

# **Masterarbeit**

## **Untersuchung der intra-und interfamiliären klinischen Variabilität der Osteogenesis Imperfecta**

### **verursacht durch heterozygote pathogene Varianten in den Genen *COL1A1* und *COL1A2***

eingereicht von

**Dr.med.univ. Kathrin Zotter**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Master of Science**

**(Msc)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Diagnostik & Forschungsinstitut für Humangenetik**

unter der Anleitung von

Prof. Dr. med. et phil.nat. Marianne Rohrbach,

Dr.sc.nat. Cecilia Giunta

und

Ao.Univ.-Prof.Mag.Dr.Dr. Erwin Petek

Zürich, 02.01.2023

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Zürich, am 02.01.2023

Kathrin Zotter eh

# Danksagung

Zu Beginn möchte ich besonderen Dank an jene aussprechen, die mir diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben: Meinen zwei Hauptbetreuerinnen Prof. Dr. med. et phil.nat. Marianne Rohrbach und Dr.sc.nat. Cecilia Giunta. Sie haben mich in die Welt des Stoffwechsels eingeführt und mich in ihre Forschungsgruppe aufgenommen. Sie haben mich mit ihrer Begeisterung für ihr Fach angesteckt, haben mich stets mit zahlreicher Fachliteratur versorgt und hilfreiche Inputs gegeben. Ich möchte mich bei ihnen für die geduldige Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Ebenso geht mein Dank an das Team des Universitätslehrgangs „Medizinische Genetik“. Ihr habt mich bereits während meines Humanmedizinstudiums für euer Fach begeistern können und dies auch während des Masters für Medizinische Genetik weiter geschafft. Ich danke euch für diese zwei lehrreichen Jahre und all die neuen Inhalte, die ihr mir mit auf den Weg geben konntet.

Zu guter Letzt geht mein Dank an meine Familie und Freunde, die mich auch bei diesem Meilenstein in meinem Leben so tatkräftig unterstützt haben. Ein besonderer Dank geht an Max-Joseph, der stets hinter mir steht und an mich glaubt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
-----------------------------------	----------

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>II</b>
------------------------------	-----------

<b>ABSTRACT.....</b>	<b>IV</b>
----------------------	-----------

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
----------------------------	----------

<b>1.1. Osteogenesis Imperfecta.....</b>	<b>1</b>
--	----------

1.1.1. Klinik und Epidemiologie .....	1
---------------------------------------	---

1.1.2. Klassifikation nach Sillence .....	3
---	---

1.1.3. Mechanismus und Pathophysiologie .....	4
---	---

1.1.3.1. Biosynthese Kollagen.....	4
------------------------------------	---

1.1.3.2. Strukturelle und quantitative Kollagen Defekte.....	5
--	---

1.1.3.3. Defekte der Kollagen Synthese, Prozessierung und Reifung.....	6
--	---

1.1.3.4. Defekte in Osteoblastendifferenzierung und -funktion.....	11
--	----

1.1.3.5. Weitere Gene mit Beeinflussung der Knochenstabilität.....	13
--	----

1.1.4. Therapien der Osteogenesis Imperfecta .....	15
--	----

1.1.4.1. Medikamentöse Therapien.....	15
---------------------------------------	----

1.1.4.2. Orthopädisches Management .....	17
--	----

1.1.4.3. Physiotherapien.....	17
-------------------------------	----

<b>2. METHODIK.....</b>	<b>18</b>
-------------------------	-----------

<b>2.1 Datensatz .....</b>	<b>18</b>
----------------------------	-----------

2.1.1. Genehmigung durch SWISSETHIK .....	18
---	----

2.1.2. Beteiligte Zentren.....	18
--------------------------------	----

2.1.3. Datensammlung.....	18
---------------------------	----

2.1.4. Statistische Analyse und Literaturrecherche .....	21
--	----

<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>22</b>
---------------------------	-----------

<b>3.1. Demographische Daten .....</b>	<b>22</b>
3.1.1. Klinischer Phänotyp intrafamiliär in <i>COL1A1</i> und <i>COL1A2</i> .....	22
3.1.1.1. Kohorte 1 ( <i>COL1A1</i> ).....	23
3.1.1.2. Kohorte 2 ( <i>COL1A2</i> ).....	27
3.1.2. Klinischer Phänotyp interfamiliär .....	30
3.1.2.1. Familie 1.....	30
3.1.2.2. Familie 2.....	31
3.1.2.3. Familie 3.....	33
3.1.2.4. Familie 4.....	34
3.1.3. Symptomvergleich <i>COL1A1</i> und <i>COL1A2</i> .....	34
3.1.4. OI/EDS-Overlap-Syndrom .....	35
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1. Interpretation der Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
4.1.1. Intrafamiliärer Vergleich in <i>COL1A1</i> und <i>COL1A2</i> <sup>^</sup> .....	39
4.1.1.1. Glycin Substitutionen <i>COL1A1</i> .....	40
4.1.1.2. Glycin Substitutionen <i>COL1A2</i> .....	42
4.1.2. Interfamiliärer Vergleich in <i>COL1A1</i> und <i>COL1A2</i> .....	43
4.1.2.1. Familie 1.....	43
4.1.2.2. Familie 2.....	44
4.1.2.3. Familie 3.....	45
4.1.2.4. Familie 4.....	45
4.1.3. OI/EDS-Overlap-Syndrom .....	46
4.1.3.1. Fallbeispiel 7 .....	46
4.1.3.2. Familie 5.....	46
<b>4.2. Fazit.....</b>	<b>48</b>
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>50</b>
<b>6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>57</b>

# Abkürzungsverzeichnis

BMPs	„Bone morphogenetic protein“ =Knochenmorphogenetische Proteine
COMP	„Cartilage oligomeric matrix protein“ =Oligomeres Matrixprotein des Knorpels
COPII	„Coat protein complex II“= Mantelproteinkomplex II
CRTAP	„Cartilage associated protein“ =Knorpel-assoziiertes-Protein
ECM	Extrazellulärmatrix
EDS	Ehlers Danlos Syndrom
ER	Endoplasmatisches Retikulum
HSP47	Heat Shock Protein 47
LH1	Lysylhydroxylase 1
LH2	Lysylhydroxylase 2
MLBR	Major Ligand Binding Regions
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
mTLD	Mammalian Tolloid Protein
OI	Osteogenesis Imperfecta
OPG	Osteoprotegerin
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PEDF	Pigment Epithelium-derived Faktor
PPiB	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase B
P3H1	Prolyl-3-Hydroxylase-1
RANKL	Receptor Activator of NF-KB-Ligand
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
SPARC	“Secreted Protein, Acidic, Cysteine-rich” =Osteonectin
S1P	Sphingosine-1-Phosphat
S2P	Membrangebundene Transkriptionsfaktor-Site-2-Protease
TRIC-B	“Trimeric intracellular cation-selective channel B” =Ubiquitär exprimierter monovalenter Kationenkanal
UPR	Unfolded Protein Response

# Zusammenfassung

**Einführung:** Osteogenesis Imperfecta ist eine heterogene Gruppe hereditärer Bindegewebserkrankungen und präsentiert sich mit großer klinischer und genetischer Variabilität. Hauptmerkmal der Erkrankung sind eine erniedrigte Knochendichte- und fragilität, einhergehend mit erhöhter Frakturneigung. Die klinische Ausprägung reicht von mild betroffenen Individuen bis hin zu perinatal letalem Krankheitsbild. Ein Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankung und Genotyp-Phänotyp-Korrelation zeigt sich essenziell für die Prognose sowie Therapiemöglichkeiten. Korrelationsanalysen sind gegenwärtig Inhalt der Forschung und zeigen verschiedene Hypothesen.

**Methode:** Zur Eruiierung dieser Thematik wurde eine retrospektive Datenanalyse aus einem Register mit 31 PatientInnen mit heterozygoten, pathogenen Varianten in den Genen *COL1A1* und *COL1A2* mit der klinischen Diagnose einer Osteogenesis Imperfecta bzw. eines Osteogenesis Imperfecta/Ehlers-Danlos-Overlap-Syndrom durchgeführt sowie eine umfassende Literaturrecherche mit Gegenüberstellung von bereits publizierten Fällen identer oder ähnlicher pathogener Varianten betrieben.

**Ergebnis:** Glycin-Substitutionen in der  $\alpha 1(I)$ -Kette der Triple Helix-Domäne führen eher zu einem letalen OI-Typ-II als jene in der  $\alpha 2(I)$ -Kette. PatientInnen mit Glycin-Substitutionen in *COL1A1* im Bereich des N-Terminalen Ende der Triple-Helix sind mit einem milden OI-Typ-I assoziiert, während Glycin-Substitutionen im Bereich des C-Terminalen-Ende der Triple-Helix-Kette mit einem schweren-letalen OI-Typ-II oder -IV assoziiert sind. Im Gegensatz hierzu zeigt sich, dass der klinische Schweregrad der Glycin-Substitutionen in der  $\alpha 2(I)$ -Kette nicht mit einem gehäuften Auftreten im Bereich des N-oder C-Terminalen-Ende der Triple-Helix assoziiert ist, sondern zufällig im gesamten Bereich der Triple-Helix auftritt. Bezüglich der OI/EDS-Overlap-Syndrom PatientInnen zeigt sich, dass die Hälfte aller Mutationen im Bereich des N-Terminalen-Ende der Triple-Helix auftritt. Die klinische Symptomatik zeigt sich in beiden Genen ähnlich, mit häufigem Auftreten von Frakturen, Orthopädischen Merkmalen und Blauen Skleren. Interfamiliär kann, bei unterschiedlicher

klinischer Ausprägung bei identer Mutation, kein direkter Rückschluss von Genotyp auf Phänotyp gezogen werden.

**Schlussfolgerung:** Weiterhin ist eine genaue Phänotyp-Genotyp-Korrelation unklar, dank intensiver Forschung zeigen sich jedoch zahlreiche vielversprechende Hypothesen.

# Abstract

**Introduction:** Osteogenesis Imperfecta is defined as a heterogeneous group of hereditary connective tissue disorders characterized by an increased clinical and genetic variability. Characteristic features of the disease are a reduced bone mass and fragility, followed by a higher incidence of bone fractures. The clinical manifestation ranges from mildly affected individuals to a perinatal lethal form. An understanding of the underlying pathophysiology of the disease as well as of the genotype-phenotype-correlation is essential for the prognosis and therapy. Correlation analysis are currently the subject of research and show different hypothesis.

**Methods:** To investigate this topic a retrospective data analysis from a register of 31 patients with heterozygous, pathogenic variants in the genes *COL1A1* and *COL1A2* with the clinical diagnosis of Osteogenesis Imperfecta respectively Osteogenesis Imperfecta/Ehlers-Danlos-Overlap-Syndrom was performed. Furthermore, a comprehensive literature research was conducted with comparison of already published cases with the same or similar pathogenic variants.

**Results:** Glycine substitutions in the  $\alpha 1(I)$ -chain of the triple helix domain rather lead to a lethal OI-type-I than those in the  $\alpha 2(I)$ -chain. Patients with glycine substitutions in *COL1A1* near the N-terminal end of the triple helix are associated with a mild OI type-I, whereas glycine substitutions near the C-terminal end of the triple helix are associated with a severe-lethal OI type-II or -IV. In contrast it turns out that the severity of glycine substitutions in the  $\alpha 2(I)$ -chain is not associated with a frequent occurrence near the N-or C-terminal end of the triple helix, but occurs rather randomly along the triple helical domain. Regarding the OI/EDS-Overlap-syndrom patients it is shown that half of the mutations occur in the area near the N-terminal end of the triple helix. The clinical symptoms are similar in both genes, with frequent occurrence of fractures, orthopedic features and blue sclera. In the families with the same variant no direct conclusion can be drawn from genotype to phenotype.

**Conclusion:** Still an exact phenotype-genotype correlation is unclear, but thanks to intensive research numerous promising hypotheses have emerged.

# 1. Einleitung

## 1.1. Osteogenesis Imperfecta

### 1.1.1. Klinik und Epidemiologie

Osteogenesis Imperfecta (OI) ist eine Bindegewebserkrankung der Knochenmatrixformation und des Remodeling, welche sich mit großer phäno- sowie genotypischer Variabilität präsentiert. Verursacht wird die Erkrankung durch Mutationen in jenen Genen (*COL1A1*, *COL1A2*), welche für Typ-I-Kollagen codieren. Typ-I-Kollagen macht den Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix von Knochen und Haut aus. Heutzutage weiß man, dass auch zahlreiche Mutationen in Kollagenzugehörigen Genen OI verursachen können.

Charakteristika der OI sind eine niedrige Knochendichte sowie Knochenfragilität, welche eine Prädisposition für Frakturen der langen Knochen, Wirbelkörperkompressionen, Deformitäten der langen Knochen, Rippen und Wirbelsäule sowie Wachstumsretardierung darstellen. Weiters können assoziierte sekundäre Merkmale, wie beispielsweise blaue Skleren, Schallleitungs-/empfindungsschwerhörigkeit, Zahnanomalien (Dentinogenesis Imperfecta), Skoliose, Herzklappenerkrankungen, Muskelschwäche und erhöhte Bandbeweglichkeit auftreten.

Die intellektuellen Fähigkeiten sind in der Regel nicht beeinträchtigt. Die Manifestationsformen reichen vom bereits intrauterinen Fruchttod bis hin zu sehr milden OI-Symptomen im höheren Lebensalter. Die unterschiedlichen Schweregrade der OI können nur teilweise durch das ursächliche Gen bzw. den Typ von Mutation erklärt werden. Ein Verständnis der unterschiedlichen pathophysiologischen Pathways ist Voraussetzung zur Entwicklung neuer therapeutischer Optionen sowie Verbesserung der Lebensqualität dieser Patienten <sup>1,2</sup>.

Die genaue Inzidenz der OI ist unklar, liegt zwischen 1:15.000-1:20.000, und wird zu den sogenannten "Orphan diseases" gezählt, also seltenen Erkrankungen, die laut Definition der Europäischen Union weniger als 1:2000 Einwohner betreffen <sup>3-6</sup>. Das Gebiet der OI-Forschung hat von den neuesten Fortschritten der klinischen und molekularen Charakterisierung profitiert. Hierdurch zeigt sich ebenso eine Verbesserung der klinischen Diagnose und des Managements.

In der Vergangenheit war OI als autosomal-dominante Erkrankung bekannt, welche durch einen Typ-I Kollagen Defekt entsteht. Zwischen 85-90% aller OI-Erkrankungen werden durch strukturelle oder quantitative Mutationen in den Typ-I-Kollagen-Genen verursacht <sup>7</sup>.

Der heutige Stand der Forschung zeigt die Entdeckung zahlreicher autosomal-rezessiver genetischer Formen der Erkrankung. Im Jahr 2006 wurde das erste nicht-Kollagen-Gen für eine rezessive Form der OI identifiziert und zeigte somit neue Pathomechanismen der OI auf <sup>8,9</sup>. Seither sind ungefähr 18 weitere Gene, welche eine OI verursachen können, bekannt und die Erkrankung hat sich hin von einem klar definierten klinischen Erscheinungsbild zu einer Gruppe heterogener genetischer Erkrankungen gewandelt. Die meisten dieser Gene kodieren für Proteine, welche in der Kollagensynthese und posttranslationalen Modifikation involviert sind, jedoch auch für jene, welche an der allgemeinen Knochenmineralisierung und Osteoblasten-Entwicklung beteiligt sind. Durch Mutationen in jenen Genen kommt es zu quantitativen sowie qualitativen Beeinträchtigung des Skelettsystems <sup>1,10</sup>.

Es existieren zahlreiche Modellansätze zu einer Erklärung einer möglichen Genotyp-Phänotyp-Korrelation. Die ersten Modelle fokussierten sich auf die Kollagen-Kette, in welcher die Mutation auftritt. Man ging davon aus, dass Mutationen in dem Gen *COL1A1* schwerwiegender als jene in dem Gen *COL1A2* sind. Erklärt wurde dies dadurch, dass Typ-I-Kollagen-Heterotrimere zwei Kopien der  $\alpha 1(I)$ -Kette enthalten, sodass eine zufällige Anordnung der mutierten Ketten dazu führt, dass bis zu 75% der Heterotrimere eine oder mehrere abnormale  $\alpha 1(I)$ -Ketten enthalten. Im Gegensatz hierzu würden nur bis zu 50% der Heterotrimere abnormale  $\alpha 2(I)$ -Ketten enthalten <sup>11-13</sup>.

Eine später etablierte Theorie fokussierte sich auf eine verzögerte Faltung der Helix aufgrund von Glycin Substitutionen. Es wurde erkannt, dass Mutationen in der Triple-Helix-Domäne zu zusätzlicher Hydroxylierung und Glykosylierung an N-Terminalen Enden an der Stelle der veränderten Sequenz mit Folge einer verzögerten Helixfaltung führen. Man schloss daraus, dass der klinische Schweregrad der Erkrankung mit der Position der Mutation korreliert. Jene Mutationen, welche sich nahe am C-Terminalen-Ende der  $\alpha 1(I)$ -Ketten befinden, waren mit einem letalen Krankheitsbild assoziiert, während jene, welche sich am N-Terminalen-Ende lokalisiert zeigen, mit einem moderaten bis milden Krankheitsbild assoziiert waren. Jene

Mutationen, welche mittig lokalisiert waren, wurden mit einem schweren, nicht-letalen Krankheitsbild assoziiert <sup>11,14</sup>.

Ein weiteres Modell beschäftigte sich mit der Stabilität der Kollagen-Typ-I Helix. Man ging davon aus, dass Mutationen, welche hoch-stabilisierende Regionen der Helix unterbrechen mit einem klinisch schwerwiegenderen Phänotyp einhergehen als Mutationen in niedrig-stabilisierenden Regionen <sup>11,15,16</sup>.

Weitere Theorien zeigten, dass letale Mutationen in  $\alpha 2(I)$ -Ketten seltener auftreten als in  $\alpha 1(I)$ -Ketten und in Clustern oder regelmäßigem Abstand anzutreffen sind <sup>11,17,18</sup>.

### **1.1.2. Klassifikation nach Sillence**

Seit 1979 erfolgt die klassische Einteilung der OI nach Sillence in vier Typen. Diese werden durch dominant vererbte Mutationen in *COL1A1* sowie *COL1A2* verursacht und die Klassifikation erfolgt anhand der klinischen Präsentation, der radiologischen Merkmalen sowie des Vererbungsmuster. Der Typ-I ist charakterisiert durch blaue Skleren, nahezu unauffälliges Körperwachstum und late-onset Hörverlust. Eine Dentinogenesis Imperfecta fehlt hier normalerweise. Die letale Form der OI, meist bereits intrauterin auftretend, wird als Typ-II bezeichnet. Der Typ-III ist eine schwere Form der OI, gekennzeichnet durch progressiv fortschreitende Deformitäten und extremen Kleinwuchs. Typ-V zeigt sich in der Regel schwerwiegender als Typ-I, allerdings milder als Typ-II und -III, mit weißen Skleren, Kleinwuchs, Knochendeformität und Dentinogenesis Imperfecta. Die Einteilung der Nomenklatur erfolgte bereits vier Jahre vor der Entdeckung des genetischen Ursprungs der Erkrankung, denn erst 1984 wurde festgestellt, dass ein Kollagendefekt zur OI führen kann <sup>2,10,19</sup>. Heutzutage gibt es neue Ansätze der Typeneinteilung der OI anhand von weiteren Symptomen, histologischen sowie molekulargenetischen Befunden. Einerseits basierend auf den klinischen Erscheinungsbildern der rezessiven OI, andererseits ein genetisch funktioneller Ansatz, wobei die Sillence Typen I-IV für Mutationen in *COL1A1* und *COL1A2* verwendet werden und neue Gene zusätzliche Typennummern, basierend auf der genetischen Mutation ohne klinische Korrelation, erhalten <sup>2,10</sup>.

### 1.1.3. Mechanismus und Pathophysiologie

#### 1.1.3.1. Biosynthese Kollagen

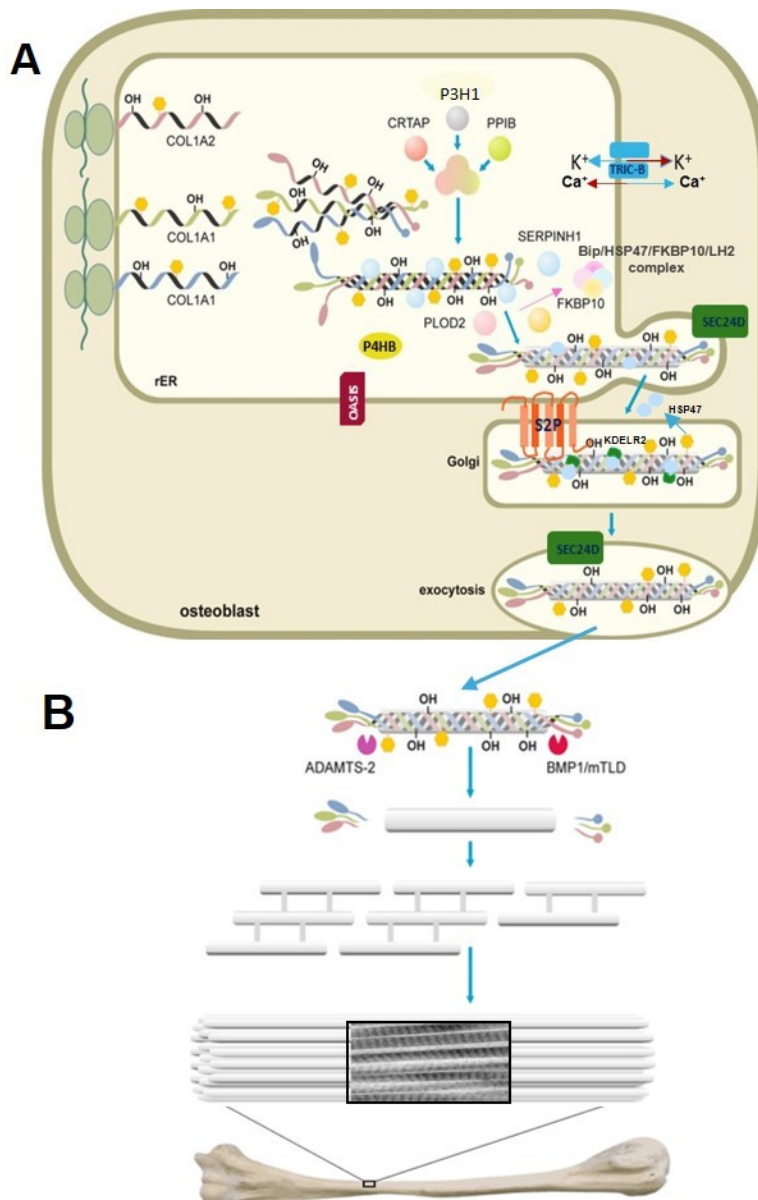


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kollagen Biosynthese. A) Intrazellulärer Weg B) Extrazellulärer Weg.

Die Kollagensynthese kann in einen intrazellulären und einen extrazellulären Weg unterteilt werden. Beim intrazellulären Weg lagert sich die mRNA nach abgeschlossener Transkription an die freien Ribosomen und beginnt mit der Translation des Präprokollagen. Zusammen mit dem Signalpeptid verbindet sich das Ribosom mit dem rER und führt die weitere Biosynthese in das Lumen des ER fort. Im weiteren Schritt kommt es durch die Hydroxylase und weitere Cofaktoren zur Hydroxylierung von Prolin zu Hydroxyprolin und Lysin zu Hydroxylysin. Dies ist besonders

für die Stabilität des Kollagenmoleküls wichtig, da es hierdurch zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen kommt, welche die drei Einzelhelices in ihrer Verdrehung unterstützen. Im weiteren Verlauf kommt es zur Glykolisierung des Prokollagen und an den Enden der Peptidkette werden Registerpeptide befestigt, über die jeweils drei Prokollagenmoleküle zu einer Triplehelix via Disulfidbrücken verbunden werden. Im extrazellulären Weg kommt es zu einer Abspaltung der überschüssigen Registerpeptide durch eine Peptidase und die Prokollagenmoleküle lagern sich zusammen. Mithilfe von Lysoxyl-Oxidasen können kovalente feste Verknüpfungen ausgebildet werden, welche wichtig für die Zugfestigkeit des Kollagens sind. Durch Quervernetzungen zwischen den Kollagenmolekülen entstehen die Tropokollagenmoleküle, die zu Protofilamenten aneinandergereiht werden und sich zu Kollagenfibrillen verbinden. Diese werden im nächsten Schritt zu Faserbündeln, den Kollagenfasern, zusammengefügt <sup>20</sup>.

Im Weiteren wird detaillierter auf die einzelnen Schritte der Biosynthese eingegangen.

### **1.1.3.2. Strukturelle und quantitative Kollagen Defekte**

Die zwei Hauptgene der OI, *COL1A1* und *COL1A2*, zählen zu den häufigsten Auslösern der Erkrankung. Aufgrund der Größe der beiden Gene sind zahlreiche Mutationen bekannt, welche zu sehr unterschiedlichen Krankheitsbildern führen können. *COL1A1* ist lokalisiert am Chromosom 17 und besteht aus 51 Exons, während *COL1A2* am Chromosom 7 lokalisiert ist und aus 52 Exons besteht. Eine zuverlässige Genotyp-Phänotyp Korrelation konnte bisher nicht identifiziert werden. Grundsätzlich können zwei Pathophysiologien unterschieden werden: Einerseits die „Loss-of-function“ Mutationen, welche zu einer Haploinsuffizienz führen. Hier kommt es zu einer Verminderung der Genexpression und daraus resultierend zu einer verminderten Menge von normalem Typ-I Kollagen, jedoch ohne Beeinträchtigung der Qualität. Diese Mutationen sind meist mit einer milden Form der OI (Typ-I) assoziiert. Im Gegensatz dazu können strukturelle Defekte (häufig Glycin Substitutionen) in veränderter Struktur der Kollagenmoleküle resultieren und können sowohl zu milden bis hin zu letalen OI Formen führen <sup>1,10</sup>.

Durch diese Veränderungen wird ebenso die Knochenresorption stimuliert, da versucht wird, qualitativ geminderten Knochen abzubauen. Osteoblasten produzieren aufgrund des vermehrten Abbaus und der verminderten Knochenstabilität reichlich

Osteoid von geringer Qualität. Hierdurch entwickelt sich eine sogenannte „high turnover Osteoporose“<sup>21</sup>.

### **1.1.3.3. Defekte der Kollagen Synthese, Prozessierung und Reifung**

Die Kollagen Typ-I Biosynthese setzt sich aus diversen Schritten zusammen und benötigt zahlreiche Proteine für die post-translationale Modifikation, Faltung, Transport und Qualitätskontrolle. Mutationen in ebendiesen Genen können ebenso zum klinischen Bild einer OI führen wie Mutationen in den Kollagen-Genen (*COL1A1*, *COL1A2*)<sup>1</sup>.

Typ-I Kollagen ist ein Triple-Helix-Molekül bestehend aus zwei pro- $\alpha$ 1(I) Ketten sowie einer pro- $\alpha$ 2(I) Kette, welche durch *COL1A1* und *COL1A2* kodiert werden. Es ist die Hauptkomponente der Extrazellulärmatrix von Knochen, Haut und Sehnen. Die Kollagen-Triplehelix besteht aus einer einfachen Struktur, allerdings zeigt sich die Biosynthese von Prokollagen Typ-I äußerst komplex<sup>10</sup>.

Kollagen wird als Prokollagenmolekül synthetisiert und besteht aus einem N-terminalen sowie C-terminalen globulären Pro-Peptid, welches die helikale Domäne flankiert. Die helikalen Domänen bestehen aus ununterbrochenen Wiederholungen von Gly-Xaa-Yaa Triplets, in welchen die Aminosäure Glycin systematisch an jedem dritten helikalen Rest auftritt, während die Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin häufig an den X-bzw. Y-Positionen vorkommen. Mehr als 1600 verschiedene krankheitsverursachende Varianten wurden innerhalb des Kollagen Typ-I beschrieben. Die Mehrheit tritt in dem für die Triplehelix codierenden Teil der Gene auf<sup>11</sup>.

Die entfalteten Ketten werden zahlreichen posttranslationalen Modifikationen unterzogen. Im rauen Endoplasmatischen Retikulum beginnt die Faltung der drei pro- $\alpha$ -Ketten an ihrem C-terminalen Ende zu einer Triplehelix und setzt sich reißverschlussartig zu dem N-Propeptid fort<sup>22</sup>.

Dieser Prozess findet nach Abschluss der Synthese der pro- $\alpha$ -Ketten und während ihrer posttranslationalen Modifikation statt und wird höchstwahrscheinlich durch die cis-trans Isomerisierung der Prolin-Peptidbindung geschwindigkeitslimitiert<sup>23</sup>.

#### **1.1.3.3.1. P4HB**

Die Kollagen Triple-Helix-Domänen der pro- $\alpha$ -Ketten sind weitestgehend hydroxyliert und glykolisiert. Die Hydroxylierung mehrerer Prolinreste durch den Prolyl-4-

Hydroxylase Komplex verleiht der Triplehelix thermische Stabilität. Eine Untereinheit dieses Komplexes ist das Protein PDI (Protein Disulfid Isomerase), welches durch das *P4HB* Gen kodiert wird. Mutationen in diesem Gen führen zu Typ I Cole-Carpenter-Syndrom und sind klinisch ebenso im Zusammenhang mit moderater bis schwerer OI beschrieben. Der genaue Pathomechanismus hierbei ist unklar <sup>1,24</sup>.

#### **1.1.3.3.2. *PLOD2***

Durch die Hydroxylierung einiger Lysinreste durch die Lysylhydroxylase 1 und 2 (LH1, LH2) kommt es zu Vernetzungen innerhalb der Moleküle sowie zu zusätzlicher Stabilität. Weiters entstehen Bindungsstellen für Kohlenhydrateinheiten, entweder Galactose oder Glucosyl-Galactose, welche unverzichtbar für die Kollagenstabilität sind. LH2 wird durch *PLOD2* codiert und Mutationen in diesem Gen können zum Bruck-Syndrom-Typ 2 sowie OI Typ-XI führen. Klinisch präsentieren sich die Patienten mit moderaten bis schweren Skelettveränderungen und progressiven Gelenkskontrakturen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von LH2 durch die Chaperone HSP47 (codiert durch *SERPINH1*) sowie FKBP65 (codiert durch *FKBP10*) im Endoplasmatischen Retikulum (ER) reguliert wird <sup>1,24</sup>.

#### **1.1.3.3.3. *P3H1, CRTAP und PPIB***

Im Gegensatz dazu erfolgt die Hydroxylierung von spezifischen Prolin-Resten im Kollagenmolekül an Position Pro986 der  $\alpha 1(I)$  Ketten und Position Pro707 der  $\alpha 2(I)$  Ketten vollständig oder teilweise durch den Prolyl-3-Hydroxylierungs-Komplex, welcher aus Prolyl-3-Hydroxylase-1 (*P3H1*), Knorpel-assoziiertem-Protein (*CRTAP*) und Cyclophilin B (*PPIB*) besteht <sup>7,25</sup>.

Diese Proteine sind dafür bekannt, als Kollagen-spezifische ER-Chaperone zu fungieren und wurden als Erste für die Ursache der autosomal rezessiven OI beschrieben <sup>8,9,26-33</sup>.

Kommt es zu Mutationen in jenen drei Genen (*P3H1*, *CRTAP* und *PPIB*) führt dies zu OI unterschiedlicher Schweregrade. Pathophysiologisch kommt es durch Mutationen in jenen Genen zu einer Verminderung der Prolin-986 Hydroxylierung, welche eine Verzögerung der Kollagenfaltung zur Folge hat. Eine intrazelluläre Retention sowie Aggregation von übermodifizierten Kollagen  $\alpha$ -Ketten kann einen Zelltod induzieren.

Alle Fälle der *CRTAP*- oder *P3H1*-Defekte teilen sich dieselben biochemischen Eigenschaften und führen zu einer heterogenen klinischen Präsentation ähnlich zur OI, welche durch *COL1A1/COL1A2* Mutationen verursacht wird. Mutationen in diesen Genen führen meist zu schweren OI-Formen, welche häufig bereits intrauterin zu Frakturen führen können. Eine OI, welche durch *PPIB*-Defekte verursacht wird, zeigt sich äußerst selten und biochemisch deutlich unterschiedlich. Cyclophilin B (*PPIB*) stellt die cis-trans Isomerisierung der Kollagen-Prolyl-Peptid Verbindung sicher und zusammen mit FKBP65, ein molekulares Chaperon, verhindert es eine vorzeitige Zusammensetzung der Prokollagenketten in Fibrillen. Weiters kann Cyclophilin B die Lysyl-Hydroxylierung der Kollagenketten sowie intermolekulare Vernetzungen beeinflussen, indem es mit der LH1 interagiert. Die Patienten sind klinisch meist sehr schwer betroffen <sup>1,34</sup>.

#### **1.1.3.3.4. ADAMTS2**

Zusammengefügte Prokollagene werden via Golgi-vesikulärem-Transport in den Extrazellulärraum sezerniert. Ihre N- und C-Propeptide werden anschließend durch spezifische Proteinasen gespalten. Hierdurch bilden sich die reifen Tropokollagen-Moleküle, welche sich zu den charakteristischen Kollagenfibrillen formieren. Diese werden durch kovalente Vernetzungen zwischen Hydroxylysyl- und Lysylresten der N- und C-Telopeptide und den hydroxylierten Seitenketten stabilisiert. Kommt es zu einer fehlerhaften N-Propeptid-Spaltung durch das Enzym ADAMTS2, entsteht das Ehlers-Danlos-Syndrom Typ-VIIC <sup>34</sup>.

#### **1.1.3.3.5. BMP1**

Die Spaltung des C-Propeptids ist komplexer, hier sind vier verschiedene Proteasen sowie Veränderungen durch Enhancer Proteine beteiligt. *BMP1* ist ein Gen, welches für die Protease BMP1 codiert und wichtig für die Spaltung von C-Propeptiden ist. Mammalian Tolloid Protein (mTLD) ist ein alternatives Splice-Produkt von *BMP1*. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Mutationen im wichtigsten C-Protease-Enzym BMP1/mTLD zu schwerer OI führen <sup>35,36</sup>.

Durch ein Fehlen der BMP1/mTLD-Funktion kommt es zu einer Veränderung der C-terminalen Prozessierung beider Prokollagen-I-Ketten gleichzeitig. Dies führt zu sehr niedrigen Levels von vollständig prozessiertem Typ-I-Kollagen: Die Prozessie-

rung von Kollagen Typ-I zeigt sich bei jenen Patienten beeinträchtigt und möglicherweise verzögert. Eine Kollagenübermodifikation wurde jedoch nicht gefunden<sup>36,37</sup>.

#### **1.1.3.3.6. *TMEM38B***

Einige Proteine im ER, welche am Kollagenstoffwechsel und -modifikation beteiligt sind, sind kalziumabhängig. *TMEM38B* codiert für einen ubiquitär exprimierten monovalenten Kationenkanal (TRIC-B), welcher im ER in der Membran integriert ist. Er spielt eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Calciumentleerung und somit der Zelldifferenzierung. Kommt es zu Veränderungen in der Calciumentleerung beeinträchtigt dies die Regulierung der Kollagenmodifikation durch diverse Enzyme im ER. Folgend entsteht ER Stress und es kommt zu einer reduzierten Kollagen Sekretion. Mutationen in diesem Transmembranprotein können zu autosomal rezessiver OI führen und sind mit einem moderaten klinischen Phänotyp assoziiert<sup>1,38-40</sup>.

#### **1.1.3.3.7. *MBTPS2***

S2P, eine membrangebundene Zink-Metalloprotease, (codiert durch *MBTPS2*) wird mit diversen intrazellulären Kaskaden in Verbindung gebracht. Eine Aufgabe ist die intramembrane Proteolyse der Transkriptionsfaktoren CR3L1, ATF6 und SREBP. Vermittelt durch eine Verringerung von LH1 kommt es zu einer verminderten Kollagensekretion sowie einer beeinträchtigten Differenzierung der Osteoblasten. Klinisch führt diese Mutation zu einem moderaten bis schweren Phänotyp, allerdings sind bisher nur wenige Mutationsträger bekannt<sup>1</sup>.

#### **1.1.3.3.8. *SERPINH1***

Um die thermodynamisch ungünstige Faltung von Prokollagenketten in eine Triple-Helix Struktur zu ermöglichen, werden Kollagen-spezifische ER-Chaperons benötigt. Diese binden bevorzugt an die gefaltete Triple-Helix und stabilisieren somit deren Struktur<sup>41</sup>. Das Kollagen spezifische „Heat Shock Protein 47“ (HSP47), welches von *SERPINH1* codiert wird, erkennt nur korrekt gefaltete Kollagen-Triple-Helixe<sup>42,43</sup>.

Mutationen in dem Gen *SERPINH1* führen zu einer Missfaltung und/oder Instabilität von HSP47. Die Folge sind eine verzögerte Kollagensekretion sowie eine Veränderung der Kollagenstruktur oder teilweise eine Retention des Kollagens in der Zelle.

Klinisch führt eine Mutation in diesem Gen zu moderaten bis schweren OI-Formen<sup>1</sup>.

#### **1.1.3.3.9. FKBP10**

Im Gegensatz dazu zählt das Protein FKBP65 (codiert durch *FKBP10*), welches ebenso als Peptidyl-Prolyl-Isomerase funktioniert, als generelles Chaperon. Es konnte in-vitro gezeigt werden, dass FKBP65 in Verbindung mit HSP47 als Chaperon des Kollagen-Heterotrimeren wirkt<sup>44</sup>. Auf diese Weise führt der FKBP65/HSP47 Komplex als Chaperon zur Kollagen Triple-Helix Faltung im ER. Mutationen in diesen zwei Proteinen wurden in rezessiven OI-Fällen identifiziert. Eine Kollagen Übermodifikation konnte nicht nachgewiesen werden<sup>45-47</sup>.

Im Dachshund Modell der rezessiven OI zeigte sich die HSP47-Mutation jedoch charakterisiert durch Übermodifikation und intrazelluläre Retention von Prokollagen-Typ-I<sup>48,49</sup>. Ebenso wurde kürzlich eine HSP47-Arg222Ser Variante in einem schwer betroffenen Patienten entdeckt, welche zu posttranslationaler Übermodifikation von Typ-I Prokollagen mit erhöhter Glykolisierung und/oder Hydroxylierung von Lysin und Prolinresten führt, wie dies bereits im Dachshund Modell demonstriert wurde<sup>50</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass die Übermodifikation auf einen Kompensationsmechanismus zurückzuführen ist, welcher zu einer erhöhten Expression und Bindung von Molekülen anderer Kollagen-Chaperone und modifizierender Enzyme zu Typ-I-Prokollagen führt<sup>51</sup>.

Mutationen in *FKBP10* wurden zusätzlich in Patienten mit klinischem Phänotyp mit Knochenfragilität sowie kongenitalen Kontraktoren beschrieben, passend zu dem Krankheitsbild „Bruck Syndrom“<sup>52</sup>.

#### **1.1.3.3.10. KDELR2**

Weiters wurden kürzlich biallelische Missense- und Nonsense-Varianten in *KDELR2* entdeckt, welche zu schweren OI-Krankheitsbildern führen. *KDELR2* ist am retrograden Transport von Proteinen von cis-Golgi zu ER beteiligt. In Patientenzellen konnte eine verzögerte Sekretion und intrazelluläre Retention von Kollagen-Typ-I innerhalb des ER gezeigt werden. Ebenso zeigte sich eine reduzierte Menge an sezerniertem Kollagen-I als Reaktion auf eine reduzierte Expression von Kollagen in Fibroblasten. Eine wichtige Rolle hierbei spielen die intrazelluläre Reduktion von HSP47 und FKBP65. In betroffenen Individuen kommt es

höchstwahrscheinlich zu dem klinischen Bild einer OI durch das Unvermögen von HSP47 an KDELR2 zu binden. Daraus resultiert, dass HSP47 nicht von Kollagen-Typ-I dissoziieren kann. Stattdessen bleibt HSP47 an die extrazellulären Kollagenmoleküle gebunden und stört die Bildung von Kollagenfibrillen <sup>53</sup>.

#### **1.1.3.3.11. SEC24D**

*SEC24D* codiert für ein Protein des COPII (Mantelproteinkomplex II)-abhängigen ER-zu-Golgi-Transports und Mutationen hier induzieren eine Retention von Prokollagen im ER. Diese Mutationen führen zu einer syndromalen Form der OI, ähnlich dem Cole-Carpenter-Syndrom. Klinisch präsentieren sich Betroffene mit einer gestörten Schädelossifikation sowie erhöhter Frakturrate, teils auch bereits intrauterin auftretend <sup>1,54</sup>.

#### **1.1.3.3.12. SPARC**

SPARC (secreted protein, acidic, cysteine-rich) ist ein Glykoprotein, welches durch *SPARC* codiert wird. Es bindet an Kollagen-Typ-I und wirkt als molekulares Chaperon während der Kollagen Biosynthese. Ebenso bindet es an weitere Proteine der Extrazellulärmatrix (ECM). Mutationen in diesem Gen führen zu einem Austausch von Aminosäuren des Proteins, hierdurch kommt es zu einer Übermodifizierung und verzögerten Sekretion von Kollagen. Bisher wurden zwei Mutationen in *SPARC* entdeckt, welche zu schwerer Knochenfragilität und klinischem Phänotyp einer OI Typ-IV führten <sup>1,55</sup>.

### **1.1.3.4. Defekte in Osteoblastendifferenzierung und -funktion**

Kürzlich wurden einige neue Gene, welche an der Differenzierung von Osteoblasten beteiligt sind, mit dem Phänotyp der OI beschrieben.

#### **1.1.3.4.1. WNT1**

Heterozygote *WNT1*-Mutationen wurden bei Patienten mit früh einsetzender Osteoporose identifiziert. Im Gegensatz dazu führen homozygote *WNT1*-Mutationen zur schwerer OI mit Kleinwuchs, Frakturen sowie vertebrealen Kompressionen. Ebenso präsentierten sich einige Patienten mit Hirnfehlbildungen <sup>56-59</sup>. Die genaue Pathophysiologie der *WNT1*-Mutationen hin zum OI-Phänotyp ist weiterhin nicht ganz verstanden. *WNT1* bindet an den zweifachen Rezeptorkomplex „Frizzled“ und

„LRP5/6“, hierdurch wird das Messenger Protein  $\beta$ -Catenin stabilisiert und zum Nucleolus transportiert. Seine Aufgabe besteht nun in der Expression von Genen, welche die Osteoblastendifferenzierung und-funktion regulieren. Treten Mutationen in *WNT1* auf, führt dies zu veränderter Signaltransduktion und eingeschränkter Expression von Osteoblast-spezifischen Genen. Dies führt zu einer Veränderung der Knochenhomöostase mit einem Ungleichgewicht der Knochenbildung und -resorption. *WNT1* wird ebenso im Gehirn exprimiert und betroffene Patienten weisen daher häufig auch eine Beteiligung des zentralen Nervensystems auf <sup>1,59-61</sup>.

#### **1.1.3.4.2. *MESD***

*MESD* codiert für ein ER-Chaperon für die WNT Signalrezeptoren LRP5 und LRP6. Die bisher identifizierten Mutationen sind Trunkierende- oder Frameshift- Mutationen, welche „downstream“ der Chaperon-Aktivitäts-Domäne, jedoch „upstream“ der ER-Retentions-Domäne auftreten. Klinisch präsentieren sich Betroffene mit Knochenfragilität und Oligodontie. Betroffene von LRP5- oder LRP6-Mangel zeigen sich ebenso mit Knochenfragilität und Oligodontie. Da es bei OI verursachenden Mutationen in *MESD* höchstwahrscheinlich nicht zu einem vollständigen Mangel der Chaperon Funktion für LRP5 oder LRP6 kommt, ist der klinische Phänotyp nicht ident mit jenem Phänotyp mit komplettem LRP5- oder LRP6-Mangel <sup>1,62</sup>.

#### **1.1.3.4.3. *CREB3L1***

Ein weiteres Gen, welches hauptsächlich auf Osteoblastenebene wirkt, ist *CREB3L1*. Es codiert für den Transkriptionsfaktor CR3L1 (früher OASIS), welcher die Typ-I Prokollagenexpression während der murinen Knochenbildung reguliert. Kommt es zu ER Stress wird das N-Terminale Fragment von CR3L1 durch zwei Metalloproteasen (S1P und S2P) freigesetzt. Dieses Fragment enthält einen Transkriptionsfaktor und kann somit die Expression von *UPR*-Genen (=unfolded protein response) induzieren. Durch die Bindung von CR3L1 kommt es zu einer Aktivierung der Osteoblasten-spezifischen *COL1A1* Promoter-Region. Diese existiert nicht in der korrespondierenden Haut-spezifischen *COL1A1* Promoter-Region, daher führen Mutationen in jenem Gen bei betroffenen Patienten zwar zu verminderter Kollagen Produktion im Knochen, jedoch nicht in Hautzellen <sup>1</sup>.

Bei einem Geschwisterpaar konnte eine große, homozygote Deletion von *CREB3L1* nachgewiesen werden, welche zu einer letalen Knochendysplasie sowie Merkmalen von OI führte<sup>63</sup>. Biallelische Varianten führen meist zu einem klinisch moderaten bis schweren OI-Phänotyp, während monoallelische Varianten in *CREB3L1* meist mit einem milden OI-Phänotyp assoziiert sind und teils keine klinischen Symptome einer Skeletterkrankung vorweisen<sup>1</sup>.

#### **1.1.3.4.4. *TENT5A***

*TENT5A* (früher *FAM46A*) codiert für eine Nukleotidyltransferase, dessen genaue Funktion unklar ist. Es konnte gezeigt werden, dass *TENT5A* Protein in menschlichen Osteoblasten exprimiert wird, dies lässt eine Rolle in der Knochenhomöostase vermuten. Im Mausmodell führte eine Nonsense-Mutation im *TENT5A* zu einem OI-ähnlichen Phänotyp mit Skelettdysplasien. Studien betreffend den Klauenfrosch zeigen eine Aktivierung des BMP-Signalwegs durch das *TENT5A* Protein. Dieser ist wesentlich für die Knochenbildung und Homöostase<sup>1,64</sup>.

#### **1.1.3.4.5. *SP7***

Wichtig für die Initiierung der Differenzierung von Pre-Osteoblasten in Osteoblasten und Osteozyten ist der Osteoblasten-spezifische Transkriptionsfaktor *SP7* (codiert durch *SP7*). Mutationen in jenem Gen zeigten in einer Studie einen Patienten mit Knocheninstabilität sowie daraus resultierend gehäuften Frakturen<sup>1,65</sup>.

#### **1.1.3.5. *Weitere Gene mit Beeinflussung der Knochenstabilität***

Mutationen in Genen, welche für die Regulierung der ECM Mineralisierung oder Osteoklastenfunktion verantwortlich sind, stehen ebenso in Verbindung zur OI. Osteoklasten sind verantwortlich für die Resorption von Knochenmaterial. Folgend führen Mutationen in jenen Genen zu einer gestörten Knochenhomöostase<sup>1</sup>.

##### **1.1.3.5.1. *SERPINF1***

*SERPINF1* kodiert für das Protein PEDF (pigment epithelium-derived factor) und ist eines jener beiden Gene, welche für den OI Typ-VI verantwortlich ist. Mutationen in diesem Gen führen zu einer normalen Produktion und Sekretion von Typ-I Kollagen in Fibroblasten von Betroffenen, begünstigen jedoch eine erhöhte Knochenresorp-

tion<sup>1,50</sup>. In Knockout Maus Modellen führte ein Verlust von PEDF zu keinem offensichtlichen Knochenphänotyp, sondern zu epithelialen und vaskulären Anomalien<sup>66</sup>. Kommt es hingegen zu einem Verlust von PEDF beim Menschen, führt dies zu schwerer OI. PEDF reguliert OPG (=Osteoprotegerin), einen physiologischen Hemmer der Osteoklastengnese, im Knochen hoch und hemmt somit die Osteoklastenreifung. Dies ist zurückzuführen auf eine RANKL (Receptor Activator of NF- $\kappa$ B-Ligand) vermittelte Blockierung der Osteoklastenproliferation und -differenzierung<sup>67</sup>. Bei betroffenen Patienten zeigt sich eine charakteristische Klinik: Initial zeigen die Patienten in der Regel keine Frakturen, gefolgt von einer fortschreitenden, schweren Knochendysplasie<sup>68</sup>.

#### **1.1.3.5.2. *PLS3***

Ein weiteres Gen, welches eine wichtige Rolle in der Knochenbildung, -Mineralisierung und Resorption spielt, ist *PLS3* (codiert für Plastin-3). Studien zeigen, dass Mutationen in *PLS3* *wahrscheinlich* zu einer frühen Osteoporose bzw. OI-ähnlichen Phänotypen führen können, indem sie eine insuffiziente Mineralisierung der Osteoblasten, Dysregulation der Osteozyten und erhöhte Knochenresorption durch Osteoklasten bewirken. Die Vererbung erfolgt über das X-Chromosom, daher sind homozygote männliche Individuen meist früher und stärker betroffen als heterozygote Frauen<sup>1,69</sup>.

#### **1.1.3.5.3. *IFITM5***

Im Gegensatz zu OI-Mutationen, welche zu reduzierter Knochenmineralisierung führen, zeigt sich, dass eine Mutation in *IFITM5* eine erhöhte ektopische Ossifikation begünstigt und zu einer OI Typ-V führt. Es konnte gezeigt werden, dass diese einzigartige Form der OI bei allen Individuen durch die gleiche heterozygote Variante c.[-14C>T] in der 5'-UTR des *IFITM5* Gens verursacht wird<sup>70,71</sup>.

Klinisch betroffene Individuen weisen eine mittelschwere Knochendysplasie auf, charakterisiert durch Verknöcherung der Membrana interossea des Unterarms, Radiuskopfdisklokation sowie hyperplastische Kallusformierungen nach Knochenbrüchen<sup>72,73</sup>.

*IFITM5* kodiert ein Protein welches 132 Aminosäuren lang ist, und zwei Transmembrandomänen besitzt. Es zeigt sich in Osteoblasten stark angereichert und wird im Mausmodell bei der Osteoblastenbildung als wichtig angesehen (86).

2014 konnte eine De-novo-Mutation (c.119C>T) in der codierenden Region von *IFITM5* bei schwer betroffenen OI Patienten identifiziert werden, welche ähnliche knochenhistologische Merkmale wie Patienten mit autosomal-rezessiver OI Typ-VI aufwiesen (*SERPINF1*)<sup>74</sup>.

#### **1.1.4. Therapien der Osteogenesis Imperfecta**

Trotz jahrelanger Forschung bleibt die OI weiterhin eine lebenslange, nicht kurative Erkrankung. Die orthopädischen Interventionen sowie pharmakologischen Therapien, welche für die Behandlung der OI zulässig sind, sind nicht spezifisch. Hauptziel sind eine supportive und symptomatische Therapie zur Verbesserung der Lebensqualität. Die unterschiedlichen Therapiemöglichkeiten sind abhängig von der Schwere der OI, die auch innerhalb einer Familie stark variieren kann. Einige Patienten mit milder OI benötigen keine spezifische Therapie, sondern werden lediglich regelmäßig bezüglich Komplikationen überwacht. Operationen sind hier selten notwendig und abhängig von der Frakturart und nicht vom OI-Typ. Patienten mit moderater bis schwerer OI benötigen meist multidisziplinäre Behandlungen und häufig frühe Korrekturen von „Lange-Röhrenknochen-Deformitäten“<sup>75,76</sup>.

##### **1.1.4.1. Medikamentöse Therapien**

###### **1.1.4.1.1. Bisphosphonate**

Eine Möglichkeit der OI Therapie ist die intravenöse Behandlung mit Bisphosphonaten. Diese hemmen die Osteoklastenaktivität und Knochenresorption, indem sie sich an die Hydroxylapatitkristalle am Knochen binden und zur Apoptose der Osteoklasten führen. Hierdurch verbessern sie die Knochenmasse und fördern das Knochenwachstum bei Kindern<sup>21,75</sup>. Ein Therapiebeginn wird meist bei moderat bis schwer betroffenen Patienten mit einer Frakturrate >2/Jahr, Wirbelkörperfrakturen oder chronischen Knochenschmerzen initiiert<sup>21</sup>.

In Metaanalysen wurde der positive Effekt der Bisphosphonat-Therapie zur Senkung der Frakturrate der langen Röhrenknochen nicht bestätigt. Trotzdem konnte eine Verbesserung der Lebensqualität im Sinne von Schmerzreduktion und Zugewinn an Mobilität gezeigt werden. Häufige Nebenwirkungen der Therapie sind insbesondere bei der ersten Gabe „Akute-Phase Reaktion“ mit grippeähnlichen Symptomen und transienter Hypocalciämie. Bei Erwachsenen wurde ebenso eine Kieferkopfnekrose in beobachtet<sup>10</sup>. Langfristige Nebenwirkungen sind aufgrund der

mangelnden Erfahrung bei Kindern bislang nicht bekannt. Bei bestimmten OI-Typen zeigen sich jedoch ungenügende Therapieerfolge mit Bisphosphonaten <sup>21,75,77</sup>.

#### **1.1.4.1.2. Teriparatid und Denosumab**

Neuere Therapiealternativen sind beispielsweise Teriparatid, welches die Knochenbildung stimuliert und einen positiven Effekt auf die Knochendichte vorweist. Es zählt zu den Parathormon-Analoga und führt zu einer direkten Stimulation des Knochenaufbaus, beeinflusst jedoch nicht den Knochenabbau. Weiters führt Teriparatid zu einer erniedrigten Frakturrate. Bei Kindern wird dieses Präparat aufgrund von erhöhtem Neoplasie-Risiko allerdings bislang nicht eingesetzt <sup>76,78</sup>.

Eine weitere Therapieoption ist Denosumab, ein anti-RANK Ligand-Antikörper, welcher die Osteoklastenformierung und Knochenresorption hemmt. Dieser wird bereits seit einigen Jahren zur Therapie der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen und Männern eingesetzt. In Kindern gibt es Studien zu OI Typ-VI Patienten über einen Zeitraum von 2 Jahren. Hier konnte eine Erhöhung der Knochendichte und -mobilität sowie eine Suppression der Knochenresorption gezeigt werden. Langzeitdaten sind noch nicht bekannt <sup>76</sup>.

#### **1.1.4.1.3. Sclerostin-Antikörper**

Weiters wurde kürzlich eine Therapie mit einem Sclerostin-Antikörper publiziert, welche eine Erhöhung der Knochenbildung, -Masse und -Stärke bei Osteoporose in OI Mäusen gezeigt hat <sup>76,79</sup>. Eine Inhibition von Sclerostin, welches ein negativer Regulator der Knochenmasse ist, könnte neue therapeutische Möglichkeiten in der Behandlung von OI aufzeigen. Sclerostin wird vor allem von Osteozyten sezerniert und antagonisiert Wnt/ $\beta$ -catenin Signale in Osteoblasten. Dies führt zu einer Inhibition der Osteoblastengenese und Knochenformation. In Tierstudien wurde gezeigt, dass Sclerostin-Antikörper die Knochenformation und Knochendichte verbessern konnten. Weiters wurden Studien an Mäusen bezüglich rezessiver OI Formen durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Antisclerostin Antikörpern zu einer Verbesserung der Knochenmasse, trabekulären Mikroarchitektur und erhöhter Knochenstärke- und -formation führt. Diese Effekte waren allerdings deutlich geringer bei der jüngeren Mäusekohorte, dies lässt einen Unterschied des

Therapieerfolgs bei unterschiedlichen Altersgruppen vermuten. Studien am Menschen bezüglich OI Therapien mit Sclerostin Antikörpern sind aktuell Thema der Forschung<sup>80</sup>.

#### **1.1.4.1.4. Gentherapien**

Innovative Therapien, welche in Zukunft eine mögliche Heilung der OI bewirken könnten, sind Gentherapien. „Gene Silencing“ kann zu einer Suppression des mutierten Allels von *COL1A1* oder *COL1A2* führen und würde den klinisch schweren Phänotyp der OI in eine mildere Form, in welcher eine reduzierte Menge von qualitativ normalem Kollagen vorliegt, umwandeln. Aktuell sind in vitro Studien diesbezüglicher Gentherapien in der Forschung<sup>10</sup>.

#### **1.1.4.2. Orthopädisches Management**

Frakturen können in der Regel je nach Frakturtyp ( undisloziert/disloziert) konservativ oder chirurgisch behandelt werden. Die Dauer der Frakturheilung unterscheidet sich bei den klassischen OI-Formen nicht zu jener von Nicht-Betroffenen. Einige seltene Varianten sind mit verlängerter Heilung assoziiert, wie beispielsweise Mutationen in *IFTM5* oder *WNT1*. Implantationsmaterial für OI Patienten muss anpassungsfähige Elastizität und Stärke, optimiert für den OI Knochen, aufweisen. Ein Material, welches diese speziellen mechanischen und biologischen Anforderungen für dysplastischen Knochen erfüllt, ist aktuell nicht am Markt verfügbar. Studien diesbezüglich sind aktuell Thema der Forschung.<sup>1</sup>

#### **1.1.4.3. Physiotherapien**

Grundsätzlich dienen alle Therapiemöglichkeiten der OI einer Verbesserung der Mobilität und Selbstständigkeit. Durch regelmässige Muskulaturkräftigung im Sinne einer Physiotherapie kann der Sehnen- und Bandapparat gestärkt werden. Die Kräftigung der Muskulatur führt ebenso zu einer Anregung der Osteoblastenaktivität. Eine größere Unterstützung der OI Forschung für eine bessere molekulare Charakterisierung sowie ein umfassenderes Verständnis der Pathomechanismen ist notwendig, um die Entwicklung neuer OI zentrierter Therapien zur Verbesserung der Patientenversorgung zu gewährleisten<sup>21</sup>.

## 2. Methodik

### 2.1 Datensatz

#### 2.1.1. Genehmigung durch SWISSETHIK

Am 04. 06. 2019 genehmigte SWISSETHIK, die Kantonale Ethikkommission Zürich, die Durchführung der wissenschaftlichen Arbeit „*Molecular Basis and Pathology of Connective Tissue Disorders. Towards Personalized Medicine*“ am Patientengut des Registers und der Biobank der Abteilung Stoffwechsel und Forschungszentrum für das Kind, Universitätskinderspital Zürich. Alle PatientInnen bzw. deren rechtlicher Vormund, stimmten zu Lebzeiten zu, ihre Daten zu Forschungszwecken nutzen zu dürfen. Die Bewilligung erlaubt auch die Weiterverwendung des biologischen Materials und/oder der gesundheitsbezogenen Personendaten bei fehlender Einwilligung und Information nach Art. 34 HFG der Helvetischen Konföderation.

Die Durchführung dieser Arbeit ist Teil der erwähnten Forschungsgruppe. Um den medizinischen Datenschutz zu gewährleisten, gemäß Bewilligung, wurden alle Patientendaten anonymisiert.

#### 2.1.2. Beteiligte Zentren

Die Datensammlung erfolgte an der Stoffwechselabteilung und am Forschungszentrum für das Kind des Universitäts-Kinderspital Zürich, Schweiz.

#### 2.1.3. Datensammlung

Das RedCAP Register der Einheit für Bindegewebserkrankungen der Abteilung Stoffwechsel und Forschungszentrum für das Kind, Kinderspital Zürich wurde nach Fällen mit folgender pathologischer, genetischer Diagnose durchsucht: Heterozygote, pathogene Varianten in den Genen *COL1A1* und *COL1A2* mit der klinischen Diagnose einer Osteogenesis Imperfecta bzw. eines Osteogenesis Imperfecta/Ehlers-Danlos-Overlap Syndrom. Fälle mit klinischer Osteogenesis Imperfecta, welche nicht durch heterozygote Mutationen in den zwei Hauptgenen *COL1A1* und *COL1A2* verursacht werden, wurden nicht berücksichtigt.

Ziel der Arbeit ist ein Vergleich der inter-und intrafamiliären Variabilität der Osteogenesis Imperfecta verursacht durch Mutationen in den Genen *COL1A1* und

COL1A2 anhand der ausgewählten Patientenpopulation sowie eine vergleichende Literaturrecherche bezüglich identischer bzw. ähnlicher Mutationen.

Die Daten wurden retrospektiv aus einer Untergruppe des RedCAP Registers der Einheit für Bindegewebserkrankungen der Abteilung Stoffwechsel und Forschungszentrum für das Kind, Kinderspital Zürich von insgesamt 31 PatientInnen mit klinisch sowie genetisch diagnostizierter OI bzw. eines OI/EDS Overlap-Syndrom extrahiert. Folgende demographische Parameter wurden aus den Akten ermittelt: Alter bei klinischer Diagnose, Alter bei biochemischer Diagnose, Alter bei genetischer Diagnose, Geschlecht.

Die Datenauswertung wurde in unterschiedliche Perioden eingeteilt, deren Aufteilung wie beschrieben erfolgte: Antenatal (=vorgeburtlich), Neonatal (=0-1.Lebensmonat), Säuglingsperiode (=1.-12.Lebensmonat), Kindheit (=1.-9.Lebensjahr), Jugend (=10.-19.Lebensjahr), Erwachsenenperiode (=ab dem 20.Lebensjahr).

Weiters wurde nach Vorhandensein folgender Symptome recherchiert und der Zeitraum des Auftretens (Antenatal, Neonatal, Säuglingsperiode, Kindheit, Jugend, Erwachsenenperiode) notiert (in alphabetischer Reihenfolge): Aborte, Arachnodaktilie, betroffene Verwandte Ersten-Grades, Blaue Skleren, definitive Diagnose, Deformitäten der langen Röhrenknochen, Dentinogenesis Imperfecta, Frakturen, Genetische Mutation, Gelenkdislokation, Gelenkhypermobilität (Beighton Score), Gelenkschmerzen, Hämatomneigung, Herzklappenerkrankungen, Hörverlust, Kleinwuchs, Knochendichte (T-Score), Operationen, Orthopädische Merkmale (Skoliose/Lordose, Knochenfehlbildungen, Knöchernerne Hypoplasien, Knochendeformitäten-/fehlstellungen,), Sillence Klassifikation.

Detaillierter erfolgte eine Einteilung der Frakturen in einen milden, moderaten sowie schweren Typ. Definiert als milder Typ wurde, wer in einer bis allen Lebensperioden <5 Frakturen mit adäquatem Trauma und/oder keine Frakturen hatte.

Definiert als moderater Typ wurde, wer in einer bis drei Lebensperioden <3 Frakturen ohne adäquates Trauma und/oder wer in einer bis allen Lebensperioden  $\geq 5$  Frakturen mit adäquatem Trauma hatte. Die Einteilung in einen schweren Typ erfolgte, wenn ein Patient in einer bis allen Lebensperioden  $\geq 5$  Frakturen ohne adäquates Trauma und/oder in  $\geq$  vier Lebensperioden <5 Frakturen ohne adäquates Trauma und/oder intrauterine Frakturen hatte.

Der Zeitpunkt des Auftretens der klinischen Symptome sowie eine genaue Angabe der klinischen Symptome ließ sich nicht bei jedem PatientIn nachvollziehen. In diesen Fällen wurde bei der Datenerhebung ein „not reported“ (=ohne Angabe) verwendet. Dies wurde bei der Auswertung einem „no“ (=nein) gleichgesetzt.

Erfüllten die PatientInnen das vorgesehene Alterskriterium nicht, wurde ein „age not reached“ (=Alter nicht erreicht) verwendet. PatientInnen die dieses Kriterium nicht erfüllten, wurden in der entsprechenden Zeitperiode bei der Auswertung nicht miteinbezogen.

Einige PatientInnen zeigten sich in der vorgesehenen Alterskategorie bereits verstorben, dies wurde in der Datenerhebung als „deceased“ (=verstorben) klassifiziert. Diese wurden in der entsprechenden Zeitperiode bei der Auswertung ebenso nicht berücksichtigt.

Der Zeitpunkt der klinischen Diagnose wurde als die Erstkonsultation bei Auftreten von Symptomen, welche mit OI vereinbar sind, definiert. Der Zeitpunkt der biochemischen und genetischen Diagnose wurde als Datum des Erhalts des schriftlichen Befundes der jeweiligen Untersuchung definiert.

Die Einteilung der Mutation in der Triple-Helix erfolgte in drei Teile zu je ca. 1014 Basenpaaren: Im Gen *COL1A1* wurde für eine Mutation mit Lokalisation zwischen Exon 6-20 der Begriff „im Bereich des N-Terminalen-Ende der Triple-Helix“ verwendet. Eine Mutation mit Lokalisation zwischen Exon 21-32 wurde als „im mittleren Bereich der Triple-Helix“ bezeichnet und eine Mutation mit Lokalisation zwischen Exon 33-49 wurde als „im Bereich des C-Terminalen-Ende der Triple-Helix“ bezeichnet.

Für das Gen *COL1A2* zeigt sich die Einteilung wie folgt: Für eine Mutation mit Lokalisation zwischen Exon 6-21 wurde der Begriff „im Bereich des N-Terminalen-Ende der Triple-Helix“ verwendet. Eine Mutation mit Lokalisation zwischen Exon 22-36 wurde als „im mittleren Bereich der Triple-Helix“ bezeichnet und eine Mutation mit Lokalisation zwischen Exon 37-49 wurde als „im Bereich des C-Terminalen-Ende der Triple-Helix“ bezeichnet.

#### **2.1.4. Statistische Analyse und Literaturrecherche**

Zur statistischen Datenanalyse und Sammlung aller relevanten Informationen wurde das Programm *Microsoft Excel for Mac Version 16.63.1* verwendet. Es erfolgte eine deskriptive statistische Analyse der erworbenen Daten und eine Darstellung der Informationen in Prozent.

Weitere statistische Tests (Fishers Exact Test; Logistisches Regressions Modell) konnten aufgrund der niedrigen Patientenzahl und damit verbundenen fehlenden Signifikanz nicht durchgeführt werden.

Die Literaturrecherche erfolgte über die medizinische Datenbank PubMed. Mithilfe von Schlüsselwörtern wie beispielsweise „Osteogenesis Imperfecta“, UND „Pathophysiologie“ UND „COL1A1“ UND „COL1A2“ erfolgte die Suche in dieser Datenbank. Die Suche wurde mit einigen anderen Kombinationen verglichen, die sich später als nicht optimal herausstellten. Diese dienten jedoch dazu, die Validität der anderen Suchergebnisse zu bestätigen. Weiters wurde eine Recherche der Datenbanken nach Publikationen von Autoren durchgeführt, welche sich intensiv mit Osteogenesis Imperfecta beschäftigen, ohne die Suche auf die Schlüsselwörter einzuschränken.

Weiters wurden die Publikationen auf Quellenangaben von Arbeiten durchsucht, die ähnliche oder idente Mutationen wie unser Patientengut vorweisen konnten.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Demographische Daten

Es wurden 31 OI-PatientInnen bzw. OI/Ehlers-Danlos-Overlap-Syndrom PatientInnen untersucht, von denen ausreichende Informationen bezüglich klinischer Symptome vorlagen, sowie eine Mutation in den zwei Hauptgenen *COL1A1* und *COL1A2* nachgewiesen werden konnte.

#### 3.1.1. Klinischer Phänotyp intrafamiliär in *COL1A1* und *COL1A2*

In der Gesamtkohorte zeigen sich 45.2% (N=14) der PatientInnen als Träger einer Mutation im Gen *COL1A1*, sowie 54.8% (N=17) der PatientInnen als Träger einer Mutation im Gen *COL1A2*. Bei 51.6% (N=16) der PatientInnen führt die Mutation zu einem qualitativen und quantitativen Defekt (57.2% in *COL1A1*, 47% in *COL1A2*). Bei den restlichen PatientInnen wurde entweder keine biochemische Untersuchung der Fibroblasten durchgeführt oder die Untersuchung zeigte sich normal.

Betreffend der Kollagenstruktur zeigen sich 3.2% (N=1) der Mutationen im Signalpeptid, 48.4% (N=15) im Bereich des N-Terminalen-Ende der Triple-Helix, 19.4% (N=6) im mittleren Teil der Triple-Helix, 12.9% (N=4) im Bereich des C-Terminalen-Ende der Triple-Helix und 3.2% (N=1) im C-Terminalen-Propeptid. 12.9% (N=4) der Patienten\_Innen kann keine Lokalisation zugeordnet werden.

Insgesamt werden 20 verschiedene Mutationen identifiziert, mit überwiegendem Teil Glycin-Substitutionen.

Je nach betroffenem Gen erfolgt eine Zuteilung zu Kohorte 1 (*COL1A1*) oder Kohorte 2 (*COL1A2*). Insgesamt 80.6% (N=25) der PatientInnen präsentieren sich mit der klinischen Diagnose einer OI sowie 19.4% (N=6) der PatientInnen mit der klinischen Diagnose eines OI/Ehlers-Danlos-Overlap-Syndrom.

In der Gesamtkohorte zeigt sich die Geschlechterverteilung wie folgt: 48.39% (N=15) Männer und 51.61% (N=16) Frauen. Insgesamt sind 8 Familien Teil der Kohorte. Die einzelnen Familienmitglieder sind interfamiliär Träger der identischen genetischen Mutation.

Der Zeitpunkt der klinischen Diagnose liegt im Durchschnitt bei 78 Monaten. Im Vergleich hierzu liegt der Zeitpunkt der biochemischen Diagnose im Durchschnitt bei

194 Monaten, sowie der Zeitpunkt der genetischen Diagnose im Durchschnitt bei 165 Monaten.

74.2% (N=23) der PatientInnen zeigen sich mit einer positiven Familienanamnese, während sich 25.8% (N=8) mit einer sporadischen Form zeigen. Eine positive Familienanamnese korreliert mit OI-Typ I (34.8% der Fälle), während eine sporadische Form mit OI-Typ-II in Verbindung gebracht wird (37.5% der Fälle).

Mutationen, welche im Bereich des C-terminalen-Ende der Triple-Helix auftreten, führen in 25% (N=1) zu OI-Typ-II, 25% (N=1) zu OI-Typ-III, 25% (N=1) zu OI-Typ-IV und 25% (N=1) zu OI/EDS-Overlap-Syndrom und verursachen meist einen moderaten bis schweren klinischen Phänotyp. Mutationen, welche im Bereich des N-Terminalen-Ende der Triple-Helix auftreten führen in 40% (N=6) zu OI-Typ-I, in 26.7% (N=4) zu OI-Typ-IV, 20% (N=3) zu OI/EDS-Overlap-Syndrom, 6.7% (N=1) zu OI-Typ-III und 6.7% (N=1) zu OI-Typ-I/IV und verursachen meist einen milden-moderaten klinischen Phänotyp.

#### **3.1.1.1. Kohorte 1 (COL1A1)**

Von den insgesamt 14 Individuen der Kohorte 1 zeigt sich die Geschlechterverteilung wie folgt: 50% Frauen (N=7) und 50% Männer (N=7). 21.4% (N=3) verstarben bereits intrauterin oder kurz nach der Geburt (< 1.Lebensmonat). Alle Patienten der Kohorte 1 zeigen sich mit der definitiven Diagnose einer Osteogenesis Imperfecta. Nach Sillence-Klassifikation entsprechen 42.9% Typ I (N=6), 21.4% Typ II (N=3), 0% Typ III (N=0), 14.3% Typ IV (N=2) und 21.4% Typ I oder Typ IV (N=3). Der Großteil der PatientInnen ist Träger einer Glycin-Substitution.

Die Lokalisation der Mutation zeigt sich bei 7.1% (N=1) im Signalpeptid, 28.6% (N=4) im Bereich des N-Terminalen-Ende der Triple-Helix, 28.6% (N=4) im mittleren Teil der Triple-Helix, 14.3% (N=2) im Bereich des C-Terminalen-Ende der Triple-Helix und 7.1% (N=1) im C-Terminalen Propeptid.

28.6% (N=4) zeigen sich mit einem quantitativen und qualitativen Defekt, 28.6% (N=4) mit einem qualitativen Defekt. Bei 35.7% (N=5) wurde keine biochemische Kollagenuntersuchung durchgeführt. Bei 7.1% (N=1) zeigt sich eine unauffällige biochemische Untersuchung.

Die häufigsten klinischen Symptome, die in einer bis allen der sechs Lebensperioden auftreten, sind Frakturen mit 78.57% (N=11), gefolgt von Orthopädische Merkmalen mit 71.43% (N=10), sowie Blaue Skleren bei 64.29% (N=9), Deformitäten der

langen Röhrenknochen bei 57.14% (N=8) und verminderte Knochendichte (T-Score) bei 57.14% (N=8).

Bezüglich der Frakturschwere zeigen sich 42.86% (N=6) mit einem milden Typ, 28.57% (N=4) mit einem moderaten Typ und 28.57% (N=4) mit einem schweren Typ.

Seltene klinische Symptome, welche in mindestens einer Lebensperiode auftreten, sind mit 0% (N=0) Arachnodaktylie, mit 0% Hämatomneigung und mit 14.29% (N=2) Hörminderung.

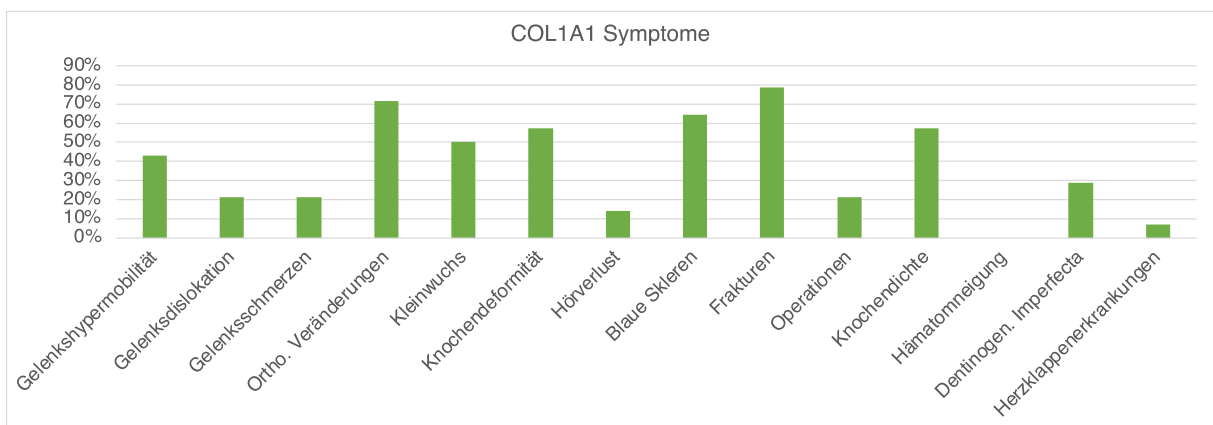


Abbildung 2: Prozentuale Symptomverteilung des Gens *COL1A1*.

### 3.1.1.1.1. Glycin Substitutionen *COL1A1*

In Kohorte 1 zeigt sich eine Verteilung der Lokalisation der Mutation wie folgt:

PatientInnen mit dem letalen OI-Typ-II zeigen sich alle mit Glycin-Substitutionen. Hiervon weist ein PatientIn die Substitution im Signal Peptid auf, ein PatientIn im mittleren Teil der Triple Helix sowie ein PatientIn im Bereich des C-Terminalen Ende der Triplex-Helix. Alle PatientInnen aus Kohorte 1 mit Glycin-Substitutionen im Bereich des N-Terminalen Ende der Triple-Helix (N=4) weisen einen milden OI-Typ-I auf.

PatientInnen mit Glycin-Substitutionen im Bereich des C-Terminalen Ende (N=2) weisen einen schweren bis letalen OI-Typ-II respektive -IV auf.

Ein PatientIn (*Fallbeispiel 1*) mit Glycin-Substitution im Bereich des C-Terminalen-Ende der Triple-Helix der  $\alpha 1(I)$  Kette präsentiert sich mit perinatal letaler OI-Typ-II. Die Variante ist an folgender Position zu finden: *COL1A1* im Exon 47, c.3496G>T (p.Gly1166Cys) und zählt zu den SNV. Sie befindet sich an Position Gly988Cys,

Nahe der nach Marini et al. <sup>11</sup> definierten Region 910-964 der Kollagen Triple-Helix, (gezählt ab des ersten Glycin der Triple-Helix, ab Exon 6 des *COL1A1* Genes, nämlich Aminosäure 179 des kompletten „Translatierten“ Kollagen I Proteins ab Methionin 1) zugeordnet werden kann. <sup>11,81</sup>.

In einer Publikation von Steinmann et al. <sup>82</sup> konnte gezeigt werden, dass dieser PatientIn sowohl normale pro- $\alpha$ 1(I) Ketten, als auch pro- $\alpha$ 1(I) Ketten mit Cystein anstelle von Glycin in der Triple-Helix-Domäne produziert. Bei keinem der Eltern konnte die Mutation nachgewiesen werden, somit ist von einer De-Novo-Mutation auszugehen. Die Kindsmutter ist am Marfan-Syndrom erkrankt.

Unser PatientIn produziert drei verschiedene Typ-1-Prokollagene: Moleküle mit zwei mutierten pro $\alpha$ 1(I)-Ketten, Moleküle mit einer normalen und einer mutierten pro $\alpha$ 1(I)-Kette und Moleküle mit zwei normalen pro $\alpha$ 1(I)-Ketten. Die Moleküle mit einer oder zwei mutierten  $\alpha$ 1(I)-Ketten werden zahlreichen post-translationalen Modifikationen durch exzessive Lysyl-Hydroxilierung und Hydroxylysyl-Glycosylierung, unterzogen, führen somit zu verzögerter Triple-Helix-Formation und werden länger als gewöhnlich in der Zelle retiniert. Dadurch reduziert sich die Kollagensekretion der betroffenen Zellen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe <sup>82</sup>.

Ein weiteres Fallbeispiel der Kohorte 1 zeigt einen PatientenIn (*Fallbeispiel 2*) mit einer heterozygoten De-Novo-Glycin-Substitution im Signalpeptid mit schwerem OI-Typ-II. Die Mutation zeigt sich an Position *COL1A1* im Exon1, c.64G>C (p.Gly22Arg).

In der Publikation des Falls von Lindert et al. im Jahr 2018 <sup>83</sup> konnte gezeigt werden, dass die Mutation zu einer verminderten Kollagensekretion führt. Weiters konnten normale Kollagen-I-Ketten nachgewiesen werden, mit jedoch verminderter Sekretion von Kollagen-I der Fibroblasten. Beide Kollagen-Typ-I-Ketten zeigen ein normales Migrationsmuster, was auf fehlende strukturelle ECM-Veränderungen rückschließen lässt. Weiters befindet sich die Mutation in einer Domäne, welche nicht Teil der Kollagenfibrillen der ECM ist, sowie keine Rolle bei der Triple-Helix-Faltung und Prozessierung spielt.

Ein Teil des Kollagens mit abnormer Modifikation wurde in der Zelle retiniert. Hieraus wurde geschlossen, dass die vorliegende Mutation zu einer Beeinträchtigung der Spaltung und folglich zu einer Verminderung der Abgabe von Pre-Pro-Kollagen

führt. Dies könnte zur einer Fehlfaltung und ER-Stress führen oder eine dominant negative Wirkung auf die COL1A1-Kette haben, die vom normalen Allel kodiert wird  
83

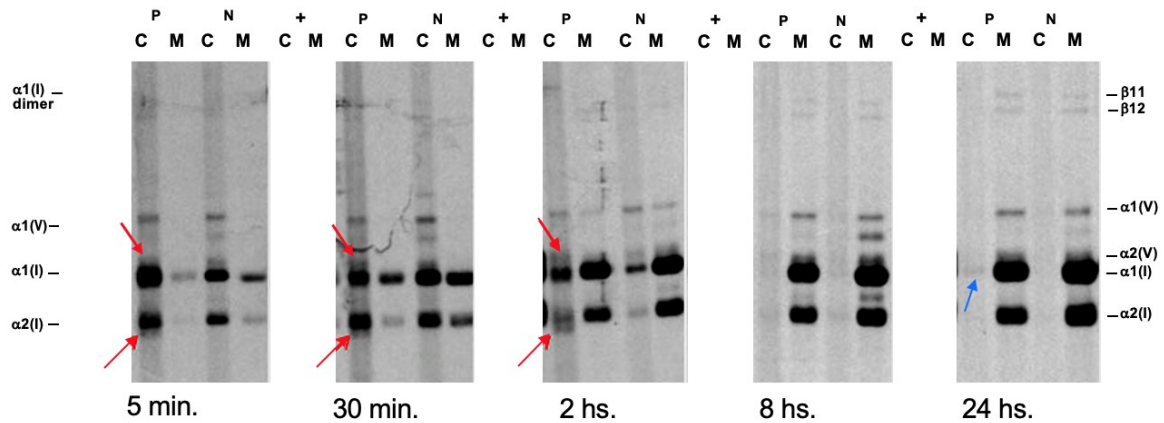


Abbildung 3: Elektrophorese *Fallbeispiel 2*. Kollagen biochemische Analyse auf kultivierten Fibroblasten von P (PatientIn) und N (Kontrolle). Es zeigt sich nach 5 Minuten, 30 Minuten, 2 Stunden, 8 Stunden und 24 Stunden eine verminderte Menge von Typ-I Kollagen  $\alpha1(I)$ - und  $\alpha2(I)$ -Ketten bei dem PatientIn (P). Dies weist darauf hin, dass weniger Kollagen-Typ-I von den Zellen produziert und sezerniert wird. Weiters zeigt sich eine breitere Bande in der Zellschicht (C) der OI Fibroblasten und nach 24 Stunden ist ein kleiner Kollagenrest weiterhin in der Zellschicht (C) der OI Fibroblasten sichtbar. In der Kontrollgruppe ist dieser nach 24 Stunden nicht mehr sichtbar <sup>83</sup>

Ein weiterer PatientIn (*Fallbeispiel 3*) zeigt eine COL1A1 Glycin-Substitution im Exon 36 an Position c.2461G>A (p.Gly821Ser) lokalisiert in der Triple-Helix im Bereich des C-Terminalen-Ende mit einem klinisch schweren OI-Typ-IV. Klinisch präsentiert sich der Patient mit bereits intrauterin aufgetretenen Frakturen und Deformitäten der langen Röhrenknochen. Weitere klinische Symptome, welche in mindestens einer Lebensperiode auftreten, sind: Gelenkshypermobilität, Gelenkschmerzen, Orthopädische Veränderungen, Kleinwuchs, Operationen aufgrund der Frakturen und verminderte Knochendichte.

Die biochemische Untersuchung der Fibroblasten einer Hautbiopsie zeigt eine verminderte elektrophoretische Mobilität, eine Übermodifikation der  $\alpha1(I)$ - und  $\alpha2(I)$ -Ketten sowie eine intrazelluläre Retention.

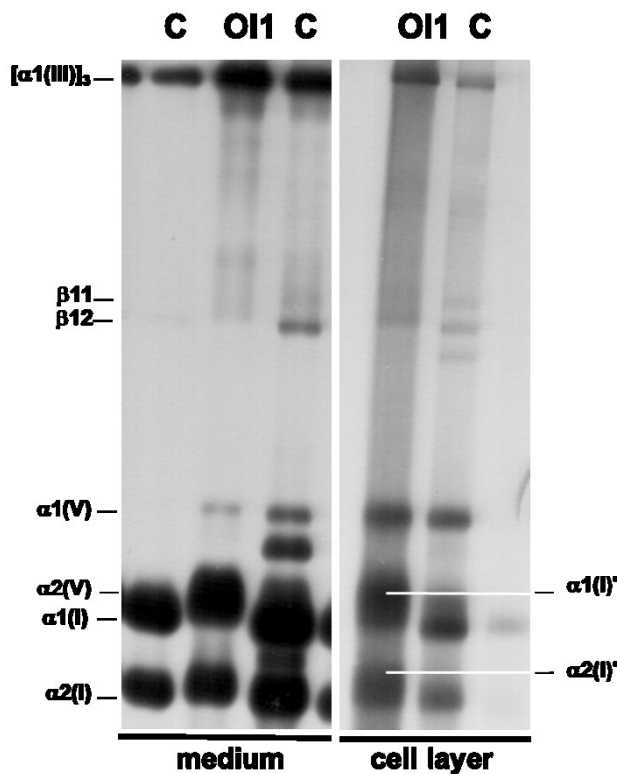


Abbildung 4: Elektrophorese *Fallbeispiel 3* mit Übermodifikation der  $\alpha1(I)$ - und  $\alpha2(I)$ -Ketten (diese sind als  $\alpha1(I)'$  und  $\alpha2(I)'$  bezeichnet)<sup>84</sup>.

### 3.1.1.2. Kohorte 2 (COL1A2)

In Kohorte 2 zeigen sich 17 Individuen, hiervon 47.06% Frauen (N=8) und 52.94% Männer (N=9). 11.8% (N=2) verstarben bereits intrauterin oder kurz nach der Geburt (< 1.Lebensmonat). 64.7% (N=11) Individuen zeigen sich mit der definitiven Diagnose einer Osteogenesis Imperfecta, 35.3% (N=6) Individuen weisen die definitive Diagnose Osteogenesis Imperfecta/Ehlers-Danlos-Overlap-Syndrom (OI/EDS-Overlap-Syndrom) auf.

Nach Sillence-Klassifikation entsprechen 11.8% Typ I (N=2), 5.9% Typ II (N=1), 17.6% Typ III (N=3), 23.5% Typ IV (N=4) und 5.9% Typ I oder Typ IV (N=1).

Der Großteil der Patienten ist Träger einer Glycin-Substitution. Der spezifische Mutationstyp ist bei 100% (N=17) eine Missense-Mutation. Die Lokalisation der Mutation zeigt sich bei 64.7% (N=11) im Bereich des N-Terminalen-Ende der Triple-Helix, 11.8% (N=2) im mittleren Teil der Triple-Helix und 11.8% (N=2) im Bereich des C-Terminalen-Ende der Triple-Helix. 11.8% (N=2) der PatientInnen kann keine Lokalisation zugeordnet werden.

29.4% (N=5) der PatientInnen zeigen sich mit einem quantitativen und qualitativen Defekt, 17.6% (N=3) mit einem qualitativen Defekt. Bei 47.1% (N=8) wurde keine biochemische Kollagenuntersuchung durchgeführt. Bei 5.9% (N=1) zeigt sich eine unauffällige biochemische Untersuchung.

Die häufigsten klinischen Symptome, die in einer bis allen der sechs Lebensperioden auftreten, sind Orthopädische Veränderungen mit 64.71% (N=11), Blaue Skleren bei 64.71% (N=11) und Frakturen bei 64.71% (N=11), gefolgt von Gelenkhypermobilität mit 52.94% (N=9), sowie Dentinogenesis Imperfecta bei 47.06% (N=8). Bezüglich der Frakturschwere zeigen sich 58.82% (N=10) mit einem milden Typ, 23.53% (N=4) mit einem moderaten Typ und 17.65% (N=3) mit einem schweren Typ.

Seltene klinische Symptome, welche in mindestens in einer Lebensperiode auftreten, sind mit 0% (N=0) Arachnodaktylie, mit 11.76% (N=2) Hämatomneigung und 11.76% (N=2) Hörminderung.

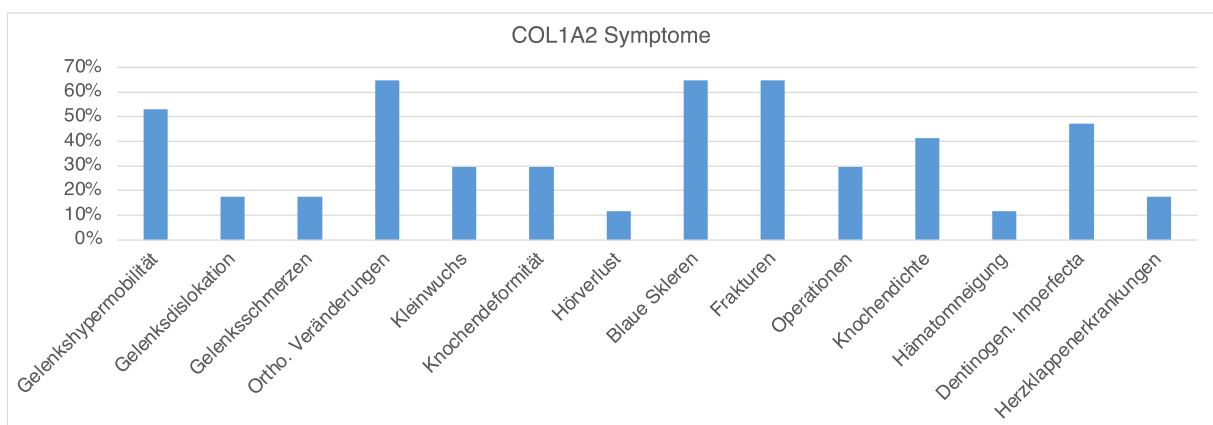


Abbildung 5: Prozentuale Symptomverteilung des Gens COL1A2.

### 3.1.1.2.1. Glycin Substitutionen COL1A2

Die Verteilung der Lokalisation der Mutation in Kohorte 2 zeigt sich wie folgt:

18.2% (N=2) der PatientInnen mit Glycin Substitutionen im Bereich des N-Terminale-Ende weisen einen OI-Typ-I auf, 9.1% (N=1) der Patientin\_Innen weisen einen OI-Typ-III auf, 36.4% (N=4) der PatientInnen weisen einen OI-Typ IV auf, 9.1% (N=1) der PatientInnen weisen einen OI-Typ I/IV auf und 27% (N=3) der PatientInnen weisen ein OI-Ehlers-Danlos-Overlap-Syndrom auf.

PatientInnen mit Glycin-Substitutionen im Bereich des C-Terminale-Ende weisen in 50% (N=1) einen OI-Typ-III und in 50% (N=1) ein OI/EDS-Overlap-Syndrom auf.

In Kohorte 2 zeigt sich ein PatientIn (*Fallbeispiel 4*) mit letaler OI-Typ-II verursacht durch eine Glycin Substitution, lokalisiert in der Mitte der Triple Helix. Die Mutation befindet sich an der Lokalisation *COL1A2* Exon 28, c.1598G>A (p.Gly553Asp). Es erfolgte eine biochemische Untersuchung der Chorionvillusbiopsie, welche ein abnormes in vivo sowie in vitro gebildetes Kollagen-Typ-I aufweist mit deutlich sichtbarer Doublette der  $\alpha 2(I)$ -Ketten sowie übermodifizierten  $\alpha 1(I)$ -Ketten. Eine biochemische Analyse von Hautfibroblasten zeigt ein identisches Bild mit Retention von abnormem Kollagen-Typ-I in den Zellen.

Ein weiterer PatientIn der Kohorte 2 (*Fallbeispiel 5*) präsentiert sich mit einer Glycin Substitution zu Serin mit Lokalisation *COL1A2* im Exon 24, c.1378G>A (p.Gly460Ser) mit einem schweren OI-Typ-III. Dieser Patient präsentiert sich bereits in der Neonatalperiode mit auftretenden Frakturen sowie Deformitäten der langen Röhrenknochen. Weiters zeigt er in mindestens einer Lebensperiode Blaue Skleren, Gelenkshypermobilität, Orthopädische Veränderungen und Hörminderung/-Verlust.

Ein weiteres Fallbeispiel aus Kohorte 2 (*Fallbeispiel 6*) zeigt einen PatientenIn mit einer heterozygoten Glycin-Substitution an Lokalisation *COL1A2* im Exon 38, c.2314G>C (p.Gly772Arg) in der Triple-Helix im Bereich des C-Terminalen-Ende. Klinisch präsentiert sich der PatientIn mit einem schweren OI-Typ-III mit Auftreten von Frakturen bereits intrauterin sowie Deformitäten der langen Röhrenknochen. Weiters zeigt sich der Patient mit folgenden Symptomen in mindestens einer Lebensperiode: Gelenkshypermobilität, Gelenksschmerzen, Orthopädische Veränderungen, Kleinwuchs, Blauen Skleren, Operationen aufgrund der Frakturen, verminderter Knochendichte, Dentinogenesis Imperfecta und Herzklappenerkrankung.

In der biochemischen Untersuchung der Hautfibroblasten zeigt sich eine signifikant verminderte elektrophoretische Mobilität der  $\alpha$ -und  $\beta$ -Ketten, eine Übermodifikation  $\alpha 1(I)$ ,  $\beta 1,1$ - und  $\beta 1,2$ -Ketten sowie intrazelluläre Retention der abnormen  $\alpha$ -Ketten.

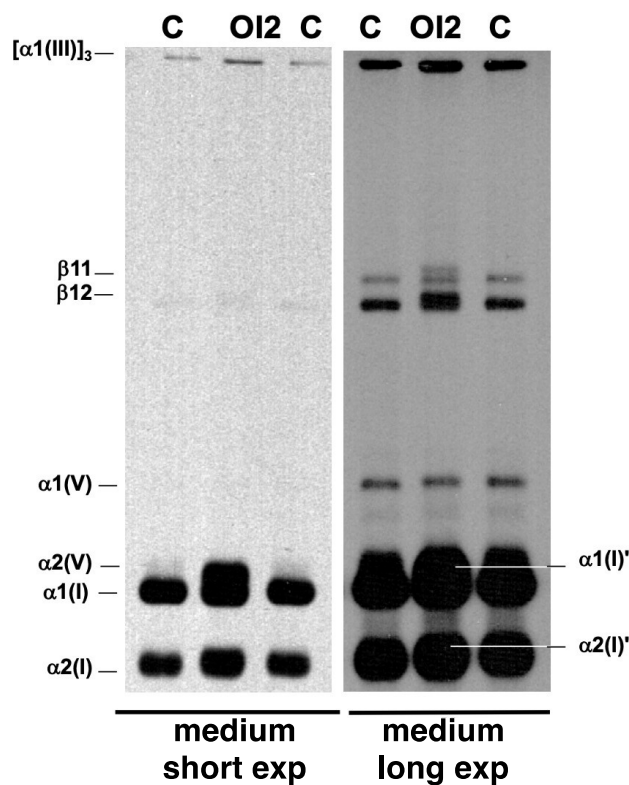


Abbildung 6: Elektrophorese *Fallbeispiel 6* mit signifikant verminderter elektrophoretischer Mobilität der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des Patienten (OI2), eine Übermodifikation  $\alpha 1(\text{I})$ ,  $\beta 1,1$ - und  $\beta 1,2$ -Ketten sowie intrazelluläre Retention der abnormen  $\alpha$ -Ketten im Vergleich zur Kontrolle (C)<sup>84</sup>.

### 3.1.2. Klinischer Phänotyp interfamiliär

In der Gesamtkohorte zeigen sich 8 Familien, welche interfamiliär Träger der identischen Mutation sind. Von diesen werden 5 Familien, von welchen sich ausreichend klinische Information generieren lässt, genauer miteinander verglichen und deren Geno- und Phänotyp in Korrelation gestellt. Eine Familie weist ein OI/EDS-Overlap-Syndrom auf und wird dementsprechend im Kapitel 3.1.3. „OI/EDS-Overlap-Syndrom“ genauer beschrieben.

#### 3.1.2.1. Familie 1

Familie 1 präsentiert sich mit einer heterozygoten Mutation in *COL1A1* im Exon 15 an Position c.976G>A (p.Gly326Ser), welche zu einem Austausch der Aminosäure Glycin zu Serin führt und eine Missense-Mutation hervorruft. Insgesamt 3 Individuen sind Teil dieser Auswertung.

Die Geschlechterverteilung zeigt sich mit 66.67% (N=2) männlich und 33.33% (N=1) weiblich. Alle Individuen haben die bestätigte klinische Diagnose einer Osteogenesis Imperfecta vom Sillence-Typ-I.

100% (N=3) zeigen in einer bis allen sechs Lebensperioden Frakturen, Orthopädische Veränderungen sowie Blaue Skleren. Weitere klinische Symptome, welche in mindestens einer Lebensperiode auftreten, sind mit 66.67% (N=2) Kleinwuchs und Deformität der langen Röhrenknochen. Die Schweregradeinteilung der Frakturen zeigt sich wie folgt: 66.67% (N=2) vom moderaten Typ und 33.33% (N=1) vom milden Typ. Keines der Familienmitglieder präsentiert sich mit Frakturen vor der Lebensperiode Kindheit. Eine erniedrigte Knochendichte in mindesten einer Lebensperiode findet sich bei 33.33% (N=1) der Individuen.

Bei keinem der Familienmitglieder treten die klinischen Symptome Dentinogenesis Imperfecta, Herzklappenerkrankung, Hämatomneigung, Arachnodaktylie, notwendige Operationen aufgrund der Frakturen oder Gelenksschmerzen auf.

#### **3.1.2.2. Familie 2**

Familie 2 präsentiert sich mit einer heterozygoten Mutation in *COL1A1* im Exon 25 an Position c.1678G>A (p.Gly560Ser), welche zu einem Austausch der Aminosäuren Glycin zu Serin führt und eine Missense-Mutation hervorruft. Lokalisiert zeigt sich die Mutation in der Mitte der Triple Helix.

Insgesamt 3 Individuen sind Teil dieser Auswertung. Hiervon sind 66.67% (N=2) weiblich und 33.33% (N=1) männlich. Alle Individuen haben die bestätigte klinische Diagnose einer Osteogenesis Imperfecta, 33.3% (N=1) vom Sillence-Typ-IV und 66.7% (N=2) vom Sillence-Typ-I/IV. Bei allen Individuen liegt eine bestätigte genetische Diagnose vor, 2 Individuen zeigen sich ebenso mit einer biochemischen Diagnose mit Nachweis einer qualitativen Mutation.

Die häufigsten klinischen Symptome, welche in mindestens einer Lebensperiode auftreten, sind mit 33.33% (N=1) Orthopädische Veränderungen, Kleinwuchs, Deformität der langen Röhrenknochen, Hörbeeinträchtigung, Blaue Skleren, Frakturen und Dentinogenesis imperfecta. 100% (N=3) der Familienmitglieder zeigen sich bei der Schweregradeinteilung der Frakturen vom milden Typ. Keines der Familienmitglieder präsentiert sich mit Frakturen vor der Lebensperiode Jugend.

Keines der Familienmitglieder weist eine verminderte Knochendichte, Hämatomneigung, Herzklappenerkrankung, Arachnodaktylie, Gelenkhypermobilität-/dislokation/-schmerzen oder notwendige Operationen aufgrund der Frakturen auf.

Es wurde eine biochemische Analyse der Kollagensynthese und -Sekretion aus Fibroblasten aus Hautbiopsien von zwei Familienmitgliedern durchgeführt. In beiden PatientInnen zeigen sich ähnliche Veränderungen der Produktion von Typ-I-Kollagen.

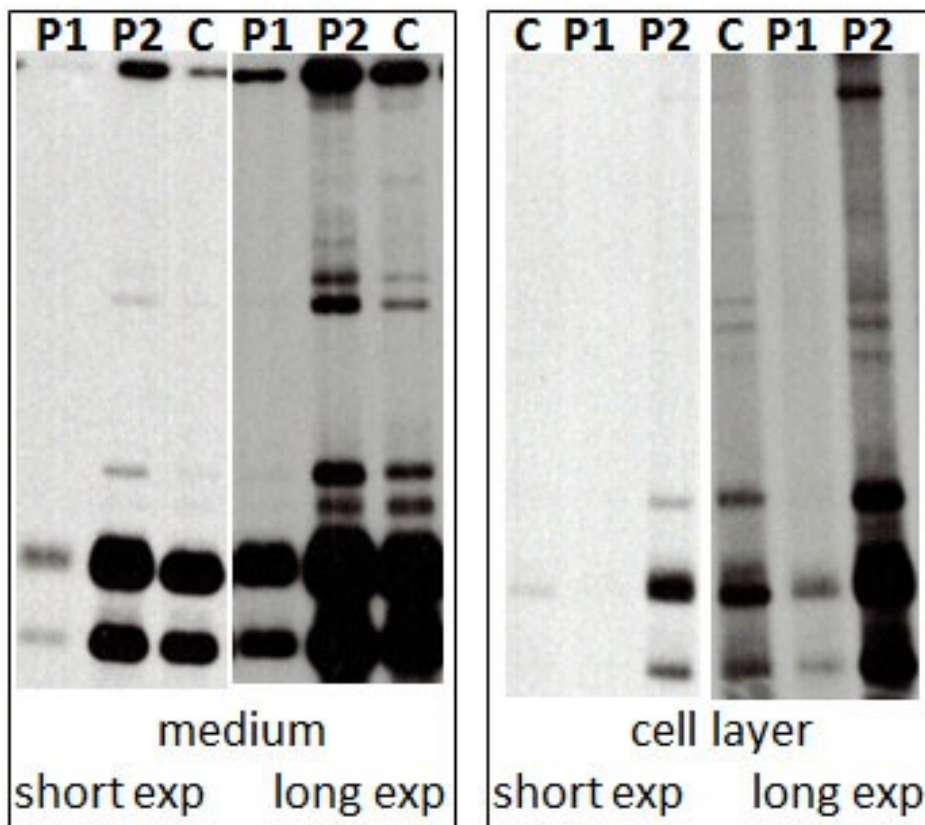


Abbildung 7: *Familie 2*. Kollagen biochemische Analyse auf kultivierten Fibroblasten von PatientIn P1 und PatientIn P2. In der Steady-State-Analyse von Prokollagen in der Elektrophorese zeigt sich, dass in beiden Familienmitgliedern die  $\alpha 1(I)$ - und  $\alpha 2(I)$ -Ketten des Kollagen-I eine erniedrigte elektrophoretische Mobilität und ein breiteres Erscheinungsbild im Vergleich zu den Kontrollbanden aufweisen (Medium). Weiters kann eine moderate intrazelluläre Retention von  $\alpha 1(I)$ -Ketten in der Zellschicht beobachtet werden (cell layer).

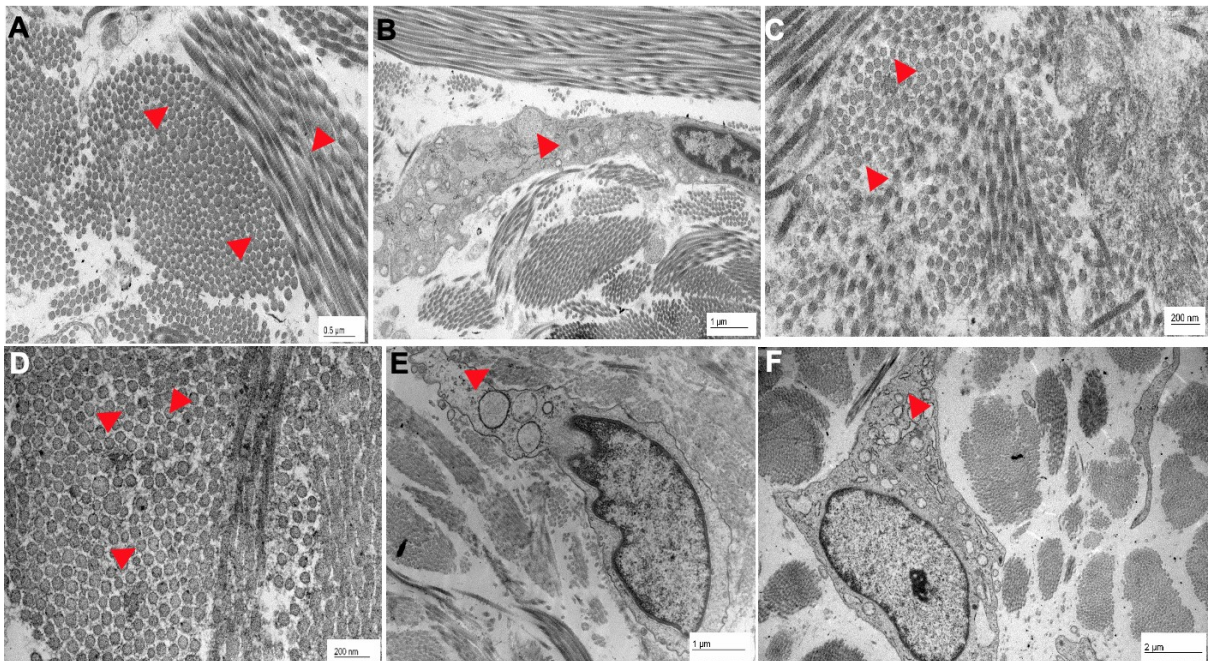


Abbildung 8: *Familie 2*. Elektronen Mikroskopie der Dermis einer Hautbiopsie von P1 (A-C) and P2 (D-F). In der Elektronenmikroskopie zeigen sich ähnliche Abnormalitäten der Kollagenfibrillen im Sinne von erhöhter Variabilität der Größe und teils mit blumenkohlartigem Erscheinungsbild. Weiters zeigen sich die Zysternen des ER erweitert.

### 3.1.2.3. *Familie 3*

Familie 3 präsentiert sich mit einer heterozygoten Mutation in *COL1A2* im Exon 12 an der Position c.568G>A (p.Gly190Arg), welche zu einem Austausch der Aminosäuren Glycin zu Arginin führt und eine Missense-Mutation hervorruft. Insgesamt sind 2 Individuen Teil dieser Auswertung. Hiervon sind 50% (N=1) weiblich und 50% (N=1) männlich. Alle Individuen haben die bestätigte klinische Diagnose einer Osteogenesis Imperfecta vom Sillence-Typ IV. 100% (N=2) zeigen in mindestens einer Lebensperiode Orthopädische Veränderungen und Frakturen auf. 100% (N=2) der Individuen präsentieren sich bei der Schweregradeinteilung der Frakturen mit einem moderaten Typ. Keines der Familienmitglieder präsentiert sich mit Frakturen vor der Lebensperiode Säuglingsalter.

Weitere klinische Symptome sind mit 50% (N=1) Gelenkhypermobilität/- und -dislokation, Kleinwuchs, Deformität der langen Röhrenknochen, Operationen aufgrund der Frakturen, verminderte Knochendichte, Hämatomneigung und Dentinogenesis imperfecta. Keines der Familienmitglieder zeigt klinische Symptome von Gelenkschmerzen, Hörminderung, Arachnodaktylie oder Herzklappenerkrankung.

#### **3.1.2.4. Familie 4**

Familie 4 präsentiert sich mit einer heterozygoten Mutation in *COL1A2* im Exon 19 an der Position c.956G>A (p.Gly319Glu), welche zu einem Austausch der Aminosäuren Glycin zu Glutamin führt und eine Missense-Mutation hervorruft. Insgesamt 3 Individuen sind Teil dieser Auswertung. Hiervon sind 66.67% (N=2) weiblich und 33.33% (N=1) männlich. Alle Individuen haben die bestätigte klinische Diagnose einer Osteogenesis Imperfecta. 66.7% (N=2) vom Sillence-Typ IV und 33.3% (N=1) vom Sillence-Typ I.

Die häufigsten klinischen Symptome, welche in mindestens einer Lebensperiode auftreten, sind mit 100% (N=3) Frakturen, Blaue Skleren, verminderte Knochendichte und Dentinogenesis Imperfecta. Die Schweregradeinteilung der Frakturen liegt mit 66.67% (N=2) beim milden Typ und 33.33% (N=1) beim moderaten Typ. 33.33% (N=1) musste aufgrund der Frakturen in mindestens einer Lebensperiode operiert werden. Bei keinem Individuum treten die Frakturen vor der Lebensperiode Kindheit auf.

Weitere häufige klinische Symptome, welche in mindestens einer Lebensperiode auftreten, sind mit 66.67% (N=2) Kleinwuchs. Keiner der Individuen präsentiert sich mit den klinischen Symptomen Hörminderung, Hämatomneigung, Herzerkrankungen oder Arachnodaktylie.

#### **3.1.3. Symptomvergleich *COL1A1* und *COL1A2***

Die Gesamtkohorte wurde in zwei Gruppen, je nach Auftreten der Mutation, in entweder *COL1A1* (Kohorte 1) oder *COL1A2* (Kohorte 2), eingeteilt.

100% (N=14) der PatientInnen der Kohorte 1 zeigen sich mit der definitiven klinischen Diagnose einer OI, während in Kohorte 2 64.7% (N=11) der PatientInnen sich mit der definitiven Diagnose einer OI, sowie 35.3% (N=6) PatientInnen sich mit der definitiven Diagnose OI/EDS-Overlap-Syndrom zeigen.

In Kohorte 1 zeigt sich nach Sillence-Klassifikation der größte Anteil der PatientInnen mit 42.9% vom Typ I. In Kohorte 2 zeigt sich der größte Anteil der PatientInnen mit 23.5% vom Typ IV.

Kohorte 1 zeigt einen höheren Anteil vom perinatal letalen Typ-II OI mit 21.4% (N=3). In Kohorte 2 zeigen sich 5.9% (N=1) der PatientInnen mit perinatal letalem Typ-II OI.

Die drei häufigsten klinischen Symptome, die in einer bis allen der sechs Lebensperioden auftreten, sind in Kohorte 1 und Kohorte 2 identisch: In Kohorte 1 zeigen sich Frakturen mit 78.57% (N=11), gefolgt von Orthopädische Merkmalen mit 71.43% (N=10), sowie Blaue Skleren bei 64.29% (N=9). In Kohorte 2 zeigen sich die häufigsten klinischen Symptome, die in einer bis allen sechs Lebensperioden auftreten, mit Frakturen bei 64.71% (N=11), Orthopädische Veränderungen bei 64.71% (N=11) und Blaue Skleren bei 64.71% (N=11).

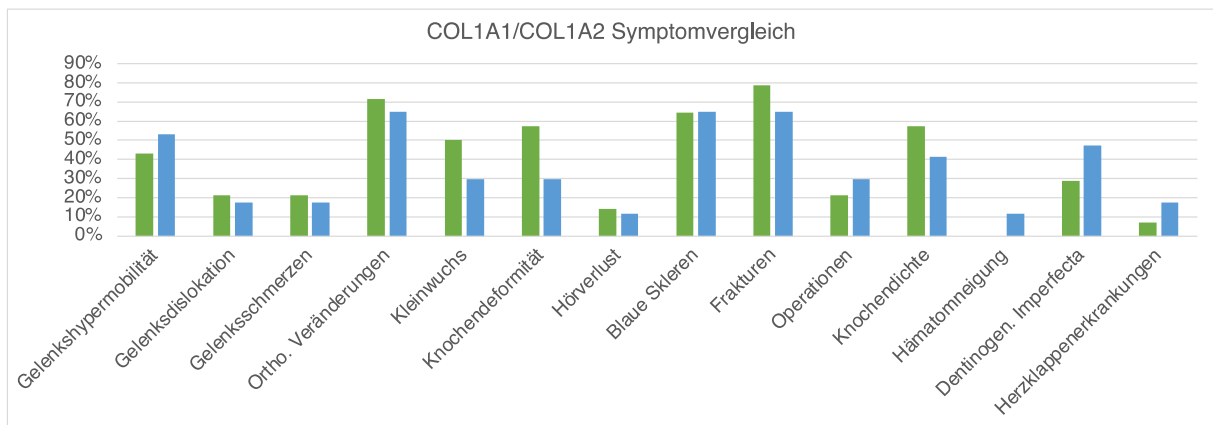


Abbildung 9: Prozentuale Symptomverteilung des Gens *COL1A1* und *COL1A2*

### 3.1.4. OI/EDS-Overlap-Syndrom

In der Gesamtkohorte zeigen sich ebenso 19.4% (N=6) mit einem OI/EDS-Overlap-Syndrom. In all diesen Fällen zeigt sich eine heterozygote Mutation in *COL1A2*. Die Verteilung der Lokalisation der Mutation in dieser Untergruppe zeigt sich wie folgt: 50% (N=3) befinden sich im Bereich des N-Terminalen-Ende der Triple-Helix sowie 16.7% (N=1) im Bereich des C-Terminalen-Ende der Triple Helix. 33.3% (N=2) der PatientInnen zeigen sich mit einer Mutation im Intron.

Die häufigsten klinischen Symptome, welche in mindestens einer Lebensperiode auftreten, sind mit 83.33% (N=5) Gelenkshypermobilität und Orthopädische Veränderungen. Frakturen treten in mindestens einer Lebensperiode mit einer Häufigkeit von 33.33% (N=2) auf. Bei keinem Individuum treten die Frakturen vor der Lebensperiode „Neonatal“ auf.

Weitere häufige klinische Symptome, welche in mindestens einer Lebensperiode auftreten, sind mit 50% (N=3) Blaue Skleren und Dentinogenesis Imperfecta. Keiner der Individuen präsentiert sich mit den klinischen Symptomen Kleinwuchs oder Deformität der langen Röhrenknochen.

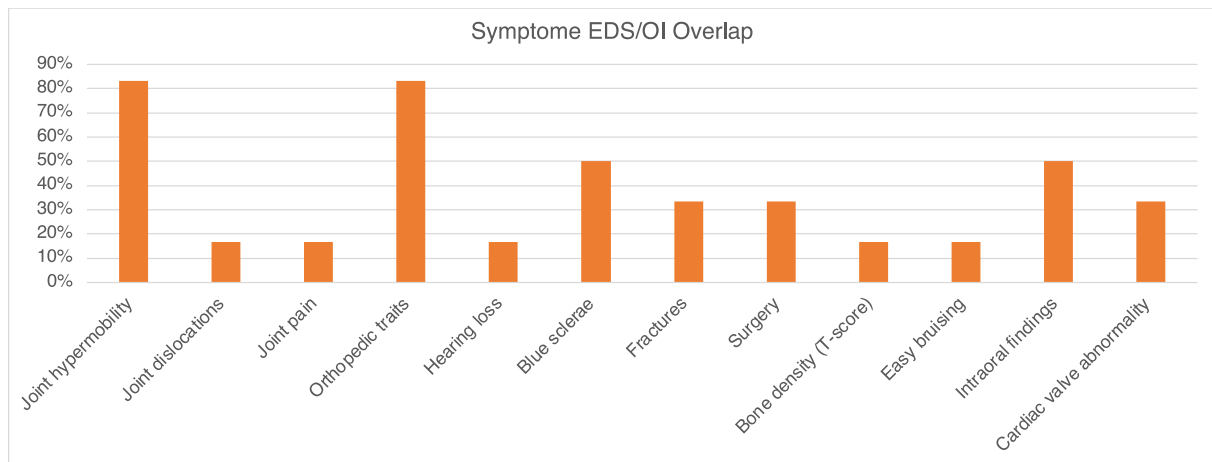


Abbildung 10: Prozentuale Symptomverteilung des OI/EDS Overlap Syndroms

Ein Beispiel einer Mutation in der  $\alpha 2(I)$ -Kette zeigt einen PatientIn (*Fallbeispiel 7*) mit einer Mutation im Intron 33 zwischen Exon 33 und 34 an der Position c.2026-2A>G, die zu einem fehlerhaften Spleißen führt. Ebenso wäre auf molekularer Ebene alternativ der Verlust von Exon 34 (Exon skipping), der Einschluss von Intron 33 (intron inclusion) oder die Verwendung einer kryptischen Spleißstelle möglich. Es wird hierbei entweder die mRNA instabil oder es bildet sich ein mutiertes, nicht-funktionelles pro $\alpha 1(I)$ -Molekül.

Der PatientIn präsentierte sich mit einem OI/EDS-Overlap-Syndrom mit klinischen Symptomen einer Dentinogenesis Imperfecta, hyperelastischer Haut, moderater Gelenksüberbeweglichkeit, Kyphoskoliose sowie bläulich/gräulichen Skleren. Eine biochemische Fibroblasten Analyse des Kollagen des PatientIn sowie des Vaters des PatientIn mit identer Mutation zeigt, dass die beschriebene Mutation in der Zelllinie der Fibroblasten zu einer Haploinsuffizienz des Typ-I-Kollagen führt.

Bisher existieren in der Literatur keine Publikationen zu dieser Variante.

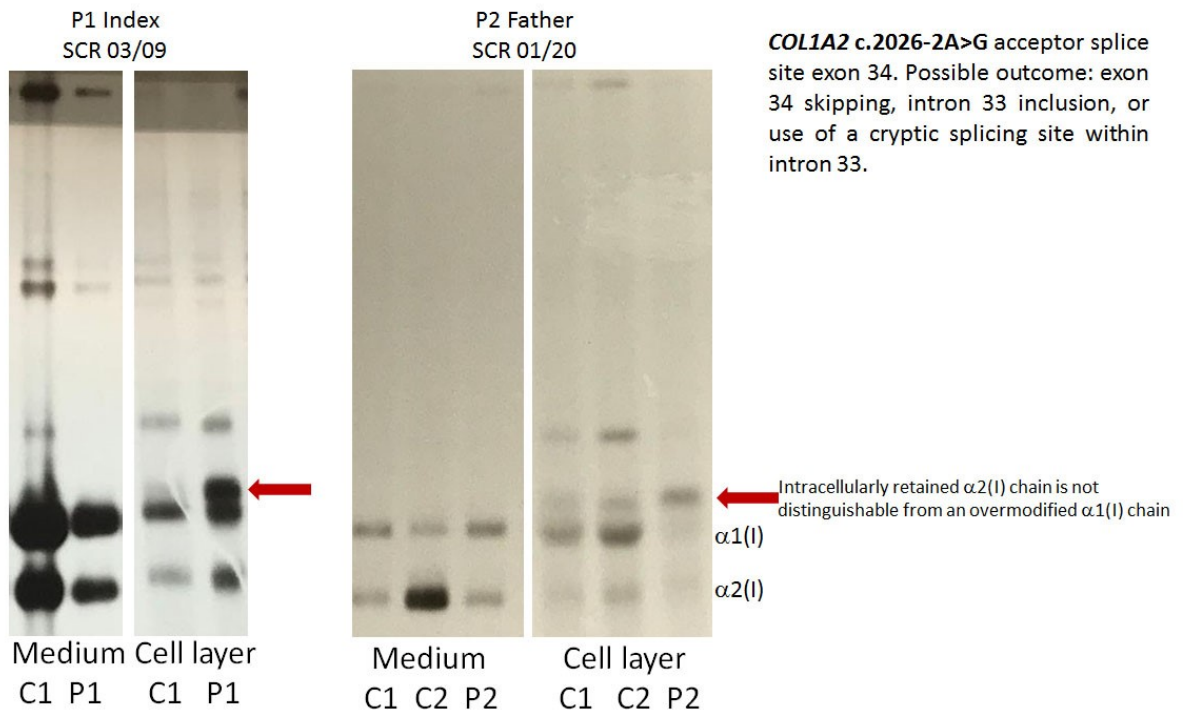


Abbildung 11: Fallbeispiel 7, Gelelektrophorese. OI/EDS Overlap Syndrom. PatientIn P1 und PatientIn P2 (Kindsvater). In einer biochemischen Analyse des Kollagen aus Fibroblasten zeigt sich bei P1 ein normaler Anteil der Kollagene I:III:IV im Kulturmedium (medium). In der Zellschichtfraktion (cell layer) zeigt sich bei P1 jedoch eine Verminderung der Intensität der korrespondierenden Bande der  $\alpha 1(I)$ -Kette vergleichbar mit der Intensität der  $\alpha 2(I)$ -Kette, aufgrund der Anwesenheit einer zusätzlichen  $\alpha 1(I)$ -Kette. In der Mediumfraktion fehlt diese helle Bande, was darauf rückschließen lässt, dass die übermodifizierte  $\alpha 1(I)$ -Kette in der Zelle retiniert wird.

In der elektrophoretischen Mobilität zeigt sich eine starke Verminderung der übermodifizierten und intrazellulär retinierten  $\alpha 1(I)$ -Kette.

Ein weiteres Fallbeispiel (*Fallbeispiel 8*) zeigt eine Familie (Familie 5), welche sich mit einer heterozygoten Mutation in *COL1A2* im Exon 8 an der Position c.335G>T (p.Gly112Val) präsentiert. Diese führt zu einem Austausch der Aminosäuren Glycin zu Valin und ruft eine Missense-Mutation hervor. Insgesamt sind 3 Individuen Teil dieser Auswertung. Die Geschlechterverteilung zeigt sich mit 66.67% (N=2) weiblich und mit 33.33% (N=1) männlich. Alle Individuen haben die bestätigte klinische Diagnose eines OI/EDS-Overlap-Syndrom. Die am häufigsten auftretenden klinischen Symptome in mindestens einer Lebensperiode sind mit 100% (N=3): Gelenkshypermobilität, Orthopädische Veränderungen und Blaue Skleren. Weiters treten in mindestens einer Lebensperiode Frakturen sowie Operationen aufgrund

von Frakturen mit einer Häufigkeit von 66.67% (N=2) auf. Die Schweregradeinteilung aufgrund von Frakturen zeigt sich wie folgt: 66.67% (N=2) mit mildem Typ und 33.33% (N=1) mit moderatem Typ. 33.33% (N=1) zeigt sich mit Frakturen (<5 ohne adäquates Trauma) bereits in der Neonatalperiode.

Keiner der Patienten weist klinische Symptome von Gelenkdislokationen/-schmerzen, Kleinwuchs, Deformitäten der langen Röhrenknochen, Hörminderung, verminderte Knochendichte, Hämatomneigung oder Arachnodaktylie auf.

Ein Familienmitglied ist Teil einer Publikation von Morlino et al. aus 2020 <sup>84</sup>, welche sich mit der neuen Klassifikation eines OI/EDS-Overlap-Syndrom beschäftigt. Hier wurden 21 Individuen aus 13 Familien untersucht, in welchen, nach vermutetem EDS, Mutationen in *COL1A1* und *COL1A2* gefunden wurden. Die Individuen konnten weder als definitive OI, noch als eine der drei bisher klassifizierten EDS Varianten zugeordnet werden.

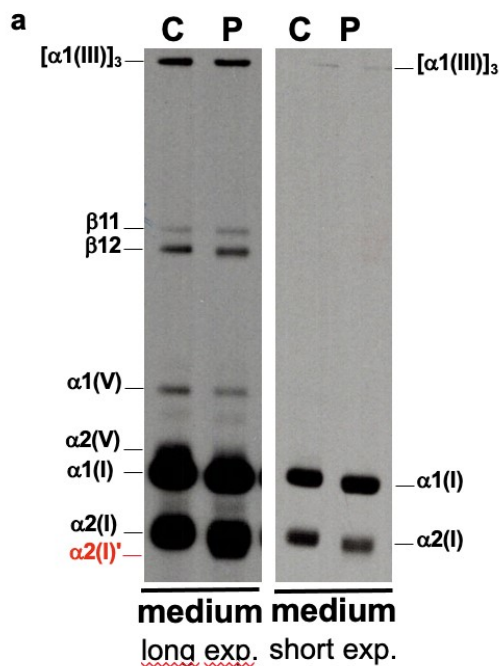


Abbildung 12: Familie 5, P (PatientIn), Kollagen Biochemische Analyse eines Familienmitglieds der Familie 5. Es zeigt sich die Präsenz einer verbreiterten  $\alpha 2(I)$ -Bande und schnellerer elektrophoretischer Migration der  $\alpha 2(I)$ -und  $\beta 1,2$ -Ketten des Kollagen Typ I. Dies weist auf eine anders modifizierte  $\alpha 2(I)$ -Kollagen-Kette und modifiziertes Kollagen hin <sup>84</sup>.

## 4. Diskussion

### 4.1. Interpretation der Ergebnisse

Osteogenesis Imperfecta stellt eine seltene, klinisch äußerst variable Erkrankung dar. Bis heute konnte keine eindeutige Genotyp-Phänotyp-Korrelation detektiert werden. Ziel dieser Arbeit ist es, Daten von betroffenen PatientInnen mit diagnostizierter OI bzw. OI/EDS-Overlap-Syndrom bezüglich klinischem und genetischem Phänotyp auszuwerten und zu analysieren, um eine mögliche Korrelation zu identifizieren sowie den interfamiliären klinischen Phänotyp miteinander zu vergleichen. Hierzu wurde die Arbeit in mehrere Teile gegliedert und mit bereits vorhandener Literatur und Datenbanken verglichen.

#### 4.1.1. Intrafamiliärer Vergleich in *COL1A1* und *COL1A2*<sup>^</sup>

Es zeigt sich in dieser Arbeit, wie in der Publikation von Marini et al.<sup>11</sup> bereits beschrieben, dass Glycin-Substitutionen in der  $\alpha 1(I)$ -Kette der Triple Helix-Domäne eher zu einem letalen OI-Typ-II führen als jene in der  $\alpha 2(I)$ -Kette.

Weiters lässt sich auch in dieser Arbeit ein unterschiedliches Muster der Genotyp-Phänotyp Zusammenhänge in Bezug auf die  $\alpha 1(I)$ - und  $\alpha 2(I)$ -Kette erkennen. In der  $\alpha 1(I)$ -Kette zeigen sich Glycin-Substitutionen im Bereich des N-Terminalen-Ende der Triple-Helix alle mit nicht-letalem OI-Typ. Alle PatientInnen mit Mutationen in dieser Region aus Kohorte 1 präsentieren sich mit einem klinischen milden OI-Typ-I. Respektive präsentieren sich alle PatientInnen mit Glycin-Substitutionen im Bereich des C-Terminalen-Ende der Triple-Helix mit schwerem bis letalem OI-Typ-II oder -IV.

Es wurde ein PatientIn aus Kohorte 1 mit letaler OI-Typ-II identifiziert, welcher sich sehr nahe jener, durch Marini et al.<sup>11</sup> definierten letalen Region 910-964, befindet. In dieser Region sowie einer vorangestellten Region 691-823 treten fast ausschließlich letale Mutationen auf. Diese Regionen korrelieren mit zwei der drei Major Ligand Binding Regions“: MLBR2 und MLBR3, welche wahrscheinlich eine wichtige Rolle für die Kollagen-Anordnung, Matrix Metalloproteinasen (MMPs), Fibronectin und Integrin-Bindungsstellen spielen. Die MLBR1 befindet sich am N-terminalen Ende der Triple-Helix, hier sind die meistem Glycin-Substitutionen nicht letal<sup>11</sup>.

Im Vergleich hierzu findet sich die perinatal letale OI-Typ-II Glycin-Substitution in der  $\alpha 2(I)$ -Kette in der Mitte der Triple-Helix. Fälle mit klinisch schwerer OI zeigen kein vermehrtes Auftreten im Bereich des N-Terminalen-Ende bzw. C-Terminalen-Ende, sondern zeigen sich verteilt auf die gesamte Triple-Helix. Es zeigt sich ein vermehrtes Auftreten von OI/EDS-Overlap-Syndrom im Bereich des N-Terminalen-Ende der Triple-Helix.

#### **4.1.1.1. Glycin Substitutionen COL1A1**

Bereits in einer von Marini et al. veröffentlichten Publikation aus 2007 <sup>11</sup> zeigt sich, dass, mit wenigen Ausnahmen, der Großteil seiner Kohorte mit Glycin-Substitutionen in *COL1A1* im Bereich des N-Terminalen Ende der Triple-Helix-Kette mit einem nicht-letalen klinischen Phänotyp assoziiert ist. Der generelle Schweregrad des klinischen Phänotyps bei Glycin-Substitutionen entlang der  $\alpha 1(I)$  Kette verläuft nicht linear mit einer Zunahme des klinischen Schweregrads vom N-terminalen zum C-terminalen Ende der Triple-Helix. Ebenso lassen sich letale Formen der OI nicht in Clustern entlang der Kette identifizieren <sup>11</sup>.

Byers et al. <sup>14</sup> schreibt in einer Publikation aus 1991, dass Glycin-Substitutionen der Triple-Helix der  $\alpha 1(I)$  Kette zu einem schweren klinischen Phänotyp führen, je näher sie sich am C-Terminalen Ende befinden, sowie einen mildem Phänotyp hervorrufen, wenn sie sich N-Terminalen Ende befinden.

In Kohorte 1 zeigt sich, dass PatientInnen mit Glycin-Substitutionen im Bereich des N-Terminalen-Ende alle einen milden OI-Typ-I aufweisen, während Patienten mit Glycin Substitutionen im Bereich des C-Terminalen-Ende einen schweren bis letalen OI-Typ II bzw. IV. aufweisen.

Die Typ-I Kollagen-Fibrille lässt sich in drei MLBR unterteilen: MLBR1, MLBR2 und MLBR3. Die Region MLBR2 erstreckt sich von der helikalen Position 682-830 und enthält wichtige Regionen für die Kollagen-Anordnung, Spaltung durch MMPs, Fibronectin, und Integrin-Bindungsstellen. MLBR3 erstreckt sich von der helikalen Position 920 bis zum Ende der helikalen Region. Es konnten hier Abschnitte der helikalen Position 691-823 sowie 910-964 nachgewiesen werden, in welchen laut

Marini et al. <sup>11</sup> nur letale Substitutionen identifiziert wurden. Dies korreliert mit den MLBR2 und MLBR3 <sup>11,85</sup>.

*Fallbeispiel 1* zeigt einen perinatal letalen OI-Typ-II, welcher sich Nahe der nach Marini et al. definierten Region 910-964 befindet <sup>11,81</sup>.

Die Rolle des Marfan-Gens in der Beeinflussung des Phänotyps bei diesem Patienten ist unklar, eine Vererbung dieser Mutation von der Kindsmutter an den Patienten wurde jedoch auch nicht belegt.

Ein Erklärungsmodell des schwerwiegenden Phänotyps dieses Patienten von Steinmann et al. <sup>82</sup> im Jahr 1983 beruht auf einer Verkürzung der Länge der Triple-Helix von Kollagen-Typ-I. Durch die Substitution von Cystein anstelle von Glycin entsteht ein lokaler Verlust in der Triple-Helix und sie wird in zwei verkürzte Domänen unterteilt. Dies kann einen niedrigeren Schmelzpunkt zur Folge haben. Weiters beschreibt diese Publikation, dass der Effekt einer einzelnen Glycin-Substitution wahrscheinlich abhängig von der Lokalisation in der Triple-Helix sowie der betroffenen Kette ist. Eine weitere Hypothese ist, dass ein abnormes Molekül in der ECM die Aggregation mit Umwandlung von Prokollagen in Kollagen stören kann sowie die Stabilisierung der Fibrillen beeinträchtigt <sup>82</sup>.

*Fallbeispiel 2* zeigt einen Patienten mit einer heterozygoten Glycin-Substitution im Signalpeptid mit perinatal letaler OI-Typ-II. In zwei Publikationen wurden bereits PatientInnen mit identischer Mutation mit OI-Typ-II sowie OI-Typ-III identifiziert <sup>86,87</sup>.

Signal-Peptide bestehen aus einem hydrophoben Kern, wodurch das Protein-Targeting während der Translation ermöglicht wird. Sie enthalten ebenso eine Spaltstelle, welche den Austritt des Proteins aus der Membranpore ermöglicht. Für eine suffiziente Spaltung werden kleine Aminosäuren wie Alanin, Glycin und Serin an der -1 Position der Spaltstelle benötigt. Das Signal-Peptid spielt keine Rolle bei der Triple-Helix-Faltung/Prozessierung und ist kein Teil der Kollagenfibrillen in der ECM.

In anderen Studien, welche sich mit Signal-Peptid-Mutationen in verschiedenen Genen beschäftigten, konnten ebenso pathologische Veränderungen gezeigt werden. Mutationen in *COL5A1* (klassisches EDS) zeigten beispielsweise, dass Mutationen in hydrophoben Regionen zu einem Protein Defizit führen, während Mutationen an

der Spaltstelle, wie beispielsweise *COL10A1* (Metaphysäre Dysplasie Typ Schmid) oder Insulin (Diabetes), mit ER Stress assoziiert sind <sup>83,88-90</sup>.

Zusammenfassend schlussfolgert die Publikation von Lindert et al.<sup>83</sup>, dass eine Akkumulation von ungefalteten Proteinen sowie ER Stress zu einem schwereren OI-Krankheitsbild führen kann.

*Fallbeispiel 3* zeigt einen PatientenIn mit einer heterozygoten Glycin-Substitution im Bereich des C-Terminalen-Ende der Triple-Helix mit moderater bis schwerer OI-Typ-IV. Die Variante wurde schon mehrfach beschrieben und zeigt sich assoziiert mit OI-Typ-I, OI-Typ-III, OI-Typ-IV und OI mit normalen Skleren <sup>91</sup>. In einer Publikation von Ho Duy et al.<sup>92</sup> zeigten sich 4 PatientInnen mit identer Variante, welche alle einen ähnlichen klinischen Phänotyp mit OI-Typ-I oder OI-Typ-IV aufweisen.

In der „Osteogenesis Imperfecta Variant Database“ finden sich 31 beschriebene pathogene idente Mutationen mit unterschiedlichen klinischen Phänotypen <sup>93</sup>.

#### **4.1.1.2. Glycin Substitutionen COL1A2**

Gleiche Glycin Substitutionen in der  $\alpha 2(I)$ -Kette weisen in der Publikation von Marini et al <sup>11</sup> in unterschiedlichen Familien häufiger einen übereinstimmenden Phänotyp auf als in der  $\alpha 1(I)$ -Kette. Weiters zeigt sich in dieser Publikation, dass die letalen Glycin-Substitutionsmutationen der  $\alpha 2(I)$ -Kette im Gegensatz zu jenen der  $\alpha 1(I)$ -Kette in Clustern auftreten, welche sich über 2/3 der Kette verteilen. Diese Cluster-Regionen spielen eine wichtige Rolle bei der Bindung von Proteoglykanen und somit bei der Interaktion der Kollagenfibrillen mit anderen Molekülen der ECM.

Bedeutend für den klinischen Phänotyp ist hier die Lokalisation der Mutation und nicht die ausgetauschte Aminosäure. Die Cluster treten vor allem in Regionen auf, welche sich als entscheidende Domänen für die Interaktion der Proteoglykane mit Kollagenfibrillen zeigen. Kein Patient aus Kohorte 2 mit nicht-letalem OI-Typ befindet sich in einer der acht von Marini et al. definierten Cluster Region <sup>11</sup>.

*Fallbeispiel 4* zeigt einen PatientenIn mit letaler OI-Typ-II verursacht durch eine Glycin Substitution. Die Mutation lässt sich anhand der Clustereinteilung nach Marini et al. Cluster 2 zuordnen <sup>11</sup>. In der Literatur und den Datenbanken sind keine weiteren Fälle mit identer Mutation beschrieben.

*Fallbeispiel 5* zeigt einen PatientIn mit Glycin-Substitution mit einem schweren OI-Typ-III. Im Paper von Marini et al.<sup>11</sup> zeigen sich 6 Fälle mit identischer Mutation mit ebenso einem klinisch schweren Phänotyp mit OI-Typ-III, 2 Fälle mit OI-Typ-II/III und 1 Fall mit OI-Typ-IV. In den Datenbanken existieren keine weiteren publizierten Fälle betreffend dieser Mutation.

*Fallbeispiel 6* zeigt einen PatientenIn mit schwerer OI-Typ-III verursacht durch eine Glycin-Substitution. Es handelt sich um eine Hot-Spot Region mit Austausch einer hoch-konservierten Aminosäure<sup>94</sup>.

Eine ähnliche Mutation an identer Lokalisation wurde bereits in der Literatur beschrieben: *COL1A2* c.2314G>A (p.Gly772Ser). Der betroffene PatientIn zeigt eine schwere Dentinogenesis Imperfecta mit Verlust aller Zähne bis zum 20. Lebensjahr sowie weitere OI-Merkmalen wie beispielsweise erhöhte Frakturrate, verminderte Knochendichte und Kleinwuchs<sup>95</sup>.

Dies zeigt sich ähnlich zu den Symptomen, welche bei Fallbeispiel 6 beschrieben wurden.

#### **4.1.2. Interfamiliärer Vergleich in COL1A1 und COL1A2**

##### **4.1.2.1. Familie 1**

Familie 1 präsentiert sich mit einer Glycin zu Serin Substitution und daraus folgend einer Missense-Mutation. In der genetischen Datenbank Varsome wird die Variante nach ACMG Klassifikation als „pathogen“ eingestuft. Es zählt als Hot-Spot-Region mit einer Länge von 17 Aminosäuren mit 15 Missense-/Inframe Varianten. Die betroffene Position gilt als hoch-konserviert. Ebenso wurden zwei pathogene alternative Varianten bereits identifiziert: chr17:50196180C>T (Gly326Asp); chr17:50196181C>G (Gly326Arg). Es existieren aktuell keine Publikationen bezüglich dieser Variante<sup>96</sup>.

In Familie 1 führt die Variante bei allen Individuen zu einer Osteogenesis Imperfecta vom Sillence-Typ-I. Alle Mitglieder der Familie 1 präsentieren sich mit einem milden klinischen Phänotyp. Bezüglich der Frakturrate zeigen alle Individuen ein Auftreten von erhöhter Knochenbrüchigkeit erst ab der Lebensperiode „Kindheit“. Die

Schweregradeinteilung der Frakturen zeigt sich bei der Mehrheit der Familienmitglieder, 66.67% (N=2), moderat. Ein Familienmitglied weist einen milden Schweregrad auf.

Eine Deformität der langen Röhrenknochen tritt bei 66.67% (N=2) bereits antenatal auf. Bezüglich des klinischen Phänotyps, insbesondere mit Augenmerk auf den Sillence-Typ, Frakturhäufigkeit und Deformität der langen Röhrenknochen weisen die Familienmitglieder eine ähnliche Krankheitsausprägung auf. Vergleiche in Bezug auf andere Individuen mit identischer Mutation können aufgrund von fehlender Datenlage nicht gezogen werden.

#### **4.1.2.2. Familie 2**

Familie 2 präsentiert sich mit einer Glycin zu Serin Substitution und daraus folgend einer Missense Mutation. In der genetischen Datenbank Varsome wird die Variante nach ACMG Klassifikation als „pathogen“ eingestuft <sup>97</sup>. In der „Osteogenesis Imperfecta Variant Database“ betreffend dieser Variante finden sich 19 verschiedene Einträge zu identen Mutationen, welche eine Assoziationen mit OI Typ-I,-II,-III und Typ-IV zeigen <sup>98</sup>.

Die betroffene Position gilt als hoch-konserviert. Und es wurden ebenso 2 pathogene alternative Varianten identifiziert: chr17:50194032 C>A (Gly560Cys); chr17:50194032 C>G (Gly560Arg) <sup>97</sup>.

In eine Publikation von Marini et al <sup>11</sup> konnte gezeigt werden, dass eine Substitution mit Arginin zu einem letalen OI-Typ-II führt, während Serin Substitutionen an identer Stelle zu einer OI-Typ-I, -III und -IV führen, sowie Cystin Substitutionen an identer Stelle zu einer OI-Typ-IV führen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Substitution eines einzelnen Glycins durch eine andere Aminosäure bei unterschiedlichen Individuen zu letaler und nicht-letaler Form der OI führen kann.

In Familie 2 führt die Variante bei 2 Individuen zu einer OI Sillence-Typ-I/IV sowie bei einem Individuum zu einer OI-Typ-IV. Der klinische Phänotyp zeigt sich bei den Familienmitgliedern unterschiedlich stark ausgeprägt von mildem bis hin zu schwerem klinischen Phänotyp. Eine Genotyp-Phänotyp Korrelation kann hier nicht gezeigt werden.

#### **4.1.2.3. Familie 3**

Familie 3 präsentiert sich mit einer Gylcin zu Arginin Substitution und daraus folgend einer Missense Mutation.

In der genetischen Datenbank Varsome wird die Variante nach ACMG Klassifikation als „pathogen“ eingestuft. Bisher existieren keine Publikationen bezüglich der identen Variante. Die betroffene Position gilt als hoch-konserviert.

Es wurde bereits 1 pathogene alternative Varianten identifiziert: chr7:94406278 (Gly190Glu), welche durch ClinVar als „likely pathogenic“ eingestuft wird <sup>99</sup>.

In Familie 3 führt die Variante bei allen Individuen zu einer Osteogenesis Imperfecta vom Sillence-Typ-IV. Alle Mitglieder der Familie 1 präsentieren sich mit einem moderaten klinischen Phänotyp. Bezüglich der Frakturrate zeigen alle Individuen ein Auftreten von erhöhter Knochenbrüchigkeit erst ab der Lebensperiode „Säuglingsalter“. Die Schweregradeinteilung der Frakturen zeigt sich bei allen Familienmitglieder moderat. Im Zusammenschau der Symptome und des Schweregrades weist die Familie 3 eine ähnliche phänotypische Krankheitsausprägung auf. Vergleiche in Bezug auf andere Individuen mit identischer Mutation können aufgrund von fehlender Datenlage nicht gezogen werden.

#### **4.1.2.4. Familie 4**

Familie 4 präsentiert sich mit einer Gylcin zu Glutamin Substitution und daraus folgend einer Missense Mutation.

In der genetischen Datenbank Varsome wird die Variante nach ACMG-Klassifikation als „pathogen“ eingestuft. Es zählt als Hot-Spot-Region mit einer Länge von 17 Aminosäuren mit 13 Missense-/Inframe Varianten. Die betroffene Position gilt als hoch-konserviert. Ebenso wurden zwei pathogene alternative Varianten bereits identifiziert: chr7:94409741 (Gly319Arg); chr7:94409741 (Gly319Arg). Es existieren aktuell keine Publikationen bezüglich dieser Variante <sup>100</sup>.

In Familie 4 führt die Variante bei allen Individuen zu einer Osteogenesis Imperfecta. Bei 2 Individuen zu einer OI Sillence-Typ-IV sowie bei einem Individuum zu einer OI-Typ-I. Alle Mitglieder der Familie 4 präsentieren sich mit einem milden bis moderaten klinischen Phänotyp. Bezüglich der Frakturrate zeigt keines der Individuen ein Auftreten von erhöhter Knochenbrüchigkeit vor der Lebensperiode „Kindheit“. Die

Schweregradeinteilung der Frakturen zeigt sich bei der Mehrheit der Familienmitglieder, 66.67% (N=2) mild. Ein Familienmitglied weist einen moderaten Schweregrad auf.

Bezüglich des klinischen Phänotyps, insbesondere mit Augenmerk auf den Sillence-Typ, Frakturhäufigkeit und Deformität der langen Röhrenknöchel weisen die Familienmitglieder eine unterschiedliche Krankheitsausprägung auf, ein Individuum präsentiert sich mit stärkerer Krankheitsausprägung. Vergleiche in Bezug auf andere Individuen mit identischer Mutation können aufgrund von fehlender Datenlage nicht gezogen werden.

#### **4.1.3. OI/EDS-Overlap-Syndrom**

Malfait et al. veröffentlichte eine Hypothese, dass OI/EDS-Overlap-Syndrome häufig im Bereich Nahe des N-Terminals Propeptids der  $\alpha 1(I)$  und  $\alpha 2(I)$ -Ketten auftreten<sup>84,101</sup>. Dies konnte in der Publikation von Morlino et al.<sup>84</sup> ebenso, mit vereinzelt Ausnahmen, in einem kleinen Patientengut bestätigt werden.

In unserer Gesamtkohorte zeigt sich, dass 50% (N=3) der PatientInnen mit OI/EDS-Overlap-Syndrom Mutationen im Bereich Nahe des N-Terminals-Ende der Triple-Helix vorweisen.

##### **4.1.3.1. Fallbeispiel 7**

Fallbeispiel 7 zeigt einen PatientenIn mit einer Mutation im Intron, welche in fehlerhaftem Spleißen resultiert. Der genaue Pathomechanismus ist nicht verstanden und ebenso wäre ein Exon-Skipping von Exon 34, Intron-Inclusion von Intron 33 oder die Verwendung einer kryptischen Spleißstelle möglich. Klinisch präsentiert sich die Patientin vor allem mit Symptomen einer Dentinogenesis Imperfecta sowie Kyphoskoliose. Ein weiteres Familienmitglied präsentiert sich ebenso mit identer Mutation und Dentinogenesis Imperfecta. In der „Osteogenesis Imperfecta Variant Database“ sowie „Varsome“ sind keine weiteren identen Varianten gelistet.

##### **4.1.3.2. Familie 5**

Familie 5 präsentiert sich mit einer Glycin zu Valin Substitution und daraus folgend einer Missense Mutation.

In der genetischen Datenbank Varsome wird die Variante nach ACMG-Klassifikation als „pathogen“ eingestuft. Die betroffene Position gilt als hoch-konserviert.

Bisher existieren keine Publikationen bezüglich der identen Variante.

Es wurden bereits 2 pathogene alternative Varianten identifiziert: chr7:94404702 G>A(Gly112Ser); chr7:94404703G>A (Gly112Asp) <sup>100</sup>.

Die Variante führt bei allen Individuen der Familie 4 zu einem OI/EDS-Overlap-Syndrom. Klinisch präsentieren sich die Familienmitglieder mit einem ähnlichen Krankheitsbild.

Morlino et al. publizierte 2013 <sup>84</sup> 21 Familien mit 13 Mutationen mit pathogenen Varianten in *COL1A1* und *COL1A2*. Bei allen Familien war der initiale Verdacht auf ein EDS aufgrund ihrer Bindegewebssymptome. Es wurden jedoch bei allen Familien Varianten in Genen detektiert, welche primär mit OI assoziiert sind. Ein Mitglied der Familie 5 ist Teil dieser Publikation. In der Untersuchung der Fibroblasten jenes PatientenIn konnte gezeigt werden, dass die ECM-Zusammensetzung und Integrin-Expression bei unserem PatientenIn größere Ähnlichkeit zu EDS-Kontrollen aufwies, als zu OI Kontrollen.

Es sind keine weiteren identen Varianten in den Datenbanken (Varsome, Osteogenesis Imperfecta Variant Database) aufgelistet, daher können keine weiteren Vergleiche bezüglich Genotyp-Phänotyp Korrelation gezogen werden.

## 4.2. Fazit

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit versucht anhand von 31 PatientInnen mit diagnostizierter Osteogenesis Imperfecta bzw. Osteogenesis Imperfecta/Ehlers Danlos-Overlap-Syndrom eine mögliche Genotyp-Phänotyp-Korrelation auszuwerten und zu analysieren. Hierzu wurden einerseits prediction Algorithmen (Varsome, ClinVar), OI-Datenbanken (Osteogenesis Imperfecta Variant Database) verwendet, als auch Publikationen bezüglich identer bzw. ähnlicher Varianten herangezogen.

Es zeigt sich in dieser Arbeit, dass Glycin-Substitutionen in der  $\alpha 1(I)$ -Kette der Triple Helix-Domäne eher zu einem letalen OI-Typ-II führen als jene in der  $\alpha 2(I)$ -Kette.

Alle PatientInnen mit Glycin-Substitutionen in *COL1A1* im Bereich des N-Terminalen Ende der Triple-Helix-Kette sind mit einem milden OI-Typ-I assoziiert ist, während Glycin-Substitutionen im Bereich des C-Terminalen-Ende der Triple-Helix-Kette mit einem schweren-letalen OI-Typ-II oder -IV assoziiert sind.

Im Gegensatz hierzu zeigt sich, dass der klinische Schweregrad der Glycin-Substitutionen in der  $\alpha 2(I)$ -Kette nicht mit einem gehäuften Auftreten im Bereich des N- oder C-Terminalen-Ende der Triple-Helix assoziiert ist, sondern zufällig im gesamten Bereich der Triple-Helix auftritt.

Es zeigt sich weiters, dass die Hälfte aller OI/EDS-Overlap-Syndrome im Bereich des N-Terminalen-Ende der Triple-Helix auftritt.

Die häufigsten klinischen Symptome, die in einer bis allen der sechs Lebensperioden auftreten, waren in Mutationen der  $\alpha 1(I)$ -und  $\alpha 2(I)$ -Kette identisch mit Frakturen, Orthopädische Merkmalen sowie Blaue Skleren.

Im Gegensatz hierzu zeigte sich die Subgruppe des OI/EDS-Overlap-Syndrom mit unterschiedlicher Symptomatik. Hier sind die häufigsten klinischen Symptome, welche in mindestens einer Lebensperiode auftreten, Gelenkshypermobilität und Orthopädische Merkmale. Frakturen treten nur in einem kleinen Teil der Patientensubgruppe auf.

Innerhalb der Familien zeigen sich unterschiedliche phänotypische Ausprägungen trotz identer Mutation. Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation kann hier in den meisten Fällen nicht gezogen werden.

Bei der Auswertung zeigen sich einige Limitationen:

Bei einem sehr kleinen Patientengut lassen sich keine statistischen Signifikanzen berechnen. Ergebnisse können nur als prozentualer Anteil an der kleinen Gesamtpopulation ausgewertet werden. Bei einigen PatientInnen war wenig klinische Information zugänglich, was zu einer insignifikanten Korrelation zwischen bestimmten Genotypen und Phänotypen führt.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass hiermit einige bereits vorhandene Hypothesen zur Genotyp-Phänotyp Korrelation unterstützt werden können, für eine genauere und detaillierte Auswertung und Prognose allerdings eine größere Kohorte notwendig wäre.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Etich J, Lessmeier L, Rehberg M, et al. Osteogenesis imperfecta-pathophysiology and therapeutic options. *Mol Cell Pediatr* 2020;7(1):9. DOI: 10.1186/s40348-020-00101-9.
2. Speer CP, Gahr M, Dötsch Jr. Pädiatrie. 5th ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2018.
3. Martin E, Shapiro JR. Osteogenesis imperfecta:epidemiology and pathophysiology. *Curr Osteoporos Rep* 2007;5(3):91-7. DOI: 10.1007/s11914-007-0023-z.
4. Phillipi CA, Remington T, Steiner RD. Bisphosphonate therapy for osteogenesis imperfecta. *Cochrane Database Syst Rev* 2008(4):CD005088. DOI: 10.1002/14651858.CD005088.pub2.
5. Kliegman RM. Nelson textbook of pediatrics. 21st edition. ed. Philadelphia, MO: Elsevier, 2019.
6. Österreich ÖG. Orphan Diseases. (<https://www.gesundheit.gv.at/lexikon/O/seltene-erkrankungen.html>).
7. Marini JC, Cabral WA, Barnes AM, Chang W. Components of the collagen prolyl 3-hydroxylation complex are crucial for normal bone development. *Cell Cycle* 2007;6(14):1675-81. DOI: 10.4161/cc.6.14.4474.
8. Barnes AM, Chang W, Morello R, et al. Deficiency of cartilage-associated protein in recessive lethal osteogenesis imperfecta. *N Engl J Med* 2006;355(26):2757-64. DOI: 10.1056/NEJMoa063804.
9. Morello R, Bertin TK, Chen Y, et al. CRTAP is required for prolyl 3- hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta. *Cell* 2006;127(2):291-304. DOI: 10.1016/j.cell.2006.08.039.
10. Marini JC, Forlino A, Bachinger HP, et al. Osteogenesis imperfecta. *Nat Rev Dis Primers* 2017;3:17052. DOI: 10.1038/nrdp.2017.52.
11. Marini JC, Forlino A, Cabral WA, et al. Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Hum Mutat* 2007;28(3):209-21. DOI: 10.1002/humu.20429.
12. Prockop DJ, Constantinou CD, Dombrowski KE, et al. Type I procollagen: the gene-protein system that harbors most of the mutations causing osteogenesis imperfecta and probably more common heritable disorders of connective tissue. *Am J Med Genet* 1989;34(1):60-7. DOI: 10.1002/ajmg.1320340112.
13. Sykes B. The molecular genetics of collagen. *Bioessays* 1985;3(3):112-7. DOI: 10.1002/bies.950030306.
14. Byers PH, Wallis GA, Willing MC. Osteogenesis imperfecta: translation of mutation to phenotype. *J Med Genet* 1991;28(7):433-42. DOI: 10.1136/jmg.28.7.433.
15. Bachinger HP, Davis JM. Sequence specific thermal stability of the collagen triple helix. *Int J Biol Macromol* 1991;13(3):152-6. DOI: 10.1016/0141-8130(91)90040-2.
16. Bachinger HP, Morris NP, Davis JM. Thermal stability and folding of the collagen triple helix and the effects of mutations in osteogenesis imperfecta on the triple helix of type I collagen. *Am J Med Genet* 1993;45(2):152-62. DOI: 10.1002/ajmg.1320450204.

17. Marini JC, Lewis MB, Wang Q, Chen KJ, Orrison BM. 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* 1993;268(4):2667-73. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8094076>).
18. Wang Q, Orrison BM, Marini JC. 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* 1993;268(33):25162-7. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7693712>).
19. Fratzl-Zelman N, Misof BM, Roschger P, Klaushofer K. Classification of osteogenesis imperfecta. *Wien Med Wochenschr* 2015;165(13-14):264-70. DOI: 10.1007/s10354-015-0368-3.
20. Horn F. *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium*: Thieme, 2012.
21. Rehberg M, Etich J, Leßmeier L, Sill H, Netzer C, Semler O. Osteogenesis imperfecta – Pathophysiologie und aktuelle Behandlungsstrategien. *Medizinische Genetik* 2020;31(4):372-382. DOI: 10.1007/s11825-020-00287-3.
22. Engel J, Prockop DJ. The zipper-like folding of collagen triple helices and the effects of mutations that disrupt the zipper. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 1991;20:137-52. DOI: 10.1146/annurev.bb.20.060191.001033.
23. Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci* 2005;118(Pt 7):1341-53. DOI: 10.1242/jcs.01731.
24. Ishikawa Y, Bachinger HP. A molecular ensemble in the rER for procollagen maturation. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833(11):2479-91. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.04.008.
25. Weis MA, Hudson DM, Kim L, Scott M, Wu JJ, Eyre DR. Location of 3-hydroxyproline residues in collagen types I, II, III, and V/XI implies a role in fibril supramolecular assembly. *J Biol Chem* 2010;285(4):2580-90. DOI: 10.1074/jbc.M109.068726.
26. Ishikawa Y, Wirz J, Vranka JA, Nagata K, Bachinger HP. Biochemical characterization of the prolyl 3-hydroxylase 1.cartilage-associated protein.cyclophilin B complex. *J Biol Chem* 2009;284(26):17641-7. DOI: 10.1074/jbc.M109.007070.
27. Marini JC, Cabral WA, Barnes AM. Null mutations in LEPRE1 and CRTAP cause severe recessive osteogenesis imperfecta. *Cell Tissue Res* 2010;339(1):59-70. DOI: 10.1007/s00441-009-0872-0.
28. Cabral WA, Chang W, Barnes AM, et al. Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. *Nat Genet* 2007;39(3):359-65. DOI: 10.1038/ng1968.
29. Pyott SM, Schwarze U, Christiansen HE, et al. Mutations in PPIB (cyclophilin B) delay type I procollagen chain association and result in perinatal lethal to moderate osteogenesis imperfecta phenotypes. *Hum Mol Genet* 2011;20(8):1595-609. DOI: 10.1093/hmg/ddr037.
30. van Dijk FS, Nesbitt IM, Zwikstra EH, et al. PPIB mutations cause severe osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2009;85(4):521-7. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.09.001.
31. Willaert A, Malfait F, Symoens S, et al. Recessive osteogenesis imperfecta caused by LEPRE1 mutations: clinical documentation and identification of the splice form responsible for prolyl 3-hydroxylation. *J Med Genet* 2009;46(4):233-41. DOI: 10.1136/jmg.2008.062729.

32. Baldridge D, Schwarze U, Morello R, et al. CRTAP and LEPRE1 mutations in recessive osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat* 2008;29(12):1435-42. DOI: 10.1002/humu.20799.
33. Bodian DL, Chan TF, Poon A, et al. Mutation and polymorphism spectrum in osteogenesis imperfecta type II: implications for genotype-phenotype relationships. *Hum Mol Genet* 2009;18(3):463-71. DOI: 10.1093/hmg/ddn374.
34. Colige A, Sieron AL, Li SW, et al. Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene. *Am J Hum Genet* 1999;65(2):308-17. DOI: 10.1086/302504.
35. Asharani PV, Keupp K, Semler O, et al. Attenuated BMP1 function compromises osteogenesis, leading to bone fragility in humans and zebrafish. *Am J Hum Genet* 2012;90(4):661-74. DOI: 10.1016/j.ajhg.2012.02.026.
36. Martinez-Glez V, Valencia M, Caparros-Martin JA, et al. Identification of a mutation causing deficient BMP1/mTLD proteolytic activity in autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat* 2012;33(2):343-50. DOI: 10.1002/humu.21647.
37. Lindahl K, Barnes AM, Fratzl-Zelman N, et al. COL1 C-propeptide cleavage site mutations cause high bone mass osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat* 2011;32(6):598-609. DOI: 10.1002/humu.21475.
38. Rubinato E, Morgan A, D'Eustacchio A, et al. A novel deletion mutation involving TMEM38B in a patient with autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *Gene* 2014;545(2):290-2. DOI: 10.1016/j.gene.2014.05.028.
39. Shaheen R, Alazami AM, Alshammari MJ, et al. Study of autosomal recessive osteogenesis imperfecta in Arabia reveals a novel locus defined by TMEM38B mutation. *J Med Genet* 2012;49(10):630-5. DOI: 10.1136/jmedgenet-2012-101142.
40. Volodarsky M, Markus B, Cohen I, et al. A deletion mutation in TMEM38B associated with autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *Hum Mutat* 2013;34(4):582-6. DOI: 10.1002/humu.22274.
41. Makareeva E, Leikin S. Procollagen triple helix assembly: an unconventional chaperone-assisted folding paradigm. *PLoS One* 2007;2(10):e1029. DOI: 10.1371/journal.pone.0001029.
42. Koide T, Asada S, Takahara Y, Nishikawa Y, Nagata K, Kitagawa K. Specific recognition of the collagen triple helix by chaperone HSP47: minimal structural requirement and spatial molecular orientation. *J Biol Chem* 2006;281(6):3432-8. DOI: 10.1074/jbc.M509707200.
43. Koide T, Nishikawa Y, Asada S, et al. Specific recognition of the collagen triple helix by chaperone HSP47. II. The HSP47-binding structural motif in collagens and related proteins. *J Biol Chem* 2006;281(16):11177-85. DOI: 10.1074/jbc.M601369200.
44. Ishikawa Y, Vranka J, Wirz J, Nagata K, Bachinger HP. The rough endoplasmic reticulum-resident FK506-binding protein FKBP65 is a molecular chaperone that interacts with collagens. *J Biol Chem* 2008;283(46):31584-90. DOI: 10.1074/jbc.M802535200.
45. Alanay Y, Avaygan H, Camacho N, et al. Mutations in the gene encoding the RER protein FKBP65 cause autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2010;86(4):551-9. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.02.022.
46. Christiansen HE, Schwarze U, Pyott SM, et al. Homozygosity for a missense mutation in SERPINH1, which encodes the collagen chaperone protein HSP47, results in

- severe recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2010;86(3):389-98. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.01.034.
47. Barnes AM, Cabral WA, Weis M, et al. Absence of FKBP10 in recessive type XI osteogenesis imperfecta leads to diminished collagen cross-linking and reduced collagen deposition in extracellular matrix. *Hum Mutat* 2012;33(11):1589-98. DOI: 10.1002/humu.22139.
  48. Drogemuller C, Becker D, Brunner A, et al. A missense mutation in the SERPINH1 gene in Dachshunds with osteogenesis imperfecta. *PLoS Genet* 2009;5(7):e1000579. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000579.
  49. Lindert U, Weis MA, Rai J, et al. Molecular Consequences of the SERPINH1/HSP47 Mutation in the Dachshund Natural Model of Osteogenesis Imperfecta. *J Biol Chem* 2015;290(29):17679-17689. DOI: 10.1074/jbc.M115.661025.
  50. Becker J, Semler O, Gilissen C, et al. Exome sequencing identifies truncating mutations in human SERPINF1 in autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2011;88(3):362-71. DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.01.015.
  51. Syx D, Ishikawa Y, Gebauer J, et al. Aberrant binding of mutant HSP47 affects posttranslational modification of type I collagen and leads to osteogenesis imperfecta. *PLoS Genet* 2021;17(2):e1009339. DOI: 10.1371/journal.pgen.1009339.
  52. Kelley BP, Malfait F, Bonafe L, et al. Mutations in FKBP10 cause recessive osteogenesis imperfecta and Bruck syndrome. *J Bone Miner Res* 2011;26(3):666-72. DOI: 10.1002/jbmr.250.
  53. van Dijk FS, Semler O, Etich J, et al. Interaction between KDELR2 and HSP47 as a Key Determinant in Osteogenesis Imperfecta Caused by Bi-allelic Variants in KDELR2. *Am J Hum Genet* 2020;107(5):989-999. DOI: 10.1016/j.ajhg.2020.09.009.
  54. Garbes L, Kim K, Riess A, et al. Mutations in SEC24D, encoding a component of the COPII machinery, cause a syndromic form of osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2015;96(3):432-9. DOI: 10.1016/j.ajhg.2015.01.002.
  55. Mendoza-Londono R, Fahiminiya S, Majewski J, et al. Recessive osteogenesis imperfecta caused by missense mutations in SPARC. *Am J Hum Genet* 2015;96(6):979-85. DOI: 10.1016/j.ajhg.2015.04.021.
  56. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med* 2013;19(2):179-92. DOI: 10.1038/nm.3074.
  57. Faqeih E, Shaheen R, Alkuraya FS. WNT1 mutation with recessive osteogenesis imperfecta and profound neurological phenotype. *J Med Genet* 2013;50(7):491-2. DOI: 10.1136/jmedgenet-2013-101750.
  58. Laine CM, Joeng KS, Campeau PM, et al. WNT1 mutations in early-onset osteoporosis and osteogenesis imperfecta. *N Engl J Med* 2013;368(19):1809-16. DOI: 10.1056/NEJMoa1215458.
  59. Pyott SM, Tran TT, Leistriz DF, et al. WNT1 mutations in families affected by moderately severe and progressive recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2013;92(4):590-7. DOI: 10.1016/j.ajhg.2013.02.009.
  60. van Noort M, Meeldijk J, van der Zee R, Destree O, Clevers H. Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin. *J Biol Chem* 2002;277(20):17901-5. DOI: 10.1074/jbc.M111635200.
  61. Willert K, Nusse R. Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4(9):a007864. DOI: 10.1101/cshperspect.a007864.

62. Moosa S, Yamamoto GL, Garbes L, et al. Autosomal-Recessive Mutations in MESD Cause Osteogenesis Imperfecta. *Am J Hum Genet* 2019;105(4):836-843. DOI: 10.1016/j.ajhg.2019.08.008.
63. Symoens S, Malfait F, D'Hondt S, et al. Deficiency for the ER-stress transducer OASIS causes severe recessive osteogenesis imperfecta in humans. *Orphanet J Rare Dis* 2013;8:154. DOI: 10.1186/1750-1172-8-154.
64. Doyard M, Bacrot S, Huber C, et al. FAM46A mutations are responsible for autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *J Med Genet* 2018;55(4):278-284. DOI: 10.1136/jmedgenet-2017-104999.
65. Lapunzina P, Aglan M, Temtamy S, et al. Identification of a frameshift mutation in Osterix in a patient with recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2010;87(1):110-4. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.05.016.
66. Doll JA, Stellmach VM, Bouck NP, et al. Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. *Nat Med* 2003;9(6):774-80. DOI: 10.1038/nm870.
67. Akiyama T, Dass CR, Shinoda Y, Kawano H, Tanaka S, Choong PF. PEDF regulates osteoclasts via osteoprotegerin and RANKL. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391(1):789-94. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.11.139.
68. Semler O, Netzer C, Hoyer-Kuhn H, Becker J, Eysel P, Schoenau E. First use of the RANKL antibody denosumab in osteogenesis imperfecta type VI. *J Musculoskeletal Neuronal Interact* 2012;12(3):183-8. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22947550>).
69. Brlek P, Anticevic D, Molnar V, et al. X-Linked Osteogenesis Imperfecta Possibly Caused by a Novel Variant in PLS3. *Genes (Basel)* 2021;12(12). DOI: 10.3390/genes12121851.
70. Cho TJ, Lee KE, Lee SK, et al. A single recurrent mutation in the 5'-UTR of IFITM5 causes osteogenesis imperfecta type V. *Am J Hum Genet* 2012;91(2):343-8. DOI: 10.1016/j.ajhg.2012.06.005.
71. Semler O, Garbes L, Keupp K, et al. A mutation in the 5'-UTR of IFITM5 creates an in-frame start codon and causes autosomal-dominant osteogenesis imperfecta type V with hyperplastic callus. *Am J Hum Genet* 2012;91(2):349-57. DOI: 10.1016/j.ajhg.2012.06.011.
72. Balasubramanian M, Parker MJ, Dalton A, et al. Genotype-phenotype study in type V osteogenesis imperfecta. *Clin Dysmorphol* 2013;22(3):93-101. DOI: 10.1097/MCD.0b013e32836032f0.
73. Rauch F, Moffatt P, Cheung M, et al. Osteogenesis imperfecta type V: marked phenotypic variability despite the presence of the IFITM5 c.-14C>T mutation in all patients. *J Med Genet* 2013;50(1):21-4. DOI: 10.1136/jmedgenet-2012-101307.
74. Farber CR, Reich A, Barnes AM, et al. A novel IFITM5 mutation in severe atypical osteogenesis imperfecta type VI impairs osteoblast production of pigment epithelium-derived factor. *J Bone Miner Res* 2014;29(6):1402-11. DOI: 10.1002/jbmr.2173.
75. Marom R, Rabenhorst BM, Morello R. Osteogenesis imperfecta: an update on clinical features and therapies. *Eur J Endocrinol* 2020;183(4):R95-R106. DOI: 10.1530/EJE-20-0299.
76. Bregou Bourgeois A, Aubry-Rozier B, Bonafe L, Laurent-Applegate L, Pioletti DP, Zambelli PY. Osteogenesis imperfecta: from diagnosis and multidisciplinary

- treatment to future perspectives. *Swiss Med Wkly* 2016;146:w14322. DOI: 10.4414/smw.2016.14322.
77. Marom R, Lee YC, Grafe I, Lee B. Pharmacological and biological therapeutic strategies for osteogenesis imperfecta. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2016;172(4):367-383. DOI: 10.1002/ajmg.c.31532.
  78. Lindsay R, Krege JH, Marin F, Jin L, Stepan JJ. Teriparatide for osteoporosis: importance of the full course. *Osteoporos Int* 2016;27(8):2395-410. DOI: 10.1007/s00198-016-3534-6.
  79. Sinder BP, Lloyd WR, Salemi JD, et al. Effect of anti-sclerostin therapy and osteogenesis imperfecta on tissue-level properties in growing and adult mice while controlling for tissue age. *Bone* 2016;84:222-229. DOI: 10.1016/j.bone.2016.01.001.
  80. Grafe I, Alexander S, Yang T, et al. Sclerostin Antibody Treatment Improves the Bone Phenotype of *Crtap*(-/-) Mice, a Model of Recessive Osteogenesis Imperfecta. *J Bone Miner Res* 2016;31(5):1030-40. DOI: 10.1002/jbmr.2776.
  81. Varsome. COL1A1 c.3496G>T. (<https://varsome.com/variant/hg38/COL1A1%20c.3496G%3ET?annotation-mode=germline>).
  82. Steinmann B, Rao VH, Vogel A, Bruckner P, Gitzelmann R, Byers PH. Cysteine in the triple-helical domain of one allelic product of the alpha 1(I) gene of type I collagen produces a lethal form of osteogenesis imperfecta. *J Biol Chem* 1984;259(17):11129-38. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6469997>).
  83. Lindert U, Gnoli M, Maioli M, et al. Insight into the Pathology of a COL1A1 Signal Peptide Heterozygous Mutation Leading to Severe Osteogenesis Imperfecta. *Calcif Tissue Int* 2018;102(3):373-379. DOI: 10.1007/s00223-017-0359-z.
  84. Morlino S, Micale L, Ritelli M, et al. COL1-related overlap disorder: A novel connective tissue disorder incorporating the osteogenesis imperfecta/Ehlers-Danlos syndrome overlap. *Clin Genet* 2020;97(3):396-406. DOI: 10.1111/cge.13683.
  85. Di Lullo GA, Sweeney SM, Korkko J, Ala-Kokko L, San Antonio JD. Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *J Biol Chem* 2002;277(6):4223-31. DOI: 10.1074/jbc.M110709200.
  86. Pollitt R, McMahon R, Nunn J, et al. Mutation analysis of COL1A1 and COL1A2 in patients diagnosed with osteogenesis imperfecta type I-IV. *Hum Mutat* 2006;27(7):716. DOI: 10.1002/humu.9430.
  87. Lindahl K, Astrom E, Rubin CJ, et al. Genetic epidemiology, prevalence, and genotype-phenotype correlations in the Swedish population with osteogenesis imperfecta. *Eur J Hum Genet* 2015;23(8):1042-50. DOI: 10.1038/ejhg.2015.81.
  88. Chan D, Ho MS, Cheah KS. Aberrant signal peptide cleavage of collagen X in Schmid metaphyseal chondrodysplasia. Implications for the molecular basis of the disease. *J Biol Chem* 2001;276(11):7992-7. DOI: 10.1074/jbc.M003361200.
  89. Liu M, Lara-Lemus R, Shan SO, et al. Impaired cleavage of preproinsulin signal peptide linked to autosomal-dominant diabetes. *Diabetes* 2012;61(4):828-37. DOI: 10.2337/db11-0878.
  90. Symoens S, Malfait F, Renard M, et al. COL5A1 signal peptide mutations interfere with protein secretion and cause classic Ehlers-Danlos syndrome. *Hum Mutat* 2009;30(2):E395-403. DOI: 10.1002/humu.20887.

91. Varsome. COL1A1 c.2461G>A.  
(<https://varsome.com/variant/hg38/Col1a1%20c.2461G%3EA?annotation-mode=germline>).
92. Ho Duy B, Zhytnik L, Maasalu K, et al. Mutation analysis of the COL1A1 and COL1A2 genes in Vietnamese patients with osteogenesis imperfecta. Hum Genomics 2016;10(1):27. DOI: 10.1186/s40246-016-0083-1.
93. Raymond Dagleish IO, Wei Kheng Teh. Osteogenesis Imperfecta Variant Database. ([https://oi.gene.le.ac.uk/variants.php?select\\_db=COL1A1&action=search\\_all&search\\_Variant%2FDNA=c.2461G%3EA](https://oi.gene.le.ac.uk/variants.php?select_db=COL1A1&action=search_all&search_Variant%2FDNA=c.2461G%3EA)).
94. Varsome. COL1A2 c.2314G>C.  
(<https://varsome.com/variant/hg38/Col1a2%20c.2314G%3EC?annotation-mode=germline>).
95. Lu Y, Zhao F, Ren X, Li Z, Yang X, Han J. A rare case of osteogenesis imperfecta combined with complete tooth loss. J Pediatr Endocrinol Metab 2014;27(1-2):143-7. DOI: 10.1515/jpem-2013-0069.
96. Varsome. COL1A1 c.976G>A.  
(<https://varsome.com/variant/hg38/col1A1%20c.976G%3EA?annotation-mode=germline>).
97. Varsome. Chr17-50194032-c-t (col1a1:P.G560s).  
(<https://varsome.com/variant/hg38/COL1A1%20c.1678G%3EA?annotation-mode=germline>).
98. Raymond Dagleish IO, Wei Kheng Teh. Osteogenesis Imperfecta Variant Database. ([https://oi.gene.le.ac.uk/variants.php?select\\_db=COL1A1&action=search\\_all&search\\_Variant%2FDNA=c.1678G%3EA](https://oi.gene.le.ac.uk/variants.php?select_db=COL1A1&action=search_all&search_Variant%2FDNA=c.1678G%3EA)).
99. Varsome. COL1A2 c.568G>A.  
(<https://varsome.com/variant/hg38/Col1a2%20c.568G%3EA?annotation-mode=germline>).
100. Varsome. COL1A2 c.956G>A.  
(<https://varsome.com/variant/hg38/Col1a2%20c.956G%3EA?annotation-mode=germline>).
101. Malfait F, Francomano C, Byers P, et al. The 2017 international classification of the Ehlers-Danlos syndromes. Am J Med Genet C Semin Med Genet 2017;175(1):8-26. DOI: 10.1002/ajmg.c.31552.

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kollagen Biosynthese (Einheit für Bindegewebserkrankungen, Abteilung Stoffwechsel und Forschungszentrum für das Kind, Kinderspital Zürich)	Seite 4
Abbildung 2: Prozentuale Symptomverteilung <i>COL1A1</i>	Seite 25
Abbildung 3: Elektrophorese Fallbeispiel 2 (Lindert et al, 2018)	Seite 27
Abbildung 4: Elektrophorese Fallbeispiel 3 (Morlino et al, 2020)	Seite 28
Abbildung 5: Prozentuale Symptomverteilung <i>COL1A2</i>	Seite 29
Abbildung 6: Elektrophorese <i>Fallbeispiel 6</i> (Morlino et al, 2020)	Seite 31
Abbildung 7: <i>Familie 2</i> . Kollagen biochemische Analyse auf kultivierten Fibroblasten (Einheit für Bindegewebserkrankungen, Abteilung Stoffwechsel und Forschungszentrum für das Kind, Kinderspital Zürich)	Seite 33
Abbildung 8: <i>Familie 2</i> . Elektronen Mikroskopie der Dermis (Einheit für Bindegewebserkrankungen, Abteilung Stoffwechsel und Forschungszentrum für das Kind, Kinderspital Zürich)	Seite 34
Abbildung 9: Prozentuale Symptomverteilung des Gens <i>COL1A1</i> und <i>COL1A2</i>	Seite 36
Abbildung 10: Prozentuale Symptomverteilung des OI/EDS Overlap Syndroms	Seite 37
Abbildung 11: Fallbeispiel 7, Gelelektrophorese (Einheit für Bindegewebserkrankungen, Abteilung Stoffwechsel und Forschungszentrum für das Kind, Kinderspital Zürich)	Seite 38

Abbildung 12: Familie 5, Kollagen Biochemische Analyse (Morlino et al, 2020)

Seite 39