Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand:
Univ.-Prof. Dr. H.-J. Gabius

Angefertigt unter der Leitung von
Priv.-Doz. Dr. Dr. R. G. Erben

Die Rolle des PHEX-Gens in der Phosphathomöostase

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

Von
Dagmar Mayer
aus Gräfelfing

München 2004

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Priv.-Doz. Dr. Dr. R. G. Erben
Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. H.-Ch. Siebert

Tag der Promotion: 23. Juli 2004

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen IV

1 Einleitung 1

2 Literaturübersicht 3

2.1 **Phosphathomöostase** 3
2.1.1 Phosphatverteilung 3
2.1.1.1 Organisches Phosphat 3
2.1.1.2 Anorganisches Phosphat 4
2.1.2 Die Regulation der Phosphathomöostase 4
2.1.2.1 Phosphatabsorption im Gastrointestinaltrakt 5
2.1.2.2 Rückresorption und Ausscheidung von Phosphat in der Niere 6
2.1.2.3 Biochemie des Phosphattransports in der Niere 7
2.1.3 Hormonelle Regelung des Phosphattransports 8
2.1.3.1 Effekte von PTH an der Niere 9
2.1.4 Phosphatmetabolismus bei Tieren 9
2.1.5 Hypophosphatämie 10
2.1.5.1 Hypophosphatämie in der Tiermedizin 10

2.2 **Hereditäre Krankheiten mit Hypophosphatämie** 11
2.2.1 X-chromosomale hypophosphatämische Rachitis (XLH) 12
2.2.1.1 Klinisches Bild 12
2.2.1.2 Genetik 13
2.2.1.3 PHEX-Expression und Mutationen 13
2.2.1.4 Pathophysiologie von XLH 14
2.2.1.4.1 Murines Gegenstück zu XLH – die *Hyp*-Maus 14
2.2.1.4.2 Renale Tubulusanomalie 14
2.2.1.4.3 Renaler Vitamin D-Metabolismus 15
2.2.1.4.4 Nachweis eines humoralen Faktors 16
2.2.1.4.5 Knochendefekte 17
2.2.2 Wie führt die Inaktivierung von PHEX/*Phex* zur Erkrankung? 17
2.2.3 Autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis (ADHR) 19
2.2.4 Tumor-induzierte Osteomalazie (TIO) 19

2.2.5 Erklärt ein gemeinsames Modell die Pathogenese von ADHR, XLH und TIO? ... 20

2.3 **Ziel der vorliegenden Arbeit** ... 22

3 **Material und Methoden** ... 23

3.1 **Tiermaterial** ... 23
3.1.1 Generierung der PHEX-transgenen Mäuse ... 23
3.1.2 Genotypisierung der PHEX-transgenen Mäuse ... 24
3.1.2.1 Isolierung genomischer DNA ... 24
3.1.2.2 Genotypisierung mittels PCR ... 25
3.1.3 Genotypisierung der *Hyp*-Mäuse ... 26
3.1.4 Expressionsanalyse des PHEX-Transgens mit RT-PCR ... 27
3.1.5 Expressionsanalyse mit Northern Blot-Analyse ... 28
3.1.6 Tierhaltung ... 28

3.2 **Versuchsdurchführung** ... 29

3.3 **Biochemische Parameter des Knochenstoffwechsels** ... 30
3.3.1 Blutparameter ... 30
3.3.2 Urinparameter ... 30

3.4 **Histologische Aufarbeitung des Knochengewebes** ... 31
3.4.1 Histologie ... 31
3.4.1.1 Präparation, Fixierung und Entwässerung der Knochen ... 31
3.4.1.2 Infiltration und Einbettung ... 32
3.4.1.3 Herstellung von Knochenschnitten ... 33
3.4.1.4 Färbung der Knochenschnitte ... 33

3.5 **Knochenmineraldichte-Messung** ... 34

3.6 **Statistik** ... 35

4 **Ergebnisse** ... 36

4.1 **Faktorielle Varianzanalyse** ... 36

4.2 **Expression von humanem PHEX in transgenen Mäusen** ... 36

4.3 **Phänotyp der PHEX-tg-Mäuse** 38

4.4 **Phänotyp der *Hyp*-Mäuse** 38
4.4.1 Phänotypische Veränderungen 38
4.4.2 Histologische Knochenuntersuchung 38
4.4.3 Knochenmineraldichte-Messung 41
4.4.4 Biochemische Parameter in Serum und Urin 41

4.5 **Phänotyp der *Hyp*/PHEX-tg-Mäuse** 45
4.5.1 Phänotypische Veränderungen 45
4.5.2 Histologische Knochenuntersuchung 45
4.5.3 Knochenmineraldichte-Messung 45
4.5.4 Biochemische Parameter in Serum und Urin 46

5 **Diskussion** 50

5.1 **Phänotyp der PHEX-tg Mäuse** 50

5.3 **Phänotyp der *Hyp*-Mäuse** 51

5.4 **Weitgehende Normalisierung des *Hyp*-Phänotyps bei *Hyp*/PHEX-tg-Mäusen** 52

5.5 **Ausblick** 55

6 **Zusammenfassung** 56

Summary 57

7 **Literaturverzeichnis** 58

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADHR	Autosomal dominant hypophosphatemic rickets
AP	Alkalische Phosphatase
APES	3-Aminopropyltriethoxy-Silan
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BMD	Knochenmineraldichte (bone mineral density)
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
Ca	Kalzium
cDNA	komplementäre DNA
CK	Kreatinkinase
Crea	Creatinin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPD	Deoxypyridinolin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Gramm
GOT	Glutamat-Ocalacetat-Transferase
HCl	Salzsäure
IU	international unit
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
M	molar
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minuten
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	millimolar
MMA	Methylmethacrylat
mRNA	messenger-RNA
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat

NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
pH	pondus Hydrogenii
PHEX	Phosphate regaulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome
pmol	Pikomol
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathyroid hormone related peptide
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Reverse Transkriptase
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat/EDTA
TE	Tris/EDTA
TIO	Tumor-induzierte Osteomalazie
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRCa	Tubuläre Reabsorption von Kalzium
TRP	Tubuläre Reabsorption von Phosphat
U	Einheit der enzymatischen Aktivität
UrCa	Kalzium, gemessen im Urin
UrCrea	Creatinin, gemessen im Urin
UrNa	Natrium, gemessen im Urin
V	Volt
WT	Wildtyp
XLH	X-linked hypophosphatemic rickets

1 Einleitung

Im Körper von Mensch und Tier spielt Phosphat eine lebenswichtige Rolle bei der Skelettentwicklung, im Mineralhaushalt sowie bei vielen unterschiedlichen Zellfunktionen im Intermediär-Stoffwechsel und bei Energie-Übertragungsprozessen. Des Weiteren stellt Phosphat einen essentiellen Bestandteil der Knochensubstanz, der Phospholipide von Zellmembranen und der Nukleinsäuren dar.
Von einer Hypophosphatämie beim Menschen und beim Kleintier spricht man bei Serum-Phosphatwerten unter 2.5 mg/dl. Ein chronischer Mangel an Phosphat führt zu Mineralisationsdefekten sowie zur Anhäufung von unmineralisiertem Osteoid. Dieses Krankheitsbild wird bei Mensch und Tier im Wachstum als Rachitis, nach Abschluss der Wachstumsphase als Osteomalazie bezeichnet. Beim Menschen tritt eine akute Hypophosphatämie auch im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsbildern, wie zum Beispiel Diabetes mellitus oder einer respiratorischen Alkalose auf. Auch eine Überfunktion der Nebenschilddrüsen (primärer Hyperparathyreoidismus) führt zum Auftreten einer Hypophosphatämie bei gleichzeitiger Hyperkalzämie. Bei tiermedizinischen Patienten in der Klein- und Großtierpraxis wird von Hypophosphatämie in Verbindung mit unterschiedlichen Krankheitsbildern berichtet. Hierbei wäre der Diabetes mellitus beim Hund (WILLARD et al., 1987) und der Katze (ADAMS et al., 1993), die hämolytische Anämie und die hypokalzämische Gebärparese beim Rind (OGAWA et al., 1989; GOFF, 2000) oder das chronische Nierenversagen beim Pferd (TENNANT et al., 1982) zu nennen. Für die Behandlung, aber auch die Diagnose von Krankheiten, die mit einer Störung im Phosphathaushalt einhergehen, ist es von großer Bedeutung, die physiologischen Regulationsmechanismen der Phosphathomöostase zu kennen.

Die Serum-Konzentration von Phosphat ist von der Nahrung, der intestinalen Absorption, der renalen Filtration und Reabsorption sowie von der Verteilung zwischen Intrazellulärraum und Knochenspeicher abhängig. Unter physiologischen Bedingungen wird die Phosphatkonzentration im Normalbereich (zwischen 2,5 und 4,5 mg/dl) gehalten. Die wichtigsten bekannten Hormone, die die Phosphathomöostase aufrechterhalten, sind das Parathormon (PTH) aus den Nebenschilddrüsen und Calcitriol ($1,25(OH_2)D_3$). Sie regulieren den Phosphathaushalt über Steuerung von intestinaler Absorption und renaler Reabsorption bzw. Exkretion (KUMAR, 1997; MURER et al., 2001). PTH hemmt direkt die Reabsorption von Phosphat in der Niere und fördert indirekt die intestinale Phosphat-Absorption über die Stimulierung der Calcitriol-Synthese. Calcitriol wiederum steigert die intestinale Absorption und renale Reabsorption von Phosphat. Die Niere stellt das wichtigste Regulationsorgan der Phosphathomöostase dar, wobei die Serum-Phosphatkonzentration über glomeruläre Filtration und vermehrte bzw. verminderte Reabsorption gesteuert wird (STOFF, 1982).

Neue Erkenntnisse über weitere Faktoren, die mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Regulation des Phosphathaushaltes beteiligt sind, kamen in jüngster Zeit aus der Forschung über Erkrankungen, deren gemeinsame charakteristischen Krankheitsmerkmale auf einen Defekt der renalen Phosphat-Reabsorption sowie des Vitamin D-Stoffwechsels zurückzuführen sind. Es handelt sich bei diesen um die X-chromosomal vererbte Hypophosphatämie (XLH), die autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis (ADHR) und die Tumor-induzierte Osteomalazie (TIO).
Untersuchungen dieser Krankheiten gaben mehr und mehr Anhaltspunkte dafür, dass zusätzlich zu Parathormon und Calcitriol noch andere Faktoren, so genannte „Phosphatonine“, den Phosphathaushalt beeinflussen. Es handelt sich um eine Gruppe von Faktoren, die zusätzlich zur Parathormon/Calcitriol-Regulation die Phosphatkonzentration direkt über eine verminderte renale Reabsorption und eine Unterdrückung der Calcitriol-Synthese reduzieren. In diesem Zusammenhang wurden neue Gene, PHEX (Phosphate-regulating gene with homomologies to endopeptidases on the X-chromosome) und FGF23 (Fibroblast growth factor 23), entdeckt, die bei der Aufrechterhaltung der Phosphathomöostase offensichtlich eine wichtige Rolle spielen (STREWLER, 2001; KUMAR, 2002; SCHIAVI und KUMAR, 2004).

In der vorliegenden Arbeit sollten die Pathomechanismen, die an der Entstehung der X-chromosomal vererbten Hypophosphatämie (XLH) beim Menschen und der homologen Krankheit *Hyp* bei der Maus beteiligt sind, weiter aufgeklärt werden. Es ist bekannt, dass bei XLH und *Hyp* inaktivierende Mutationen im PHEX-Gen auftreten (THE HYP CONSORTIUM, 1995; TENENHOUSE, 1999). Unklar ist jedoch, auf welche Weise der Funktionsausfall dieses Gens zu renalem Phosphatverlust und Rachitis führt.

Wir untersuchten den Einfluss einer ubiquitären Überexpression des humanen PHEX-Gens in *Hyp*-Mäusen, die eine durch Spontanmutation entstandenen Deletion im murinen Phex-Gen aufweisen. Zur Auswertung wurden biochemische Parameter des Knochenstoffwechsels, Knochenmineraldichte-Messungen und die Beurteilung der Knochen-Histologie herangezogen.

2 Literaturübersicht

2.1 Phosphathomöostase

Phosphat spielt im Körper von Mensch und Tier eine außerordentlich wichtige Rolle. Störungen im Phosphatstoffwechsel manifestieren sich mit deutlichen biochemischen und klinischen Folgen. Der Phosphathaushalt wird weniger strikt als z.B. der Kalziumhaushalt geregelt, doch auch hier stehen Regulationsmechanismen zur Verfügung, die die Phosphatkonzentration im Körper konstant halten. Hinsichtlich der Referenzbereiche bestehen erhebliche Altersabhängigkeiten, die durch das Knochenwachstum bedingt sind. Die Phosphat-Spiegel unterliegen außerdem circadianen Schwankungen mit einem Maximum am späteren Abend und einem Minimum am frühen Morgen. Beim erwachsenen Menschen liegt der Referenzbereich des Serum-Phosphats zwischen 0.87 und 1.45 mmol/l (2.7 bis 4.5 mg/dl) (KNOCHEL, 1985). Von einer Hypophosphatämie spricht man bei Mensch und Kleintier, wenn die Phosphat-Werte unter 0.87 mmol/l (2.7 mg/dl) absinken.

2.1.1 Phosphatverteilung

Im menschlichen und tierischen Körper liegt Phosphat zum größten Teil (80-85%) im mineralisierten Knochen als Hydroxylapatit [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] vor. Das Skelett dient somit als Speicher, aus dem Phosphat und Kalzium freigesetzt oder in den diese auch eingelagert werden können. 9-15% des Gesamtkörper-Phosphats sind im Muskel enthalten, der Rest ist in anderen Weichgeweben und weniger als 1% in der extrazellulären Flüssigkeit zu finden. Kalium stellt das wichtigste intrazelluläre Kation, Phosphat das wichtigste intrazelluläre Anion dar.
Im Plasma liegt Phosphor als anorganisches und organisches Phosphat vor. Intrazelluläres Phosphat liegt vorwiegend in organischer Form vor, anorganisches Phosphat befindet sich vor allem extrazellulär (KNOCHEL, 1985).

2.1.1.1 Organisches Phosphat

Organisches Phosphat ist im Körper in vielen Verbindungen, wie zum Beispiel Phospholipiden, Phosphoproteinen, Nukleinsäuren, Enzymen und Co-Faktoren enthalten. Zyklisches 3‘,5‘-Adenosin-Monophosphat (cAMP) dient als Second Messenger von vielen Hormonen. Adenosintriphosphat enthält zwei energiereiche Phosphatbindungen und ist die Energiequelle vieler lebensnotwendiger physiologischer Prozesse: im Membrantransport für die Natrium-Kalium-Pumpe, bei der Synthese chemischer Verbindungen und bei der Muskelkontraktion (GUYTON, 1981). Eine weitere wichtige Phosphatverbindung ist das 2,3-Diphosphoglycerat

(2,3-DPG), in welcher 70-80% des organischen Phosphats in den roten Blutkörperchen vorliegen.

2.1.1.2 Anorganisches Phosphat

Den Großteil des extrazellulären Phosphats stellt das anorganische Phosphat (P_i) dar. Etwa 12-15% des P_i sind nicht-kovalent an Plasmaproteine gebunden, der Rest zirkuliert in Form der beiden freien Phosphat-Ionen Monohydrogenphosphat (HPO_4^{2-}) und Dihydrogenphosphat ($H_2PO_4^-$) und liegt bei einem pH-Wert von 7,4 im Verhältnis 4:1 vor.
Anorganisches Phosphat ist an vielen lebenswichtigen Körperfunktionen beteiligt, wie die oxidative Phosphorylierung, die Produktion von 2,3-DPG in den Erythrozyten und die Glykogenolyse in Leber und Niere. Außerdem ist es ein Co-Faktor vieler enzymatischen Reaktionen (FRASER et al., 1987). Als Dihydrogenphosphat/Monohydrogenphosphat wirkt Phosphat als wichtiges Puffersystem im Intrazellulärraum, Blutplasma und Urin und spielt so eine große Rolle im Säure-Basen-Haushalt.

2.1.2 Die Regulation der Phosphathomöostase

Im Folgenden werden die physiologischen Vorgänge zur Aufrechterhaltung der Phosphathomöostase anhand der Physiologie des Menschen erklärt. Die Absorption, Reabsorption und hormonelle Regulation laufen jedoch, mit einigen Ausnahmen beim Wiederkäuer, bei den monogastrischen Tieren in ähnlicher Weise ab.
Da P_i im Körper an sehr vielen wichtigen Stoffwechselvorgängen beteiligt ist und die Phosphatkonzentration im Körper ähnlich wie die Kalziumkonzentration innerhalb enger Grenzen konstant gehalten werden muss, ist es sehr wichtig, dass ein empfindliches Mess-System und schnell greifende Regulationsmechanismen zur Verfügung stehen.
Zwischen Kalzium und Phosphat besteht eine enge Beziehung, da sie durch ein annähernd konstantes Löslichkeitsprodukt (das Produkt der Konzentrationen von Ca^{2+} und HPO_4^{2-}, das gerade noch die volle Löslichkeit des Salzes im Plasma erlaubt) miteinander verbunden sind. Wird dieses Löslichkeitsprodukt überschritten, lagern sich Kristalle physiologischerweise in den Knochen ab, es kann aber auch zu pathologischen Ablagerungen in Gelenken, der Niere oder in anderen Organen kommen.
Die Phosphatkonzentration steht somit in einem engen Zusammenhang mit der Kalziumkonzentration. Bei einer Hyperphosphatämie kann sich die Konzentration an Kalzium im Serum verringern und umgekehrt kann ein Abfall der Serumphosphat-Konzentration zu einer Hyperkalzämie führen, weil dabei Kalzium aus dem Knochen freigesetzt wird.

Die Phosphathomöostase wird durch drei Organsysteme aufrechterhalten: den Dünndarm, die Nieren und das Skelett.
In der menschlichen Nahrung ist Phosphat so reichlich vorhanden, dass das Auftreten einer Unterversorgung sehr selten ist. Phosphatmangel kann eigentlich nur beim Hungern, nach der Einnahme von Komplexbildnern oder sekundär als Folge eines renalen Phosphatverlustes entstehen.
Das meiste Phosphat aus der Nahrung wird im Dünndarm aufgenommen, wobei die hormonelle Regulation dieses Prozesses bei der Aufrechterhaltung der Phosphathomöostase kaum eine Rolle spielt. Das absorbierte Phosphat wird anschließend über komplizierte, hormonell gesteuerte Regulationsmechanismen über die Niere wieder ausgeschieden und bei Bedarf im Knochen als Hydroxylapatit, in Phospholipiden oder anderen organischen Verbindungen eingelagert. Der größte Teil wird jedoch über den Urin ausgeschieden.
Der Niere kommt somit als Regulationsorgan bei der Aufrechterhaltung der Phosphathomöostase die wichtigste Rolle zu. Außerdem kann bei einer extremen Unterversorgung Phosphat auch aus dem Knochen freigesetzt werden.

2.1.2.1 Phosphatabsorption im Gastrointestinaltrakt

Die Hauptquellen für Phosphat stellen Milchprodukte, Gemüse, Getreide und Fleisch dar. Die tägliche Aufnahme des menschlichen Organismus beträgt durchschnittlich 800 bis 1600 mg und liegt damit etwa eineinhalb bis dreimal über dem tatsächlichen Phosphatbedarf. Mit der Nahrung wird sowohl organisches als auch anorganisches Phosphat aufgenommen. Organische Phosphatverbindungen werden durch Phosphatasen im Darm hydrolisiert, da nur anorganisches Phosphat resorbiert wird. Die Aufnahme erfolgt im Dünndarm vor allem im Jejunum und Ileum, zu einem geringen Anteil auch im Duodenum (WALLING, 1977).
Die Phosphatabsorption steigt mit der zugeführten Phosphatmenge linear an. 60 bis 65% davon werden resorbiert (LEE et al., 1985). Die Aufnahme läuft über zwei Wege: ein zellvermittelter aktiver Transport und passive Diffusion (CROSS et al., 1990).
Der aktive Phosphat-Transport erfolgt über eine durch Calcitriol ($1,25(OH)_2D_3$) stimulierte, an Natrium gekoppelte Aufnahme an der luminalen Membran der Dünndarmepithelzellen. Der Einfluss von $1,25(OH)_2D_3$ liegt in der von Calcitriol angeregten Transkription von Messenger-RNA. Diesbezüglich wurden einige auf Calcitriol ansprechende, Na^+-abhängige Phosphat-Cotransporter in der Bürstensaummembran des Darms gefunden, die eine hohe Affinität für Phosphat besitzen (DEBIEC und LORENC, 1988; HILFIKER et al., 1998; KATAI et al., 1999; BAI et al., 2000). Nachdem Phosphat so in die Zelle aufgenommen wurde, wird angenommen, dass es entlang des Mikrotubuli-Systems zur basolateralen Membran transportiert und

dort durch einen passiven Carrier-vermittelten Mechanismus, dem elektrochemischen Gradienten folgend, freigesetzt wird.
Diese Vorgänge sind jedoch nur zu einem geringen Anteil an der Aufrechterhaltung der Phosphathomöostase beteiligt. Man fand zwar heraus, dass der aktive Transport durch $25(OH)D_2$ und $1,25(OH)_2D_3$ gesteigert werden kann (RIZZOLI et al., 1977; LEE et al., 1985; CROSS et al., 1990), die absorbierte Phosphat-Menge geht allerdings bei Vitamin D-Mangel lediglich um 15% zurück.

Zum großen Teil geschieht die Phosphatabsorption über passive Diffusion. Da die K_m des aktiven Transports relativ niedrig liegt (2 mM) und die Diffusion überwiegt, sobald die Phosphat-Konzentration 1,8 mM überschreitet, was sogar schon beim Fasten geschieht, ist es einleuchtend, warum diese passive Diffusion den hauptsächlichen Absorptionsweg darstellt (WILKINSON, 1976; WALTON und GRAY, 1979).
Daraus ergibt sich, dass der aktive Transport nur unter ungewöhnlichen Umständen eine Rolle spielt, wenn beispielsweise die Phosphat-Verfügbarkeit extrem niedrig ist. Unter diesen Umständen scheinen ein Aktivator-Protein für den Na^+-abhängigen Transport (P_iUS) und der Typ III Na^+/P_i-Cotransporter wichtig zu sein (KATAI et al., 1999).
Eine Störung der Aufnahme durch Diffusion kann zum einen im Alter auftreten und zum anderen bei der Bildung von nicht absorbierbaren Kalzium-, Aluminium- oder Magnesiumsalzen im Darm. In diesen Fällen kann es zu einer Verminderung der intestinalen Phosphatabsorption um bis zu 50% kommen.

2.1.2.2 Rückresorption und Ausscheidung von Phosphat in der Niere

Die Niere reagiert empfindlich auf Veränderungen im Phosphatstoffwechsel. Hier werden erhöhte oder erniedrigte Phosphat-Konzentrationen über die glomeruläre Filtration und die tubuläre Reabsorption wieder ausgeglichen (MIZGALA und QUAMME, 1985).
In den Glomerula werden etwa 90% des P_i aus dem Plasma filtriert (HARRIS et al., 1976). Nicht filtrierbares Phosphat ist Plasmaphosphat, das an Plasmaproteine gebunden ist und solches, das in Verbindung mit Kalzium oder Magnesium vorliegt.
In der Niere werden physiologischerweise 80 bis 90% des filtrierten P_i rückresorbiert. Dies geschieht vor allem im proximalen Tubulus. 60 bis 70% werden in den ersten Abschnitten des Tubulus contortus proximalis in den Segmenten S1 und S2 rückresorbiert, im Tubulus rectus proximalis 15 bis 20%. Möglicherweise kommt es auch im Tubulus distalis zu einer Rückresorption, es scheint jedoch kein P_i-Transport im dünnen oder dicken Teil der Henleschen Schleife stattzufinden (CHENG und SACKTOR, 1981; DOUSA und KEMPSON, 1982; KNOX und HARAMATI, 1985; SUKI und ROUSE, 1996). Die transzelluläre Aufnahme von

Phosphat ist ein Carrier-vermittelter, sättigbarer Vorgang, dessen Transfermaximum T_{max} in Abhängigkeit von der P_i-Aufnahme beträchtlichen Schwankungen unterliegt. Daher kann man diesen Wert am besten bestimmen, indem man während einer P_i-Infusion die maximale P_i-Reabsorption pro Volumeneinheit der Glomerulären Filtrationsrate (T_mP/GFR) misst. Alternativ lässt sich auch das Nomogram von Bijvoet heranziehen, mit dem man T_mP/GFR anhand der P_i- und Creatinin-Exkretion und der Plasma-Phosphat-Konzentration schätzt (WALTON und BIJVOET, 1975).
In jenen Abschnitten, in denen P_i rückresorbiert wird, wurden Parathormon (PTH)-sensitive Adenylatcyclasen nachgewiesen (MOREL, 1981; KNOX und HARAMATI, 1985). PTH ist in diesen Abschnitten für eine Reduzierung der P_i-Reabsorption über einen cAMP-abhängigen und einen cAMP-unabhängigen Signalmechanismus verantwortlich. Im Gegensatz dazu wurden in den medullären und distalen Tubulusabschnitten, in denen also kein Phosphat reabsorbiert wird, eine Calcitonin-sensitive Adenylatcyclase nachgewiesen (BERNDT und KNOX, 1984). Calcitonin hemmt aber auch über einen cAMP-unabhängigen Mechanismus, der möglicherweise über einen Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels gesteuert wird, die Phosphatreabsorption im proximalen geschlängelten und geraden Tubulus (MURER et al., 2000).

2.1.2.3 Biochemie des Phosphattransports in der Niere

Die Aufnahme von Phosphat erfolgt über einen Na^+-abhängigen sekundär-aktiven Transport. Der Transport verläuft elektroneutral, wobei mit jedem P_i-Ion zwei Na^+-Ionen in die Tubuluszelle aufgenommen werden. Na^+ wird mit Hilfe einer Na^+-K^+ ATPase-Pumpe an der basolateralen Membran aktiv aus der Zelle heraustransportiert und so der Na^+-Gradient für den Phosphattransport in der Zelle aufrecht erhalten.
An der basolateralen Membran verlässt das Phosphat dem elektrochemischen Gradienten folgend die Zelle. Der Transport von Phosphat durch das Zytosol und der Mechanismus, mit dem P_i an der basolateralen Seite aus der Zelle abgegeben wird, sind noch nicht völlig geklärt. Es werden derzeit folgende Möglichkeiten diskutiert: ein Na^+-P_i-Cotransport, Anionen-Austausch und eine undichte Stelle an der Membran, an der P_i austritt (MURER et al., 2000). Der P_i-Transport an der basolateralen Membran soll die folgenden zwei Funktionen erfüllen: erstens die vollständige Reabsorption, wenn der Bedarf der Zelle an P_i gedeckt ist und zweitens Einstrom von P_i, wenn die P_i-Aufnahme an der luminalen Seite den Bedarf der Zelle nicht decken kann (LÖW et al., 1984; SCHWAB et al., 1984).

Der limitierende Schritt der Reabsorption ist die aktive Aufnahme an der Bürstensaummembran. Hier setzen die Regulationsmechanismen an. Es existieren drei Na^+-P_i-Cotransporter,

deren molekulare Struktur aufgeklärt wurde: Typ I (Npt 1), Typ II (Npt 2) und Typ III Na^+-P_i-Cotransporter. Alle drei zeigen stark unterschiedliche Eigenschaften, was Aminosäuresequenz, pH-Abhängigkeit, Substrataffinität und Gewebsexpression betrifft (SORRIBAS et al., 1994; HELPS et al., 1995).
Transkripte des Typs IIa wurden im proximalen Tubulus und eine Expression des Proteins in der apikalen Membran nachgewiesen. Im selben Tubulusabschnitt wurde der Typ III Na^+-P_i-Cotransporter gefunden, jedoch scheint er an der basolateralen Membran exprimiert zu werden (MURER et al., 2000; WERNER und KINNE, 2001). Die Funktion des Typ I Cotransporters ist noch nicht aufgeklärt.
Der Typ IIa Cotransporter scheint die Schlüsselrolle im Na^+-P_i-Cotransport an der Bürstensaummembran und damit bei der Phosphatreabsorption zu spielen. Als Folge eines Verlusts des Npt2-Gens bei Npt2-Knockout-Mäusen tritt Phosphaturie als Folge einer Reduktion der Na^+-P_i-Cotransportrate um etwa 70% auf (BECK et al., 1998; MURER et al., 1999).

2.1.3 Hormonelle Regelung des Phosphattransports

Die Serumphosphat-Konzentration wird über ein komplexes Zusammenspiel von intestinaler Absorption, dem Austausch zwischen Intrazellulärraum und Knochenspeicher und der renaltubulären Reabsorption konstant gehalten.
Für die Regulation der Phosphathomöostase sind vor allem das Parathormon (PTH) aus den Nebenschilddrüsen und Calcitriol verantwortlich.

Eine Verminderung der extrazellulären Phosphatkonzentration stimuliert direkt die Aktivität der 25-Hydroxyvitamin D_3-1α-Hydroxylase und dadurch die renale Produktion von Calcitriol ($1,25(OH)_2D_3$) in den Mitochondrien der proximalen Tubuluszellen, was wiederum die intestinale Absorption von Kalzium und Phosphat erhöht (PORTALE et al., 1989). Der daraus resultierende erhöhte Kalziumspiegel hemmt die Ausschüttung von PTH und fördert dadurch die Phosphatreabsorption in der Niere. Erniedrigte Serumphosphatwerte gehen mit erhöhten Serumkalziumwerten einher. Niedrige Kalziumkonzentrationen wiederum bewirken einen Abfall der zirkulierenden PTH-Spiegel, was eine Verminderung der Phosphatexkretion im Urin nach sich zieht. Die Regulation des Phosphathaushaltes über PTH entspricht somit einer indirekten Regulation über den Kalziumspiegel.

Auch andere Hormone und humorale Faktoren beeinflussen die P_i-Homöostase. So senken PTHrP (Parathyroid hormone related protein), Glukokortikoide, Östrogene, Calcitonin, Transforming growth factor α und β (TGFα und β) und hohe P_i-Plasmawerte die P_i-Reabsorption. Andererseits fördern Calcitriol, Schilddrüsenhormone, Insulin, IGF-I (Insulin-like growth

factor I), Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) und ein niedriger P_i-Spiegel die Reabsorption von Phosphat im proximalen Tubulus (WILKINSON, 1976).
An dieser Auflistung lässt sich erkennen, dass der Phosphattransport durch unterschiedliche Faktoren gesteuert wird, wobei die Regulation in allen Fällen in der Niere, und hier in den proximalen Tubuluszellen, erfolgt.

2.1.3.1 Effekte von PTH an der Niere

Die Wirkung von PTH in der Niere erklärt sich aus einer reduzierten Reabsorption von Phosphat im proximalen Tubulus. Sowohl PTH als auch eine hohe P_i-Aufnahme führen zu einer Hemmung des Na^+/P_i-Cotransports an der Bürstensaummembran, indem die Endozytose von Npt2-Protein ausgelöst wird (PFISTER et al., 1998).
Auf molekularer Ebene läuft der Regulationsmechanismus folgendermaßen ab: unter Einfluss von PTH werden Typ IIa Na^+-P_i-Cotransporter aus der luminalen Membran endozytiert, über Mikrotubuli zu den Lysosomen transportiert und mit diesen verschmolzen. Um die Transportfunktion bei akutem oder chronischem Phosphatmangel erneut zu aktivieren, werden die Transporter neu synthetisiert und in die Membran eingebaut. Möglicherweise steht auch ein intrazellulärer Pool zur Verfügung, aus dem bei Bedarf Typ IIa Cotransporter wieder zur Membran transportiert werden können (MURER et al., 1999; MURER et al., 2000).
Die Effekte von PTH werden intrazellulär über die Proteinkinasen A und C übertragen. Die PTH-vermittelte Hemmung der Phosphatreabsorption wird bei niedrigen Hormonkonzentrationen (10^{-8} bis 10^{-10} M) über das Proteinkinase C-System und bei höheren Konzentrationen über das Proteinkinase A-System geregelt.

2.1.4 Phosphatmetabolismus bei Tieren

In der Tiermedizin muss bei der Beschreibung der physiologischen Vorgänge des Phosphatmetabolismus zwischen Wiederkäuern und monogastrischen Tieren unterschieden werden (BREVES und SCHRÖDER, 1991). Die Phosphatabsorption im Darm bei Tieren mit einhöhligem Magen verläuft analog derer beim Menschen: Phosphat wird größtenteils im Jejunum über einen sekundär-aktiven, natriumgekoppelten P_i-Cotransport – der durch Vitamin D gesteigert werden kann – und passive Diffusion absorbiert. Die Phosphathomöostase wird über die Niere als Regulationsorgan unter dem Einfluss von Parathormon und Calcitriol aufrechterhalten.
Bei den Wiederkäuern liegen andere Verhältnisse vor. Hier werden große Mengen an Phosphat über den Speichel in den Gastrointestinaltrakt sezerniert. Die tägliche Sekretionsrate liegt zwischen 5 und 10 g Phosphat bei Schafen und zwischen 30 und 60 g bei Rindern

(REINHARDT et al., 1988; SCOTT, 1988; BREVES und SCHRÖDER, 1991). In Mikropunktions-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die größte Menge Phosphat von der Parotis-Speicheldrüse sezerniert wird (COMPTON et al., 1980). Die Absorption von Phosphat bei Wiederkäuern geschieht zwar, wie bei monogastrischen Säugetieren auch, hauptsächlich im Jejunum, jedoch wird in Pansen und Psalter, vermutlich durch passive Diffusion, ebenfalls Phosphat aufgenommen (BREVES et al., 1988). Im Gegensatz zu den Nicht-Wiederkäuern sind der Mechanismus und die Regulation der Phosphatabsorption im Jejunum nur unvollständig aufgeklärt.
Bei Wiederkäuern ist die Aufrecherhaltung der Phosphathomöostase nicht von der Niere als wichtigstem Regulationsorgan abhängig. Bei diesen Tieren wird der Phosphatmetabolismus in erster Linie über die Speicheldrüsen oder den Gastrointestinaltrakt reguliert.

2.1.5 Hypophosphatämie

Für das Wachstum und die Entwicklung des Skeletts ist eine ausreichende Versorgung mit Kalzium und Phosphat notwendig; ein Mangel an diesen Mineralien führt zu einer eingeschränkten Knochenmineralisation. Im wachsenden Organismus kann dies zu einer Rachitis und nach der Skelettreife zur Entwicklung einer Osteomalazie führen.
Hypophosphatämische Rachitis ähnelt in vielen klinischen und radiologischen Gesichtspunkten einer Kalziummangel-Erkrankung; es kommt jedoch zu keinem sekundären Hyperparathyreoidismus oder einem gesteigerten Knochenabbau.
Erbkrankheiten, die zur verminderten Phosphatreabsorption in der Niere führen, sind beim Menschen die häufigsten Ursachen angeborener Rachitis und stellen heutzutage die wichtigsten Ursachen von Rachitis in der westlichen Welt dar.

2.1.5.1 Hypophosphatämie in der Tiermedizin

In der Tiermedizin wird nicht so häufig über Hypophosphatämie berichtet wie in der Humanmedizin. Hier treten Fälle von Hypophosphatämie meist in Verbindung mit anderen Erkrankungen auf, zum Beispiel Diabetes mellitus beim Hund (WILLARD et al., 1987), hämolytische Anämie bei Rindern (OGAWA et al., 1989) und chronisches Nierenversagen beim Pferd (TENNANT et al., 1982). Außerdem kommt es bei den so genannten „downer cows“ zu stark erniedrigten Serum-Phosphatwerten (<1 mg/dl), bei denen auch nach einer erfolgreichen Behandlung der Hypokalzämie im Zusammenhang mit einer hypokalzämischen Gebärparese die Serum-Phosphatwerte nicht ansteigen (GOFF, 2000).

Meist tritt eine Hypophosphatämie (< 2,5 mg/dl) in der Tiermedizin also als Begleiterscheinung von verschiedenen Krankheitsbildern auf. Die Ursachen der Hypophosphatämie sind transzelluläre Verschiebungen vom Extrazellulärraum in die Körperzellen, eine reduzierte intestinale Absorption oder verminderte renale Reabsorption. Da Phosphat ein wichtiger Bestandteil von ATP ist, äußert sich eine akut verminderte Phosphatkonzentration vor allem in Zellen mit hohem Energieverbrauch, wie den roten Blutkörperchen, Skelettmuskelzellen und Gehirnzellen. Chronische Hypophosphatämien führen zu den typischen Skelettmanifestationen in Form von Rachitis oder Osteomalazie.
Eine transzelluläre Verschiebung (Maldistribution) kann bei Diabetes mellitus oder einer respiratorischen Alkalose auftreten. Bei Diabetes mellitus kann die Hypophosphatämie als Folge einer Ketoazidose und Hyperglykämie entstehen. Die Glykosurie bei unbehandeltem Diabetes mellitus führt zur osmotischen Diurese und somit zur Phosphaturie. Bei Patienten, die mit Insulin behandelt werden, bewirkt Insulin die Verschiebung von Phosphat aus dem Blut in die Zellen. In beiden Fällen entsteht eine Hypophosphatämie.
Eine reduzierte intestinale Absorption tritt bei phosphatarmer Ernährung oder bei Vitamin D-Mangel, durch phosphatbindende Stoffe oder im Zusammenhang des Malabsorptionssyndroms auf. Eine reduzierte renale Reabsorption wurde in der Veterinärmedizin im Zusammenhang mit primärem Hyperparathyreoidismus und Hyperadrenokortizismus beschrieben. Außerdem bei renalen Tubulsdefekten (zum Beispiel Fanconi's Syndrom) und nach Verabreichung von Natriumbikarbonat oder von Diuretika, die am proximalen Tubulus wirken.

2.2 Hereditäre Krankheiten mit Hypophosphatämie

Es existieren einige Erbkrankheiten beim Menschen, bei denen es zu einem renalen Phosphatverlust kommt. Dazu gehören die X-chromosomale hypophosphatämische Rachitis (**X**-**l**inked **h**ypophosphatemic rickets, **XLH**), die autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis (**A**utosomal **d**ominant **h**ypophosphatemic **r**ickets, **ADHR**), die hereditäre hypophosphatämische Rachitis mit Calciurie (**H**ereditary **h**ypophosphatemic **r**ickets with **h**ypercalciuria, **HHRH**) sowie die hypophosphatämische Knochenkrankheit (**H**ypophosphatemic **b**one **d**isease, **HBD**). Des Weiteren gibt es die **T**umor-**i**nduzierte **O**steomalazie (**TIO**), eine Tumorerkrankung, bei der die Patienten unter den Folgen einer Hypophosphatämie leiden.
Im Folgenden werde ich mich auf das Krankheitsbild der XLH konzentrieren.

2.2.1 X-chromosomale hypophosphatämische Rachitis (XLH)

2.2.1.1 Klinisches Bild

Die X-chromosomale hypophosphatämische Rachitis (XLH), auch als familiäre hypophosphatämische Rachitis oder Vitamin D-resistente Rachitis bezeichnet, ist die beim Menschen am häufigsten auftretende hereditäre Rachitis mit einer Prävalenz von 1:20 000 (DAVIES et al., 1981). XLH wird X-chromosomal dominant vererbt. Väter vererben demnach die Krankheit den Töchtern, jedoch nicht den Söhnen. Mütter vererben die Krankheit mit einer 50:50 Wahrscheinlichkeit an ihre Töchter und Söhne. Da die Erkrankung einem dominanten Erbgang folgt, führt bereits ein defektes Allel zum Auftreten von XLH.
Durch die Bezeichnung Vitamin D-resistente Rachitis soll der Unterschied zu der durch Vitamin-D-Mangel erworbenen Rachitis verdeutlicht werden, da eine Besserung von XLH durch eine Gabe von normalen Dosen von Vitamin D nicht möglich ist, die Patienten somit eine Vitamin D-resistente Form der Rachitis aufweisen (WINTERS et al., 1958).
Charakteristische Krankheitsmerkmale sind Wachstumsverzögerung, Rachitis mit daraus resultierender Verformung der Beine, Osteomalazie, Hypophosphatämie, Insertionstendopathien (Kalzifizierung von Sehnen, Bändern und Gelenkkapseln) und renale Defekte in der Phosphatreabsorption und des Vitamin D-Stoffwechsels. Außerdem können die Zahnentwicklung und -mineralisation gestört sein (ECONS und DREZNER, 1992; RASMUSSEN und ANAST, 1995). Typische Laborbefunde sind zusätzlich zur Hypophosphatämie normale Kalzium- und PTH-Werte, erhöhte Alkalische Phosphatase-Spiegel und Calcitriolwerte, die unerwarteterweise im Normalbereich oder darunter liegen (ECONS und DREZNER, 1992; RASMUSSEN und ANAST, 1995).
Die Schwere der Krankheit – auch innerhalb derselben Familie – kann sehr unterschiedlich sein. Die Krankheitssymptome reichen von einer leichten Hypophosphatämie bis zu schweren Knochendeformierungen (LOBAUGH et al., 1984). WHYTE et al. (1996) konnten keine Abhängigkeit der Schwere des Krankheitsverlaufs von Geschlecht und Rasse oder Unterschiede in der Vererbung durch Vater oder Mutter feststellen. Bei Frauen verläuft die Krankheit jedoch häufig schwächer, so dass lediglich eine Hypophosphatämie nachgewiesen wird, jedoch keinerlei Skelettdeformierung (WINTERS et al., 1958). Die ersten Anzeichen der Krankheit bei betroffenen Kindern sind verdickte Gelenke und eine O-förmige Verformung der Beine als Folgen der Rachitis. Des Weiteren kann es aufgrund einer gestörten Dentin-Mineralisation zur verzögerten Zahnentwicklung und zu Zahnabszessen kommen. In den meisten Fällen werden die Symptome erst in einem Alter von sechs bis zwölf Monaten festgestellt (HARRISON et al., 1966).

2.2.1.2 Genetik

1995 gelang einem Internationalen Konsortium mittels positionaler Klonierung die Isolierung des für XLH verantwortlichen Gens. Das Gen erhielt die Bezeichnung PEX für Phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome (THE HYP CONSORTIUM, 1995). Später folgte eine Umbenennung in „PHEX“, um eine Verwechslung mit Genen, die für peroxysomale Erkrankungen verantwortlich sind, zu vermeiden.
Das PHEX-Gen befindet sich auf dem Chromosomabschnitt Xp22.1. Es umfasst 243 kb, weist 22 Exons auf und codiert für ein Protein, das aus 749 Aminosäuren besteht (FRANCIS et al., 1997). Das entsprechende murine *Phex*-Gen, welches kurz nach dem humanen Gen kloniert wurde, stimmt zu 95% mit der humanen Sequenz überein (DU et al., 1996; STROM et al., 1996; BECK et al., 1997).
PHEX weist auf der Aminosäure-Ebene Homologien zu der M13-Familie von Zink-Metallopeptidasen auf, zu der die Neutral endopeptidase (NEP), Endothelin-converting enzymes 1 und 2 (ECE-1 und ECE-2) und das Kell Blutgruppen-Antigen (KELL) gehören (TURNER und TANZAWA, 1997). NEP wird in zahlreichen Geweben exprimiert und ist mitbeteiligt an der proteolytischen Inaktivierung verschiedener kleiner Peptide (ROQUES et al., 1993). ECE-1 wiederum wird vor allem im Gefäß-Endothel exprimiert und ist an der Aktivierung des Peptids Endothelin aus einer inaktiven Vorstufe beteiligt (XU et al., 1994). Bei all diesen Enzymen handelt es sich um Typ II Membran-Glycoproteine, die N-terminal eine kurze zytoplasmatische Domäne, eine transmembranäre Domäne und eine lange extrazelluläre Domäne, die auch nach proteolytischer Abspaltung von der Membran ihre Peptidase-Aktivität beibehält, aufweisen. Außerdem besitzt das PHEX-Protein, ebenso wie ECE-1 und NEP, zehn Cysteinreste und ein Zink-bindendes Motiv, die bei ECE-1 und NEP wesentlich an der Konformationsintegrität und der katalytischen Aktivität beteiligt sind (TURNER und TANZAWA, 1997).
Die Ähnlichkeit mit dieser Familie von Metallopeptidasen legt nahe, dass PHEX/*Phex* an der Aktivierung bzw. Inaktivierung bioaktiver Peptide beteiligt ist.

2.2.1.3 PHEX-Expression und Mutationen

PHEX/*Phex* wird vorwiegend in Osteoblasten, Osteozyten und Odontoblasten exprimiert. Außerdem konnte mRNA und/oder Protein in Lunge, Gehirn, Muskeln, Nebenschilddrüsen und Gonaden nachgewiesen werden. Interessanterweise wird das Gen jedoch nicht in der Niere exprimiert (BECK et al., 1997; BLYDT-HANSEN et al., 1999).
Seit Entdeckung des PHEX/*Phex*-Gens wurden etwa 170 verschiedene Mutationen im Zusammenhang mit XLH identifiziert, darunter Deletionen, Frame-Shift-, Exon-Splicing- und

Nonsense-Mutationen. Außerdem konnten viele Missense-Mutationen nachgewiesen werden (FRANCIS et al., 1997; HOLM et al., 1997). Alle Mutationen gehen mit einem Funktionsverlust des PHEX/*Phex*-Gens einher (SABBAGH et al., 2000). Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Schwere der Erkrankung und der Art oder dem Ort der Mutation, das bedeutet zwischen Genotyp und Phänotyp, festgestellt werden (FILISETTI et al., 1999).
Das durch eine Spontanmutation entstandene Krankheitsbild *Hyp* bei Mäusen (*Hyp* steht für Hypophosphatämie), das der XLH beim Menschen sehr ähnelt, wird durch eine ausgedehnte 3´-Deletion im *Phex*-Gen hervorgerufen (BECK et al., 1997). Ein ähnliches murines Homolog, die *Gy*-Maus (*Gy* steht für Gyro), weist eine große Deletion auf, die das 5´-Ende des *Phex*-Gens und das Spermin-Synthase-Gen mit einbezieht (MEYER et al., 1998).

2.2.1.4 Pathophysiologie von XLH

2.2.1.4.1 Murines Gegenstück zu XLH – die *Hyp*-Maus

Die Erforschung dieser Erbkrankheit wurde durch die Entdeckung der *Hyp*-Maus als murines Gegenstück zu XLH beim Menschen erleichtert. Auch die *Hyp*-Maus vererbt die Krankheit X-chromosomal dominant (EICHER et al., 1976). Die Phänotypen von XLH und *Hyp* sind sich sehr ähnlich, so weist die *Hyp*-Maus ebenfalls Hypophosphatämie, Verzwergung und eine reduzierte Reabsorption von filtriertem Phosphat in der Niere auf. Es ist kein Einfluss der Gen-Dosis oder der Vererbung des mutierten Allels von Vater- oder Muttertier feststellbar (QIU et al., 2004).
Eine weitere homologe Form zu XLH, die *Gy*-Maus weist nahezu denselben Phänotyp auf, zeigt jedoch zusätzlich Abnormalitäten des Innenohres, Taubheit, Hyperaktivität und Im-Kreis-Laufen. Außerdem sind die männlichen Mäuse kleiner als die *Hyp*-Männchen und steril (LYON et al., 1986).

2.2.1.4.2 Renale Tubulusanomalie

Die charakteristische Hypophosphatämie, die bei XLH-Patienten und *Hyp*-Mäusen auftritt, ist die Folge einer verminderten renalen Phosphatreabsorption, wobei es zur vermehrten Exkretion von Phosphat im Urin kommt.

Der Ort der verminderten Reabsorption konnte mit Hilfe von Mikropunktions-Untersuchungen an *Hyp*-Mäusen in der Bürstensaummembran des proximalen Tubulus lokalisiert werden (GIASSON et al., 1977; TENENHOUSE und SCRIVER, 1978; COWGILL et al., 1979). Der Defekt bleibt auch nach einer Parathyroidektomie bestehen (COWGILL et al., 1979; KIEB-

ZAK et al., 1981), und ist allein auf die Reabsorption von P beschränkt (LYON et al., 1986). In weiteren Forschungsarbeiten wurde der Frage nachgegangen, in welchem Zusammenhang der Funktionsverlust des PHEX-Gens mit der verminderten Reabsorption von Phosphat steht. Die Expression des Na^+-P_i-Cotransporters (Npt2) in der Bürstensaummembran ist bei *Hyp*-Mäusen auf Protein- und mRNA-Ebene um 43% gegenüber normalen Mäusen reduziert (TENENHOUSE et al., 1995). Demnach kommt es bei einem Funktionsausfall von PHEX zur transkriptionalen Herunterregulierung von Npt2, was darauf hin deutet, dass PHEX eine regulatorische Funktion bei der Aufrechterhaltung der Phosphathomöostase zukommt. Da PHEX in der Niere nicht exprimiert wird (s.o.), kann ein lokaler Nierendefekt ausgeschlossen werden. Die verminderte Transkription von Npt2 wird demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit durch einen humoralen Faktor ausgelöst.

2.2.1.4.3 Renaler Vitamin D-Metabolismus

Zusätzlich zur Hypophosphatämie ist eine gestörte Regulation des Vitamin D-Stoffwechsels charakteristisch für die XLH-Erkrankung, bzw. für *Hyp*- und *Gy*-Mäuse. Bei *Hyp*- und *Gy*-Mäusen liegen die Serumkonzentrationen von 1,25 Dihydroxyvitamin D_3 ($1,25(OH)_2D_3$) vorwiegend im Normalbereich oder darunter (MASON et al., 1982; LOBAUGH und DREZNER, 1983; TENENHOUSE und JONES, 1990; TENENHOUSE et al., 1992), was angesichts der vorliegenden Hypophosphatämie unverhältnismäßig niedrig ist.

Normalerweise bewirken PTH oder eine Hypophosphatämie einen deutlichen Anstieg der Syntheserate und Serumkonzentration von Calcitriol ($1,25(OH)_2D_3$) (GRAY et al., 1976; INSOGNA et al., 1983; PORTALE et al., 1989). Dabei wird Calcidiol ($25(OH)D_2$) in Mitochondrien der Niere durch die 25-Hydroxyvitamin D_3-1α-Hydroxylase zum aktiven Calcitriol hydroxyliert, das die intestinale Kalzium-Absorption stimuliert. Bei XLH-Patienten bzw. *Hyp*-Mäusen bewirken diese Stimulatoren der Calcitriol-Synthese jedoch keinen Anstieg der Calcitriolwerte.

Die Aktivität der 25-Hydroxyvitamin D_3-1α-Hydroxylase ist bei *Hyp*-Mäusen im Vergleich zu normalen Mäusen, die aufgrund einer Phosphat-Mangeldiät ähnliche Phosphatwerte im Serum aufweisen, vermindert (LOBAUGH und DREZNER, 1983). Außerdem kann bei *Hyp*-Mäusen keine Steigerung der Enzymaktivität durch induzierten Kalziummangel oder Infusion von PTH gemessen werden (NESBITT et al., 1986). Darüber hinaus ist die 24-Hydroxylierung, der initiale Schritt des Vitamin D-Katabolismus, bei *Hyp*-Mäusen paradoxerweise sogar erhöht (TENENHOUSE et al., 1988).

Diese abweichende Enzymregulation stellt nicht die Folge gestörter Transkriptions-, sondern Translations- oder Posttranslationsprozesse dar. Der gemessene mRNA-Spiegel der 25-Hydroxyvitamin D_3-1α-Hydroxylase steigt durch PTH-Stimulation bei *Hyp*-Mäusen ver-

gleichbar stark an wie bei den gesunden Wurfgeschwistern mit induziertem Phosphatmangel. Die Steigerung der Enzymaktivität bei den gesunden Mäusen liegt jedoch fünfmal höher als bei den *Hyp*-Mäusen. Dies schließt eine reduzierte Transkriptionsaktivität aus (FUJIWARA et al., 2003).

Die abweichende Vitamin D-Regulation tritt bei *Hyp*-Mäusen am proximalen Tubulus – dem gleichen Tubulusabschnitt, an dem auch die P_i-Reabsorption vermindert ist – auf (LOBAUGH und DREZNER, 1983; NESBITT und DREZNER, 1990). Deshalb wäre eine mögliche Erklärung der verminderten 25(OH)D_3-1α-Hydroxylase-Aktivität das veränderte intrazelluläre Milieu der proximalen Tubuluszellen (NESBITT und DREZNER, 1990).

2.2.1.4.4 Nachweis eines humoralen Faktors

Es war lange Zeit nicht bekannt, ob die verminderte Phosphat-Reabsorption auf einem primären Defekt der Niere oder einem humoralen Faktor beruht.
Die beiden murinen Homologe zu XLH, *Hyp* und *Gy*, waren auch hier wieder wichtig, um die Pathogenese der Hypophosphatämie weiter aufzuklären. In Parabiose-Experimenten von normalen und *Hyp*-Mäusen kam es bei den zuvor gesunden Mäusen zur Entwicklung einer Hypophosphatämie und Phosphaturie anstatt zu einer Korrektur des phosphaturischen Defekts in der *Hyp*-Maus (MEYER et al., 1989a). Eine Parathyroidektomie der *Hyp*-Maus vor der Parabiose konnte die Hypophosphatämie bei der normalen Maus nicht verhindern (MEYER et al., 1989b). Damit war der Beweis erbracht, dass ein humoraler Faktor, der nicht das Parathormon sein kann, für den renalen Phosphatverlust verantwortlich ist. Auch nachfolgende Experimente mit Nieren-Kreuz-Transplantationen unterstützen diese Hypothese. Nach Transplantation einer Niere aus einer *Hyp*-Maus in eine nephrektomierte gesunde Maus funktionierte die Niere völlig normal und die Empfängermaus entwickelte keine Hypophosphatämie. Im Gegensatz dazu reabsorbierte eine vorher normal funktionierende Niere Phosphat nicht mehr ausreichend, wenn sie aus einer gesunden Maus in eine nephrektomierte *Hyp*-Maus transplantiert wurde. Es kam zur persistierenden Hypophosphatämie (NESBITT et al., 1992).
In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass *Hyp*-Mäuseserum die Phosphataufnahme in primärkultivierten Zellen des proximalen Tubulus hemmt (LAJEUNESSE et al., 1996).
Diese Ergebnisse sprechen gegen die Annahme eines intrinsischen Defekts der Niere. Dazu passt auch der Fallbericht eines XLH-Patienten, der nach einer Nierentransplantation wieder vermehrt Phosphat über die Niere verlor (MORGAN et al., 1974).

2.2.1.4.5 Knochendefekte

Zusätzlich zu Rachitis und Osteomalazie kommt es bei *Hyp*-Mäusen zu einem vorzeitigen Schluss der Schädelknochen und zu einer abnormalen Schädelform, resultierend aus einem abnormalen Wachstum des Os nasale (EICHER et al., 1976).

Histologisch typisch für XLH-Patienten sind hypomineralisierte periosteolytische Läsionen im kortikalen Knochen, wodurch so genannte „Halos“ um Osteozyten herum entstehen (FROST, 1958). Dieser Befund bleibt auch nach einer Therapie mit Phosphat und $1,25(OH)_2D_3$, nach der sich die Knochenmineralisation bessert, bestehen (MARIE und GLORIEUX, 1983). Ähnliche periosteolytische Läsionen treten auch bei *Hyp*-Mäusen auf (GLORIEUX und ECAROT-CHARRIER, 1987).
In weiteren Versuchen wurden Periostea und Osteoblasten aus normalen und *Hyp*-Mäusen nach Transplantation in die Glutealmuskulatur von normalen und *Hyp*-Mäusen histologisch untersucht. Bei Transplantation von normalen Zellen in *Hyp*-Mäuse war die Matrix-Mineralisation vermindert, was dafür spricht, dass die extrazelluläre Umgebung bei der Knochenbildung eine wichtige Rolle spielt und in diesem Fall nicht genug Phosphat vorhanden war. Wurden Osteoblasten von *Hyp*-Mäusen in normale Mäuse transplantiert, verbesserte sich zwar die Knochenbildung, es kam jedoch zu keiner Normalisierung. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die gestörte Knochenmineralisation nicht allein die Folge des erniedrigten Phosphatspiegels ist, sondern zusätzlich ein primärer Osteoblastendefekt vorliegt (ECAROT-CHARRIER et al., 1988). Der Mineralisationsdefekt kann außerdem auf normale Zellen in Co-Kultur-Experimenten übertragen werden, wobei davon ausgegangen wird, dass die Osteoblasten einen Faktor produzieren, der die normale Mineralisation hemmt (XIAO et al., 1998).

2.2.2 Wie führt die Inaktivierung von PHEX/*Phex* zur Erkrankung?

Es ist offensichtlich, dass mit der klassischen Vorstellung von der PTH/Vitamin D-Achse die komplexen Veränderungen des renalen Phosphat-Handlings und der Knochenmineralisation bei XLH/*Hyp* nicht mehr hinreichend erklärt werden können. Man geht stattdessen davon aus, dass andere phosphaturische Hormone, die man als „Phosphatonine“ zusammenfasst (KUMAR, 2002), und weitere Faktoren, die den Mineralisationsprozess bei hypophosphatämischen Krankheiten regulieren (so genannte „Minhibins“) (XIAO et al., 1998; QUARLES und DREZNER, 2001) hierbei beteiligt sind.

Es ist erwiesen, dass die Pathogenese von XLH auf inaktivierende Mutationen im PHEX/*Phex*-Gen zurückzuführen ist. Auf welche Weise die fehlende Funktion dieser Endopeptidase zum renalen Phosphatverlust führt, ist jedoch noch unklar.
Aufgrund der Tatsache, dass alle Mutationen des PHEX-Gens, die bis jetzt gefunden wurden, mit einem Funktionsverlust des Gens verbunden sind, kann man annehmen, dass das Produkt des PHEX-Gens direkt oder indirekt einen phosphaturischen Faktor beeinflusst, der das renale Phosphathandling reguliert. Dieses Substrat wurde als „Phosphatonin“ bezeichnet (ECONS und DREZNER, 1994; KUMAR, 1997).

Es ist derzeit noch nicht bekannt, wie es im Einzelnen zu einer verminderten Expression von Npt2 (dem Na^+/P_i-Cotransporter im proximalen renalen Tubulus)-mRNA kommt. Man nimmt an, dass PHEX/*Phex* an der Inaktivierung eines phosphaturischen Hormons oder Aktivierung eines Phosphat-bewahrenden Hormons beteiligt ist (THE HYP CONSORTIUM, 1995; BECK et al., 1997; ECONS und FRANCIS, 1997). Auf diese Weise würde sich bei einem Funktionsverlust von PHEX/*Phex* ein Überschuss eines phosphaturischen Hormons oder ein Mangel an Phosphat-bewahrendem Hormon ergeben. In jedem Fall würde jedoch Phosphat vermehrt ausgeschieden werden. Da PHEX/*Phex* nicht in der Niere exprimiert wird (DU et al., 1996; BECK et al., 1997; RUCHON et al., 2000), muss der Faktor die Niere über den Kreislauf erreichen. Aufgrund der Tatsache, dass PHEX zur Familie der Neutralen Endopeptidasen gehört, ist anzunehmen, dass dieses phosphaturische Hormon durch PHEX abgebaut oder inaktiviert wird.

Die Expression von PHEX in der Nebenschilddrüse könnte allerdings auch ein Hinweis darauf sein, dass PHEX an der Inaktivierung von PTH beteiligt ist. Dies würde bedeuten, dass ein Funktionsverlust des Gens zur PTH-Dysregulation führt (BLYDT-HANSEN et al., 1999). Allerdings sprechen die Ergebnisse von Parabiose-Experimenten mit parathyroidektomierten *Hyp*-Mäusen gegen diese Hypothese (MEYER et al., 1989b).

Das Krankheitsbild von XLH/*Hyp* kommt mit großer Wahrscheinlichkeit aufgrund mehrerer unabhängiger Vorgänge zustande. Zum einen aufgrund eines primären Osteoblastendefektes, zum anderen aufgrund der erhöhten Konzentration eines phosphaturischen Hormons. Der Knochen- und Knorpeldefekt ist so gravierend, dass er sich nicht allein mit der Hypophosphatämie erklären lässt. Wie oben beschrieben, liegen Versuchsergebnisse vor, die eindeutig für einen intrinsischen Knochendefekt sprechen (ECAROT-CHARRIER et al., 1988; ECAROT et al., 1992). Außerdem wurde die Hypothese aufgestellt, dass Osteoblasten von *Hyp*-Mäusen den phosphaturischen Faktor produzieren, der den renalen Phosphattransports und die Knochenmineralisation hemmt (NESBITT et al., 1995). Für unabhängige Pa-

thomechanismen sprechen auch Experimente, bei denen die Wiederherstellung der PHEX-Funktion in Osteoblasten unter Kontrolle eines Maus Osteocalcin-Promotors (LIU et al., 2002) oder eines pro-α1(I) Kollagen-Promotors (BAI et al., 2002) nicht die Normalisierung der Hypophosphatämie, wohl aber teilweise eine Korrektur des Knochendefekts bewirkte.

2.2.3 Autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis (ADHR)

Bei ADHR handelt es sich um eine weitere hereditäre Erkrankung, die im Gegensatz zu XLH jedoch autosomal vererbt wird. Das Krankheitsbild von ADHR ähnelt sehr dem von XLH. Auch hier treten renaler Phosphatverlust und unverhältnismäßig normale Calcitriol-Serumspiegel auf. Phänotypisch sind Kleinwuchs, Knochenschmerzen, Rachitis und Osteomalazie charakteristisch. Bei ADHR kommt es allerdings im Gegensatz zu XLH bei einigen Betroffenen zum Verschwinden der Krankheit. Diese Menschen sind im Kindesalter rachitisch und weisen eine verminderte renale Phosphatreabsorption auf, doch im Erwachsenenalter kann der renale Defekt nicht mehr nachgewiesen werden (ECONS und McENERY, 1997).
Die molekulare Erforschung dieser autosomal vererbten hypophosphatämischen Erkrankung brachte auch neue Einblicke in die Pathogenese von XLH.
Das Gen FGF23 wurde als dasjenige identifiziert, welches beim Menschen durch die Missense-Mutationen R176Q, R179W und R179Q zum Krankheitsbild von ADHR führt (THE ADHR CONSORTIUM, 2000). FGF23 ist das größte der 22 Mitglieder der Familie der Fibroblast Growth Factors (POWERS et al., 2000). Bei ADHR-Patienten sind Argininreste des FGF23 durch Glutamin und Tryptophan oder Glutamin ersetzt. Dadurch kann FGF23 nicht mehr gespalten und somit auch nicht inaktiviert werden (THE ADHR CONSORTIUM, 2000). Ungespaltenes FGF23 induziert in In vivo-Experimenten Hypophosphatämie, supprimiert die $1,25(OH)_2D_3$-Spiegel und führt zu Rachitis/Osteomalazie (SHIMADA et al., 2001; WHITE et al., 2001; SAITO et al., 2003).

2.2.4 Tumor-induzierte Osteomalazie (TIO)

Eine weitere Krankheit, bei der es zu renalem Phosphatverlust kommt, die jedoch nicht vererbt wird, ist die Tumor-induzierte Osteomalazie (TIO). Meist handelt es sich bei diesen Tumoren um Hämangiopericytoma, es können jedoch auch andere mesenchymale Tumoren auftreten (REYES-MUGICA et al., 2000). Bei TIO produzieren die Tumorzellen phosphaturische Faktoren („Phosphatonine“), die bei den Betroffenen zu renalem Phosphatverlust und Hypophosphatämie mit vergleichbaren Folgen wie bei XLH und ADHR führen (CAI et al., 1994; ECONS und DREZNER, 1994).

Aus Tumoren, die TIO auslösen, konnten verschiedene Gene, darunter FGF23, isoliert werden (BOWE et al., 2001; DE BEUR et al., 2002). Zusätzlich wurde eine Erhöhung der FGF23-Blutspiegel bei Patienten mit TIO festgestellt (JONSSON et al., 2003; WEBER et al., 2003). SHIMADA et al. (2001) isolierten cDNA aus einem Hämangiopericytoma, das eine TIO hervorgerufen hatte, und fanden Klone, die mit FGF23 übereinstimmten. Nacktmäuse mit einem FGF23-sezernierendem Tumor entwickeln die gleichen Symptome wie Menschen mit TIO: schwere Hypophosphatämie, Rachitis, Skelettdeformationen, reduzierte Mineralisation der Knochen und unmineralisiertes Osteoid (SHIMADA et al., 2001). Durch eine Tumorentfernung können ein Sinken der FGF23-Spiegel und eine Korrektur der Hypophosphatämie sowie des abnormalen Vitamin D-Metabolismus erzielt werden (YAMAZAKI et al., 2002; WEBER et al., 2003).

Aus TIO-Tumoren konnte außerdem das Matrix Extrazelluläre Phosphoglycoprotein (MEPE), auch OF45 genannt (GOWEN et al., 2003), isoliert und kloniert werden (ROWE et al., 2000). Möglicherweise stellt MEPE den Mineralisations-Hemmfaktor Minhibin dar (QUARLES und DREZNER, 2001). Bei MEPE-Knockout-Mäusen tritt eine gesteigerte Osteoblasten-vermittelte Mineralisation auf, was einen Hinweis darauf gibt, dass MEPE die Knochenbildung und -mineralisation hemmt (GOWEN et al., 2003). Des Weiteren sind MEPE-Transkripte im schlecht mineralisierten Knochen von *Hyp*-Mäusen vermehrt zu finden (ARGIRO et al., 2001). GUO et al. (2002) untersuchten, ob MEPE ein Substrat für *Phex* ist, konnten jedoch nur zeigen, dass *Phex* möglicherweise an der Hydrolyse von MEPE beteiligt ist und somit eine indirekte Rolle bei der Inaktivierung einnimmt.

Und noch einem weiteren Faktor wird eine mögliche Rolle in der Pathogenese von hypophosphatämischen Erkrankungen zugesprochen: FRP-4, frizzled-protein 4, wurde ebenfalls aus Tumoren von TIO-Patienten isoliert (DE BEUR et al., 2002). BERNDT et al. (2003) konnten zeigen, dass FRP-4 im Serum von TIO-Patienten vermehrt nachweisbar ist. Dieser Faktor kann bei normalen Ratten ohne Stimulation der 25-Hydroxyvitamin D3-1α-Hydroxylase eine Phosphaturie auslösen (KUMAR, 2002).

2.2.5 Erklärt ein gemeinsames Modell die Pathogenese von ADHR, XLH und TIO?

Auch bei XLH-Patienten können erhöhte Spiegel an zirkulierendem FGF23, die mit der Schwere der Ausprägung der Hypophosphatämie korrelieren, festgestellt werden (YAMAZAKI et al., 2002; WEBER et al., 2003).

Die phänotypischen Ähnlichkeiten von ADHR, XLH und TIO und die erhöhten FGF23-Spiegel bei allen drei Krankheiten führte zu einem Enzym/Substrat-Modell, das die Pathogenese dieser hypophosphatämischen Erkrankungen zu erklären versucht (STREWLER, 2001).
Nach dieser Vorstellung ist FGF23 das lang gesuchte Phosphatonin, jenes phosphaturische Hormon, das die renale Phosphatreabsorption hemmt. Weiterhin geht man davon aus, dass nur ungespaltenes (full length) FGF23 phosphaturisch wirkt und dass PHEX FGF23 in inaktive Spaltungsprodukte zerlegt, wozu das mutierte PHEX bei XLH-Patienten und *Hyp*-Mäusen jedoch nicht in der Lage ist. Im Falle von ADHR dagegen liegt eine Mutation im FGF23-Gen vor, welches somit resistent gegenüber der Spaltung durch PHEX ist. Auf diese Weise kommt es hier ebenfalls zu erhöhten FGF23-Spiegeln. Bei der TIO überfordert die Überproduktion an FGF23 durch den Tumor die Inaktivierung durch die Abbaumechanismen.

Im Falle von XLH könnten die erhöhten FGF23-Spiegel darauf zurückzuführen sein, dass die Osteoblasten diesen phosphaturischen Faktor produzieren. Dafür sprechen die Ergebnisse von NESBITT et al. (1999), die zeigten, dass ein Faktor aus *Hyp*-Osteoblasten die Phosphataufnahme renaler Tubuluszellen hemmt.
Es konnte zwar bisher nicht nachgewiesen werden, dass FGF23 ein Substrat von PHEX ist, jedoch fanden LIU et al. (2003) eine gesteigerte Expression von FGF23 in den Osteoblasten von *Hyp*-Mäusen. Dies liefert einen weiteren Anhaltspunkt dafür, dass Osteoblasten FGF23 sezernieren. Die Beobachtungen, dass erhöhte MEPE-Spiegel mit den erhöhten FGF23-Spiegeln einhergehen, könnte bedeuten, dass FGF23 auch eine gesteigerte MEPE-Produktion in Osteoblasten zur Folge hat (LIU et al., 2003).

Diese Hypothese geht allerdings davon aus, dass PHEX in der Lage ist, FGF23, MEPE oder andere mögliche Phosphatonine zu spalten. Auf der Suche nach dem PHEX-Substrat fanden GUO et al. (2001) heraus, dass Leu-Enkephalin durch die Endopeptidase gespalten werden kann. Zudem konnte eine Hydrolyse von $PTHrP_{107-139}$ durch rekombinantes PHEX festgestellt werden (BOILEAU et al., 2001). Rekombinantes PHEX kann außerdem Peptide, die aus FGF23 und MEPE abgeleitet wurden, spalten (CAMPOS et al., 2003). Es stellt sich allerdings die Frage, ob PHEX, das solch eine starke Ähnlichkeit zu NEP aufweist, dazu fähig ist, FGF23 zu spalten. Die dreidimensionale Struktur von PHEX ist zwar noch nicht aufgeklärt, NEP kann jedoch nur Oligopeptid-Substrate spalten und die Homologie der beiden Metalloproteasen legt ein ähnliches Verhalten von PHEX nahe (OEFNER et al., 2000). Es ist deshalb wahrscheinlicher, dass PHEX nicht direkt FGF23 oder MEPE spaltet, sondern Spaltungsprodukte aus FGF23 und MEPE inaktiviert, die phosphaturische Aktivität besitzen (ARGIRO et al., 2001; QUARLES und DREZNER, 2001).

Eine Knochenmark-Transplantation, bei der Wildtyp-Knochenmarkszellen *Hyp*-Mäusen transplantiert wurden, führte zur Verbesserung des Vitamin D-Metabolismus und der Knochenmineralisation. Diese Ergebnisse wurden auf folgende Weise erklärt: Knochenmarkszellen enthalten unter anderem auch Osteoblasten-Vorläuferzellen. Da es sich bei PHEX um ein membranständiges Protein handelt, kann eine Transplantation von Knochenmarkszellen gesunder Mäuse in *Hyp*-Mäuse zur normalen Enzymfunktion führen (MIYAMURA et al., 2000). Eine Expression von FGF23 konnte zwar im Knochenmark nicht nachgewiesen werden (SHIMADA et al., 2001), wenn jedoch die Hypothese richtig ist, dass sich im Knochenmark lediglich Vorläuferzellen der Osteoblasten befinden, FGF23 aber möglicherweise von den reifen Osteoblasten produziert wird, kann man dies in Einklang mit der Enzym/Substrat-Theorie bringen.
Durch die Generierung von *fgf23*-Knockout (KO)-Mäusen wurde kürzlich nachgewiesen, welch herausragend wichtige Rolle FGF23 in der Regulation der Phosphathomöostase einnimmt. Die *fgf*23-KO-Mäuse wiesen eine schwere Hyperphosphatämie mit erhöhter renaler Phosphatreabsorption sowie hohe $1,25(OH)_2D_3$-Werte auf (SHIMADA et al., 2004). Die Ergebnisse zeigen, dass die Produktion von FGF23 innerhalb enger Grenzen reguliert werden muss, und dass es eine wichtige physiologische Rolle in der Regulation von Serumphosphat und $1,25(OH)_2D_3$ spielt.

2.3 Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob eine ubiquitäre Überexpression des humanen PHEX-Gens in *Hyp*-Mäusen zu einer Normalisierung des *Hyp*-Phänotyps führt. Dazu generierten wir transgene Mäuse, die humanes PHEX unter der Kontrolle des humanen β-actin Promotors exprimieren. Da der β-actin Promotor in allen Zellen eine hohe Aktivität aufweist, kann eine ubiquitäre Expression des Transgens erzielt werden (GUNNING et al., 1987).

In vorangegangenen Experimenten, in denen PHEX gezielt nur in Osteoblasten exprimiert wurde, blieb die Hypophosphatämie unverändert und der Knochen-Phänotyp besserte sich lediglich geringfügig (BAI et al., 2002; LIU et al., 2002). Dies kann bedeuten, dass PHEX, das nur in den Osteoblasten exprimiert wird, nicht an der Regulation der biologischen Aktivität der mutmaßlichen „Phosphatonine“ FGF23, MEPE, FRP-4 oder anderer Faktoren beteiligt ist.

3 Material und Methoden

3.1 Tiermaterial

3.1.1 Generierung der PHEX-transgenen Mäuse

Um den Einfluss einer ubiquitären Expression von humanem PHEX (hPHEX) zu untersuchen, wurden transgene Mäuse generiert. Das 4-kb Fragment des humanen β-actin-Promotors wurde aus dem Plasmid phACTβ-FRT-neoFRT-lacZ (GenBank Accession-Nummer U46492), das freundlicherweise von S. Dymecki (Carniegie Institute of Washington, Baltimore) (DYMECKI, 1996) bereitgestellt wurde, durch einen Doppel-Verdau mit *Hind*I-II/*Sal*I herausgeschnitten. Das Fragment wurde so zusammen mit der gesamten humanen PHEX (hPHEX) cDNA in das pcDNAI Plasmid (Invitrogen) kloniert, dass sich der Promotor stromaufwärts des humanen PHEX befindet. Mittels Restriktionsendonuclease-Verdau und Sequenzanalysen wurde die richtige Ausrichtung des Konstruktes bestätigt. Das eingesetzte Konstrukt (Abb. 1) besteht aus dem 4 kb-Fragment des humanen β-actin-Promotors, den 2393 bp des humanen PHEX und 1058 bp des pcDNAI Vektors (welches eine Splicing- und eine Poly-A-Sequenz, die in der PHEX-codierenden cDNA fehlen, beinhaltet). Es wurde durch Digestion mit *Sal*I aus dem modifizierten Vektor freigesetzt und nach standardisierter Technik gereinigt. In der Massachusetts General Hospital Transgenic Facility (Boston, Massachusetts, USA) wurden die Mikroinjektionen in den Pronukleus befruchteter Eizellen des FVB/N-Stammes durchgeführt. Die beiden Founder-Tiere dieser FVB/N-Linie, zwei männliche Mäuse, die mit den Nummern 236 und 237 gekennzeichnet waren, wiesen eine besonders hohe Expression des Transgens auf und wurden mit Wildtyp-Mäusen angepaart, um zwei individuelle transgene Mauslinien zu bekommen. Die beiden Linien wurden β-actin 236 und β-actin 237 benannt. Diese FVB/N-Mäuse wurden für ein bis zwei Generationen in den genetischen Hintergrund C57/BL6 rückgekreuzt. Die C57/Bl6-Mäuse erhielten wir vom Max-Planck-Institut, Martinsried. Das Transgen wurde an die Nachkommen weitervererbt. Das DNA-Insertionsmuster beider Linien ist in Abb. 2 gezeigt.

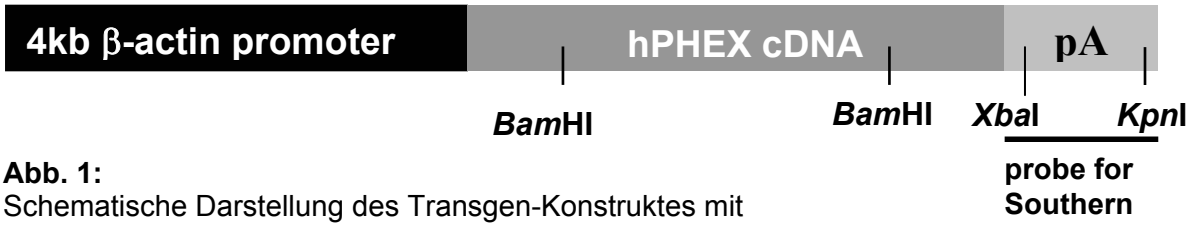
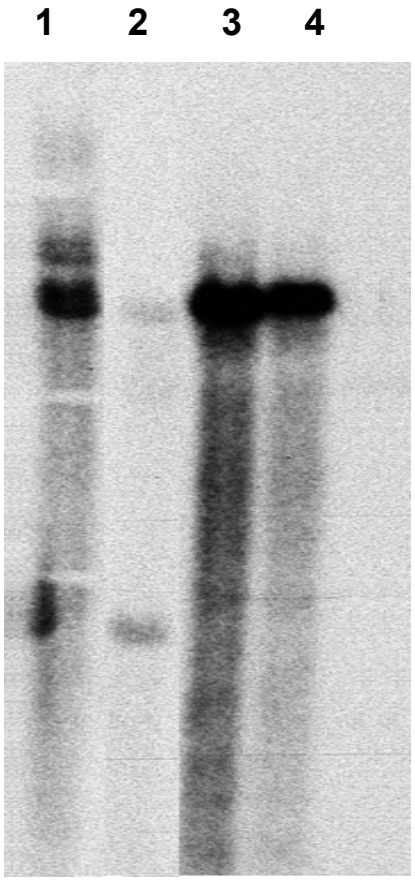


Abb. 1:
Schematische Darstellung des Transgen-Konstruktes mit der humanen PHEX cDNA. Für die Genotypisierung der transgenen Tiere mit der Southern-Blot-Analyse wurde die Probe A zusammen mit einem *Bam*HI-Verdau verwendet. Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI, *Kpn*I und *Xba*I sind ebenfalls gekennzeichnet.



1 founder #236

2 F1 of #236

3 founder #237

4 F1 of #237

Abb. 2:
Die Integration Sites des Transgens sind für die Founder-Tiere 236 und 237 und die F1-Generation dargestellt (Banden 1 und 2, bzw. 3 und 4).
Southern Blot unter Benutzung der in Abb. 1 dargestellten Sonde.

3.1.2 Genotypisierung der PHEX-transgenen Mäuse

3.1.2.1 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus Schwanzspitzen von Mäusen extrahiert. Für die Genotypisierung der transgenen Mäuse wurde den Tieren kurz nach dem Absetzen im Alter von drei Wochen etwa ein halber Zentimeter des Schwanzes abgeschnitten und in ein 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Unter Zugabe von 500 µl Schwanzlysis-Puffer (10% SDS, 1 M Tris pH 7.5, 0.5 M EDTA, 5 M NaCl) und 500 µg/ml Proteinase K (Fa. Boehringer, Mannheim) wurden die Schwanzproben für 12 Stunden bei 55°C in einem Schüttel-Thermoblock (Fa. Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Anschließend wurden zu jedem Eppendorf-Reaktionsgefäß 500 µl Phenol/Chloroform-Gemisch pipettiert, kräftig gemischt und für fünf Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Dann wurde der klare Überstand abpipettiert und in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammen mit 2 µl 0.5 M EDTA (pH 8), 200 µl 4 M NH_4Ac und 800 µl Isopropanol gegeben, gemischt und nochmals für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand so vorsichtig abgekippt, dass nur das Pellett am Boden des Eppendorf-Reaktionsgefäßes zurückblieb. Anschließend wurden 200 µl Aqua dest. dazupipettiert und für 5 Minuten bei 65°C mit offenem Deckel stehen gelassen.

Die DNA sollte man bei Zimmertemperatur resuspendieren lassen. Danach können die Proben bei 4°C aufbewahrt werden.

3.1.2.2 Genotypisierung mittels PCR

Um DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) amplifizieren zu können, werden Oligonukleotidprimer benötigt. Primer sind kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle (20-30 bp), die zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize komplementär sind. Eine DNA-Polymerase verlängert unter den richtigen Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynukleotid-Triphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize. So werden neue DNA-Stränge synthetisiert, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist. Um die Synthese zu wiederholen, wird die doppelsträngige DNA erneut durch Hitze aufgeschmolzen. Mehrfache Zyklen führen zu einer exponentionellen Anreicherung des Produkts im Reaktionsansatz.

Das humane PHEX-Transgen enthält eine Poly-A-Sequenz des Vektors pcDNAI (Invitrogen). Diese Sequenz wird in genomischer DNA der Mäuse nicht gefunden und ist damit spezifisch für das Transgen-Konstrukt. In der PCR zur Genotypisierung der transgenen Mäuse verwendeten wir einen Primer aus diesem Teil des Gens und einen aus der codierenden PHEX-Sequenz.
Als Primer wurden verwendet:
Forward-Primer: 5‘-TTCCACCACTGCTCCCATTCATC-3‘
Reverse-Primer 5‘-GTTATGCTCATGTGAGGTGC-3‘
Das Produkt, das entstand, hatte eine Länge von 542 bp und konnte nur bei transgenen Tieren nachgewiesen werden.
Der Reaktionsansatz für die PCR-Reaktion war folgender:

100 ng DNA
5 µl 10xPCR-Puffer (0.05 M KCl, 0.01 M Tris pH 8.3)
3 µl 25 mM $MgCl_2$
2 µl 2.5 mM dNTPs
1 µl 25 pmol/µl PHEX-Primer for
1 µl 25 pmol/µl PHEX-Primer rev
0.5 U Taq Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim)
Auffüllen mit Aqua dest. auf 50 µl

Die einzelnen Reaktionsansätze wurden in Reaktionsgefäße pipettiert und in einen Thermocycler (Fa. Eppendorf, Hamburg) platziert. Das verwendete PCR-Programm war folgendes:

1. Initiale Denaturierung	5 Minuten	94°C
2. 30 Zyklen:		
Denaturierung	45 Sekunden	94°C
Primeranlagerung	45 Sekunden	64°C
Kettenverlängerung	45 Sekunden	72°C
3. Finale Kettenverlängerung	7 Minuten	72°C
4. Lagerung	bis zur Entnahme	4°C

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden über Elektrophorese in einem 2%igen ethidiumbromidhaltigen Agarosegel (0.5 µg Ethidiumbromid pro ml Gel) mit TBE-Puffer (4.5 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA) bei 80-90 V aufgetrennt. Die Identifizierung und Charakterisierung der resultierenden Banden erfolgte unter UV-Licht.
Die Founder-Tiere und die F1-Generation wurden mittels Southern-Blot-Analyse (Abb. 2) genotypisiert. Die genomische DNA wurde mit *Bam*HI gespalten und an eine spezifische DNA-Probe (*Xba*I/*Kpn*I 954 bp) hybridisiert, die von dem pcDNA1-Plasmid stammte.

3.1.3 Genotypisierung der *Hyp*-Mäuse

Die *Hyp*-Mäuse (genetischer Hintergrund C57/Bl6) stammten aus der Eigenzucht des Instituts für Tierphysiologie der Universität München. *Hyp*-Mäuse besitzen eine durch Spontanmutation entstandene Deletion (von Exon 16 bis Exon 22) am 3'-Ende des *Phex*-Gens. Die von der Mutation betroffenen Tiere wurden mittels der beiden Primerpaare im Exon 3 und im Exon 19 identifiziert. Bei Wildtyp- sowie bei *Hyp*-Mäusen erhielt man eine Bande des Exons 3 (300 bp), doch nur bei Wildtyp-Männchen bzw. Wildtyp- und heterozygoten Weibchen war noch eine zweite Bande für Exon 19 (304 bp) nachweisbar.

Folgende Primer wurden verwendet:
Forward-Primer Exon 3: 5'- TCTTGTCAAACAGTGTTCTGG-3'
Reverse-Primer Exon 3: 5'-CCAGGGEGECATTTGAGGAG-3'
Forward-Primer Exon 19: 5'-GCTTGGGCTAGTTTGCTATCTC-3'
Reverse-Primer Exon 19: 5'-TGAGTTGGTGCTATACACGGAG-3'.

Die Extraktion der DNA erfolgte wie oben beschrieben.
Der Reaktionsansatz für die PCR-Reaktion war folgender:

100 ng DNA
5 µl 10xPCR-Puffer
3 µl 25mM $MgCl_2$
2 µl 2.5 mM dNTPs
1 µl 25 pmol/µl Hyp ex3for Primer

1 µl 25 pmol/µl Hyp ex3rev Primer
1 µl 25 pmol/µl Hyp ex19for Primer
1 µl 25 pmol/µl Hyp ex19rev Primer
0.5 U Taq Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim)
Auffüllen mit Aqua dest. auf 50 µl

Die einzelnen Reaktionsansätze wurden in Reaktionsgefäße pipettiert und in einen Thermocycler (Fa. Eppendorf. Hamburg) platziert. Das verwendete PCR-Programm war folgendes:

1. Initiale Denaturierung	5 Minuten	94°C
2. 30 Zyklen:		
Denaturierung	45 Sekunden	94°C
Primeranlagerung	45 Sekunden	64°C
Kettenverlängerung	45 Sekunden	72°C
3. Finale Kettenverlängerung	7 Minuten	72°C
4. Lagerung	bis zur Entnahme	4°C

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden über Elektrophorese in einem 2%igen ethidiumbromidhaltigen Agarosegel (0.5 µg Ethidiumbromid pro ml Gel) mit TBE-Puffer (4.5 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA) bei 80-90 V aufgetrennt. Die Identifizierung und Charakterisierung der resultierenden Banden erfolgte unter UV-Licht.

3.1.4 Expressionsanalyse des PHEX-Transgens mit RT-PCR

Um die Gewebeverteilung des hPHEX-Gens in den transgenen Mäusen per RT-PCR zu bestimmen, wurden Wildtyp- und transgene Wurfgeschwister getötet und Niere, Herz, Lunge, Darm, Gehirn, Milz, Haut, Ovarien, Hoden, Muskel, Pankreas, Knochen und Kehlkopf (inklusive Schilddrüse und Nebenschilddrüsen) entnommen, die in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des RNeasy Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden) zur Extraktion aus den Organen und mit Trizol (Fa. Gibco BRL, Karlsruhe) zur Extraktion aus den Knochen gewonnen. 2 µg DNAse (Fa. Ambion, Austin, USA) -behandelter RNA wurden unter Verwendung des RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot) revers transkribiert.
Für den Nachweis der Transgen-Expression verwendeten wir den spezifischen Forward-Primer mit der Sequenz 5‘-CCTGGATCCTTGGTGGTCTACT-3‘ und den Reverse-Primer 5‘-GAGCTGGTTGTTGGTGAATGTGAT-3‘ und erhielten in den Organen, die das hPHEX exprimieren, ein Genprodukt mit der Länge von 265 bp. Die verwendeten Primer amplifizieren keine mRNA, die für das murine Phex codiert.

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

1. Initiale Denaturierung	3 Minuten	94°C
2. 35 Zyklen:		
Denaturierung	1 Minute	94°C
Primeranlagerung	1 Minute	55°C
Kettenverlängerung	1 Minute	72°C
3. Finale Kettenverlängerung	10 Minuten	72°C
4. Lagerung	bis zur Entnahme	4°C

3.1.5 Expressionsanalyse mit Northern Blot-Analyse

Für die Untersuchung der Expression des Transgens auf RNA-Ebene mittels der Northern Blot-Analyse wurde die RNA von Leber und Niere von Wildtyp- und transgenen Tieren wie unter *3.1.4* beschrieben, extrahiert.
Die RNA-Moleküle der gesamten RNA wurden durch Elektrophorese in einem 1%igen Agarosegel (denaturierend durch Zusatz von Formaldehyd) aufgetrennt und mittels Kapillarblot auf eine Membran aus Nitrocellulose transferiert. Die so auf der Nitrosecellulosemembran fixierten Moleküle wurden mit einer ^{32}P-markierten 0.5 kb langen DNA-Sonde, die für humanes PHEX spezifisch ist, hybridisiert. Die Prä-Hybridisierung erfolgte für ca. 1 Stunde bei 60°C, die Hybridisierung für ca. 12 Stunden bei 60°C in einer Hybridisierungskammer. Nach der Hybridisierung wurden die Filter gewaschen, zusammen mit einem Röntgenfilm (Kodak Biomax MS Films, Fa. Kodak, New York, USA) in eine Autoradiografiekassette gelegt und bei -70°C für 4 bis 10 Tage exponiert.

3.1.6 Tierhaltung

Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen Typ II in Gruppen von drei bis fünf Tieren in einem fensterlosen, vollklimatisierten Raum bei 24°C Raumtemperatur und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% gehalten. Es wurde ein Lichtprogramm mit 12 Stunden Licht / 12 Stunden Dunkelheit eingehalten.
Leitungswasser und ein handelsübliches, pelletiertes Alleinfuttermittel (1314, Fa. Altromin, Lage) mit 0,9% Kalzium, 0,7% Phosphor und 600 IU Vitamin D/kg stand den Tieren ad libitum zur Verfügung.

Alle Tiere, die für diese Arbeit analysiert wurden, waren Nachkommen der Anpaarungen von heterozygoten *Hyp*-Weibchen (genetischer Hintergrund C57/BL6) mit heterozygoten PHEX-tg-Männchen (genetischer Hintergrund Intercross FVB/N und C57/BL6). Für beide Linien (236 und 237) erhielten wir durch diese Anpaarungen Wurfgeschwister mit den Genotypen WT/WT, WT/PHEX-tg, *Hyp*/WT und *Hyp*/PHEX-tg. Für die im Folgenden beschriebenen Auswertungen wurden insgesamt 69 männliche Mäuse aus der Eigenzucht des Instituts für

Tierphysiologie der Universität München mit oben beschriebenen Anpaarungen verwendet. Die Gruppengröße pro Genotyp und pro Linie war n = 7-10.

♂ / ♀	**Hyp**	**WT**
PHEX-tg	**Hyp/PHEX-tg**	**WT/PHEX-tg**
WT	**Hyp/WT**	**WT/WT**

3.2 Versuchsdurchführung

Sämtliche Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt und unter dem Aktenzeichen 211-2531.2-13/2001 geführt.

Für alle Messungen wurden 3 Monate alte (84-104 Tage) männliche Mäuse verwendet. Alle Mäuse erhielten vor den jeweiligen Versuchsenden 3 und 1 Tage vor ihrer Tötung eine Fluorochrom-Doppelmarkierung von 20 mg/kg Calcein gelöst in 2%iger $NaHCO_3$ (Fa. Sigma, Deisenhofen) zur Kenntlichmachung der sich in Mineralisation befindenden Knochenoberfläche.

Am Abend vor den jeweiligen Versuchsenden wurden die Tiere einzeln für 15 Stunden in Stoffwechselkäfige gesetzt und der Urin aufgefangen, um Veränderungen in der renalen Exkretion von Mineralien und die Urinmenge zu bestimmen. Den Tieren wurde in dieser Zeit das Futter entzogen, Wasser stand ad libitum zur Verfügung.
Am Versuchsende erhielten alle Mäuse eine Ketamin/Xylazin-Injektionsanästhesie (70 mg/kg Ketamin Hostaket®, Fa. Hoechst, Wiesbaden, und 7 mg/kg Xylazin Rompun® 2%ig, Fa. Bayer, Leverkusen, i.p.). Anschließend wurde ihnen 100 µl Blut mit einer heparinisierten Kapillare aus dem retroorbitalen Sinus entnommen, um das ionisierte Kalzium zu bestimmen. Sofort danach wurden die Mäuse durch Entbluten aus der abdominalen V. cava schmerzlos getötet.

Anschließend wurden der erste Lendenwirbel sowie der linke und rechte Femur entnommen. Der Wirbel und der linke Femur waren für die Histologie bestimmt und wurden in 4%igem Paraformaldehyd bei -4°C auf einem Magnetrührer aufbewahrt (weiteres Vorgehen s.u.). Der rechte Femur war für die Mineraldichtebestimmung bestimmt und wurde bis zur Messung bei Zimmertemperatur in 70%igem Ethanol aufbewahrt.

3.3 Biochemische Parameter des Knochenstoffwechsels

3.3.1 Blutparameter

Ionisiertes Kalzium, Natrium und Kalium wurde mit einem AVL 9140 Elektrolyte Analyzer (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) gemessen.
Die Blutproben, welche den Mäusen bei Versuchsende durch Entbluten entnommen wurden, wurden gesammelt und nach einer Stunde im Wärmeschrank bei 30°C für 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Serum wurde anschließend abpipettiert, in mehrere Fraktionen unterteilt und bis zur weiteren Verwertung bei –35°C eingefroren.
In den Serumproben wurden Kalium, Kalzium, Phosphat, Aspartat-Amino-Transferase (AST), alkalische Phosphatase (AP), Gesamt-Bilirubin, Kreatinkinase, Albumin, Harnstoff, Creatinin, Parathormon (PTH) und 1,25 Dihydroxyvitamin D_3 bestimmt.

Die Serumspiegel von Kalium und Kalzium wurden flammenphotometrisch (Modell EFOX 5053, Fa. Eppendorf, Hamburg) gemessen.

Phosphat, Creatinin, Harnstoff, Bilirubin, Albumin, AST und Alkalische Phosphatase-Aktivität wurden mit einem Hitachi 766 Automatic Analyzer (Fa. Boehringer, Mannheim) bestimmt.

Die Serumspiegel von PTH wurden mittels eines mausspezifischen Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Fa. Immutopics, San Clemente, CA) bestimmt.

Die Bestimmung der Serumspiegel von 1,25 Dihydroxyvitamin D_3 erfolgte mit Hilfe eines Radiorezeptorassays (Fa. Immundiagnostik, Bensheim).

3.3.2 Urinparameter

Der in der Nacht vor der Tötung in den Stoffwechselkäfigen aufgefangene Urin wurde nach Bestimmung der Menge pro Tier mit 2normaler HCl 1:1 verdünnt und anschließend nochmals 1:11 mit Aqua dest. versetzt, so dass die Endverdünnung 1:22 betrug.

Im Urin wurden bestimmt: Natrium, Kalzium, Creatinin, Phosphat und Deoxypyridinolin (DPD), ein Knochenkollagen-Abbauprodukt.
Aus dem 1:1 verdünnten Urin wurden die Natrium- und Kalziumspiegel mit einem EFOX 5053 Flammenphotometer (Fa. Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Die Messung der Creatinin-

und Phosphatkonzentrationen erfolgte mit einem Hitachi 766 Automatic Analyzer (Fa. Boehringer, Mannheim).

Gesamt-Deoxypyridinolin (DPD) wurde mittels eines ELISA-Testkits (Fa. Metra Biosystems, Mountain View, CA) nach saurer Hydrolyse gemäß den Herstellerangaben bestimmt.

Die renal-tubuläre Reabsorption von Phosphat (TRP) und Kalzium (TRCa) wurde anhand folgender Formeln bestimmt:
%TRP=[1-UrP*SeCrea)/(SeP*UrCrea)]*100 und
%TRCa=[1-(UrCa*SeCrea)/(SeCa*UrCrea)]*100
(Ur: im Urin gemessen; Se: Serum; P: Phosphat; Ca: Kalzium; Crea: Creatinin)

3.4 Histologische Aufarbeitung des Knochengewebes

3.4.1 Histologie

3.4.1.1 Präparation, Fixierung und Entwässerung der Knochen

Die dem Tier entnommenen Knochen wurden sorgfältig von anhaftenden Gewebsresten befreit und in Histokörbchen gelegt. Zur Kennzeichnung der Proben wurden zusammen mit den Knochen mit Bleistift beschriftete Papierschildchen in die Körbchen gegeben. Die Fixierung erfolgte über Nacht in 4%iger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung bei 4°C.
Zur Herstellung dieser Lösung wurden 8 g PFA-Pulver in ein Becherglas eingewogen, mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt und bis zur vollständigen Lösung des PFA bei ca. 80°C auf der Heizplatte eines Magnetrührers belassen. Anschließend wurde 2 M NaOH tropfenweise bis zur schlagartigen Klärung der Lösung zugegeben. Diese 8%ige PFA-Lösung wurde nach dem Abkühlen 1:1 mit 0.1 M Phosphatpuffer (2.722 g Kaliumhydrogenphosphat und 14.24 g di-Natriumhydrogenphosphat auf 1000 ml Aqua dest., pH 7.4) gemischt und gegebenenfalls auf pH 7.4 eingestellt.
Um eine optimale Durchmischung der Fixationslösung zu erreichen, wurde – wie auch für alle weiteren Schritte – ein Magnetrührer verwendet.
Nach 24stündiger Inkubation erfolgte das Auswaschen der Fixierlösung mit 0.1 M Phosphat-Puffer, welcher 10% Sucrose enthielt.
Die weitere Entwässerung der Knochen erfolgte über eine aufsteigende Alkoholreihe, wobei die Knochen nacheinander jeweils für 2-3 Tage in 70%igen Ethanol, 95%igen Ethanol, 100%igen Isopropanol und Xylol verbracht wurden (SCHENK et al., 1984).

3.4.1.2 Infiltration und Einbettung

Die Knochen wurden in drei Schritten nach der Methode von WOLF et al. (1991), modifiziert nach ERBEN (1997), für jeweils drei bis vier Tage in Methylmethacrylat (MMA) inkubiert. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen war folgende:

MMA-Lösung 1:	600 ml MMA
	350 ml Butylmethacrylat
	50 ml Methylbenzoat
	12 ml Polyethylenglykol 400
MMA-Lösung 2:	600 ml MMA
	350 ml Butylmethacrylat
	50 ml Methylbenzoat
	12 ml Polyethylenglykol 400
	4 g Benzoylperoxid
MMA-Lösung 3:	600 ml MMA
	350 ml Butylmethacrylat
	50 ml Methylbenzoat
	12 ml Polyethylenglykol 400
	8 g Benzoylperoxid

Die Einbettung fand in Rollrandgläsern mit vorgefertigten MMA-Böden statt. Dazu wurde der Gläschenboden mit 3 ml vorgekühltem Polymerisationsgemisch (frisch angesetzte MMA-Lösung 3 mit Zusatz von 6 ml N,N-Dimethyl-Phosphat-Toluidin zur Beschleunigung des Reaktionsablaufs) bedeckt, mit Stickstoff begast und verschlossen. Die Polymerisation erfolgte in ca. 24 Stunden bei 4°C im Kühlschrank.

Die einzelnen Knochen wurden vorsichtig auf den Böden platziert, mit MMA-Polymerisationslösung (frische MMA-Lösung 3 plus 4 ml N,N-Dimethyl-Phosphat-Toluidin) bis zum Rand der Gläschen übergossen, da der Aushärtungsvorgang sauerstoffempfindlich ist, und in einer Klimakammer (Fa. Binder, Tuttlingen) polymerisiert. Die Polymerisation war nach drei Tagen bei Temperaturen von -25°C bis -18°C abgeschlossen. Die weitere Lagerung erfolgte bei 4°C im Kühlschrank.

3.4.1.3 Herstellung von Knochenschnitten

Nach vollständiger Polymerisation wurden die Rollrandgläser mit einem leichten Gummihammerschlag abgeklopft und die MMA-Blöcke mit Säge und Feile für den Schneidevorgang zurechtgetrimmt. Anschließend wurden aus der Sagittalebene der Femora mittels eines HM 360-Mikrotoms (Fa. Microm, Walldorf) 3 µm dicke Knochenschnitte angefertigt. Diese wurden direkt vom Mikrotommesser auf mit APES (Fa. Sigma, Deisenhofen) vorbehandelte Objektträger überführt, mit 70%igem Ethanol beträufelt und nach vorsichtigem Strecken des Kunststoffs mit Hilfe eines feinhaarigen Pinsels mit einer Kunststoff-Folie (Kisol-Folie, Fa. Kettenbach, Eschenburg) bedeckt. Die Folie wurde mit einem Gummi-Roller glatt gerollt. Anschließend trockneten die Schnitte in einer Objektträgerpresse 2 Tage lang bei 42°C im Wärmeschrank.

3.4.1.4 Färbung der Knochenschnitte

Nach Auswahl der qualitativ besten Schnitte hinsichtlich der Schnittebene und Auftreten von Artefakten wurden diese nach folgenden Färbeprotokollen gefärbt:

Mit der *von-Kossa/Mc Neal Färbung* (SCHENK et al., 1984) wird kalzifizierter Knochen intensiv schwarz gefärbt.
Zunächst mussten die Schnitte durch dreimaliges 20minütiges Inkubieren in Methoxyethylacetat entplastet und danach durch jeweils 5minütiges Verbringen in 70%igen Ethanol, 40%igen Ethanol und Aqua dest. für die anschließend verwendeten hydrophilen Färbelösungen vorbereitet werden (BARON et al., 1983; modifiziert nach ERBEN, 1997).

Anschließend durchliefen die Schnitte folgende Färbeschritte:

Von Kossa:

5%iges Silbernitrat	10 min
Abspülen in Aqua dest.	3 mal
Natriumcarbonat/Formaldehyd	2 min
(150 ml 6.7%ige Natriumcarbonatlösung	
+ 50 ml 38%ige Formaldehydlösung)	
Abspülen mit Leitungswasser	1 mal
Farmer's Reducer	30 sec
(200 ml 10%ige Natriumthiosulfatlösung	
+ 10 ml 10%ige Formaldehydlösung)	

fließendes Leitungswasser	20 min
Abspülen mit Aqua dest.	1 mal

McNeal:

5%ige Tetrachromlösung	60 min
Abspülen mit Aqua dest.	1 mal
Abspülen mit Isopropanol (100%)	2 mal
Xylol	5 min

Bis zum Eindecken der Präparate mit DePex (Fa. Boehringer, Ingelheim) wurden die Schnitte in frischem Xylol aufbewahrt.

Zur Messung der in vivo durch zweimalige Calceinapplikation markierten, aktiv in Mineralisation befindlichen Knochenoberflächen mittels Fluoreszenzmikroskopie, wurden die Schnitte ohne Entplastung mit Fluoromount (Fa. Serva, Heidelberg) eingedeckt und bis zur Auswertung lichtgeschützt aufbewahrt.

3.5 Knochenmineraldichte-Messung

Die periphere quantitative Computertomographie (pQCT) ist eine nichtinvasive, röntgendiagnostische Methode, mit der Veränderungen der Knochenmineraldichte und der geometrischen Eigenschaften analysiert und dreidimensional dargestellt werden können.

Die Bestimmung der Knochenmineraldichte (bone mineral density, BMD) mittels pQCT erfolgte an den rechten Femora, die bei den jeweiligen Versuchsenden unmittelbar nach der Blutentnahme entnommen, vorsichtig von anhaftenden Gewebsresten befreit und bis zur Messung in 70%igem Ethanol bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurden.
Zur Messung wurden vier Schnittebenen herangezogen. Die erste Ebene war die Mitte der Diaphyse des Femurs, die übrigen drei Messebenen lagen 1.5, 2 und 2.5 mm proximal der Gelenkfläche des Kniegelenks am distalen Femur.
Gemessen wurde mit einem XCT Research M+ pQCT Gerät (Fa. Stratec Medizintechnik, Pforzheim). Die Voxelsize betrug 0.070 mm und als unterer Schwellenwert für die Berechnung der kortikalen Knochenmineraldichte wurde 600 mg/cm³ gewählt.

Folgende Parameter wurden bestimmt:

Am Femurschaft:
Gesamtknochenmineraldichte in mg/cm³ (Total density)
Kortikale Mineraldichte in mg/cm³ (Cortical density)
Gesamtquerschnittsfläche in mm² (Total area)
Querschnittsfläche der Kortikalis in mm² (Cortical area)
Kortikale Dicke in mm (Cortical thickness)
Periostaler Umfang in mm (Periostal perimeter)
Endostaler Umfang in mm (Endostal perimeter)

An der Metaphyse:
Gesamtknochenmineraldichte in mg/cm³ (Total density)
Kortikale und subkortikale Mineraldichte in mg/cm³ (Cortical&subcortical density)
Gesamtmineraldichte der Spongiosa in mg/cm³ (Trabecular density)
Gesamtquerschnittsfläche im mm² (Total area)
Querschnittsfläche der Kortikalis und Subkortikalis in mm² (Cortical&subcortical area)
Querschnittsfläche der Spongiosa in mm² (Trabecular area)

3.6 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mittels SPSS für Windows 11.5 (SPSS, Chicago, USA) durchgeführt. Die Daten wurden zunächst unter Verwendung einer faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet, um den Einfluss der *Linie* der transgenen Tiere (Linie 236 und 237), der *Hyp*-Mutation (*Hyp)* und des PHEX-Transgens (*PHEX*) zu untersuchen. Im Rahmen der faktoriellen ANOVA wurde auch die gegenseitige Interaktion zwischen den einzelnen Faktoren analysiert, wobei eine signifikante Interaktion anzeigt, dass für die unterschiedlichen genetischen Variablen nicht-additive Wechselwirkungen bestehen. Nachdem sich für den Einflussfaktor *Linie* keine statistische Signifikanz ergab, wurden die Daten beider Maus-Linien zusammengefasst und mit einer einfachen ANOVA unter Verwendung der Gruppierungsvariable *Genotyp* weiter analysiert. Falls die einfache ANOVA signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen anzeigte, wurde als Post hoc-Test der Student-Newman-Keuls-Test für multiple Vergleiche zwischen den einzelnen Genotypen verwendet.

P-Werte von <0,05 wurden für alle Analysen als statistisch signifikant angesehen. Die Daten in den Tabellen sind als Mittelwerte ± Standardabweichung, die Daten in den Abbildungen als Mittelwerte ± Standardfehler angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Faktorielle Varianzanalyse

Die faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) ergab keinen signifikanten Effekt der Variablen *Linie* auf irgendeinen der in Tab. 1 dargestellten Parameter. Im Gegensatz dazu war *Hyp* mit signifikanten Auswirkungen auf Körpergewicht, ionisiertes Kalzium im Blut, Serumphosphat, prozentuale renal-tubuläre Phosphatreabsorption, Gesamt-DPD-Exkretion im Urin, Gesamt-Knochenmineraldichte (BMD) des Femurschaftes und der Femur-Metaphyse, sowie der Kortikalisdicke des Femurschaftes verbunden. Mit Ausnahme von ionisiertem Kalzium und der Phosphathomöostase hatte die Variable *PHEX* ebenfalls signifikante Effekte auf diese Parameter. Für alle Parameter, die einen signifikanten Einfluss von *PHEX* zeigten, stellte sich eine wechselseitige Interaktion zwischen *PHEX* und *Hyp* heraus, weil *PHEX* nur in der Gegenwart, nicht aber in Abwesenheit von *Hyp* einen Einfluss hatte (siehe unten). Das Fehlen von signifikanten Effekten der *Linie* machte es möglich, die Ergebnisse der beiden Tier-Linien zusammen auszuwerten. Deshalb wurden die Untersuchungsergebnisse beider Linien für alle nachfolgenden statistischen Analysen zusammengefasst und mittels einfacher Varianzanalysen ausgewertet.

Tab. 1: Dreifache faktorielle Varianzanalyse ausgewählter biochemischer und Knochendichte-Parameter bei drei Monate alten männlichen Wildtyp-, PHEX-tg-, Hyp- und Hyp/PHEX-tg-Mäusen

Variable	Linie	Hyp	PHEX	Linie*Hyp	Linie*PHEX	PHEX*Hyp
Körpergewicht	n.s.	p<0,001	p<0,001	n.s.	n.s.	p<0,001
ionisiertes Kalzium im Blut	n.s.	p=0,003	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Serumphosphat	n.s.	p=0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
% tubuläre Phosphatreabsorption	n.s.	p=0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
DPD Urin / Creatinin	n.s.	p<0,001	p<0,001	n.s.	n.s.	p<0,001
Gesamt BMD Femurschaft	n.s.	p<0,001	p<0,001	n.s.	p=0,039	p<0,001
Kortikalisdicke Femurschaft	n.s.	p<0,001	p<0,001	n.s.	n.s.	p<0,001
Gesamt BMD distale Femur-Metaphyse	n.s.	p<0,001	p<0,001	n.s.	n.s.	p<0,005

n.s.: nicht signifikant; * gegenseitige Interaktion; DPD: Deoxypyridinolin; BMD: bone mineral density.

4.2 Expression von humanem PHEX in transgenen Mäusen

Mit Hilfe der RT-PCR konnten wir aufzeigen, dass das humane PHEX-Transgen bei den von uns generierten PHEX-transgenen Mäusen in allen Organen, außer im Gehirn, exprimiert

wurde (Abb. 3). Das Gewebeexpressionsmuster war bei beiden transgenen Mauslinien gleich. Um auszuschließen, dass bei der Expressionsanalyse Verunreinigungen durch genomische DNA nachgewiesen wurden, wurde eine PCR mit DNAse-behandelten RNA-Proben ausgeführt, der jedoch keine reverse Transkription folgte. Da die DNA der transgenen Mäusen das Transgen-Konstrukt, welches die Sequenz der humanen cDNA ohne Introns beinhaltet, aufweist, wäre es möglich gewesen, dass genomische DNA amplifiziert wird. Es konnte jedoch für die DNAse-behandelte RNA kein PCR-Produkt nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung von Organen von Wildtyp-Mäusen, von denen eine Exprimierung von Phex bekannt ist – wie Lunge und Knochen – konnte ebenfalls kein PCR-Produkt gefunden werden. Damit wurde bestätigt, dass die Primer spezifisch für humanes PHEX waren und kein murines Phex amplifiziert wurde.

Um das Gewebeexpressionsmuster, das wir anhand der RT-PCR feststellten, zu bestätigen, wurde eine Northern Blot-Analyse mit einer spezifischen, 0.5 kb langen, humanen PHEX-Sonde durchgeführt. Das Transgen konnte dabei jedoch in keinem der untersuchten Gewebe nachgewiesen werden.

Da in der RT-PCR deutlich geringere Mengen an RNA nachgewiesen werden können, spricht ein negatives Ergebnis in der Northern Blot-Analyse für eine niedrige Expression des Transgens in den PHEX-tg-Mäusen.

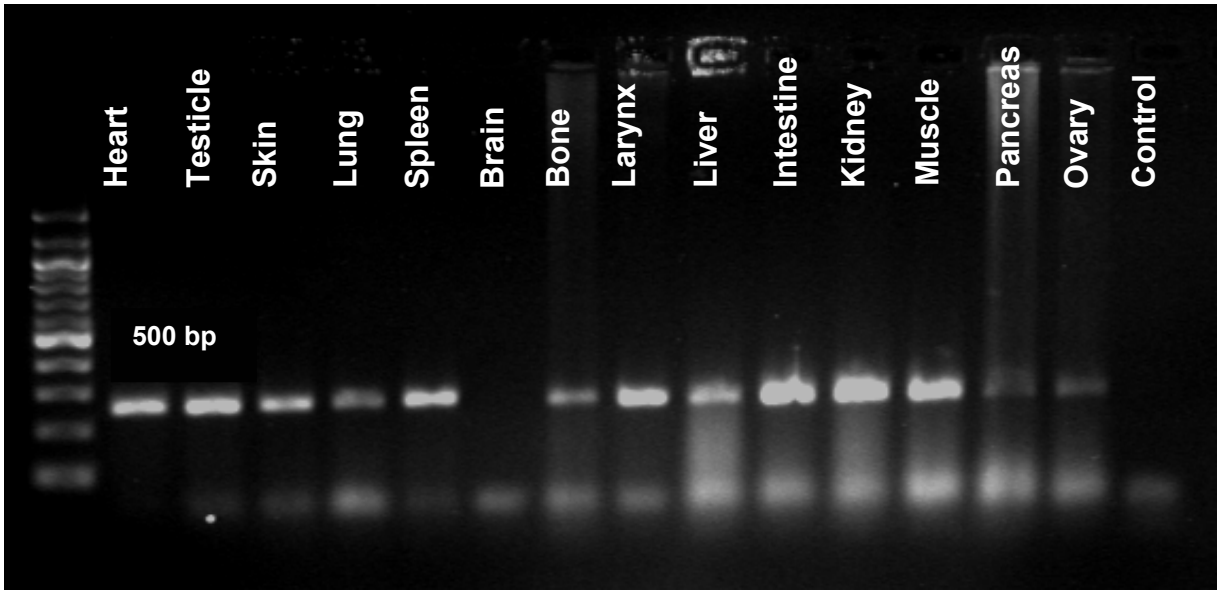


Abb. 3: Ubiquitäre Expression des Transgens bei PHEX-tg-Mäusen. RT-PCR-Untersuchung von DNAse-behandelter RNA aus Niere, Herz, Lunge, Darm, Gehirn, Milz, Haut, Ovarien, Hoden, Muskel, Pankreas, Knochen und Larynx inklusive Schilddrüse und Nebenschilddrüsen von PHEX-tg-Mäusen zeigte eine Expression in allen Organen bis auf das Gehirn. Die verwendeten Primer waren spezifisch für hPHEX.

4.3 Phänotyp der PHEX-tg-Mäuse

Das Körpergewicht der PHEX-tg-Mäuse wies verglichen mit den Wildtyp-Wurfgeschwistern keine Unterschiede auf (Abb. 4A und Tab. 2). Die mittels pQCT gemessene Knochenmineraldichte (BMD) und kortikale Dicke des Femurschaftes, sowie die BMD der distalen Femur-Metaphyse (Abb. 4B-E und Tab. 4 und 5), Knochenhistologie (Abb. 5A und B), Knochenmineralisation (Abb. 5C) und der Mineralhaushalt (Abb. 6A-F und Tab. 2 und 3) waren von denen der Wildtyp-Wurfgeschwister nicht zu unterscheiden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das ubiquitär überexprimierte Transgen keinen Einfluss auf die Knochenmorphologie hat.

4.4 Phänotyp der *Hyp*-Mäuse

4.4.1 Phänotypische Veränderungen

Die *Hyp*-Mäuse waren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen kleinwüchsig und wiesen ein deutlich geringeres Körpergewicht auf (Abb. 4A). Im Alter von drei Wochen waren sie bereits von ihren normalen Wurfgeschwistern durch verkürzte Hinterbeine und einen kürzeren Schwanz zu unterscheiden. Später fiel die Kyphose der Brustwirbelsäule und eine ausgeprägte O-förmige Verbiegung der Femora auf. Die hemizygoten Männchen schienen stärker von den Knochendefekten betroffen zu sein. Die Lebenserwartung der *Hyp*-Mäuse war nicht verkürzt. Die heterozygoten Weibchen waren fruchtbar und zeigten keine Schwierigkeiten bei der Aufzucht ihrer Jungen.

4.4.2 Histologische Knochenuntersuchung

Bei der histologischen Untersuchung der distalen Femora der *Hyp*-Mäuse fiel vor allem das stark vermehrte Osteoid – die unmineralisierte Knochenmatrix – und die völlig unzureichende Mineralisation des Knochens auf. Verglichen mit den Knochenschnitten der Wildtyp-Mäuse konnte keine normale Wachstumsfuge nachgewiesen werden (Abb. 5A und B). Zudem waren um die Osteozyten herum die für *Hyp* charakteristischen Halos zu erkennen (Abb. 5D).
Die eingeschränkte Knochenmineralisation wurde zusätzlich durch die Untersuchung des mit Calcein markierten Knochens in der Fluoreszenzmikroskopie deutlich. Durch die Applikation von Calcein in einem bestimmten zeitlichen Abstand können die sich gerade in Mineralisation befindlichen Knochenoberflächen dargestellt werden. Bei gesunden Tieren erhält man in der Fluoreszenzmikroskopie auf diese Weise eine Doppelmarkierung der Knochenoberfläche. Bei den *Hyp*-Mäusen war der Knochen lediglich diffus markiert (Abb. 5C).

Tab. 2: Körpergewicht und biochemische Parameter im Vollblut und im Serum

Genotyp	KG	ionis. Ca^{2+}	Na^+ Vollblut	K^+ Vollblut	K Serum
	g	mM	mM	mM	mM
WT	23,79 ± 1,72	1,26 ± 0,11	152,86 ± 4,57	4,08 ± 1,07	4,32 ± 0,52
PHEX-tg	24,56 ± 1,67	1,28 ± 0,09	155,27 ± 8,37	4,07 ± 0,59	5,10 ± 3,05
Hyp	17,24# ± 1,89	1,16# ± 0,07	156,53 ± 6,18	4,2 ± 0,64	5,09 ± 2,21
***Hyp*/PHEX-tg**	22,15#* ± 1,39	1,23* ± 0,09	154,73 ± 5,73	4,14 ± 0,78	4,59 ± 1,25
ANOVA	p<0,001	p=0,002	n.s.	n.s.	n.s.

Genotyp	Ca Serum	AST	AP	Ges Bili	CK
	mM	U/l	U/l	µM	U/l
WT	2,22 ± 0,13	146,67 ± 108,05	90,13 ± 22,70	1,20 ± 0,94	66,00 ± 55,50
PHEX-tg	2,33 ± 0,24	90,13 ± 46,20	78,25 ± 20,73	1,50 ± 0,80	51,88 ± 75,78
Hyp	2,13 ± 0,13	103,44 ± 74,19	341,00# ± 93,35	1,84 ± 1,07	100,00 ± 151,75
***Hyp*/PHEX-tg**	2,19 ± 0,14	148,25 ± 116,88	151,88#* ± 40,68	1,74 ± 1,16	72,63 ± 94,41
ANOVA	n.s.	n.s.	p<0,001	n.s.	n.s.

Genotyp	Albumin	Harnstoff	Crea	Phosphat	PTH
	g/l	mM	µM	mM	pg/ml
WT	30,91 ± 2,27	15,83 ± 2,98	14,40 ± 2,03	2,84 ± 0,50	21,11 ± 21,82
PHEX-tg	31,72 ± 1,97	16,32 ± 2,77	12,00 ± 3,50	2,92 ± 0,82	28,17 ± 36,18
Hyp	32,32 ± 2,95	13,45# ± 2,40	13,33 ± 3,52	2,28# ± 0,53	113,09# ± 84,53
***Hyp*/PHEX-tg**	32,02 ± 3,32	13,85# ± 2,92	12,93 ± 3,01	2,33# ± 0,62	75,03# ± 74,73
ANOVA	n.s.	p<0,05	n.s.	p<0,05	p<0,001

Genotyp	$1,25(OH)_2D_3$
	pg/ml
WT	40,64 ± 33,56
PHEX-tg	44,36 ± 32,75
Hyp	33,4 ± 23,93
***Hyp*/PHEX-tg**	45,60 ± 25,31
ANOVA	n.s.

Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n = 15 - 16 pro Gruppe).
* p<0.05 vs. *Hyp*; # p<0.05 vs. Wildtyp;
einfache ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Test.

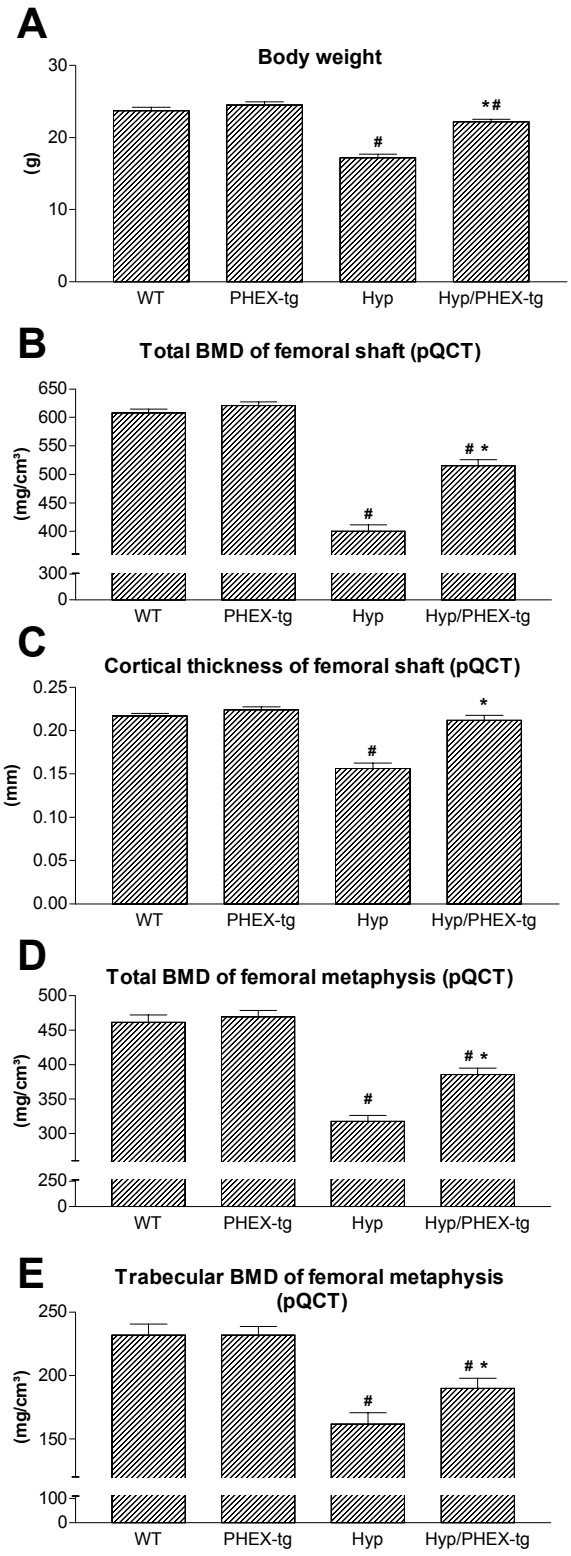


Abb. 4: Normalisierung eines Teils des *Hyp*-Knochen-Phänotyps bei *Hyp*/PHEX-tg-Mäuse
Körpergewicht (**A**), im pQCT gemessene Gesamt-Knochenmineraldichte (BMD) (**B**), Kortikalisdicke des Femurschaftes (**C**), Gesamt- (**D**) und trabekuläre (**E**) Knochenmineraldichte der distalen Femur-Metaphyse bei 3 Monate alten männlichen Wildtyp (WT), PHEX-tg, *Hyp* und *Hyp*/PHEX-tg-Mäusen.

Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler angegeben (n = 15 - 19 pro Gruppe)
* $p<0.05$ vs. *Hyp*;
# $p<0.05$ vs. Wildtyp;
einfache ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Test.

4.4.3 Knochenmineraldichte-Messung

Auch die mit Hilfe des pQCT gemessenen Daten wiesen die mangelnde Knochenmineralisation der *Hyp*-Mäuse nach. Die Gesamt-Knochenmineraldichte (bone mineral density, BMD) des Femurschaftes und der Femur-Metaphyse, sowie die trabekuläre BMD der Metaphyse waren im Vergleich zu den Messungen bei Wildtyp-Wurfgeschwistern deutlich verringert (Abb. 4B-E; Tab. 4 und 5).

4.4.4 Biochemische Parameter in Serum und Urin

Die Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase im Serum der drei Monate alten *Hyp*-Mäuse lag im Vergleich zu normalen Wurfgeschwistern etwa um das Vierfache höher (Abb. 6A und Tab. 2). Das ionisierte Kalzium war bei den *Hyp*-Mäusen erniedrigt (Abb. 6C und Tab. 2). Der Serumphosphat-Spiegel der *Hyp*-Mäuse war verglichen mit dem der Wildtyp-Wurfgeschwister erwartungsgemäß erniedrigt, der PTH-Serumspiegel dagegen stark erhöht (Abb. 6D und F; Tab. 2). Die Serumwerte von $1,25(OH)_2D_3$ waren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen leicht erniedrigt, was jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (Tab. 2)

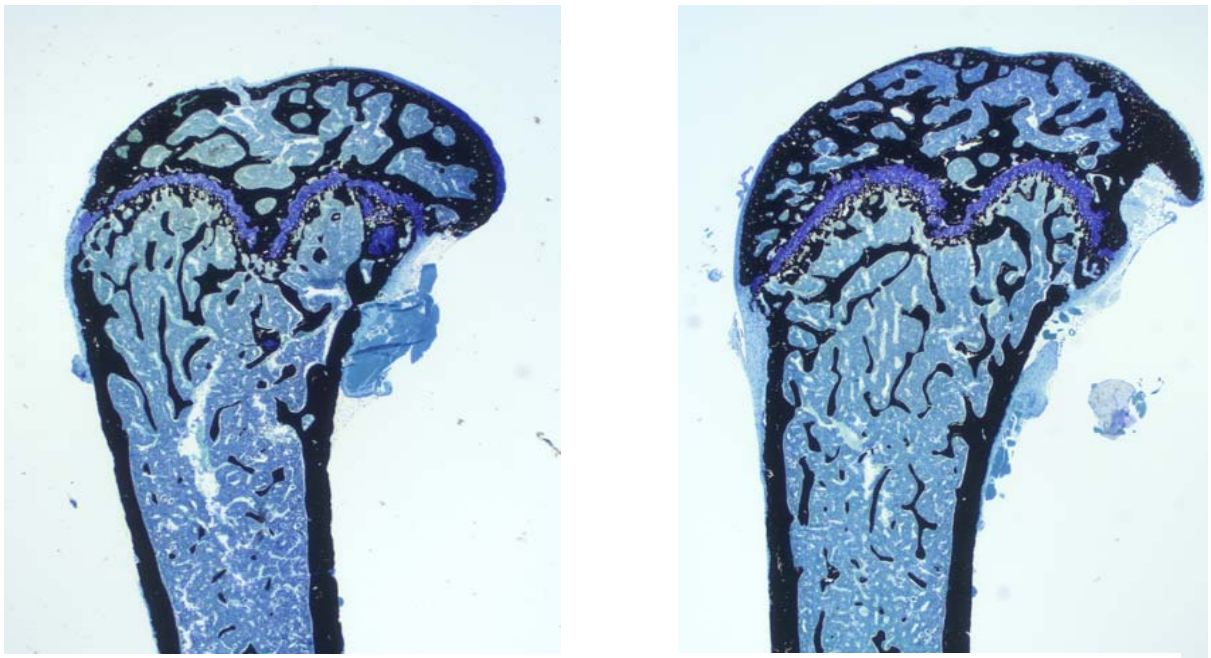
Tab. 3: Biochemische Parameter im Urin

Genotyp	UrCrea	UrNa/Crea	UrCa/Crea	%TRP	%TRCa
	mM	mM/mM	mM/mM	%	%
WT	2,26 ± 1,21	52,28 ± 14,96	1,18 ± 0,82	83,50 ± 8,93	98,46 ± 1,14
PHEX-tg	2,12 ± 1,11	57,95 ± 18,57	1,00 ± 0,47	80,76 ± 7,20	98,99 ± 0,44
Hyp	2,29 ± 0,63	51,83 ± 16,06	1,12 ± 0,50	75,20$^{\#}$ ± 6,67	98,63 ± 0,67
***Hyp*/PHEX-tg**	1,82 ± 0,88	51,95 ± 11,96	0,96 ± 0,53	72,53$^{\#}$ ± 8,73	98,87 ± 0,71
ANOVA	n.s.	n.s.	n.s.	P<0,05	n.s.

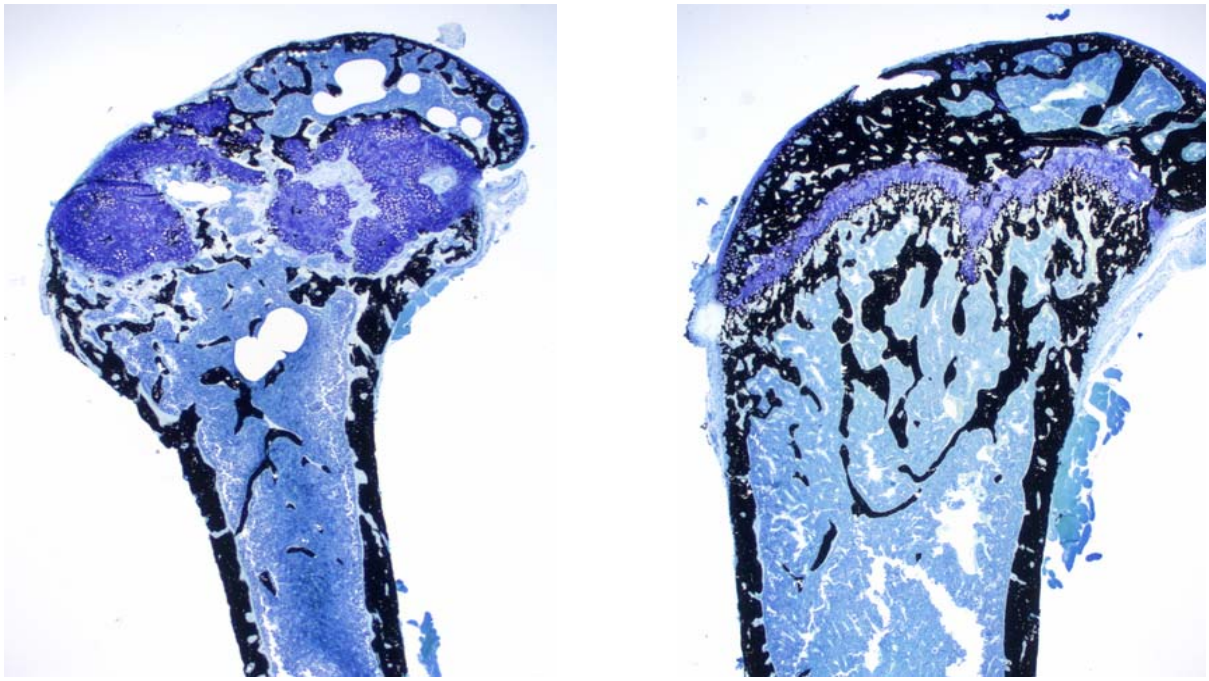
Genotyp	%TRCa^{2+}	DPD/Crea	DPD/24h
	%	mmol/mmol	mmol
WT	97,12 ± 2,23	11,74 ± 7,14	7,98 ± 4,26
PHEX-tg	98,23 ± 0,81	14,47 ± 8,96	8,94 ± 7,90
Hyp	97,50 ± 1,25	59,34$^{\#}$ ± 17,71	36,41$^{\#}$ ± 13,01
***Hyp*/PHEX-tg**	98,02 ± 1,12	22,86$^{\#*}$ ± 9,55	16,77$^{\#*}$ ± 8,48
ANOVA	n.s.	p<0,001	P<0,001

Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 12 - 16 pro Gruppe) angegeben.
p<0.05 vs. *Hyp*; # p<0.05 vs. Wildtyp; einfache ANOVA gefolgt von Student-Newman-Keuls-Test.

Wie zu erwarten lag die renal-tubuläre Reabsorption von Phosphat bei *Hyp*-Mäusen unter der der normalen Wurfgeschwister (Abb. 6A und Tab. 3). Sehr deutlich erhöht war die Deoxypyridinolin-Exkretion der *Hyp*-Mäuse bezogen auf die Creatinin-Exkretion (Abb. 6B).

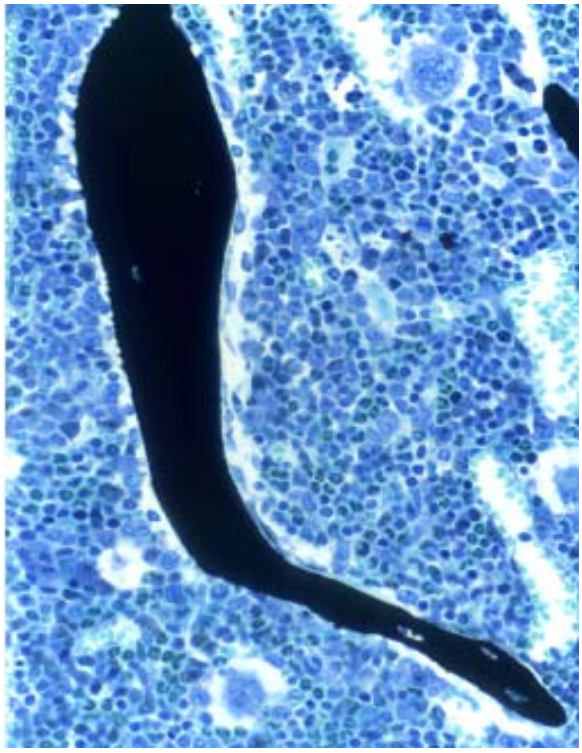


WT **PHEX-tg**

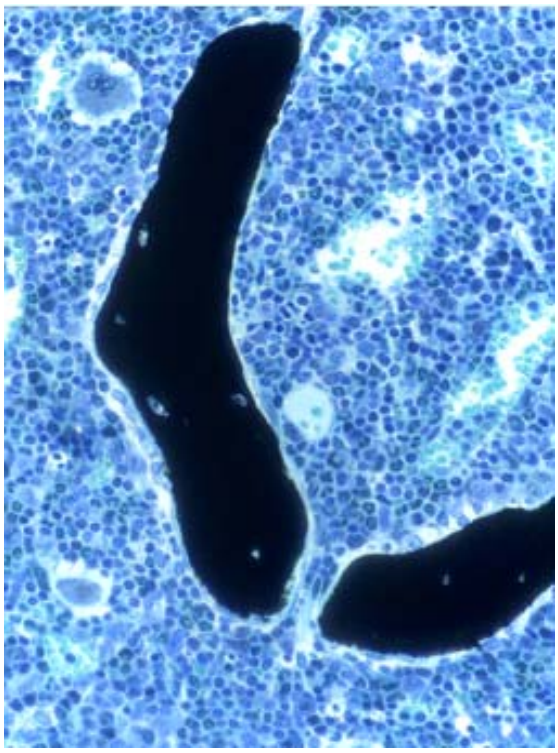


Hyp ***Hyp*/PHEX-tg**

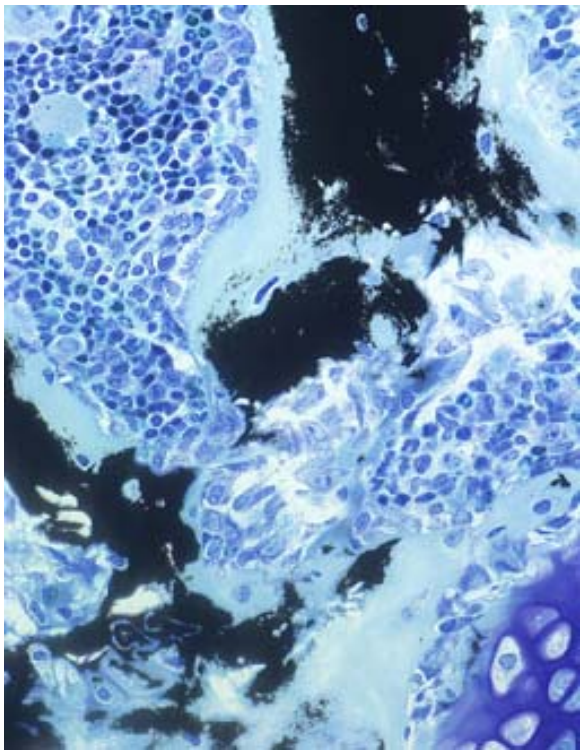
Abb. 5A: Normalisierung der Knochenstruktur bei *Hyp*-Mäusen, die das humane PHEX-Transgen exprimieren. PHEX-tg-Mäuse zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine normale Knochenstruktur des distalen Femurs. Der Knochen-Phänotyp von *Hyp*-Mäusen war durch eine schwere Rachitis charakterisiert. *Hyp*-Mäuse, die das Transgen exprimierten, wiesen eine deutliche Verbesserung der allgemeinen Knochenstruktur und eine normale Wachstumsfuge auf.
3 μm dicke, unentkalkte Schnitte des distalen Femurs von 3 Monate alten männlichen Mäusen, gefärbt nach *von Kossa/McNeal*; 25fache Vergrößerung.



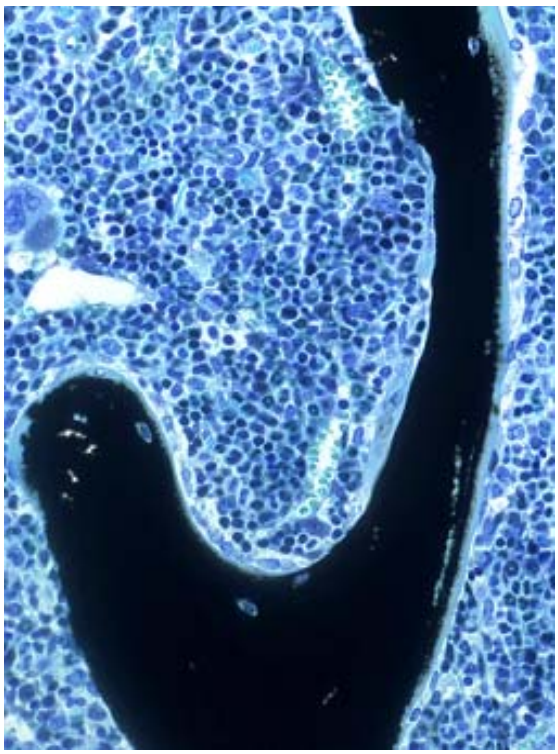
WT



PHEX-tg



Hyp



***Hyp*/PHEX-tg**

Abb. 5B: Bei stärkerer Vergrößerung erkannte man in der sekundären Spongiosa der distalen Femur-Metaphyse einen normalen Knochenturnover bei Wildtyp- und PHEX-tg-Mäusen, aber eine schwere Osteoidose bei *Hyp*-Mäusen. *Hyp*/PHEX-tg-Mäuse zeigten im Vergleich zu *Hyp*-Kontrolltieren eine deutliche Verminderung des Osteoid-Volumens.
3 μm dicke, unentkalkte Schnitte des distalen Femurs von 3 Monate alten männlichen Mäusen, gefärbt nach *von Kossa/McNeal*; 400fache Vergrößerung.

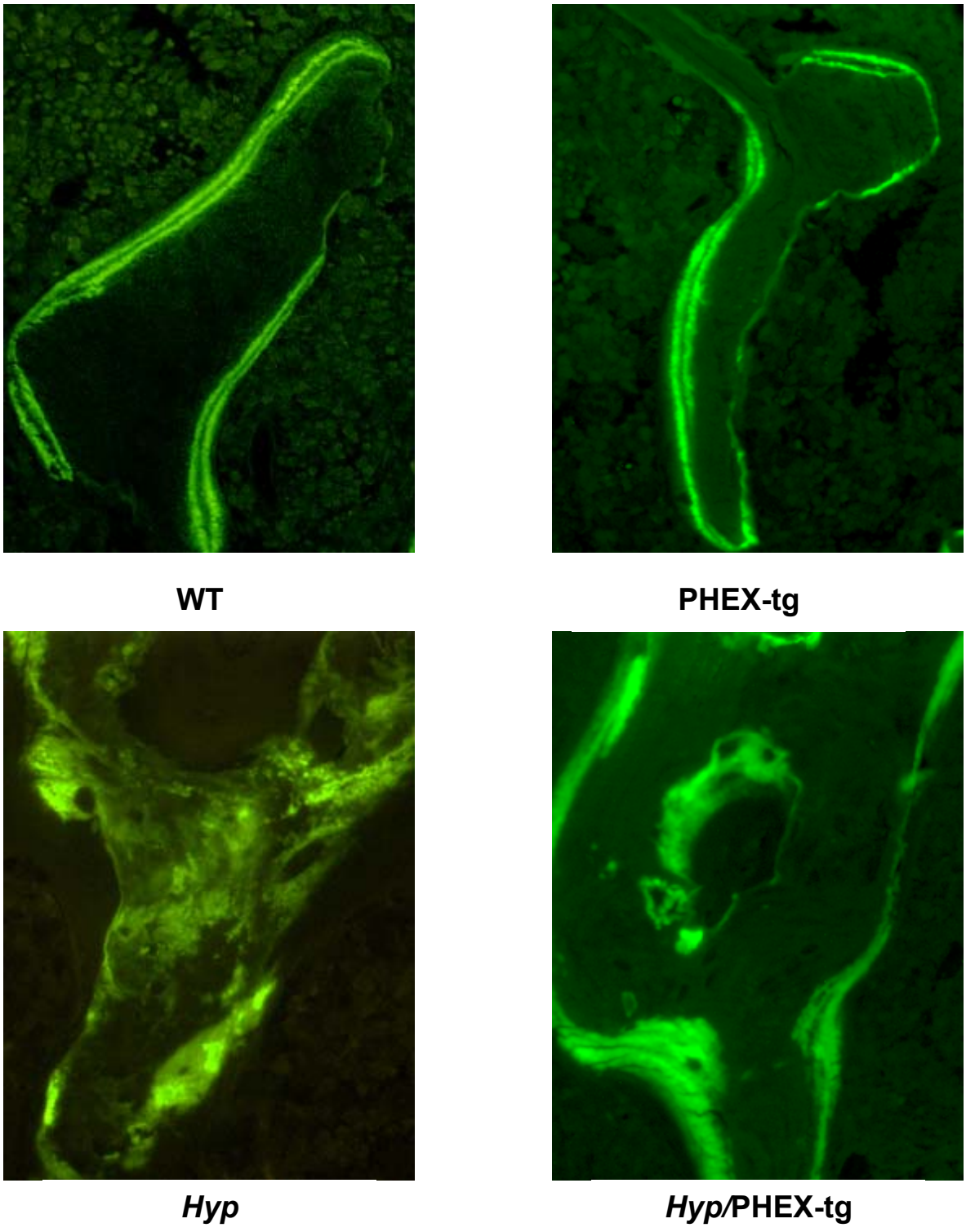
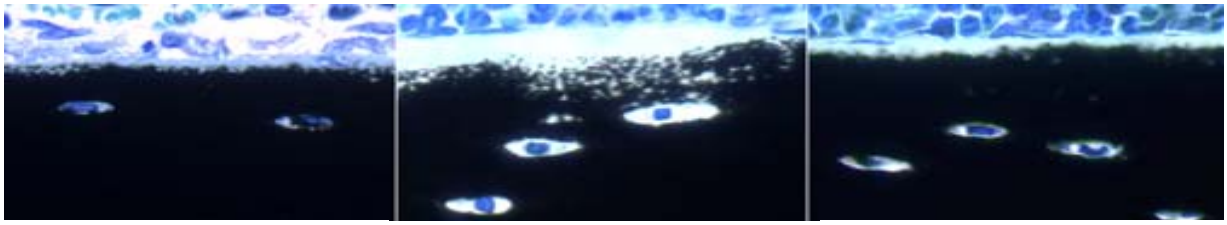


Abb. 5C:. Eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der in vivo verabreichten Calcein-Doppelmarkierung zeigte eine normale Knochenmineralisation in Form von grün fluoreszierenden Doppelbanden bei Wildtyp- und PHEX-tg-Mäusen. Aufgrund des Mineralisierungsdefekts erkannte man bei *Hyp*-Mäusen nur eine diffuse Markierung mit Calcein. Bei *Hyp*/PHEX-tg-Mäusen war die Calcein-Einlagerung wesentlich geordneter als bei *Hyp*-Tieren, jedoch zeigte das Fehlen einer deutlichen Calcein-Doppelmarkierung eine immer noch eingeschränkte Knochenmineralisation an.
3 μm dicke, unentkalkte und ungefärbte Schnitte des distalen Femurs von 3 Monate alten männlichen Mäusen. Epifluoreszenz unter Blau-Anregung. 400fache Vergrößerung.



WT ***Hyp*** ***Hyp*/PHEX-tg**

Abb. 5D: Die abnormalen Halos um die Osteozyten von *Hyp*-Mäusen herum waren bei *Hyp*/PHEX-tg-Mäusen deutlich verbessert.
3 μm dicke, unentkalkte Schnitte des distalen Femurs von 3 Monate alten männlichen Mäusen, gefärbt nach *von Kossa/McNeal*; 1000fache Vergrößerung.

4.5 Phänotyp der *Hyp*/PHEX-tg-Mäuse

4.5.1 Phänotypische Veränderungen

Hyp-Mäuse, die das humane PHEX-Transgen exprimierten, zeigten verglichen mit Wildtyp-Mäusen ein nahezu normales Körpergewicht (Abb. 4A und Tab. 2). Die Tiere waren etwas kleiner als die Wildtyp-Wurfgeschwister, der charakteristische Phänotyp von *Hyp*-Mäusen konnte bei den *Hyp*/PHEX-tg-Tieren jedoch nicht festgestellt werden.

4.5.2 Histologische Knochenuntersuchung

Im Vergleich zu *Hyp*-Mäusen konnte in der histologischen Untersuchung von Knochenschnitten der unentkalkten, in Methylmethacrylat eingebetteten Femora deutliche Verbesserungen der Knochenstruktur nachgewiesen werden. Der Knochenaufbau und die Epiphysenfugen waren nahezu normal, die Osteoidose war deutlich verbessert (Abb. 5A und B). Ferner waren die Halos rings um die *Hyp*-Osteozyten so gut wie nicht mehr nachzuweisen (Abb. 5D). Die Knochenmineralisation, die durch die Calcein-Doppelmarkierung dargestellt werden kann, blieb jedoch eingeschränkt, was durch das Fehlen deutlich voneinander getrennter Calcein-Doppellinien im trabekulären und kortikalen Knochen der distalen Femur-Metaphyse deutlich wurde (Abb. 5C).

4.5.3 Knochenmineraldichte-Messung

Die Ergebnisse der pQCT-Messungen ergaben für die *Hyp*/PHEX-tg-Mäuse eine deutlich verbesserte, wenn auch im Vergleich zu den Wildtyp-Wurfgeschwistern noch reduzierte, Knochenmineraldichte (Abb. 4A-E und Tab. 4 und 5). Im Vergleich zu *Hyp*-Mäusen wiesen

die Gesamt-BMD-Werte des Femurschaftes einen Anstieg um 29% und die Gesamt-BMD-Messungen der Femur-Metaphyse einen Anstieg um 21% auf. Folglich konnte das Transgen bei *Hyp*-Mäusen 55% der BMD-Reduktion am Femurschaft und 47% der BMD-Reduktion an der Femur-Metaphyse ausgleichen. Die Kortikalisdicke des Femurschaftes wurde bei *Hyp*-Mäusen durch das Transgen völlig normalisiert (Abb. 4C)

4.5.4 Biochemische Parameter in Serum und Urin

Übereinstimmend mit dem nahezu normalen Knochen-Phänotyp der *Hyp*/PHEX-tg-Mäuse waren die biochemischen Parameter des Knochenstoffwechsels, also zum Beispiel die Alkalische Phosphatase im Serum und die Deoxypyridinolin (DPD)-Exkretion im Urin, im Vergleich zu *Hyp*-Mäusen deutlich reduziert (Abb. 6A und B). Interessanterweise konnte durch das PHEX-Transgen der Blutspiegel des ionisierten Kalziums bei *Hyp*-Mäusen fast normalisiert werden (Abb. 6C). *Hyp*-Mäuse und *Hyp*/PHEX-tg-Mäuse zeigten jedoch, trotz der ausgeprägten Verbesserungen des Knochen-Phänotyps der *Hyp*/PHEX-tg-Tiere, eine ähnlich stark verminderte tubuläre Phosphatreabsorption (Abb. 6E und Tab. 3) und waren im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen hypophosphatämisch (Abb. 6D). Die Serum-PTH-Werte zeigten keinen Unterschied zu *Hyp*-Mäusen, waren folglich verglichen mit Wildtyp-Kontrollen stark erhöht (Abb. 6F). Wir konnten auch keine Unterschiede in der renal-tubulären Reabsorption von Kalzium (TRCa) im Vergleich der unterschiedlichen Gruppen feststellen, unabhängig davon, ob wir ionisierte Kalzium- oder Gesamtkalziumwerte aus dem Serum zur Kalkulation heranzogen (Tab. 3). Im Vergleich zu *Hyp*-Mäusen waren die Serumwerte von $1,25(OH)_2D_3$ leicht erhöht (Tab. 2). Dieser Unterschied erlangte jedoch keine statistische Signifikanz.

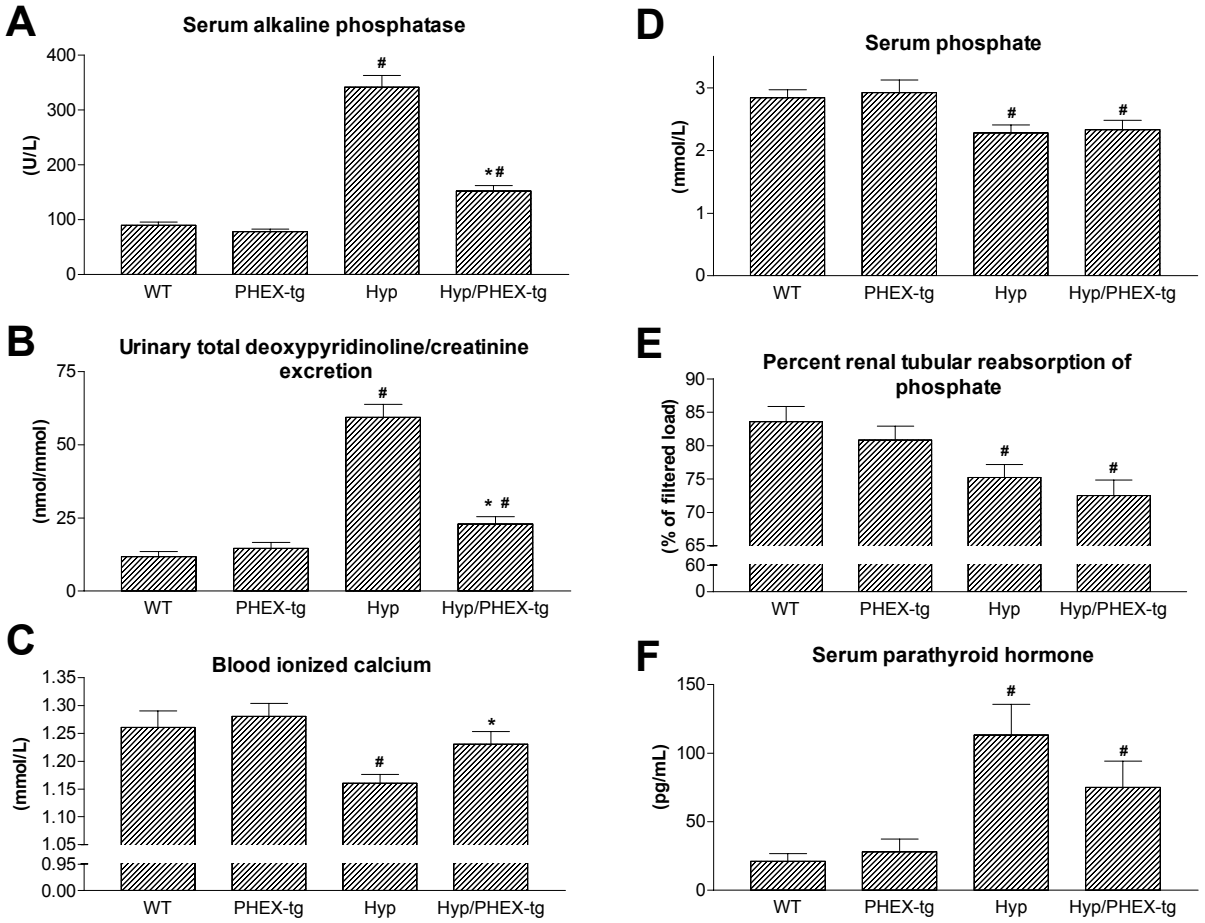


Abb. 6: Das humane PHEX-Transgen normalisierte zum Teil die biochemischen Parameter des Knochenstoffwechsels und das ionisierte Kalzium im Blut, jedoch nicht den renalen Phosphatverlust bei *Hyp*-Mäusen. Alkalische Phosphatase im Serum (**A**), Deoxypyridinolin-Ausscheidung im Urin (DPD) (**B**), ionisiertes Kalzium im Blut (**C**), Serumphosphat (**D**) und renal-tubuläre Reabsorption von Phosphat (**E**) bei 3 Monate alten männlichen Wildtyp- (WT), PHEX-tg-, *Hyp*- und *Hyp*/PHEX-tg-Mäusen. Die PTH-Werte im Serum blieben bei *Hyp*/PHEX-tg-Tieren erhöht (**F**).
Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler angegeben (n = 12 - 16 pro Gruppe).
* $p<0.05$ vs. *Hyp*; # $p<0.05$ vs. Wildtyp; einfache ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Test.

Tab. 4: Knochenmineraldichte-Messung der Femur-Metaphyse

Genotyp	Total Density	Cortical&subcort. Density	Trabecular Density	Total Area	Trabecular Area	Cortical&subcort. Area
Einheit	(mg/cm³)	(mm²)	(mg/cm³)	(mm²)	(mg/cm³)	(mm²)
WT	461.58 ± 42.89	729.96 ± 31.38	232.21 ± 35.27	3.79 ± 0.32	2.00 ± 0.27	1.79 ± 0.25
PHEX-tg	469.85 ± 40.13	741.45 ± 22.56	232.39 ± 29.76	3.94 ± 0.44	2.06 ± 0.28	1.88 ± 0.29
Hyp	318,24# ± 34.62	562,98# ± 69.04	162,14# ± 36.48	5,26# ± 0.82	3,14# ± 0.53	2,19# ± 0.38
***Hyp*/PHEX-tg**	386,07#* ± 37.21	660,64#* ± 33.76	190,08#* ± 32.47	5,24# ± 0.55	2,99# ± 0.25	2,24# ± 0.42
ANOVA	p<0,001	p=0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001

Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n = 15 - 19 pro Gruppe).
* p<0.05 vs. *Hyp*; # p<0.05 vs. Wildtyp;
einfache ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Test.

Tab. 5: Knochenmineraldichte-Messung des Femurschaftes

Genotyp	Total density	Total area	Cortical density	Cortical area	Cortical thickness	Periostal perimeter	Endocortical perimeter
Einheit	(mg/cm³)	(mm²)	(mg/cm³)	(mm²)	(mm)	(mm)	(mm)
WT	608.86 ± 28.45	2.15 ± 0.18	1146.02 ± 31.40	0.98 ± 0.08	0.22 ± 0.01	5.19 ± 0.21	3.82 ± 0.18
PHEX-tg	622.82 ± 28.68	2.24 ± 0.24	1163.77 ± 32.19	1.03 ± 0.11	0.22 ± 0.15	5.3 ± 0.29	3.89 ± 0.23
Hyp	400,94# ± 45.22	2.21 ± 0.36	870,05# ± 38.62	0,75# ± 0.16	0,16# ± 0.03	5.26 ± 0.41	4,27# ± 0.35
***Hyp*/PHEX-tg**	516,09#* ± 42.7	2,65#* ± 0.26	1045,59#* ± 39.93	1,08* ± 0.15	0,21* ± 0.02	5,77#* ± 0.29	4.43# ± 0.21
ANOVA	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001

Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n = 15 - 19 pro Gruppe).
* p<0.05 vs. *Hyp*; # p<0.05 vs. Wildtyp;
einfache ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Test.

5 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde der Frage nachgegangen, ob eine ubiquitäre Expression von humanem PHEX bei transgenen Mäusen den Phänotyp von *Hyp*-Mäusen wieder normalisieren kann. Für unsere Untersuchungen kreuzten wir *Hyp*-Mäuse, die das murine Homolog zu Patienten mit X-chromosomal vererbter hypophosphatämischer Rachitis (XLH) darstellen und eine durch spontane Mutation entstandene Deletion im 3'-Ende des *Phex*-Gens in sich tragen, mit transgenen Mäusen, die das humane PHEX-Gen unter der Kontrolle des humanen β-actin Promotors ubiquitär exprimieren. Durch Anpaarung von heterozygoten *Hyp*-Weibchen mit heterozygoten PHEX-tg-Männchen erhielten wir Wildtyp-, PHEX-tg-, *Hyp*- und *Hyp*/PHEX-tg-Wurfgeschwister, von denen wir die männlichen Mäuse im Alter von drei Monaten untersuchten. Als Untersuchungsparameter wurden Blut- und Urinparameter, Knochenmineraldichte-Messungen und histologische Untersuchungen der Knochen herangezogen.

5.1 Phänotyp der PHEX-tg Mäuse

Die generierten PHEX-transgenen Mäuse, die humanes PHEX ubiquitär exprimieren, unterschieden sich phänotypisch nicht von Wildtyp-Mäusen in unserer Studie. Dies entspricht der Vorstellung der Funktion des PHEX-Gens, einer Endopeptidase, dass es sein(e) Substrat(e) aktiviert oder inaktiviert, und eine PHEX-Überexpression den Knochen- und Mineralhaushalt deshalb nicht beeinflusst. Diese Beobachtungen gehen konform mit den Ergebnissen früherer Experimente, bei denen Mäuse das PHEX-Gen gezielt in Osteoblasten überexprimierten. Hier konnten ebenfalls keine Veränderungen der Knochenmorphologie oder der Serumphosphatwerte im Vergleich zu nicht-transgenen normalen Mäusen festgestellt werden (BAI et al., 2002; LIU et al., 2002).

Die Expression des Transgens wiesen wir mit Hilfe von Reverser Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) nach. Mit Hilfe der RT-PCR konnte eine Expression in allen untersuchten Organen, außer dem Gehirn, festgestellt werden. Die Northern Blot-Analyse verlief jedoch negativ, ein Ergebnis, das damit erklärt werden kann, dass man mit der RT-PCR Transkripte nachweisen kann, die in einer wesentlich niedrigeren Anzahl vorliegen.
Die niedrige Expression des Transgens in allen untersuchten Organen unserer transgenen Mäuse trotz des verwendeten starken humanen β-actin Promotors ist schwer zu erklären. β-actin ist ein ubiquitär exprimiertes Gen, das relativ stark in allen Geweben exprimiert wird. Mit Hilfe des gleichen Promotor-Konstrukts erhielt man für andere Gene in transgenen Mäusen gute Expressionsergebnisse (DYMECKI, 1996).

Möglicherweise wird die PHEX-Expression in den transgenen Mäusen durch posttranskriptionale Gene-silencing-Mechanismen herunterreguliert. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass das humane wie auch das murine PHEX/*Phex*-Gen keine typischen Kozak-Sequenzen wie 97% aller bekannten Gene enthalten. Damit gehört es zu den 3% von Genen, die im Translations-Start-Bereich kein Purin an der -3 Position aufweisen. Von letzteren Genen wird angenommen, dass sie posttranskriptional reguliert werden (KOZAK, 1996; LIU et al., 2001).

5.3 Phänotyp der *Hyp*-Mäuse

Der Phänotyp der *Hyp*-Mäuse in unserer Studie stimmte erwartungsgemäß mit dem in der Literatur beschriebenen überein.
Hyp-Mäuse konnten schon zum Zeitpunkt des Absetzens eindeutig anhand des geringeren Körpergewichts, der kürzeren Hinterbeine und des kürzeren Schwanzes von ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern unterschieden werden. Mit zunehmendem Alter wurden die Unterschiede ausgeprägter, es traten zusätzlich eine Kyphose der Brustwirbelsäule und eine deutliche Verbiegung der Femora bei den *Hyp*-Mäusen auf. Dieselben Beobachtungen machten EICHER et al. (1976) bei der Beschreibung der *Hyp*-Mäuse als Modell für XLH beim Menschen. Wie auch bei EICHER et al. (1976) beschrieben, schienen die männlichen *Hyp*-Mäuse von der Erkrankung schwerer betroffen zu sein als die weiblichen. Die weiblichen heterozygoten *Hyp*-Mäuse waren fruchtbar und zur Aufzucht ihrer Jungen in der Lage.

Wie zu erwarten, waren die Serumphosphatwerte der *Hyp*-Mäuse erniedrigt und die prozentuale renal-tubuläre Phosphatreabsorption verringert, was auf einem Defekt im proximalen Tubulusabschnitt der *Hyp*-Mäuse beruht, der zur verringerten Reabsorption von Phosphat führt (GIASSON et al., 1977; TENENHOUSE und SCRIVER, 1978). Ein biochemischer Parameter der Knochenresorption, die Deoxypyridinolin-Exkretion im Urin, lag bei den *Hyp*-Mäusen wesentlich höher als bei den Wildtyp-Wurfgeschwistern. Eine weitere Folge des erhöhten Knochenumsatzes bei Rachitis war der im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen etwa vierfach erhöhte Serumwert der Alkalischen Phosphatase. Das ionisierte Kalzium im Blut war bei unseren *Hyp*-Mäusen erniedrigt. Dies kann möglicherweise Folge der etwas niedrigeren $1,25(OH)_2D_3$-Werte bei diesen Tieren gewesen sein. Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit Ergebnissen in der Literatur, nach denen $1,25(OH)_2D_3$-Serumspiegel angesichts der Hypophosphatämie bei *Hyp* unverhältnismäßig niedrig waren (TENENHOUSE und JONES, 1990; TENENHOUSE et al., 1992) und auf einer eingeschränkten Aktivität der 25-Hydroxyvitamin D_3-1α-Hydroxylase beruhen (TENENHOUSE, 1984; NESBITT et al., 1986).

Interessanterweise lagen die PTH-Serumwerte unserer *Hyp*-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Wurfgeschwistern mehr als fünfmal höher. Dies legt einen Einfluss von PTH auf das Krankheitsbild von *Hyp* nahe. EICHER et al. (1976) konnten in früheren Untersuchungen keine erhöhten PTH-Werte bei *Hyp*-Mäusen messen. Diese Diskrepanz ist möglicherweise anhand der verbesserten PTH-Assays heutzutage zu erklären. Bei XLH-Patienten wurden normale (ARNAUD, 1971) bis hohe (LEWY et al., 1972) PTH-Serumwerte festgestellt (siehe unten).
Auch die Messung der Knochenmineraldichte mittels peripherer quantitativer Computertomographie stellte eindrucksvoll den Knochendefekt der *Hyp*-Mäuse dar. Die Gesamt-Knochenmineraldichte von Femurschaft, Femur-Metaphyse und Spongiosa der Metaphyse, als auch die Kortikalisdicke des Femurschaftes waren bei *Hyp*-Mäusen aufgrund der Mineralisationsstörung stark erniedrigt.
Eine Osteoidose in trabekulärem und kortikalem Knochen unserer *Hyp*-Mäuse wurde in den Knochenschnitten histologisch anhand des stark vermehrten Osteoids festgestellt. Diese Befunde sind charakteristisch für XLH-Patienten (ALBRIGHT et al., 1937; FROST, 1958; MARIE und GLORIEUX, 1981). In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen konnten wir bei der histologischen Untersuchung auch die für XLH typische Halo-Bildung um die Osteozyten nachweisen (FROST, 1958; VILLANUEVA et al., 1961; MARIE und GLORIEUX, 1983). Diese Läsionen sind ebenfalls auf eine eingeschränkte Knochenmineralisation zurückzuführen. Zusätzlich konnte der Mineralisationsdefekt durch die Calcein-Doppelmarkierung und die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop deutlich gemacht werden. Bei *Hyp*-Mäusen konnte keine fluoreszierende Doppelmarkierung der Knochenoberfläche nachgewiesen werden, wie es bei Wildtyp-Kontrolltieren der Fall war. Der Defekt der Knochenmineralisation bei Hyp-Mäusen und XLH-Patienten ist mit hoher Wahrscheinlichkeit einerseits Folge der Hypophosphatämie und andererseits eines intrinsischen Osteoblastendefekts (ECAROT et al., 1992; XIAO et al., 1998).

5.4 Weitgehende Normalisierung des *Hyp*-Phänotyps bei *Hyp*/PHEX-tg-Mäusen

In vorangegangenen Experimenten von LIU et al. (2002), in denen das PHEX-Gen durch den Osteocalcin-Promotor gezielt in Osteoblasten von *Hyp*-Mäusen überexprimiert wurde, konnten der Knochendefekt und der gestörte Phosphathaushalt nicht beseitigt werden. Durch die Verwendung des Maus Pro-α1(I) Kollagen Gen Promotors zur gezielten Expression von PHEX in den Osteoblasten konnte die gestörte Mineralisation von Knochen und Zähnen bei *Hyp*-Mäusen zwar deutlich verbessert werden, die Hypophosphatämie und die Störungen im Vitamin D-Stoffwechsel blieben jedoch bestehen (BAI et al., 2002).

In unserer Arbeit konnten wir nun aufzeigen, dass eine ubiquitäre Überexpression von PHEX den Knochen-Phänotyp von *Hyp*-Mäusen weitgehend normalisieren kann.
Das Körpergewicht der *Hyp/*PHEX-tg Mäuse war annähernd normal, sie zeigten eine erstaunliche Verbesserung der Knochenmineraldichte des Femurs, normale Wachstumsfugen und eine fast normale Knochenstruktur, einschließlich der Beseitigung der Halo-Bildung rings um die Osteozyten. Auch eine Hypokalzämie war bei den *Hyp/*PHEX-tg Mäusen fast nicht mehr feststellbar. Der renale Phosphatverlust blieb jedoch weiterhin bestehen, was eventuell auf die nach wie vor erhöhten PTH-Serumspiegel zurückgeführt werden kann.
Es ist denkbar, dass die bei den *Hyp/*PHEX-tg Mäusen noch feststellbaren Mineralisationsdefekte mit der bei diesen Tieren bestehenden Hypophosphatämie erklärt werden können, und dass die *Hyp*-phänotypischen Veränderungen der Knochenzellen oder –matrix völlig aufgehoben wurden. Dies ist auch damit vereinbar, dass bei den *Hyp/*PHEX-tg Mäusen eine normale Knochenstruktur, jedoch eine eingeschränkte Knochenmineralisation festgestellt werden konnte.

Da wir eine Expression des PHEX-Gens bei unseren transgenen Mäusen in allen untersuchten Geweben – außer im Gehirn – nachweisen konnten, ist es schwierig zu erklären, warum die Hypophosphatämie bei den *Hyp/*PHEX-tg Tieren durch die Überexpression nicht beseitigt werden konnte.
Da auf DNA-Ebene eine 91%ige und auf Protein-Ebene sogar eine 96%ige Übereinstimmung zwischen dem humanen und murinen Gen ermittelt wurde (STROM et al., 1996; BECK et al., 1997), ist eine volle Funktionalität des humanen PHEX in der Maus sehr wahrscheinlich.
Es ist anzunehmen, dass bei XLH/*Hyp* zwei unabhängig voneinander auftretende Phänomene zu den Krankheitsbildern führen: Zum einen die eingeschränkte renale Reabsorption von Phosphat in der Niere, ausgelöst durch ein nicht inaktiviertes phosphaturisches Hormon, und zum anderen die charakteristischen Knochendefekte, die durch einen intrinsischen Osteoblastendefekt (XIAO et al., 1998) ausgelöst werden. Die Ergebnisse unserer Versuche könnten darauf beruhen, dass das humane PHEX zwar in der Lage ist, das murine, zum Knochendefekt führende, Homolog zu inaktivieren, jedoch den die Phosphaturie verursachenden zirkulierenden Faktor nicht, oder nur unzureichend, zu inaktivieren vermag. Dies deutet darauf hin, dass PHEX physiologischerweise mehrere unterschiedliche Substrate in möglicherweise unterschiedlichen Geweben inaktiviert. Dafür spricht auch die schon früh festgestellte Tatsache, dass bei manchen von XLH betroffenen Frauen zwar ein renaler Phosphatverlust, jedoch keine Defekte am Skelett nachweisbar waren (WINTERS et al., 1958). Wäre der charakteristische Knochen-Phänotyp ausschließlich eine Folge der Hypophosphatämie, müssten auch bei diesen Frauen Knochenveränderungen feststellbar sein.

Da wir die Gewebsverteilung des überexprimierten PHEX-Proteins nicht kennen, könnte der Einwand erhoben werden, dass die Expression auf Proteinebene möglicherweise nicht ubiquitär ist und dass dies ursächlich für die nicht vollständige Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps bei *Hyp*/PHEX-tg Mäusen sei.
Die Verbesserung des Knochenphänotyps bei *Hyp/*PHEX-tg-Mäusen ist allerdings in unserer Untersuchung deutlicher ausgeprägt als bei alleiniger Überexpression von PHEX in Osteoblasten (BAI et al., 2002), obwohl bei letzterer eine höhere Expression nachgewiesen werden konnte. Daraus kann man ableiten, dass die PHEX-Expression in unseren transgenen Mäusen auf Proteinebene ausreichend ist, um den Knochenphänotyp weitgehend zu normalisieren. Auch ohne Kenntnis der Expression auf Proteinebene sind unsere Ergebnisse somit nur sehr schwer mit der Vorstellung vereinbar, dass die Störung der Knochenmineralisation und der renale Phosphatverlust bei Hyp-Mäusen durch ein und denselben Faktor ausgelöst werden. Deshalb stärken unsere Befunde die Hypothese, dass mehrere unterschiedliche Faktoren an der Pathogenese von XLH und *Hyp* beteiligt sein müssen.

Eine weitere interessante Erkenntnis aus unserer Studie ist außerdem, dass die Serumwerte des ionisierten Kalziums bei unseren *Hyp/*PHEX-tg Mäusen beinahe im Normalbereich lagen. Es wird angenommen, dass die niedrigen Kalziumwerte bei *Hyp*-Mäusen aus einer verminderten Kalziumabsorption im Dünndarm aufgrund unverhältnismäßig niedriger $1,25(OH)_2D_3$-Serumwerte resultieren (MEYER et al., 1987). Auf eine exogene Verabreichung von $1,25(OH)_2D_3$ reagieren *Hyp*-Mäuse mit einer normal gesteigerten intestinalen Kalziumabsorption (MEYER und MEYER, 1988). Da bei unseren *Hyp/*PHEX-tg Tieren das renale Kalziumhandling und die $1,25(OH)_2D_3$-Werte denen von *Hyp*-Mäusen entsprachen, ist die Normalisierung der ionisierten Kalziumwerte nicht anhand dieser Vorstellung zu erklären. Ausgehend von unseren Ergebnissen wäre es denkbar, dass PHEX auch an der intestinalen Kalziumabsorption direkt oder indirekt beteiligt ist.

Ebenfalls bemerkenswert an unserer Studie ist, dass die PTH-Serumkonzentration der *Hyp*/PHEX-tg-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp- und PHEX-tg Mäusen erhöht waren. Dies kann jedoch nicht auf eine Hypokalzämie als Auslöser zurückzuführen sein, da die Serumspiegel von ionisiertem Kalzium fast normalisiert waren.
Der Nachweis der Expression von PHEX in den Nebenschilddrüsen von XLH-Patienten (BLYDT-HANSEN et al., 1999) und die Feststellung eines Hyperparathyreoidismus bei mehreren Patienten, die noch keine Phosphat- und Calcitriol-Therapie erhielten (LEWY et al., 1972; CARPENTER et al., 1994; KNUDTZON et al., 1995), führten zu der Annahme, dass von der Phosphat-Therapie unabhängige Faktoren, wie eine primäre Nebenschilddrüsen-Dysregulation, zum Hyperparathyreoidismus bei XLH führen.

Die Tatsache, dass das PHEX-Gen zur Spaltung von exogen zugeführtem PTH in der Lage ist (LIPMAN et al., 1998), könnte bedeuten, dass PHEX in noch ungeklärter Weise an der Inaktivierung von PTH beteiligt ist. Ein Funktionsverlust dieser Endopeptidase könnte folglich in erhöhten PTH-Spiegeln resultieren. *Hyp*-Mäuse reagierten auf eine vollständige Entfernung der Nebenschilddrüsen mit niedrigeren Phosphat-Spiegeln, Hypokalzämie und einer reduzierten renalen Phosphatexkretion, die jedoch im Vergleich zu normalen, gesunden Mäusen weiterhin erhöht blieb (KIEBZAK et al., 1981). In Parabiose-Versuchen mit parathyreoidektomierten (PTX) Mäusen war die Phosphatreabsorption der Nieren normaler PTX-Mäuse, die chirurgisch mit *Hyp*-PTX-Mäusen verbunden wurden, weiterhin reduziert (MEYER et al., 1989b). Die Phosphaturie kann demnach nicht ausschließlich durch PTH verursacht werden. In unserer Studie könnte eine Ursache für die nach wie vor erhöhte renale Phosphatausscheidung der *Hyp*/PHEX-tg-Mäuse in den erhöhten PTH-Spiegel dieser Tiere liegen. Es ist derzeit unklar, warum die Überexpression von humanem PHEX – trotz Normalisierung des ionisierten Kalziums – nicht zu einer Erniedrigung der PTH-Spiegel bei *Hyp*/PHEX-tg-Mäusen führte. Möglicherweise ist humanes PHEX nicht in ausreichendem Maße dazu fähig, murines PTH zu inaktivieren. Trotz dieser Unklarheiten unterstützt unsere Studie die Auffassung, dass eine Dysregulation der PTH-Sekretion an der Pathogenese von XLH und *Hyp* beteiligt ist.

5.5 Ausblick

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass eine ubiquitäre Expression des humanen PHEX-Transgens den *Hyp*-Knochenphänotyp weitgehend normalisieren kann, jedoch nicht den renalen Phosphatverlust. Dieser Versuch stellt somit einen weiteren Schritt zur Identifizierung derjeniger Faktoren dar, die zusätzlich zu PTH und Calcitriol die Phosphathomöostase regulieren.

Die Aufklärung dieser Mechanismen könnte in der Human- und Tiermedizin zu wichtigen Fortschritten bei der Erkennung und Behandlung von Krankheiten, die mit einer Störung der Phosphat-Regulation verbunden sind, führen.

6 Zusammenfassung

Mutationen des PHEX-Gens, eines phosphatregulierenden Gens, das Homologien zu Endopeptidasen auf dem X-Chromosom aufweist, sind für die Entstehung der X-chromosomal vererbten Hypophosphatämie (XLH) beim Menschen und der homologen Krankheiten der beiden Mausmutanten *Hyp* und *Gy* verantwortlich. Kürzlich wurde nachgewiesen, dass eine gezielte Überexpresssion von PHEX in Osteoblasten für die Normalisierung des *Hyp*-Phänotyps nicht ausreicht. Somit war es das Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, ob eine ubiquitäre Überexpression von PHEX in *Hyp*-Mäusen deren Phänotyp völlig normalisieren kann. Um diese Hypothese zu überprüfen, generierten wir zwei Mauslinien, die beide das humane PHEX-Gen unter Kontrolle des humanen β-actin-Promotors überexprimieren. Wir wiesen bei diesen transgenen Mäusen (PHEX-tg) mittels RT-PCR-Analyse eine Expression des Transgens in allen untersuchten Organen, außer im Gehirn, nach. Im Anschluss daran paarten wir weibliche heterozygote *Hyp*-Mäuse mit männlichen heterozygoten PHEX-tg-Mäusen, um Wildtyp-, PHEX-tg-, *Hyp*- und *Hyp*/PHEX-tg-Nachkommen zu erhalten. Für alle Untersuchungen wurden zwölf Wochen alte männliche Mäuse verwendet. Im Vergleich zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern wiesen die PHEX-tg-Mäuse eine mittels peripherer quantitativer Computertomographie (pQCT) gemessene normale Knochenmineraldichte (BMD) auf, ebenso eine normale Knochenhistologie und normale Phosphatwerte in Serum und Urin. Die *Hyp*-Mäuse zeigten den bekannten Phänotyp, charakterisiert durch vermindertes Körpergewicht, Hypophosphatämie, Hyperphosphaturie und Rachitis. *Hyp*/PHEX-tg Mäuse hatten im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen ein normales Körpergewicht und zeigten eine dramatische, wenn auch nicht normalisierende Verbesserung in der BMD des Femurs. Die Gesamt-BMD des Femurschaftes stieg von 401 ± 45 bei *Hyp*-Mäusen auf 516 ± 43 mg/cm³ bei *Hyp*/PHEX-tg-Mäusen und die Gesamt-BMD der Femur-Metaphyse von 318 ± 35 bei *Hyp*-Mäusen auf 386 ± 37 mg/cm³ bei *Hyp*/PHEX-tg-Mäusen (Mittelwerte ± Standardabweichung). Bei den Wildtyp-Wurfgeschwistern betrug die BMD des Femurschaftes und der Femur-Metaphyse 609 ± 28 bzw. 462 ± 43 mg/cm³. Im Vergleich zu *Hyp*-Mäusen war bei der Beurteilung der Knochenhistologie bei den *Hyp*/PHEX-tg-Mäusen eine deutliche Verbesserung der Knochenstruktur, normale Wachstumsfugen sowie ein deutlich vermindertes Osteoid-Volumen erkennbar, obwohl weiterhin Knochenmineralisationsstörungen festzustellen waren. Überraschenderweise zeigten jedoch *Hyp* und *Hyp*/PHEX-tg-Mäuse vergleichbare Verminderungen in der renal-tubulären Phosphatreabsorption und waren im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen hypophosphatämisch. Alle Ergebnisse waren für beide Maus-Linien vergleichbar. Folglich untermauern unsere Ergebnisse die Annahme, dass die pathophysiologischen Mechanismen, die zum renalen Phosphatverlust und zum Knochendefekt bei XLH führen, unabhängig voneinander sind.

Summary

The role of the PHEX gene for phosphate homeostasis

Mutations of PHEX, a phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome, are responsible for X-linked hypophosphatemia (XLH) in humans, and its mouse homologue, *Hyp.* Recently, it has been shown that targeted overexpression of PHEX in osteoblasts is not sufficient to rescue the *Hyp* phenotype. Therefore, the aim of this study was to examine whether ubiquitous overexpression of PHEX in transgenic mice would fully rescue the *Hyp* phenotype. To test this hypothesis, we generated two mouse lines overexpressing the human PHEX gene under the control of a human β-actin promoter. With the exception of brain, RT-PCR analyses showed expression of the transgene in PHEX transgenic (PHEX-tg) mice in all tissues examined. Subsequently, we crossed female heterozygous *Hyp* mice with male heterozygous PHEX-tg mice to produce wildtype (WT), PHEX-tg, *Hyp*, and *Hyp*/PHEX-tg offspring. Twelve-week-old male mice were used for all studies. Compared with their WT littermates, PHEX-tg mice had normal bone mineral density (BMD) as measured by peripheral quantitative computed tomography, normal bone histology, and normal serum and urinary phosphate. *Hyp* mice demonstrated the known phenotype characterized by reduced body weight, hypophosphatemia, hyperphosphaturia, and rickets. *Hyp*/PHEX-tg mice had normal body weight relative to wildtype controls, and showed a dramatic, albeit not complete, improvement in femoral BMD. Total BMD of the femoral shaft increased from 401 ± 45 in *Hyp* to 516 ± 43 mg/cm³ in *Hyp*/PHEX-tg mice, and total BMD of the femoral metaphysis from 318 ± 35 in *Hyp* to 386 ± 37 mg/cm³ in *Hyp*/PHEX-tg mice (mean ± SD). In wildtype littermates, the BMD of the femoral shaft and the femoral metaphysis was 609 ± 28 and 462 ± 43 mg/cm³, respectively. *Hyp*/PHEX-tg mice had almost normal body weight relative to wildtype controls, showed a dramatic improvement in femoral bone mineral density, normal growth plates, and, despite remaining disturbances in bone mineralization, almost normal bone architecture when compared with *Hyp* mice. Surprisingly, however, *Hyp* and *Hyp*/PHEX-tg mice had comparable reductions in tubular reabsorption of phosphate, and were hypophosphatemic relative to wildtype controls. All results were similar for both PHEX-tg mouse lines. Thus, our data further strengthen the notion that the pathophysiological mechanisms behind renal phosphate wasting and the bone mineralization defect in XLH may involve different factors.

7 Literaturverzeichnis

ADAMS, L.G., R.M. HARDY, D.J. WEISS and J.W. BARTGES, 1993

Hypophosphatemia and hemolytic anemia associated with diabetes mellitus and hepatic lipidosis in cats. J Vet Int Med 7, 266-271.

ALBRIGHT, F., A.M. BUTLER and E. BLOOMBERG, 1937

Rickets resistant to vitamin D therapy. Am J Dis Child 54, 529-547.

ARGIRO, L., M. DESBARATS, F.H. GLORIEUX and B. ECAROT, 2001

MEPE, the gene encoding a tumor-secreted protein in oncogenic hypophosphatemic osteomalacia, is expressed in bone. Genomics 74, 342-351.

ARNAUD, C., 1971

Serum parathyroid hormone in X-linked hypophosphatemia. Science 173, 845-847.

BAI, L., J.F. COLLINS and F.K. GISHAN, 2000

Cloning and characterization of a type III Na-dependent phosphate cotransporter from mouse intestine. Am J Physiol Cell Physiol 279, C1135-1143.

BAI, X., D. MIAO, D. PANDA, S. GRADY, M.D. MC KEE, D. GOLTZMAN and A.C. KARAPLIS, 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(12), 2913-2925.

BARON, R., A. VIGNERY, L. NEFF, A. SILVERGLATE and A. SANTA MARIA,1983

Processing of undecalcified bone specimens for bone histomorphometry. In: Bone histomorphometry: Techniques and interpretetion. (Ed.: R. R. RECKER), CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 13-35.

BECK, I., A.C. KARAPLIS, N. AMIZUKA, A.S. HEWSON, H. OZAWA and H.S. TENENHOUSE, 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., Y. SOUMOUNOU, J. MARTEL, G. KRISHNAMURTHY, C. BAUTHIER, C.G. GOODYER and H.S. TENENHOUSE, 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, T., T.A. CRAIG, A.E. BOWE, J. VASSILIADIS, D. RECZEK, R. FINNEGAN, S.M.J. DE BEUR, S.C. SCHIAVI and R. KUMAR, 2003

Secreted frizzled-related protein 4 is a potent tumor-derived phosphaturic agent. J Clin Invest 112(5), 785-794.

BERNDT, T.J. and F.G. KNOX, 1984

Proximal tubule site of inhibition of phosphate reabsorption by calcitonin. Am J Physiol 246, F927-930.

BLYDT-HANSEN, T.D., H.S. TENENHOUSE and P. GOODYER, 1999

PHEX expression in parathyroid gland and parathyroid hormone dysregulation in X-linked hypophosphatemia. Pediatr Nephrol 13, 607-611.

BOILEAU, G., H.S. TENENHOUSE, I. GROSEILLERS and P. CRINEL, 2001

Characterization of PHEX endopeptidase catalytic activity: identification of parathyroid-hormone-related peptide$_{107-139}$ as a substrate and osteocalcin, PP_i and phosphate as inhibitors. Biochem J 355, 707-713.

BOWE, A.E., R. FINNEGAN, S.M.J. DE BEUR, J. CHO, M.A. LEVINE, R. KUMAR and S.C. SCHIAVI, 2001

FGF-23 inhibits renal tubular phosphate transport and is a PHEX substrate. Biochem Biophys Res Com 284, 977-981.

BREVES, G., H. HÖLLER, P. PACKHEISER, G. GÄBEL and H. MARTENS, 1988

Flux of inorganic phosphate across the sheep rumen wall *in vivo* and *in vitro*. Quart J Exp Physiol 73, 343-351.

BREVES, G. and B. SCHRÖDER, 1991

Comparative aspects of gastrointestinal phosphorus metabolism. Nutr Res Rev 4, 125-140.

CAI, Q., S.F. HODGSON, P.C. KAO, V.A. LENNON, G.G. KLEE, A.R. ZINSMIESTER and R. KUMAR, 1994

Brief report: Inhibition of renal phosphate transport by a tumor product in a patient with oncogenic osteomalacia. N Engl J Med 330 (23), 1645-1649.

CAMPOS, M., C. COUTURE, I.Y. HIRATA, M.A. JULIANO, T.P. LOISEL, P. CRINE, L. JULIANO, G. BOILEAU and A.K. CARMONA, 2003

Human recombinant endopeptidase PHEX has a strict S'_1 specificity for acidic residues and cleaves peptides derived from fibroblast growth factor-23 and matrix extracellular phosphoglycoprotein. Biochem J 373, 271-279.

CARPENTER, T.O., M.A. MITNICK, A. ELLISON, C. SMITH and K.L. INSOGNA, 1994

Nocturnal hyperparathyroidism: a frequent feature of X-linked hypophosphatemia. J Clin Endocrinol Metab 78, 1378-1383.

CHENG, L. and B. SACKTOR, 1981

Sodium gradient-dependent phosphate transport in renal brush border membrane vesicles. J Biol Chem 256 (4) 1556-1564.

COMPTON, J.S., J. NELSON, R.D. WRIGHT and J.A. YOUNG, 1980

A micropuncture investigation of electrolyte transport in the parotid glands of sodium-replete and sodium-depleted sheep. J Physiol 309, 429-446.

COWGILL, L.D., S. GOLDFARB, K. LAU, E. SLATOPOLSKY and Z.S. AGUS, 1979

Evidence for an intrinsic renal tubular defect in mice with genetic hypophosphatemic rickets. J Clin Invest 63, 1203-1210.

CROSS, H.S., H. DEBIEC and M. PETERLIK, 1990

Mechanism and regulation of intestinal phosphate absorption. Miner Electrolyte Metab 16, 115-124.

DAVIES, M., 1981

The rheumatic manifestations of metabolic bone disease. Clin Rheumat Dis 7, 595-646

DE BEUR, S.M.J., R.B. FINNEGAN, J. VASSILIADIS, B. COOK, D. BARBERIO, S. ESTES, P. MANAVALAN, J. PETROZIELLO, S.L. MADDEN, J.Y. CHO, R. KUMAR, M.A. LEVINE and S.C. SCHIAVI, 2002

Tumors associated with oncogenic osteomalacia express genes important in bone and mineral metabolism. J Bone Min Res 17(6), 1102-1110.

DEBIEC, H. and R. LORENC, 1988

Identification of Na^+, P_i-binding protein in kidney and intestinal brush-border membranes. Biochem J 255, 185-191.

DOUSA, T.P. and S.A. KEMPSON, 1982

Regulation of renal brush border membrane transport of phosphate. Mineral Electrolyte Metab 7, 113-121.

DU, L., M. DESBARATS, J. VIEL, F.H. GLORIEUX, C. CAWTHORN and B. ECAROT, 1996

cDNA cloning of the murine Pex gene implicated in X-linked hypophosphatemia and evidence for expression in bone. Genomics 36, 22-28.

DYMECKI, S.M., 1996

A modular set of *Flp, FRT* and *lacZ* fusion vectors for manipulating genes by site-specific recombination. Gene 171, 197-201.

ECAROT, B., F.H. GLORIEUX, M. DESBARATS, R. TRAVERS and L. LABELLE, 1992

Defective bone formation by Hyp mouse bone cells transplanted into normal mice: evidence in favor of an intrinsic osteoblast defect. J Bone Min Res 7 (2), 215-220.

ECAROT-CHARRIER, B., F. GLORIEUX, R. TRAVERS, M. DESBARATS, F. BOUCHARD and A. HINEK, 1988

Defective bone formation by transplanted hyp mouse bone cells into normal mice. Endocrinology 123, 768-773.

ECONS, M.J. and M.K. DREZNER,1992

Bone disease resulting from inherited disorders of renal tubule transport and vitamin D metabolism. In: Disorders of bone and mineral metabolism. (Ed.: F. L. Coe and M. J. Favus), Raven, New York, pp. 935-950.

ECONS, M.J. and M.K. DREZNER, 1994

Tumor-induced osteomalacia - unveiling a new hormone. N Engl J Med 330 (23), 1679-1681.

ECONS, M.J. and F. FRANCIS, 1997

Positional cloning of the Pex gene: new insights into the pathophysiology of X-linked hypophosphatemic rickets. Am J Physiol 273, F489-F498.

ECONS, M.J. and P.T. McENERY, 1997

Autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia: clinical characterization of a novel renal phosphate-wasting disorder. J Clin Endocrin Metab 82 (2), 674-681.

EICHER, E.M., J.L. SOUTHARD, C.R. SCRIVER and F.H. GLORIEUX, 1976

Hypophosphatemia: Mouse model for human familial hypophosphatemic (vitamin D-resistant) rickets. Proc Natl Acad Sci USA 73 (12), 4667-4671.

ERBEN, R.G., 1997

Embedding of bone samples in methylmethacrylate: an improved method suitable for bone histomorphometry, histochemistry, and immunohistochemistry. J Histochem Cytochem 45 (2), 307-313.

FILISETTI, D., G. OSTERMANN, M. VON BREDOW, T. STROM, G. FILLER, J. EHRICH, S. PANETIER, J. GERNIER, P.S.N. ROWE, F. FRANCIS, A. JULIENNE, A. HANAUER, M.J. ECONS and C. OUDET, 1999

Non-random distribution of mutations in the *PHEX* gene, and under-detected missense mutations at non-conserved residues. Eur J Hum Genet 7, 615-619.

FRANCIS, F., T.M. STROM, S. HENNIG, S. BÖDDRICH, B. LORENZ, O. BRANDAU, K.L. MOHNIKE, M. CAGNOLI, C. STEFFENS, S. KLAGES, K. BORZYM, T. POHL, C. OUDET, M.J. ECONS, P.S.N. ROWE, R. REINHARDT, T. MEITINGER and H. LEHRACH, 1997

Genomic organization of the human PEX gene mutated in X-linked dominant hypophosphatemic rickets. Gen Res 7, 573-585.

FRASER, D., G. JONES and S.W. KOOH,1987

Calcium and phosphate metabolism. In: Fundamentals of clinical chemistry. (Ed.: N. W. Tietz), WB Saunders, Philadelphia, pp. 705-728.

FROST, H.M., 1958

Some observations on bone mineral in a case of vitamin D-resistant rickets. Henry Ford Hosp Med Bull 6, 300.

FUJIWARA, I., R. ARAVINDEN, R.L. HORST and M.K. DREZNER, 2003

Abnormal regulation of renal 25-hydroxyvitamin D-1α-hydroxylase activity in X-linked hypophosphatemia: a translational or post-translational defect. J Bone Min Res 18 (3), 434-442.

GIASSON, S.D., M.G. BRUNETTI, G. DANAN, N. VIGNEAULT and S. CARRIERE, 1977

Micropuncture study of renal phophorus transport in hypophosphatemic vitamin D resistant rickets mice. Pflügers Archiv 371, 33-38.

GLORIEUX, F.H. and B. ECAROT-CHARRIER,1987

X-linked vitamin-D resistant rickets: is osteoblast activity defective? In: Calcium regulation and bone metabolism: Basic and clinical aspects. (Ed.: D. V. Cohn, T. J. Martin and P. J. Meunier), Elsevier, Amsterdam. 9, pp. 227-231.

GOFF, J.P., 2000

Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders. Vet Clin North Am 16 (2), 319-337.

GOWEN, L.C., D.N. PETERSEN, A.L. MANSOLF, H. QI, J.L. STOCK, G.T. TKALCEVIC, H.A. SOIMMONS, D.T. CRAWFORD, K.L. CHIDSEY-FRINK, H.Z. KE, J.D. MC NEISH and T.A. BROWN, 2003

Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (*OF45*) results in increased bone formation and bone mass. J Biol Chem 278 (3), 1998-2007.

GRAY, R.W., D.R. WILZ, A.E. CALDAS and J. LEMANN, 1976

The importance of phosphate in regulating plasma 1,25$(OH)_2$-Vitamin D levels in humans: studies in healthy subjects, in calcium-stone formers and in patients with primary hyperparathyroidism. J Clin Endocrinol Metab 45, 299-306.

GUNNING, P., J. LEAVITT, G. MUSCAT, S. NG and L. KEDES, 1987
A human β-actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts. Proc Natl Acad Sci USA 84, 4831-4835.

GUO, R., S. LIU, R.F. SPURNEY and L.D. QUARLES, 2001
Analysis of recombinant *Phex*: an endopeptidase in search of a substrate. Am J Physiol Endocrinol Metab 281, E837-847.

GUO, R., P.S.N. ROWE, S. LIU, L.G. SIMPSON, Z. XIAO and L.D. QUARLES, 2002
Inhibition of MEPE cleavage by *Phex*. Biochem Biophys Res Commun 297, 38-45.

GUYTON, A.C., Ed. (1981).
Textbook of medical physiology. Philadelphia, WB Saunders.

HARRIS, C.A., R.A.L. SUTTON and J.H. DIRKS, 1976
Effects of hypercalcemia on calcium and phosphate ultrafilterability and tubular reabsorption in the rat. Am J Physiol 233 (2), F201-F206.

HARRISON, H.E., H.C. HARRISON, F. LIFSHITZ and A.D. JOHNSON, 1966
Growth disturbance in hereditary hypophosphatemia. Am J Dis Child 112, 290-297.

HELPS, C., H. MURER and J. MC GIVAN, 1995
Cloning, sequence analysis and expression of the cDNS encoding a sodium-dependent phosphate transporter from the bovine renal epithelial cell line NBL-1. Eur J Biochem 228, 927-930.

HILFIKER, H., O. HATTENHAUER, M. TRAEBERT, I. FORSTER, H. MURER and J. BIBER, 1998
Characterization of a murine type II sodium-phosphate cotransporter expressed in mammalian small intestine. Proc Natl Acad Sci USA 95, 14564-14569.

HOLM, I.A., X. HUANG and L.M. KUNKEL, 1997
Mutational analysis of the PEX gene in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. Am J Hum Genet 60, 790-797.

INSOGNA, K.L., A.E. BROADUS and J.M. GERTNER, 1983
Impaired phosphorus conservation and 1,25 Dihydroxyvitamin D generation during phosphorus deprivation in familial hypophosphatemic rickets. J Clin Invest 71, 1562-1569.

JONSSON, K.B., R. ZAHRADNIK, T. LARSSON, K.E. WHITE, T. SUGIMOTO, Y. IMANISHI, T. YAMAMOTO, G. HAMPSON, H. KOSHIYAMA, Ö. LJUNGGRAN, K. OBA, M. YANG, A. MIYAUCHI, M.J. ECONS, J. LAVIGNE and H. JÜPPNER, 2003
Fibroblast growth factor 23 in oncogenic osteomalacia and X-linked hypophosphatemia. New Engl J Med 348 (17), 1656-1663.

KATAI, K., K. MIYAMOTO, S. KISHIDA, H. SEGAWA, T. NII, H. TANAKA, Y. TANI, H. ARAI, S. TATSUMI, K. MORITA, Y. TAKETANI and E. TAKEDA, 1999
Regulation of intestinal Na+-dependent phosphate co-transporters by a low-phosphate diet and 1,25-dihydroxyvitamin D_3. Biochem J 343, 705-712.

KIEBZAK, G.M., Meyer R.A. and P.M. MISH, 1981
X-linked hypophosphatemic mice respond to thyroparathyroidectomy. Mineral Electrolyte Metab 6, 153-164.

KNOCHEL, J.P.,1985
Deranged phosphorus metabolism. In: The Kidney: Physiology and pathophysiology. (Ed.: D. W. Seldin and G. Giebisch), Raven Press, New York. pp. 1397-1416.

KNOX, F.G. and A. HARAMATI,1985
Renal regulation of phosphate excretion. In: The Kidney: Physiology and Pathophysiology. (Ed.: D. W. Seldin and G. Giebisch), Raven Press, New York, pp. 1381-1396.

KNUDTZON, J., J. HALSE, E. MONN, A. NESLAND, K.P. NORDAL, P. PAUS, M. SELP, S. SUND and G. SODAL, 1995
Autonomous hyperparathyroidism in X-linked hypophosphatemia. Clin Endocrinol 42, 199-203.

KOZAK, M., 1996
Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. Mamm Genome 7, 563-574.

KUMAR, R., 1997

Phosphatonin - a new phosphaturic hormone? (Lessons from tumor-induced osteomlacia and X-linked hypophosphatemia). Nephrol Dial Transplant 12, 11-13.

KUMAR, R.,1997

Vitamin D and the kidney. In: Vitamin D. (Ed.: D. Feldman, F. H. Glorieux and J. W. Pike), Academic Press, San Diego, pp. 275-292.

KUMAR, R., 2002

New insights into phosphate homeostasis: fibroblast growth factor 23 and frizzled-related protein-4 are phosphaturic factors derived from tumors associated with osteomalacia. Curr Opin Nephrol Hypertens 11, 547-553.

LAJEUNESSE, D., R.A. MEYER and L. HAMEL, 1996

Direct demonstration of a humerally-mediated inhibition of renal phosphate transport in the Hyp mouse: involvement of an osteoblast-derived factor. Kidney Int 50, 1531-1538.

LEE, D.B.N., M.W. WALLING and N. BRAUTBAR, 1985

Intestinal phosphate reabsorption: influence of vitamin D and non-vitamin D factors. Am J Physiol 250, G369-G373.

LEWY, J.E., E.C. CABANA, H.A. REPETTO, J.M. CANTERBURY and E. REISS, 1972

Serum parathyroid hormone in hypophosphatemic vitamin D-resistant rickets. J Pediatr 81 (2), 294-300.

LIPMAN, M.L., D. PANDA, H.P.J. BENNETT, J.E. HENDERSON, E. SHANE, Y. SHEN, D. GOLTZMAN and A.C. KARAPLIS, 1998

Cloning of human *PEX* cDNA. J Biol Chem 273 (22), 13729-13737.

LIU, S., R. GUO and L.D. QUARLES, 2001

Cloning and characterization of the proximal murine Phex promoter. Endocrinology 142 (9), 3987-3995.

LIU, S., R. GUO, L.G. SIMPSON, Z. XIAO, C.E. BURNHAM and L.D. QUARLES, 2003

Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX. J Biol Chem 278 (39), 37419-37426.

LIU, S., R. GUO, Q. TU and L.D. QUARLES, 2002

Overexpression of Phex in osteoblasts fails to rescue the *Hyp* mouse phenotype. J Biol Chem 277 (5), 3686-3697.

LOBAUGH, B., W.M. BURCH and M.K. DREZNER,1984

Abnormalities of vitamin D metabolism and action in the vitamin D resistant rickets and osteomalacic diseases. In: Vitamin D. (Ed.: R. Kumar), Martinus Nijhoff, Boston.

LOBAUGH, B. and M.K. DREZNER, 1983

Abnormal regulation of renal 25-hydroxyvitamin D levels in the X-linked hypophosphatemic mouse. J Clin Invest 71, 400-403.

LÖW, I., T. FRIEDRICH and G. BURCKHARDT, 1984

Properties of an anion exchanger in rat renal basolateral membrane vesicles. Am J Physiol 246, F334-F342.

LYON, M.F., C.R. SCRIVER, L.R.I. BAKER, H.S. TENENHOUSE, J. KRONICK and S. MANDLA, 1986

The *Gy* mutation: another cause of X-linked hypophosphatemia in mouse. Proc Natl Acad Sci USA 83, 4899-4903.

MARIE, P.J. and F.H. GLORIEUX, 1981

Histomorphometric study of bone remodeling in hypophosphatemic vitamin D-resistant rickets. Metab Bone Dis Rel Res 3, 31-38.

MARIE, P.J. and F.H. GLORIEUX, 1983

Relation between hypomineralized periosteocytic lesions and bone mineralization in vitamin D-resistant rickets. Calcif Tissue Int 35, 443-448.

MASON, R.S., P.G. ROHL, D. LISSNER and S. POSEN, 1982

Vitamin D metabolism in hypophosphatemic rickets. Am J Dis Child 136, 909-913.

MEYER, M.H. and R.A.Jr. MEYER, 1988

Increased intestinal absorption of calcium in young and adult X-linked hypophosphatemic mice after the administration of 1,25-Dihydroxyvitamin D_3. J Bone Min Res 3 (2), 151-157.

MEYER, R.A., C.M. HENLEY, M.H. MEYER, P.L. MORGAN, A.G. MC DONALD, C. MILLS and D.K. PRICE, 1998

Partial deletion of both the spermine synthase gene and the *Pex* gene in the X-linked hypophosphatemic, Gyro (*Gy*) mouse. Genomics 48, 289-295.

MEYER, R.A., M.H. MEYER, R.W. GRAY and M.E. BRUNS, 1987

Evidence that low plasma 1,25-dihydroxyvitamin D causes intestinal malabsorption of calcium and phosphate in juvenile X-linked hypophosphatemic mice. J Bone Min Res 2 (1), 67-82.

MEYER, R.A.Jr., M.H. MEYER and R.W. GRAY, 1989a

Parabiosis suggests a humoral factor is involved in X-linked hypophosphatemia in mice. J Bone Miner Res 4 (4), 493-500.

MEYER, R.A., H.S. TENENHOUSE, M.H. MEYER and A.H. KLUGERMANN, 1989b

The renal phosphate transport defect in normal mice parabiosed to X-linked hypophosphatemic mice persists after parathyroidectomy. J Bone Miner Res 4 (4), 523-532.

MIYAMURA, T., X. TANAKA, M. INOUE, Y. ICHINOSE and Y. SEINO, 2000

The effects of bone marrow transplantation on X-linked hypophosphatemic mice. J Bone Min Res 15 (8), 1451-1458.

MIZGALA, C.L. and G.A. QUAMME, 1985

Renal handling of phosphate. Physiol Rev 65 (2), 431-466.

MOREL, F., 1981

Sites of hormone action in the mammalian nephron. Am J Physiol 240, F159-F164.

MORGAN, J.M., W.L. HAWLEY, A.I. CHENOWETH, W.J. RETAN and A.G. DIETHELM, 1974

Renal transplantation in hypophosphatemia with vitamin D-resistant rickets. Arch Intern Med 134, 549-552.

MURER, H., I. FORSTER, N. HERNANDO, G. LAMBERT, M. TRAEBERT and J. BIBER, 1999

Posttranscriptional regulation of the proximal tubule Na-Pi-II transporter in response to PTH and dietary Pi. Am J Physiol 277 (3), F676-F684.

MURER, H., N. HERNANDO, I. FORSTER and J. BIBER, 2001

Molecular aspects in the regulation of renal inorganic phosphate reabsorption: the type IIa sodium/inorganic phosphate co-transporter as the key player. Curr Opin nephrol hypertens 10, 555-561.

MURER, H., N. HERNANDO, I. FORSTER and J. BIBER, 2000

Proximal tubular phosphate reabsorption: molecular mechanisms. Physiol Rev 80 (4), 1373-1409.

NESBITT, T., T.M. COFFMAN, R. GRIFFITHS and M.K. DREZNER, 1992

Crosstransplantation of kidneys in normal and Hyp mice. J Clin Invest 89, 1453-1459.

NESBITT, T. and M.K. DREZNER, 1990

Abnormal parathyroid hormone-related peptide stimulation of renal 25-Hydroxyvitamin D-1α-Hydroxylase in *Hyp* mice: evidence for a generalized defect of enzyme activity in the proximal convoluted tubule. Endocrinology 127, 843-848.

NESBITT, T., M.K. DREZNER and B. LOBAUGH, 1986

Abnormal parathyroid hormone stimulation of 25-Hydroxyvitamin D-1α-Hydroxylase activity in the hypophosphatemic mouse. J Clin Invest 77, 181-187.

NESBITT, T., M.J. ECONS, J.K. BYUN, J. MARTEL, H.S. TENENHOUSE and M.K. DREZNER, 1995

Phosphate transport in immortalized cell cultures from the renal proximal tubule of normal and *Hyp* mice: evidence that the *Hyp* gene locus product is an extrarenal factor. J Bone Miner Res 10 (9), 1327-1333.

NESBITT, T., I. FUJIWARA, R. THOMAS, Z. XIAO, L.D. QUARLES and M.K. DREZNER, 1999

Coordinated maturational regulation of PHEX and renal phosphate inhibitory activity: evidence for the pathophysiological role of PHEX in X-linked hypophosphatemia. J Bone Min Res 14 (12), 2027-2035.

OEFNER, C., A. D´ARCY, M. HENNIG, F.K. WINKLER and G.E. DALE, 2000

Structure of human neutral endopeptidase (Neprilysin) complexed with phosphoamidon. J Mol Biol 296, 341-349.

OGAWA, E., K. KOBAYASHI and N. YOSHIURA, 1989

Hemolytic anemia and red blood cell metabolic disorder sttributable to low phosphorus intake in cows. Am J Vet Res 50 (3), 388-392.

PFISTER, M.F., I. RUF, G. STANGE, U. ZIEGLER, E. LEDERER, J. BIBER and H. MURER, 1998

Parathyroid hormone leads to the lysosomal degradation of the renal type II Na/Pi cotransporter. Proc Natl Acad Sci USA 95, 1909-1914.

PORTALE, A.A., B.P. HALLORAN and R.C. MORRIS, 1989

Physiologic regulation of the serum concentration of 1,25-Dihydroxyvitamin D by phosphorus in normal men. J Clin Invest 83, 1494-1499.

POWERS, C.J., S.W. MC LESKEY and A. WELLSTEIN, 2000

Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. Endocrine-related cancer 7, 165-197.

QIU, Z.Q., R. TRAVERS, F. RAUCH, F.H. GLORIEUX, C.R. SCRIVER and H.S. TENENHOUSE, 2004

Effect of gene dose and parental origin on bone histomorphometry in X-linked *Hyp* mice. Bone 34 (1), 134-139.

QUARLES, L.D. and M.K. DREZNER, 2001

Editorial: pathophysiology of X-linked hypophosphatemia, tumor-induced osteomalacia and autosomal dominant hypophosphatemia: a perPHEXing problem. J Clin Endocrin Metab 86 (2), 494-496.

RASMUSSEN, H. and C.W. ANAST,1995

Mendelian hypophosphatemias. In: The metabolic and molecular basis of inherited disease. (Ed.: B. A. Criver CR, Sly W.S., Valle D.), McGraw Hill, New York:, pp. 3717-3745.

REINHARDT, T.A., R.L. HORST and J.P. GOFF, 1988
Calcium, phosphorus, and magnesium homeostasis in ruminants. Vet Clin North Am: Food Anim Practice 4 (2), 331-350.

REYES-MUGICA, M., S.L. ARNSMEIER, P.F. BACKELJAUW, J. PERSING, B. ELLIS and T.O. CARPENTER, 2000
Phosphaturic mesenchymal tumor-induced rickets. Ped Dev Path 3, 61-69.

RIZZOLI, R., H. FLEISCH and J.P. BONJOUR, 1977
Role of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 on intestinal phosphate absorption in rats with a normal vitamin D supply. J Clin Invest 60, 639-347.

ROQUES, B.P., F. NOBLE, V. DAUGÉ, M. FOURNIÉ and A. BEAUMONT, 1993
Neutral Endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. Pharm Rev 45 (1), 87-146.

ROWE, P.S.N., P.A. DE ZOYSA, R. DONG, H.R. WANG, K.E. WHITE, M.J. ECONS and C.L. OUDET, 2000
MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia. genomics 67, 54-68.

RUCHON, A.F., H.S. TENENHOUSE, M. MARCINKIEWICZ, G. SIEGFRIED, J.E. AUBIN, L. DESGROSEILLERS, P. CRINE and G. BOILEAU, 2000
Developmental expression and tissue distribution of Phex protein: effect of the Hyp mutation and relationship to bone markers. J Bone Min Res 15 (8), 1440-1450.

SABBAGH, Y., A.O. JONES and H.S. TENHOUSE, 2000
PHEXdb, a locus-specific database for mutations causing X-linked hypophosphatemia. Hum Mutat 16, 1-6.

SAITO, H., K. KUSANO, M. KINOSAKI, H. ITO, M. HIRATA, H. SEGAWA, K. MIYAMOTO and N. FUKUSHIMA, 2003
Human fibroblast growth factor-23 mutants suppress Na^+-dependent phosphate co-transport activity and 1a,25-dihydroxyvitamin D_3 production. J Biol Chem 278 (4), 2206-2211.

SCHENK, R.K., A.J. OLAH and W. HERRMANN,1984

Preparation of calcified tissues for light microscopy. In: Methods of calcified tissue preparation. (Ed.: G. R. Dickson), Elsevier, Amsterdam, pp. 1-56.

SCHIAVI, S.C. and R. KUMAR, 2004

The phosphatonin pathway: new insights in phosphate homeostasis. Kidney Int 65 (1), 1-14.

SCHWAB, S.J., S. KLAHR and M.R. HAMMERMANN, 1984

Na^+ gradient -dependent P_i uptake in basolateral membrane vesicles from dog kidney. Am J Physiol 246, F663-F669.

SCOTT, D.,1988

Control of phosphorus balance in ruminants. In: Aspects of digestive physiology in ruminants. (Ed.: D. A.), Comstock Publ. Assoc., Ithaca, pp. 156-174.

SHIMADA, T., M. KAKITANI, Y. YAMAZAKI, H. HASEGAWA, Y. TAKEUCHI, T. FUJITA, S. FUKUMOTO, K. TOMIZUKA and T. YAMASHITA, 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., S. MIZUTANI, T. MUTO, T. YONEGA, R. HINO, S. TAKEDA, Y. TAKEUCHI, T. FUJITY, S. FUKUMOTO and T. YAMASHITA, 2001

Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. PNAS 98 (11), 6500-6505.

SORRIBAS, V., D. MARKOVICH, G. HAYES, G. STANGE, J. FORGO, J. BIBER and H. MURER, 1994

Cloning of a Na/P_i cotransporter from opossum kidney cells. J Biol Chem 269 (9), 6615-6621.

STOFF, J.S., 1982

Phosphate homeostasis and hypophosphatemia. Am J Med 72, 489-495.

STREWLER, G.J., 2001

FGF23, hypophosphatemia, and rickets: has phosphatonin been found? PNAS 98 (11), 5945-5946.

STROM, T.M., F. FRANCIS, B. LORENZ, A. BÖDDRICH, M.J. ECONS, H. LEHRACH and T. MEITINGER, 1996

Pex gene deletions in *Gy* and *Hyp* mice provide mouse models for X-linked hypophosphatemia. Hum Mol Genet 6 (2), 165-175.

SUKI, W.N. and D. ROUSE,1996

Renal transport of calcium, magnesium and phosphate. In: Brenner and Rector's the kidney. (Ed.: B. M. Brenner), Saunders, Philadelphia.

TENENHOUSE, H.S., 1984

Investigations of the mechanism for abnormal renal 25-hydroxyvitamin D_3-1-hydroxylase activity in the hypophosphatemic X-linked *Hyp* mouse. Endocrinology 115 (3), 634-639.

TENENHOUSE, H.S., 1999

X-linked hypophosphatemia: a homologous disorder in humans and mice. Nephrol Dial Transplant 14, 333-341.

TENENHOUSE, H.S. and G. JONES, 1990

Abnormal regulation of renal vitamin D catabolism by dietary phosphate in murine X-linked hypophosphatemic rickets. J Clin Invest 85, 1450-1455.

TENENHOUSE, H.S., J. MARTEL, J. BIBER and H. MURER, 1995

Effect of P_i restriction on renal Na^+-P_i cotransporter mRNA and immunoreactive protein in X-linked *Hyp* mice. Am J Physiol 268, F1062-F1069.

TENENHOUSE, H.S., R.A.J. MEYER, S. MANDLA, M.H. MEYER and R.W. GRAY, 1992

Renal phosphate transport and vitamin D metabolism in X-linked hypophosphatemic *Gy* mice: responses to phosphate deprivation. Endocrinology 131 (1), 51-.

TENENHOUSE, H.S. and C.R. SCRIVER, 1978

The defect in transcellular transport of phosphate in the nephron is located in brush-border membranes in X-linked hypophosphatemia (*Hyp* mouse model). Can J Biochem 56, 640-646.

TENENHOUSE, H.S., A. YIP and G. JONES, 1988

Increased renal catabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 in murine X-linked hypophosphatemic rickets. J Clin Invest 81, 461-165.

TENNANT, B., P. BETTLEHEIM and J.J. KANEKO, 1982

Paradoxic hypercalcemia and hypophosphatemia associated with chronic renal failure in horses. J Am Vet Med Assoc 180 (6), 630-634.

THE ADHR CONSORTIUM, 2000

Autosomal dominant hypophosphatemic rickets is associated with mutations in FGF23. Nature Genetics 26, 345-348.

THE HYP CONSORTIUM, 1995

A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. Nature Genet 11, 130-136.

TURNER, A.J. and K. TANZAWA, 1997

Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. FASEB 11, 355-364.

VILLANUEVA, A.R., H.M. FROST and H. ROTH, 1961

Halo volume - Part III. Existence of a pattern in the matrix. Henry Ford Hosp Med Bull 9, 133.

WALLING, M.W., 1977

Intestinal Ca and phosphate transport: differential responses to vitamin D_3 metabolites. Am J Physiol 233, E488-E494.

WALTON, J. and T.K. GRAY, 1979

Absorption of inorganic phosphate in the human small intestine. Clin Sci 56, 407-412.

WALTON, R.J. and O.L.M. BIJVOET, 1975

Nomogram for derivation of renal threshold phosphate concentration. The Lancet 2, 309-310.

WEBER, T.J., S. LIU, O.S. INDRIDASON and L.D. QUARLES, 2003

Serum FGF23 levels in normal and disordered phosphorus homeostasis. J Bone Min Res 18 (7), 1227-1234.

WERNER, A. and R.K.H. KINNE, 2001

Evolution of the Na-Pi cotransport systems. Am J Physiol 280, R301-R312.

WHITE, K.E., K.B. JONSSON, G. CARN, G. HAMPSON, T.D. SPECTOR, M. MANNSTADT, B. LORENZ-DEPIEREUX, A. MIYAUCHI, I.M. YANG, Ö. LYUNGGREN, T. MEITINGER, T.M. STROM, H. JÜPPNER and M.J. ECONS, 2001

The autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) gene is a secreted polypeptide overexpressed by tumors that cause phosphate wasting. J Clin Endocrin Metab 86 (2), 497-500.

WHYTE, M.P. and F.W. SCHRANCK, 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, 4047-4081.

WILKINSON, R.,1976

Absorption of calcium, phosphorus and magnesium. In: Calcium, phosphate and magnesium metabolism. (Ed.: B. E. C. Nordin), Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 36-112.

WILLARD, M.D., C.A. ZERBE, W.D. SCHALL, C. JOHNSON, S.E. CROW and R. JONES, 1987

Severe hypophosphatemia associated with diabetes mellitus in six dogs and one cat. J Am Vet Med Assoc 190 (8), 1007-1010.

WINTERS, R.W., J.B. GRAHAM, T.F. WILLIAMS, V.W. MC FALLS and C.H. BURNETT, 1958

A genetic study of familial hypophosphatemia and vitamin D-resistant rickets with a review of the literature. Medicine (Baltimore) 37, 97-142.

WOLF, E., K. RÖSER, M. HAHN, H. WELKERLING and G. DELLING, 1991

Enzyme and immunohistochemistry on undecalcified bone and bone marrow biopsies after embedding in plastic: a new embedding method for routine application. Virchows Archiv A 420, 17-24.

XIAO, Z.S., M. CRENSHAW, R. GUO, T. NESBITT, M.K. DREZNER and L.D. QUARLES, 1998

Intrinsic mineralization defect in *Hyp* mouse osteoblasts. Am J Physiol Endocrinol Metab 275, E700-708.

XU, D., N. EMOTO, A. GLAID, C. SLAUGHTER, S. KAW, D. DE WIT and M. YANAGISAWA, 1994

ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. Cell 78, 473-485.

YAMAZAKI, Y., R. OKAZAKI, M. SHIBATA, Y. HASEGAWA, K. SATOH, T. TAJIMY, Y. TAKEUCHI, T. FUJITA, K. NAKAHARA, T. YAMASHITA and S. FUKUMOTO, 2002

Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia. J Clin Endocrin Metab 87 (11), 4957-4960.

Danksagung

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Reinhold G. Erben für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung.
Außerdem danke ich Frau Dr. Karin Weber vielmals für ihre gute Betreuung und Hilfe bei den Laborarbeiten.

Ein ganz großes Dankeschön geht an Frau Karin Begsteiger, Frau Claudia Bergow und Frau Siglinde Hirmer für die geduldige Einweisung im Labor, Hilfsbereitschaft bei den Versuchsenden und der Erstellung der Knochenschnitte sowie der Analyse der Laborproben. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinen Mitdoktoranden Nina Unger und Martin Herber, die mir bei meinen nicht enden wollenden Mini-Versuchsenden geholfen haben. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Ute Zeitz, die mich so geduldig in die Mäusezucht eingewiesen hat, so hilfsbereit war und immer ein offenes Ohr für Fragen hatte. Es hat viel Spaß gemacht – nicht nur aufgrund der Geburtstags- und Grillfeiern – in so einem netten Team zu arbeiten.

Außerdem bedanke ich mich bei meiner Mutter, die mir das Studium mit ermöglicht und mich immer unterstützt hat (nicht zuletzt bei der Korrektur dieser Arbeit), obwohl sie mich oft lieber in einem Beruf mit „Kostüm und Aktentasche“ gesehen hätte. Vielen Dank auch an Lise, der mir in den letzten Jahren viel geholfen hat.

Schließlich danke ich meinem Freund Dan an dieser Stelle dafür, dass er in den letzten Jahren immer für mich da war und meine Launen geduldig ertragen hat.

Lebenslauf

Dagmar Angelika Mayer

17. September 1976	Geboren in Gräfelfing als Tochter von Hubert und Elisabeth Mayer, geb. Hohn

Schulausbildung:

1983 – 1986	Besuch der Volksschule in Iffeldorf
1986 – 1995	Besuch des Gymnasiums Weilheim
30. Juni 1995	Abitur

Studium:

1996 – 2002	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
08. August 2002	Studienabschluss
29. August 2002	Approbation

Dissertation:

seit September 2002	Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der LMU München