

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand Prof. Dr. H.-J. Gabius

Angefertigt unter der Leitung von

Prof. Dr. Dr. R. G. Erben

Interaktion zwischen Fibroblast growth factor-23 und dem Vitamin-D-Hormon-System

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Martina Lehnert
aus Düren

München 2007

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E.P. Märtlbauer
Referent: Prof. Dr. Dr. Erben
Korreferenten: Prof. Dr. Gabius
Prof. Dr. Peters
Jun. Prof. Dr. Deeg
Prof. Dr. Kienzle

Tag der Promotion: 9. Februar 2007

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Phosphathomöostase	3
2.1.1 Phosphatverteilung	3
2.1.2 Phosphataufnahme über den Gastrointestinaltrakt	4
2.1.3 Rückresorption und Ausscheidung von Phosphat in der Niere	4
2.1.4 Regulation der Phosphathomöostase	5
2.1.5 Phosphatonine	6
2.1.6 Hypophosphatämie	7
2.1.7 Hyperphosphatämie	8
2.2 Vitamin D	9
2.2.1 Synthese	9
2.2.2 Regulation des Vitamin-D-Metabolismus	11
2.2.3 Der Vitamin-D-Rezeptor	11
2.2.4 Physiologische Wirkung von Vitamin D	12
2.2.5 Hypervitaminose	16
2.2.6 Vitamin-D-Mangel	17
2.2.7 Vitamin-D-abhängige Krankheiten	18
2.3 Fibroblast Growth Factor 23	21
2.3.1 Struktur	21
2.3.2 Expression	22
2.3.3 Wirkung	23
2.3.4 Regulation	24
2.4 Klotho	25
2.4.1 Struktur	25

2.4.2	Expression	27
2.4.3	Wirkung	27
2.4.4	Regulation	28
3	Publikation "Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23 results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in <i>PheX</i>-deficient mice"	30
4	Publikation " Ablation of Vitamin D Signaling Rescues Bone, Mineral, and Glucose Homeostasis in Fgf-23 Deficient Mice"	43
5	Diskussion	68
6	Zusammenfassung	73
7	Summary	75
8	Literaturverzeichnis	77
	Lebenslauf	90
	Danksagung	91

Abkürzungsverzeichnis

[Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂]	Hydroxyapatit
1,25(OH) ₂ D	1,25-Dihydroxyvitamin D
1,25D ₃ -MARRS	Membrane-associated-rapid-response-steroid-binding-protein
24,25(OH) ₂ D	24,25-Dihydroxycholecalciferol
25(OH)D ₃	25-Hydroxycholecalciferol
Abb.	Abbildung
ADHR	Autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
Ca	Kalzium
cAMP	Cyclo-Adenosinmonophosphat
cGMP	Cyclo-Guanosin-(3,5)-monophosphat
DBP	Vitamin D binding protein
dL	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECaC	Epithelialer Kalziumkanal
et al.	Et altera
FGF	Fibroblast growth factor
FRP	Frizzled-related protein
GH	Wachstumshormon (Somatotropin)
HBD	Hypophosphatämische Knochenkrankheit

HHRH	Hereditäre hypophosphatämische Rachitis
IL	Interleukin
InsP ₃	Inositol-(1,4,5)-triphosphat
K	Kalium
KL	Klotho
LBD	Liganden-Bindungs-Domäne
LDLR	Low density lipoprotein Rezeptor (LDL R)
MEPE	Matrix extracellular phosphoglycoprotein
mg	Milligramm
mM	Millimol
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
Na	Natrium
NaPi	Natrium-Phosphat-Cotransporter
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pg	Pikogramm
PHEX	Phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome
Pi	Anorganisches Phosphat
PMCA	Plasmamembran-Ca ²⁺ ATPase
PTH	Parathormon
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
TIO	Tumor-induzierte Osteomalazie

VDDR	Vitamin D dependent rickets
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VDREs	Vitamin D response elements
WT	Wildtyp
XLH	X-linked hypophosphatemic rickets

1 Einleitung

Phosphor ist für den menschlichen und den tierischen Organismus ein essentielles Mineral, das an einer Vielzahl von zellulären Stoffwechselfvorgängen beteiligt ist. Die Regulationsmechanismen der Phosphathomöostase sind bisher nur unvollständig geklärt. Seit langem ist bekannt, dass es engen Zusammenhang zwischen Kalzium- und Phosphathomöostase gibt. Die klassischen kalziumregulierenden Hormone Parathormon und Vitamin D beeinflussen auch den Phosphathaushalt. Neue Erkenntnisse über die Beteiligung weiterer endokriner Faktoren – so genannter „Phosphatonine“ – kamen aus der Forschung über Erbkrankheiten beim Menschen, deren gemeinsames charakteristisches Merkmal der renale Phosphatverlust ist (BERNDT et al., 2005). Genetische Analysen haben gezeigt, dass eine loss-of-function-Mutation im *PHEX*-Gen (Phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome) die Ursache für eine dieser Erbkrankheiten, die X-chromosomale hypophosphatämische Rachitis (XLH), ist. Es existiert auch ein Mausmodell für diese Erkrankung, die so genannte *Hyp*-Maus, die ebenfalls durch eine Deletion im *Phex*-Gen charakterisiert ist (HRUSKA et al., 1995; TENENHOUSE, 1999). Einige Jahre später wurde gefunden, dass bei einer weiteren Form der erblichen Rachitis, der ADHR (autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis), Punktmutationen im Fibroblast growth factor-23 (FGF-23)-Gen vorliegen, die zu einem Aminosäureaustausch an einer Stelle des Proteins führen, die möglicherweise als Spaltungsstelle für Endopeptidasen fungiert (ADHR CONSORTIUM, 2000; WHITE et al., 2001; BAI et al., 2003). Die Folge der Genmutationen ist bei beiden Krankheiten ein erhöhter Serumspiegel von FGF-23. Auch bei der Tumor-induzierten Osteomalazie (TIO) lässt sich ein erhöhter Serumspiegel von FGF-23 feststellen (NELSON, 2003). Betroffene Patienten weisen in Übereinstimmung mit den oben angeführten Krankheitsbildern einen renalen Phosphatverlust und daraus folgend eine ungenügende Knochenmineralisation auf. Um weitere Informationen über den Einfluss von FGF-23 auf die Phosphathomöostase, den Knochenstoffwechsel und einen möglichen Zusammenhang mit der körpereigenen Regulation des Vitamin-D-Haushaltes zu gewinnen, wurden für die vorliegende Arbeit *Fgf-23*-defiziente Mäuse untersucht, ebenso wie Nachkommen aus der Verpaarung dieser Tiere mit Mäusen, die einen inaktivierten Vitamin-D-Rezeptor aufweisen. Nachdem der Phänotyp von *Fgf-23*-Knockout-Mäusen frappierende Übereinstimmung mit dem Phänotyp von Mäusen

aufweist, die durch einen genetischen Defekt in der Bildung des sogenannten „Anti-aging“-Hormons *Klotho* charakterisiert sind, wurden auch Studien über einen möglichen Zusammenhang zwischen diesen Faktoren durchgeführt.

2 Literaturübersicht

2.1 Phosphathomöostase

Phosphor liegt im Körper von Mensch und Tier hauptsächlich in oxygenierter Form als Phosphatsalz vor. Phosphat ist, neben Kalzium, ein essentieller Bestandteil der Knochensubstanz. Weiterhin übernimmt Phosphat im Organismus lebenswichtige Aufgaben, es dient unter anderem bei verschiedenen zellulären Stoffwechselfvorgängen als Puffer für den Säure-Base-Haushalt von Blut und Urin und ist Bestandteil der Zellmembran und der Nukleinsäuren. Die Aufrechterhaltung einer physiologischen Konzentration ist für die normale Skelettentwicklung und -mineralisation sehr wichtig. Der Serum-Phosphatspiegel wird relativ konstant gehalten; er liegt beim erwachsenen Menschen zwischen 0,80 und 1,45 mmol/L, entsprechend 2,5 - 4,5 mg/dL (SHIBER und MATTU, 2002). Die Blutwerte unterliegen geringfügigen biphasischen Tagesschwankungen ($0,2 \pm 0,03$ mmol/L) mit Tiefstwerten am Vormittag und Höchstwerten nachmittags und in den frühen Nachtstunden (PORTALE et al., 1987). Bei Kindern und Jugendlichen, bzw. Jungtieren, findet man aufgrund des Skelettwachstums deutlich höhere Phosphatspiegel (KNOX und HARAMATI, 1985). Bei den Haussäugetieren findet man je nach Tierart sehr unterschiedliche Referenzbereiche. Die Angaben reichen von 2,1 – 5,0 mg/dL (entsprechend 0,7 – 1,6 mmol/L) beim adulten Hund bis zu 6,5 – 10,2 mg/dL (2,1 – 3,3 mmol/L) beim Schwein (Kraft und Dürr, 1999).

2.1.1 Phosphatverteilung

Im Organismus von Mensch und Tier liegt Phosphat zum größten Teil (ca. 80%) als kristallines Hydroxyapatit [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] im Knochen vor. Jeweils knapp 10% befinden sich in der Muskulatur und im Weichteilgewebe, weniger als 1% in der extrazellulären Flüssigkeit. Das Verhältnis von intrazellulärem zu extrazellulärem Phosphat wird auf 100:1 geschätzt (KNOCHEL, 1985). In den Zellen liegt Phosphat vorwiegend in organischer Form vor; unter anderem als Bestandteil von Phospholipiden, Phosphoproteinen und Nukleinsäuren (DNA, RNA). Es ist essentiell für viele Stoffwechselfvorgänge, zum Beispiel für Speicherung und Freisetzung von Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP). Als „Second Messenger“ (cAMP, cGMP, InsP_3) und Substrat für Kinasen und Phosphatasen ist es an der Regulation intrazellulärer Signalwege beteiligt. Eine weitere elementare Phosphatverbindung, in der über 70%

des organischen Phosphats im Körper vorliegen, findet man in den Erythrozyten als 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG). Dieses reguliert die Sauerstoffabgabe an das Gewebe durch die Bindung an Hämoglobin (FRASER et al., 1987). Den Hauptteil des extrazellulären Phosphors stellen anorganische Phosphate (Pi) dar. Etwa 85% davon sind die freien Phosphationen Monohydrogenphosphat (HPO_4^{2-}) und Dihydrogenphosphat (H_2PO_4^-), die bei einem physiologischen pH-Wert im Verhältnis 4:1 vorliegen; 10% liegen im Blut an Proteine gebunden vor und 5% bilden Komplexe mit Kalzium, Magnesium oder Natrium (GAASBEEK und MEINDERS, 2005).

2.1.2 Phosphataufnahme über den Gastrointestinaltrakt

In beinahe allen Nahrungsmitteln, wie Fleisch, Gemüse, Getreide und Milchprodukten, ist Phosphat ausreichend enthalten. Ein Mensch nimmt bei durchschnittlicher Ernährung knapp das Doppelte bis ein Dreifaches der benötigten Menge zu sich. Je nach Verwertbarkeit und Bedarf werden zwischen 20 und 80% aus der Nahrung über den Gastrointestinaltrakt aufgenommen, wobei die Absorption direkt proportional zum Gehalt in der Nahrung ist. Dies geschieht hauptsächlich im Dünndarm, bei Wiederkäuern ist es zu einem geringen Anteil auch über die Vormägen möglich. Die intestinale Resorption geschieht einerseits über passive Diffusion der Phosphationen, andererseits über einen aktiven Transportmechanismus, der durch 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ [$1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$] stimuliert wird (CROSS et al., 1990). Die aktive Phosphataufnahme erfolgt an Natrium gekoppelt an der luminalen Membran (Bürstensaum-Membran) der Dünndarmepithelzellen, und auch basolateral sind spezifische Natrium-Phosphat-Cotransporter-Isoformen (NaPi-Transporter) nachgewiesen worden (BAI et al., 2000). Allerdings scheinen diese nur eine untergeordnete Rolle – außer bei Mangelzuständen – zu spielen. Der Natrium-unabhängige Transportvorgang macht ungefähr 40 bis 50% der gesamten intestinalen Phosphataufnahme aus (KATAI et al., 1999).

2.1.3 Rückresorption und Ausscheidung von Phosphat in der Niere

Unter „steady-state“-Bedingungen ist die Niere der wichtigste Regulator des Serum-Phosphatspiegels, sie stellt sicher, dass die Ausscheidung über den Urin äquivalent zur Netto-Absorption über das Intestinum ist. Phosphat wird in den Glomerula frei filtriert und 80 bis 90% davon werden in den renalen Tubuli reabsorbiert. Zwei Drittel

dieser Reabsorption erfolgt im proximalen Tubulus über einen Natrium-abhängigen Prozess (GAASBEEK und MEINDERS, 2005). Bisher sind drei verschiedene Typen von Natrium-Phosphat-Cotransportern nachgewiesen worden. Für die Aufnahme ist vor allem der Co-Transporter vom Typ 2 von Bedeutung. Von ihm gibt es die drei Isoformen a, b und c. Intestinal wirkt hauptsächlich NaPi-2b, renal scheinen NaPi-2a und 2c von größerer Bedeutung zu sein. Letztere werden in der Niere in der Bürstensaum-Membran der proximalen Tubuli exprimiert, NaPi-2c in den superfiziellen und kortikalen Nephronanteilen. Durch die Analyse von NaPi-2a-Knockout-Mäusen (NaPi2^{-/-}) weiß man, dass dieser Transporter für 70-80% des apikalen Pi-Influx verantwortlich ist. Bei den beiden Isoformen NaPi-2a und 2b handelt es sich um einen elektrogenen, sekundär-aktiven Transport, das heißt mit jedem PO₄²⁻-Ion werden drei Na⁺-Ionen aus dem Lumen in die Zelle aufgenommen, während NaPi-1c elektroneutral ist (2 Na⁺: 1 PO₄²⁻). Die Na⁺-K⁺-ATPasen an der basolateralen Membranseite transportieren Natriumionen aktiv, also unter Energieverbrauch, aus der Zelle und halten so einen Gradienten für den Phosphat-Transport aufrecht (BECK et al., 1998; HERNANDO et al., 2005; HILFIKER et al., 1998; MIYAMOTO et al., 2004).

2.1.4 Regulation der Phosphathomöostase

Die Serumkonzentration an Phosphat wird wegen der vielfältigen Bedeutung dieses Minerals für den Organismus innerhalb eines relativ engen Bereichs konstant gehalten. Der Phosphatspiegel kann über die intestinale Aufnahme aus der Nahrung, die renal-tubuläre Reabsorption und die interne Verschiebung zwischen Intra- und Extrazellulärraum reguliert werden. Die tägliche Austauschrate zwischen extrazellulärer Flüssigkeit und Skelett beträgt bei einem Erwachsenen ca. 210 mg (LEVI, 2001) und findet aufgrund des ständigen Knochenbaus statt. Die bestimmenden Faktoren dieser Regulation sind das Parathormon (PTH), das in den Epithelkörperchen (Nebenschilddrüsen) gebildet wird, und der aktive Metabolit des Vitamin D, das Calcitriol (1,25(OH)₂D₃). Ein „Calcium-sensing receptor“ misst eine Verringerung der Plasmakonzentration an Kalzium-Ionen, woraufhin eine vermehrte Sekretion von PTH erfolgt. Dieses bewirkt an der Niere eine gesteigerte tubuläre Rückresorption von Kalzium und gleichzeitig eine Hemmung der Rückresorption von Phosphat. Untersuchungen auf molekularer Ebene haben gezeigt, dass unter Einfluss von PTH NaPi-2a-Transporter aus der luminalen Membran endozytiert und

über Mikrotubuli zu den Lysosomen transportiert werden, wo sie mit diesen verschmelzen (MURER et al., 1999; MURER et al., 2000). Weiterhin stimuliert das Hormon die Synthese von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Niere und hemmt die Bildung von 24,25-Dihydroxycholecalciferol, einer inaktiven Form des Vitamin D. Zusätzlich wird dem Körper mehr Kalzium zur Verfügung gestellt, indem es über eine Stimulation der Osteoklastenreifung vermehrt aus den Knochen mobilisiert wird. Niedrige extrazelluläre Phosphat-Konzentrationen bewirken ebenfalls eine Steigerung der 1α -Hydroxylase-Aktivität. Die wichtigste Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ besteht in der Stimulation der intestinalen Kalzium- und Phosphatresorption, zusätzlich wird auch die renal-tubuläre Reabsorption von Kalzium erhöht.

Die Regulation der Phosphat- und damit auch der Kalziumhomöostase scheint bei monogastrischen Tieren weitgehend analog zu den beim Menschen beschriebenen Vorgängen abzulaufen. Die Aufnahme erfolgt im Darm durch passive Diffusion und an Natrium gekoppelten Transporter, die von Calcitriol stimuliert werden. Calcitriol und Parathormon regulieren die Ausscheidung über die Niere. Beim Wiederkäuer allerdings scheint die intestinale Resorption wesentlich weniger von Vitamin D abhängig zu sein, das heißt eine gesteigerte Aufnahme von Phosphat ist auch bei reduzierter Kalziumresorption möglich. Eine regulatorische Funktion für die Homöostase haben bei diesen Tieren vor allem der Gastrointestinaltrakt und die Speicheldrüse, weniger die Nieren. Über die Glandula parotis werden täglich zwischen 5 und 10 g Phosphat bei den kleinen, und 30 bis 60 g bei den großen Wiederkäuern in den Magen-Darm-Trakt sezerniert (entspricht ca. 60 bis 160 L Speichel) (REINHARDT et al., 1988; BREVES und SCHRÖDER, 1991). Außerdem geschieht die Resorption nicht nur im Dünndarm, geringe Mengen können auch über die Vormägen durch passive Diffusion aufgenommen werden (BREVES et al., 1988).

2.1.5 Phosphatonine

Die Regulierung der normalen Serumphosphat-Konzentration unterliegt einer relativ engen Kontrolle durch die oben genannten endokrinen Botenstoffe. In neueren Studien, die Krankheiten mit renalem Phosphatverlust betreffen, haben sich Hinweise auf das Vorkommen phosphaturischer Substanzen, so genannter Phosphatonine, ergeben. Diese hormonähnlichen Stoffe sollen bei erhöhten Phosphatspiegeln direkt an der Niere wirken, indem sie die Reabsorption vermindern und gleichzeitig die

Bildung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durch Hemmung der 1α -Hydroxylase unterdrücken. Folgende Phosphatonin-ähnlichen Peptide sind aufgrund ihrer Beteiligung an Krankheiten mit ausgeprägter Hypophosphatämie für die Forschung von besonderem Interesse: Secreted frizzled-related protein 4 (FRP-4), Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) und Fibroblast growth factor-23 (FGF23). Die Wirkung dieser Substanzen unter normalen und pathologischen Bedingungen ist noch nicht vollständig bekannt und bedarf weiterer Untersuchung (SCHIAVI und KUMAR, 2004).

2.1.6 Hypophosphatämie

Hypophosphatämie im klinischen Sinn gibt nur Auskunft über die Höhe der messbaren Phosphatkonzentration im Blut, sie bezieht sich aber nicht auf das Vorliegen eines tatsächlichen Mangels. Einerseits kann also eine Hypophosphatämie bei erniedrigtem, normalem oder erhöhtem Gesamtphosphat im Körper vorliegen, andererseits aber auch ein absoluter Mangel bei normalen oder abweichenden Blutwerten vorhanden sein (SHIBER und MATTU, 2002). Von einer moderaten Hypophosphatämie spricht man bei Plasmakonzentrationen von 0,32 - 0,65 mmol/L (entsprechend 1,0 - 2,0 mg/dl), von einer schwerwiegenden bei $<0,32$ mmol/L (MILLER und SLOVIS, 2000). Prinzipiell gibt es drei Möglichkeiten für die Entstehung einer Hypophosphatämie: Eine verringerte intestinale Absorption, die interne Umverteilung oder eine vermehrte Abgabe über den Urin. Da Phosphat in nahezu allen Lebens- und Futtermitteln reichlich vorhanden ist, kommt es eigentlich nur bei ausgeprägter Malnutrition zu einem Defizit, wie es teilweise bei extrem phosphatarmer Diät, Aufnahme von Komplexbildnern (z.B. Antazida), anhaltendem Erbrechen oder sekretorischer Diarrhoe, im Alter und bei Alkoholabusus vorkommt (SUBRAMANIAN und KHARDORI, 2000). Die häufigste Ursache ist wohl die Umverteilung zwischen Intrazellulärraum, Blut und Knochenspeicher. Zu einer verstärkten Verschiebung des Phosphats vom extrazellulären Raum in die Zellen kommt es beispielsweise bei der Therapie einer diabetischen Ketoazidose, bei respiratorischer Alkalose (durch Sepsis, Hitzschlag, hepatisches Koma, Gicht, Alkoholentzug, Überdosis von Salicylaten etc.), unter Einfluss verschiedener Hormone und ähnlicher Substanzen (Insulin, Glukagon, Dopamin, Steroide, β -2-Agonisten u.a.) und bei erhöhter Zellproliferation (akuter Leukämie, Burkitt-Lymphom, Hungry bone syndrom) (GAASBEEK und MEINDERS, 2005). Ein Mangel im

Organismus kann auch durch einen vermehrten Phosphatverlust über den Urin auftreten. Bei primärem oder sekundärem Hyperparathyreoidismus geschieht dies durch Hemmung der Natrium-Phosphat-Cotransporter aufgrund einer erhöhten Parathormon-Produktion. Bei dem seltenen Fanconi-Syndrom, das beim multiplen Myelom und als Erbkrankheit beim Hund auftreten kann, ist die Rückresorption durch einen proximalen Tubulusdefekt gestört. Beim Menschen existieren einige Erbkrankheiten, die ebenfalls durch renalen Phosphatverlust gekennzeichnet sind; dazu gehören die autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis (ADHR), die hereditäre hypophosphatämische Rachitis mit Kalziurie (HHRH), die hypophosphatämische Knochenkrankheit (HBD), sowie die X-chromosomale hypophosphatämische Rachitis (XLH), auf die später noch Bezug genommen wird. Eine erhöhte Phosphaturie ist auch nach Nierentransplantationen beschrieben worden, hierbei vermutet man den Einfluss von phosphaturischen Substanzen (LEVI, 2001). Die klinischen Symptome einer Hypophosphatämie sind sehr unterschiedlich und sowohl vom Schweregrad als auch der Dauer abhängig. Fast jedes Organsystem wird durch einen Mangel in seiner Funktion beeinträchtigt, besonders die Knochen- und Mineralhomöostase, das kardiale, respiratorische und hämatologische, sowie das zentralnervöse System.

2.1.7 Hyperphosphatämie

Beim Menschen spricht man von einer moderaten Hyperphosphatämie, wenn Plasmawerte >6 mg/dl vorliegen, von einer hochgradigen erst bei Werten $>9 - 14$ mg/dl (THATTE et al., 1995). Erhöhte Phosphatspiegel im Blut können aufgrund einer erhöhten exogenen Zufuhr, vermehrter gastrointestinaler Aufnahme, gesteigerter Rückresorption in der Niere, verringerter Ausscheidung mit dem Urin oder durch eine Pseudohyperphosphatämie (u.a. beim Multiplen Myelom und bei Hypertriglyceridämie) entstehen. Erhöhte Phosphat-Serumspiegel treten fast nie solitär auf, meist sind sie Folge- bzw. Begleiterscheinungen einer Grunderkrankung (z.B. Nierenversagen), mit weiteren pathologischen Veränderungen, so dass die genaue Zuordnung der Symptome einer Hyperphosphatämie schwierig ist. Liegt die Ursache in einer eingeschränkten Nierenfunktion, tritt begleitend meist eine Hypokalzämie auf, da durch Komplexbildung der Ca^{2+} -Ionen mit Phosphat dem Organismus weniger freies Kalzium zur Verfügung steht. Dadurch ergibt sich, je nach betroffenem Organsystem, eine große Bandbreite verschiedener Symptome. Häufig werden

Schwäche, Übelkeit, Tetanie, Krämpfe und Herzrhythmusstörungen beobachtet. Die geringere Verfügbarkeit von Kalziumionen ergibt sich aus der sogenannten „steady-state-reaction“ zwischen Kalzium und Phosphat ($\text{Ca}^{2+} + \text{HPO}_4^- \leftarrow \rightarrow \text{CaHPO}_4^-$). Wird das Löslichkeitsprodukt von Kalzium und Phosphat überschritten (größer 70), kann es neben der physiologischen Ablagerung im Knochen auch zur Ausfällung von Kalziumphosphatsalzen im Gewebe kommen. Diese Kalzifizierung wiederum führt zu einer Beeinträchtigung der Organfunktionen. Betroffen sind hier vor allem Niere, Herz, Lunge und das Gefäßsystem. Durch den Versuch des Organismus eine Hyperphosphatämie auszugleichen, indem vermehrt Kalzium mobilisiert wird, kann sich langfristig ein sekundärer Hyperparathyreoidismus und eine konsekutive Osteodystrophie entwickeln (WEISINGER und BELLORIN-FONT, 1998).

2.2 Vitamin D

Seit langem ist bekannt, dass Vitamin D für die Kalzium- und Phosphathomöostase und damit für den Knochenstoffwechsel eine sehr wichtige Rolle spielt. Mittlerweile weiß man aber auch, dass es auf weitere biologische Vorgänge einen Einfluss hat, unter anderem auf Zelldifferenzierung und -wachstum, auf Immunreaktionen und auf die Insulinsekretion (DUSSO et al., 2005).

2.2.1 Synthese

Vitamin D kann über die Nahrung aufgenommen werden oder unter Einwirkung von Sonnenlicht in der Haut gebildet werden. Exposition von UVB-Strahlung, im Bereich von 290 bis 310 nm, bewirkt in den basalen Zellen der Epidermis eine photolytische Umwandlung von 7-Dehydrocholesterol zu Provitamin D₃. Durch eine langsame, thermische Isomerisierung entsteht das Secosteroid Vitamin D₃. Wird dieser Prozess über längere Zeit aufrechterhalten und eine bestimmte Konzentration erreicht, kommt es zu einer Photokonversion des Secosteroids in die biologisch inaktiven Substanzen Tachysterol und Lumisterol. Letzteres kann bei Bedarf wieder in Prävitamin D₃ umgewandelt werden und hat somit eine Speicherfunktion. Gleichzeitig wird dadurch auch eine übermäßige kutane Vitamin-D-Produktion verhindert. Wegen der Möglichkeit einer endogenen Synthese handelt es sich also nicht um ein echtes Vitamin, sondern erst dann, wenn keine ausreichende UV-Bestrahlung vorliegt. Bei dem in der Nahrung vorliegenden Vitamin D unterscheidet man zwischen

Cholekalziferol (Vitamin D₃) tierischen Ursprungs und Ergokalziferol (Vitamin D₂) aus pflanzlichen Quellen. Beide Formen haben beim Menschen und bei Säugetieren ein ähnliches Wirkungspotential und werden im folgenden Text unter dem Begriff Vitamin D zusammengefasst. Lediglich bei Vögeln ist nachgewiesen, dass Ergokalziferol eine geringere Wirksamkeit gegenüber Vitamin D₃ besitzt. Nach der intestinalen Resorption von Vitamin D im Dünndarm, beziehungsweise der Bildung von Provitamin D₃ in der Haut, wird es, an ein Vitamin-D-bindendes-Protein (DBP) und an Albumin gebunden, zur Leber transportiert. In den Hepatozyten erfolgt der erste Schritt der metabolischen Aktivierung, indem das 25-C-Atom durch eine Monooxygenase hydroxyliert wird. Bei diesem Enzym handelt es sich wahrscheinlich um das sogenannte Cytochrom P-450 vom Typ 1CYP2R (CHENG et al., 2004). Die 25-Hydroxylierung ist kaum reguliert, d.h. der Serumspiegel dieses 25-Hydroxycholecalciferol (25(OH)D₃) ist proportional zur Vitamin-D-Aufnahme und kann zur Statusbestimmung herangezogen werden (HOLICK, 1981). Als nächster Schritt erfolgt die Einführung einer Hydroxylgruppe am 1-C-Atom mittels der 1 α -Hydroxylase, einem Enzym, das in den Mitochondrien von Zellen im proximalen Tubulus der Niere vorhanden ist. Unter physiologischen Bedingungen ist dieses Organ die einzige Quelle des biologisch aktiven Vitamin D, dem 1,25-Dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂D₃), auch Calcitriol genannt. Eine systemisch relevante Produktion an anderer Stelle erfolgt nur während der Gravidität in der Plazenta oder bei Vorliegen pathologischer Zustände wie beispielsweise Sarkoidose, Tuberkulose oder rheumatoider Arthritis. Calcitriol kann aber von vielen Zellen in geringem Maße auch lokal produziert werden und wirkt dann vermutlich als autokriner oder parakriner Faktor mit zellspezifischen Funktionen. Entsprechende Expression von 1 α -Hydroxylase hat man mittlerweile in verschiedenen Geweben (Prostata, Kolon, Lunge, Nebenschilddrüse, β -Zellen des Pankreas und Monocyten) nachgewiesen (HEWISON et al., 2004). Neben der 1 α -Hydroxylierung von 25(OH)D₃ existiert in der Niere eine weitere Hydroxylierungsreaktion zum 24,25-Dihydroxycholecalciferol (24,25(OH)₂D₃). Dieses Produkt stellt eine Art Inaktivierung des Vitamin D dar, denn seine biologische Aktivität ist ungefähr 10000 mal schwächer als die von 1,25(OH)₂D₃, eine darüber hinaus gehende Bedeutung ist noch unklar (NORMAN et al., 2002).

2.2.2 Regulation des Vitamin-D-Metabolismus

Für einen ausgeglichenen Mineral- und Knochenstoffwechsel muss der Vitamin-D-Spiegel im Organismus innerhalb eines relativ engen Schwankungsbereichs reguliert werden. Die Regulation des ersten Hydroxylierungsschritts in der Leber ist nur von untergeordneter Bedeutung, während die enzymatische Reaktion in der Niere wesentlich genauer geregelt wird. Diese Aufgabe übernehmen das Parathormon, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ selbst, sowie die Serumspiegel von Phosphat und Kalzium. PTH aktiviert die renale 1α -Hydroxylase, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hemmt ihre Aktivität. Eine Hypokalzämie führt durch Stimulation des Enzyms zu einem Anstieg des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegels, eine Hyperkalzämie bewirkt genau das Gegenteil. Parallel dazu kommt es durch den Kalziumüberschuss zu einer Aktivitätssteigerung der 24 -Hydroxylase, wodurch die biologisch wirksame Form des Vitamin D reduziert wird. Hohe Serumphosphat-Konzentrationen führen ebenfalls zu einer Hemmung der 1α -Hydroxylase. Bei Zellkulturen lässt sich allerdings kein direkter Einfluss des Phosphats feststellen, so dass man einen systemisch über ein Hormon vermittelten Effekt vermutet. Vor kurzem entdeckte phosphaturische Faktoren könnten eventuell beteiligt sein. Zu den bekanntesten dieser Substanzen zählen FRP-4, MEPE und FGF-23 (DUSSO et al., 2005).

2.2.3 Der Vitamin-D-Rezeptor

2.2.3.1 Genomische Wirkung

Vitamin D selbst zeigt keine biologische Aktivität, sondern kann nur über die Interaktion mit einem intrazellulären Rezeptor wirken. Dieser gehört zur Superfamilie der Steroidhormonrezeptoren und besitzt eine hohe Bindungsaffinität gegenüber $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (EVANS, 1988). Der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) funktioniert als ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor, d.h. der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Komplex löst eine Änderung der Gentranskription aus. Dieser Prozess lässt sich in mehrere Schritte unterteilen: Nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ bindet $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an einer spezifischen Liganden-Bindungs-Domäne (LBD), die durch ihren molekularen Aufbau für die hohe Affinität von Hormon und Rezeptor verantwortlich ist. Die DNA-Bindungsregion wird von zwei „Zinkfingern“ gebildet. Mutationen in dieser Region resultieren in einem Bindungsdefekt und äußern sich bei Mensch und Tier durch eine Vitamin-D-Resistenz (HAUSSLER et al., 1998). Nach der Ligandenbindung erfolgt

die Heterodimerisierung mit einem Retinoid-X-Rezeptor (RXR). Nachfolgend wird dieses Heterodimer an sogenannte „Vitamin D response elements“ (VDREs) gebunden, die in der Promoterregion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -regulierten Genen liegen. Zusätzlich sind weitere Co-Regulatoren (mit VDR interagierende Nukleoproteine) beteiligt, die die Gen-Transkriptionsrate erhöhen oder reduzieren (BROWN et al., 1999; EBERT, 2006).

2.2.3.2 Nicht-genomische Wirkung

Vitamin D hat, ähnlich anderen Steroidhormonen, auch eine „nichtgenomische“ Wirkung, das heißt eine Reaktion erfolgt in so kurzer Zeit (Sekunden bis Minuten), dass sie nicht über die oben beschriebene Genexpression hervorgerufen worden sein kann, sondern nur durch schnellere Einflüsse wie Veränderungen im Kalzium-einstrom oder der Kinase-Aktivität (BOYAN et al., 2003). Es wurde vermutet, dass solche Effekte über einen Rezeptor an der Zelloberfläche und nicht über den nukleären VDR vermittelt werden. Bisher sind zwei verschiedene solcher Rezeptoren über $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Bindung beschrieben worden: Ein „membrane-associated-rapid-response steroid-binding protein ($1,25\text{D}_3$ -MARRS) im Darm von Hühnern (NEMERE et al., 2004) und Annexin II in Osteosarkomzellen von Ratten. Letzterer ist allerdings noch umstritten (MIZWICKI et al., 2004). Experimente mit VDR-defizienten Mäusen zeigten aber, dass diese nichtgenomischen Effekte nur über den klassischen Rezeptor vermittelt werden (ERBEN et al., 2002). Die genaue Rolle dieser nichtgenomischen Wirkungen ist weitgehend ungeklärt. Bisher sind stimulatorische Effekte auf den vesikulären Kalziumtransport, die zytosolischen Kalzium- und cGMP-Spiegel, die Kinasen, Chloridkanäle und auf den Phosphoinosit-Metabolismus nachgewiesen worden. Interessant ist auch die schnelle, nicht-genomische Wirkung auf Chondrozyten, wo durch Änderungen des Lipid-Turnover, der Prostaglandinproduktion und der Protease-Aktivität Einfluss auf Knochenmatrix und Kalzifizierung genommen wird (BOYAN et al., 1994).

2.2.4 Physiologische Wirkung von Vitamin D

2.2.4.1 Klassische Zielorgane (Darm, Skelett und Niere)

Das endokrine Vitamin-D-System nimmt eine wichtige regulatorische Funktion innerhalb der Interaktionen zwischen Darm, Skelett, Nebenschilddrüsen und Niere

ein. Die biologisch wichtigste Wirkung dieses Systems besteht in der Stimulation der intestinalen Kalzium- und Phosphatresorption zur Aufrechterhaltung eines physiologischen Kalziumspiegels. Anhand von Tiermodellen wurde gezeigt, dass sowohl der VDR als auch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ selbst für eine effektive Resorption im Dünndarm essentiell sind. Mäuse, denen der VDR, die 1α -Hydroxylase oder beides zugleich fehlt, wiesen deutliche Parallelen zu humanen Patienten mit vitamin-D-abhängiger Rachitis vom Typ I und II auf (LI et al., 1998; PANDA et al., 2004). Es existieren zwei getrennte Mechanismen im Dünndarm zur Absorption von Kalzium – zum einen der passive, parazelluläre Transport und der aktive, transzelluläre Transport. Vitamin D fördert und erleichtert die Aufnahme von Kalzium durch die luminale Zellmembran in den Enterozyten und beeinflusst den Weitertransport durch das Zytoplasma. Der folgende Transportschritt durch die basolaterale Membran macht das Kalzium für den Organismus verfügbar. Während dieses Prozesses liegt das Kalzium an CalbindinD9k/D28k gebunden vor. Die Abgabe in den Blutkreislauf geschieht durch die Plasmamembran- Ca^{2+} ATPase (PMCA1b) und mit Hilfe des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher NCX1 (BOUILLON et al., 2003). An der aktiven zellulären Kalziumaufnahme und dem Transportmechanismus in die Zelle sind die epithelialen Kalziumkanäle ECaC2 und EcaC1 (TRPV5) beteiligt. Der murine ECaC2 wird in vielen Zielgeweben des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ exprimiert (nachgewiesen u.a. in Niere, Darm, Lunge, Leber, Milz, Haut und Knochen) (PENG et al., 2000; ZHUANG et al., 2002). Die Expression des ECaC1 lässt sich dagegen nur in der Niere nachweisen (WEBER et al., 2001). Erhöhte Hormonkonzentrationen des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bewirken einen Anstieg der mRNA von ECaC2 und EcaC1. Fehlt hingegen im Tiermodell ein intakter VDR, so ist die Genexpression der beiden Kanäle reduziert (VAN ABEL et al., 2003). Ein Beweis für die Regulation der ECaC1 durch Vitamin D_3 lieferte eine Studie, bei der Ratten auf eine Vitamin D-Mangeldiät gesetzt wurden. Neben dem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Serum-Spiegel, sank auch der mRNA- und der Proteinspiegel von ECaC1 signifikant (HOENDEROP et al., 2001). Wurden diese Tiere mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Injektionen supplementiert, zeigte sich eine deutliche erhöhte der Expression des ECaC1. Eine andere Arbeitsgruppe generierte ein Mausmodell mit einem inaktiven 1α -Hydroxylase-Gen. Bei diesen Knockout-Mäusen zeigte sich eine Verringerung der renalen ECaC1- und der intestinalen ECaC2-Expression im Vergleich zu den Wildtypen (DARDENNE et al., 2001). WEBER et al. (2001) zeigten anhand von VDR-Mutanten, dass die murine ECaC-Expression allein durch den Kalzium-Spiegel

reguliert wird und nicht durch genomischen Effekte von Vitamin D₃. Bei VDR-defizienten Mäusen auf Normaldiät zeigte sich ein deutlicher Abfall der ECaC1- und 2-Expression. Wurden diese Tiere jedoch auf eine kalziumangereicherte Diät („rescue diet“) gesetzt, ließ sich keine Veränderung mehr in der Expression feststellen. ECaC2 von Mensch und Maus lassen sich stets in Verbindung mit CalbindinD9k und /oder -D28k lokalisieren, wodurch die Vermutung nahe liegt, dass der apikale ECaC und intrazelluläre Ca-bindende Proteine Teile der Kaskade sind, die den Kalzium-Eintritt und die intrazelluläre Kalzium-Konzentration in vielen Geweben reguliert. Eine Analyse der Promotor-Regionen der humanen und murinen ECaC1- und ECaC2-Gene zeigte Vitamin D responsive elements, die eine Erklärung für den Vitamin D-vermittelten Anstieg der ECaC-Expression darstellen könnten (WEBER et al., 2001; HOENDEROP et al., 2001). Eine nichtgenomische, also schnelle Wirkung, führt zu einer gesteigerten vesikulären und parazellulären Kalziumaufnahme, deren quantitativer Beitrag noch nicht geklärt ist. Für die Skelettentwicklung und Aufrechterhaltung der Knochenhomöostase ist Vitamin D essentiell. Die Folgen von Vitamin-D-Mangel oder nicht funktionierendem VDR sind schon seit langem für Mensch und Tier dokumentiert. Ein Mangelzustand während des Wachstums führt zu Rachitis, bei Adulten zu Osteomalazie. Obwohl VDR in Osteoblasten und in Osteoklasten-Vorläuferzellen exprimiert werden, scheint es keinen direkten Einfluss auf den Knochen zu geben. Studien mit VDR-Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass die durch den Vitaminmangel hervorgerufenen Pathologien durch Fütterung einer sogenannten „rescue diet“ verhindert werden können. Nach Anreicherung des Futters mit Kalzium, Phosphat und Laktose sind die typischen Mangelsymptome wie Hypokalzämie, sekundärer Hyperparathyreoidismus und veränderte Knochenstrukturen (gestörte Knochenmineralisierung und Desorganisation der Wachstumsfuge) weitgehend nicht mehr vorhanden (ERBEN et al., 2002, PANDA et al., 2004). Die Hauptaufgabe des Vitamin D für „Modeling und Remodeling“ des Knochens scheint also in der Bereitstellung von Kalzium und Phosphat zu liegen. Die Regulation des Vitamin-D-Spiegels selbst geschieht größtenteils in der Niere durch einen negativen Feedback-Mechanismus, d.h. eine erhöhte Konzentration des 1,25(OH)₂D₃ supprimiert die 1 α -Hydroxylase und fördert gleichzeitig die 24,25-Hydroxylase. Außerdem wird die Expression von Megalin induziert, einem low-density-lipoprotein-Rezeptor (LDL-R). Aufgrund der bekannten Rolle des LDL-R im Cholesterin-Metabolismus (BROWN und GOLDSTEIN, 1986)

wurde lange Zeit angenommen, dass auch Megalin ausschließlich für die Bindung und Aufnahme von Lipoproteinen verantwortlich sei. Heute weiß man, dass dieser Rezeptor an vielen zellulären Prozessen beteiligt ist. Er agiert unter anderem als Signalüberträger bei der Migration von Neuronen (TROMMSDORFF et al., 1999) und kontrolliert die Vitamin-D- und Vitamin-A-Homöostase. Der Hauptexpressionsort von Megalin im adulten Säugetier sind die proximalen Tubuli der Niere, mit geringerer Intensität findet es sich auch in Pneumozyten Typ II in der Lunge, sowie im weiblichen und im männlichen Genitaltrakt (GLIEMANN, 1998). In der Niere spielt der Rezeptor bei der Rückgewinnung von Plasmaproteinen aus dem Primärharn eine entscheidende Rolle, vor allem für die Resorption von Vitamin-D-bindendem Protein (DBP) in Verbindung mit dem 25-Hydroxycholekalziferol (NYKJAER et al. 1999). Aber Megalin ist, neben der Funktion in der renalen Rückresorption von Vitamin-D-bindendem Protein, noch auf einer weiteren Ebene in den Kalziumstoffwechsel eingebunden. Sowohl in der Nebenschilddrüse, als auch in der Niere wird es von den gleichen Zellen, die auch den Rezeptor für das Parathormon (PTH) exprimieren, produziert. Megalin bindet PTH und verhindert durch lysosomalen Abbau die Bindung an den Rezeptor und damit eine transmembrale Signalübertragung (HILPERT et al., 1999). Wie früher schon erwähnt, bewirkt PTH, durch die Mobilisation von Kalzium aus den Knochen, eine schnelle Erhöhung des Serumspiegels. Außerdem steigert es die tubuläre Rückresorption, hemmt die Reabsorption von Phosphat und stimuliert die renale $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese. In der Niere gibt es, ähnlich wie im Darm, epitheliale Kalziumkanäle vom Typ TRPV5, durch die Kalzium Vitamin-D-abhängig in die Zellen gelangt (HOENDEROP et al., 2001).

2.2.4.2 Nicht-klassische Zielorgane

Bei Störungen des endokrinen Vitamin-D-Systems findet man viele weitere pathologische Veränderungen, die in keinem direkten Zusammenhang mit der Kalziumhomöostase stehen, und so auf eine Beteiligung des Calcitriols oder seiner Metaboliten an weiteren biologischen Prozessen im Körper von Mensch und Tier hinweisen. Epidemiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass es eine Verbindung zwischen dem gehäuften Auftreten von Prostata-, Brust- und Kolonkarzinomen bei Vitamin-D-Mangel gibt. Eine hemmende Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Proliferation verschiedener Zellkulturlinien und eine positive Beeinflussung der Zelldifferenzierung unterstützen die Annahme, dass das Hormon regulierend auf

Wachstum und Reifung von Zellen wirkt (KARP et al., 2004). Weitere Studien zeigen auch einen regulativen Einfluss auf die Apoptoserate von Tumorzellen (SERGEEV, 2004), bzw. einen Schutz vor frühzeitigem Zelltod (SAUER et al., 2003). Der VDR lässt sich in Zellen des Immunsystems nachweisen und scheint vielfältig an der Immunabwehr des Organismus beteiligt zu sein. Man kennt schon lange den positiven Einfluss von Vitamin D auf die Differenzierung von Monozyten zu reifen Makrophagen (LIU et al., 1996). Zusätzlich unterstützt es die Abwehrzellen bei Entzündungsreaktionen, indem es die Bildung von Hitzeschock-Proteinen induziert. Im Gegensatz dazu wird auch eine immunsuppressive Wirkung auf Lymphozyten beschrieben, deren Proliferationsrate und Aktivität gesenkt wird (MATHIEU und ADORINI, 2002). In der Haut lässt sich der VDR in Epidermiszellen und in Anteilen der Haarfollikel nachweisen. Wie bei einigen Zellen des Immunsystems fördert $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auch bei Keratinozyten die Differenzierung durch Bereitstellung von Kalzium (XIE et al., 2006). Wie für die Lymphozyten beschrieben, wirkt die biologisch aktive Form des Hormons auch immunsuppressiv auf die Antigen-präsentierenden Langerhans-Zellen der Epidermis. Dies wird teilweise in der Therapie autoimmunbedingter Krankheiten, wie zum Beispiel bei Psoriasis und Sklerodermie, genutzt (MA et al., 2006). Der VDR ist zudem noch für die normale Entwicklung von Haut und Haaren essentiell. Patienten mit erblich bedingten VDR-Defekten und auch VDR-Knockout-Mäuse zeigen Alopezie und dermale Zysten (ERBEN et al., 2002; HSIEH et al., 2003). Nicht nur der Nachweis von 1α -Hydroxylase-Aktivität in Pankreaszellen (β -Zellen) sondern auch eine ungenügende Insulinsekretion und höhere Diabetes-Inzidenz bei Vitamin-D-Mangel, weisen auch hier auf eine Beteiligung des Vitamin-D-Systems hin (SCHWARTZ et al., 2004).

2.2.5 Hypervitaminose

Vitamin D gehört zu den fettlöslichen Vitaminen und wird beim Säugetier vor allem im Fettgewebe gespeichert, bei einigen Fischarten auch in der Leber. Werden sehr hohe Dosen des Vitamins oder aktiver Vitamin-D-Metaboliten aufgenommen, können die körpereigenen Regulationsmechanismen dies nicht mehr ausgleichen. Je nach Dauer der Überschreitung unterscheidet man zwischen akuter und chronischer Toxizität. Bis zum Auftreten erster Symptome vergehen bei akuten Cholekalziferol-Vergiftungen meist 36 Stunden bis drei Tage. Beobachtete Symptome sind Anorexie, Erbrechen, Meläna, Hyperthermie, Ataxie bis hin zu Paresen, Kammerflimmern und

Schock. Charakteristisch sind Hyperkalzämie und -phosphatämie, sowie erhöhte Kalziumausscheidung mit dem Urin. Bei chronischer Überversorgung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ treten vor allem Blutungen in der Magen- und Dünndarmmukosa auf und es kommt zu einer Zunahme der Knochenmasse und zur Ausfällung von Kalziumphosphatsalzen in den Geweben. Von diesen Verkalkungen sind praktisch alle Organe betroffen: Magen-Darm-Trakt, Leber, Niere, Lunge, Herz und Blutgefäße. Bevorzugt lagert sich das Kalziumphosphat zwischen elastischen Fasern oder Kollagenfasern ab (ST ARNAUD et al., 2000). In der Tiermedizin ist besonders die Intoxikation bei Herbivoren, im alpinen Raum durch übermäßige Aufnahme von Goldhafer (*Trisetum flavescens*), bekannt. Der dafür verantwortliche Inhaltsstoff dieser Pflanze ist neben Cholecalciferol das $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -C(25)-Glukosid, aus dem im Pansen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ freigesetzt wird. Bei anderen Haussäugetieren sind nur wenige Fälle beschrieben, meistens wurden humane Substitutionspräparate oder Rodentizide aufgenommen (MELLO, 2003; MELLANBY et al., 2005).

2.2.6 Vitamin-D-Mangel

Ein Vitamin-D-Mangel entsteht, wenn über längere Zeit nicht genügend Vitamin D zugeführt wird, d.h. wenn über die Nahrung zu wenig aufgenommen werden kann oder der Körper zuwenig dem Sonnenlicht (oder entsprechender UV-Bestrahlung) ausgesetzt wird. Malabsorption bzw. Malassimilation können sich aufgrund autoimmuner und/oder chronischer Entzündungsprozesse entwickeln (chronische Pankreatitis, Morbus Crohn, Giardiasis, etc.). Als Folgeerscheinung verschiedener Krankheiten kann ebenfalls eine Unterversorgung auftreten. Bekannt ist dies bei eingeschränkter oder gestörter Funktion von Leber und Niere und bei einigen Erbkrankheiten. Eine nicht ausreichende Versorgung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ führt immer zu einem Kalziummangel, der auch das typische Krankheitsbild dominiert. Indem der Körper versucht, einer Hypokalzämie regulierend entgegenzuwirken, entwickelt sich ein sekundärer Hyperparathyreoidismus. Bei chronischem Mangel wird ein erhöhtes Risiko einer Erkrankung an Bluthochdruck, Diabetes Typ I, Rheumatoider Arthritis und verschiedenen Krebserkrankungen vermutet (HOLICK, 2005).

2.2.6.1 *Rachitis und Osteomalazie*

Das klinische Bild einer ungenügenden Vitamin-D-Versorgung während des Wachstums zeigt sich als Rachitis. Betroffene Kinder beziehungsweise Jungtiere zeigen eine Störung der desmalen und enchondralen Ossifikation mit einem Wachstumsstillstand insbesondere im Bereich der Epiphysenfugen. Die Veränderungen führen unter anderem zu einer Deformation der Gliedmaßen und einer Auftreibung und Verdickung der Knochen-Knorpel-Grenze, insbesondere an den Rippen ("Rachitischer Rosenkranz"). Bei älteren Kindern kann sich ein unproportionierter, rachitischer Zwergwuchs einstellen. Die Osteomalazie des Erwachsenen ist die Folge eines Vitamin-D-Mangels nach Abschluss des Längenwachstums. Wie bei der Rachitis findet nur noch eine mangelhafte Mineralisation der neu gebildeten Knochengrundsubstanz statt. Bei gleichbleibendem Knochenabbau kommt es so zu einer zunehmenden Erweichung aller Knochen, die sich in den statisch-mechanisch belasteten Abschnitten am stärksten auswirkt und zu Mikrofrakturen führt (WHARTON und BISHOP, 2003).

2.2.7 Vitamin-D-abhängige Krankheiten

2.2.7.1 *Vitamin-D-resistente Rachitis*

Darüber hinaus gibt es seltene familiäre Vitamin-D-resistente Formen der Rachitis/Osteomalazie, die durch autosomal rezessiv vererbte Gendefekte bedingt sind. Man unterscheidet zwei verschiedene Varianten: Bei der Vitamin-D-abhängigen Rachitis vom Typ 1 (VDDR-1), die auch als Pseudo-Vitamin-D-abhängige Rachitis bezeichnet wird, liegt eine inaktivierende Punktmutation im 1α -Hydroxylase-Gen (CYP27B1) vor (DARDENNE et al., 2003). Die Behandlung erfolgt durch eine Supplementierung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Bei VDDR vom Typ 2 ist die Ursache eine Mutation im VDR-Gen selber. Verschiedene Mutationsvarianten sind beschrieben, die Folgen sind jedoch immer die gleichen: Teilweise oder vollständige Geweberesistenz gegenüber Vitamin D. Je nach Ausprägung besteht die Therapie in Form einer Behandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in extrem hoher Dosierung und eventuell zusätzlicher intravenöser Kalziumapplikation (MALLOY und FELDMAN, 2003).

2.2.7.2 X-chromosomale hypophosphatämische Rachitis (XLH)

Die X-chromosomale hypophosphatämische Rachitis (XLH) ist die beim Menschen am häufigsten auftretende erbliche Form der Rachitis (Prävalenz von 1:20000). Man bezeichnet die XLH auch als Vitamin-D-resistente Rachitis, da eine Therapie mit normalen Dosen des Vitamins nicht als Behandlung ausreicht (WINTERS et al., 1991). Die Symptome entsprechen denen einer Rachitis bzw. Osteomalazie, allerdings findet man neben der Hypophosphatämie normale Kalzium- und Parathormonspiegel, die Serumwerte von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ liegen im Normbereich oder sind erniedrigt. Die Krankheit wird X-chromosomal dominant vererbt, d.h. bereits ein defektes Allel kann zu Symptomen führen. Bisher gibt es keine Anhaltspunkte warum die Ausprägung des Phänotyps sehr variabel ist; Frauen sind meistens weniger schwer betroffen (WHYTE et al., 1996). Die Erforschung dieser Erbkrankheit wurde durch die Entdeckung der sogenannten *Hyp*-Maus (*Hyp* steht für die charakteristische Hypophosphatämie), einem murinen Gegenstück zur XLH, sehr vereinfacht (HRUSKA et al., 1995; TENENHOUSE, 1999). Der Phänotyp dieser Tiere zeigt eine große Übereinstimmung mit der humanen XLH: Man beobachtet die ausgeprägte Hypophosphatämie durch den renalen Phosphatverlust, die Wachstumsretardierung und auch eine veränderte Knochenhistologie (SCRIVER und TENENHOUSE, 1992). Als Ursache für die Erkrankung fand man verschiedene, inaktivierende Mutationen im sogenannten PHEX-Gen (die Abkürzung steht für "Phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome"), das auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms in Xp22.1 lokalisiert ist. PHEX wird im Knochen und in Zähnen, jedoch nicht in der Niere exprimiert. Die Nukleotidsequenz des entsprechenden murinen Phex-Gens stimmt zu über 90% mit dem des humanen Gens überein. Betrachtet man die Aminosäure-Sequenz, findet man eine deutliche Übereinstimmung mit Zink-Metallopeptidasen der M13-Familie, zu denen unter anderem die „Neutrale Endopeptidase (NEP), das Blutgruppen-Antigen KELL und die Endothelin-konvertierenden-Enzyme gehören. Die Ähnlichkeit auf molekularer Ebene von PHEX zu diesen Enzymen lässt vermuten, dass es ebenfalls an der Aktivierung bzw. Inaktivierung von bioaktiven Peptiden beteiligt ist (BECK et al., 1997, TURNER und TANZAWA, 1997, BARONCELLI et al., 2004). Ein vermutetes Substrat für PHEX ist FGF-23, dessen Serumkonzentration sowohl bei XLH-Patienten, als auch bei *Hyp*-Mäusen erhöht ist (WEBER et al., 2003, LIU et al., 2003). Die pathogenetischen Mechanismen, durch die Mutationen im PHEX-Gen das

Krankheitsbild der XLH auslösen, sind aber noch nicht vollständig geklärt. Die Ergebnisse einer Verpaarung von *Hyp*-Mäusen mit transgenen Tieren, die PHEX überexprimieren, deuten allerdings darauf hin, dass verschiedene und unabhängige Mechanismen für den renalen Phosphatverlust und die Knochendeformationen bei *Hyp* und XLH verantwortlich sind (ERBEN et al., 2005).

2.2.7.3 Autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis (ADHR)

Bei der ADHR handelt es sich um eine weitere Erbkrankheit, die durch einen renalen Phosphatverlust gekennzeichnet ist. Das Krankheitsbild entspricht dem der Rachitis bzw. Osteomalazie, allerdings sind die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Serumspiegel, ebenso wie bei der XLH-Erkrankung auch, wider Erwarten innerhalb des Referenzbereiches. Als Ursache für ADHR fand man im FGF23-Gen drei verschiedene Missense-Mutationen an Position 176 bzw. 179 (R176Q, R179W und R179Q), bei denen Argininreste durch Glutamin und Tryptophan oder Glutamin ersetzt werden. Aufgrund dieser Änderung kann das FGF-23-Protein nicht mehr gespalten und damit inaktiviert werden (ADHR CONSORTIUM, 2000; WHITE et al., 2001; BAI et al., 2003).

2.2.7.4 Tumor-induzierte Osteomalazie (TIO)

Von mesenchymalen Tumoren und vom Hämangioperizyotom ist bekannt, dass sie über paraneoplastische Sekretion phosphaturischer Substanzen, Symptome einer Osteomalazie verursachen können (DE BEUR et al., 2002). Als Auslöser für den renalen Phosphatverlust und die verminderte Expression der 1α -Hydroxylase hat man bestimmte Polypeptide gefunden, die bei fast allen TIO-Patienten überexprimiert werden: FGF-23 und oft auch FRP4. Diese Überexpression kann bereits als Tumormarker Verwendung finden (NELSON, 2003). Die Entfernung eines solchen Tumors bei TIO führt zur Normalisierung des Phosphatmetabolismus und der FGF-23-Serumspiegel, während eine kontinuierliche FGF-23-Gabe dieselben Symptome wieder auslösen kann (SHIMADA et al., 2001).

2.3 Fibroblast Growth Factor 23

2.3.1 Struktur

Bei dem vom ADHR-Consortium als erstes beschriebenen FGF-23 handelt es sich um ein kleines Polypeptid aus der Familie der Wachstumsfaktoren. Innerhalb dieser Familie erfolgt eine weitere Unterteilung in sieben Gruppen, FGF-23 wird der sogenannten FGF-19-Subfamilie zugeordnet (YAMASHITA, 2005). Das dazugehörige Gen ist auf Chromosom 12p13.3 lokalisiert, setzt sich aus drei Exons zusammen und umfasst knapp 11 kb an genomischer Sequenz. Mittlerweile sind insgesamt 25 dieser Familie zugehörige Faktoren gefunden worden. Ihre Gemeinsamkeit besteht weniger in einer ähnlichen Aktivität, sondern ergibt sich aus ihrer molekularen Struktur. Alle Mitglieder besitzen ein homologes Kernstück aus ungefähr 140 Aminosäuren. Sie formen, durch ihre Faltung in zwölf antiparallele β -Stränge, eine Art Zylinder, der durch die jeweils unterschiedlichen Amino- bzw. Carboxygruppen abgeschlossen wird. Interessanterweise ist diese Anordnung mit der von Interleukin-1 ($IL-1\alpha$ und -1β) identisch (ZHU et al., 1991). Die Namensgebung „Wachstumsfaktor“ erfolgte bei den zuerst gefundenen Faktoren (FGF-1 und 2) wegen ihrer stimulierenden Wirkung auf die Proliferation und Differenzierung verschiedener Zellen, danach numerisch nach ihrer Entdeckung. FGFs binden an spezifische Rezeptor-Tyrosinkinasen und bewirken dadurch eine Rezeptordimerisierung und -aktivierung, welche letztendlich eine Signaltransduktionskaskade auslöst (POWERS et al., 2000). Das FGF-23-Protein ist mit 251 Aminosäuren im Vergleich zu den bisher untersuchten FGFs relativ groß. Seine Anfangssequenz von 24 AS scheint für ein Signalpeptid zu codieren, dann folgt die für FGFs typische Kernsequenz. C-terminal weist es eine spezifische Verlängerung von 72 AS auf (FUKUMOTO, 2005). An diesem Übergang (zwischen Arg179 und Ser180) von der FGF-typischen Kernstruktur zu der für FGF-23 spezifischen Sequenz scheint die Stelle lokalisiert zu sein, an der das Protein gespalten wird und dadurch seine Inaktivierung erfolgt. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass nur das Wildtyp-Protein und mutiertes, und somit nicht mehr spaltbares FGF-23, hypophosphatämisch wirkt, nicht aber die C- oder N-terminalen Fragmente (SHIMADA et al., 2002).

FGF-23

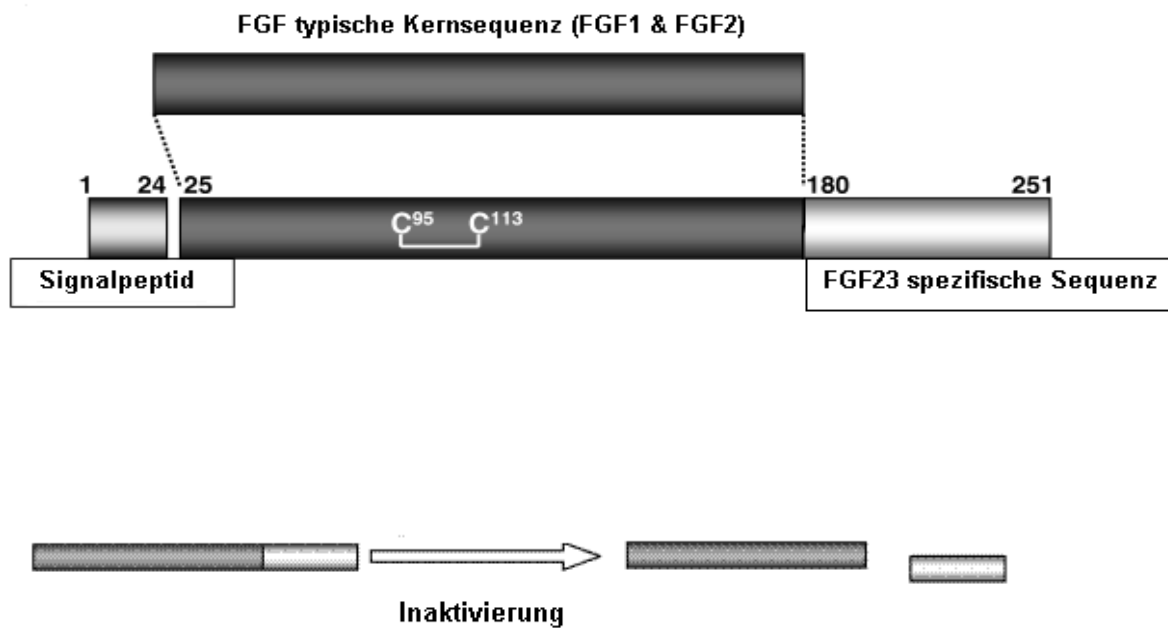


Abbildung 1: Schematische Struktur von *FGF-23* mit Darstellung der internen Spaltung (modifiziert nach Yamashita, 2005).

2.3.2 Expression

FGF-23 wird lediglich in einigen bestimmten Geweben exprimiert und die Transkription findet auch nur auf einem sehr geringen Level statt. Mittels Northern Blot Analyse kann man bei verschiedenen Krebszell-Linien entsprechende mRNA von 1,3 und 3 kb nachweisen. Durch Anwendung von RT-PCR konnte FGF-23 aus humanem Gewebe von Herz, Leber, Schilddrüse, Nebenschilddrüsen, Darm und Skelettmuskulatur amplifiziert werden, nicht jedoch aus der Niere (ADHR CONSORTIUM, 2000, SHIMADA, 2001). Aus weiteren Studien weiß man, dass die höchste FGF-23-Expression im Knochen stattfindet, gefolgt von Thymus, Hirn- und Herzgewebe. Vor allem während der Phase des „Remodelings“ erfolgt in den Osteoblasten und Osteozyten eine erhöhte Expression (RIMINUCCI et al., 2003; LIU et al., 2003; SITARA et al., 2004).

2.3.3 Wirkung

Die Wirkung und vor allem die Regulation von FGF-23 sind noch nicht vollständig bekannt. Durch Untersuchungen von bestimmten Krankheiten beim Menschen und durch Studien am Tiermodell und in der Zellkultur lassen sich jedoch einige Eigenschaften definieren. Wird im Organismus von Mensch oder Tier dieser Wachstumsfaktor überexprimiert oder kann er nicht durch Spaltung inaktiviert werden, entwickelt sich eine Hypophosphatämie aufgrund eines renalen Phosphatverlustes. Trotz dieses Phosphatmangels sind die Vitamin-D-Serumwerte unangepasst normal oder sogar erniedrigt (LARSSON et al., 2004). Auch rekombinantes FGF-23, in hohen Dosen appliziert, hat einen phosphaturischen Effekt, indem es die Expression der Natrium-Phosphat-Cotransporter in der Niere hemmt. Zu keinem Zeitpunkt ist eine Änderung der Parathormonspiegel feststellbar und die Hypophosphatämie bei Ratten, denen die Nebenschilddrüsen entfernt wurden, lässt sich durch FGF-23-Verabreichung reproduzieren. Die renale mRNA der 1α -Hydroxylase wird reduziert und die der 24,25-Hydroxylase steigt etwa eine Stunde nach der Injektion an (SEGAWA et al., 2003). Weitere Studien unterstützen die These, dass es sich bei FGF-23 um einen systemisch wirkenden, hormonähnlichen Faktor handelt. Untersuchungen an Knockout-Mäusen, bei denen das *Fgf-23*-Gen durch eine Neomycin-Kassette ersetzt wurde, haben gezeigt, dass ein Fehlen des Gens nicht zu embryonaler Letalität führt, der Organismus aber stark beeinträchtigt wird. Heterozygote Mäuse weisen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (WT) bezüglich äußerem Erscheinungsbild, klinisch chemischen Parametern und Histologie auf. Homozygote (-/-) Tiere zeigen jedoch Wachstumsretardierung ($6,6 \pm 0,2$ g vs. $23,6 \pm 1,1$ g beim WT im Alter von 11 Wochen), einen deutlich veränderten Knochenphänotyp und eine merklich verkürzte Lebenserwartung (<13 Wochen) (SHIMADA et al., 2004; SITARA et al., 2004). Das Bild einer vorzeitigen Alterung entsteht unter anderem durch Niereninsuffizienz, Gewebekalkifizierung, Muskelschwund, Kyphose, Thymus- und Milzatrophy. Zusätzlich stellt man eine Hypoglykämie fest. Bei den *Fgf-23*-defizienten Mäusen liegt immer eine ausgeprägte Hyperphosphatämie durch gesteigerte renale Phosphat-Reabsorption vor. Gleichzeitig sind die Serumspiegel von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stark erhöht. Daraus schließt man, dass dieser Wachstumsfaktor einen wichtigen Einfluss auf die Regulation der Phosphat- und Vitamin-D-Homöostase hat (SHIMADA et al., 2004; RAZZAQUE et al., 2006). Für eine andere Studie wurden *Fgf-23*-

heterozygote Mäuse mit *Hyp*-Mäusen gekreuzt, um das XLH-auslösende Phosphatonin zu bestimmen. Bei den Nachkommen aus dieser Verpaarung wird die Hypophosphatämie der *Hyp*-Mäuse vergleichsweise umgekehrt – die Tiere haben den Phänotyp von Fgf-23-defizienten Mäusen, einschließlich der erhöhten Phosphatwerte – so dass man andere phosphaturische Faktoren wie FRP und MEPE als Ursache für die XLH ausschließen kann (SITARA et al., 2004). Da die höchste FGF-23-Expression in den Osteoblasten und Osteozyten stattfindet, ist eine direkte Wirkung auf die Knochen naheliegend, allerdings noch nicht genau untersucht. Transgene Mäuse, die entweder verändertes humanes FGF-23 (R176Q) exprimieren, oder normales FGF-23 überexprimieren, weisen eine Wachstumsretardierung, histologisch veränderte Epiphysenfugen und Zeichen einer Osteomalazie auf. Allerdings weiß man dadurch noch nicht, ob die Ursache in einer direkten Wirkung des FGF-23 besteht oder ob es der systemische Einfluss des Wachstumsfaktors auf die Serumbiochemie ist (LARSSON et al., 2004; BAI et al., 2004).

2.3.4 Regulation

Die genaue Regulation von FGF-23 ist bisher nicht bekannt, aber wegen seines Einflusses auf die Phosphat- und Vitamin-D-Homöostase wäre eine Art Rückkopplungseffekt durch diese beiden Substanzen denkbar. In einer kleinen Studie war bei gesunden Probanden (n = 6) keine Beeinflussung der FGF-23-Serumspiegel auf eine kurzfristig veränderte diätetische Phosphatzufuhr feststellbar (LARSSON et al., 2003). Verlängert man jedoch die Dauer der verringerten, beziehungsweise erhöhten, Phosphatgabe und verhindert durch Kalziumsupplementierung einen eventuell verfälschenden Einfluss von PTH, so besteht eine umgekehrte Korrelation zwischen dem FGF-23- und dem Phosphat-Serumspiegel. Die Änderungen beim FGF-23 sind positiv mit den Änderungen der Phosphatausscheidung über den Urin (24-Stunden-Harn) korreliert, während sich die Veränderung der tubulären Phosphat-Reabsorption und die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegel genau umgekehrt verhalten (FERRARI et al., 2004). Der Einfluss des Vitamin D ist durch eine Vielzahl von Studien belegt. Im Tierversuch ist durch Injektionen von 20 bis 200 ng $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine dosisabhängige Erhöhung der Fgf-23-Serumspiegel auslösbar, der Anstieg erfolgt vor einer Änderung der Serum-Phosphatkonzentration (SHIMADA et al., 2004). Derselbe Effekt tritt auch bei Ratten auf, denen Schilddrüse und Nebenschilddrüsen entfernt

wurden (SAITO et al., 2005). Diese Ergebnisse passen zu früheren Untersuchungen des Einflusses von Fgf-23 auf den Vitamin-D-Metabolismus: Fgf-23 reguliert die 1α -Hydroxylase-mRNA und damit die Höhe des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ –Spiegels im Blut, während die biologisch aktive Form des Vitamin D den vorher beschriebenen Rückkopplungseffekt auf Fgf-23 hat (WHITE et al., 2006). Andere Forschergruppen haben einen genetischen Ansatz gewählt, um die jeweiligen Einflüsse von Phosphat, beziehungsweise Vitamin D, auf die Fgf-23-Serumkonzentration voneinander abzugrenzen. Bei Knockout-Mäusen mit genetisch veränderter DNA-Bindungsdomäne des VDR (LI et al., 1997) wurden deutlich niedrigere Fgf-23-Serumwerte als bei WT-Kontrolltieren gemessen, begleitet von einer Hypophosphatämie. Wurden bei diesen Tieren jedoch die niedrigen Phosphatwerte durch ein lediglich mit Kalzium supplementiertes Futter, oder durch eine Kalzium- und Phosphat-angereicherte Diät normalisiert, stiegen auch die Fgf-23-Serumwerte signifikant an. Daraus schließt man, dass die phosphatvermittelte Regulation des Fgf-23 unabhängig vom Vitamin-D-Rezeptor erfolgen kann (YU et al., 2005, SHIMADA et al., 2005). Eine neuere Studie zeigt mit Hilfe von In-vitro-Versuchen eine mögliche Beteiligung von Klotho als Cofaktor für die Regulation des FGF-23 (KUROSU et al., 2006).

2.4 Klotho

1997 wurde eine weitere Mauslinie beschrieben, bei der einige Tiere einen den Fgf-23-defizienten Mäusen sehr ähnlichen Phänotyp aufweisen: unter anderem Wachstumsretardierung, verkürzte Lebenserwartung, Kyphose, Muskelschwund und ektopische Kalzifizierung. Als Ursache fand man ein mutiertes Gen – *Klotho* – welches vorzeitige Alterserscheinungen bei Mäusen hervorruft, die homozygot für dieses Allel sind. Da die charakteristischen Befunde bei diesen Mäusen durch eine gestörte Kalzium- und Phosphathomöostase bedingt sind, wird ein entscheidender Einfluss von *Klotho* für deren Regulation und die von Vitamin D postuliert (KURO-O et al., 1997, NEGRI, 2005).

2.4.1 Struktur

Erste Forschungsarbeiten haben ergeben, dass das *Klotho*-Gen für ein neues Typ I Membranprotein der β -Glucosidasen-Familie 1 codiert. Die Zuordnung erfolgte aufgrund seiner molekularen Struktur. Es weist eine ähnliche Aminosäuren-Sequenz wie

Mitglieder der oben genannten Proteinfamilie auf, allerdings fehlen typische Glutamin-Reste, die an der katalytischen Aktivität dieser Enzymgruppe beteiligt sind. Untersuchungen haben gezeigt, dass das Protein dennoch spezifisch Steroid- β -Glucuronide hydrolysiert und seine Enzymaktivität durch spezifische β -Glucuronidase-Hemmer gehemmt wird (TOHYAMA et al., 2003). Das humane *Klotho*-Gen ist auf Chromosom 13q12 lokalisiert, besteht aus 5 Exons und umfasst 50 kb an genomischer Sequenz. Analysen von isolierter humaner *Klotho*-cDNA haben gezeigt, dass durch alternatives Spleißen zwei Transkripte entstehen: Ein Transkript enthält ein offenes Leseraster (open reading frame) von 1012 Aminosäuren (1014 AS bei Maus und Ratte) und codiert für das oben erwähnte Transmembranprotein. Die Struktur ist mit dem *Klotho*-Protein der Maus identisch und besteht aus einer N-terminalen Signal-Sequenz, einer aus zwei „internal repeats“ (hKL1, hKL2) bestehenden extrazellulären Domäne, einer membranübergreifenden Region und einer kurzen intrazellulären Domäne (Abb.2). Das andere Transkript entspricht dieser Membranform, weist aber ein Stop-Codon auf, infolge dessen das codierte Protein nur noch 549 Aminosäuren aufweist. Dadurch fehlt hKL2, die Intrazellular- und die Transmembran-Domäne. Vermutlich handelt es sich bei dieser verkürzten Isoform um ein sekretorisches Protein (MATSUMURA et al., 1998; SHIRAKI-IIDA et al., 1998).

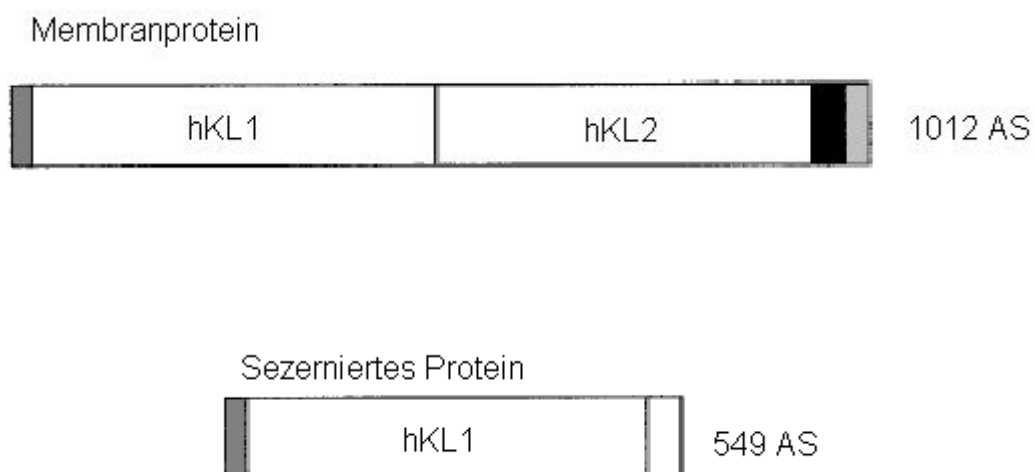


Abbildung 2: Schematische Struktur der Klotho-Proteine aufgrund humaner cDNA-Analyse

In neueren Studien konnte dieses lösliche KL1, als Produkt des alternativen Spleißens der mRNA, nicht nachgewiesen werden. Stattdessen fand man mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern ein extrazelluläres Klotho-Protein im Serum und in der Zerebrospinalflüssigkeit von Mäusen. Da diese sezernierte Form von Klotho mit 130 kDa größer ist als das nach den Gen-Transkripten angenommene von nur 70 kDa, vermutet man posttranslationale Prozesse, wie beispielsweise eine Oligomerisierung (IMURA et al., 2004).

2.4.2 Expression

Den bisherigen Studien zufolge findet bei Mäusen, im Gegensatz zum Menschen, nur eine geringe für das lösliche KL1 codierende mRNA-Expression statt und die Serumspiegel von KL1 sind gering. Möglich sind aber auch eine sehr kurze Halbwertszeit und schnelle Elimination, die die Bestimmung im Serum erschweren (MATSUMURA et al., 1998). Der Haupt-Expressionsort von Klotho befindet sich im Gehirn und in der Niere, hier ausschließlich im distalen Tubulus des Nephrons. Mit Hilfe von RT-PCR und Immunhistologie ist ein geringeres Vorkommen auch in Plazenta, Skelettmuskulatur, Harnblase, Aorta, Pankreas, in primären Geschlechtsorganen, Kolon und Schilddrüse nachweisbar, nicht aber in Knochen, Haut, Magen oder Lunge (KURO-O et al., 1997; LI et al., 2004).

2.4.3 Wirkung

Über die genaue Bedeutung von Klotho für den Organismus herrscht noch große Unklarheit. Bisherige Informationen basieren fast nur auf der Beschreibung des Phänotyps von Klotho-defizienten Mäusen und auf In-vitro-Versuchen. Diese Tiere haben einen Defekt in der *klotho*-Expression, der sich in einem Syndrom äußert, das große Ähnlichkeit zum Alterungsprozess beim Menschen aufweist. Interessanterweise sind davon auch viele Organe betroffen, in denen Klotho nicht exprimiert wird. Für diese Mutation homozygote Mäuse (*kl/kl*) zeigen eine Wachstumsretardierung ab einem Alter von drei bis vier Wochen (das Gewicht erreicht nie mehr als 10 g) und eine deutlich verkürzte Lebensdauer von durchschnittlich 60 Tagen. Nach dem Absetzen lassen sich eine zunehmende Inaktivität (Reduzierung der Spontanmotorik um bis zu 50%) und Marasmus beobachten (KURO-O et al., 1997). Es liegt eine Atrophie von Thymus und Haut vor, ebenso von Hoden, Ovar und Uterus. Die

histologischen Untersuchungen zeigen Arteriosklerose, ektopische Kalzifizierungen in vielen Organen (unter anderem Magen- und Gefäßwände, Lunge, Choroidplexus, Haut und Herzmuskel) und die Ausbildung eines Lungenemphysems. Die Histologie von Knochen solcher Tiere ähnelt dem Zustand bei humaner Osteoporose mit „low-turnover“- Osteopenie: sie haben alle eine geringere Knochendichte als die von WT-Wurfgeschwistern und weisen eine reduzierte Anzahl von Osteoblasten auf (KAWAGUCHI et al., 1999). Färbungen der Glandula pituitaria mittels Immunhistochemie zeigen eine Verkleinerung der GH-produzierenden Zellen (Growth Hormon). Bei den untersuchten Blutparametern zeigen Kalzium, Phosphat und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine leichte Erhöhung und man findet erniedrigte Glukose- und Insulinspiegel (KURO-O et al., 1997; TSUJIKAWA et al., 2005). Weitere Einblicke über die Wirkungsweise ergab die Generierung einer Mäuselinie, die Klotho unter der Kontrolle eines humanen Elongationsfaktor- 1α -Promotors überexprimiert. Solche Tiere leben - je nach Geschlecht - zwischen 18 und 30% länger als WT-Kontrollen. Auffällig ist eine geringere Fertilität und eine veränderte Insulinresistenz. Durch In-Vitro-Versuche in der Zellkultur vermutet man, dass Klotho die Insulin-Signalübertragung durch Hemmung der Tyrosin-Phosphorylierung von Insulin- und IGF1-Rezeptoren beeinflusst (KUROSU et al., 2005). Eine weitere wichtige Rolle scheint Klotho in der Regulation der Kalzium-Homöostase zu übernehmen. Durch Hydrolyse von extrazellulären Oligosacchariden des Kalziumkanals TRPV5 wird dieser aktiviert (CHANG et al., 2005; LEWIN und OLGAARD, 2006).

2.4.4 Regulation

Da die Wirkung von Klotho noch nicht genau bekannt ist, sind Aussagen zur Regulation desselben sehr schwierig und stellen lediglich Vermutungen dar. Bisher weiß man nur, dass die Reduzierung des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durch eine Vitamin-D-arme Diät den Phänotyp der kl/kl-Mäuse deutlich verbessert. Bei gesunden Mäusen induziert die Gabe von Vitamin D die Expression von Klotho in der Niere (TSUJIKAWA et al., 2005). Eine Reduktion des Phosphorgehalts im Futter führt ebenfalls zu einer deutlichen klinischen Verbesserung bei männlichen kl/kl-Mäusen. Bei weiblichen Tieren muss allerdings für einen ähnlichen Effekt, neben der Phosphatreduktion, Zink supplementiert werden (MORISHITA et al., 2001). Aufgrund der festgestellten Veränderungen bei den oben beschriebenen Klotho-defizienten Mäusen, also erhöhte Calcitriol-, 1α -Hydroxylase-, Kalzium- und Phosphat-Spiegel,

vermutet man eine Beteiligung von *klotho* in Form eines negativen Feedback-Mechanismus am endokrinen Vitamin-D-System (YOSHIDA et al., 2002; NABESHIMA, 2002; Razzaque et al., 2006).

3 Publikation

Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23 results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in *PheX*-deficient mice

Despina Sitara^a, Mohammed S. Razzaque^a, Martina Hesse^b, Subbiah Yoganathan^c, Takashi Taguchi^d, Reinhold G. Erben^b, Harald Jüppner^e, Beate Lanske^a

^a Department of Oral and Developmental Biology, The Forsyth Institute, Harvard School of Dental Medicine, 140 The Fenway, Boston, MA, 02115, USA

^b Institute of Physiology, Physiological Chemistry and Animal Nutrition, Ludwig Maximilians University, Munich, Germany

^c Animal Facility, The Forsyth Institute, Boston, MA, USA

^d Department of Pathology, Nagasaki University, Graduate School of Medical Sciences, Nagasaki, Japan

^e Endocrine Unit, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA, USA

Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23 results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in *Phex*-deficient mice

Despina Sitara^a, Mohammed S. Razzaque^a, Martina Hesse^b, Subbiah Yoganathan^c, Takashi Taguchi^d, Reinhold G. Erben^b, Harald Jüppner^e, Beate Lanske^{a,*}

^aDepartment of Oral and Developmental Biology, The Forsyth Institute, Harvard School of Dental Medicine, 140 The Fenway, Boston, MA, 02115, USA

^bInstitute of Physiology, Physiological Chemistry and Animal Nutrition, Ludwig Maximilians University, Munich, Germany

^cAnimal Facility, The Forsyth Institute, Boston, MA, USA

^dDepartment of Pathology, Nagasaki University, Graduate School of Medical Sciences, Nagasaki, Japan

^eEndocrine Unit, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA, USA

Received 22 September 2004; received in revised form 24 September 2004; accepted 24 September 2004

Abstract

Fibroblast growth factor-23 (FGF-23), a recently identified molecule that is mutated in patients with autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR), appears to be involved in the regulation of phosphate homeostasis. Although increased levels of circulating FGF-23 were detected in patients with different phosphate-wasting disorders such as oncogenic osteomalacia (OOM) and X-linked hypophosphatemia (XLH), it is not yet clear whether FGF-23 is directly responsible for the abnormal regulation of mineral ion homeostasis and consequently bone development. To address some of these unresolved questions, we generated a mouse model, in which the entire *Fgf-23* gene was replaced with the *lacZ* gene. *Fgf-23* null (*Fgf-23*^{-/-}) mice showed signs of growth retardation by day 17, developed severe hyperphosphatemia with elevated serum 1,25(OH)₂D₃ levels, and died by 13 weeks of age. Hyperphosphatemia in *Fgf-23*^{-/-} mice was accompanied by skeletal abnormalities, as demonstrated by histological, molecular, and various other morphometric analyses. *Fgf-23*^{-/-} mice had increased total-body bone mineral content (BMC) but decreased bone mineral density (BMD) of the limbs. Overall, *Fgf-23*^{-/-} mice exhibited increased mineralization, but also accumulation of unmineralized osteoid leading to marked limb deformities. Moreover, *Fgf-23*^{-/-} mice showed excessive mineralization in soft tissues, including heart and kidney. To further expand our understanding regarding the role of *Fgf-23* in phosphate homeostasis and skeletal mineralization, we crossed *Fgf-23*^{-/-} animals with *Hyp* mice, the murine equivalent of XLH. Interestingly, *Hyp* males lacking both *Fgf-23* alleles were indistinguishable from *Fgf-23*^{-/-} mice, both in terms of serum phosphate levels and skeletal changes, suggesting that *Fgf-23* is upstream of the phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome (*Phex*) and that the increased plasma Fgf-23 levels in *Hyp* mice (and in XLH patients) may be at least partially responsible for the phosphate imbalance in this disorder.

© 2004 Elsevier B.V./International Society of Matrix Biology. All rights reserved.

Keywords: *Fgf-23* null; *Hyp*; Phosphate; Mineralization; Bone

1. Introduction

Inorganic phosphate (Pi) is not only essential for intracellular signalling, DNA synthesis, and energy metab-

olism, but it is also essential for normal skeletal growth and development. However, despite its broad biological importance, the regulation of phosphate homeostasis is not clearly understood. Recent advances have provided new insights into the complex mechanisms involved in renal phosphate handling and bone mineralization (Drezner, 2002). Particularly the molecular definition of two

* Corresponding author. Tel.: +1 617 432 5748; fax: +1 617 432 5767.

phosphate-wasting disorders, X-linked hypophosphatemia (XLH), which is caused by mutations in PHEX (Holm et al., 1997; HYP_Consortium, 1995), and autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR), which is caused by mutations in FGF-23 (ADHR_Consortium, 2000; Econs et al., 1997; White et al., 2001), has identified important factors involved in the regulation of phosphate homeostasis. Furthermore, overexpression of FGF-23 was found in some tumors that cause oncogenic osteomalacia (OOM) (Seufert et al., 2001; Shimada et al., 2001; White et al., 2002); a significant elevation of plasma FGF-23 concentrations was detected in these patients (Jonsson et al., 2003; Nelson et al., 2003; Yamazaki et al., 2002). Several phosphaturic factors, including FGF-23, frizzled-related protein 4 (FRP4), and matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) were cloned from cDNA libraries derived from OOM tumors (Berndt et al., 2003; De Beur et al., 2002; Rowe et al., 2004; Shimada et al., 2001), for instance, hemangiopericytoma.

Understanding the molecular and cellular mechanisms involved in the regulation of phosphate homeostasis is particularly important as low serum phosphate levels can result in defective skeletal growth and mineral ion deposition, in turn leading to osteomalacia and rickets. In contrast, high serum phosphate levels contribute to the development of arteriosclerosis, soft tissue calcifications in mice and human, and secondary hyperparathyroidism, particularly in end-stage renal disease in human (Bai et al., 2002; Dunstan et al., 2004; Imanishi et al., 2004; Larsson et al., 2003; Schiavi and Kumar, 2004; Weber et al., 2003).

Recently, recombinant FGF-23 was shown to selectively enhance renal phosphate excretion when given in vivo (Shimada et al., 2004a; Shimada et al., 2002). Furthermore, transgenic mice overexpressing human wild-type FGF-23 under the control of different promoters showed hypophosphatemia and increased urinary phosphate excretion due to reduced expression of the sodium-dependent phosphate cotransporter types IIa (NaPi-2a) and IIc (NaPi-2c) in the renal cortex (Larsson et al., 2004; Shimada et al., 2004b). Renal phosphate wasting in these transgenic mice also led to skeletal abnormalities such as disrupted growth plates and reduced bone mineral density (BMD) (Larsson et al., 2004; Shimada et al., 2004b). Similarly, transgenic mice overexpressing human (R176Q) FGF-23, a mutant form of FGF-23 resistant to degradation by furin-like proteases (Bai et al., 2003), showed more pronounced hypophosphatemia and rickets/osteomalacia (Bai et al., 2004) than animals expressing the wild-type FGF-23 (Bai et al., 2003; Saito et al., 2003).

XLH is the most common form of inherited rickets, which is caused by inactivating mutations in a phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome, termed PHEX (HYP_Consortium, 1995). *Hyp* mice represent the murine homologue of XLH (Du et al., 1996; Strom et al., 1997; Tenenhouse, 1999), and

these animals exhibit renal phosphate wasting and hypophosphatemia, as well as high serum Fgf-23 levels (Aono et al., 2003). On the other hand, targeted disruption of *Fgf-23* gene in mice was shown to result in hyperphosphatemia, diminished phosphate excretion, and up-regulation of NaPi-2a expression in proximal tubular cells as well as decreased bone mineral density (Shimada et al., 2004a).

Despite recent advances in our understanding of FGF-23 in the regulation of phosphate homeostasis and bone development, several key questions remain to be solved. For instance, the cellular source of FGF-23 and effector organs are not yet clearly defined (Carpenter, 2003; Riminucci et al., 2003; Strewler, 2001).

Furthermore, reported studies provide conflicting data regarding the role of PHEX in the degradation of FGF-23 (Bowe et al., 2001; Campos et al., 2003; Liu et al., 2003), and it remains uncertain whether FGF-23 is responsible for phosphate wasting in patients with XLH or in *Hyp* mice. To address some of these partially resolved questions, we generated *Fgf-23* null mice by replacing the entire coding region (exons 1–3) of the mouse *Fgf-23* gene with the *lacZ* gene, thus providing a sensitive tool for examining the expression pattern of *Fgf-23* during embryonic and post-embryonic development.

2. Results

2.1. Generation of *Fgf-23* null mice

Targeted deletion of the *Fgf-23* gene resulted in viable heterozygous (*Fgf-23*^{+/-}) and homozygous mutant animals (*Fgf-23*^{-/-}) (Fig. 1A and B). Heterozygous mice appeared to be healthy and were fertile. *Fgf-23*^{-/-} mice were born at the expected Mendelian ratio, and, at birth, their gross appearance were indistinguishable from those of their wild-type littermates. The number of males and females born was comparable (30 females vs. 28 males). By day 10, *Fgf-23* null animals showed visually detectable growth retardation, which became significantly different by day 17. The mean body weight of *Fgf-23*^{-/-} mice at 11 weeks was 6.6±0.2 vs. 23.6±1.1 g for *Fgf-23*^{-/-} and wild-type males, respectively (*p*<0.001). Moreover, the longevity of the *Fgf-23*^{-/-} mice was markedly shorter than that of either wild-type or heterozygous *Fgf-23*^{+/-} littermates. The survival rate of homozygous mice did not differ significantly between male and female (*p*=0.6965); all *Fgf-23*^{-/-} animals had died by 13 weeks of age.

2.2. Expression of *lacZ* under the control of the endogenous *Fgf-23* promoter

To study *Fgf-23* expression prenatally, we performed β-galactosidase staining of heterozygous and wild-type

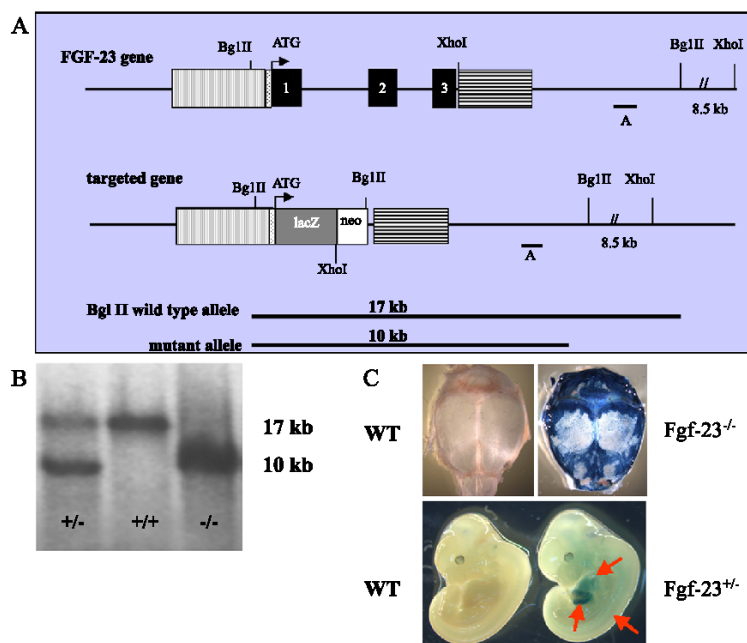


Fig. 1. (A) Schematic representation of the murine *Fgf-23* gene and the corresponding knock-out/in targeting vector. Exons 1 to 3 are shown in black boxes. Vertical and horizontal shaded boxes represent the 5' and 3' flanking regions of the *Fgf-23* gene, respectively, which were used for homologous recombination. The *lacZ* gene was cloned in frame with the initiator methionine of the *Fgf-23* gene. The *neomycin* resistance (*neo*) gene is driven by the phosphoglycerate kinase-1 (PGK-1) promoter and contains an Sv40 polyA adenylation site. Probe A was used as external probe to hybridize genomic Southern blots (*Bgl*III digest) shown in (B) (wild type=+/+, heterozygous=+/-, homozygous=-/-). Panel (C) represents lacZ staining of a wild-type (lower left) and a heterozygous *Fgf-23* embryo (*Fgf-23*^{+/-}, lower right) at E12.5. Arrows depict lacZ positive tissues (somites, liver, and heart). Upper panels demonstrate lacZ staining in a wild type (left) and *Fgf-23*^{-/-} (right) skull at 3 weeks. Blue staining represents expression of the *Fgf-23* gene.

embryos at E11.5 (data not shown) and E12.5. LacZ-positive staining was clearly detectable in three predominant sites: heart, liver, and somites; wild-type littermates did not show any staining (Fig. 1C). To evaluate the expression of *Fgf-23* postnatally, we performed lacZ staining using skull bones, such as calvaria, obtained from 4- and 6-week-old wild-type and *Fgf-23*^{-/-} mice. Strong blue staining was visible in osteoblasts and cells at the sutures of mutants; no lacZ staining was detected in bones of wild-type controls, even after an extended period of staining.

2.3. Serum measurements in *Fgf-23*^{-/-} mice

Serum phosphate levels of wild-type and *Fgf-23*^{-/-} male and female mice were assessed at 3 and 6 weeks. *Fgf-23*^{-/-} mice ($n=7$) showed significantly higher serum phosphate levels than control littermates ($n=15$; 16.3 ± 0.3 vs. 9.6 ± 0.5 mg/dl) at 3 weeks (see Fig. 7B). In addition, we detected significantly higher serum $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ concentration in *Fgf-23*^{-/-} animals (368.1 ± 226.3 pg/ml) than in wild-type mice (56.4 ± 13.8 pg/ml). Similarly, alkaline phosphatase activity was higher in *Fgf-23*^{-/-} than in wild-type mice (990.86 ± 317.22 vs. 238.33 ± 38.45 U/l). There was no significant change in PTH concen-

tration, both in wild-type and mutant mice (data not shown).

2.4. Abnormal bone mineral content and density in *Fgf-23*^{-/-} mice

Fgf-23^{-/-} mice were markedly growth-retarded and exhibited reduced body weight, size, and consequently skeletal size. We analysed *Fgf-23*^{-/-} and wild-type littermates by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) for whole-body bone mineral content (BMC) normalized to body weight at 3 (control $n=8$, *Fgf-23*^{-/-} $n=6$), 6 (control $n=9$, *Fgf-23*^{-/-} $n=6$), and 11 weeks (control $n=2$, *Fgf-23*^{-/-} $n=2$). We observed that *Fgf-23*^{-/-} mice had significantly higher BMC/g at all time points measured (Fig. 2A). Furthermore, the difference in BMC/g calculated among *Fgf-23*^{-/-} animals differed significantly at 3, 6, and 11 weeks of age. However, autoradiographic studies (Fig. 2B) showed that the bone mineral density (BMD) of hindlimbs (and forelimbs, data not shown) was strikingly decreased in *Fgf-23*^{-/-} animals. To further validate this observation, we performed additional measurements of fore- and hindlimbs by DEXA. These analyses confirmed that hindlimb BMD of *Fgf-23*^{-/-} animals was significantly reduced at all investigated time points (Fig. 2C). The difference in BMD among *Fgf-23*^{-/-}

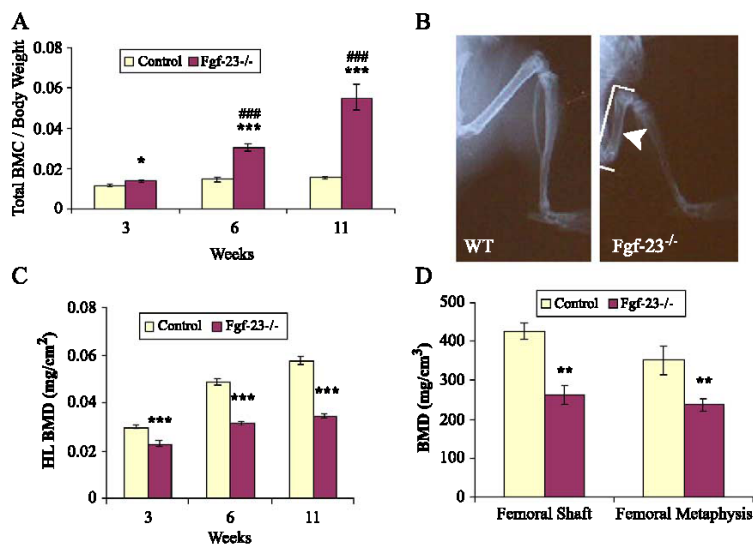


Fig. 2. (A) Graphic display of total bone mineral content (BMC) of control and *Fgf-23*^{-/-} animals at 3, 6, and 11 weeks. Each value obtained for BMC was normalized to the body weight of the corresponding animal. *Fgf-23*^{-/-} mice show a statistically significant increase in total BMC when compared to control littermates (*=*p*<0.05; ***=*p*<0.0001). A statistically significant increase in total BMC was also observed among *Fgf-23*^{-/-} mice with time (###=*p*<0.0001). (B) X-ray autoradiography of hindlimbs from a wild-type (WT) and an *Fgf-23*^{-/-} mouse. Brackets depict length, and arrowhead depicts thickness of femur in *Fgf-23*^{-/-} mouse. (C) Graph represents bone mineral density of hindlimbs measured by PIXImus analysis. *Fgf-23*^{-/-} mice show a statistically significant decrease in BMD at 3, 6, and 11 weeks when compared to controls (***=*p*<0.0001). (D) BMD obtained from femoral shaft (left) and femoral metaphysis (right) of wild-type (white bar) and *Fgf-23*^{-/-} animals (dark bar) by QCT at 4 weeks of age. *Fgf-23*^{-/-} mice show a statistically significant decrease in BMD (**=*p*<0.001).

animals increased significantly with time. We extended our measurements by peripheral quantitative computerized tomography (pQCT) and again found that volumetric BMD of the femoral shaft and the femoral metaphysis was lower in *Fgf-23*^{-/-} (*n*=7) mice compared with wild-type littermates (*n*=7) at 4 weeks of age (Fig. 2D).

2.5. Abnormal bone formation, skeletal mineralization, and development of soft tissue calcifications in *Fgf-23*^{-/-} mutants

To further examine bone mineralization in *Fgf-23*^{-/-} animals, we performed Alizarin Red S staining of whole-

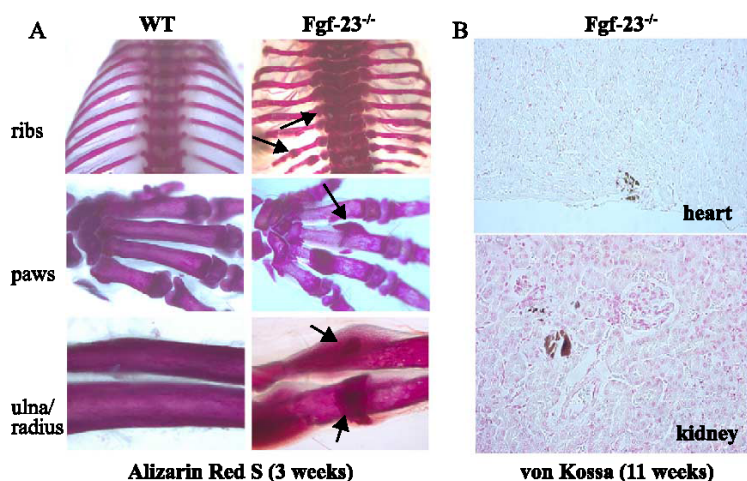


Fig. 3. (A) Alizarin red S staining of skeletal elements (ribs, paws, ulna/radius) from a wild type (left panels) and *Fgf-23*^{-/-} (right panels) at 3 weeks. Arrows depict some areas with abnormal mineralization in *Fgf-23*^{-/-} bones. (B) Abnormal mineralization is shown in heart (top) and in and around the tubules of *Fgf-23*^{-/-} kidney (bottom) at 11 weeks. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

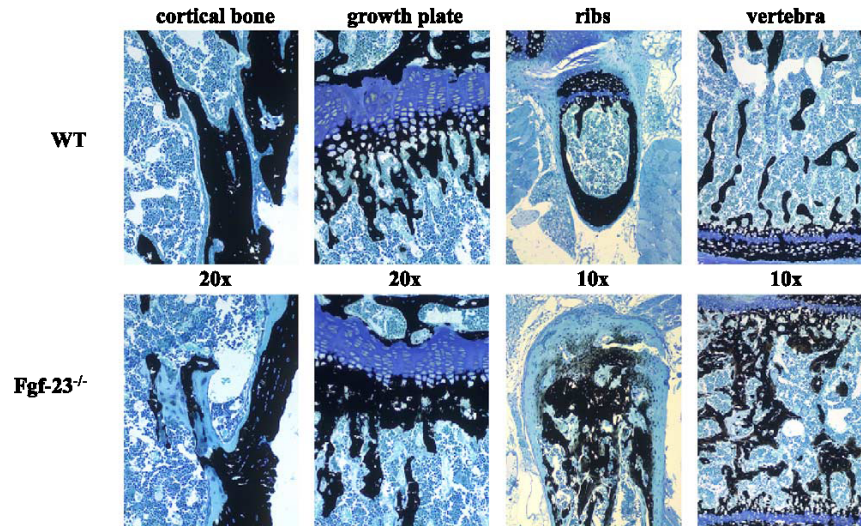


Fig. 4. Three-micrometer-thick undecalcified sections from 4-week-old wild-type (upper panels) and *Fgf-23*^{-/-} (lower panels) bones (cortical bone, growth plate, ribs, vertebra) were stained with von Kossa/McNeal (magnification 20×, 10×). Black staining represents mineralization. More mineral deposition is found in the area below the growth plate (metaphysis), ribs, and in vertebra. In contrast, areas of unmineralized osteoid (light blue) are found in cortical bone. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

body skeletons and compared them with wild-type littermates at 3 and 6 weeks. During dissections, it became evident that *Fgf-23*^{-/-} mice suffered from severe axial and appendicular skeletal malformations, which were confirmed by staining for bone mineral (Fig. 3A). Furthermore, we noted the presence of bone nodules at most ribs and paws and the presence of lesions that were reminiscent of rachitic changes, such as widened epiphysis (ribs) and transparency of stained bones (paw). Excessive mineral accumulation

was also noted in areas surrounding the shaft of radius and ulna of *Fgf-23*^{-/-} mice. However, despite increased yet disproportionate accumulation of bone mineral, the mutant bones were abnormally fragile and deformed. Von Kossa staining of different soft tissues at various time points postnatally showed considerable mineralization in non-skeletal tissues of *Fgf-23*^{-/-} mice. As shown in Fig. 3B, abnormal mineralization was detected in various organs, including heart and kidney of older animals.

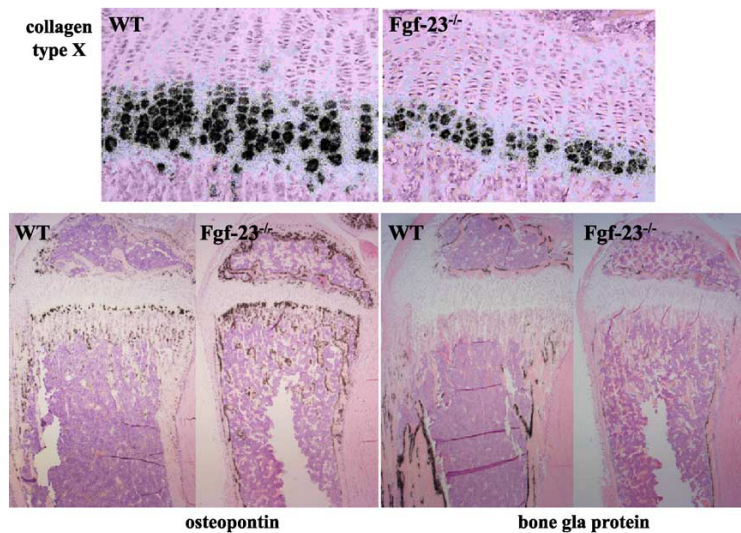


Fig. 5. In situ hybridization was performed on 6µm-thick decalcified paraffin sections from tibia of wild-type (WT) and *Fgf-23*^{-/-} animals at 3 weeks. The zone of hypertrophic chondrocytes was reduced in *Fgf-23*^{-/-}, which was confirmed by decreased collagen type X mRNA expression. In contrast, osteopontin mRNA expression was elevated in osteoblasts of *Fgf-23*^{-/-} animals, while bone gla protein (osteocalcin) mRNA expression was diminished.

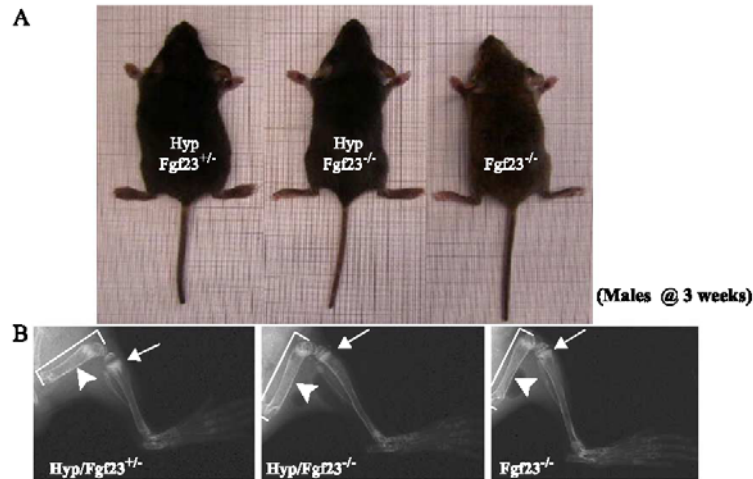


Fig. 6. (A) Gross features of three male littermates at 3 weeks. Shown are *Hyp/Fgf23^{+/-}* (left), *Fgf23^{-/-}* (right), and compound mutants *Hyp/Fgf23^{-/-}* (middle). (B) X-ray autoradiographs of hindlimbs from the same animals shown in panel (A). Arrows point to the growth plate of tibia. The features typical of rickets shown in *Hyp/Fgf23^{+/-}* (left panel) had improved considerably in compound mutants *Hyp/Fgf23^{-/-}* (middle panel). Arrowheads depict thickness of femoral shaft of these animals. *Hyp/Fgf23^{-/-}* compound mutants (middle) exhibit longer (brackets) and thinner long bones than *Hyp/Fgf23^{+/-}* (left) animals.

To further study the mineralization patterns of mutant bones, we performed histological analyses on methylmethacrylate sections (Fig. 4). Histological examination of femurs from 4-week-old *Fgf-23^{-/-}* mice revealed increased osteoid formation in cortical bone. In addition, the growth plates were narrowed with decreased numbers of hypertrophic chondrocytes in the mutants. More mineral deposition was apparent in the primary spongiosa immediately adjacent to the hypertrophic chondrocytes. Histology of ribs and vertebra showed a marked increase

in woven bone formation and a striking accumulation of osteoid.

2.6. Chondrocyte and osteoblast differentiation in *Fgf-23^{-/-}* mice

To further analyse the differentiation status of bone cells, we performed in situ hybridizations on paraffin sections from tibia of *Fgf-23^{-/-}* mice ($n=6$) and wild-type littermates ($n=6$) at 3 weeks of age (Fig. 5). We were able to confirm the

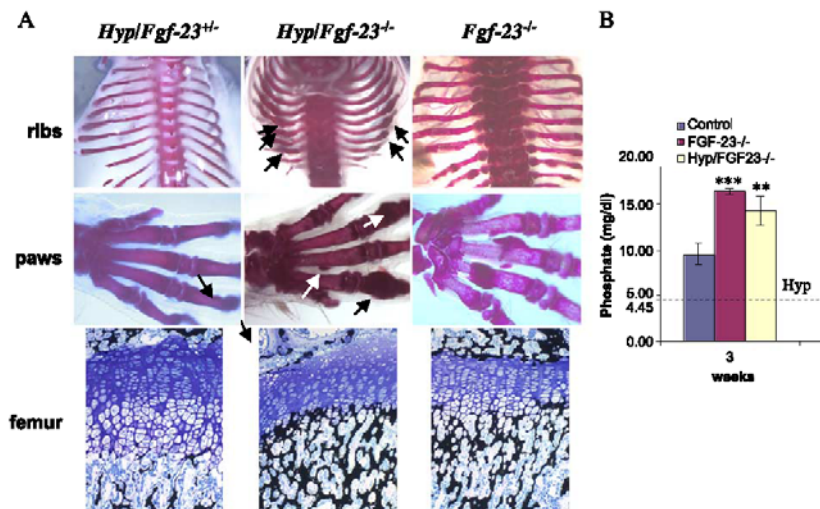


Fig. 7. (A) Alizarin red S staining of skeletal elements (ribs, paws) from a *Hyp/Fgf23^{+/-}* (left), *Hyp/Fgf23^{-/-}* (middle), and *Fgf23^{-/-}* (right) mice at 3 weeks. Arrows depict some areas with abnormal mineralization in *Hyp/Fgf23^{-/-}* bones resembling the phenotype of *Fgf23^{-/-}* skeleton. Lower panels represent 3 μ m-thick undecalcified sections from femur of 3-week-old *Hyp/Fgf23^{+/-}* (left), *Hyp/Fgf23^{-/-}* (middle), and *Fgf23^{-/-}* (right) mice stained with Von Kossa/McNeal. Panel (B) represents a graph comparing serum phosphate levels of wild-type controls, *Fgf23^{-/-}*, and *Hyp/Fgf23^{-/-}* compound mutants at 3 weeks of age. The horizontal dotted line illustrates published serum phosphate levels in *Hyp* mice (mean: 4.45 mg/dl) (***) $p < 0.0001$; ** $p < 0.001$) (Lorenz-Depiereux et al., 2004).

previously noted (Shimada et al., 2004a) reduction of hypertrophic chondrocytes from 6–10 cell layers in wild-type to 3–5 cell layers in mutant animals, as demonstrated by the marked decrease in collagen type X expression. We also examined expression of osteopontin, a marker of late hypertrophic chondrocytes and early osteoblasts, and observed a relative increase in expression in osteoblasts from *Fgf-23*^{-/-} mice. In contrast, expression of bone gla protein, a marker for mature osteoblasts, was clearly reduced in *Fgf-23*^{-/-} mice.

2.7. Generation and analyses of male *Hyp* mice lacking both *Fgf-23* alleles

To analyse the consequences of complete ablation of both *Fgf-23* and *Phex*, we generated male *Hyp* mice that were null for *Fgf-23* (*Hyp/Fgf-23*^{-/-}) and compared the findings to male animals of the genotypes *Hyp/Fgf-23*^{+/-} and *Fgf-23*^{-/-}; analyses were performed at 3 weeks of age. Compound mutants (*Hyp/Fgf-23*^{-/-}) were viable and indistinguishable from wild-type animals at birth. Gross appearances among the three analysed genotypes are shown in Fig. 6A. Evaluation of bones by X-ray studies (Fig. 6B) showed that *Hyp/Fgf-23*^{+/-} animals exhibited extremely short and thickened femurs, as well as cupping of the metaphysis below the growth plates, findings which are characteristic of *Hyp* mice (Miao et al., 2001). In comparison, bones of compound mutants were longer and thinner with relatively regular appearing growth plates. We further analysed the mineralization pattern of the skeleton of these animals by Alizarin Red S staining (Fig. 7A) at 3 weeks of age. In contrast to *Hyp/Fgf-23*^{+/-} animals, which did not show any apparent changes compared to wild-type males (see Fig. 3A), the skeleton of the compound mutants *Hyp/Fgf-23*^{-/-} resembled more closely that of *Fgf-23*^{-/-} mice. In particular, *Hyp/Fgf-23*^{-/-} animals showed similar nodular deformities in ribs and paws that were initially observed in *Fgf-23*^{-/-} mice (Fig. 7A, shown by arrows). Histological analyses on methylmethacrylate sections of femurs from 3-week-old mice showed strong resemblance in the mineralization pattern of *Hyp/Fgf-23*^{-/-} and *Fgf-23*^{-/-} mice. Serum phosphate level was significantly higher in *Hyp/Fgf-23*^{-/-} animals (14.2±1.6 mg/dl, n=2) than in *Hyp* mice (about 4 mg/dl), as previously reported (Lorenz-Depiereux et al., 2004), and thus were similar to those observed in *Fgf-23*^{-/-} mice (16.3±0.28) (Fig. 7B; Shimada et al., 2004a).

3. Discussion

In the present study, we generated mice in which the entire coding region of the *Fgf-23* gene had been replaced with the *lacZ* gene and the *neomycin*-resistance cassette. In comparison to wild-type littermates, mice with ablation of both *Fgf-23* alleles were smaller in size, showed gross

deformities of numerous skeletal elements, and died prematurely. These animals furthermore had severe hyperphosphatemia and elevated serum 1,25(OH)₂D₃ levels, which confirms that *Fgf-23* is an important regulator of 1-alpha hydroxylase activity (Larsson et al., 2004; Shimada et al., 2004a). In contrast, heterozygous *Fgf-23*^{+/-} animals showed no obvious skeletal abnormalities, and their size and longevity were similar to those of wild-type littermates, suggesting that *Fgf-23* haploinsufficiency does not lead to obvious consequences. Since our findings were indistinguishable from those recently described for mice homozygous for ablation of *Fgf-23* exon 1 alone (Shimada et al., 2004a), the replacement of *Fgf-23* with the *lacZ* reporter, as in the animals described in this report, does not appear to affect the phenotype of *Fgf-23*^{-/-} mice.

Earlier studies have shown that treatment of wild-type mice with recombinant intact human FGF-23 increases urinary phosphate excretion leading to hypophosphatemia (Shimada et al., 2001). Furthermore, the transgenic expression of wild-type or mutant FGF-23 resulted in severe rickets/osteomalacia (Bai et al., 2004; Larsson et al., 2004; Shimada et al., 2004b), but it remained uncertain whether these changes were due to direct effects of *Fgf-23* on cartilage and bone or were simply related to changes in phosphate homeostasis. *FGF-23* is expressed in normal bone-forming osteoblasts and their progenitors, with a particularly prominent increase of its mRNA at sites of new bone formation due to fractures (Riminucci et al., 2003). This makes it plausible that *Fgf-23* is directly involved in normal bone formation. In accord with the notion, our *Fgf-23* null animals displayed considerable reductions in BMD. Similar observations had also been documented and reported earlier (Shimada et al., 2004a). It thus appears likely that *Fgf-23*, locally produced in bone cells, affects through paracrine/autocrine mechanisms the regulation of bone formation, while the observed mineralization defect may be caused, at least partially, by changes in phosphate homeostasis and/or increased 1,25(OH)₂D₃ levels.

Lack of *Fgf-23*, however, led to exostotic changes at several sites, e.g., ribs and phalanges (see Fig. 3A). This makes it plausible that this novel growth factor also has an important role in preventing bone formation at certain skeletal sites (see also below). *Fgf-23* null mice furthermore showed a decreased zone of hypertrophic chondrocytes, making it likely that *Fgf-23* has a role in chondrocyte growth and differentiation, unless the observed changes are secondary to the abnormalities in serum phosphate and/or 1,25(OH)₂D₃ concentration or to other changes that involve PTHrP-dependent signalling through the PTH/PTHrP receptor (Kronenberg, 2003). In addition, *Fgf-23* may contribute to regulating the expression of other molecules, such as *PHEX* (HYP_Consortium, 1995), *MEPE* (Argiro et al., 2001; Quarles, 2003; Rowe et al., 2004), *LRP-5/Wnt*, and/or *FRP4* (Schiavi and Kumar, 2004).

Fgf-23 is expressed only at low levels in certain tissues and organs, including brain, bone, heart, and thymus (Liu et

al., 2003; Riminucci et al., 2003; Shimada et al., 2001; Yamashita et al., 2000). The presence of *lacZ* as a marker for *Fgf-23* expression therefore provided a useful marker for assessing its expression pattern during embryonic and postembryonic development of *Fgf-23*^{+/-} mice, i.e., animals with presumably undisturbed phosphate homeostasis. The expression pattern of *Fgf-23* in embryonic tissues has not yet been studied in any detail, while some studies have reported very weak expression of *FGF-23* transcripts in adult liver, lymph node, thymus, heart, and brain (Liu et al., 2003; Shimada et al., 2001; Yamashita et al., 2000). The presence of the *lacZ* gene may furthermore allow a rapid detection of changes in *Fgf-23* expression induced by phosphate, 1,25(OH)₂D₃, and other factors, and it may help with the identification and isolation of *Fgf-23*^{+/-} cells, which could be useful in studying the regulation of Fgf-23 synthesis and secretion in vitro. Our *Fgf-23*^{+/-} mice with knock-in of the *lacZ* gene will therefore be of particular significance for further exploring the cells producing Fgf-23 and studying the molecules that regulate its synthesis and secretion.

Hyp mice, the murine equivalent of XLH patients, show renal phosphate wasting leading to hypophosphatemia and thus impaired skeletal mineralization (Xiao et al., 1998). In these animals, Fgf-23 levels were shown to be elevated (Aono et al., 2003), which is similar to the findings in patients with XLH (Jonsson et al., 2003; Shimada et al., 2002; Weber et al., 2003). Using our *Fgf-23*^{-/-} mice, we were able to modify the hypophosphatemia and rickets in *Hyp* mice. In fact, serum phosphate levels were reversed in the compound *Hyp/Fgf-23*^{-/-} mice. This could indicate that Phex/PHEX is either directly or indirectly involved in the degradation of intact biologically active FGF-23. However, in vitro studies have thus far provided no consistent results regarding the role of Phex/PHEX in this process; only one reported study suggested PHEX-dependent degradation of wild-type FGF-23 (Bowe et al., 2001) but not of FGF-23 with the R176Q mutation (Bai et al., 2003; Liu et al., 2003). Our compound *Hyp/Fgf-23*^{-/-} mice showed biochemical and morphological features that are similar to those we found in *Fgf-23*^{-/-} knockout mice. Indeed, in contrast to the hypophosphatemia observed in *Hyp* mice (Lorenz-Depiereux et al., 2004), *Hyp/Fgf-23*^{-/-} males showed serum phosphate levels that were indistinguishable from those of *Fgf-23*^{-/-} animals. This suggests that Fgf-23 resides upstream of Phex, although it does not provide enough information for a direct role of this endopeptidase in the degradation of Fgf-23. The “rescued” *Hyp* mice furthermore showed exostosis-like skeletal changes at ribs and digits, emphasizing the fact that Fgf-23 is not only involved in bone formation but may also have additional roles in preventing bone formation at aberrant sites.

One of the significant findings of this study was extensive soft tissue mineralization in *Fgf-23*^{-/-} mice. This is of particular importance because high serum phosphate levels could contribute to the development of arteriosclerosis and other soft tissue calcifications and could lead

to secondary hyperparathyroidism; these are major complications encountered in end-stage renal disease patients undergoing haemodialysis. The cardiovascular mortality rate is 20 to 40 times higher for adults on dialysis than for the general population (Collins et al., 2001). Recent studies documented hyperphosphatemia and increased calcium phosphate product as contributing factors to increased mortality in dialysis patients (Block et al., 1998; Block and Port, 2000; Ganesh et al., 2001). Although accelerated coronary calcification in end-stage renal disease patients is thought to be related to inadequate or inappropriate treatment of hyperphosphatemia, our lack of understanding of phosphate homeostasis makes it difficult to develop any long-term therapeutic strategies. Commonly used phosphate binders to minimize hyperphosphatemia contain aluminum or calcium. Aluminum accumulates in the tissues and causes neurologic, skeletal, and haematologic toxicities (Alfrey et al., 1976; Ott et al., 1982), while ingestion of calcium carbonate, an effective phosphate binder, leads to hypercalcemia and increases the risk of vascular calcification in end-stage renal disease patients (Meric et al., 1990; Slatopolsky et al., 1986). Recently, a novel calcium- and aluminum-free phosphate binder, poly(allylamine hydrochloride) (RenaGel), was reported to reduce serum phosphorus and iPTH concentrations without significant changes in serum calcium levels (Chertow et al., 1997; Slatopolsky et al., 1999); it will be interesting to determine whether the phosphate-lowering effects of this newly developed agent exert its effect through manipulating FGF-23.

In summary, we have generated *Fgf-23* knockout animals, which showed hyperphosphatemia, increased levels of 1,25(OH)₂D₃, and numerous skeletal abnormalities, which reversed the development of hypophosphatemia in *Hyp* mice. These animals will facilitate further exploration of Fgf-23 biology. Since *Fgf-23* was replaced with the *lacZ* reporter, our mice will also provide an additional in vivo tool to determine the role of Fgf-23 during early development and will facilitate designing in vitro studies to examine the transcriptional activation, synthesis, and secretion of Fgf-23.

4. Experimental procedures

4.1. Generation of *Fgf-23* null animals

Using the cDNA encoding mouse *Fgf-23*, kindly provided by Dr. Tim Strom, Gesellschaft für Umwelt und Gesundheitsforschung, Munich, Germany, a Sv129J mouse genomic library in lambda Dash II (kindly provided by T. Doetschmann) was screened. Three clones (clones 24, 25, and 27) were identified containing the full-length gene and additional 15 kb of 5' and 3' flanking sequences. For construction of the targeting vector, the entire coding region (exons 1–3) of the mouse *Fgf-23* gene was replaced with the *lacZ* gene and the *neomycin* (*neo*) resistance gene. The coding region of

the *lacZ* gene was cloned—in frame—downstream of the initiator methionine of *Fgf-23* such that *lacZ* translation will start at the translational start site for *Fgf-23*.

The pPNT plasmid was used as a backbone to construct the targeting vector (Bradley, 1987). A ~5-kb *EcoRI*-*Bam*HI fragment derived from the 5' noncoding region of *Fgf-23* was chosen as the 5' flanking region. After cutting with *EcoRI* and blunt-ending, the *EcoRI*-*Bam*HI fragment was released from the genomic DNA clone with *Bam*HI. This fragment was then cloned into the *Bam*HI site and the blunt-ended *Xba*I site of the vector carrying the *lacZ* gene (p β Gal); the restriction sites for *EcoRI* in the fragment of the mouse gene and the *Xba*I site in the vector are thus no longer present. A “*Bam*HI connector” carrying the initiator methionine was cloned into the preserved *Bam*HI site to connect the 3' end of the 5' flanking region of *Fgf-23* to the *lacZ* gene. The combined fragment was then released by digestion with *Not*I/*Xho*I and cloned into *Not*I/*Xho*I sites of the pPNT targeting vector, immediately upstream of the *neo* cassette. A 4-kb *Xho*I-*EcoRI* fragment derived from the 3' end of the *Fgf-23* gene was made blunt by Klenow enzyme and was then cloned immediately downstream of the *neo* gene by ligation into blunt-ended *EcoRI* sites of the vector to generate the final targeting vector, pPNT-*Fgf-23*; 5' and the 3' nucleotide sequences and orientation of each DNA fragment were confirmed by sequence analysis. Since the pPNT-*Fgf-23* vector contains also the herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-tk) gene flanked by the PGK-1 promoter and polyadenylation signal, the vector is thus designed to allow double selection for homologous recombination events prior to screening by Southern blot analysis (Karaplis et al., 1994). The pPNT-*Fgf-23* was linearized using the restriction enzyme *Not*I and electroporated into ES cells. After double selection of ES cells for the presence of the *neo* gene with G418 (300 μ g/ml), and for absence of the HSV-Tk gene with FIAU (0.2 μ M), 192 surviving ES cell clones were isolated and expanded, and 27 (14%) were shown by Southern blot analyses to have undergone homologous recombination (data not shown). Two independent ES cell clones resulted in germline transmission. Mice were fed standard diet (7012 Harlan Teklad LM-485 autoclavable rodent diet), containing 0.62% phosphorus and 0.84% calcium, and autoclaved tap water. All animal experiments were approved by the institutional care and use committee at the Forsyth Institute (Harvard School of Dental Medicine).

4.2. Southern blot and PCR analyses

Genotyping was performed initially by Southern blot analysis. Genomic DNA (~10 μ g) purified from tail clips using standard procedures was digested with *Bgl*II and hybridized to an external probe (Probe A 367 bp) (Fig. 1). The expected lengths of the *Bgl*II fragments were 17 kb for the wild-type allele and 10 kb for the mutant allele (Fig. 1A, B). Further genotyping of mice was performed by PCR

using the following specific primers: *Fgf-23* forward 5'-AGT GGA CGC TGG AGA ATG GCT ATG-3', *Fgf-23* reverse 5'-CTG GGA AAG GGG CGA CAC C-3'; *Neo* forward 5'-GAT CGG CCA TTG AAC AAG ATG-3', *Neo* reverse 5'-AAG GTG AGA TGA CAG GAG ATC-3'. After an initial denaturation for 5 min at 94 °C, amplification cycles consisted of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 58 °C for *Neo* and 65 °C for *Fgf-23* for 1 min, and 1-min extension at 72 °C for 35 cycles followed by a final extension for 10 min at 72 °C. The expected product size for *Fgf-23* is 397 bp and, for *Neo*, 310 bp.

4.3. LacZ staining

Fgf-23 mRNA expression was achieved through β -galactosidase staining of *Fgf-23*^{+/-} embryos at E12.5 and calvaria of *Fgf-23*^{-/-} animals at 3 and 6 weeks. Tissues were fixed in a mixture of 37% formaldehyde and 25% glutaraldehyde on ice for a maximum of 2 h followed by three washes (15 min each) in a rinse buffer containing 0.02% NP-40 (Roche)/PBS at room temperature. Subsequently, tissues were stained at 37 °C for 30 min (calvaria) and overnight (embryos) in a shaker placed in a dark incubator. Staining solution contained 5mM K₃Fe(CN)₆ (ACROS Organics), 5mM K₄Fe(CN)₆ (ICN Biomedicals), 0.01% DCA, 2mM MgCl₂, 0.02% NP-40, 5mM EGTA, and 1 mg/ml X-gal (TAKARA), in 1 \times PBS.

4.4. PIXImus and quantitative computerized tomography (pQCT)

Bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) were determined on 3-, 6-, and 11-week-old wild-type and *Fgf-23* null animals. Mice were anaesthetized by intraperitoneal injection with ketamine and xylazine (0.087 mg of ketamine and 0.013 mg of xylazine per 1 g of body weight). Measurements were determined using the PIXImus small animal dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) system (Lunar), with data analysis of software version 1.4x. Bone mineral density is a two-dimensional measurement comprised of mineral within the area determined to be bone by the present thresholds in the PIXImus densitometer. The resolution of the PIXImus is 0.8 \times 0.18-mm pixels with a usable scanning field of 80 \times 100 mm, allowing for measurement of single whole mice and collection of isolated specimens. Calibrations were performed with a phantom of known density, and quality assurance measurements were performed prior to BMD measurements.

BMD of the left femur was measured by peripheral quantitative computerized tomography (pQCT) using a XCT Research M+pQCT machine (Stratec Medizintechnik, Pforzheim, Germany). The measurements were made with a collimator opening of 0.2 mm on specimens stored in 70% ethanol. One slice in the middiaphysis of the femur, and three slices in the distal femoral metaphysis located 1.5, 2, and 2.5 mm proximal to the articular surface of the knee

joint were measured. All BMD values of the distal femoral metaphysis were calculated as the mean over three slices. A voxel size of 0.070 mm and a threshold of 600 mg/cm³ were used for calculation of cortical BMD.

4.5. X-ray studies

X-rays of mice were taken by the Faxitron MX-20 Specimen Radiography System (Faxitron X-ray, Wheeling, IL) using a Kodak Portal Oncology film (Eastman-Kodak). Measurements were taken at 33 kV with a 30-s exposure. The image was developed by a Kodak M35A X-OMAT processor (Kodak Diagnostic Imaging).

4.6. Skeletal staining with Alizarin Red S

The mineralization pattern of the skeleton was analysed in 3- and 6-week-old mice as described earlier by McLeod (McLeod, 1980). Briefly, adult mice were skinned, eviscerated, and fixed in 95% ethanol. Subsequently, acetone was used to remove fat. Skeletons were then stained by Alizarin Red S and sequentially cleared in 1% potassium hydroxide. Mineralized bones were visualized by red staining.

4.7. Histology and tissue preparation

For histological analyses, paraffin sections of bones and soft tissues were produced at 3 and 11 weeks postnatally. Animals were dissected, and tissues were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA)/PBS pH 7.4 at 4 °C for several days. Bones were subsequently demineralized for 1–2 weeks in 20% EDTA. All tissues were rinsed in PBS, dehydrated at room temperature through an ethanol series: 70% for 6 h, 80% for 1 h, 96% for 1 h, and 100% for 3 h, cleared twice in xylene for 1 h/step, embedded in paraffin, serial sectioned at 6 µm using a Microm HM 360 microtome (Microm, Walldorf, Germany), and mounted on SuperFrost Plus slides.

To obtain methylmethacrylate sections, samples were fixed in 4% PFA for 24 h at 4 °C and washed overnight in PBS containing 10% sucrose at 4 °C. Subsequently, bones were dehydrated and embedded undecalcified in methylmethacrylate. Three-micrometer-thick sections were prepared from various sites of the skeleton, including ribs, vertebra, and femurs using a HM 360 microtome (Microm) and stained with von Kossa/toluidine blue (Schenk et al., 1984).

4.8. Riboprobes and in situ hybridization

Complementary ³⁵S-UTP-labeled riboprobes (complementary RNAs for collagen type X, osteopontin, and bone gla protein) were used for performing in situ hybridization on paraffin sections. Plasmids encoding the cDNA were linearized with appropriate restriction enzymes to transcribe either antisense or sense riboprobes in vitro using the appropriate RNA polymerase. In situ hybridization was carried out as described previously (Lanske et al., 1998).

Briefly, bone sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in a decreasing ethanol series (100%, 90%, 70%). After proteinase K treatment and postfixation in 4% PFA, sections were incubated in 0.2N HCl. Sections were then acetylated with 0.25% acetic anhydride in triethanolamine buffer. Before hybridization was performed, sections were dehydrated in 70% and 95% ethanol and air-dried. Sections were then hybridized with ³⁵S-labeled antisense riboprobes in a humidified chamber at 55 °C for 16 h. After hybridization, nonspecifically bound riboprobes were removed by washing the slides with 2× SSC and 2× SSC/50% formamide at 50 °C and treating them with RNase at 37 °C for 20 min. The final wash steps were performed once in 2× SSC and twice in 0.2× SSC at 50 °C for 20 min. To detect the hybridization of riboprobes on tissues, sections were dehydrated in 70% and 95% ethanol and air-dried. To estimate the intensity of bound riboprobes, slides were exposed overnight to X-ray film (Kodak Biomax MR-1) at room temperature. Sections were then coated with Kodak NTB2 emulsion, exposed for the time needed (determined by autoradiography), developed with Kodak Dektol developer, and fixed with Kodak fixer. After counterstaining with hematoxylin and eosin, tissue sections were analysed with a Zeiss microscope using bright- and dark-field optics.

4.9. Measurement of biochemical serum and urinary parameters

Blood was obtained from the vena cava of 3-, 4-, and 6-week-old wild-type and *Fgf-23* null animals. Serum was isolated by centrifugation at 3000 ×g for 10 min and stored at –80 °C. Serum PTH levels were measured using a Mouse Intact PTH ELISA kit (Immunotopics, San Clemente, CA). Serum concentrations of 1,25(OH)₂D₃ were measured using a radioreceptor assay (Immudiagnostik, Bensheim, Germany). Serum phosphorus and serum alkaline phosphatase were determined using a Hitachi 766 autoanalyzer (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany).

4.10. Statistical analysis

Statistically significant differences between groups were evaluated by Student's *t* test for comparison between two groups or by one-way analysis of variance (ANOVA) for multiple comparison. All values were expressed as mean ± S.E.M. A *p* value less than 0.05 was considered to be statistically significant. All analyses were performed using Microsoft Excel and GraphPad Prism 3.0.

Acknowledgements

The authors wish to thank C. Carr for her technical help, J. Saxton for performing the histological sections, and Dr. R. Bronson for helpful discussions. This work was supported

by a fund provided to BL from Harvard School of Dental Medicine.

References

- ADHR Consortium, 2000. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. The ADHR Consortium. *Nat. Genet.* 26, 345–348.
- Alfrey, A.C., LeGendre, G.R., Kaehny, W.D., 1976. The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication. *N. Engl. J. Med.* 294, 184–188.
- Aono, Y., Shimada, T., Yamazaki, Y., Hino, R., Takeuchi, Y., Fujita, T., Fukumoto, S., Nagano, N., Wada, M., Yamashita, T., 2003. The neutralization of FGF-23 ameliorates hypophosphatemia and rickets in Hyp mice. *J. Bone Miner. Res.* 18, (Suppl. 2), 1056.
- Argiro, L., Desbarats, M., Glorieux, F.H., Ecarot, B., 2001. Mepe, the gene encoding a tumor-secreted protein in oncogenic hypophosphatemic osteomalacia, is expressed in bone. *Genomics* 74, 342–351.
- Bai, X., Miao, D., Panda, D., Grady, S., McKee, M.D., Goltzman, D., Karaplis, A.C., 2002. Partial rescue of the Hyp phenotype by osteoblast-targeted PHEX (phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome) expression. *Mol. Endocrinol.* 16, 2913–2925.
- Bai, X.Y., Miao, D., Goltzman, D., Karaplis, A.C., 2003. The autosomal dominant hypophosphatemic rickets R176Q mutation in fibroblast growth factor 23 results proteolytic cleavage and enhances in vivo biological potency. *J. Biol. Chem.* 278, 9843–9849.
- Bai, X., Miao, D., Li, J., Goltzman, D., Karaplis, A.C., 2004. Transgenic mice overexpressing human fibroblast growth factor 23(R176Q) delineate a putative role for parathyroid hormone in renal phosphate wasting disorders. *Endocrinology* 145, 5269–5279.
- Berndt, T., Craig, T.A., Bowe, A.E., Vassiliadis, J., Reczek, D., Finnegan, R., Jan De Beur, S.M., Schiavi, S.C., Kumar, R., 2003. Secreted frizzled-related protein 4 is a potent tumor-derived phosphaturic agent. *J. Clin. Invest.* 112, 785–794.
- Block, G.A., Port, F.K., 2000. Re-evaluation of risks associated with hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in dialysis patients: recommendations for a change in management. *Am. J. Kidney Dis.* 35, 1226–1237.
- Block, G.A., Hulbert-Shearon, T.E., Levin, N.W., Port, F.K., 1998. Association of serum phosphorus and calcium \times phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am. J. Kidney Dis.* 31, 607–617.
- Bowe, A.E., Finnegan, R., Jan de Beur, S.M., Cho, J., Levine, M.A., Kumar, R., Schiavi, S.C., 2001. FGF-23 inhibits renal tubular phosphate transport and is a PHEX substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 977–981.
- Bradley, A., 1987. Production and analysis of chimeric mice. In: Robertson, E.J. (Ed.), *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*. IRL Press, Washington, DC, pp. 113–152.
- Campos, M., Couture, C., Hirata, I.Y., Juliano, M.A., Loisel, T.P., Crine, P., Juliano, L., Boileau, G., Carmona, A.K., 2003. Human recombinant PHEX has a strict S1' specificity for acidic residues and cleaves peptides derived from FGF-23 and MEPE. *Biochem. J.* 373, 271–279.
- Carpenter, T.O., 2003. Oncogenic osteomalacia—a complex dance of factors. *N. Engl. J. Med.* 348, 1705–1708.
- Chertow, G.M., Burke, S.K., Lazarus, J.M., Stenzel, K.H., Wombolt, D., Goldberg, D., Bonventre, J.V., Slatopolsky, E., 1997. Poly(allylamine hydrochloride) (RenaGel): a noncalcemic phosphate binder for the treatment of hyperphosphatemia in chronic renal failure. *Am. J. Kidney Dis.* 29, 66–71.
- Collins, A.J., Li, S., Ma, J.Z., Herzog, C., 2001. Cardiovascular disease in end-stage renal disease patients. *Am. J. Kidney Dis.* 38, S26–S29.
- De Beur, S.M., Finnegan, R.B., Vassiliadis, J., Cook, B., Barberio, D., Estes, S., Manavalan, P., Petroziello, J., Madden, S.L., Cho, J.Y., et al., 2002. Tumors associated with oncogenic osteomalacia express genes important in bone and mineral metabolism. *J. Bone Miner. Res.* 17, 1102–1110.
- Drezner, M., 2002. Phosphorus homeostasis and related disorders. In: Bilezikian, J., Raisz, L., Rodan, G. (Eds.), *Principles in Bone Biology*. Academic Press, New York, pp. 321–338.
- Du, L., Desbarats, M., Viel, J., Glorieux, F.H., Cawthorn, C., Ecarot, B., 1996. cDNA cloning of the murine Pex gene implicated in X-linked hypophosphatemia and evidence for expression in bone. *Genomics* 36, 22–28.
- Dunstan, C.R., Zhou, H., Seibel, M.J., 2004. Fibroblast growth factor 23: a phosphatonin regulating phosphate homeostasis? *Endocrinology* 145, 3084–3086.
- Econs, M.J., McEnery, P.T., Lennon, F., Speer, M.C., 1997. Autosomal dominant hypophosphatemic rickets is linked to chromosome 12p13. *J. Clin. Invest.* 100, 2653–2657.
- Ganesh, S.K., Stack, A.G., Levin, N.W., Hulbert-Shearon, T., Port, F.K., 2001. Association of elevated serum PO(4), Ca \times PO(4) product, and parathyroid hormone with cardiac mortality risk in chronic hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 2131–2138.
- Holm, I.A., Huang, X., Kunkel, L.M., 1997. Mutational analysis of the PEX gene in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 790–797.
- HYP Consortium, 1995. A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Nat. Genet.* 11, 130–136.
- Imanishi, Y., Inaba, M., Nakatsuka, K., Nagasue, K., Okuno, S., Yoshihara, A., Miura, M., Miyachi, A., Kobayashi, K., Miki, T., et al., 2004. FGF-23 in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. *Kidney Int.* 65, 1943–1946.
- Jonsson, K.B., Zahradnik, R., Larsson, T., White, K.E., Sugimoto, T., Imanishi, Y., Yamamoto, T., Hampson, G., Koshiyama, H., Ljunggren, O., et al., 2003. Fibroblast growth factor 23 in oncogenic osteomalacia and X-linked hypophosphatemia. *N. Engl. J. Med.* 348, 1656–1663.
- Karaplis, A.C., Laz, A., Glowacki, J., Bronson, R.T., Tybulewicz, V.L., Kronenberg, H.M., Mulligan, R.C., 1994. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev.* 8, 277–289.
- Kronenberg, H.M., 2003. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423, 332–336.
- Lanske, B., Divieti, P., Kovacs, C., Pirro, A., Landis, W., Krane, S., Bringham, F., Kronenberg, H., 1998. The parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor mediates actions of both ligands in murine bone. *Endocrinology* 139, 5194–5204.
- Larsson, T., Nisbeth, U., Ljunggren, O., Juppner, H., Jonsson, K.B., Riminucci, M., Collins, M.T., Fedarko, N.S., Cherman, N., Corsi, A., et al., 2003. Circulating concentration of FGF-23 increases as renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers. *Kidney Int.* 64, 2272–2279.
- Larsson, T., Marsell, R., Schipani, E., Ohlsson, C., Ljunggren, O., Tenenhouse, H.S., Juppner, H., Jonsson, K.B., 2004. Transgenic mice expressing fibroblast growth factor 23 under the control of the $\{\alpha\}$ 1(I) collagen promoter exhibit growth retardation, osteomalacia and disturbed phosphate homeostasis. *Endocrinology* 145, 3087–3094.
- Liu, S., Guo, R., Simpson, L.G., Xiao, Z.S., Burnham, C.E., Quarles, L.D., 2003. Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX. *J. Biol. Chem.* 278, 37419–37426.
- Lorenz-Depiereux, B., Guido, V.E., Johnson, K.R., Zheng, Q.Y., Gagnon, L.H., Bauschatz, J.D., Davisson, M.T., Washburn, L.L., Donahue, L.R., Strom, T.M., Eicher, E.M., 2004. New intragenic deletions in the Pex gene clarify X-linked hypophosphatemia-related abnormalities in mice. *Mamm. Genome* 15, 151–161.

- McLeod, M.J., 1980. Differential staining of cartilage and bone in whole fetuses by alcian blue and alizarin red S. *Teratology* 22, 299–301.
- Meric, F., Yap, P., Bia, M.J., 1990. Etiology of hypercalcemia in hemodialysis patients on calcium carbonate therapy. *Am. J. Kidney Dis.* 16, 459–464.
- Miao, D., Bai, X., Panda, D., McKee, M., Karaplis, A., Goltzman, D., 2001. Osteomalacia in hyp mice is associated with abnormal plex expression and with altered bone matrix protein expression and deposition. *Endocrinology* 142, 926–939.
- Nelson, A.E., Bligh, R.C., Mirams, M., Gill, A., Au, A., Clarkson, A., Juppner, H., Ruff, S., Stalley, P., Scolyer, R.A., et al., 2003. Clinical case seminar: fibroblast growth factor 23: a new clinical marker for oncogenic osteomalacia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 4088–4094.
- Ott, S.M., Maloney, N.A., Coburn, J.W., Alfrey, A.C., Sherrard, D.J., 1982. The prevalence of bone aluminum deposition in renal osteodystrophy and its relation to the response to calcitriol therapy. *N. Engl. J. Med.* 307, 709–713.
- Quarles, L.D., 2003. FGF23, PHEX, and MEPE regulation of phosphate homeostasis and skeletal mineralization. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, E1–E9.
- Riminucci, M., Collins, M.T., Fedarko, N.S., Cherman, N., Corsi, A., White, K.E., Waguespack, S., Gupta, A., Hannon, T., Econs, M.J., et al., 2003. FGF-23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting. *J. Clin. Invest.* 112, 683–692.
- Rowe, P.S., Kumagai, Y., Gutierrez, G., Garrett, I.R., Blacher, R., Rosen, D., Cundy, J., Navvab, S., Chen, D., Drezner, M.K., et al., 2004. MEPE has the properties of an osteoblastic phosphatonin and inhibin. *Bone* 34, 303–319.
- Saito, H., Kusano, K., Kinoshita, M., Ito, H., Hirata, M., Segawa, H., Miyamoto, K., Fukushima, N., 2003. Human fibroblast growth factor-23 mutants suppress Na⁺-dependent phosphate co-transport activity and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ production. *J. Biol. Chem.* 278, 2206–2211.
- Schenk, R., Olah, A., Herrmann, W., 1984. Preparation of calcified tissues for light microscopy. In: Dickson, G. (Ed.), *Methods of Calcified Tissue Preparation*. Elsevier, Amsterdam, pp. 1–56.
- Schiavi, S.C., Kumar, R., 2004. The phosphatonin pathway: new insights in phosphate homeostasis. *Kidney Int.* 65, 1–14.
- Seufert, J., Ebert, K., Muller, J., Eulert, J., Hendrich, C., Werner, E., Schuuz, N., Schulz, G., Kenn, W., Richtmann, H., et al., 2001. Octreotide therapy for tumor-induced osteomalacia. *N. Engl. J. Med.* 345, 1883–1888.
- Shimada, T., Mizutani, S., Muto, T., Yoneya, T., Hino, R., Takeda, S., Takeuchi, Y., Fujita, T., Fukumoto, S., Yamashita, T., 2001. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6500–6505.
- Shimada, T., Muto, T., Urakawa, I., Yoneya, T., Yamazaki, Y., Okawa, K., Takeuchi, Y., Fujita, T., Fukumoto, S., Yamashita, T., 2002. Mutant FGF-23 responsible for autosomal dominant hypophosphatemic rickets is resistant to proteolytic cleavage and causes hypophosphatemia in vivo. *Endocrinology* 143, 3179–3182.
- Shimada, T., Kakitani, M., Yamazaki, Y., Hasegawa, H., Takeuchi, Y., Fujita, T., Fukumoto, S., Tomizuka, K., Yamashita, T., 2004a. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J. Clin. Invest.* 113, 561–568.
- Shimada, T., Urakawa, I., Yamazaki, Y., Hasegawa, H., Hino, R., Yoneya, T., Takeuchi, Y., Fujita, T., Fukumoto, S., Yamashita, T., 2004b. FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type Iia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 409–414.
- Slatopolsky, E., Weerts, C., Lopez-Hilker, S., Norwood, K., Zink, M., Windus, D., Delmez, J., 1986. Calcium carbonate as a phosphate binder in patients with chronic renal failure undergoing dialysis. *N. Engl. J. Med.* 315, 157–161.
- Slatopolsky, E.A., Burke, S.K., Dillon, M.A., 1999. RenaGel, a non-absorbed calcium- and aluminum-free phosphate binder, lowers serum phosphorus and parathyroid hormone. *The RenaGel Study Group. Kidney Int.* 55, 299–307.
- Strewler, G.J., 2001. FGF23, hypophosphatemia, and rickets: has phosphatonin been found? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 5945–5946.
- Strom, T., Francis, F., Lorenz, B., Böddrich, A., Econs, M., Lehrach, H., Meitinger, T., 1997. Pex gene deletions in Gy and Hyp mice provide mouse models for X-linked hypophosphatemia. *Hum. Mol. Genet.* 6, 165–171.
- Tenenhouse, H.S., 1999. X-linked hypophosphataemia: a homologous disorder in humans and mice. *Nephrol. Dial. Transplant.* 14, 333–341.
- Weber, T.J., Liu, S., Indridason, O.S., Quarles, L.D., 2003. Serum FGF23 levels in normal and disordered phosphorus homeostasis. *J. Bone Miner. Res.* 18, 1227–1234.
- White, K.E., Jonsson, K.B., Carn, G., Hampson, G., Spector, T.D., Mannstadt, M., Lorenz-Depiereux, B., Miyauchi, A., Yang, I.M., Ljunggren, O., et al., 2001. The autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) gene is a secreted polypeptide overexpressed by tumors that cause phosphate wasting. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 497–500.
- White, K.E., Waguespack, S.G., Econs, M.J., 2002. Case 29-2001: oncogenic hypophosphatemic osteomalacia. *N. Engl. J. Med.* 346, 381–382.
- Xiao, Z.S., Crenshaw, M., Guo, R., Nesbitt, T., Drezner, M.K., Quarles, L.D., 1998. Intrinsic mineralization defect in hyp mouse osteoblasts. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 38, E 700–E 708.
- Yamashita, T., Yoshioka, M., Itoh, N., 2000. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277, 494–498.
- Yamazaki, Y., Okazaki, R., Shibata, M., Hasegawa, Y., Satoh, K., Tajima, T., Takeuchi, Y., Fujita, T., Nakahara, K., Yamashita, T., Fukumoto, S., 2002. Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 4957–4960.

4 Publikation

Ablation of Vitamin D Signaling Rescues Bone, Mineral, and Glucose Homeostasis in Fgf-23 Deficient Mice

Martina Hesse ¹, Leopold F. Fröhlich ¹, Ute Zeitz ¹, Beate Lanske ², and Reinhold G. Erben ¹

¹ Institute of Pathophysiology, Department of Natural Sciences, University of Veterinary Medicine, 1210 Vienna, Austria

² Department of Oral and Developmental Biology, Harvard School of Dental Medicine, Boston, MA, USA

Matrix Biology 26;2 (2007) 75-84

ABSTRACT

To explore further the role of the vitamin D axis for fibroblast growth factor-23 (FGF23) signaling, we mated Fgf-23 deficient (*Fgf-23*^{-/-}) mice and vitamin D receptor (VDR) mutant mice with a non-functioning VDR. To prevent secondary hyperparathyroidism in VDR and compound mutant mice, all mice were kept on a rescue diet enriched with calcium, phosphorus, and lactose. Consistent with previous findings, *Fgf-23*^{-/-} animals showed hypercalcemia, hyperphosphatemia, growth retardation, ectopic calcifications, severe osteoidosis, skin atrophy, and renal dysfunction. In addition, here we describe that *Fgf-23*^{-/-} mice are hypoglycemic, and have profoundly increased peripheral insulin sensitivity and improved subcutaneous glucose tolerance, but normal renal expression of the aging suppressor gene *Klotho*. Although VDR and double mutants on the rescue diet still had moderately elevated parathyroid hormone serum levels and lower bone mineral density compared to wild-type mice, double mutant mice were normocalcemic and normophosphatemic, and had normal body weight, normal renal function, and no ectopic calcifications. Ablation of vitamin D signaling in compound mutants also normalized subcutaneous glucose tolerance tests and insulin secretory response. In conclusion, our results indicate that the alterations in mineral and carbohydrate metabolism present in *Fgf-23*^{-/-} mice require an intact vitamin D signaling pathway.

Key words: Vitamin D – Fibroblast growth factor 23 - Glucose homeostasis - Calcium homeostasis – Bone

INTRODUCTION

Fibroblast growth factor-23 (FGF23) was first discovered as an important factor for mineral homeostasis, when mutations in the *FGF23* gene were identified as the cause of autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) in humans, a disease that is characterized by renal phosphate wasting (The ADHR Consortium, 2000). The mutations found in ADHR patients were shown to interfere with cleavage and inactivation of this growth factor (White et al., 2001; Shimada et al., 2002). Elevated serum levels of FGF23 are also found in other phosphate-wasting disorders such as tumor-induced osteomalacia (TIO), and X-linked hypophosphatemic rickets (XLH) (Yamazaki et al., 2002; Jonsson et al., 2003). Therefore, excessive serum FGF23 appears to be the common pathogenetic factor in all these phosphate-wasting disorders. Experimental studies have conclusively shown that FGF23 causes hypophosphatemia in different transgenic or pharmacological models (Shimada et al., 2001; Shimada et al., 2004a; Shimada et al., 2004c; Larsson et al., 2004). However, the molecular mechanism by which FGF23 leads to hypophosphatemia and inhibition of renal tubular reabsorption of phosphate is still unclear.

Recent evidence has linked FGF23 to the vitamin D hormone system. The production of the biologically active form of vitamin D, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 [$1,25(OH)_2D_3$], is tightly controlled through regulation of renal 1α -hydroxylase activity (reviewed in (Bringhurst et al., 1998)). $1,25(OH)_2D_3$ acts through a nuclear receptor, the vitamin D receptor (VDR), which is a member of the nuclear receptor superfamily (Evans, 1988). One of the major factors controlling renal 1α -hydroxylase activity is parathyroid hormone (PTH). Another such factor appears to be FGF23. When recombinant FGF23 was injected into normal or parathyroidectomized mice, renal 1α -hydroxylase mRNA expression decreased within 1 hour, serum levels of $1,25(OH)_2D_3$ decreased within 3 hours, whereas it took 9 hours post-injection until serum phosphate and renal expression of type IIa sodium-phosphate cotransporter (NaPi-2a), the key molecule in renal tubular phosphate reabsorption, declined (Shimada et al., 2004a). Mice bearing FGF23-producing Chinese hamster ovary cells also showed decreased renal 1α -hydroxylase expression (Shimada et al., 2001). Conversely, gene-targeted mice deficient in Fgf-23 (Fgf-23 null, *Fgf-23^{-/-}*) show hyperphosphatemia and highly elevated serum $1,25(OH)_2D_3$ levels due to increased renal 1α -hydroxylase expression, together with ectopic calcifications, growth retardation, and organ atrophy (Shimada et al., 2004b; Sitara et al., 2004). These *in*

in vivo results suggest that FGF23 inhibits renal 1 α -hydroxylase gene expression, while lack of FGF23 results in a profound up-regulation of this enzyme. Because 1,25(OH) $_2$ D $_3$ is a powerful regulator of calcium and phosphate metabolism (Brighurst et al., 1998), some actions of FGF23 could be mediated indirectly through inhibition of 1,25(OH) $_2$ D $_3$ synthesis. In addition, recent studies indicate that FGF23 is regulated by phosphate and by 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (Saito et al., 2005), suggesting a feedback loop between serum phosphorus, FGF23, and 1,25(OH) $_2$ D $_3$. On the other hand, *in vitro* studies have suggested a direct inhibition of renal tubular phosphate transport by FGF23, and transgenic mice overexpressing FGF23 exhibited renal phosphate wasting in the presence of unchanged serum levels of calcium and 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (Shimada et al., 2004c; Larsson et al., 2004; Bai et al., 2004). Therefore, the role of 1,25(OH) $_2$ D $_3$ in FGF23 signaling is presently unclear.

The *Klotho* gene has recently been characterized as an aging suppressor gene, encoding for a transmembrane protein mainly expressed in the kidney and in brain (Kuro-o et al., 1997). The extracellular domain of *Klotho* is shed, and acts as an endocrine signal suppressing intracellular insulin signaling, and, thus, reducing peripheral insulin sensitivity (Kurosu et al., 2005). Interestingly, *Klotho* $^{-/-}$ and *Fgf-23* $^{-/-}$ mice share some striking phenotypic similarities. Both mouse strains are characterized by shortened life span, growth retardation, muscle and skin atrophy, and ectopic calcifications. In addition, *Klotho* $^{-/-}$ mice also show highly elevated serum 1,25(OH) $_2$ D $_3$, and feeding a vitamin D deficient diet improves the phenotype of *Klotho* $^{-/-}$ mice (Tsuji-kawa et al., 2003). Therefore, similar to *Fgf-23* $^{-/-}$ mice, 1,25(OH) $_2$ D $_3$ may mediate many of the pathophysiological consequences of *Klotho* deficiency.

To investigate further the functions of 1,25(OH) $_2$ D $_3$ and of *Klotho* in the pathophysiology of FGF23 deficiency-induced changes in mineral and carbohydrate homeostasis, we interbred *Fgf-23* $^{-/-}$ mice (Sitara et al., 2004) with gene-targeted mutant mice expressing a VDR with an intact hormone binding domain but lacking the first zinc finger necessary for DNA binding (VDR $^{\Delta\Delta}$) (Erben et al., 2002). VDR-ablated mice on a normal mouse diet show hypocalcemia, hypophosphatemia, rickets, and severe secondary hyperparathyroidism (Yoshizawa et al., 1997; Erben et al., 2002; Li et al., 1997), possibly interfering with a clear interpretation of the results from the current study. Therefore, all experiments presented in this study were performed on the so-called rescue diet rich in calcium, phosphorus, and lactose. This

rescue diet has been shown to normalize calcium homeostasis in mice with a non-functioning VDR (Li et al., 1998; Erben et al., 2002). Here we show that *Fgf-23*^{-/-}/VDR^{ΔΔ} double mutant mice are a phenocopy of VDR^{ΔΔ} mice, suggesting that the alterations in mineral and carbohydrate metabolism present in *Fgf-23*^{-/-} mice depend upon intact signaling through the vitamin D receptor.

RESULTS

Ablation of vitamin D signaling rescues mineral homeostasis and bone phenotype of *Fgf-23*^{-/-} mice

To generate compound mutant mice deficient both in *Fgf-23* and a functioning VDR, we interbred *Fgf-23*^{-/-} mice (Sitara et al., 2004) with VDR mutant (VDR^{ΔΔ}) mice (Erben et al., 2002). The genotypes of the offspring from the double heterozygous matings were in agreement with the expected Mendelian frequency (data not shown). At 4 weeks of age, the body weight of *Fgf-23*^{-/-} mice was profoundly reduced (Table 1). In agreement with earlier reports (Shimada et al., 2004b; Sitara et al., 2004), *Fgf-23*^{-/-} mice were severely hypercalcemic and hyperphosphatemic. PTH was undetectable in all *Fgf-23*^{-/-} mice. In addition, ablation of *Fgf-23* resulted in elevated serum levels of alkaline phosphatase, creatine kinase, and urea, together with reduced serum albumin. Despite the hypercalcemia, *Fgf-23*^{-/-} mice showed low renal calcium excretion, and very high levels of renal tubular reabsorption of calcium. We did not measure 1,25(OH)₂D₃ in this experiment, because it is well known that 1,25(OH)₂D₃ is profoundly elevated both in *Fgf-23*^{-/-} (Shimada et al., 2004b; Sitara et al., 2004) and VDR^{ΔΔ} mice (Erben et al., 2002).

TABLE 1. Age, body weight, clinical chemistry, and mineral homeostasis in 4-week-old *Fgf-23*, *VDR*, and double mutant mice on a rescue diet rich in calcium, phosphorus, and lactose

<i>Variable</i>	<i>Wildtype</i>	<i>Fgf-23</i> ^{-/-}	<i>VDR</i> ^{Δ/Δ}	<i>Fgf-23</i> ^{-/-} / <i>VDR</i> ^{Δ/Δ}
Age (d)	28.2 ± 0.5	28.2 ± 0.5	27.4 ± 0.4	27.2 ± 0.5
Body weight (g)	14.1 ± 0.7*	6.6 ± 0.2	12.6 ± 0.4*	12.5 ± 0.6*
Serum calcium (mmol/l)	2.55 ± 0.03*	2.97 ± 0.04	2.61 ± 0.16*	2.42 ± 0.08*
Serum phosphorus (mmol/l)	3.38 ± 0.10*	5.06 ± 0.17	2.64 ± 0.15* #	3.06 ± 0.17*
Alkaline phosphatase (U/l)	345 ± 14*	1134 ± 134	569 ± 22* #	530 ± 27* #
Creatine kinase (U/l)	196 ± 72*	587 ± 140	225 ± 36*	241 ± 49*
Serum albumin (g/L)	29.6 ± 0.6*	25.6 ± 0.9	29.7 ± 0.8*	29.2 ± 1.1*
Serum Crea (μmol/L)	8.2 ± 0.9	12.4 ± 1.3	9.0 ± 0.7	9.7 ± 1.4
Serum urea (mmol/L)	6.9 ± 0.5*	15.3 ± 1.1	6.3 ± 0.4*	6.6 ± 0.5*
Serum PTH (pg/ml)	6 ± 4	2 ± 0	113 ± 27* #	83 ± 22* #
UrCa/Crea (mmol/mmol)	4.16 ± 1.16	1.40 ± 0.37	6.54 ± 1.00*	8.30 ± 2.09*
UrP/Crea (mmol/mmol)	16.2 ± 2.3	21.3 ± 3.1	11.0 ± 4.2	19.5 ± 7.9
%TRCa (%)	98.6 ± 0.5	99.6 ± 0.2	97.9 ± 0.3	97.5 ± 0.6
%TRP (%)	96.1 ± 0.8	94.6 ± 1.9	95.9 ± 1.9	96.4 ± 1.0

Ur, urinary; Crea, creatinine; Ca, calcium; P, phosphorus; PTH, parathyroid hormone; TR, tubular reabsorption.

All values are means ± SEM of 3 - 17 animals in each group; * P<0.05 vs. *Fgf-23*^{-/-}, # P<0.05 vs. wild-type by one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test.

We have shown earlier that the rescue diet normalizes the calcium absorption defect and the subsequent severe secondary hyperparathyroidism in 10-week-old $VDR^{\Delta/\Delta}$ mice (Erben et al., 2002; Zeitz et al., 2003). Although the rescue diet did not fully normalize serum PTH in 4-week-old VDR mutants in the current study, the $VDR^{\Delta/\Delta}$ mice were normocalcemic, and had normal body weight. A possible explanation for the discrepancy with our earlier reports that the rescue diet fully normalizes serum PTH (Erben et al., 2002; Zeitz et al., 2003) may be the younger age of the mice in the current study. Additional experiments showed that PTH serum levels were $1,269 \pm 46$ pg/ml in 4-week-old $VDR^{\Delta/\Delta}$ mice on a normal mouse diet containing 0.9% calcium and 0.7% phosphorus. Therefore, the serum PTH levels of 113 ± 27 and 83 ± 22 pg/ml found in $VDR^{\Delta/\Delta}$ and compound mutants in this study, respectively, can be considered a mild secondary hyperparathyroidism. In line with the moderately elevated serum PTH, $VDR^{\Delta/\Delta}$ mice showed decreased serum phosphorus, and increased alkaline phosphatase relative to wild-type controls. Interestingly, ablation of vitamin D signaling in normocalcemic double mutant mice fully rescued the alterations in mineral homeostasis induced by *Fgf-23* deficiency. We did not find any significant differences in serum or urine biochemistry between $VDR^{\Delta/\Delta}$ mice and double mutant mice.

It is thought that the major physiological source of FGF23 is bone, and FGF23 may have important molecular functions in skeletogenesis. Therefore, we also examined the bone phenotype in this experiment. It has been shown that bone mineralization is impaired in *Fgf-23*^{-/-} mice (Shimada et al., 2004b; Sitara et al., 2004). Consistent with these earlier studies we found severe osteoidosis, but not rickets, in *Fgf-23* mutants (Fig. 1A-C). A hallmark of rickets is a widened and disorganized growth plate which was not found in *Fgf-23*^{-/-} mice (Fig. 1B). In agreement with impaired bone mineralization induced by *Fgf-23* deficiency, we observed distinctly reduced volumetric bone mineral density of the femoral shaft and femoral metaphysis (Fig. 1E), together with thinning of mineralized cortical bone in *Fgf-23*^{-/-} mice (Fig. 1C). The histology of distal femurs and growth plates from $VDR^{\Delta/\Delta}$ mice was indistinguishable from wild-type mice (Fig. 1A-B).

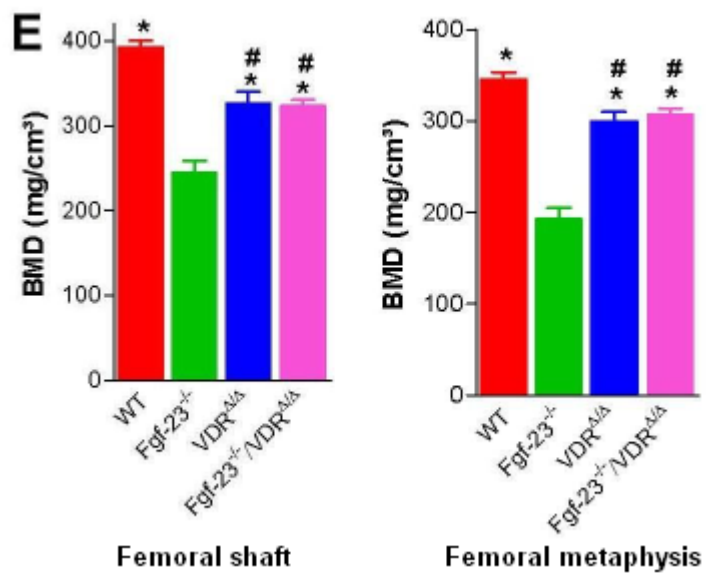
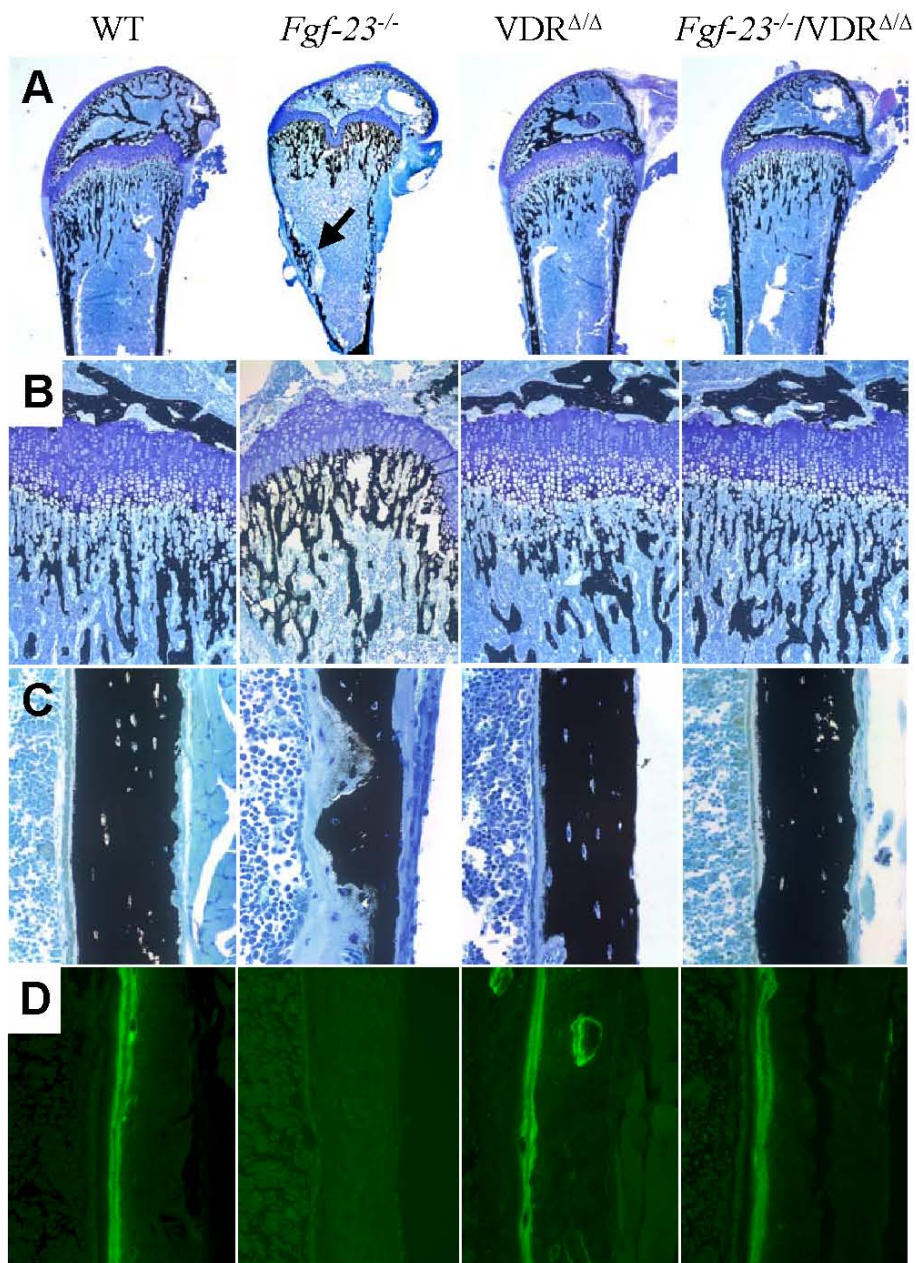


Figure 1. Histological analysis of the bone phenotype. Undecalcified sections of distal femurs from 4-week-old wild-type (WT), *Fgf-23*^{-/-}, VDR mutant (VDR^{Δ/Δ}), and *Fgf-23*^{-/-}/VDR^{Δ/Δ} compound mutant mice on the rescue diet were stained with von Kossa/McNeal (**A – C**) or left unstained for fluorochrome analysis (**D**). Representative sections are shown. (**A**) Low power view of the distal femur, showing severe osteoidosis in *Fgf-23*^{-/-} mice as evidenced by the presence of excessive osteoid formation in cortical bone (arrow) reminiscent of callus formation in the course of fracture repair, and the pronounced reduction in mineralized bone in the femoral epiphysis and in cortical bone of the *Fgf-23*^{-/-} animal compared with the wild-type mouse. VDR mutants and *Fgf-23*^{-/-}/VDR^{Δ/Δ} compound mutants show normal bone architecture. (**B**) Growth plate morphology, indicating that the width of the growth plate is unchanged in *Fgf-23*^{-/-} mice relative to WT controls. (**C**) Mid-diaphyseal cortical bone shows a pronounced reduction in mineralized bone, together with a profound increase in osteoid in *Fgf-23*^{-/-} mice. (**D**) Fluorescent calcein labels were visualized by epifluorescent microscopy. While WT mice showed distinct endocortical calcein double labeling, calcein labels were totally absent in *Fgf-23* mutants. Endocortical calcein double labels in VDR and compound mutants were present but not as distinct as in wild-type mice. Three-μm-thick undecalcified sections. Original magnification x25 (**A**), x100 (**B**), and x400 (**C** and **D**). (**E**) Total volumetric bone mineral density (BMD, mg/cm³) of the femoral shaft (left) and of the distal femoral metaphysis (right) measured by peripheral quantitative computed tomography (pQCT). Data in **E** represent mean ± SEM of 3 – 7 mice each. * denotes P < 0.05 vs. *Fgf-23*^{-/-}; # P < 0.05 vs. WT, 1-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test.

However, in line with the mild secondary hyperparathyroidism present in VDR^{Δ/Δ} mice cortical, but not trabecular, BMD was lower compared with wild-type controls (Table 2). Calcein double labels were absent in *Fgf-23*^{-/-} mice, whereas VDR^{Δ/Δ} showed endocortical calcein double labeling (Fig. 1D). However, probably due to the mild secondary hyperparathyroidism, the labels in VDR^{Δ/Δ} mice were not as distinct as in wild-type mice, suggesting that bone formation may have been slightly impaired (Fig. 1D). Interestingly, the bone phenotype of normocalcemic compound mutants was identical to that of VDR^{Δ/Δ} mice, suggesting that FGF23 has no essential function in bone (Fig. 1 and Table 2).

TABLE 2. Bone mineral density of femurs from 4-week-old wild-type, *Fgf-23*, *VDR*, and double mutant mice on a rescue diet rich in calcium, phosphorus, and lactose

<i>Variable</i>			Wild-type	<i>Fgf-23</i> ^{-/-}	<i>VDR</i> ^{Δ/Δ}	<i>Fgf-23</i> ^{-/-} / <i>VDR</i> ^{Δ/Δ}
Total	BMD	shaft	393 ± 7*	244 ± 14	327 ± 13* #	324 ± 6* #
	(mg/cm ³)					
Cortical	BMD	shaft	701 ± 5*	466 ± 19	620 ± 17* #	630 ± 7* #
	(mg/cm ³)					
Cortical thickness		shaft	0.231 ± 0.004*	0.155 ± 0.009	0.202 ± 0.003* #	0.202 ± 0.001* #
	(mm)					
Total	BMD	distal	346 ± 7*	193 ± 12	300 ± 10* #	307 ± 7* #
	metaphysis	(mg/cm ³)				
Trabecular	BMD	distal	190 ± 11*	136 ± 5	189 ± 10*	205 ± 9*
	metaphysis	(mg/cm ³)				

BMD, bone mineral density measured by peripheral quantitative computed tomography in the femoral shaft and in the femoral distal metaphysis.

All values are means ± SEM of 3 - 7 animals in each group; * P<0.05 vs. *Fgf-23*^{-/-}, # P<0.05 vs. wild-type by one-way ANOVA followed by Student-Neumann-Keuls multiple comparison test.

Ectopic calcifications and organ atrophy are absent in *Fgf-23*^{-/-}/*VDR*^{Δ/Δ} double mutant mice

It is known that deletion of FGF23 function results in ectopic calcifications, organ atrophy, and premature aging in genetically engineered mice (Razzaque et al., 2006). To test whether ablation of vitamin D signaling in normocalcemic *Fgf-23*^{-/-}/*VDR*^{Δ/Δ} double mutants would rescue the ectopic calcifications found in *Fgf-23*^{-/-} mice, we examined von Kossa-stained paraffin sections of all major organ systems. At 6 weeks of age, soft tissue calcifications have been reported in blood vessels, heart, kidney, skin, and lung of *Fgf-23*^{-/-} mice (Razzaque et al., 2006). However, in our 4-week-old *Fgf-23*^{-/-} mice, ectopic calcifications were observed only occasionally. Figures 2A and

2B show an example of diffuse calcification of the submucosa in a main bronchus of an *Fgf-23*^{-/-} mouse. Soft tissue calcifications were completely absent in wild-type, *VDR*^{ΔΔ}, or double mutant mice (data not shown).

In addition, ablation of vitamin D signaling fully rescued the atrophy of the skin and of other organs such as intestine and spleen present in *Fgf-23*^{-/-} mice (Fig. 2C and D, and data not shown). Similar to *VDR*^{ΔΔ} mice, double mutant mice showed the beginning development of epidermal cysts in the skin (Fig. 2C).

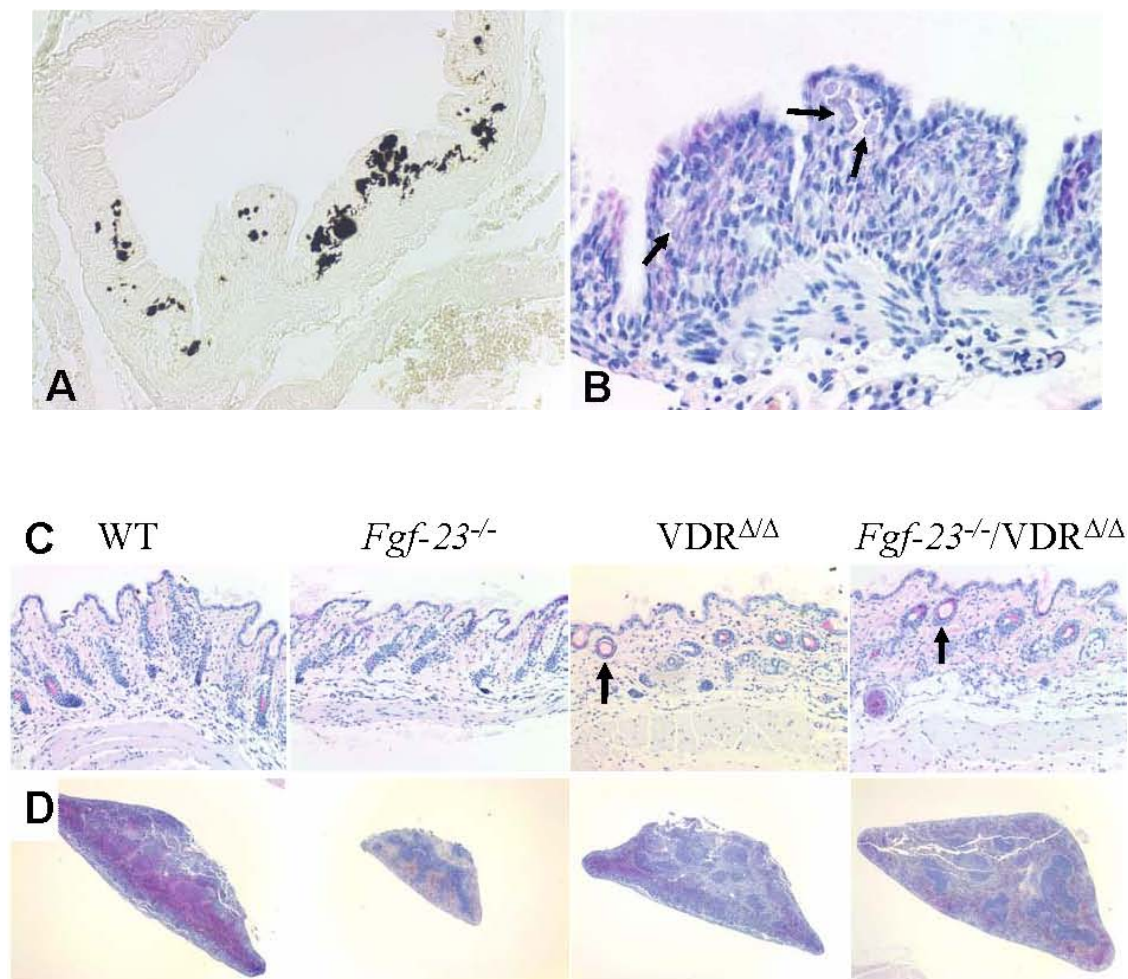


Figure 2. Analysis of ectopic calcifications and organ histology. Representative paraffin sections from 4-week-old mice on the rescue diet were stained with von Kossa (A) or haematoxylin/eosin (B - D). (A) Diffuse calcification in a main bronchus of a *Fgf-23*^{-/-} animal. (B) High power view of the same site shows amorphous mineral deposits in the submucosal tissue (arrows). Five- μ m-thick sections. Original magnification x25 (D), x200 (A and C), and x400 (B). Thinning of the skin (C) and spleen atrophy (D) present in *Fgf-23*^{-/-} mice were absent in *VDR* mutants and compound mutants. Beginning development of epidermal cysts in *VDR* and compound mutants is marked with arrows (C).

Improved glucose tolerance and insulin sensitivity in *Fgf-23*^{-/-} mice is corrected in *Fgf-23*^{-/-}/*VDR*^{Δ/Δ} double mutants, and is independent of *Klotho*

Klotho protein functions as a circulating hormone that binds to a cell-surface receptor and represses intracellular signals of insulin and insulin-like growth factor 1 (Kurosu et al., 2005). Therefore, lack of *Klotho* results in augmented insulin sensitivity. The striking similarities between *Fgf-23*^{-/-} and *Klotho*^{-/-} mice prompted us to examine glucose tolerance tests and the histology of the endocrine pancreas in our experiments. Fig. 3A shows that all genotypes had normal morphology of pancreatic islets. To rule out differences in intestinal glucose uptake because of altered gut functions in *Fgf-23*^{-/-} mice, we performed subcutaneous glucose tolerance tests. We found that *Fgf-23*^{-/-} mice were hypoglycemic at baseline (Fig. 3B), and showed a 30% reduction in the area under the curve after a subcutaneous glucose challenge, relative to wild-type controls (Fig. 3C). To test whether the improved glucose tolerance is caused by increased insulin secretion or by increased peripheral insulin sensitivity, i.e., an augmented flux of glucose into peripheral tissues, we measured serum insulin at baseline, and at 10 minutes after the subcutaneous glucose challenge (Figs. 3D-E). At baseline, 9 out of 12 *Fgf-23*^{-/-} mice had undetectable insulin levels (<0.1 ng/ml). Interestingly, *Fgf-23*^{-/-} mice did not respond to the glucose challenge with increased insulin secretion. At 10 minutes after the glucose challenge, 6 out of 12 mice were still below the detection limit of the assay, while all other genotypes showed a 2- to 3-fold increase in insulin secretion between baseline and 10 minutes. When expressed as the absolute increase in insulin concentration after the glucose stimulus, *Fgf-23*^{-/-} mice showed an 86-fold reduction in insulin secretory response relative to wild-type controls.

We reported earlier that *VDR*^{Δ/Δ} mice are characterized by reduced insulin secretory response (Zeititz et al., 2003). In line with these data, the increase in insulin concentration between baseline and 10 minutes after the glucose challenge was lower in *VDR*^{Δ/Δ} mice compared with wild-type controls. However, this difference did not reach statistical significance in this experiment. Glucose tolerance curves and insulin secretory response of double mutants closely matched those of *VDR*^{Δ/Δ} mice (Figs. 3B-E), demonstrating that the alterations in carbohydrate metabolism in *Fgf-23*^{-/-} mice are caused indirectly through increased signaling through the vitamin D axis.

To examine the role of *Klotho* in the pathophysiology of the increased insulin sensitivity in *Fgf-23*^{-/-} mice, we measured renal expression of *Klotho* by Northern analysis and qRT-PCR. We found unchanged renal expression of *Klotho* in all genotypes with both analytical techniques (Fig. 3F and G), suggesting that the alteration in carbohydrate metabolism found in *Fgf-23*^{-/-} mice are not caused by down-regulation of the renal expression of *Klotho*.

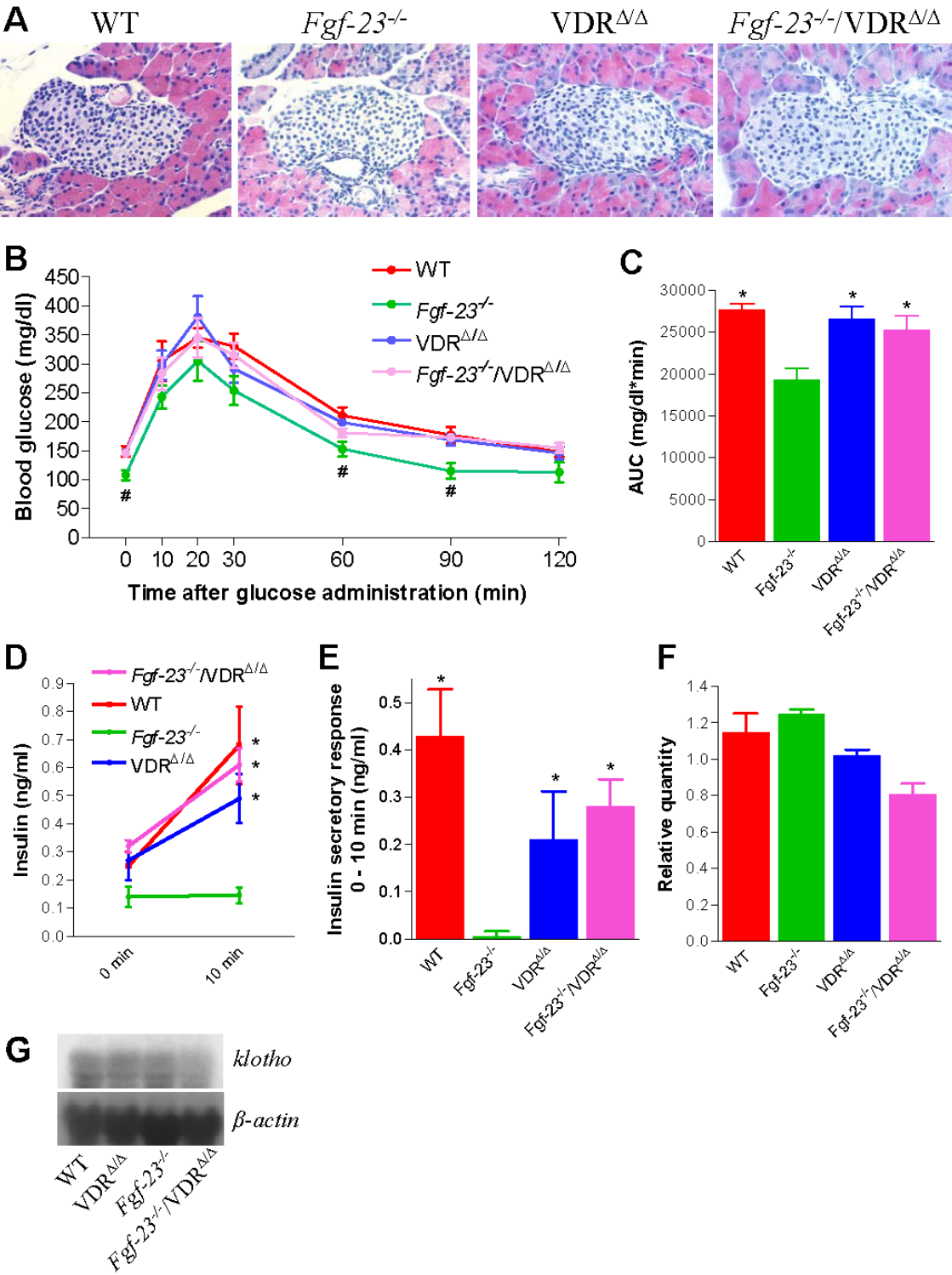


Figure 3. Pancreas histology, glucose homeostasis, and renal expression of *Klotho* in 4-week-old mice on the rescue diet. **(A)** Histological analysis revealed normal morphology of pancreas islets in all gene-targeted mice. **(B)** Subcutaneous glucose tolerance tests were performed in 5 – 12 mice of each genotype. D-glucose (1.5 g/kg body weight) was subcutaneously administered at time 0 after a 2-hour fast. **(C)** The area under the curve was calculated for all glucose tolerance tests. **(D)** Serum insulin levels at baseline and 10 minutes after a subcutaneous glucose challenge (1.5 g/kg body weight) were measured in 5 – 12 mice of each genotype. **(E)** From the data shown in **D**, the absolute difference in serum insulin between 10 minutes after the glucose challenge and baseline was calculated. **(F)** Quantitative RT-PCR analysis of renal *Klotho* expression in 4-week-old mice, normalized to *hprt* using the comparative $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (n = 2 of each genotype). Data in **B – F** represent mean \pm SEM. * denotes $P < 0.05$ vs. *Fgf-23*^{-/-}, # $P < 0.05$ vs. WT, 1-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test. **(G)** Representative Northern analysis of total RNA (10 μ g per lane) isolated from the kidney of 4-week-old female mice. Blots were hybridized with cDNA probes specific for *Klotho*, using a β -actin-specific cDNA probe as loading control.

DISCUSSION

To clarify the role of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in FGF23 signaling, we generated compound mutants deficient in *Fgf-23* and VDR function. Compound mutants were a phenocopy of VDR mutants, suggesting that the abnormalities in mineral homeostasis and bone phenotype found in *Fgf-23*^{-/-} mice are mainly caused by excessive vitamin D signaling. In accordance with our findings, it has been reported that very high levels of endogenous calcitriol in mice with a defective vitamin D catabolism induce impaired bone mineralization (St Arnaud et al., 2000). Furthermore, we show that normocalcemic mice lacking both FGF23 and a functioning VDR have normal serum phosphate levels, and normal renal tubular reabsorption of phosphate. In addition, we found no difference in renal tubular reabsorption of phosphate between VDR and double mutants.

A limitation of the current study is that, despite feeding the rescue diet, VDR and compound mutants showed a mild hyperparathyroidism. This may complicate the interpretation of our results, because elevated PTH may override renal or bone effects of *Fgf-23* deficiency. In addition, it could be argued that correction of hypercalcemia and hyperphosphatemia in *Fgf-23*^{-/-} mice by ablation of vitamin D signaling may rescue the bone and mineral phenotype even in the absence of a causal link between FGF23 and vitamin D. However, as mentioned above, several lines of evidence have shown that FGF23 regulates the renal production of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Shimada et al., 2001; Shimada et al., 2004a; Shimada et al., 2004b;

Sitara et al., 2004). In light of the recent report that Fgf-23 serum levels are elevated in VDR knock-out mice on the rescue diet (Yu et al., 2005), the identical phenotype of compound mutants (with absent Fgf-23) and VDR mutants (with high circulating Fgf-23) strongly supports the hypothesis that the effects of Fgf-23 deficiency on bone and mineral homeostasis are mediated indirectly through excessive vitamin D signaling. Similar results have been obtained in compound mutants deficient in Fgf-23 and renal 1 α -hydroxylase (Sitara et al., 2006). Therefore, although we cannot rule out that the lacking phosphaturic effects of FGF23 in compound mutants were masked by mild hyperparathyroidism, our data suggest that FGF23 has no major essential function in mineral and bone metabolism. Rather, the most important effect of FGF23 deficiency on mineral homeostasis appears to be the loss of the negative feedback control over renal 1 α -hydroxylase activity. Although our data suggest that FGF23 has no major essential *physiological* role in bone and mineral metabolism apart from its regulatory function of renal 1 α -hydroxylase, the *pharmacological* effects of FGF23 may be partially independent of vitamin D signaling. For example, it was shown that FGF23 has phosphaturic activity in VDR knockout mice (Inoue et al., 2005).

Recently, it has been reported that Klotho may act as a cofactor for FGF23 signaling on renal tubular cells (Kurosu et al., 2006), providing a potential explanation for the striking similarities between the phenotypes of *Klotho*^{-/-} and *Fgf-23*^{-/-} mice. Based on this model, ablation of FGF23 or Klotho function would have similar downstream effects in terms of loss of negative feedback control over renal 1 α -hydroxylase. In both cases, up-regulation of renal 1 α -hydroxylase activity results in excessive production of 1,25(OH)₂D₃, resulting in hypercalcemia and hyperphosphatemia due to stimulation of intestinal uptake of calcium and phosphate, and increased renal reabsorption of calcium. Despite the fact that PTH was undetectable in *Fgf-23*^{-/-} mice renal tubular reabsorption of phosphate tended to be slightly lower relative to wild-type controls. The current findings suggest that hyperphosphatemia in *Fgf-23*^{-/-} mice on the phosphate-rich rescue diet is maintained by a combination of almost normal renal tubular reabsorption of the increased filtered phosphate load, and of probably increased intestinal absorption of phosphate. Together with elevated 1,25(OH)₂D₃, the lack of direct inhibition of intestinal phosphate absorption by Fgf-23 in *Fgf-23*^{-/-} mice may further contribute to increased intestinal absorption of phosphate (Miyamoto et al., 2005).

Our study has shown that, similar to *Klotho*^{-/-} mice, *Fgf-23*^{-/-} mice are characterized by improved glucose tolerance due to increased insulin sensitivity. Although we did not measure insulin sensitivity directly, the combination of improved glucose tolerance with decreased insulin secretory response is indicative of increased insulin sensitivity when differences in intestinal glucose uptake can be ruled out by parenteral administration of glucose. We recently reported that renal expression of *Klotho* was down-regulated in *Fgf-23*^{-/-} mice on a normal diet (Razzaque et al., 2006). In the current study, we found that renal *Klotho* expression was unchanged in *Fgf-23*^{-/-}, *VDR*^{ΔΔ}, and double mutants on the rescue diet. It is known that renal *Klotho* expression is regulated by dietary phosphate (Morishita et al., 2001). Therefore, as a potential explanation for this discrepancy, it is possible that down-regulation of *Klotho* by Fgf-23 deficiency is not observed on a high phosphate diet. Nevertheless, the data provided by this study show that alterations in *Klotho* expression do not cause the changes in glucose metabolism seen in Fgf-23-ablated mice. In analogy to our finding that ablation of vitamin D signaling rescues the increased insulin sensitivity in *Fgf-23*^{-/-} mice, it was reported that the phenotype of *Klotho*^{-/-} mice is significantly improved on a vitamin D deficient diet (Tsujikawa et al., 2003). Therefore, both lines of evidence from *Klotho*^{-/-} and *Fgf-23*^{-/-} mice suggest that 1,25(OH)₂D₃ may be an important regulator of peripheral insulin sensitivity. However, at present, we cannot rule out that the increased insulin sensitivity in *Fgf-23*^{-/-} mice is caused by hypercalcemia and/or hyperphosphatemia, rather than increased 1,25(OH)₂D₃. Further experimentation is required to address this question. Nevertheless, it is interesting to note in this context that a vitamin D response element was found in the human insulin receptor gene promoter (Maestro et al., 2003), and that epidemiological data have shown a close association of serum 25(OH)D concentrations with peripheral insulin sensitivity (Chiu et al., 2004).

In conclusion, our study indicates that the major role of FGF23 in mineral and bone metabolism is its regulatory function on renal 1 α -hydroxylase activity. Furthermore, our results suggest that 1,25(OH)₂D₃ may also be an important regulator of peripheral insulin sensitivity.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

We have recently generated VDR (Erben et al., 2002) and *Fgf-23* (Sitara et al., 2004) mutant mice by embryonic stem cell technology. In order to generate mice deficient both in *Fgf-23* and VDR, we mated heterozygous *Fgf-23*^{+/-} with heterozygous VDR mutant mice. The double heterozygous offspring from these matings were intercrossed to generate wild-type, *Fgf-23*^{-/-}, VDR^{ΔΔ}, and *Fgf-23*^{-/-} /VDR^{ΔΔ} mice. The mice were kept at 24°C with a 12 hour/12 hour light/dark cycle, and were allowed free access to a so-called rescue diet and tap water. The rescue diet (Altromin, Lage, Germany, and Ssniff, Soest, Germany) containing 2.0% calcium, 1.25% phosphorus, 20% lactose and 600 IU vitamin D/kg was fed starting from 16 days of age. This diet has been shown to normalize mineral homeostasis in VDR-ablated mice (Li et al., 1998; Erben et al., 2002; Zeitz et al., 2003). Some litters were kept on a normal mouse chow (Ssniff) to examine PTH serum levels on a normal diet. All experiments were performed on 4-week-old male and female offspring of double heterozygous x double heterozygous matings. The VDR mutant mice used for the matings had been backcrossed to C57BL/6 genetic background for 6 generations. The *Fgf-23* mutant mice were an intercross between C57BL/6 and Sv129. Genotyping of the mice was performed by multiplex PCR using genomic DNA extracted from tail. The following 6 primers were simultaneously used in one reaction (F, forward; R, reverse): mVDR-F1 5'-GCCTGCTCTTCTTACAGGGATG-3', mVDR-R1 5'-GGA CT CACCTGAAG-AAACCCTTGC-3', LacZ-R1 5'-GGCCTCAGGAAGATCGCACTCC-3', m*Fgf-23*-F1 5'-AGTGGACGCTGGAGAATGGCTATG-3, m*Fgf-23*-R1 5'-CTGGGAAAGGGG-CGACACC'-3, and m*Fgf-23*-F2 5'-AGCCTGTCTGGGAGTGTCAG-3'. The reverse mutant *Fgf-23* primer is identical to the mutant VDR reverse primer located in the *lacZ* cassette (*lacZ*-R1). After an initial denaturation for 10 min at 94°C, amplification cycles consisted of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 58°C for 1 min, and 1 min extension at 72°C for 33 cycles, followed by a final extension for 10 min at 72°C. The expected product size for wild-type VDR is 170 bp, for mutant VDR 250 bp, for wild-type *Fgf-23* 397 bp, and for mutant *Fgf-23* 302 bp. All animals were subcutaneously injected with calcein (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany; 20 mg/kg) on days 2 and 1 prior to necropsy. Spontaneous urine was collected before necropsy. At 4 weeks of age, the mice were killed by exsanguination from the abdominal V. cava under anesthesia with ketamine/xylazine (67/7 mg/kg i.p.). All

animal procedures were approved by the Ethical Committee of the University of Veterinary Medicine Vienna.

Biological chemistry

Total calcium in serum and urine was determined by flame photometry (EFOX 5053, Eppendorf, Hamburg, Germany). Serum alkaline phosphatase activity, creatine kinase activity, serum urea, creatinine, albumin, and phosphorus as well as urinary creatinine and urinary phosphorus were analyzed on a Hitachi 766 Autoanalyzer (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Renal tubular reabsorption of phosphorus (TRP) was calculated according to the formula $\%TRP = [1 - (UrP \cdot SeCrea) / (SeP \cdot UrCrea)] \cdot 100$ (Ur, urinary; Se, serum; P, phosphorus; Crea, creatinine). PTH concentrations were assessed using a two-sided enzyme-linked immunosorbent assay specific for intact mouse and rat PTH (Immutopics, San Clemente, CA). Insulin was measured by a rat-specific enzyme-linked immunosorbent assay using mouse insulin standards (ChrysalChem, Chicago, IL).

Subcutaneous glucose tolerance and insulin secretion

To examine alterations in subcutaneous glucose tolerance and insulin secretion, 4-week-old wild-type, *Fgf-23*^{-/-}, *VDR*^{ΔΔ}, and *Fgf-23*^{-/-}/*VDR*^{ΔΔ} mice on the rescue diet (n= 5 – 12 each) were kept individually on hunger grids in their normal cage environment for a 2-hour period before testing. During that period, the mice had free access to tap water, but were deprived of food. Thereafter, glucose (1.5 mg/g body weight) was administered at time 0 by subcutaneous injection. Glucose was dissolved in physiological saline at a concentration of 0.5 mmol/L. Blood glucose levels at 0, 10, 20, 30, 60, 90, and 120 minutes were determined in about 2 - 3 μl of whole blood obtained by tail vein puncture employing a standard test system (One Touch Ultra, Lifescan, Neckargemünd, Germany). Using the same experimental protocol, serum samples for measurement of insulin levels (5 – 10 μl) were obtained by tail vein puncture at baseline and 10 minutes after the glucose challenge.

Northern blot analysis

For Northern blot analyses, total RNA from kidneys of 4-week-old mice was prepared using Trizol reagent (GIBCO; Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA). Ten μg of each RNA was mixed with glyoxal sample loading dye (Ambion, Inc., Austin, TX USA), incubated 30 min at 50°C and fractionated on a 1% agarose gel in 1 x BTPE buffer as described previously (Burnett, 1997). The samples were transferred to a

nylon membrane (Hybond-N+, Amersham Biosciences), cross-linked by ultraviolet light and hybridized with a 1.46 kb probe specific for *Klotho* (Acc No. AB005141, nucleotides 951 – 2409). A 1.15 kb mouse β -actin-specific probe was used as loading control.

Quantitative RT-PCR

The levels of gene expression for mouse *Klotho* and the reference housekeeping gene, *hprt*, were determined in the kidneys of 4-week-old mice by qRT-PCR. Total RNA was isolated as described for Northern blots, and converted to cDNA using the SuperScript III First-Strand Synthesis System with Oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer (Invitrogen, Lofer, Austria). Quantitative RT-PCR was performed on an MxP3000 real-time PCR system (Stratagene) by using a PCR mix with HOT FIREPol DNA Polymerase I (SolisBiodyne, Tartu, Estonia) according to standard protocols (Kaufman et al., 2005). The PCR cycling profile was 95°C for 12 min, followed by 40 amplification cycles of 95°C for 30 s and 60°C for 60 s, to generate dissociation curves. Each measurement was set up in triplicate. Nontemplate controls and nonamplification controls were included to rule out nonspecific amplification. For each sample, we used 100 ng of cDNA per well for the reference and target genes. To validate the amount and quantity of kidney RNA for *Klotho* expression, transcript levels of the reference gene, *hprt*, were measured. For each sample, target values were corrected by *hprt* copies to obtain normalized values independent of variation in starting material. Each primer and probe pair was validated using the comparative C_T method for relative quantification ($\Delta\Delta C_T$) where the amount of target gene copies is normalized to a reference gene (*hprt*). The correlation between the C_T and the fold difference in RNA concentration for each probe and primer set was measured by creating an 8-fold serial dilution standard curve over the entire detection scale. For each probe and primer pair combination used in this study, the correlation coefficient of detection was at least 0.99. When we performed the relative efficiency plot of target versus reference gene, the absolute value of the slope of log input (ng cDNA) versus ΔC_T was less than 0.1. The fold difference between the different mouse genotypes was calculated assuming 100% efficient PCR where each C_T is normalized to *hprt* using the comparative $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. A 2-fold difference in gene expression was defined to be within the discrimination ability of the assay.

We designed intron-spanning primers (F, forward, R, reverse; VBC Biotech, Vienna, Austria) and the TaqMan probes (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Germany) with the

Primer Express 1.5 software (Applied Biosystems). The following upstream and downstream primers were used: *Klotho*, mKI-qF4 (5'-TCCGGCCTCAGATACCCTTAC-3') and mKI-qR4 (5'-GGTTCACCTGGGTCTGGTTACC-3) with the mKI-Taq1 FAM-CGAGAAATGCGGGTCCACTTCGCT-BHQ1; and *hprt*, mHPRT-f (5'-TTGCTCGAGATGTCATGAAGGA-3') and mHPRT-r (5'-TGAGAGATCATCTCCACCAATAACTT-3') with mHPRT-Taq1 (FAM-TGGGAGGCCATCACATTGTGGC-BHQ1).

Organ and bone histology

For organ histology, spleen, liver, intestine, thymus, lung, heart, aorta, kidney, pancreas, and skin of 4-week-old mice were fixed in 4% PFA overnight. Paraffin embedding, sectioning at 5 µm, and haematoxylin/eosin staining was carried out according to standard procedures. To detect ectopic calcifications, paraffin sections were stained with von Kossa. Processing of bone specimens was performed as described (Erben, 1997).

Bone mineral density measurements

Bone mineral density (BMD) of the left femur was measured by peripheral quantitative computed tomography (pQCT) using a XCT Research M+ pQCT machine (Stratec Medizintechnik, Pforzheim, Germany). One slice (0.2-mm-thick) in the mid-diaphysis of the femur, and 3 slices in the distal femoral metaphysis located 1.5, 2, and 2.5 mm proximal to the articular surface of the knee joint were measured. BMD values of the distal femoral metaphysis were calculated as the mean over 3 slices. A voxel size of 0.070 mm and a threshold of 250 mg/cm³ were used for calculation of cortical BMD. For the discrimination between trabecular and cortical BMD in the distal femoral metaphysis a threshold of 450 mg/cm³ was used.

Statistical analyses

Statistics were computed using SPSS for Windows 11.5 (SPSS, Chicago, IL). The data from male and female mice were initially analyzed using 3-way factorial analysis of variance (ANOVA). Three-way factorial ANOVA evaluated the effects of the *Fgf-23*, *VDR*, and sex, and also determined whether there were two-way interactions between the individual factors, i.e., whether the different factors mutually influenced each other in a non-additive way. The factor sex did not show a significant effect on any parameter in the 4-week-old mice used for this study, and there were no significant interactions between sex and *Fgf-23* or *VDR*. Therefore, the combined

data from both genders were subsequently analyzed by 1-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test. P values of less than 0.05 were considered significant. The data are presented as the mean \pm SEM.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank M. Skalicky for her help with the statistical analyses. C. Bergow and S. Hirmer are acknowledged for excellent technical assistance. This work was supported by grants from the University of Veterinary Medicine Vienna to R.G.E.

References

- Bai, X., Miao, D., Li, J., Goltzman, D., Karaplis, A.C., 2004. Transgenic mice overexpressing human fibroblast growth factor 23 (R176Q) delineate a putative role for parathyroid hormone in renal phosphate wasting disorders. *Endocrinology* 145, 5269-5279.
- Bringhurst, F.R., Demay, M.B., Kronenberg, H.M., 1998. Hormones and disorders of mineral metabolism. In Wilson, J.D. et al. (Eds.), *Williams Textbook of Endocrinology*, W.B. Saunders, Philadelphia, USA, pp. 1155-1209.
- Burnett, W.V., 1997. Northern blotting of RNA denatured in glyoxal without buffer recirculation. *BioTechniques* 22, 668-671.
- Chiu, K.C., Chu, A., Go, V.L., Saad, M.F., 2004. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 820-825.
- Erben, R.G., 1997. Embedding of bone samples in methylmethacrylate: An improved method suitable for bone histomorphometry, histochemistry, and immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 45, 307-313.
- Erben, R.G., Soegiarto, D.W., Weber, K., Zeitz, U., Lieberherr, M., Gniadecki, R., Möller, G., Adamski, J., Balling, R., 2002. Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D. *Mol. Endocrinol.* 16, 1524-1537.
- Evans, R.M., 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.

- Inoue, Y., Segawa, H., Kaneko, I., Yamanaka, S., Kusano, K., Kawakami, E., Furutani, J., Ito, M., Kuwahata, M., Saito, H., Fukushima, N., Kato, S., Kanayama, H.O., Miyamoto, K., 2005. Role of the vitamin D receptor in FGF23 action on phosphate metabolism. *Biochem. J.* 390, 325-331.
- Jonsson, K.B., Zahradnik, R., Larsson, T., White, K.E., Sugimoto, T., Imanishi, Y., Yamamoto, T., Hampson, G., Koshiyama, H., Ljunggren, O., Oba, K., Yang, I.M., Miyauchi, A., Econs, M.J., Lavigne, J., Juppner, H., 2003. Fibroblast growth factor 23 in oncogenic osteomalacia and X-linked hypophosphatemia. *N. Engl. J. Med.* 348, 1656-1663.
- Kaufman, H.L., Deraffele, G., Mitcham, J., Moroziewicz, D., Cohen, S.M., Hurst-Wicker, K.S., Cheung, K., Lee, D.S., Divito, J., Voulo, M., Donovan, J., Dolan, K., Manson, K., Panicali, D., Wang, E., Horig, H., Marincola, F.M., 2005. Targeting the local tumor microenvironment with vaccinia virus expressing B7.1 for the treatment of melanoma. *J. Clin. Invest* 115, 1903-1912.
- Kuro-o, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T., Ohyama, Y., Kurabayashi, M., Kaname, T., Kume, E., Iwasaki, H., Iida, A., Shiraki-Iida, T., Nishikawa, S., Nagai, R., Nabeshima, Y.I., 1997. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390, 45-51.
- Kurosu, H., Ogawa, Y., Miyoshi, M., Yamamoto, M., Nandi, A., Rosenblatt, K.P., Baum, M.G., Schiavi, S., Hu, M.C., Moe, O.W., Kuro, O., 2006. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by *Klotho*. *J. Biol. Chem.*
- Kurosu, H., Yamamoto, M., Clark, J.D., Pastor, J.V., Nandi, A., Gurnani, P., McGuinness, O.P., Chikuda, H., Yamaguchi, M., Kawaguchi, H., Shimomura, I., Takayama, Y., Herz, J., Kahn, C.R., Rosenblatt, K.P., Kuro-o M, 2005. Suppression of aging in mice by the hormone *Klotho*. *Science* 309, 1829-1833.
- Larsson, T., Marsell, R., Schipani, E., Ohlsson, C., Ljunggren, O., Tenenhouse, H.S., Juppner, H., Jonsson, K.B., 2004. Transgenic mice expressing fibroblast growth factor 23 under the control of the $\alpha 1(I)$ collagen promoter exhibit growth retardation, osteomalacia, and disturbed phosphate homeostasis. *Endocrinology* 145, 3087-3094.
- Li, Y.C., Amling, M., Pirro, A.E., Priemel, M., Meuse, J., Baron, R., Dellling, G., Demay, M.B., 1998. Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents

- hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice. *Endocrinology* 139, 4391-4396.
- Li, Y.C., Pirro, A.E., Amling, M., Delling, G., Baroni, R., Bronson, R., Demay, M.B., 1997. Targeted ablation of the vitamin D receptor: An animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9831-9835.
- Maestro, B., Davila, N., Carranza, M.C., Calle, C., 2003. Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 84, 223-230.
- Miyamoto, K., Ito, M., Kuwahata, M., Kato, S., Segawa, H., 2005. Inhibition of intestinal sodium-dependent inorganic phosphate transport by fibroblast growth factor 23. *Ther. Apher. Dial.* 9, 331-335.
- Morishita, K., Shirai, A., Kubota, M., Katakura, Y., Nabeshima, Y., Takeshige, K., Kamiya, T., 2001. The progression of aging in *klotho* mutant mice can be modified by dietary phosphorus and zinc. *J. Nutr.* 131, 3182-3188.
- Razzaque, M.S., Sitara, D., Taguchi, T., St Arnaud, R., Lanske, B., 2006. Premature aging-like phenotype in fibroblast growth factor 23 null mice is a vitamin D-mediated process. *FASEB J.* 20, 720-722.
- Saito, H., Maeda, A., Ohtomo, S., Hirata, M., Kusano, K., Kato, S., Ogata, E., Segawa, H., Miyamoto, K., Fukushima, N., 2005. Circulating FGF-23 is regulated by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and phosphorus in vivo. *J. Biol. Chem.* 280, 2543-2549.
- Shimada, T., Hasegawa, H., Yamazaki, Y., Muto, T., Hino, R., Takeuchi, Y., Fujita, T., Nakahara, K., Fukumoto, S., Yamashita, T., 2004a. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J. Bone Miner. Res.* 19, 429-435.
- Shimada, T., Kakitani, M., Yamazaki, Y., Hasegawa, H., Takeuchi, Y., Fujita, T., Fukumoto, S., Tomizuka, K., Yamashita, T., 2004b. Targeted ablation of *Fgf23* demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J. Clin. Invest* 113, 561-568.
- Shimada, T., Mizutani, S., Muto, T., Yoneya, T., Hino, R., Takeda, S., Takeuchi, Y., Fujita, T., Fukumoto, S., Yamashita, T., 2001. Cloning and characterization of

- FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 98, 6500-6505.
- Shimada, T., Muto, T., Urakawa, I., Yoneya, T., Yamazaki, Y., Okawa, K., Takeuchi, Y., Fujita, T., Fukumoto, S., Yamashita, T., 2002. Mutant FGF-23 responsible for autosomal dominant hypophosphatemic rickets is resistant to proteolytic cleavage and causes hypophosphatemia in vivo. *Endocrinology* 143, 3179-3182.
- Shimada, T., Urakawa, I., Yamazaki, Y., Hasegawa, H., Hino, R., Yoneya, T., Takeuchi, Y., Fujita, T., Fukumoto, S., Yamashita, T., 2004c. FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 409-414.
- Sitara, D., Razzaque, M.S., Hesse, M., Yoganathan, S., Taguchi, T., Erben, R.G., Juppner, H., Lanske, B., 2004. Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23 results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in *PheX*-deficient mice. *Matrix Biol.* 23, 421-432.
- Sitara D, Razzaque MS, St-Arnaud R, Taguchi T, Erben RG, Lanske B Genetic ablation of vitamin D activation pathway reverses biochemical and skeletal anomalies in *Fgf-23* null animals. *Am J Pathol* 2006 (in press)
- St Arnaud, R., Arabian, A., Travers, R., Barletta, F., Raval-Pandya, M., Chapin, K., Depovere, J., Mathieu, C., Christakos, S., Demay, M.B., Glorieux, F.H., 2000. Deficient mineralization of intramembranous bone in vitamin D-24- hydroxylase-ablated mice is due to elevated 1,25-dihydroxyvitamin D and not to the absence of 24,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology* 141, 2658-2666.
- The ADHR Consortium, 2000. Autosomal dominant hypophosphatemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat. Genet.* 26, 345-348.
- Tsujikawa, H., Kurotaki, Y., Fujimori, T., Fukuda, K., Nabeshima, Y., 2003. *Klotho*, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol. Endocrinol.* 17, 2393-2403.
- White, K.E., Carn, G., Lorenz-Depiereux, B., Benet-Pages, A., Strom, T.M., Econs, M.J., 2001. Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF-23. *Kidney Int.* 60, 2079-2086.

- Yamazaki, Y., Okazaki, R., Shibata, M., Hasegawa, Y., Satoh, K., Tajima, T., Takeuchi, Y., Fujita, T., Nakahara, K., Yamashita, T., Fukumoto, S., 2002. Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 87, 4957-4960.
- Yoshizawa, T., Handa, Y., Uematsu, Y., Takeda, S., Sekine, K., Yoshihara, Y., Kawakami, T., Arioka, K., Sato, H., Uchiyama, Y., Masushige, S., Fukamizu, A., Matsumoto, T., Kato, S., 1997. Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nature Genet.* 16, 391-396.
- Yu, X., Sabbagh, Y., Davis, S.I., Demay, M.B., White, K.E., 2005. Genetic dissection of phosphate- and vitamin D-mediated regulation of circulating Fgf23 concentrations. *Bone* 36, 971-977.
- Zeitz, U., Weber, K., Soegiarto, D.W., Wolf, E., Balling, R., Erben, R.G., 2003. Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *FASEB J.* 17, 509-511.

5 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen bestand in der weiteren Charakterisierung der physiologischen Rolle des Fibroblast growth factor-23 (FGF-23) im Knochen- und Mineralstoffwechsel und in der Erforschung der Interaktion zwischen diesem Faktor und dem Vitamin-D-Hormonsystem. Für diese Untersuchungen generierten wir eine Mauslinie, bei der das *Fgf-23*-Gen vollständig durch das *lacZ*-Gen und eine *neomycin*-Kassette ersetzt wurde. Der Phänotyp dieser *Fgf-23*-defizienten Mäuse entspricht weitgehend dem unabhängig von uns entwickelten Knockout-Modell einer japanischen Arbeitsgruppe, die bei ihrem Genkonstrukt nur das Exon 1 des *Fgf-23*-Gens entfernten (SHIMADA et al., 2004). Durch das Reporter-gen *LacZ* hat unser Modell den Vorteil, dass die Expression von Fgf-23 bei den Tieren relativ einfach und schon in frühen Entwicklungsstadien (ab E11.5) durch eine entsprechende histochemische LacZ-Färbung qualitativ nachweisbar ist. Da die LacZ-Färbung auch bei *Fgf-23*^{+/-}-Tieren möglich ist, kann die Expression des Reporter-gens auch bei physiologisch unauffälligen Tieren verfolgt werden (SITARA et al., 2004). Quantitative Bestimmungen der Expression von Fgf-23 auf mRNA-Ebene bedürfen allerdings der quantitativen RT-PCR oder Northern blotting (RIMINUCCI et al., 2003; LIU et al., 2003).

Mäuse, denen beide *Fgf-23*-Allele fehlen, zeigen einen ausgeprägten Phänotyp. Sie haben eine stark verkürzte Lebenserwartung und weisen neben einer deutlichen Wachstumsretardierung schwere Deformationen der Wirbelsäule und der Gliedmaßen auf. Immer lassen sich auch an diversen Stellen des Skeletts Mineralisierungsstörungen nachweisen, die vor allem in Form von Exostosen auftreten. Besonders markant sind die Zubildungen an den Vordergliedmaßen und den Rippen. Ganz ähnlich aussehende Veränderungen an den Knochen, allerdings mit etwas abweichender Lokalisierung, werden in der Humanmedizin entsprechend als „rachitischer Rosenkranz“ beschrieben (NAJADA et al., 2004). Histologische Bilder von Knochen dieser *Fgf-23*^{-/-}-Mäuse zeigen vermehrte Ansammlungen von unmineralisiertem Osteoid in der Kortikalis und die Wachstumsfugen zeigen eine verringerte Anzahl hypertropher Chondrozyten. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Überexpression oder zusätzliche Applikation von Fgf-23 eine Hypophosphatämie bewirken und ebenfalls zu Skelettveränderungen in Form von Rachitis bzw. Osteomalazie führen (SHIMADA et al., 2001; BAI et al., 2004; LARSSON et al., 2004). Aufgrund all dieser aufgezählten Veränderungen und der Tatsache, dass Fgf-

23 am stärksten in osteoblastären Zellen exprimiert wird, wurde zunächst vermutet, dass dieser Wachstumsfaktor einen direkten Einfluss auf die Mineralhomöostase hat und die Knochenformation über Wachstum und Differenzierung der Osteoblasten beeinflusst (SITARA et al., 2004). Die Ergebnisse unserer zweiten Studie unterstützen diese Schlussfolgerungen jedoch nicht. Durch Verpaarung mit VDR-Mutanten wird bei den *Fgf-23*^{-/-}-Mutanten der Effekt des biologisch wirksamen 1,25(OH)₂D₃ aufgrund des inaktivierten Vitamin-D-Rezeptors ausgeschaltet. Die biochemischen Befunde bei diesen Doppelmutanten sind mit denen von VDR-Mutanten identisch, d.h. die Tiere sind normokalzämisch, normophosphatämisch und haben eine unveränderte renal-tubuläre Phosphat-Reabsorption. Die Knochenmorphologie der Doppelmutanten entspricht weitgehend der von VDR-defizienten Mäusen. Sowohl bei der vergleichenden mikroskopischen Beurteilung, als auch bei Messungen der Knochenmineraldichte ließen sich keine Unterschiede zwischen VDR- und Doppelmutanten finden. Demzufolge sind der gestörte Mineralhaushalt und der abnorme Knochenphänotyp bei *Fgf-23*-Mutanten an einen intakten Vitamin-D-Signaltransduktionsweg gekoppelt. Da wir in unserem Kreuzungsexperiment mit *Fgf-23*- und VDR-Mutanten keine 1,25(OH)₂D₃-Spiegel gemessen haben, ist es derzeit nicht völlig sicher, ob die toxischen Wirkungen von 1,25(OH)₂D₃ bei *Fgf-23*-Knockout-Mäusen direkt durch einen erhöhten Hormonspiegel verursacht werden oder ob auch eine übermäßige Signalübertragung eine Rolle spielen könnte. Vieles spricht jedoch dafür, dass die toxischen Wirkungen durch hohe 1,25(OH)₂D₃ Serumspiegel verursacht werden, denn bei *Fgf-23*^{-/-}-Mäusen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen stark erhöhte 1,25(OH)₂D₃-Serumwerte gemessen (SITARA et al., 2004; SHIMADA et al., 2004). Diese Theorie wird auch durch eine Studie unterstützt, in welcher gezeigt wurde, dass sehr hohe 1,25(OH)₂D₃-Werte bei Mäusen, deren 24-Hydroxylase-Gen und damit der Hauptabbau-Weg für Vitamin-D-Metabolite inaktiviert wurde, ebenfalls eine gestörte Knochenmineralisation verursachen (ST ARNAUD et al., 2000). Die Rolle von FGF-23/*Fgf-23* für den Mineralhaushalt und die Knochenformation ist demnach nicht essentiell – wie bisher angenommen –, sondern seine Wirkung scheint vor allem in einem negativem Feedback-Mechanismus zur Regulation der 1 α -Hydroxylase und damit des 1,25(OH)₂D₃-Spiegels zu bestehen.

In einigen Aspekten weisen die VDR-Mutanten und *Fgf-23*^{-/-}/VDR-Doppelmutanten noch deutliche Unterschiede zu den Wildtyp-Kontrolltieren auf. Obwohl die Knochenhistologie von VDR- und Doppelmutanten weitgehend der von Wildtyp-

Tieren entsprach, zeigte die Analyse der Knochenmineraldichte mit Hilfe von peripherer quantitativer Computertomographie eine gegenüber den Wildtyp-Kontrollen signifikant niedrigere Gesamt- und kortikale Knochenmineraldichte im Bereich der Femurdiaphyse und -metaphyse. Die naheliegendste Erklärung hierfür ist wohl eine nicht vollständig erfolgte Supplementierung über die Rescue diet. Sowohl VDR- als auch Doppelmutanten haben moderat erhöhte Parathormon-Spiegel, die auf einen sekundären Hyperparathyreoidismus hinweisen. Dieser ist jedoch nur als gering einzustufen, wenn man die PTH-Werte und die Ausprägung der Knochenbefunde mit VDR-Mutanten auf einer normalen Diät vergleicht. Ohne alimentäre oder parenterale Substitution entwickeln solche Tiere eine schwere Rachitis mit Wachstumsretardierung und den typischen Knochenveränderungen. Die Parathormon-Serumspiegel dieser Mäuse erreichen Werte von über 1000 pg/ml (ERBEN et al., 2002), also fast ein Zehnfaches des in dieser Studie gemessenen Parameters. Frühere Studien an zehn Wochen alten Mäusen belegen eindeutig die vollständige Wirksamkeit der speziellen Rescue diet (ZEITZ et al., 2003). Dennoch erschwert dieser bestehende Hyperparathyreoidismus eindeutige Schlussfolgerungen aus den vorliegenden Experimenten. Eventuell könnten durch den erhöhten Hormon-Spiegel die Ausprägungen des *Fgf-23*-Defizits überdeckt werden. Zum Phänotyp der *Fgf-23*^{-/-} defizienten Mäuse gehören auch die generalisierten und beträchtlichen Weichteilkalzinosen, die allem Anschein nach Folge der chronischen Hyperphosphatämie und Hyperkalzämie sind. Hier liegt noch erhöhter Forschungsbedarf zur Pathogenese und besonders zur Therapie vor. Eine ähnliche Problematik findet sich in der Humanmedizin bei der Langzeitbehandlung von chronischem Nierenversagen, bei Dialysepatienten und bei Nierenerkrankungen im Endstadium. Dort beobachtet man vermehrt Arteriosklerose und Gewebskalzifizierungen, die vermutlich zu dem erhöhten kardiovaskulären Erkrankungsrisiko dieser Patienten beitragen (FOLEY et al., 1995; BRIESE et al., 2006). Untersuchungen bei chronischen Dialysepatienten zeigen eine Erhöhung der FGF-23-Serumspiegel, vermutlich durch die Vitamin-D-Supplementierung, die hohen Phosphatspiegel und die PTH-Stimulation bedingt (FUKAGAWA und KAZAMA, 2006). Unser Mausmodell könnte bei der Entwicklung neuer Therapieansätze unter Berücksichtigung der physiologischen und pharmakologischen Wirkung von FGF-23 hilfreich sein.

Bisher ist noch nicht genau bekannt, wie und durch welches Enzym FGF-23 gespalten und damit inaktiviert wird. Seit Erforschung der humanen Erbkrankheit XLH gilt PHEX als möglicher Kandidat, allerdings ist die Literatur hierzu noch ziemlich uneinheitlich (BOWE et al., 2001; BAI et al., 2003; ERBEN et al., 2005). Bei der Verpaarung von *Hyp*-Mäusen (murines „Gegenstück“ zur XLH) mit *Fgf-23*^{-/-} kann die ausgeprägte Hypophosphatämie quasi umgekehrt werden. Der Phänotyp von *Hyp/Fgf-23*^{-/-}-Tieren gleicht fast vollständig dem der *Fgf-23*^{-/-}-Mäuse, einschließlich der erhöhten Phosphatwerte und der veränderten Knochenhistologie. Daher kann man lediglich vermuten, dass *PHEX* direkt oder indirekt an der Inaktivierung von *Fgf-23* beteiligt ist.

Vergleicht man *Fgf-23*^{-/-}- und *Klotho*^{-/-}-Mäuse bezüglich ihres Phänotyps, finden sich einige auffallende Gemeinsamkeiten: verkürzte Lebensdauer, Störungen in der Mineralhomöostase mit abnormaler Knochenformation und Gewebekalzinosen. In der Literatur finden sich verschiedene Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang. In-vitro-Versuche zeigen beispielsweise eine höhere Affinität des Komplexes von *Klotho* und FGF-Rezeptor zu *Fgf-23* als der Rezeptor oder *klotho* allein, d.h. *klotho* könnte als Cofaktor fungieren (KUROSU et al., 2006). Als relativ gesichert scheint die Beteiligung von *klotho* am endokrinen Vitamin-D-System in Form eines negativen Feedback-Mechanismus zu sein. Ähnlich wie bei *Fgf-23* wird eine kontrollierende Funktion bezüglich die Expression der renalen 1 α -Hydroxylase, dem Schlüsselenzym der Vitamin-D-Aktivierung, vermutet (YOSHIDA et al., 2002; NABESHIMA, 2002; RAZZAQUE et al., 2006). Fehlt diese hemmende Regulation, kommt es zu einer übermäßigen Synthese der biologisch aktiven Form des Vitamins und nachfolgend zur Hyperphosphatämie und -kalzämie.

Bei beiden Mäuselinien, *Fgf-23*^{-/-} und *Klotho*^{-/-}, ist eine veränderte Glukosetoleranz beschrieben worden. Tiere, die humanes KLOTHO überexprimieren, zeigen zwar normale Blutzuckerspiegel, aber gleichzeitig auch eine höhere Resistenz gegenüber Insulin (KUROSU et al., 2005). Subkutane Glukosetoleranz-Tests an *Fgf-23*^{-/-}-Mäusen haben gezeigt, dass solche Tiere bereits nach kurzen Hungerphasen hypoglykämisch sind und auf nachfolgende subkutane Glukosegaben deutlich weniger ansprechen als Wildtyp-Kontrolltiere. Der gemessene Insulinspiegel bleibt bei 50% der Tiere unterhalb der Nachweisgrenze (HESSE et al., 2006). Dennoch kann die höhere Insulinsensitivität bei *Fgf-23*^{-/-}-defizienten Tieren nicht mit dem Funktionsverlust von *klotho* erklärt werden, da wir in unseren Versuchen eine

unveränderte renale Expression desselben gefunden haben. Man weiß jedoch, dass die Expression von Klotho durch alimentäre Phosphat-Supplementierung oder -Restriktion beeinflusst werden kann (MORISHITA et al., 2001). So zeigen Messungen bei Tieren auf einer normalen Diät eine „Down-Regulation“ von *klotho* (RAZZAQUE et al., 2006), während bei *Fgf-23^{-/-}/VDR*-Doppelmutanten auf der Rescue diet, wie oben bereits erwähnt, keinerlei Änderung der Expression festzustellen ist. Um sicher auszuschließen, dass die Klotho-Expression bei *Fgf-23*-Mutanten auf der Rescue diet verändert ist, sollten die Expression auf Proteinebene und eventuell auch die Serumspiegel von Klotho gemessen werden.

Ein interessanter Aspekt dieser Untersuchungen ist auch die Normalisierung der Insulinsensitivität in den *Fgf-23^{-/-}/VDR*-Doppelmutanten. Diese Daten lassen die Vermutung zu, dass die Insulinsensitivität durch Änderungen im endokrinen Vitamin-D-System beeinflusst werden könnte. Sollte sich dieser Fund bestätigen, könnte dies hohe Relevanz für die Human- und Tiermedizin haben. Humanmedizinische Studien deuten ebenfalls auf einen Zusammenhang von Vitamin D, Kalzium und veränderter Glukosetoleranz, einschließlich Diabetes hin (HARKNESS et al., 2005; REIS et al., 2005; PITTAS et al., 2006). Eine in Kalifornien durchgeführte Studie an gesunden Probanden unterschiedlicher Rassezugehörigkeit hat eine starke Assoziation von oraler Glukosetoleranz und peripherer Insulinsensitivität mit den 25-Hydroxyvitamin D-Serumspiegeln ergeben (CHIU et al., 2004). Zusätzlich wurde ein VDRE im Promotor des humanen Insulinrezeptorgens gefunden (MAESTRO et al., 2003). Alternativ ist es allerdings auch möglich, dass durch die sehr wahrscheinlich erniedrigten Wachstumshormon-Spiegel bei den stark wachstumsretardierten *Fgf-23*-Mutanten ein wichtiger Gegenspieler von Insulin erniedrigt ist und dadurch die Insulinsensitivität gesteigert wird. Es bleibt künftigen Forschungsarbeiten vorbehalten, diesen sehr interessanten Fragestellungen nachzugehen.

6 Zusammenfassung

Fibroblast growth factor-23 (FGF-23), ein Molekül, das bei Patienten mit autosomal dominanter hypophosphatämischer Rachitis (ADHR) mutiert ist, scheint an der Regulation der Phosphat-Homöostase beteiligt zu sein. Obwohl Patienten, die an verschiedenen Krankheiten mit renalem Phosphatverlust leiden, erhöhte FGF-23-Serumspiegel aufweisen, ist noch unklar, ob dieser Faktor direkt für die Dysregulation der Mineralhomöostase und somit auch für die Knochenentwicklung verantwortlich ist. Zur weiteren Abklärung generierten wir ein Mausmodell, bei welchem das gesamte *FGF-23*-Gen durch ein *lacZ*-Gen ersetzt wurde. *Fgf-23*-defiziente Mäuse (*Fgf-23*^{-/-}) zeigten Wachstumsretardierung, eine schwere Hyperphosphatämie mit erhöhtem 1,25-Vitamin D₃-Serumspiegel, und starben noch vor Erreichen der 13. Lebenswoche. Die begleitend auftretenden Skelettdeformationen wurden histologisch, auf molekularer Ebene und morphometrisch nachgewiesen. *Fgf-23*^{-/-}-Mäuse wiesen aufgrund der Ansammlung von unmineralisiertem Osteoid eine erniedrigte Knochenmineraldichte der Gliedmaßen auf, die zu der deutlichen Deformation der Extremitäten führt. Darüber hinaus zeigten diese *Fgf-23*^{-/-}-Mäuse eine ausgeprägte Weichteilkalzifizierung. Zum weiteren Verständnis der Rolle von FGF-23 für die Phosphat-Homöostase und Skelettmineralisierung, kreuzten wir *Fgf-23*^{-/-}-Tiere mit *Hyp*-Mäusen, dem murinen Äquivalent der humanen XLH. Interessanterweise waren die männlichen *Hyp*-Mäuse, denen zusätzlich beide FGF-23-Allele fehlten, bezüglich Serumphosphat und Skelettveränderungen nicht von *Fgf-23*^{-/-} zu unterscheiden. Daraus schließt man, dass *FGF-23 Phex* (einem phosphatregulierenden Gen mit Homologien zu Endopeptidasen auf dem X-Chromosom) nachgeordnet ist.

Um die Rolle des Vitamin-D-Einflusses bei der FGF-23-Signalübertragung zu untersuchen, verpaarten wir *Fgf-23*^{-/-}-Mäuse mit Mäusen, die einen nicht funktionierenden Vitamin-D-Rezeptor besitzen (VDR-Mutanten). Um einen sekundären Hyperparathyreoidismus zu verhindern, wurden alle Tiere auf einer mit Kalzium, Phosphor und Laktose angereicherte Diät gehalten. In Übereinstimmung mit früheren Daten zeigten *Fgf-23*^{-/-}-Mäuse Hyperkalzämie, Hyperphosphatämie, Wachstumsretardierung, ektopische Kalzifizierung, ausgeprägte Osteoidose, Hautatrophie und renale Dysfunktion. Ergänzend stellten wir bei *Fgf-23*^{-/-}-Mäusen eine Hypoglykämie fest, mit deutlich erhöhter peripherer Insulin-Sensitivität und erhöhter subkutaner Glukosetoleranz, aber normaler renaler Expression des den Alterungs-

prozess beeinflussenden Hormons *Klotho*. Obgleich VDR- und Doppelmutanten auf der Sonderdiät immer noch mäßig erhöhte Parathormon-Spiegel und eine geringere Knochendichte im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen aufwiesen, hatten die Doppelmutanten ein normales Körpergewicht, waren normokalzämisch und -phosphatämisch, und zeigten keine ektopische Kalzifikation und renale Dysfunktion. Der fehlende Vitamin-D-Übertragungsweg bei den Doppelmutanten normalisierte zusätzlich die subkutanen Glukosetoleranz-Tests und das Ansprechverhalten auf Insulin. Zusammengefasst lässt sich aus unseren Ergebnissen schließen, dass die Veränderungen im Mineral- und Kohlehydratstoffwechsel von *Fgf-23*^{-/-}-Mäusen einen intakten Vitamin-D-Signalübertragungsweg voraussetzen.

7 Summary

Interaction between fibroblast growth factor-23 and the vitamin D hormone system

Fibroblast growth factor-23 (FGF-23), a molecule that is mutated in patients with autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR), appears to be involved in the regulation of phosphate homeostasis. Although increased levels of circulating FGF-23 were detected in patients with different phosphate-wasting disorders, it is not yet clear whether FGF-23 is directly responsible for the abnormal regulation of mineral ion homeostasis and consequently bone development. To explore these questions further, we generated a mouse model in which the entire *Fgf-23* gene was replaced with the *lacZ* gene. *Fgf-23* null (*Fgf-23*^{-/-}) mice showed signs of growth retardation, developed severe hyperphosphatemia with elevated serum 1,25(OH)₂D₃ levels, and died by 13 weeks of age. Hyperphosphatemia in *Fgf-23*^{-/-} mice was accompanied by skeletal abnormalities, as demonstrated by histological, molecular, and morphometric analyses. *Fgf-23*^{-/-} mice had decreased bone mineral density of the limbs due to an accumulation of unmineralized osteoid leading to marked limb deformities. Moreover, *Fgf-23*^{-/-} mice showed excessive mineralization in soft tissues. To further expand our understanding regarding the role of *Fgf-23* in phosphate homeostasis and skeletal mineralization, we crossed *Fgf-23*^{-/-} animals with *Hyp* mice, the murine equivalent of XLH. Interestingly, *Hyp* males lacking both *Fgf-23* alleles were indistinguishable from *Fgf-23*^{-/-} mice, both in terms of serum phosphate levels and skeletal changes, suggesting that *Fgf-23* is downstream of the phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome (*Phex*).

To explore further the role of the vitamin D axis for FGF-23 signaling, we mated *Fgf-23* deficient mice and vitamin D receptor (VDR) mutant mice with a non-functioning VDR. To prevent secondary hyperparathyroidism in VDR and compound mutant mice, all mice were kept on a rescue diet enriched with calcium, phosphorus, and lactose. In analogy to previous findings, *Fgf-23*^{-/-} animals showed hypercalcemia, hyperphosphatemia, growth retardation, ectopic calcifications, severe osteoidosis, skin atrophy, and renal dysfunction. In addition, here we describe that *Fgf-23*^{-/-} mice are hypoglycemic, and have profoundly increased peripheral insulin sensitivity and improved subcutaneous glucose tolerance, but normal renal expression of the aging suppressor gene *Klotho*. Although VDR and double mutants on the rescue diet still had moderately elevated parathyroid hormone serum levels and lower bone mineral

density compared to wild-type mice, double mutant mice had normal body weight, were normocalcemic and normophosphatemic, and ectopic calcifications as well as renal dysfunction were absent. Ablation of vitamin D signaling in compound mutants also normalized subcutaneous glucose tolerance tests and insulin secretory response. In conclusion, our results indicate that the alterations in mineral and carbohydrate metabolism present in *Fgf-23*^{-/-} mice require an intact vitamin D signaling pathway.

8 Literaturverzeichnis

- Abel van M, Hoenderop JG, Kemp van der AW, Leeuwen van JP, Bindels RJ, 2003: Regulation of the epithelial Ca²⁺ channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 285, G78-G85.
- ADHR Consortium, 2000: Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat Genet.* 26 (3), 34534-8.
- Bai L, Collins JF, Ghishan FK, 2000: Cloning and characterization of a type III Na-dependent phosphate cotransporter from mouse intestine. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279 (4), C1135-C1143.
- Bai X, Miao D, Li J, Goltzman D, Karaplis AC, 2004: Transgenic mice overexpressing human fibroblast growth factor 23 (R176Q) delineate a putative role for parathyroid hormone in renal phosphate wasting disorders. *Endocrinology.* 145 (11), 5269-5279.
- Bai XY, Miao D, Goltzman D, Karaplis AC. 2003: The autosomal dominant hypophosphatemic rickets R176Q mutation in fibroblast growth factor 23 resists proteolytic cleavage and enhances in vivo biological potency. *J Biol Chem.* 278 (11), 9843-9849.
- Baroncelli GI, Bertelloni S, Sodini F, Galli L, Vanacore T, Fiore L, Saggese G, 2004: Genetic advances, biochemical and clinical features and critical approach to treatment of patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Pediatr Endocrinol Rev.* 1 (4), 361-379.
- Beck I, Karaplis AC, Amizuka N, Hewson AS, Ozawa H, Tenenhouse HS, 1998: Targeted inactivation of Npt 2 in mice leads to severe renal wasting, hypercalciuria and skeletal abnormalities. *Proc Natl Acad Sci. USA* 95, 5372-5377.
- Beck L, Soumounou Y, Martel J, Krishnamurthy G, Gauthier C, Goodyer CG, Tenenhouse HS, 1997: Pex/PEX tissue distribution and evidence for a deletion in the 3' region of the Pex gene in X-linked hypophosphatemic mice. *J Clin Invest.* 99 (6), 1200-1209.
- Berndt TJ, Schiavi, SC, Kumar R, 2005: "Phosphatonins and the regulation of phosphorus homeostasis. *Am J Physiol.* 289 (6), F 1170-82 Review.

- Bouillon R, Van Cromphaut S, Carmeliet G, 2003: Intestinal calcium absorption: Molecular vitamin D mediated mechanisms. *J Cell Biochem.* 127,332-339.
- Bowe AE, Finnegan R, Jan de Beur SM, Cho J, Levine MA, Kumar R, Schiavi SC, 2001: FGF-23 inhibits renal tubular phosphate transport and is a PHEX substrate. *Biochem Biophys Res Commun.* 284 (4), 9779-81.
- Boyan BD, Dean DD, Sylvia VL, Schwartz Z, 2003: Steroid hormone action in musculoskeletal cells involves membrane receptor and nuclear receptor mechanisms. *Connect Tissue Res.* 44 *Suppl.*, 130-135.
- Breves G and Schröder B, 1991: Comparative aspects of gastrointestinal phosphorus metabolism. *Nutr Res Rev.* 4, 125-140.
- Breves G, Holler H, Packheiser P, Gabel G, Martens H, 1988: Flux of inorganic phosphate across the sheep rumen wall in vivo and in vitro. *Q J Exp Physiol.* 73 (3), 343-351.
- Briese S, Wiesner S, Will JC, Lembcke A, Opgen-Rhein B, Nissel R, Wernecke KD, Andreae J, Haffner D, Querfeld U, 2006: Arterial and cardiac disease in young adults with childhood-onset end-stage renal disease-impact of calcium and vitamin D therapy. *Nephrol Dial Transplant.* 21(7), 1906-14.
- Brown AJ, Dusso A, and Slatopolsky E, 1999: Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol.* 277, F157-F175.
- Brown MS, Goldstein JL, 1986: A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 232 (4746), 34-47.
- Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW, Topala CN, Bindels RJ, Hoenderop JG, 2005: The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science.* 310 (5747), 490-3.
- Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, Russel DW, 2004: Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101, 7711-7715.
- Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF, 2004: Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and betacell dysfunction. *Am J Clin Nutr.* 79 (5), 820-5
- Cross HS, Debiec H, Peterlik M, 1990: Mechanism and regulation of intestinal phosphate absorption. *Miner Electrolyte Metab.* 16, 115-124.

- Dardenne O, Prud'homme J, Arabian A, Glorieux FH, St-Arnaud R, 2001: Targeted inactivation of the 25-hydroxyvitamin D(3)-1(alpha)-hydroxylase gene (CYP27B1) creates an animal model of pseudovitamin D-deficiency rickets. *Endocrinology*. 142 (7), 3135-3141.
- Dardenne O, Prud'homme J, Glorieux FH, St-Arnaud R, 2004: Rescue of the phenotype of CYP27B1 (1alpha-hydroxylase)-deficient mice. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 89-90 (1-5), 327-30.
- De Beur SM, Finnegan RB, Vassiliadis J, Cook B, Barberio D, Estes S, Manavalan P, Petroziello J, Madden SL, Cho JY, Kumar R, Levine MA, Schiavi SC, 2002: Tumors associated with oncogenic osteomalacia express genes important in bone and mineral metabolism. *J Bone Miner Res*. 17 (6), 1102-1110.
- Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E, 2005: Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 289, F8-F28.
- Ebert R, Schutze N, Adamski J, Jakob F, 2006: Vitamin D signaling is modulated on multiple levels in health and disease. *Mol Cell Endocrinol*, *Epub ahead of print*.
- Erben RG, Mayer D, Weber K, Jonsson K, Juppner H, Lanske B, 2005: Overexpression of human PHEX under the human beta-actin promoter does not fully rescue the Hyp mouse phenotype. *J Bone Miner Res*. 20 (7), 1149-60.
- Erben RG, Soegiarto DW, Weber K, Zeitz U, Lieberherr M, Gniadecki R, Moller G, Adamski J, Balling R, 2002: Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D. *Mol Endocrinol*. 16, 1524-1537.
- Evans RM, 1988: The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.
- Ferrari SL, Bonjour JP, Rizzoli R, 2005: Fibroblast growth factor-23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab*. 90 (3), 1519-1524.
- Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Martin CJ, Murray DC, Barre PE, 1995: Clinical and echocardiographic disease in patients starting end-stage renal disease therapy. *Kidney Int*. 47 (1), 186-92.
- Fraser D, Jones G, Kooh SW, 1987: Calcium and phosphate metabolism. In: *Fundamentals of clinical chemistry*. Hrsg: Tietz NW, Saunders WB. Philadelphia, 705-728.

- Fukagawa M, Kazama JJ, 2006: FGF23: its role in renal bone disease. *Pediatr Nephrol. Epub ahead of print.*
- Fukumoto S, 2005: Post-translational modification of Fibroblast Growth Factor 23. *Ther Apher Dial. 9 (4), 319-322.*
- Gaasbeek A, Meinders AE, 2005: Hypophosphatemia: an update on its etiology and treatment. *Am J Med. 118, 1094-1101.*
- Gliemann J, 1998: Receptors of the low density lipoprotein (LDL) receptor family in man. Multiple functions of the large family members via interaction with complex ligands, *Biol Chem. 379 (8-9), 951-964.*
- Harkness LS, Bonny AE, 2005: Calcium and vitamin D status in the adolescent: key roles for bone, body weight, glucose tolerance, and estrogen biosynthesis. *J Pediatr Adolesc Gynecol. 18 (5), 305-11.*
- Hausler MR, Whitfield GK, Hausler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW, 1998: The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res. 13, 325-349.*
- Hernando N, Biber J, Forster I, Murer H, 2005: Recent Advances in renal phosphate transport. *Ther Apher Dial. 9, 323-327.*
- Hewison M, Zehnder D, Chakraverty R, Adams JS, 2004: Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 α -hydroxylase. *Mol Cell Endocrinol. 215, 31-38.*
- Hilfiker H, Hattenhauer O, Traebert M, Forster I, Murer H, Biber J, 1998: Characterization of murine type II sodium-phosphate cotransporter expressed in mammalian small intestine. *Proc Natl Acad Sci. 95, 14564-14569.*
- Hilpert J, Nykjaer A, Jacobsen C, Wallukat G, Nielsen R, Moestrup SK, Haller H, Luft FC, Christensen EI, Willnow TE, 1999: Megalin antagonizes activation of the parathyroid hormone receptor. *J Biol Chem. 274 (9), 5620-5625.*
- Hoenderop JG, Muller D, Van Der Kemp AW, Hartog A, Suzuki M, Ishibashi K, Imai M, Sweep F, Willems PH, Van Os CH, Bindels RJ, 2001: Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. *Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. 12 (7), 1342-1349.*
- Holick MF, 1981: The cutaneous photosynthesis of previtamin D₃: a unique photoendocrine system. *J Invest Dermatol. 77, 51-58.*

- Holick, MF, 2005: The vitamin D epidemic and its health consequences. *J Nutr.* 135 (11), 2739S-2748S.
- Hruska KA, Rifas L, Cheng SL, Gupta A, Halstead L, Avioli L, 1995: X-linked hypophosphatemic rickets and the murine Hyp homologue. *Am J Physiol.* 268 (3 Pt 2), F357-362.
- Hsieh JC, Sisk JM, Jurutka PW, Haussler CA, Slater SA, Haussler MR, Thompson CC, 2003 Physical and functional interaction between the vitamin D receptor and hairless corepressor, two proteins required for hair cycling. *J Biol Chem.* 278 (40), 38665-74.
- Imura A, Iwano A, Tohyama O, Tsuji Y, Nozaki K, Hashimoto N, Fujimori T, Nabeshima Y, 2004: Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS Lett.* 565 (1-3), 143-147.
- Karp CM, Pan H, Zhang M, Buckley DJ, Schuler LA, Buckley AR, 2004: Identification of HRPAP20: a novel phosphoprotein that enhances growth and survival in hormone-responsive tumor cells. *Cancer Res.* 64 (3), 1016-1025.
- Katai K, Miyamoto S, Kishida S, Segawa H, Nii T, Tanaka H, Tani Y, Arai H, Tatsumi S, Morita K, Taketani Y, Takeda E, 1999: Regulation of intestinal Na⁺-dependent phosphate co-transporters by a low-phosphate diet and 1,25 dihydroxyvitamin D₃. *Biochem J.* 343, 705-712.
- Kawaguchi H, Manabe N, Miyaura C, Chikuda H, Nakamura K, Kuro-o M, 1999: Independent impairment of osteoblast and osteoclast differentiation in klotho mouse exhibiting low-turnover osteopenia. *J Clin Invest.* 104 (3), 229-237.
- Knochel JP, 1985: Deranged phosphorus metabolism. In: *The Kidney: Physiology and Pathophysiology.* Hrsg.: Seldin DW, Giebisch G. Raven Press, New York, 1397-1416.
- Knox FG, Haramati A, 1985: Renal regulation of phosphate excretion. In *The Kidney: Physiology and Pathophysiology.* Hrsg.: Seldin DW, Giebisch G. Raven Press, New York, 1381-1396.
- Kraft W, Dürr UM, 1999: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.* 5.Auflage, Schattauer, Stuttgart. 256f.

- Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI, 1997: Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 390 (6655), 45-51.
- Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu MC, Moe OW, Kuro-o M, 2006: Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem*. 281 (10), 6120-6123.
- Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP, Kuro-o M, 2005: Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science*. 309 (5742), 1829-1833.
- Larsson T, Marsell R, Schipani E, Ohlsson C, Ljunggren O, Tenenhouse HS, Juppner H, Jonsson KB, 2004: Transgenic mice expressing fibroblast growth factor 23 under the control of the alpha1(I) collagen promoter exhibit growth retardation, osteomalacia, and disturbed phosphate homeostasis. *Endocrinology*. 145 (7), 3087-3094.
- Larsson T, Nisbeth U, Ljunggren O, Juppner H, Jonsson KB, 2003: Circulating concentration of FGF-23 increases as renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers. *Kidney Int*. 64 (6), 2272-2279.
- Levi M, 2001: Post-transplant hypophosphatemia. *Kidney Int*. 59, 2377-2387.
- Lewin E, Olgaard K, 2006: Klotho, an important new factor for the activity of Ca²⁺ channels, connecting calcium homeostasis, ageing and uraemia. *Nephrol Dial Transplant*. *Epub ahead of print*.
- Li SA, Watanabe M, Yamada H, Nagai A, Kinuta M, Takei K, 2004: Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice. *Cell Struct Funct*. 29 (4), 91-99.
- Li YC, Amling M, Pirro AE, Priemel M, Meuse J, Baron R, Delling G, Demay MB, 1998: Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice. *Endocrinology* 139, 4391-4396.

- Li YC, Pirro AE, Amling M, Delling G, Baron R, Bronson R, Demay MB, 1997: Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 94 (18), 9831-9835.
- Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP, 1996: Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev.* 10 (2), 1421-53.
- Liu S, Guo R, Simpson LG, Xiao ZS, Burnham CE, Quarles LD, 2003: Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX. *J Biol Chem.* 278 (39), 37419-37426.
- Ma Y, Khalifa B, Yee YK, Lu J, Memezawa A, Savkur RS, Yamamoto Y, Chintalacharuvu SR, Yamaoka K, Stayrook KR, Bramlett KS, Zeng QQ, Chandrasekhar S, Yu XP, Linebarger JH, Iturria SJ, Burris TP, Kato S, Chin WW, Nagpal S, 2006: Identification and characterization of noncalcemic, tissue-selective, nonsecosteroidal vitamin D receptor modulators. *J Clin Invest*, *Epub ahead of print.*
- Maestro B, Davila N, Carranza MC, Calle C, 2003: Identification of a Vitamin D response element in the human insulin-like receptor gene promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 84 (2-3), 223-30.
- Malloy PJ, Feldman D 2003: Hereditary 1,25-Dihydroxyvitamin D-resistant rickets. *Endocr Dev.* 6, 175-199.
- Mathieu C, Adorini L, 2002: The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med.* 8 (4), 179-179.
- Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y, 1998: Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 242 (3), 626-630.
- Mellanby RJ, Mee AP, Berry JL, Herrtage ME, 2005: Hypercalcaemia in two dogs caused by excessive dietary supplementation of vitamin D. *J Small Anim Pract.* 46 (7), 334-338.
- Mello JR, 2003: Calcinosis--calcinogenic plants. *Toxicon.* 41 (1), 1-12.

- Miller DW, Slovis CM, 2000: Hypophosphatemia in the emergency department therapeutics. *Am J Emerg Med.* 18, 457-461.
- Miyamoto K, Ito M, Kuwahata M, Kato S, Segawa H, 2005: Inhibition of intestinal sodium-dependent inorganic phosphate transport by fibroblast growth factor 23. *Ther Apher Dial.* 9, 331-335.
- Mizwicki MT, Bishop JE, Olivera CJ, Huhtakangas J, Norman AW, 2004: Evidence that annexin II is not a putative membrane receptor for 1 α ,25(OH) $_2$ -vitamin D $_3$. *J Cell Biochem.* 91, 852-863.
- Morishita K, Shirai A, Kubota M, Katakura Y, Nabeshima Y, Takeshige K, Kamiya T, 2001: The progression of aging in klotho mutant mice can be modified by dietary phosphorus and zinc. *J Nutr.* 131 (12), 3182-3188.
- Murer H, Forster I, Hernando N et al., 1999: Post-transcriptional regulation of the proximal tubule NaPi-II transporter in response to PTH and dietary P(i). *Am J Physiol.* 27, F676-F684.
- Murer H, Hernando N, Forster I, Biber J, 2000: Proximal tubular phosphate reabsorption: molecular mechanism. *Physiol Rev.* 80, 1373-1409.
- Nabeshima Y, 2002: Klotho: a fundamental regulator of aging. *Ageing Res Rev.* 1(4), 627-638.
- Najada AS, Habashneh MS, Khader M, 2004: The frequency of nutritional rickets among hospitalized infants and its relation to respiratory diseases. *J Trop Pediatr.* 50 (6), 364-368.
- Negri AL, 2005: The klotho gene: a gene predominantly expressed in the kidney is a fundamental regulator of aging and calcium/phosphorus metabolism. *J Nephrol.* 18 (6), 654-658.
- Nelson AE, Bligh RC, Mirams M, Gill A, Au A, Clarkson A, Juppner H, Ruff S, Stalley P, Scolyer RA, Robinson BG, Mason RS, Bligh PC, 2003: Clinical case seminar: Fibroblast growth factor 23: a new clinical marker for oncogenic osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab.* 88 (9), 4088-4094.
- Nemere I, Farach-Carson MC, Rohe B, Sterling TM, Norman AW, Boyan BD, Safford SE, 2004: Ribozyme knockdown functionally links a 1,25(OH) $_2$ D $_3$ membrane binding protein (1,25D $_3$ -MARRS) and phosphate uptake in intestinal cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101, 7392-7397.

- Norman AW, Okamura WH, Bishop JE, Henry HL, 2002: Update on biological actions of 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ (rapid effects) and 24R,25(OH)₂-vitamin D₃. *Mol Cell Endocrinol.* 197 (1-2), 1-13.
- Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J, Melsen F, Christensen EI, Willnow TE, 1999: An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D₃. *Cell.* 96(4), 507-515.
- Panda DK, Miao D, Bolivar I, Li J, Huo R, Hendy GN, Goltzman D, 2004: Inactivation of the 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis. *J Biol Chem.* 279, 16754-16766.
- Peng JB, Chen XZ, Berger UV, Weremowicz S, Morton CC, Vassilev PM, Brown EM, Hediger MA, 2000: Human calcium transport protein CaT1. *Biochem Biophys Res Commun.* 278 (2), 326-332.
- Pittas AG, Dawson-Hughes B, Li T, Van Dam RM, Willett WC, Manson JE, Hu FB, 2006: Vitamin D and calcium intake in relation to type 2 diabetes in women. *Diabetes Care.* 29 (3), 650-656.
- Portale AA, Halloran BP, Morris RC jr., 1987: Dietary intake of phosphate modulates the circadian rhythm in serum concentration of phosphorus: implications for the renal production of 1,25 dihydroxyvitamin D. *J Clin Invest.* 80, 1147-1154.
- Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A, 2000: Fibroblast growth factors, their receptors and signalling. *Endocr Relat Cancer.* 7 (3), 1651-97.
- Razzaque MS, Sitara D, Taguchi T, St-Arnaud R, Lanske B, 2006: Premature aging-like phenotype in fibroblast growth factor 23 null mice is a vitamin D-mediated process. *FASEB J.* *Epub ahead of print.*
- Reinhardt T.A, Horst RL, Goff JP, 1988: Calcium, phosphorus and magnesium homeostasis in ruminants. *Vet Clin North Am: Food Anim Practice.* 4, 331-350.
- Reis AF, Hauache OM, Velho G, 2005: Vitamin D endocrine system and the genetic susceptibility to diabetes, obesity and vascular disease. A review of evidence. *Diabetes Metab.* (4 Pt 1), 318-325.
- Riminucci M, Collins MT, Fedarko NS, Cherman N, Corsi A, White KE, Waguespack S, Gupta A, Hannon T, Econs MJ, Bianco P, Gehron Robey P, 2003: FGF-23 in

- fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting. *J Clin Invest.* 112 (5), 683-692.
- Saito H, Maeda A, Ohtomo S, Hirata M, Kusano K, Kato S, Ogata E, Segawa H, Miyamoto K, Fukushima N, 2005: Circulating FGF-23 is regulated by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and phosphorus in vivo. *J Biol Chem.* 280 (4), 2543-2549.
- Sauer B, Ruwisch L, Kleuser B, 2003: Antiapoptotic action of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 in primary human melanocytes. *Melanoma Res.* 13 (4), 339-347.
- Schiavi SC, Kumar R, 2004: The phosphatonin pathway: New insights in phosphate homeostasis. *Kidney International.* 65, 1-14.
- Scriver CR, Tenenhouse HS, 1992: X-linked hypophosphataemia: a homologous phenotype in humans and mice with unusual organ-specific gene dosage. *J Inher Metab Dis.* 15 (4), 610-624.
- Segawa H, Kawakami E, Kaneko I, Kuwahata M, Ito M, Kusano K, Saito H, Fukushima N, Miyamoto K, 2003: Effect of hydrolysis-resistant FGF23-R179Q on dietary phosphate regulation of the renal type-II Na/Pi transporter. *Pflugers Arch.* 446 (5), 585-592.
- Sergeev, IN, 2004: Calcium as a mediator of 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced apoptosis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 89-90 (1-5), 419-425.
- Shiber JR, Mattu A, 2002: Serum phosphate abnormalities in the emergency department. *J Emerg Med.* 23, 395-400.
- Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukumoto S, Yamashita T, 2004: FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res.* 19 (3), 429-435.
- Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Tomizuka K, Yamashita T, 2004: Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest.* 113 (4), 561-568.
- Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T, 2001: Cloning and characterization of FGF23 as a

- causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 98 (11), 6500-6555.
- Shimada T, Muto T, Urakawa I, Yoneya T, Yamazaki Y, Okawa K, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T, 2002: Mutant FGF-23 responsible for autosomal dominant hypophosphatemic rickets is resistant to proteolytic cleavage and causes hypophosphatemia in vivo. *Endocrinology.* 143 (8), 3179-3182.
- Shimada T, Urakawa I, Yamazaki Y, Hasegawa H, Hino R, Yoneya T, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T, 2004: FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa. *Biochem Biophys Res Commun.* 314 (2), 409-414.
- Shimada T, Yamazaki Y, Takahashi M, Hasegawa H, Urakawa I, Oshima T, Ono K, Kakitani M, Tomizuka K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T, 2005: Vitamin D receptor-independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol.* 289 (5), F1088-1095.
- Shiraki-Iida T, Aizawa H, Matsumura Y, Sekine S, Iida A, Anazawa H, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y, 1998: Structure of the mouse *klotho* gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS Lett.* 424 (1-2), 6-10.
- Sitara D, Razzaque MS, Hesse M, Yoganathan S, Taguchi T, Erben RG, Juppner H, Lanske B, 2004: Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23 results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in *Phex*-deficient mice. *Matrix Biol.* 23 (7), 421-432.
- St-Arnaud R, Arabian A, Travers R, Barletta F, Raval-Pandya M, Chapin K, Depovere J, Mathieu C, Christakos S, Demay MB, Glorieux FH, 2000: Deficient mineralization of intramembranous bone in vitamin D-24-hydroxylase-ablated mice is due to elevated 1,25-dihydroxyvitamin D and not to the absence of 24,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology.* 141 (7), 2658-2666.
- Subramanian R, Khardori R, 2000: Severe hypophosphatemia. Pathophysiologic implications, clinical presentations, a treatment. *Medicine (Baltimore).* 79, 1-8.
- Tenhouse HS, 1999: X-linked hypophosphataemia: a homologous disorder in humans and mice. *Nephrol Dial Transplant.* 14 (2), 333-341.

- Thatte L, Oster JR, Singer I, Bourgoignie JJ, Fishman LM, Roos BA, 1995: Review of the literature: severe hyperphosphatemia. *Am J Med Science*. 310, 167-174.
- The HYP Consortium, 1995:A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Nat Genet*. 11 (2), 130-136.
- Tohyama O, Imura A, Iwano A, Freund JN, Henrissat B, Fujimori T, Nabeshima Y, 2004: Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides. *J Biol Chem*. 279 (11), 9777-9784.
- Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA, Herz J, 1999: Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell*. 97 (6), 689-701.
- Tsujikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T, Fukuda K, Nabeshima Y, 2005: Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol Endocrinol*. 17 (12), 2393-2403.
- Turner AJ, Tazawa K 1997: Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J*. 11 (5), 355-364.
- Weber K, Erben RG, Rump A, Adamski J, 2001: Gene structure and regulation of the murine epithelial calcium channels ECaC1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 289 (5), 1287-1294.
- Weber TJ, Liu S, Indridason OS, Quarles LD, 2003: Serum FGF23 levels in normal and disordered phosphorus homeostasis. *J Bone Miner Res*. 18 (7), 1227-1234.
- Weisinger JR, Bellorin-Font E, 1998: Magnesium and phosphorus. *Lancet*. 352, 391-396.
- Wharton B, Bishop N, 2003: Rickets. *Lancet*. 362 (9393), 1389-400.
- White KE, Carn G, Lorenz-Depiereux B, Benet-Pages A, Strom TM, Econs MJ, 2001: Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF-23. *Kidney Int*. 60 (6), 2079-2086.

- White KE, Larsson TM, Econs MJ, 2006: The Roles of Specific Genes Implicated as Circulating Factors Involved in Normal and Disordered Phosphate Homeostasis: Frp-4, MEPE, and FGF23. *Endocr Rev. Epub ahead of print.*
- Whyte MP, Schranck FW, Armamento-Villareal R, 1996: X-linked hypophosphatemia: a search for gender, race, anticipation, or parent of origin effects on disease expression in children. *J Clin Endocrinol Metab.* 81 (11), 4075-4080.
- Winters RW, Graham JB, Williams TF, McFalls VW, Burnett CH, 1991. A genetic study of familial hypophosphatemia and vitamin D resistant rickets with a review of the literature, 1958. *Medicine (Baltimore)* 70 (3) 215-217
- Xie Z, Chang S, Oda Y, Bikle DD, 2006: Hairless suppresses vitamin D receptor transactivation in human keratinocytes. *Endocrinology.* 147 (1), 314-323.
- Yamashita T, 2005: Structural and biochemical properties of fibroblast growth factor 23. *Ther Apher Dial.* 9 (4), 313-318.
- Yoshida T, Fujimori T, Nabeshima Y, 2002: Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1 α -hydroxylase gene. *Endocrinology.* 143 (2), 683-689.
- Yu X, Sabbagh Y, Davis SI, Demay MB, White KE, 2005: Genetic dissection of phosphate- and vitamin D-mediated regulation of circulating Fgf23 concentrations. *Bone.* 36 (6), 971-977.
- Zeitz U, Weber K, Soegiarto Desi W, Wolf E, Balling R, Erben RG: Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *FASEB J.* 17 (3), 509-11
- Zhu X, Komiya H, Chirino A, Faham S, Fox GM, Arakawa T, Hsu BT, Rees DC, 1991: Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science.* 251 (4989), 90-93.
- Zhuang L, Peng JB, Tou L, Takanaga H, Adam RM, Hediger MA, Freeman MR, 2002: Calcium-selective ion channel, CaT1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Lab Invest.* 82 (12), 1755-1764.

Lebenslauf

**Martina Ulrike Lehnert,
geb. Hesse**

Geburtsdatum	07.09.1977
Geburtsort	Düren
Eltern	Dr. rer. nat. Ulrich Hesse Hildegard Hesse, geb. Dautzenberg
Familienstand	Verheiratet mit Robert Lehnert

Schulbildung

1984 – 1988	Besuch der Grundschule in Obermaubach
1988 – 1997	Besuch des Franziskus-Gymnasiums in Vossenack

Studium

1997-2003	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
23.08.2003	Studienabschluss
23.01.2004	Approbation
Seit November 2003	Anfertigung einer Dissertation am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der LMU München
Seit Februar 2005	Fortsetzung der Dissertation als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Pathophysiologie an der Veterinärmedizinischen Universität Wien
Seit August 2006	Assistenzärztin in der Tierärztlichen Klinik Dr. Staudacher in Aachen

Danksagung

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. Dr. Reinhold G. Erben für die Überlassung des interessanten Themas und die gute Betreuung während der gesamten Arbeit.

Ein großes Dankeschön richte ich an die gesamte Arbeitsgruppe für die tolle Zusammenarbeit, vor allem natürlich an Claudi, die im Labor und auch sonst immer viel Zeit und Geduld für mich hatte; an Katharina, Susanna und Kathrin, für ihre Hilfe nicht nur bei meinen zahlreichen Versuchsenden. Ohne sie und auch die anderen Doktoranden hätte ich mich in Wien wohl ziemlich verloren gefühlt. Nicht zu vergessen der „Münchner Teil“ der AG Erben, vor allem Dr. Karin Weber und Siglinde Hirmer, für die Einarbeitung und Hilfe im Labor, bei Rechenproblemen und für die vielen Proben-Transporte in die Innere. Natürlich auch an Idi für die Einweisung ins Mäuse-Handling und die lustige Zeit im Plüschlabor.

Für ihre vielfältige Hilfe bei Statistik, Physik, Excel und Verwaltung danke ich auch Frau Prof. Dipl. Ing. Dr. Monika Skalicky ganz herzlich.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Dr. Leo Fröhlich für die tatkräftige (und zeitintensive) Hilfe bei RT-PCR, Northern-Blot und Co, die ohne einen Biologen bzw. Genetiker wohl nie so gut funktioniert hätten...

Außerdem bedanke ich mich bei meiner Familie, die mir das Studium ermöglicht hat und auf deren Unterstützung ich immer zählen kann!

Ein ganz besonders wichtiger Dank gilt meinem Freund Robert, der mir bei allen Problemen zur Seite stand und immer für mich da ist.

Und natürlich danke ich Onkel Gottfried für seine Lebensweisheiten, die mich auf die weiteren Höhen und Tiefen des Lebens vorbereiten.