bei 37°C) gelöst und auf eine Konzentration 500 µg/ml eingestellt.

2.2.2.2 Isolierung von DNA aus Zellkultur (modifiziert nach Miller et al. 1988)

Die konfluent gewachsenen Zellen wurden abtrypsiniert und einmal mit 1x PBS (Dulbecco) gespült. Durch Zentrifugation (10 Minuten, 1000 rpm) wurde das Zellpellet gesammelt, das anschließend mit 5 ml SE-Puffer resuspendiert und mit 500 µl 10% SDS plus 30 µl Proteinase K (10 mg/ml) versetzt wurde, um es anschließend über Nacht bei 55°C zu inkubieren. Die weiteren Schritte erfolgten wie unter 2.2.2.1 beschrieben.

2.2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA (nach Birnboim und Doly 1979)

Für eine Isolierung einer kleinen Menge reichte ein Ansatz von einem gepickten Klon in 4 ml ÜN SOB_{amp} Kultur aus, die dann mit dem GFX™ Micro Plasmid Purification Kit (APBiotech) durchgeführt wurde. Für die Transfektionsversuche wurde ca. 1 ml Vorkultur in 500 ml SOB_{amp} Kultur überimpft und am nächsten Tag mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit mit der Methode der alkalischen Lyse in Gegenwart des Detergenz SDS nach Herstellerangaben durchgeführt. Durch schnelle Neutralisierung blieben Proteine denaturiert, während Plasmide renaturieren konnten. Nach der Zelllyse erfolgte die Abtrennung von Proteinen, Zelldebris und hochmolekularer DNA durch Zentrifugation/Filtrieren. Anschließend wurde das Plasmid mittels Reverser Phasenchromatographie (RPC) über eine Säule mit mehreren Waschschritten weiter aufgereinigt.

Nach der Elution der Plasmid-DNA wurde diese zunächst mit Isopropanol und dann mit 70% Ethanol gefällt und gewaschen. Das so gewonnene Plasmid wurde in 1x TBE gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt.

2.2.3 Extraktion von RNA aus Fibroblasten/Osteoblasten

2.2.3.1 Extraktion von messenger RNA (mRNA)

Für die direkte Isolierung polyadenylierter mRNA aus eukaryontischen Zellen wurde der Quickprep™ mRNA Purification Kit von Pharmacia verwendet. (Ein Teil der RNA der Patienten wurde mit dem Dynabeads® mRNA DIRECT Kit nach Angaben der Produzenten isoliert). Zum Homogenisieren wurde das Lysat mit einer Spritze, die eine enge Kanüle (0,4 mm x 19 mm) besitzt, mehrmals aufgezogen. Alternativ wurde das Lysat mit QIAshredder-Säulen (Qiagen) homogenisiert. Die poly(A)⁺-RNA wurde auf Oligo(dT)-Zellulose-Säulen gebunden und zunächst mit High Salt Puffer mehrmals resuspendiert und anschließend mit Low Salt Puffer ohne Resuspension versetzt. Dabei erfolgte auch die DNA-Entfernung. Nach der Elution erfolgte die Fällung der RNA in 1/10 Volumen Kaliumacetat, 2 Volumen Ethanol absolut und 10 µl Glykogen als Präzipitationshilfe (ÜN bei -20°C). Als nächstes erfolgte ein Waschschriff mit 80%igem Ethanol, abschließend wurde die RNA in 1x TE-Puffer gelöst und dabei 15 Minuten auf Eis stehen gelassen. Für die Konzentrationsbestimmung durch photometrische Messung wurde ein Aliquot entnommen. Die Aufbewahrung der mRNA erfolgte bei -70°C bis zur cDNA Umschreibung.

2.2.3.2 Extraktion von totaler RNA (Gesamt RNA)

Für diese Art der Extraktion wurde der RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Die Zellen wurden zunächst mit Lysispuffer (stark denaturierender GITC-Puffer, inaktiviert RNAsen, GITC: Guanidiniumisothiocyanat) und Mercaptoethanol versetzt und anschließend mit einer Spritze und einer dünnen Kanüle geschert, so daß bei diesem Schritt auch gleichzeitig die DNA mit zerkleinert wurde. Das Lysat wurde auf eine Silikagelmembran mit 70%igem Ethanol überführt um eine optimale Bindung an die Membran zu erhalten. Mit dieser Methode wurden längere RNA Moleküle angereichert. Nach einer Reihe von Wasch- und Zentrifugationsschritten wurde die Gesamt-RNA mit DEPC-H₂O (DEPC: Diethylpyrocarbonat) eluiert. Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA wurde die Probe 1:100 mit Aqua injectabile verdünnt und bei der Wellenlänge 260 nm (und 280 nm) gemessen. Eine RNA-Konzentration von 40 µg/ml ist einer OD₂₆₀=1 (OD: optische Dichte) entsprechend. Die RNA-Proben werden bei -70°C aufbewahrt.

2.2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Durch die PCR-Methode (engl. polymerase chain reaction) (Saiki et al., 1988) können kurze und spezifische Abschnitte der DNA kopiert und amplifiziert werden. Für das zu vervielfältigende DNA-Fragment werden zwei flankierende Oligonukleotide (Primer) gesucht, die eine komplementäre Sequenz zur Matrize haben und deren 5' Terminus die Produktlänge begrenzt. Die DNA-Polymerase braucht einen kurzen Abschnitt doppelsträngiger DNA, um einen Startpunkt zu finden. Die zu amplifizierende DNA wird bei einem bestimmten Ionenmilieu, den Primern, der Nukleotidtriphosphaten (dNTPs) und einer thermostabilen DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase, ein rekombinantes und modifiziertes Enzym von *Thermus aquaticus*, einem Bakterium aus heißen Quellen) zu sehr hohen Kopienzahlen (exponentiell) innerhalb kurzer Zeit repliziert. Dabei verläuft die Reaktion in sich wiederholenden Schritten von Denaturierung, Primeranlagerung (annealing) und Primerverlängerung (extension). Die Hitzestabilität der Enzyme ist wichtig für die vielen Denaturierungsschritte während der PCR. Bei schwer zu amplifizierenden DNA-Abschnitten ist es oft notwendig, noch weitere Zusätze hinzuzufügen, dabei haben sich z.B. DMSO, Betain, TMAC (Tetramethylammoniumchlorid) und deaza-NTPs bewährt. Letztere verhindern das Ausbilden von intramolekularen stabilen Sekundärstrukturen, sogenannte "loops", wobei das Guanin mit sich selbst paaren kann statt mit Cytosin.

Die Amplifikationsbedingungen für die einzelnen PCR-Reaktionen sind in Kap. 2.1.3 bzw. in Tab. 3.4.1 zu finden.

Spezielle PCR-Anwendungen						
PCR Standard-protokoll			Nullmutationsscreening (Primer 12FPvu und 12RPvu)		Sp1 Transkriptionsfaktor- anbindungsstelle (Primer 11FP1841Sp1 und 11RP2047Sp1)	
	Zeit	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit	Temperatur
Initiatiale Denaturierung	4 min	95°C	4 min	95°C	4 min	95°C
Denaturierung	30 sec	95°C	30 sec	95°C	50 sec	94°C
Annealing	30 sec	*	10 Zyklen, 20 Zyklen jeweils 45 sec	52°C, 64°C	10 sec, Steigerung (ramp):	62°C 1°C pro 10 sec
Extension	30-45 sec	72°C	1 min	72°C	15 sec	72°C
Finale Extension	5 min	72°C	7 min	72°C	5 min	72°C
	30 Zyklen RoboCycler® Gradient 96		30 Zyklen RoboCycler® Gradient 96		35 Zyklen Gene Amp PCR System 9600	

Tab. 2.2.4.1 PCR Amplifikationsbedingungen für genomische DNA

*variabel, siehe Kapitel 2.1.3

Beim PCR Standardprotokoll wurde aufgrund der großen Fragmentgrößen für die Primerpaare VitDF/VitDRBsm die Elongation in den einzelnen Zyklen auf 1 Minute und bei VitDF/VitDRAPaTaq auf 2 Minuten erhöht.

2.2.4.1 Real-Time-PCR (LightCycler)

Der LightCycler ist ein PCR-Gerät, kombiniert mit einem Fluorimeter (Lichtquelle LED: Licht-emittierende Diode), das eine Spezialoptik für die Messung von Mikrovolumina nutzt. Mit Hilfe des LightCyclers ist es nicht nur möglich, schnelle Zyklus-Zeiten zu erreichen, sondern auch ein Überwachen der PCR-Reaktionskinetik, wodurch eine schnelle Optimierung der Reaktionsparameter sowie quantitative PCR- und RT-PCR-Messungen möglich werden. Es werden Borsilikatglaskapillaren verwendet, die ein günstiges Ober-fläche zu Volumen-Verhältnis haben und somit den effizienten Hitzetransfer ermöglichen. Gleichzeitig dienen sie auch als optisches Element zur Sammlung des Lichts. Die Anlagerung von SybrGreen wird am Ende der Elongationsphase mit einem 530 nm Filter gemessen, wenn die größte Menge an doppelsträngiger DNA vorliegt. Mit Hilfe der DNA-Schmelzpunktanalyse wird das Amplifikationsprodukt überprüft. Zur einfacheren Analyse der Schmelzkurve wird die erste Ableitung ($-d$ Fluoreszenz/ d Temperatur versus der Temperatur) von der Software erstellt. Die Eichgerade des Standards (Kontroll-DNA K30) wurde durch serielle Verdünnung hergestellt von 1 µg bis 0,25 µg in 1:2 Verdünnungsschritten. Bei der LightCycler PCR mußte eine höhere Magnesiumchloridkonzentration für die PCR eingesetzt werden und bereits bestehende Standard-PCR-Protokolle mußten neu etabliert werden. Bei einer Temperatur von 67°C und 4 mM MgCl₂ konnte die Optimierung der PCR Reaktionsparameter abgeschlossen werden. Das Amplifikationsprotokoll setzte sich folgendermaßen zusammen (Tab. 2.2.4.1.1):

Segment	Temperatur	Zeit	Anstieg Temperatur/Zeit (ramp)	Meßmodus
Vorinkubation (1 Zyklus)				
1	95°C	600 sec	20°C/sec	—
Amplifikation (45 Zyklen)				
1	95°C	15 sec	20°C/sec	—
2	67°C	8 sec	20°C/sec	—
3	72°C	15 sec	20°C/sec	Einzelmessung
Schmelzkurvenanalyse (1 Zyklus)				
1	95°C	0 sec	20°C/sec	—
2	65°C	15 sec	20°C/sec	—
3	95°C	0 sec	0,1°C/sec	kontinuierliche Messung
Kühlen (1 Zyklus)				
1	40°C	30 sec	20°C/sec	—

Tab. 3.4.1.1 LightCycler Amplifikationsbedingungen

Die Fluoreszenzkanäle wurden auf die Werte F1-Kanal: 5, F2-Kanal: 15 und F3-Kanal: 30 eingestellt mit dem Kanal-Setting: F1/1.

2.2.5 Reverse Transkription (RT-PCR)

Mit Hilfe des Gene Amp[®] RNA PCR Kits erfolgte die reverse Transkription der RNA zu first strand cDNA. Die Arbeitsanweisungen aus dem Kit wurden modifiziert, da die Kollagengene schwierig zu amplifizieren sind. Bei der Umschreibung (20 µl) wurde die MuLV Reverse Transkriptase (aus Murinen Leukämie Virus; 2,5 Units) mit 1 Unit RNase Inhibitor und 5 mM MgCl₂ sowie Random Hexamers verwendet. Durch Verwendung eines Amplifikationsprimers statt der Random Hexamers konnte z.T. eine Erhöhung der Spezifikation erreicht werden. Die dNTPs wurden in einer Endkonzentration von 1 mM eingesetzt und 30-35 pmol Primer wurden verwendet. Für die RT-PCR wurden 50 ng mRNA bzw. 1 µg totaler RNA eingesetzt. Für die nachfolgende Amplifikation der doppelsträngigen cDNA (100 µl) wurden 0,5 µl AmpliTaq DNA-Polymerase (5 U/µl) eingesetzt, das entspricht 2,5 U/100 µl mit variierenden Magnesiumchloridkonzentrationen. Die reverse Transkription erfolgte in einem Zyklus unter folgenden Bedingungen: 15 min. bei 42°C, 5 Minuten bei 99°C zur Inaktivierung und 5 Minuten bei 5°C. Die RT PCR Bedingungen nach der reversen Transkription befinden sich in der Tab. 2.2.5.1.

	Protokoll 1		Standardprotokoll	
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95°C	105 s	95°C	2 min
Denaturieren	95°C	15 s	95°C	30 sec
Annealing	*°C	20 s	*°C	30 sec
Extension	72°C	1 min	72°C	30 sec
Finale Extension	72°C	7 min	72°C	5 min

Tab. 2.2.5.1 RT PCR Amplifikationsbedingungen nach der reversen Transkription

* variabel, siehe Kapitel 2.1.3

2.2.6 DNA-Gelelektrophorese

Makromoleküle lassen sich umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts auftrennen. Für die Auftrennung der PCR-Produkte wurden zunächst Testgele mit einer Agarosekonzentration von 1-2% hergestellt. Ein Längenstandard gab Aufschluß über die Größe der zu erwartenden Fragmente. Der Bromphenolblau-Farbstoff komigriert etwa mit einer DNA von 500 bp Länge, damit ließ sich das Laufverhalten der Probe abschätzen. Anschließend wurde die DNA mit Ethidiumbromid (50 µl/500 ml) gefärbt und mit Hilfe eines Transilluminators im UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht. Die Elektrophorese wurde bei 160 Volt und einer Dauer von 1,5 Stunden durchgeführt. Höherprozentige Gele mit besseren Trennungseigenschaften, z.B. Nu Sieve®-Agarose, wurden für die Elektrophorese von Restriktionsverdauprodukten verwendet.

2.2.7 Restriktionsverdau von Plasmiden und genomischer DNA

Für die DNA-Analysen mit Restriktionsenzymen wurde nach Standardprotokollen gearbeitet, wobei die Reaktionsbedingungen der Hersteller berücksichtigt wurden.

2.2.8 Mutationsscreening mittels CSGE-Methode (nach Ganguly et al. 1993)

Eine ganze Reihe von Methoden sind entwickelt worden um schnell und zuverlässig Einzelbasenaustausche in DNA-Sequenzen zu erfassen (Cotton 1993). Bei der CSGE-Methode (conformation sensitive gel electrophoresis) werden mild denaturierend wirkende Substanzen eingesetzt, die die Eigenschaft der durch Mutationen hervorgerufenen Einzelbasenfehlpaarungen (mismatch) nutzen, um Konformationsänderungen zu produzieren. Diese Konformationsänderungen schlagen sich dann in einem veränderten Wanderungsverhalten der DNA- Homo- und Heteroduplices in der Gelelektrophorese nieder. PCR-Produkte im Bereich von 200-800 bp können untersucht werden. Für die Gelelektrophorese wurden Platten mit einem Spacerabstand von 1 mm verwendet. Die beste Trennleistung wurde in einem 6% igen Polyacrylamidgel (29:1 Acrylamid/Bisacrylamid), polymerisiert in 10% (v/v) Ethylenglycol/ 15% (w/v) Formamid (siehe Erratum 29%)/ 0,5x Tris-Taurin-Puffer (TTE) mit APS und TEMED, erreicht. Vor der Elektrophorese wurden die PCR-Produkte mit 10 mM EDTA (Endkonzentration) versetzt. 20 µl jeder Probe wurden 5 min. bei 98°C denaturiert und anschließend 30 min. bei 68°C inkubiert, um eine Heteroduplexbildung zu erlauben. 4 µl wurden dann auf das Gel aufgetragen, versetzt mit gleicher Menge eines Ladepuffers, bestehend aus 20% (v/v) Ethylenglycol/ 30% (w/v) Formamid/ 0,025% Xylencyanol FF/ 0,025% Bromphenolblau. Ein 0,25x TTE-Puffer wurde in der oberen Kammer und ein 1x TTE-Puffer in der unteren Kammer als Elektrodenpuffer verwendet. Ein

Elektrophoresenvorlauf erfolgte bei 45 W für 15 min, die Proben wurden dann ebenfalls bei 45 W aufgetrennt. Ein Temperaturgradient von 35°C im oberen Teil des Gels und 38°C im unteren Bereich des Gels wurde durch die Autoren vorgeschlagen (Ganguly et al., 1993), konnte jedoch, gerätetechnisch bedingt, nicht verwirklicht werden. Die Gellauftemperatur wurde auf 37°C eingestellt. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde mit 1 µg/ml Ethidiumbromid für 6 min. gefärbt und anschließend für 12 min. entfärbt. Eine vorsichtige Sektion des relevanten Gelbereichs bei der Auflage des Gels auf dem Trans-illuminator war erforderlich, weil das Gel eine sehr zerbrechliche Struktur aufweist. Es gibt inzwischen ein modifiziertes CSGE-Protokoll (Spotila et al., 2000).

2.2.9 Sequenzierung (nach Sanger 1977)

Die von Sanger eingeführte Methode des Kettenabbruchs durch Didesoxynukleotide (ddNTPs) wurde verwendet in Kombination mit einem automatischen Sequenziergerät, dem ALFexpress™ (Ansorge et al., 1993). Das Prinzip ist das gleiche wie bei einer PCR-Reaktion. Zusätzlich werden noch Nukleotide eingesetzt, die nicht nur in der 2' Position der Ribose keine OH-Gruppe tragen, sondern auch in der 3'-Position. Solche Dideoxynukleotide können zwar noch eingebaut werden, die Kette wird jedoch an dieser Stelle abgebrochen. Denaturierende Standardsequenziergele (6%, 19:1 Acrylamid/Bisacrylamid) wurden mit einer Dicke von 0,5 mm verwendet. Die Trennleistung wurde in einem 7%igen Polyacrylamidgel bei einer Spacerdicke von 0,3 mm und veränderten Laufbedingungen noch verbessert. Plasmide (große Fragmente) wurden in LongRanger Acrylamid aufgetrennt. 0,5x bis 1x TBE wurden als Laufpuffer eingesetzt. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurden diese denaturiert. Für die verschiedenen Gele wurden jeweils spezielle Laufbedingungen für die Gelelektrophorese eingestellt (Tab.2.2.9.1).

Protokollname	'0,5 mm Stand'	'longranger 1'	'longranger 2'	'Repro 0,3 mm'	'Repro 0,5 mm'
Spannung	1500 V	1500 V	800 V	1500 V	1500 V
Stromstärke	38 mA	38 mA	60 mA	60 mA	38 mA
Leistung	34 W	34 W	25 W	25 W-30 W	34 W
Temperatur	55°C	55°C	55°C	55°C	55°C
Meßintervall	2 sec.	2 sec.	2 sec.	2 sec.	2 sec.

Tab. 2.2.9.1 Laufbedingungen der verschiedenen Sequenziergele

Die über MicroSpin S-400 HR Säulen gereinigten PCR-Produkte (25-100 ng) wurden mit dem Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP und die Plasmide (5µg) mit dem ALFexpress™ AutoRead™ sequencing Kit mit der T7-Polymerase (beides

APBiotech) mit CY-5 markierten Primern, wie von den Herstellern angegeben, sequenziert. Das Cycle-Sequencing wurde wie folgt vorgenommen: Nach 5 min. Inkubation bei 96°C erfolgte anschließend eine lineare Amplifikation: 30 sec. 96°C, 10 sec. 60°C und 20 sec. 72°C (25 Zyklen) ohne einen finalen Extensionsschritt. Bei dem AutoRead™ Sequencing Kit konnte eine Verbesserung der Sequenzierleistung bei Erhöhung der Temperatur auf 42°C (statt 37°C) festgestellt werden.

Die Software GCG (Devereux et al., 1984) bietet die Möglichkeit der Auswertung der Sequenzdaten (Programm Fasta, siehe auch Pearson und Lipman, 1988). Dabei wird die Methode von Wilbur und Lipman (1983) verwendet. Über das Internet können die Sequenzen auch online bei der NCBI World Wide Web Home Page (The Wisconsin Sequence Analysis Package) analysiert werden (Programm Blast, Altschul et al., 1997). Blast kann aufgrund des unterschiedlichen Algorithmus ein anderes Ergebnis liefern.

2.2.10 Fragmentanalyse

Die Fragmentanalyse stellt eine Möglichkeit für die Analyse von PCR-Produkten dar. Durch Fragmentanalyse wurden die Polymorphismen im Rahmen der Assoziationsstudie von folgenden Genen VDR (Poly A), BGN, TGF- β 1 und IGF-I untersucht. Beim Nullmutationsscreening wurden die Marker (ACT)_n (Pepe 1993) und 4 bp Insertion der 3' untranslatierten Region von COL1A1 auf Heterozygotie (Nuytinck et al., 1998) getestet. Bei der Untersuchung des Bruck-Syndroms wurden die Mikrosatelliten D17S969, D17S2196 und D17S1294 aus dem chromosomalen Bereich 17p12 für die Segregationsanalyse verwendet. Ermittelte Allelgrößen und Stammbaumdaten der Familien wurden mit der Software Cyrillic ausgewertet. Für die Fragmentanalyse wurden interne und externe Standards benötigt, um die Verschiebung der Peaks durch lokal veränderte Laufbedingungen zu korrigieren und die exakte Fragmentgröße bestimmen zu können. Eine Referenz-DNA mit bekannter/n Fragmentgröße(n) war unentbehrlich für die Berechnung der Fragmentgröße der Probe. Vor dem Probenauftrag erfolgte eine Denaturierung. Folgende Laufbedingungen wurden eingestellt: 1500 V, 38 mA, 15 W, 50 °C und in einem Meßintervall von 2 sec. wird gemessen (bei VDR: Poly A). Bei den mit UV-Licht polymerisierten Gelen wurde die Temperatur auf 55°C hochgesetzt. Die Stromstärke wurde auf 60 mA und die Leistung auf 30 Watt bei den Gelen zur Analyse des (ACT)_n VNTRs erhöht. Die Laufzeit war abhängig von der Fragmentgröße. Für die PCR-Reaktion wurden CY5 markierte Primer benötigt. Die Längenstandards waren z.T. kommerziell erworben und z.T. selbst hergestellt gewesen. Es wurden 6%ige denaturierende Polyacrylamidgele verwendet und ein 0,6x TBE wurde als Laufpuffer eingesetzt. Bei Verwendung von 0,3 mm statt 0,5 mm dicken Gelen mußte durch die schnellere Laufgeschwindigkeit die Leistung von 25 Watt auf 15 Watt reduziert

werden und der Laufpuffer auf bis zu 1x TBE erhöht (Meßintervall 1 sec.) werden. Die Auswertung erfolgte mit der ALFexpress Fragmentmanager Software.

2.2.10.1 Statistische Analyse

Die Tests für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurden durchgeführt, indem beobachtete und erwartete Genotypen miteinander verglichen wurden. Das Kopplungsungleichgewicht zwischen den unterschiedlichen polymorphen Stellen und den verschiedenen ethnischen Gruppen wurde mit dem Chi-Quadrat-Test abgeschätzt. Die Genotypen wurden als ein kategorischer Faktor in eine logistische Regressionsanalyse eingegeben, um den Einfluß auf den Schweregrad der Erkrankung abzuschätzen. Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des StatView[®]-Programms (SAS Institute Inc., USA, 1998) durchgeführt.

2.2.11 Klonierung

Klonierung ist die Vermehrung genetisch identischer Organismen. Im molekularbiologischen Sinn wird dieser Begriff heute erweitert auf die in vitro Herstellung rekombinanter DNA, sprich die Transformation eines neuen DNA-Konstrukts in Bakterien und deren Rückgewinnung in größerer Menge. Bei einer Rekombination wird ein Vektor, z.B. ein Plasmid mit der zu klonierenden DNA ligiert. Solche Vektoren müssen Selektionsmarker und einen funktionierenden Replikationsursprung (ori) für den Wirtsorganismus haben. Zwei Formen der Klonierung wurden verwendet: Zum einen kann in die Multiple-Cloning-Site (Polylinker) mit Hilfe von Restriktionsverdau die neue DNA eingeführt werden, unter Verwendung von Restriktionsendonukleasen, deren Schnittstellen sich in der Multiple-Cloning-Site (MCS) befinden. Dabei werden die durch den Restriktionsverdau linearisierten Moleküle wieder in die zirkuläre Form überführt. Die Klonierung über verschiedene Restriktionsendonukleaseschnittstellen *KpnI* und *BglII* in den Oligonukleotidsequenzen hat den Vorteil der Entstehung von überhängenden Enden (sog. sticky ends) bei Verdau der PCR-Produkte und des Vektors, so daß eine Religation des Vektors unterbunden wird und die richtige Orientierung des Inserts erreicht wird. Zum anderen besitzt der Vektor bei der sehr effizienten TOPO TA Klonierung (Invitrogen) einen überhängenden Polythymidinrest an seinen 3' Termini, damit die komplementären Termini der durch die Taq-Polymerase zusätzlich angehängten Adenosinreste dort anbinden können. Das Besondere dieses Systems ist die kovalent gebundene Topoisomerase I mit Ligaseaktivität (Shuman 1994).

2.2.11.1 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

Die Religation des Vektors kann entweder durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase verhindert werden oder durch den Einsatz von zwei verschiedenen Restriktionsenzymen, die inkompatible Enden produzieren.

Ligationsansatz:

Um die Ligation durchzuführen wurden 50 ng linearisierter Vektor in einem molaren Verhältnis von 1:3 mit der Insert-DNA gemischt und mit 1 µl 1000 Units T4 DNA Ligase (NEB) in einem 10 µl Volumen mit 1/10 Puffer über Nacht bei 15°C inkubiert.

2.2.11.2 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Elektroporation:

Die Transformation wird durch Entladung einer elektrischen Spannung in einem schlecht leitenden Medium (Aqua bidest.) erreicht. Im Augenblick der elektrischen Entladung kommt es zu einem kurzzeitigen Öffnen der Zellmembran, wodurch DNA aus der Umgebung aufgenommen werden kann. Ein Elektrodenabstand von 2 mm in der Küvette ist für Prokaryonten wie Escherichia coli optimal in Kombination mit 2500 V und einem Widerstand von 129Ω. Die Küvette wurde auf Eis vorgekühlt. Beim Einstellen der Bedingungen war zu beachten, daß der kritische Wert für die Feldstärke von 12.25 kV/cm nicht überschritten wurde. 1-2 µl aus dem Ligationsansatz wurden zu 40 µl elektrokompenter Zellen gegeben und 960 µl SOC Medium nach der Elektroporation sofort dazupipettiert. Anschließend wurden die Bakterien in ein 10 ml Röhrchen überführt und 1 Stunde mit 220 rpm bei 37°C im Brutschrank geschüttelt. Auf SA-Platten wurden 200 µl der Suspension ausplattiert und ÜN im Brutschrank inkubiert.

Bei chemisch kompetenten Bakterien wurde die Transformation nach Angaben der Hersteller mit Hitzeschock durchgeführt. Sie wurden genau 30 Sekunden in einem auf 42°C vorgeheiztes Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann bis zu 1 Stunde bei 37°C auf dem Schüttler (225 rpm) wachsen gelassen um sie anschließend auszuplattieren. Am Folgetag konnte bei Vorhandensein des LacZ-Gens im Plasmid bei Verwendung von X-Gal-haltigen Agarplatten eine Blau-Weißselektion durchgeführt werden, wobei nichttransformierte Zellen in blauer Farbe erschienen. Zusätzlich erfolgte eine Überprüfung mittels PCR-Reaktion oder Plasmid-Minipräp mit Verdau mit einem geeigneten Restriktionsenzym und anschließender Anzucht zur Plasmidpräparation zum Sequenzieren oder für die Transfektion.

Diese Methode kann auch für die Transfektion von eukaryontischen Zellen (in diesem Fall Saos-2 Zellen) verwendet werden. Die zu transfizierenden Plasmide wurden mit dem Lösungsgemisch, das

aus einem 1:1 Verhältnis aus Sucrose-Phosphatpuffer und 1x PBS bestand, gemischt. Damit wurden dann die pelletierten Zellen aufgenommen und in die Küvette überführt. Der Elektrodenabstand betrug in der Küvette 4 mm. Die Transfektionsbedingungen sollten 500 μ F und 400 V nicht überschreiten. Anschließend war eine Ruhephase (5 min.) bei Raumtemperatur für die Zellen einzuhalten bevor sie in die Kulturgefäße überführt wurden.

2.2.12 Transfektion

Unter Transfektion versteht man den DNA- oder RNA- vermittelten Gentransfer. Es gibt zwei Arten von Transfektion, die stabile oder permanente, bei der die eingeschleusten Fremdgene in der Zelle persistieren, weil sie in das Genom der Wirtszelle eingebaut werden und die transiente oder abortive, bei der die eingeschleusten Gene nur vorüber- gehend aktiv sind und im Laufe weiterer Zellteilungen wieder verlorengehen.

Zellen, die für Transfektionsversuche eingesetzt werden, sollten vorher auf das Vorhandensein von Mycoplasmen getestet werden, da das die Transfizierbarkeit und die Biologie der befallenen Zellen beeinflussen kann. Ein Mycoplasmentest wurde für die zu transfizierenden Zellen durchgeführt (Hopert et al., 1993). Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Transfektionseffizienz zu messen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Kotransfektion mit einem Vektor, der das Gen für das grün fluoreszierende Protein (EGFP) besitzt, durchgeführt und es erfolgte eine anschließende Untersuchung der fluoreszierenden Zellen in einem FACSsort Gerät (Becton Dickinson). Die Generation der pGL3-Vektoren (high copy ori) erlaubt im Vergleich zu ihren Vorgängern die Messung von Luziferaseexpression in Zelltypen die sich schwer transfizieren lassen und die Untersuchung von schwachen Promotorelementen und weisen weitere Vorteile im Vektordesign auf. Die verschiedenen Zelltypen unterscheiden sich sehr in ihrer Transfizierbarkeit, deshalb muß für jede Zellart die geeignetste Transfektionsmethode herausgefunden werden. Bei der Durchführung von Transfektionsexperimenten ist weiterhin darauf zu achten, daß die Zellen sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden und keine allzu hohe Passagenummer besitzen (vom Zelltyp abhängig, nicht >30).

Kalzium-Phosphat-Methode (Rozenblatt et al., 1979)

293 Zellen wurden in eine 35 mm Petrischale (six well) ausgesät, dabei wurde eine Zellzahl von 1×10^6 gewählt, so daß sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 50%-70% aufwiesen. Ein paar Stunden vor der Transfektion fand ein Mediumwechsel statt (3 ml DMEM mit 10% FKS). 293 Zellen lösten sich leicht vom Untergrund ab, deshalb war ein vorsichtiges Arbeiten notwendig. 2-10 μ g Plasmid wurden mit 300 μ l Transfektionspuffer (1x HEPES, pH 7.03) versetzt, gemischt und

43 µl einer 1M CaCl₂-Lösung hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine halbstündige Inkubation bei RT um die Präzipitatbildung zu ermöglichen. Der pH-Wert und die eingesetzte absolute DNA-Menge hatte einen entscheidenden Einfluß auf die Transfektionseffizienz.

Transfizieren mit Effectene™ (Qiagen)

Das Transfektionsreagenz basiert auf einem nicht-liposomalen Lipid. Durch die Interaktion mit einem Enhancer kommt es zur Kondensation der DNA in einem definierten Puffersystem. Durch anschließende Zugabe des Transfektionsreagenz erfolgte die Komplexbildung der Liposomen mit der DNA.

Bei HeLa-Zellen wurden 250.000 Zellen am Vortag ausgesät. Das Verhältnis von DNA und Transfektionsreagenz konnte im Verhältnis 1:10 und 1:25 variieren, höhere Dosen waren aus Toxizitätsgründen nicht ratsam. 0,4 µg Plasmid wurden mit 3,2 µl Enhancer versetzt, gemischt und bis zu 5 min. inkubiert. Es erfolgte eine Zugabe von 10 µl Effectene™ und nach 10 sekundiger Vermischung durch Schütteln wurde bis zu 10 min. inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit 1x PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen und es wurden 2 ml DMEM Medium zugegeben. Abschließend wurden 600 µl Medium zum Transfektionsansatz hinzugefügt und sofort zu den Zellen gegeben.

Transfizieren mit DOTAP

Hierbei handelt es sich um ein kationisches liposomales Transfektionsreagenz (Lipo-fektion). Osteosarkomzellen lassen sich schwer transfizieren, DOTAP-Reagenz (Roche) scheint jedoch eine geeignete Lösung dafür zu sein. Nach den Vorgaben der Hersteller wurden die geeigneten Bedingungen eingestellt.

2.2.12.1 Messung der Transfektionseffizienz mit Hilfe eines FACS Geräts

Ein FACS Gerät (fluorescence activated cell sorting) ist ein Zellzählgerät, mit dem weitaus mehr Parameter der Zellen untersucht werden können, als mit einem herkömmlichen Zellzählgerät. Im Kanal 1 (P1) wird die Größe der Zellen gemessen (forward scattering: FSC, 180°), im Kanal 2 (P2) die Ablenkung des Laserstrahls (sideways scattering: SSC, 90°C) und im Kanal 3 (P3), dem FITC-Kanal, läßt sich bei 530 nm der EGFP-Vektor messen. Für jede Zellart müssen die Bedingungen neu geeicht werden. Die Zellen müssen mehrmals in 1xPBS gespült und gut resuspendiert sein, damit die feine Kapillare nicht verstopft.

Folgende Meßprotokolle wurden bei einem FACSort-Gerät (Becton Dickinson) für die einzelnen Zelltypen verwendet (Tab. 2.2.12.1.1):

Einstellung der Detektoren für HeLa-Zellen					Einstellung der Detektoren für 293-Zellen				
Ka-nal	Detektor-bezeichnung	Span-nung	Verstärkung (AmpGain)	Modus	Ka-nal	Detektor-bezeichnung	Span-nung	Verstärkung (AmpGain)	Modus
P1	FSC	E-1	4,40	Lin	P1	FSC	E-1	4,40	Lin
P2	SSC	330	1,00	Lin	P2	SSC	330/365*	1,00	Lin
P3	FL1	410	1,00	Log	P3	FL1	446/480*	1,00	Log
P4	FL2	435	1,00	Log	P4	FL2	360	1,00	Log
P5	FL3	400	1,00	Log	P5	FL3	400	1,00	Log
P6	FL2-A		1,00	Lin	P6	FL2-A		1,00	Lin
P7	FL2-W		1,00	Lin	P7	FL2-W		1,00	Lin
Value 54					Value 54				
keine Kompensation					keine Kompensation				
Einstellung der Detektoren für MG-63-Zellen					Einstellung der Detektoren für Saos-2-Zellen				
Ka-nal	Detektor-bezeichnung	Span-nung	Verstärkung (AmpGain)	Modus	Ka-nal	Detektor-bezeichnung	Span-nung	Verstärkung (AmpGain)	Modus
P1	FSC	E-1	4,40	Lin	P1	FSC	E-1	4,40	Lin
P2	SSC	310	1,00	Lin	P2	SSC	310	1,00	Lin
P3	FL1	420	1,00	Log	P3	FL1	400	1,00	Log
P4	FL2	349	1,00	Log	P4	FL2	349	1,00	Log
P5	FL3	369	1,00	Log	P5	FL3	369	1,00	Log
P6	FL2-A		1,00	Lin	P6	FL2-A		1,00	Lin
P7	FL2-W		1,00	Lin	P7	FL2-W		1,00	Lin
Value 52					Value 52				
Kompensation FL1 - 3,0% FL2					Kompensation FL1 - 3,0% FL2				

Tab. 2.2.12.1.1 Darstellung der Expression durch Messung der Luziferaseaktivität

* Änderung im weiteren Versuchsverlauf

2.2.12.2 Darstellung der Expression durch Messung der Luziferaseaktivität

Es gibt verschieden Möglichkeiten die Genexpression mit Reportergenen darzustellen. Der Luziferasereporter genassay wurde aufgrund seiner hohen Sensitivität (100 fach) ausgewählt. Die firefly-Luziferase (Leuchtkafer Photinus pyralis) ist ein Enzym (EC 1.13.12.7), welches die oxydative Decarboxylierung von Käfer-Luziferin in Gegenwart von Mg^{2+} , ATP und molekularem Sauerstoff katalysiert. Es entstehen Oxyluziferin, AMP, PP_i , CO_2 und Lichtemission mit der Wellenlänge 562 nm. Durch Zugabe von Koenzym A wird die Lichtemission durch den Abbau von oxidiertem Luziferin gespült, welches die Reaktion hemmt. Der Steady-Glo™ Luciferase Assay System Kit (Promega) erlaubt einen hohen Probendurchsatz und erzeugt stabilere Signale. Weiterhin wurde der Luciferase Reporter Gene Assay (Boehringer) verwendet, der nach demselben Prinzip arbeitete. Beide Kits wurden nach Angaben der Hersteller eingesetzt. Ein Aliquot wurde zur Proteinbestimmung in Zell-Lysaten bei $-20^{\circ}C$ eingefroren. Da kein Luminometer zur Verfügung stand wurden die Proben in einem Szintillationscounter gemessen.

2.2.12.3 Messung des Proteingehalts (nach Lowry et al. 1951)

Die Proteinbestimmungen wurden durchgeführt, um einen Parameter für die Luziferase-aktivität zu bekommen. Dabei wurden die cpm (counts per minute) pro Proteinmenge ins Verhältnis gesetzt um die Luziferasewerte miteinander vergleichen zu können. Bei der Lowry-Methode reagierte das Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz mit den Proteinen und bildete einen Phosphor-Wolfram/Molybdänsäure-Komplex, bei dem sich durch die Reaktion mit den Tyrosinresten eine blaue Färbung ergab, deren Extinktion photometrisch bestimmt wurde und mit der des Eichproteins (Rinderserum-Albumin: BSA) verglichen wurde. K^+ , Mg^{2+} , EDTA, Tris und Thiol-Reagenzien haben einen Einfluß auf die Reaktion. Die Reaktion ist abhängig vom Gehalt an Tyrosin. Die erhaltenen Proteinwerte sind miteinander vergleichbar, geben aber keine absoluten Werte an, da verschiedene Proteine mit unterschiedlichem Tyrosingehalt enthalten sind. Zunächst wurde eine Kalibrierkurve von 0 bis 1 mg/ml mit BSA (1mg/ml) in Schritten von 0,2 mg/ml mit 1x Lysis-Puffer hergestellt und von allen zu bestimmenden Werten wurde eine Doppelbestimmung gemacht. In Einmal-Plastik-Küvetten erfolgte die Messung bei 750 nm gegen Lysispuffer. Die Reagenzien sind kommerziell erhältlich: DC-Protein Assay (BioRad). Über die Eichgerade konnten die Konzentrationen der einzelnen Proben durch Messung ihrer Extinktion bestimmt werden.

2.2.13 Southern Blot (nach Southern 1975, Sambrook et al. 1989)

Blotten ist der Transfer von Makromolekülen auf geeignete Membranen zur Detektion. Beim Southern Blot wurden die Nukleinsäuren durch Kapillarttransfer durch die Wanderung einer hochkonzentrierten Salzlösung mitgenommen und blieben an der Membran haften. Die Analyse von Mikrosatelliten erlaubte über ihre Eigenschaft als polymorphe Marker, Informationen über die Segregation von Genloci in Familien zu bekommen. Bei den mit dieser Methode untersuchten Mikrosatelliten handelte es sich um $(CA)_n$ -Wiederholungen, die durch Verwendung eines radioaktiv markierten $(CA)_{11}$ -Oligonukleotid nachgewiesen wurden. Die PCR-Produkte wurden zur Gelelektrophorese auf ein 6%iges denaturierendes Polyacrylamidgel (0,2 mm) aufgetragen und ein 1x TBE wurde als Elektrodenpuffer verwendet. Vor der Auftrennung erfolgte ein 2 minütiger Denaturierungsschritt bei 95°C. Die Trennung der Fragmente wurde bei 50°C und 1.8 kV durchgeführt. Zur optimalen Ausnutzung des Gels wurden mehrere Fragmente verschiedener Loci mit unterschiedlicher Fragmentgröße zusammen in einer Spur aufgetrennt (Abb. 3.2.2.1).

2.2.13.1 Southern-Transfer

Der Transfer erfolgte auf eine Hybond N⁺ Nylonmembran bei Raumtemperatur. Zunächst wurde die Membran mit 1x TBE angefeuchtet und luftblasenfrei auf das Acrylamidgel appliziert.

Anschließend wurden über die Membran mehrere Lagen Filtrierkarton gelegt und mit einem Gewicht beschwert. Am nächsten Tag wurde die Membran mit der DNA-Seite auf ein mit 0,4 N NaOH getränktes Saugpapier appliziert und 15 min denaturiert. Anschließend erfolgte ein Neutralisationsschritt mit 5x SSC, bei dem gleichzeitig noch vorhandene Gelreste entfernt wurden. Zum Schluß wurde die Membran kurz luftgetrocknet und in Folie eingeschweißt. Eine Fixierung der DNA durch Inkubation bei 80°C war nicht notwendig. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.2.13.2 Herstellung radioaktiv markierter Oligonukleotidsonden für die Hybridisierung

Mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase (PNK) wurden die einzelsträngigen Oligonukleotidsonden markiert. Dabei wurde in einer Gleichgewichtsreaktion der Austausch einer Phosphorylgruppe zwischen dem 5'-Terminus der Sonde und dem radioaktiven [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP vollzogen.

Markierungsansatz:

10x One phor all Puffer	2 μl
Oligonukleotid (CA) ₁₁	100 pmol
[$\gamma^{32}\text{P}$]ATP	7 μl (37×10^4 Bq/ μl , 5000 Ci/mmol)
T4-Polynukleotidkinase (PNK)	1 μl (9,7 Units)
Aqua bidest	ad 20 μl

Der Markierungsansatz wurde 30 min. bei 37°C inkubiert und anschließend mit 1xTE auf 100 μl aufgefüllt. Ein 10 minütiger Inkubationsschritt folgte zur Enzyminaktivierung bei 80°C. Eine DEAE Sephacelsäule (Ionentauscher, 0,2 ml) wurde mit 15 ml 1xTE equilibriert. Die markierte Sonde wurde anschließend mit 2 ml 0,2 M NaCl (in TE) von nicht-inkorporierten Nukleotiden gereinigt und mit 1 ml 0,5 M NaCl (in TE) eluiert. Im Szintillationszähler wurden 2 μl der Sonde zur Kontrolle des radioaktiven Einbaus (Cerenkov-Strahlung) gemessen.

2.2.13.3 Hybridisierung und Waschen der Blots

Die Hybridisierung des Blots erfolgte in Plexiglasröhren, die mit Gummistopfen verschlossen wurden in einem Rotationsofen. Als erstes erfolgte ein Prähybridisierungsschritt des Filters mit 5x SSPE/ 10% SDS für 2 Stunden bei 60°C. Die Prähybridisierungslösung wurde nicht ausgetauscht. Das gesamte Volumen der markierten Sonde wurde dazu-pipettiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 45°C. Zum Schluß wurde der Filter 1x 20 min und 1x 15 min bei 30°C in 6x SSC gewaschen, kurz luftgetrocknet und in Folie eingeschweißt. Nach dem Waschen erfolgte wieder eine Überprüfung der Cerenkov-Strahlung des Filters. Die Autoradiografie erfolgte in

Röntgenkassetten mit Verstärkerfolie (Cronex) (Laskey und Mills 1977) auf Fuji RX Röntgenfilmen bei -80°C durchgeführt. Die Expositionsdauer richtet sich nach der Signalstärke und betrug in diesem Fall 3 Stunden.

3 Ergebnisse

3.1 Mutationsscreening bei Patienten mit Osteogenesis imperfecta (OI)

Bei den Kollagen Typ I Mutationen werden am häufigsten Glyzinsubstitutionen (79%, Wang et al., 1996) beobachtet, Exon skippings (Spleißmutationen) unter Beibehaltung des Leserahmens stehen an zweiter Stelle mit 11%. Die Häufigkeit ist sicherlich in der großen Anzahl von 52 Exons begründet. Die restlichen Mutationen sind größere Deletionen, Insertionen oder Duplikationen, die mehrere Exons umfassen. Deletionen oder Insertionen einzelner Basen findet man selten. Der Anteil rekurrerender Mutationen beträgt 20% (Körkkö et al., 1997).

3.1.1 Screening mittels CSGE-Methode brachte erste Hinweise auf Mutationen

Im Rahmen des Mutationsscreenings konnten bei Patienten mit Osteogenesis imperfecta sechs neue Mutationen gefunden werden, vier davon im *COL1A1* Gen und die anderen zwei Mutationen im *COL1A2* Gen. Wenn nicht anders erwähnt wurden alle hier dargestellten Mutationen durch direktes Doppelstrangsequenzieren der PCR-Produkte mittels zyklischem Sequenzieren erhalten. Der Aufbau des Systems für die Mutationssuche durch die Sequenzierung des *COL1A1* Gens erwies sich als schwierig, da in der Anfangszeit u.a. fehlerhafte Datenbankeinträge (D'Alessio et al., 1988, Bernard et al., 1983 und Westerhausen et al., 1991) dafür sorgten, daß einige der gesuchten Primerpaare durch mismatch nicht anbinden konnten und kein Produkt ergaben. Eine Neusequenzierung zur Aufdeckung der fehlerhaften Bereiche wurde notwendig, was durch Dalgleish (1997) geschah (GenBank Z74615).

Mutationsscreening mittels der CSGE-Methode:

Das Gen *COL1A1* hat eine genomische Größe von 18 kb und das Gen *COL1A2* von 38 kb. Da es sich bei den Kollagen Typ I Genen um mittelgroße Gene handelt, wurde ein Vorscreenen nach Mutationen auf cDNA Ebene notwendig um größere Genabschnitte abzudecken und somit eine schnellere Mutationssuche zu gewährleisten. Die CSGE-Methode (conformation sensitive gel electrophoresis) detektiert Heteroduplexbanden-bildung bei mismatch Basenpaarung, die mit Hilfe von leicht denaturierenden Agenzien detektierbar gemacht wird. Die Abbildung 3.1.1.1 zeigt alle Mutationen bei OI Patienten, die mit der CSGE-Methode gefunden worden sind, in der Übersicht.

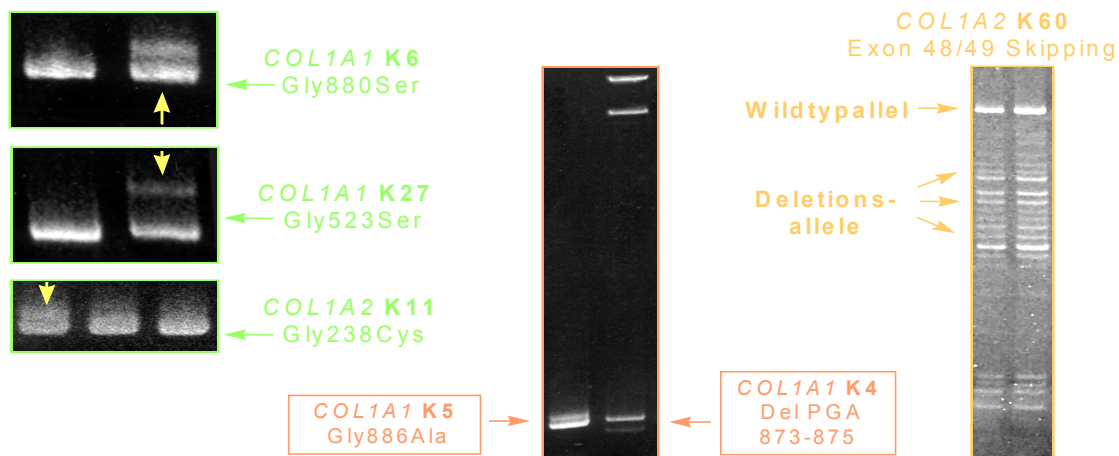


Abb. 3.1.1.1 Ergebnisse des CSGE Mutationsscreenings bei OI Patienten in den Kollagen Typ I Genen

Die Heteroduplexbanden sind jeweils durch Pfeile markiert.

Um die CSGE-Methode noch effizienter zu gestalten wurde sie erstmalig auf einem automatischen Detektionssystem (ALFexpress™ Sequenziergerät) etabliert. Es ergaben sich dadurch Vorteile in der automatischen Dokumentation und vor allem eine Zeitersparnis (Abb. 3.1.1.2.). Die Acrylamidkonzentration des Gels wurde auf 7% erhöht und durch die hohe Sensitivität des automatischen Detektionssystems wurde um die Hälfte weniger Probenmaterial benötigt. Die Proben zeigten ein sehr schnelles Laufverhalten während der Gelelektrophorese, so daß für diese Anwendung die Stromstärke verringert werden konnte. Jeweils zwei Homo- und Heteroduplexbanden wurden bei dem Patient K4 mit der klassischen CSGE-Methode detektiert und dienten dann als Positivkontrolle für die automatische Etablierung der CSGE-Methode. Dasselbe Muster aus zwei Homo- und Heteroduplexbanden wurde bei der CSGE-Methode auf dem ALFexpress™ Sequenziergerät gefunden (Abb. 3.1.1.2.).

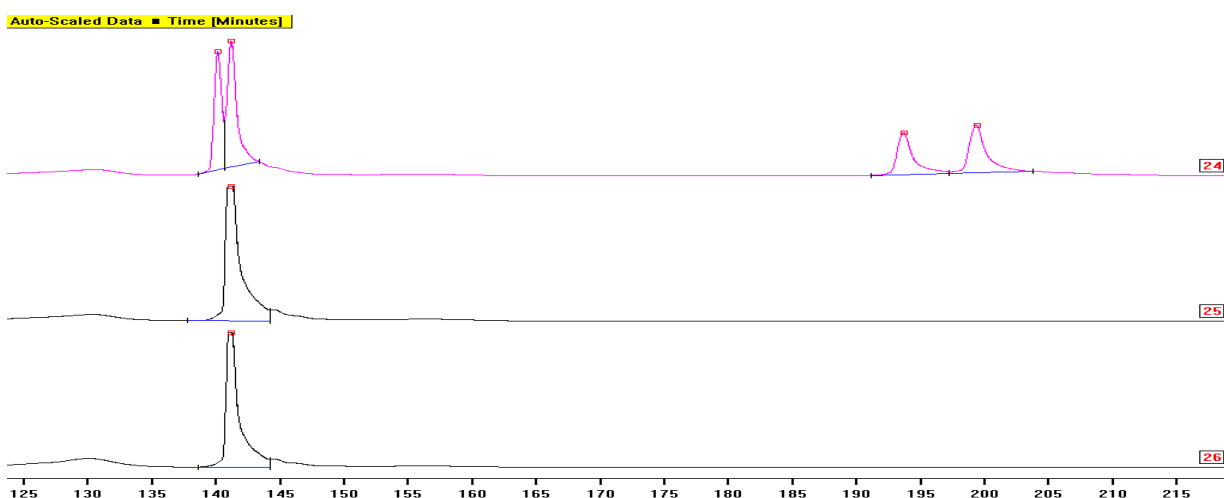


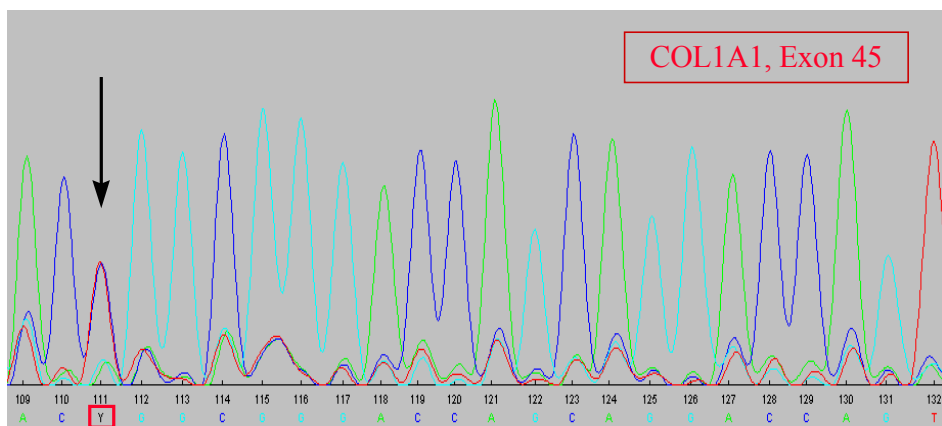
Abb. 3.1.1.2 CSGE-Mutationsscreening auf einem ALF express™ Sequencer zum Vergleich zwischen klassischer und automatischer CSGE-Methode

Die PCR-Produkte, bei denen ein verändertes Laufverhalten der Banden in der CSGE-Gelelektrophorese festgestellt werden konnte, wurden anschließend sequenziert. Dabei wurde zunächst die cDNA sequenziert und im Falle einer Sequenzveränderung wurde der entsprechende Abschnitt genomischer DNA des Patienten amplifiziert und zur Verifizierung der Mutation durch Sequenzierung herangezogen. Bei den in den Kapiteln 3.1.2 - 3.1.5 dargestellten Mutationen handelt es sich um heterozygote Mutationen.

3.1.2 Glyzinsubstitutionen als häufigste Mutationsursache bei OI Patienten

Es wurde eine Substitution im *COL1A1* Gen bei der Patientin K6 mit OI Typ IV gefunden (Abb. 3.1.2.1), bei dem im Nukleotid 3291 eine G→A Transition erfolgte (c.3172G>A) und die zu einer p.G880S Substitution führte.

Gly880Ser, GGT → AGT nt 3291, c.3172G>A
OI IV



Gly880Ser OI IV: Lund et al. 1997

Abb. 3.1.2.1 p.G880S Substitution (*COL1A1*)

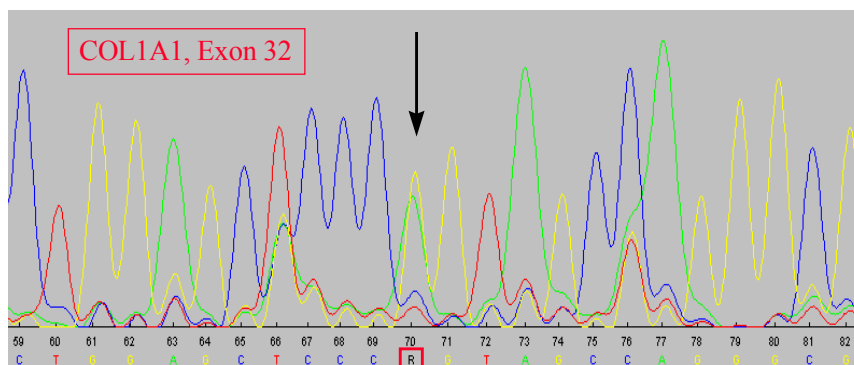
Die Mutation ist durch einen Pfeil markiert.

Bei Patient K5 wurde ganz in der Nähe eine weitere Glyzinsubstitution im *COL1A1* Gen gefunden, wobei in diesem Fall die zweite Position des für die Aminosäure Glyzin kodierenden Kodons betroffen war: GGC→GCC (Abb. 3.1.2.2). Es handelt sich hierbei um das Nukleotid 3310 (c.3191G>C) bei dem die Transversion erfolgte. Dieser Austausch führte zu einem Ersatz der Aminosäure Glyzin in der Position 886 durch die Aminosäure Alanin was den Phänotyp einer OI Typ I/IV zur Folge hatte.

[illegible]

Die Mutation ist durch einen Pfeil markiert.

OI III



OI IV: Sarafova et al. 1998

Die Mutation ist durch einen Pfeil markiert.

3.1.3 Spleißmutationen als zweithäufigste Mutationsursache bei OI

Eine Mutation ganz anderen Typs wurde bei dem Patienten K60 im *COL1A2* Gen gefunden. Exon skipping infolge einer Spleißmutation ist der zweithäufigste Mutationstyp bei OI Patienten. Dieser Fall ist besonders interessant, da bei der Sequenzierung der klonierten cDNA Fragmente verschieden lange Transkripte entdeckt wurden (Abb 3.1.3.1).

Da es sich um eine heterozygote Mutation handelt, gibt es natürlich das Normalallel (Klon 4), das weiteren Transkripte mit Verlust der letzten 30 AS des Exon 48 sowie der ersten 6 AS von Exon 49 (Verlust von 36 AS, Klon 9) und Transkripte, bei denen die letzten 15 AS von Exon 48 und die ersten 9 AS von Exon 49 verloren gehen, so daß insgesamt ein Verlust von 24 AS (Klon 5) im Leserahmen (engl. in frame) auftritt. Bei dieser Variante scheint es sich um ein sehr häufiges Transkript zu handeln, weil es unter allen untersuchten Klonen die Hälfte ausmachte. Ein weiteres, etwas längeres Transkript mit einer um 3 AS kürzeren Deletion ist beobachtet worden, bei welchem die letzten 12 AS von Exon 48 und die ersten 9 AS von Exon 49 verlorengehen, mit dem Ergebnis einer 21 AS Deletion der cDNA (Klon 3, Abb. 3.1.3.2 und Abb. 3.1.3.2). Ein weiteres Transkript mit einem Verlust von 24 AS wurde gefunden, bei dem die letzten 19 AS von Exon 48 und die ersten 5 AS von Exon 49 verloren gehen (Klon 12). Es wurden keine Transkripte mit Intronsequenzen gefunden und alle Transkripte befanden sich im Leserahmen. Nach Auftragen der cDNA des Patienten auf ein CSGE-Screening-Gel konnte eine Vielzahl von Banden detektiert werden (Abb. 3.1.1.1).

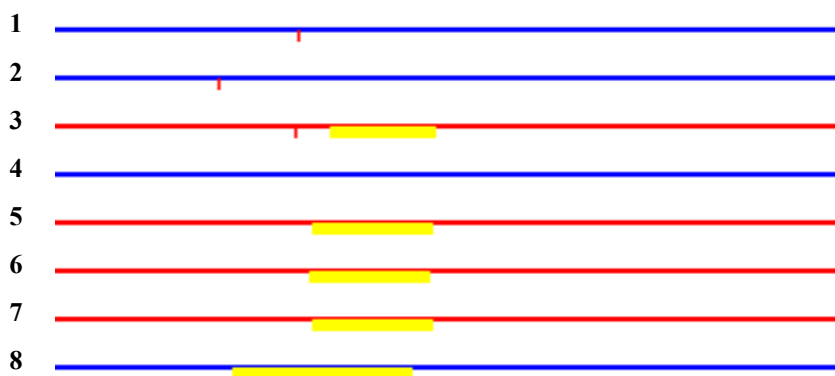


Abb. 3.1.3.1 Schematische Darstellung der Zusammensetzung der verschiedenen Deletionsallele im *COL1A2* Gen bei Patient K60

Die Abbildung zeigt den schematischen Sequenzvergleich, der mit der Sequence Analyzer Software™ durchgeführt wurde (alignment). Die Zeilen 1, 2 und 4 zeigen das Normalallel. In der Zeile 3 befindet sich der Klon mit der 21 AS Deletion. Die Zeilen 5, 6 und 7 repräsentieren die Transkripte mit einer Deletion von 24 AS und in der Zeile 8 ist der Klon mit der 36 AS Deletion dargestellt. Deletionen sind durch Boxen in gelber Farbe dargestellt. Senkrechte Striche stellen Sequenzvariationen dar.

Klon 4	CCGTGGGTCCTGCTGGTCCCTAGGGGCCCTGCTGGTCCCTTCTGGCCCTGCTGGAAAAGATG
Klon 9	CCGTGGGTCCTGCTGGTCCCTAGGGGCCCTGCTGGTCCCTTCT
Klon 5	CCGTGGGTCCTGCTGGTCCCTAGGGGCCCTGCTGGTCCCTTCTGGCCCTGCTGGAAAAGATG
Klon 3	CCGTGGGTCCTGCTGGTCCCTAGGGGCCCTGCTGGTCCCTTCTGGCCCTGCTGGAAAAGATG
Klon 12	CCGTGGGTCCTGCTGGTCCCTAGGGGCCCTGCTGGTCCCTTCTGGCCCTGCTGGAAAAGATG
c1a2cneu	CCGTGGGTCCTGCTGGTCCCTAGGGGCCCTGCTGGTCCCTTCTGGCCCTGCTGGAAAAGATG
	3140 3150 3160 3170 3180 3190
Klon 4	GTCGCACTGGACATCCTGGTACAGTTGGACCTGCTGGCATTTCGAGGCCCTCAGGGTCACC
Klon 9	
Klon 5	GTCGCACTGGACATCCTGGTACAGTT
Klon 3	GTCGCACTGGACATCCGGTACAGTTGGACCTGCT
Klon 12	GTCGCACTGGACAT
c1a2cneu	GTCGCACTGGACATCCTGGTACGGTTGGACCTGCTGGCATTTCGAGGCCCTCAGGGTCACC
	3200 3210 3220 3230 3240 3250
Klon 4	AAGGCCCTGCTGGCCCCCTGGTCCCCCTGGCCCTCCTGGACCTCCAGGTGTAAGCGGTG
Klon 9	GGCCCTCCTGGACCTCCAGGTGTAAGCGGTG
Klon 5	GGACCTCCAGGTGTAAGCGGTG
Klon 3	GGACCTCCAGGTGTAAGCGGTG
Klon 12	CCTGGCCCTCCTGGACCTCCAGGTGTAAGCGGTG
c1a2cneu	AAGGCCCTGCTGGCCCCCTGGTCCCCCTGGCCCTCCTGGACCTCCAGGTGTAAGCGGTG
	3260 3270 3280 3290 3300 3310
Legende:	blau: Sequenzende des Exon 47 rot: Exon 48 grün: Sequenzbeginn des Exon 49 magenta: c.3219G>A Polymorphismus führt zu p.T983T (Baldwin et al., 1989) zyan: Polymerasefehler

Abb. 3.1.3.2 Sequenzvergleich ausgewählter Sequenzen des klonierten cDNA-Abschnitts des Patienten K60

Der dargestellte Abschnitt zeigt einen c-terminalen Ausschnitt der cDNA des *COL1A2* Gens (c1a2cneu). Sequenzlücken bei den Sequenzen Klon 9 (36 AS), Klon 5 (24 AS), Klon 3 (21 AS) und Klon 12 (24 AS) zeigen den jeweils deletierten Bereich bei der Patienten-DNA an. Der Klon 4 repräsentiert das Normalallel.

Die Vielzahl von Transkripten unterschiedlicher Länge ist wahrscheinlich durch die Benutzung von kryptischen Spleißstellen entstanden sein. Die Tab. 3.1.3.1 zeigt die Untersuchung möglicher Spleißstellen.

	Basensequenz der untersuchten kryptischen 3' Spleißstelle	Wahrscheinlichkeit in %	Basensequenz der untersuchten kryptischen 5'-Spleißstelle	Wahrscheinlichkeit in %	Anmerkung
Deletions- allel mit Verlust von 21 AS	[CCCCTGGCCC]T[C <u>CTG</u>]	55,4%	CT <u>G</u> GCATT	36,3%	
	[CCCTGGCCCT]C[C <u>TGG</u>]	74,3%	TG <u>G</u> CATTC	42,3%	optimale Kombi- nation
	[CCTGGCCCTC]C[T <u>GGA</u>]	65,9%	GGCATT <u>C</u> G	15,5%	
	[CCCCTGGCCC]C[T <u>CCT</u>]	40,9%	GCT <u>G</u> GCAT	12,9%	
Deletions- allel mit Verlust von 24 AS	[CCCCTGGTCC]C[C <u>CTG</u>]	55,6%	CT <u>G</u> GTACG	31,9%	
	GCCCCCCTGG]T[CCCC]	45,3%	TCCTGGTA	26,3%	
	CCCTGGTCCC]C[C <u>TGG</u>]	73,2%	TG <u>G</u> TACGG	63,3%	optimale Kombi- nation
	CCTGGTCCCC]C[T <u>GGC</u>]	61,3%	GGT <u>A</u> CGGT	34,8%	
Intron 48, Wildtyp	[TTTCACCTTT]G[C <u>AGG</u>]	96,6%	CT <u>G</u> TAAGT	79%	
Exon 48, p.T983T, G>A	[ACATCCTGGT]A[C <u>AGT</u>] [ACATCCTGGT]A[C <u>GGT</u>]	75,3% 59,3%			poly- morph, Baldwin et al., 1989

Tab. 3.1.3.1 Darstellung der Wahrscheinlichkeit der Verwendung von kryptischen Spleißstellen im Bereich Exon 48 bis 49 des *COL1A2* Gens

In der Tab. 3.1.3.3 sind die Nukleotidfrequenzen der einzelnen Positionen dargestellt, die zur Berechnung benötigt wurden. Unterstrichene Bereiche kennzeichnen die essentiellen Basen und Fettdruck kennzeichnet die Übereinstimmung mit der Konsensussequenz. (nach Shapiro und Senapathy 1987)

In der folgenden Abbildung (3.1.3.3) ist die Konsensussequenz von eukaryontischen Spleißstellen dargestellt, welche die Grundlage für die in Tabelle 3.1.3.1 dargestellten Wahrscheinlichkeiten für die Benutzung kryptischer Spleißstellen darstellt.

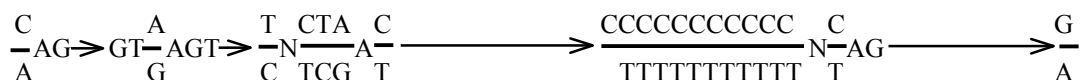


Abb. 3.1.3.3 Konsensussequenz eukaryontischer Spleißstellen

Das Computerprogramm Sequence Analyzer™ der ALFexpress™ Software setzt, wenn sich Deletionen innerhalb von Wiederholungssequenzen befinden, die Zuordnung der Deletionen nicht

zweifelsfrei. Verschiedene Positionen müssen deshalb als kryptische Spleißstelle in Erwägung gezogen werden. Folgende Formeln wurden zur Berechnung der Wahrscheinlichkeiten für die Nutzung einer bestimmten kryptischen Spleißstelle verwendet (Shapiro und Senapathy, 1987):

⇒ für die **5' Spleißstelle** (Tab. 3.1.3.2):

$$\text{score} = 100(t - \min_t) / (\max_t - \min_t)$$

wobei $\min_t$ = Summe aller niedrigsten Nukleotidfrequenzen in Prozent

$\max_t$ = Summe aller höchsten Nukleotidfrequenzen in Prozent

und

⇒ für die **3' Spleißstelle** (Tab. 3.1.3.2):

$$\text{score} = 100((t_1 - l_1) / (h_1 - l_1) + (t_2 - l_2) / (h_2 - l_2)) / 2$$

wobei t_1 = Summe der best möglichen 8 von 10 Nukleotidfrequenzen in Prozent an Pyrimidinpositionen

t_2 = Summe der best möglichen 4 Nukleotidfrequenzen in Prozent an CAGG Positionen

l_1 = Summe der niedrigsten 8 von 10 vorhandenen niedrigsten Nukleotidfrequenzen in Prozent an Pyrimidinpositionen

l_2 = Summe der niedrigsten vorhandenen Nukleotidfrequenzen der 4 Nukleotide in Prozent an CAGG Positionen

h_1 = Summe der höchsten 8 von 10 vorhandenen Nukleotidfrequenzen in Prozent an Pyrimidinpositionen

h_2 = Summe der höchsten vorhandenen Nukleotidfrequenzen der 4 Nukleotide in Prozent an CAGG Positionen

ist.

Beide Anteile (Pyrimidin- und CAGG Positionen) werden gleich gewichtet.

3' Spleißstelle						5' Spleißstelle					
Posi- tion	Basen der Konsensussequenz					Posi- tion	Basen der Konsensussequenz				
	A	C	G	T			A	C	G	T	
-14	TC	9	31	15	45						
-13	TC	9	33	13	45						
-12	TC	7	31	11	51						
-11	TC	7	35	7	51						
-10	TC	10	35	7	47						
-9	TC	10	35	11	44						
-8	CT	7	43	7	42						
-7	TC	9	41	8	42						
-6	TC	6	39	6	48						
-5	TC	6	40	8	46						
-4		23	29	23	24						
-3	C	3	74	1	22	-3	A	32	37	19	12
-2	A	100	0	0	0	-2	G	58	13	15	15
-1	G	0	0	100	0	-1	G	10	4	78	8
+1	G	28	13	49	10	+1	T	0	0	100	0
						+2	AG	0	0	0	100
						+3	A	57	2	39	2
						+4	G	71	8	12	9
						+5	T	5	6	84	5
						+6		16	15	22	47

Tab. 3.1.3.2 Vorkommen der einzelnen Nukleotidfrequenzen an den einzelnen Spleißstellenpositionen in Prozent bei Primaten

Die Positionen beziehen sich auf die in Abb. 3.1.3.3 dargestellten Konsensussequenz eukaryontischer Spleißstellen

Das genomische Sequenzieren der Exons 47, 48 und 49 des *COL1A2* Gens des Patienten ergab keinen Hinweis auf eine Mutation. Die Intron-Exon-Übergänge zeigten auch keine Veränderung. Durch das vollständige Sequenzieren des Introns 48 des *COL1A2* Gens wurde zunächst eine IVS48+169delA Mutation gefunden, die sich später als Datenbankfehler herausstellte. Die bei Patient K60 gefundene Exon Skipping Mutation, bei der viele verschiedene Transkripte auftraten (Tab. 3.1.3.1), ist eine bisher erstmals auftretende Mutation, da keine bisher bekannten Sequenzmotive betroffen sind, die für ein korrektes Spleißen verantwortlich sind. Die Deletion einzelner Basenpaare ist ein sehr seltener Mutationstyp bei Patienten mit OI. Spleißenhancer gibt es in Introns und Exons mit unterschiedlichen Konsensussequenzen, daher müssen sie in der Regel empirisch überprüft werden. Aus diesem Grund mußte diese Mutation über funktionelle Analyse dieser Intronregion oder Ausschluß eines Polymorphismus an dieser Position der DNA verifiziert werden. Die Deletion eines Nukleotids führt zum Verlust der Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *NlaIII*. An der Untersuchung von hundert Kontroll-DNAs sollte gezeigt

werden, daß es sich um eine neue Mutation handelt, da keine der Kontrollen einen Restriktionsstellenverlust zeigen sollte. Überraschenderweise stellte sich heraus, daß sowohl die DNA der Kontrollen als auch die DNA des Patienten K60 mittels Restriktionsverdau mit *Nla*III geschnitten werden konnten. Durch erneuten Sequenzvergleich zeigte sich, daß in der GenBank Sequenz AF004877 eine zusätzliche Base vorlag, wie der Vergleich mit dem GenBank Klon AC002528 bewies.

3.1.4 Rekurrierende Mutationen haben unterschiedlichen Einfluß auf die Ausprägung der Heterogenität bei OI

Bei Patient K4 wurde eine neun Basenpaardeletion (c.3152-3160delGGAGCACCA) unter Beibehaltung des Leserahmens (engl. in frame) im *COL1A1* Gen gefunden (Abb. 3.1.4.1), welche sich in einem Verlust der Aminosäuren Prolin, Glyzin und Alanin (PGA) in den Aminosäurepositionen 873-875 widerspiegelte. Bei dem Patienten K4 handelt es sich um einen Fötus mit letalem OI Typ II.

Del (ProGlyAla) PGA OI II 873→875, c.3152-3160delGGAGCACCA

Alignment Position	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	
Consensus	>>	G	G	G	G	C	A	C	C	A	G	g	a	G	C	A	C	C	A	G	G	A	G	C
Seq 1	>>	G	G	G	G	C	A	C	C	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	G	A	G	C	
Seq 2	>>	G	G	G	G	C	A	C	C	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	G	A	G	C	
Seq 3	>>	G	G	G	G	C	A	C	C	A	G	G	A	G	C	A	C	C	A	G	G	A	G	C
Seq 5	>>	G	G	G	-	-	-	-	-	-	-	-	G	c	A	C	C	A	G	G	A	G	C	
Seq 6	<<	G	G	G	G	C	A	C	C	A	G	G	A	G	C	A	C	C	A	G	G	A	G	C

Amino-
säuren

G A P G A P G A P

Abb. 3.1.4.1 Sequenzanalyse im *COL1A1* Gen bei Patient K4

Die mit gelber Farbe hinterlegten Bereiche kennzeichnen die 9 Basenpaar Deletion, im Vergleich dazu das Normalallel des Patienten (Sequenzen 3 und 6).

Bei Sequenzvergleichen können bestimmte Sequenzwiederholungen, wie in diesem Beispiel eine Triplettwiederholung der Aminosäuren PGA, der Analysensoftware (ALFexpress™ sequence analyzer Software) Probleme bei der Auswertung bereiten (Abb. 3.1.4.1). Wie in der Abbildung 3.1.4.1 zu sehen ist, liegen die mit gelber Farbe hinterlegten Bereiche nicht übereinander. Werden die Sequenzen miteinander verglichen, läßt sich der deletierte Bereich erkennen. Da die Mutation heterozygoter Natur ist mußte das PCR-Produkt zum Sequenzieren kloniert werden (Abb. 3.1.4.2).

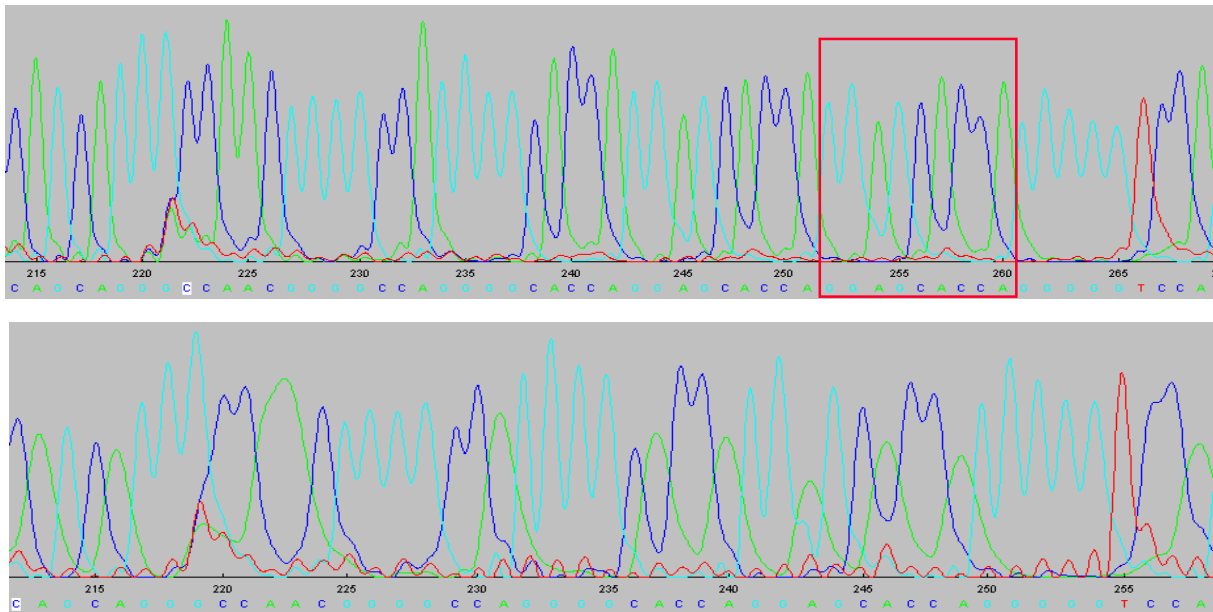


Abb. 3.1.4.2 Ein Vergleich der Sequenzen der klonierten PCR-Produkte des Patienten K4 zeigen die deletierten Basen in einem roten Kasten.

Bei der Mutation p.P873_A875del handelt es sich um eine Mutation, bei der die rekurrende Mutation zum gleichen Phänotyp führte (Abb. 3.1.4.3). An einem weiteren Beispiel kann jedoch gezeigt werden, daß dieser Sachverhalt jedoch nicht unbedingt immer zu erwarten ist (Tab. 3.1.4.1).

Del (ProGlyAla) PGA	Phänotyp: OI Typ II	(Hawkins et al. 1991)
in der Region der Aminosäuren 867-875, c.3150-3158delTCCTGGTGC		
Del (GlyAlaHyp) GAP	Phänotyp: OI Typ II	(Wallis et al. 1992)
die Aminosäuren 874-876 betreffend, c.3155-3163delGTGCCCCTG		

Abb. 3.1.4.3 Übersicht der rekurrenden Deletionen in der Tripelhelix im *COL1A1* Gen im Bereich der Aminosäuren 867-875

Eine rekurrende Mutation (Abb. 3.1.4.3) wurde bei einer Patientin (K11) mit dem OI Typ III im *COL1A2* Gen gefunden (Tab. 3.1.4.1). Dabei handelte es sich um die N-terminalste Cystein Substitution in der Position Gly238, die bisher beschrieben wurde. Eine Substitution im Nukleotid 1121 ändert dabei die erste Position des für die Aminosäure Glyzin kodierenden Kodons: **GGT**→**TGT**, (c.982 G>T).

G l y 2 3 8 C y s , G G T → T G T n t 1 1 2 1 , c . 9 8 2 G > T
O I I I I

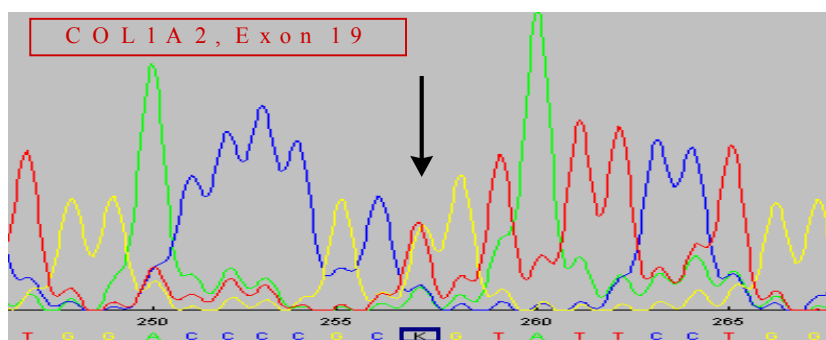


Abb. 3.1.4.4 p.G238C Substitution (*COL1A2*) bei Patientin K11

Die Mutation ist durch einen Pfeil markiert.

p.G238S, c.982G>A Transition, (nt 1121)	OI I	Lund et al., 1998
	OI IV	Pepin et al., 1997
	OI IV	Nuytinck et al., 1997
	OI III	Nuytinck et al., 1997
	OI III	Rose et al., 1995
p.G238C, c.982G>T Transversion, (nt 1121)	OI III	Patientin K11

Tab. 3.1.4.1 Rekurrierende Mutationen in der Position 238 im Gen *COL1A2*

Eine Zusammenstellung aller rekurrierenden Mutationen (Tab. 3.1.4.2a und 3.1.4.2b) aus der Mutationsdatenbank der Kollagen Typ I Mutationen (Dalglish, 1997; 1998) zeigt, daß in *COL1A1* 13 Positionen und im Gen *COL1A2* 7 Positionen betroffen sind, wodurch eine nicht zufällige Verteilung ersichtlich wird.

Mutation	OI I	OI II	OI II/III	OI III	OI III/IV	OI IV
p.G79R	••					
p.G154R	•			••		
p.G211R		•			•	
p.G220A		•				•
p.G223C	•					•
p.G349C						••
p.G352C		•			•	••
p.G352S						•
p.G382R		•				•
p.G382S						•
p.G382C						•
p.G415S			•		•	
p.G526C				••		
p.G589S				••		•
p.G862S		•		•••		
p.R963Stop	•••					

Tab. 3.1.4.2a Verteilung rekurrierender *COL1A1* Mutationen und deren klinischer Phänotyp

CpG Dinukleotid*	Mutation	OI I	OI II	OI II/III	OI III	OI III/IV	OI IV
CGC <u>CGT</u> A T	p.G238S p.G238C	•			•• •		••
GCC <u>CGT</u> T	p.G247C	•			••		
CGC <u>CGT</u> A	p.G502S		•••				
CGT <u>G</u> GT GTC?	p.G586V				•		•
CCT <u>G</u> GT T	p.G646C	••					
CGC <u>CGT</u> A	p.G859S			•	••		
CCC <u>CGT</u> A	p.G922S						••••

Tab. 3.1.4.2b Verteilung rekurrerender *COL1A2* Mutationen und deren klinischer Phänotyp
(*CpG Dinukleotide sind unterstrichen)

Die Position 238 im *COL1A2* Gen hat die höchste Frequenz von allen rekurrerenden Mutationen in beiden Genen, die bisher beobachtet worden sind. Serin- und Cystein-substitutionen sind die am häufigsten beobachteten Mutationen bei isolierten und sich wiederholenden Mutationen in *COL1A2*. Das läßt sich auch für das *COL1A1* Gen beobachten, dort kommt zusätzlich Arginin auch sehr häufig als Glyzinsubstituent vor (siehe Tab. 3.1.4.2).

<i>COL1A1</i>	Arg 4x	Cys 4x	Ser 3x	Ala 1x
<i>COL1A2</i>	Ser 4x	Cys 2x	Val 1x	

Tab. 3.1.4.2 Frequenz der Aminosäuresubstituenten, die in Prädilektionsstellen beobachtet werden

3.1.5 Nullmutationsscreening bei Osteogenesis imperfecta Typ I Patienten

Nullallele sind Allele, welche kein Genprodukt erzeugen. Sie entstehen durch sogenannte Nullmutationen, die eine Reduktion von intaktem Protein um 50% verursachen. Zunächst wird durch PCR-Amplifikation auf genomischer Ebene ein Marker beim Patienten auf Heterozygotie getestet. Im Falle der Heterozygotie (d.h. informativer Marker) erfolgt der Nachweis des sog. funktionellen Allelverlusts durch eine RT-PCR-Amplifikation mit den gleichen Primern. Die Bestätigung des Vorhandenseins von nur noch einem Allel bei den Transkripten dient als Nachweis für eine Nullmutation. Betrachtet man den RFLP *MnII* sowie den FLP mit der 4 bp Insertion, so waren 6 von 22 Patienten (27,3%) zunächst auf genomischer Ebene informativ, wobei ein Patient

für ein oder mehrere Marker informativ sein kann (Abb. 3.1.5.1). Zum Vergleich: In einer Studie, in der ein Nullmutationscreening an 70 Patienten mit OI Typ I durchgeführt wurde, waren 23 Patienten informativ für den *MnII* RFLP (Willing et al., 1992). Es wird meist der *MnII* Marker untersucht, da der FLP mit der 4 bp Insertion weniger informativ ist. Die Heterozygotenfrequenz des *MnII* RFLPs liegt bei 0,39. Bisher kommen nur im *COL1A1* Gen Nullmutationen vor (Willing et al., 1992).

FLP*	Allelkombination/Anzahl der Patienten			
4 bp Insertion	Fragmente von 430 bp und 434 bp	keine	Insertion,	Insertion,
3'UTR, <i>COL1A1</i>	Fragmentanalyse	Insertion,	heterozygot	homozygot
		homozygot		
		2	5	15
<i>MnII</i> , <i>COL1A1</i>	C88T nach dem Stopkodon, Fragmente: mm	Mm	MM	
	C-Allel: 134 bp und T-Allel: 195 bp			
	nach Restriktionsverdau mit <i>MnII</i>			
		15	6	1

Tab. 3.1.5.1 Darstellung der Allelverteilung der LFPs des Nullmutationsscreenings

Es wurden 22 Patienten mit dem OI Typ I untersucht. Die Bezeichnung der Polymorphismen erfolgte durch die jeweils verwendete Restriktionsendonuklease, wenn eine Schnittstelle vorhanden war.

*FLP: Fragmentlängenpolymorphismen

Die informativen Patienten K5, K8, K37, K44, K72 und K73 wurden untersucht. Bei K73 konnte eine Nullmutation beim *MnII* RFLP festgestellt werden, somit können das *COL1A2* und andere Gene für die Mutationssuche ausgeschlossen werden (Abb. 3.1.5.1). Durch Klonierung und anschließende Sequenzierung erfolgte eine zusätzliche Bestätigung des durch den Restriktionsverdau gewonnen Ergebnisses. Beim Patienten K5 konnte später im Rahmen des schrittweisen Mutationsscreenings eine Glyzinsubstitution im Exon 45 des *COL1A1* Gens festgestellt werden, die nicht zu einem Ausfall eines Allels führt (Abb. 3.1.2.2).

	229	219	209	199	189	179
K73 cDNA	ACTTTCCCCCAACCCGGAACAGACAAGCAACCCAACTGAACCCCCCAAAGCCAAA					
c1a1neu.dat	ACTTTCCCCCAACCCGGAACAGACAAGCAACCCAACTGAACCCCCCAAAGCCAAA					
	16100	16110	16120	16130	16140	16150
						<i>MnII</i>
K73 gDNA	ACTTTCCCCCAACCCGGAACAGACAAGCAACCCAACTGAACCCCCCAAAGCCAAA					
c1a1neu.dat	ACTTTCCCCCAACCCGGAACAGACAAGCAACCCAACTGAACCCCCCAAAGCCAAA					
	16100	16110	16120	16130	16140	16150

Abb. 3.1.5.1 Nachweis der Nullmutation bei Patient K73 durch Sequenzieren der cDNA Klone

Mit Hilfe der Klammer wird die Position der *MnII*-Schnittstelle markiert

In einer großen Familie mit OI Typ I und intrafamiliärer Variabilität waren Familienmitglieder informativ, von denen aber kein Gewebe zur RNA-Isolierung für das Nullmutationsscreening zur Verfügung stand.

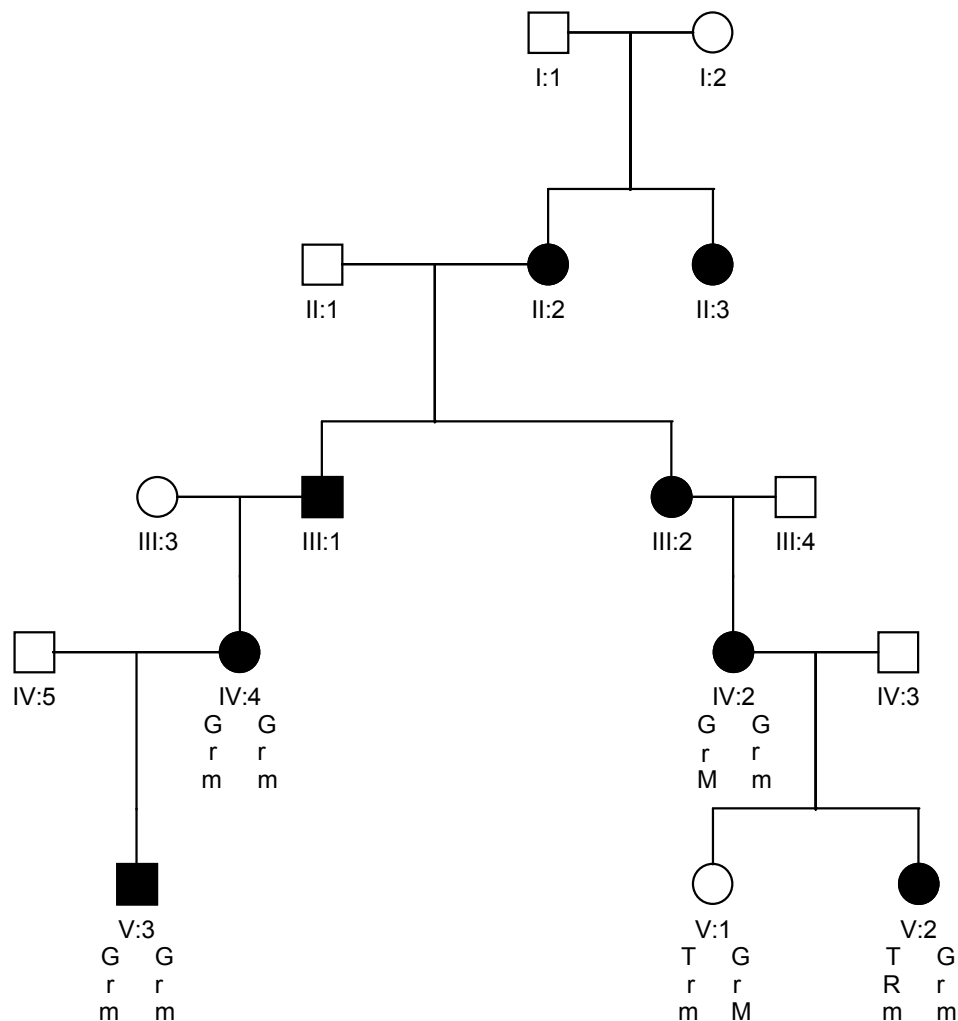


Abb. 3.1.5.2 Stammbaum einer Familie mit OI Typ I und intrafamiliärer Variabilität

Dargestellt ist die Segregationsanalyse der RFLPs *BalI*, *RsaI* und *MnII* des *COL1A1* Gens. Im *COL1A2* Gen wurden der RFLP *PvuII* und ein (ACT)_n VNTR untersucht, die in der Abbildung nicht dargestellt sind. (Legende: IV:2=K118, IV:4=K45, V:1=K117, V:2=K29, V:3=K31)

Bei den Patienten K29 und K31 wurden beide Kollagen Typ I Gene auf cDNA Ebene untersucht und in einer weiteren Dissertation (Schlenker 2001) wurden die Exons 6-25, den N-terminalen Bereich der Tripelhelix umfassend, auf genomischer DNA Ebene sequenziert. Bisher wurde keine Mutation in den Kollagen Typ I Genen detektiert.

Patient	Biochemie, soweit vorhanden	Phänotyp	Mutation
K4 OI Typ II, letal	gesamtes Kollagen Typ I ist übermodifiziert	geringe Mineralisation der Knochen, dünne Rippen, Verbiegung/Verkürzung vor allem der unteren Extremitäten	p.P873_A875del <i>COL1A1</i>
K5 OI Typ I/IV (eher Typ IV, aber mild betroffen)	gesamtes Kollagen Typ I ist übermodifiziert	weißliche Skleren, leichtes Wachstumsdefizit, mäßig erhöhte Frakturneigung, Dentinogenesis imperfecta, die Mutter ist auch betroffen	p.G886A <i>COL1A1</i>
K6 OI Typ IV (Typ III/IV aufgrund der Befunde)	gesamtes Kollagen Typ I ist übermodifiziert	leicht bläuliche Skleren, Epiphysencysten, Dentinogenesis imperfecta, Kleinwuchs, Skelettdeformierungen, deutlich erhöhte Frakturneigung, einmalige hyperplastische Kallusbildung	p.G880S <i>COL1A1</i>
K11 OI Typ III	Serum Prokollagen I C-terminals Propeptid (PICP) ist reduziert, Kollagen Typ I ist deutlich übermodifiziert	multiple Frakturen, leicht blaue Skleren, Epiphysencysten, Dentinogenesis imperfecta, Reduzierung der Skelettmineralisation, erheblicher Minderwuchs, starke Frakturneigung, ausgeprägte Skelettdeformierung	p.G238C <i>COL1A2</i>
K27 OI Typ III	Kollagen Typ I ist deutlich übermodifiziert	multiple Frakturen, Minderwuchs, Verbiegung/Verkürzung der unteren Extremitäten, reduzierte Knochendichte, keine blauen Skleren	p.G523S <i>COL1A1</i>
K29* OI Typ I, intrafam. Variabilität	keine Übermodifikation des Kollagen Typ I, da ein OI Typ I vorliegt	blaue Skleren, ungewöhnlich viele Frakturen für OI Typ I, Cousine von K31	<i>COL1A1?</i>
K31* OI Typ I, intrafam. Variabilität	keine Übermodifikation des Kollagen Typ I, da ein OI Typ I vorliegt	blaue Skleren, einige wenige Frakturen, ausgeprägte Osteoporose, Cousin von K29	<i>COL1A1?</i>
K60 OI Typ III		leicht bläuliche Skleren, Dentinogenesis imperfecta, erheblicher Minderwuchs, starke Frakturneigung, ausgeprägte Skelettdeformierung	alternatives Spleißen siehe Kap. 4.1.3 <i>COL1A2</i>

Tab. 3.1.5.2 Kurze Zusammenstellung der klinisch, biochemisch und molekularbiologisch ermittelten Daten, die im Rahmen der umfassenden Untersuchung von OI Patienten des Ulmer Kollektivs ermittelt wurden

*Zu der Familie mit OI Typ I und intrafamiliärer Variabilität gehören noch weitere Familienmitglieder: K45, K68, K90, K117 und K118. In Leukozyten wird keine zur Extraktion von mRNA ausreichende Transkriptmenge gebildet, deshalb stand außer von den Patienten K29 und K31 keine mRNA für die Durchführung des Nullmutationsscreening zur Verfügung.

3.2 Sonderformen der Osteogenesis imperfecta (OI)

3.2.1 OI Patienten Typ V mit hyperplastischer Kallusbildung

Die Patienten K23 und K24 haben einen Pänotyp der OI Typ V (früher Typ IV) mit hyperplastischer Kallusbildung (Brenner et al., 1989 und Mörike et al., 1993). Im Rahmen des OI Mutationsscreenings wurde die DNA der Patienten durch CSGE Screening und direktes Sequenzieren untersucht und es konnte trotz des klinischen Bildes der Osteogenesis imperfecta bisher keine Mutation in den Genen *COL1A1* und *COL1A2* detektiert werden. Eine Reihe von Sequenzvariationen wurden festgestellt, die im Anhang (Tab. 1) aufgelistet worden sind. Inzwischen wurde ein größeres Patientenkollektiv mit OI Typ V publiziert, die ebenfalls keine Mutation in den Kollagen Typ I Genen besitzen (Glorieux et al., 2000), was sich mit den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen deckt. Die Sequenzierung des Dekorin Gens (DCN) zeigte keine Sequenzveränderung in den kodierenden Abschnitten (Walter, 2001, persönliche Mitteilung).

3.2.2 Patienten mit Brucksyndrom sind nicht allelisch zur OI

Es gab Hinweise darauf, daß das Brucksyndrom allelisch zur OI ist und aus diesem Grund wurden bei den Brucksyndrom Patienten K21 und K22 die Kollagen Typ I Gene sequenziert. Es konnten Polymorphismen, aber keine Mutationen gefunden werden (Anhang Tab. 1).

Da in einer Familie mit Brucksyndrom der Genlocus für ein Kandidatengen, das für eine bisher unbekannte Telozeptid-Lysyl-Hydroxylase (TLH) kodiert, auf das Chromosom 17p12 kartiert wurde (Bank et al., 1999), konnte mit der DNA aus einer Familie aus der Ulmer Zellbank, die den Patienten K22 mit einschließt, eine Mikrosatellitenanalyse durchgeführt werden (Abb. 3.2.2.1). Die Mikrosatellitenanalyse wurde erweitert, indem der Abstand der polymorphen Marker auf 2 cM verringert wurde.

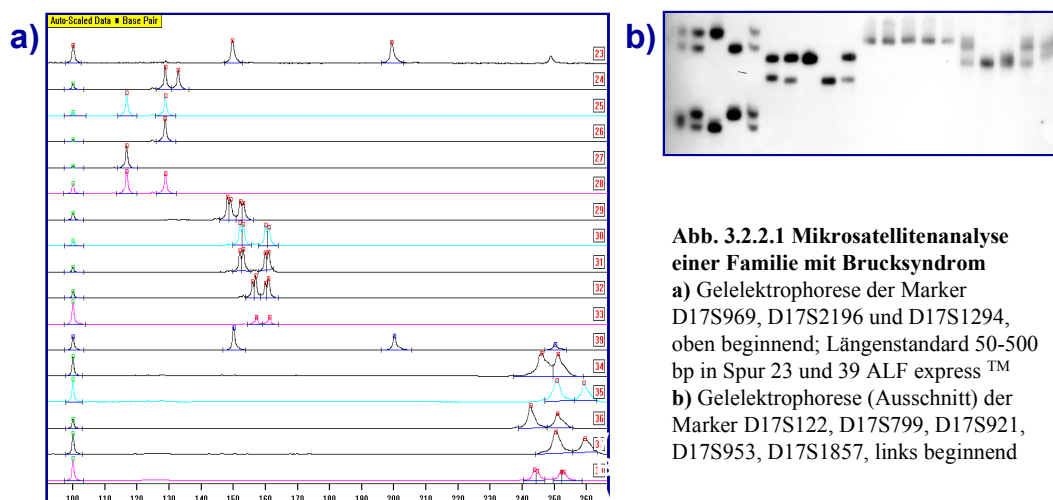


Abb. 3.2.2.1 Mikrosatellitenanalyse einer Familie mit Brucksyndrom
a) Gelelektrophorese der Marker D17S969, D17S2196 und D17S1294, oben beginnend; Längenstandard 50-500 bp in Spur 23 und 39 ALF express™
b) Gelelektrophorese (Ausschnitt) der Marker D17S122, D17S799, D17S921, D17S953, D17S1857, links beginnend

Die Segregationsanalyse in der Familie des Patienten K22 war nicht informativ (Abb. 3.2.2.2). Die Heterozygotenfrequenz war bei den sieben Dinukleotidwiederholungen (repeats) ≥ 0.65 . Für die Tetranukleotidwiederholungen sind keine Angaben verfügbar.

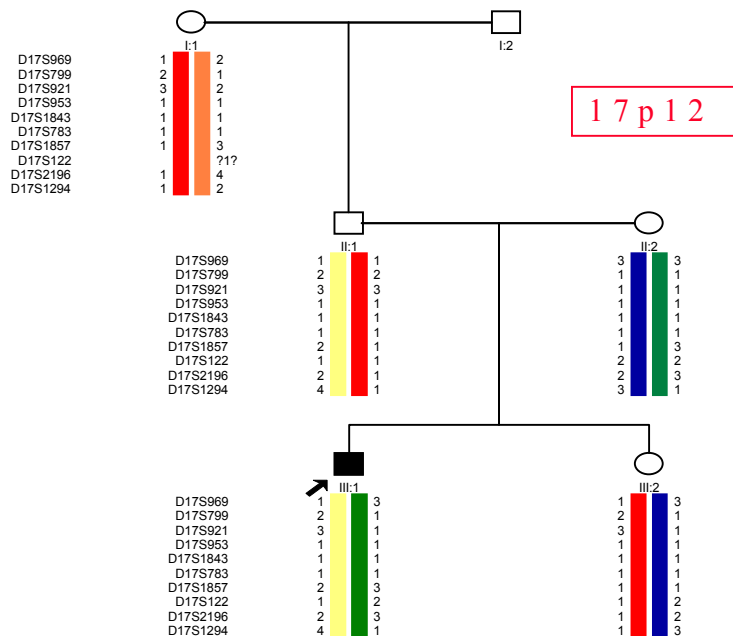


Abb. 3.2.2.2 Stammbaum der Familie mit Brucksyndrom mit Darstellung der Segregation der untersuchten polymorphen Marker in der Chromosomenregion 17p12

Da es sich um eine kleine Familie handelt, standen nur die Eltern und 2 Kinder für die Untersuchung zur Verfügung. Aus diesen Gründen ist eine weitere Eingrenzung der möglichen Kandidatenregion für die bisher unbekannte Telozeptid-Lysyl-Hydroxylase (TLH) auf das Chromosom 17p12 anhand dieser Familie nicht möglich.

3.3 Suche nach modifizierenden Genen und ihr Beitrag zur Heterogenität der Osteogenesis imperfecta

3.3.1 Mutationen in Bereichen großer Kollagenstabilität und ihr Beitrag zur Heterogenität der Osteogenesis imperfecta (OI)

Schon lange bevor die Kollagenmutationsdatenbank (Dalglish, 1997 und 1998) veröffentlicht wurde, war es von großem Interesse, alle bekannten OI-Mutationen zu sammeln, um dadurch mögliche Rückschlüsse über das Mutationsverhalten der Kollagengene ziehen zu können. Für diese Analyse (November 1997) wurden alle bis dahin bekannten Mutationen (235) verwendet. Davon sind 146 Glyzinsubstitutionen in einem der 338 Gly-X-Y-Motive der Tripelhelix. Mit dem GCG Programmpaket (Genetics Computer Group) gibt es u.a. die Möglichkeit, Sequenzdaten (cDNA) in Proteindaten umschreiben zu lassen. Für die Methode zur Untersuchung von kollagenstabilisierenden AS (Dölz et al., 1986) wurden ältere Sequenzdaten verwendet, weshalb

kleine Abweichungen zu den hier verwendeten aktuelleren Daten möglich sind. Es wurde geprüft, ob Unterschiede in der regionalen Stabilität die Ausnahmen des Regionalmodells (Marini et al., 1993 und Wang et al., 1993) erklären können. Basierend auf der Frequenz der häufigsten kollagenspezifischen Tripeptide **GPP** (42/338), **GPA** (30/338) und **GAP** (20/338) (Tab. 3.3.1.1) wurde z.B. für das *COL1A1* Gen die relative Wahrscheinlichkeit für ein benachbartes Tripeptid nach der Methode von Dölz (1986) berechnet. Der Wert eines eher seltenen Tripeptids kann dabei erhöht sein, wenn es zwischen kollagenspezifischen Tripeptiden angesiedelt ist (Abb. 4.3.1.1).

Anzahl	Tripeptideinheit	%
42	GPP	12,4
30	GPA	8,9
20	GAP	5,9
11	GLP, GEP, GER, GSP	3,3 (pro Tripeptid)
10	GAK	3,0
9	GAR, GPR	2,7 (pro Tripeptid)
8	GPS	2,4
7	GPK, GFP, GPQ	2,1 (pro Tripeptid)
6	GEA, GDA	1,8 (pro Tripeptid)
5	GAD, GDR, GRP, GAA, GPV	1,5 (pro Tripeptid)
4	GEQ, GET	1,2 (pro Tripeptid)
100	restliche Tripeptide , Anzahl < 4	29,6

Tab. 3.3.1.1 Frequenz der kollagenspezifischen Tripeptide in *COL1A1*

Anzahl	Tripeptideinheit	%
27	GPP, GPA	8,0 (pro Tripeptid)
15	GLP	4,4
12	GAP	3,6
10	GPS, GPR, GAA	3,0 (pro Tripeptid)
9	GAR, GER, GPV	2,7 (pro Tripeptid)
7	GPQ, GAV	2,1 (pro Tripeptid)
5	GPN, GSR	1,5 (pro Tripeptid)
4	GSP, GEA, GFP, GEV, GPT	1,2 (pro Tripeptid)
145	restliche Tripeptide , Anzahl < 4	42,9

Tab.3.3.1.2 Frequenz der kollagenspezifischen Tripeptide in *COL1A2*

Von jedem Tripeptid wurden die benachbarten Tripeptide mit einem Algorithmus analysiert. Der Parameter P_{rel} gibt die relative Wahrscheinlichkeit (W) der Anwesenheit eines Tripeptids in einer spezifischen Sequenz an und wird durch die durchschnittliche Wahrscheinlichkeit von zwei

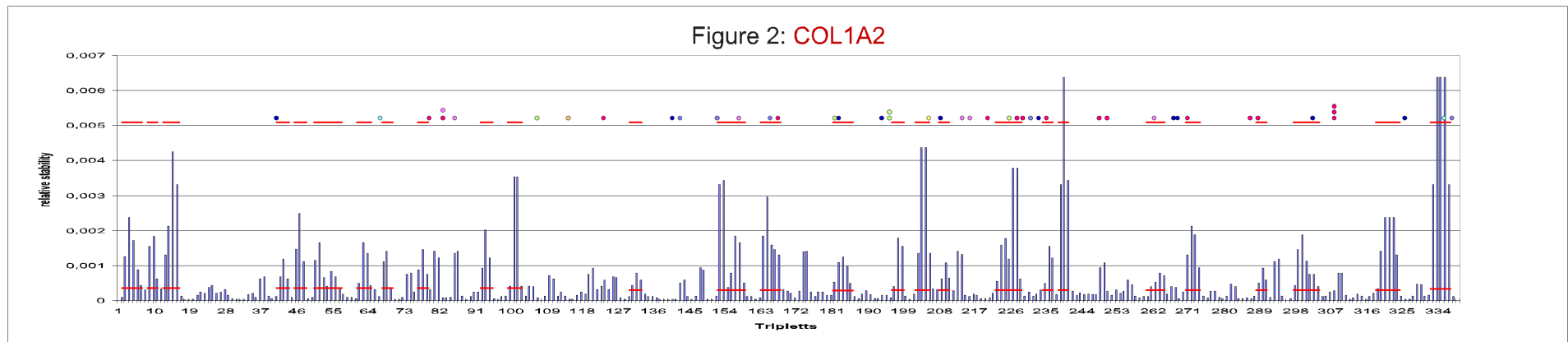
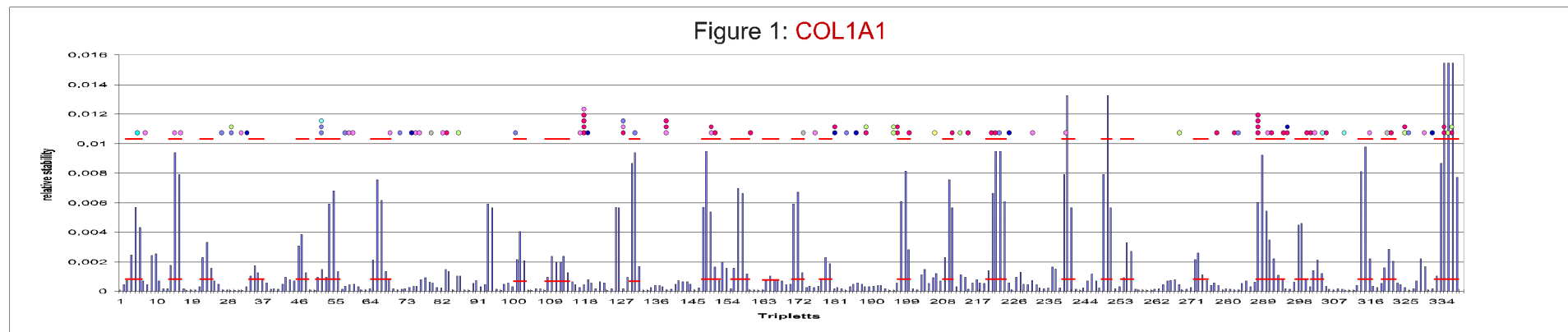
Hexapeptiden berechnet: einem ersten Hexapeptid, bestehend aus dem vorher-gehenden Tripeptid (T-1) und dem zu untersuchenden Tripeptid (T) gegen das zu testende Tripeptid und seinem Nachfolger (T+1).

Folgende Formel liegt der Berechnung zugrunde:

$$P_{\text{rel}} = \{W[(T-1)(T)] + W[(T)(T+1)]\}/2$$

Abweichungen von einer zufälligen Tripeptidverteilung führten zur Definition von Bereichen höherer Stabilität (engl. clustern), innerhalb derer kollagentypische Tripeptide vorkommen. Das sind neben GPP (=GPHyp), GPA und GAP (=GAHyp) noch weitere Triplets (siehe Tab. 3.3.1.1 und 3.3.1.2). Einige wenige positive Ladungen können in kollagentypischen Sequenzen toleriert werden, repräsentiert durch GPR und GPL. Die Aminosäuren Prolin und 4-Hydroxyprolin sind besonders wichtig für die Stabilität der Kollagen-Tripelhelix (Burjanadze et al., 1982).

Die Auswahl des P_{rel} -Wertes wurde in Anlehnung an die Publikation getroffen, dort befinden sich 34% aller Tripeptide in Bereichen höherer Stabilität ('cluster'). Die Verteilung der Bereiche höherer Stabilität entlang der Sequenz zeigt ein repetitives Muster. In diesen Bereichen höherer Stabilität gibt es kollagenspezifische Tripeptide mit größerer Häufigkeit (siehe Tab. 3.3.1.1 und 3.3.1.2). Es wurde eine nicht zufällige Verteilung gefunden. Der Wert für die relative Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Tripeptids in einer gegebenen Sequenz wurde mit einer Mindestgröße von 3 Tripeptiden pro 'cluster' so festgelegt, daß 1/3 aller Tripeptide sich in Bereichen höherer Stabilität befanden. Mit der Festlegung dieser Kriterien wurde ein optimales Arrangement für die Auswertung erreicht. Im **COL1A1** Gen lagen 39% (39 von 100) Mutationen in 60,7% (17 von 28) der 'cluster' (obere Abb. 3.3.1.1a). Somit konnte für das **COL1A1** Gen gezeigt werden, daß sich mit 61% die Mehrheit der Mutationen nicht in Bereichen größerer Kollagenstabilität befinden, was die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese auf der Grundlage des Regionalmodells (Marini et al., 1993, Wang et al., 1993) besagte. Im **COL1A2** Gen befanden sich 32,6% (15 von 46) Mutationen in 44,4% (12 von 27) der cluster (untere Abb. 3.3.1.1b). Dieser Befund stützt auch die Widerlegung der aufgestellten Hypothese auf der Grundlage des Regionalmodells.



Legend:

• asparagine • cysteine • arginine • serine • valine • glutamine • arginine - stop • arginine - histidine • alanine

Abb. 3.3.1.1 Darstellung der zur Kollagenstabilität beitragenden Aminosäure-Tripletts mit den Glyzinsubstituenten aus der Kollagen-mutationsdatenbank (Dalglish, 1997)

Die in roter Farbe dargestellten Querbalken bezeichnen die einzelnen Cluster und ihre Grenzen.

Die kollagentypischen Sequenzen sind nicht zufällig oder gleichmäßig verteilt, sie finden sich gehäuft in sogenannten ‘clustern’ (Bereichen höherer Stabilität). Im Durchschnitt findet sich alle 15 - 20 Tripeptide ein Bereich höherer Stabilität. Die Sequenzdaten, die dieser Analyse zugrundeliegen differieren etwas im Vergleich zur Originalpublikation (Dölz et al., 1986), da dort auch auf noch nicht korrigierte Sequenzdaten zurückgegriffen wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde auf die zu der Zeit verfügbaren Sequenzdaten (D'Alessio et al., 1988 Exon 1-25, Bernard et al., 1983 und Westerhausen et al., 1991 Exon 26 - 52 von *COL1A1*) zurückgegriffen.

Verteilung der Glyzinsubstitutionen nach klinischem Schweregrad der OI			
innerhalb Regionen größerer Stabilität		außerhalb Regionen größerer Stabilität	
OI Typ I	3	OI Typ I	5
OI Typ II	12	OI Typ II	29
OI Typ II/III	0	OI Typ II/III	2
OI Typ III	10	OI Typ III	8
OI Typ III/IV	0	OI Typ III/IV	4
OI Typ IV	2	OI Typ IV	10
OI Typ I/IV	1	OI Typ I/IV	1
Verteilung der Glyzinsubstitutionen nach Aminosäuren			
innerhalb Regionen größerer Stabilität		außerhalb Regionen größerer Stabilität	
Cystein	8	Cystein	14
Arginin	4	Arginin	9
Alanin	3	Alanin	1
Valin	2	Valin	8
Asparagin	0	Asparagin	8
Serin	17	Serin	20
Glutamin	0	Glutamin	0

Tab. 3.3.1.3 Verteilung der Mutationen im *COL1A1* Gen (Stand 1999)

Verteilung der Glyzinsubstitutionen nach klinischem Schweregrad der OI			
innerhalb Regionen größerer Stabilität		außerhalb Regionen größerer Stabilität	
OI Typ I	0	OI Typ I	6
OI Typ II	12	OI Typ II	10
OI Typ II/III	0	OI Typ II/III	1
OI Typ III	1	OI Typ III	13
OI Typ III/IV	2	OI Typ III/IV	4
OI Typ IV	4	OI Typ IV	9
OI Typ I/IV	0	OI Typ I/IV	0

Verteilung der Glyzinsubstitutionen nach Aminosäuren			
innerhalb Regionen größerer Stabilität		außerhalb Regionen größerer Stabilität	
Cystein	2	Cystein	9
Arginin	2	Arginin	4
Alanin	0	Alanin	1
Valin	4	Valin	3
Asparagin	3	Asparagin	9
Serin	8	Serin	17
Glutamin	0	Glutamin	1

Tab. 3.3.1.4 Verteilung der Mutationen im *COL1A2* Gen (Stand 1999)

Die Auflistung der Verteilungen der Glyzinsubstitutionen inner- und außerhalb der Regionen größerer Kollagenstabilität (Tab. 3.3.1.3 und 3.3.1.4) zeigt, daß sowohl in der $\alpha 1(I)$ - als auch der $\alpha 2(I)$ -Kette der größte Anteil der Glyzinsubstitutionen außerhalb der Regionen größerer Kollagenstabilität zu finden ist. Die Verteilung nach Schweregraden ist annähernd die gleiche zwischen den Regionen im *COL1A1* Gen. Entgegen der Erwartung aus dem Regionalmodell (Marini et al., 1993) sind Mutationen in Regionen höherer Kollagenstabilität nicht mit klinisch schwereren Formen der OI assoziiert. Die Glyzinsubstituenten sind nicht zufällig verteilt. Bei der Verteilung der Aminosäuresubstituenten sind im *COL1A1* Gen wie im *COL1A2* Gen gehäuft die AS Asparagin, Serin und Cystein in Bereichen außerhalb der Regionen größerer Kollagenstabilität (Tab. 3.3.1.3 und 3.3.1.4) zu finden. Bei beiden Genen ist innerhalb der Regionen größerer Kollagenstabilität die AS Serin der häufigste Glyzinsubstituent.

3.3.2 Untersuchung des Sp1 Polymorphismus auf seinen Einfluß auf die Variabilität bei Osteogenesis imperfecta

Ein SNP-Polymorphismus wurde in einem von mehreren möglichen Sp1 Bindungsstellen im ersten Intron von *COL1A1* gefunden (Grant et al., 1996), der signifikant assoziiert ist mit reduzierter Knochendichte bei postmenopausalen Frauen. Die klinische Überlappung von Osteoporose und OI gab den Ausschlag für die Untersuchung des Sp1 Polymorphismus an OI Patienten mit der Annahme, daß dieser Polymorphismus sich auf die klinische Variabilität bei OI auswirkt. Der Sp1-Polymorphismus wurde an OI Patienten (n=72) und an Kontrollprobanden (n=100) aus dem kaukasischen Bevölkerungskreis untersucht. Einige ausgewählte Patienten, welche näher im Rahmen dieser Arbeit untersucht worden sind, sind in der Tab. 3.3.2.1 dargestellt.

Patient	Diagnose	SP 1 Poly-morphismus	Patient	Diagnose	SP 1 Poly-morphismus
K4	OI Typ II, letal	G/G	K27	OI Typ III	T/T
K5	OI Typ I/IV	G/G	K29	OI Typ I, intrafamiliäre Variabilität	G/T
K6	OI Typ IV	G/G	K31	OI Typ I, intrafamiliäre Variabilität	G/T
K11	OI Typ III	T/T	K60	OI Typ III	G/T
K21	Bruck-Syndrom	G/T	K73	OI Typ I	G/G
K22	Bruck-Syndrom	G/G			
K23	OI Typ V (früher Typ IV), hyperplastische Kallusbildung	G/G			
K24	OI Typ V (früher Typ IV), hyperplastische Kallusbildung	G/T			

Tab. 3.3.2.1 Darstellung der Ergebnisse der Genotypisierung ausgewählter OI Patienten für den Sp1 Transkriptionsfaktor-anbindungsstellenpolymorphismus in Intron 1 im *COL1A1* Gen

Bisher konnte keine Mutation bei den Patienten K29 und K31 in den Kollagen Typ I Genen im kodierenden Bereich festgestellt werden. Bei diesen beiden Patienten und bei einem weiteren mit ungeklärter Osteopenie (K34), wurden die vier möglichen Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Sp1 im Intron 1 des *COL1A1* Gens in unmittelbarer Nähe des Enhancerelements sequenziert, um festzustellen, ob sich dort eventuell ein weiterer Polymorphismus befindet, der gemeinsam mit dem Enhancer einen Einfluß auf die Transkription des *COL1A1* Gens ausübt. Hinzu kamen die Patienten K32, K47 und P3, die zum Teil eine sehr stark ausgeprägte Osteoporose aufwiesen. Es wurden jedoch keine weiteren Polymorphismen gefunden.

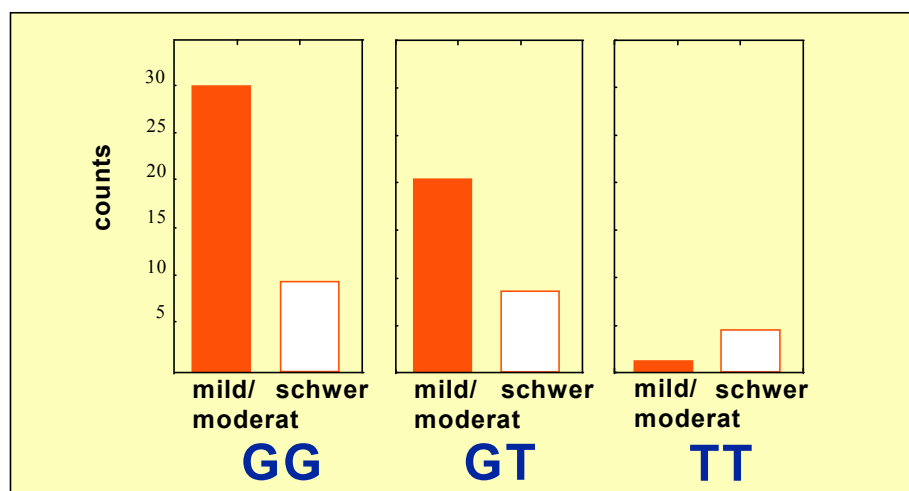


Abb. 3.3.2.1 Frequenzkorrelation des *COL1A1* Sp1 Polymorphismus in Intron 1 und die Klassen der mild/moderaten und schweren Osteogenesis imperfecta

Betrachtet man die klinisch schwer ausgeprägten Typen der OI gegen die kombinierten milden und moderaten Formen (Tab. 3.3.2.2) so findet man eine Korrelation zum *COL1A1* Sp1 Polymorphismus mit einem vorwiegenden Vorkommen der 'T'-Allele (Abb. 3.3.2.1). Für die statistische Analyse war eine einfachere Klassifikation der Patienten in Gruppen nötig. Das Risiko einen schweren Typ der OI zu entwickeln hängt nicht nur von den bereits besprochenen Faktoren ab (siehe Kap. 1.1.1), sondern ist für den TT Genotyp signifikant höher als für den GG Genotyp (Abb. 3.3.2.1 odds ratio 10.18, 95% Konfidenz Intervall 1.021 to 101.5, $p = 0.0479$). Der GT Genotyp zeigt eine Tendenz zu den klinisch schwer ausgeprägten Typen der OI, ist aber nicht statistisch signifikant.

Klassifikation nach Sillence	N	Vereinfachte klinische Einteilung	N
OI Typ I	18	mild	18
OI Typ II	10		
OI Typ II/III	2		
OI Typ III	13	schwer	25
OI Typ III/IV	3		
OI Typ IV	17		
OI, unklassifiziert	9	moderat	29
Gesamt	72		72
Kontrollen	100		

Tab. 3.3.2.2 Einteilung der Patienten nach ihrem klinischen Erscheinungsbild nach der Sillence-Klassifikation (Sillence und Rimoin 1978) und die vereinfachte Aufteilung der Patienten in Gruppen für die statistische Analyse

Die Prävalenz der Genotypen in der OI Studiengruppe war die gleiche wie in der Kontrollgruppe (siehe Tab. 3.3.2.3). Die beobachteten und erwarteten Allelfrequenzen waren in der OI-Gruppe und in der Kontrollgruppe (siehe Tab. 3.3.2.3) gleich. Die beobachteten Frequenzen zwischen beiden Gruppen ($\chi^2 = 2.07$, $p = 0.356$) befanden sich in Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, damit ist eine Präselektion (bias) bei der Auswahl der ausgesuchten Probanden unwahrscheinlich.

Polymorph.	OI-Patienten (n = 72)			Kontrollen (n = 100)		
<i>COL1A1</i> Sp1-Allele	beobachtet	erwartet*	p-test für das H.-W.Gleichgewicht	beobachtet	erwartet*	p-test für das H.-W.Gleichgewicht
GG	.542	.542	$\chi^2 = 0.00$ $p = 1.000$	.650	.640	$\chi^2 = 0.18$ $p = 0.912$
GT	.388	.388		.300	.320	
TT	.070	.070		.050	.040	

Tab. 3.3.2.3 Haplotyp Frequenzen des *COL1A1* Sp1 Polymorphismus in Intron 1

Eine weitere Unterteilung in klinisch „mild“, „moderat“ und „schwer“ Betroffene (Tab. 3.3.2.2), basierend auf der Sillence Klassifikation (Sillence and Rimoin, 1978), zeigte, daß die statistische Signifikanz („power“) nicht ausreichend ist, um eine Signifikanz in einer Studiengruppe dieser Größe zu detektieren. Zum Vergleich: die Haplotyp Frequenzen von drei distinkten Populationen (Grant et al., 1996) und (Uitterlinden et al., 1998) befinden sich auch im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Tab. 3.3.2.4a), aber nur die Gruppe aus Aberdeen zeigt die gleiche Verteilung wie die hier untersuchte Gruppe (Tab. 3.3.2.4b).

	Diese Studie	Aberdeen	London
Aberdeen	$\chi^2 = 1.26, p = 0.533$	-	-
London	$\chi^2 = 5.56, p = 0.062$	$\chi^2 = 2.77, p = 0.251$	-
Rotterdam	$\chi^2 = 6.51, p = 0.039$	$\chi^2 = 3.79, p = 0.150$	$\chi^2 = 1.53, p = 0.465$

Tab. 3.3.2.4b Ein Vergleich der Allelfrequenzen der verschiedenen Studienpopulationen

Die Allelfrequenzen der London and Rotterdam Gruppe unterscheiden sich von der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Studiengruppe.

Zum ersten Mal kann eine Assoziation eines Polymorphismus mit dem Schweregrad der klinischen Manifestation bei Osteogenesis imperfecta gezeigt werden. In der hier untersuchten Gruppe von OI Patienten sind die schweren Fälle signifikant assoziiert mit einem Polymorphismus in einer möglichen Anbindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1 im Intron 1 des *COL1A1* Gens. Dieser Polymorphismus wurde bereits bei postmeno-pausalen Frauen mit Osteoporose beschrieben (Grant et al., 1996) und in beiden Studiengruppen fand man den g.2046G>T Polymorphismus eher bei den klinisch schwereren Fällen.

Polymorphismus	Bevölkerungsbasierende Untersuchungen								
<i>COL1A1 Sp1 Allele</i>	Britische Studie, <u>Aberdeen</u> pre-/postmenopausale Frauen normal/Osteoporose (Grant et al., 1996)			Britische Studie, <u>London</u> postmenopausale Frauen normal/Osteoporose (Grant et al., 1996)			Niederländische Studie, <u>Rotterdam</u> , postmenopausale Frauen, normal/Osteoporose (Uitterlinden et al., 1998)		
	n = 205			n = 94			n = 1778		
	beobachtet	erwartet*	p-test für das H.-Weinberg- Gleichgewicht	beobachtet	erwartet*	p-test für das H.-Weinberg- Gleichgewicht	beobachtet	erwartet*	p-test für das H.-Weinberg- Gleichgewicht
GG	.605	.609		.670	.689		.671	.673	
GT	.351	.343	$\chi^2 = 0.06$	.319	.282	$\chi^2 = 1.04$	.296	.295	$\chi^2 = 0.02$
TT	.044	.048	p = 0.971	.011	.029	p = 0.594	.033	.032	p = 0.992

Tab. 3.3.2.4a Auflistung aller bisher publizierten Haplotyp Frequenzen des *COL1A1* Sp1 Polymorphismus im kaukasischen Bevölkerungskreis

Alle untersuchten Gruppen befinden sich im Hardy-Weinberg Gleichgewicht.

*Erwartet unter der Annahme des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts

3.3.3 Funktionelle Untersuchungen des Sp1-Polymorphismus zur Verifizierung seines Einflusses auf die Transkriptionsaktivität des *COL1A1* Gens

Die genaue Kenntnis der regulatorischen Elemente und ihrer Sequenzgrundlage ist die erste Voraussetzung für die Beurteilung von Expressionsuntersuchungen. Zu Beginn dieser Arbeit waren nur Teile der regulatorischen Region von *COL1A1* bekannt (Chu et al., 1985 [GenBank J03559] und Jimenez et al., 1994 [GenBank U06669]), die jedoch noch ergänzt werden mussten (Bornstein et al., 1987 [GenBank J03559]), in dieser Arbeit vervollständigt wurden und bei der GenBank Datenbank mit der Zugangsnummer AF034478 publiziert wurden (siehe Anhang). Im Rahmen der Komplettierung der Sequenz des *COL1A2* Gens wurde auch das Intron 26 sequenziert und mit der Zugangsnummer AF034477 in die GenBank Datenbank eingegeben (siehe Anhang).

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Versuche wurden transient mit Hilfe einer Kotransfektion vorgenommen, bei der zwei verschiedene Plasmide gleichzeitig in die Wirtszelle eingeschleust wurden. Auf dem einen Plasmid befindet sich ein sogenannter Selektionsmarker, in diesem Fall das EGFP (Abb. 2.8.1), mit dem die Transfektionseffizienz abgeschätzt werden kann. Das zweite Plasmid trägt das Reportergen (Abb. 2.8.2), dessen Genprodukt in der Zelle durch den entsprechenden Assay schnell nachgewiesen werden kann.

Es sind bemerkenswerte Unterschiede feststellbar in der Fähigkeit der verschiedenen Zelllinien, mit einer bestimmten Methode DNA aufzunehmen. So erwies sich die Effectene™ Methode (Qiagen) als effizient für HeLa-Zellen und mit der Kalziumphosphat-Methode lassen sich 293-Zellen sehr gut transfizieren. Nach 48 Stunden Inkubation der Zellen nach der Transfektion konnte die Transfektionsrate durch die Optimierung aller Parameter bei 293 Zellen sogar auf 100% erhöht werden. Es hat sich herausgestellt, daß die Transfektion von 293 Zellen mit Kalziumphosphat die beste Methode war in Bezug auf Transfektionseffizienz, Reproduzierbarkeit und Expression. Saos-2 Zellen wurden im Verhältnis 1:10, 1:25 und 1:50 DNA zu Effectene™-Reagenz getestet und mit 0,5 und 1 µg transfiziert. Das Verhältnis 1:25 mit 1µg Plasmid zeigte sich als beste Kombination mit einer Transfektionseffizienz von 16,6%. Bei der Verwendung der Kalziumphosphatmethode wurde beim Einsatz von 6 µg Plasmid die höchste Effizienz von 23,7% bei Saos-2 Zellen erhalten. Die Transfektionswerte für FuGene6 (Roche) waren am besten mit 2 µg Plasmid und 6 µl Transfektionsreagenz, es wurden 7,3% erreicht. Superfect (Qiagen) erreichte eine noch geringere Effizienz als FuGene6, wobei es sich zusätzlich noch toxisch auswirkte, was an der großen Zahl toter Zellen ersichtlich wurde.

Mit DOTAP (Roche) bzw. Elektroporation wurden zusätzlich Saos-2 Zellen, um die Expression der Allele an einer Knochenzelllinie zu untersuchen, transfiziert. Saos-2 Zellen erwiesen sich jedoch als

sehr transfektionsrefraktär, so daß keine der Methoden zu ausreichender Transfektionseffizienz führte. Osteosarkomzelllinien lassen sich allgemein sehr schwer transfizieren (Dr. U. Maurer, Universität Ulm, Abt. Innere III, persönliche Mitteilung). Mit DOTAP ließen sich die Zellen zwar transfizieren, die Signale der Luziferaseaktivität waren aber durch die geringe Transfektionseffizienz zu schwach für eine Auswertung, da sie sich kaum vom Hintergrundrauschen abgehoben hatten. MG-63 Zellen ließen sich mit der Kalziumphosphatmethode kaum und mit Effectene mit einer Effizienz von 8,7% mit 1 µg Plasmid transfizieren. Für die Expressionsversuche war das nicht ausreichend und diese Versuchsserie wurde eingestellt. Bei diesen Versuchen ging es in erster Linie nicht darum, die optimalsten Transfektionsbedingungen für ein Modellsystem für ganze Versuchsreihen zu finden, sondern eines womit man möglichst schnell und effizient transient transfizieren kann, da es sich bei dem Versuch um eine einmalige Anwendung handelt. Mit dem pIRES 2-EGFP Vektor erfolgte eine zu schwache Fluoreszenzbildung, er wurde durch die Vektoren pEGFP-N1 und pEGFP-C1 ersetzt. HeLa Zellen haben eine starke Eigenfluoreszenz.

Für Saos-2 Zellen wurde der optimale Überlebensbereich der Zellen von 200 bis 250 V bei 250 µF ermittelt. Diese Bedingungen gelten, wenn ein Transfektionspuffer verwendet wird, der aus einem 1:1 Gemisch aus Sucrose-Natriumphosphatpuffer und 1x PBS (Dulbecco) besteht und 5µg DNA transfiziert werden. Die anschließende Luziferasemessung zeigte, daß das Signal der transfizierten Zellen zur Detektion zu schwach ist. Diese Methode eignet sich eher zur permanenten Transfektion und Anzucht der Zellen unter Selektionsbedingungen.

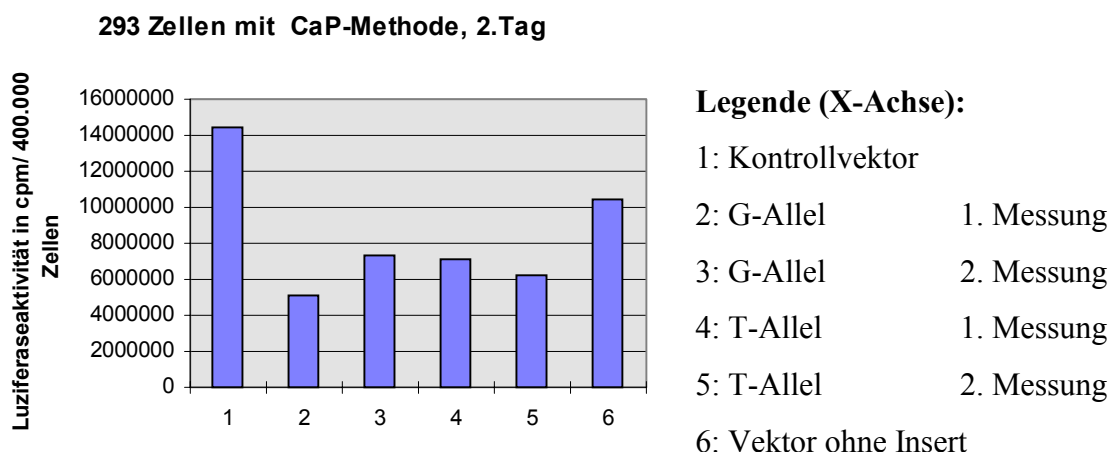


Abb. 3.3.3.1 Expression des pGL3-Kontroll- und pGL3-Promotorvektors mit den verschiedenen Sp1 Transkriptionsfaktor Polymorphismusallelen von *COL1A1*

Zur Überprüfung der gewonnenen Daten aus dem Luziferaseassay wurden mehrere Meßreihen durchgeführt.

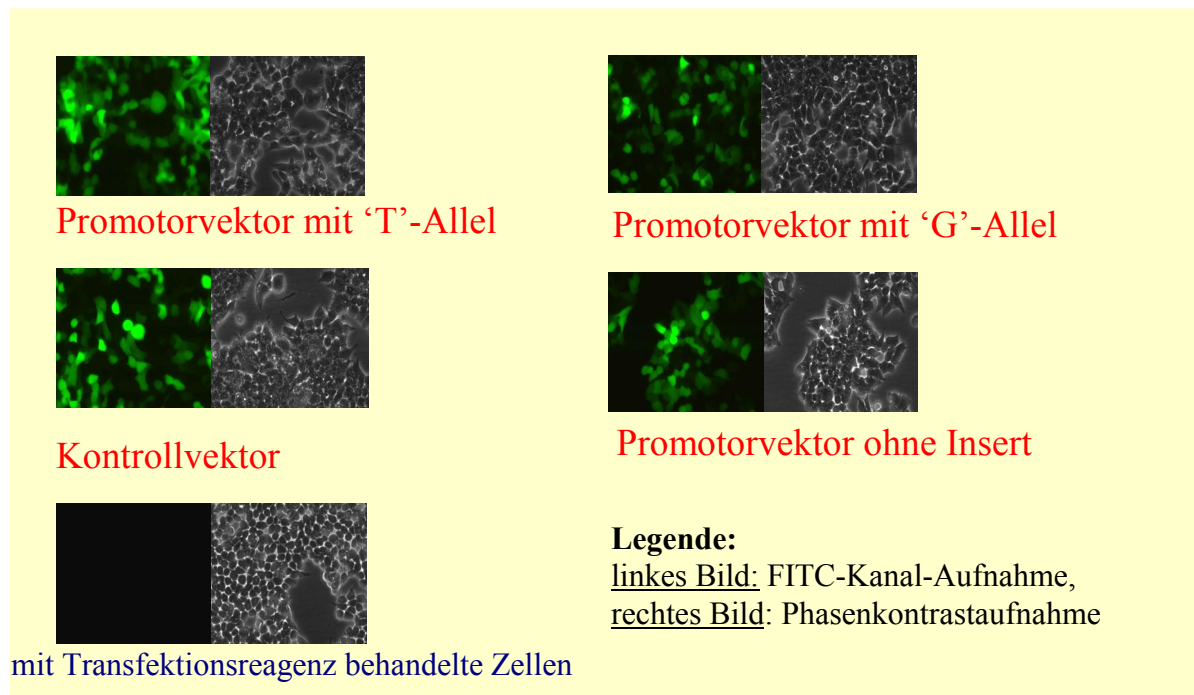


Abb. 3.3.3.2 Kotransfektion von 293 Zellen mit dem pEGFP-N1 Vektor und dem pGL3 Promotor- bzw. Kontroll Vektor, welche die 'firefly'-Luziferase als Reportergen enthalten

Es wurde versucht, mit Hilfe des Expand™ Long Template Kit (Roche) das ganze *COL1A1* Gen mit seinen 18 kb zu amplifizieren, um eine Möglichkeit zu finden bei Heterozygoten für den Sp1-Transkriptionsfaktor Polymorphismus in Intron 1 vom *COL1A1* Gen zu untersuchen. Vor dem Hintergrund des in der Arbeit vorgestellten Modells (siehe Abb. 4.3.2.3), sollte untersucht werden können, ob eine Mutation und z.B. das 'T'-Allel des Sp1-Transkriptions-faktor Polymorphismus auf einem gemeinsamen Allel liegen. Damit wäre es möglich, Aussagen zu treffen, ob die Expression des mutierten Allels dadurch hochreguliert ist. Nach Angaben der Hersteller konnten die 15 kb des Referenzgens mit dem Human tPA Control Primer Set (Roche) amplifiziert werden, beim *COL1A1* Gen gelang es zum einen nicht aufgrund der einzustellenden PCR-Bedingungen und der GC-reichen Sequenz, die hohe Temperaturen zum Aufschmelzen braucht, die Polymerasen jedoch bei diesen extremen Amplifikationszeiten niedrigere Temperaturen brauchen und zum anderen durch die hohe Sekundärstrukturbildung aufgrund der monotonen Sequenz, die auch durch den Einsatz von 7-deaza-GTP und anderen Agenzien, die zur Überwindung von Sekundärstrukturproblemen beitragen, nicht überwunden werden konnten.

3.3.3.1 Untersuchung der allelspezifischen Expression des *COL1A1* Gens mittels RT-PCR am LightCycler

In einem Vorversuch wurden die Primer auf ihre Allelspezifität für das 'G'- und 'T'-Allel geprüft, indem die PCR-Parameter von 58°C-64°C mit variierenden MgCl₂-Konzentrationen verändert

wurden und es zeigte sich eine absolute Spezifität. Die Patienten K20, K21, K24, K29, K37, K46, K50, K54, K58, K60, K66, K75 wurden zur Untersuchung der allelspezifischen Expression herangezogen, da sie beide Allele des SNP Polymorphismus besitzen und von ihnen Zellen zur Gewinnung von RNA zur Verfügung standen. Bevor die eigentlichen Messungen durchgeführt werden konnten, mußten jeweils die allelspezifischen Primer zunächst mit DNA (homozygote DNA für den SNP Polymorphismus mit den Allelen ‘GG’ und ‘TT’) und ohne DNA (zur Überprüfung der Tendenz zur Bildung von Primerdimeren) in der PCR Reaktion getestet werden um eine Verfälschung des Ergebnisses auszuschließen.

COL1A1 Sp1 SNP					COL1A1 Sp1 SNP				
Proband		G-Allel	T-Allel	T/G	Proband		G-Allel	T-Allel	T/G
K29	OI I	3,449 *10 ¹²	4,114 *10 ¹²	1,19	K21	Bruck	2,756 *10 ¹²	4,542 *10 ¹²	1,65
K46	OI II	6,117 *10 ¹²	7,569 *10 ¹²	1,24	K24	Hyp.K.	1,448 *10 ¹²	1,355 *10 ¹²	0,28
K50	OI II	4,082 *10 ¹²	6,021 *10 ¹²	1,48	K20	OI I	2,874 *10 ¹²	5,254 *10 ¹²	1,83
K54	OI II	6,491 *10 ¹²	7,722 *10 ¹²	1,19	K37	OI I	3,211 *10 ¹²	6,861 *10 ¹²	2,14
K58	OI II	1,745 *10 ¹²	3,096 *10 ¹²	1,77	K60	OI III	3,161 *10 ¹²	4,871 *10 ¹²	1,54
K75	OI I	2,268 *10 ¹²	4,263 *10 ¹²	1,88	K66	OI IV	2,871 *10 ¹²	4,299 *10 ¹²	1,50

Tab. 3.3.1.1.1 Allelspezifische RT-PCR mit Hilfe des LightCyclersystems (Realtime-PCR)

Darstellung der Meßwerte aus mehreren Meßreihen. Die Abkürzungen Bruck und Hyp.K. stehen für Brucksyndrom und Hyperplastische Kallusbildung.

Anhand einer Kontroll-DNA (K30) wurde eine serielle Verdünnungsreihe für die Standardmeßreihe hergestellt, anhand derer die Quantifizierung für die einzelnen Allele berechnet wurden (Tab. 3.3.1.1.1). Der Quotient aus ‘T’- und ‘G’-Allel gibt die Erhöhung der Transkriptmenge an. Die Meßwerte variieren leicht zwischen den Messungen und sind nicht als absolute Werte anzusehen. Aus der Tab. 3.3.1.1.1 wird eine durchschnittlich anderthalbfache Erhöhung der Transkriptmenge bei Vorliegen eines ‘T’-Allels ersichtlich. Der Einfluß auf die Transkription ist ausführlich in Kap. 4.3.2 beschrieben.

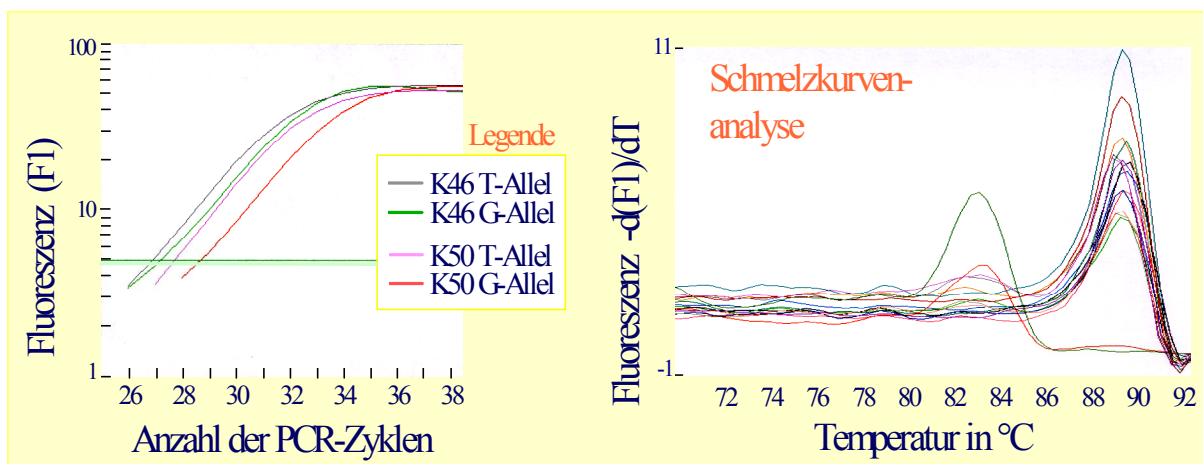


Abb. 3.3.3.1.1 Allelspezifische RT-PCR mit Hilfe des LightCyclers (Realtime PCR) zur quantitativen Messung der Transkriptmenge der Allele des Sp1 SNP in Intron 1 des *COL1A1* Gens
In der linken Abbildung sind die Amplifikationskurven der Patienten K46 und K50 zu sehen.

3.3.4 Untersuchung des Vitamin-D-Rezeptors als Kandidat für die Modifikation der Ausprägung des Schweregrades bei OI

Das *COL1A1* Gen hat ein VDRE-Element (vitamin D response element) in der Promotor-region, deshalb wäre eine veränderte *COL1A1* Transkription durch eine veränderte Vitamin D Wirkung möglich, wenn sich z.B. die Anzahl oder die Konformation der nukleären Vitamin-D-Rezeptoren (VDR) ändert. Aus diesem Grund wurden die VDR Polymorphismen herangezogen, um ihren möglichen Einfluß auf die Variabilität bei Osteogenesis imperfecta zu testen. Die Genotypen der OI Patienten und der Kontrollgruppe befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Tab. 3.3.4.1).

Polymorphis- mus	OI-Patienten			Kontrolle		
<i>VDR</i> <i>BsmI</i> RFLP	(n = 72)			(n = 54)		
BB	.222	.180	$\chi^2 = 1.05$ p = 0.592	.260	.250	$\chi^2 = 0.04$ p = 0.982
Bb	.403	.488		.480	.500	
bb	.375	.332		.260	.250	
<i>ApaI</i> RFLP						
AA	.222	.257	$\chi^2 = 0.70$ p = 0.705	.280	.320	$\chi^2 = 0.69$ p = 0.710
Aa	.570	.500		.570	.490	
aa	.208	.243		.150	.190	
<i>TaqI</i> RFLP						
TT	.375	.372	$\chi^2 = 0.00$ p = 0.999	.296	.348	$\chi^2 = 1.45$ p = 0.480
Tt	.472	.476		.593	.484	
tt	.153	.152		.111	.168	

Polymorphismus	OI-Patienten			Kontrolle		
<i>FokI</i> RFLP						
FF	.389	.390		.296	.330	
Ff	.472	.469	$\chi^2 = 0.00$	.556	.489	$\chi^2 = 0.51$
ff	.139	.141	p=1.000	.148	.181	p = 0.775

Tab. 3.3.4.1 Allelfrequenzen der einzelnen VDR Polymorphismen bei OI Patienten und im Kontroll-Kollektiv

*Erwartet unter der Annahme des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts

Von den 27 möglichen VDR Haplotypen wurden 7 Kombinationen in der OI Gruppe und 8 Kombinationen in der Kontrollgruppe gefunden. Drei der Haplotypen baT (20,8%), BA_T (13,9%) und bAT (1,4%) sind homozygot (Tab. 3.3.4.2) und somit kann keine genaue Allel-zuordnung erfolgen. Die Verteilung und Frequenz der Haplotypen war in der Kontrollgruppe ähnlich: baT (14,8%), BA_T (11,1%) und bAT (1,8%). Es konnte keine Assoziation zwischen dem Schweregrad der OI und den individuellen VDR Haplotypen festgestellt werden.

Genotyp	OI Gruppe		Kontroll Gruppe	
	N	[%]	N	[%]
BbAaTt	29	40.3	23	42.7
bbaaTT	15	20.8	8	14.8
bbAaTT	11	15.3	4	7.4
BBAAtt	10	13.9	6	11.1
BBAATt	5	6.9	8	14.8
BBAatt	1	1.4	-	-
bbAATT	1	1.4	1	1.8
bbAaTt	-	-	1	1.8
BbAaTT	-	-	3	5.6
Total	72	100	54	100

Tab. 3.3.4.2 Frequenzen und Verteilung der kombinierten VDR Genotypen der OI Patienten und der Kontrollgruppe

Es zeigte sich eine ähnliche Verteilung der Frequenzen zwischen der Kontrollgruppe und der kombinierten kaukasischen Studiengruppe (χ^2 -Test, p-Wert >0,05 bedeutet keine signifikanten Unterschiede), während Asiaten und Afrikaner unterschiedliche Frequenzen der untersuchten Polymorphismen zeigten (p<0,05; Tab 3.3.4.3). Nur in der Gruppe der Südamerikaner waren zwei RFLPs und zwar *ApaI* und *FokI* denen der Kontrollgruppe, die hier verwendet wurde, gleich. Vergleicht man die kombinierte kaukasische Population mit anderen ethnischen Gruppen, so zeigt

das *ApaI* Allel bei den Südamerikanern und das *BsmI* Allel bei den Afrikanern gleiche Verteilung, während alle anderen Allelfrequenzen unterschiedlich waren (Tab. 3.3.4.3).

Ethnische Gruppe	VDR RFLPs	χ^2 test	p-Wert	Referenzen
Kontrollgruppe				
versus	<i>BsmI</i>	3.68	0.158	Garnero et al., 1995; Carling et al., 1997; Riggs et al., 1995; Tokita et al., 1996; Krall et al., 1995; Kiel et al., 1997; Morrison et al., 1992; Need et al., 1996; Eccleshall et al., 1998
Kaukasier	<i>ApaI</i>	1.82	0.403	
	<i>TaqI</i>	2.49	0.288	
versus	<i>BsmI</i>	11.87	0.003	Sainz et al., 1997; McClure et al., 1997; Gross et al., 1996
Süd-amerikaner	<i>ApaI</i>	2.18	0.336	
	<i>TaqI</i>	9.21	0.010	
	<i>FokI</i>	0.95	0.622	
versus	<i>BsmI</i>	163.17	0.000	Tokita et al., 1996; Tsai et al., 1996; Arai et al., 1997
Asiaten	<i>ApaI</i>	30.38	0.000	
	<i>TaqI</i>	104.93	0.000	
	<i>FokI</i>	11.36	0.003	
versus	<i>BsmI</i>	8.55	0.014	Fleet et al., 1995; Harris et al., 1997
Afrikaner	<i>FokI</i>	16.52	0.000	
Kaukasier	<i>BsmI</i>	14.43	0.001	
vs.	<i>ApaI</i>	2.23	0.327	
Südamerikaner	<i>TaqI</i>	19.17	0.000	
Kaukasier	<i>BsmI</i>	329.83	0.000	
vs. Asiaten	<i>ApaI</i>	148.87	0.000	
	<i>TaqI</i>	367.35	0.000	
Kaukasier	<i>BsmI</i>	4.51	0.105	
vs. Afrikaner				

Tab. 3.3.4.3 Vergleich der VDR Haplotypfrequenzen die in der Kontrollgruppe beobachtet wurden mit kombinierten Populationen, die keine Osteoporose aufwiesen
P-Werte kleiner als 0.05 zeigen signifikante Unterschiede auf.

Das Vorhandensein eines Dinukleotid Repeat Polymorphismus (CA)_n in der 3' untranslatierten Region (3'UTR) des Biglykan Gens (*BGN*) (Just et al., 1994, GenBank HSU11686) ermöglichte eine Untersuchung des *BGN* Gens im Rahmen dieser Assoziationsstudie. Weiterhin wurden im insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor IGF-I Gen ein (CA)_n Repeat Polymorphismus im Promotorbereich untersucht und im Transforming growth factor- β 1 Gen (TGF- β 1) eine Deletionsvariante in Intron 4 (713-8delC, Langdahl et al., 1997). Es konnte keine Korrelation der untersuchten Polymorphismen in den VDR, *BGN*, TGF- β 1 und IGF-I Genen mit dem Schweregrad der phänotypischen Ausprägung bei Osteogenesis imperfecta gefunden werden.

4 Diskussion

Ungeachtet der Tatsache, daß inzwischen über 200 Mutationen in den Typ I Kollagen-genen bei OI Patienten gefunden worden sind (Dalglish 1997), ist das Verständnis wie diese Mutationen den äußerst variablen klinischen Phänotyp hervorrufen noch eine Herausforderung. Die weitere Erforschung dieser Erkrankung ist vor allem wichtig für die Entwicklung möglicher Therapieansätze.

4.1 Mutationsspektrum bei Patienten mit Osteogenesis imperfecta

Die auf der 7. Internationalen OI Konferenz veröffentlichten Daten (Montréal, Prockop et al., 1999) belegen bei 107 untersuchten OI Patienten und bei 23 Patienten mit der differentialdiagnostischen Abklärung einer OI oder einer Kindesmißhandlung (battered child syndrome), daß in 82% der Fälle eine Mutation in einem der Kollagen Typ I Gene gefunden wurde. Dabei war die höchste **Mutationsdetektionsrate** 95% (36 von 38) bei OI Typ IA Patienten (ohne Dentinogenesis imperfecta, multiple Frakturen, distinkt blaue Skleren und annähernd normale Statur) und die niedrigste 65% (20 von 31) bei Patienten mit milder oder moderater Form der Krankheit, OI Typ I B (mit Dentinogenesis imperfecta) und IV. Bei den schweren Formen der OI Typ II und III belief sich die Mutationsdetektionsrate auf 82% (32 von 39). Von den verbleibenden 7 Patienten, bei denen keine Mutation detektiert wurde, wurde bei 5 Patienten die Diagnose OI bereits vorgeburtlich durch Ultraschalluntersuchung aufgestellt. Die Untersuchung der *COL1A1* und *COL1A2* Gene zur differentialdiagnostischen Abklärung einer möglichen Kindesmißhandlung ergab in 2 von 23 Fällen einen Gendefekt (Prockop et al., 1999). Diese Patienten hatten auch die typisch blauen Skleren. Wenn Frakturen die einzige Manifestation sind, ist der Ausschluß einer Kindesmißhandlung schwer, da die DNA-Diagnostik nicht immer zu einer endgültigen Klärung des Sachverhalts beiträgt. Bei dem in dieser Arbeit untersuchten OI Patientenkollektiv handelt es sich um eine sehr heterogen zusammengesetzte Gruppe. Das könnte ein Grund sein, weshalb die Mutationsrate niedriger ist als die publizierte Mutationsrate mit ca. 80%. Bei den publizierten OI Typ V Patienten erfolgte zunächst eine Mutationssuche auf cDNA Ebene (Glorieux et al., 2000), jedoch gingen die Autoren nach zunächst erfolgloser Suche zu genomischem Screenen über. Auch in der vorliegenden Arbeit erfolgte zunächst die Mutationssuche auf cDNA Ebene, in der Routinediagnostik sollte die molekulargenetische Untersuchung auf genomischer DNA Ebene erfolgen. Mutationssuche auf Proteinebene ist ein bisher gut dokumentierter Ansatz, der eine nur leicht niedrigere Detektionsrate hat wie die Tests auf DNA-Ebene. Nicht alle Methoden zur Detektion von Mutationen zeigen die

gleiche Sensitivität. Auch mögliche technische Fehler bei der Durchführung der Mutationssuche sind zu berücksichtigen.

Die **CSGE-Methode** zur Detektion von Kollagenmutationen ist die derzeit anerkannteste bei den Forschergruppen, die sich mit Mutationssuche in Kollagengen beschäftigt (COL1A1: Spotila et al., 1991, COL2A1: Williams et al., 1992, COL3A1: Kuivaniemi et al., 1991, COL7A1: Christiano et al., 1993). Diese Methode ist nicht nur sensitiv, sondern auch einfach und schnell durchzuführen. Durch die Etablierung auf dem ALFexpress™ Sequenziergerät ergaben sich eine Reihe von Vorteilen, zum einen in der automatischen Dokumentation, was auch den Vorteil der Zeitersparnis brachte und zum anderen in der höheren Sensitivität (Abb. 4.1.1.2.). Alle Mutationen dieser Arbeit wurden mittels der CSGE-Methode (conformation sensitive gel electrophoresis, Ganguly et al., 1993) über ein auffälliges Laufverhalten der entsprechenden PCR-Produktbanden gefunden. Mild denaturierend wirkende Agenzien können bei Basenfehlpaarungen die Tendenz verstärken Konformationsänderungen einzugehen, indem eine der beiden fehlgepaarten Basen nach außen rotiert wird (Ganguly et al., 1993) und eine 'Krümmung' der DNA Helix erfolgt. Liegt eine sogenannte 'Blase' vor, bei der beide mismatch Basen in der DNA Helix nach innen rotiert sind oder liegen beide ungepaarten Basen nach außen rotiert vor als 'Ausstülpung' (Bhattacharyya und Lilley, 1989), dann ist es unwahrscheinlich, daß ein verändertes Laufverhalten in der Gelelektrophorese durch Konformationsänderung zu erwarten ist. Basenpaaraustausche, die weniger als 50 bp vom Rand der PCR-Produkte entfernt liegen und solche, die sich in GC-reichen Domänen mit einer hohen Schmelztemperatur befinden, werden nicht detektiert. Durch die Untersuchung überlappender PCR-Fragmente konnte das Problem weitgehend gelöst werden. Die Detektionsprobleme in GC-reichen Domänen bleiben jedoch bestehen. Beim Mutationsscreening wurde die Taq-Polymerase trotz ihrer hohen Fehlerrate ($1,1 \times 10^{-4}$ bis $2,8 \times 10^{-4}$) verwendet (Rossiter et al., 1990), da alle auf cDNA Basis detektierten Mutationen zusätzlich durch genomische Sequenzierung überprüft wurden und die Wiederholung eines fehlerhaften Nukleotideinbaus an der gleichen Position unwahrscheinlich ist.

Durch Kopplungsanalysen wurden über 90% der typischen familiären OI Fälle mit den Kollagen Typ I Genen assoziiert (Sykes et al., 1990). In diesem Zusammenhang sei nochmals betont, daß die Mehrzahl der OI Fälle Einzelfälle sind. Es bleibt offen, ob diese sporadisch auftreten oder ob ein elterliches Keimzellmosaik vorliegt. Es gibt derzeit keine Daten für die tatsächliche Prävalenz von Kollagen Typ I Mutationen bei OI Patienten (Glorieux et al., 2000). Die CSGE Methode zur Mutationsdetektion ist mittlerweile bei verschiedenen Kollagengen angewendet worden und international anerkannt (Ganguly et al., 1993). Trotzdem gibt es immer noch eine hohe Rate falsch-negativer Resultate beim Mutationsscreening (Glorieux et al., 2000), die nur durch direktes

Sequenzieren überwunden werden kann. Als ein Fazit dieser Dissertation wird das Sequenzieren genomischer DNA im routinemäßigen Einsatz empfohlen, weil die Verwendung von cDNA zu insensitiv ist. Die Kollagen Typ I Gene haben eine Vielzahl von kurzen Exons (je 52) mit 54 bp oder einem Vielfachen davon, so daß der hohe Arbeitsaufwand durch eine Automatisierung mit dem Einsatz von Pipettierrobotern bewältigt werden kann. So kann konsekutiv in einer Pipettierstation sowohl die PCR-Amplifikation als auch die anschließende Aufreinigung der PCR-Produkte mit Exonuklease I, um überschüssige Primer zu degradieren, durchgeführt werden. Zusätzlich erfolgt der Einsatz von Shrimps Alkalischer Phosphatase, um die verbleibenden Nukleotide für die im dritten Schritt erfolgende Sequenzierreaktion zu dephosphorylieren (Hanke und Wink 1994, Werle et al., 1994).

Bei einer Familie mit intrafamiliärer Variabilität konnte bisher keine Mutation gefunden werden. Mögliche Ursachen können darin liegen, daß sich die Mutation in eine GC-reichen Domäne mit einer hohen Schmelztemperatur befindet oder daß das mutationstragende Allel nicht exprimiert wird und somit einer auf cDNA basierenden Analyse entgeht. Weitere Ursachen für das Nichtdetektieren einer Mutation sind bereits ausführlich im Kap. 4.1 diskutiert. Bei den Patienten K29 und K31 wurde auch auf genomischer DNA Ebene (N-terminal, Exon 6-25) keine Mutation gefunden (Ulrike Schlenker 2000). Mutationen bei OI Typ I Patienten kommen in der Regel häufiger in den N-terminalen Abschnitten der Kollagen Typ I Gene vor. Betrachtet man die Verteilung der Mutationen über das gesamte *COL1A1* Gen, so wird der „phänotypische Gradient“, eingeteilt nach klinisch mildem, moderatem und schwerem Phänotyp, den das Gradientenmodell vorhersagt, schlecht ersichtlich (Kennerknecht, 1999). Unterteilt man das *COL1A1* Gen in vier Abschnitte, so findet man 62,9% (17 von 27) OI Typ I Mutationen in der N-terminalen Hälfte des Gens. Betrachtet man das am weitesten N-terminal gelegene Viertel, so sind es noch 40,7% (11 von 27) der Mutationen, die zu einem OI Typ I führen (Kennerknecht, 1999). Die Mutationssuche sollte noch auf die Exons 26 - 49 und gegebenenfalls auf die Exons 1-5 und 50 - 52 ausgedehnt werden, die für die Propeptide kodieren. Nicht auszuschließen ist, daß in einer bisher nicht untersuchten intronischen Sequenz eine funktionelle Mutation vorhanden ist. Die Marker für das Nullmutationsscreening waren ebenfalls nicht informativ.

Auf der 7. Internationalen Osteogenesis imperfecta Tagung (Montréal, Prockop et al., 1999) wurden Daten über das Mutationsscreening bei OI Patienten veröffentlicht. Dabei war die Mutationsrate in den Kollagen Typ I Genen bei OI Typ I Patienten mit blauen Skleren 93% (OI Typ I A) und ohne blaue Skleren 73%. Die Analyse wurde mit der CSGE-Methode durchgeführt. Bei zirka 20% der OI Patienten ist keine genaue Klassifikation nach der Sillence-Klassifikation (1978) möglich. Faßt man

die milderen OI Typen I B und IV in eine Gruppe zusammen, so lag die Kollagen Typ I Mutationsrate nur bei 65% (Prockop et al., 1999). Diese Daten legen nahe, daß die OI auch durch Mutationen in anderen Genen entstehen kann.

Schon seit längerer Zeit wird wegen des heterogenen Erscheinungsbildes der OI diskutiert, ob Mutationen auch in anderen Genen als denen für Typ I Kollagen vorhanden sind. Es gibt zwei große Familien bei denen man durch Kopplungsanalyse die Gene *COL1A1* und *COL1A2* als die Mutationsloci ausschließen konnte. Das wurde gezeigt für einen OI Fall mit rezessiver Vererbung in einer südafrikanischen Familie (Wallis et al., 1993) und in einer Sippe mit amerikanischem Ursprung (Quebec) (Travers et al., 1999). Bei der konsanguinen Großfamilie aus Quebec stellt sich aufgrund des klinischen Bildes die Frage, ob es sich nicht um eine neue Form der OI handelt. Der Genlocus wurde bisher auf die Chromosomenregion 3p22-24.1 eingegrenzt und die Gene *COL5A1*, *COL5A2* und Osteonectin wurden als mögliche Mutationsloci ausgeschlossen. Diese Beispiele zeigen, daß die Mutationssuche bei Patienten, bei denen keine Mutation in den Kollagen Typ I Genen in dieser Arbeit gefunden wurde auf weitere Loci ausgedehnt werden muß. Kopplungsanalysen können für sporadische Fälle nicht angewendet werden. Es ist denkbar, daß ein kleiner, bisher unbekannter Prozentsatz durch **rezessive Mutationen** in anderen Genen hervorgerufen wird, die dann direkt oder indirekt die Kollagen Typ I Genexpression herunterregulieren oder einen Einfluß auf die Translation haben. Eine Beeinflussung der Kollagensekretion ist auch denkbar. Diese Gene zu identifizieren ist von großer Bedeutung für das weitere Verständnis der Mechanismen, die die Kollagensynthese und deren Einbau in die Matrix kontrollieren. Es gibt auch eine okuläre Form der OI, auch als „osteoporosis-pseudoglioma syndrome“ (OPG) bekannt, bei der erhöhte Knochenbrüchigkeit und Blindheit assoziiert sind. Der Locus wurde bisher auf die Chromosomenregion 11q12-13 kartiert. Die Mutationssuche bei OI bleibt auch weiterhin interessant: Es wurde ein Geschwisterpaar mit multiplen Frakturen infolge wellenartiger Defekte der tibialen Kortikalis gefunden, wobei Hyperostose und Hypoostose alternieren (Moog et al., 1999). Weiterhin fanden sich bei diesen Fällen multiple Schaltknochen (Wormian bones, benannt nach Olaf Worm), Dentinogenesis imperfecta und Hypertelorismus, aber keine Osteopenie. Die Expression der *COL1A1* und *COL1A2* Gene zeigte normale Werte, es wurden keine Nullallele gefunden und das Verhältnis von Kollagen Typ III zu Typ I war auch normal. Die Mutter der Kinder zeigt Dentin- aber keine Skelettanomalitäten. Es wurde bereits ein ähnlicher, sporadischer Fall beschrieben (Suarez und Stickler, 1974). Die Diskussion, ob es sich hierbei um einen neuen Typ einer Skelettdysplasie handelt, ist - trotz der starken Überlappung mit Symptomen der OI - noch nicht abgeschlossen.

4.1.1 Glyzinsubstitutionen als Folge von Punktmutationen in den Kollagen Typ I Genen

Genetische Faktoren, die den Phänotyp der OI beeinflussen sind neben dem Verhältnis von normalen und mutierten pro $\alpha 1(I)$ - und pro $\alpha 2(I)$ -Ketten, die Position der Mutation (Gradienten- und Regionalmodell siehe Kap. 4.3.1) und die Art des Glyzinsubstituenten. Weiterhin können Mosaik zur Variabilität des Phänotyps führen (Wang et al., 1996, Wallis et al., 1990 und Cohen-Solal et al., 1996). Homozygote Mutationen entstehen extrem selten, z.B. bei uniparentaler Disomie (Spotila et al., 1992) oder bei heterozygoten Eltern einer Verwandtenehe (De Paepe et al., 1997). Im Falle eines Defekts einer $\alpha 1$ -Kette kann es Kollagenfibrillen geben mit keiner, einer oder zwei mutierten Ketten, wobei die zahlenmäßige Zusammensetzung dem Zufall überlassen bleibt.

Alle im Ulmer Patientenkollektiv gefundenen Mutationen sind heterozygot. Bei den in dieser Arbeit gefundenen OI Mutationen handelt es sich entweder um Neumutationen oder um Keimzellmosaik. Die gefundene C-terminale Mutation im *COL1A1* Gen bei **Patientin K6** mit OI Typ IV, bei der im Nukleotid 3291 eine G>A Transition erfolgte und die die Aminosäureposition 880 (von 1014 Aminosäuren der Tripelhelix) betrifft, unterstützt das Gradientenmodell (Byers et al., 1991) nicht, da bei klinisch mild betroffenen Phänotypen (OI Typ IV) die Mutation eher N-terminal erwartet wird. Die gleiche Mutation wurde bei einem weiteren OI Typ IV Patienten (Lund et al., 1997) detektiert. Die gefundene Mutation bei **Patient K5**, bei dem eine G>C Transversion im Nukleotid 3191 im *COL1A1* Gen vorlag, ist ebenfalls schlecht mit dem Gradientenmodell zu vereinen, da bei einem milden Phänotyp wie in diesem Fall mit OI Typ I/IV die Mutation eher N-terminal erwartet wird. Durch den Nachweis einer Glyzinsubstitution läßt sich auch ein bei OI Typ I Patienten häufiges Nullallel ausschließen. Bei der **Patientin K27** mit OI Typ III wurde eine G>A Transition des Nukleotids 2101 mit der Folge einer Glyzin zu Serin Aminosäuresubstitution in der Position 523 gefunden. Es ist bereits eine weitere Mutation an dieser Stelle beschrieben worden: eine G>T Substitution erfolgte bei einem OI Typ IV Patienten, was einen p.G523C Aminosäureaustausch zur Folge hatte (Sarafova et al., 1998). Eine weitere Betrachtung zur phänotypischen Ausprägung der gefundenen Mutationen ist in Kapitel 4.3.3 im Zusammenhang mit der Erörterung der Auswirkungen des Sp1 Polymorphismus in Intron 1 vom *COL1A1* Gen zu finden.

4.1.2 Spleißmutationen führen zu Exon Skipping

Der Ausschluß eines Introns kann eine Leserasterverschiebung, eine Destabilisierung des RNA-Transkripts oder einen Funktionsverlust des Proteins bewirken (Richard und Beckmann, 1995). Bei der bei Patient K60 gefundenen Exon Skipping Mutation, bei der viele verschiedene Transkripte auftraten (Tab. 3.1.3.1), die jedoch keine Sequenzabschnitte aus den Introns enthielten, handelt es

sich um eine bisher bisher noch nicht beschriebene Mutation. Das vollständige Sequenzieren der Exons 47 - 49 sowie des Intron 48 des *COL1A2* Gens ergab keine Mutation. Bei vielen Exon Skippings ist die Mutation selbst nicht weiter verfolgt worden und somit in der Kollagenmutationsdatenbank (Dalglish 1997) nicht aufgeführt, vermutlich weil es sich um vollständiges Exon skipping handelt. Zwei Transversionen wurden in Intron 48 des *COL1A2* Gens bei Patient K60 gefunden: A-17C und A-41C, wobei im Vergleich mit der Konsensussequenz (Abb. 3.1.3.3) sich die A-17C Position in einer der möglichen Verzweigungsstellen (engl. branch site) befindet. Verzweigungsstellen liegen normalerweise ca. 20 - 40 bp stromabwärts von der Spleißakzeptorstelle. Diese mögliche Verzweigungsstelle liegt nah an der pyrimidinreichen Sequenz und zwei weitere Kandidaten liegen 50 - 60 bp entfernt. Da diese zwei Transversionen jedoch auch bei zwei gesunden Probanden gefunden wurden, scheiden sie als Mutationen aus. Die verschiedenen Transkripte bei dem Patienten K60 machen deutlich, daß weitere, kryptische Spleißstellen (engl. cryptic splice sites) verwendet werden. Das Trinukleotid GGG taucht viermal so häufig in humanen intronischen Sequenzen auf als in einer zufälligen Sequenz, deshalb geht man davon aus, daß diese G-reichen Motive am Spleißprozeß beteiligt sind (Sirand-Pugnet et al., 1995). Eukaryontisches prä-mRNA Spleißen wird nicht nur durch die Konsensussequenzen der Exon-Intron-Übergänge und der Verzweigungsstelle reguliert (Abb. 3.1.3.3). Inzwischen wurde eine weitere intronische (A/U)GGG Wiederholungssequenz in der β -Tropomyosin prä-mRNA des Huhns gefunden, die eine Anbindungsstelle für ein wichtiges, an der Spleißkomplexbildung beteiligtes, Protein ist (Sirand-Pugnet et al., 1995) und als Spleißverstärker (Enhancer) fungiert. Bei Patienten mit einer Mutation im Wachstumshormongen (GH, engl. growth hormone) (IGHD II, autosomal dominante, isolierte Wachstumshormondefizienz) wurde aberrantes Spleißen des Exon 3 (IVS3del) gefunden. Eine G28A Transition und eine 18bp Deletion 28_45del führten zu einem Skipping von Exon 3 (Cogan et al., 1997). In diesem Intron wurde auch eine einzelne Tandem-Wiederholungssequenz (XGGG) gefunden und man geht davon aus, daß das Anbinden des A1 heterogenen nukleären Ribonukleoproteins (hnRNP) eine bedeutende Rolle in der Konformationsbildung, dem Transport und der 5' Spleißstellenselektion in prä-mRNAs, die multiple 5' Spleißstellen besitzen, spielt (Cogan et al., 1997). Die Prüfung des humanen Introns 48 des *COL1A2* Gens ergab das Vorhandensein einer solchen Konsensussequenz, jedoch nicht als Tandemwiederholung. Funktionelle Untersuchungen könnten aufzeigen, ob ein Spleißenhancer in seiner Funktionalität gestört wird, da bisher keine Mutation gefunden wurde. Ein weiterer Spleißverstärker wurde beschrieben (Kiesewetter et al., 1993), indem Polypyrimidin-wiederholungen unterschiedlicher Länge das Spleißverhalten änderten. Polypyrimidin-Wiederholungen in Intron 8 führten zur unterschiedlichen Modifizierung des durch die Mutation p.R117H im CFTR Gen hervorgerufenen

Krankheitsbildes der Cystischen Fibrose, wobei die 7T Variante zu normalem Spleißen führt und die 5T Variante das Spleißen des Exon 9 verändert. Im Intron 48 des *COL1A2* Gens gibt es auch solch einen kurzen Polypyrimidinabschnitt, der bei Patientin K60 jedoch nicht verändert ist. Eine 562 bp Deletion ist im *COL1A1* Gen beschrieben worden, die zu alternativem Spleißen der mRNA des *COL1A1* Gens führt (Wang et al., 1996). Es entsteht eine mRNA mit einer p.603_639del Deletion (2-7% Anteil, der sich unwesentlich auf den Phänotyp auswirkt), wobei eine Kombination mit einer Insertion von 156 nt vom 3' Terminus von Intron 36 entsteht. Eine weitere mRNA wird produziert, die zu 35 - 40% transkribiert wurde, sich nicht mehr im Leserahmen befindet und unter Nutzung einer kryptischen Spleißstelle in Exon 34 mit dem Spleißakzeptor von Exon 37 hergestellt wurde. Eine dritte mRNA Population wurde generiert, indem der normale Exon 32 Spleißdonor mit dem Spleißakzeptor von Exon 37 unter Beibehaltung des Leserahmens (engl. in frame) kombiniert wurde. Der Anteil dieser mRNA an der gesamten mRNA beträgt 55 - 65% und es erfolgt eine p.568_640del Deletion. Während die Großmutter die Deletion im Mosaik besitzt und klinisch nicht betroffen ist, haben Vater und Tochter den OI Typ III. Diese Mutation zeigt viele Besonderheiten. Bei einer Deletion mehrerer Exons würde man normalerweise einen letalen Krankheitsverlauf erwarten, aber die Kombination von partiellem Nullallel des *COL1A1* Gens durch die Unterbrechung des Leserahmens (Komponente für milde Verlaufsform) und einem pro $\alpha 1(I)$ Kollagenkettenabbruch führte zu dem klinisch schweren Erscheinungsbild der OI Typ III. Verschieden wirkende Selektionsmechanismen scheinen den Phänotyp zu modulieren. Es ist möglich, daß bei dem Patienten K60 ein ähnlicher Prozeß abläuft.

Für das Episialingen wird eine ähnliche Konstellation wie für den Polymorphismus p.T983T in Exon 48 von *COL1A2* (Tab. 3.1.3.1) beschrieben (Ligtenberg et al., 1990). Dabei handelt es sich um eine stille Mutation im Exon, die ebenfalls zu allelischen Unterschieden führt. Es ist auch eine G>A Transition, bei der die Aminosäure Threonin erhalten bleibt. Stromabwärts wird im Abstand von 8 bp eine neue alternative 3' Spleißstelle generiert. Wenn R=Guanin (siehe IUPAC code, Anhang) wird die 3' Spleißstelle stromaufwärts genutzt und wenn R=Adenin wird stromabwärts die 3' Spleißstelle verwendet. Berechnet man in diesem Fall die Wahrscheinlichkeit der Verwendung von kryptischen Spleißstellen, so hat die von den Autoren dargelegte Spleißstelle eine Wahrscheinlichkeit von 69,4% [TAAACCCGCA]A[CAGT], die durch die Exonmutation hervorgerufene Sequenzveränderung sogar 78% [AACAGTTGTT]A[CRGG], wenn R=Adenin und 62,1% wenn R=Guanin.

Die helikale Domäne der Kollagene ist durch das sich ständig wiederholende Aminosäuretriplett Gly-X-Y gekennzeichnet. Dabei befindet sich in der zweiten Position, der X-Position, sehr oft ein Hydroxyprolin und betrachtet man den carboxyterminalen Abschnitt des triplehelikalen Abschnitts

der Kollagen Typ I Gene, so findet sich eine starke Anhäufung des Aminosäuretripletts GPP (Abb. 3.3.1). Somit befindet sich dort ein Bereich, der auf DNA-Ebene sehr monoton und außerdem sehr pyrimidinreich ist. Die Aminosäure Prolin wird durch das Kodontriplett CCN kodiert, wobei Cytosin ein Pyrimidin ist. Solche pyrimidinreichen Sequenzen stellen einen Teil der Konsensussequenz der Introns am 3' Terminus dar und damit werden in diesem Bereich gute Voraussetzungen für kryptische Spleißstellen geschaffen, die offenbar zahlreich genutzt werden (Abb. 3.1.1.1). Das β -Globin Gen enthält z.B. eine ganze Reihe von kryptischen Spleißstellen (Cooper et al., 1995).

An der Intron 8 Spleiß-Donor Position des *COL1A1* Gens wurde eine G+1A Transition identifiziert, die zu verschiedenen Spleißprodukten führt (Schwarze et al., 1999). Folgende Transkripte wurden gefunden: Exon 7 Extension durch 96 Nukleotide, Intron 8 oder Intron 7 und 8 Retention, Exon 8 Skipping und Nutzung einer kryptischen Donor Stelle in Exon 8. Diese Arbeitsgruppe untersuchte die Reihenfolge, in der die Exons beim Prozessieren der prä-mRNA entfernt werden. Es gibt schnell gespleißte Exons, die zu Exon Skipping führen und langsam gespleißte Exons, welche zum Verbleiben intronischer Abschnitte im Transkript bzw. der Benutzung kryptischer Spleißstellen führen. Die Ergebnisse zeigen, daß es unabhängig von der Mutation zwei verschiedene Wege gibt, die eine unterschiedliche Reihenfolge des Herausspleißens der Exons aus der prä-mRNA befolgen und daß dies je nach Art des Exons in unterschiedlicher Schnelligkeit passiert. Es gibt somit zwei Determinanten für die Auswirkung von Spleißmutationen. Diese Mechanismen könnten eine weitere Erklärung für die phänotypische Variabilität sein. Weiterhin ist eine temperaturabhängige Expression einer Spleißmutation in den Fibroblasten eines Patienten mit EDS Typ VII beobachtet worden. Es lag eine neu entstandene Substitution des letzten Nukleotids des Exon 6 des *COL1A2* Gens vor. Im Gegensatz dazu fand man bei einem Patient mit der Mutation in der 5' Spleißstelle des Intron 6 ein komplettes Herausspleißens des Exon 6 bei allen Temperaturen (Weil et al., 1989).

4.1.3 Rekurrierende Mutationen bei Patienten mit Osteogenesis imperfecta können unterschiedliche OI Phänotypen hervorbringen

Glyzinsubstitutionen sind die dominierenden Kollagenmutationen. Eine neue Punktmutation im *COL1A2* Gen wurde bei der Patientin K11 mit Osteogenesis imperfecta Typ III gefunden. Eine G→T Transversion in der Nukleotidposition 1121 führt zu einer p.G238C Aminosäuresubstitution. Das ist die bisher N-terminalste Cysteinmutation in *COL1A2*. Bisher wurden fünf weitere Serinsubstitutionen in dieser Position beobachtet, bei denen ein sehr variabler Phänotyp bei den nicht-verwandten Patienten von der klinischen leichten Form der OI I über die variable klinische

Form der OI IV bis hin zur klinisch schwer verlaufenden Form OI III beobachtet werden konnte (Tab. 3.1.4.1).

Die Serumspiegel des Prokollagen Typ I C-Propeptids (PICP), welches die Menge an sezerniertem Prokollagen Typ I in vivo reflektiert, waren bei dieser Patientin K11 reduziert (Brenner et al., 1996), was auf einen quantitativen Effekt der Mutation auf die Kollagen Typ I Biosynthese schließen läßt. Der PICP-Wert war vergleichbar mit denen anderer OI Typ III Patienten und lag höher als bei den Typ I Patienten, bei denen man oft Nullallele findet. Das zeigt, daß - neben den quantitativen Effekten auf die Kollagen Typ I Biosynthese - die Sekretion strukturell defekter Moleküle eine bedeutende Rolle bei der Ausbildung des klinischen Phänotyps spielt.

Jede Substitution der in jeder dritten Position der helikalen Kollagendomäne vorkommenden Aminosäure Glyzin führt zum klinischen Phänotyp einer Osteogenesis imperfecta, somit stellt dies ein ideales in vivo Mutationsdetektionssystem dar. Die vielen Möglichkeiten an Glyzinsubstitutionen erklären, warum ein langer Zeitraum verging, bis rekurrernde Mutationen überhaupt detektiert wurden (Körkkö et al., 1997 und Pruchno et al., 1991).

Betrachtet man die rekurrernden Mutationen, so wird augenscheinlich, daß CpG Dinukleotide häufig vertreten sind. CpG Dinukleotide sind für C nach T Transitionen durch Methylierung und anschließende Desaminierung des 5-Methylcytosins prädisponiert (Coulondre et al., 1978). Die Transitionsrate von Cytosin in CpG Dinukleotiden beträgt 9.7×10^{-8} (in anderen Regionen 7.3×10^{-9}) und die Transversionsrate von Cytosin in CpG Dinukleotiden beträgt 5.4×10^{-9} (bei allen anderen Transversionen liegt der Wert bei 6.9×10^{-9}) (Gianelli et al., 1999). Rekurrernde Mutationen werden daher öfter in CpG Dinukleotiden beobachtet (Pruchno et al., 1991). Im *COL1A1* Gen sind es 7 von 13 Mutationen und in *COL1A2* 5 von 7 Mutationen, die sich in einer CpG Dinukleotidsequenz ereignen (siehe Tab. 3.1.4.1a und 3.1.4.1b). Es wurde festgestellt, daß die Mutationsrate der CpGs im Sequenzkontext YYCGRR (siehe IUPAC Code, Anhang Tab.) und vor allem im Sequenzkontext YYCGRY erhöht ist (Ollila et al., 1996). Das *COL1A1* Gen hat sechs solcher G/CCCCGAGG/T Sequenzmotive, während im *COL1A2* Gen keine bekannt sind (Körkkö et al., 1998).

Unter der Annahme eines zufälligen Basenpaaraustausches und einer fehlenden posttranskriptionalen oder posttranslationalen Selektion sind die Aminosäuren Serin und Cystein als Glyzinsubstituenten in *COL1A1* und *COL1A2* überrepräsentiert (Tab. 3.1.4.2), während in *COL1A1* Valin und Alanin sowie in *COL1A2* Arginin unterrepräsentiert sind. Es könnte daran liegen, daß die schweren Fälle eher klinisch erfaßt werden, denn im allgemeinen führen diese Art der Substituenten zu den klinisch schweren oder letalen Form der OI und selten zur klinisch milden Form der OI. Trotz identischer Mutationen variiert in der Hälfte der Prädilektionsstellen der OI Phänotyp

beträchtlich von milden (OI Typ I) bis zu klinisch schweren Erscheinungsformen (OI Typ II und III) (Tab. 3.1.4.1a und 3.1.4.1b). In einer Familie mit intrafamiliärer klinischer Variabilität mit OI Typ IV wurde eine Mutation beschrieben (Zolezzi et al., 1997), die zum alternativen Spleißen des Exon 26 in *COL1A2* führte. Es wurde spekuliert, daß individuelle genetische Unterschiede in der Spleißmaschinerie zu den verschiedenen OI Typ IV Phänotypen geführt haben könnten. Familien mit intrafamiliärer Variabilität eignen sich gut für die Untersuchung der die Heterogenität determinierenden Faktoren.

Es bleibt nach wie vor offen, warum identische Mutationen bei einer Erkrankung, die einem klassisch monogenen Erbgang folgt, zu einer solchen phänotypischen Variabilität führen. Es gibt eine ganze Reihe von Erkrankungen mit identischen Mutationen und phänotypischer Variabilität (Wolf 1997). Eine Reihe verschiedener Ursachen werden diskutiert, z.B. modifizierende Gene bzw. der allgemeine genetische Hintergrund oder epigenetische Faktoren (Lewin et al., 1998). Umwelteinflüsse und stochastische Effekte können auch eine Veränderung bewirken. So kann z.B. eine funktionelle Variation hervorgerufen werden durch eine Mutation in einer Untereinheit eines Polymerproteins in Kombination mit zufälligem Zusammenbau der Untereinheiten, so daß nicht nur das klinische Erscheinungsbild variiert, sondern auch der Erbgang. Beispiele sind die Chloridkanäle des Skelettmuskels (Lehmann-Horn und Rüdel 1996) und die kritische Tripletexpansion bei Chorea Huntington, indem durch stochastische Effekte die Affinität des Huntingtins für andere Proteine verändert wird (Wolf 1997). Betrachtet man die molekulare Pathogenese der OI, so können auch hier statistische Ereignisse eine Rolle spielen, da Prokollagenmoleküle bei einer *COL1A1* Mutation z.B. ein, zwei, oder gar keine mutierte *COL1A1* Kette beinhalten können. Eine „Qualitätskontrolle“ durch Chaperone wird auch diskutiert (Satoh et al., 1996, Wilson et al., 1998). Chaperone sind Proteine, die die richtige Faltung von anderen Proteinen überwachen. Möglicherweise ist diese Selektion auch ursächlich bei der Patientin K1, bei der sich trotz einer heterozygoten p.G610C Mutation nur 6 - 8% aberrantes Typ I Kollagen in der extrazellulären Matrix fand (Prof. Brenner, Universität Ulm, Abt. Orthopädie, persönliche Mitteilung).

Zusätzliche intragenische Sequenzvariationen können auch ihren Beitrag zum heterogenen Erscheinungsbild einer Erkrankung beitragen (siehe 4.1.2). Es gibt Beispiele, die einen klinischen Zusammenhang mit der Assoziation von Polymorphismen nahelegen. Im Anhang dieser Arbeit (Tab. 1) ist eine Liste der bei den Patienten gefundenen Polymorphismen aufgeführt. Ein Beispiel liefert eine Mutation im Prion Gen (*PRNP*), die zu einer p.D178N Substitution führt. Durch einen assoziierten Polymorphismus (p.M129V) wird der Phänotyp verändert. In 15 Fällen mit Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (CJD) wurde Valin in dieser Position gefunden, während sie bei familiärer fataler Insomnie (FFI) (Goldfarb et al., 1992) durch Methionin substituiert war. Im Rahmen dieser Arbeit

wurden deshalb mit Hilfe von Assoziationsstudien mehrere Kandidatengene des Knochenmetabolismus untersucht, die eine Rolle als Modifikatoren bei der Ausprägung der Heterogenität der Osteogenesis imperfecta spielen könnten.

Die im Rahmen des Mutationsscreenings im Leserahmen (engl. in frame) gefundene Deletion eines Aminosäuretripletts aus Prolin, Glyzin und Alanin im Bereich 873-875 (Abb. 3.1.4.1) gehört ebenfalls zu den rekurrierenden Mutationen. Bei dieser Position scheint es sich auch um eine Prädispositionsstelle zu handeln. Weitere Deletionen sind bereits beschrieben worden (Abb. 3.1.4.3). In diesem Fall findet sich eine Übereinstimmung der Phänotypen bei identischer Mutation, alle Patienten haben den letalen OI Typ II. Da das Glyzin-X-Y Motiv unter Beibehaltung des Leserasters erhalten bleibt wird kein Nullallel gebildet und erklärt somit den klinisch schweren Verlauf der OI. Die strukturelle Veränderung befindet sich weit C-terminal (AS 873-875 von 1014) und da die Helixbildung in N-terminale Richtung erfolgt, wird die Tripelhelix exzessiv posttranslational übermodifiziert. Die Inkorporation verkürzter Kollagenketten in die Tripelhelix stört die Kollagenbildung und somit die Kollagenfibrillen massiv.

4.1.4 Nullmutationsscreening zur schnellen Mutationsdetektion bei OI Typ I Patienten

Das Nullmutationsscreening ist eine schnelle und zuverlässige Methode, die vor allem bei OI Typ I Patienten zu einer schnelleren Mutationsdetektion führt und auch bei Segregationsanalysen in OI Familien sehr hilfreich ist, wo sie auch im Rahmen der Pränataldiagnostik eingesetzt wird.

Mutationen, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation führen, scheinen die häufigste molekulare Ursache für den OI Typ I Phänotyp zu sein (Willing et al., 1996). Das können Punktmutationen sein oder solche, die zu einer Leserasterverschiebung (engl. frame shift) führen (Deletionen, Insertionen). Auch Spleißmutationen sind in der Lage, wenn intronische Sequenzen im Transkript verbleiben oder kryptische Spleißstellen benutzt werden, eine Leserasterverschiebung herbeizuführen, die letztendlich wieder zu einem vorzeitigen Kettenabbruch bei der Translation führen. Es wurde festgestellt, daß Einzelbaseninsertionen oder -deletionen sehr häufig im Sequenzkontext CCC CCT vorkommen, wenn dieser Sequenzkontext dupliziert ist (Jego et al., 1993). Bei einem Mutationsscreening von OI Typ I Patienten (Körkkö et al., 1998) wurden in 9 von 14 Fällen Einzelbaseninsertionen oder -deletionen im Sequenzkontext CCC CCT gefunden, der für die Aminosäuren Pro-Pro bzw. Pro-Hyp kodiert.

Für ein Nullmutationsscreening werden mehrere Fragmentlängenpolymorphismen verwendet. Der *MnII* Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) in der 3' untranslatierten Region (UTR) von *COL1A1* (Westerhausen et al., 1990) wird in der Literatur als C88T Transition nach dem Stopkodon angegeben, das entspricht der genomischen Position g.16483C>T. Die

Heterozygotenfrequenz des *MnII* RFLPs ist sehr niedrig (0.39) (Nuytinck et al., 1998), deshalb ist er bei vielen OI Patienten nicht informativ. Des weiteren existiert ein 4 bp Insertionspolymorphismus c.5075-5076insAGCA (dem Nukleotid nt 5194 folgend) in der 3'UTR des *COL1A1* Gens, stromabwärts von dem *MnII* RFLP (Nuytinck et al., 1998). In der Datenbank GenBank Sequenz Z74615 ist die Insertion nicht angeführt, dieses Allel kommt mit einer Frequenz von 29% vor. Das Allel mit der 4 bp Insertion hat eine Frequenz von 71% und die Heterozygotenfrequenz liegt bei 0,41. In dieser Arbeit wurde durch eine Kombination der Marker *MnII* RFLP und des 4 bp Insertionspolymorphismus die Informativität der Marker erhöht. Von den 22 untersuchten OI Typ I Patienten waren 5 Patienten heterozygot, an denen der Nachweis eines Nullallels durchgeführt wurde. Bei einem OI Patient (K73) konnte ein Nullallel nachgewiesen werden.

Die RFLP Polymorphismen *RsaI* in *COL1A1*, *PvuII* in *COL1A1* und der (ACT)_n VNTR in *COL1A2* werden für Segregationsanalysen in OI Typ I Familien benutzt. Der *RsaI* RFLP (Sykes et al., 1986) befindet sich im *COL1A1* Gen (Intron 5). Der *PvuII* RFLP befindet sich in Exon 25 in *COL1A2* (Constantinou et al., 1990) und stellt eine CpA nach CpC Transversion in Kodon 392 (p.392P>P) dar. Das Allel mit der *PvuII* Schnittstelle hat eine Frequenz von 60,3%, das Allel ohne Schnittstelle kommt mit einer Frequenz von 39,7% vor und die Heterozygotenfrequenz beträgt 45%. Ein hoch polymorpher (ACT)_n VNTR (engl. variable number of tandem repeats) Mikrosatellit wurde in Intron 12 des *COL1A2* Gens gefunden (Pepe 1993). Es wurden Allele mit 6 bis 12 Wiederholungen gefunden, wobei die Allele (ACT)₁₁ und (ACT)₁₂ sehr selten sind und nur in der afrikanischen Bevölkerung gefunden wurden. Die Heterozygotenfrequenz liegt zwischen 0.634 und 0.741. Da Trinukleotidwiederholungen instabil sein können wurde vorgeschlagen, bei bisher nicht vollständig geklärten Kollagenopathien diesen (ACT)_n VNTR zu analysieren (Pepe 1993). Inzwischen stehen weitere Polymorphismen zur Verfügung: g.9168C>T in Intron 27 von *COL1A1*, detektierbar durch eine *TaqI* Restriktionsenzymkennungsstelle (Mirandola et al., 1999) mit den folgenden Allelfrequenzen: 0.88 (C-Allel) und 0.12 (T-Allel). Solche SNPs (engl. single nucleotide polymorphisms) findet man in der Humanen Genomischen Bi-Allelischen Sequenzdatenbank (<http://hgbase.cgr.ki.se>).

Die Mechanismen, durch die Mutationen im *COL1A1* Gen die Reduktion der pro $\alpha 1(I)$ Kettensynthese bewirken, sind sehr heterogen. So könnte das Fehlen eines Allels auf Mutationen im Promotor oder Enhancer hinweisen. Eine solche Mutation wurde bisher noch nicht identifiziert (Willing et al., 1995 und Ergebnisse im Rahmen dieser Dissertation, die dieses Ergebnis bestätigen). Des weiteren kann die Produktion instabiler RNA, welche im Nukleus degradiert oder ein aberranter mRNA Transport vom Nukleus ins Zytoplasma zu erniedrigten mRNA Spiegel führen

(Willing et al., 1992). Nullallelmutationen können auch zu einer erniedrigten Transkription führen, wie z.B. bei einer A>G Transition an der 3' Akzeptorstelle von Intron 16. Diese Transition führte zu einem Exon 17 Skipping, bei dem nur etwa 10% der abnormalen mRNA statt der erwarteten 50% gemessen wurden (Willing et al., 1992). Bei einer normalen Transkriptionsrate kann sich eine Nullmutation so auswirken, daß eine verringerte Heterotrimerbildung erfolgt. Bei einer 5 bp Deletion mit Leserasterverschiebung konnte z.B. kein Einbau der instabilen, verlängerten $\alpha 1(I)$ Ketten in die Tripelhelix beobachtet werden (Willing et al., 1990).

4.2 Mutationskartierung bei Sonderformen der Osteogenesis imperfecta

4.2.1 Osteogenesis imperfecta Typ V Patienten mit hyperplastischer Kallusbildung

OI Patienten mit hyperplastischer Kallusbildung sind bisher immer in der OI Typ IV Gruppe nach der Sillence-Klassifikation zusammengefaßt worden. International übereinstimmend ist diese Patientengruppe einer eigenen Klassifikation (OI Typ V) zugeordnet worden (Glorieux et al., 2000). Es wird davon ausgegangen, daß diesem OI Typ keine Kollagen Typ I Mutation zugrundeliegt, wie auch die in dieser Arbeit vorgelegten Sequenzierdaten bestätigen. Hyperplastische Kallusbildung ist ein sehr auffälliges Merkmal einiger OI Patienten. Bemerkenswerterweise handelt es sich hierbei um Patienten mit weißen Skleren und einer negativen Familienvorgeschichte. Die Kallusbildung führt zu einer Bewegungseinschränkung der Patienten. Bisher konnte noch nicht geklärt werden, warum Männer häufiger als Frauen betroffen sind (Falvo et al., 1974). Durch das Mutationsscreening konnte bei einer Patientin mit OI Typ IV, die nur einen singulären hyperplastischen Kallus ausbildete, eine c.3172G>A Transition gefunden werden, die zu einer p.G880S Substitution führte. Die Zuordnung dieser Patientin zum OI Typ V ist noch unklar, da das diagnostische Hauptkriterium - eine vermehrte Kallusbildung - noch nicht beurteilt werden kann. Ein weiteres Kriterium ist, daß OI Typ V Patienten bisher keine Mutationen in den Kollagen Typ I Genen zeigten. Der Patient K23 hatte in der Kindheit eine Frakturrate von 2 bis 5 Frakturen pro Jahr. Im Alter von 10 Jahren zeigte sich nach einem Knochenbruch an der distalen Metaphyse des rechten Femurs ein hyperplastischer Kallus (Brenner et al., 1989). Nach operativer Entfernung trat innerhalb von zwei Wochen an dieser Stelle wiederholt eine Kallusbildung auf, die zunächst ein rapides Wachstum zeigte, das sich dann aber mit der Zeit verlangsamte. Eine biochemische Untersuchung des Kallusgewebes ergab, daß Kollagen- und Proteingehalt bezogen auf die Zellzahl gering und daß Typ I und Typ III Kollagen übermodifiziert waren, wie durch die Messung des erhöhten Gehalts an Hydroxylysin herausgefunden werden konnte. Der Mineralisationsgrad des Kallusgewebes war ebenfalls gering und der Hydroxylierungsgrad des Kollagens war in den unreifen Regionen am

höchsten. Im nativen Knochengewebe des Patienten fand sich jedoch ein normaler Gehalt an Protein und Kollagen, bezogen auf die Zellzahl, sowie eine normale Hydroxylierung von Prolin und Lysin des Typ I Kollagen. Auch Hautfibroblasten des Patienten synthetisierten in vitro normal modifiziertes Typ I Kollagen. Es gibt OI-Patienten, bei denen überschießende knochenartige Gewebe ausgebildet werden, die das Aussehen eines Osteosarkoms haben (Lasson et al., 1978).

Bei den proteinchemischen Untersuchungen des Ulmer OI Patientenkollektivs konnten in einem Teil der Fälle Hinweise auf heterozygote Kollagen Typ I Defekte festgestellt werden, da durch Übermodifikation ein verlangsamtes Laufverhalten einer Bande neben der Normalbande bei der Gelelektrophorese auftrat. Es gibt aber Patienten, deren Prokollagen Typ I Proteinfraction in der Gelelektrophorese normal oder ausschließlich langsamer wandert. Für letztere Beobachtung gibt es bisher noch keine Erklärung (Prof. R. Brenner, persönliche Mitteilung). Kollagen von OI Typ I Patienten weist meist keine Übermodifikation auf (Brenner et al., 1989). Da die Übermodifikation von Kollagen eine physiologische Eigenschaft der fetalen Knochenentwicklung ist, kann sie im adulten Knochen als pathologisches Unreifezeichen angesehen werden (Kirsch et al., 1981). Auch in osteoporotischen Knochen fand man eine höhere Hydroxylierung der Lysinreste in den $\alpha 1(I)$ - und $\alpha 2(I)$ -Ketten (Kowitz et al., 1997). Weiterhin wurde gesehen, daß dadurch eine Überglykosylierung der Hydroxylsylreste stattfindet, die durch Störung der Fibrillogenese wiederum negativ mit dem Knochenvolumen korreliert ist und somit dessen mechanische Eigenschaften beeinträchtigt (Bätge et al., 1997). Übermodifikation wurde bei dem Patienten K23 nur in der Randzone des wachsenden Kallus gefunden, aber nicht im Knochen bzw. in Zellkulturen der verschiedenen Gewebe (Brenner et al., 1989). Die Erhöhung der posttranslationalen Hydroxylierung von Prolin und Lysin kommt bei OI Patienten vor, die durch eine Mutation in den Typ I Kollagenen eine verzögerte Helixbildung haben (Raghunath et al., 1994). Durch den Einbau einer Aminosäure mit Seitenkette kommt es zu länger offenstehenden Einzelketten bei der Helixbildung. Aus diesem Grund können modifizierende Enzyme, die OH-Gruppen einfügen, länger wirken, so daß es zur Übermodifikation kommt. Der unterschiedliche Grad an Kollagen-modifikation bei dem Patienten K23 mit rezidivierender Kallusbildung legt den Schluß nahe, daß ein Defekt in einem bisher unbekannten Kontrollmechanismus während der fetalen Knochenentwicklung und der Gewebereparatur vorliegt, der die Aufgabe hat, einer zu frühen Mineralisierung vorzubeugen (Glimcher et al. 1980). Weitere Faktoren, wie z.B. der Wachstumsfaktor TGF- β scheinen auch einen Einfluß auf die Hydroxylierung der Lysinreste zu haben (siehe Kap. 4.3.5).

Es läßt sich zusammenfassen, daß trotz biochemischer Veränderungen bei den Patienten K23 und K24 in den Kollagen Typ I Genen keine Mutationen gefunden worden sind. Das stimmt mit den Literaturdaten überein, da bei OI Typ V Patienten bisher keine Mutationen gefunden worden sind

(Glorieux et al., 2000). Ausführliche Untersuchungen zur Kallus-bildung dieser Patienten sind bereits publiziert (Mörke et al., 1993 und Brenner et al., 1989). Die Patientin K6 gehört trotz der Kallusbildung bisher in die Klassifikation OI Typ IV, da bei ihr die Mutation p.G880S im *COL1A1* Gen gefunden wurde (Kap. 5.1.3). Die hyperplastische Kallusbildung war bei der Patientin K6 bisher nur einmal zu beobachten.

Es gibt Hinweise darauf, daß manche OI Patienten Defekte in anderen Proteinen haben, z.B. im Osteonectin (Fisher et al., 1987). Es konnte gezeigt werden, daß die Über-modifikation von Kollagen Typ I nicht zwingend die Folge einer Mutation in einem Kollagenen sein muß (Daw et al., 1988). In einer Familie mit OI Typ III konnte eine Kopplung mit den Kollagen Typ I Genen ausgeschlossen werden. Es wurde gezeigt, daß bei OI Patienten nicht nur die Lysyl-, sondern auch die Prolylreste übermodifiziert sind, ein Zusammenhang mit der Frakturrate oder Wachstumsretardierung konnte nicht festgestellt werden (Lehmann et al. 1995). Zusätzliche OH-Gruppen stören die Fibrillogenese (bzw. Selbstzusammenlagerung, Torre-Blanco et al., 1992) und die Mineralisation, indem die Fibrillen oft irregulär geformt sind und die Apatitkristallgröße verringert ist (Vetter et al., 1991). Bei der OI Typ V handelt es sich um eine autosomal dominante Form. Defekte bei Enzymen, die posttranslationale Modifikationen ausführen, folgen meist einem rezessiven Erbgang und kommen primär nicht als Kandidaten in Frage. Es scheint eher so zu sein, daß ein Defekt in der Regulation der koordinierten Osteoblastendifferenzierung und -funktion die Ursache ist (Glorieux et al., 2000). Dekorin, ein extrazelluläres Matrixprotein das den Kollagen-Fibrillendurchmesser reguliert, könnte ein Kandidat für einen Modifikator der OI sein. Seit längerem ist bekannt, daß die Expression der Proteoglykane Dekorin (DCN) und Biglykan (BGN) bei OI Patienten reduziert ist (Fedarko et al., 1992). Aus diesen Gründen wurde bei den zwei OI Patienten mit hyperplastischer Kallusbildung eine Analyse des Dekoringens durchgeführt. Da keine Sequenzveränderung festgestellt werden konnte (Walter 2001), muß die Regulierung durch andere Faktoren auf Transkriptions- oder Translations-, eventuell auch auf Proteinebene erfolgen.

4.2.2 Das Brucksyndrom als Sonderform der OI

Bisher wurde vermutet, daß das Brucksyndrom (MIM 259450) allelisch zur OI ist. Die in dieser Arbeit vorliegenden Sequenzdaten konnten aber eine Kollagen Typ I Mutation nicht bestätigen. Peter Byers (persönliche Mitteilung in Mc Pherson 1997) bestätigte auch für einen weiteren Brucksyndrom-Patienten, daß keine Kollagen Typ I Mutation vorliegt. Erste Hinweise auf eine Störung der Quervernetzung des Typ I Kollagen des untersuchten Patienten sind bereits publiziert (Brenner et al., 1993). Die Quervernetzung der Fibrillen ist ein essentieller Schritt für die mechanische Stabilität und Zugfestigkeit der Kollagen- fibrillen.

Wichtige Enzyme für die Quervernetzung sind die Lysylhydroxylasen 1, 2 und 3 (*PLOD1*, *PLOD2* und *PLOD3*, procollagen-lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1, 2 und 3). In einer Studie konnte gezeigt werden, daß hohe Enzymspiegel sowohl vom *PLOD1* Gen also auch vom *PLOD3* Gen in Hautfibroblasten wie auch in Knochenmarkzellen gefunden worden sind (Uzawa et al., 1999). *PLOD2* mRNA hingegen fand sich sogar sechsfach erhöht in den Osteoprogenitorzellen, aber nicht in den Hautfibroblasten. Dieser Anstieg beginnt zeitgleich mit der Matrixmineralisierung und es erfolgt ein Anstieg in der Hydroxylierung der Lysylreste in den nicht-tripelhelikalen Domänen der Typ I Kollagenketten. Die Pathogenese von Bruck-Patienten ist wahrscheinlich auf einen Quervernetzungsdefekt zurückzuführen und das *PLOD2* Gen ist ein wichtiger Kandidat dafür. Die Erforschung des molekularen Defekts für das Brucksyndrom (BS) gestaltet sich schwierig, weil seit der Erstbeschreibung 1897 weltweit nur 13 weitere Patienten als Einzelfälle beschrieben wurden (Bruck 1897, Sharma und Anand 1964, Viljoen et al. 1989, McPherson 1997, Breslau-Siderius et al., 1998) und somit keine Stammbäume für Kopplungsanalysen zur Verfügung stehen. Erst 1999 wurde durch genomweites Screening bei einer konsanguinen kurdischen Familie mit drei Betroffenen mit Brucksyndrom (BS) und vier nicht betroffenen Kindern eine einzelne Region auf Chromosom 17p12 identifiziert, bei der alle betroffenen Kinder einen identischen Haplotyp zeigen. In dieser Region vermutet man eine Knochen-Telozeptidyl-Lysylhydroxylase, die für den BS-Phänotyp verantwortlich gemacht wird. Diese Annahme resultiert aus der verminderten Hydroxylierung der Lysinreste der Telopectide, was zu aberranter Quervernetzung führt, während die Lysinreste der Tripelhelix normal modifiziert sind. Es wird postuliert, daß zwei Formen der Lysylhydroxylase (LH) (procollagen-lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygenase, EC 1.14.11.4) existieren: eine helikale LH (HLH) und eine Telopectid-LH (TLH). Die Lysylhydroxylase katalysiert die Umwandlung von Lysin zu Hydroxylysin. Weiterhin ist zu beachten, daß die Quervernetzung des Kollagen Typ I Kollagens gewebeabhängig ist, so wird Kollagen Typ I in Knochen und Kollagen Typ II im Knorpel durch Seitenwege des Hydroxyallysin Metabolismus (Aldehyd aus Hydroxylysin (Hyl)) unterstützt, während die Quervernetzung z.B. in der Haut und der Kornea über den Allysin Metabolismus (Aldehyd aus Lysin) beschränkt wird. Auffällig ist bei den Patienten auch, daß das Fehlen der Quervernetzungen aus dem über Hydroxylysin verlaufenden Syntheseweg durch den über Lysin verlaufenden Syntheseweg ersetzt werden können. Letztendlich führen beide Synthesewege zu verschiedenen Formen von Quervernetzungen, wobei bei dem Hydroxyallysinweg aus bifunktionalen noch trifunktionale Verbindungen hergestellt werden können (Bank et al., 1999). Das erklärt auch, daß Knochen und Gelenke in gleichem Maße betroffen sind und warum keine Kollagen Typ I Mutationen gefunden worden sind.

Mit Hilfe der Lysyloxidase (LOX, protein-lysin 6-oxidase, EC 1.4.3.13) erfolgen weiterhin Quervernetzungen, wobei interagierende Aldehyde (Allysin und Hydroxyallysin) erzeugt werden. Die Lysyloxidase ist ein extrazelluläres Kupferenzym und initiiert nicht nur die Quervernetzung der Kollagene sondern auch des Elastins, indem sie die oxidative Desaminierung der ϵ -Aminogruppe der Lysin- und Hydroxylysinreste katalysiert (Hämäläinen et al. 1993). Beim Ehlers-Danlos-Syndrom Typ V (MIM 305200), IX (MIM 304150), beim Menkes Syndrom (MIM 309400) (Kuivaniemi et al. 1985) sowie bei der X-gebundenen Form der Cutis laxa (occipital horn syndrome) (Byers et al., 1980) findet man erniedrigte Enzymspiegel der Lysyloxidase. Da sich der Genlocus auf 5q23.3-q31.2 befindet ist er bei den X-gebundenen Formen als Primärdefekt auszuschließen. Ein markantes Merkmal der OI Patienten sind zusätzliche Schaltknochen im Schädelbereich (Wormian bones). Es gibt Patienten (Khakoo et al. 1997) mit Cutis laxa, Wormian bones und erniedrigter Lysyloxidaseaktivität, die sich weiterhin durch Gelenkschlaffheit auszeichnen. Da weitere Kennzeichen der OI oder des EDS wie z.B. blaue Skleren und Osteoporose hinzukommen können, ist eine differentialdiagnostische Abgrenzung oft nicht möglich. Ein weiteres Beispiel ist ein Patient mit Symptomen der OI (blaue Skleren) und des EDS (Gelenkschlaffheit, schlaffe Haut), bei dem eine heterozygote Deletion von Exon 9 in *COL1A2*, hervorgerufen durch eine G+5A Substitution in der Spleißdonorregion von Intron 9 (Feshchenko et al. 1998), gefunden wurde. Eine Untersuchung der Patienten der Ulmer Zellbank auf mögliche Mutationen in den Kollagen Typ I Genen war erforderlich, auch wenn die biochemischen Daten (Brenner et al., 1993) bisher keinen Hinweis auf eine Kollagen Typ I Mutation gaben oder ein atypischer OI Phänotyp vorliegt.

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Bruck-Syndrom Patienten K22 und seiner Familie fand sich keine Rekombination (engl. cross over) in der Kandidatenregion auf Chromosom 17p12. Die Marker (alle 2 cM) wurden möglichst eng gelegt, um bei einem Rekombinationsereignis die Region des Krankheitslocus gleichzeitig weiter einzugrenzen. Bei dem Index-Patient dieser Familie variierten der Durchmesser der Kollagenfibrillen des Osteoids (Brenner et al., 1993), so daß auch hier eine Untersuchung des Dekorings sicher interessant wäre. Beim Pepsinverdau von Knochenstücken war das Kollagen leichter herauszulösen als im normalen Knochen. Weiterhin waren die Apatitkristalle vergrößert. Durch die gestörte Fibrillenformation kommt es zu Veränderungen in der Mineralisation der Knochen. Das Kollagen Typ I Protein des Patienten zeigte in der Gelelektrophorese ein normales Wanderungsverhalten.

Eine Störung der Kollagenvernetzung ist immer für die Fragilität der Knochen bei OI Patienten verantwortlich gemacht worden. Bisher gab es nur wenig Informationen über die Rolle des Kollagens beim Verlust der Gewebeintegrität. Es existieren aktuelle Untersuchungen (Bank et al.,

2000), bei denen die Kollagenvernetzung bei OI Patienten der Typen I, III und IV untersucht worden ist, indem die Quervernetzungen wie Hydroxylsypyridinolin (HP) und Lysylpyridinolin (LP) sowie die Menge des tripelhelikalen Hydroxylysin (Hyl) gemessen worden sind. Wider Erwarten zeigte sich, daß die Fragilität der Knochen nicht durch eine gestörte intrafibrilläre Kollagenanordnung und/oder den Verlust der Quervernetzungen zustande kommt. Nach Pepsinverdau zeigte sich weiterhin, daß die Kollagenmoleküle an der Fibrillenoberfläche weniger Quervernetzungen aufweisen als im Fibrillennern. Das widerlegt die Annahme, daß eine zufällige, gleichmäßige Verteilung der aberranten Kollagenmoleküle vorliegt und zeigt, daß sich die durch eine Mutation veränderten Moleküle präferentiell an der Oberfläche befinden.

4.3 Mögliche Modifikatoren für den klinischen Schweregrad der OI

4.3.1 Assoziation des Schweregrades der OI mit der Position der Glyzinsubstitution anhand von Modelluntersuchungen zur Kollagenstabilität

Werden mutierte Kollagenketten in die tripelhelikale Domäne eingebaut stören sie empfindlich die hohe Ordnungsstruktur der Kollagenfibrillen. Die phänotypische Ausprägung einer Glyzinsubstitution in Typ I Kollagen hängt u.a. von deren Position ab, was zur Einführung eines Gradientenmodells (Byers et al., 1991) führte, bei dem die letalen OI Fälle eher im C-terminalen Bereich zu finden sind und die milden eher N-terminal. Nachdem zunehmend Ausnahmen von diesem Modell bekannt geworden sind, wurde ein zweites Modell entwickelt, das Regionalmodell (Marini et al., 1993 und Wang et al., 1993), bei dem die schwereren OI-Erkrankungen Regionen zugeordnet werden, die einen größeren Beitrag zur Stabilität der Kollagenmoleküle leisten. Glyzinsubstitutionen erniedrigen die thermische Stabilität der Tripelhelixmoleküle, verzögern die Bildungsrate des Prokollagens bei physiologischen Temperaturen, erhöhen den Grad an posttranslationalen Modifikationsprozessen und beeinträchtigen die Exportrate mutierter Ketten aus der Zelle (Byers und Steiner 1992). In vitro Experimente lassen den Schluß zu, daß Kollagenmoleküle, die abnormale Kollagenketten tragen, langsamer in die Fibrillen eingebaut werden als normale (Torre Blanco et al., 1992). Bei normalen Knochen dienen die Kollagenfibrillen als Matrice für die Mineralisation, dort werden Hydroxyapatitkristalle in die Fibrillen eingebaut (Traub et al., 1989). Bei normalen Knochen sind 70% der Kollagenfibrillen mit Hydroxyapatitkristallen inkrustiert, während gleiche Bereiche bei altersgleichen OI Kindern nur wenig Inkrustierung mit Hydroxyapatitkristallen zeigten (Culbert et al., 1995). Die Fibrillen bestehen aus normalen und mutierten Kollagenketten. Diese Ergebnisse zeigten, daß das Vorhandensein abnormaler Kollagenketten in derselben Fibrille die Einlagerung von Hydroxyapatitkristallen massiv erschwert, der genaue Mechanismus ist bisher jedoch noch nicht

verstanden. Es ist möglich, daß in der Mineralisation gestörte Fibrillen in Knochen von OI Patienten die Fähigkeit verlieren, Faktoren, die die Mineralisation fördern, zu binden (Culbert et al., 1995). Zur Untersuchung der Hypothese des Regionalmodells wurden die bis zu diesem Zeitpunkt bekannten Mutationen aus der Kollagenmutationsdatenbank (Dalglish, 1997) in Beziehung zu Regionen großer Kollagenstabilität (cluster) gesetzt, die nach einem Modell (Dölz et al., 1986) berechnet wurden. Der Parameter P_{rel} (engl. relative probability) gibt die relative Wahrscheinlichkeit der Anwesenheit eines Tripeptids bezogen auf die flankierenden Tripeptide in einer Sequenz an (siehe Kap. 3.3.1). Es gibt zwei Selektionsbedingungen, die man variieren kann, um eine cluster-Einteilung vorzunehmen: die minimale cluster-Länge und den P_{rel} -Wert. Als optimale cluster-Größe erwies sich eine Anzahl $\geq$ drei Tripeptide. Der P_{rel} -Wert wurde so gelegt, daß sich eine ausreichende Menge an Tripeptiden innerhalb der Regionen großer Kollagenstabilität (cluster) befindet (Dölz et al., 1986). Diese Auswahl ist also willkürlich. Wird der P_{rel} -Wert zu niedrig gewählt, so sind fast alle Tripeptide in Regionen großer Kollagenstabilität. Die Verteilung zeigt, daß sich - entgegen der am Anfang dieses Kapitels genannten Annahme des Regionalmodells - die klinisch schwer auswirkenden Mutationen offensichtlich nicht gehäuft in Bereichen mit hoher Proteinstabilität befinden. Glyzinsubstitutionen innerhalb und außerhalb der Proteinregionen, die einen höheren Beitrag zur Stabilität leisten, haben den gleichen störenden Effekt. Die Ausnahmen des Gradientenmodells müssen anders erklärt werden.

4.3.2 Ein *COL1A1* Sp1-Polymorphismus ist mit unterschiedlicher Ausprägung des OI Phänotyps assoziiert

Eine genetische Komponente bei der Bildung der Knochenmasse ist gut dokumentiert (Pocock et al., 1987) und eine Reihe von Kandidatengenen (siehe Kap. 4.3.5) wurden untersucht, die einen möglichen Einfluß auf den Knochenmetabolismus haben (siehe Kap. 1.4). Kollagen Typ I ist das Hauptprotein in Knochen und es ist naheliegend, daß die Regulation der Expression der Kollagen Typ I Gene in Beziehung zur genetischen Regulation der Knochendichte steht (Tokita et al., 1994). Bei der Untersuchung von 26 Patienten mit isolierter Osteoporose wurden 3 Patienten gefunden, die heterozygot für Mutationen in *COL1A1* (p.P27A, n=2) oder *COL1A2* (p.G661S) waren (Spotila et al., 1991). Es gibt eine konsanguine Familie, bei der die Heterozygoten für eine 4 bp Deletion in *COL1A2* eine ausgeprägte Osteoporose zeigen und nur das homozygot betroffene Kind OI hat (Prockop 1988). Weiterhin zeigte sich, daß Osteoporose mit einem Sp1 Polymorphismus im ersten Intron des *COL1A1* Gens assoziiert ist (Grant et al., 1996). Man geht davon aus, daß sich dieser Polymorphismus auf die Regulation der Transkription des *COL1A1* Gens funktionell auswirkt. Es wurde schon gezeigt, daß das erste Intron einen Einfluß auf die Transkriptionsaktivität hat, indem

chimäre Gene konstruiert wurden, die unterschiedlich große Segmente des menschlichen pro $\alpha 1(I)$ Kollagen Gen Promotors enthielten (Rossouw et al., 1987).

Sp 1-Transkriptionskontrollsequenzmotive im Intron 1 von COL1A1

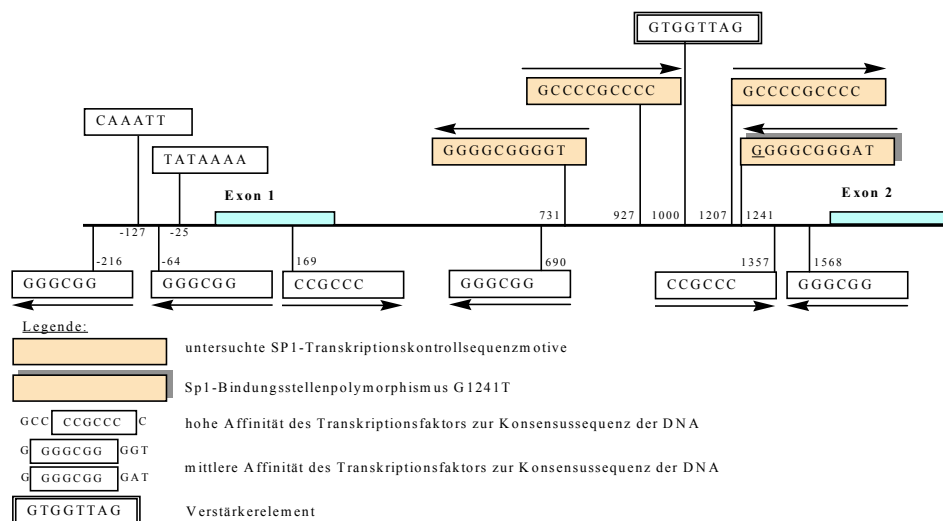


Abb. 4.3.2.1 Die Promotorregion des COL1A1 Gens

Eingezeichnet sind potentielle Anbindungsstellen des Transkriptionsfaktors Sp1.

Vier mögliche Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Sp1 befinden sich in der Zentralregion von Intron 1 in der unmittelbaren Nähe eines Enhancer Elements (Abb. 4.3.2.1). Zwei der vier Sp1 Motive haben eine relativ hohe und zwei eine mittlere Affinität für den Transkriptionsfaktor Sp1. Einer der Konsensussequenzen mit mittlerer Affinität beinhaltet den Polymorphismus (Rossouw et al., 1987). Mit der in-vivo-footprinting Methode würde sich die Frage klären lassen, welche der möglichen Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Sp1 tatsächlich genutzt werden.

Konsensussequenz des Transkriptionsfaktor Sp1



Promoter-specific activation of RNA-Pol II transcription by Sp1 (Kadonaga et al. 1986, TIBS 11)

Sequenz	Relative Affinität
G GGGCGG GGC	hoch
T GGGCGG GGC	hoch
T GGGCGG AGT	hoch
G GGGCGG AGC	hoch
G GGGCGG GGG	moderat
G GGGCGG GGT	moderat
T GGGCGG GGT	moderat
T GGGCGG AAC	moderat
G GGGCGG GAT	moderat
G GGGCGG GAC	moderat
G GGGCGG AGA	niedrig
G GGGCGG CGC	niedrig

Abb. 4.3.2.2 Veränderungen in der Konsensussequenz des Transkriptionsfaktors Sp1 haben Einfluß auf die Affinität

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei sechs nicht verwandten Patienten mit z.T. sehr schwerer Osteoporose (K29, K31, K32, K34, K47 und P3), die sich nicht auf sekundäre, körperliche Inaktivierung zurückführen ließ, das erste Intron des *COL1A1* Gens sequenziert. Es wurde kein Basenaustausch in einem der vier möglichen Sp1 Motive, die das Enhancermotiv flankieren, gefunden.

Es wurde ein G>T Polymorphismus in einer dieser Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Sp1 gefunden, der signifikant mit reduzierter Knochendichte bei postmenopausalen Frauen assoziiert ist (Grant et al., 1996). Dabei zeigte sich, daß Frauen, die homozygot für das 'T'-Allel waren, im Durchschnitt eine geringere Knochendichte hatten als Frauen mit dem 'G'-Allel. Die Heterozygoten nahmen dabei einen intermediären Status ein, was auch in einer größeren Studie (Uitterlinden et al., 1998) bestätigt werden konnte. Die klinische Überlappung von Osteoporose und OI gab den Ausschlag für die Untersuchung des Sp1 Polymorphismus an OI Patienten. Die beobachteten Allel-frequenzen in dieser Arbeit bei der OI- und der Kontrollgruppe befanden sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, was demonstriert, daß es sich hierbei um repräsentative Gruppen handelt. Es zeigte sich eine erhöhte Prävalenz der 'T'-Allele bei den klinisch schweren Formen der OI. Die Werte waren nicht stark signifikant, was darauf schließen läßt, daß noch weitere modifizierende Faktoren eine Rolle spielen. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß in der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gruppe von OI Patienten bei den Heterozygoten im Gegensatz zu Osteoporosepatienten keine signifikante Assoziation gefunden werden konnte. Zum Vergleich: Im heterozygoten Zustand haben Osteoporose-patienten mittlere Knochendichtewerte. Die fehlende Assoziation bei dem in dieser Arbeit untersuchten OI Kollektiv kann an dem schwachen Effekt des Sp1 Polymorphismus liegen, der möglicherweise bei dieser kleinen Kollektivgröße nicht erkennbar wird. Dies ist ein generelles Problem von Assoziationsstudien. Bei der Beurteilung dieser Fragestellungen sollte man sich vergegenwärtigen, daß ein starker Effekt auch an einem kleinen Kollektiv erkennbar wird, während ein schwacher Effekt eines großen Kollektivs bedarf. Dies gilt auch für die im Kapitel (4.3.5) dargestellten Assoziationsstudien.

Während der Haupteffekt bei der OI durch eine Mutation in der kodierenden Region der Kollagen Typ I Gene hervorgerufen wird, übt der Polymorphismus nur eine modifizierende Wirkung aus. Ob dieser Sp1 Polymorphismus im Kopplungsungleichgewicht mit einem benachbarten Krankheitslocus steht oder doch von funktioneller Relevanz ist konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, obwohl vieles für die zweite Variante spricht. Ex-pressionsuntersuchungen mit einer Minigenversion des humanen pro $\alpha 1(I)$ Kollagen Gens in stabil transfizierten Mausfibroblasten (Olsen et al., 1991) oder menschlichen Osteo-blasten (Breault et al., 1997) suggerieren, daß das Intron 1 von *COL1A1* nicht erforderlich ist für hohe Expressionsspiegel und somit keinen

einschneidenden Einfluß hat. Es konnte jedoch eine gewebespezifische und sich in der Ontogenese auswirkende Rolle für das erste Intron in der Transkriptionsregulation des *COL1A1* Gens gezeigt werden (Hormuzdi et al., 1998). Eine attraktive Hypothese um die beobachtete Assoziation zu erklären ist, daß die G>T Transversion die Anbindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1 in Intron 1 verändern könnte. Für das 'T'-Allel wurde in Knochengewebe ein 1,8 facher Anstieg der Bindungsaffinität des Transkriptionsfaktors Sp1 an die Konsensussequenz (mittels Gel shift assay-Methode) und ein dreifacher Überschuß an Transkripten, verglichen mit den 'G'-Allelen (mittels der Methode allelspezifischer PCR), gemessen (Hobson et al., 1998). Alle bisher gewonnenen Daten wurden zu einem Modell zusammengefaßt (Abb. 4.3.2.3).

In wenigen Worten zusammengefaßt könnte man das Modell folgendermaßen beschreiben: Bei Vorliegen eines „T“-Allels besitzt der Transkriptionsfaktor Sp1 eine höhere Affinität zur DNA und das wirkt sich in einer erhöhten Expression des „T“-Allels aus. Somit wird ein Überschuß an $\alpha 1(I)$ -Ketten hergestellt, was zu einer vermehrten Homotrimerbildung führt. Bei den klinisch schweren Fällen kommt es zu einer vermehrten Homotrimerbildung des mutationstragenden Allels und bei den klinisch leichteren Fällen des Wildtypallels. Wie schon erwähnt nehmen die für den Sp1 Polymorphismus heterozygoten OI Patienten keine Intermediärstellung wie die Osteoporosepatienten ein. Es ist möglich, daß ein intermediärer Effekt bei der OI kompensiert werden kann, wenn sich das 'T'-Allel in *trans* Stellung zur Mutation befindet und das Normalallel vermehrt transkribiert wird, was letztendlich zu einem milderen Phänotyp führt, weil mehr intakte Ketten vorhanden sind. Die verstärkte Bildung von pro $\alpha 1(I)$ Ketten kann zur vermehrten Bildung von Homo-trimeren und somit zu Osteoporose führen, bei Osteogenesis imperfecta hat es aber einen sogenannten "heilenden" Effekt. Aus der Pathogenese der OI wurde schon ersichtlich (Kapitel 1.1.1), daß die von Nullallelen hervorgerufene Verminderung an Protein einen milderen Phänotyp hervorruft als die durch Punktmutationen induzierte Bildung von fehlgefalteten Kollagenfibrillen, die die hohe Ordnungsstruktur des Kollagens stören und zu einer klinisch schwer ausgeprägte Form der OI führen.

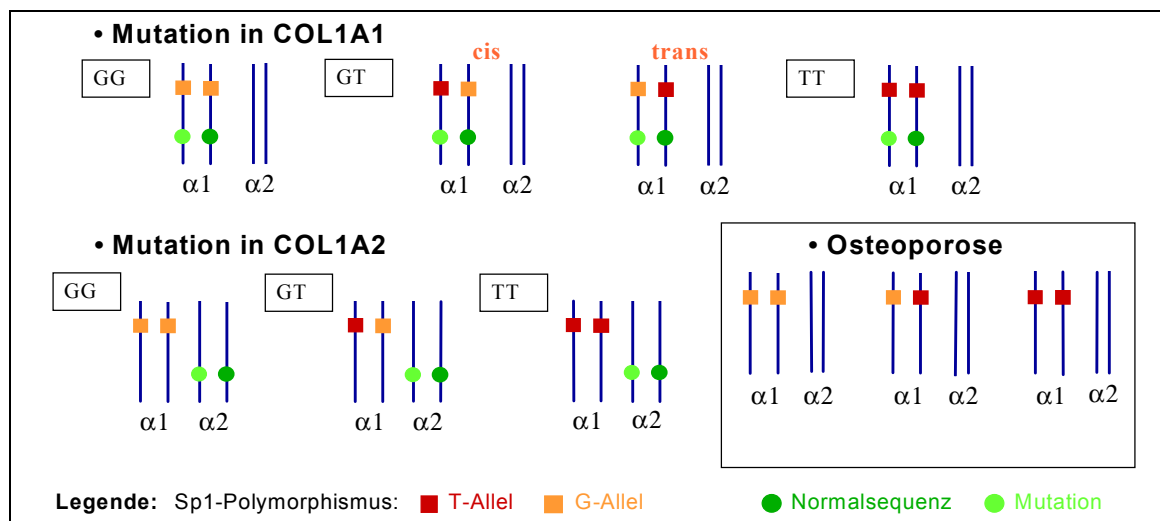


Abb. 4.3.2.3 Modell über die Modifikation des Osteogenesis imperfecta Phänotyps im Falle einer erhöhten Expression des *COL1A1* Gens durch das 'T'-Allel

4.3.3 Korrelation von Genotyp und OI Phänotyp mit dem Modell über die Wirkung des Sp1 Transkriptionsfaktorpolymorphismus

Es gibt rekurrende Mutationen mit variablen Phänotypen (siehe z.B. Abb. 3.1.4.3), deshalb wäre es sehr interessant, den Sp1 Polymorphismus bei anderen Patienten zu untersuchen, da unterschiedliche Genotypen für den variablen Phänotyp trotz gleicher Mutation verantwortlich sein können. Im folgenden Kapitel wird die Gültigkeit des in der Abbildung 4.3.2.3 aufgestellten Modells an ausgewählten OI Patienten überprüft. Bei dem Modell geht man davon aus, daß, wenn sich Mutation und 'T'-Allel in *cis* Position befinden, eine Verschlechterung des Phänotyps auftritt, da durch eine erhöhte Transkriptionsrate des 'T'-Allels ein Überschuß an mutierten Allelen vorliegt, die sich zu Homotrimeren zusammenlagern.

Bei Patientin **K11** mit OI Typ III wurde eine p.G238C Mutation im *COL1A2* Gen und der Genotyp T/T beim *COL1A1* Sp1 Polymorphismus gefunden. Nimmt man an, daß durch das 'T'-Allel die Expression des *COL1A1* Gens hochreguliert ist, gibt es ein Mehrangebot an pro α1(I)-Ketten. Die überschüssigen Ketten können Homotrimere bilden, die zu einer höheren Fragilität des Knochens wie bei Osteoporosepatienten beitragen. Bei OI Patienten ist die Beurteilung etwas komplizierter, er wäre denkbar daß zum einen die überschüssigen Homotrimere bevorzugter bei der Fibrillogenese eingebaut werden als die normal zusammengesetzten Kollagenmoleküle, welche mutierte pro α2(I)-Ketten enthalten mit dem Ergebnis einer möglicherweise positiven Beeinflussung des Phänotyps. Zum anderen ist ein additiver Effekt vorstellbar, der zu einer klinisch schweren Form der OI wie bei der Patientin K11 führt. Im Falle einer Cysteinsubstitution muß man die Möglichkeit einer Disulfidbrückenbildung in Betracht ziehen, die zu einer Knickbildung in den Kollagen-fibrillen führt (Lightfoot et al., 1992) und die dem sogenannten „heilenden Effekt“ der α1(I)-

Homotrimerbildung entgegenläuft. Bisher wurde Knickbildung in den Kollagen-fibrillen nur bei Mutationen im *COL1A1* Gen gefunden, aber es ist denkbar, daß sich eine Cystein Substitution im *COL1A2* Gen ähnlich auswirkt.

Bei Patient **K60** liegt der Sp1 Polymorphismus im heterozygoten Zustand vor. Im Falle einer *COL1A1* Genmutation wäre interessant, ob sich Mutation und T-Allel in *cis* oder *trans* Position befinden. Bei diesem Patienten liegt die Mutation wie bei Patientin K11 im *COL1A2* Gen. Die Vielzahl der Transkripte mit unterschiedlich großen Deletionen (Kap.3.1.3) dürfte das Fibrillenbildung jedoch empfindlich stören. Sollte jedoch ein Groß-teil der mutierten $\alpha 2(I)$ -Kollagenketten von intrazellulären Kontrollmechanismen erkannt und abgebaut werden, so wäre eine vermehrte Homotrimerbildung von $\alpha 1(I)$ -Ketten zu erwarten (siehe auch Kap. 4.1.2).

Patientin **K27** mit OI Typ III war homozygot für das 'T'-Allel des *COL1A1* Sp1 Polymorphismus. Die Patientin hatte eine p.G523S Mutation im *COL1A1* Gen. Es ist anzunehmen, daß es in diesem Fall sowohl zu einer verstärkten Expression des normalen als auch des mutierten *COL1A1* Allels kommt. Die überschüssigen pro $\alpha 1(I)$ -Ketten können entweder degradieren oder, was eher wahrscheinlich ist, sich zu Homotrimeren formieren, was im Gegensatz dazu die pro $\alpha 2(I)$ -Ketten nicht können (Kap. 1.2, Bonadio et al., 1990). Durch die Homozygotie des 'T'-Allels mit vermehrter pro $\alpha 1(I)$ -Homotrimer-bildung und Einbau mutierter pro $\alpha 1(I)$ -Ketten wird die klinisch schwere Form der OI gefördert. Andererseits können die mutierten $\alpha 1(I)$ -Ketten so instabil sein, so daß sie degradieren und daß hauptsächlich $\alpha 1(I)$ -Ketten vom Normalallel der Helixbildung zur Verfügung stehen.

Diese Überlegungen zeigen, daß durch die Komplexizität vieler überlappender oder z.T. gegenläufiger Einflußfaktoren die Beurteilung des OI Phänotyps zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch sehr schwer ist.

Nicht nur nicht-verwandte Patienten mit einer rekurrenden Mutation, sondern auch Familien mit intrafamiliärer Variabilität eignen sich sehr gut für die Untersuchung modifizierender Faktoren der OI. Es sind bereits mehrere solcher Familien beschrieben worden (Rowe et al., 1990 und Willing et al., 1990). Bei einer Familie mit intrafamiliärer Variabilität des Ulmer OI Kollektivs konnte mit Hilfe des Mutationsscreenings bisher keine Mutation in den Kollagen Typ I Genen gefunden werden (siehe Kap. 4.1.1). Bei dem in Abb. 3.1.5.2 dargestellten Stammbaum mit intrafamiliärer Variabilität bei einer OI Typ I zeigt die Segregationsanalyse, daß die Erkrankung wahrscheinlich mit einem *COL1A1* Allel segregiert. Das Familienmitglied K117 ist nicht betroffen während ihre Schwester K29 eine OI hat. Beide Kinder sind heterozygot für den *COL1A1* Sp1 Polymorphismus, da die Mutter K118 homozygot für das 'G'-Allel ist, muß das 'T'-Allel vom Vater kommen und

somit in *trans* Stellung zur Mutation stehen. Die gesunde heterozygote Tochter K117 wird somit allenfalls eine leichte Osteoporoseneigung zeigen, während für ihre Schwester K29 mit dem klinisch am schwersten ausgeprägten Phänotyp eine vermehrte $\alpha 1(I)$ Homotrimerbildung zu erwarten ist, die durch das 'T'-Allel zu erklären wäre. Knochendichtemessungen ergaben bei Patientin K29 (im Alter von 18 Jahren) den Befund einer schweren Osteoporose. Ihre nicht betroffene Schwester K117 hatte (im Alter von 24 Jahren) eine normale Knochendichte und die Mutter K118 wies (im Alter von 43 Jahren) eine erniedrigte Knochendichte auf. Alle anderen Familienmitglieder, die auch das Mutationsallel tragen (K31, K45 und K118) sind für das 'G'-Allel homozygot. Der Familienzweig mit den Kindern K29 und K117 hat OI Typ I und bei dem anderen Familienzweig mit der Patientin K68 ist der Verdacht auf OI bzw. Kindesmißhandlung gestellt worden. Es ist also nicht auszuschließen, daß ein Polymorphismus oder eine weitere Mutation zur phänotypischen Ausprägung bei K29 beitragen. Fraglich ist jedoch, warum der Vater von K29 keinen OI Phänotyp zeigt. In der Familie haben alle mit Knochenbrüchen Betroffenen auch blaue Skleren, was die Wahrscheinlichkeit für eine Mutation in einem der Kollagen Typ I Gene erhöht, allerdings kommen blaue Skleren auch bei anderen Syndromen, die mit der OI Überlappung zeigen, vor (Kap. 4.1). Es gibt eine OI Familie bei der alle Betroffenen blaue Skleren haben. Ein Betroffener, der nur die blauen Skleren zeigte, hatte nicht die in der Familie bekannte Kollagen Typ I Mutation.

Interessant wäre die Überprüfung der Knochendichte an OI Typ I Patienten mit Nullmutationen. Patienten, die das 'T'-Allel in *cis* Position auf dem Normalallel tragen, sollten eine Erhöhung der Menge an Typ I Kollagen und somit der Knochendichte haben. Daraus ergäbe sich eine positive Prognose.

4.3.4 Funktionelle Untersuchungen zur unterschiedlichen Expression des *COL1A1* Gens durch den Sp1-Polymorphismus

Eine positive Regulation der Aktivität des *COL1A1* Promotors durch den Transkriptionsfaktor Sp1 konnte gezeigt werden (Li et al., 1995). Bei der Mov-13 Maus hat eine provirale Insertion des Moloney murine leukemia virus (MMLV) in Intron 1 des *COL1A1* Gens stattgefunden (Bonadio et al., 1990) mit Blockierung der Kollagen Typ I Synthese auf der Ebene der Transkription. Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine Erhöhung bei der Expression des 'T'-Allels bei HeLa- und 293-Zellen mit Hilfe des Luzi-ferasereporter-genassays gefunden werden. Obwohl der Luziferasereporter-genassay sensitiver als ein Reporter-genassay mit Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) ist, scheint auch dessen Sensitivität nicht auszureichen, um einen Aktivitätsunterschied bis zu Faktor 2 zu detektieren. Das kann an vielen Parametern liegen, die

jeweils einer großen Schwankungsbreite unterliegen, wie z.B. Zellzahl, Vektoraufnahme, etc. Daher mußten bestimmte Parameter standardisiert werden, z.B. durch Messung der Zellzahl, der Transfektionseffizienz und des Proteingehalts. Dazu bedurfte es vieler Versuchswiederholungen. In einer Studie wurde u.a. auch der Luziferasereporterassay verwendet und es konnten keine Funktionsunterschiede der untersuchten VDR Allele festgestellt werden, da die Sensitivität der Methode nicht ausreichte, um den geringen Unterschied zu detektieren (Gross et al., 1998).

Es gibt eine ganze Reihe von Transfektionstechniken: Bei der Kalziumphosphat-Methode wird die DNA durch feine Präzipitate auf die Zell-Oberfläche aufgebracht und durch Endocytose aufgenommen. Auch bei der Liposomentechnik werden die Phospho-lipid/Nukleinsäure-Komplexe durch Endocytose in die Zelle geschafft, hierbei verschmelzen die Vesikel mit der Zellmembran. Mittlerweile gibt es auch hier eine ganze Reihe von verschiedenen Lipiden und Lipidmischungen, einige wenige schaffen es auch, primäre Zellen zu transfizieren. Der Einsatz von kationischen Liposomen ist für die Gen-therapie als ein vielversprechendes nichtvirales System von großem Interesse. Die genauen biochemischen und biophysikalischen Mechanismen der Komplexbildung und des Transfers sind nach wie vor noch nicht geklärt. Bei den Transfektionsversuchen konnte teilweise eine starke Zytotoxizität festgestellt werden durch die Zugabe von kationischen Lipiden. Bei dem Transfektionsreagenz DOTAP (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methylsulfat) handelt es sich um ein monokationisches Lipid, durch das in dieser Arbeit auch die schwer zu transfizierenden Osteosarkomzellen transfiziert werden konnten.

Bei der Auswertung ist von der vereinfachenden Annahme ausgegangen worden, daß bei Kotransfektionsexperimenten beide Plasmide gleich gut von den Zellen aufgenommen und gleich stark exprimiert werden. Tatsächlich ist es aber so, daß nicht alle Zelltypen die verschiedenen Vektoren gleich gut aufnehmen und andere Zellen nehmen vielleicht beide Vektoren auf, exprimieren aber nicht beide Proteine. Nicht jedes Plasmid wird gleich gut in die Zelle aufgenommen, deshalb wäre ein Plasmid, das beide Marker (Transfektionskontrolle und Reporter) gleichzeitig enthält am geeignetsten. Diese Kombination ist jedoch derzeit nicht kommerziell erhältlich.

Bei den transfizierten Konstrukten, die das 'G'- und das 'T'-Allel enthielten zeigten sich keine Expressionsunterschiede bei HeLa-, als auch bei 293 Zellen. Es könnte daran liegen, daß entgegen vorangegangener Untersuchungsbefunde (z.B. Hobson et al., 1998) doch keine erhöhte Expression des *COL1A1* Gens bei Vorhandensein des 'T'-Allels vorliegt. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit liegt im Aufbau des Konstrukts. Der Vektor ohne Insert zeigte oft eine ähnlich hohe Luziferaseaktivität wie die Vektoren mit den verschiedenen Allelen. Daraus läßt sich schließen, daß das inklonierte Fragment keine Enhanceraktivität besitzt, oder daß die ausgewählte Region zu klein

ist. Die Untersuchungen der Promotoraktivität von Genen werden oft durchgeführt, indem verschieden große Deletionen aus dem Promotorbereich des betreffenden Gens untersucht werden. Bei der Untersuchung der Region des Sp1 SNP Polymorphismus in Intron 1 des *COL1A1* Gens konnte kein größerer Bereich des Introns ausgewählt werden, um ihn auf Enhanceraktivität zu prüfen, da in diesem Bereich sehr viele potentielle Sp1 Transkriptionsfaktorbindungsstellen liegen, die die Transkription beeinflussen können. Es ist auch vorstellbar, daß nur das Zusammenspiel der Transkriptionsfaktoren den verstärkenden Effekt des 'T'-Allels zeigt. Eine DNA in-vivo-footprint Analyse könnte bei der Klärung dieser Frage behilflich sein.

4.3.5 Sche nach weiteren modifizierenden Genen des OI Phänotyps

In der Kollagen-Mutationsdatenbank (Dalglish, 1997, 1998) finden sich einige Beispiele für nicht verwandte OI-Patienten mit identischen Mutationen in den Kollagen Typ I Genen aber unterschiedlichem Phänotyp. Aus diesem Grund werden exogene und/oder endogene Modifikatoren angenommen, welche die klinische Ausprägung der Krankheit beeinflussen. Besonders solche Faktoren, die die Knochendichte beeinflussen sollten gute Kandidaten sein. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Assoziationsstudie durchgeführt, um festzustellen, ob eine Korrelation des Schweregrades der OI mit anderen, am Knochenmetabolismus beteiligten Genen besteht, die als Modifikator auf die OI wirken.

Bei Osteoporosepatienten wurde eine signifikante Assoziation der Vitamin-D-Rezeptor-Genpolymorphismen (*VDR*) und der Serumspiegel zirkulierenden Osteokalzins gefunden (Morrison et al., 1992). Der *BsmI*-RFLP ist mit der Knochendichte (engl. BMD, bone mineral density) bei Osteoporose in der Weise assoziiert, daß die Allelkombination „BB” vorwiegend bei Patienten mit geringen BMD-Wert gefunden wurde (Morrison et al., 1994). Mittlerweile gibt es eine ganze Anzahl von Studien, die sich mit dieser Problematik auch im Kontext verschiedener ethnischer Gruppen befaßt haben, wobei die Resultate sehr kontrovers sind. Manche Studien unterstützen diese Assoziation, andere hingegen führen das Vorhandensein des „b” Allels auf niedrige Knochendichte zurück (Cooper und Umbach 1996, Eisman 1995, Peacock 1995). In dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten OI Patientenkollektiv wurde bei keinem der untersuchten Allele eine Assoziation gefunden. Es fand sich auch kein Hinweis für einen synergistischen Effekt der vier Genotypen. Es ist erwähnenswert, daß keiner der Polymorphismen zu einer Aminosäure-substitution im VDR führt (Abb. 4.3.5.1). Die Polymorphismen können stille Mutationen sein, die für dieselbe Aminosäure kodieren (z.B. Isoleuzin, Exon 9) oder können sich in der nicht-kodierenden Region befinden. Es gibt eine Reihe an Erklärungsmöglichkeiten für die gegensätzlichen Resultate aus den Assoziationsstudien. Einige der Untersuchungen sind an Populationen gemacht worden mit

unterschiedlichen bzw. variierenden ethnischen Gruppen, bei denen z.B. der *BsmI* RFLP nicht in allen Gruppen informativ war. Da die Allelfrequenzen bei den verschiedenen ethnischen Gruppen unterschiedlich ausfallen, ist es schwierig, eine Assoziation zum klinischen Bild herzustellen. In der Region von Intron 8 bis Exon 9 (*BsmI*, *ApaI* und *TaqI* RFLPs) und Exon 2 (*FokI* RFLP) kann eine verminderte Knochendichte mit den Allelen „B“, „A“, „t“ und „f“ assoziiert sein. Häufig sind die statistischen Unterschiede zwischen den Gruppen und/oder die Anzahl der Individuen zu klein, um erfaßt zu werden. Es braucht eine starke statistische Signifikanz („power“) um eine Assoziation zu erkennen. Die Frage ist nun, wie allelische Unterschiede zu funktionellen Unterschieden führen können, wenn sie sich nicht in kodierenden Abschnitten befinden. So können sie neutraler Natur sein und als genetischer Marker für ein benachbartes modifizierendes Gen dienen (Kopplung). Sie können auch Sequenzmotive sein, die die mRNA Spiegel direkt beeinflussen.

Es gibt nur sehr wenige Studien über mögliche Wirkmechanismen der Polymorphismen. Im Falle des *FokI* RFLP ist eine funktionelle Beziehung denkbar. Eine C>T Transition in Exon 2 des *VDR* Gens bewirkt die Ausbildung eines zweiten Startkodons drei Kodons strangaufwärts (Abb. 4.3.5.1) und könnte so zu einer Verlängerung der Proteinsequenz um ein Kodon führen (Gross et al., 1996). Die Proteinfunktion kann sich ändern, da ein um ein Kodon längeres Transkript z.B. eine andere Konformation annehmen und dadurch seine Funktionalität verändern kann.

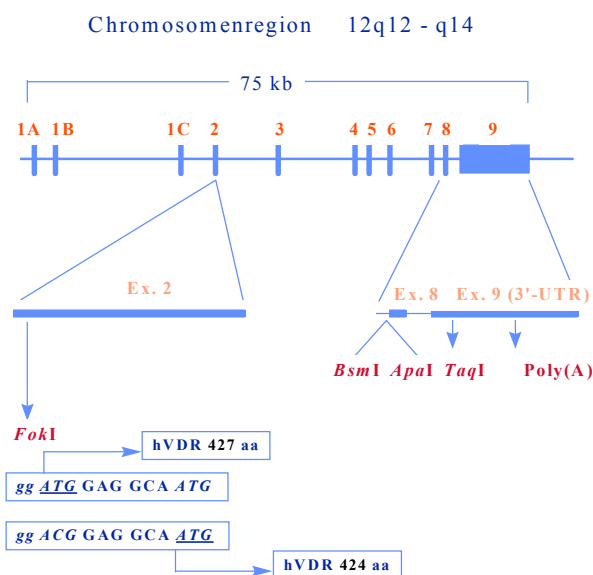


Abb. 4.3.5.1 Übersicht der polymorphen Vitamin-D-Rezeptor (hVDR) Positionen, die in dieser Studie verwendet wurden.

Der *FokI* RFLP führt zu einem potentiellen zweiten Translationsstartkodon, hervorgerufen durch eine C→T Transition (dargestellt durch Unterstreichung der entsprechenden Teilsequenz)

In der Studie wurde mit verschiedenen Methoden eine funktionelle Analyse der beiden Varianten durchgeführt, es konnten aber keine Unterschiede bezüglich Affinität (der bevorzugten Nutzung eines Startkodons) und Funktion festgestellt werden (Gross et al., 1998). Die Autoren führen die Ergebnisse u.a. auf die mangelnde Sensitivität der Nachweismethoden zurück. In einem Reportergenassay zeigte sich die längere Variante als weniger effizient (Miyamoto et al., 1997). Im Fall von „BB“ und „bb“ Fibroblasten zeigten die Zellen keine Expressionsunterschiede der beiden Allele. Daraus läßt sich schließen, daß der *FokI* RFLP selbst keine funktionelle Bedeutung hat,

sondern lediglich ein genetischer Marker desselben oder eines benachbarten Gens ist (Gross et al., 1998). Diese Annahme wird weiterhin unterstützt durch eine Anzahl anderer positiver Korrelationen z. B. mit dem Risiko für Osteoarthritis (Keen et al., 1997), für Hyperthyroidismus (Carling et al., 1997) und für Prostatakrebs (Ingles et al., 1997). Es gibt eine Studie, die gleichzeitig den S_{pl} Polymorphismus im *COL1A1* Gen, den *FokI* RFLP im *VDR* Gen, den (AGC)_n VNTR im Androgenrezeptor, einen TA Mikrosatelliten in der 5'UTR im Östrogenrezeptor und einen C>T Polymorphismus im Osteokalzinpromotor bei prä- und perimenopausalen Frauen untersucht haben (Sowers et al., 1999). Für die Knochenmineraldichte (BMD, engl. bone mineral density) oder den Knochenumsatz konnte für die Polymorphismen in *COL1A1*, *VDR* und Osteokalzin keine Assoziation gefunden werden. Der Androgenrezeptor- und der Östrogenrezeptorpolymorphismus zeigten eine starke Assoziation zur Knochenmineral-dichte, was annehmen läßt, daß in der untersuchten Gruppe Geschlechtshormone eine starke Wirkung auf die Knochenmineraldichte haben.

Das menschliche parathyroidhormon-ähnliche Peptid (*hPTHrP*) enthält ein DNA-Element in reverser Orientierung, das homolog ist zu einem stromaufwärts liegenden, negativen Vitamin D response Element (nVDRE) im humanen Parathyroidhormon Gen (*hPTH*). Es wurde gezeigt, daß die Orientierung keinen Einfluß auf die transkriptionelle Repression hat (Nishishita et al., 1998). Der Vitaminrezeptor bindet an Retinsäure-X-Rezeptor (RXR) bei positiver Regulation (Expressionsinduktion), nicht jedoch bei negativer Rückkopplung (Endprodukthemmung). Die aktive Form von Vitamin D (1,25-dihydroxy-vitamin D₃) kann als Endprodukt der PTH-Wirkung betrachtet werden, der die mRNA-Synthese hemmt um den Serum-Kalziumgehalt konstant zu halten. Über die Konsensussequenz AG(G/A)TTCA, welche als direkte Wiederholung (repeat) vorliegt, wird die Genregulation gesteuert. Im negativen Fall liegt nur eine Kopie der Konsensussequenz vor, flankiert von den 4 Basen CTAT in der Gegenstrangsequenz. Positive VDREs sind z.B. in *hCOL1A1* und *hOC* (Osteokalzin) gefunden worden. Aus diesem Grund ist der Vitamin-D-Rezeptor als ein Kandidat für diese Assoziationsstudie ausgewählt worden, weil er einen direkten Einfluß auf die Genexpression von *COL1A1* hat.

TGF- β ist ein osteotropher Wachstumsfaktor. Die Wirkungsweise von TGF- β ist jedoch komplex. Es ist ein multifunktionales Zytokin, das nicht nur Zellproliferation und -differenzierung reguliert, sondern auch Gewebeumbau und Wundheilung sowie Angio-genese (Blobe et al., 2000). In diesem Zusammenhang ist jedoch die stimulierende Funktion der Kollagensynthese wichtig. In normalen humanen Osteoblasten wurde von in einer in vitro-Studie herausgefunden (Seitzer et al., 1995), daß TGF- β einen hemmenden Einfluß auf die Hydroxylierung der Lysylreste hat und eine Erniedrigung der mRNA Grundspiegel um ein Drittel bewirkt. Gleichzeitig wurden OI Patienten (OI Typ I, III

und IV) untersucht, bei denen man keinen Einfluß des TGF- β auf die Lysylhydroxylierung fand. Das Fehlen der lokalen regulatorischen Aktivität von TGF- β kann eine Rolle spielen bei der Überhydroxylierung der Lysinreste im Typ I Kollagen, was auch bei Patienten mit einer generalisierten Osteopenie festgestellt wurde. Diese Erkenntnis ist auch wichtig im Zusammenhang mit den Patienten mit hyperplastischem Kallus (siehe Kap. 4.2.1 Osteogenesis imperfecta Typ V). TGF- β wird in Osteoblasten und -klasten synthetisiert und wird anschließend im Knochen gespeichert. Die Freisetzung der aktiven Form erfolgt während der Knochenresorption. Osteoblasten von OI Patienten haben eine erhöhte Menge an TGF- β Rezeptoren (Gebken, persönliche Mitteilung). Durch Mangel an TGF- β wird die Expression der TGF- β Rezeptoren hochreguliert. IGF-I (insulin-like growth factor-I) ist ein stark mitogen wirkender Wachstumsfaktor für Osteoblasten (Scheven et al., 1991). Der primäre Signalmechanismus ist noch nicht ausreichend untersucht. IGF-I zeigt pleiotrope Effekte, so stimuliert es außer der Proliferation auch die Kollagen Typ I Produktion und die Knochenmatrixsynthese (Hock et al. 1988,) und ist für den anabol wirkenden Effekt vom Parathyroidhormon verantwortlich. IGF-I hat einen fördernden Effekt auf die Zellproliferation durch die Stimulierung von *ERK1* und *Cdk2*, wie es für MG-63-Zellen gezeigt wurde (Zhang et al., 1999). Der MEK/ERK Signalweg ist zelltyp- und wachstumsfaktorabhängig. Diese Arbeit zeigt, daß die Aktivierung von MEK/ERK erforderlich für die Aktivierung von *Cdk2* bei IGF-I stimulierter Zellproliferation ist.

Zusammenfassend lassen sich einige wichtige Punkte für die Durchführung einer erfolgreichen Assoziationsstudie mit vertrauenswürdigen Ergebnissen darstellen: Zum einen ist die Zusammensetzung der untersuchten Population ausschlaggebend mit einer möglichst auslesefreien Wahl der Probanden. Weiterhin ist die Größe des Kollektivs entscheidend: Während sich ein starker Effekt bereits in einem kleinen Kollektiv zeigt, ist ein schwacher Effekt nur in einem großen Kollektiv nachweisbar. In kleinen Kollektiven kann es zu scheinbaren Signifikanzen kommen, die sich erst mit zunehmender Kollektivgröße wieder „auflösen“. Es sollten Polymorphismen verwendet werden, die sich funktionell auswirken. Bei der Interpretation von Ergebnissen aus Assoziationsstudien sollten mögliche, bislang noch unbekannte Modifikatoren, die nur schwer zu erfassen sind, immer mitdiskutiert werden:

- endogene/exogene Umweltfaktoren
- andere Sequenzvariationen im untersuchten Gen (Haplotypisierung)
- Kopplungsungleichgewicht (engl. linkage disequilibrium) mit anderen Genen
- pleiotrope Effekte (Uitterlinden, 2000)

In einer Assoziationsstudie konnte gezeigt werden, daß ein Allel des *COL9A2* Gens mit einer Erkrankung der Zwischenwirbelscheiben (Intervertebral disc disease, IDD, MIM 603932) assoziiert

ist (Annunen et al., 1999). In 6 von 157 untersuchten Individuen mit IDD wurde eine p.326Q>W Substitution gefunden, in den 174 Kontrollen jedoch nicht. Zwei zusätzliche Polymorphismen wurden in Kosegregation mit dem Tryptophanallel gefunden, was auf eine Vererbung eines seltenen, ancestralen Haplotyps schließen läßt. Als die am meisten hydrophobe AS kann das Tryptophan (Trp) die Kollagen Tripelhelix unterbrechen oder die Interaktion mit Kollagen Typ II stören oder das Wirken der Lysyloxidase beeinträchtigen, die die Quervernetzungen vornimmt. Das Tryptophanallel kosegregierte mit dem Krankheitsphänotyp in den Familien mit einem LOD Score von 4,5. Eine weitere Kopplungsanalyse führte zu einem LOD Score von 7,1. Die Autoren konnten jedoch nicht ausschließen, daß sich der wahre krankheitsverursachende Locus eventuell auch außerhalb des *COL9A2* Gens befinden könnte.

Im Knochenstoffwechsel spielen sehr viele Faktoren eine Rolle und ihre Wirkungsweise ist durch die komplexe Vernetzung der Signalkaskaden und gegenseitigem Wechselspiel von systemisch und lokal wirkenden Faktoren nur z.T. verstanden. Das Skeletal Genome Anatomy Project (SGAP) hat sich zur Aufgabe gemacht, alle Gene, die im Knochen-stoffwechsel eine Rolle spielen, zu erfassen und ihre Funktion zu untersuchen. Diese Informationen werden in der Skelettgenbank (Ho et al., 2000) niedergelegt und mit Hilfe der DNA-Chiptechnologie werden sicher bald Untersuchungsmöglichkeiten zur Verfügung stehen, mit denen man gezielt Expressionsprofile der am Knochenstoffwechsel beteiligten Gene untersuchen kann und solche aufwendigen Assoziationsuntersuchungen vereinfachen bzw. überflüssig machen.

4.4 Ausblick

Betrachtet man die vielen Wachstumsfaktoren, Zytokine und anderen Signalmoleküle, die eine Rolle während der Osteoblasten- und Osteoklastenregulation haben, so ist die genomweite Suche nach möglichen Kandidatengenen ein erster Schritt, um mögliche Modifikatoren der Osteogenesis imperfecta zu finden und durch Expressionsstudien funktionell zu untersuchen.

Therapieansätze bei OI:

Bei dem Versuch, die Osteogenesis imperfecta zu therapieren, wurden bisher sehr unterschiedliche Konzepte entwickelt, die die verschiedenen Ebenen von der zellulären Stimulierung bis zur Gentherapie umfassen. So wurde durch die Gabe von **Wachstums-hormonen** ein Versuch der Stimulation der Osteoneogenese unternommen (Vieira et al., 2000) und die Effekte von **Bisphosphonat**medikamenten (z.B. Pamidronat) auf den Knochenmetabolismus bei OI Kindern (Glorieux et al., 1998) untersucht. Bisphosphonate wirken hemmend auf die Osteoklastenaktivität und lagern sich im Gewebe ab. Reduzierte Knochenresorption und erhöhte Knochenmasse wurden festgestellt. Eine erhöhte Knochendichte und reduziertes Knochenschmerzempfinden, sowie eine

höhere Mobilität und weniger Frakturen konnten während der Behandlung erreicht werden. **Bone morphogenetic proteins** (BMPs) sind bedeutende Regulatoren der Osteoblasten-differenzierung. Im Feten dienen sie als Morphogen für die Entwicklung einer Reihe von Organen und sind essentiell für eine normale Skelettentwicklung, während sie beim Er-wachsenen als Signalmoleküle agieren. BMP-2 scheint das wichtigste aus dieser Gruppe für das humane adulte Skelett zu sein. Adenovirus-vermittelter Gentransfer des rekombinanten, humanen bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) kann mesenchymale Progenitorzellen (pluripotente Stammzellen) zu Proliferation und Differenzierung anregen und somit Knochenbildung fördern (Lou et al., 1999). **Adenovirus-vermittelter Gen-transfer** von TGF- β 1 in Osteoblasten war in vivo (bei der Ratte) und in vitro (MC3T3-E1 osteoblastenähnliche Zellen) erfolgreich (Saadeh et al., 1999). Pittenger et al. (1999) haben das Wachstumsverhalten in vitro von humanen adulten mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) intensiv untersucht, da sie durch ihre Pluripotenz vielfältige Möglichkeiten zur Regeneration von verletztem Gewebe (Zell-) bzw. bei der Gentherapie bieten. Allogene Übertragung von **mesenchymalen Stammzellen** ergab bei Mäusen eine Ansiedlung von 6 - 7% der Zellen im Knochen des Versuchstieres vom Spendertier nach bis zu 3 Monaten (Pereira et al., 1995). Bei drei Kindern mit dem schweren OI Phänotyp gelang es durch allogene Knochenmarkstransplantation die Frakturrate zu reduzieren (Horwitz et al., 1999). Die Überprüfung der Ansiedlung der Zellen im Knochen nach 3 Monaten ergab eine Erfolgsrate von bis zu 2%, so daß der Anstieg des Mineralgehalts und die Wachstumsverbesserung der Kinder als Folge der allogenen Knochenmarkstransplantation angezweifelt wird (Bishop 1999 und Marini 1999). In vitro wurden Konzepte zur Gen-therapie mit **Antisense-Oligonukleotiden** und **hammerhead Ribozymen** entwickelt. Bei der Etablierung von gentherapeutischen Ansätzen mit Antisense-Oligonukleotiden gibt es oft Probleme eine Genkonversion zu erreichen. Beide Methoden wirken spezifisch auf die Mutation. Bei den Antisense- Oligonukleotiden gibt es auch das Problem, daß auch die Expression des Normalallels um 20-30% herunterreguliert ist. Es gibt eine Untersuchung (Wang und Marini 1996) für OI Patienten, wobei eine Möglichkeit zur geeigneten Applikation jedoch noch nicht gefunden wurde. Da OI Mäuse einen ähnlichen Phänotyp zeigen, eignen sich die **murinen Modelle** (z.B. knock-in Maus mit p.G349C mit OI Typ IV) ausgezeichnet für Untersuchungen der Pathophysiologie der OI und für das Testen therapeutischer Agenzien wie z.B. Bisphosphonate. Sie lassen sich auch bei der Untersuchung der Wirkung von hammerhead Ribozymen heranziehen, die dann in der Gentherapie ihre Anwendung finden. Die Nachkommen der Mäuse zeigen phänotypische Variabilität, was sich auch sehr gut als Modell eignet, um den genetischen Hintergrund zu untersuchen, der zu dieser Variabilität führt. Erwähnenswert ist auch, daß der Gehalt an übermodifiziertem Typ I Kollagen in den isolierten Fibro- und Osteoblasten der

knock-in Maus variiert. An der oim/oim Maus konnte gezeigt werden, daß retroviral transfizierte Knochenmarkszellen sich spezifisch im Knochen ansiedeln und Knorpel bzw. Knochen bilden, während sie sich in anderen Geweben nicht integrieren konnten (Oyama et al., 1999).

Pränataldiagnostik bei OI:

Strategien zur Durchführung einer Pränataldiagnostik für Osteogenesis imperfecta Patienten sind bereits publiziert (Pepin et al., 1997). Pränataldiagnostik bei Typ I durch Nullmutationsscreening im *COL1A1* Gen (Nuytinck et al., 1999) bzw. Mutationsscreening durch CSGE und Sequenzieren der beiden Kollagen Typ I Gene ist möglich (Körkkö et al., 1998). Ultraschalluntersuchungen sind ein unverzichtbarer Bestandteil der pränatalen Untersuchung. Embryonen, die durch intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) erzeugt wurden konnten bereits - bei bekannter Mutation (durch genetische Präimplantationsdiagnostik, Winston und Handyside 1993) auf der Basis von Einzelzellanalyse (De Vos et al., 2000) erfolgreich zur Geburt von gesunden Zwillingen führen.

5 Zusammenfassung

Für das Ziel, aus dem Wissen über die Pathogenese der OI Therapieansätze abzuleiten, wurden wichtige Grundlagen geschaffen. Ein Beitrag zur Vervollständigung der Sequenzen der Kollagen Typ I Gene wurde geleistet, indem ein Teil der regulatorischen Region vom *COL1A1* Gen bei der GenBank Datenbank mit der Zugangsnummer AF034478 und das Intron 26 des *COL1A2* Gens mit der Zugangsnummer AF034478 eingereicht wurden. Mit dem in dieser Arbeit etablierten System zur routinemäßigen, molekulargenetischen Untersuchung von OI Patienten ist es gelungen, eine ganze Reihe neuer (p.G886A und p.G523S im *COL1A1* Gen) und rekurrerender (p.G880S und p.P873_A875del im *COL1A1* Gen sowie p.G238C im *COL1A2* Gen) Mutationen zu finden. Auch eine Verbesserung der herkömmlichen CSGE-Mutationsscreeningmethode durch Automatisierung mit Hilfe des ALFexpress™ Sequenzier-gerätes konnte erzielt werden. Es wurde bei einer OI Typ III Patientin eine bisher noch nicht beschriebene Mutation durch den Nachweis multipler Deletionsfragmente identifiziert. Hierbei konnte bei einer Patientin mit OI Typ III die Verwendung kryptischer Spleißstellen im *COL1A2* Gen demonstriert werden. Zur schnelleren Untersuchung von OI Typ I Patienten wurde das Nullmutationsscreening als Vorscreeningmethode erfolgreich etabliert. Aus einem Kollektiv von 22 OI Typ I Patienten wurde ein Patient mit einer Nullmutation des *COL1A1* Gens gefunden. Die anderen Patienten waren nicht informativ bzw. ein Patient hatte eine Glyzinsubstitution. Die Etablierung der Mutationsscreeningmethoden für die Kollagen Typ I Gene stellte eine gewisse Herausforderung dar, weil die monotonen und sich zum einen durch große Sequenzhomologie auszeichnenden und zum anderen zur Ausbildung von Sekundärstrukturen neigenden Kollagensequenzen sich nicht in jeder Region einfach molekulargenetisch untersuchen lassen. Es konnten eine ganze Reihe von z.T. noch nicht beschriebenen Polymorphismen detektiert werden.

Zum ersten Mal konnte eine Assoziation eines Polymorphismus mit dem klinischen Schweregrad bei Osteogenesis imperfecta gezeigt werden. Wahrscheinlich methodisch bedingt konnte eine Expression des klonierten Abschnitts der Sp1 Polymorphismusallele nicht erreicht werden (Luziferasereportergenassay, Transfektionskontrolle über EGFP), jedoch mit der allelspezifischen, quantitativen Bestimmung der Transkriptmenge (LightCycler) konnte eine erhöhte Transkription für das ,T'-Allel des Sp1 Polymorphismus im *COL1A1* Gen gezeigt werden. Im Rahmen der funktionellen Untersuchungen des Sp1 Polymorphismus wurde festgestellt, daß sich das *COL1A1* Gen nicht für eine Amplifikation des gesamten Gens eignet. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit konnte ein Modell über die mögliche Wirkungsweise des Sp1 Polymorphismus aufgestellt werden, welches sich vereinfacht folgendermaßen darstellen läßt: Durch eine höhere Affinität des ,T'-Allels

kann es zu einer gesteigerten Expression und zu vermehrter $\alpha 1(I)$ -Homotrimerbildung kommen. Bei den klinisch schweren Fällen ist bei Vorhandensein eines „T“-Polymorphismus im mutationstragenden Allel eine schlechtere Prognose durch vermehrte Homotrimerbildung von defektem Prokollagen zu erwarten. Anhand der im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Mutationen und einer Familie mit intrafamiliärer Variabilität wurde das Modell überprüft. Bisher unterstützen die Ergebnisse das Modell, jedoch sind größere Fallzahlen nötig, um es weiter zu testen und die Kenntnis, ob weitere Genpolymorphismen Kollagen Typ I Transkripte beeinflussen, ist nötig. Für die Pränataldiagnostik bei OI Patienten kann in Zukunft sicherlich durch die Genotypisierung dieses Polymorphismus Unterstützung für die phänotypische Prognose erlangt werden.

Mit Hilfe von Assoziationsstudien wurden weitere Polymorphismen in Genen, die den Knochenstoffwechsel beeinflussen (VDR, TGF- β , IGF-I und BGN), untersucht. Sie zeigten als Modifikatoren keine Assoziation mit der Pathogenese der OI. Modellhafte Untersuchungen zur Stabilität der Kollagenmoleküle im Zusammenhang mit den bisher gefundenen Mutationen zeigten, daß die Glyzinsubstitutionen an sich einen so starken, störenden Einfluß auf die Kollagenkettenbildung haben, daß sich Mutationen in Regionen höherer Kollagenstabilität nicht zu einem klinisch schwerer ausgeprägten Phänotyp auswirkten, wie durch das Regionalmodell erwartet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Sonderformen der OI untersucht. Bei OI Typ V Patienten mit hyperplastischer Kallusbildung und bei Patienten mit Brucksyndrom konnte bisher keine Mutation in den kodierenden Sequenzen für den triplehelikalen Abschnitt des *COL1A1* und *COL1A2* Gens - übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen - gefunden werden. Anhand einer Familie mit Brucksyndrom wurde eine Segregationsanalyse durchgeführt, um eine weitere Eingrenzung der möglichen Kandidatenregion für eine bisher unbekannte Telopeptid-Lysyl-Hydroxylase auf dem Chromosom 17p12 zu erreichen. Die Familienmitglieder zeigten im untersuchten Abschnitt keine Rekombination.

Abschließend läßt sich zusammenfassen, daß neben Kollagen Typ I Mutationen anscheinend komplexe Mechanismen in der Pathogenese wirksam werden, die den OI Phänotyp modulieren.

6 Literaturverzeichnis

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., et al.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402, 1997.
- Annunen, S., Paassilta, P., Lohiniva, J. et al.** An allele of COL9A2 associated with intervertebral disc disease. *Science.* 285(5426):409-412, 1999.
- Anson, W., Zimmermann, J., Erfle, H., et al.** Sequencing Reactions for ALF (EMBL) Automated DNA Sequencer. In: *DNA sequencing protocols*. Griffin, H. and Griffin, A. (eds.) Totowa, NJ: Humana Press Inc. 1993, p. 317-356.
- Arai, H., Miyamoto, K., Taketani, Y., et al.** A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J.Bone.Minor.Res.* 12:915-921, 1997.
- Baldwin, C.T., Constantinou, C.D., Dumars, K.W., Prockop, D.J.** A single base mutation that converts glycine 907 of the alpha 2(I) chain of type I procollagen to aspartate in a lethal variant of osteogenesis imperfecta. The single amino acid substitution near the carboxyl terminus destabilizes the whole triple helix. *J.Biol.Chem.* 264(5):3002-3006, 1989.
- Bank, R.A., Tekoppele, J.M., Janus, G.J.M. et al.** Pyridinium cross-links in bone of patients with Osteogenesis imperfecta: Evidence of a normal intrafibrillar collagen packing. *J.Biol.Chem.* 15(7):1330-1336, 2000.
- Bank, R.A., Robins, S.P., Wijmenga, C., et al.** Defective collagen crosslinking in bone, but not in ligament or cartilage, in Bruck syndrome: indications for a bone-specific telopeptide lysyl hydroxylase on chromosome. *Natl.Acad.Sci.* 96(3):1054-1058, 1999.
- Bätge, B., Winter, C., Notbohm, H., Acil, Y., Brinckmann, J., Müller, P.K.** Glycosylation of human bone collagen I in relation to lysylhydroxylation and fibril diameter. *J.Biochem.Tokyo.* 122(1):109-115, 1997.
- Bedalov, A., Salvatori, R., Dodig, M. et al.** Regulation of COL1A1 expression in type I collagen producing tissues: identification of a 49 base pair region which is required for transgene expression in bone of transgenic mice. *J.Bone.Minor.Res.* 10(10):1443-1451, 1995.
- Benson, D., Boguski, M., Lipman, D. and Ostell, J.** GenBank. *Nucleic Acids Research* 24:1-5, 1996.
- Bernard, M.P., Chu, M.L., Myers, J.C., Ramirez, F., Eikenberry, E.F. and Prockop, D.J.** Nucleotide sequences of complementary deoxyribonucleic acids for the pro alpha 1 chain of human type I procollagen. Statistical evaluation of structures that are conserved during evolution. *Biochemistry* 22:5213-5223, 1983.
- Bhattacharyya, A., Lilley, D.M.** The contrasting structures of mismatched DNA sequences containing looped-out bases (bulges) and multiple mismatches (bubbles). *Nucleic Acids Res.* 17(17):6821-6840, 1989.
- Birnboim, H.C., Doly, J.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6):1513-1523, 1979.
- Bishop, N.J.** Osteogenesis imperfecta calls for caution. *Nat.Med.* 5(5):466-467, 1999.
- Blobe, G.C., Schieman, W.P., Lodish, H.F.** Role of transforming growth factor beta in human disease. *N.Engl.J.Med.* 342(18):1350-1358, 2000.

- Bonadio, J., Saunders, T.L., Tsai, E., et. al.** Transgenic mouse model of the mild dominant form of osteogenesis imperfecta. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 87(18):7145-7149, 1990.
- Bornstein, P., McKay, J.** The first intron of the alpha 1(I) collagen gene contains several transcriptional regulatory elements. *J.Biol.Chem.* 263(4):1603-1606, 1988.
- Bornstein, P., McKay, J., Morishima, J.K., Devarayalu, S., Gelinas, R.E.** Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional control of the human alpha 1(I) collagen gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 84(24):8869-8873, 1987.
- Boskey, A.L.** Noncollagenous matrix proteins and their role in mineralization. *Bone.Miner.* 6(2):111-123, 1989.
- Breault, D.T., Lichtler, A.C., Rowe, D.W.** COL1A1 transgene expression in stably transfected osteoblastic cells. Relative contributions of first intron, 3'-flanking sequences, and sequences derived from the body of the human COL1A1 minigene. *J.Biol.Chem.* 272:31241-31250, 1997.
- Brenner, R.E.** Collagen and bone markers in patients with osteogenesis imperfecta. In: *Pediatric osteology: New developments in diagnosis and therapy.*, Schönau, E. (ed.) Amsterdam: Elsevier Science, 1996, 221-226.
- Brenner, R.E., Vetter, U., Stoss, H., Muller, P.K., Teller, W.M.** Defective collagen fibril formation and mineralization in osteogenesis imperfecta with congenital joint contractures (Bruck syndrome). *Eur.J.Pediatr.* 152(6):505-508, 1993.
- Brenner, R.E., Vetter, U., Nerlich, A., Worsdorfer, O., Teller, WM., Muller, P.K.** Biochemical analysis of callus tissue in osteogenesis imperfecta type IV. Evidence for transient overmodification in collagen types I and III. *J.Clin.Invest.* 84(3):915-921, 1989.
- Breslau-Siderius, E.J., Engelbert, R.H.H., Pals, G., Van der Sluijs, J.A.** Bruck syndrome: a rare combination of bone fragility and multiple congenital joint contractures. *J.Pediatr.Orthop.* 7: 35-38, 1998.
- Bruck, A.** Ueber eine seltene Form von Erkrankung der Knochen und Gelenke. *Dtsch.Med.Wschr.* 23:152-155, 1897.
- Burjanadze, T.V., Kisiriya, E.L.** Dependence of thermal stability on the number of hydrogen bonds in water-bridged collagen structure. *Biopolymers.* 21(9):1695-701, 1982.
- Byers, P.H.** Osteogenesis imperfecta. In: *Connective Tissue and its Heritable Disorders*, edited by Royce, P.M. and Steinmann, B. New York: Wiley-Liss, Inc. 1993, p. 317-350.
- Byers, P.H. and Steiner, R.D.** Osteogenesis imperfecta. *Annu.Rev.Med.* 43:269-282, 1992.
- Byers, P.H., Wallis, G.A., Willing, M.C.** Osteogenesis imperfecta: translation of mutation to phenotype. *J.Med.Genet.* 28:433-442, 1991.
- Byers, P.H.** Brittle bones-fragile molecules: disorders of collagen gene structure and expression. *Trends.Genet.* 6:293-300, 1990.
- Byers, P.H., Siegel, R.C., Holbrook, K.A., Narayanan, A.S., Bornstein, P., Hall, J.G.** X-linked cutis laxa: defective cross-link formation in collagen due to decreased lysyl oxidase activity. *N.Engl.J.Med.* 303(2):61-65, 1980.

- Cauley, J.A., Zmuda, J.M., Yaffe, K., Kuller, L.H., Ferrell, R.E., Wisniewski, S.R., Cummings, S.R.** Apolipoprotein E polymorphism: A new genetic marker of hip fracture risk-The Study of Osteoporotic Fractures. *J.Bone.Minor.Res.* 14(7):1175-1181, 1999.
- Canalis, E.** Effect of insulinlike growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *J.Clin.Invest.* 66(4):709-719, 1980.
- Carling, T., Kindmark, A., Hellman, P., Holmberg, L., Akerstrom, G., Rastad, J.** Vitamin D receptor alleles b, a, and T: risk factors for sporadic primary hyperparathyroidism (HPT) but not HPT of uremia or MEN 1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 231:329-332, 1997.
- Chan, J.M., Stampfer, M.J., Giovannucci, E., et al.** Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science.* 279(5350): 563-566, 1998.
- Christiano, A.M., Hoffman, G.G., Chung Honet, L.C., Lee, S., Cheng, W., Uitto, J., Greenspan, D.S.** Structural organization of the human type VII collagen gene (COL7A1), composed of more exons than any previously characterized gene. *Genomics* 21(1):169-179, 1994.
- Christiano, A.M., Greenspan, D.S., Hoffman, G.G., et al.** A missense mutation in type VII collagen in two affected siblings with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Nat.Genet.* 4(1):62-66, 1993.
- Chu, M.L. and Prockop, D.J.** Collagen: Gene Structure. In: *Connective Tissue and its Heritable Disorders*, Royce, P.M. and Steinmann, B. (eds.) New York: Wiley-Liss, Inc. 1993, p. 149-165.
- Chu, M.L., de Wet, W., Bernard, M., Ramirez, F.** Fine structural analysis of the human pro-alpha 1 (I) collagen gene. Promoter structure, AluI repeats, and polymorphic transcripts. *J.Biol.Chem.* 260(4):2315-2320, 1985.
- Chu, M.L., de Wet, W., Bernard, M., Ding, J.F., Morabito, M., Myers J., Williams, C., Ramirez, F.** Human pro alpha 1(I) collagen gene structure reveals evolutionary conservation of a pattern of introns and exons. *Nature* 310(5975):337-340, 1984.
- Cogan, J.D., Prince, M.A., Lekhakula, S., et al.** A novel mechanism of aberrant pre-mRNA splicing in humans. *Hum.Mol.Genet.* 6(6):909-912, 1997.
- Cohen-Solal, L., Zolezzi, F., Pignatti, P.F., Mottes, M.** Intrafamilial variable expressivity of osteogenesis imperfecta due to mosaicism for a lethal G382R substitution in the COL1A1 gene. *Mol.Cell.Probes.* 10(3):219-225, 1996.
- Cohn, D.H. and Zhang, X.** PCR-based linkage strategies for the type I collagen genes. *Matrix* 10:236, 1990.
- Cole, W.G., Dalgleish, R.** Perinatal lethal osteogenesis imperfecta. *J.Med.Genet.* 32(4):284-289, 1995.
- Constantinou Deltas, C.D., Ladda, R.L. and Prockop, D.J.** Somatic cell mosaicism: another source of phenotypic heterogeneity in nuclear families with osteogenesis imperfecta. *Am.J.Med.Genet.* 45:246-251, 1993.
- Constantinou, C.D., Spotila, L.D., Zhuang, J., Sereda, L., Hanning, C., Prockop, D.J.** PvuII polymorphism at the COL1A2 locus. *Nucleic Acids Res.* 18(18):5577, 1990.
- Cooper, G.S., Umbach, D.M.** Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? A meta-analysis. *J.Bone.Minor.Res.* 11:1841-1849, 1996.

- Cooper, D.N., Krawczak, M., Antonarakis, S.E.** In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (eds.) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 7. Ausgabe, McGraw-Hill, New York 1995, pp. 259-291.
- Cotton, R.G.** Current methods of mutation detection. *Mutat.Res.* 285(1):125-144, 1993.
- Coulondre, C., Miller, J.H., Farabaugh, P.J., Gilbert, W.** Molecular basis of base substitution otopspots in *Escherichia coli*. *Nature*. 274(5673):775-780, 1978.
- Culbert, A.A., Lowe, M.P., Atkinson, M., Byers, P.H., Wallis, G.A., Kadler, K.E.** Substitutions of aspartic acid for glycine-220 and of arginine for glycine-664 in the triple helix of the pro alpha 1(I) chain of type I procollagen produce lethal osteogenesis imperfecta and disrupt the ability of collagen fibrils to incorporate crystalline hydroxyapatite. *Biochem.J.* 311(3): 815-820, 1995.
- D'Alessio, M., Bernard, M., Pretorius, P.J., de Wet, W., Ramirez, F. and Pretorius, P.J.**, corrected to Pretorius-PJ]. Complete nucleotide sequence of the region encompassing the first twenty-five exons of the human pro alpha 1(I) collagen gene (COL1A1) [published erratum appears in *Gene* 71(2):501, 1988.]. *Gene* 67:105-115, 1988.
- Daw et al.** abstract, *J.Med.Genet.* 25:275,1988.
- Dalgleish, R.** The Human Collagen Mutation Database 1998. *Nucleic.Acids.Res.* 26(1):253-255, 1998.
- Dalgleish, R.** The human type I collagen mutation database. *Nucleic Acids Res.* 25:181-187, 1997.
- Deng, H.W., Li, J., Li, J.L., Johnson, M., Gong, G., Recker, R.R.** Association of VDR and estrogen receptor genotypes with bone mass in postmenopausal Caucasian women: different conclusions with different analyses and the implications. *Osteoporos.Int.* 9(6):499-507, 1999.
- Devereux, J., Haeberli, P., Smithies, O.** A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic-Acids-Res.* 12(1 Pt 1): 387-395, 1984.
- De Paepe, A., Nuytinck, L., Raes, M., Fryns, J.P.** Homozygosity by descent for a COL1A2 mutation in two sibs with severe osteogenesis imperfecta and mild clinical expression in the heterozygotes. *Hum.Genet.* 99(4):478-483, 1997.
- De Vos, A., Sermon, K., Van de Velde, H., et al.** Two pregnancies after preimplantation genetic diagnosis for osteogenesis imperfecta type I and type IV. *Hum.Genet.* 106(6):605-613, 2000.
- Den Dunnen, J.T., Antonarakis, S.E.** Mutation nomenclature extensions to describe complex mutations: a discussion. *Hum.Mut.* 15:7-12, 2000.
- Dickson, I.,R.** Bone. In: *Connective Tissue And Its Heritable Disorders*, Royce, P.M. and Steinmann, B. (eds.) New York: Wiley-Liss, Inc. 1993, p. 249-285.
- Dion, A.S., Myers, J.C.** COOH-terminal propeptides of the major human procollagens. Structural, functional and genetic comparisons. *J.Mol.Biol.* 193(1):127-143, 1987.
- Dölz, R., Heidemann, E.** Influence of different tripeptides on the stability of the collagen triple helix. I. Analysis of the collagen sequence and identification of typical tripeptides. *Biopolymers.* 25(6):1069-1080, 1986.
- Dohi, Y., Iki, M., Ohgushi, H., Gojo, S., Tabata, S., Kajita, E., Nishino, H., Yonemasu, K.** A novel polymorphism in the promoter region for the human osteocalcin gene: the possibility of a correlation

- with bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *J.Bone.Minor.Res.* 13(10):1633-9, 1998.
- Eccleshall, T.R., Garnero, P., Gross, C., Delmas, P.D., Feldman, D.** Lack of correlation between start codon polymorphism of the vitamin D receptor gene and bone mineral density in premenopausal French women: the OFELY study. *J.Bone.Minor.Res.* 13:31-35, 1998.
- Eisman, J.A.** Vitamin D receptor gene alleles and osteoporosis: an affirmative view [editorial]. *J.Bone.Minor.Res.* 10:1289-1293, 1995.
- Elford, P.R., Guenther, H.L., Felix, R., Cecchini, M.G., Fleisch, H.** Transforming growth factor-beta reduces the phenotypic expression of osteoblastic MC3T3-E1 cells in monolayer culture. *Bone.* 8(4):259-262, 1987.
- Ewens, W.J., Spielman, R.S.** The transmission/disequilibrium test: history, subdivision, and admixture. *Am.J.Hum.Genet.* 57(2):455-464, 1995.
- Falvo, K.A., Root, L., Bullough, P.G.** Osteogenesis imperfecta: clinical evaluation and management. *J.Bone.Joint.Surg.Am.* 56(4):783-93, 1974.
- Fedarko, N.S., Moerike, M., Brenner, R., Robey, P.G., Vetter, U.** Extracellular matrix formation by osteoblasts from patients with osteogenesis imperfecta. *J.Bone.Minor.Res.* 7(8):921-930, 1992.
- Ferrari, S., Rizzoli, R., Manen, D., Slosman, D., Bonjour, J.P.** Vitamin D receptor gene start codon polymorphisms (FokI) and bone mineral density: interaction with age, dietary calcium, and 3'-end region polymorphisms. *J.Bone.Minor.Res.* 13(6):925-30, 1998.
- Feshchenko et al.** Mutation in brief. *Hum.Mutat.* 12:138, 1998.
- Fisher, L.W., Drum, M.A., Robey, P.G., Conn, K.M., Termine, J.D.** Osteonectin content in human osteogenesis imperfecta bone shows a range similar to that of two bovine models of OI. *Calcif.Tissue.Int.* 40(5):260-264, 1987.
- Fleet, J.C., Harris, S.S., Wood, R.J., Dawson Hughes, B.** The BsmI vitamin D receptor restriction fragment length polymorphism (BB) predicts low bone density in premenopausal black and white women. *J.Bone.Minor.Res.* 10:985-990, 1995.
- Forlino, A., Porter, F.D., Lee, E.J., Westphal, H., Marini, J.C.** Use of the Cre/lox recombination system to develop a non-lethal knock-in murine model for osteogenesis imperfecta with an alpha1(I) G349C substitution. Variability in phenotype in BrtlIV mice. *J.Biol.Chem.* 274(53):37923-37931, 1999.
- Galéra, P., Musso, M., Ducy, P., Karsenty, G.** c-Krox, a transcriptional regulator of type I collagen gene expression, is preferentially expressed in skin. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 91(20):9372-9376, 1994.
- Ganguly, A., Rock, M.J., Prockop, D.J.** Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes [published erratum appears in Proc.Natl.Acad. Sci. 91(11):5217, 1994.]. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 90(21):10325-10329, 1993.
- Garnero, P., Borel, O., Grant, S.F., Ralston, S.H., Delmas, P.D.** Collagen Ialpha1 Sp1 polymorphism, bone mass, and bone turnover in healthy French premenopausal women: the OFELY study. *J.Bone.Minor.Res.* 13(5):813-7, 1998.

- Garnero, P., Borel, O., Sornay Rendu, E., Arlot, M.E., Delmas, P.D.** Vitamin D receptor gene polymorphisms are not related to bone turnover, rate of bone loss, and bone mass in postmenopausal women: the OFELY Study. *J.Bone.Miner.Res.* 11:827-834, 1996.
- Garnero, P., Borel, O., Sornay Rendu, E., Delmas, P.D.** Vitamin D receptor gene polymorphisms do not predict bone turnover and bone mass in healthy premenopausal women. *J.Bone.Miner.Res.* 10:1283-1288, 1995.
- Gennari, L., Becherini, L., Mansani, R., et al.** FokI polymorphism at translation initiation site of the vitamin D receptor gene predicts bone mineral density and vertebral fractures in postmeno-pausal Italian women. *J.Bone.Miner.Res.* 14(8):1379-86, 1999.
- Gianelli, F., Anagnostopoulos, T., Green, P.M.** Mutation Rates in Humans. II. Sporadic Mutation Specific-Rates and Rate of Detrimental Human Mutations Inferred from Hemophilia B. *Am.J.Hum.Genet.* 65:1580-1587, 1999.
- Glimcher, M.J., Shapiro, F., Ellis, R.D., Eyre, D.R.** Changes in tissue morphology and collagen composition during the repair of cortical bone in the adult chicken. *J.Bone.Joint.Surg.Am.* 62(6):964-973, 1980.
- Glorieux, F.H., Rauch, F., Plotkin, H. et al.** Type V Osteogenesis imperfecta: A new form of brittle bone disease. *J.Bone.Miner.Res.* 15(9):1650-1658, 2000.
- Glorieux, F.H., Bishop, N.J., Plotkin, H., Chabot, G., Lanoue, G., Travers, R.** Cyclic administration of pamidronate in children with severe osteogenesis imperfecta. *N.Engl.J.Med.* 339(14):947-952, 1998.
- Goldfarb, L.G., Petersen, R.B., Tabaton, M., et al.** Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science.* 258(5083):806-808, 1992.
- Grant, S.F.A., Reid, D.M., Blake, G., Herd, R., Fogelman, I. and Ralston, S.H.** Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nature Genetics* 14:203-205, 1996.
- Grainger, D.J., Percival, J., Chiano, M., Spector, T.D.** The role of serum TGF-beta isoforms as potential markers of osteoporosis. *Osteoporos.Int.* 9(5):398-404, 1999.
- Gray, P.H.K.** A case of osteogenesis imperfecta, associated with dentinogenesis imperfecta, dating from antiquity. *Clin Radiol* 20:106-108, 1969.
- Gross, C., Krishnan, A.V., Malloy, P.J., Eccleshall, T.R., Zhao, X.Y., Feldman, D.** The vitamin D receptor gene start codon polymorphism: a functional analysis of FokI variants. *J.Bone.Miner.Res.* 13(11):1691-1699, 1998.
- Gross, C., Eccleshall, T.R., Malloy, P.J., Villa, M.L., Marcus, R., Feldman, D.** The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J.Bone.Miner.Res.* 11(12):1850-1855, 1996.
- Hämäläinen, E.R., Kemppainen, R., Pihlajaniemi, T., Kivirikko, K.I.** Structure of the human lysyl oxidase gene. *Genomics.* 17(3):544-548, 1993.
- Hanke, M., Wink, M.** Direct DNA sequencing of PCR-amplified vector inserts following enzymatic degradation of primer and dNTPs [published erratum appears in *Biotechniques* 18(4):636, 1995.] *Biotechniques.* 17(5):858-860, 1994.

- Harris, S.S., Eccleshall, T.R., Gross C., Dawson Hughes, B., Feldman, D.** The vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. *J.Bone.Minor.Res.* 12:1043-1048, 1997.
- Harris, S.E., Bonewald, L.F., Harris, M.A. et al.** Effects of transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type I collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *J.Bone.Minor.Res.* 9(6):855-63, 1994.
- Hawkins, J.R., Superti-Furga, A., Steinmann, B., Dalgleish, R.** A 9-base pair deletion in COL1A1 in a lethal variant of osteogenesis imperfecta. *J.Biol.Chem.* 266(33):22370-22374, 1991.
- Ho, N.C., Jia, L., Driscoll, C.C., Gutter, E.M., Francomano, C.A.** A skeletal gene database. *J.Bone.Minor.Res.* 15(11):2095-2122, 2000.
- Hobson, E., Dean, V., Grant, S.F.A., Ralston, S.H.** Functional effects of a polymorphism of the collagen (I) alpha 1 gene (COL1A1) in osteoporosis. *J.Med.Genet* 35, Suppl. 1, 1998 (British Human Genetics Conference 1998, Spoken presentations SP73).
- Hock, J.M., Centrella, M., Canalis, E.** Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology.* 122(1):254-260, 1988.
- Hopert, A., Uphoff, C.C., Wirth, M., Hauser, H., Drexler, H.G.** Mycoplasma detection by PCR analysis. *In-Vitro.Cell.Dev.Biol.Anim.* 29A(10):819-821, 1993.
- Horwitz, E.M., Prockop, D.J., Fitzpatrick, L.A. et al.** Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat.Med.* 5(3):309-313, 1999.
- Hormuzdi, S., Penttinen, R., Jaenisch, R., Bornstein, P.** A gene-targeting approach identifies a function for the first intron in expression of the alpha1(I) collagen gene. *Mol.Cell.Biol.* 18:3368-3375, 1998.
- Hosoi, T., Miyao, M., Inoue, S., Hoshino, S., Shiraki, M., Orimo, H., Ouchi, Y.** Association study of parathyroid hormone gene polymorphism and bone mineral density in Japanese postmeno-pausal women. *Calcif.Tissue.Int.* 64(3):205-8, 1999.
- Houlston, R.S., Tomlinson, I.P.** Modifier genes in humans: strategies for identification. *Eur.J.Hum.Genet.* Jan; 6(1):80-88, 1998.
- Hustmyer, F.G., Liu, G., Johnston, C.C., Christian, J., Peacock, M.** Polymorphism at an Sp1 binding site of COL1A1 and bone mineral density in premenopausal female twins and elderly fracture patients. *Osteoporos.Int.* 9(4):346-50, 1999.
- Hustmyer, F.G., Peacock, M., Hui, S., Johnston, C.C., Christian, J.** Bone mineral density in relation to polymorphism at the vitamin D receptor gene locus. *J.Clin.Invest.* 94:2130-2134, 1994.
- Ingles, S.A., Haile, R.W., Henderson, B.E., et al.** Strength of linkage disequilibrium between two vitamin D receptor markers in five ethnic groups: implications for association studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 6:93-98, 1997.
- Ingles, S.A., Ross, R.K., Yu, M.C., Irvine, R.A., La-Pera, G., Haile, R.W., Coetzee, G.A.** Association of prostate cancer risk with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. *J.Natl.Cancer.Inst.* 89(2):166-170, 1997.

- Jego, N., Thomas, G., Hamelin, R.** Short direct repeats flanking deletions, and duplicating insertions in p53 gene in human cancers. *Oncogene*. 8(1):209-213, 1993.
- Jimenez, S.A., Varga, J., Olsen, A., Li, L., Diaz, A., Herhal, J. Koch, J.** Functional analysis of human alpha1(1) procollagen gene promoter. Differential activity in collagen-producing and non-producing cells and response to transforming growth factor beta 1. *J.Biol.Chem.* 269:12684-12691, 1994.
- Jimi, E., Shuto, T., Koga, T.** Macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1 alpha maintain the survival of osteoclast-like cells. *Endocrinology* 136(2):808-811, 1995.
- Jouanny, P., Guillemin, F., Kuntz, C., Jeandel, C., Pourel, J.** Environmental and genetic factors affecting bone mass. Similarity of bone density among members of healthy families. *Arthritis.Rheum.* 38(1):61-67, 1995.
- Just, W., Rau, W., Müller, R., Geerkens, C., Vogel, W.** Dinucleotide repeat polymorphism at the human biglycan (BGN) locus. *Hum.Mol.Genet.* 3(12):2268, 1994.
- Kadonaga, J.T.** Promoter-specific activation of RNA-Pol II transcription by Sp1. *Trends.Biochem Sciences(TIBS)* 11, 1986.
- Keen, R.W., Hart, D.J., Lanchbury, J.S., Spector, T.D.** Association of early osteoarthritis of the knee with a Taq I polymorphism of the vitamin D receptor gene. *Arthritis.Rheum.* 40:1444-1449, 1997.
- Kennerknecht, I., Schlenker, U., Trummer, T., Just, W., Vogel, W., Brenner, R.** The "gradient model" of phenotype expression of Osteogenesis imperfecta is a poor predictor for the location of mutatis when screening small collections. *Med.Genetik.* 1:195, 1999.
- Kiel, D.P., Myers, R.H., Cupples, L.A., et al.** The BsmI vitamin D receptor restriction fragment length polymorphism (bb) influences the effect of calcium intake on bone mineral density. *J.Bone.Miner.Res.* 12:1049-1057, 1997.
- Kielty, C.M., Hopkinson, I. and Grant, M.E.** Collagen: The Collagen Family: Structure, Assembly, and Organization in the Extracellular Matrix. In: *Connective Tissue and its Heritable Disorders*, Royce, P.M. and Steinmann, B. (eds.) New York: Wiley-Liss, Inc. 1993, p. 103-147.
- Kiesewetter, S., Macek, M. Jr., Davis, C., et al.** A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nat.Genet.* 5(3):274-278, 1993.
- Khakoo, A., Thomas, R., Trompeter, R., Duffy, P., Price, R., Pope, F.M.** Congenital cutis laxa and lysyl oxidase deficiency. *Clin.Genet.* 51:109-114, 1997.
- Kirsch, E., Krieg, T., Remberger, K., Fendel, H., Bruckner, P., Müller, P.K.** Disorder of collagen metabolism in a patient with osteogenesis imperfecta (lethal type): increased degree of hydroxylation of lysine in collagen types I and III. *Eur.J.Clin.Invest.* 11(1):39-47, 1981.
- Körkkö, J., Ala Kokko, L., de Paepe, A., Nuytinck, L., Earley, J., Prockop, D.J.** Analysis of the COL1A1 and COL1A2 genes by PCR amplification and scanning by conformation-sensitive gel electrophoresis identifies only COL1A1 mutations in 15 patients with osteogenesis imperfecta type I: identification of common sequences of null-allele mutations. *Am.J.Hum.Genet.* 62(1):98-110, 1998.
- Körkkö, J., Kuivaniemi, H., Paassilta, P., et al.** Two new recurrent nucleotide mutations in the COL1A1 gene in four patients with osteogenesis imperfecta: about one-fifth are recurrent. *Hum.Mutat.* 9:148-156; 1997.

- Kowitz, J., Knippel, M., Schuhr, T., Mach, J.** Alteration in the extent of collagen I hydroxylation, isolated from femoral heads of women with a femoral neck fracture caused by osteoporosis. *Calcif.Tissue.Int.* 60(6):501-505, 1997.
- Krall, E.A., Parry, P., Lichter, J.B., Dawson Hughes, B.** Vitamin D receptor alleles and rates of bone loss: influences of years since menopause and calcium intake. *J.Bone.Minor.Res.* 10:978-984, 1995.
- Krall, E.A., Dawson-Hughes, B.** Heritable and life-style determinants of bone mineral density. *J.Bone.Minor.Res.* 8(1):1-9, 1993.
- Kuivaniemi, H., Tromp, G. and Prockop, D.J.** Mutations in collagen genes: causes of rare and some common diseases in humans. *FASEB J.* 5:2052-2060, 1991.
- Kuivaniemi, H., Sabol, C., Tromp, G., Sippola Thiele, M. and Prockop, D.J.** A 19-base pair deletion in the pro-alpha 2(I) gene of type I procollagen that causes in-frame RNA splicing from exon 10 to exon 12 in a proband with atypical osteogenesis imperfecta and in his asymptomatic mother. *J.Biol.Chem.* 263:11407-11413, 1988.
- Kuivaniemi, H., Peltonen, L., Kivirikko, K.I.** Type IX Ehlers-Danlos syndrome and Menkes syndrome: the decrease in lysyl oxidase activity is associated with a corresponding deficiency in the enzyme protein. *Am.J.Hum.Genet.* 37(4):798-808, 1985.
- Langdahl, B.L., Lokke, E., Carstens, M., Stenkjaer, L.L., Eriksen, E.F.** Osteoporotic fractures are associated with an 86-base pair repeat polymorphism in the interleukin-1--receptor antagonist gene but not with polymorphisms in the interleukin-1beta gene. *J.Bone.Minor.Res.* 15(3):402-414, 2000.
- Langdahl, B.L., Ralston, S.H., Grant, S.F., Eriksen, E.F.** An Sp1 binding site polymorphism in the COL1A1 gene predicts osteoporotic fractures in both men and women. *J.Bone.Minor.Res.* 13(9):1384-1389, 1998.
- Langdahl, B.L., Knudsen, J.Y., Jensen, H.K., Gregersen, N., Eriksen, E.F.** A sequence variation: 713-8delC in the transforming growth factor-beta 1 gene has higher prevalence in osteoporotic women than in normal women and is associated with very low bone mass in osteoporotic women and increased bone turnover in both osteoporotic and normal women. *Bone.* 20(3):289-294, 1997.
- Laskey, R.A., Mills, A.D.** Enhanced autoradiographic detection of ^{32}P and ^{125}I using intensifying screens and hypersensitized film. *FEBS.Lett.* 82(2):314-316, 1977.
- Lasson, U., Harms, D., Wiedemann, H.R.** Osteogenic sarcoma complicating osteogenesis imperfecta tarda. *Eur.J.Pediatr.* 129(3):215-218, 1978.
- Lehmann, H.W., Rimek, D., Bodo, M., Brenner, R.E., et al.** Hydroxylation of collagen type I: evidence that both lysyl and prolyl residues are overhydroxylated in osteogenesis imperfecta. *Eur.J.Clin.Invest.* 25(5):306-310, 1995.
- Lehmann-Horn, E., Rüdell, R.** Molecular pathophysiology of voltage-gated ion channels. In: Blaustein, M.P., Grunicke, H., Habermann, E., Pette, D., Schultz, G., Schweiger, M. (eds.) *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1996, pp. 195-268.
- Lewin, B.** The mystique of epigenetics. *Cell.* 93(3):301-303, 1998.
- Li, W.H., Graur, D.** Evolution by gene duplication and exon shuffling. In: *Fundamentals of molecular evolution*, edited by Li, W.H. and Graur, D. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 1997, p. 136-171.

- Li, L., Artlett, C.M., Jimenez, S.A., Hall, D.J., Varga, J.** Positive regulation of human alpha 1 (I) collagen promoter activity by transcription factor Sp1. *Gene*. 164(2):229-234, 1995.
- Lightfoot, S.J., Holmes, D.F., Brass, A., Grant, M.E., Byers, P.H., Kadler, K.E.** Type I procollagens containing substitutions of aspartate, arginine, and cysteine for glycine in the pro alpha 1 (I) chain are cleaved slowly by N-proteinase, but only the cysteine substitution introduces a kink in the molecule. *J.Biol.Chem.* 267(35):25521-25528, 1992.
- Ligtenberg, M.J., Vos, H.L., Gennissen, A.M., Hilkens, J.** Episialin, a carcinoma-associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini. *J.Biol.Chem.* 265(10):5573-5578, 1990.
- Lim, S.K., Park, Y.S., Park, J.M., et al.** Lack of association between vitamin D receptor genotypes and osteoporosis in Koreans. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 80:3677-3681, 1995.
- Lobstein, J.F.** Von der Knochenbrüchigkeit oder Osteopsathyose. In: Lehrbuch der pathologischen Anatomie, Thieme Stuttgart Vol 2, 1835, p. 179.
- Lou, J., Tu, Y., Ludwig, F.J., Zhang, J., Manske, P.R.** Effect of bone morphogenetic protein-12 gene transfer on mesenchymal progenitor cells. *Clin.Orthop.* 369:333-339, 1999.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.** Protein measurements with the Folin Phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193, 265-275, 1951.
- Lui, V.C., Ng, L.J., Sat, E.W., Cheah, K.S.** The human alpha 2(XI) collagen gene (COL11A2): completion of coding information, identification of the promoter sequence, and precise localization within the major histocompatibility complex reveal overlap with the KE5 gene. *Genomics* 32(3):401-412, 1996.
- Lund, A.M., Jensen, B.L., Nielsen, L.A., Skovby, F.** Dental manifestations of osteogenesis imperfecta and abnormalities of collagen I metabolism. *J.Craniofac.Genet.Dev.Biol.* 18(1):30-37, 1998.
- Lund, A.M., Skovby, F., Schwartz, M.** Serine for glycine substitutions in the C-terminal third of the alpha 1(I) chain of collagen I in five patients with nonlethal osteogenesis imperfecta. *Hum.Mutat.* 9(4):378-382, 1997.
- Marini, J.C.** Osteogenesis imperfecta calls for caution. *Nat.Med.* 5(5):466-467, 1999.
- Marini, J.C., Lewis, M.B., Wang, Q., Chen, K.J., Orrison, B.M.** Serine for glycine substitutions in type I collagen in two cases of type IV osteogenesis imperfecta (OI). Additional evidence for a regional model of OI pathophysiology. *J.Biol.Chem.* 268:2667-2673; 1993.
- McClure, L., Eccleshall, T.R., Gross, C., et al.** Vitamin D receptor polymorphisms, bone mineral density, and bone metabolism in postmenopausal Mexican-American women. *J.Bone.Miner.Res.* 12:234-240, 1997.
- McKusick, V.A.** Mendelian inheritance in man. Baltimore and London. The Johns Hopkins University Press. 11th edition:1994.
- McPherson, E., Clemens, M.** Bruck syndrome (osteogenesis imperfecta with congenital joint contractures): review and report on the first North American case. *Am.J.Med.Genet.* 70(1):28-31, 1997.
- Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, H.F.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16:1215, 1988.

- Mirandola, S., Pignatti, P.F., Mottes, M.** A novel intragenic polymorphism within the COL1A1 locus which can be detected by Taq I restriction of amplified genomic DNA. *Mol.Cell.Probes.* 13(3):243-245, 1999.
- Miyamoto, K., Kesterson, R.A., Yamamoto, H., et al.** Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol.Endocrinol.* 11:1165-1179, 1997.
- Mörrike, M., Windsheimer, E., Brenner, R., Nerlich, A., Bushart, G., Teller, W., Vetter, U.** Effects of transforming growth factor beta on cells derived from bone and callus of patients with osteogenesis imperfecta. *J.Orthop.Res.* 11(4):564-572, 1993.
- Moog, U., Maroteaux, P., Schrandt-Stumpel, C.T., et al.** Two sibs with an unusual pattern of skeletal malformations resembling osteogenesis imperfecta: a new type of skeletal dysplasia? *J.Med.Genet.* 36(11):856-858, 1999.
- Morrison, N.A., Qi, J.C., Tokita, A., et al.** Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 367:284-287, 1994.
- Morrison, N.A., Yeoman, R., Kelly, P.J., Eisman, J.A.** Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 89:6665-6669, 1992.
- Murray, R.E., McGuigan, F., Grant, S.F., Reid, D.M., Ralston, S.H.** Polymorphisms of the interleukin-6 gene are associated with bone mineral density. *Bone* 21:89-92; 1997.
- Need, A.G., Horowitz, M., Stiliano, A., Scopacasa, F., Morris, H.A., Chatterton, B.E.** Vitamin D receptor genotypes are related to bone size and bone density in men. *Eur.J.Clin.Invest.* 26:793-796, 1996.
- Nerlich, A.G., Brenner, R.E., Wiest, I., Lehmann, H., Yang, C., Muller, P.K., von der Mark, K.** Immunohistochemical localization of interstitial collagens in bone tissue from patients with various forms of osteogenesis imperfecta. *Am.J.Med.Genet.* 45(2):258-259, 1993.
- Nishishita, T., Okazaki, T., Ishikawa, T., Igarashi, T., Hata, K., Ogata, E., Fujita, T.** A negative vitamin D response DNA element in the human parathyroid hormone-related peptide gene binds to vitamin D receptor along with Ku antigen to mediate negative gene regulation by vitamin D. *J.Biol.Chem.* 273(18):10901-10907, 1998.
- Nishiyama, T., McDonough, A.M., Bruns, R.R., Burgeson, R.E.** Type XII and XIV collagens mediate interactions between banded collagen fibers in vitro and may modulate extracellular matrix deformability. *J.Biol.Chem.* 269(45):28193-28199, 1994.
- Nuytinck, L., Sayli, B.S., Karen, W., de Paepe, A.** Prenatal diagnosis of osteogenesis imperfecta type I by COL1A1 null-allele testing. *Prenat.Diagn.* 19(9):873-875, 1999.
- Nuytinck, L., Coppin, C., De Paepe, A.** A four base pair insertion polymorphism in the 3' untranslated region of the COL1A1 gene is highly informative for null-allele testing in patients with osteogenesis imperfecta type I. *Matrix Biol.* 16(6):349-352, 1998.
- Nuytinck, L., Wettinck, K., Freund, M., Van Maldergem, L., Fabry, G., De Paepe, A.** Osteogenesis imperfecta phenotypes resulting from serine for glycine substitutions in the alpha2(I) collagen chain. A four base pair insertion polymorphism in the 3' untranslated region of the COL1A1 gene is highly informative for null-allele testing in patients with osteogenesis imperfecta type I. *Eur.J.Hum.Genet.* 5(3):161-167, 1997.

- Nuytinck, L., Dagleish, R., Spotila, L., Renard, J.P., Van Regemorter, N., De Paepe, A.** Substitution of glycine-661 by serine in the alpha1 (I) and alpha2 (I) chains of type I collagen results in different clinical and biochemical phenotypes. *Hum.Genet.* 97:324-329, 1996.
- Ollila, J., Lappalainen, I., Vihinen, M.** Sequence specificity in CpG mutation hotspots. *FEBS.Lett.* 396(2-3):119-122, 1996.
- Olsen, A.S., Geddis, A.E., Prockop, D.J.** High levels of expression of a minigene version of the human pro alpha 1 (I) collagen gene in stably transfected mouse fibroblasts. Effects of deleting putative regulatory sequences in the first intron. *J.Biol.Chem.* 266:1117-11121, 1991.
- Oyama, M., Tatlock, A., Fukuta, S. et al.** Retrovirally transduced bone marrow stromal cells isolated from a mouse model of human osteogenesis imperfecta (oim) persist in bone and retain the ability to form cartilage and bone after extended passaging. *Gene Ther.* 6(3):321-329, 1999.
- Pavlin, D., Bedalov, A., Kronenberg, M.S. et al.** Analysis of regulatory regions in the COL1A1 gene responsible for 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated transcriptional repression in osteoblastic cells. *J.Cell.Biochem.* 56(4):490-501, 1994.
- Peacock, M.** Vitamin D receptor gene alleles and osteoporosis: a contrasting view [editorial]. *J.Bone.Miner.Res.* 10:1294-1297, 1995.
- Pearson, W.R. and Lipman, D.J.** Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448, 1988.
- Pepe, G.** A highly polymorphic (ACT)_n VNTR (variable nucleotide of tandem repeats) locus inside intron 12 of COL1A2, one of the two genes involved in dominant osteogenesis imperfecta. *Hum.Mutat.* 2:300-305, 1993.
- Pepin, M., Atkinson, M., Starman, B.J., Byers, P.H.** Strategies and outcomes of prenatal diagnosis for osteogenesis imperfecta: a review of biochemical and molecular studies completed in 129 pregnancies. *Prenat.Diagn.* 17(6):559-570, 1997.
- Pereira, R.F., Halford, K.W., O'Hara, M.D., Leeper, D.B., Sokolov, B.P., Pollard, M.D., Bagasra, O., Prockop, D.J.** Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92(11):4857-4861, 1995.
- Pereira, R., Halford, K., Sokolov, B.P., Khillan, J.S., Prockop, D.J.** Phenotypic variability and incomplete penetrance of spontaneous fractures in an inbred strain of transgenic mice expressing a mutated collagen gene (COL1A1). *J.Clin.Invest.* 93(4):1765-1769, 1994.
- Pfeilschifter, J., Wuster, C., Vogel, M., Enderes, B., Ziegler, R., Minne, H.W.** Inflammation-mediated osteopenia (IMO) during acute inflammation in rats is due to a transient inhibition of bone formation. *Calcif.Tissue.Int.* 41(6):321-5, 1987.
- Pfeilschifter, J., Mundy, G.R.** Modulation of type beta transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 84(7):2024-8, 1987.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C. et al.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284(5411):143-147, 1999.
- Pocock, N.A., Eisman, J.A., Hopper, J.L., Yeates, M.G., Sambrook, P.N., Eberl, S.** Genetic determinants of bone mass in adults. A twin study. *J.Clin.Invest.* 80(3):706-710, 1987.

- Pope, F.M., Nicholls, A.C., McPheat, J., Talmud, P. and Owen, R.** Collagen genes and proteins in osteogenesis imperfecta. *J.Med.Genet.* 22:466-478, 1985.
- Prockop, D.J., Korkko, J., Kinnarney, M. and Ala-Kokko, L.** Direct DNA Testing of collagen I genes in Osteogenesis imperfecta. *abstract book*, 1999 (7th International Conference on osteogenesis imperfecta, Montréal, Canada, 1999, Spoken presentations I-1).
- Prockop, D.J., Kivirikko, K.I.** Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu.Rev.Biochem.* 64:403-434, 1995.
- Prockop, D.J., Baldwin, C.T. and Constantinou, C.D.** Mutations in type I procollagen genes that cause osteogenesis imperfecta. *Adv.Hum.Genet.* 19:105-132, 1990.
- Prockop, D.J.** Osteogenesis imperfecta. A model for genetic causes of osteoporosis and perhaps several other common diseases of connective tissue. *Arthritis.Rheum.* 31:1-8, 1988.
- Pruchno, C.J., Cohn, D.H., Wallis, G.A., Willing, M.C., Starman, B.J., Zhang, X.M., Byers, P.H.** Osteogenesis imperfecta due to recurrent point mutations at CpG dinucleotides in the COL1A1 gene of type I collagen. *Hum.Genet.* 87:33-40, 1991.
- Raghunath, M., Bruckner, P., Steinmann, B.** Delayed triple helix formation of mutant collagen from patients with osteogenesis imperfecta. *J.Mol.Biol.* 236(3):940-949, 1994.
- Ramachandran, G.N.** Stereochemistry of collagen. *Int.J.Pept.Protein.Res.* 31(1):1-16, 1988.
- Retief, E., Parker, M.I. and Retief, A.E.** Regional chromosome mapping of human collagen genes alpha 2(I) and alpha 1(I) (COLIA2 and COLIA1). *Hum.Genet.* 69:304-308, 1985.
- Richard, I., Beckmann, J.S.** How neutral are synonymous codon mutations? *Nat.Genet.* 10(3):259, 1995.
- Riggs, B.L., Nguyen, T.V., Melton, L.J., et al.** The contribution of vitamin D receptor gene alleles to the determination of bone mineral density in normal and osteoporotic women. *J.Bone.Minor.Res.* 10:991-996, 1995.
- Robey, P.G., Young, M.F., Flanders, K.C., et al.** Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type beta (TGF-beta) in vitro. *J.Cell.Biol.* 105(1):457-463, 1987.
- Roodman, G.D.** Osteoclast function in Paget's disease and multiple myeloma. *Bone* 17(2 Suppl):57S-61S, 1995.
- Rose, N.J., Mackay, K., Byers, P.H., Dalgleish, R.** A Gly238Ser substitution in the alpha 2 chain of type I collagen results in osteogenesis imperfecta type III. *Hum.Genet.* 95(2):215-218, 1995.
- Rosen, C.J., Kurland, E.S., Vereault, D., et al.** Association between serum insulin growth factor-I (IGF-I) and a simple sequence repeat in IGF-I gene: implications for genetic studies of bone mineral density. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 83(7):2286-2290, 1998.
- Rossert, J., Eberspaecher, H., de Crombrughe, B.** Separate cis-acting DNA elements of the mouse pro-alpha 1(I) collagen promoter direct expression of reporter genes to different type I collagen-producing cells in transgenic mice. *J.Cell.Biol.* 129(5):1421-1432, 1995.
- Rossi, P., Karsenty, G., Roberts, A.B., Roche, N.S., Sporn, M.B., de Crombrughe, B.** A nuclear factor 1 binding site mediates the transcriptional activation of a type I collagen promoter by transforming growth factor-beta. *Cell* 52(3):405-414, 1988.

- Rossiter, B.J., Caskey, C.T.** Molecular scanning methods of mutation detection. *J.Biol.Chem.* 265(22):12753-127536, 1990.
- Rossouw, C.M., Vergeer, W.P., du Plooy, S.J., Bernard, M.P., Ramirez, F., de Wet, W.J.** DNA sequences in the first intron of the human pro-alpha 1(I) collagen gene enhance transcription. *J.Biol.Chem.* 262(31):15151-15157, 1987.
- Rowe, D.W., Stover, M.L., McKinstry, M., et al.** Molecular mechanisms (real and imagined) for osteopenic bone disease. (Abstract) 4th Int. Conf. on Osteogenesis Imperfecta, Pavia, Italy 57 only, 9/9/1990.
- Rowe, D.W., Shapiro, J.R.** Osteogenesis imperfecta. In: *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders.*, 3rd ed., Avioli, L.V., Krane, S.M. (eds.) San Diego: Academic Press 1998, p. 651-695.
- Rozenblatt, S., Koch, T., Pinhasi, O., Bratosin, S.** Infective substructures of measles virus from acutely and persistently infected cells. *J.Virol.* 32(1):329-333, 1979.
- Saadeh, P.B., Mehrara, B.J., Steinbrech, D.S. et al.** Transforming growth factor-beta1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts. *Am.J.Physiol.* 277(4 Pt 1):C628-37, 1999.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., et al.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239(4839): 487-491, 1988.
- Sainz, J., Van Tornout, J.M., Loro, M.L., Sayre, J., Roe, T.F., Gilsanz, V.** Vitamin D-receptor gene polymorphisms and bone density in prepubertal American girls of Mexican descent. *N.Engl.J.Med.* 337:77-82, 1997.
- Sambrock, J., Frisch, E.F., Maniatis, T.** Molecular cloning: A laboratory manual. (2nd edition) Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl. Acad.Sci.* 74(12):5463-5467, 1977.
- Sarafova, A.P., Choi, H., Forlino, A., Gajko, A., Cabral, W.A., Tosi, L., Reing, C.M., Marini, J.C.** Three novel type I collagen mutations in osteogenesis imperfecta type IV probands are associated with discrepancies between electrophoretic migration of osteoblast and fibroblast collagen. *Hum.Mutat.* 11(5):395-403, 1998.
- Satoh, M., Hirayoshi, K., Yokota, S., Hosokawa, N., Nagata, K.** Intracellular interaction of collagen-specific stress protein HSP47 with newly synthesized procollagen. *J.Cell.Biol.* 133(2):469-483, 1996.
- Scheven, B.A., Hamilton, N.J., Fakkeldij, T.M., Duursma, S.A.** Effects of recombinant human insulin-like growth factor I and II (IGF-I/-II) and growth hormone (GH) on the growth of normal adult human osteoblast-like cells and human osteogenic sarcoma cells. *Growth Regul.* 1(4):160-167, 1991.
- Schönherr, E., Hausser, H., Beavan, L., Kresse, H.** Decorin-type I collagen interaction. Presence of separate core protein-binding domains. *J.Biol.Chem.* 270(15):8877-8883, 1995.
- Schönherr, E., Witsch Prehm, P., Harrach, B., Robenek, H., Rauterberg, J., Kresse, H.** Inter-action of biglycan with type I collagen. *J.Biol.Chem.* 270(6):2776-2783, 1995.

- Schwarze, U., Starman, B.J., Byers, P.H.** Redefinition of Exon 7 in the COL1A1 Gene of Type I Collagen by an Intron 8 Splice-DonorSite Mutation in a Form of Osteogenesis Imperfecta: Influence of Intron Splice Order on Outcome of Splice-Site Mutation *Am.J.Hum.Genet.* 65:336-344, 1999.
- Scott, J.E., Orford, C.R.** Dermatan sulphate-rich proteoglycan associates with rat tail-tendon collagen at the d band in the gap region. *Biochem.J.* 197(1):213-216, 1981.
- Seitzer, U., Bätge, B., Acil, Y., Müller, P.K.** Transforming growth factor beta 1 influences lysyl hydroxylation of collagen I and reduces steady-state levels of lysyl hydroxylase mRNA in human osteoblast-like cells. *Eur.J.Clin.Invest.* 25(12):959-966, 1995.
- Shapiro, M.B. and Senapathy, P.** RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res.* 15:7155-7174, 1987.
- Sharma, N.L., Anand, J.S.** Osteogenesis imperfecta with arthrogryposis multiplex congenita. *Indian Med.J.* 53:124-126, 1964.
- Shuman, S.** Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J.Biol.Chem.* 269(51):32678-32684, 1994.
- Sillence, D.O. and Rimoin, D.L.** Classification of osteogenesis imperfect [letter]. *Lancet* 1:1041-1042, 1978.
- Sirand-Pugnet, P., Durosay, P., Brody, E., Marie, J.** An intronic (A/U)GGG repeat enhances the splicing of an alternative intron of the chicken β -tropomyosin pre-mRNA. *Nucl.Acids Res.* 23(17):3501-3507, 1995.
- Smith** In: "The brittle bone syndrome" London: Butterworths, 1983, p. 74-82.
- Sokolov, B.P., Prytkov, A.N., Tromp, G., Knowlton, R.G., Prockop, D.J.** Exclusion of COL1A1, COL1A2, and COL3A1 genes as candidate genes for Ehlers-Danlos syndrome type I in one large family. *Hum.Genet.* 88(2):125-129, 1991.
- Southern, E.M.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* 98(3):503-517, 1975.
- Sowers, M., Willing, M., Burns, T., et al.** Genetic markers, bone mineral density, and serum osteocalcin levels. *J.Bone.Minor.Res.* 14(8):1411-1419, 1999.
- Spotila, L.D., Rodriguez, H., Koch, M., et al.** Association of a Polymorphism in the TNFR2 Gene with Low Bone Mineral Density. *J.Bone.Minor.Res.* 5(7):1376-1383, 2000.
- Spotila, L.D., Sereda, L., Prockop, D.J.** Partial isodisomy for maternal chromosome 7 and short stature in an individual with a mutation at the COL1A2 locus. *Am.J.Hum.Genet.* 51(6):1396-1405, 1992.
- Spotila, L.D., Constantinou, C.D., Sereda, L., Ganguly, A., Riggs, B.L. and Prockop, D.J.** Mutation in a gene for type I procollagen (COL1A2) in a woman with postmenopausal osteoporosis: evidence for phenotypic and genotypic overlap with mild osteogenesis imperfecta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:5423-5427, 1991.
- Stöss, H., Pontz, B., Vetter, U., Karbowski, A., Brenner, R., Spranger, J.** Osteogenesis imperfecta and hyperplastic callus formation: light- and electron-microscopic findings. *Am.J.Med.Genet.* 45(2):260, 1993.

- Stracke, H., Schulz, A., Moeller, D., Rossol, S., Schatz, H.** Effect of growth hormone on osteoblasts and demonstration of somatomedin-C/IGF I in bone organ culture. *Acta.Endocrinol.Copenh.* 107(1):16-24, 1984.
- Suarez, C.R., Stickler, G.B.** Case Report 22. *Syndr.Ident.* 2:9-11, 1974.
- Sykes, B., Ogilvie, D., Wordsworth, P., et al.** Consistent linkage of dominantly inherited osteogenesis imperfecta to the type I collagen loci: COL1A1 and COL1A2. *Am.J.Hum.Genet.* 46:293-307, 1990.
- Sykes, B., Ogilvie, D., Wordsworth, P., Anderson, Jones, N.** Osteogenesis imperfecta is linked to both type I collagen structural genes. *Lancet.* 2(8498): 69-72, 1986.
- The Wisconsin Sequence Analysis Package.** Madison, WI. Genetics Computer Group, Inc. Version 8.0. 1994.
- Tokita, A., Matsumoto, H., Morrison, N.A., et al.** Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in premenopausal Japanese women. *J.Bone.Minor.Res.* 11:1003-1009, 1996.
- Tokita, A., Kelly, P.J., Nguyen, T.V., et al.** Genetic influences on type I collagen synthesis and degradation: further evidence for genetic regulation of bone turnover. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 78:1461-1466, 1994.
- Torre-Blanco, A., Adachi, E., Romanic, A.M., Prockop, D.J.** Copolymerization of normal type I collagen with three mutated type I collagens containing substitutions of cysteine at different glycine positions in the alpha 1 (I) chain. *J.Biol.Chem.* 267(7):4968-4973, 1992.
- Traub, W., Arad, T., Weiner, S.** Three-dimensional ordered distribution of crystals in turkey tendon collagen fibers. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 86(24):9822-9826, 1989.
- Travers, R., Rauch, F., Glorieux, F.H.** Osteogenesis imperfecta (OI) in a native american community: histomorphometric findings. *abstract book*, 1999 (7th International Conference on osteogenesis imperfecta, Montréal, Canada, 1999, P-44).
- Tromp, G., Kuivaniemi, H., Stacey, A., et al.** Structure of a full-length cDNA clone for the prepro alpha 1(I) chain of human type I procollagen. *Biochem.J.* 253:919-922, 1988.
- Tsai, K.S., Hsu, S.H., Cheng, W.C., Chen, C.K., Chieng, P.U., Pan, W.H.** Bone mineral density and bone markers in relation to vitamin D receptor gene polymorphisms in Chinese men and women. *Bone*19:513-518, 1996.
- Tsipouras, P., Borresen, A., Dickson, L.A., Berg, K., Prockop, D.J., Ramirez, F.** Molecular heterogeneity in the mild autosomal dominant forms of osteogenesis imperfecta. *Am.J.Hum.Genet.* 36:1172-1179, 1984.
- Uitterlinden, A.G.** Plenarvortrag 115 (nicht im abstract book vorhanden), Osteologie 2000, Würzburg, 2000.
- Uitterlinden, A.G., Burger, H., Huang, Q., et al.** Relation of alleles of the collagen type I alpha1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *N.Engl.J.Med.* 338:1016-1021; 1998.
- Uzawa, K., Grzesik, W.J., Nishiura, T., et al.** Differential expression of human lysyl hydroxylase genes, lysine hydroxylation, and cross-linking of type I collagen during osteoblastic differentiation in vitro. *J.Bone.Minor.Res.* 14(8):1272-1280, 1999.

- Vetter, U., Fisher, L.W., Mintz, K.P., et al.** Osteogenesis imperfecta: changes in noncollagenous proteins in bone. *J.Bone Miner.Res.* 6:501-505, 1991.
- Vetter, U., Brenner, R., Teller, W.M. and Wörsdorfer, O.** [Osteogenesis imperfecta. New viewpoints on principles, clinical aspects and therapy]. *Klin.Padiatr.* 201:359-368, 1989.
- Vieira, N.E., Goans, R.E., Weiss, G.H., Hopkins, E., Marini, J.C., Yergey, A.L.** Calcium kinetics in children with osteogenesis imperfecta type III and IV: pre- and post-growth hormone therapy. *Calcif.Tissue Int.* 67(2):97-100, 2000.
- Viljoen, D., Versfeld, G., Beighton, P.** Osteogenesis imperfecta with congenital joint contractures (Bruck syndrome). *Clin.Genet.* 36:122-126, 1989.
- Vogel, K.G., Paulsson, M., Heinegard, D.** Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem.J.* 223(3):587-97, 1984.
- Vrolik, W.** Tabulae ad illustrandum embryogenesis nominis et mammalium tam naturalem quam adnormen. GMP Londenck, Amsterdam, 1849.
- Vuorio, E., de Crombrughe, B.** The family of collagen genes. *Annu.Rev.Biochem.* 59:837-872, 1990.
- Vuust, J., Sobel, M.E., Martin, G.R.** Regulation of type I collagen synthesis. Total pro alpha 1(I) and pro alpha 2(I) mRNAs are maintained in a 2:1 ratio under varying rates of collagen synthesis. *Eur.J.Biochem.* 151(3):449-453, 1985.
- Wallis, G.A., Sykes, B., Byers, P.H., Mathew, C.G., Viljoen, D. Beighton, P.** Osteogenesis imperfecta type III: mutations in the type I collagen structural genes, COL1A1 and COL1A2, are not necessarily responsible. *J.Med.Genet.* 30(6):492-6, 1993.
- Wallis, G.A., Kadler, K.E., Starman, B.J., Byers, P.H.** A tripeptide deletion in the triple-helical domain of the pro alpha 1(I) chain of type I procollagen in a patient with lethal osteogenesis imperfecta does not alter cleavage of the molecule by N-proteinase. *J.Biol.Chem.* 267(35):25529-25534, 1992.
- Wallis, G.A., Starman, B.J., Zinn, A.B. and Byers, P.H.** Variable expression of osteogenesis imperfecta in a nuclear family is explained by somatic mosaicism for a lethal point mutation in the alpha 1(I) gene (COL1A1) of type I collagen in a parent. *Am.J.Hum.Genet.* 46:1034-1040, 1990.
- Wang, Q., Forlino, A., Marini, J.C.** Alternative splicing in COL1A1 mRNA leads to a partial null allele and two In-frame forms with structural defects in non-lethal osteogenesis imperfecta. *J.Biol.Chem.* 271(45):28617-28623, 1996.
- Wang, Q., Marini, J.C.** Antisense oligodeoxynucleotides selectively suppress expression of the mutant alpha 2(I) collagen allele in type IV osteogenesis imperfecta fibroblasts. A molecular approach to therapeutics of dominant negative disorders. *J.Clin.Invest.* 97(2):448-454, 1996.
- Wang, Q., Orrison, B.M., Marini, J.C.** Two additional cases of osteogenesis imperfecta with substitutions for glycine in the alpha 2(I) collagen chain. A regional model relating mutation location with phenotype. *J.Biol.Chem.* 268(33):25162-25167, 1993.
- Weber, I.T., Harrison, R.W., Iozzo, R.V.** Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis. *J.Biol.Chem.* 271(50):31767-31770, 1996.
- Weil, D., D' Alessio, M., Ramirez, F., Steinamnn, B., Wirtz, M.K., Glanville, R.W., Hollister, D.W.** Temperature-dependent expression of a collagen splicing defect in the fibroblasts of a patient with Ehlers-Danlos syndrome type VII. *J.Biol.Chem.* 264(28):16804-16809, 1989.

- Werle, E., Schneider, C., Renner, M., Volker, M., Fiehn, W.** Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Res.* 22(20):4354-4355, 1994.
- Westerhausen, A., Constantinou, C.D., Pack, M., et al.** Completion of the last half of the structure of the human gene for the Pro alpha 1 (I) chain of type I procollagen (COL1A1) *Matrix* 11(6):375-379, 1991.
- Westerhausen, A.I., Constantinou, C.D., Prockop, D.J.** A sequence polymorphism in the 3'-nontranslated region of the pro alpha 1 chain of type I procollagen. *Nucleic Acids Res.* 18(16):4968, 1990.
- Wilbur, W.J., Lipman, D.J.** Rapid similarity searches of nucleic acid and protein databases. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 80, 726-730, 1983.
- Williams, C.J., Harrison, D.A., Hopkinson, I., et-al.** Detection of sequence variants in the gene for human type II procollagen (COL2A1) by direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified genomic DNA. *Hum.Mutat.* 1(5):403-416, 1992.
- Willing, M.C., Deschenes, S.P., Slayton, R.L. and Roberts, E.J.** Premature Chain Termination is a Unifying Mechanism for COL1A1 Null Alleles in Osteogenesis Imperfecta Type I Cell Strains. *Am.J.Hum.Genet.* 59:799-809, 1996.
- Willing, M.C., Slayton, R.L., Pitts, S.H., Deschenes, S.P.** Absence of mutations in the promoter of the COL1A1 gene of type I collagen in patients with osteogenesis imperfecta type I. *J.Med.Genet.* 32(9):697-700, 1995.
- Willing, M.C., Deschenes, S.P., Scott, D.A., et al.** Osteogenesis imperfecta type I: molecular heterogeneity for COL1A1 null alleles of type I collagen. *Am.J.Hum.Genet.* 55:638-647, 1994.
- Willing, M.C., Pruchno, C.J. and Byers, P.H.** Molecular heterogeneity in osteogenesis imperfecta type I. *Am.J.Med.Genet.* 45:223-227, 1993.
- Willing, M.C., Pruchno, C.J., Atkinson, M., Byers, P.H.** Osteogenesis imperfecta type I is commonly due to a COL1A1 null allele of type I collagen. *Am.J.Hum.Genet.* 51(3):508-515, 1992.
- Willing, M.C., Cohn, D.H. and Byers, P.H.** Frameshift mutation near the 3' end of the COL1A1 gene of type I collagen predicts an elongated Pro alpha 1(I) chain and results in osteogenesis imperfecta type I [published erratum appears in J.Clin.Invest. 85(4):following 1338, 1990.]. *J.Clin.Invest.* 85:282-290, 1990.
- Wilson, R., Lees, J.F., Bulleid, N.J.** Protein disulfide isomerase acts as a molecular chaperone during the assembly of procollagen. *J.Biol.Chem.* 273(16):9637-9643, 1998.
- Winston, R.M., Handyside, A.H.** New challenges in human in vitro fertilization. *Science.* 260(5110):932-936, 1993.
- Wolf, U.** Identical mutations and phenotypic variation. *Hum Genet.* 100:305-321, 1997.
- Xu, T., Bianco, P., Fisher, L.W., et al.** Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat.Genet.* 20(1):78-82, 1998.
- Zhang, W., Lee, J.C., Kumar, S., Gowen, M.** ERK pathway mediates the activation of Cdk2 in IGF-1-induced proliferation of human osteosarcoma MG-63 cells. *J.Bone.Minor.Res.* 14(4):528-535, 1999.

- Zolezzi, F., Valli, M., Clementi, M., Mammi, I., Cetta, G., Pignatti, P.F., Mottes, M.** Mutation producing alternative splicing of exon 26 in the COL1A2 gene causes type IV osteogenesis imperfecta with intrafamilial clinical variability. *Am.J.Med.Genet.* 71(3):366-370, 1997.

6.1 Elektronisches Datenbankverzeichnis

- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/> (Mc Kusick, V.A. 1994)
- The Genome Database (GDB), URL: <http://www.gdb.org>
- NCBI Entrez Genome Database (National Center for Biotechnology Information)
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Genome>
URL: http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/query_form.html
- The Human Gene Mutation Database. Trends Genet. 13:121-122.
HGMD™ Human Gene Mutation Database Cardiff
URL: <http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html> (Krawczak, M., Cooper, D.N., 1997)
- Nomenklatur für die Beschreibung von Sequenzvariationen
URL: <http://www.dmd.nl/mutnomen.html> (den Dunnen und Antonarakis, 2000)
- Datenbank der humanen Kollagen Typ I und III Mutationen
URL: <http://www.le.ac.uk/genetics/collagen/index.html> (Dalglish, 1997 und 1998)
- Human Genomic Bi-Allelic Sequence Database
Single Nukleotid Polymorphismen (SNP)
URL: <http://hgbase.cgr.ki.se>
- Skeletal Genome Anatomy Project (SGAP) (Ho et al., 2000)
- Skeletal Dysplasia Registry: International Nomenclature of Constitutional Disorders of Bone
Osteochondrodysplasias (Cedars-Sinai Medical Center)
URL: <http://www.csmc.edu/genetics/skeldys/nomenclature.html>

Anhang

LOCUS **AF034478** 268 bp DNA PRI 13-DEC-1997

DEFINITION **Homo sapiens pro-alpha1(I) collagen (COL1A1) gene, partial promoter sequence.**

ACCESSION AF034478

VERSION AF034478.1 GI:2687361

KEYWORDS .

SOURCE human.

 ORGANISM Homo sapiens

 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 268)

 AUTHORS Trummer,T. and Kennerknecht,I.

 TITLE Direct Submission

 JOURNAL Submitted (14-NOV-1997) Department of Medical Genetics, University of Ulm, Parkstr. 11, Ulm D-89073, Germany

FEATURES Location/Qualifiers

 source 1..268

 /organism="Homo sapiens"

 /db_xref="taxon:9606"

 /chromosome="17"

 /map="17q21.3-17q22"

 misc_feature 1..268

 /note="overlaps sequences found in GenBank Accession Numbers J03559 and U06669"

 promoter <1..>268

 /note="pro-alpha1(I) collagen (COL1A1) gene"

BASE COUNT 61 a 92 c 49 g 66 t

ORIGIN

 1 actcttctct aagtcaccaa tgatcacagg cctcccacta aaaatacttc ccaactctgg

 61 ggtggaagag tttgggggat gaatttttag gggattgcaa gcccgaatcc ccacctctgt

 121 gtccctagaa tccccacccc ctaccttggc tgctccatca cccaaccacc aaagctttct

 181 tctgcagagg ccacctagtc atgtttctca ccctgcacct cagcctcccc actccatctc

 241 tcaatcatgc ctagggtttg gaggaagg

LOCUS **AF034477** 553 bp DNA PRI 01-DEC-1997

DEFINITION **Homo sapiens pro-alpha2(I) collagen (COL1A2) gene, intron 26, complete sequence.**

ACCESSION AF034477

VERSION AF034477.1 GI:2654104

KEYWORDS .

SOURCE human.

 ORGANISM Homo sapiens

 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 553)

Anhang

```

AUTHORS   Trummer,T. and Kennerknecht,I.
TITLE     Complete nucleotide sequence of intron 26 of the human
          pro-alpha2(I) collagen gene, COL1A2
JOURNAL   Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 553)
AUTHORS   Trummer,T. and Kennerknecht,I.
TITLE     Direct Submission
JOURNAL   Submitted (12-NOV-1997) Department of Medical Genetics, University
          of Ulm, Parkstrasse 11, Ulm D-89073, Germany
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..553
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /chromosome="7"
                     /map="7q21.3-q22"
     intron           1..553
                     /gene="COL1A2"
                     /number=26
     gene             1..553
                     /gene="COL1A2"
                     /note="pro-alpha2(I) collagen"
BASE COUNT   183 a    101 c    83 g    186 t
ORIGIN
      1 gtaggtgcta acttgtgtac agatctattc acatagcatt catctaagaa ccacactttt
     61 ttttttacac catctgatat ctttttgtca ctttcctttc aagatggcat ccccaggggt
    121 ccttttacta tcataaaatg ccttttttaa aaccaaactt ataaaacagt gagcaaaaaac
    181 aaatcagaat atacattagg tcaaaaatac agaagcactt ggcttttatt ttattcattt
    241 tgtaattaaa agggtagtaa tatgtagtag cattctctgg cctttataaa ttgccttggtg
    301 tcgcatactt cgcttgagtc atatcaaaag ttagtaggca aaccataaaa tatatatacc
    361 tactatgtac ccacacaaat taaaaattta aaaagttagt aggcagtatt tgggctttcg
    421 tgggaacca caatgagttt aattcatgct aaaatgacaa acttgtttta aggaagtaat
    481 acctgaggct ttgagacatc ttaaactacc tggtctgcag ctaaccatca gcctttctgt
    541 taaatatatt tag

```

Tabelle 1: Polymorphismen:

Patient	Gen	DNA-Ebene	Protein-Ebene	Bemerkung [*]
K1	COL1A2	c.808A>G	Val180Ile	kein Eintrag in der Datenbank
K3	COL1A2	c.808A>G	Val180Ile	kein Eintrag in der Datenbank
		c.3066C>A	Phe932Leu	Baldwin 1989
		c.3219G>A	Thr983The	Baldwin 1989
		c.3546C>T	Pro1092Pro	C-Propeptid, kein Eintrag in der Datenbank
		c.3567A>T	Glu1099Asp	C-Propeptid, Marini 1993
		c.3570C>T	Ala1100Ala	C-Propeptid, Marini 1993
		c.3592C>T	Pro1108Ser	C-Propeptid, Makela, 1990
		c.3597C>T	Thr1109Thr	C-Propeptid, kein Eintrag in der Datenbank
		c.3726T>A	Val1152Val	C-Propeptid, Marini 1993

		c.4062T>G	His1804Glu	kein Eintrag in der Datenbank
Patient	Gen	DNA-Ebene	Protein-Ebene	Bemerkung*
K4	COL1A2	c.808A>G	Val180Ile	kein Eintrag in der Datenbank
K5	COL1A2	c.808A>G	Val180Ile	kein Eintrag in der Datenbank
		c.1645G>C	Pro459Ala	Bateman 1992
		c.1448T>C	Ala393Val	kein Eintrag in der Datenbank
		c.1509C>T	Asp413Asp	kein Eintrag in der Datenbank
		c.1319G>C	Arg350Pro	kein Eintrag in der Datenbank
K6	COL1A2	c.808A>G	Val180Ile	kein Eintrag in der Datenbank
		c.1645G>C	Pro459Ala	Bateman 1992
		c.1448T>C	Ala393Val	kein Eintrag in der Datenbank
		c.1509C>T	Asp413Asp	kein Eintrag in der Datenbank
K11	COL1A2	c.808G>A	Val179Ile	kein Eintrag in der Datenbank
		c.1446C>A	Pro392Pro	Constantinou 1990
		c.1448T>C	Ala393Val	kein Eintrag in der Datenbank
		c.1509C>T	Asp413Asp	kein Eintrag in der Datenbank
		c.1645G>C	Pro459Ala	Bateman 1992
K15	COL1A2	c.87C>T	Thr29Thr	N-Propeptid, Zhuang 1996
		c.246C>T	Asp82Asp	N-Telopeptid, Strobel 1992
		c.808G>A	Val179Ile	kein Eintrag in der Datenbank
		c.1878G>T	Val536Val	
		c.2033C>A	Pro588His	kein Eintrag in der Datenbank
		c.808G>A	Val179Ile	kein Eintrag in der Datenbank
		c.981C>T	Arg237Arg	
K21	COL1A2	c.808A>G	Val180Ile	kein Eintrag in der Datenbank
		c.808G>A	Val179Ile	kein Eintrag in der Datenbank
		c.3066C>A	Phe932Leu	Baldwin 1989
		c.3219G>A	Thr983The	Baldwin 1989
		c.3546C>T	Pro1092Pro	C-Propeptid, kein Eintrag in der Datenbank
		c.3567A>T	Glu1099Asp	C-Propeptid, Marini 1993
		c.3570C>T	Ala1100Ala	C-Propeptid, Marini 1993
		c.3592C>T	Pro1108Ser	C-Propeptid, Makela, 1990
		c.3597C>T	Thr1109Thr	C-Propeptid, kein Eintrag in der Datenbank
		c.3726T>A	Val1152Val	C-Propeptid, Marini 1993
		c.4062T>G	His1804Glu	kein Eintrag in der Datenbank
K22	COL1A2	c.808A>G	Val180Ile	kein Eintrag in der Datenbank
		c.3066C>A	Phe932Leu	Baldwin 1989
		c.3219G>A	Thr983The	Baldwin 1989
		c.3546C>T	Pro1092Pro	C-Propeptid, kein Eintrag in der Datenbank
		c.3567A>T	Glu1099Asp	C-Propeptid, Marini 1993
		c.3570C>T	Ala1100Ala	C-Propeptid, Marini 1993
		c.3592C>T	Pro1108Ser	C-Propeptid, Makela, 1990
		c.3597C>T	Thr1109Thr	C-Propeptid, kein Eintrag in der Datenbank

Patient	Gen	c.3726T>A DNA-Ebene	Val1152Val Protein-Ebene	C-Propeptid, Marini 1993 Bemerkung*
		c.4062T>G	His1804Glu	kein Eintrag in der Datenbank
K23	COL1A2	c.808A>G	Val180Ile	kein Eintrag in der Datenbank
		c.246C>T	Asp82Asp	N-Telopeptid, Strobel 1992
		c.808G>A	Val179Ile	kein Eintrag in der Datenbank
		c.1446C>A	Pro392Pro	Constantinou 1990
		c.1448T>C	Ala393Val	kein Eintrag in der Datenbank
		c.1509C>T	Asp413Asp	kein Eintrag in der Datenbank
		c.1645G>C	Pro459Ala	Bateman 1992
		c.3066C>A	Phe932Leu	Baldwin 1989
		c.3219G>A	Thr983The	Baldwin 1989
		c.3546C>T	Pro1092Pro	C-Propeptid, kein Eintrag in der Datenbank
		c.3567A>T	Glu1099Asp	C-Propeptid, Marini 1993
		c.3570C>T	Ala1100Ala	C-Propeptid, Marini 1993
		c.3592C>T	Pro1108Ser	C-Propeptid, Makela, 1990
		c.3597C>T	Thr1109Thr	C-Propeptid, kein Eintrag in der Datenbank
		c.3726T>A	Val1152Val	C-Propeptid, Marini 1993
		c.4062T>G	His1804Glu	kein Eintrag in der Datenbank
K24	COL1A2	c.808A>G	Val180Ile	kein Eintrag in der Datenbank
		c.246C>T	Asp82Asp	N-Telopeptid, Strobel 1992
		c.1446C>A heterozygot?!	Pro392Pro	Constantinou 1990
		c.1448T>C	Ala393Val	kein Eintrag in der Datenbank
		c.3066C>A	Phe932Leu	Baldwin 1989
		c.3219G>A	Thr983The	Baldwin 1989
		c.3546C>T	Pro1092Pro	C-Propeptid, kein Eintrag in der Datenbank
		c.3567A>T	Glu1099Asp	C-Propeptid, Marini 1993
		c.3570C>T	Ala1100Ala	C-Propeptid, Marini 1993
		c.3592C>T	Pro1108Ser	C-Propeptid, Makela, 1990
		c.3597C>T	Thr1109Thr	C-Propeptid, kein Eintrag in der Datenbank
		c.3726T>A	Val1152Val	C-Propeptid, Marini 1993
		c.4062T>G	His1804Glu	kein Eintrag in der Datenbank
K27	COL1A2	c.1446C>A	Pro392Pro	Constantinou 1990
		c.1448T>C	Ala393Val	kein Eintrag in der Datenbank
		c.1509C>T	Asp413Asp	kein Eintrag in der Datenbank
		c.1645G>C	Pro459Ala	Bateman 1992
K29	COL1A2	c.3066C>A	Phe932Leu	Baldwin 1989
		c.3219G>A	Thr983The	Baldwin 1989
		c.3546C>T	Pro1092Pro	C-Propeptid, kein Eintrag in der Datenbank
		c.3567A>T	Glu1099Asp	C-Propeptid, Marini 1993
		c.3570C>T	Ala1100Ala	C-Propeptid, Marini 1993
		c.3592C>T	Pro1108Ser	C-Propeptid, Makela, 1990
		c.3597C>T	Thr1109Thr	C-Propeptid, kein Eintrag in der

				Datenbank
Patient	Gen	DNA-Ebene	Protein-Ebene	Bemerkung*
		c.3726T>A	Val1152Val	C-Propeptid, Marini 1993
		c.4062T>G	His1804Glu	kein Eintrag in der Datenbank
K32	COL1A2	c.808G>A	Val179Ile	kein Eintrag in der Datenbank
		c.1509C>T	Asp413Asp	kein Eintrag in der Datenbank
		c.1645G>C	Pro459Ala	Bateman 1992
		c.2033C>A	Pro588His	kein Eintrag in der Datenbank
		c.2145C>T	Gly625Gly	kein Eintrag in der Datenbank
		c.2169C>T	Asp633Asp	kein Eintrag in der Datenbank
		c.2184G>T	Pro638Pro	kein Eintrag in der Datenbank
		c.2205G>T	Pro645Pro	kein Eintrag in der Datenbank
		c.2228G>C	Ala653Gly	Kuivaniemi 1988
		c.2655T>A	Pro795Pro	Baldwin 1989
		c.3066C>A	Phe932Leu	Baldwin 1989
		c.3219G>A	Thr983The	Baldwin 1989
		c.3546C>T	Pro1092Pro	C-Propeptid, kein Eintrag in der Datenbank
		c.3567A>T	Glu1099Asp	C-Propeptid, Marini 1993
		c.3570C>T	Ala1100Ala	C-Propeptid, Marini 1993
		c.3592C>T	Pro1108Ser	C-Propeptid, Makela, 1990
		c.3597C>T	Thr1109Thr	C-Propeptid, kein Eintrag in der Datenbank
		c.3726T>A	Val1152Val	C-Propeptid, Marini 1993
		c.4062T>G	His1804Glu	kein Eintrag in der Datenbank
K51	COL1A2	c.1645G>C	Pro459Ala	Bateman 1992
		c.1446C>A	Pro392Pro	Constantinou 1990
		c.1448T>C	Ala393Val	kein Eintrag in der Datenbank
		c.1509C>T	Asp413Asp	kein Eintrag in der Datenbank
K54	COL1A2	c.246C>T	Asp82Asp	N-Telopeptid, Strobel 1992
K55	COL1A2	c.1446C>A	Pro392Pro	Constantinou 1990
		c.1448T>C	Ala393Val	kein Eintrag in der Datenbank
		c.1509C>T	Asp413Asp	kein Eintrag in der Datenbank
		c.1645G>C	Pro459Ala	Bateman 1992
K66	COL1A2	c.1446C>A	Pro392Pro	Constantinou 1990
		c.1448T>C	Ala393Val	kein Eintrag in der Datenbank
		c.1509C>T	Asp413Asp	kein Eintrag in der Datenbank
		c.1645G>C	Pro459Ala	Bateman 1992
		c.2033C>A	Pro588His	kein Eintrag in der Datenbank
K94	COL1A2	c.808A>G	Val180Ile	kein Eintrag in der Datenbank
K112	COL1A2	c.1509C>T	Asp413Asp	kein Eintrag in der Datenbank
Kon- trollen* ²				
K30	COL1A2	c.2033A>C	His588Pro	kein Eintrag in der Datenbank
		c.2145C>T	Gly625Gly	kein Eintrag in der Datenbank

		c.2169C>T	Asn633Asn	kein Eintrag in der Datenbank
Patient	Gen	DNA-Ebene	Protein-Ebene	Bemerkung*
		c.2184G>T	Pro638Pro	kein Eintrag in der Datenbank
K38	COL1A2	c.2033A>C	His588Pro	kein Eintrag in der Datenbank

* Die Angaben beziehen sich auf die Kollagen Mutationsdatenbank (Dalglish, 1997,1998). Es sind Polymorphismen aufgeführt, die beim routinemäßigen Sequenzieren der Fragmente detektiert worden sind oder die eine Heteroduplexbildung zeigten und anschließend sequenziert wurden. Die Liste erhebt somit keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

*² Polymorphismen der Kontrollen sind nur aufgeführt, wenn sie nicht schon bei einem Patienten bisher gefunden wurden.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Walther Vogel danke ich zum einen für die Aufnahme in die Abteilung Medizinische Genetik/Humangenetik und zum anderen als Leiter des Projektes „Analyse monogener Defekte bei Kollagenen und Proteoglykanen“ (B 3/1 Osteogenesis imperfecta) im Rahmen des IZKF für die Vergabe dieses Dissertationsthemas und für seine Diskussionsbereitschaft, sowie für die Ermöglichung der Fortbildung auf Tagungen. Weiterhin möchte ich mich auch für die Bereitschaft der Übernahme der Wahlprüferfunktion bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich natürlich auch bei meinem Doktorvater, **Herrn Prof. Dr. Ingo Kennerknecht** nicht nur für seine vielen Anregungen, Tipps und konstruktive Kritik bedanken, sondern auch für seine sehr gute Betreuung der Arbeit trotz der durch die Entfernung auftretenden Schwierigkeiten bis zum Schluß und daß er immer ein „offenes Ohr“ für die Probleme bei der Etablierung des Mutations-screeningsystems gehabt hat. Mit seiner Unterstützung hat er einen wesentlichen Beitrag zu meiner wissenschaftlichen Ausbildung geleistet.

Bei **Herrn PD Dr. Walter Just** möchte ich mich für die nette Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe bedanken und daß er es mir ermöglicht hat, meine Doktorarbeit zu Ende bringen zu können sowie den Freiraum bei der Durchführung der Experimente, den er mir gewährte. Dabei war die Unterstützung ganz vielfältiger Art, von der computertechnischen Unterstützung bis hin zu fachlichen Ratschlägen. Vielen Dank auch für die Bereitschaft der Übernahme der Wahlprüferfunktion.

Herrn Prof. Dr. Rolf Brenner danke ich für die Bereitstellung der Zellbank mit Fibro- und Osteoblastenkulturen von OI Patienten, für die umfassende klinische und biochemische Charakterisierung der Patienten, sowie für die Übernahme des Korreferats.

Ein ganz großer Dank geht an **Alexandra Killian** für ihre Unterstützung und ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit, die mich die längste Zeit während dieser Arbeit im Labor begleitet hat und mich mit ihrer lebenslustigen Art angesteckt hat. Liebe Alexandra, wir waren nicht nur ein gutes Team, die Zusammenarbeit mit Dir hat mir großen Spaß gemacht.

Den Arbeitsgruppen am Oberen Eselsberg und in der Parkstraße möchte ich für die anregende Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima danken. Für ihre Hilfsbereitschaft und ihre guten Ratschläge, sowie die nette Zusammenarbeit bei der experimentellen Arbeit möchte ich mich besonders bei **Frau Theresia Trautmann** und **Angela Schulze**, die mir besonders in der Schlußphase der Arbeit geholfen hat, bedanken.

Bei **Dr. Frank Radecke** und **Sarah Simic** möchte ich mich für die vielen Ratschläge für die Durchführung von Transfektionsversuchen bedanken und die Unterstützung bei der Realisierung am FACS-Gerät und Dokumentation am Mikroskop, sowie für die Überlassung von Zellen der 293 Zelllinie. **Ulrike Schlenker** danke ich für die genomische Sequenzierung der Exons 6-25 der Patienten-DNA K29 und K31. Bei **Sven Walter** möchte ich für die Sequenzierung des Dekorin Gens bei den Patienten K23 und K24 bedanken. **Dr. Walter Seidl** danke ich für die Überlassung der Osteosarkomzelllinien.

Mein besonderer Dank gilt nicht zuletzt **meinen Eltern**, die mir diese Arbeit ermöglicht haben, mir jede Unterstützung gaben und immer gesagt haben: „Du schaffst es!“. Meinem Freund **Richard** danke ich nicht nur für sein Verständnis, daß ich wenig Zeit für ihn hatte, sondern auch für seine immerwährende Hilfsbereitschaft und daß er mir bei allen Rückschlägen geholfen hat, nicht den Mut zu verlieren.

Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) sowie von der Thyssen-Stiftung gefördert.