

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. E. Herting
Sektion für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie und Diabetes
Leiter: Prof. Dr. O. Hiort

Molekulargenetische Charakterisierung von Patienten mit hypophosphatämischer Rachitis

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
Aus der Sektion Medizin

Vorgelegt von
Merle Sophie Thieme
aus Henstedt-Ulzburg

Lübeck 2013

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Olaf Hiort
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Frank Kaiser
- Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.2013
- Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 19.11.2013

Promotionskommission der Sektion Lübeck

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1. <i>Physiologie des Calcium-Phosphat-Haushalts</i>	1
1.1.1. Calcium und Phosphat regulierende Organe	1
1.1.2. Hormonelle Regulation durch Parathormon und Calcitriol	3
1.1.3. Regulation durch Phosphatonine und Minhibine	5
1.2. <i>Pathologie im Calcium-Phosphat-Haushalt</i>	9
1.2.1. X-chromosomal dominante hypophosphatämische Rachitis (XLH)	9
1.2.2. Autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis (ADHR)	12
1.2.3. Autosomal rezessive hypophosphatämische Rachitis (ARHR)	13
1.2.4. Diagnostik	14
1.2.5. Therapie	14
1.2.6. Weitere genetische Störungen des Phosphatstoffwechsels	15
1.3. <i>Fragestellung dieser Arbeit</i>	18
2. Material und Methoden	19
2.1. <i>Patientenproben und Versuchsablauf</i>	19
2.2. <i>DNA-Extraktion</i>	20
2.3. <i>Konzentrationsbestimmung und Arbeitsverdünnung</i>	20
2.4. <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	20
2.4.1. Optimierung der PCR-Bedingungen	21
2.4.1.a. Berechnung der Annealing-Temperatur	21
2.4.1.b. Gradienten-PCR	21
2.4.2. Durchführung der PCR	22
2.4.3. Überprüfung der PCR-Produkte mit Gel-Elektrophorese	23
2.5. <i>Sequenzierung nach der Didesoxymethode (nach Sanger)</i>	23
2.5.1. Vorbereitung der Sequenzierung	24
2.5.2. Sequenzierungsreaktion mittels BigDye	24
2.5.3. Aufreinigung der DNA-Proben	25
2.5.4. Sequenzanalyse	26
2.6. <i>Multiplex Ligation dependent Probe Amplification® (MLPA)</i>	27
2.6.1. Methodik	27
2.6.2. Durchführung der MLPA	28
2.7. <i>Arbeiten am Massachusetts General Hospital</i>	29
2.7.1. Sequenzierung des DMP1-Gens	29
2.7.2. Restriktionsanalyse	30
3. Ergebnisse	32
3.1. <i>PCR-Bedingungen</i>	32
3.2. <i>Ergebnisse der Analyse des FGF23-Gens</i>	33
3.3. <i>Ergebnisse der Analyse des PHEX-Gens</i>	35
3.3.1. Ergebnisse der Analyse des PHEX-Gens mit der MLPA®-Methode	35
3.3.2.a. Frameshift-Mutationen: Duplikation	41
3.3.2.b. Missense Mutationen: Hemizygoten Substitutionen	42
3.3.2.c. Missense-Mutationen: Heterozygoten Substitutionen	43
3.3.2.d. Nonsense-Mutationen	43
3.3.2.e. Splice-site-Mutationen	44
3.3.2.f. Putative Splice-site-Mutationen	45
3.3.2.g. Polymorphismen	45
3.4. <i>Ergebnisse der Analyse des DMP1-Gens</i>	46
3.5. <i>Häufigkeitsanalyse</i>	49
4. Diskussion	50
4.1. <i>Ausblick</i>	69

Zusammenfassung	70
Literaturverzeichnis	71
Anhang	82
<i>a. Tabellen</i>	<i>82</i>
<i>b. Abbildungen</i>	<i>91</i>
Abbildungsverzeichnis	97
Tabellenverzeichnis	98
Lebenslauf	99
Danksagung	100

Abkürzungsverzeichnis

1,25(OH) ₂ D ₃	Calcitriol, aktives Vitamin D
1α-Hydroxylase	25-Hydroxyvitamin-D ₃ -1α-Hydroxylase
25(OH)D	25-Hydroxyvitamin D ₃
A	Adenin
ADHR	Autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis
ARHR	Autosomal rezessive hypophosphatämische Rachitis
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
AS	Aminosäure
ASARM	Acidic serine- and aspartate rich MEPE-associated motif
BMP1	Bone morphogenetic protein 1, Knochenmorphogenetisches Protein 1
Bp	Basenpaar
C	Cytosin
c.(Ziffer)	Position einer Base in der cDNA
cDNA	Komplementäre DNA, kodierende DNA
C-Terminus/-terminal	Carboxy-Terminus/-terminal
Ca, Ca ²⁺	Calcium
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Calciumapatit
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CGH	Comparative genome hybridization
CLCN5	Chloride channel, voltage-sensitive 5
Del	Deletion
DMP1	Dentin matrix protein 1, Dentin matrix acidic phosphoprotein 1
DNA, DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)	Desoxyribonukleosidtriphosphat für Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin
ddNTP (ddATP, ddGTP, ddTTP ddCTP)	Didesoxyribonukleosidtriphosphat für Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENS	Syndrom des epidermalen Nävus
„ENXADXGG“-Motiv	Zink-bindendes Motiv: Glutaminsäure-Asparagin-Beliebig-Alanin-Aspartat-Beliebig-Glycin-Glycin
E ₆₄₂ NIADNGG ₆₄₉	Zink-bindendes Motiv im PHEX-Protein an Position 642-649: Glutamin-Asparagin-Isoleucin-Alanin-Aspartat-Asparagin-Glycin-Glycin
FGF7	Fibroblast growth factor 7
FGF23	Fibroblast growth factor 23
FGFR	Fibroblast growth factor receptor

FGFR1(IIIc)	FGF-Rezeptor 1, Subtyp IIIc
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GALNT3	Polypeptid N-Acetylgalactosaminyltransferase 3
GNAS	Die Alpha-Untereinheit des G-Proteins ($G\alpha$) kodierendes Gen
„HEXXH“-Motiv	Zink-bindendes Motiv: Histidin-Glutaminsäure-Beliebig-Beliebig-Histidin
(H ₅₈₀ EFTH ₅₈₄)	Zink-bindendes Motiv im PHEX-Protein an Position 580-584: Histidin-Glutaminsäure-Phenylalanin-Threonin-Histidin
HHRH	Hereditäre hypophosphatämische Rachitis mit Hyperkalzurie
HRH	Hypophosphatämische Rachitis mit Hyperparathyreoidismus
HYP	Hypophosphatämisch; Hypophosphatämische Rachitis
IGF1	Insulin-like growth factor 1
Ins	Insertion
i.S.	Im Serum
IVS	Intervening Sequence; Intron
kDa	Kilo-Dalton, 1000 Dalton
M	Molar
MEPE	Matrix Extracellular Phosphoglykoprotein
Mg	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MLPA	Multiplex Ligation dependent Probe Amplification [®]
mM	Milli-Molar
mRNA	Messenger RNA
n	Anzahl
N-Terminus, -terminal	Amino-Terminus, -terminal
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NCX1	Natrium-Calcium-Austauscher
NFκB	Nukleärer Faktor Kappa B
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NPT	Natrium-Phosphat-Kotransporter
NPT2a; NaPi-IIa	Natrium-Phosphat-Kotransporter vom Typ 2a, Gen <i>SLC34A1</i>
NPT2b; NaPi-IIb	Natrium-Phosphat-Kotransporter vom Typ 2b, Gen <i>SLC34A2</i>
NPT2c; NaPi-IIc	Natrium-Phosphat-Kotransporter vom Typ 2c. Gen <i>SLC34A3</i>
OCRL1	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphonat-5-Phosphatase kodierendes Gen
P, PO ₄ ³⁻	Phosphat
P(Nr.)	Patientennummer
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHEX	Phosphat regulierendes Gen mit Homologien zu den

	Endopeptidasen auf dem X-Chromosom
PG	Proteoglykan
pM	Pico-Molar
PMCA1b	Plasmamembran-Ca-ATPase 1b
PTH	Parathormon
RANK	Receptor activator of NFκB
RANKL	Receptor activator of NFκB Ligand
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Real-Time-PCR
RXR	Retinoid X receptor
sFRP4	Secreted frizzled related protein 4
SIBLING	Small integrin-binding ligand, N-linked glykoproteins
SLC34Ax	Solute carrier family 34 (sodium phosphate) member x
SNP	Single nucleotide polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismus
SPC	Subtilisin-like pro-protein convertase
SSCP	Single strand conformation polymorphism
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase aus dem Bakterium Thermus-aquaticus
TE	Tris-EDTA-Puffer
TIO	Tumor-induzierte Osteomalazie
TLL1	Tolloid like Proteinase 1
Tm	Schmelztemperatur
TRPV	Transient Receptor Potential Channel, Subtyp Vanilloid-Rezeptor
TRPV5,6	Transient Receptor Potential Channel, Subtyp Vanilloid-Rezeptor 5 bzw. 6
USA(Nummer)	Patientennummer (Zusendung aus den USA)
UTR	Untranslated Region; Untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolettes Licht
VDBP	Vitamin-D-bindendes-Protein
VDR	Vitamin D Rezeptor
VDRE	Vitamin D responsive element
XLH	X-chromosomal dominante hypophosphatämische Rachitis
Zn	Zink
μl	Mikro-Liter

1. Einleitung

1.1. Physiologie des Calcium-Phosphat-Haushalts

Calcium und Phosphat haben einen wesentlichen Einfluss auf diverse biologische Abläufe im menschlichen Körper: Phosphat ist unter anderem in die Nukleinsäuresynthese, den Energiemetabolismus, die Erzeugung zellulärer Signale durch die Phosphorylierung von Proteinen sowie die Stabilisierung von Zellmembranen involviert, während Calcium beispielsweise für die Hormonsekretion, die Muskelkontraktion, die Blutgerinnungskaskade und zur Exzitation von Neuronen benötigt wird (Shaikh et al., 2008, Taylor und Bushinsky, 2009). In Form von Hydroxylapatit liegt ein Großteil des Calciums und Phosphats im Knochen vor und stellt einen maßgeblichen Bestandteil dessen mineralisierter Phase dar (Taylor und Bushinsky, 2009). Durch das Zusammenwirken verschiedener Hormone und deren Erfolgsorgane Gastrointestinaltrakt, Nieren und Knochen wird die Konzentration von Calcium und Phosphat in engen Grenzen konstant gehalten.

1.1.1. Calcium und Phosphat regulierende Organe

Dem menschlichen Körper werden täglich im Durchschnitt 1000 mg Phosphat mit der Nahrung zugeführt, von denen bis zu 70% im Dünndarm, vorrangig im Jejunum, resorbiert werden. Die enterale Resorption erfolgt sowohl durch einen passiven parazellulären Mechanismus, der stark von der luminalen Phosphatkonzentration abhängig ist und keiner Sättigung zu unterliegen scheint (Shaikh et al., 2008), als auch durch einen aktiven natriumabhängigen Transport durch den Natrium-Phosphat-Kotransporter vom Typ 2b (NPT2b) (Sabbagh et al., 2009). Der enteral nicht resorbierte Anteil wird mit dem Stuhl ausgeschieden, zuzüglich einer in das Intestinum sezernierten Menge von ca. 150 mg am Tag.

Das resorbierte Phosphat kann nach dem Übergang in das Blut an Lipide oder Ester gebunden oder in freier Form als anorganisches Phosphat vorliegen. In den Nieren wird von dem glomerulär filtrierte Phosphat im Normalfall ein Großteil (ca. 80%) vor allem entlang der proximalen Tubuli reabsorbiert (Murer et al., 2003).

Der Natrium-Phosphat-Kotransporter NPT2a ist für 70-80% der renalen Phosphatreabsorption verantwortlich (Beck et al., 1998, Hernando et al., 2005). Er wird ausschließlich in der Bürstensaummembran der proximalen Tubuli exprimiert (Custer et al., 1994, Murer et al., 2003), vorrangig in den tiefer liegenden Nephrons (Custer et al., 1994, Madjdpour et al., 2004, Hernando et al., 2005).

Der Natrium-Phosphat-Kotransporter NPT2c vermittelt die verbleibenden 20-30% der Phosphatreabsorption im proximalen Tubulus der Niere (Hernando et al., 2005). In der

1. Einleitung

Studie von Segawa et al. (2002) konnte NPT2c bei der Untersuchung der Ratten-Niere immunhistochemisch ausschließlich in den proximalen Tubuli oberflächlich liegender und juxtamedullärer Nephrons nachgewiesen werden. Weiterhin scheint die Expression altersabhängig zu sein und im Säuglingsalter eine stärkere Bedeutung zu haben als bei Erwachsenen (Segawa et al., 2002).

Der Phosphattransport durch die Kanäle der NPT-Familie erfolgt nach dem Prinzip des sekundär aktiven Transports und stellt einen natriumabhängigen Kotransport dar. Er wird angetrieben durch einen Konzentrationsgradienten mit einer intrazellulär niedrigeren Natriumkonzentration im Vergleich zum Extrazellulärraum, dessen Aufrechterhaltung durch das Zusammenwirken der apikalen NPT-Kotransporter mit der basolateralen Na-K-ATPase gelingt (Razzaque und Lanske 2007).

Auch die Calciumaufnahme findet überwiegend im Dünndarm statt, wo von etwa 1000 mg zugeführtem Calcium ca. 40-50% resorbiert und 300 mg in das Intestinum sezerniert werden, sodass netto eine Resorption von ca. 100-200 mg resultiert. Die enterale Resorption von Calcium kann ebenfalls einem parazellulären Mechanismus folgen, der Tight Junctions involviert und nicht sättigbar zu sein scheint, oder über einen aktiven transzellulären Mechanismus erfolgen (Perez et al., 2008).

An der apikalen Membran des Endothels vermitteln die Calcium-Kanäle TRPV5 und TRPV6 der TRPV-Familie (Transient Receptor Potential Vanilloid) die Aufnahme von Calcium (van Abel et al., 2005). Intrazellulär wird das freie ionisierte Calcium von dem Protein Calbindin gebunden, wodurch eine calciumvermittelte Apoptose der Zelle verhindert wird (Christakos et al., 2007). Der Austritt aus dem Epithel an der basolateralen Membran geschieht aktiv unter Mitwirken der Plasmamembran-Ca-ATPase (PMCA1b) und des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX1) (Perez et al., 2008).

Nach dem Übertritt in das Blut kann das Calcium an Proteine gebunden werden. Nach glomerulärer Filtration des nicht an Proteine gebundenen Calciums in der Niere erfolgt die Reabsorption zum Großteil durch einen passiven natriumabhängigen Transport im proximalen Tubulus (Hoenderop et al., 2005). Aktive Reabsorptionsmechanismen umfassen einen parazellulären Durchtritt durch Tight Junctions im dicken aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife und einen transzellulären Transport in dem distalen und dem Verbindungstubulus, der durch apikale TRPV5- und TRPV6-Kanäle, intrazelluläre Bindung durch Calbindin und basolaterale NCX1 und PMCA1 aufrechterhalten wird (Hoenderop et al., 2005). Im Normalfall liegt ein ausgeglichener Calcium- und Phosphathaushalt vor und die aufgenommenen und ausgeschiedenen Mengen halten sich die Waage.

Der Knochen speichert die Mehrheit des Calciums und Phosphats in Form von Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Der Knochen ist ein dynamisches Organ, das

1. Einleitung

ständig Umbau- und Remodelingprozessen durch die knochenaufbauenden Osteoblasten und die knochenresorbierenden Osteoklasten unterliegt (Taylor und Bushinsky, 2009).

Die mehrkernigen Osteoklasten entstehen durch Fusion ihrer Vorläuferzellen. Sowohl die Osteoklasten als auch ihre Vorläufer exprimieren einen Rezeptor (RANK, receptor activator of nuclear factor- κ B), an den ein von Osteoblasten gebildeter Ligand (RANKL, receptor activator of nuclear factor- κ B ligand) binden kann. Infolgedessen wird der Transkriptionsfaktors NF- κ B (nuclear factor- κ B) aktiviert und er transloziert in den Zellkern (Boyce und Xing, 2007), wo er die Transkription osteoklastischer Gene und die Osteoklastogenese induziert. Durch das Binden von RANKL kann Osteoprotegerin negativ auf die Osteoklastendifferenzierung und die Knochenresorption einwirken (Boyce und Xing, 2007).

Das Konstanthalten der Serumspiegel von Phosphat und Calcium wird durch das Zusammenspiel der Organe Gastrointestinaltrakt, Nieren und Knochen erreicht. Deren Koordination wird einerseits durch die seit Langem bekannten Hormone Parathormon und Calcitriol sowie andererseits durch einige in den letzten Jahren zunehmend im Fokus der Forschung stehende Regulatoren wie die Phosphatonine übernommen. Auf zellulärer Ebene sind unter anderem die Kanäle von der TRPV- und NPT-Familie sowie RANKL, die Vitamin-D- und Calcium-Sensing-Rezeptoren als hormonelle Zielstrukturen bedeutend.

1.1.2. Hormonelle Regulation durch Parathormon und Calcitriol

Vitamin D ist ein wichtiger Bestandteil der komplexen Regulation der Serumspiegel von Calcium und Phosphat. Es kann entweder lichtinduziert aus endogenem 7-Dehydrocholesterol über das Zwischenprodukt Prävitamin D gebildet oder durch die Nahrung aufgenommen werden. In der Zirkulation wird es durch das Vitamin-D-Bindende Protein (VDBP) zur Leber transportiert, wo das Vitamin D zu Calciferdiol (25-OH-Vitamin D) hydroxyliert wird. In den Mitochondrien proximaler Nierentubuluszellen kann entweder die 1α -Hydroxylase (25-Hydroxyvitamin-D₃- 1α -Hydroxylase) das Calciferdiol zu aktivem Calcitriol (1,25(OH)₂D₃) hydroxylieren oder die 24-Hydroxylase inaktiviert es. Die Synthese des Calcitriols wird durch das Parathormon (PTH), das aus der Schilddrüse stammende Calcitonin sowie niedrige Phosphatspiegel gefördert und auch durch Calcitriol selber reguliert, indem es seinen Abbau durch die 24-Hydroxylase stimuliert und die Enzymaktivität der 1α -Hydroxylase inhibiert (Takeyama und Kato, 2011).

Calcitriol ist die aktive Form des Vitamin D und vermittelt seine Funktionen durch das Binden an den nukleären Vitamin-D-Rezeptor (VDR) und den Retinoid X Rezeptor

1. Einleitung

(RXR) (Jurutka et al., 2007). Der Calcitriol-VDR-RXR-Komplex transloziert in den Zellkern, wo er an VDRE (Vitamin D response elements) der DNA bindet und im Sinne eines Transkriptionsfaktors die Genexpression von Proteinen reguliert (Perez et al., 2008).

Die enterale Calciumresorption wird durch Calcitriol verstärkt, indem es die Transkription essentieller Proteine der transzellulären Calciumabsorption wie die apikalen TRPV5, TRPV6, das intrazelluläre Calbindin sowie die basolateralen PMCA1b und NCX1 kontrolliert (Song et al., 2003, Perez et al., 2008). Calcitriol bewirkt auch eine Steigerung der enteralen Phosphatresorption durch eine verstärkte Expression des Natrium-Phosphat-Kotransporters vom Typ 2b (Xu et al., 2002). Eine weitere wichtige Funktion von Calcitriol ist die vermehrte Transkription und Expression des phosphaturischen Faktors FGF23 (Fibroblast growth factor 23) (Kolek et al., 2005, Barthel et al., 2007) sowie des RANKL in Osteoblasten (Holick, 2007).

Das Parathormon ist ein weiterer wichtiger hormoneller Regulator der Calcium- und Phosphathomöostase. Es wird in den Nebenschilddrüsen produziert und in Vesikeln gespeichert. Die Freisetzung aus den Vesikeln wird hauptsächlich durch das Binden von Calcium an den Calcium-Sensing-Rezeptor kontrolliert, wobei eine Hypokalzämie zu einer vermehrten Freisetzung des Parathormons führt.

PTH übt durch das Binden seines G-Protein gekoppelten PTH-Rezeptors folgende Funktionen aus: Im proximalen Tubulus der Niere wirkt PTH phosphaturisch, da es einen negativen Effekt auf die Konzentration der Natrium-Phosphat-Kotransporter NPT2a und NPT2c hat. Ursächlich ist eine Förderung der endozytotischen Entfernung der Transporter aus der Bürstensaummembran sowie deren Abbau in den Lysosomen (Bacic et al., 2006, Segawa et al., 2007). Im distalen Tubulus wirkt PTH calciumretenierend, da es durch eine vermehrte Expression des Calcium-Kanals TRPV5 die Calciumreabsorption fördert (Hoenderop et al., 2001). Einen zusätzlichen Einfluss auf den Calcium- und Phosphathaushalt hat PTH, indem es die Expression der katabolen 1α -Hydroxylase und somit die Synthese von Calcitriol fördert (Bastepe und Jüppner, 2008). Indirekt bewirkt PTH somit auch eine Steigerung der Calcium- und Phosphatresorption im Darm. Calcitriol stellt wiederum einen Regulator für PTH dar und reduziert sekundär dessen Biosynthese und Freisetzung aus den Nebenschilddrüsen infolge einer Erhöhung des Calciumspiegels im Serum sowie durch seine Funktion als Transkriptionsfaktor für das PTH-Gen (Kim et al., 2007).

Im Knochen induzieren Calcitriol und PTH eine katabole Stoffwechsellage, indem sie die Osteoklastogenese und die Knochenresorption durch die Expression bestimmter Zytokine wie RANKL fördern (Kiela und Ghishan, 2009). Eine intermittierende PTH-

1. Einleitung

Exposition stimuliert dagegen die Osteoblasten und die Knochenbildung (Bergwitz und Jüppner, 2010). Die Abbildung 1 fasst die wesentlichen Elemente der PTH-Vitamin-D-Achse zusammen.

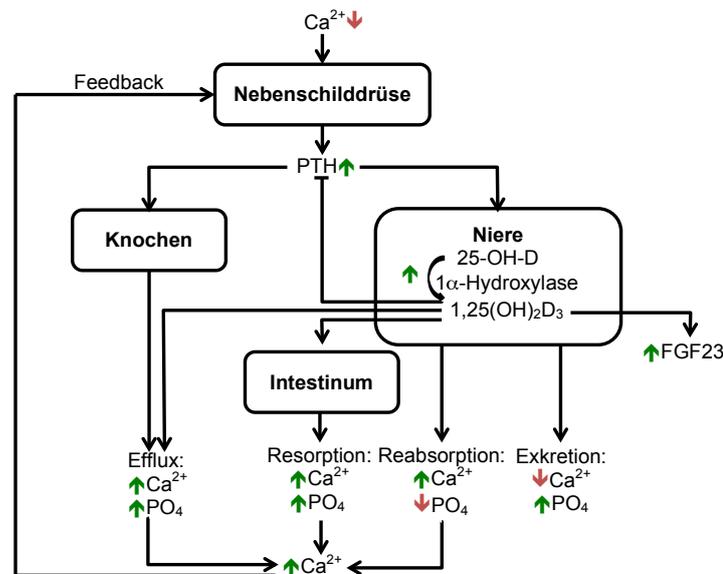


Abbildung 1: Die Parathormon-Vitamin-D-Achse (nachgezeichnet und erweitert nach Quarles, 2008)

Eine Verminderung des freien Calciums im Serum führt in den Nebenschilddrüsen zu einer vermehrten PTH-Sekretion. An der Niere wirkt PTH calciumretinierend und phosphaturisch. PTH fördert die Synthese von Calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) durch die Stimulation der 1α -Hydroxylase-Aktivität, wodurch die Resorption von Phosphat und Calcium im Intestinum gesteigert wird. Im Knochen bewirkt PTH eine vermehrte Freisetzung und Mobilisierung von Calcium und Phosphat. Durch die PTH-vermittelten Wirkungen kommt es netto zu einer leichten Verminderung des Phosphatspiegels sowie zu einer Anhebung des Calciumspiegels im Serum. Letzteres reduziert über einen Feedback-Mechanismus die Sekretion von PTH aus den Nebenschilddrüsen.

1.1.3. Regulation durch Phosphatonine und Minhibine

Lange wurde angenommen, dass die Phosphathomöostase hauptsächlich durch die vornehmlich calciumregulierenden Faktoren Calcitriol und PTH beeinflusst wird. Doch die Untersuchung von Erkrankungen des Phosphathaushalts haben einen weiteren, unabhängigen Regulationsmechanismus offengelegt, der noch immer nicht vollständig verstanden ist. Im Rahmen der Erforschung der Tumorinduzierten Osteomalazie (TIO) wurde die Existenz eines neuen Hormons mit Wirkung auf den Phosphathaushalt beschrieben, das nachfolgend Phosphatonin genannt wurde (Cai et al., 1994, Econs und Drezner, 1994).

Das Phosphatonin ist definiert als ein zirkulierender Faktor, der die renale Phosphatreabsorption vermindert, entgegen der Erwartungen keine kompensatorische Erhöhung der 1α -Hydroxylase-Aktivität und damit der Calcitriolsynthese bewirkt (Berndt et al., 2005) und die Phosphatkonzentration in hohem Maße beeinflusst.

1. Einleitung

Neben dem Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23), dem eine zentrale Rolle in der Phosphatregulation zugesprochen wird, sind als weitere potentielle Phosphatonine unter anderem das secreted frizzled-related protein 4 (sFRP4), der Fibroblast Growth Factor 7 (Carpenter et al., 2005), Klotho und MEPE (Matrix extracellular phosphoglykoprotein) identifiziert worden.

FGF23 wird im Knochen von Osteoblasten und Osteozyten sowie in Zellen der venösen Sinus im Knochenmark, im Thalamus und im Thymus exprimiert (Liu et al., 2006a). Das aus 251 Aminosäuren bestehende FGF23-Protein besitzt in seiner N-terminalen Domäne eine Signalpeptidsequenz, vorrangig im Mittelteil des Proteins Homologien zu anderen Mitgliedern der FGF-Familie und in seiner C-terminalen Domäne eine einzigartige Struktur (Shimada et al., 2001). In vitro besitzt FGF23 nur eine geringe Affinität zu den FGF-Rezeptoren (FGFR), was auf die Existenz von Kofaktoren in vivo hindeutet (Kiela und Ghishan, 2009). Das Transmembranprotein Klotho bindet neben anderen FGFR den FGFR1 (Subtyp IIIc) und macht ihn dadurch zu dem spezifischen Rezeptor für FGF23 (Urakawa et al., 2006, Kurosu et al., 2006). FGF23 bindet diesen FGFR1-Klotho-Komplex mit einer weitaus höheren Affinität als den Rezeptor oder Klotho alleine (Urakawa et al., 2006, Kurosu et al., 2006). Während Klotho zunächst als essentieller Kofaktor für FGF23 verstanden wurde, werden aufgrund neuerer Erkenntnisse auch Klotho-unabhängige Funktionen von FGF23 diskutiert (Razzaque, 2009).

FGF23 übt über multiple Mechanismen einen hypophosphatämischen und phosphaturischen Effekt aus. Die Abbildung 2 gibt einen Überblick über diese Funktionen. FGF23 reduziert die Synthese des phosphat- und calciumeinsparenden Hormons Calcitriol durch eine Verminderung der Expression der anabolen 1α -Hydroxylase einerseits und durch eine Stimulation der katabolen D-24-Hydroxylase andererseits (Shimada et al., 2004; Perwad et al., 2007). Infolgedessen werden durch einen Vitamin-D-Rezeptor-vermittelten Prozess die Transportaktivität und die Konzentration der intestinalen NPT2b-Kanäle vermindert und die Resorption von Phosphat aus dem Intestinum reduziert (Miyamoto et al., 2005).

In der Niere wirkt FGF23 phosphaturisch, indem es die Expression und Aktivität von NPT2a und NPT2c im Epithel proximaler Tubuli vermindert und damit die Reabsorption von Phosphat reduziert (Larsson et al., 2004, Baum et al., 2005). Die Zielstrukturen von FGF23 sind definiert durch das Vorhandensein der FGFR sowie der membrangebundenen Form von Klotho (Karuso et al., 2006, Urakawa et al., 2006). Zunächst konnte die Existenz von Klotho im distalen, jedoch nicht im proximalen Tubulus bestätigt werden, weshalb die Effekte von FGF23 auf den proximalen Tubulus als indirekt gewertet wurden (Quarles 2008). Eine neue Studie belegt jedoch auch die

1. Einleitung

Anwesenheit von Klotho im Epithel und Lumen des proximalen Tubulus (Hu et al., 2010).

Auch die Nebenschilddrüse stellt ein Zielorgan für FGF23 dar (Krajisnik et al., 2007): Der FGF23-Spiegel unterliegt einer Regulation durch Calcitriol, da dieses die Gentranskription und -expression von FGF23 steigert. Somit wird der FGF23-Spiegel auf indirektem Wege durch PTH beeinflusst, da dieses die Calcitriol-Synthese reguliert. FGF23 scheint jedoch in der Nebenschilddrüse in Anwesenheit von FGFR und Klotho einen direkten Effekt auf die Gen-Expression und -Sekretion von PTH zu haben (Ben-Dov et al., 2007, Krajisnik et al., 2007, Galitzer et al., 2008).

Die Expression von FGF23 wird durch verschiedene Faktoren der Calcium-Phosphat-Regelkreise beeinflusst: Das Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) sowie das PHEX-Protein vermindern die Expression (Quarles 2008, Martin et al., 2011), während sie durch einen VDRE-vermittelten Effekt von Calcitriol (Liu et al., 2006b) und erhöhte Phosphatspiegel im Serum erhöht wird (Burnett et al., 2006).

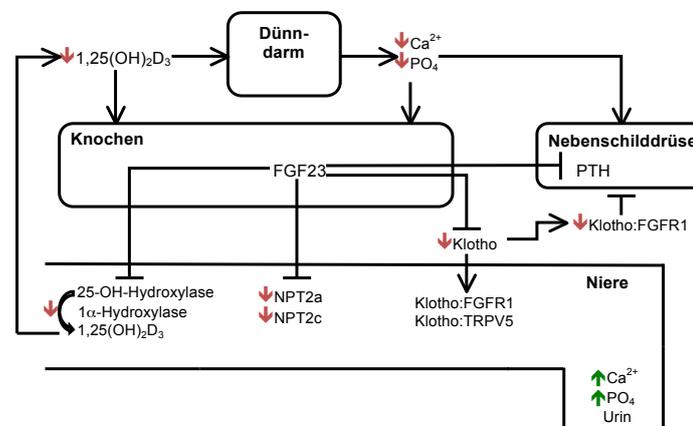


Abbildung 2: Die FGF23-Klotho-Achse (nachgezeichnet und erweitert nach Quarles, 2008)

FGF23 ist ein Hormon mit phosphaturischer und hypophosphatämischer Wirkung, das vorrangig im Knochen gebildet wird. In der Niere bewirkt es eine Verminderung der Phosphat-Reabsorption sowie des Calcitriol-Spiegels infolge einer reduzierten 1α -Hydroxylase-Aktivität. Weiterhin hemmt FGF23 die Expression des Kofaktors Klotho in der Niere sowie die Klotho-TRPV5-vermittelte Calciumreabsorption. In der Nebenschilddrüse vermindert FGF23 die Expression und Sekretion von PTH.

Wie bereits beschrieben hat Klotho in seiner membrangebundenen Form eine wichtige Funktion als Kofaktor für FGF23 und damit in der Regulation des Calcium- und Phosphathaushalts. In seiner sezernierten Form besitzt Klotho aber auch FGF23-unabhängige Funktionen. Dazu zählen unter anderem eine Steigerung der Aktivität des Calciumkanals vom TRPV5-Typ (Chang et al., 2005), die Regulation der Aktivität einiger Wachstumsfaktoren wie dem IGF1 (Insulin-like growth factor 1) (Kurosu et al., 2005) und die Supprimierung des Proteinlevels von NPT2a (Hu et al., 2010).

1. Einleitung

Desweiteren hat Klotho sowohl durch seinen Einfluss auf den Calcium-Phosphathaushalt als auch auf IGF1 einen positiven Effekt auf den Alterungsprozess (Kuro-o, 2011).

Auch das Matrix Extracellular Phosphoglykoprotein (MEPE) steht im Zusammenhang mit der Erforschung regulatorischer Mechanismen im Phosphathaushalt. Diesbezüglich wird ihm eine multifunktionale Rolle zugesprochen (Rowe et al., 2000, 2004a). MEPE besitzt die Eigenschaft eines Phosphatonins und vermindert die renale Phosphatreabsorption (Dobbie et al., 2008) durch eine direkte Beeinflussung des natriumabhängigen Phosphat-Transportes (Rowe et al., 2004a). Weiterhin ist MEPE ein wichtiges Mitglied der SIBLING-Familie (small integrin-binding ligand, N-linked glykoproteins). Dabei handelt es sich um eine Familie polyanionischer Proteine, die in einem Cluster auf dem Chromosom 4q kodiert werden und denen eine Schlüsselrolle in der Mineralisation von Dentin und Knochen zugesprochen wird (Qin et al., 2004). Die SIBLING-Proteine besitzen ASARM-Motive (acidic serine- and aspartate rich MEPE-associated motif), die durch eine Gruppe von Cathepsin-Proteasen in Form von Peptiden freigesetzt werden können (Martin et al., 2008). Diese ASARM-Peptide besitzen die Eigenschaft, die Mineralisation zu hemmen (sog. „Minhibine“), indem sie die Anzahl der Osteoblasten und die Expression osteoblastischer Gene sowie die Differenzierung der Osteoklasten vermindern, direkt an Hydroxylapatitkristalle binden (Martin et al., 2008) und die Expression des PHEX-Proteins reduzieren (Liu et al., 2007). Ein weiterer wichtiger Vertreter der SIBLING Proteine ist das Dentin Matrix Protein 1 (DMP1).

1. Einleitung

1.2. Pathologie im Calcium-Phosphat-Haushalt

Das Referenzintervall für Phosphat im Serum beträgt bei Erwachsenen 2,6-4,5 mg/dl, während es bei Kindern abhängig vom Lebensalter ist. Die Ursachen einer Hypophosphatämie können vielfältig sein. Eine Hypophosphatämie kann unter anderem durch eine verminderte intestinale Aufnahme infolge Malabsorption, Malnutrition oder einem Defekt im Vitamin-D-Regelkreis entstehen; weiterhin kann einer Hypophosphatämie ein Phosphatverlust in der Niere infolge verschiedener hereditärer oder erworbener Erkrankungen der Phosphatreabsorption zugrunde liegen (Bastepe und Jüppner, 2008). Auch ein verstärkter Einstrom von Phosphat in die Zellen aufgrund einer Sepsis oder einer Ketoazidose kann zu einer Hypophosphatämie führen (Bastepe und Jüppner, 2008). In dieser Arbeit liegt der Fokus auf den genetisch bedingten Erkrankungen mit Hypophosphatämie.

Infolge einer langfristig bestehender Hypophosphatämie kommt es zu einem variablen Phänotyp mit Mineralisationsdefekten der Knochen und Zähne. Am Skelett manifestiert sich eine Osteomalazie mit generalisierten Knochenschmerzen und pathologischen Frakturen. In der Kindheit sind zusätzlich die Wachstumsfugen betroffen, infolgedessen sich das klinische Bild einer Rachitis entwickelt. Es kommt zu Auftreibungen metaphysärer Regionen. Desweiteren äußert sich die Hypophosphatämie in einem Kleinwuchs sowie in verbogenen langen Röhrenknochen mit Genua vara oder valga. Weitere Verformungen können am Thorax auftreten und eine Kyphose oder Kielbrust (Pectus carinatum) bedingen. Infolge eines begleitenden Calciummangels kann die Muskulatur betroffen sein und eine Krampfneigung oder Tetanie aufweisen. An den Zähnen manifestiert sich der Mineralisationsdefekt in Form von Zahnfäule und Abszessen am Zahnhals.

1.2.1. X-chromosomal dominante hypophosphatämische Rachitis (XLH)

Die X-chromosomal dominante hypophosphatämische Rachitis ist die am meisten verbreitete hereditäre Erkrankung mit Phosphatverlust. Die Erkrankungshäufigkeit liegt bei ca. 1:20.000. Erstmals wurde diese Erkrankung als „Vitamin-D resistente Rachitis“ bezeichnete Erkrankung von Albright et al. im Jahre 1937 in Abgrenzung zu der damals vorherrschenden Vitamin-D-Mangel-Rachitis beschrieben.

Ursächlich sind inaktivierende Mutationen im PHEX-Gen (Phosphat Regulierendes Gen mit Homologien zu den Endopeptidasen auf dem X-Chromosom), das sich auf dem X-Chromosom (Xp 22.1 - Xp 22.2) befindet. Es umfasst 22 Exons und kodiert ein Protein mit 749 Aminosäuren, das signifikante Homologien zu der M13-Familie der membrangebundenen Zink-Metalloproteasen aufweist (HYP Consortium, 1995). Diese integralen Membranglykoproteine besitzen eine kurze cytoplasmatische N-terminale

1. Einleitung

Domäne sowie eine kurze transmembranäre Domäne und eine große extrazelluläre C-terminale Domäne mit Zink-bindendem Motiv (Rowe, 2004b). Das PHEX-Protein weist zwei konservierte Zink-bindende Motive auf, zum Einen das in den meisten Endopeptidasen konservierte „HEXXH“-Motiv (Strom und Lorenz-Depiereux, 2001), das die Aminosäuren 580-548 umfasst ($H_{580}EFTH_{584}$) und von Exon 17 kodiert wird. Zum Anderen enthält es das für die M13-Familie charakteristische „ENXADXGG“-Motiv (Strom und Lorenz-Depiereux, 2001), das von Exon 19 kodiert und von den Aminosäuren 642-649 gebildet wird ($E_{642}NIADNGG_{649}$). Weiterhin besitzt das PHEX-Protein zehn konservierte Cysteinreste.

Das PHEX-Protein wird in vielen Geweben exprimiert, aber vorrangig in reifen Osteoblasten und Odontoblasten (Bastepe und Jüppner, 2008). Die Expression von PHEX wird durch eine Vielzahl an Hormonen reguliert: Glukokortikoide (Hines et al., 2002), IGF1 und das Wachstumshormon (Zoidis et al., 2002) erhöhen seinen Spiegel, während Vitamin-D (Hines et al., 2004), ASARM-Peptide (Martin et al., 2008) sowie PTH (Alos und Ecarot, 2005) und PTH-related Peptid (Vargas et al., 2003) den gegenteiligen Effekt haben.

Obwohl PHEX seit Jahren im Fokus der Forschung steht, sind viele Details wie das physiologische Substrat und die genaue Rolle in der Knochenmineralisierung und der renalen Phosphatregulation nicht gänzlich geklärt. Gängige Meinung ist es aber, dass PHEX einen phosphaturischen Faktor oder die gesamte Gruppe der Phosphatonine inaktiviert. Zeitweilig wurde angenommen, dass FGF23 das gesuchte Phosphatonin und das Substrat von PHEX ist (Bowe et al., 2001). Die Annahme, dass PHEX das FGF23-Protein spaltet konnte widerlegt werden, allerdings vermindert PHEX dessen Spiegel durch die Regulation seiner Expression (Liu et al., 2003). Folglich findet sich bei inaktivierenden PHEX-Mutationen ein erhöhter Spiegel an FGF23, wodurch es zu einer verminderten Phosphatreabsorption im proximalen Tubulus der Niere und zu einer Hypophosphatämie kommt.

Weiterhin bindet PHEX mit dem Zink-bindenden Motiv das ASARM-Motiv des MEPE-Proteins und verhindert dadurch dessen Hydrolyse durch Cathepsin-B und die Freisetzung des ASARM-Peptids (Martin et al., 2008). Durch einen Verlust dieser hemmenden Funktion bei XLH-Patienten und im murinen Modell bei den sog. HYP-Mäusen kommt es zu einem gesteigerten Abbau von MEPE und vom DMP1-Protein mit der Freisetzung großer Mengen an ASARM-Peptiden (Martin et al., 2008). Die ASARM-Peptide sind mit ihrer mineralisationshemmenden und phosphaturischen Wirkung (Vergleich Abschnitt 1.1.3.) wahrscheinlich eine Schlüsselursache für die Mineralisationsdefekte bei Patienten mit XLH (Martin et al., 2008).

1. Einleitung

Aktuell sind in der ständig aktualisierten PhexDatabase der McGill-Universität in Kanada (Sabbagh et al., 2000) 328 Mutationen beschrieben worden, die mit XLH assoziiert sind (Tag des Zugriffs 06.06.2013). Darunter befinden sich sowohl Basenpaarsubstitutionen als auch Insertionen und Deletionen, die zu einem Verlust der Funktion von PHEX führen. Es gibt jedoch Patienten mit der klinischen Diagnose einer XLH, die keine Mutation in der kodierenden Region aufweisen. In diesem Kontext wurde gezeigt, dass XLH auch durch Mutationen bedingt sein kann, die zu Pseudoexons führen. Es wird geschätzt, dass Mutationen dieser Art 0,6% der PHEX-Mutationen ausmachen (Christie et al., 2001).

Die Symptome der XLH treten meist im Laufe der ersten Lebensjahre auf und verstärken sich infolge mechanischer Belastung. Die Symptome sind innerhalb einer betroffenen Familie oft variabel ausgeprägt. Vom Genotyp lässt sich nicht auf die klinische Ausprägung bei den Patienten rückschließen. Die Studie von Holm et al. (2001) konnte weder eine signifikante Korrelation zwischen Phänotyp und der Lokalisation der Mutation (5' versus 3' des Zink-bindenden Motivs an AS 649) noch der Art der Mutation (Protein verkürzende versus nicht verkürzende Mutationen) für die gesamte Kohorte nachweisen. Eine Korrelation nahe der Signifikanzgrenze konnte lediglich unter Ausschluss der sporadischen Fälle bei der Betrachtung der familiären Fälle zwischen verkürzenden Mutationen und stärker ausgeprägten Skelettbeteiligungen nachgewiesen werden (Holm et al., 2001). In der Studie von Song et al. (2007) gab es Hinweise auf eine ausgeprägtere skelettale Symptomatik bei Mutationen in der C-terminalen Hälfte des PHEX-Proteins.

Infolge des X-chromosomalen Erbgangs wäre ein Gen-Dosis-Effekt denkbar, der sich in einer geringeren Symptomatik bezüglich der dentalen und skelettalen Erkrankung bei weiblichen gegenüber männlichen Betroffenen widerspiegeln würde. Dieses hat sich jedoch nicht nachweisen lassen (Holm et al., 2001, Cho et al., 2005, Song et al., 2007). Die XLH scheint eine reverse Antizipation zu besitzen, d.h. einen Trend zu milderer Symptomatik in jüngeren Generationen (Holm et al., 2001), wofür eine zunehmend frühere und effektivere Behandlung ursächlich sein könnte.

1. Einleitung

1.2.2. Autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis (ADHR)

Die autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis ist eine sehr seltene Erkrankung, die erstmals 1971 beschrieben wurde (Bianchine et al., 1971) und sich durch eine Hypophosphatämie infolge eines renalen Phosphatverlustes sowie einen unpassend normwertigen Calcitriol-Spiegel auszeichnet. Ursächlich sind aktivierende Missense-Mutationen im FGF23-Gen (ADHR Consortium 2000) und ein erhöhter FGF23-Spiegel (Imel et al., 2007).

Das 32 kDa schwere Glykoprotein FGF23 unterliegt einer posttranslationalen Modifizierung im Golgi-Apparat, wo FGF23-spaltende und –aktivierende Enzyme konkurrieren und dessen Sekretion beeinflussen (Kato et al., 2006). Das FGF23-Protein besitzt die Aminosäuresequenz Arginin¹⁷⁶-Histidin¹⁷⁷-Threonin¹⁷⁸-Arginin¹⁷⁹ (R¹⁷⁶HTR¹⁷⁹), die mit der Erkennungssequenz „RXXR“ einer Gruppe von Propeptidkonvertasen (subtilisin-like pro-protein convertase, SPC) übereinstimmt. Die Spaltung und Inaktivierung des FGF23-Proteins wird durch die SPCs vorgenommen (Benet-Pagès et al., 2004) und findet zwischen dem Arginin¹⁷⁹ und dem Serin¹⁸⁰ statt (Shimada et al., 2002).

Zur Sekretion des intakten FGF23 ist eine O-Glykosylierung nötig, die von der Glykosyltransferase GALNT3 (Polypeptid N-Acetylgalactosaminyltransferase 3) selektiv am Threonin¹⁷⁸ vorgenommen wird (Kato et al., 2006). Zusätzlich blockiert die O-Glykosylierung die Erkennungssequenz für die SPCs und verhindert eine Inaktivierung (Kato et al., 2006). Alle bisher identifizierten Mutationen bei Patienten mit ADHR sind Missense-Mutationen, die auf Proteinebene das Arginin¹⁷⁶ oder das Arginin¹⁷⁹ betreffen und somit die Erkennungssequenz der SPCs verändern. Infolgedessen wird das Protein nicht inaktiviert, was zu einer Akkumulation aktiver FGF23-Proteine mit konsekutiver Verstärkung seiner phosphaturischen Funktionen führt (White et al., 2001).

Klinisch manifestiert sich die ADHR mit unvollständiger Penetranz und einem variablen Beginn, der entweder im Erwachsenenalter liegen und zu der Ausbildung einer Osteomalazie ohne Verformungen der unteren Extremität führen kann, oder im Kindesalter liegen und zum Vollbild einer Rachitis mit Beteiligung der Wachstumsfugen und Verformungen der unteren Extremität führen kann (Econs und McEnery, 1997). Interessanterweise konnte bei Patienten mit frühem Beginn der Krankheitserscheinungen eine spontane Remission des renalen Phosphatverlustes nach der Pubertät beobachtet werden (Econs und McEnery, 1997, Kruse et al., 2001).

1. Einleitung

1.2.3. Autosomal rezessive hypophosphatämische Rachitis (ARHR)

Die autosomal rezessive hypophosphatämische Rachitis ist eine weitere sehr seltene Erkrankung des Phosphathaushalts, die zu einer Hypophosphatämie infolge eines renalen Phosphatverlustes führt. Laborchemisch zeigt sich ein erhöhter oder normwertiger FGF23-Wert, ein normwertiger oder erniedrigter Calcitriol-Spiegel und eine erhöhte Aktivität der Alkalischen Phosphatase.

Klinisch entwickelt sich ein Phänotyp mit Rachitis bzw. Osteomalazie, der von XLH- und ADHR-Patienten nicht zu unterscheiden ist. Ursächlich sind homozygote Mutationen im Gen für das Dentin Matrix Protein 1 (Lorenz-Depiereux et al., 2006). Es befindet sich auf dem Chromosom 4q21 und enthält 6 Exons. Das DMP1-Protein umfasst 513 Aminosäuren und ist ein stark polyanionisches, nicht kollagenes Matrixprotein, das zur SIBLING-Familie gehört.

DMP1 wird vorwiegend in mineralisierten Geweben exprimiert (Qin et al., 2007). Die Expression ist stadienabhängig und findet während der embryonalen Entwicklung verstärkt in hypertrophen Chondrozyten und Osteoblasten und postnatal in Osteozyten (Feng et al., 2002) sowie Odontoblasten statt.

DMP1 wird als Präkursor exprimiert und proteolytisch in eine N-terminale 37kDa- und eine C-terminale 57kDa-Einheit gespalten (Qin et al., 2003), wobei letztere die funktionelle Domäne darstellt (Lu et al., 2008). Die These, dass durch PHEX die funktionelle Domäne vom DMP1-Präkursor abgespalten wird, konnte nicht bestätigt werden (Lu et al., 2008). Stattdessen scheint dieser Vorgang durch Bone Morphogenetic Protein 1/Tolloid like Proteinase (BMP1/TLL1) vermittelt zu werden (Qin et al., 2003, Steiglitiz et al., 2004), dessen Präkursor pro-BMP1 zuvor durch Furin-like Proproteinkonvertasen im Golgi-Apparat aktiviert wird (Lu et al., 2008). Außerdem wird DMP1 wie die anderen SIBLING-Proteine durch Cathepsin B gespalten und setzt infolgedessen ASARM-Peptide bzw. Minhibine frei (Martin et al., 2008).

In der Knochenformierung wird DMP1 eine duale, phasenabhängige Rolle zugesprochen: Im Zellkern undifferenzierter Osteoblasten liegt DMP1 in seiner nicht phosphorylierten Form vor und aktiviert im Sinne eines Transkriptionsfaktors die osteoblastenspezifische Gene von Osteocalcin und der alkalischen Phosphatase (Narayanan et al., 2003). Während der Reifung zum Osteoblasten wird DMP1 im Zellkern durch die Kasein Kinase II phosphoryliert und transloziert in die Extrazellulärmatrix, wo es die Mineralisation beeinflusst (Narayanan et al., 2003). Darüber hinaus führt DMP1 zu einer verminderten Expression von FGF23 in Osteozyten (Martin et al., 2011).

1. Einleitung

Im Falle eines defekten DMP1, wie es bei Patienten mit ARHR und der DMP1-Null-Maus vorliegt, bleibt der Differenzierungs- und Mineralisierungsprozess des Knochens aus und es kommt zu einem starken Anstieg der FGF23-mRNA in Osteozyten mit nachfolgender Beeinflussung der Regulationsmechanismen des Phosphatspiegels (Feng et al., 2006). Desweiteren fehlt DMP1 als essentieller Bestandteil für eine normale Knorpel- und Dentinbildung (George et al., 2007).

1.2.4. Diagnostik

Die laborchemischen und klinischen Auffälligkeiten bei Patienten mit hypophosphatämischer Rachitis entwickeln sich abhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung im Laufe der ersten Lebensmonate und -jahre (XLH) oder auch erst im Erwachsenenalter (ADHR, adulte Gruppe) und können unterschiedlich stark ausgeprägt sein.

Die klinischen Leitbefunde sind ein disproportionierter Kleinwuchs, eine verminderte Wachstumsgeschwindigkeit und Skelettverformungen. Auffälligkeiten am Skelett lassen sich mithilfe von Röntgenuntersuchungen eventuell bereits im Säuglingsalter nachweisen.

Die charakteristische Laborkonstellation weist neben der Hypophosphatämie einen erhöhten Wert für die Alkalische Phosphatase und das FGF23-Protein sowie ein normwertiges Calcium i.S. auf. Das Parathormon hat einen normwertigen bis erhöhten Spiegel. Das Calcitriol ist bei XLH, ADHR sowie ARHR trotz eines verminderten Serumphosphatspiegels nicht erhöht. Die tubuläre Phosphatreabsorption in der Niere ist vermindert und die Calciumausscheidung im Urin normwertig, falls keine assoziierte Hyperkalziurie vorliegt.

Häufig liegt eine positive Familienanamnese vor, allerdings gibt es auch sporadische Fälle durch *de novo* Mutationen. Ohne Kenntnis der Genetik lässt sich mithilfe des diagnostischen Vorgehens keine eindeutige Zuordnung zu einer der genannten Erkrankungen vornehmen.

1.2.5. Therapie

Der möglichst frühzeitige Beginn einer Therapie ist anzustreben, um Mineralisationsdefekte an Knochen und Zähnen zu verhindern.

Patienten mit XLH werden derzeit mit einer oralen Substitution von Phosphat und aktivierten Vitamin-D-Metaboliten (z.B. Rocaltrol®) behandelt. Die Gabe von Phosphat erfolgt zum Ausgleich der Hypophosphatämie in mehreren Tagesdosen. Da durch eine Applikation von Phosphat die Entwicklung eines sekundären Hyperparathyreoidismus begünstigt wird, erfolgt zusätzlich die Gabe von Calcitriol. Die Therapie mit Calcitriol

1. Einleitung

muss dem Lebensalter angepasst werden und erfolgt, um der Entwicklung eines sekundären Hyperparathyreoidismus entgegenzuwirken, Calcium und PTH im Serum im Normbereich zu halten, die Aktivität der Alkalischen Phosphatase zu normalisieren sowie eine erhöhte renale Calciumausscheidung zu verhindern (Bastepe und Jüppner, 2008). Der Einsatz von Wachstumshormonen war umstritten (Haffner et al., 2004), neuere Studien belegen jedoch eine Zunahme des Längenwachstums im Vergleich zu einer konservativ behandelten Kontrollgruppe (Živičnjak et al., 2011). Weiterhin kann eine zahnmedizinische Therapie infolge von Abszessbildungen oder eine orthopädische bzw. chirurgische Therapie zur Korrektur starker Skelettverformungen notwendig werden. Die Therapie der ADHR und der ARHR ist stark an dieses Konzept angelehnt.

Der Therapieerfolg wird regelmäßig durch körperliche und laborchemische Untersuchungen gesichert. Die wichtigste therapieinduzierte Nebenwirkung stellt die Nephrokalzinose dar, die durch eine hohe renale Ausscheidung von Calcium und Phosphat entsteht. Daher finden wiederholt Sonographien der Nieren statt, um eine Nephrokalzinose frühzeitig erkennen und behandeln zu können. Die apparative Diagnostik umfasst weiterhin Röntgenuntersuchungen zur Beurteilung der Osteomalazie und Rachitis.

1.2.6. Weitere genetische Störungen des Phosphatstoffwechsels

Es gibt weitere Erkrankungen, die zu einer Hypophosphatämie führen. Man kann sie unterteilen in eine Gruppe von Erkrankungen, die direkt die Phosphatreabsorption betreffen und eine Gruppe, die sekundär infolge einer Erhöhung des FGF23-Spiegels zu einer Hypophosphatämie führen. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über einige der wichtigsten Entitäten.

Die Osteoglophonische Dysplasie (OGD) ist neben den beschriebenen Erkrankungen XLH, ADHR und ARHR eine weitere hereditäre, FGF23-abhängige Erkrankung. Zugrunde liegt eine aktivierende Mutation im FGFR1-Gen, die autosomal dominant vererbt wird und zu einem erhöhten FGF23-Spiegel führt (White et al., 2005).

Die Tumorinduzierte Osteomalazie wird durch einen zirkulierenden Faktor verursacht, der durch einen mesenchymalen Tumor gebildet wird und zu einer Hypophosphatämie, einen renalen Phosphatverlust und einen unerwartet niedrigen Calcitriol-Wert führt. Es werden erhöhte Werte für FGF23, MEPE, DMP1 und sFRP4 beobachtet (Berndt et al., 2003).

1. Einleitung

Tabelle 1. Überblick über FGF23-abhängige hypophosphatämische Erkrankungen (modifiziert und erweitert nach Quarles, 2008)

Klinische Syndrome	Gen/Protein	Mechanismus
a. Hereditär		
X-chromosomal dominante hypophosphatämische Rachitis (XLH)	Phosphat regulierendes Gen mit Homologien zu den Endopeptidasen auf dem X-Chromosom (PHEX)	Vermehrte FGF23-Bildung durch Osteozyten
Autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis (ADHR)	Fibroblast growth factor 23 (FGF23)	Erhöhter FGF23-Spiegel durch verminderten Abbau
Autosomal rezessive hypophosphatämische Rachitis (ARHR)	Dentin matrix protein 1 (DMP1)	Vermehrte FGF23-Bildung durch Osteozyten
Osteoglophonische Dysplasie (OGD)	Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1)	Vermehrte FGF23-Bildung/-Funktion am Endorgan
b. Erworben/Sporadisch		
Hypophosphatämische Rachitis mit Hyperparathyreoidismus (HRH)	Klotho	Erhöhte Klotho- und FGF23-Spiegel
McCune-Albright-Syndrom/Fibröse Dysplasie	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha stimulating activity polypeptide (GNAS)	Erhöhte FGF23-Produktion durch fibröse Läsionen im Knochen
Tumorinduzierte Osteomalazie (TIO)	Evtl. Matrix Extracellular Phosphoglykoprotein (MEPE) und Secreted frizzled related protein 4 (sFRP4)	Vermehrte FGF23-Bildung durch Tumoren
Syndrom des epidermalen Nävus (ENS)	Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3)	Erhöhte FGF23-Spiegel durch aktivierende FGFR3-Mutationen

Zusammenfassende Darstellung FGF23-abhängiger hypophosphatämischer Erkrankungen mit der Bezeichnung des klinischen Syndroms, des betroffenen Gens bzw. Proteins sowie dem Entstehungsmechanismus. a. Hereditäre FGF23-abhängige hypophosphatämische Rachitiden. b. Erworbene bzw. sporadische FGF23-abhängige hypophosphatämische Rachitiden.

In Tabelle 2 sind hereditäre Erkrankungen zusammengetragen, die primär die renale Phosphatreabsorption betreffen.

1. Einleitung

Tabelle 2. Überblick über hereditäre, primäre Störungen der Phosphatreabsorption (modifiziert und erweitert nach Quarles, 2008)

Klinische Syndrome	Gen/Protein	Mechanismus
Hereditäre hypophosphatämische Rachitis mit Hyperkalziurie (HHRH)	Solute carrier family 32 (sodium phosphate), member 3 (SLC34A3)	Phosphaturie durch einen Defekt des NPT2c mit verminderter Phosphatreabsorption
Autosomal rezessive pulmonale alveoläre Mikrolithiasis (PAM)	Solute carrier family 32 (sodium phosphate), member 2 (SLC34A2)	Transporterdefekt des NPT2a, ohne Hypophosphatämie
Debré-de-Toni-Fanconi-Syndrom	Glucose transporter Typ 2 (GLUT2), Gen: Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter, member 2 (SLC2A2)	Phosphaturie durch tubuläre Transportstörung und Verlust von Aminosäuren
X-linked recessive hypophosphatemic rickets	Chloride channel, voltage-sensitive 5 (CLCN5)	Phosphaturie durch Störung der Endozytose und Verteilung der NPT2c, führt zum partiellen Fanconi-Syndrom mit Proteinurie und Hyperkalziurie
Lowé Syndrom/Okulo-cerebro-renales Syndrom (LOS)	Oculocerebrorenal syndrome of Lowé (OCRL1)	Phosphaturie durch Störung der Endozytose von NPT2, führt zum sekundären Fanconi-Syndrom mit Proteinurie

Zusammenfassende Darstellung primärer, hereditärer Störungen der Phosphatreabsorption, mit der Bezeichnung des klinischen Syndroms, des betroffenen Gens bzw. Proteins sowie dem Entstehungsmechanismus.

Zu den Erkrankungen, die primär die renale Phosphatreabsorption betreffen, zählt die hereditäre hypophosphatämische Rachitis mit Hyperkalziurie (HHRH). Sie unterliegt einem autosomal rezessiven Vererbungsmechanismus und beruht auf inaktivierenden Mutationen im Gen des NPT2c-Transporters im proximalen Tubulus der Niere (Bergwitz et al., 2006). Die Patienten weisen neben der Hypophosphatämie einen erhöhten Spiegel von Calcitriol auf, infolgedessen es zu einer verstärkten intestinalen Absorption und renalen Exkretion von Calcium kommt.

1. Einleitung

1.3. Fragestellung dieser Arbeit

Der Prozess der Diagnoseerstellung und Therapieeinstellung bei Patienten mit hypophosphatämischer Rachitis erfolgt oft erst nachdem wertvolle Zeit verstrichen ist und der Patient bereits manifeste rachitische Symptome aufweist. Aufgrund des klinischen Erscheinungsbildes und laborchemischer Untersuchungen ist eine Differenzierung zwischen den hereditären hypophosphatämischen Erkrankungen XLH, ADHR und ARHR aufgrund der ähnlichen Pathomechanismen bislang nicht möglich. Durch die Untersuchung der DNA-Proben von Patienten mit klinisch erstellter Diagnose einer hypophosphatämischen Rachitis soll in dieser Arbeit das molekulargenetische Korrelat in Form einer Mutation im Gen für PHEX, FGF23 oder DMP1 gefunden und beschrieben werden.

Die Analyse der DNA erfolgt unter Verwendung von zwei verschiedenen Methoden. Bei der Sequenzierung handelt es sich um ein Standardverfahren der molekulargenetischen Diagnostik, während die Multiplex Ligation dependent Probe Amplification (MLPA) von PHEX ein relativ neues Verfahren ist. Es stellt sich die Frage, ob sich die MLPA-Methode als zusätzliche Screeningmethode eignet und ob sich durch ihren Einsatz das diagnostische Verfahren bei Verdacht auf hypophosphatämische Rachitis optimieren lässt.

2. Material und Methoden

Die Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte befindet sich in den Tabellen A2-A18 im Anhang. Von der Auflistung ausgenommen sind Materialien, die zu der Standardausrüstung eines Labors gehören.

2.1. Patientenproben und Versuchsablauf

In dieser Studie wurden DNA-Proben von 57 Patienten untersucht. Den Untersuchungen wurde am 23.01.2004 von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck unter der Nummer 04-020 zugestimmt. Das Kriterium zur Aufnahme in diese Studie ist der Verdacht auf eine hereditäre hypophosphatämische Rachitis, der auf Auffälligkeiten in der laborchemischen Konstellation, der klinischen Symptomatik sowie ggf. einer positiven Familienanamnese beruht. Der Ablauf der Untersuchungen wird in Abbildung 3 wiedergegeben.

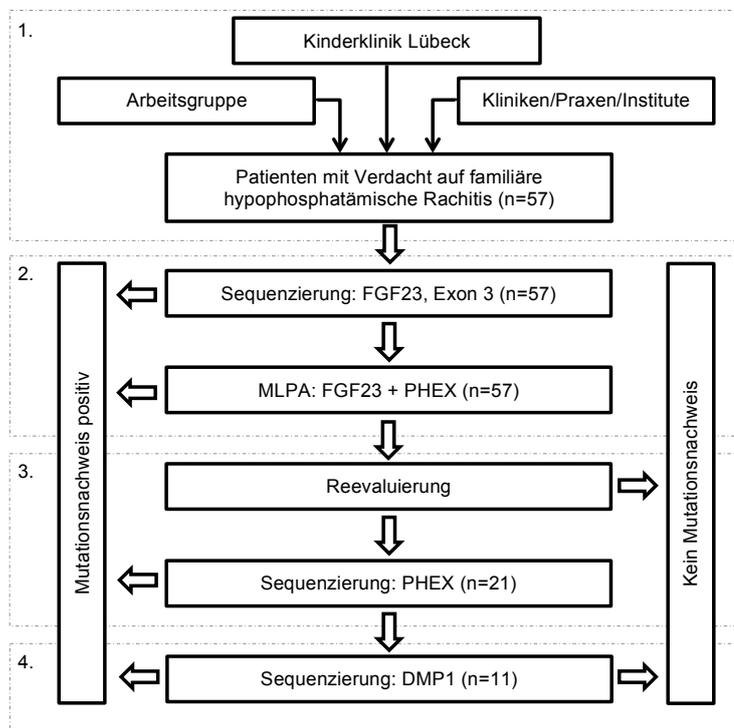


Abbildung 3: Darstellung des Studiendesigns

Darstellung des Studiendesigns. 1. Patientenkollektiv: Eine Blutprobe zur Gewinnung der DNA wurde den Patienten entweder in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Lübeck entnommen oder von einer anderen Institutionen zugesandt. Das Patientenkollektiv enthält darüber hinaus Patientenproben, die in einer vorangegangenen Studie dieser Arbeitsgruppe mithilfe der SSCP-Methode auf Mutationen des PHEX-Gens

untersucht wurden und bei denen kein Mutationsnachweis gelang. 2. Molekulargenetische Untersuchung: Sequenzierung des Exons 3 des FGF23-Gens gefolgt von der MLPA-Methode (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), mit der sowohl das PHEX- als auch das FGF23-Gen untersucht werden. 3. Die Patienten mit unauffälligen Analysen wurden entsprechend der Datenlage und Anzahl der Voruntersuchungen reevaluiert, sodass sich bei 21 Patienten die Sequenzierung des PHEX-Gens anschloss. 4. Patienten, die mithilfe der MLPA und der Sequenzierung weder eine Mutation im PHEX- noch im FGF23-Gen aufweisen, können von der sehr seltenen ARHR betroffen sein.

2. Material und Methoden

Die entsprechende Untersuchung des DMP1-Gens fand in Kooperation mit dem Labor Prof. Jüppner, Massachusetts General Hospital, Boston, statt.

2.2. DNA-Extraktion

Um die molekulargenetischen Untersuchungen durchführen zu können, wird die DNA der Patienten benötigt. Es wurde den Patienten Blut entnommen und mit dem Gerinnungshemmer EDTA vermischt. Unter Anwendung des QiaAmp DNA Blood Maxi Kit wurde die DNA aus dem EDTA-Vollblut isoliert und weiter bearbeitet.

2.3. Konzentrationsbestimmung und Arbeitsverdünnung

Um unterschiedliche Konzentrationen der DNA-Proben nach der Extraktion anzugleichen, ist mithilfe eines Bio-Photometers (Eppendorf) eine Konzentrationsbestimmung der mit TE-Puffer verdünnten DNA-Probe durchzuführen. Dabei macht man sich das Phänomen zunutze, dass DNA und RNA ein Absorptionsmaximum von ultraviolettem Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm aufweisen. Entsprechend des Lambert-Beer-Gesetzes lässt sich die Konzentration des absorbierenden Moleküls mit der Menge des absorbierten Lichts korrelieren. Mithilfe der so errechneten Konzentration lässt sich eine Arbeitsverdünnung von 100 ng/µl herstellen. Eine Kontamination mit Proteinen, die ein Absorptionsmaximum bei 280 nm aufweisen, lässt sich mithilfe des Quotienten E_{260}/E_{280} abschätzen, der bei reiner DNA 1,8 betragen sollte.

2.4. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase Chain Reaction ist eine Methode, die es erlaubt einen definierten DNA-Abschnitt unter Verwendung eines ausgewählten Primerpaares und einer thermostabilen Taq-Polymerase exponentiell zu vervielfältigen, indem die Prozesse Denaturierung, Annealing und Elongation mithilfe eines Thermocyclers periodisch durchlaufen werden.

Der Prozess beginnt mit einer Denaturierung der DNA bei 94°C bis 96°C, infolgedessen die Doppelstränge in Einzelstränge getrennt werden. Bei einer von dem jeweilig verwendeten Primerpaar abhängigen Temperatur findet das Annealing statt. In diesem Schritt legen sich die Primer, die zuvor so ausgewählt wurden, dass sie die Region des Interesses auf dem DNA-Strang flankieren, komplementär an die Proben-DNA. In der Elongationsphase bindet die thermostabile Polymerase bei 72°C an die Primer und komplettiert die DNA-Einzelstränge unter Verwendung beigesetzter Oligonukleotide zu Doppelsträngen. Darauf folgt ein weiterer Denaturierungsschritt bei

2. Material und Methoden

94°C, sodass am Ende eines Zyklus doppelt so viele Einzelstränge vorliegen wie zu Beginn. Dieser Reaktionszyklus wird vielfach durchschritten.

2.4.1. Optimierung der PCR-Bedingungen

Um ein spezifisches Anlagern der Primer während der Annealing-Phase zu ermöglichen, muss die entsprechende Temperatur für jedes Primerpaar gewählt werden. Während eine zu niedrig gewählte Temperatur unspezifische Bindungen begünstigt und eine Amplifizierung unerwünschter Produkte zur Folge hat, führt eine zu hoch gewählte Annealingtemperatur zum Ausbleiben der Bindung.

2.4.1.a. Berechnung der Annealing-Temperatur

Zum Berechnen der optimalen Temperatur hat sich bei Primern die Wallace-Regel („4+2-Regel“) durchgesetzt, bei der man zur Errechnung der Schmelztemperatur je Adenin und Thymin in der Primersequenz mit 2 und je Guanin und Cytosin mit 4 multipliziert:

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$$

Die Summe ergibt einen Richtwert für die Schmelztemperatur. Dem liegt zugrunde, dass die Schmelztemperatur eines Nukleinsäurenfragments von der Anzahl seiner Basen sowie der Zusammensetzung der Basen abhängig ist. Da G-C-Basenpaarungen durch drei Wasserstoffbrückenbindungen und A-T-Basenpaarungen durch zwei Wasserstoffbrücken stabilisiert werden, erhöhen erstere die Stabilität und damit die Schmelztemperatur.

2.4.1.b. Gradienten-PCR

Mithilfe einer Gradienten-PCR können für einen Primer verschiedene Annealingtemperaturen getestet werden. Alle Proben unterliegen gleichzeitig denselben Bedingungen, lediglich die Annealing-Temperatur im Mastercycler Gradient (Eppendorf) wird ausgehend von der errechneten Schmelztemperatur in 0,5°C-Schritten variiert, sodass bei 10 Proben eine Spannbreite von 5°C getestet werden kann. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist im Anhang in der Tabelle A18 aufgeführt. Nach dem Ablauf der PCR werden die Proben entsprechend dem Abschnitt 2.4.3. mithilfe einer Elektrophorese aufgetrennt und die Banden ausgewertet. Die Annealing-Temperatur mit dem besten Ergebnis wird für die Patientenproben ausgewählt.

2. Material und Methoden

2.4.2. Durchführung der PCR

In der Regel werden Versuche mithilfe des AmpliTaq DNA Polymerase Kits von Applied Biosystems durchgeführt. Jede Probe enthält je 1,0 µl Primer Sense und Antisense (20 pm), 5,0 µl 10x Puffer, 5,0 µl 2 mM dNTPs, 0,2 µl AmpliTaq Polymerase 5U/µl und 37,0 µl Aqua bidest. Dem Reagenzienmix von 49 µl wird 1,0 µl DNA 100ng/µl hinzugegeben. Bei jedem PCR-Versuch wird darüber hinaus eine Kontrollprobe angesetzt, die keine DNA enthält und dem Ausschluss einer Verunreinigung des Reagenzienmixes dienen soll. Die Proben durchlaufen im Thermocycler PTC 200 (MJ Research) das dem Primerpaar angepasste PCR-Programm, das in Tabelle 3 dargestellt ist.

Schritt	Temperatur (in °C)	Zeit (in Minuten)
1. Denaturierung	94	5
2. Annealing	Variabel	1,5
3. Elongation	72	2
4. Denaturierung	94	1,25
5. Wiederholung des Zyklus ab Schritt 2, 34x		
6. Annealing	Variabel	1,5
7. Elongation	72	5
8. Ende	4	

Tabelle 3: PCR-Programm „AmpliTaQ“

Ablauf des PCR-Programms „AmpliTaQ“ mit den einzelnen Schritten unter Angabe der verwendeten Temperatur in Grad Celsius sowie der Dauer in Minuten.

Alternativ wird bei qualitativen Mängeln eine HotStart-PCR durchgeführt. Entsprechend dem HotStarTaq Plus Master Mix Kit von Qiagen werden je 1 µl des Primers Sense und Antisense (20 pm), 5 µl 10x HotStar Puffer (enthält 15 mM MgCl₂), 5 µl 2 mM dNTPs, 37 µl Aqua bidest und 0,1 µl HotStar Taq 5u/µl mit 1 µl DNA 100 ng/µl versetzt. Das PCR-Programm ist in Tabelle 4 dargestellt.

Schritt	Temperatur (in °C)	Zeit (in Minuten)
1. Denaturierung	96	15
2. Denaturierung	96	1,25
3. Annealing	Variabel	1,5
4. Elongation	72	2
5. Wiederholung des Zyklus ab Schritt 2, 34x		
6. Annealing	Variabel	1,5
7. Elongation	72	5
8. Ende	4	

Tabelle 4: PCR-Programm „HotStar“

Darstellung des PCR-Programms „HotStar“ unter Angabe der verwendeten Temperatur in Grad Celsius sowie der Dauer in Minuten.

2. Material und Methoden

Die verwendete Polymerase liegt als inaktive Komponente vor, die erst durch eine initiale Denaturierung von 15 Minuten aktiviert wird. Durch diese späte Aktivierung wird die Verlängerung unspezifisch angelagerter Primer und Primerdimere bei niedriger Temperatur verhindert.

2.4.3. Überprüfung der PCR-Produkte mit Gel-Elektrophorese

Mithilfe der Gel-Elektrophorese lässt sich eine Überprüfung der PCR-Produkte auf Qualität und Quantität durchführen, indem die Produktgröße (in bp) sowie die Produktmenge und das Vorliegen von Verunreinigungen abgeleitet werden können.

Auf ein Elektrophoresegel mit einem Anteil von 2% Agarose werden jeweils 5 µl der PCR-Produkte (zusätzlich eines Mikroliters Ladepuffer-III) sowie 6 µl eines Markers gegeben (HAEIII digest Marker oder 100bp-Marker). In der mit 1xTBE-Puffer befüllten Elektrophorese-Kammer werden die Proben für 45 bis 60 Minuten bei einer Spannung von 100 Volt aufgetrennt. Nach 15-minütiger Färbung des Gels mit einer Ethidiumbromid-Lösung sowie einer kurzen Entfärbung mit Aqua bidest wird das Gel unter UV-Licht dargestellt und auf einem Foto festgehalten.

Die Basenpaarlänge der PCR-Produkte kann dank der Darstellung mit UV-Licht im Vergleich zu der Laufstrecke der definierten Banden des Markers abgeschätzt werden. Ein Vergleich der Helligkeit der Banden zu dem Marker ermöglicht die Bewertung der Quantität des Produktes. Auf eine Verunreinigung der PCR-Proben weist die Kontrollprobe hin, in deren Laufstrecke keine Bande zu sehen sein sollte. Falls eine Bande zu sehen ist, wird repräsentativ von einer Verunreinigung aller Proben ausgegangen und der Versuch wiederholt.

2.5. Sequenzierung nach der Didesoxymethode (nach Sanger)

Die DNA-Sequenzierung nach der Didesoxymethode dient der Analyse der Nukleotidsequenz eines DNA-Fragmentes und beruht auf der Synthese von Komplementärsträngen unterschiedlicher Länge.

Unter Verwendung einer Polymerase und Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) kommt es zu der Synthese von Strängen, die der Patienten-DNA komplementär sind. Der Ausgangspunkt wird durch den verwendeten Primer definiert. Jeder der Ansätze enthält zusätzlich eine Art von Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs: ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP). DdNTPs sind modifizierte dNTPs. Sie zeichnen sich durch den Verlust der 3'-OH-Gruppe und einer Fluoreszenzmarkierung aus. Nach Einbau eines der vier Didesoxyribonukleosidtriphosphate kommt es aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe zu einem Abbruch der Kettensynthese. Da alle Stränge einen definierten Anfangspunkt haben, spiegelt die Länge der Synthesefragmente die Position des

2. Material und Methoden

jeweiligen Nukleotids wider. Trennt man die Synthesefragmente ihrer Größe nach in einem Kapillarsequenzierer auf einem Acrylamidgel auf, so erhält man anhand der Fluoreszenzmarkierung die Sequenz des DNA-Fragmentes. Das grundlegende Prinzip der Sequenzierungsmethode ist in Abbildung 4 dargestellt.

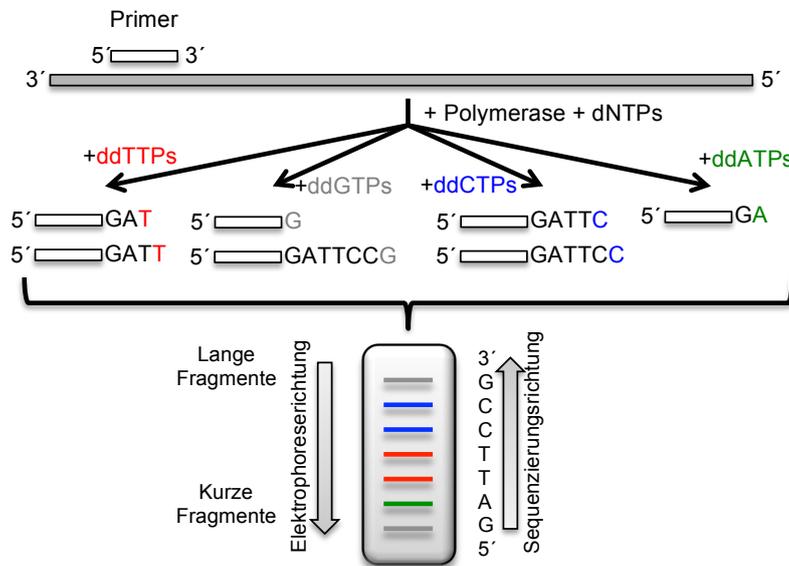


Abbildung 4:
Schematische Darstellung der Kapillarsequenzierung nach der Didesoxymethode

Nach der Zugabe von Primer, Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) sowie fluoreszenzmarkierter Didesoxyribonukleosidtriphosphaten (ddNTPs)

kommt es zur Amplifikation von Komplementärsträngen. Nach dem Einbau eines ddNTPs kommt es zu einem Kettenabbruch. Im Kapillarsequenziergerät werden die Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt und mithilfe der Fluoreszenzmarkierung der Nukleotide lässt sich die Sequenz analysieren.

2.5.1. Vorbereitung der Sequenzierung

Nachdem man sich davon überzeugt hat, dass die PCR-Produkte der richtigen Länge in einer ausreichenden Menge und ohne Kontamination vorliegen, werden die Proben für die Sequenzierungsreaktion vorbereitet. Durch die Zugabe von zwei Arten von Enzymen werden die überschüssigen Polymerase-Enzyme, Nukleotide und Primer aus der PCR-Reaktion entfernt. Dazu werden 5 µl des PCR-Produktes mit 0,5 µl Exonuklease I (20U/µl) und 1 µl Shrimp Alkaline Phosphatase (= Calf Intestine Alkaline Phosphatase) (1U/µl) versetzt. Im Thermocycler findet für 15 Minuten bei 37°C eine Inkubation statt. Dem folgt für 15 Minuten bei 85°C eine Inaktivierungsphase, nach der die Proben frei von aktiven Substanzen sind.

2.5.2. Sequenzierungsreaktion mittels BigDye

Gemäß des BigDye Terminator v3.1 Sequencing Kits (Applied Biosystems) werden 6,5 µl gereinigten PCR-Produktes (5µl PCR-Produkt zuzüglich 1,5 µl Exonuklease und SAP) auf Eis gehalten und mit 8,25 µl Aqua bidest, 3,5 µl Big-Dye-Puffer (5x-Puffer), 0,75 µl Primer Sense oder Antisense (Konzentration: 20 pmol/µl) und zuletzt 1 µl

2. Material und Methoden

BigDye versetzt. Im Thermocycler durchlaufen die Proben das PCR-Programm „BigDye“, das in Tabelle 5 dargestellt ist.

Schritt	Temperatur (in °C)	Zeit
1.	96	3 Minuten
2.	50	20 Sekunden
3.	60	4 Minuten
4.	96	20 Sekunden
5. Wiederholung des Zyklus ab Schritt 2, 24 x		
6.	50	20 Sekunden
7.	60	4 Minuten

Tabelle 5: PCR-Programm „BigDye“

Darstellung des PCR-Programms „BigDye“, das für die Sequenzierungsreaktion angewendet wurde. Es sind die einzelnen Schritte und die verwendete Temperatur in Grad Celsius sowie die Dauer aufgelistet.

Alternativ wird ein laboreigenes Protokoll verwendet, falls sich die Analyse einer Probe nach Verwendung des Standardprotokolls als qualitativ minderwertig herausstellt und eine Wiederholung erfolgen muss (Tabelle 6).

Schritt	Temperatur (in °C)	Zeit (in Minuten)
1.	96°C	3 Minuten
2.	98°C	10 Sekunden
3.	60°C	1,5 Minuten
4.	50°C	1,5 Minuten
5. Wiederholung des Zyklus ab Schritt 2, 24 x		
6.	4°C	

Tabelle 6: PCR-Programm „HotDye“

Darstellung des PCR-Programms „HotDye“, das als Alternative zum Big Dye Programm infolge einer Sequenzierung mit unzureichender Qualität Verwendung findet. Es

sind die einzelnen Phasen unter Angabe der verwendeten Temperatur in Grad Celsius sowie der Dauer angegeben.

2.5.3. Aufreinigung der DNA-Proben

Das Aufreinigen der Proben erfolgt durch das Ausfällen der DNA aus der wässrigen Lösung nach Zugabe von Ethanol und Natrium-Acetat. Die 20 µl umfassende Probe wird mit 80 µl Aqua dest., 10 µl 3 M Natrium-Acetat pH 5,0 und 250 µl 100% Ethanol versetzt und 20 Minuten bei 17949 g zentrifugiert. Durch die Zentrifugalkraft sammelt sich das ausgefallene Produkt am Boden des Reaktionsgefäßes. Der Überstand wird verworfen und das ausgefallene Produkt mit 200 µl 70% Ethanol resuspendiert. Erneut

2. Material und Methoden

wird die Probe zentrifugiert und der Überstand verworfen. In dem Reaktionsgefäß befindet sich das aufgereinigte PCR-Produkt, das bei 37° für 15 Min getrocknet wird. Proben ohne zufriedenstellende Ergebnisse in der Sequenzanalyse werden bei der erneuten Sequenzierung mit einem anderen Verfahren aufgereinigt. Durch die Verwendung von Säulen (Dye Ex 2.0 Spin Kit von QIAGEN) wird die DNA durch Gelfiltration von weiteren Reaktionsbestandteilen getrennt: Zunächst werden die Säulen in einem Reaktionsgefäß für die Dauer von drei Minuten bei 750 g (= 2700 rpm) in einer Zentrifuge mit ausschwingbarem Rotor vorbereitet. Nach Zugabe von 20 µl der Probe werden die Säulen weitere drei Minuten bei 750 g zentrifugiert. Das in den Säulen enthaltene Gel trennt die Probe nach dem Molekulargewicht, sodass sich schließlich nur das aufgereinigte PCR-Produkt am Boden des Reaktionsgefäßes befindet.

2.5.4. Sequenzanalyse

Die Analyse der DNA-Sequenzen erfolgt mithilfe des 4-Kapillarsequenzierers 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hitachi).

Zunächst wird das aufgereinigte PCR-Produkt mit je 20 µl Formamid versetzt und für zwei Minuten bei 95° denaturiert. Für jeden Patient liegt je eine Probe für die Analyse des Sense- sowie des Antisense-Strangs vor. Nach Überführen der Proben in eine 96-Loch-Platte erfolgt die Analyse mit dem Kapillarsequenzierer. Die DNA-Fragmente werden entsprechend ihrer Länge elektrophoretisch aufgetrennt. Die Sequenz wird mithilfe eines Lasers anhand der Fluoreszenz detektiert. Unter Verwendung der Softwareprogramme Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems, USA) und SeqManager, Lasergene 6.0 (DNASar, USA) werden die Analysen in einem Chromatogramm bildlich dargestellt und ausgewertet. Mit dem Software-Programm „SeqScape“ vergleicht man die Basensequenz der Patienten mit den entsprechenden Wildtyp-Sequenzen.

2.6. Multiplex Ligation dependent Probe Amplification® (MLPA)¹

2.6.1. Methodik

Die MLPA ist eine modifizierte PCR-Methode zur relativen quantitativen bzw. semiquantitativen Analyse von bis zu 50 verschiedenen DNA- oder RNA-Sequenzen in nur einem Ansatz. Mit dieser Methode ist es möglich, Deletionen oder Duplikationen einzelner Exons oder ganzer Gene zu detektieren. Im Gegensatz zu einer herkömmlichen PCR wird nicht die Zielsequenz der Patienten-DNA amplifiziert, sondern an die Zielsequenz gebundenen MLPA-Oligonukleotide. Es wird nur ein einziges Paar PCR-Primer für die gesamte Amplifikation benötigt. Die Abbildung 5 gibt einen Überblick über die MLPA-Methode.

Die MLPA-Reaktion verläuft in vier Schritten. Während der Denaturierungs- und Hybridisierungsphase wird die DNA über Nacht mit einem MLPA-Mix inkubiert. In diesem Mix befinden sich je MLPA-Probe zwei Arten von Oligonukleotiden (Abb.5, Teil1). Die Oligonukleotide beinhalten jeweils eine Hybridierungssequenz, die sich an die Patienten-DNA anlagert, sowie eine Primer-Sequenz als Ansatzpunkt für die Polymerase. Die „stuffer“-Sequenz beeinflusst die Länge der Amplifikationsprodukte und ist für jede Zielsequenz unterschiedlich.

In der zweiten Phase hybridisieren beide Oligonukleotide im Normalfall an ihre Zielsequenz an der Proben-DNA und werden miteinander ligiert (Abb. 5, Teil 2). Liegt in der Zielsequenz jedoch eine Veränderung der Basenfolge vor, werden die Oligonukleotide in der Ligationsphase nicht miteinander verbunden. Nur ligierte Oligonukleotide werden während der PCR-Phase exponentiell amplifiziert (Abb. 5, Teil 3). Dadurch lässt sich die Anzahl der amplifizierten Proben mit der Anzahl der Zielsequenzen in der Patienten-DNA korrelieren.

Mithilfe eines Kapillarsequenzierers werden die Amplifikationsprodukte elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 5, Teil 4). Unter Verwendung der Programme GeneMapper® und Coffalyser werden die Signale in Balkendiagrammen graphisch dargestellt und auswertbar. Da nicht ligierte Oligonukleotide nicht exponentiell amplifiziert werden, führen sie zu keinem Signal und brauchen nicht in einem zusätzlichen Schritt entfernt zu werden.

Zur Qualitätskontrolle enthält das PHEX/FGF23 MLPA Kit vier Q-Fragmente für die DNA-Menge (Quantität) und drei D-Fragmente für die DNA-Denaturierung. Die Q-Fragmente sind unabhängig von der Ligation und liegen in kleinen Mengen vor. Nach erfolgreicher MLPA-Reaktion geben die Q-Fragmente in der graphischen Darstellung Aufschluss über eine fehlerhafte Ligation oder unzureichende DNA-Menge.

¹ In Anlehnung an das Handbuch des SALSA MLPA-Kit P223 PHEX von MRC Holland sowie <http://www.mrc-holland.com>.

2. Material und Methoden

Die D-Fragmente sind dagegen wie die MLPA-Proben DNA- und ligationsabhängig. In der graphischen Darstellung sollten ihre Signale ähnliche Werte auf der Y-Achse wie die MLPA-Proben erreichen, falls die Ligation und die Denaturierung erfolgreich waren.

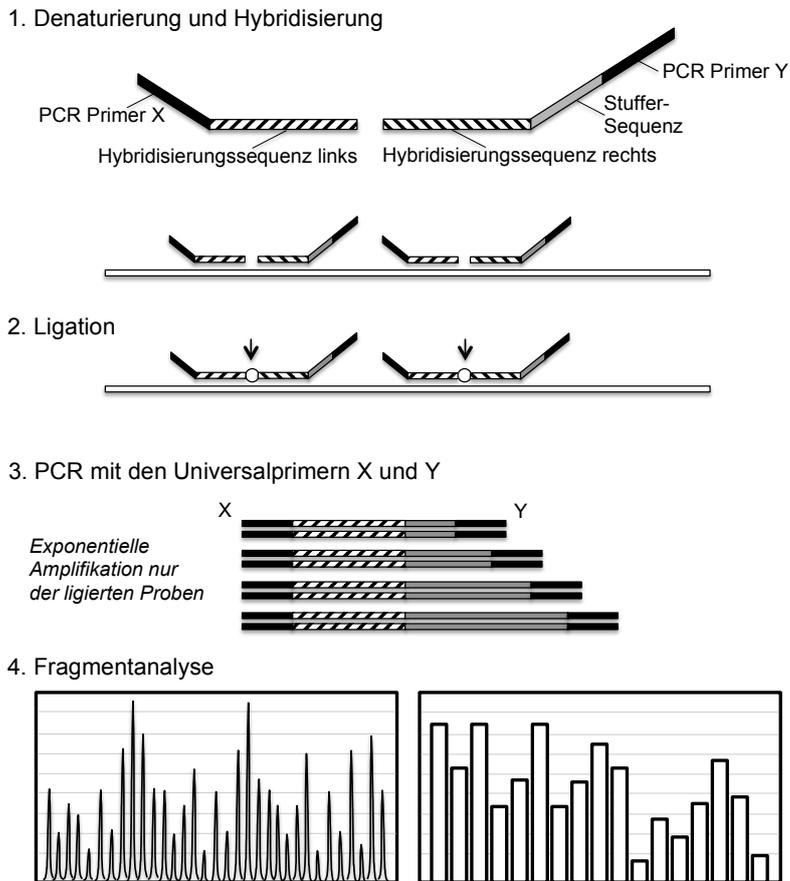


Abbildung 5: Schematische Darstellung der MLPA-Methode (nachgezeichnet und erweitert nach einer Abbildung von <http://www.mrc-holland.com>)

1. Denaturierung und Hybridisierung. Der Patienten-DNA werden Oligonukleotide zugesetzt, die eine Hybridisierungssequenz, eine Primersequenz und eine individuelle „Stuffer“-Sequenz beinhalten. Nach der Denaturierung lagern sich die Oligonukleotide an den DNA-Strang. 2. Ligation. Die Ligase

verbindet nur korrekt angelagerte Oligonukleotide. 3. PCR. In der PCR-Reaktion werden die ligierten Proben exponentiell amplifiziert. Die Syntheseprodukte sind dank der unterschiedlich langen „Stuffer“-Sequenzen einer Zielsequenz zuzuordnen. 4. Analyse. Die Analyse ermöglicht die quantitative Darstellung der Amplifikationsprodukte sowie die qualitative Analyse der Reaktion.

2.6.2. Durchführung der MLPA

Die Verwendung des SALSA MLPA-Kit P223 PHEX (MRC Holland) ermöglicht die Untersuchung der DNA-Probe auf Mutationen im PHEX- sowie im FGF23-Gen.

Während des ersten Schrittes werden 200 ng DNA mit TE zu 5 µl ergänzt und 15 Minuten bei 95°C denaturiert. Nach dem Abkühlen der Probe auf 25°C im Thermocycler werden jeweils 1,5 µl SALSA-Probemix und 1,5 µl MLPA Puffer zugegeben. Nach einer Inkubation bei 95°C für eine Minute wird die Probe 16 Stunden bei 60°C gehalten. In dieser Zeit hybridisiert die DNA der Patientenprobe mit dem MLPA-Mix und den Oligonukleotiden.

2. Material und Methoden

Für die Ligationsreaktion wird die Temperatur auf 54°C reduziert und 32 µl Ligase-Mix zugegeben (pro Probe 3 µl Ligase-Puffer-A + 3 µl Ligase-Puffer-B + 25 µl Wasser + 1 µl Ligase), für 15 Minuten bei 54° inkubiert und nachfolgend für 5 Minuten auf 98° erhitzt. Für die PCR-Reaktion werden 4 µl SALSA-PCR-Puffer, 26 µl Wasser und 10 µl MLPA-Ligations-Reaktion/-Produkt in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und auf 60°C erhitzt. Während die Reaktionsgefäße im Gerät sind, werden 10 µl Polymerase-Mix zugegeben (2 µl SALSA-Primer + 2 µl SALSA-Enzyme dilution buffer + 5,5 µl Wasser + 0,5 µl SALSA-Polymerase). Die MLPA-PCR durchläuft 35 Zyklen nach dem in Tabelle 7 dargestellten Programm.

Mithilfe des 4-Kapillarsequenzierers 3130 Genetic Analyzer (ABI) werden die Amplifikationsprodukte elektrophoretisch aufgetrennt. Unter Verwendung der Programme GeneMapper® und Coffalyser werden die Signale in Balkendiagrammen graphisch dargestellt und ausgewertet.

Tabelle 7: Cyclyer-Programm „MLPA-PCR“

Schritt	Temperatur (in °C)	Zeit (in Minuten)
1.	60	Zugabe des Polymerase-Mix
2.	95	0,5
3.	30	0,5
4.	72	1
5. Wiederholung des Zyklus ab Schritt 2, 35x		
6.	72	20

Darstellung des Cyclyer-Programms „MLPA-PCR“. Es sind die einzelnen Schritte unter Angabe der verwendeten Temperatur in Grad Celsius sowie der Dauer aufgelistet.

2.7. Arbeiten am Massachusetts General Hospital

Nach Ausschluss von Mutationen und Deletionen im PHEX- sowie im FGF23-Gen mit zwei unabhängigen Methoden erfolgt die Untersuchung einiger Patientenproben auf die sehr seltene autosomal rezessive hypophosphatämische Rachitis. In Kooperation mit Prof. Jüppner erfolgte diese Untersuchung in der Endocrine Unit des Massachusetts General Hospitals der Harvard Universität in Boston, USA.

2.7.1. Sequenzierung des DMP1-Gens

Die DNA-Proben wurden in der zentralen Einrichtung für Sequenzierungen des Massachusetts General Hospital bearbeitet. Es erfolgte die Sequenzierung aller sechs Exons des DMP1-Gens. Nach der Übermittlung der Datensätze wurden die Ergebnisse unter Verwendung des Sequencher®-Programmes analysiert.

Infolge eines Mutationsnachweises wurde in einem Falle (P181) die Sequenzierung des betroffenen Abschnittes wiederholt. Die PCR erfolgte unter Verwendung der Primer 318 und 319 und die Sequenzierung mithilfe der Primer 320 und 321, deren

2. Material und Methoden

Sequenzen in Tabelle A13 im Anhang zu finden sind. Der PCR-Ansatz ist Tabelle A14 und das PCR-Programm Tabelle A15 im Anhang zu entnehmen.

Die Elektrophorese erfolgte auf einem 2%-Agarose-Gel mit einem 100bp Markers bei 90 Volt für 45 Minuten. Zur Qualitätskontrolle wurde unter der UV-Kamera ein Photo angefertigt. Zusätzlich wurden unter denselben Voraussetzungen 96 Kontrollen auf das Vorliegen der entsprechenden Mutation sequenziert.

2.7.2. Restriktionsanalyse

Eine Restriktionsanalyse kann zu der Bestätigung einer in der Sequenzanalyse erkannten Mutation beitragen. Dazu wird ein Restriktionsenzym verwendet, das DNA-Stränge an einer oder mehrerer definierter Basenfolgen, einer sogenannten Erkennungssequenz, zerschneidet. Eine Erkennungssequenz kann sowohl durch eine Mutation eingeführt als auch zerstört werden. Das entsprechende Enzym wird unter Verwendung des NEBcutters (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>) ausgewählt, indem zunächst alle potentiellen Restriktionsenzyme für die Wildtyp- als auch für die mutierte Sequenz gesucht werden. Es wird ein Enzym gewählt, dessen Erkennungssequenz nur einmalig entweder in der Wildtyp- oder in der mutierten Sequenz auftritt und dessen Schnittprodukte in der Größe (in bp) so unterschiedlich ausfallen, dass sie in einer Gelelektrophorese deutlich voneinander unterscheidbare Banden bilden. Einen Überblick über die grundlegenden Prinzipien einer Restriktionsanalyse gibt Abbildung 6 wider.

Eine Restriktionsanalyse wurde bei P115 vorgenommen. Nach dem Durchführen einer PCR mit dem Primerpaar DMP1-E2/3 (Sequenz im Anhang) mit der Patientenprobe, einer Normalkontrolle sowie einer Leerprobe, wird dem PCR-Produkt das Restriktionsenzym zugesetzt (siehe Tabelle 8) und über Nacht bei einer von dem gewählten Enzym abhängigen Temperatur inkubiert.

Menge (in µl)	Material
0,5	Restriktionsenzym (10 U/ µl)
1	NEB-Buffer je nach Enzym 10x
0,5	MgCl ₂ 200 mM
8	H ₂ O

Tabelle 8: Ansatz für das Restriktionsenzym

Darstellung eines Probenansatzes für das Restriktionsenzym unter Angabe der verwendeten Substanz sowie der Menge in Mikroliter (µl).

2. Material und Methoden

Anschließend erfolgt eine Gelelektrophorese der drei Proben sowie eines 100bp Markers auf einem 2%-Agarose-Gel bei 90 Volt für eine Stunde. Unter UV-Belichtung wird ein Photo angefertigt, anhand dessen man das Ergebnis analysiert.

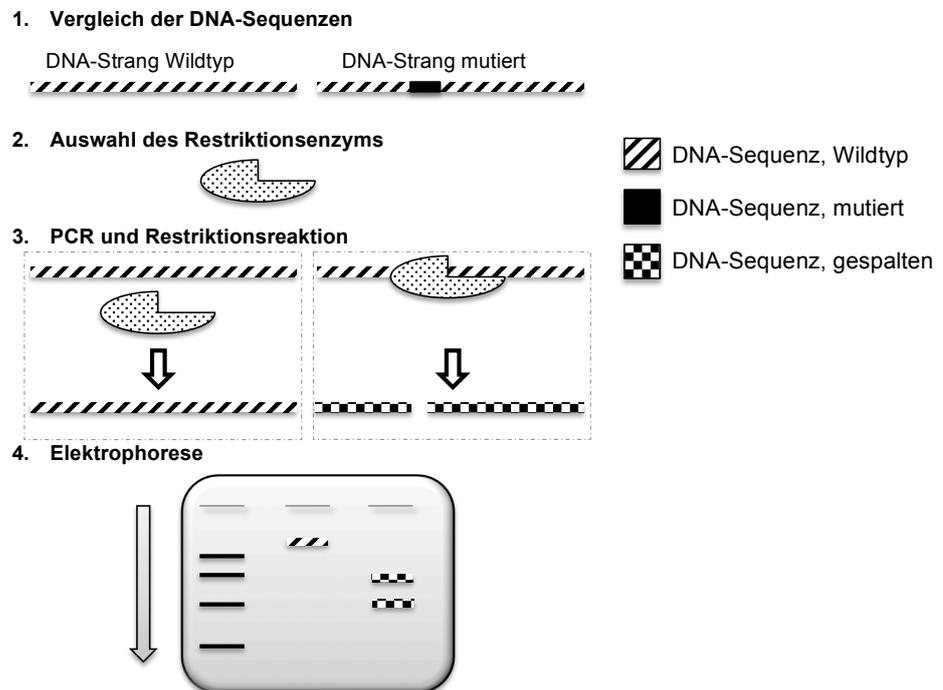


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Restriktionsanalyse

1,2. Eine bekannte Mutation kann mit einer Restriktionsanalyse bestätigt werden. Die Kenntnis der mutierten sowie der Wildtyp-Sequenz bestimmt die Auswahl des geeigneten Restriktionsenzym. **3.** Einer PCR mit der mutierten DNA sowie einer Vergleichsprobe folgt die Restriktionsreaktion mit dem ausgewählten Enzym. Dieses schneidet die Amplifikationsprodukte bei Vorhandensein der Erkennungssequenz in kleinere Abschnitte. **4.** In der Elektrophorese werden die Sequenzen der Länge nach aufgetrennt. Die mutierte Sequenz führt zu einer Erkennungssequenz, wodurch im Vergleich zur Wildtypsequenz zwei kleine Banden entstehen.

3. Ergebnisse

3.1. PCR-Bedingungen

Durch Berechnung der Annealing-Temperatur, Verwendung einer Gradienten-PCR sowie der Gel-Elektrophorese wurden die PCR-Bedingungen für die verwendeten Primer optimiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 und Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 9: PCR-Bedingungen für die 22 Exons des PHEX-Gens

Exon	Annealing-Temp. (in °C)	Puffer	Taq	Primer	dNTPs
1	60	HotStar	Hot Star	1 a/s goji	2mM
2	60	HotStar	Hot Star	2 a/s goji	2mM
3	59	AmpliTaq	AmpliTaq	3 a/s goji	2mM
4	60	AmpliTaq	AmpliTaq	4 a/s goji	2mM
5	60	AmpliTaq	AmpliTaq	5 a/s goji	2mM
6	60	HotStar	Hot Star	6 a/s goji	2mM
7	63	AmpliTaq	AmpliTaq	7 a/s goji	2mM
8	55	1,5/8,4	AmpliTaq	8 a/s	2mM
9	60	AmpliTaq	AmpliTaq	9 a/s goji	2mM
10	59	AmpliTaq	AmpliTaq	10 a/s goji	2mM
11	63	AmpliTaq	AmpliTaq	11 a/s goji	2mM
12	59	2,5/8,4	AmpliTaq	12 a/s	0,2mM
13	60	AmpliTaq	AmpliTaq	13 a/s goji	2mM
14	60	HotStar	Hot Star	14 a/s goji	2mM
15	58	AmpliTaq	AmpliTaq	15 a/s 2	2mM
16	60	AmpliTaq	AmpliTaq	16 a/s goji	2mM
17	58	AmpliTaq	AmpliTaq	17 a/s goji	2mM
18	65	AmpliTaq	AmpliTaq	18 a/s goji	2mM
19	58	AmpliTaq	AmpliTaq	19 a/s goji	2mM
20	63	AmpliTaq	AmpliTaq	20 a/s goji	2mM
21	58	AmpliTaq	AmpliTaq	21 a/s 2	2mM
22	58	AmpliTaq	AmpliTaq	22 a/s 2	2mM

Darstellung der optimierten PCR-Bedingungen für die 22 Exons des PHEX-Gens unter Angabe der Annealing-Temperatur in Grad Celsius, des verwendeten Puffers, der verwendeten Taq-Polymerase sowie des verwendeten Primers und der Konzentration der Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP). Die entsprechende Primersequenz ist der Tabelle A12 im Anhang zu entnehmen. Die Bezeichnung Goji bezieht sich auf die Quelle der Primersequenzen (Goji et al., 2006).

3. Ergebnisse

Tabelle 10: PCR-Bedingungen für das Exon 3 des FGF23-Gens

Exon	Annealing-Temp. (in °C)	Puffer	Taq	Primer	dNTPs
3	71	AmpliTaq	AmpliTaq	3 a/s	2mM

Darstellung der optimierten PCR-Bedingungen für das Exon 3 des FGF23-Gens unter Angabe der Annealing-Temperatur in Grad Celsius, des verwendeten Puffers, des Namens und der Menge der verwendeten Taq-Polymerase sowie des verwendeten Primers und der Konzentration der Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP). Die entsprechende Primersequenz ist der Tabelle A13 im Anhang zu entnehmen.

3.2. Ergebnisse der Analyse des FGF23-Gens

Zunächst wurden alle 57 Patientenproben mit der Sequenzierungsmethode auf Mutationen im Exon 3 des FGF23-Gens untersucht. Zur Beschreibung der Mutationen wurde die Referenzsequenz NM_020638.2 herangezogen.

In zehn Fällen (P50, P106, P88, P113, P127, P85, P96, P63, USA8, USA9) ist der bekannte Polymorphismus c.716C>T, p.T239M aufgefallen (ADHR Consortium, 2000; Cho et al., 2005), dieses entspricht 17,5% des Kollektivs. Eine Sequenzanalyse mit diesem Polymorphismus ist in Abbildung 7 dargestellt.

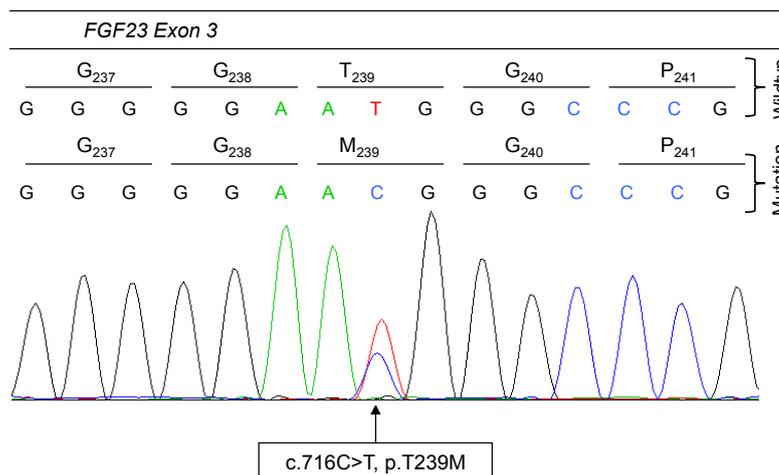


Abbildung 7: Darstellung der Sequenzanalyse des Polymorphismus c.716 C>T, p.T239M in Exon 3 des FGF23-Gens

Im oberen Abschnitt wird die Wildtypsequenz sowie die Nukleotidabfolge der Patientenprobe aufgeführt. Wenn drei Basen eine Aminosäure kodieren, sind

diese durch einen Unterstrich markiert und der Einbuchstabencode für die jeweilige Aminosäure mit der Position im Protein aufgeführt. Im unteren Bildteil ist die Sequenzanalyse dargestellt, die bei der Analyse der Probensequenz entsteht. Die einzelnen Basen werden mithilfe einer farblichen Markierung voneinander abgegrenzt (rot: Tyrosin, blau: Cytosin, grün: Adenin, schwarz: Guanin). Es zeigt sich eine heterozygote Substitution des Tyrosins an Position 716 der kodierenden DNA durch ein Cytosin, wodurch es zu der Kodierung eines Methionins anstelle eines Threonins an Position 239 in der Aminosäuresequenz kommt.

3. Ergebnisse

Eine weitere Auffälligkeit im FGF23-Gen hat sich bei der Analyse des Chromatogramms der Patientin P79 ergeben (Abbildung 8). Es liegt eine heterozygote Deletion eines Cytosins an Position c.568 vor, wodurch die Aminosäure Leucin durch ein Stopcodon ersetzt wird und zu einem Abbruch der Proteinbiosynthese führt (c.568delC, p.L190X).

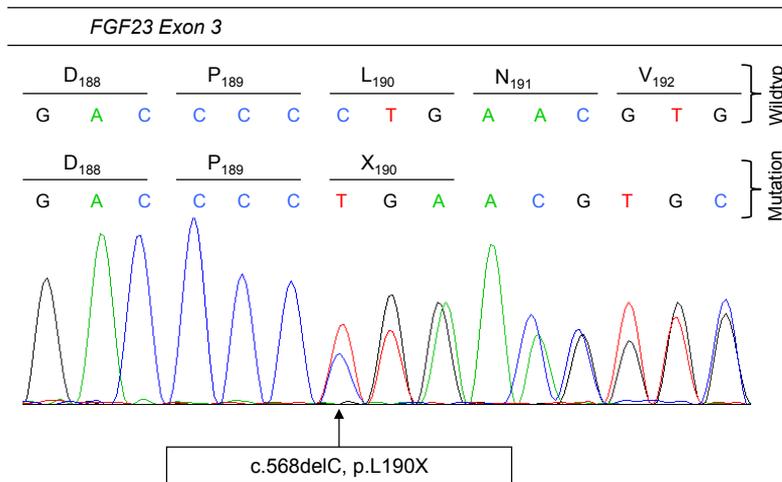


Abbildung 8: Sequenzanalyse des FGF23-Gens von P79 mit der heterozygoten Mutation c.568delC, p.L190X.

Es ist das Chromatogramm des Exon 3 des FGF23-Gens von P79 dargestellt. Es zeigt sich eine heterozygote Deletion eines Cytosins an Position

568 der kodierenden DNA. Im oberen Bildabschnitt zeigt sich die Wildtypsequenz mit der Wildtyp-Aminosäuresequenz. Darunter zeigt sich die infolge der Deletion veränderte Nukleotidsequenz sowie das Einführen eines Stopcodons an Position 190.

Obwohl alle Proben auch mit der MLPA-Methode auf das Vorliegen einer Deletion bzw. Duplikation im FGF23-Gen untersucht wurden, ist keine Veränderung nachgewiesen worden.

3. Ergebnisse

3.3. Ergebnisse der Analyse des PHEX-Gens

Der Sequenzierung des FGF23-Gens schließt sich die Untersuchung des PHEX-Gens an. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene Methoden angewandt (Abbildung 9). Zunächst wurde die MLPA-Methode bei allen 57 Patientenproben durchgeführt. In zehn Fällen hat dieses zu einer Auffälligkeit führt. Im Folgenden wurden nach einer Reevaluierung der klinischen Daten einundzwanzig der verbleibenden Patientenproben mit der Sequenzierungsmethode untersucht, wodurch in elf Proben Mutationen detektiert wurden (exklusive Polymorphismen).

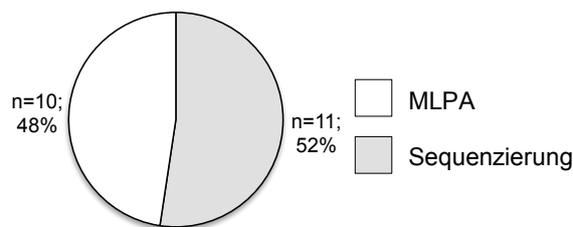


Abbildung 9: Schematische Darstellung der PHEX-Mutationen nach Methode

Es sind die Verteilungsverhältnisse der detektierten PHEX-Mutationen entsprechend der verwendeten Methode dargestellt. Insgesamt beläuft sich die Anzahl der Mutationen im PHEX-Gen auf 22 (exklusive Polymorphismen). In 48% der Fälle war die MLPA[®]-Methode erfolgreich und in 52% der Fälle wurde die Mutation durch die Sequenzierungsmethode detektiert.

3.3.1. Ergebnisse der Analyse des PHEX-Gens mit der MLPA[®]-Methode

Mithilfe der MLPA-Methode wurden die Proben auf eine Deletion bzw. Duplikation in allen 22 Exons des PHEX-Gens sowie in den drei Exons des FGF23-Gens untersucht. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt in Abhängigkeit vom Geschlecht. Bei einem Jungen mit einem Normalbefund sollten alle Signale der Exons für das FGF23- sowie für das PHEX-Gen bei einer Ratio von eins auf der Y-Achse liegen. Eine heterozygote Deletion im FGF23-Gen würde zu dem Absinken des Signals auf einen Wert von Null führen. Bei einer heterozygoten Mutation ist eine Signalstärke von 0,5 auf der Y-Achse zu erwarten. Eine Deletion im PHEX-Gen eines Jungen lässt das Signal auf einen Wert von Null sinken, da nur ein X-Chromosom vorhanden ist (hemizygoter Mutation). In Abbildung 10 ist beispielhaft eine derartige hemizygoter Deletion bei der Analyse des männlichen P141 dargestellt, die das Exon 12 betrifft.

3. Ergebnisse

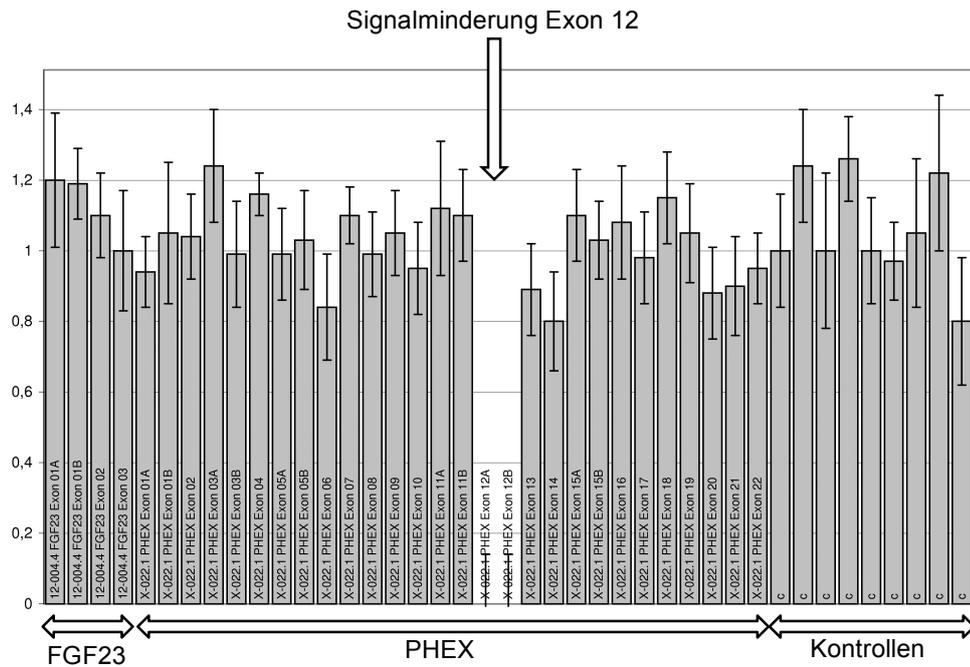


Abbildung 10: MLPA-Analyse des FGF23- und PHEX-Gens von P141 (m) mit hemizygoter Deletion des Exons 12

Es ist die MLPA-Analyse der drei Exons des FGF23-Gens sowie der 22 Exons des PHEX-Gens von P141 (männlich) und die Kontrollproben dargestellt. Es zeigt sich ein Signalverlust des Exons 12, das in zwei Teilen amplifiziert wird (12A und 12B). Aufgrund des völligen Signalverlustes ist von einer hemizygoten Deletion des Exons 12 auszugehen. Die restlichen Exons des PHEX-Gens sowie die drei Exons des FGF23-Gens zeigen eine Signalstärke um 1 auf der Y-Achse, was einem Normalbefund entspricht.

Bei *Mädchen* bedeutet ein Normalbefund für das PHEX-Gen, dass im Vergleich zu den Jungen doppelt so viele Kopien der Sequenzen vorliegen. Dennoch kommen die Signale nicht bei einer Ratio von zwei auf der Y-Achse zur Darstellung, sondern infolge der Justierung ebenfalls bei einem Wert von eins. Aufgrund dieser Justierung liegen die Signale für das FGF23-Gen bei zwei gesunden Allelen bei einem Wert von 0,5 auf der Y-Achse. Ein entsprechender Normalbefund für ein Mädchen ist in Abbildung 11 dargestellt.

3. Ergebnisse

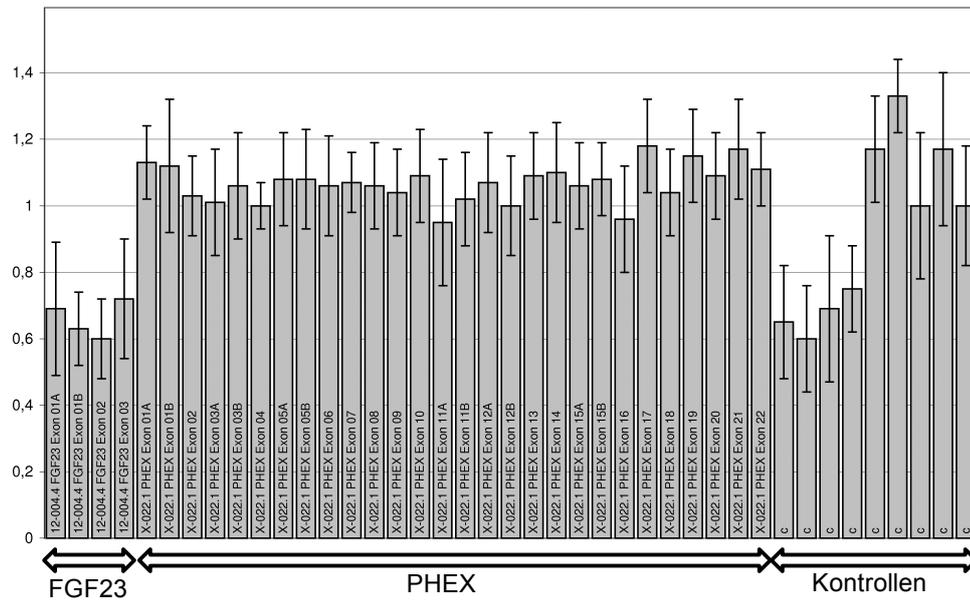


Abbildung 11: MLPA-Analyse des FGF23- und PHEX-Gens eines Mädchens mit Normalbefund

Darstellung der MLPA-Analyse der drei Exons des FGF23-Gens sowie der 22 Exons des PHEX-Gens und der Kontrollproben bei einem Mädchen. Es zeigt sich ein Normalbefund, bei dem die Signale der 22 Exons des PHEX-Gens bei einem Wert von 1 auf der Y-Achse und für die drei FGF23-Exons bei einem Wert von 0,5 auf der Y-Achse liegen.

Da Mädchen zwei X-Chromosome und folglich zwei Allele für das PHEX-Gen besitzen, führt eine heterozygote Mutation zu dem Absinken des Signals auf einen Wert von 0,5 auf der Y-Achse. Theoretisch ist es auch möglich, dass beide Allele von einer Mutation betroffen sind und eine homozygote Deletion vorliegt. Dieses würde zu einem kompletten Verlust des Signals führen.

In der Abbildung 12 ist die MLPA-Analyse eines Mädchens (P48) mit reduziertem Signal für das Exon 7 des PHEX-Gens dargestellt.

3. Ergebnisse

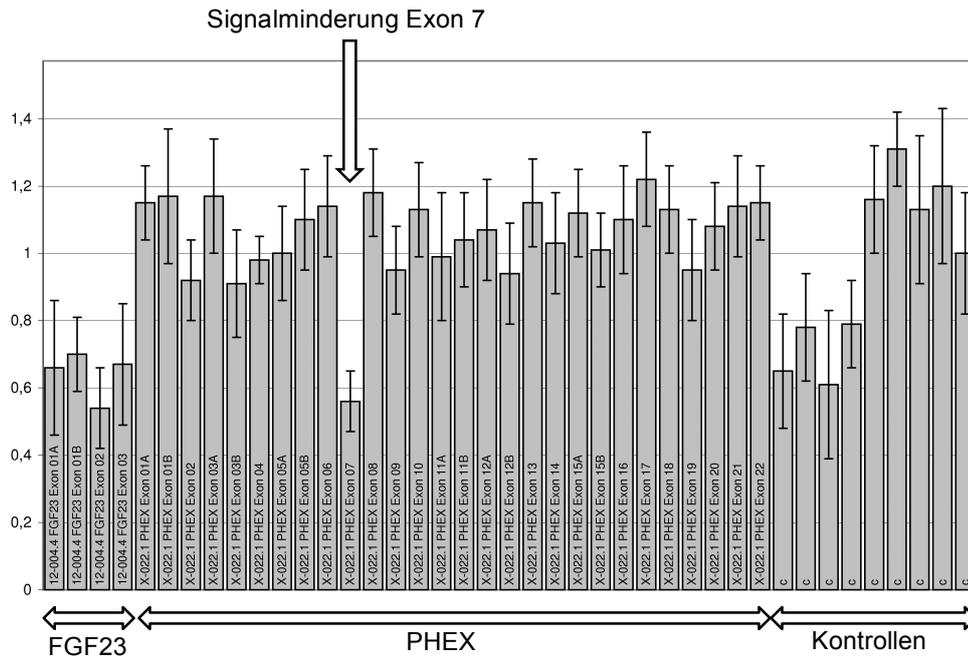


Abbildung 12: MLPA-Analyse des FGF23- und PHEX-Gens von P48 (w) mit einer Deletion des Exons 7 im PHEX-Gen

Darstellung der MLPA-Analyse der drei Exons des FGF23-Gens sowie der 22 Exons des PHEX-Gens und der Kontrollproben von P48 (weiblich). Es zeigt sich eine Signalminde rung des Exons 7 des PHEX-Gens. Aufgrund der Minderung des Signals auf einen Wert von 0,5 auf der Y-Achse ist von einer heterozygoten Deletion des Exons 7 auszugehen. Die restlichen Exons des PHEX-Gens sowie die drei Exons des FGF23-Gens zeigen einen Normalbefund.

Bei dem Betrachten der MLPA-Analyse eines männlichen Patienten (P109) zeigt sich ein Bild, das von dem zu erwartenden Ergebnis abweicht. Die Signale des Exons 11 sind deutlich reduziert, erreichen aber nicht den Nullpunkt (siehe Abbildung 13).

3. Ergebnisse

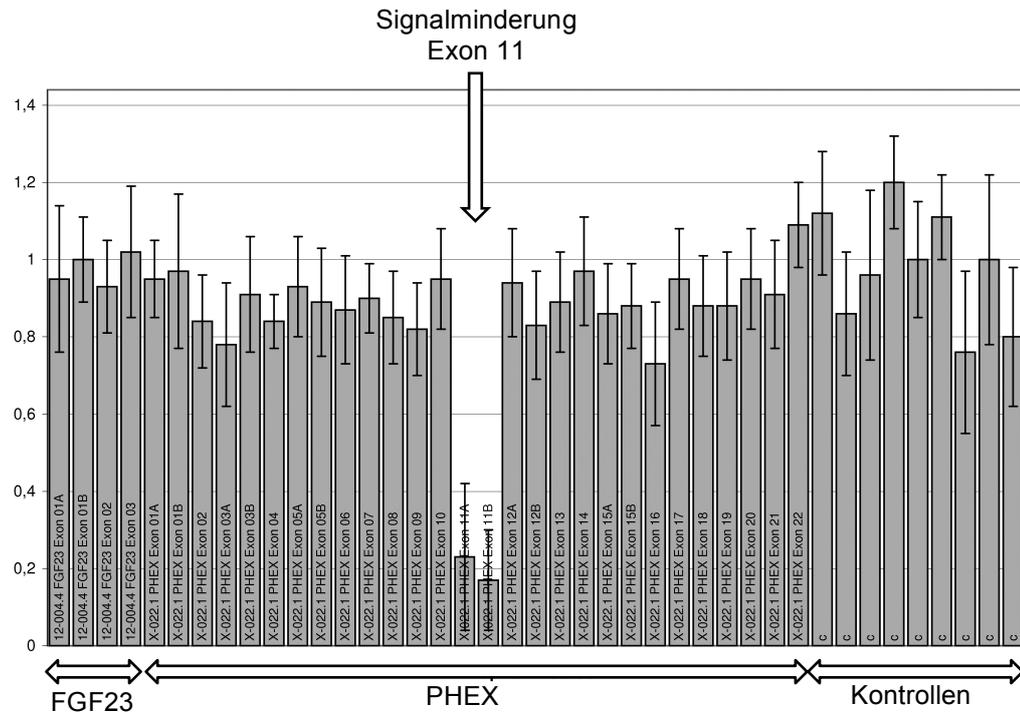


Abbildung 13: MLPA-Analyse des FGF23- und PHEX-Gens von P109 (m)

Darstellung der MLPA-Analyse der drei Exons des FGF23-Gens sowie der 22 Exons des PHEX-Gens und der Kontrollproben von P109 (männlich). Es zeigt sich eine Signalminderung des Exons 11 des PHEX-Gens auf einen Wert von ca. 0,2. Die Proben des FGF23-Gens sowie der restlichen Exons des PHEX-Gens zeigen Werte um eins auf der Y-Achse.

Bei der Verwendung der MLPA-Methode wird im Falle von Auffälligkeiten die Bestätigung mit einer anderen Methode angeraten.

Das Agarose-Gel der PCR-Produkte des Exons 12 sowie der flankierenden Exons von P141 sowie der Patientenprobe und der Normalkontrolle ist in Abbildung 14 dargestellt. Das Agarose-Gel des Exons 3 sowie der flankierenden Exons von der Patientenprobe USA10 sowie der Normalkontrolle ist in der Abbildung A12 im Anhang dargelegt.

3. Ergebnisse

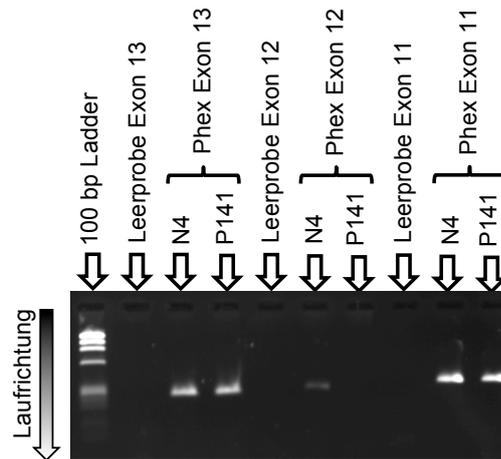


Abbildung 14: Agarose-Gel der Exons 11, 12 und 13 von P141 sowie einer Normalkontrolle (N4)

Das Agarose-Gel zeigt die Auftrennung der PCR-Produkte von P141 sowie der Normalprobe N4 für die Exons elf bis dreizehn des PHEX-Gens sowie einen 100 bp Marker. Desweiteren zeigt sich jeweils eine Leerprobe, in dessen Laufstecke sich keine Verunreinigungen nachweisen lassen. Für das Exon dreizehn sowie Exon elf des PHEX-Gens zeigen sowohl P141 als auch die N4 eine Bande mit einer ähnlichen Signalintensität. Das Exon 12 wird unter Verwendung der Normalprobe N4 amplifiziert, nicht jedoch bei Verwendung der Patientenprobe P141.

Die Ergebnisse der MLPA-Analysen sind in der Tabelle 11 zusammengeführt. Insgesamt konnte mithilfe der MLPA-Methode bei 10 Patienten eine Auffälligkeit im PHEX-Gen detektiert werden. Die Analyse des FGF23-Gens wies in keinem Fall Auffälligkeiten auf. Die entsprechenden Abbildungen befinden sich in Abbildung A1-A7 im Anhang.

Patient	Geschlecht	Gen	Exon
P109	M	PHEX	Exon 11
P141	M	PHEX	Exon 12
USA10	M	PHEX	Exon 3
P48	W	PHEX	Exon 7
P78	W	PHEX	Exon 1-9
P89	W	PHEX	Exon 13-22
P106	W	PHEX	Exon 17-19
P127	W	PHEX	Exon 1-5
P145	W	PHEX	Exon 1
P150	W	PHEX	Exon 9

Tabelle 11: Darstellung der Auffälligkeiten in der MLPA-Analyse

Zusammenfassende Darstellung der in dieser Arbeit detektierten Auffälligkeiten in der MLPA-Analyse. Es ist die Patientenkenung, das Geschlecht, das auffällige Gen sowie das bzw. die betroffenen Exons angegeben.

3. Ergebnisse

3.3.2. Ergebnisse der Analyse des PHEX-Gens durch Sequenzierung

Die Sequenzierung des PHEX-Gens von 21 Patienten hat in elf Fällen eine Mutation in einem der 22 Exons oder der flankierenden Bereiche ergeben. Zusätzlich konnte bei 6 Patienten ein vorbekannter Polymorphismus in Exon 1 dargestellt werden. Zur Beschreibung der Mutationen in dem kodierenden Bereich ist die Referenzsequenz NM_000444.4 herangezogen worden, für Mutationen im Intronbereich wurde die Referenzsequenz NG_007563.1 verwendet.

3.3.2.a. Frameshift-Mutationen: Duplikation

Bei der Auswertung der Sequenzierung des männlichen Patienten P70 fällt eine Duplikation in Exon 1 auf. Durch das Einfügen eines Adenins an Position 61 (c.61dupA) kommt es zu dem Verschieben des Leserasters. Das Basentriplett (ATT), das die Aminosäure Isoleucin an Position 21 kodiert, wird durch das Einfügen eines Adenins (AAT) zu Asparagin verändert und führt nach 30 weiteren Aminosäuren zu einem Kettenabbruch infolge der Einführung eines Stopcodons (p.I21NfsX30). Diese Mutation konnte bei der Sequenzierung der entsprechenden Region ebenfalls bei der Mutter (P71) bestätigt werden (ohne Abbildung).

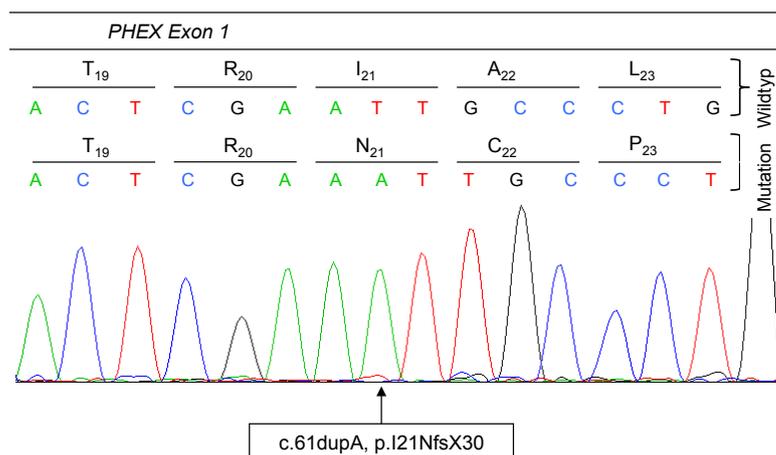


Abbildung 16:
Sequenzanalyse des Exons 1 des PHEX-Gens von P70 (c.61dupA, p.I21NfsX30)

Es ist das Elektropherogramm des Exons 1 des PHEX-Gens von P70 dargestellt. Es zeigt sich eine Duplikation

eines Adenins an Position 61 der kodierenden DNA. Die Duplikation ist durch einen Pfeil markiert. Im oberen Bildteil ist die Wildtypsequenz sowie die mutierte Nukleotidabfolge bei P70 dargestellt. Die Duplikation führt zu einem Verschieben des Leserasters, beginnend bei der Aminosäure Isoleucin an Position 21. Nach weiteren 30 Aminosäuren wird ein Stopcodon eingeführt (c.61dupA, p.I21NfsX30).

3. Ergebnisse

3.3.2.b. Missense Mutationen: Hemizygot Substitutionen

Bei drei männlichen Patienten zeigte sich mithilfe der Sequenzierung eine hemizygot Substitution. Im Falle von P135 befindet sich diese Mutation an der ersten Position des protein-kodierenden Teils des Gens (Abbildung 17). Es handelt sich um eine Substitution des Adenins durch ein Cytosin (c.1A>G). Die Mutation führt zu einem Austausch des Startcodons bzw. der ersten Aminosäure Methionin zu Valin (p.M1V).

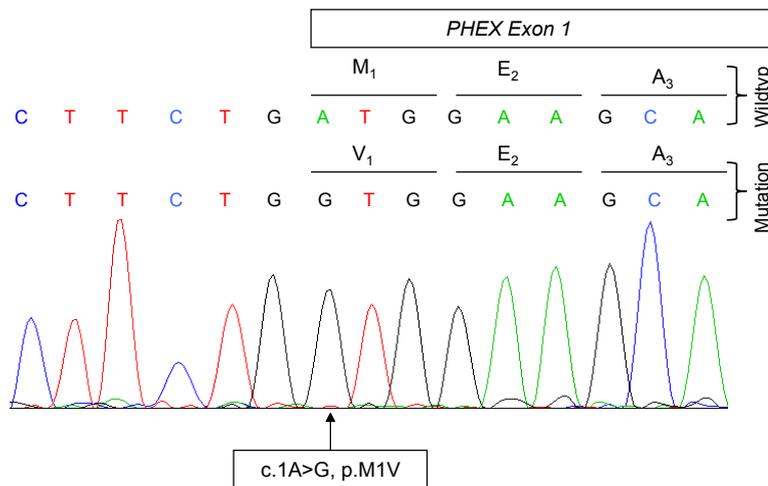


Abbildung 17:
Sequenzanalyse des Exons 1 des PHEX-Gens von P135 (c.1 A>G, p.M1V)

Es ist das Elektropherogramm des Exons 1 des PHEX-Gens sowie der Intron-Exon-Übergang von P135 dargestellt. Es zeigt sich eine Substitution des Adenins an Position 1 der

kodierenden DNA. Die Substitution ist durch einen Pfeil markiert. Im oberen Bildteil ist die Wildtypsequenz sowie die mutierte Nukleotidabfolge bei P135 dargestellt. Die Substitution führt zu einem Austausch der ersten Aminosäure bzw. des Startcodons Methionin durch ein Valin.

Eine weitere hemizygot Mutation liegt bei dem Patienten P10 vor. In Exon 18 weist er die Substitution eines Thymins durch ein Guanin auf (c.1853 T>G). Auf Protein-Ebene führt dieses zu dem Austausch der Aminosäure Methionin an Position 618 durch ein Arginin (p.M618R). Die Abbildung des Elektropherogramms wird in Abbildung A 8 im Anhang dargestellt.

Bei dem Patienten P128 liegt die Substitution eines Guanins durch ein Cytosin in Exon 16 vor (c.1700G>C), was zu dem Austausch eines Arginins zu Prolin (p.R567P) führt (Abbildung 18).

3. Ergebnisse

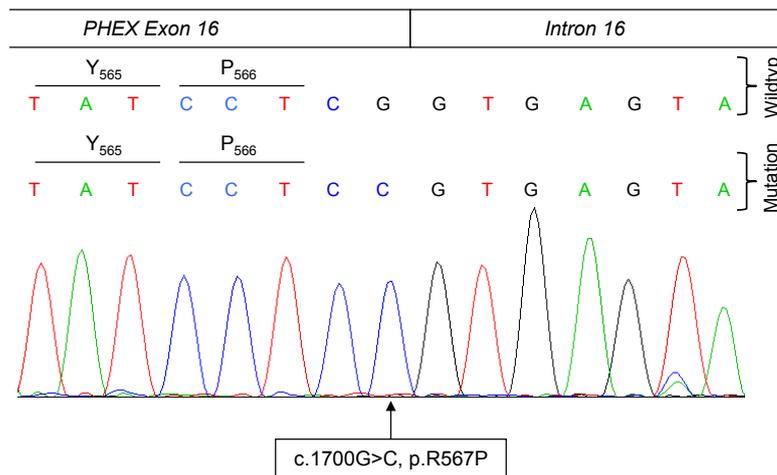


Abbildung 18:
Sequenzanalyse des Exons 16 des PHEX-Gens von P128 (c.1700G>C,p.R567P)

Es ist das Elektropherogramm des Exons 16 des PHEX-Gens sowie der Intron-Exon-Übergang von P128 dargestellt. Es zeigt sich eine Substitution des

Guanins an Position 1700 der kodierenden DNA durch ein Cytosin. Die Substitution ist durch einen Pfeil markiert. Im oberen Bildteil ist die Wildtypsequenz sowie die mutierte Nukleotidabfolge bei P128 dargestellt. Die Substitution führt zu einem Austausch der Aminosäure Arginin an Position 567 des Proteins durch ein Prolin.

3.3.2.c. Missense-Mutationen: Heterozygote Substitutionen

Mithilfe der Sequenzierung konnte bei zwei weiblichen Patienten eine heterozygote Substitution im PHEX-Gen ausgemacht werden, die zu dem einfachen Austausch einer Aminosäure führt.

Bei P186 liegt in Exon 20 die Substitution eines Cytosins durch ein Arginin vor, die zu dem Austausch der Aminosäure Asparagin an Position 680 des Proteins durch ein Lysin führt (c.2040 C>A, p.N680K) (Abbildung A9 im Anhang).

Bei P189 führt die heterozygote Substitution eines Adenins durch ein Cytosin in Exon 18 an Position 1862 der cDNA zu dem Austausch der Aminosäure Glutamin durch Prolin an Position 621 im Protein (c.1862 A>C, p.Q621P) (Abbildung A10 im Anhang).

3.3.2.d. Nonsense-Mutationen

Bei der Analyse von zwei Patientenproben hat sich eine Nonsense-Mutation nachweisen lassen, d.h. die Substitution einer Base führt zu dem Austausch einer Aminosäure durch ein Stopcodon.

Im Falle von P15 zeigt sich in der Sequenzierung von Exon 15 die Substitution eines Cytosins durch ein Tyrosin an Position 871 der cDNA, infolgedessen es zu dem Einführen eines Stopcodons anstelle eines Arginins an Position 291 in der Aminosäuresequenz kommt (c.871C>T, p.R291X) (Abbildung A11 im Anhang).

3. Ergebnisse

P183 weist infolge des Austausches eines Guanins durch ein Adenin in Exon 10 an Position 1158 der cDNA anstelle des Tryptophans an Position 386 der Aminosäuresequenz ein Stopcodon auf (c.1158G>A, p.W386X) (Abbildung 19).

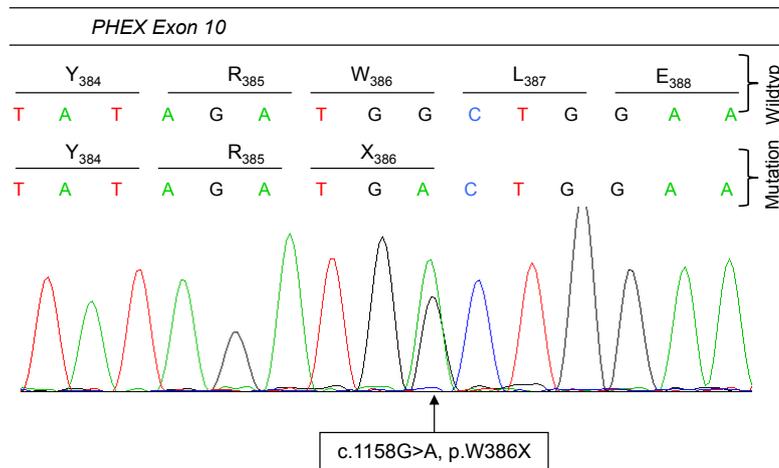


Abbildung 19:
Sequenzanalyse des Exons 10 des PHEX-Gens von P183 (c.1158 G>A, W386X).

Es ist das Elektropherogramm des Exons 10 des PHEX-Gens von P183 dargestellt. Es zeigt sich eine Substitution des Guanins an Position 1158 der cDNA durch ein Adenin. Die Substitution ist

durch einen Pfeil markiert. Im oberen Bildteil ist die Wildtypsequenz sowie die mutierte Nukleotidabfolge bei P183 dargestellt. Die Substitution führt zu einem Austausch der Aminosäure Tryptophan an Position 386 in der Aminosäuresequenz durch ein Stopcodon.

3.3.2.e. Splice-site-Mutationen

Im Falle von P113 befindet sich die Mutation nicht im Bereich des Exons, sondern sie betrifft den Übergang von Exon und Intron. Betroffen ist die Donor-Splice-Site von Intron 15 (c.1645+1G>A), dessen Konsensus-Sequenz von Guanin-Thymin zu Adenin-Thymin verändert wird.

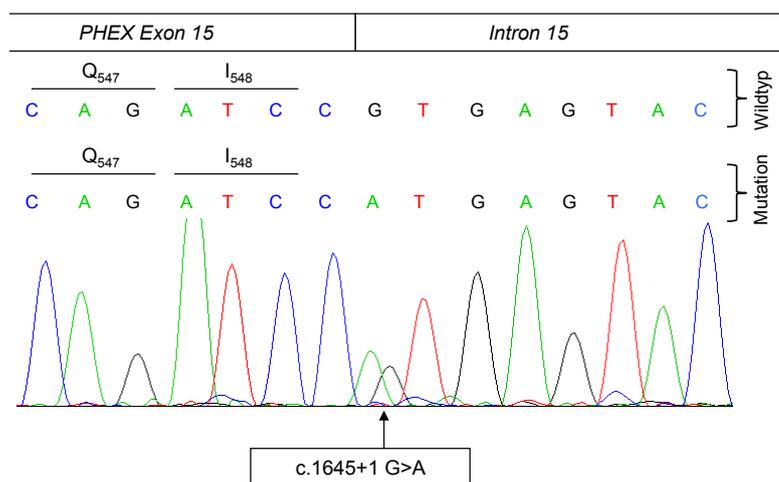


Abbildung 20:
Sequenzanalyse des Exons 15 des PHEX-Gens von P113 (c.1645+1G>A).

Es ist das Elektropherogramm des Exons 15 des PHEX-Gens sowie der Intron-Exon-Übergang von P113 dargestellt. Es zeigt sich eine Substitution des Guanins am Intron-Exon-

Übergang durch ein Adenin. Die Substitution ist durch einen Pfeil markiert. Im oberen Bildteil ist die Wildtypsequenz sowie die mutierte Nukleotidabfolge bei P113 dargestellt.

3. Ergebnisse

3.3.2.f. Putative Splice-site-Mutationen

Bei einer weiteren Patientin zeigt sich eine Mutation im Intron 21. Es handelt sich bei P63 um eine heterozygote Substitution, die 10 Basenpaare vor dem Beginn des Exons 22 liegt und zu dem Austausch eines Cytosins durch ein Adenin führt (Abbildung 21).

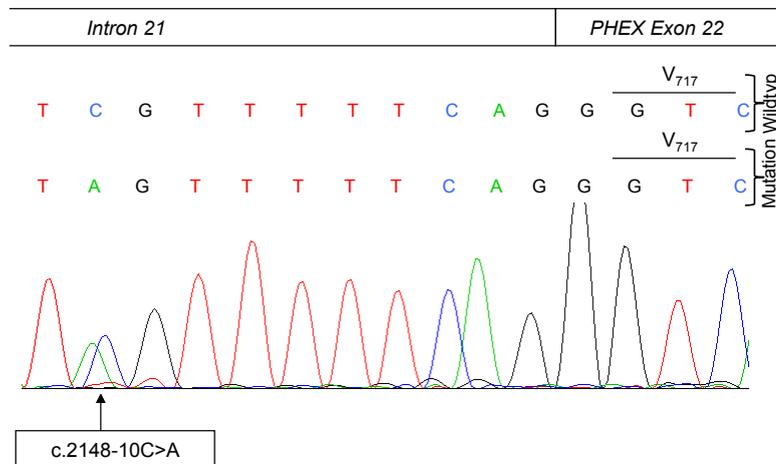


Abbildung 21:
Sequenzanalyse des Exons 22 des PHEX-Gens von P63 (IVS21-10C>A).

Es ist das Elektropherogramm des Exons 22 des PHEX-Gens sowie der Intron-Exon-Übergang von P63 dargestellt. Es zeigt sich eine Substitution des Cytosins im

Intron 21 zehn Basenpaare vor dem Beginn des Exons 22. Die Substitution ist durch einen Pfeil markiert. Im oberen Bildteil ist die Wildtypsequenz sowie die mutierte Nukleotidabfolge bei P63 dargestellt.

3.3.2.g. Polymorphismen

Bei der Analyse der PHEX-Sequenzen weisen sechs Patienten eine heterozygote Substitution in Intron 17 auf (c.1769-10C>T), die sich als bekannter Polymorphismus erweist (SNP Nummer rs3752433) (Gaucher et al., 2009).

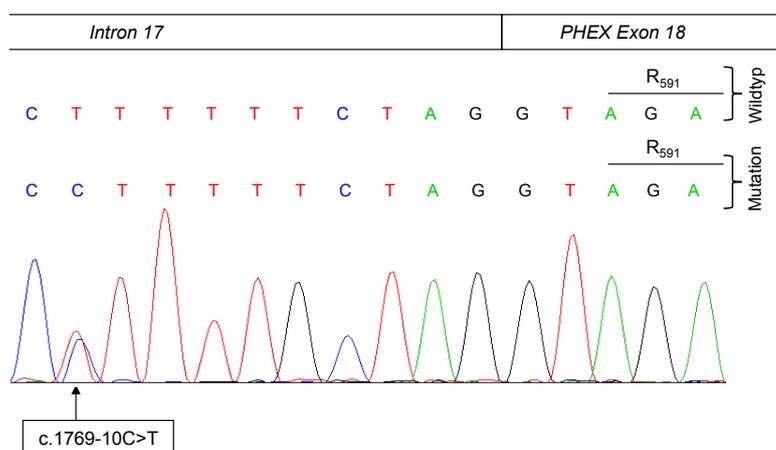


Abbildung 22:
Sequenzanalyse des Exons 18 des PHEX-Gens mit dem Polymorphismus c.1769-10C>T.

Es ist das Elektropherogramm des Exons 18 des PHEX-Gens sowie der Intron-Exon-Übergang dargestellt. Es zeigt sich eine Substitution

des Cytosins im Intron 17 zehn Basenpaare vor dem Beginn des Exons 18. Die Substitution ist durch einen Pfeil markiert. Im oberen Bildteil ist die Wildtypsequenz sowie die mutierte Nukleotidabfolge dargestellt.

3. Ergebnisse

3.4. Ergebnisse der Analyse des DMP1-Gens

Die Analyse der Sequenzierungen des DMP1-Gens bei elf Patienten hat in zwei Fällen zu Auffälligkeiten geführt. Für die Beschreibung der Mutationen wird die Referenzsequenz NM_004407.3 herangezogen.

Der Patient P115 weist die homozygote Deletion eines Thymins an Position 31 in Exon 2 auf, die nachfolgend zu einem Frameshift führt. Infolgedessen wird die Aminosäuresequenz des DMP1-Proteins verändert und das Tryptophan an Position elf der Aminosäuresequenz durch ein Threonin ersetzt. Desweiteren führt der Frameshift zu dem Einfügen eines Stopcodons nach 9 weiteren Aminosäuren (c.31delT, p.W11GfsX9). Das Elektropherogramm ist in Abbildung 23 dargestellt.

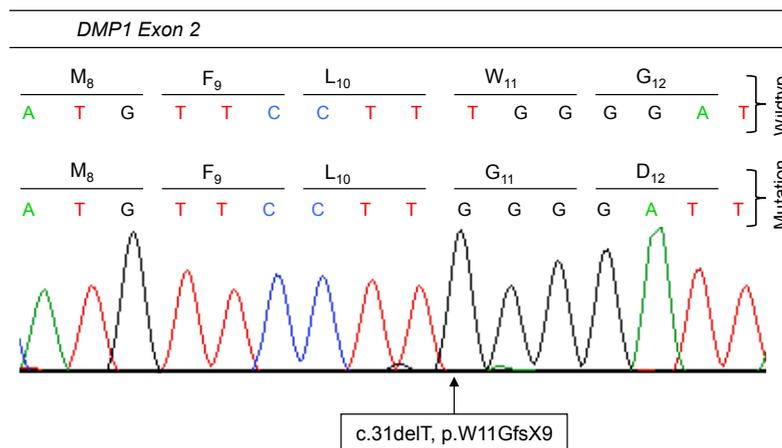


Abbildung 23:
Sequenzanalyse des Exons 2 des DMP1-Gens von P115 mit der homozygoten Deletion c.31delT, p.W11GfsX9.

Es ist das Elektropherogramm des Exons 2 des DMP1-Gens von P115 dargestellt. Es zeigt sich eine Deletion

eines Thymins an Position 31 der kodierenden DNA. Die Deletion ist durch einen Pfeil markiert. Im oberen Bildteil ist die Wildtypsequenz sowie die mutierte Nukleotidabfolge bei P115 dargestellt. Die Deletion führt zu einem Verschieben des Leserasters und zu dem Einführen eines Stopcodons nach weiteren 9 Aminosäuren.

Zur Bestätigung dieser Mutation wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Unter Verwendung des NEBcutters (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>) zeigt sich, dass durch die bei P115 auftretende Deletion eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym Sty1 eingeführt wird, die bei der Wildtyp-Sequenz nicht vorhanden ist. Infolgedessen schneidet Sty1 das PCR-Produkt von 751 bp bei vorhandener Deletion in zwei Fragmente von ca. 135 bp und ca. 615 bp.

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente eines Verdau mit dem Restriktionsenzym Sty1 des betroffenen Patienten P115 sowie einer Normalkontrolle bestätigt die Mutation (Abbildung 24). In der Laufstrecke der Normalkontrolle zeigt sich wie erwartet nur eine Bande, die im Vergleich zum 100bp Marker bei ca. 751 bp liegt. Die Normalkontrolle besitzt also eine Wildtyp-Sequenz und damit nicht die für Sty1 notwendige Erkennungssequenz, sodass das PCR-Produkt nicht geschnitten wird. In

3. Ergebnisse

der Laufstrecke von P115 zeigen sich dagegen zwei Banden bei ca. 135 sowie 615 bp, wodurch das Einführen der Erkennungssequenz durch die Deletion bestätigt ist. Darüber hinaus wird bestätigt, dass die Mutation homozygot ist, da keine dritte Bande bei 752 bp vorhanden ist. Im Gespräch mit der Familie zeigt sich, dass es in der Familie keine weiteren Betroffenen gibt. Die Eltern sowie der Zwillingbruder sind klinisch nicht auffällig. Material zur genetischen Untersuchung lag nicht vor. Ein Verwandtschaftsverhältnis zwischen den Eltern ist möglich, jedoch nicht bekannt.

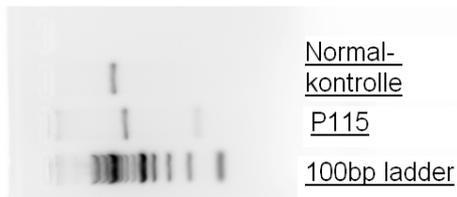


Abbildung 24: Darstellung der Restriktionsanalyse von P115

Es ist das Agarose-Gel der Restriktionsanalysen von P115 und einer Normalkontrolle unter Verwendung von Sty1 sowie ein 100 Basenpaar Marker dargestellt. In der

Laufstrecke der Normalkontrolle zeigt sich eine Bande, die dem PCR-Produkt von Exon 2 des DMP1-Gens mit 751 Basenpaaren entspricht. In der Laufstrecke von P115 zeigen sich zwei Banden, die jeweils einem Fragment von 135 Basenpaaren sowie 615 Basenpaaren entsprechen.

Die zweite Auffälligkeit bei der Analyse des DMP1-Gens liegt bei P181 vor. Es handelt sich um eine heterozygote Mutation in Exon 6, die zu der Substitution eines Cytosins durch ein Adenin und zum Austausch der Aminosäure Glutamin an Position 159 durch Lysin führt (c.475C>A, p.Q159K). Das entsprechende Elektropherogramm ist in Abbildung 25 dargestellt. Da diese Mutation entgegen der bislang bekannten Entitäten nur ein Allel betrifft, wurde dieses Ergebnis durch eine Wiederholung der Sequenzierung noch einmal bestätigt.

Um zu untersuchen, ob es sich um einen neu entdeckten Polymorphismus handelt, wurde bei 95 Normalkontrollen der entsprechende Bereich des Sense- sowie Antisensestranges auf das Vorliegen dieser Mutation sequenziert und analysiert. Dabei zeigt sich, dass keine der Normalkontrollen diese Mutation aufweist.

Im Folgenden wurde die direkte Verwandtschaft des Patienten molekulargenetisch auf das Vorliegen dieser Mutation untersucht. Dabei zeigt sich, dass weder die Mutter noch die Schwester Träger dieser Mutation sind. Bei dem Vater (P202) ließ sich jedoch ebenfalls diese Mutation nachweisen. Bei der klinischen Untersuchung bestätigt sich, dass auch er an einer Hypophosphatämie leidet sowie anamnestisch Genua vara vorliegen.

3. Ergebnisse

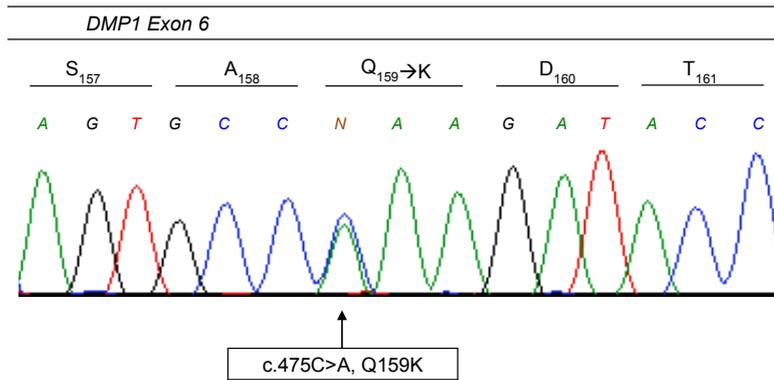


Abbildung 25:
Darstellung der Sequenzanalyse von P181 (c.475C>A, p.Q159K)

Es ist das Elektropherogramm des Exons 6 des DMP1-Gens von P181 dargestellt. Es zeigt sich eine

heterozygote Substitution eines Tyrosins durch ein Adenin an Position 475 der cDNA. Die Mutation ist durch einen Pfeil markiert. Im oberen Bildteil ist die Nukleotidabfolge von P115 sowie die Aminosäuresequenz dargestellt. Die Substitution führt zu einem Austausch der Aminosäure Glutamin an Position 159 der Aminosäuresequenz durch Lysin.

3. Ergebnisse

3.5. Häufigkeitsanalyse

Bei der molekulargenetischen Analyse von 57 Patienten mit dem Verdacht auf hypophosphatämische Rachitis ist in 33 Fällen (58%) in den untersuchten Bereichen kein genetisches Korrelat gefunden worden, während bei 24 Patienten (42%) positive Befunde vorliegen.

Von dem untersuchten Kollektiv haben 2% (n=1) eine Mutation im FGF23-Gen, 3% (n=2) eine Mutation im DMP1-Gen und 37% (n=21) im PHEX-Gen. Desweiteren liegt in 17% der Fälle (n=10) ein Polymorphismus im FGF23-Gen vor und in 11% (n=6) ein Polymorphismus im PHEX-Gen. Die Abbildung 26 gibt einen Überblick über die Ergebnisse.

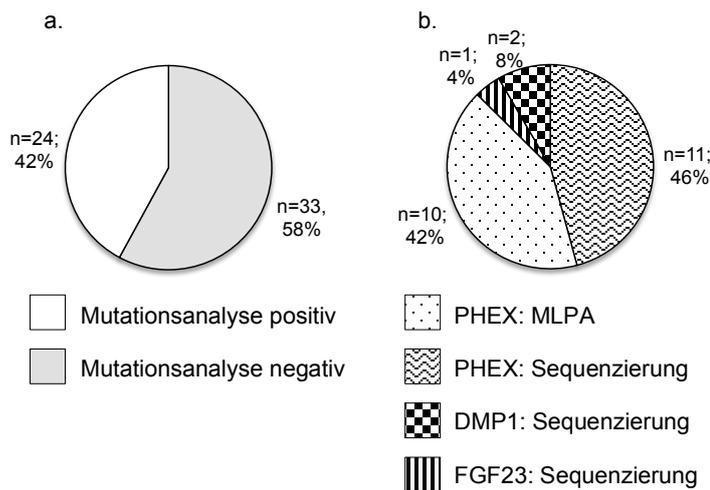


Abbildung 26:
Zusammenfassende graphische Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit

A. Vergleichende Darstellung der negativen gegenüber der positiven Mutationsanalysen exklusive der Polymorphismen unter Angabe der Anzahl (n) sowie des prozentualen Verhältnisses (%).

B. Darstellung aller positiven Mutationsnachweise nach

betroffenem Gen und der verwendeten Methode. Angegeben sind die absoluten Zahlen (n) und das prozentuale Verhältnis (%).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA von 57 Patienten mit der klinischen Diagnose einer hypophosphatämischen Rachitis untersucht, um ein molekular-genetisches Korrelat in Form von einer Mutation im FGF23-, PHEX- oder DMP1-Gen zu finden. Bei 24 der 57 Patienten (42%) ist der Nachweis einer Mutation gelungen, wofür mitunter eine Kombination der Untersuchungsmethoden MLPA und Sequenzierung notwendig war.

Die Ursache der XLH sind Mutationen im PHEX-Gen, die zu einem Funktionsverlust des PHEX-Proteins führen. Die McGill Universität in Kanada betreibt eine Datenbank im Internet (<http://www.phexdb.mcgill.ca>, Sabbagh et al., 2000), in der alle bislang veröffentlichten Mutationen zusammengefasst werden. Aktuell beläuft sich die Anzahl auf 328 Mutationen (*Anmerkung: Es sind 329 Mutationen angegeben, die Nummer 141 ist jedoch nicht vergeben.* Tag des Zugriffs: 06.06.2013) und umfasst sowohl Punktmutationen wie Substitutionen, Deletionen, Insertionen, kombinierte Deletionen-Insertionen und Duplikationen, als auch Deletionen, die größere Abschnitte umfassen.

	Anzahl	Prozent
Substitutionen	189	57,6%
Deletionen	91	27,7%
(davon große Deletionen*)	(15)	(4,6%)
Insertionen	40	12,2%
Sonstige (Kombinierte Deletionen/ Insertionen; Duplikationen)	8	2,4%

Tabelle 11: Übersicht über die bislang veröffentlichten PHEX-Mutationen

Unter Verwendung der Informationen aus der PHEX-Databse der McGill-Universität in Kanada sind die bislang veröffentlichten Mutationen (Stand 28.04.2013) nach Art der Mutation eingruppiert und sowohl in absoluten Zahlen (n) als auch im Verhältnis (%) wiedergegeben. *Große Deletionen: Deletionen, die mind. ein Exon umfassen.

In der PHEX-Databse sind acht Polymorphismen aufgeführt. In der „GeneCard“ des PHEX-Gens wurden dagegen insgesamt 3069 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) zusammengetragen (Tag des Zugriffs: 06.06.2013, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PHEX&search=pheX>).

Zu der Mutationsanalyse des PHEX-Gens sind in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Verfahren verwendet worden. Durch diese Kombination konnte bei 21 von 57 Patienten eine Mutation (exklusive Polymorphismen) nachgewiesen werden. Dieses entspricht einem Anteil von mindestens 36,8% der untersuchten Patienten. Die

4. Diskussion

MLPA war bei 10 Patienten (17,5%) und die Sequenzierung bei 11 Patienten (19,3%) positiv. An allen detektierten PHEX-Mutationen hat die MLPA somit einen Anteil von 47,6% und die Sequenzierung von 52,4%. Darüber hinaus konnte mit der Sequenzierung bei sechs Patienten ein Polymorphismus im PHEX-Gen nachgewiesen werden.

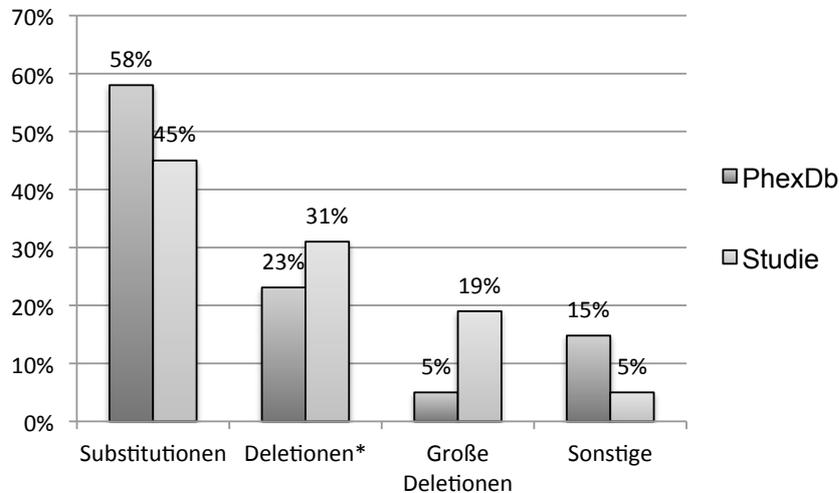


Abbildung 27: Graphische Darstellung des Mutationsspektrums im PHEX-Gen

Es wird die Detektionsrate von Substitutionen (exklusive Polymorphismen), Deletionen (*exklusive großer Deletionen, die mehr als ein Exon umfassen), großen Deletionen und sonstigen Mutationen (inkl. Insertionen, Duplikationen, kombinierte Deletionen/Insertionen) dieser Studie im Vergleich zu den Daten der PheX-Datenbank dargestellt. Die Auffälligkeiten in der MLPA, die sich nur auf ein Exon beschränken, werden unter sonstige Mutationen gezählt.

In Abbildung 27 ist ein Vergleich des Mutationsspektrums zwischen den bislang publizierten und den in dieser Studie gefundenen PHEX-Mutationen graphisch dargestellt. Es zeigt sich eine deutlich höhere Rate an großen Deletionen als im Vergleich zu den publizierten Daten. Die Ursache könnte durch ein verstärktes Auftreten dieser Mutationsart im untersuchten Kollektiv begründet sein. Wahrscheinlich ist dieser Unterschied jedoch durch die Wahl der Methoden zu erklären. In früheren Untersuchungen erfolgte die Mutationsanalyse häufig nur unter Verwendung der Sequenzierung bzw. der SSCP-Methode. In der vorliegenden Studie hat die zusätzliche Verwendung der MLPA-Methode das zu erfassende Mutationsspektrum um große Deletionen erweitert. In der Analyse des gesamten Spektrums hat sich diese Kombination beider Methoden als vorteilhaft erwiesen und die Detektionsrate von Deletionen im internationalen Vergleich deutlich angehoben. Im Vergleich zu den Daten der PheX-Datenbank zeigt sich, dass einige der in dieser Arbeit nachgewiesenen Mutationen bereits durch andere Autoren publiziert worden sind: Die Substitutionen p.R567P (c.1700 G>C) sowie p.N680K (c.2040 C>A) und p.W386X (c.1158 G>A) sind im Jahre 2000 durch Tynisma et al. beschrieben worden.

4. Diskussion

Die Splice-Site-Mutation c.1645+1G>A ist erstmals durch Holm et al. (2001) veröffentlicht worden. Die Substitution p.R291X (c.871 C>T) sowie Deletionen des Exons 9 und des Exons 12 wurden in der Publikation von Francis et al. (1997) beschrieben. Die Intronmutation c.1769-10 C>T in Intron 17 ist ein Polymorphismus und liegt nach der Studie von Gaucher et al. (2009) bei 25-37,5% der europäischen Population vor. In dieser Arbeit weisen lediglich 10,5% der Patienten diesen Polymorphismus auf.

Einige der in dieser Arbeit identifizierten Mutationen im PHEX-Gen sind dagegen bislang nicht bekannt und werden erstmals beschrieben, es handelt sich um die Mutationen p.I21NfsX30 (c.61dupA), p.Q621P (c.1862 A>C), p.M1V (c.1A>G), p.M618R (c.1853T>G), die Intronmutation c.2148-10C>A, und die großen Deletionen E1-5, E17-19, E1-9 und E13-22. Desweiteren liegen Auffälligkeiten in der MLPA vor, die sich lediglich über ein Exon erstrecken (E1, E3b, E7, E11).

Mutationen im PHEX-Gen, die das Entstehen einer XLH bedingen, führen zu einem Funktionsverlust des PHEX-Proteins und stellen somit „loss-of-function“-Mutationen dar. Doch wie lässt sich der Funktionsverlust eines großen, 749 Aminosäuren umfassenden Proteins durch die genannten Punktmutationen erklären?

Die *Duplikation* eines Adenins im Exon 1 des PHEX-Gens bei P70 (p.I21NfsX30, c.61dupA) führt zu dem Verschieben des Leserasters und einer mehrheitlich veränderten Aminosäuresequenz, beginnend mit der Aminosäure an Position 21. Auf funktioneller Ebene kommt es nach weiteren 30 Aminosäuren zu einem Stopcodon, sodass ein funktionsunfähiges Protein entsteht.

Bei P183 (p.W386X) und P15 (p.R291X) führt die Substitution einer Base zum Austausch einer Aminosäure durch ein Stopcodon (*Nonsense-Mutation*). Das Stopcodon wird durch die Basentriplets TAG, TAA und TGA kodiert und führt zu einem Abbruch der Translation. Bei den betroffenen Patienten kommt es dadurch an Position 386 bzw. 291 der 749 Aminosäuren zum Abbruch der Proteinsynthese, was den Verlust von etwa der Hälfte des Proteins inklusive des Zink-bindenden Motivs bedeutet.

P135 weist eine Substitution der ersten Base der kodierenden Sequenz auf, sodass das Basentriplett ATG, das das Startcodon darstellt, zu GTG verändert wird (c.1A>G, p.M1V). Das Startcodon ist das Startsignal für die Translation eines Proteins und kodiert für die erste Aminosäure am N-Terminus. Bei dieser Patientin muss von einem völligen Verlust des PHEX-Proteins ausgegangen werden. All diese Mutationen sollten daher zu dem Vollbild der XLH einhergehen.

4. Diskussion

Infolge einer *Missense-Mutation* kommt es zum Austausch einer Aminosäure ohne ein Verschieben des Leserasters. Veränderungen in der Aminosäuresequenz können die Ausbildung der Sekundärstruktur in Form von α -Helices, β -Faltblätter und Haarnadelschleifen sowie die dreidimensionale Anordnung des Proteins (Tertiärstruktur) stören. Für die Ausbildung der Tertiärstruktur sind die Seitenketten der Aminosäuren entscheidend, da sich zwischen ihnen nicht kovalente Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen ausbilden. Cysteinreste sind von besonderer Bedeutung, da sie miteinander kovalente Disulfidbrücken eingehen können, die die Tertiärstruktur entscheidend beeinflussen. Entsprechend ihrer Fähigkeit zur Wasserlöslichkeit werden Aminosäuren in eine hydrophile und hydrophobe Gruppe eingeteilt. Die hydrophoben Wechselwirkungen führen dazu, dass sich hydrophobe Seitenketten im Inneren des Proteins zusammenlagern, während die hydrophilen an der Außenseite zum Liegen kommen. P10 weist den Austausch der hydrophoben, apolaren Aminosäure Methionin an Position 618 durch die stark hydrophile, basische Aminosäure Arginin auf. Die Substitution in der DNA von P186 führt zum Austausch des hydrophilen, apolaren Asparagins an Position 680 durch die stärker hydrophile, basische Aminosäure Lysin. Durch die Punktmutation in der DNA von P189 wird die mäßig hydrophile, polare Aminosäure Glutamin an Position 621 durch das hydrophobe, apolare Prolin ersetzt. Prolin ist für seinen erheblichen Einfluss auf die Ausbildung der Sekundärstruktur bekannt, da es die Fähigkeit besitzt, α -Helices und β -Faltblätter zu unterbrechen. Dieser Aminosäureaustausch befindet sich in unmittelbarer Nähe zu dem Cystein an Position 617. P128 weist ebenfalls den Austausch einer Aminosäure durch das hydrophobe, apolare Prolin auf, der in diesem Fall das stark hydrophile, basische Arginin an Position 567 betrifft. Die Veränderungen befinden sich in unmittelbarer Nähe zu dem wichtigen Zink-bindenden Motiv an Position 580-584. Durch die genannten Missense-Mutationen ist eine Beeinflussung der Funktionsfähigkeit des PHEX-Proteins aufgrund von Veränderungen der Tertiärstruktur denkbar. Zur endgültigen Beweisführung sind jedoch Untersuchungen auf Transkriptions- oder Proteinebene notwendig.

Bei P113 liegt die Substitution einer Base im Intron 15 und betrifft die *Splice-Site* (c.1645+1G>A). Die Bedeutung von Mutationen in den nicht kodierenden Abschnitten ist noch nicht gänzlich verstanden. Es gibt Studien, die darauf hinweisen, dass auch Mutationen der nicht translatierten Sequenz, die einen Anteil von 65% am PHEX-Gen hat (Dixon et al., 1998), eine XLH zur Folge haben können. Mutationen in den nicht translatierten Regionen wie den Introns, Promotoren oder 3'UTR könnten bei 35% aller XLH-Patienten vorliegen (Christie et al., 2001).

4. Diskussion

Während des Splicings werden die Introns entfernt und die Exons zur mRNA verbunden. Für das Splicing ist am 5'-Ende des Introns die Basenfolge GT bzw. GU (Donor-Splice-Site), ein Adenosin in einer pyrimidinreiche Region (branch point) im Zentrum des Introns und am 3'-Ende die Basenfolge AG (Akzeptor-Splice-Site) sowie das Vorhandensein eines Splicosoms nötig. Fehler im Splicing können das Entfernen der Introns aus der mRNA verhindern oder zum Entstehen von Pseudoexons führen. Im Fall von P113 ist die Donor-Splice-Site GT am 5'-Ende zu AT verändert. Es ist von einer kritischen Beeinflussung der Spleißvorgangs auszugehen, um die Folgen auf die Proteinfunktion abzuschätzen müssten jedoch funktionelle Analysen durchgeführt werden.

P63 weist eine Mutation im Intron 21 auf, die 10 Basen vor Beginn des Exons 22 zum Austausch eines Cytosins durch ein Adenin führt (c.2148-10C>A). Die Mutation führt zu dem Entstehen eines AG-Motivs nur acht Basen vor der originären Akzeptor-Splice-Site AG am 3'-Ende des Introns. Die Relevanz dieser Veränderung ist nicht gesichert. Es könnte sich um einen Polymorphismus handeln. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es zum alternativen Spleißen und zum Entstehen eines *Pseudoexons* an der neu entstandenen AG-Sequenz kommt und das Exon 22 um acht Basenpaare verlängert wird. Infolgedessen könnte es zu einem Verschieben des Leserasters kommen, wodurch auch zwei für die Tertiärstruktur entscheidende Cysteine betroffen wären. Die Ausbildung von Pseudoexons im PHEX-Gen wurde bisher nur in wenigen Fällen beschrieben, da sich Studien häufig auf die kodierende Sequenz und die flankierenden Splice-Sites konzentrieren. Im Rahmen einer Studie von Christie et al. (2001) wurde bei Patienten mit klinischer Diagnose einer XLH und negativem Mutationsnachweis in den kodierenden Abschnitten des PHEX-Gens eine Analyse der Intronbereiche vorgenommen. Bei einer Familie konnte eine Mutation in Intron 7 detektiert werden, durch die eine neue Donor-Splice-Site entsteht. Durch die Aktivierung von drei normalerweise inaktiven Akzeptor-Splice-Sites entstehen drei Pseudoexons. Das Transkript enthält in einem Fall 17 zusätzliche Aminosäuren, in den anderen zwei Fällen kommt es infolge eines Frameshifts zum Abbruch des PHEX-Proteins nach der Insertion von 10 bzw. 11 zusätzlichen Aminosäuren. Laut dieser Studie ist anzunehmen, dass bei 9% der Patienten mit klinischer XLH und fehlendem Mutationsnachweis in den kodierenden Regionen Pseudoexons vorliegen bzw. Pseudoexons 0,6% aller PHEX-Mutationen ausmachen (Christie et al., 2001).

Das Ausmaß der Veränderungen durch die detektierten Punktmutationen ist nur abzuschätzen. Sie scheinen jedoch entweder die Proteinstruktur derart zu stören, dass die Zink-bindenden Motive unzugänglich oder durch eine Deletion oder Frameshift-Mutation nicht vorhanden sind. Infolgedessen bleibt das Binden des Zink-bindenden

4. Diskussion

Motivs an das ASARM-Peptid des MEPE-Proteins sowie weiterer SIBLING-Proteine aus, was zu einer erhöhten Freisetzung von ASARM-Peptiden bzw. Minhibinen mit nachfolgenden Mineralisationsdefekten führt (zur Pathophysiologie der XLH Vgl. Kapitel 1.2.1.). In Abbildung 28 ist ein Überblick über die in dieser Studie detektierten Punktmutationen dargestellt.

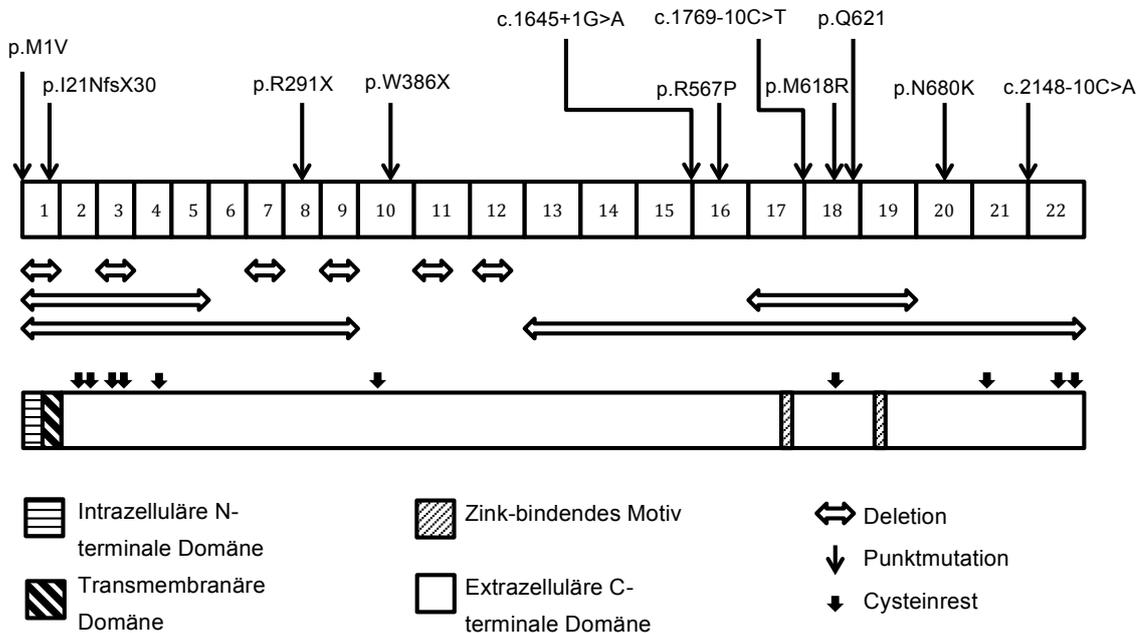


Abbildung 28: Schematische Darstellung der detektierten PHEX-Mutationen im Gen und Protein

Darstellung des PHEX-Gens mit seinen 22 Exons sowie die in dieser Studie detektierten Mutationen. Oberhalb der Exons sind durch die Sequenzierung detektierte Punktmutationen und unterhalb der Exons durch die MLPA gefundene Mutationen aufgetragen. Im unteren Bildteil wird schematisch das PHEX-Protein mit seinen Domänen, den Zink-bindenden Motiven in Exon 17 und 19 sowie den zehn konservierten Cysteinen dargestellt.

Auch die mit der MLPA detektierten Deletionen müssten das PHEX-Protein in seiner Funktion erheblich einschränken, um zur XLH zu führen. Auffälligkeiten in der MLPA-Analyse lassen jedoch nur eingeschränkt auf die Größe der zugrunde liegenden Deletion schließen. Da die MLPA nicht als beweisend gewertet wird, empfiehlt es sich Auffälligkeiten bei der Untersuchung durch eine andere Methode zu bestätigen. Im Abschnitt 3.3.1. sind die Ergebnisse der daraufhin erfolgten PCR-Untersuchungen bei zwei männlichen Patienten aufgeführt.

Aufgrund des X-chromosomalen Erbganges wäre bei männlichen Patienten in der PCR infolge der Deletion eines ganzen Exons das komplette Fehlen der entsprechenden Bande zu erwarten, da keine Amplifikation stattfinden könnte. Im Falle von P141 ist keine Bande des entsprechenden Exons entstanden, sodass eine große Deletion des Exons 12 als bestätigt gilt (Abbildung 14). Im Falle von USA10 liegt eine Bande des

4. Diskussion

betroffenen Exons 3 vor, die in ihrer Intensität gemindert ist (Abbildung A12 im Anhang). Eine große Deletion scheint demnach bei diesem Patienten nicht zu Grunde zu liegen. Wie lässt sich dieses Ergebnis interpretieren?

Eine weitere Ursache der nicht stattfindenden Amplifikation in der MLPA können Punktmutationen oder kleinere, nur wenige Basenpaare umfassende Deletionen oder Duplikationen in dem Bereich des Exons sein, an den sich die MLPA-Primer anlagern. Dadurch bliebe das Anlagern und Ligieren der Primer sowie die Amplifikation aus. Die Sequenzen der MLPA- und PCR-Primer sind nicht identisch und sie binden an unterschiedlichen Exonbereichen. Falls eine Mutation in dem Bereich des Exons vorliegt, an den sich die MLPA-Primer anlagern, kann es demnach sein, dass eine PCR ungestört abläuft und zu der Amplifikation der DNA führt.

Bei den weiblichen Patienten eignet sich die konventionelle PCR nicht als Methode, um Auffälligkeiten in der MLPA zu verifizieren. Infolge des zweifach vorhandenen X-Chromosoms und der gleichzeitigen Amplifikation beider Allele mit der PCR könnte man Veränderungen der entstehende Bande nicht eindeutig bewerten. Die Real-Time-PCR ist eine Variante, bei der durch den Einsatz und der Messung von Fluoreszenz während der exponentiellen Phase der PCR die Quantifizierung der DNA ermöglicht wird. Die Deletion eines Gens oder großer Abschnitte könnte man in der Quantifizierung nachvollziehen. Doch auch diese Methode wäre nicht für alle Mutationen beweisend. Die Ursache einer ausbleibenden Amplifikation mit der MLPA kann, wie bei den männlichen Patienten beschrieben, auch durch kleinere Mutationen im Primer-Bereich bedingt sein, die von den Real-Time-PCR-Primern nicht erfasst werden und zu einem Normalbefund führen würden. Demnach schließt ein Normalbefund in der Real-Time-PCR nach auffälliger MLPA eine Mutation nicht aus und es würden weitere Untersuchungen erforderlich.

Desweiteren könnte eine Deletion mittels Array comparative genome hybridization (array CGH) bestätigt werden. Dabei handelt es sich um eine Methode zur Detektion von Kopienzahlvariationen, d.h. Abweichungen in der Anzahl der Kopien eines DNA-Abschnittes im Genom, mittels Fluoreszenzmarkierung der Proben-DNA sowie Referenz-DNA und einem Vergleich der Signalintensitäten.

Da die Bestätigung der MLPA-Ergebnisse, insbesondere bei den weiblichen Patienten mithilfe der Real-Time-PCR oder array CGH, einen erheblichen Aufwand mit mehreren Untersuchungen erfordert, konnte die Bestätigung mit unabhängigen Methoden nur teilweise erfolgen und die Ergebnisse der MLPA sind mit einer gewissen Einschränkung zu betrachten.

4. Diskussion

Alle bisher identifizierten Mutationen im FGF23-Gen, die eine ADHR zur Folge haben, betreffen einen der beiden Arginin-Reste der Erkennungssequenz R₁₇₆HTR₁₇₉ für die SPCs in Exon 3. Bisher sind die heterozygoten Substitutionen p.R176Q (c.527G>A), p.R179W (c.535C>T) und p.R179Q (536G>A) beschrieben worden (ADHR Consortium 2000). Durch die Veränderung der Erkennungssequenz erfolgt keine Spaltung und Inaktivierung des FGF23-Proteins durch die SPCs (siehe Abbildung 29, Teil a). Die aktiven FGF23-Proteine kumulieren und es ergibt sich eine erhöhte Aktivität („gain-of-function“).

Nach der vorliegenden Arbeit ist bei 10 von 57 Patienten (18%) die heterozygote Substitution c.716C>T, p.T239M in Exon 3 des FGF23-Gens vorhanden. Erstmals wurde dieser Polymorphismus vom ADHR Consortium beschrieben, der in einem Kollektiv aus britischen, deutschen und amerikanischen Patienten zu 10,3% vorlag (ADHR Consortium, 2000). In einer koreanischen Studie liegt die Prävalenz dieses Polymorphismus bei Normalkontrollen um 32% und bei Patienten mit hypophosphatämischer Rachitis bei 33% (Cho et al., 2005). Im Vergleich zu den genannten Studien ist der Polymorphismus im untersuchten Patientenkollektiv in einer ähnlichen Größenordnung vorhanden, obgleich sich regionale Unterschiede andeuten. Desweiteren konnte im Rahmen der Sequenzierung des FGF23-Gens bei P78 sowie dessen Mutter eine heterozygote Deletion detektiert werden, die zu einem Frameshift und dem Austausch des Leucins an Position 190 durch ein Stop-Codon führt (c.568delC, p.L190X). Diese Mutation betrifft nicht direkt die Erkennungssequenz der SPCs und unterscheidet sich dadurch deutlich von den bislang bekannten Mutationen, die eine ADHR zur Folge haben. Die Proteinbiosynthese des FGF23-Proteins endet am neu eingeführten Stopcodon an Position 190 (siehe Abbildung 29). Das entstehende Protein ähnelt stark dem durch die SPCs inaktivierten Protein, das zwischen den Aminosäuren an Position 179 und 180 gespalten wird. Darüber hinaus weist die betroffene Patientin neben der Deletion in Exon 3 des FGF23-Proteins auch Auffälligkeiten in der MLPA-Analyse des PHEX-Gens auf, die a.e. einer großen Deletion des Exons 1-9 entspricht. In Zusammenschau dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die Mutation im FGF23-Gen nicht zur ADHR führt, sondern eine XLH vorliegt.

Die Patientenproben sind nicht nur mit der Sequenzierung auf eine Mutation im FGF23-Gen untersucht worden, sondern auch mit der MLPA-Methode. Mit der MLPA ist jedoch bei keinem Patienten eine Auffälligkeit detektiert worden. Wenn man bedenkt, dass die ADHR bislang nur durch Mutationen der R₁₇₆HTR₁₇₉-Sequenz in Exon 3 in Zusammenhang gebracht werden konnte, ist die MLPA-Methode wie sie aktuell verwendet wurde nicht zielführend. Es wird nach großen Deletionen oder

4. Diskussion

Duplikationen der einzelnen Exons gesucht. Kleine Punktmutationen der R₁₇₆HTR₁₇₉-Sequenz werden jedoch nicht erfasst, da sich die Primer an anderer Stelle anlagern. Die ADHR ist extrem selten. Sie kommt weniger häufig vor als die XLH, bislang ist keine Prävalenzrate bekannt. In dieser Studie ist eine Person von einer Mutation betroffen, das entspricht 1,7% bzw. unter Einbeziehung der Mutter der Patientin in die Gesamtkohorte 3,4%. Wie beschrieben hat diese Mutation jedoch wahrscheinlich keine ADHR zur Folge. Es wurde für diese Studie eine höhere Detektionsrate an Mutationen im FGF23-Gen erwartet, da das Kollektiv Patienten enthält, die eine klinische Diagnose der hypophosphatämischen Rachitis ohne Nachweis einer PHEX-Mutation haben. Ursächlich könnte eine insgesamt verminderte Prävalenz an FGF23-Mutationen im untersuchten geographischen Raum sein, die sich in der geringen Rate an FGF23-Polymorphismen im Vergleich zu der koreanischen Studie andeuten mag.

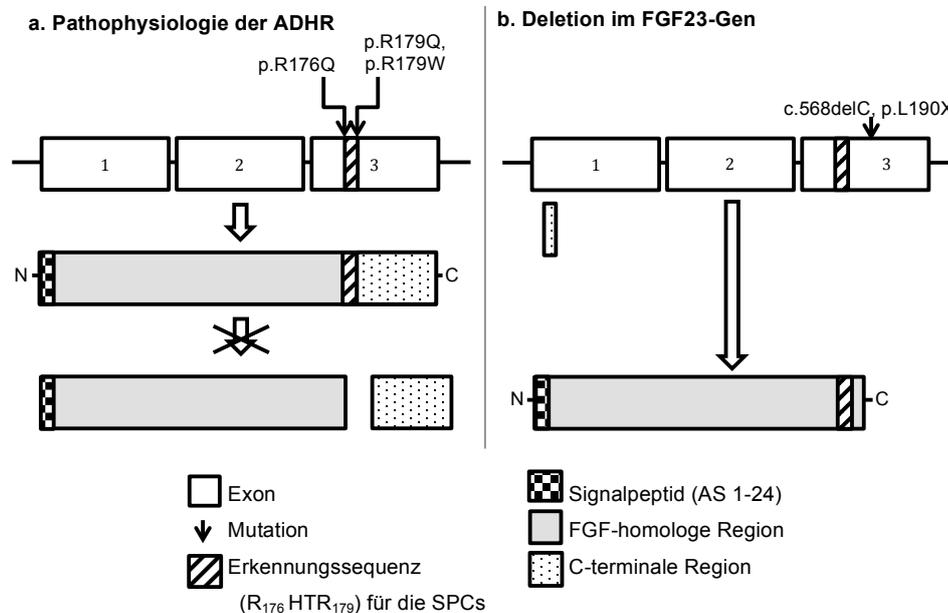


Abbildung 29: Mutationen im FGF23-Gen

a. Pathophysiologie der ADHR: Es ist das FGF23-Gen mit seinen drei Exons mit den bislang bekannten Mutationen sowie das entstehende FGF23-Protein mit seinen funktionellen Domänen dargestellt. Die Mutationen der Erkennungssequenz für die SPCs verhindern die Spaltung und Inaktivierung des FGF23-Proteins, infolgedessen kommt es zu einer gesteigerten Aktivität („gain-of-function“) und zum Ausbilden einer ADHR. **b. Deletion c.568delC:** Es ist das FGF23-Gen mit seinen drei Exons und der Deletion c.568delC dargestellt. Im unteren Bildteil zeigt sich das FGF23-Protein mit seinen funktionellen Domänen, das infolge der Mutation ein Stoppcodon an Position 190 der Aminosäuresequenz trägt.

Die Untersuchung des DMP1-Gens erfolgte in der vorliegenden Studie erst nach dem Ausschluss einer PHEX- und FGF23-Mutation mit zwei unabhängigen Methoden, da die autosomal rezessive hypophosphatämische Rachitis (ARHR) die seltenste der drei Erkrankungen ist.

4. Diskussion

Als Ursache für die ARHR sind bislang wenige Mutationen beschrieben worden. Eine homozygote Substitution im Startcodon führt zu einem Austausch des Methionins durch ein Valin (p.M1V) (Feng et al., 2006, Lorenz-Deperieux et al., 2006). Die homozygote Deletion der Basen c.1484-1490 in Exon 6 bewirkt das Verschieben des Leserasters und den Austausch der 18 C-terminalen Aminosäuren durch 33 andere Aminosäuren (Feng et al., 2006). Eine homozygote Nonsense-Mutation p.W33X (c.98G>A) verursacht in einer japanischen Familie mit konsanguinen Eltern das Ausbilden einer ARHR (Koshida et al., 2010). Eine homozygote Deletion (c.485delT, p.E163R) in Exon 6 führt zu einem Frameshift und einem vorzeitigen Stopcodon (Turan et al., 2010). Weiterhin sind eine homozygote Deletion eines Basenpaares in Exon 6 (c.362delC) beschrieben worden, die nach 120 Aminosäuren zu einem Stopcodon führt (Lorenz-Deperieux et al., 2006) sowie eine homozygote Mutation in der Akzeptor-Splice-Site von Intron 2 (c.55-1G>C) (Lorenz-Deperieux et al., 2006). Eine große Deletion, die die Exons drei bis sechs umfasst, ist bei einer Familie aus der Studie von Farrow et al. (2009) für die ARHR verantwortlich. Die Polymorphismen p.S69C, p.D117N, p.R272H und p.K463R dagegen führen nicht zur ARHR.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mithilfe der Sequenzierungsmethode bei zwei Patienten eine Mutation im DMP1-Gen gefunden werden (3,4%). Die MLPA-Methode hat bei der Analyse des DMP1-Gens keine Rolle gespielt, da es mit dem verwendeten Kit nicht erfasst wird.

In einem Fall handelt es sich um die homozygote Deletion eines Tyrosins in Exon 2 mit nachfolgendem Frameshift, beginnend mit der Aminosäure an Position 11. Infolgedessen entsteht ein Stopcodon nach 9 weiteren Aminosäuren der 513 Aminosäuren (c.31delT, p.W11GfsX9), was auf funktioneller Ebene zu dem Verlust eines großen Teiles des DMP1-Proteins führt. Die Mutation liegt bei dem betroffenen Patienten homozygot vor. In der klinischen Betrachtung der nahen Familienangehörigen (Eltern und Zwilling) zeigt sich kein weiterer Betroffener, wie es bei autosomal rezessiven Erbgängen häufig der Fall ist. Das genetische Material für die Untersuchung auf das Vorliegen einer heterozygoten Mutation stand nicht zur Verfügung. Bei dem autosomal rezessiven Erbgang wäre das Vorliegen einer heterozygoten Mutation bei beiden Elternteilen zu erwarten, alternativ könnte eine uniparentale Disomie bzw. ein heterozygoter Genverlust vorliegen. Mit den verwendeten Methoden ist dieses nicht auszuschließen. Bei den bislang publizierten Fällen von ARHR lag in den betroffenen Familien häufig eine Konsanguinität der Eltern vor, die auch in dieser Familie möglich ist, da beide Elternteile einer deutschen Enklave im Ausland entstammen. Ein direktes Verwandtschaftsverhältnis ist jedoch

4. Diskussion

nicht bekannt. Die vorliegende Mutation scheint in vielerlei Hinsicht einer typischen Mutation bei autosomal rezessiver hypophosphatämischer Rachitis zu entsprechen. In Abbildung 30 ist eine Übersicht zu den bislang bekannten sowie in dieser Arbeit detektierten DMP1-Mutationen dargestellt.

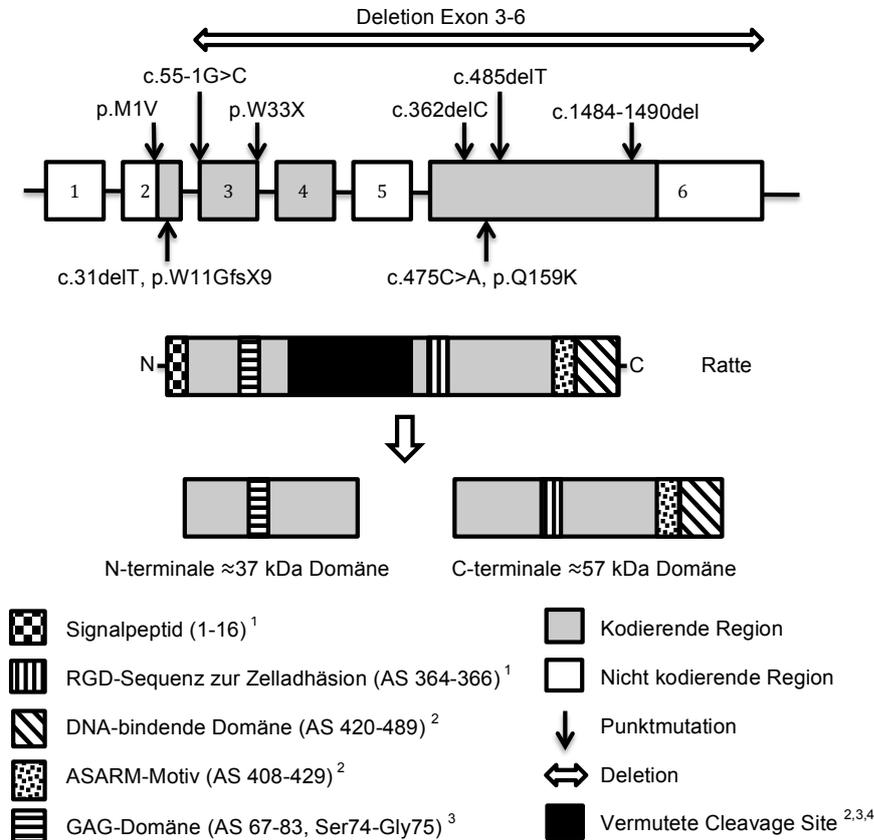


Abbildung 30: Übersicht zu den DMP1-Mutationen (nachgezeichnet und erweitert nach Koshida et al., 2010)

Das DMP1-Gen ist schematisch mit seinen sechs Exons unter Hervorhebung der kodierenden Regionen dargestellt. Oberhalb des Gens sind die bislang veröffentlichten Mutationen aufgetragen, die zu einer ARHR führen, unterhalb des Gens sind die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Mutationen gezeigt. Weiterhin ist das besser erforschte DMP1-Protein der Ratte mit strukturellen Merkmalen dargestellt, das anstelle von 513 bzw. 497 AS nur 489 AS umfasst. (Quellen: 1. Pubmed, 2. Chaussin et al., 2009, 3. Qin et al., 2007, 4. Steiglitiz et al., 2004)

Im zweiten Fall handelt es sich um die heterozygote Substitution p.Q159K (c.475C>A). Bei der Untersuchung von 95 Normalkontrollen mittels Sequenzierung wurde diese Mutation in keinem Fall vorgefunden, sodass es sich nicht um einen häufigen Polymorphismus zu handeln scheint. In der molekulargenetischen Analyse der nahen Familienangehörigen zeigt sich, dass weder die Mutter noch die Schwester Träger der Mutation sind. Der Vater hingegen weist ebenfalls die besagte Mutation auf und zeigt darüber hinaus das klinische Bild einer Osteomalazie mit Genua vara und einer Hypophosphatämie. Das Vorliegen einer heterozygoten anstelle einer homozygoten

4. Diskussion

Mutation scheint der Definition einer autosomal rezessiven hypophosphatämischen Rachitis zu widersprechen. Dennoch ist in diesem Fall nach Ausschluss von anderen Mutationen im PHEX-, FGF23- und DMP1-Gen, dem Ausschluss eines häufigen Polymorphismus und dem Nachweis derselben Mutation und Klinik beim Vater diese Mutation als Ursache der Erkrankung denkbar.

Das DMP1-Protein trägt eine ungewöhnlich hohe Anzahl an sauren Domänen, wodurch eine hohe Kapazität zur Calcium-Ionenbindung vorliegt, die notwendig ist für das Mitwirken an der Mineralisation (Qin et al., 2007). Die cDNA der 57-kDa-Domäne besteht zu 40,3% aus den sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat bzw. deren Amide Asparagin und Glutamin (Qin et al., 2006). Die basische Aminosäure Lysin kommt dagegen nur in 2,4% vor, in der 37-kDa-Domäne sogar nur zu 1,7% (Qin et al., 2006). Der Austausch der Aminosäure Glutamin durch die basische Aminosäure Lysin infolge der heterozygoten Mutation könnte in dem ungewöhnliche saurem Protein die Ausbildung der Sekundär- und Tertiärstruktur erheblich stören. Insbesondere bei der Anlagerung der BMP1/TLL1 und Spaltung des Proteins scheinen Aspartatrete in der Nähe von α -Helices eine wichtige Rolle zu spielen (Qin et al., 2003).

Bislang sind nur homozygote Mutationen als Ursache der ARHR bekannt, und somit widerspricht die genannte heterozygote Substitution dem bislang bekannten Pathomechanismus. Diese DMP1-Mutation ist durch ihre Heterozygotie hoch interessant und könnte durch weitere Erforschung neue Aspekte bezüglich des DMP1-Proteins, der ARHR und dem Calcium-Phosphat-Stoffwechsel in Physiologie und Pathologie liefern.

Bei 58% der untersuchten Patienten konnte mit den verwendeten Methoden weder eine Mutation im PHEX- noch im FGF23- oder DMP1-Gen nachgewiesen werden. Im Vergleich zeigt sich, dass bei Dixon et al. (1998) in 32,4% und in der Studie von Francis et al. (1997) in 13% der familiären Fällen bzw. in 43% der sporadischen Fällen trotz klinischer Diagnose einer XLH keine Mutation im PHEX-Gen gefunden werden kann. Wodurch lässt sich die niedrigere Rate an Mutationsnachweisen in dieser Arbeit im Vergleich zu den publizierten Studien erklären?

Grundsätzlich kann ein fehlender Mutationsnachweis trotz korrekter Diagnose, gewissenhaften Arbeitens und entsprechender Vorkehrungsmaßnahmen in einem fehlerhaften Verarbeiten der Proben, der Kontamination mit Fremdmaterial bei der Probengewinnung und -verarbeitung oder in einer fehlerhaften Analyse begründet liegen.

Die Diagnosestellung beruht vorrangig auf Auffälligkeiten im klinischen Erscheinungsbild (v.a. Kleinwuchs, Skelettverformungen insbesondere der unteren

4. Diskussion

Extremität, röntgenologische Veränderungen), in der Familienanamnese (in Hinblick auf rachitische Symptome) und in den laborchemischen Parametern (v.a. Hypophosphatämie, erhöhter Wert der Alkalischen Phosphatase, reduzierte tubuläre Phosphatrückresorption). Doch es gibt verschiedene Gründe die zu einer falsch positiven oder negativen Diagnose führen können.

Werte außerhalb des Referenzintervalls bei der klinischen oder laborchemischen Untersuchung sind nicht zwingend pathologisch. Es kann sich auch um eine Normvariante handeln, d.h. eine von der Norm abweichende Veränderung ohne Krankheitswert. Ein vermindertes Längenwachstum kann unter anderem die Folge einer verminderten Zielgröße bei kleinen Eltern sein (familiärer Kleinwuchs) oder passager bei verzögert einsetzendem Längenwachstum (konstitutioneller Entwicklungsverzögerung) vorliegen. Ein pathologischer Wert bei der Analyse eines laborchemischen Parameters kann auf einem Messfehler beruhen und durch eine Kontamination oder eine Verunreinigung sowie technische Fehler entstehen.

Eine positive Familienanamnese ist ein weiterer Faktor, der die Verdachtsdiagnose stützt. Ohne die Kenntnis der Genetik einer betroffenen Familie lässt sich jedoch nicht zwingend auf den Vererbungsmechanismus und die Ausprägung in den nachfolgenden Generationen schließen. Die drei untersuchten Krankheiten führen zwar zu einer ähnlichen Symptomatik, aber sie folgen sehr unterschiedlichen Vererbungsmechanismen. Darüber hinaus kommt es auch zu *de novo* Mutationen und sporadischen Fällen. Bei der XLH machen diese Neumutationen 18% (Whyte et al., 1996) bis 22% (Dixon et al., 1998) aus. Eine positive Familienanamnese kann folglich bei manifesten rachitischen Symptomen ein Hinweis auf das Vorliegen einer hereditären hypophosphatämischen Rachitis geben und eventuell eine prozentuale Wahrscheinlichkeit für das Auftreten bei Nachfahren ergeben, eine negative Familienanamnese ist jedoch kein Ausschlusskriterium für eine hypophosphatämische Rachitis.

Die Diagnosestellung wird weiterhin dadurch erschwert, dass die klinische Ausprägung bei den drei untersuchten Erkrankungen sehr heterogen sein kann (siehe Kapitel 1.2.). Eine besondere Schwierigkeit ergibt sich bei der Diagnosestellung, wenn es sich um einen sporadischen Fall mit einem milden klinischen Verlauf handelt.

Es gibt eine Vielzahl an Erkrankungen, die zu biochemischen und pathophysiologischen Veränderungen führen, die der hypophosphatämischen Rachitis ähneln. In der vorliegenden Arbeit wurden nur drei hereditäre, FGF23-abhängige Erkrankungen untersucht. Es ist nicht auszuschließen, dass Patienten an einer differentialdiagnostisch relevanten Erkrankung leiden, die in dieser Studie nicht betrachtet wird.

4. Diskussion

Falls die Diagnose einer hypophosphatämischen Rachitis korrekt gestellt wurde, kann die Ursache für das Fehlen eines Mutationsnachweises im Versuchsaufbau liegen. Es wurden alle Patientenproben auf eine Mutation im Exon 3 des FGF23-Gens sequenziert und mit der MLPA auf Mutationen im PHEX- und FGF23-Gen untersucht. Die Sequenzierung des PHEX-Gens sowie des DMP1-Gens ist jedoch nur für einen Teil der Patientenproben erfolgt. Um das Kosten-Nutzen-Verhältnis zu optimieren, wurden abhängig von der Anzahl erfolgloser Voruntersuchungen und der Qualität der vorliegenden klinischen Daten nur einige Patienten untersucht. Es ist nicht auszuschließen, dass Patienten Mutationen in einem nicht untersuchten Exon bzw. Gen tragen.

Desweiteren wurden die meisten Primer in dieser Studie so gewählt, dass sie die entsprechenden Exons zusätzlich von wenigen flankierenden Basenpaaren des Introns erfassen. Durch dieses gängige Vorgehen analysiert man die kodierende Sequenz und die zugehörigen Splice-Sites. Der Großteil der Introns sowie der nicht translatierten Region (UTR) wird demnach nicht untersucht, obgleich dort liegende Mutationen eine Relevanz für das Entwickeln einer XLH haben können (Christie et al., 2001). Mit den durchgeführten Untersuchungen kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Patienten an derartigen Mutationen leiden.

Rückblickend lässt sich in vielen Fällen die Diagnose nicht verifizieren, da die entsprechenden Daten nicht vorliegen. Die Eingangskriterien für diese Studie sind nicht einheitlich gewählt worden und es gibt eine große Heterogenität bezüglich der patientenbezogenen Informationen. Die vorhandenen klinischen Daten der Patienten sind in der Tabelle A1 im Anhang zusammengetragen. Neben ausführlich untersuchten Patienten mit Verlaufsdaten über mehrere Jahre beinhaltet das Kollektiv auch zugewiesene Materialproben infolge eines klinischen Verdachtes auf Phosphatdiabetes ohne die Angabe weiterer Informationen. Da keine klaren Eingangskriterien definiert wurden, ist als Ursache der erhöhten Anzahl an negativen Ergebnissen ein vermehrtes Einsenden von Material aufgrund eines einfachen Verdachtes und nicht aufgrund einer gesicherten Diagnose denkbar. Ein großer Nutzen der genetischen Untersuchung liegt zweifelsfrei darin, Kinder im Neugeborenen- und Kleinkindesalter mit positiver Familienanamnese auf das Vorliegen einer Mutation zu untersuchen, um noch vor dem Ausbilden der Symptome oder laborchemischer Veränderungen mit einer Therapie beginnen zu können. Durch die Untersuchung dieser asymptomatischen Patienten ergibt sich allerdings eine größere Rate an gesunden Patienten im Kollektiv und folglich eine niedrigere Erfolgsrate, als es bei Studien mit ausschließlich klinisch nachweislich erkrankten Patienten der Fall ist.

4. Diskussion

Zu der Heterogenität des Kollektivs hat des Weiteren das Einschließen von Patienten beigetragen, die in einer vorherigen Studie bereits vergeblich mit der SSCP-Methode auf eine Mutation im PHEX-Gen untersucht wurden (Felgenhauer S, Med. Diss. Lübeck, 2005). Es ist denkbar, dass das Kollektiv dadurch zugunsten negativer Ergebnisse verzerrt wurde. Eine weitere Ursache für den vergleichsweise hohen Anteil an Negativergebnissen kann in regionalen Unterschieden begründet sein, die beispielsweise auf einer größeren Rate an Mutationen in den nicht translatierten Bereichen, einem bislang unbekanntem Gen oder einem größeren Anteil an sporadischen Fällen basiert. Bei den Mutationen in den nicht translatierten Bereichen kann es sich zum Beispiel um eine höhere Rate an SNPs in regulatorischen Regionen handeln, die die Genregulation beeinflussen (regulatorySNP), oder um SNPs, die die RNA-Prozessierung beeinflussen (structural RNASNP). Desweiteren kann eine erhöhte Anzahl von Mutationen in den Genen von mikroRNA oder deren Bindesequenz in der 3`untranslatierte Region der mRNA des Zielgens vorliegen. Bei der mikroRNA handelt es sich um nicht kodierende RNA, die ein wichtiger Bestandteil der Genregulation auf der posttranskriptionalen Ebene darstellt.

Die Untersuchung von genetischem Material zur Beschreibung von Mutationen ist ein wichtiger Bestandteil bei der Erforschung von Krankheiten. Die alleinige Kenntnis einer Mutation gibt allerdings wenig Aufschluss auf den Pathomechanismus, die Ausprägung, den Verlauf und die Schwere der Erkrankung bei den Betroffenen. Die zusätzliche Kenntnis dieser individuellen klinischen Entwicklung kann dagegen zu einem mehrdimensionalen Verständnis führen, das einen Wissensgewinn für die Zukunft bietet.

Die Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp bei Patienten mit hypophosphatämischer Rachitis stellt sich grundsätzlich jedoch schwierig dar, da die Erkrankung sehr selten ist und erhobene Daten dadurch häufig in ihrer Aussagekraft eingeschränkt sind. Bei der XLH konnte bislang keine Korrelation zwischen dem Phänotyp und der Lokalisation sowie der Art der Mutation auf dem PHEX-Gen nachgewiesen werden. Lediglich Tendenzen zu einer stärkeren Skelettbeteiligung bei verkürzenden Mutationen in familiären Fällen (Holm et al., 2001) oder in der C-terminalen Domäne (Song et al., 2007) sowie eine reverse Antizipation (Holm et al., 2001) wurde beschrieben. Die ADHR zeichnet sich durch eine variable Penetranz aus und kann sowohl im Kleinkind- als auch Erwachsenenalter beginnen, einen milden Krankheitsverlauf zeigen und im Falle eines frühen Beginns im späteren Verlauf zu einer Normalisierung der Laborparameter führen (Econs und McEnery 1997). Auch bei der weniger erforschten ARHR wird von einer großen Spannweite an klinischen

4. Diskussion

Ausprägungen mit sowohl milden als auch schwereren Verläufen ausgegangen (Koshida et al., 2010).

Die Korrelation der individuellen Entwicklung anhand der klinischen Daten mit der detektierten Mutation ist in dieser Arbeit aufgrund der großen Heterogenität in der Datenerfassung nicht möglich. Die Beziehung zwischen dem Phänotyp und dem Mutationsort und der Mutationsart wäre insbesondere beim getrennten Betrachten der betroffenen Gene von Interesse gewesen.

Für die Mutationsanalyse wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Die Sequenzierung führte in 14 Fällen zur Detektion einer Mutation: eine im FGF23-Gen, elf im PHEX-Gen und zwei im DMP1-Gen. Die MLPA war dagegen in zehn Fällen bei der Analyse des PHEX-Gens auffällig, während die Untersuchungen des FGF23-Gens unauffällig waren.

Das zu erfassende Mutationsspektrum der MLPA-Methode umfasst im Gegensatz zur Sequenzierung große Deletionen und Duplikationen im PHEX- und FGF23-Gen. Zudem ist die MLPA eine vergleichsweise zeit- und kostensparende Methode. Durch die Verwendung der MLPA-Methode konnte im Vergleich mit internationalen Studienergebnissen eine überdurchschnittlich hohe Rate an Deletionen detektiert werden (siehe Abbildung 27).

Bei der Suche nach Punktmutationen ist die MLPA nur sehr eingeschränkt zielführend, da diese nur erfasst werden, wenn sie sich in der Primersequenz befinden. Dieses führt insbesondere bei der Analyse des FGF23-Gens zu einem Nachteil, da sich die Primer nicht an die relevante R₁₇₆HTR₁₇₉-Sequenz in Exon 3 anlagern und dortige Punktmutationen nicht detektiert werden. Große Deletionen oder Duplikationen im FGF23-Gen könnten mit der Methode zwar nachgewiesen werden, aber sie entsprechen nicht dem bekannten Mutationsprofil bei der ADHR und sind nicht zu erwarten. Weiterhin deckt die MLPA Punktmutationen im PHEX-Gen nicht ausreichend ab. Diese machen jedoch einen Großteil der bislang detektierten Mutationen aus. In der Phex-Database sind etwa die Hälfte aller Mutationen Substitutionen. Das DMP1-Gen wird von der verwendeten Methode momentan nicht erfasst, sodass die ARHR nicht berücksichtigt wird.

Ein Nachteil der MLPA-Methode ist, dass sie nicht beweisend ist und die Bestätigung durch mindestens eine andere Methode erfordert, da Polymorphismen oder Punktmutationen in der Primersequenz falsch positive Ergebnisse liefern können. Für diese Bestätigung kann je nach Fragestellung beispielsweise die Sequenzierungsmethode, konventionelle PCR, Array-CGH, Quantitative PCR oder Quantitative-Realtime-PCR herangezogen werden.

4. Diskussion

Die Sequenzierung ist eine etablierte Methode und erfasst Punktmutationen und kleine Deletionen, Duplikationen sowie Insertionen. Sie liefert sehr genaue Ergebnisse für eine durch die gewählten Primer definierte Sequenz, die in der Regel die kodierende Region und die Intron-Exon-Übergänge umfasst. Desweiteren ist es möglich, die Patienten auf Mutationen in allen drei Genen zu untersuchen. Mutationen der nicht kodierenden bzw. translatierten Regionen werden zumeist nicht sequenziert, doch eine Erweiterung auf diese Bereiche ist ebenfalls bei entsprechender Wahl der Primer möglich. Ein Nachteil dieser Methode ist darin zu sehen, dass das zu erfassende Mutationsspektrum große Deletion, Duplikationen oder Insertionen nicht beinhaltet. Für eine Screeningmethode ist sie darüber hinaus vergleichsweise teuer und aufwändig, sodass sie nur bei begründetem Verdacht zum Einsatz kommen sollte. Infolge des hohen Stellenwertes der Sequenzierungsmethode sind modifizierte Sequenzierungsmethoden entwickelt worden, dank derer große Teile oder gar das ganze Genom eines Individuums in kürzerer Zeit analysiert werden können. Diese Methoden werden unter dem Begriff „Next Generation Sequencing“ zusammengefasst und umfassen unter anderem die Pyrosequenzierung, bei der durch die Luziferase-Reaktion Lichtsignale entstehen und Rückschluss auf die DNA-Sequenz geben. Ein weiteres Verfahren stellt die Sequenzierung durch Hybridisierung dar, bei der Oligonukleotide auf einem DNA-Chip oder Microarray vorliegen und mit fluoreszenz- oder radioaktiv markierten Proben-DNA hybridisieren. Durch die Sequenzierungsmethoden der nächsten Generation ist die gleichzeitige Analyse mehrerer Gene zu einem wesentlich günstigeren Preis möglich (Panel Sequenzierung).

Die erfassbaren Mutationsspektren der MLPA und der in dieser Arbeit verwendete Sequenzierungsmethode ergänzen sich sehr gut. Nur durch die Kombination beider Verfahren ist in dieser Arbeit eine hohe Methodensicherheit erzielt worden, durch die eine überdurchschnittlich hohe Rate an großen Deletionen detektiert werden konnte. Die Verwendung von den zwei Methoden ist demnach als positiv zu bewerten.

Aus der kritischen Betrachtung der Eingangskriterien, der Methoden und Ergebnisse lässt sich eine Strategie ableiten, mit der zukünftig eine Optimierung der genetischen Analyse ermöglicht werden soll (Abbildung 31).

4. Diskussion

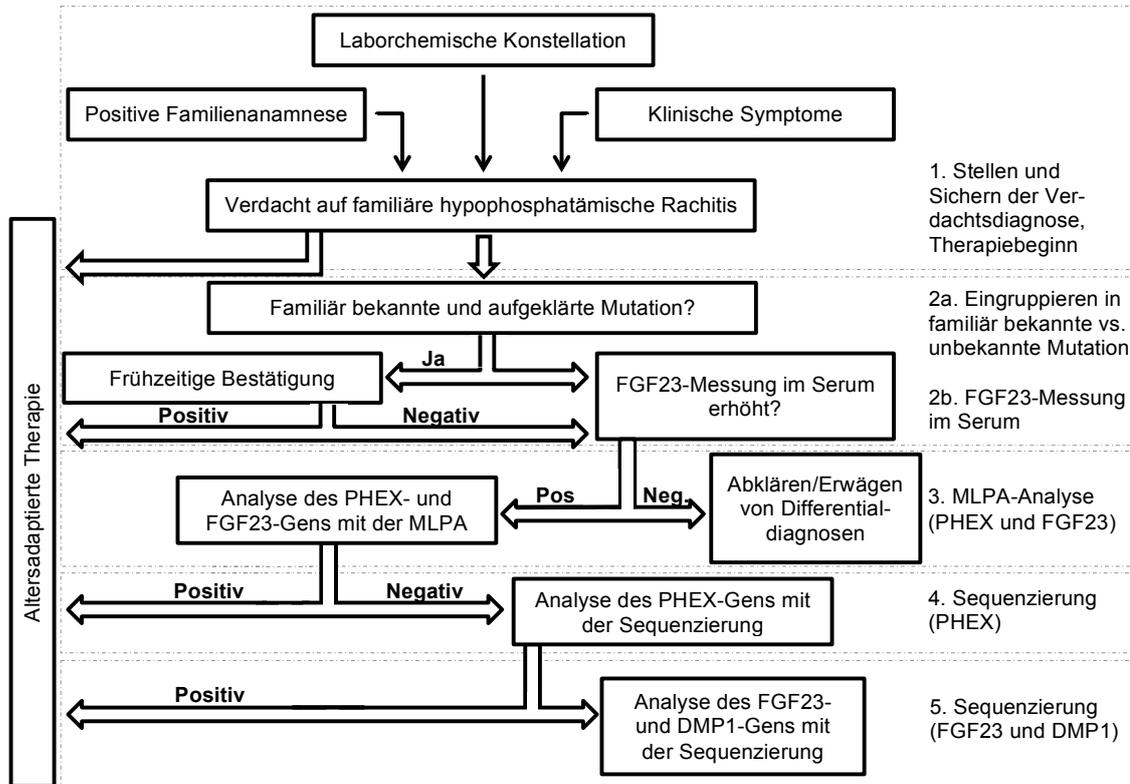


Abbildung 31: Algorithmus zur genetischen Diagnostik bei Verdacht auf hypophosphatämische Rachitis

1. Grundlage der Diagnose sind klinische, laborchemische und familienanamnestische Auffälligkeiten. Die Therapie wird ohne Mutationsnachweis begonnen. **2a.** Beim Vorliegen einer bekannten Mutation in einer betroffenen Familie wird ein Patient bereits vor dem Auftreten erster Symptome mittels Sequenzierung auf das Vorliegen dieser Mutation untersucht. **2b.** Bei negativer Untersuchung bzw. keiner familiären Mutation wird mithilfe einer FGF23-Analyse im Serum die Differentialdiagnose eingegrenzt. **3.** Bei erhöhtem FGF23-Spiegels erfolgt ein Screening mit der MLPA. **4.** Bei negativem Ergebnis erfolgt die Sequenzierung zunächst des PHEX-Gens. **5.** Im negativen Falle erfolgt die Sequenzierung des FGF23- und DMP1-Gens.

Da ein früher Therapiebeginn mit Phosphat und Rocaltrol entscheidend für die Ausbildung des Phänotyps und die Endgröße ist, wird diese unabhängig von der genetischen Untersuchung direkt nach der Diagnosestellung eingeleitet, im Verlauf dem Lebensalter angepasst und regelmäßig kontrolliert. Das diagnostische Vorgehen ist abhängig davon, ob eine familiäre Mutation vorliegt. Ist dieses der Fall, so schließt sich eine gezielte Untersuchung des betroffenen Gens an. Ist keine familiäre Mutation bekannt oder lässt sich diese nicht nachweisen, erfolgt eine Messung des FGF23-Proteins im Serum. Durch die Analyse des FGF23-Proteins im Serum soll die Anzahl an Fehldiagnosen und unnötigen Untersuchungen minimiert werden. Bei einem erhöhten FGF23-Wert erfolgt die genetische Untersuchung entsprechend der Wahrscheinlichkeit des betroffenen Gens und dem Kosten- bzw. Zeitaufwand für die Methode zunächst mit der MLPA-Methode. Bei unauffälligem MLPA-Ergebnis schließt

4. Diskussion

sich die Untersuchung des PHEX-Gens sowie ggf. des FGF23- und DMP1-Gens mit der Sequenzierung an.

Das Ziel ist das Auffinden familiärer Mutationen, wodurch die genetische Analyse erheblich vereinfacht wird und eine frühzeitige Therapie von Neugeborenen vor der Ausbildung von Knochen- und Dentindefekten sowie Minderwuchs und Beindeformitäten ermöglicht wird. Für den Patienten und seine Familie ist der größte Nutzen der genetischen Untersuchung in der humangenetischen Beratung zu sehen, die es ermöglicht, Geschwister oder eigene Kinder gezielt auf die entsprechende Mutation zu untersuchen.

Die Genetik stellt nur einen Faktor zum besseren Verständnis des Phosphatdiabetes und des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels dar. Das gemeinsame Betrachten des Genotyps im Zusammenhang mit dem Phänotyp, dem Therapieverlauf und den Komplikationen kann darüber hinaus einen Wissensgewinn bieten, der zu einer verbesserten Therapie führen kann. Ein Ansatz zur Erfassung dieser Daten wäre das Einführen einer Datenbank, in die nicht nur die Mutationen, sondern auch die relevanten klinischen und laborchemischen Parameter aufgenommen werden. Mit diesen Informationen könnte eine aussagekräftige statistische Auswertung und Korrelation zwischen der Lokalisation und der Art der Mutationen, dem Geschlecht sowie den familiären im Vergleich zu den sporadischen Fälle getroffen werden und prognostisch relevante Ergebnisse hervorbringen. Durch die Erforschung und Beschreibung von Mutationen und der klinischen Ausprägung kann man darüber hinaus langfristig auf ein besseres Verständnis des Calcium- und Phosphathaushalts und dessen Pathophysiologie hoffen. Durch die Erforschung der Grundlagen der Erkrankungen können langfristig neuartige Kenntnisse auf enzymatischer oder Protein-Ebene gewonnen werden und zur Entwicklung von Medikamenten führen, die den Krankheitsverlauf entscheidend beeinflussen könnten.

4. Diskussion

4.1 Ausblick

Für die Patienten ohne Mutationsnachweis ist die Reevaluation der Diagnose denkbar. Bei gesicherter Diagnose wäre als nächster Schritt die Untersuchung auf Mutationen in den nicht translatierten Bereichen wie den Introns, Promotoren oder 3'UTR-Regionen des PHEX-Gens sowie auf SNPs möglich. Nach dem Ausschluss der FGF-23-abhängigen, hereditären Ursachen könnte sich die Analyse des SLC34A3-Gens als Ursache einer HHRH anschließen. Für das PHEX-Gen wäre die Entwicklung eines „Next Generation Sequencing“-Panels denkbar, mit dem man zukünftig schnell sämtliche für die XLH ursächlichen Gene sequenzieren könnte.

Die heterozygote DMP1-Mutation ist interessant, da sie der aktuellen Auffassung der ARHR widerspricht und dennoch für das Krankheitsbild verantwortlich sein könnte. Mithilfe einer funktionellen Analyse des mutierten DMP1-Proteins, z.B. im Zellmodell mithilfe eines Plasmids mit der mutierten DMP1-Sequenz, könnte die Spaltung der mutierten gegenüber der Wildtypsequenz untersucht werden und eine Aussage über die Relevanz der DMP1-Mutation gegeben werden.

Zusammenfassung

Die Diagnose einer hypophosphatämischen Rachitis basiert zumeist auf einer typischen Symptomatik mit einer entsprechenden laborchemischen Konstellation und gegebenenfalls positiver Familienanamnese. Dem Krankheitsbild können verschiedene Ursachen zugrunde liegen, die sowohl hereditäre als auch erworbene Formen umfassen.

In dieser Studie wurden 57 Patienten mit der klinischen Diagnose einer hypophosphatämischer Rachitis unter Verwendung der Sequenzierungsmethode sowie der „Multiplex Ligation dependent Probe Amplification“ auf das Vorliegen der hereditären X-chromosomal dominanten, autosomal dominanten sowie autosomal rezessiven hypophosphatämische Rachitis untersucht.

Das „Phosphat regulierende Gen mit Homologien zu den Endopeptidasen auf dem X-Chromosom“ wies bei sechs Patienten einen Polymorphismus auf sowie 21 weitere Mutationen, die sowohl eine Duplikation, Substitutionen und Deletionen als auch eine Splice-Site-Mutation und eine putative Pseudoexon-Mutation im Intron umfassen. Im Gen des „Fibroblast growth factor 23“ konnte in zehn Fällen ein Polymorphismus identifiziert werden sowie eine Deletion, die jedoch nicht zu der autosomal dominanten hypophosphatämischen Rachitis zu führen scheint. Im Gen des „Dentin matrix protein 1“ konnte eine homozygote Deletion sowie eine Punktmutation gefunden werden, die entgegen der Erwartungen bei einer autosomal rezessiven Erkrankung heterozygot vorliegt.

Die Kombination der Sequenzierung mit der „Multiplex Ligation dependent Probe Amplification“ hat sich als positiv erwiesen und durch die Erweiterung des erfassbaren Mutationsspektrum eine hohe Methodensicherheit ergeben. Vor allem die Möglichkeit große Deletionen im PHEX-Gen zu detektieren hat im internationalen Vergleich eine überdurchschnittlich hohe Nachweisrate ergeben.

Aus der Betrachtung der Eingangskriterien und der Ergebnisse sowie dem Vergleich der Methoden hat sich ein Algorithmus ergeben, der in Zukunft die molekulargenetische Untersuchung bei der klinischen Diagnose einer hypophosphatämischen Rachitis erleichtern soll. Das Vorgehen richtet sich nach dem Vorhandensein einer familiär bekannten Mutation und beinhaltet neben den genannten Methoden eine Serummessung des Fibroblast growth factor 23. Das Ziel ist das Auffinden familiärer Mutationen, damit die Betroffenen eine humangenetische Beratung in Anspruch nehmen können und zukünftig Familienmitgliedern bereits im Säuglingsalter eine Diagnostik und Therapie mit einer besseren Langzeitprognose ermöglicht wird.

Literaturverzeichnis

- ADHR Consortium, The (2000). "Autosomal dominant hypophosphatemic rickets is associated with mutations in FGF23." *Nature Genetics* 26: 345-348.
- Alos N und Ecarot B (2005). "Downregulation of osteoblast PheX expression by PTH." *Bone* 37: 589-598.
- Bacic D, Lehir M, Biber J, Kaissling B, Murer H and Wagner CA (2006). "The renal Na⁺/phosphate cotransporter NaPi-IIa is internalized via the receptor-mediated endocytic route in response to parathyroid hormone." *Kidney International* 69; 495-503.
- Barthel TK, Mathern D, Whitfield GK, Haussler CA, Hopper IV. HA, Hsieh J, Slater SA, Hsieh G, Kaczmarek M, Jurutka PW, Kolek OI, Ghishan FK and Haussler MR (2007). "1,25-dihydroxyvitamin D₃/VDR-mediated induction of FGF23 as well as transcriptional control of other bone anabolic and catabolic genes that orchestrate the regulation of phosphate and calcium mineral metabolism." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 103: 381–388.
- Bastepe M und Jüppner H (2008). "Inherited hypophosphatemic disorders in children and the evolving mechanisms of phosphate regulation." *Review in Endocrine and Metabolic Disorders* 9(2):171-180.
- Baum M, Schiavi S, Dwarakanath V and Quigley R (2005). "Effect of fibroblast growth factor-23 on phosphate transport in proximal tubules." *Kidney International* 68: 1148-1153.
- Beck L, Karaplis AC, Amizuka N, Hewson AS, Ozawa H, and Tenenhouse HS (1998). "Targeted inactivation of NPT2 in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities." *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95(9):5372-5377.
- Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M, Sirkis R, Naveh-Many T and Silver J (2007). "The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats." *The Journal of Clinical Investigation* 117: 4003-4008.
- Benet-Pagès A, Lorenz-Depiereux B, Zischka H, White KE, Econs MJ and Strom TM (2004). "FGF23 is processed by proprotein convertases but not by PHEX." *Bone* 35: 455-462.
- Bergwitz C, Roslin NM, Tieder M, Loredó-Ostí JC, Bastepe M, Abu-Zahra H, Frappier D, Burkett K, Carpenter TO, Anderson D, Garabédian M, Sermet I, Fujiwara TM, Morgan K, Tenenhouse HS and Jüppner H (2006). "SLC34A3 mutations in patients with hereditary hypophosphatemia rickets with hypercalciuria predict a key role for the sodium-phosphate cotransporter NaPi-IIc in maintaining

- phosphate homeostasis." *The American Journal of Human Genetics* 78:179-192.
- Bergwitz C und Jüppner H (2010). "Regulation of phosphate homeostasis by PTH, Vitamin D, and FGF23." *Annual Review of Medicine* 61:91-104.
- Berndt T, Craig TA, Bowe AE, Vassiliadis J, Reczek D, Finnegan R, Jan De Beur SM, Schiavi SC and Kumar R (2003). "Secreted frizzled-related protein 4 is a potent tumor-derived phosphaturic agent." *Journal of Clinical Investigation* 112: 785–794.
- Berndt TJ, Schiavi S und Kumar R (2005). ""Phosphatonins" and the regulation of phosphorus homeostasis." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 289:F1170-F1182.
- Bowe AE, Finnegan R, Jan de Beur SM, Cho J, Levine MA, Kumar R und Schiavi SC (2001). "FGF23 inhibits renal tubular phosphate transport and is a Phex substrate." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 281(4):977-981.
- Boyce BF und Xing L (2007). "Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin." *Arthritis Research & Therapy* 9 Suppl 1:S1.
- Burnett SM, Gunawardene SC, Bringham FR, Jüppner H, Lee H and Finkelstein JS (2006). "Regulation of C-Terminal and Intact FGF-23 by Dietary Phosphate in Men and Women." *Journal of Bone and Mineral Research* 21(8):1187-96.
- Carpenter TO, Ellis BK, Insogna KL, Philbrick WM, Sterpka J and Shimkets R (2005). "Fibroblast growth factor 7: an inhibitor of phosphate transport derived from oncogenic osteomalacia-causing tumors." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90(2): 1012–1020.
- Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW, Topala CN, Bindels RJ, Hoenderop JG (2005). "The β -glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel." *Science* 310:490-493.
- Chaussin C, Eapen AS, Huet E, Floris C, Ravindram S, Hao J, Menashi S and George A (2009). "MMP2-cleavage of DMP1 generates a bioactive peptide promoting differentiation of dental pulp stem/progenitor cells." *European Cells and Materials* 18: 84-95.
- Cho HY, Lee BH, Kang JH, Ha IS, Cheong HI, und Choi Y (2005). "A Clinical and Molecular Genetic Study of Hypophosphatemic Rickets in Children." *Pediatric Research* 58(2): 329-333.
- Christakos S, Dhawan P, Peng X, Obukhov AG, Nowycky MC, Benn BS, Zhong Y and Shen Q: (2007). "New insights into the function and regulation of vitamin D

- target proteins." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 103(3-5): 405-410.
- Christie PT, Harding B, Nesbit MA, Whyte MP and Thakker RV (2001). "X-Linked Hypophosphatemia Attributable to Pseudoexons of the PHEX Gene." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86(8): 3840-3844.
- Custer M, Löttscher M, Biber J, Murer H and Kaissling B (1994). "Expression of Na-Pi cotransport in rat kidney: localization by RT-PCR and immunohistochemistry." *American Journal of Physiology* 266(5 Pt 2): F767-774.
- Dixon PH, Christie PT, Wooding C, Trump D, Grieff M, Holm I, Gertner JM, Schmidtke J, Shah B, Shaw N, Smith C, Tau C, Schlessinger D, Whyte MP and Thakker RV (1998). "Mutational Analysis of PHEX Gene in X-Linked Hypophosphatemia." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83(10):3615-3623.
- Dobbie H, Unwin RJ, Faria NJR and Shirley DG (2008). "Matrix extracellular phosphoglycoprotein causes phosphaturia in rats inhibiting tubular phosphate reabsorption." *Nephrology Dialysis Transplantation* 23:730-733.
- Econs MJ und Drezner MK (1994). "Tumor-induced osteomalacia - unveiling a new hormone." *The New England Journal of Medicine* 330: 1679-81.
- Econs MJ und McEnery PT (1997). "Autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia: clinical characterization of a novel renal phosphate-wasting-disorder." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82(2):674-681.
- Farrow EG, Davis SI, Ward LM, Summers LM, Bubbear JS, Keen R, Stamp TCB, Baker LRI, Bonewald LF and White KE (2009). "Molecular Analysis of DMP1 Mutants Causing Autosomal Recessive Hypophosphatemic Rickets." *Bone* 44(2):287-294.
- Felgenhauer S, Med. Diss. Lübeck (2005). "Molekulargenetische Untersuchungen bei Patienten mit X-chromosomal dominanter hypophosphatämischer Rachitis."
- Feng JQ, Zhan J, Dallas SL, Lu Y, Chen S, Tan X, Owen M, Harris SE and MacDougall (2002). "Dentin matrix protein 1, a target molecule for Cbfa1 in bone, is a unique bone marker gene." *Journal of bone and mineral research* 17(19):1822-1831.
- Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, Yu X, Rauch F, Davis SI, Zhang S, Rios H, Drezner MK, Quarles LD, Bonewald LF and White KE (2006). "Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism." *Nature Genetics* 38(11): 1310-1315.

Literaturverzeichnis

- Francis F, Strom TM, Henning S, Böddrich A, Lorenz B, Brandau O, Mohnike KL, Cagnoli M, Steffens C, Klages S, Borzym K, Pohl T, Oudet C, Econs MJ, Rowe PSN, Reinhardt R, Meitinger T and Lehrach H (1997). "Genomic Organization of the Human PEX Gene Mutated in X-Linked Dominant Hypophosphatemic Rickets." *Genome Research* 7:573-585.
- Galitzer H, Ben-Dov I, Lavi-Moshayoff V, Naveh-Many T and Silver J (2008). "Fibroblast growth factor 23 acts on the parathyroid to decrease parathyroid hormone secretion." *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 17:363-367.
- Gaucher C, Walrant-Debray O, Nguyen TM, Esterle L, Garabédian M, Jehan F (2009). "PHEX analysis in 118 pedigrees reveals new genetic clues in hypophosphatemic rickets." *Human Genetics* 125:401-411.
- George A, Ramachandran A, Albazzaz M, Ravindran S (2007). "DMP1 - a kex regulator in mineralized matrix formation." *The Journal of mucuskeletal and neuronal interactions* 7(4):308.
- Goji K, Ozaki K, Sadewa AH, Nishio H and Matsuo M (2006). "Somatic and germline mosaicism for a mutation of the PHEX gene can lead to genetic transmission of X-Linked Hypophosphatemic Rickets that mimics an autosomal dominant trait." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91(2): 365-370.
- Haffner D, Nissel R, Wühl E and Mehls O (2004). "Effects of growth hormone treatment on body proportions and final height among small children with X-linked hypophosphatemic rickets." *Pediatrics* 113(6): e593-596.
- Hernando N, Biber J, Forster I and Murer H (2005). "Recent advances in renal phosphate transport." *Therapeutical Apheresis and Dialysis* 9(4): 323-327.
- Hines ER, Collins JF, Jones MD, Serey SH and Ghishan FK (2002). "Glucocorticoid regulation of the murine PHEX gene." *American Journal of Physiology, Renal Physiology* 283: F356-363.
- Hines ER, Kolek OI, Jones MD, Serey SH, Sirjani NB, Kiela PR, Jurutka PW, Haussler MR, Collins JF and Ghishan FK (2004). "1,25-dihydroxyvitamin D₃ down-regulation of PHEX gene expression is mediated by apparent repression of a 110 kDa transfactor that binds to a polyadenine element in the promoter." *The Journal of Biological Chemistry* 279(45): 46406-46414.
- Hoenderop JGJ, Müller D, Van der Kemp AWCM, Hartog A, Suzuki M, Ishibashi K, Imai M, Sweep F, Willems PHGM, Van Os CH und Bindels RJM (2001). "Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney." *Journal of the American Society of Nephrology* 12:1342-1349.
- Hoenderop JGJ, Nilius B und Bindels RJM (2005). "Calcium absorption across epithelia." *Physiological Reviews* 85:373-433.

Literaturverzeichnis

- Holm IA, Nelson AE, Robinson BG, Mason RS, Marsh DJ, Cowell CT and Carpenter TO (2001). "Mutational Analysis and Genotype-Phenotype Correlation of the PHEX Gene in X-Linked Hypophosphatemic Rickets." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86(8):3889-3899.
- HYP Consortium, The (1995). "A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets." *Nature Genetics* 11: 130-136.
- Hu CM, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, Razzaque MS, Rosenblatt KP, Baum MG, Kuro-o M and Moe OW (2010). "Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule." *The Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB)* 24: 3438-50.
- Imel EA, Hui SL and Econs MJ (2007). "FGF23 concentrations vary with disease status in autosomal dominant hypophosphatemic rickets." *Journal of Bone and Mineral Research* 4(22): 520-526.
- Jurutka PW, Bartik L, Whitfield GK, Mathern DR, Barthel TK, Gurevich M, Shieh J, Kazmarska M, Haussler CA und Haussler MR (2007). "Vitamin D receptor: key roles in bone mineral pathophysiology, molecular mechanism of action, and novel nutritional ligands." *Journal of bone and mineral research* 22 Suppl 2:V2-10.
- Kato K, Jeanne C, Tarp MA, Benet-Pagès A, Lorenz-Depiereux B, Bennett EP, Mandel U, Strom TM and Clausen H (2006). "Polypeptide GalNAc-transferase T3 and familial tumoral calcinosis; Secretion of fibroblast growth factor 23 requires O-glycosylation." *The Journal of Biological Chemistry* 281(27): 18370-18377.
- Kiela PR und Ghishan FK (2009). "Recent advances in the renal-skeletal-gut axis that controls phosphate homeostasis." *Laboratory Investigation* 89: 7-14.
- Kim MS, Fujiki R, Murayama A, Kitagawa H, Yamoaka K, Yamamoto Y, Mihara M, Takeyama K and Kato S (2007). " $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced transpression by vitamin D receptor through E-box-type elements in the human parathyroid hormone gene promoter." *Molecular Endocrinology* 21(2): 334-342.
- Koshida R, Yameguchi H, Yamasaki K, Tsuchimochi W, Yonekawa T, Nakazato M (2010). "A novel nonsense mutation in the DMP1 gene in a Japanese family with autosomal recessive hypophosphatemic rickets." *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 28:585-590.
- Krajisnik T, Björklund P, Marsell R, Ljunggren Ö, Åkerström G, Jonsson KB, Westin G and Larsson TE (2007). "Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid

- hormone and 1 α -hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells." *Journal of Endocrinology* 195: 125-131.
- Kruse K, Woelfel D, Strom TM (2001). "Loss of renal phosphate wasting in a child with autosomal dominant hypophosphatemic rickets caused by a FGF23 mutation." *Hormone Research in Paediatrics* 55(6):305-8.
- Kuro-o M (2011). "Klotho and the Aging Process." *The Korean Journal of Internal Medicine* 26(2):113-122.
- Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OW, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn R, Rosenblatt KP, Kuro-o M (2005). "Suppression of aging in mice by the hormone klotho." *Science* 309:1829-1833.
- Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu MC, Moe OW and Kuro-o M (2006). "Regulation of Fibroblast Growth Factor 23 Signaling by Klotho." *The Journal of Biological Chemistry and Molecular Biology* 281(10): 6120-6123.
- Larsson T, Marsell R, Schipani E, Ohlsson C, Ljunggren Ö, Tenenhouse HS, Jüppner H and Jonsson KB (2004). "Transgenic Mice Expressing Fibroblast Growth Factor 23 under the Control of the α 1(I) Collagen Promoter Exhibit Growth Retardation, Osteomalacia, and Disturbed Phosphate Homeostasis." *Endocrinology* 145: 3087-3094.
- Liu S, Guo R, Simpson LG, Xiao Z, Burnham CE and Quarles D (2003). "Regulation of Fibroblastic Growth Factor 23 Expression but Not Degradation by PHEX." *The Journal of Biological Chemistry* 278(26):37419-37428.
- Liu S, Zhou J, Tang W, Jiang X, Rowe DW and Quarles LD (2006a). "Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice." *American Journal of Physiology, Renal Physiology* 291: E38–E49.
- Liu S, Tang W, Zhou J, Stubbs JR, Luo Q, Pi M and Quarles (2006b). "Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D." *Journal of the American Society of Nephrology* 17: 1305-1315.
- Liu S, Rowe PSN, Vierthaler L, Zhou J and Quarles LD (2007). "Phosphorylated acidic serine-aspartate-rich MEPE-associated motif peptide from matrix extracellular phosphoglycoprotein inhibits phosphate regulating gene with homologies to entopeptidases on the X-chromosome enzyme activity." *Journal of Endocrinology* 192: 261-267.
- Lorenz-Deperieux B, Bastepe M, Benet-Pagès A, Amyere M, Wagenstaller J, Müller-Barth U, Badenhop K, Kaiser SM, Rittmaster RS, Shlossberg AH, Olivares JL, Loris C, Ramos FJ, Glorieux JL, Vikkula M, Jüppner H and Strom T (2006).

- "DMP1 mutations in autosomal recessive hypophosphatemia implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis." *Nature Genetics* 38(11):1248-1250.
- Lu Y, Qin C, Xie Y, Bonewald LF, Feng JQ (2008). "Studies of the DMP1 57-kDa Functional Domain both in vivo and in vitro." *Cells Tissues Organs* 189: 175-185.
- Madjdpour C, Bacic D, Kaissling B, Murer H, Biber J (2004). "Segment-specific expression of sodium-phosphate cotransporters NaPi-IIa and -IIc and interacting proteins in mouse renal proximal tubules." *European Journal of Physiology* 448: 402-410.
- Martin A, David V, Laurence JS, Schwarz PM, Lafer EM, Hedge A and Rowe PS (2008). "Degradation of MEPE, DMP1, and Release of SIBLING ASARM-Peptides (Minhibins): ASARM-Peptide(s) Are Directly Responsible for Defective Mineralization in HYP." *Endocrinology* 149(4): 1757-1772.
- Martin A, Liu S, David V, Li H, Karydis A, Feng JQ and Quarles LD (2011). "Bone proteins PHEX and DMP1 regulate fibroblastic growth factor Fgf23 expression in osteocytes through a common pathway involving FGF receptor (FGFR) signaling." *The Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Journal* 25: 1-12.
- Miyamoto K, Ito M, Kuwahata M, Kato S and Segawa H (2005). "Inhibition of Intestinal Sodium-dependent Inorganic Phosphate Transport by Fibroblast Growth Factor 23." *Therapeutic Apheresis and Dialysis* 9(4):331–335.
- Murer H, Hernando N, Forster I and Biber J (2003). "Regulation of Na/Pi transporter in the proximal tubule." *Annual Review of Physiology* 65: 531-542.
- Narayanan K, Ramachandran A, Hao J, He G, Park KW, Cho M and George A (2003). "Dual functional roles of dentin matrix protein 1. Implications in biomineralization and gene transcription by activation of intracellular Ca²⁺ store." *The Journal of Biological Chemistry* 278(19): 17500-17508.
- Perez AV, Picotto G, Carpentieri AR, Rivoira MA, Peralta López ME, Tolosa de Talamoni NG (2008). "Minireview on regulation of intestinal calcium absorption. Emphasis on molecular mechanisms of transcellular pathway." *Digestion* 77: 22-34.
- Perwad F, Zhang MY, Tenenhouse HS and Portale AA (2007). "Fibroblast growth factor 23 impairs phosphorus and vitamin D metabolism in vivo and suppresses 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase expression in vitro." *American Journal of Physiology, Renal Physiology* 293: F1577–F1583.

Literaturverzeichnis

- Qin C, Brunn JC, Cook RG, Orkiszewski RS, Malone JP, Veis A and Butler WT (2003). "Evidence for the proteolytic processing of dentin matrix protein 1. Identification and characterization of processed fragments and cleavage sites." *Journal of Biological Chemistry* 278(36): 34700-34708.
- Qin C, Baba O, Butler WT (2004). "Post-translational modifications of SIBLING proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis." *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 15(3):126-136.
- Qin C, Huang B, Wygant JN, McIntyre BW, McDonald CH, Cook RG and Butler WT (2006). "A Chondroitin Sulfate Chain Attached to the Bone Dentin Matrix Protein 1 NH₂-Terminal Fragment." *The Journal of Biological Chemistry* 281(12) 8034-8040.
- Qin C, D'Souza R and Feng JQ (2007). "Dentin Matrix Protein (DMP1): New and Important Roles for Biomineralization and Phosphate Homeostasis." *Journal of Dental Research* 86(12): 1134-1141.
- Quarles LD (2008). "Endocrine functions of the bone in mineral metabolism regulation." *The Journal of Clinical Investigation* 118(12): 3820-3828.
- Razzaque MS und Lanske B (2007). "The emerging role of the fibroblast growth factor-23-klotho axis in renal regulation of phosphate homeostasis." *Journal of Endocrinology* 194(1):1-10.
- Razzaque MS (2009). "FGF23-mediated regulation of systemic phosphate homeostasis: is Klotho an essential player?" *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 296: F470-F476.
- Rowe PSN, de Zoysa PA, Dong R, Wang HR, White KE, Econs MJ and Oudet CL (2000). "MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia." *Genomics* 67: 54-68.
- Rowe PSN, Kumagai Y, Gutierrez G, Garrett IR, Blacher R, Rosen D, Cundy J, Navvab S, Chen D, Drezner MK, Quarles LD and Mundy GR (2004a). "MEPE has the properties of an osteoblastic phosphatonin and inhibitor." *Bone* 34: 303-319.
- Rowe PSN (2004b). "The wrinkled pathways of FGF23, MEPE and PHEX." *Critical reviews in oral biology and medicine* 15(5): 264-281.
- Sabbagh Y, Jones AO and Tenenhouse HS (2000). "PHEXdb, a Locus-Specific Database for Mutations Causing X-Linked Hypophosphatemia." *Human Mutation* 16:1-6.
- Sabbagh Y, O'Brien SP, Song W, Boulanger JH, Stockmann A, Arbeeny C and Schiavi SC (2009). "Intestinal Npt2b plays a major role in phosphate absorption and homeostasis." *Journal of American Society of Nephrology* 20:2348-2358.

- Segawa H, Kaneko I, Takahashi A, Kuwahata M, Ito M, Ohkido I, Tatsumi S and Miyamoto K (2002). "Growth-related renal type II Na/Pi cotransporter." *The Journal of Biological Chemistry* 277(22): 19665-19672.
- Segawa H, Yamanaka S, Onitsuka A, Tomoe Y, Kuwahata M, Ito M, Taketani Y and Miyamoto K (2007). "Parathyroid hormone-dependent endocytosis of renal type IIc Na-P_i cotransporter." *American Journal of Physiology, Renal Physiology* 292: F395–F403.
- Shaikh A, Berndt T, Kumar R (2008). "Regulation of phosphate homeostasis by the phosphatonins and other novel mediators." *Pediatric Nephrology* 23(8): 1203–1210.
- Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S and Yamashita T (2001). "Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia." *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.* 98(11):6500-6505.
- Shimada T, Muto T, Urakawa I, Yoneya T, Yamazaki Y, Okawa K, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S und Yamashita T (2002). "Mutant FGF-23 responsible for autosomal dominant hypophosphatemic rickets is resistant to proteolytic cleavage and causes hypophosphatemia in vivo." *Endocrinology* 143(8):3179-3182.
- Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukomoto S and Yamashita T (2004). "FGF-23 is a Potent Regulator of Vitamin D Metabolism and Phosphate Homeostasis." *Journal of Bone and Mineral Research* 19: 429–435.
- Song Y, Peng X, Porta A, Takanga H, Peng J, Hediger MA, Fleet JC und Christakos S (2003). "Calcium transporter 1 and epithelial calcium channel messenger ribonucleic acid are differentially regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the intestine and kidney of mice." *Endocrinology* 144(9): 3885-3894.
- Song HR, Park JW, Cho DY, Yang JH, Yoon HR, Jung SC (2007). "PHEX Gene Mutations and Genotype-Phenotype Analysis of Korean Patients with Hypophosphatemic Rickets." *Journal of Korean Medical Science* 22:981-6.
- Steiglitz BM, Yala M, Narayanan K, George A and Greenspan DS (2004). "Bone morphogenetic protein-1/Tolloid-like proproteinases process dentin matrix protein-1." *The Journal of Biological Chemistry* 279(2):980-986.
- Strom TM und Lorenz-Depieruex B "Genetik der XLH". In: Ganten D, Ruckpaul P, OE Janssen, AE Heufelder (2001): "Molekularmedizinische Grundlagen von Endokrinopathien". Springer Verlag, Berlin. S. 373.

Literaturverzeichnis

- Takeyama K und Kato S (2011). "The Vitamin D3 1alpha-hydroxylase gene and its regulation by active vitamin D3." *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*. 75(2); 208-213.
- Taylor JG und Bushinsky D (2009). "Calcium and Phosphorus Homeostasis." *Blood Purification* 27:387-394.
- Turan S, Aydin C, Bereket A, Akcay T, Güran T, Yaralioglu BA, Bastepe M and Jüppner H (2010). "Identification of a novel dentin matrix protein-1 (DMP-1) mutation and dental abnormalities in a kindred with autosomal recessive hypophosphatemia." *Bone* 46(2):402-409.
- Tyynisma H, Kaitila I, Näntö-Salonen K, Ala-Houhala M and Alitalo T (2000). "Identification of Fifteen Novel PHEX Gene Mutations in Finnish Patients with Hypophosphatemic Rickets." *Human Mutation* 15(4):383-384.
- Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S and Yamashita T (2006). "Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23." *Nature* 444: 770–774.
- Van Abel M, Hoenderop JGJ, Bindels RJM (2005). "The epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6: regulation and implications for disease." *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 371(4):295-306.
- Vargas MA, St-Louis M, Desgroseillers L, Charli J-L and Boileau G (2003). "Parathyroid hormone-related protein (1–34) regulates PheX expression in osteoblasts through the protein kinase A pathway." *Endocrinology* 144(11): 4876-4885.
- White KE, Carn G, Lorenz-Deperieux B, Benet-Pages A, Strom TM and Econs MJ (2001). "Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF-23." *Kidney International* 60: 2079-2086.
- White KE, Cabral JM, Davis SI, Fishburn T, Evans WE, Ichikawa S, Fields J, Yu X, Shaw NJ, McLellan NJ, McKeown C, FitzPatrick D, Yu K, Ornitz DM and Econs MJ (2005). "Mutations that cause osteoglophonic dysplasia define novel roles for FGFR1 in bone elongation." *The American Journal of Human Genetics* 76:361-367.
- Whyte MP, Schranck FW and Armamento-Villareal R (1996). "X-linked hypophosphatemia: a search for gender, race, anticipation, or parent of origin effects on disease expression in children." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81(11):4075-4080.
- Xu H, Bai L, Collins JF und Ghishan FK (2002). "Age-dependent regulation of rat intestinal type IIb sodium-phosphate cotransporter by 1,25(OH)₂ vitamin D₃." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 282; C487-C493.

Literaturverzeichnis

Živičnjak M, Schnabel D, Staude H, Even G, Marx M, Beetz R, Holder M, Billing H, Fischer D-C, Rabl W, Schumacher M, Hiort O und Haffner D (2011).

"Hypophosphatmic Rickets: Effects on Linear Growth and Body Disproportion."

The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 96(12): E2097-2105.

Zoidis E, Gosteli-Peter M, Ghirlanda-Keller C, Zapf J and Schmid C (2002). "IGF-I and GH stimulate Phex mRNA expression in lungs and bones and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ production in hypophysectomized rats." European Journal of Endocrinology 146: 97-105.

Anhang

a. Tabellen

Tabelle A1: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Mutationsanalyse im FGF23-, PHEX- und DMP1-Gen sowie klinischer Daten der Patienten dieser Arbeit

	Klinische Daten	FGF23 (Ref.seq. NM_020 638.2)	PHEX (Ref.seq NM_000444.4 bzw. NG_007563.1)	DMP1 (Ref.seq. NM_004 407.3)
P10, m	FA: positiv ; NC: keine Datensatz 1 : Alter 0,18 LJ, Länge 59,5cm Perz. 0,79, AP 930 U/l (Norm 90-520), P i.S. 1,19 mmol/l (Norm 1,20-2,35) Datensatz 2 : Alter 10,94 LJ , Länge 134cm, Perz 59,07, AP 371 U/l (Norm 50-480), P i.S. 0,68mmol/l (Norm 0,90-1,75)	Negativ	c.1853T>G, p.M618R (Exon 18, homozygot)	
P15, w	FA : neg Datensatz 1: 3,11LJ, 88cm, 1,83Perz, P i.S. 1,10 mmol/l (Norm 1,05-2,00), AP 432 U/l (Norm 80-450) Datensatz 2: 17,91 LJ, 152,5cm, 0,01Perz, P i.S. 0,38 mmol/l (Norm 0,85-1,45), AP 134 U/l (Norm 38-145)	Negativ	c.871 C>T, p.R291X (Exon 8, heterozygot)	
P20, w	FA : fraglich positiv Datensatz 1 : 3,05 LJ, 91cm, 11,03 Perz., P i.S. 1,10 mmol/l (Norm 1,05-2,00), AP 775 U/l (Norm 80-450) Datensatz 2 : 15,19LJ, 147,5cm, P i.S. 0,86 mmol/l (Norm 0,85-1,45), AP 203 U/l (Norm 38-145) NC neg	Negativ	c.1769-10 C>T* (Exon 18, SNP)	
P21, m	Datensatz 1 : 4,65LJ, 101,8cm, 6,32 Perz, P i.S. 1,26 mmol/l (Norm 1,05-2,00), AP 496 U/l (Norm 80-450) Datensatz 2 : 13,18LJ, 151,1cm, 13,51 Perz, P i.S. 1,1 mmol/l (Norm 0,90-1,75), AP 1410 U/l (Norm 50-480)	Negativ		
P42, w	FA negativ Datensatz 1 : Geburtstag, 54cm,0,87 Perz, Datensatz 2 : 3LJ, 83cm, Perz 0,08, P i.S. 1,30 mmol/l (Norm 1,05-2,00), AP 1230 U/l (Norm 80-450)	Negativ		
P48, w	k.A.	Negativ	Deletion Exon 7	
P50, m	Datensatz : 3,37LJ, P i.S. 1,42 mmol/l (Norm 1,05-2,00), AP 422 U/l (Norm 80-450)	c.716C> T, p.T239M * (Exon 3, SNP)		
P63, w	Datensatz 1 : 4,59LJ, 99,10cm, 2,99 Perz, AP 945 U/l (Norm 80-450) Datensatz 2 : 13,99LJ, 154cm, 9,84Perz,	c.716C> T, p.T239M * (Exon 3, SNP)	c.2148-10C>A (Intron 21, heterozygot); c.1769-10 C>T* (Exon 18, SNP)	
P70, m	FA pos Datensatz 1 : Geb, 51cm, 0,36 Perz, Datensatz 2 : 10,75LJ, 122cm, 0,07 Perz	Negativ	c.61dupA, p.I21NfsX30	
P78, w	k.A.	Negativ	Deletion E xon 1-9	
P85, m	k.A.	c.716C> T, p.T239M * (Exon 3, SNP)		
P88, m	FA neg Datensatz 1 : 2,25Lj. 75,5cm, Perz 0,0, P i.S. 1,06 mmol/l (Norm 1,05-2,00), AP 386 U/l (Norm 80-450) Datensatz 2 : 9,03LJ, 129,6cm, Perz 12,99, P i.S. 0,99 mmol/l (Norm 0,90-1,75), AP 539 U/l (Norm 50-480)	c.716C> T, p.T239M * (Exon 3, SNP)	c.1769-10 C>T* (Exon 18, SNP)	

Anhang

P89, w	k.A.	Negativ	Deletion Exon 13-22	
P96	k.A.	c.716C>T, p.T239M* (Exon 3, SNP)		
P106, w	k.A.	c.716C>T, p.T239M* (Exon 3, SNP)	Deletion Exon 17-19	
P109, m	Datensatz 1 : 3,89 LJ, 92cm, 0,47 Perz, P i.S. 0,92 mmol/l (Norm 2,05-2,00), AP 803 U/l (Norm 80-450) Datensatz 2 : 17,91LJ, 157,6cm, 0,04Perz., P i.S. 0,80 mmol/l (Norm 0,85-1,45), AP 333 U/l (Norm 44-155)	Negativ	Deletion Exon 11	
P113, w	FA pos Datensatz 1 : 0,53LJ, 66cm, 39,03Perz, P i.S. 1,06 mmol/l (Norm 1,20-2,35), AP 882 U/l (Norm 100-600) Datensatz 2 : 6,83 LJ, 114,2cm, 5,55Perz, P i.S. 0,65 mmol/l (Norm 0,90-1,75), AP 452 U/l (Norm 80-450)	c.716C>T, p.T239M* (Exon 3, SNP)	c.1645+1G>A (Intron15, heterozygot)	
P115, m	FA negativ Datensatz 1 : 11,64LJ, 135cm, 2,83 Perz, P i.S. 0,89 mmol/l (Norm 0,90-1,75) Datensatz 2 : 18,0 LJ, 167,2cm, 2,42 Perz, P i.S. 0,82 mmol/l (Norm 0,85-1,45), Ap 408 U/l (Norm 44-155)	Negativ		c.31delT ,p.W11GfsX9 (Exon 2, homozygot)
P116, m	FA fraglich positiv (Hypophosphatämie Mutter) Datensatz 1 : 1,5LJ, 72,5cm, 0,07 Perz, P i.S. 0,76 mmol/l (Norm 1,05-2,00), AP 2370 U/l (Norm 90-530) Letzt) 5,89 LJ, 104,4cm, 0,32 Perz, P i.S. 0,94 mmol/l (Norm 0,90-1,75), AP 450 U/l (Norm 80-450)	Negativ		
P127,w	FA pos Datensatz 1 : 0,62 LJ, 70,7cm, 79,5 Perz, P i.S. 1,68 mmol/l (Norm 1,20-2,35), AP 750 U/l (Norm 100-600) Datensatz 2 : 13,66Lj, 154,2cm, Perz 13,56, P i.S. 1,92 mmol/l (Norm 0,90-1,75), AP 89 U/l (Norm 40-370)	c.716C>T, p.T239M* (Exon 3, SNP)	Deletion Exon 1-5	
P128, m	k.a.	Negativ	c.1700G>C, p.R567P (Exon 16, homozygot)	
P132 (=P41), w	Datensatz 1 : 1,91LJ, 77,5cm, Perz ???, P i.S. 1,00 mmol/l (Norm 1,05-2,0), AP 1160 U/l (Norm 90-530) (vor Therapie) Datensatz 2 : 10,3LJ, 138,1cm, 24,42 Perz, P i.S. 0,87 mmol/l (Norm 0,90-1,75), 460 U/l (Norm 40-370)	Negativ	c.1769-10 C>T* (Exon 18, SNP)	
P135, m	k.a.	Negativ	c.1A>G, p.M1V (Exon 1, homozygot)	
P141, m	FA pos (Mutter) Datensatz 1 : 0,46 LJ, 63cm, 0,11 Perz, P i.S. 1,00 mmol/l (Norm 1,20-2,35), AP 995 U/l (Norm 100-600) Datensatz 2 : 2,83 LJ, 86cm, 0,93 PErz, P i.S. 0,89 mmol/l (Norm 1,05-2,00), AP 402 U/l (Norm 80-450)	Negativ	Deletion Exon 12	
P142, w	Datensatz 1 : 6,5LJ, 104,3cm, 0,07Perz Datensatz 2 : 10,86LJ, 127cm, 0,38 Perz, P i.S. 0,81 mmol/l (Norm 0,90-1,75), AP 644 U/l (Norm 40-370)	Negativ	c.1769-10 C>T* (Exon 18, SNP)	
P145, w	k.a.	Negativ	Deletion Exon 1	
P148, w	k.a.	Negativ		
P150, ?	k.a.	Negativ	Deletion Exon 9	
P178,m	FA positiv k.a.	Negativ		
P181, w	k.a.			c.475C>A p.Q159K

Anhang

				(Exon 6, heterozygot)
P183, w	FA neg Datensatz 1 : 2,48LJ, 87,4cm, 17,26Perz, P i.S. 0,77 mmol/l (Norm 1,05-2,0), AP 1158 U/l (Norm 80-450) Datensatz 2 : 9LJ, 125cm, 4,36 Perz, P i.S. 0,98 mmol/l (Norm 0,9-1,75), AP 495 U/l (Norm 40-370)	Negativ	c.1158G>A, p.W386X (Exon 10, heterozygot); c.1769-10 C>T* (Exon 18, SNP)	
P185, w	Datensatz 1 : Geb. 52cm, 0,60 Perz Datensatz 2 : 7,03LJ, 110cm, 0,54 Perz	Negativ		
P186, w	FA pos (Vater) Datensatz 1 : 0,11LJ, 51cm, 0,07 Perz, P i.S. 1,62 mmol/l (Norm 1,20-2,35), AP 768 U/l (Norm 90-520) Datensatz 2 : 15,03 LJ, 160,3cm, 23,72 Perz, P i.S. 0,84 mmol/l (Norm 0,85-1,45), AP 96 U/l (Norm 38-145)	Negativ	c.2040C>A, p.N680K (Exon 20, heterozygot)	
P189, m	FA pos Vater Datensatz 1 : 13,59 LJ, 139cm, 0,07 Perz, AP 408 U/l (Norm 40-370) Datensatz 2 : 15,01LJ, P i.S. 0,90 (Norm 0,85-1,45), AP 403 U/l (Norm 38-145)	Negativ	c.1862A>C, p.Q621P (Exon 18, heterozygot)	
USA 1	k.a.			
USA 2	k.a.			
USA 3	k.a.			
USA 4	k.a.			
USA 5	k.a.			
USA 6	k.a.			
USA 7	k.a.			
USA8	k.a.	c.716C>T, p.T239M* (Exon 3, SNP)		
USA9	k.a.	c.716C>T, p.T239M* (Exon 3, SNP)		
USA10	k.a.	Negativ	Deletion Exon 3b	
USA 11	k.a.			
USA 12	k.a.			
USA 13	k.a.			
USA 14	k.a.			
P84, m	k.A.			
P133, m	Datensatz 1 : Geb, 52cm, 0,52 Perz Datensatz 2 : 7,52LJ, 114,6cm, 0,0 Perz			
P52, ?	k.a.			
P105, w	k.a.			
P187, w	Datensatz 1 : 2,24LJ, 83 cm, 5,36 Perz, P i.S. 0,70 mmol/l (Norm 1,05-2,0), AP 737 U/l (Norm 80-450) Datensatz 2 : 4,06LJ, 93cm, 0,65 Perz, P i.S. 0,8 mmol/l (Norm 1,05-2,00), AP 380 U/l (Norm 80-450)			
P87, w	k.a.			
P86, w	k.a.			
P79, w	k.a.	c.568del C, L190X		
P146, m	k.a.			

Bei dem Datensatz 1 handelt es sich um Daten bei der Erstvorstellung bzw. einer der ersten Vorstellungen. Der Datensatz 2 beinhaltet die Informationen des letzten Termins bzw. den umfangreichsten Datensatz einer der letzten Termine. *Polymorphismus.

Tabelle A2: Verwendete Geräte

Verwendetes Gerät	Hersteller/Bezugsquelle
Elektrophoresekammer und -schlitten	Whatman Biometra, Göttingen
Elektrophoresespannungsgerät	Micro-Bio-Tec, Brand
Fotodrucker Digital Graphic Printer	Sony
Kamera CellCam Mega	Phase GmbH, Lübeck
Mastercycler gradient	Eppendorf
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt/Greiner bio-one
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Thermomixer 5436	Eppendorf
Thermocycler PTC 200	MJ Research
UV-Illuminator	Phase GmbH, Lübeck
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Zentrifuge Mikrozentrifuge 1-15	Sigma
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf
4-Kapillarsequenzierer 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
4-Kapillarsequenzierer 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
96 well Reaction Plate	Applied Biosystems

Tabelle A3: Verwendete Software

Software	Hersteller/Bezugsquelle	Funktion
Sequencing Analysis 5.2	Applied Biosystems	Sequenzanalyse und Basecalling
SeqScape v.2.5	Applied Biosystems	Alignment und Mutationsdetektion
Gene Mapper v.40	Applied Biosystems	Fragmentlängenanalyse
Coffalyser	MRC Holland	MLPA-Analyse

Tabelle A4: Erworbene Kits, Reagenzien und Chemikalien

Verwendetes Material	Hersteller/Bezugsquelle
Agarose	Roth
AmpliTaq DNA Polymerase kit	Applied Biosystems
BigDye Terminator v3.1 Sequencing Kit	Applied Biosystems
Borsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethidiumbromidlösung 1 % (10 mg/ml)	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe
Glycerol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
φ x174 DNA HAE III Digest Marker	New England Biolabs Inc
HiDi-Formamid	Applied Biosystems
HotStarTaq Plus Mastermix kit	Qiagen
Ethanol 100%	Merck
Exonuklease I (20U/μl)	Fermentas
QiaAmp DNA Blood MaxiKit	Qiagen
SALSA MLPA kit 223 PHEX	MRC Holland
Shrimp Alkaline Phosphatase (1U/μl)	Fermentas
Trishydroxymethylaminomethan	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
100bp Marker	New England Biolabs Inc

Tabelle A5: 2%-Agarose-Gel

Material	Menge
Agarose	2,0 g
1xTBE	100ml

Tabelle A6: Agarosegel-Färbelösung (2 μg/ml)

Material	Menge
Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg EtBr / ml Aqua bidest.)	50 μl
Aqua bidest	250 ml

Anhang

Tabelle A7: 10x TBE Puffer (pH 8,3, Lagerung bei Raumtemperatur)

Material	Menge
Tris	436 g
Borsäure	223 g
Na ₂ - EDTA	37,2 g
H ₂ O bidest	4l

Tabelle A8: 1x TBE Puffer (pH 7,4; Lagerung bei Raumtemperatur)

Material	Menge
10x TBE Puffer	100 ml
H ₂ O bidest	900 ml

Tabelle A9: Loadingpuffer III (Lagerung bei 4°C)

Material	Menge
Aqua bidest	600 µl
Glycerin	300 µl
Bromphenolblau	100 µl

Tabelle A10: dNTP's (Lagerung bei -20 ° C)

Material	Menge
d- ATP (100 mM)	100 µl
d- CTP (100 mM)	100 µl
d- GTP (100 mM)	100 µl
d- TTP (100 mM)	100 µl
DEPC- H ₂ O	600 µl

Tabelle A11: Sequenzen der verwendeten Primer für das FGF23-Gen

Primer	Sequenz
FGF23 E3s	GCCCCACTGCCAGCCTTCACG
FGF23 E3a	TGCCCTGTACCTTTCCCATCCT

Tabelle A12: Sequenzen der verwendeten Primer für das PHEX-Gen

Die Bezeichnung „goji“ bezieht sich auf die Quelle der Primersequenzen (Goji et. al, 2006).

Primer	Sequenz
PHEX 1s goji	TTTCCTGACGGCAGTTTCTT
PHEX 1a goji	ACCTATGAACGCAGGCAAAC
PHEX 2s goji	TGGGTTTTGGAATACCGTGT
PHEX 2a goji	GCTCCACTGTTTCACACCAA
PHEX 3s goji	AAGGCTTGGAAGCTGGTTGA
PHEX 3a goji	ACTCATGCTTCAAATCCCAA
PHEX 4s goji	GACTTCCAACCTGGCACCAT
PHEX 4a goji	TCCAGTCTTTCACAATCATTCC
PHEX 5s goji	CCACCCCACCTCTTTTACCT
PHEX 5a goji	GCACCCCAAAGGCTAATCT
PHEX 6s goji	AATATGGCTGGGATGCAGAC
PHEX 6a goji	TCCTGCATTGGGAATATGGT
PHEX 7s goji	TCTGCTCTTCCATGTCTCTCAA
PHEX 7a goji	CAATGGGCAATGACACAAAA
PHEX 8s 2	CAGATGTTTTGGCACATGTAG
PHEX 8a 2	TGAGAGCAGGTTTTACAAGAC
PHEX 9s goji	GGATGGCAATGATCAGGAGT
PHEX 9a goji	ACCGGGATTTTCCCTATGAC
PHEX 10s 2	TATCTCTGTTAGGTGGTGAAAAG
PHEX 10a 2	TCCCCTGTCTAATCCCTAAAG
PHEX 11s goji	GGGTTAGGGTGTGCAGTGTT
PHEX 11a goji	GACAATACCCACAGGCCACT
PHEX 12s	TCAAGCTGAAAGAACC
PHEX 12a	ACATCCATTAAACCA
PHEX 13s goji	ATTTTTGCCCTTCACAGTGG
PHEX 13a goji	GAAAGGCACAAGGCCAGTAA
PHEX 14s goji	CATGGCTTTGTGACTTCTGG
PHEX 14a goji	AGAGACTCCGCTTCTCACCA
PHEX 15s 2	GTAGCCCCAAACTGAGG
PHEX 15a 2	AAAAACTGGTAAGGTGAAGAG
PHEX 16s goji	GAGGAGTGCCTTTCAGATGG
PHEX 16a goji	TTCCATGGCTTCTTTCTGCT
PHEX 17s goji	GCAGTTTATCTTGGCTTTCCA
PHEX 17a goji	TTATTGCAAGCCATCACAGC
PHEX 18s goji	TTTTGAAGGCTTGTGAGGT
PHEX 18a goji	TTCAGCAGGTATGGGGTAGG

Anhang

PHEX 19s goji	TTGATGCCTCTTGCTGAATG
PHEX 19a goji	GGTCAATGGGGAGACACACT
PHEX 20s goji	GGTGTACCTGCCTCACTGGT
PHEX 20a goji	GGGAGCAAACCTCAAGTCCTG
PHEX 21s 2	TTACAGATGACGGTTTTATTGAT
PHEX 21a 2	CACTGGCACTTGATGTAGCA
PHEX 22s 2	ATCATTTTGGGCTTTAGTTGTCTC
PHEX 22a 2	AGCCTAGGGATTTATTTTTGTTGG

Tabelle A13: Sequenzen der verwendeten Primer für das DMP1-Gen

Primer	Sequenz
DMP1 318	CAGGAGCACAGGAAAAGGAG
DMP1 319	CATTCCCTCATCGTCCAACCT
DMP1 320	GGCCCAAAGACAGACAAGAA
DMP1 321	GAGTGGAGTCACCTCCCTCA
DMT1 E2/3-F	TCAGTTCATGGACATTTGGA
DMT1 E2/3-R	CCAAATTGATTCATTGCAAA

Tabelle A14: PCR-Ansatz für Sequenzierungen (Massachusetts General Hospital)

Material (PCR Kit von QIAGEN)	Menge
Template	1,5
10 x PCR Puffer	3
dNTPs (2,5 mmol/l)	3
Q Reagent	6
MgCl (25 mM)	1
Taq 5 U/ μ l	0,3
Primer 318 (20 μ mol/ μ l)	1,5
Primer 319 (20 μ mol/ μ l)	1,5
H ₂ O	12,2
Mineralöl	1 Tropfen je Probe

Anhang

Tabelle A15: PCR-Programm für DMP1 (Massachusetts General Hospital)

Schritt	Temperatur (in °C)	Zeit (in Minuten)
1.	94°	1
2.	60	1
3.	72	1
4. Wiederholung ab Schritt 1, 35x		

Tabelle A16: 2-% Agarose-Gel (Massachusetts General Hospital)

Material	Menge
1x TAE	100 ml
Agarose	2g
Ethidiumbromid	5 µl

Tabelle A17: 1xTAE

Material	Menge
10x TAE-Puffer	10 ml
H2O destill	90 ml

Tabelle A18: PCR-Ansatz der Gradienten-PCR

Menge (in µl)	Material
4	Test-DNA 100ng/µl
2	Primer Sense (20 pmol)
2	Primer Antisense (20 pmol)
20	Ampli-Puffer (10x)
20	dNTPs 2 mM
151	Aqua bidest.
1	AmpliTaq

b. Abbildungen

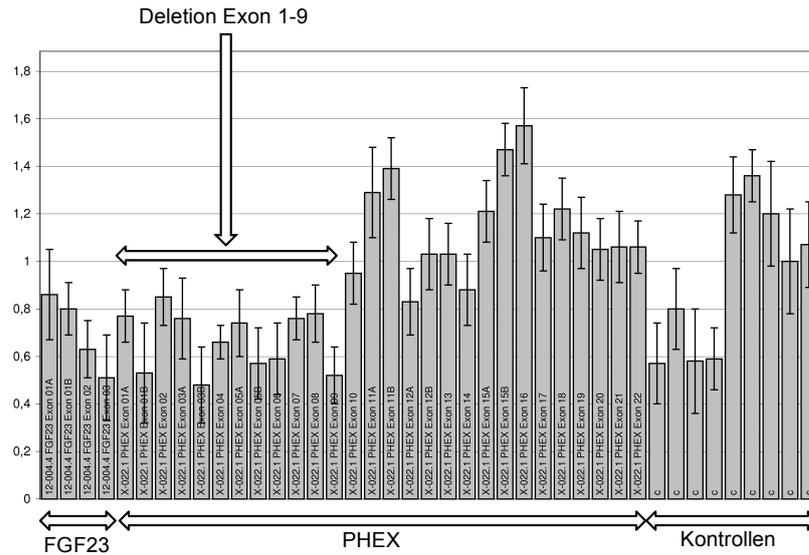


Abbildung A1: Mutationsanalyse von P78 (w) mit der MLPA

Es ist die MLPA-Analyse der drei Exons des FGF23-Gens sowie der 22 Exons des PHEX-Gens und die Kontrollproben von P78 dargestellt. Es zeigt sich ein Signalminderung der Exons 1-9 auf einen Wert von ca. 0,5 auf der Y-Achse. Die restlichen Exons des PHEX-Gens sowie die drei Exons des FGF23-Gens zeigen eine Signalstärke um 1 auf der Y-Achse, was einem Normalbefund entspricht.

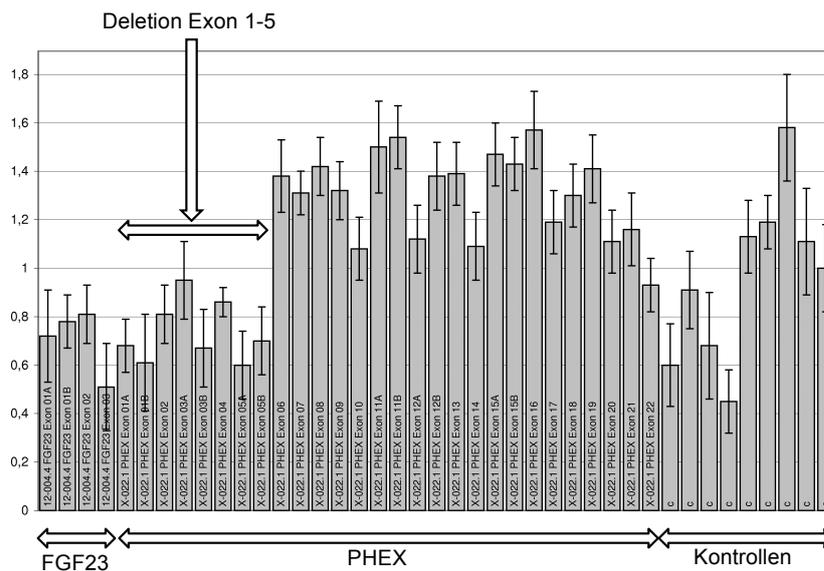


Abbildung A2: Mutationsanalyse von P127 (w) mit der MLPA

Es ist die MLPA-Analyse der drei Exons des FGF23-Gens sowie der 22 Exons des PHEX-Gens und die Kontrollproben von P127 dargestellt. Es zeigt sich ein Signalminderung der Exons 1-5 auf einen Wert von ca. 0,5 auf der Y-Achse. Die restlichen Exons des PHEX-Gens sowie die drei Exons des FGF23-Gens zeigen eine Signalstärke um 1 auf der Y-Achse, was einem Normalbefund entspricht.

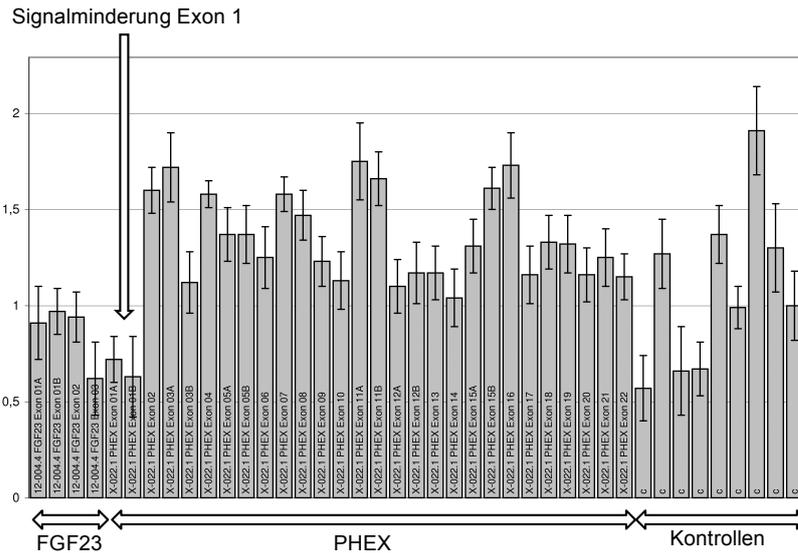


Abbildung A3: Mutationsanalyse von P145 (w) mit der MLPA

Es ist die MLPA-Analyse der drei Exons des FGF23-Gens sowie der 22 Exons des PHEX-Gens und die Kontrollproben von P145 dargestellt. Es zeigt sich ein Signalminderung der zwei Sonden in Exon 1 auf einen Wert von ca. 0,5 auf der Y-Achse. Die restlichen Exons des PHEX-Gens sowie die drei Exons des FGF23-Gens zeigen eine Signalstärke um 1 auf der Y-Achse, was einem Normalbefund entspricht.

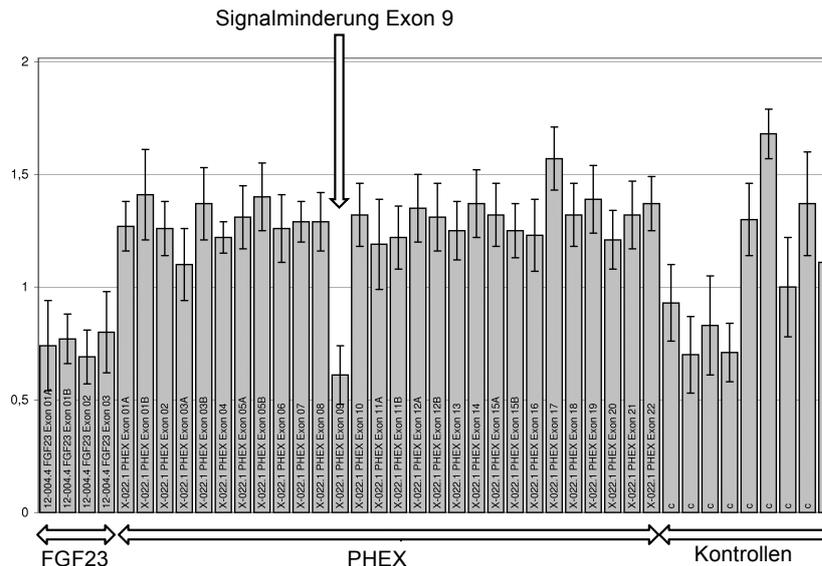


Abbildung A4: Mutationsanalyse von P150 mit der MLPA

Es ist die MLPA-Analyse der drei Exons des FGF23-Gens sowie der 22 Exons des PHEX-Gens und die Kontrollproben von P150 dargestellt. Es zeigt sich ein Signalminderung des Exons 9 auf einen Wert von ca. 0,5 auf der Y-Achse. Die restlichen Exons des PHEX-Gens sowie die drei Exons des FGF23-Gens zeigen eine Signalstärke um 1 auf der Y-Achse, was einem Normalbefund entspricht.

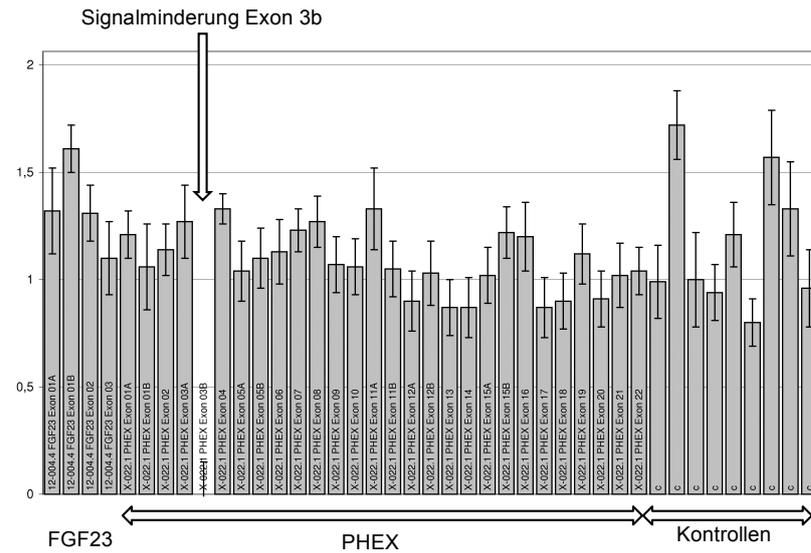


Abbildung A5: Mutationsanalyse von USA10 mit der MLPA

Es ist die MLPA-Analyse der drei Exons des FGF23-Gens sowie der 22 Exons des PHEX-Gens und die Kontrollproben von USA10 dargestellt. Es zeigt sich ein Signalminderung des Fragmentes 3b auf einen Wert von ca. 0,5 auf der Y-Achse. Die restlichen Exons des PHEX-Gens sowie die drei Exons des FGF23-Gens zeigen eine Signalstärke um 1 auf der Y-Achse, was einem Normalbefund entspricht.

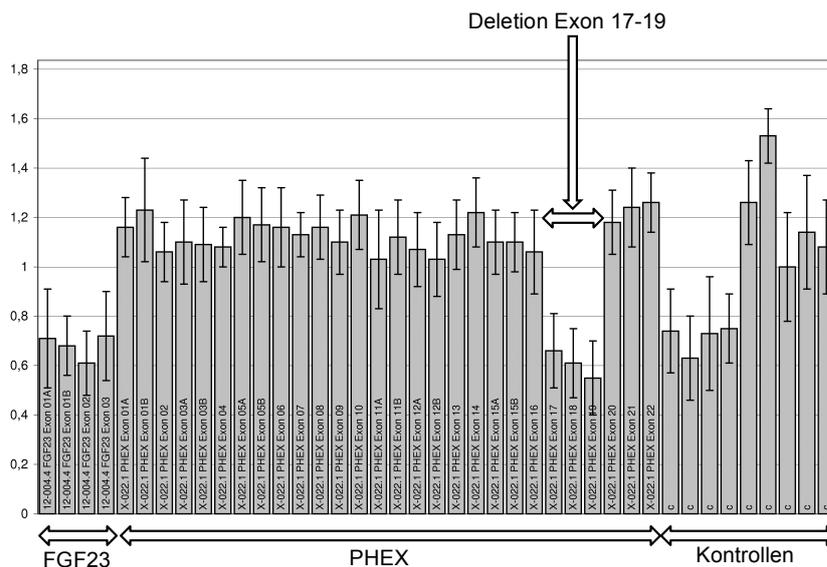


Abbildung A6: Mutationsanalyse von P106 (w) mit der MLPA

Es ist die MLPA-Analyse der drei Exons des FGF23-Gens sowie der 22 Exons des PHEX-Gens und die Kontrollproben von P106 dargestellt. Es zeigt sich ein Signalminderung der Exons 17-19 auf einen Wert von ca. 0,5 auf der Y-Achse. Die restlichen Exons des PHEX-Gens sowie die drei Exons des FGF23-Gens zeigen eine Signalstärke um 1 auf der Y-Achse, was einem Normalbefund entspricht.

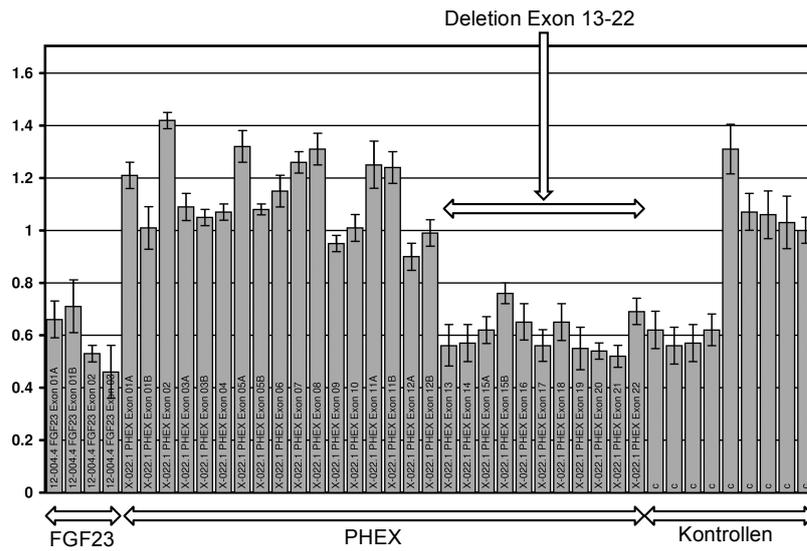


Abbildung A7: Mutationsanalyse von P89 (w) mit der MLPA

Es ist die MLPA-Analyse der drei Exons des FGF23-Gens sowie der 22 Exons des PHEX-Gens und die Kontrollproben von P89 dargestellt. Es zeigt sich ein Signalmindering der Exons 13-22 auf einen Wert von ca. 0,5 auf der Y-Achse. Die restlichen Exons des PHEX-Gens sowie die drei Exons des FGF23-Gens zeigen eine Signalstärke um 1 auf der Y-Achse, was einem Normalbefund entspricht.

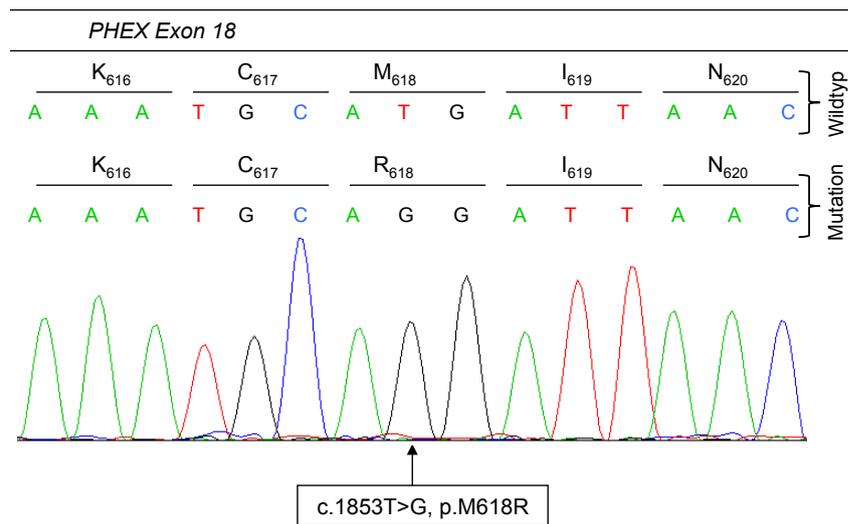


Abbildung A8: Sequenzanalyse des Exons 18 im PHEX-Gen von P10 (m) (c.1835T>G, p.M618R).

Es ist das Chromatogramm des Exons 18 des PHEX-Gens von P10 dargestellt. Es zeigt sich eine Substitution des Tyrosins durch ein Guanin an Position 1853 der kodierenden DNA. Die Substitution ist durch einen Pfeil markiert. Im oberen Bildteil ist die Wildtypsequenz sowie die mutierte Nukleotidabfolge bei P10 dargestellt. Infolge der Substitution kommt es zu einem Austausch der Aminosäure Methionin durch ein Arginin an Position 618 der Aminosäuresequenz.

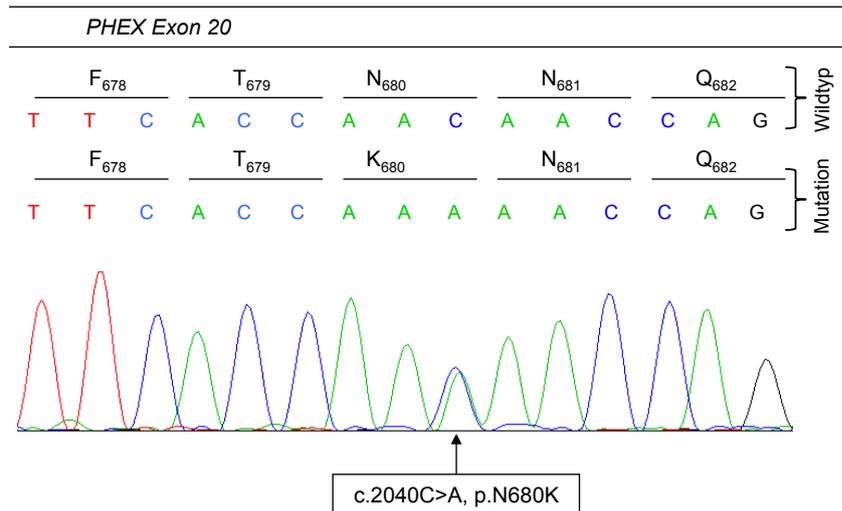


Abbildung A9: Sequenzanalyse des Exons 20 im PHEX-Gen von P186 (w) (c.2040C>A, p.N680K).

Es ist das Chromatogramm des Exons 20 des PHEX-Gens von P186 dargestellt. Es zeigt sich eine Substitution des Cytosins durch ein Adenin an Position 2040 der kodierenden DNA. Die Substitution ist durch einen Pfeil markiert. Im oberen Bildteil ist die Wildtypsequenz sowie die mutierte Nukleotidabfolge bei P186 dargestellt. Infolge der Substitution kommt es zu einem Austausch der Aminosäure Asparagin durch ein Lysin an Position 680 der Aminosäuresequenz.

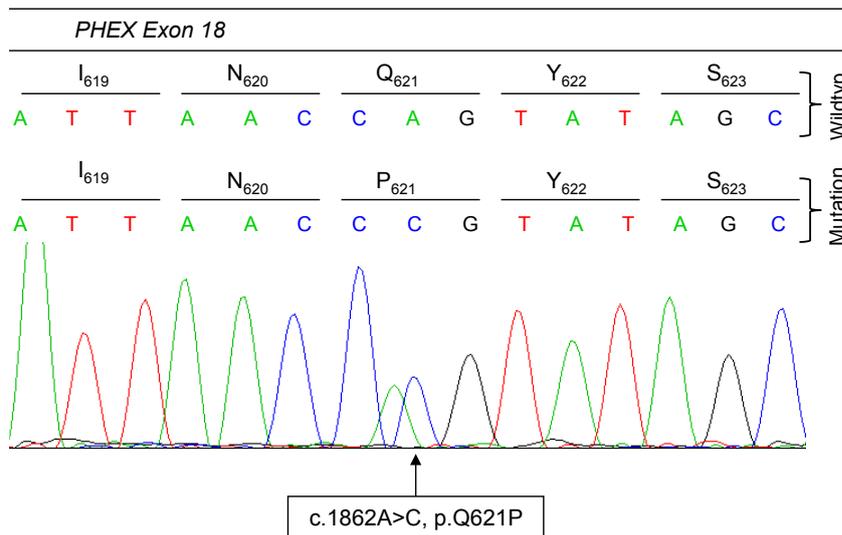


Abbildung A10: Sequenzanalyse des Exons 18 im PHEX-Gen von P189 (m) (c.1862 A>C, p.Q621P).

Es ist das Chromatogramm des Exons 18 des PHEX-Gens von P189 dargestellt. Es zeigt sich eine Substitution des Adenins durch ein Cytosin an Position 1862 der kodierenden DNA. Die Substitution ist durch einen Pfeil markiert. Im oberen Bildteil ist die Wildtypsequenz sowie die mutierte Nukleotidabfolge bei P189 dargestellt. Infolge der Substitution kommt es zu einem Austausch der Aminosäure Glutamin durch ein Prolin an Position 618 der Aminosäuresequenz.

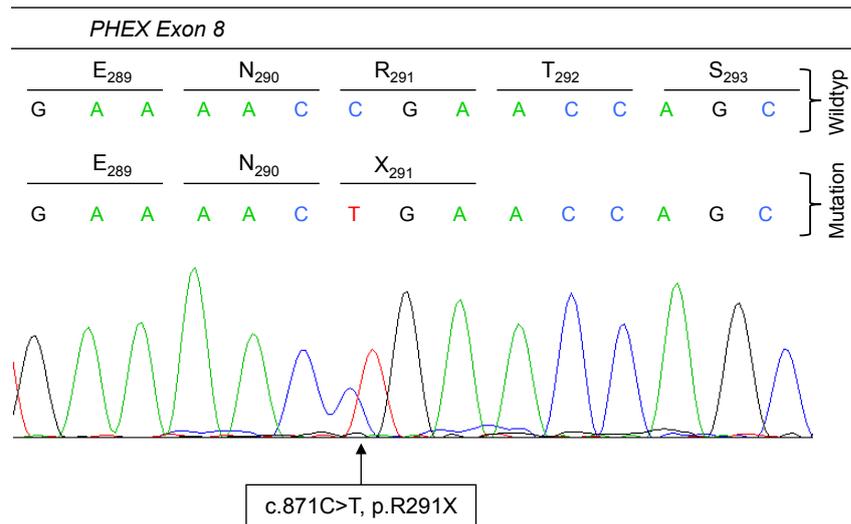


Abbildung A11: Sequenzanalyse des Exons 8 im PHEX-Gen von P15 (w) (c.871T>G, p.R291X).

Es ist das Chromatogramm des Exons 8 des PHEX-Gens von P15 dargestellt. Es zeigt sich eine Substitution des Cytosins durch ein Tyrosin an Position 871 der kodierenden DNA. Die Substitution ist durch einen Pfeil markiert. Im oberen Bildteil ist die Wildtypsequenz sowie die mutierte Nukleotidabfolge bei P15 dargestellt. Infolge der Substitution kommt es zu einem Austausch der Aminosäure Arginin durch ein Stopcodon an Position 291 der Aminosäuresequenz.

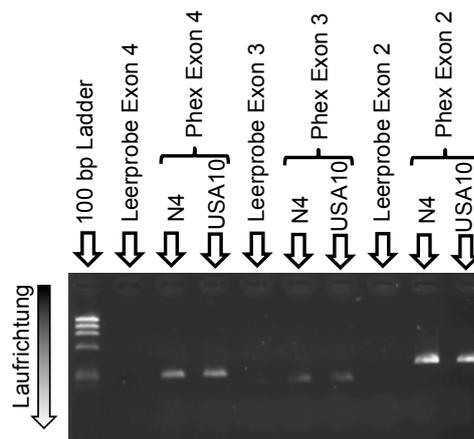


Abbildung A12: PCR der Exons 2, 3 und 4 von USA10 sowie einer Normalkontrolle (N4)

Darstellung das Agarose-Gels infolge einer PCR des Exons 3 sowie der benachbarten Exons 2 und 4 von dem Patienten USA10 und der Normalkontrolle N4 im Vergleich zu einer Leerkontrolle sowie einem 100 Basenpaar-Marker. In den Laufstrecken der N4 sowie USA10 zeigt sich bei allen drei Exons eine Bande mit einer ähnlichen Signalintensität. In der Laufstrecke der Leerproben sind keine Verunreinigungen zu erkennen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Parathormon-Vitamin-D-Achse	5
Abbildung 2: Die FGF23-Klotho-Achse	7
Abbildung 3: Darstellung des Studiendesigns	19
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Kapillar-Sequenzierung nach der Didesoxymethode	24
Abbildung 5: Schematische Darstellung der MLPA-Methode	28
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Restriktionsanalyse	31
Abbildung 7: Darstellung der Sequenzanalyse des Polymorphismus c.716 C>T, p.T239M in Exon 3 des FGF23-Gens	33
Abbildung 8: Sequenzanalyse des FGF23-Gens von P79 mit der heterozygoten Mutation c.568delC, p.L190X	34
Abbildung 9: Schematische Darstellung der PHEX-Mutationen nach Methode	35
Abbildung 10: MLPA-Analyse des FGF23- und PHEX-Gens von P141 (m) mit hemizygoter Deletion des Exons 12	36
Abbildung 11: MLPA-Analyse des FGF23- und PHEX-Gens eines Mädchens mit Normalbefund	37
Abbildung 12: MLPA-Analyse des FGF23- und PHEX-Gens von P48 (w) mit einer Deletion des Exons 7 im PHEX-Gen	38
Abbildung 13: MLPA-Analyse des FGF23- und PHEX-Gens von P109 (m)	39
Abbildung 14: Agarose-Gel der Exons 11, 12 und 13 von P141 sowie einer Normalkontrolle (N4)	40
Abbildung 16: Sequenzanalyse des Exons 1 des PHEX-Gens von P70 (c.61dupA, p.I21NfsX 30)	41
Abbildung 17: Sequenzanalyse des Exons 1 des PHEX-Gens von P135 (c.1 A>G, p.M1V)	42
Abbildung 18: Sequenzanalyse des Exons 16 des PHEX-Gens von P128 (c.1700G>C, p.R567P)	43
Abbildung 19: Sequenzanalyse des Exons 10 des PHEX-Gens von P183 (c.1158 G→A, W386X)	44
Abbildung 20: Sequenzanalyse des Exons 15 des PHEX-Gens von P113 (c.1645+1G>A)	44
Abbildung 21: Sequenzanalyse des Exons 22 des PHEX-Gens von P63 (IVS21-10C>A)	45
Abbildung 22: Sequenzanalyse des Exons 18 des PHEX-Gens mit dem Polymorphismus c.1769-10C>T45	45
Abbildung 23: Sequenzanalyse des Exons 2 des DMP1-Gens von P115 mit der homozygoten Deletion c.31delT, p.W11GfsX9	46
Abbildung 25: Darstellung der Sequenzanalyse von P181 (c.475C>A, p.Q159K)	48
Abbildung 26: Zusammenfassende graphische Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit	49
Abbildung 27: Graphische Darstellung des Mutationsspektrums im PHEX-Gen	51
Abbildung 28: Schematische Darstellung der detektierten PHEX-Mutationen im Gen und Protein	55
Abbildung 29: Mutationen im FGF23-Gen	58
Abbildung 30: Übersicht zu den DMP1-Mutationen	60
Abbildung 31: Algorithmus zur genetischen Diagnostik bei Verdacht auf hypophosphatämische Rachitis	67
Abbildung A1: Mutationsanalyse von P78 (w) mit der MLPA	91
Abbildung A2: Mutationsanalyse von P127 (w) mit der MLPA	91
Abbildung A3: Mutationsanalyse von P145 (w) mit der MLPA	92
Abbildung A4: Mutationsanalyse von P150 mit der MLPA	92
Abbildung A5: Mutationsanalyse von USA10 mit der MLPA	93
Abbildung A6: Mutationsanalyse von P106 (w) mit der MLPA	93
Abbildung A7: Mutationsanalyse von P89 (w) mit der MLPA	94
Abbildung A8: Sequenzanalyse des Exons 18 im PHEX-Gen von P10 (m) (c.1835T>G, p.M618R)	94
Abbildung A9: Sequenzanalyse des Exons 20 im PHEX-Gen von P186 (w) (c.2040C>A, p.N680K)	95
Abbildung A10: Sequenzanalyse des Exons 18 im PHEX-Gen von P189 (m) (c.1862 A>C, p.Q621P)	95
Abbildung A11: Sequenzanalyse des Exons 8 im PHEX-Gen von P15 (w) (c.871T>G, p.R291X)	96
Abbildung A12: PCR der Exons 2, 3 und 4 von USA10 sowie einer Normalkontrolle (N4)	96

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Überblick über FGF23-abhängige hypophosphatämische Erkrankungen</i>	16
<i>Tabelle 2: Überblick über hereditäre, primäre Störungen der Phosphatreabsorption</i>	17
<i>Tabelle 3: PCR-Programm „AmpliTaq“</i>	22
<i>Tabelle 4: PCR-Programm „HotStar“</i>	22
<i>Tabelle 5: PCR-Programm „BigDye“</i>	25
<i>Tabelle 6: PCR-Programm „HotDye“</i>	25
<i>Tabelle 7: Cycler-Programm „MLPA-PCR“</i>	29
<i>Tabelle 8: Ansatz für das Restriktionsenzym</i>	30
<i>Tabelle 9: PCR-Bedingungen für die 22 Exons des PHEX-Gens</i>	32
<i>Tabelle 10: PCR-Bedingungen für das Exon 3 des FGF23-Gens</i>	33
<i>Tabelle 11: Darstellung der Auffälligkeiten in der MLPA-Analyse</i>	40
<i>Tabelle 11: Übersicht über die bislang veröffentlichten PHEX-Mutationen</i>	50
<i>Tabelle A1: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Mutationsanalyse im FGF23-, PHEX- und DMP1-Gen sowie klinischer Daten der Patienten dieser Arbeit</i>	82
<i>Tabelle A2: Verwendete Geräte</i>	85
<i>Tabelle A3: Verwendete Software</i>	85
<i>Tabelle A4: Erworbene Kits, Reagenzien und Chemikalien</i>	86
<i>Tabelle A5: 2%-Agarose-Gel</i>	86
<i>Tabelle A6: Agarosegel-Färbelösung (2 µg/ml)</i>	86
<i>Tabelle A7: 10x TBE Puffer</i>	87
<i>Tabelle A8: 1x TBE Puffer</i>	87
<i>Tabelle A9: Loadingpuffer III</i>	87
<i>Tabelle A10: dNTP's</i>	87
<i>Tabelle A11: Sequenzen der verwendeten Primer für das FGF23-Gen</i>	87
<i>Tabelle A12: Sequenzen der verwendeten Primer für das PHEX-Gen</i>	88
<i>Tabelle A13: Sequenzen der verwendeten Primer für das DMP1-Gen</i>	89
<i>Tabelle A14: PCR-Ansatz für Sequenzierungen (Massachusetts General Hospital)</i>	89
<i>Tabelle A15: PCR-Programm für DMP1 (Massachusetts General Hospital)</i>	90
<i>Tabelle A16: 2-% Agarose-Gel (Massachusetts General Hospital)</i>	90
<i>Tabelle A17: 1xTAE</i>	90
<i>Tabelle A18: PCR-Ansatz der Gradienten-PCR</i>	90

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Vorname: Merle Sophie
Nachname: Thieme
Geburtstag: 21.04.1985
Geburtsort: Henstedt-Ulzburg



Schul- und Hochschulausbildung:

1991-1995: Grundschule Glashütte in Norderstedt
1995-2004: Lise-Meitner-Gymnasium in Norderstedt, Abitur
2003: Teilnahme an der Deutschen Schülerakademie der Bildung und Begabung e.V., Kurs „Aminosäuren – Bausteine des Lebens“ an der Multinationalen Akademie in Metten, Bayern
2004-2011: Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
2006: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2007-2013: Doktorandin in der klinisch experimentellen Forschungseinrichtung, „Molekulargenetische Charakterisierung von Patienten mit hypophosphatämischer Rachitis“ unter der Leitung von Prof. Dr. O. Hiort
2008: Forschungsbesuch an der Endocrine Unit des Massachusetts General Hospital/Harvard University, Prof. MD H. Jüppner
2009: Stipendium für ein Auslandssemester an der Universidad Miguel Hernandez (Elche, Spanien) im Rahmen des Erasmus-Programmes der Universität zu Lübeck
2011: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Arbeitsverhältnisse:

2011 - 2012: Assistenzärztin Asklepios Klinik Harburg, I. Medizinische Abteilung
2012 - aktuell: Assistenzärztin UKSH Campus Lübeck, Medizinische Klinik II

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Bearbeitung und Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei der Arbeitsgruppe „AG Hiort“, die mich aufgenommen und sowohl in der experimentellen Phase als auch bei dem Erstellen der Arbeit unterstützt hat. Im Speziellen gilt mein Dank Prof. Dr. Olaf Hiort, der es mir ermöglicht hat unter seiner Leitung dieses interessante Thema zu bearbeiten, der mich jederzeit in meinem Vorhaben unterstützt hat und den Kontakt zu der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jüppner ermöglicht hat. Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Claudia Havel und Dagmar Struve bedanken für die Unterstützung in der experimentellen Phase sowie bei Dr. Ralf Werner für die Diskussion der molekulargenetischen und pathophysiologischen Grundlagen und Ergebnisse. Weiterhin möchte ich Dr. Marius Schumacher danken, der mich speziell in der Anfangszeit in der experimentellen Phase betreut hat. Desweiteren gilt mein Dank dem Klinikdirektor der Kinder- und Jugendmedizin Lübeck, Prof. Dr. E. Herting für die Möglichkeit der experimentellen Forschung.

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. Harald Jüppner für die Zusammenarbeit, den Austausch an Ideen sowie die freundliche Aufnahme in seine Forschungsgruppe am Massachusetts General Hospital bedanken. In diesem Rahmen haben Sie es mir erlaubt einen einzigartigen Einblick in die Grundlagenforschung zu gewinnen, der mich persönlich und professionell geprägt hat. Weiterhin gilt mein spezieller Dank Dr. Clemens Bergwitz, Dr. Michael Mannstadt sowie Takashi Shimada, die mich bei dem Besuch der Endocrine Unit am Massachusetts General Hospital herzlich aufgenommen und mich an ihrer Freude an der experimentellen Forschung teilhaben ließen.

Weiterhin gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden, und ganz speziell meinen Eltern, denen ich nicht genug für die liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen danken kann.