

Aus der Klinik für Kinder – und Jugendmedizin

der Universität zu Lübeck

Direktor : Prof. Dr. E. Herting

**Molekulargenetische Untersuchungen bei Patienten mit
X - chromosomal dominanter hypophosphatämischer Rachitis**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Stefanie Brigitte Felgenhauer

geboren in Hamburg

Lübeck 2005

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
1 EINLEITUNG	6
1.1 PHYSIOLOGIE	6
1.2 GENETIK UND PATHOPHYSIOLOGIE	7
1.3 KLINIK	14
1.4 RADIOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN.....	15
1.5 DIAGNOSTIK	16
1.6 DIFFERENTIALDIAGNOSEN.....	16
1.7 THERAPIE	20
1.8 ZIEL DER ARBEIT	21
2 METHODEN UND MATERIAL.....	22
2.1 PATIENTENPROBEN	22
2.2 DNA -ISOLIERUNG	22
2.3 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR).....	23
2.3.1 ERRECHNUNG DER TEMPERATUR DES ANNEALING SCHRITTES	23
2.3.2 AUSTESTUNG DER PUFFER UND dNTP – BEDINGUNGEN.	24
2.3.3 DURCHFÜHRUNG DER PCR.....	24
2.3.4 VERWENDETE SUBSTANZEN UND GERÄTE - PCR.....	25
2.3.4.1 PRIMER	27
2.3.4.2 EXEMPLARISCHE RECHNUNG FÜR PRIMER EXON 1, ANTISENSE	27
2.3.4.3 PUFFER	28
2.3.4.4 dNTP	28
2.3.4.5 DNA POLYMERASE UND AQUA.....	28
2.3.4.6 GERÄTE	28
2.4 AGAROSE GEL ELEKTROPHORESE.....	29
2.4.1 VERWENDETE SUBSTANZEN UND GERÄTE - AGAROSEGEL	29
2.5 SSCP GEL - ELEKTROPHORESE	30
2.5.1 SILBERFÄRBUNG.....	31
2.5.2 VERWENDETE SUBSTANZEN UND GERÄTE : SSCP GEL	31
2.6 SEQUENZIERUNG	33
2.6.1 AUFREINIGEN VON PCR – PRODUKTEN	33
2.6.2 PRIMER – VERDÜNNUNG	33
2.6.3 SEQUENZIERUNG - PCR.....	34
2.6.3.1 ERSTELLUNG EINES “TEMPLATE MIX”	34
2.6.4 PCR	35
2.6.5 SEQUENZIERUNG - GEL ELEKTROPHORESE.....	35
2.6.6 VERWENDETES MATERIAL UND SUBSTANZEN – SEQUENZIERUNG	36

3	ERGEBNISSE	37
3.1	PCR - BEDINGUNGEN	37
3.2	MULTIPLY PCR.....	38
3.3	AUSWERTUNG DER SSCP GELE.....	40
3.4	AUFFÄLLIGKEITEN IM SSCP GEL	45
3.5	SEQUENZIERUNGEN.....	45
4.	DISKUSSION	50
4.1	DIE SSCP SCREENING METHODE.....	50
4.2	FEHLERQUELLEN BEI DER UNTERSUCHUNG	52
4.3	MUTATIONEN AUF INTRONABSCHNITTEN ODER DEM PROMOTOR.....	53
4.4	DIFFERENTIALDIAGNOSEN.....	54
4.5	VERGLEICH DER ERGEBNISSE DIESER ARBEIT MIT INTERNATIONALEN STUDIEN	56
4.6	ZUSAMMENHANG VON PHEX-MUTATIONEN MIT XLH.....	63
4.7	GENOTYP - PHÄNOTYP ANALYSE	64
4.8	AUSBLICK	67
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	68
6	LITERATURVERZEICHNIS	69
7	ANHANG	83
8	DANKSAGUNG.....	86
9	LEBENS LAUF	87

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A	Antisense (in Bezug auf Primer)
ADHR	Autosomal Dominant Hypophosphatämische Rachitis
APS	Ammoniumpersulfat
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	base pairs
C	Cytosin
CLCN5	Gen des Spannungsabhängigen Chloridkanals 5
DNA	Desoxy Ribonuceic Acid
dNTP	d Nukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamin -Tetracetat
EtBr	Ethidiumbromid
FGF 23	Fibroblast Growth Factor 23
FRP 4	frizzled related protein 4
G	Guanin
GH	Growth Hormone
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HHRH	Hereditäre Hypophosphatämische Rachitis mit Hyperkalzurie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hyp	X-linked Hypophosphatemia
IGF 1	Insulin Growth Factor 1
kb	Kilobasenpaare
KG	Körpergewicht
mRNA	Messenger Ribonucleinacid
M	molar
MEPE	Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein
mM	milli molar
N4	Normalprobe
N4 nd	Normalprobe nicht denaturiert

NTP 2	Natrium Phosphat Kotransporter 2
OCRL	Okulozerebrorenales Syndrom des Lowe Gens
OHO	Oncogenous Hypophosphatemic Osteomalacia
PAA	Polyacrylamid
PBS	phosphate buffered saline (Natrium Phosphat Puffer)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PEX, PHEX	phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases located on the X - chromosome
PTH	Parathormon
RPM	(rotation per minute)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
S	Sense (im Bezug auf Primer)
s	Sekunde
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism
T	Thymin
TBE	Trisborat - Puffer
TE	Tris - EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIO	Tumor-induced Osteomalacia
TmP	Transportmaximum für Phosphat
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
TRP	Tubuläre Phosphatrückresorption
U	Units
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
VDAR	Vitamin D Abhängige Rachitis
VSD	Ventrikel Septum Defekt
XLH	X - linked hypophosphatemia
W	Watt

1 Einleitung

Bei der familiären X – chromosomal dominanten Hypophosphatämie handelt es sich um eine erbliche Form der Vitamin D resistenten Rachitis, die durch einen Phosphatverlust hervorgerufen wird. Sie wird auch als X – chromosomal hypophosphatämische Rachitis oder Phosphatdiabetes bezeichnet.

In dieser Arbeit wird die Bezeichnung XLH für **X**-linked hypophosphatemia verwendet.

Mit einer Häufigkeit von 1 : 20.000 (Beck et al., 1997; Francis et al., 1997), bzw. 1 : 25.000 Neugeborenen (Schönau, 1996) ist sie mit ungefähr 80 % die häufigste der erblichen Rachitisformen (de Beur et al., 2002).

Als Ursache für die XLH gelten Gendefekte auf dem PHEX Gen (phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases located on the x - chromosome) in der Region Xp22.

1.1 Physiologie

Phosphat ist für den Körper ein unentbehrlicher Nährstoff, der hauptsächlich in Form von Hydroxylapatit (einem Kalziumphosphat) in Zähnen und Knochen und in geringeren Mengen intrazellulär in organischen Verbindungen wie z.B. dem Energieträger ATP vorkommt.

Er wird zu 70 % im Dünndarm aufgenommen, in der Niere zu 90 – 95 % filtriert und davon zu 80 - 90 % aus dem Tubulus resorbiert. (Ganten und Ruckpaul, 2001) Die Regulation des Phosphathaushaltes findet also vor allem in der Niere statt. (Takeda et al., 2004a)

An dieser Regulation sind Parathormon (PTH, Parathyrin) und Calcitriol maßgeblich beteiligt. PTH senkt den Plasmaphosphatspiegel bei intakter Nierenfunktion durch Hemmung der Phosphatrückresorption, die vor allem im proximalen Tubulus erfolgt, und führt gleichzeitig zu einer Phosphatmobilisierung aus den Knochen.

Calcitriol (1,25 (OH)₂ Vitamin D₃) steigert den Plasmaphosphatspiegel durch eine Stimulation der enteralen und renalen Resorption und fördert die Knochenmineralisation. Dies bewirkt indirekt eine Erhöhung des Kalziumspiegels, die eine Hemmung der PTH Sekretion zur Folge hat. (Silbernagl und Lang, 1998)

Durch Calcitriolerhöhung kann der Serumphosphatspiegel bei Phosphatmangel zunächst konstant gehalten werden. Erst bei zunehmendem Phosphatverlust sinkt die Serumphosphatkonzentration und der Einbau von Hydroxylapatit in die Knochen wird vermindert.

1.2 Genetik und Pathophysiologie

Die XLH wurde erstmals im Jahre 1937 von Albright et al. beschrieben. Die Identifikation des krankheitsverursachenden Gendefektes gelang 1995 mittels Positionsklonierung (The Hyp Consortium, 1995; Francis et al 1997). Anhand größerer intragenischer Deletionen, cDNA Selektion und Sequenzierung konnte das PHEX Gen in der Region Xp 22.1 - Xp 22.2 des kurzen Armes des X-Chromosoms identifiziert werden. (Du et al., 1996; Ganten und Ruckpaul, 2001) Die ursprüngliche Bezeichnung PEX (phosphatregulierende Endopeptidase auf dem X-Chromosom) wurde zu PHEX, um Verwechslungen mit Genen für peroxisomale Erkrankungen zu vermeiden.

Das aus 22 Exons bestehende PHEX Gen umfaßt ca. 220 kb (Ganten und Ruckpaul, 2001), wobei von der 6.6 kb umfassenden mRNA ca. 2.2 kb translatiert werden. (de Beur et al., 2002) Das Genprodukt setzt sich aus 749 Aminosäuren zusammen und zeigt mit 2 zinkbindenden Motiven eine signifikante Homologie zur M13 Familie der Zinkmetallopeptidasen :

HEXXH (Bestandteil der meisten Metallopeptidasen) und ENXADXGG (Charakteristikum der M13 Familie). (Ganten und Ruckpaul, 2001)

In die M 13 Familie gehören weiterhin Neprilysin (NEP), Endothelin Converting Enzyme 1 (ECE 1) und Kell Blutgruppen Glykoproteine, die alle große Ähnlichkeiten mit PHEX aufweisen (NEP 70 %, ECE 1 67 % und Kell 60 % Übereinstimmung der Aminosäuren). (Du et al., 1996; Ghaddar et al., 2000; Boileau et al., 2001)

RT - PCR Untersuchungen wiesen eine Expression des PHEX Gens in verschiedenen Geweben wie peripheren Lymphozyten, Gehirn, Muskel und Thyroidea auf. Mit der Northern Blot Technik zeigte sich eine Expression in Osteoblasten, Osteosarkomzellen, Zähnen, Ovarien, fetaler Lunge (Ganten und Ruckpaul, 2001) und Nebenschilddrüsen. (Blydt-Hansen et. al., 1999; Brewer et al. 2004; Schmitt und Mehls 2004)

Auch in Chondrozyten (Miao et al., 2004) und in Tumorgeweben mit paraneoplastischem renalen Phosphatverlust wird PHEX exprimiert (Lipman et al.,1998), nicht jedoch in der Niere. (Tenenhouse, 1999) Da die Expressionsrate bei neugeborenen Tieren sehr hoch ist und beim Menschen im Knochen- und Lungengewebe mit zunehmendem Alter abnimmt, wird PHEX eine entscheidende Rolle beim Wachstum zugeschrieben. (Meyer et al., 2000; Zoidis et al., 2000)

Alle Untersuchungstechniken weisen insgesamt eine niedrige Expression von PHEX auf, mit höchster Aktivität im Knochengewebe (Thompson et al., 2002) und den Zähnen. (Ganten und Ruckpaul, 2001; Takeda et. al., 2004b)

Die Expression in vielen unterschiedlichen Geweben könnte auf eine Beteiligung an anderen Prozessen als nur der Phosphatregulation hinweisen. (Liu et al., 2002)

Zum Verständnis der Pathophysiologie tragen zwei Mausmodelle wesentlich bei : die 1976 beschriebene Hyp Maus und die 1986 beschriebene Gy Maus. Beide Modelle tragen eine partielle Deletion des PHEX Gens (siehe Abbildung 1).

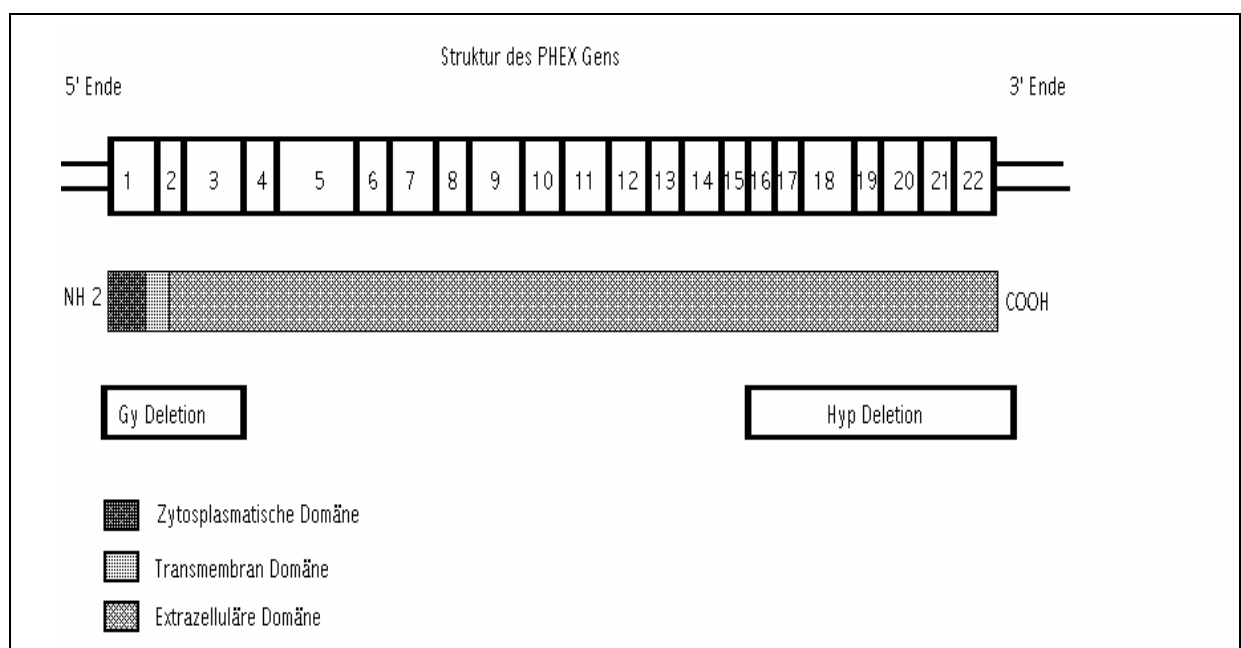


Abbildung 1 : Struktur des PHEX Gens und des Genproduktes, verändert nach phexdb.mcgill.ca (1999)

Aufgrund einer Rekombination bei Kreuzungsexperimenten von Hyp und Gy Mäusen wurden erst zwei verschiedene Genorte vermutet. (Strom et al., 1997) Nach Isolation des "PHEX Genes der Maus" zeigte sich jedoch bei Hyp Mäusen eine Deletion von Exon 16 - 22 (Wang et al., 1999), bzw. ab der Mitte des Intron 15 bis 48 kb im 3' Bereich einschließlich einer 10 kb langen intergenischen Sequenz (Sabbagh et al., 2002) und bei Gy Mäusen eine Deletion am 5' Ende. Die Deletion der Gy Maus umfaßt ca 160 - 190 kb und schließt das Gen für die Sperminsynthese (telomer zum PHEX Gen) mit ein.

Bei beiden Modellen fallen eine verminderte tubuläre Phosphatresorption, Hypophosphatämie, Rachitis, Osteomalazie und Minderwuchs auf.

Im Hyp Mausmodell sind zwei neue Spontanmutationen Hyp 2 J (intragenische Deletion von 7,3 kb auf Exon 15) und Hyp Duk (intragenische Deletion von 30 kb bei Exon 13 - 14) aufgetreten, die mit den oben genannten Symptomen assoziiert sind. Bei Hyp Duk Mutationen kommt es zusätzlich zu einer variablen Expression von Taubheit, Hyperaktivität und kranialer Dysmorphie. (Lorenz - Depiereux et al., 2004)

Gy Männchen zeigen zusätzlich durch den Verlust der Sperminsynthase eine durch Azoospermie bedingte Sterilität, und wie Gy Weibchen Hyperaktivität, Taubheit und Innenohrdefekte. Gy Männchen haben eine geringere Lebenserwartung als Gy Weibchen. (Ganten und Ruckpaul, 2001)

Die Skal Maus stellt ein drittes Mausmodell dar. Bei ihr kommt es durch eine induzierte Punktmutation zu einem Exon Skipping und damit zu einem selektiven PHEX-Mangel. (Quarles, 2003)

Die "Merkmale" Hyp und Gy werden X - chromosomal dominant vererbt. Dieser murine Genort entspricht dem PHEX Gen beim Menschen (Ganten und Ruckpaul, 2001) und stimmt zu 95 % mit ihm überein. (Du et al., 1996)

Aufgrund der Homologie zu Endopeptidasen wird davon ausgegangen, daß PHEX mit seinem hormonellen Faktor an der Aktivierung bzw. Inaktivierung von biologisch aktiven Peptiden beteiligt ist. Dieser Faktor ist wahrscheinlich für die Differenzierung von Osteoblasten oder für die Knochenmineralisierung essentiell, weiterhin soll er die Phosphatrückresorption über die Expression des Natrium Phosphatkotransporters (NPT 2) beeinflussen. (Nesbitt et al., 1999) (Ganten und Ruckpaul, 2001)

Dieser Zusammenhang zwischen PHEX Mutation und Herunterregulation der Transkription des NPT 2 wird vermutet, da bei Hyp Mäusen die Menge von NPT 2 nur bei 57 % (de Beur et al., 2002), bzw. 80 % (Tenenhouse et al., 2003) des Normalwertes liegt, und die max. Transportgeschwindigkeit (V_{max}) dieses Systems im proximalen Tubulus um 50 % vermindert ist.

Dies ist vermutlich durch eine verringerte Expression des NPT 2 bedingt, da beim Menschen das Gen für NPT 2 auf Chromosom 5q35 kartiert ist und ein Primärdefekt dementsprechend bei XLH ausscheidet.

Die Hemmung des Phosphatrücktransporters führt zu einer Hypophosphatämie unterschiedlichen Ausmaßes, einer Verminderung des Knochenminerals Hydroxylapatit und somit zu einer Rachitis. Diese geht mit ausgedehnten Proliferationszonen des Säulenknorpels im Bereich der Epiphysenfuge, Veränderungen am kortikalen und spongiösen Knochen, einem erhöhten Osteoidvolumen und einem vermehrten Osteoidsaum an Osteozyten einher. (Schönau, 1996)

Untersuchungen an Knochenzellen von Hyp Mäusen, die ins Muskelgewebe von Kontrollmäusen transplantiert wurden, zeigten schlechtere Knochenstrukturausbildungen als Zellen von normalen Mäusen. Daher vermutet man zusätzliche primäre Defekte an Osteoblasten. (Guo und Quarles, 1997; Ecarot und Desbarats, 1999)

Osteoblastenkulturen von Hyp Mäusen wiesen eine vermehrte Glukoseproduktion, einen verminderten intrazellulären pH und eine verminderte Kaseinkinase II Aktivität auf, die zu einer verminderten Phosphorylierung von Osteopontin führten. Außerdem ist die Kollagenanlagerung und Kalziumansammlung vermindert. (Miao et al., 2001) Die Vermutung, daß der Mineralisations-Inhibitor Minhibin ein Substrat für PHEX ist, könnte die Mineralisationsstörung zusätzlich zur Hypophosphatämie erklären. (Quarles, 2003)

Parabiose- und Transplantationsexperimente führten zu der Annahme, daß sich die gestörte Phosphatrückresorption nicht auf einen renalen Defekt bezieht, sondern auf eine Deregulation in einem übergeordneten humoralen System. (Tenenhouse, 1999) Bei Parabioseuntersuchungen mit Gefäßshunts von einer Hyp- und Kontrollmaus, wies nämlich auch die Niere der Kontrollmaus eine verminderte Phosphatrückresorption auf. Außerdem zeigte die Transplantation einer Kontrollmausniere in eine Hyp Maus einen Phosphatverlust, wobei umgekehrt bei Transplantation einer Hyp Niere in eine Kontrollmaus keine Hypophosphatämie vorlag.

Diese Erkenntnisse werden durch die Nierentransplantation bei einem 47 Jahre alten XLH Patienten bestätigt, bei dem eine Besserung der Hypophosphatämie ausblieb. (Ganten und Ruckpaul, 2001)

Daher nimmt man an, daß ein humoraler Faktor "Phosphatonin" durch Mutationen der PHEX - Endopeptidase vermindert inaktiviert wird und den für die Phosphatrückresorption wichtigen Natrium - Phosphat Kotransporter Typ II hemmt.

Phosphatonin wird vermutlich von Osteoblasten sezerniert, da kultivierte renale Zellen auf Serum und Osteoblastenkulturen mit einer Hemmung des Natrium Phosphat Kotransporters reagieren. (Ganten und Ruckpaul, 2001)

Bei dem Phosphatonin könnte es sich um den Fibroblast Growth Factor 23 (FGF 23) handeln. (Bowe et al., 2001; Strewler 2001; White et al., 2001a; Weber et al., 2003) Dies ist ein 251 AS umfassendes Protein, das nur in voller Länge biologisch aktiv, d.h. phosphaturisch, ist. (Fukumoto und Nakahara, 2004) Da FGF 23 bei gesunden Probanden in Mengen von 10 - 50 pg / ml im Serum vorkommt, geht man von ihm als physiologischen humoralen Faktor aus. (Fukumoto und Nakahara, 2004)

Zur FGF 23 Expression gibt es widersprüchliche Ansätze. Einerseits wurde eine geringfügige Expression in Geweben wie Leber, Thymus, Lymphknoten, Herz und Thalamus gefunden und keine Expression im Knochengewebe. (Strewler, 2001) Andererseits wurde gerade im Knochengewebe eine höhere Expression von FGF 23 als in anderen Organen, wie Niere, Leber, Schilddrüse und Nebenschilddrüse festgestellt. (Mirams et al., 2004)

Mutationen im FGF 23 Gen sind zuerst als Ursache der autosomal dominanten hypophosphatämischen Rachitis (ADHR) identifiziert worden. (Quarles und Drezner, 2001; Fukumoto und Nakahara, 2004; Gupta et al., 2004) Im Rahmen von Missense Mutationen des FGF 23 Gens bei ADHR kam es im Bereich der processing sites R 176 und R 179 zu "gain of function" Veränderungen (Strewler, 2001), welche den Abbau von FGF 23 verhindern (Quarles, 2003) bzw. das veränderte FGF 23 weniger sensitiv für Proteasen machen. (White et al., 2001b)

FGF 23 ist weiterhin als humoraler Faktor der tumorbedingten Osteomalazie isoliert worden, (Quarles und Drezner, 2001; Strewler, 2001) bei der es zu einer deutlichen FGF 23 Expression in Tumorzellen kommt. (Blumsohn, 2004) Nach vollständiger Entfernung des Tumors ist diese Form der Hypophosphatämie reversibel. (White et al., 2001a; Weber et al., 2003)

Zusätzlich zu diesen beiden Krankheitsbildern wird FGF 23 im Zusammenhang mit fibröser Knochendysplasie beschrieben, bei der die Höhe des FGF 23 Spiegels mit der Schwere der Hypophosphatämie und Skelettbeteiligung korreliert. (Gupta et al., 2004)

Aufgrund der weitgehend gleichen Klinik von ADHR, der tumorbedingten Osteomalazie und XLH, vermutet man, daß die "gain of function" Veränderungen der beiden erstgenannten Erkrankungen, der Wirkung der "loss of function" Mutation beim PHEX Gen entsprechen.

Wahrscheinlich ist die FGF 23 Expression zur Steuerung des Phosphathaushaltes im normalen Gewebe vermindert und wird durch eine PHEX - Endopeptidase in Abhängigkeit von der FGF 23 Serumkonzentration reguliert. Als Angriffspunkte der Endopeptidase werden die Prozessierungsstellen R179 oder S 180 des FGF 23 Genproduktes diskutiert, die bei der ADHR und der tumorbedingten Osteomalazie die Orte der "gain of function" Mutation bzw. Veränderung sind. (Benet-Pages et al., 2004)

Mutationen, die den Abbau von FGF 23 verhindern, sowie die Überproduktion von FGF 23 bei Tumoren und Mutationen des metabolisierenden Enzyms führen zu einer Erhöhung von FGF 23 im Serum mit den Symptomen der Phosphaturie, Hypophosphatämie und Rachitis / Osteomalazie. (Strewler, 2001; Johnsson et al., 2003)

Zu der Hypothese, daß FGF 23 Phosphatonin entspricht, gibt es kontroverse Ansätze.

Da Phosphatonin den Natrium Phosphat Kotransporter II beeinflusst, müßte FGF 23 dies auch tun. Dennoch zeigte FGF 23 in einer Studie keinen Effekt auf die Zellen, die den NPT 2 exprimieren. Diese Zellen reagierten nur auf PTH und Phosphat.

Weiterhin scheidet FGF 23 als direktes Substrat für PHEX aus, da in Experimenten mit intaktem FGF 23, sowie N terminalen und C terminalen FGF 23 Fragmenten keine Spaltung durch PHEX erfolgte. (Benet-Pages et al., 2004)

Außerdem erfolgte der Nachweis, daß FGF 23 von einem anderem Enzym (RXXR) abgebaut wird. Statt der Beteiligung am Abbau von FGF 23 vermutet man jetzt bei PHEX eine Förderung der Expression von FGF 23. Dies sollte weiter überprüft werden. (Liu et al., 2003)

Denkbar ist auch, daß FGF 23 in vivo noch weiter zu Phosphatonin aktiviert wird. Eventuell ist FGF 23 noch nicht das endgültige Phosphatonin, sondern eine Vorform oder ein Molekül, das die Bildung von Phosphatonin stimuliert. Für Phosphatonin stehen weitere Kandidatenmoleküle zur Diskussion : Stanniocalcin 1 und 2 und MEPE (matrix extracellular phosphoglycoprotein). Stanniocalcin 1 ist bei Säugetieren im distalen Nephron vorhanden und stimuliert die Phosphatresorption. Stanniocalcin 2 befindet sich in Knochen und inhibiert den Phosphattransport. MEPE (Strewler, 2001) ist genauso wie FGF 23 (Quarles und Drezner, 2001; Quarles, 2003) und frizzled-related protein (FRP 4) (Brame et al., 2004) aus Tumorzellen bei tumor-induzierter Osteomalazie isoliert worden.

Da bei MEPE defizienten Mäusen keine Hypophosphatämie, sondern eine vermehrte Knochenmasse durch vergrößerte Osteoblastenzahl und -aktivität gefunden wurde, schließt man die Rolle dieses Proteins als Phosphatonin aus.

Es wird dennoch eine Interaktion von MEPE und PHEX angenommen, wobei PHEX die Proteolyse von MEPE hemmt und damit die Freisetzung einer proteaseresistenten Peptid-Seitenkette des MEPE Moleküls (ASARM) verhindert. Diese Peptid-Seitenkette stellt wiederum einen Inhibitor der Mineralisation (Minhibin) dar. Bei PHEX Mutationen kommt es also zu einer Erhöhung des Minhibin und damit zu einer Mineralisationsstörung. (Rowe et al., 2005)

Es ist weiter denkbar, daß MEPE multifunktionell an Prozessen der extrazellulären Matrix-Mineralisation und Zell-Anheftung beteiligt ist. (Quarles, 2003)

Um den oben genannten Zusammenhang von ADHR, XLH und Tumor induzierter Osteomalazie noch besser erklären zu können, sollte in dem Bereich

- der metabolisierenden Enzyme von FGF 23 und MEPE,
- der PHEX Substrate und Mechanismen
- der Effekte von FGF 23 und MEPE auf die Nieren und Knochen
- und weiterer Phosphatonine (z.B. FRP 4) weiter geforscht werden. (Quarles, 2003)

Denn mittlerweile wird der Begriff Phosphatonin nicht nur für einen Stoff, sondern eine Gruppe von Faktoren einschließlich FGF 23 und FRP 4 verwendet. (Schiavi und Kumar, 2004)

Wie bei der XLH beim Menschen ist auch bei Hyp und Gy Mäusen der Vitamin D Haushalt gestört und weist im Vergleich zu Kontrollmäusen hohe Serumkonzentrationen auf, die für die Hypophosphatämie relativ zu niedrig sind. Die Rolle des PHEX Gens am Vitamin D Haushalt ist noch nicht geklärt.

Phosphatonin wird für eine verminderte Calcitriolproduktion (Strewler, 2001) und den beschleunigten Abbau durch Störung des autosomalen Enzyms 1,25 Dihydroxyvitamin D 24 Hydroxylase (Beck et al., 1997; Strewler, 2001) verantwortlich gemacht.

Es scheint ein negativer Rückkopplungsmechanismus zu bestehen, da Calcitriol die mRNA Expression von PHEX indirekt über einen an den Promotor bindenden Faktor hemmt. (Hines et al., 2004)

1.3 Klinik

Die Manifestation der XLH beginnt meist im 1. oder 2. Lebensjahr mit auffallenden Symptomen, wie zunehmendem Kleinwuchs (Körperhöhe unterhalb der 3. Perzentile), sowie einer verminderten Wachstumsgeschwindigkeit (dauerhaft unterhalb der 25. Perzentile). (Schönau, 1996) Der Kleinwuchs tritt meist vor der Pubertät auf und kann während der pubertären Wachstumsphase nicht mehr aufgeholt werden. (Sochett et al., 2004)

Insbesondere beim Laufenlernen, also bei mechanischer Belastung, tritt eine zunehmende Varusstellung der Beine auf. Bei Krankheitsbeginn im Schul- oder Jugendalter ist auch eine Valgusstellung möglich.



Abbildung 2 : Beindeformitäten bei einem Kind mit XLH, Universitätsklinikum Lübeck

Weitere Symptome sind eine motorische Entwicklungsverzögerung, eine generalisierte muskuläre Hypotonie, sowie Knochenschmerzen und (Pseudo-) Frakturen.

Zu den Manifestationen bei den z.T. auch völlig beschwerdefreien Erwachsenen gehören Knochenschmerzen (auch nach abgeschlossener Behandlung), Osteoarthritis (in Abhängigkeit vom Verbiegungsgrad der Knochen) und Osteomalazie. (Ganten und Ruckpaul, 2001) Ein vermehrtes Knochenwachstum im Bereich der Muskelansätze kann zu einer eingeschränkten Beweglichkeit der Gelenke führen. (Schönau, 1996)

Desweiteren sind Verkalkungen von Sehnen, Gelenkkapseln und Ligamenten (Enthesopathie), sowie Innenohrschwerhörigkeit (Econs und White, 2000) und Spinalkanalstenosen beschrieben worden. (Schönau, 1996) Muskelschwäche oder -schmerzen bestehen nicht.

Bei Kindern erfolgt der Zahndurchbruch und -wechsel oft spät und die Inzidenz von Zahnwurzelabszessen ist zeitlebens erhöht. (Schönau, 1996) Weiterhin bestehen Zahnschmelz und Dentin Defekte. (Chaussain-Miller et al., 2003)

Auch bei Patienten ohne Phosphat-Substitution kann ein sekundärer oder tertiärer Hyperparathyreoidismus auftreten. (Schmitt und Mehls, 2004)

Die Erkrankungsschwere zeigt bei Männern und Frauen bis auf angeblich ausgeprägtere radiologische Befunde bei Männern keine Unterschiede. Der Ausprägungsgrad ist allgemein sehr variabel, sowohl innerhalb einer Familie als auch zwischen Familien mit Hypophosphatämien ohne Knochenmanifestation bis hin zu schweren Deformitäten.

Der klinische Ausprägungsgrad korreliert nicht mit dem Grad der Hypophosphatämie (Kruse, 1999).

1.4 Radiologische Veränderungen

Zu den radiologischen Befunden gehören im Säuglingsalter Becherungen und Auftreibungen der Metaphysen von Unterarmen und Beinen (siehe Abb. 3). Nach dem Laufenlernen verändern sich vor allem die Knie- und Sprunggelenksbereiche. Mediale Verbreiterungen der Epiphysen am distalen Femur und an der proximalen Tibia, sowie eine O - Beinstellung der Unterschenkel mit einem keilförmigen Defekt der überlasteten Tibiametaphyse sind charakteristisch. Bei älteren unbehandelten Patienten kommt es zu einer groben Trabekelzeichnung der Röhrenknochen (Osteomalazie) und paradoxerweise recht oft zu einer Erhöhung der Knochendichte (vermutlich durch Anhäufung von intermittierend verkalktem Osteoid). (Kruse, 1999) Objektive Knochendichtemessungen sind allerdings nicht vorhanden und gerade im Beckenbereich kann der Befund durch eine generelle Dichteerhöhung nicht eindeutig gesichert werden.



Abbildung 3, rechtes Kniegelenk und oberes Sprunggelenk eines Kindes mit XLH, Universitätsklinikum Lübeck

1.5 Diagnostik

Zu den laborchemischen Leitbefunden gehören unter der Altersnorm liegende Werte für Serumphosphat, der tubulären Phosphatrückresorption (TPR) und des Transportmaximums für Phosphat (TmP). (Kruse, 1999)

Die normale Phosphatkonzentration im Serum beträgt im Kindesalter 1,2 – 1,7 mmol/l, im Erwachsenenalter 0,8 – 1,6 mmol/l und unterliegt zirkadianen Schwankungen (bis zu 0,3 mmol/l) mit höchsten Werten gegen 4 Uhr morgens und niedrigsten Werten am Vormittag. Phosphat liegt hauptsächlich als freies Ion vor, weniger als 15 % ist an Proteine gebunden. (Ganten und Ruckpaul, 2001)

Im proximalem Nierentubulus wird Phosphat zusammen mit Natrium rückresorbiert, wobei das Transportsystem mit einem Schwellenwert im Bereich der normalen Serumkonzentration sättigbar ist. Das Verhältnis von tubulärer maximaler Phosphatresorption zu glomerulärer Filtrationsrate (TmP / GFR) beschreibt die Phosphatkonzentration im Glomerulusfiltrat, unterhalb welcher das filtrierte Phosphat vollständig resorbiert wird. Die TmP variiert in Abhängigkeit von der Phosphatzufuhr und wird am besten während einer Phosphatinfusion gemessen. Nach Bestimmung der Serum- und nüchtern Morgenurin - Werte für Phosphat und Kreatinin kann sie im Normogramm von Walton und Bijvoet (1975) bestimmt werden. Normalwerte der TmP sind 1,2 - 2,6 mmol / l im Säuglingsalter und 0,6 - 1,7 mmol / l für Erwachsene. (Ganten und Ruckpaul, 2001)

Die Laborwerte der alkalischen Serumphosphatase-Aktivität und andere Marker der Osteoblastenaktivität sind mäßig erhöht. Calcium, PTH und 25 OHD im Serum, sowie Urincalcium sind bei unbehandelten Patienten normal, der Calcitriol - Serum Spiegel ist altersentsprechend, jedoch für die Hypophosphatämie relativ zu niedrig. (Kruse, 1999)

Die veränderten Laborparameter sind nicht unmittelbar nach der Geburt, wohl aber in den ersten Lebensmonaten nachweisbar. (Ganten und Ruckpaul, 2001)

1.6 Differentialdiagnosen

Die in dieser Studie untersuchten Proben beziehen sich auf Verdachtsdiagnosen der behandelnden Kinderärzte, die auf dem klinischen Erscheinungsbild des Kindes und der Laborergebnisse basieren. Differentialdiagnostisch sind kalzipenische und weitere phosphorpenische Rachitisformen abzugrenzen.

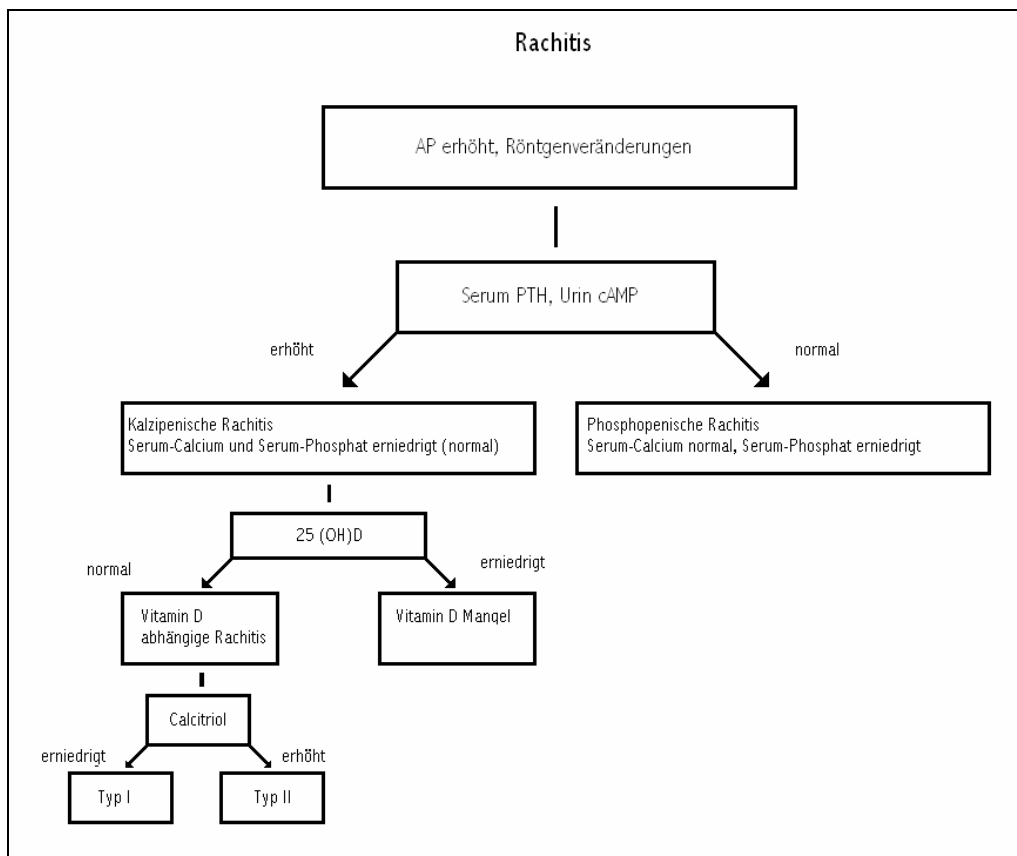


Abbildung 4 : Differentialdiagnose der Rachitis, verändert nach Kruse - Pädiatrische Endokrinologie, AP = Alkalische Phosphatase

Zu den kalzipenischen Formen gehören :

- die Vitamin D Mangelrachitis und
- die Vitamin D abhängige Rachitis Typ 1 und 2.

Bei der Vitamin D Mangelrachitis, der häufigsten Rachitisform, kommt es infolge ungenügender Sonnenexposition oder Mangel - Ernährung von Vitamin D - Derivaten zu einer verminderten Mineralisation von Osteoid. Laborchemisch fallen initial eine Erhöhung der alkalischen Serumphosphatase, sowie eine Hypokalzämie (vor Einsetzen von Kompensationsmechanismen) auf.

Bei der VDAR Typ I ist die renale Bildung von Calcitriol gestört, während bei Typ II ein Calcitriolrezeptordefekt vorliegt. (Koletzko, 2000)

Die phosphorpenischen Rachitisformen gehören aufgrund der gemeinsamen Hypophosphatämie zu den wichtigeren Differentialdiagnosen der XLH.

Zu ihnen gehören :

- die autosomal dominante hypophosphatämischen Rachitis (ADHR),
- die adulte Form des Phosphatdiabetes, die als Variante der XLH angesehen wird,
- die Tumorosteopathie (oncogenous hypophosphatemic osteomalacia (OHO) oder tumor - induced osteomalacia (TIO)),
- die Hereditäre Hypophosphatämische Rachitis mit Hyperkalzurie (HHRH),
- Das Debré–De Toni Fanconi Syndrom mit seinen vererbaren Sonderformen :
 - Dent - Syndrom und
 - Lowe Syndrom.

Die meisten weisen weitere laborchemische Charakteristika auf (siehe Abbildung 5), durch welche man sie klinisch von der XLH unterscheiden kann.

Phosphorpenische Rachitisformen	Serum				Urin				Chromosom	Genort
	Calcium	Phosphat	Calcitriol	PTH	TRP	Calcium	AS	Glukose		
XLH	n	↓	↓ / n	n	↓	n	n	n	Xp22.1	PHEX
ADHR	n	↓	↓ / n	n	↓	n	n	n	12p13	FGF 23
HHRH	n	↓	↑	n	↓	↑	n	n	?	?
Lowe Syndrom	↓ / n	↓	↓ / n	n / ↑	↓	n / ↑	↑	↑	Xq25 - 26	OCRL
Dent Syndrom	n	↓	↑	n	↓ / n	↑	n / ↑	n / ↑	Xq 11 - 22	CLCN

Abbildung 5 : Übersicht über die Laborparameter bei phosphorpenischen Rachitiden, verändert nach Kruse, Pädiatrische Endokrinologie

PTH : Parathormon, TRP : Tubuläre Phosphatrückresorption, AS : Aminosäuren, OCRL : Okulozerebronales Syndrom des Lowe Gens

Bei der ADHR gelingt die Festlegung der genauen Krankheitsursache aufgrund der identischen Symptomatik mit Rachitis, Osteomalazie, Deformitäten der unteren Extremität, Kleinwuchs, Knochenschmerzen und Zahnabszessen (The ADHR Consortium, 2000) und gleichen Laborbefunden nur durch molekulargenetische Verfahren.

Im Unterschied zur XLH liegen hier die Gendefekte auf dem (FGF) 23 Gen auf Chromosom 12 p13, welche seltener vorkommen als PHEX Mutationen. Wie bei der XLH ist der Phänotyp bei der ADHR sehr variabel. (de Beur et al., 2002)

Auch die Tumorosteopathie gleicht der XLH laborchemisch (Lipman et al, 1998), so daß bei sporadischer Osteomalazie, die nicht bereits im frühen Kindesalter auffällt, ein Tumor ausgeschlossen werden sollte. (Kruse, 1999) In diesen Tumorzellen konnte wie bei der ADHR eine FGF 23 Expression nachgewiesen werden (zur Pathophysiologie siehe Kapitel 1.2).

Es ist eine sehr seltene adulte Form des Phosphatdiabetes beschrieben worden. Da allerdings in der Studie von Econs et al. (1998) bei einem Patienten mit adultem Phosphatdiabetes und positiver XLH Familienanamnese eine Mutation auf dem PHEX Gen nachgewiesen werden konnte, ist anzunehmen, daß dieses vorerst separate Krankheitsbild doch eine variable Manifestation der XLH darstellt. (Econs et al., 1998)

Die Hereditäre Hypophosphatämische Rachitis mit Hyperkalzurie (HHRH), ein erblicher Tubulusdefekt ohne Vitamin - D Regulationsstörung, fällt, im Gegensatz zur XLH, durch einen hohen Calcitriol - Serumspiegel als Zeichen der Kompensation des Phosphatverlustes auf. Es kommt hierdurch zu einer vermehrten Kalziumaufnahme, einer Hyperkalzämie-Tendenz, sowie einer Parathormonsuppression mit Hyperkalzurie. (Kruse, 1999)

Das Debré-De Toni Fanconi Syndrom ist eine komplexe Tubulusfunktionsstörung mit Hyperphosphaturie, Glukosurie, Hyperaminoazidurie, Bikarbonat-, Kalium- und Wasserverlust. Diese Erkrankung ist entweder angeboren, im Rahmen von Begleiterkrankungen oder medikamentöser Behandlung erworben oder idiopathisch bedingt.

Zu den genetisch bedingten Formen des Fanconi Syndroms gehören:

- das Dent - Syndrom, eine X - chromosomal vererbte Tubulopathie mit Mutation des Chloridkanals 5 (CLCN 5) mit Aminoglukophosphatdiabetes und zusätzlicher Nephrokalzinose / Nephrolithiasis bei Hyperkalzurie und
- das Lowe Syndrom (okulozerebrales Syndrom) bei Tubulopathie und angeborener Katarakt, geistiger Retardierung, Muskelhypotonie und Kleinwuchs. Mutationen im OCRL Gen führen zu einer gestörten Signaltransduktion im Inositol - Phosphatstoffwechsel.

1.7 Therapie

Zur Verhinderung bzw. Beseitigung der rachitischen Knochenveränderungen und Wachstumsnormalisierung empfiehlt sich die kombinierte orale Verabreichung von Phosphat und einem Vitamin D Präparat (Calcitriol). Die Therapie sollte so früh wie möglich, bei positiver Familienanamnese schon in den ersten Lebensmonaten erfolgen, da sie sich günstig auf die Endkörpergröße auswirkt. (Mäkitie et al., 2003)

Die Phosphatzufuhr erfolgt mit einer Lösung aus Natriumdihydrogenphosphat und Natriumhydrogenphosphat (Reducto spezial oder Phosphat Sandoz Brausetabletten) in altersabhängiger Dosierung in mindestens fünf Einzeldosen, um eine kontinuierliche Erhöhung des Serumphosphatspiegels zu erreichen. Calcitriol (Rocaltrol) soll in altersentsprechender Dosierung einer phosphatinduzierten Hypokalzämie mit sekundärem oder tertiärem Hyperparathyreoidismus entgegenwirken und eine Ausheilung der Mineralisationsstörung erzielen. Bei erneut auftretender Symptomatik nach Absetzen der Therapie im Erwachsenenalter ist unter Umständen eine lebenslange Substitution erforderlich. Zur Vermeidung iatrogenen Nierenschädigungen (Nephrokalzinose durch Phosphat- und Calcitriolsubstitution) ist alle 3 - 6 Monate eine klinische und laborchemische Überwachung erforderlich. (Schönau, 1996)

Bei progredienten Fehlstellungen können Korrekturosteotomien notwendig werden, eine kinderorthopädische Betreuung ist generell zu empfehlen.

Als neuere Therapiemethode werden zusätzliche Wachstumshormongaben diskutiert.

Trotz normaler GH (Growth Hormone) Werte bei XLH sollte man bei Therapieresistenz einen (zusätzlichen) Wachstumshormonmangel in Betracht ziehen und gegebenenfalls mit GH substituieren. (Schütt et al., 2003) Aber auch ohne gleichzeitigen Wachstumshormonmangel zeigen neuere Studien verbesserte Werte des Calcium Phosphat Haushaltes bei GH Gabe und eine Wachstumsverbesserung. (Seikaly et al., 1997; Schütt et al., 2003) Dies konnte auch im Tierversuch mit Ratten bei GH und IGF 1 (Insulin Growth Factor 1) Substitution bestätigt werden. (Zoidis et al., 2002)

Die Befürchtung, daß GH ein disproportioniertes Wachstum mit einem übermäßigen Wachstum des Körperstammes begünstigt (Reusz et al., 1997, Reusz, 2001; Haffner et al., 2004), wird durch die statistische Auswertung von fünf Studien über GH Therapieansätze bei XLH widerlegt, die bei fraglich positiver Tendenz eine negative Beeinflussung ausschließen konnte. (Huiming und Chaomin, 2005)

1.8 Ziel der Arbeit

Wie in den vorangehenden Kapiteln beschrieben, ist die XLH eine schwerwiegende familiäre Erkrankung, deren Verlauf günstig durch eine frühe Phosphat-, Calcitriol- und Wachstumshormongabe beeinflusst werden kann. Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung einer effektiven, kostengünstigen und zeitsparenden Screening Methode und die Mutationsanalyse mit Erstbeschreibung von Mutationen.

Durch eine geeignete molekulargenetische Screeningmethode könnten, vor allem bei Indexfällen in der Familie, schon bei Neugeborenen Aussagen über eventuelle Mutationen im PHEX Gen gemacht werden, welche eine sehr frühzeitige Therapie ermöglichen würden.

Im Moment geben die laborchemischen und klinischen Befunde Anlaß zu einer Therapie, allerdings sind laborchemische Veränderungen erst nach ein paar Monaten auffällig, nie jedoch bereits nach der Geburt. (Kruse, 1999) Klinische Symptome treten mitunter erst im Kleinkindalter auf.

Um durch eine rechtzeitige Therapie Symptome zu verhindern, hat die frühzeitige Diagnosestellung aufgrund dieser Screeningmethode durchaus klinische Relevanz. Durch diese Arbeit soll die Diagnose einer XLH, insbesondere bei positiver Familienanamnese, erleichtert werden, damit eine schnelle Substitutionsbehandlung zur Vermeidung von klinischen Auffälligkeiten, d.h. eine Verbesserung des Phänotyps, erfolgen kann.

2 Methoden und Material

2.1 Patientenproben.

Für diese Arbeit ist ein Antrag bei der Ethikkommission eingereicht worden, der geprüft und positiv bewertet wurde.

Die Patienten sind entweder in der Kinderklinik Lübeck oder außerhalb in pädiatrischer Behandlung. Nach deren Einwilligung stehen uns DNA- oder Vollblutproben (10 - 20 ml heparinisiertes Blut) von den Patienten und nächsten Angehörigen zur Verfügung.

Die Eingangskriterien der Patienten sind Klinik und Laborparameter, die bei allen Patienten den Verdacht auf XLH entstehen lassen. Die Laborparameter und kurze Angaben zur Klinik sind in Tabelle 4 im Anhang wiedergegeben.

Bei einigen Patienten bestehen zusätzliche Diagnosen oder Verdachtsdiagnosen, die uns zum Teil bekannt sind. Bei P 47 wird zusätzlich zu dem Verdacht auf XLH ein aktivierender G Protein Defekt angenommen, da die Calcitriol Konzentration überproportional hoch war. Auch bei P48 wird ein aktivierender G Proteinddefekt vermutet. Bei P 65 kommt eine beginnende Nephrokalzinose hinzu. Bei P 69 lautet eine zusätzliche Diagnose McCune Albright Syndrom. P 1 und P 17 leiden außerdem unter einem Wachstumshormonmangel.

2.2 DNA Isolierung

Die Isolierung der DNA aus Leukozyten der Heparin Vollblutproben wurde mit dem QIAmg DNA Blood Maxi Kit von einer Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe durchgeführt. Der DNA - Gehalt wurde photometrisch bestimmt und eine Arbeitsverdünnung von 100 ng / μ l hergestellt.

2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Diese Standardmethode, die 1984 von Kary Mullis veröffentlicht wurde, ist ein Verfahren zur *in vitro* Amplifizierung von Nukleinsäurefragmenten. Der Nukleinsäuredoppelstrang wird zunächst bei ca. 94 °C denaturiert, anschließend wird das Gemisch auf eine von der Primerlänge abhängige Annealing - Temperatur abgekühlt und 15 – 25 Basen lange Oligonukleotide hinzugesetzt, die der Sequenz der 5' Enden der beiden Einzelstränge komplementär sind und als Primer fungieren. Durch Zusatz einer DNA Polymerase werden die beiden Einzelstränge zum jeweiligen Doppelstrang komplementiert (Elongation bei ca. 72 °C). Anschließend wiederholt sich derselbe Reaktionszyklus, welcher aus Denaturierung, Anheftung der Oligonukleotide sowie Extension zu neuen Doppelsträngen besteht.

Werden diese Zyklen mehrfach wiederholt, ergibt sich eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA Moleküle. (Löffler und Petrides, 1998)

Um für jedes Exon eine optimale PCR Bedingung schaffen zu können, müssen zuerst die PCR Bedingungen für jedes Exon getestet werden. Hierbei spielt vor allem die Temperatur des Annealing Schrittes, die Pufferlösung und Nukleinsäurekonzentration eine wesentliche Rolle.

2.3.1 Errechnung der Temperatur des Annealing Schrittes

Primer sind Oligonukleotide mit einer Länge von 18 – 30 bp und optimalerweise einem G/C Gehalt von 45 – 55 %. Mehrere aufeinander folgende G/ C bzw. C/G Basen zwischen dem 3' Ende des Primers und der Template DNA gewähren ein stabiles Annealing der Primer an die gewünschte DNA – Sequenz. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 1 dargestellt. Tabelle 2 zeigt die Position im Gen und die Länge der PCR Produkte an.

Die Temperatur des Annealingschrittes wird für jeweils den Sense und Antisense – Primer errechnet, indem man für jede Cytosin und Guanin Base, die in der Primer – Basenreihenfolge enthalten ist, je 4 °C addiert und für jede Thymin und Adenin Base je 2 °C (Wallace Regel). (Scheinert et al., 1995)

Aus diesen Temperaturen der Sense und Antisense – Primer errechnet man den Mittelwert und erhält die Gesamttemperatur des Primerpaares, der für die erste Testung der PCR Bedingungen je 5 °C abgezogen werden.

Gegebenenfalls können die PCR Bedingungen durch Veränderung der Annealing Temperatur optimiert werden.

Die für die 22 Primerpaare ermittelten Temperaturen sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

2.3.2 Austestung der Puffer und dNTP – Bedingungen

Nach der Ermittlung der Temperatur des Annealing – Schrittes sind für die einzelnen Primerpaare Test – PCR angesetzt worden, um die Puffer und dNTP Bedingungen zu ermitteln. Diese Test PCR sind, wie im Absatz 2.3.3 beschrieben, erstellt worden.

Folgendes Schema wurde verwendet, wobei den Proben in einer Reihe 200 µl dNTP und in einer zweiten Reihe 2 mM dNTP zupipettiert worden ist. Probe 13 fungierte als Leerprobe.

Proben-Nr	5 µl Puffer (MgCl ₂ / pH) + je 5 µl 200 µl dNTP / bzw. 2 mM dNTP + je 1 µl Primer (S + A) + 37 µl aqua + 0,1 µl Amplitaq
1	1.0 / 8.4
2	1.5 / 8.4
3	2.0 / 8.4
4	2.5 / 8.4
5	1.0 / 8.6
6	1.5 / 8.6
7	2.0 / 8.6
8	2.5 / 8.6
9	0.5 / 8.7
10	1.0 / 8.7
11	0.5 / 8.8
12	1.0 / 8.8
13	1.0 / 8.8

Von dieser Versuchsreihe sind die Ergebnisse in der Tabelle 3 dargestellt.

2.3.3 Durchführung der PCR

Die einzelnen Ansätze für die PCR enthalten :

37 µl Aqua bidest. (ggf. filtriert, hplc – high performance liquid chromatography)

5 µl 10 x Puffer (2.0 / 8.4, 2.5 / 8.4)

5 µl 200 µM dNTP oder 2 mM dNTP

1 µl Primer 1 (sense) (20 pM)

1 µl Primer 2 (antisense) (20 pM)

0,1µl Ampli Taq (Polymerase) 0,5 U bei 200 µM dNTP, oder

0,2µl Ampli Taq 0,5 U bei 2 mM dNTP und

1 µl DNA (Arbeitsverdünnung 100ng / µl).

Nach dem Vortexen und Zentrifugieren (bei 13.000 Umdrehungen / min) wurden je nach PCR-Gerät (Perkin Elmer) 3 - 4 Tropfen Mineralöl zugesetzt und folgende PCR Zyklen verwendet :

1. 5 min 94 °C
2. 1.30 min Annealing Temperatur
3. 2 min 72 °C
4. 1.15 min 94 °C

Die Schritte 2 bis 4 werden jetzt 34 mal wiederholt.

5. 1.30 min Annealing Temperatur
6. 5 min 72 °C
7. Kühlen auf 4 °C

2.3.4 Verwendete Substanzen und Geräte - PCR

Tabelle 1 : Basenreihenfolgen der PCR - Primer (5' => 3' Richtung) :

Exon	1S	GCT CTT GAG ACC AGC CAC CA	1A	ATA AAG CAC AAG GAA ACT TCT CG
	2S	ATA TCT TGC GTA TGT TTC CGA	2A	CTG TCT TCT CTT CCA CTT CC
	3S	ATT CAG TGC TTG TCA TTA ATC C	3A	TAA AGT GTA TCA CCA AAC CCC
	4S	GGA GGT TGG AAT TGT GAT TAT CA	4A	CTC TTC TTC CTC AAA CAA TAT ATT A
	5S	CTA GTG TGC TGA TCC AGT TTG C	5A	GCA GCA TGA GTC TCT TTC CC
	6S	CAT CAC TCT TGT TAA CAT GG	6A	GGC CTT AGA ACT AAT GGG C
	7S	CAT AGA AGC TAT TGT CAT GGT C	7A	GCA ATT TAT ATT TTC ATT CAG G
	8S	GAT ATC ATA CAG TAA GAA ATG G	8A	GAG ATG AAA TCC AAT CCC TTC
	9S	TCT AGA CTT GAG TAG TTG CAT C	9A	AAA GTC ACA GTA AAA TTC ATG
	10S	CTG CAG AGC ATC AGA TAT TGA C	10A	AAA GTT ATC CAG CGA TGT AAC AC
	11S	GCC ATG GGT TTT ATC CAA ATG AA	11A	GAT CTG GCT AAA TTG CCA TTA TTT
	12S	AGC ATG GAG TCA AGC TGA AAG A	12A	TGT CAA GCA TGA ACA TCC ATT AAA
	13S	AGA TGA AGG GCG CAT TTC TA	13A	TCA CCA GTT TTA ATT GCT AGG AC
	14S	GAA CAA TGA TGT TGT GGT TTG TTT	14A	AGA CTC CGC TTC TCA CCA ATG
	15S	AGC CAT GCT GTG TTT GTC TTT G	15A	CTT ACC CTC CAT CAT AGT CAT G
	16S	AGG TAC TCA TCA TTG AAT CAA TCT	16A	ATG TTC TTC CTA ATT GGT CAG TAA
	17S	AGG ATT ATG CTC TGA GAT TCA TG	17A	CAT TAT TAT AAA AGC AGC AGC TTA T
	18S	GGT GAG GGA AAG GAA AGA TG	18A	AAT GAA CCA CAA GGT GCC CC
	19S	ATA GTT GAC CGT GAA ACA CGC ATT	19A	AAC ATG GCT ATG GTA TGA ATT GAG G
	20S	TGA GCA AAG AGA AAA ACC CAC CGT T	20A	GGA GCA AAC TCA AGT CCT GCA TCT C
	21S	GCT CAT TTG TTG GGA TGC TTT TCT CT	21A	GTT AAA AAC TGC CGT CAC CCA TTT G
	22S	ACA GAA CCT GTT GAT GTG CAA GAA T	22A	GCC TCC GCT GGC ACT GTG CAA CTG

Tabelle 2 : Darstellung der 22 Exons mit ihren Basenpaarabschnitten im Gen, der Basenpaarlänge der Exons und der durch Primer begrenzte Basenpaarlänge der PCR - Produkte.

Exon	Von	Bis	bp der Exons	bp der Prod.
1	12024	12141	118	249
2	17487	17555	69	221
3	26068	26229	162	239
4	55406	55492	87	265
5	56494	56720	227	370
6	69447	69515	69	208
7	73001	73117	117	275
8	75973	76056	84	212
9	78024	78169	146	320
10	90485	90578	94	197
11	93476	93604	129	231
12	112540	112641	102	306
13	147329	147406	78	261
14	157290	157393	104	192
15	169461	169519	59	218
16	191921	191975	55	162
17	198053	198120	68	172
18	200630	200760	131	245
19	205460	205525	66	209
20	206524	206628	105	219
21	224350	224426	77	142
22	226868	226970	103	215
Gesamt			2250	

2.3.4.1 Primer

Die Primer werden nach Lieferung in 10 µl 1x TE verdünnt (Superstocklösung). 1 µl der Superstocklösung und 9 µl 1x TE ergeben eine Stocklösung mit welcher durch Zugabe einer von der Primerlänge abhängigen 1x TE Lösung eine 20 pM Arbeitslösung entsteht.

Der 1x TE Gehalt wird mit folgender Formel ausgerechnet :

Stocklösungskonzentration / (Basenzahl der Primer x 0,0066) = x µl 1x TE

Diese 1 x TE Menge gibt man zu 1µl Stocklösung hinzu.

1 x TE entspricht einer 1 : 10 Verdünnung von 10 x TE (pH 7,5)

entsprechend : 0,1 M TRIS 12,1 g/l

0,01 M EDTA (ohne Natrium) 2,92 g/l

mit anschließender Titration mit HCl auf pH 7,5.

2.3.4.2 Exemplarische Rechnung für Primer 1, Antisense

1670 µg werden in 10 µl 1x TE gelöst => 167,0 µg / µl Superstocklösung

1 µl Superstocklösung + 9 µl 1x TE => 16,70 µg / µl Stocklösung

16,70 µg / µl / (23 bp x 0,0066) = 110 µl 1x TE

110 µl 1 x TE + 1 µl Stocklösung als Arbeitsverdünnung

Für die anderen Primer sind die Mischungsverhältnisse für Stocklösungen und

Arbeitsverdünnungen nach dem gleichen Prinzip errechnet worden und Tabelle 5 im Anhang zu entnehmen.

2.3.4.3 Puffer

0.5 - 2.5 / 8.4 - 8.8 Puffer

Die Zahlenangaben des Puffers stehen für die MgCl₂ Menge und den pH Wert.

Die Puffer bestehen aus folgendem Ansatz :

500 µl 1 M KCL

200 µl 1M Tris (pH 8,4 / 8.6 / 8.7 / 8.8))

50 µl BSA

2.5 µl - 12.5 µl 2 M MgCl₂

ad 1000 µl Aqua bidest.

In Tabelle 3 sind die jeweils verwendeten Puffer für die einzelnen Exons dargestellt.

2.3.4.4 dNTP

dNTP 200 µM		10x		dNTP 2mM		10x
dGTP	100 mM	200 µM	2 µl	dGTP	100 mM 2 mM	20 µl
dTTP	100 mM	200 µM	2 µl	dTTP	100 mM 2 mM	20 µl
dATP	100 mM	200 µM	2 µl	dATP	100 mM 2 mM	20 µl
dCTP	100 mM	200 µM	2 µl	dCTP	100 mM 2 mM	20 µl
Aqua bidest			992 µl	Aqua bidest.		920 µl

2.3.4.5 DNA Polymerase und Aqua

AmpliTaq® DNA Polymerase 5 U /µl, Perkin Elmer, Firma Roche

Aqua bidest, z.T. filtriert, hplc - high performance liquid chromatography

2.3.4.6 Geräte

Zentrifuge : Fresco von Heraeus und 5415 C

Sigma, Fabrik Nr. 85312, D – 37520 Osterode am Harz (14 x 1000 rpm 1 - 15)

Rüttler : Janke + Kunkel, IKA Labortechnik, D – 7813 Staufen i. Br., Fabrik Nr. 697255

PCR - Geräte :

- PTC 200, MJ Research, D – 31833 Hess. Oldendorf, Serial Nr. ALO23163
- Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480, Norwalk CT 06856 USA, Serial Nr. P 12965

Eppendorf Pipetten

2.4 Agarose Gel Elektrophorese

Zur Bewertung der PCR Ergebnisse wurden 2-prozentige Agarose Gele (2.0 g Agarosepulver und 100 ml 1 x TBE) hergestellt.

Je 5 µl der PCR Produkt Lösung sind 5 µl Agarosefärbepuffer (Bromphenolblau – Farbpuffer) zugesetzt worden. Bei 100 V dauert die elektrophoretische Auftrennung ca. 40 - 50 min..

Die Färbung der Agarosegele erfolgt mit Ethidiumbromid (2 µg / ml, entsprechend 50 µl Stammlösung (10 mg EtBr / ml Aqua bidest.) + 250 ml Aqua bidest.) und Aqua bidest über je 10 min.. Das Gel wird unter UV Licht und als Photographie bewertet. Die Basenlängen der PCR Produkte werden mit Hilfe des Markers überprüft und Kontaminationen durch die Leerprobe ausgeschlossen.

2.4.1 Verwendete Substanzen und Geräte - Agarosegel

2,0 g Agarose (Biozym Agarose DNA > 500 Bp, D 31833 Hess. Oldendorf)

1 x TBE , 1 : 10 verdünntes 10 x TBE (pH 8.3; 0.90 M TRISMA Base (1090 g / 10 l), 0,90 M Borsäure (566.5 /10l) und 0,025 M EDTA mit Na (93.0 /10l))

Agarosefärbepuffer (Bromphenolblau – Farbpuffer) (50 % Glycerin (25 ml / 50 ml), 0,02 %

Bromphenolblau (10µl / 50 ml), 0,01 M Tris pH 8.0 (0,5 ml 1 M Tris pH 8.0);

0,1 % SDS, 3 mM EDTA (0,3 ml 0,5 M EDTA))

Marker für Agarosegele : 98 µl Agarosefärbepuffer (oder Bluestop) + 2 µl Marker Ø x 174

Hae III Digest (New England Biolabs Inc.), Verhältnis 1 : 50; 10 µl entsprechen 200 ng

Mineral Oil Firma Sigma, PO Box 14508 St. Louis, MO

Eppendorf Pipetten

Elektrophoresis Power Supply EPS 3500, 110 V

Elektrophoresegerät : Biometra P22 110 V

Elektrophoresekammer : Bio RAD, DNA SuB CELL TM (Biometra)

UV – Gerät : Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, Ca., MACRO Vue UV 25, 230 V

Kamera : DS 34 Roland, Polaroid

2.5 SSCP Gel - Elektrophorese

SSCP steht für Single - Strand Conformation Polymorphism und ist ein Polyacrylamid Gel Elektrophorese – Verfahren bei dem die Wanderung der DNA Stränge von der Sekundärstruktur abhängig ist.

DNA Einzelstränge werden durch Silberfärbung dargestellt, wobei auch die Doppelstränge erkennbar sind. Aufgrund von Temperaturänderungen, leicht variablen pH Werten oder anderen Spannungen laufen diese Einzel- und Doppelstränge unterschiedlich schnell und weit (Orita et al., 1989), so daß auch bei der gleichen Probe auf zwei verschiedenen Gelen ein anderes Gelmuster auftreten kann. Die Proben sind also jeweils auf dem Gel mit der Normalprobe und dem Marker zu vergleichen.

Es sind 10 % SSCP Gele mit folgender Zusammensetzung erstellt worden :

15 ml	10 x TBE
30 ml	30 % PAA
15 ml	Glycerin
89 ml	Aqua bidest.
1 ml	10 % APS
70 µl	TEMED

Dieser Ansatz wird zwischen zwei Glasplatten, die mit Klebeband an 3 Seiten abgedichtet sind, luftblasenfrei gegossen und mit einem Kamm versehen. Nach etwa einer Stunde ist das Gel polymerisiert und kann, nach Entfernung des unteren Klebebandes, in das Elektrophoresegerät eingespannt werden und evtl. mit 1 prozentigem Agarosegel (2.0 g Agarose + 200 ml 1x TBE) zusätzlich abgedichtet werden. Die Taschen werden mit 1 x TBE Puffer bedeckt und gespült.

Zu je 15 ml PCR Produkt, bzw. 15 ml SSCP Marker, werden 10 ml Bluestop Farbpuffer pipettiert. Diese Proben werden bei 72 °C auf dem Heizblock denaturiert und anschließend auf Eis gelagert. Der Marker, die Leerprobe und eine Normalprobe (N4 nd) werden bei Raumtemperatur belassen. Anschließend erfolgt das Pipettieren dieser Ansätze in die Taschen des Gels. Bei einer Einstellung von 12 Watt ist die Elektrophorese nach ca. 18 Stunden abgeschlossen und die Gelbanden können mit Silberfärbung dargestellt werden.

2.5.1 Silberfärbung

Die Banden auf den SSCP Gelen werden nach folgendem Färbeprotokoll sichtbar gemacht:

5 min.	10 % Ethanol (100 ml 100 % iger Ethanol + 900 ml Aqua bidest.)
3 min.	1 % Salpetersäure (15 ml 65 %ige Salpetersäure (HNO ₃) + 985 ml Aqua bidest.)
2 x 1 min.	Aqua bidest.
40 min.	Silbernitrat (AgNO ₃) (2,02 g / l)
2 x 1min.	Aqua bidest.
bis 5 min.	Entwickler ((29,6 g Na ₂ CO ₃ + 540 µl 37 prozentiges Formaldehyd) / l)
< 1 min.	10 % Essigsäure (HAC) (100 ml 100 %ige Essigsäure + 900 ml Aqua bidest.)
5 min	50 mM EDTA (pH 8.0) (200 ml (0,25 M EDTA) + 800 ml Aqua bidest.)
5 min.	Aqua bidest.

Nach dem Färbevorgang wird das Gel zur Aufbewahrung eingeschweißt.

SSCP Gele sind im Ergebnisteil dargestellt.

2.5.2 Verwendete Substanzen und Geräte - SSCP

Polyacrylamid - Gel

Glycerol (Glycerin) C₃H₈O₃ 99 % Glycerol Firma : Sigma

Temed = N,N,N',N' – Tetramethylethylenediamine (min. 99%), Firma : Sigma

10 x TBE (pH 8.3), 0,90 M TRISMA Base (1090 g / 10 l), 0,90 M Borsäure (566.5 /10l), 0,025 M EDTA mit Na (93.0 /10l)

30 % PAA (Polyacrylamid, Rotiphorese)

10 % APS (Ammoniumpersulfat) (10 g + 90 ml Aqua bidest.)

Aqua bidest.

Marker für SSCP Gele

98 µl Agarosefärbepuffer (kein Bluestop) + 2 µl Marker Ø x 174 Hae III Digest

Farbpuffer

Bluestop – Farbpuffer (28,5 ml 95 % iges Formaldehyd + 0,22 g 20 mM EDTA + 0,015 g 0,05 % iges Bromphenolblau + 0,015 g 0,05 % iges Xylene Cyanol)

Färbeprozess

Ethanol : (C₂H₅OH) min. 99,8 % rein, absolut (zur Analyse), 46.07 g / mol. 1 l = 0,79 kg,

Firma : Merck, 64271 Darmstadt, Germany

Salpetersäure (Nitric acid) 65 % Suprapur® Firma : Merck

Essigsäure (Eisessig) 100 % Firma : Merck, D-64271 Darmstadt, Germany

Formalin (min. 37 %), Firma Merck, D-64271 Darmstadt

0,25M EDTA pH 8,0 (Firma : Sigma) 0,25 M EDTA = 93.05 g / l

93.05 g EDTA + ca. 10 NaOH Plätzchen (pH 8.0) mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen

Material

Eppendorf Pipetten

Rührer : Magnetomix MIII, Colora Messtechnik GmbH

Heizblock : Techne Dri-Block® DB.2A Firma : Labtech international GmbH D-09235

Burckhardtsdorf

Gelkammern : Model S2 – Sequencing Gel Electrophoresis Apparatus, Cat Series 1105, Life Technologies Inc., Gaithersburg, Md 20898 USA

Elektrogerät : Pharmacia, LKB, ECPS 3000/150

Behälter zum Färben (Glas) : Duran ® Schott Glaswerke Mainz (379 x 320 mm)

Metallbehälter : Duran ® Schott Glaswerke Mainz (475 x 355mm)

Schüttler : IKA ® Schüttler, MTS 4 electronic Janke + Kunkel GmbH, D-7813 Staufen i. Br.

Absauggerät : KNF Neuberger D-79112 Freiburg, Type N 035

2.6 Sequenzierung

Die Sequenzierungen sind wie in folgenden Absätzen beschrieben durchgeführt worden.

2.6.1 Aufreinigen von PCR – Produkten

Vor dem Sequenzieren werden je 3 PCR von demselben Probanden erstellt, gepoolt und mittels einer Qiagensäule aufgereinigt um den DNA – Gehalt per Probe zu erhöhen und die DNA Fragmente von 100 bp bis 10 kb von Nukleotiden, Salzen, Primern und Polymerasen zu reinigen.

In Anlehnung an das Handbuch (QIAquick Spin Handbook - QIAquick PCR Purification Kit using a microcentrifuge) sind folgende Schritte durchgeführt worden :

Gemäß Anleitung wurden dem BE Puffer 96 - 100 prozentiges Ethanol zugeführt. Zentrifugiert wird jeweils bei 10.000 g (13.000 rpm)

Pro Einheit PCR Produkt werden 5 Einheiten PB Puffer zugesetzt. Die QIAquick Säule wird auf ein 2 ml Gefäß aufgesetzt und das PCR Produkt auf die Säule gegeben. Anschließend wird für 30 - 60s zentrifugiert um die DNA zu binden. Die durch die Säule gelaufenen Flüssigkeit wird verworfen. Zum Reinigen wird 0.75 ml PE Puffer zugegeben und für 30 - 60s zentrifugiert. Verwerfen der durch die Säule gelaufenen Flüssigkeit und erneute Zentrifugation für eine Minute. Aufsetzen der QIAquick Säule auf ein sauberes 1,5 ml Gefäß. Um die DNA zu lösen, werden 50µl EB Puffer (10 mM Tris Cl, pH 8,5) oder Aqua auf die Mitte der Säule pipettiert und 1 Minute zentrifugiert.

2.6.2 Primer – Verdünnung

Die Erstellung der Primer Arbeitsverdünnungen erfolgt nach dem bereits in Kapitel 2.3.4.1 beschriebenen Verfahren. Im Gegensatz zu den Arbeitsverdünnungen, bei dem die Verdünnung mit 1x TE erfolgt, erfolgt sie bei Sequenzier - Primern mit Aqua bidest.

1 : 10 Verdünnung des Primers mit Aqua bidest. als Superstocklösung

1µl Superstocklösung + 9 µl Aqua bidest. (1 : 100 Verdünnung) => Stocklösung

Ausrechnung der Menge Aqua bidest. für die Arbeitsverdünnung mittels folgender Formel :

Stocklösungskonzentration (µg / µl) / (Basenzahl x 0.0066) = x µl Aqua bidest.

Dieses Volumen Aqua bidest. + 1µl Stocklösung => 10 pM Primer Arbeitsverdünnung

Basenreihenfolge der Sequenzier - Primer (5' => 3 ' Richtung) :

Exon	1S	ACC AGC CAC CAA ACC AC	1A	AGG AAA CTT CTC GAC AC
	2S	CGT ATG TTT CCG AGG	2A	CTT CCA CTT CCC AAG
	3S	TTG TCA TTA ATC CTA TG	3A	TCA CCA AAC CCC AGT
	4S	TGT GAT TAT CAA ATG	4A	CAA TAT ATT AAA ACA
	5S	GAT CCA GTT TGC AAT T	5A	TGA GTC TCT TTC CCC AG
	6S	TGT TAA CAT GGT ACG	6A	AGA ACT AAT GGG CCT GA
	7S	TAT TGT CAT GGT CAC T	7A	ATT TTC ATT CAG GAT A
	8S	CAG TAA GAA ATG GTT C	8A	TCC AAT CCC TTC TAA
	9S	GAG TAG TTG CAT CTT G	9A	GTA AAA TTC ATG TGA
	10S	ATC AGA TAT TGA CCT A	10A	CAG CGA TGT AAC ACT GC
	11S	TTT ATC CAA ATG AAG TT	11A	TTG CCA TTA TTT TTT GC
	12S	TCA AGC TGA AAG AAC C	12A	ACA TCC ATT AAA CCA
	13S	AGG GCG CAT TTC TAC AT	13A	TTA ATT GCT AGG ACT TG
	14S	TGT GGT TTG TTT TAT TTC	14A	CTT CTC ACC AAT GTA TT
	15S	TGT TTG TCT TTG CTT CC	15A	ATA CCA GGT TAC CAA GG
	16S	TTG AAT CAA TCT CTC	16A	ATT GGT CAG TAA CTG
	17S	TCT GAG ATT CAT GCT TG	17A	GCT TAT AAA ATG AAC CG
	18S	GGA AAG GAA AGA TGA AT	18A	CAA GGT GCC CCC CTT
	19S	GAA ACA CGC ATT CAT	19A	GTA TGA ATT GAG GTA C
	20S	AAA ACC CAC CGT TGC A	20A	AGT CCT GCA TCT CAT C
	21S	GCC GTC ACC CAT TTG CC	21A	GGG ATG CTT TTC TCT TC
	22S	TGC AAG AAT TAT ATG AC	22A	AAC TGT CTC AGG ATG CC

2.6.3 Sequenzierung - PCR

Angelehnt an das „Cycle Sequencing Protocol – SequiTherm EXCEL II Long Read DNA Sequencing Kit-1f (Epicentre Technologies) sind für die Sequenzierungs - PCR die nächsten Schritte durchgeführt worden :

2.6.3.1 Erstellung eines “Template Mix”

Der Template Mix enthält für jede Probe :

7,2 µl SequiTherm EXCEL II Sequencing Puffer

1µl 10 pmol ALF markierte Primer (Antisense und Sense)

2 µl Template DNA (PCR – Produkt)

5,8 µl Aqua bidest.

1µl SequiTherm EXCEL II DNA Polymerase (5U/µl),

und wird auf Eis erstellt und vor dem Pipettieren gevortext.

Für jede Probe werden dann 4 Tubes mit

2 µl SequiTherm Excel II Long Read Termination Mix G

2 µl SequiTherm Excel II Long Read Termination Mix A

2 µl SequiTherm Excel II Long Read Termination Mix T

2 µl SequiTherm Excel II Long Read Termination Mix C

erstellt.

Diese Tubes werden auf Eis gelagert und je 4 µl des Template Mixes hinzupipettiert.

Anschließend Vortexen, Abdecken mit Mineralöl und Zentrifugation.

2.6.4 PCR - Zyklus

Folgender Zyklus wurde für die Sequenzer - PCR verwendet :

1. 5 min. 95 °C
2. 30 sec. 95 °C
3. 15 sec. 60 °C
4. 60 sec. 70 °C

Die Schritte 2 – 4 werden 24-mal wiederholt.

5. 4 °C – open end

Zugabe von 3 µl Loading Buffer und Beginn der Elektrophorese oder Lagerung bei – 20 °C

2.6.5 Sequenzierung - Gel Elektrophorese

Anfertigung des Geles mit :

80 ml Sequagel – 6

20 ml Sequagel complete

800 µl APS.

Nach dem Mischen wird die Lösung in die präparierte Gelkammer gespritzt und härtet in ca. 90 min – 2 Std. aus.

Zentrifugation der Tubes nach Beendigung der PCR um das Mineralöl abzutrennen, anschließendes Denaturieren auf dem Heizblock bei 72 °C für 5 min. und sofortige Lagerung auf Eis. Pipettieren von 3 µl Probe in die bereits gespülten Slots und Beginn der Elektrophorese, nach dem Hinzufügen von 1x TBE Puffer.

2.6.6 Verwendete Substanzen und Geräten – Sequenzierung

QIAquick PCR Purification Kit

SequiTherm EXCEL II Long Read DNA Sequencing Kit ALF

Heizblock

Sequenziergerät Pharmacia Biotech, ALF Express

1 x TBE als 1 : 10 Verdünnung von 10 x TBE (pH 8.3), 0.90 M TRISMA Base (1090 g / 10 l),
0,90 M Borsäure (566.5 /10l), 0,025 M EDTA mit Na (93.0 /10l)

Eppendorf Pipetten

3 Ergebnisse

3.1 PCR - Bedingungen

Wie in Absatz 2.3 beschrieben sind folgende PCR-Bedingungen der Exons erarbeitet worden.

Tabelle 3 : PCR – Bedingungen für die einzelnen Exons :

Exon	Basenpaarlänge des Produktes	Puffer	dNTP	AmpliTaq Units	Annealing Temperatur °C
1	249	2.0/8.4	200µM	0.5	59
2	221	2.0/8.4	200µM	0.5	55
3	239	2.0/8.4	200µM	0.5	55
4	265	2.0/8.4	200µM	0.5	59
5	370	1.5/8.4	2 mM	1.0	59
6	208	2.0/8.4	200µM	0.5	55
7	275	2.0/8.4	200µM	0.5	55
8	212	2.0/8.4	2 mM	1.0	54
9	320	2.0/8.4	2 mM	1.0	54
10	197	1.5/8.4	2 mM	1.0	59
11	231	2.0/8.4	200µM	0.5	59
12	306	2.5/8.4	200µM	0.5	59
13	261	1.5/8.4	2 mM	1,0	56
14	192	2.0/8.4	200µM	0.5	59
15	218	2.0/8.4	200µM	0.5	59
16	162	2.5/8.4	200µM	0.5	59
17	172	2.0/8.4	200µM	0.5	59
18	245	2.0/8.4	200µM	0.5	56
19	209				
20	219	2.0/8.4	200µM	0.5	69
21	142	2.0/8.4	200µM	0.5	69
22	215	2.0/8.4	200µM	0.5	69

3.2 Multiplex PCR

Um eine möglichst effektive Screening Methode zu erarbeiten, wurden Exons mit gleichen Bedingungen (Temperatur, Puffer, dNTP) und einem, aufgrund unterschiedlicher Basenlängen im SSCP Gel, differenzierbarem Bandenmuster in einem Tube – Ansatz amplifiziert.

Bei folgenden Exons konnten diese Bedingungen ermittelt werden :

Exon 2 + 7

Exon 3 + 6

Exon 5 + 10

Exon 12 + 16

Hierzu sieht das PCR – Protokoll folgendermaßen aus :

Für einen Multiplex – Ansatz enthalten die einzelnen Proben :

37 µl Aqua bidest.

5 µl 10 x Puffer (z.B. 2.0 / 8.4)

5 µl dNTP 200 µM

1 µl Primer 1 (sense – Primer des einen Exons) (20 pM)

1 µl Primer 3 (sense – Primer des anderen Exons) (20 pM)

1 µl Primer 2 (antisense zu Primer 1) (20 pM)

1 µl Primer 4 (antisense zu Primer 3) (20 pM)

0,15 – 0,2 µl Ampli Taq (Polymerase) 0,5 U

Zur Veranschaulichung der SSCP Gele mit Multiplex PCR Ansatz zeigt Abbildung 6 einzelne Ansätze mit den Exons 3,6 und 2,7 und die Multiplex Ansätze von Exon 3 + 6, sowie 2 + 7 und Abbildung 7 Einzel und Multiplexansätze der Exons 12 und 16.

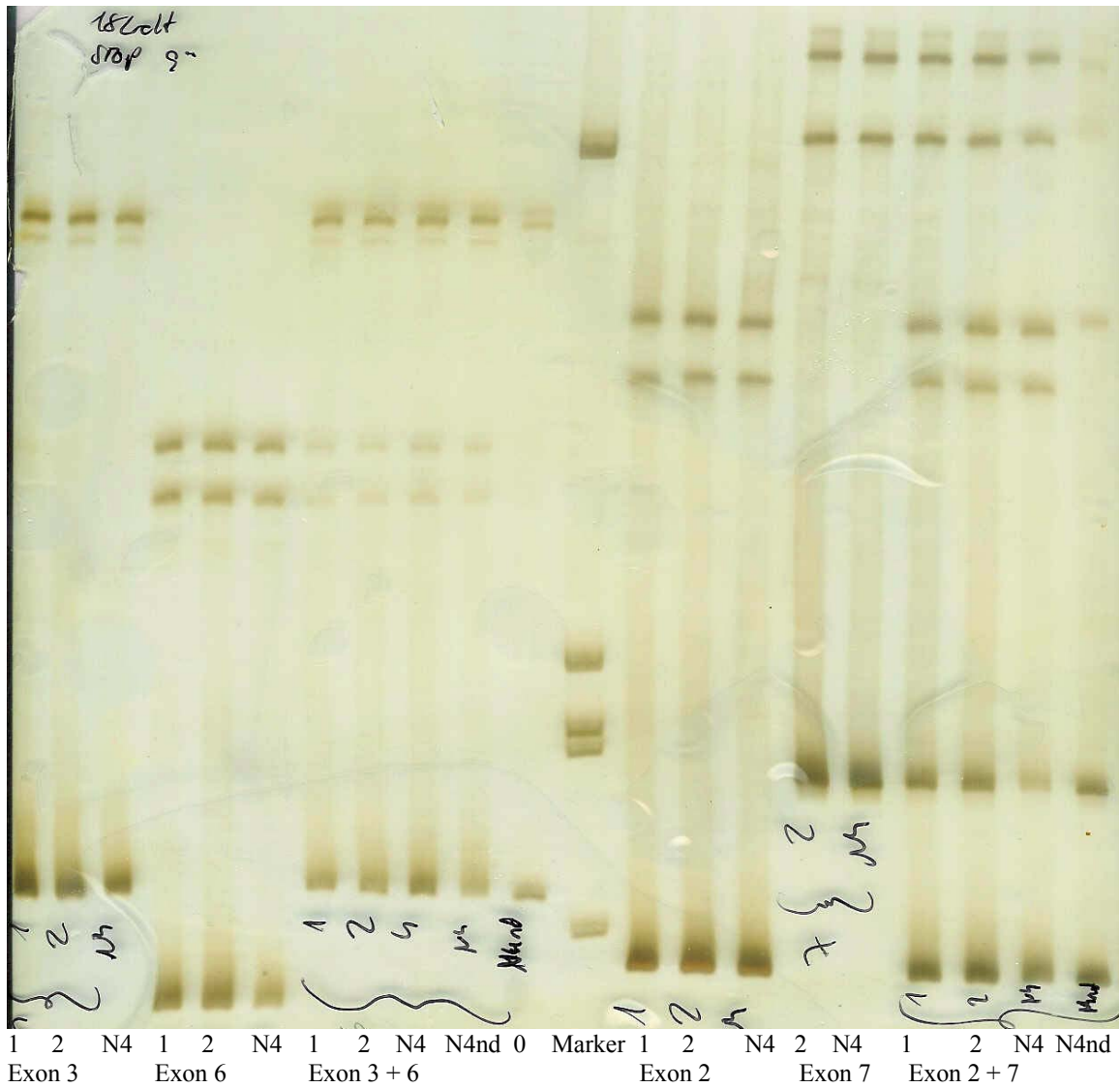


Abb. 6 : SSCP Gel, Multiplex Ansatz : Exon 3, 6 und 3+6, Exon 2, 7 und 2+7. Das Bandenmuster der Einzelansätze entspricht dem des Multiplex Ansatzes.

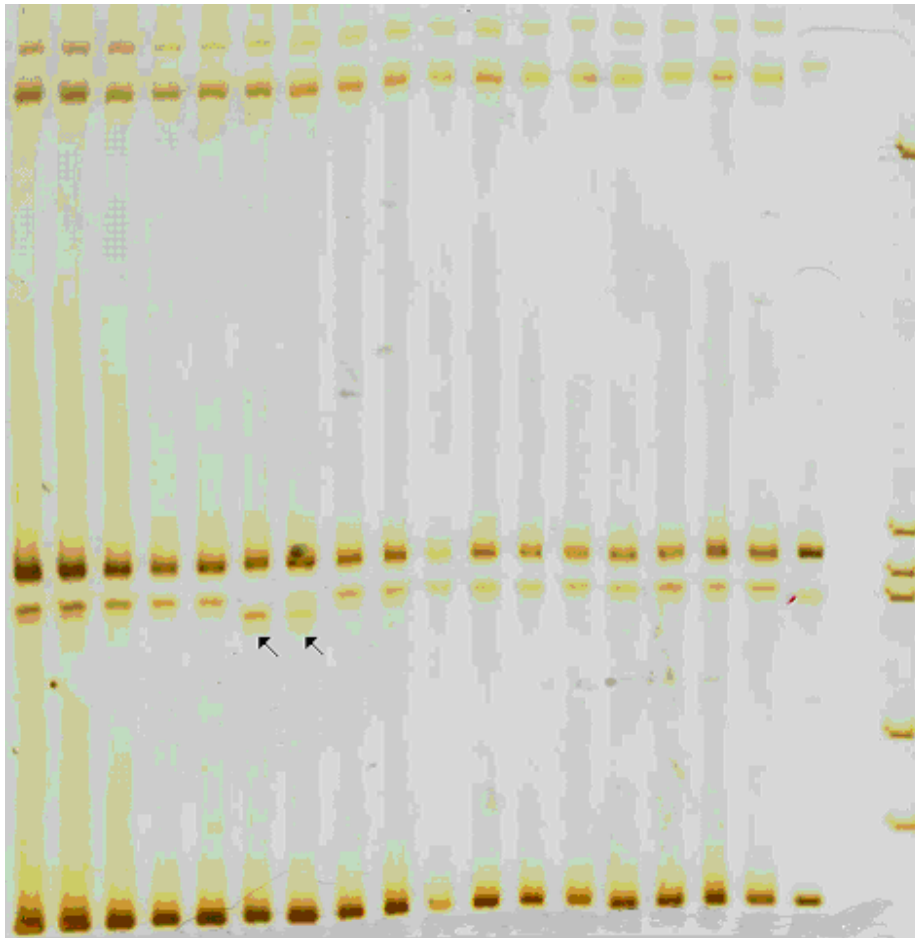
3.3 Auswertung der SSCP Gele

Auf den SSCP Gelen sind die Einzelbanden als feinere, schwächere Strukturen, die langsamer gelaufen sind, und die stärkere Doppelbande der amplifizierten DNA Abschnitte der einzelnen Exons sichtbar.

Sind Veränderungen in der DNA Sequenz vorhanden, weicht das Bandenmuster von der Normalprobe ab. (Sunnucks et al., 2000) Bei heterozygoten Patienten zeigen sich oft zusätzliche Banden, sowohl bei der Doppelbande, als auch bei den Einzelbanden.

Die SSCP Befunde können je nach Mutation auffällig, aber auch sehr diskret sein. Minimale Veränderungen der Distanz zwischen einzelnen Banden, sind z.T. nur durch Ausmessen mit dem Lineal erkennbar. Bei Veränderungen im SSCP Gel kann man keine Aussagen über den Schweregrad der Mutation treffen, außerdem sind nur Proben eines Gels untereinander mit der Normalprobe vergleichbar und nicht mit anderen Gelen, da diese Methode auf unterschiedliche Spannung, Temperaturen und pH - Werte sensibel reagiert. (Sunnucks et al., 2000)

Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch unterschiedliche Mutationen auf verschiedenen Exons.



52 53 54 57 59 61 62 63 64 65 76 67 68 69 70 71 N4 N4nd 0 Marker
 Abbildung 7 : SSCP Gel, Multiplex Ansatz der Exon 12 und 16 (80 % der Originalgröße)

Bei P61 und P62 sind Veränderungen im Bandenmuster bei Exon 16 erkennbar, die auf Mutationen schließen lassen. Es handelt sich um Mutter (P62) und Sohn (P61), die dieselbe Mutation aufweisen, wobei die Mutter heterozygot ist (erkennbar an den Einzelbanden sowohl in Höhe der Normalprobe als auch in Höhe der Mutation bei Probe 61).



5 7 8 72 73 N4 0 Marker
Abbildung 8 : SSCP Gel Exon 3

P5 zeigt einen kürzeren Abstand von Doppelbande zu Einzelbande, was auf eine Mutation schließen läßt. P8 (Mutter) und P7 (Tochter) weisen dieselbe Mutation auf. Es handelt sich um heterozygote Träger der Mutation. P72 erscheint auch heterozygot mit einem auffälligen Muster bei den Einzelbanden.

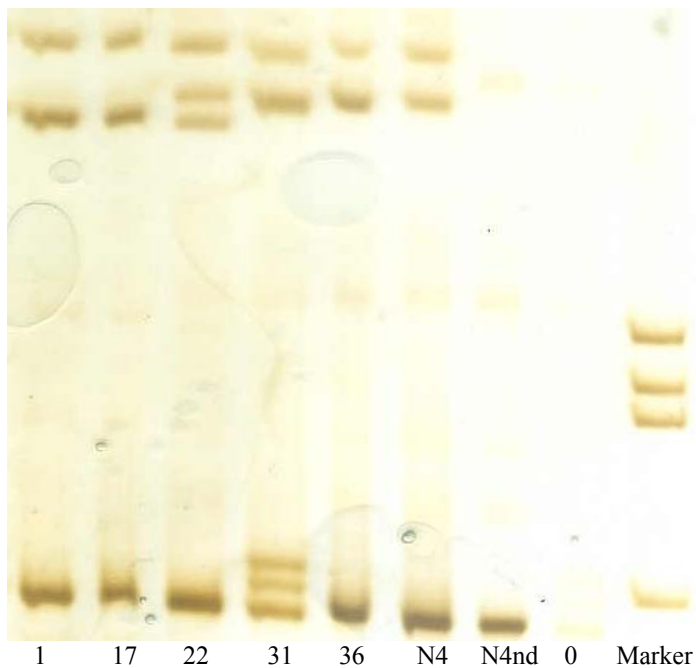
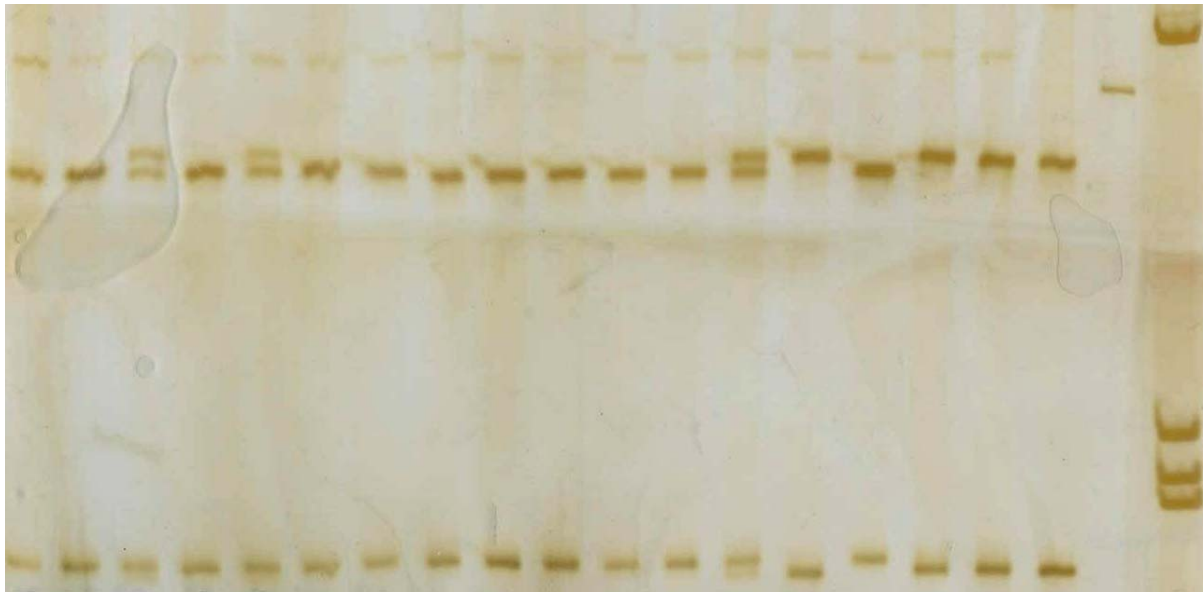


Abbildung 9 : SSCP Gel Exon 22

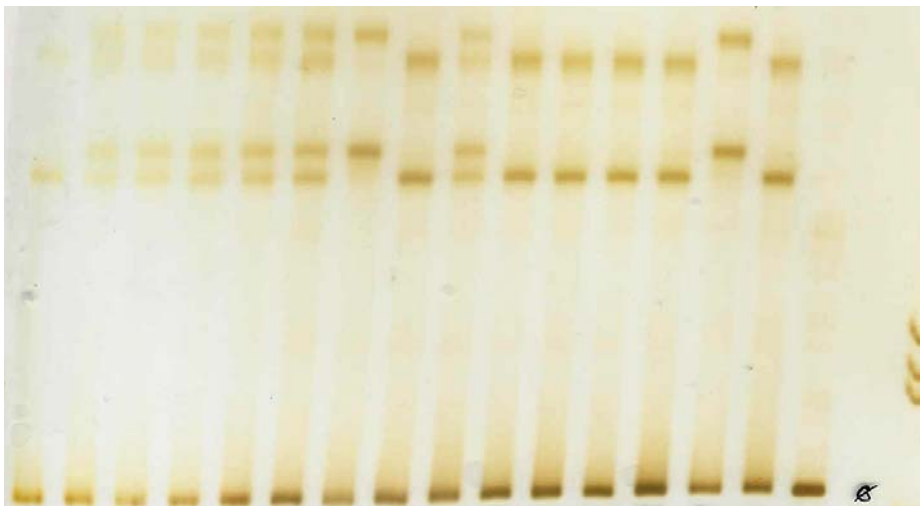
P1 und P17 sind Brüder, die identische Mutationen aufweisen. Auch P22 weist (durch Sequenzierung nachgewiesen) dieselbe Mutation auf, allerdings ist der weibliche Patient P22 im Vergleich zu P1 und P17 heterozygot.

Während bei P31 im Doppelbandenbereich eine Mutation deutlich zu erkennen ist, findet sich bei P36 nur eine diskrete Vergrößerung des Abstandes zwischen den beiden Einzelbanden, die auch auf einer Mutation auf diesem Exon beruht.



37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 N4 N4nd 0
Abbildung 10 : SSCP Gel, Exon 18 (75 % der Originalgröße)

Es ist ein Polymorphismus erkennbar, der sich sowohl im Einzel- wie auch im Doppelbandenmuster wiederfindet.



4 6 13 15 20 27 44 45 47 48 49 50 51 67 N4 N4nd 0
Abbildung 11 : SSCP Gel, Exon 1

Abbildung 11 zeigt einen Polymorphismus bei Exon 1 ähnlich wie Abbildung 10 bei Exon 18. Im Unterschied zu Exon 18 ist der Polymorphismus bei Exon 1 nur im Bereich der Einzelbanden erkennbar.

3.4 Auffälligkeiten im SSCP Gel

Bei folgenden Proben sind bei entsprechenden Exons Auffälligkeiten entdeckt worden :

Exon	Probe Nr.
Exon 1	6, 13, 15, 20, 27, 44, 48, 67 (Polymorphismus)
Exon 2	
Exon 3	5, 7, 8, 72, 73
Exon 4	40
Exon 5	46
Exon 6	37, 68
Exon 7	29
Exon 8	
Exon 9	13, 26, 35, 38
Exon 10	41, 51, 64
Exon 11	65
Exon 12	47
Exon 13	
Exon 14	
Exon 15	14, 19, 39
Exon 16	27, 61, 62
Exon 17	2, 3
Exon 18	Polymorphismus; 6, 9
Exon 19	
Exon 20	16
Exon 21	
Exon 22	1, 17, 22, 31, 36

3.5 Sequenzierungen

Bei Auffälligkeiten, ist zunächst ein weiteres SSCP Gel mit der betreffenden Probe angefertigt worden, um Fehler auszuschließen. Lag auch bei dem zweiten SSCP Gel eine Auffälligkeit vor, ist eine Sequenzierung angefertigt worden.

Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch Sequenzierungsergebnisse :

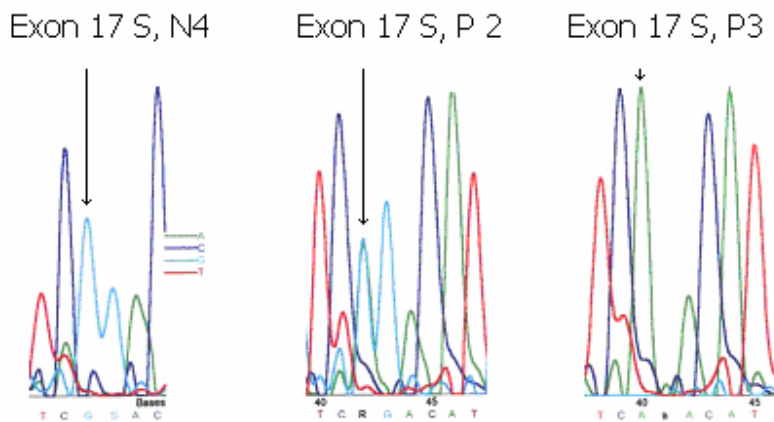


Abbildung 12 : Sequenzierung Exon 17 S, N4, P2, P3

Abbildung 12 zeigt Sequenzierungsausschnitte von Exon 17 S (Sense-Strang) bei N4 (Normalprobe), P2 und P3. Bei diesem Zwillingsspaar handelt es sich um eine c.1735 G>A Mutation. An Stelle 579 der Aminosäuresequenz kommt es durch diese Punktmutation zu einer Veränderung von Glycin zu Arginin.

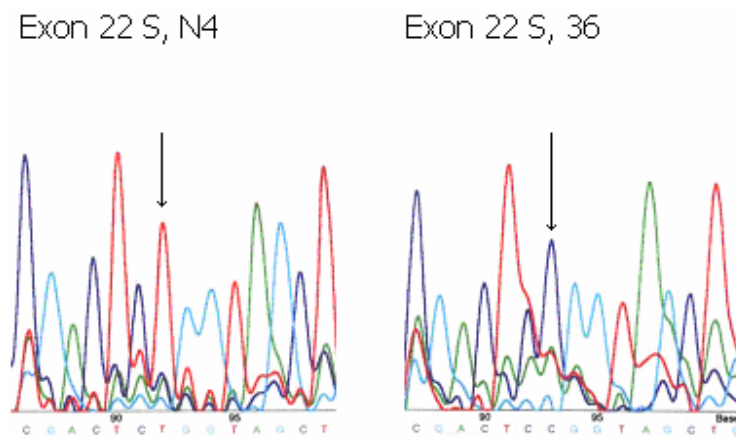


Abbildung 13 : Sequenzierung von Exon 22 S, N4 und P36

Hier ist ein Ausschnitt der Sequenzierung von Exon 22 bei N4 (Normalprobe) und P36 zu sehen. Es handelt sich um eine Punktmutation, deren genaue Bezeichnung c.2245 T>C ist. Bei Aminosäure 749 kommt zu einer Veränderung von Trypsin zu Arginin.

Die Sequenzierungen haben folgende Mutationen darstellen können :

Exon	Mutation	Codon	Bezeichnung	Probe Nr.	Anmerkung
3	deletion, frameshift => stop	c.208.delGTAAA	novo	P 72	Mutter von P 73
3	deletion, frameshift => stop	c.208.delGTAAA	novo	P 73	Sohn von P 72
3	replacement => stop	c.303 T>A 101 Tyr zu Stop	novo	P 5	
3	insertion, frameshift => stop after 2 aa	c.330.ins A Asn zu Lys, stop	novo	P 7	Tochter von P 8
3	insertion, frameshift => stop after 2 aa	c.330.ins A Asn zu Lys, stop	novo	P 8	Mutter von P 7
4	deletion, frameshift => stop	c.402.del A Lys to Ser	novo	P 40	
5	deletion	c.543.del AGAG	novo	P 46	
6	deletion	c.704.del A 235 Tyr zu Ser	novo	P 37	
7	replacement, stop	c.832 G>T 278 Glu zu Stop	E278X	P 29	
9	deletion	c.958.delAAG Lys lost	novo	P 38	
9	replacement	c.1022 T>A	novo	P 35	
11	replacement, stop	c.1180 C>A Glu zu Stop	novo	P 65	
15	replacement, missense	c.1600 C>A Pro zu Tyr	novo	P 39	
15	replacement, missense	c.1601 C>T 534 Pro zu Leu	P543L	P 14	

Exon	Mutation	Codon	Bezeichnung	Probe Nr.	Anmerkung
15	replacement, missense	c.1601 C>T 534 Pro zu Leu	P543L	P 19	
16	replacement, missense	c.1699 C>T 567 Arg zu Stop	R567X	P 27	
16	replacement, missense	c.1699 C>T 567 Arg zu Stop	R567X	P 61	Sohn von P 62
16	replacement, missense	c.1699 C>T 567 Arg zu Stop	R567X	P 62	Mutter von P 61
17	replacement, missense	c.1735 G>A 579 Gly zu Arg	G579R	P 2	Zwilling von P 3
17	replacement, missense	c.1735 G>A 579 Gly zu Arg	G579R	P 3	Zwilling von P 2
18	insertion, frameshift	c.1783.insTGAT 593 Ile zu Ile	bekannt	P 9	
20	insertion, frameshift => stop	c.1974.ins 5bp 658 TGA	novo	P 16	
22	deletion, frameshift	c.2193.del T 731 Phe zu Leu	novo	P 31	
22	replacement, stop	c.2239 C>T 747 Arg zu Stop	R747X	P 1	Bruder von P 17
22	replacement, stop	c.2239 C>T 747 Arg zu Stop	R747X	P 17	Bruder von P1
22	replacement, stop	c.2239 C>T 747 Arg zu Stop	R747X	P 22	heterozygot
22	replacement, stop	c.2245 T>C 749 Trp zu Arg	W749R	P 36	

Die Sequenzierung des Polymorphismus bei Exon 1 ergab :

Exon	Mutation	Codon	Bezeichnung	Probe Nr.	Anmerkung
1		c.33 C>T 5'UTR	5UTR33	P 44	18 % heterofrequency
1		c.33 C>T 5'UTR	5UTR33	P 67	18 % heterofrequency

Die folgende Abbildung gibt eine Übersicht über die bereits bekannten und in dieser Studie erstbeschriebenen Mutationen mit ihrer Lokalisation auf den Exons des PHEX Gens.

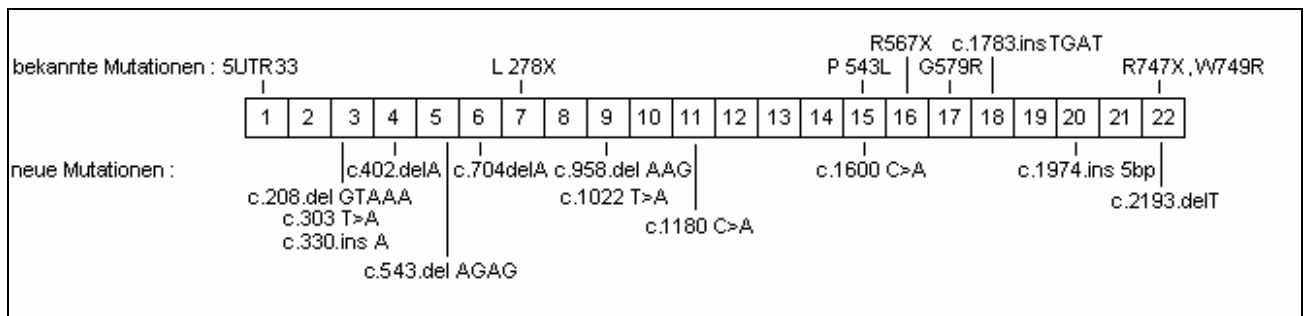


Abbildung 14 : Übersicht der in dieser Studie beschriebenen Mutationen mit ihrer Lokalisation auf dem PHEX Gen.

Im Rahmen dieser Arbeit sind insgesamt 69 Proben aus 52 unterschiedlichen Familien auf Mutationen von 21 Exons vom PHEX Gen mittels PCR / Multiplex PCR und SSCP untersucht worden. Bei Exon 19 konnten leider keine optimalen Bedingungen für diese Screening Methode geschaffen werden. Bei 61 Patienten besteht der Verdacht auf XLH, 8 Proben waren von nächsten Angehörigen. Mittels SSCP Elektrophorese sind 35 Auffälligkeiten bei den 52 Familien entdeckt worden, was einer Aufdeckungsrate von 67 % entsprechen würde. Von diesen Auffälligkeiten konnten bis jetzt 27 Mutationen bestätigt werden. Die bis dato bestätigten Mutationen würden zu einer Detektionsrate von 52 % führen. Bei den gefundenen Mutationen handelt es sich um 7 Deletionen, 4 Insertionen und 16 replacement Mutationen.

Da einige Mutationen sowohl bei mehreren Familienangehörigen auftreten (bei 5 Familien sind je zwei Familienmitglieder von derselben Mutation betroffen), als auch bei Unverwandten mehrmals vorkommen, unterscheiden sich von den 27 Mutationen nur 19.

Von diesen 19 Mutationen waren sieben bereits bekannt, bei den weiteren 12 handelt es sich um hier erstbeschriebene Mutationen (63 %).

4. Diskussion

Wie im Ergebnisteil beschrieben, sind im Rahmen dieser Studie bei 61 Betroffenen mit Verdacht auf XLH aus 52 verschiedenen Familien insgesamt 27 Mutationen (davon 19 verschiedene) und weitere acht bisher nicht sequenzierte Auffälligkeiten im SSCP Gel entdeckt worden. Die Aufdeckungsrate bei dieser Methode mit 67 % (35 Auffälligkeiten / 52 Patienten, sonst 52 % bei 27 gesicherten Mutationen / 52 Patienten) entspricht den Daten anderer internationaler PHEX Mutationsanalysen, allerdings nicht der Sensitivität des SSCP Verfahrens an sich mit Werten von 80 - 90 %. Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Zum einen könnten die niedrigeren Werte der Sensitivität an der Eignung der SSCP Methode für die Mutationsanalyse des PHEX Gens oder deren Fehlerquellen liegen. Zum anderen ist auch denkbar, daß Mutationen auf einem nicht untersuchten Genabschnitt, wie dem Promotor oder einem Intron liegen. Auch die Verantwortlichkeit von PHEX Mutationen für die Klinik des XLH könnte in Frage gestellt werden. Es ist weiterhin möglich, daß die untersuchten Patienten nicht an XLH, sondern an einer Differentialdiagnose (insbesondere ADHR) leiden.

4.1 Die SSCP Screening Methode

Das SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) Verfahren ist eine etablierte Methode zum Nachweis genetischer Veränderungen.

Die durch PCR vervielfältigten DNA Fragmente werden denaturiert und in Einzelbanden gespalten. Da zusätzlich zu den Allelen der Einzelbanden auch die Doppelbanden dargestellt werden, gilt SSCP als kodominantes Verfahren. Die Fragmente bilden eine Sekundär- / Tertiärstruktur aus und werden aufgrund ihrer Konformation elektrophoretisch gespalten. (Sunnucks et al., 2000) Das Bandenmuster wird anschließend durch Färbung mit Silbernitrat sichtbar gemacht. Es können auch Punktmutationen (Nukleotidänderungen einer Sequenz) erfaßt werden, die zu einer Konformationsänderung führen und ein anderes Bandenmuster als die Normalprobe zeigen.

Obwohl eine Reihe von Mutationsarten aufgedeckt werden können, so ist es nicht möglich bei einem X-chromosomalen Erbgang bei weiblichen heterozygoten Patienten Deletionen darzustellen. Dies ist für diese Studie ein relevanter Nachteil, da in 10 - 20 % der Fälle Deletionen ein bzw. mehrere Exons umfassen und könnte die geringere Detektionsrate erklären.

Äußere Umstände wie z.B. die Temperatur, der Glycerolgehalt im Gel, die Konzentration des Puffers und die Anwesenheit von denaturierenden Substanzen im Gel beeinflussen die Qualität und das Laufverhalten der Banden. Die höhere Temperatur könnte semistabile Konformationen verändern. Dies bedeutet, daß einzelne Gele nicht miteinander, sondern immer nur Proben innerhalb eines Gels mit der Normalprobe verglichen werden können.

Die Sensitivität wird bei optimalen Bedingungen und Basenpaarlängen von 150 - 200 bp (150 - 300 bp) mit 80 - 90 % angegeben. Die SSCP Methode zeigt den Vorteil, daß viele Proben gleichzeitig gescreent werden können. Dadurch wird diese Methode, die außerdem keine komplizierten Techniken oder Instrumente voraussetzt, kosten- und zeitsparend. (Gupta und Agarwal, 2003)

Im Vergleich zu anderen Methoden, wie der RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) werden unterschiedliche Mutationen erfaßt und nicht nur ganz bestimmte für die Marker vorhanden sind. (Hayashi et al., 1993) Hierdurch zeigt sich diese Methode für das Auffinden verschiedenartiger Mutationen oder Polymorphismen überlegen. (Orita et al., 1989) Ein Nachteil des Verfahrens ist jedoch, daß der Grad der Veränderung im SSCP Gel und der Schweregrad der Mutation nicht miteinander korrelieren.

In dieser Arbeit sind 69 Proben auf 22 Exons zu screenen gewesen.

In Bezug auf die Heterogenität der zu erwartenden Mutationen und die Basenpaarlängen der zu untersuchenden Exonabschnitte von 142 - 370 bp erschien uns das SSCP Verfahren als das Effektivste. Bei 15 der 22 PCR Produkte liegt die Basenpaarlänge zwischen 150 und 250 bp und damit im Optimum, lediglich Exon 4, 5, 7, 9 und 12 weisen eine längere Sequenz und Exon 21 eine kürzere Basenpaarlänge auf. In diesen Bereichen könnte es sein, daß aufgrund der geringeren Sensitivität Mutationen nicht erfaßt worden sind. Dies gilt insbesondere für Exon 21. In dieser Region werden international Mutationen mit 7 % angegeben, in dieser Studie konnten keine Auffälligkeiten gefunden werden. Auch dies könnte die geringere Detektionsrate von 67 %, bzw. 52 % erklären.

Bei längeren Genabschnitten wird die SSCP Methode als ungeeignet angesehen, da sich komplexere Sekundärstrukturen ausbilden können, die eventuell vorhandene Mutationen maskieren. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß eine größere Anzahl Polymorphismen auftritt, die als Mutationen fehlgedeutet werden können. (Kozlowski und Krzyzosiak, 2005)

Andererseits wird beschrieben, daß zwar die Sensitivität mit steigender Fragmentlänge abnimmt, also von 99 % bei 100 - 300 bp bis zu 80 % bei Längen von über 400 bp, daß aber trotzdem Analysen mit Genabschnitten bis 775 bp durchführbar waren. (Sunnucks et al., 2000) Außerdem gelang es nicht für Exon 19 optimale Bedingungen für das PCR / SSCP Verfahren zu ermitteln, es können in dieser Arbeit also nur Aussagen über 21 der 22 Exons gemacht werden.

Ein weiterer Faktor der für die Sensitivität entscheidend ist, ist der pH Wert. Dieser wird vom Glycerolgehalt des Geles beeinflusst. Glycerol erniedrigt den pH Wert des Puffers Triborat und erhöht damit die Sensitivität. Zur Optimierung des SSCP Verfahrens sind in dieser Studie SSCP Gele mit 10 % Glycerolgehalt angefertigt worden.

Bei den Multiplex Ansätzen ist von uns anhand eines Vergleichs mit den betreffenden Einzelansätzen eine Übereinstimmung, der von einander gut abgegrenzten Banden, gefunden worden. Sofern alle Banden im Multiplex Gel gut erkennbar sind, ist die Sensitivität dieser Methode als gleichwertig mit der von Einzelansätzen anzusehen, dafür aber erheblich effektiver. (Weiss et al., 1996)

Aus diesem Grund ist die Multiplex PCR Methode bereits in anderen Bereichen der medizinischen und ökologischen Forschung als einfache und kostengünstige Screening Methode etabliert worden, (Yip et al., 2004, Stukenbrock und Rosendahl 2005) und könnte auch im Bereich der Mutationsanalysen bei der XLH in Zukunft von Bedeutung sein.

4.2 Fehlerquellen bei der Untersuchung

Bei jeder Arbeit kann es zu Fehlern durch den Menschen oder Maschinen kommen, so daß auch diese Arbeit keinen Anspruch auf Fehlerlosigkeit erheben kann und bei jedem Teilschritt Fehlerquellen denkbar sind.

Um die Gefahr falscher Ergebnisse möglichst gering zu halten, sind in jedem Teilschritt Überprüfungsmöglichkeiten vorhanden. Die Agarosegele sollen Hinweise auf eventuelle Kontaminationen bei der PCR liefern und anhand der Marker läßt sich abschätzen, ob das PCR Produkt der Basenlänge des gewünschten Exons entspricht.

Bei den SSCP Gelen ist eine große Variabilität der Mutationen gegeben. Hier sind die Gele durch Dritte mitangesehen worden und die Abstände zwischen den einzelnen Banden im Zweifel mit einem Lineal ausgemessen worden.

Bei einer vermuteten Mutation oder bei Unsicherheiten wurden von den entsprechenden Proben erneut SSCP Gele angefertigt. Dennoch kann es sein, daß minimale Veränderungen übersehen wurden.

Bei Auffälligkeiten in den Multiplex SSCP Gelen ist ein PCR und SSCP Gel Ansatz mit dem einzelnen Exon angefertigt worden, obwohl etwaige Interaktionen der beiden PCR Produkte durch Vergleich der Banden von den Einzelansätzen mit dem Multiplex-Ansatz bereits ausgeschlossen wurden.

Im Vergleich zu anderen Studien haben wir keine Normalpersonen getestet, um Polymorphismen auszuschließen. Es könnte daher sein, daß es sich bei einer vermeintlichen Mutation um einen seltenen Polymorphismus handelt. Ein Polymorphismus ist per Definition ein Allel, das bei mindestens einem Prozent der Bevölkerung auftritt, entsprechend 2 % bei Heterozygoten (Passarge, 2001). Die Anzahl der Proben dieser Studie läßt keine sicheren Angaben über seltene Polymorphismen zu.

4.3 Mutationen auf Intronabschnitten oder dem Promotor

Im Rahmen unserer Untersuchung haben wir den zu vervielfältigenden Genabschnitt so gewählt, daß die Exons mit insgesamt zwischen 65 und 204 Basenpaaren zu beiden Seiten von Primern begrenzt werden. Sollte eine Mutation vor oder hinter diesem Bereich im Intron auftreten, so ist sie nicht mit erfaßt worden. Außerdem ist der Gen- Promotor nicht untersucht worden, der laut anderer Studien auch von Mutationen betroffen sein kann. Es ist also durchaus denkbar, daß bei unseren Patienten Mutationen in PHEX-Abschnitten vorhanden sind, die wir nicht untersucht haben. Immerhin enthalten nur 35 % (2247 bp) der PHEX mRNA coding sequences, 65 % sind untranslated regions.

Bei Hyp Mäusen kommen keine coding cDNA Mutationen vor, sondern Veränderungen in untranslated regions oder der Promotorregion. Dies könnte einerseits ein Hinweis für einen regulatorischen Charakter des Genproduktes (Du et al., 1996) sein und deutet andererseits auf das Vorhandensein von Mutationen im bei dieser Arbeit nicht untersuchten Genbereich.

Im internationalen Vergleich werden bei 35 % der Patienten mit XLH Symptomen, in dem ca. 700 bp langen extrazellulären Teil von Exon 2 - 22 keine Mutationen gefunden, obwohl dieser vielfältige Mutationen, sowie Mutationen im Bereich der untranslatierten 5'UTR, enthalten kann. Dieses könnte auf Mutationen im 3'UTR - und Intron - Bereich mit hierdurch bedingten mRNA "Splicing Abnormalities" hinweisen. (Christie et al., 2001)

In einer Studie sind Intronabschnitte von 11 Patienten mit klinischer XLH und fehlendem Nachweis von Mutationen auf Exons des PHEX Gens untersucht worden. Bei einem Patienten wurden drei übergroße Transkripte im Intron 7 gefunden, die durch Insertionen und dadurch bedingten Missense Mutationen hervorgerufen werden und zu unreifen "Termination Codons" führen. Es kommt zu einer neuen Splice Site, die mit drei vorhandenen Splice Sites reagiert, die normalerweise inaktiv sind. Es findet also ein Einbau von drei Pseudoexons statt, bei deren Translation ein verändertes Protein entsteht. (Christie et al., 2001)

Pseudoexon-Mutationen werden mit einer Häufigkeit von 0.6 % bei XLH Patienten angegeben. Nach Ausschluß einer Mutation im Exonbereich vermutet man eine Häufigkeit von bis zu 9 %. Patienten mit Pseudoexon Mutationen unterscheiden sich vom Phänotyp nicht von anderen XLH Patienten. Daher könnten sie in ihrer Häufigkeit unterschätzt werden, weil sich die Forschung auf Mutationen der Splice Sites und codierenden Sequenzen konzentriert. (Christie et al., 2001)

4.4 Differentialdiagnosen

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, sind differentialdiagnostisch vor allem die phosphorpenischen Rachitiden : ADHR (autosomal dominante Hypophosphatämische Rachitis), TIO (Tumor induzierte Osteomalazie) und HHRH (Hereditäre Hypophosphatämische Rachitis mit Hyperkalzämie) von Bedeutung. (Ritz et al., 2003) Da die Hyperkalzämie als Laborparameter eine XLH ausschließt, die beiden anderen Diagnosen aber die gleichen Laborparameter wie die XLH aufweisen, müssen vor allem diese ausgeschlossen werden.

Die Diagnosestellung wird durch die pathophysiologischen Zusammenhänge erschwert (siehe Absatz 1.3). Drehpunkt des pathophysiologischen Modells ist FGF 23, das in seiner vollen Länge phosphaturisch wirkt. Daher bedingen "gain of function" Mutationen des FGF 23 Gens bei ADHR Veränderungen, die den Abbau von FGF 23 erschweren und zu einer Hypophosphatämie führen. Bei der TIO kommt es aufgrund des Tumors zu einer FGF 23 Überproduktion.

Es wird angenommen, daß PHEX FGF 23 in inaktive Metabolite spalten kann. (Quarles, 2003, Takeda et al., 2004a) Kommt es also bei der XLH zu "loss of function" Mutationen im PHEX Gen, bleibt FGF23 in seiner aktiven, phosphaturischen Form bestehen. (Strewler, 2001; Quarles, 2003; Rowe, 2004)

Bei der TIO erfolgt die Diagnosestellung nach der Klinik des Tumors und dem Manifestationsalter. Bei nicht eindeutiger Tumorsymptomatik und der Möglichkeit der Manifestation der TIO im Kindesalter bzw. XLH Manifestationen im Erwachsenenalter (z.B. als adulte Phosphatdiabetesform) kann sie erschwert werden. Es ist daher bei jeder Hypophosphatämie / Osteomalazie zu einem späteren Zeitpunkt nach einem beschwerdefreiem Intervall eine TIO auszuschließen.

Die Differenzierung einer ADHR von einer XLH gestaltet sich ohne Mutationsanalysen noch schwieriger. Die Klinik und die Laborparameter sind identisch und beide Rachitisformen variieren stark in Bezug auf die Symptomatik und den Manifestationsgrad.

Im Unterschied zur XLH kann der Phosphatverlust bei ADHR zum Teil kompensiert werden. Es sind Patienten beschrieben worden, bei denen diese Kompensation zu einem späteren Zeitpunkt, z.B. nach Schwangerschaften nicht mehr bestand, umgekehrt gab es aber auch nach manifester Hypophosphatämie wieder die spontane Rückerlangung der Fähigkeit Phosphat zu resorbieren. (Kruse, 2001)

Da XLH die weitaus häufigere erbliche Rachitisform darstellt, ist ADHR weniger bekannt und wird unterschätzt. Bei dem autosomal dominanten Erbgang mit der Möglichkeit der Übertragung der ADHR von männlichen Patienten auf männliche Nachfahren, kann bei kleinen Familienstammbäumen oft keine Aussage gemacht werden, so daß vermehrt von einer XLH - Diagnose ausgegangen wird. Die Möglichkeit der genetischen Untersuchung könnte zeigen, daß ADHR eine größere Bedeutung hat, als bisher angenommen. Dies gilt insbesondere für Patienten mit unbestätigter PHEX Mutation bei denen eine FGF 23 Mutation bestätigt werden kann. (Econs und McEnery, 1997)

Bei allen Patienten, bei denen wir nicht eindeutig eine PHEX Mutation finden konnten, besteht also der Verdacht auf ein ADHR, bzw. bei späterem Manifestationsalter auch der auf TIO.

Bei den 33 % bzw. 48 % der Patienten ohne Bestätigung einer XLH sollte nach Möglichkeit eine Mutationsanalyse des FGF23 Gen erfolgen bzw. eine TIO ausgeschlossen werden.

4.5 Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit internationalen Studien

Die Aufdeckungsrate dieser Forschungsarbeit liegt mit 67 %, bzw. 52 % zwar unter der Aufdeckungsrate der SSCP Methode, die mit 80 - 90 % angegeben wird, ist aber dennoch mit Detektionsraten andere PHEX Mutationsanalysen vergleichbar.

Dixon et al. (1998) gaben eine Detektionsrate von 60 % bei 46 Patienten an, hiervon 77 % bei familiärer und 47 % bei sporadischer Hypophosphatämie. Durch Screening von 72 Probanden konnten Polymorphismen ausgeschlossen werden

1997 wurde von Holm et al. eine Aufdeckungsrate von 41 % angegeben. Hier werden als mögliche Ursachen für die niedrigere Detektionsrate Deletionen bei heterozygoten Patientinnen, Mutationen in den nicht identifizierten 15 % des PHEX Gens oder Mutationen, die nicht mittels SSCP entdeckt werden können, angegeben.

Die Studie Holm et al. (2001) zeigte bei 50 Patienten eine Aufdeckungsrate von 62 %, davon 69 % bei 35 Patienten mit familiärer XLH und 47 % bei 15 sporadischen Fällen. Es handelt sich hierbei um 22 neue Mutationen (71%) und neun bereits bekannte.

Filisetti et al. (1999) geben eine Sensitivität von bis zu 83 % an. In der Studie von Francis et al. (1997) ist insgesamt eine Detektionsrate von 80 % bei männlichen Patienten angegeben worden, hiervon 86 % bei 25 Patienten mit familiärer XLH und 57 % bei 14 sporadischen Fällen.

In der Arbeit von Rowe et al. (1997) ergab sich beim Screening von 81 Patienten mit familiärer Hypophosphatämie auf 17 Exons eine Detektionsrate von 32 % bei bestätigten Mutationen und 51 % nach Addition unbestätigter Mutationen.

Bei einer weiteren Analyse von 18 Familien auf 22 Exons ergab sich eine Rate von 83 %. Bei 28 % von 7 Patienten mit sporadischer Rachitis bestätigten sich PHEX Mutationen. (Rowe et al., 1997)

Wie auch bei den Studien von Holm et al. (1997), Francis et al. (1997) und Dixon et al. (1998) zeigt sich hier, daß die Detektionsrate bei sporadischen Hypophosphatämien niedriger ist. Gerade bei Patienten mit sporadischer XLH ohne bestätigte Mutation im PHEX Gen könnte eine andere Ursache der Hypophosphatämie wie z.B. ADHR oder TIO vorliegen.

Die Studie von Tynismaa et al.(2000) zeigte eine Detektionsraten von 100 % bei 5 Patienten mit familiärer Hypophosphatämie und 93 % bei 15 Patienten mit sporadischer Hypophosphatämie. Dieses Ergebnis einer finnischen Studie erscheint im Vergleich sehr hoch und ist wahrscheinlich in der geringeren Patientenzahl begründet.

Eine japanische Studie gab auch eine Detektionsrate von 100% bei vier untersuchten Familien an. Der Vergleich mit Werten aus Europa, Nord Amerika, Afrika, Amerika, dem indischen Subkontinent, Saudi Arabien und Südost Asien, die bei 60 - 80 % liegen, weisen auf eine zu niedrige Zahl der untersuchten Patienten hin, um genaue Aussagen über Detektionsraten machen zu können. (Sato et. al., 2000) Die Detektionsrate dieser Forschungsarbeit liegt also durchaus in dem Bereich der Werte anderer internationaler Studien.

In dieser Studie können leider keine gesicherten Angaben über die Prozentzahl an de novo Mutationen gemacht werden, da nicht bei allen Patienten bekannt ist, ob sie eine positive Familienanamnese bezüglich XLH haben. Bei 10 Patienten (P1, P2, P3, P7, P8, P17, P61, P62, P72 und P73) konnte eine familiäre XLH bestätigt werden und bei 3 Patienten (P40, P13 und P16) eine familiäre Hypophosphatämie sicher ausgeschlossen werden. Bei den anderen Patienten können keine Aussagen über Familienangehörige getroffen werden.

Andere Studien z.B. Dixon et al. (1998) und Tenenhouse (1999) beschreiben 22 % de novo Mutationen. Bei Saggese und Baroncelli (2000) handelte es sich bei 77 % um familiäre und bei 23% um sporadische XLH. Etwas höhere Prozentzahlen für sporadische Hypophosphatämien mit 37 % bei insgesamt 59 Patienten weist die Studie von Popowska et al. (2001) auf.

Bei allen Exons sind die verschiedensten Mutationen entdeckt worden, die alle einen Funktionsverlust des Genes hervorzurufen scheinen.

Bei den bisher entdeckten 175 verschiedenen Mutationen handelt es sich laut PHEX Database, einer Website (phexdb.mcgill.ca) der McGill Universität, Canada, die der Zentralisation und Verteilung von Informationen über PHEX Mutationen dient (Sabbagh et al., 2000), im Juli 2004 um:

104 Replacement Mutationen (59 %), davon

31 stop (nonsense) (18 %)

37 missense (21 %)

36 abnormal splicing (21 %)

42 Deletionen (24 %), davon

26 frameshift (9 %)

14 Deletionen (8 %)

2 abnormal splicing (1 %)

18 Insertionen (10 %), davon

15 frameshift (9 %)

1 insertion (<1 %)

2 abnormal splicing (1 %)

3 Deletional Insertionen (frameshift) (2 %)

1 Duplikation (frameshift) (<1 %)

7 Polymorphismen (4 %)

Die folgende Abbildung stellt einen Vergleich zwischen den in dieser Studie gefundenen Mutationsarten und den eben beschriebenen dar.

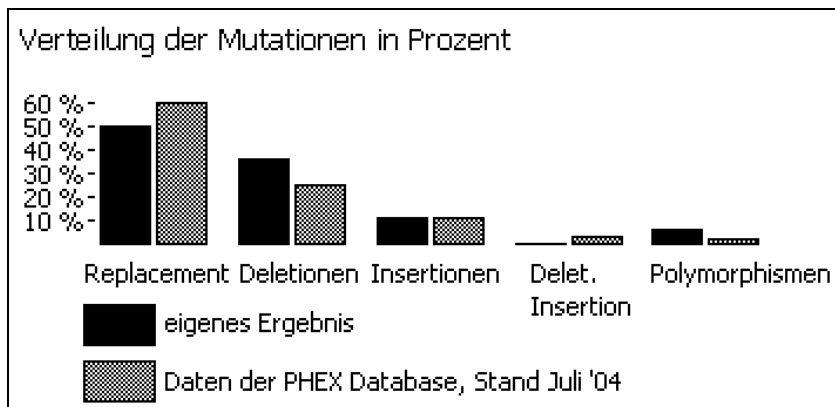


Abb.15 zeigt die Verteilung der einzelnen verschiedenen Mutationstypen in Prozent. Die Angaben der eigenen Ergebnisse, beziehen sich auf die 19 verschiedenen Mutationen und den Polymorphismus auf Exon 1, die anderen Daten entsprechen denen der Mutationslistung der PHEX.db.

Es sind Mutationen auf allen Exons des PHEX Gens beschrieben worden. Es gibt keinen Hot Spot, wobei dennoch einige Exons mehr als andere betroffen zu sein scheinen. Abb. 16 zeigt die Verteilung der in dieser Arbeit gefundenen Mutationen auf die einzelnen Exons im Vergleich zu der Verteilung der bisher publizierten Mutationen.

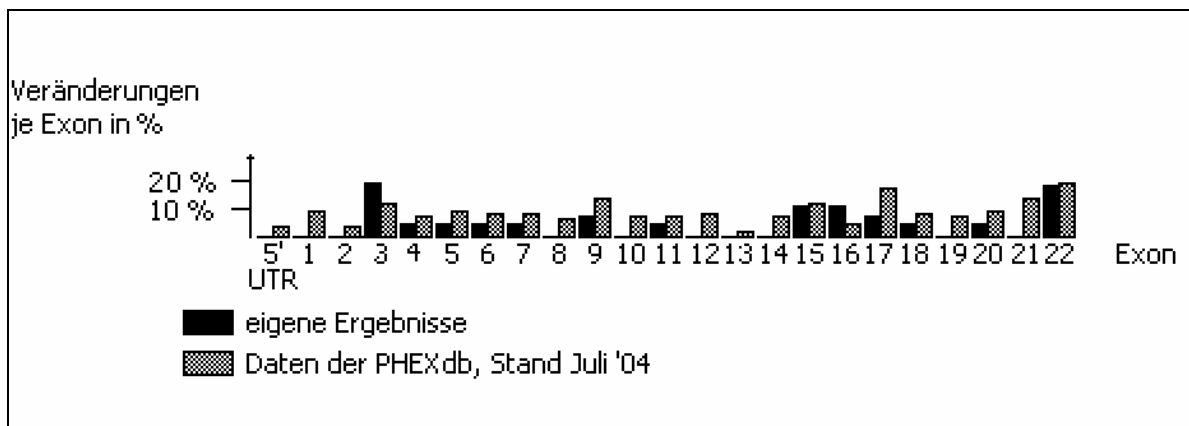


Abb. 16 stellt die Verteilung der Veränderungen je Exon in Prozent dar. Als eigene Ergebnisse sind die 27 bestätigten Mutationen herangezogen worden, die anderen Daten beziehen sich auf die Auswertung der Mutationstabelle der phex.db, Stand Juli 2004.

Folgende Mutationen, die in unserem Patientenstamm vorkamen, sind bereits beschrieben :

- Die Mutation E278X von Filisetti et al. (1999), ein nordeuropäischer Patient.
- Die Mutation P543L ist international siebenmal beschrieben worden :
 - Francis et al. (1997), ein deutscher Patient,
 - Rowe et al. (1997), ein französischer Patient,
 - Dixon et al. (1998), ein nordeuropäischer Patient mit familiärer Hypophosphatämie,
 - Dixon et al. (1998), ein schwarz - amerikanischer Patient mit sporadischer Hypophosphatämie,
 - Filisetti et al. (1999), ein nordeuropäischer Patient,
 - Popowska et al. (2000 und 2001), drei polnische Patienten.

In unserer Forschungsarbeit trat diese Mutation bei zwei nicht verwandten Patienten auf.

- Die Mutation G579R ist international neunmal beschrieben worden :
 - Francis et al. (1997), zwei unverwandte deutsche Patienten; durch eine Untersuchung von 43 weiteren Patienten wird ein Polymorphismus ausgeschlossen.
 - Rowe et al. (1997), ein polnischer Patient,
 - Rowe et al. (1997), ein spanischer Patient,
 - Dixon et al. (1998), ein nordeuropäischer Patient,
 - Filisetti et al. (1999), zwei unverwandte, nordeuropäische Patienten,
 - Popowska et al. (2000 und 2001), vier unverwandte, polnische Patienten,
 - Sabbagh et al. (2001 und 2003).

In unserer Studie kommt diese Mutation bei drei Patienten vor, wobei zwei Patienten miteinander verwandt sind.

- die Mutation R747X ist international sechsmal beschrieben :
 - Francis et al. (1997), drei deutsche, unverwandte Patienten,
 - Dixon et al. (1998), ein nordeuropäischer Patient, mit sporadischer XLH,
 - Dixon et al. (1998), eine saudiarabische Familie mit familiärer XLH,
 - Filisetti et al. (1999), ein nordeuropäischer Patient,
 - Popowska et al. (2000 und 2001), eine polnische Familie mit vier Betroffenen.
- Die Mutation W749 von Dixon et al. (1998), ein schwarz - amerikanischer Patient.
- Die Mutation c.1783.ins TGAT ist einmal von Francis et al. (1997) beschrieben.
- Der Polymorphismus 5UTR33 ist in einer Studie von Dixon et al. (1998) mit einer Heterozygotenfrequenz von 18 % angegeben.

Bei den Mutationen P543L, G579R und R747X fällt auf, daß sie mehrmals auftreten. Es könnte sich also um international häufigere Mutationen oder auch Polymorphismen handeln. Ein Founder Effect erscheint aufgrund der geographischen Verteilung unwahrscheinlich. Untersuchungen bei 96 gesunden Probanden zeigten, daß die Mutation P543L kein Polymorphismus ist. (Holm et al., 2001) Aufgrund des Basenaustausches von Proline zu Leucin wird die lokale Hydrophobie des PHEX Genproduktes verändert, da Leucin aliphatisch ist. Dadurch könnte die Substratbindung erschwert werden. (Francis et al., 1997) Es handelt sich um eine "loss of function" Mutation. Im Rahmen einer Genotyp / Phänotyp Analyse ist bei P543L Patienten eine schwere Wachstumsstörung, aber kaum ein Einfluß auf Zähne und die Kopfform festgestellt worden. (Popowska et al., 2001)

Die missense Mutation G 579R führt auch zu einem Funktionsverlust von PHEX. Hier kommt es zu einem Basenaustausch von Glycin zu Arginin genau ein Basenpaar vor dem HEXXH Motiv, einem wichtigen Bestandteil der Metallopeptidasen. (Francis et al., 1997) Man vermutet außerdem, daß es durch eine verminderte Glykosylierung zu einem gestörten Transport durch die Zellwand kommt. (Sabbagh et al. 2001, Sabbagh et al., 2003)

Folgende Mutationen sind in dieser Studie zum ersten Mal beschrieben :

- c.208.del bei Exon 3. Eine Deletion mit resultierendem Frameshift, die bei zwei Angehörigen einer Familie gefunden wurde.
- c.303 T>A bei Exon 3. Durch diese Replacement Mutation kommt es zu einer Tyrosin zu Stop Codon Veränderung.
- c.330.ins A bei Exon 3. Diese Insertion führt zu einem Austausch von Asparagin zu Lysin, welche einen vorzeitigen Abbruch der Aminosäurenkette bewirkt. Auch diese Mutation konnte bei zwei Familienangehörigen bestätigt werden.
- c.402.del A bei Exon 4. Diese Deletion führt zu einer Lysin zu Serin Veränderung mit vorzeitigem Abbruch der Aminosäurenkette.
- c.543.del AGAG bei Exon 5.
- c.704.del A bei Exon 6. Diese Deletion bewirkt eine Tyrosin zu Serin Veränderung.
- c.958.del AAG bei Exon 9. Durch diese Deletion geht die Aminosäure Lysin verloren.
- c.1022 T>A bei Exon 9.
- c.1180 C>A bei Exon 11. Es kommt zu einer Glutaminsäure zu Stop Codon Veränderung.
- c.1600 C>A bei Exon 15. Als Replacement Mutation führt diese Veränderung zu einem Austausch von Prolin zu Tyrosin
- c.1974.ins 4bp bei Exon 20. Diese Veränderung führt zu einem Stop Codon.
- c.2193.del T bei Exon 22. Hier kommt es zu einem Austausch von Phenylalanin zu Leucin.

4.6 Zusammenhang von PHEX - Mutationen mit XLH

Im Hinblick auf die Verteilung der Mutationen über die einzelnen Exons (siehe Abbildung 16) fällt auf, daß diese Verteilung relativ gleichmäßig ist und kein "Hot Spot" vorhanden ist.

Alle Exons sind von Mutationen betroffen, kein Exon hat im Vergleich zu anderen einen übermäßig großen Anteil an Mutationen.

Hieraus ergibt sich die Frage, ob PHEX Mutationen überhaupt für XLH verantwortlich sind.

Wie bereits in dem Absatz : Genetik und Pathophysiologie erwähnt, ist das PHEX Gen auf dem X Chromosom Xp22.1 - 2 isoliert worden und die Pathogenese anhand von Mausmodellen mit ähnlicher Hypophosphatämie Symptomatik hergeleitet worden.

Die Identifikationen von Hyp und Gy Mutationen ist ein starker Hinweis dafür, daß PHEX das einzige Phosphathaushalt beeinflussende Gen auf dem X - Chromosom ist. (Econs und Francis, 1997) Es konnte kein zweites großes Gen in der Region ermittelt werden, wobei nicht auszuschließen ist, daß kleinere Exons übersehen worden sind. (The Hyp Consortium, 1995)

Die 98 prozentige Identität und 96 prozentige Ähnlichkeit des murinen mit dem humanen PHEX Gens (Grieff et al., 1997) spricht für den richtigen Genort der XLH.

Durch Mutationsuntersuchungen des PHEX Genes bei Patienten mit Symptomen der XLH versucht man weitere Sicherheit zu erlangen, daß dieser Genort dem Krankheitsbild entspricht.

Laut der PHEX Database der McGill Universität sind im Juli 2004 175 verschiedene Mutationen auf dem PHEX Gen beschrieben worden, welche einen Zusammenhang zwischen PHEX Mutationen und XLH wahrscheinlich machen. Zur weiteren Überprüfung dieser These sind PHEX Antisense Vektor Untersuchungen an humanen Osteoblasten durchgeführt worden. Nach dem Zuführen des Vektors fiel eine geringe PHEX Expression (mRNA und Protein) und eine gestörte Mineralisation auf, so daß naheliegt, daß PHEX den richtigen Genort für das Krankheitsbild der XLH darstellt. (Shih et al., 2002)

4.7 Genotyp - Phänotyp Analyse

Bisher konnte beim Menschen in Bezug auf PHEX Mutationen und XLH keine eindeutige Genotyp - Phänotyp Korrelation beschrieben werden.

Dies liegt unter anderem an den sehr variablen Symptomen der XLH. Bei einigen Patienten kommt es zu sehr schweren Knochen- und Wachstumsstörungen, während andere symptomlos mit einer PHEX Mutation leben. (zur Klinik, siehe Kapitel : 1.7)

Auch wenn XLH auf dem X-Chromosom vererbt wird, gibt es bei betroffenen Frauen keinen milderen Verlauf durch die zufällige Ausschaltung des defekten Chromosoms. Die Lyon Hypothese wird nicht erfüllt, da Mädchen genauso wie Jungen betroffen sind (Grieff et al., 1997). Auch im Phänotyp von männlichen und weiblichen Hyp-Mäusen konnte kein Unterschied festgestellt werden. (Econs und Francis, 1997)

Hierfür stehen ein Gen Dosage Effekt, Haploinsuffizienz oder eine klassische Dominanz mit gleicher Krankheitsschwere wie bei männlichen Erkrankten zur Diskussion. Bei Patientinnen wird möglicherweise die Hälfte des normalen Allels exprimiert, was für eine normale Funktion nicht ausreichend zu sein scheint. Bei Männern fehlt das jeweilige Transkript völlig. (Ganten und Ruckpaul, 2001)

Bei Frauen könnte bevorzugt eine Inaktivierung des normalen PHEX Allels im Zielgewebe stattfinden. Bis jetzt liegen keine Untersuchungen über X Inaktivierungen in Osteoblasten vor. Im Mausmodell gibt es allerdings Hinweise, daß normale Allele in Osteoblasten exprimiert werden. Unter der Annahme, daß die Inaktivierung randomisiert abläuft, könnten dominant negative Mutationen oder ein Dosisseffekt die Ausprägung des Phänotyps erklären. Da das Mutationsverhalten bei XLH hauptsächlich Funktionsverlustmutationen zeigt, schließt dies einen dominant negativen Mechanismus aus (bei dem ein fehlerhaftes Protein die Funktion des eigentlichen Produktes behindert), so daß der Dosisseffekt als Erklärung wahrscheinlicher ist. (Econs und Francis, 1997) Auch eine Haploinsuffizienz ist denkbar (Drezner, 2000), wenn das PHEX Produkt einen katalytischen Schritt in einer geschwindigkeitsbegrenzten Reaktion ausmacht. (Econs und White, 2000) Da es durch PHEX Mutationen zu einem geringeren Vorkommen des NTP 2 Transporters kommt, scheint die Expression hiervon durch PHEX beeinflusst zu sein.

Durch Untersuchungen an Hyp Mäusen hat man festgestellt, daß die Osteoid Menge pro Knochenvolumen bei 3 veränderten Genotypen gleich ist, so daß in Bezug auf die Mineralisierung ein vollständig dominanter Defekt ohne Gen Dosis Effekt besteht. Unterschiede in der Wirbelsäulenlänge bei diesen 3 Gruppen könnten auf unterschiedliche pathophysiologische Prozesse in Bezug auf Mineralisation und Knochenwachstum hinweisen. (Qiu et al., 2004)

Da es nicht nur zwischen den beiden Geschlechtern variable Phänotypen gibt, sondern auch innerhalb desselben Geschlechtes sind Phänotyp / Genotyp Untersuchungen durchgeführt worden. In der Studie von Ganten und Ruckpaul (2001) sind bei drei Familien fünf Mutationsträger ohne Knochendeformitäten gefunden worden.

Es handelt sich bei diesen Mutationen um Missense Mutationen, bei denen die Aminosäuren nicht in der M13 Familie konserviert sind. Dies zeigt, daß bestimmte Mutationen einen leichteren Phänotyp hervorrufen können.

Die Studie von Holm et al. (2001) untersuchte einen Patientenstamm von 31 Personen auf folgende zwei Theorien :

1. Patienten mit destruktiven Mutationen (Deletionen, Insertionen, Nonsense und Splice Site Mutationen) führen zu stärkeren Veränderungen im Phänotyp als Missense Mutationen.
2. Vom 5' Ende bis bp 649 scheinen die Patienten stärker betroffen zu sein, als von bp 649 bis zum 3' Ende, da im erstgenannten Abschnitt die transmembran Domäne und die zwei zinkbindenden Motive liegen.

Beide Theorien konnten nicht bestätigt werden. Es sind in der gesamten Gruppe keine Korrelationen gefunden worden, auch nicht zwischen Geschlecht und Ausprägungsgrad. Dennoch fällt auf, daß spätere Generationen leichtere Ausprägungen zu haben scheinen, als Patienten mit Neumutationen. Es besteht außerdem ein Trend zu stärkeren Zahnbeteiligungen bei erwachsenen Männern. (Holm et al., 2001)

Bei einer Auswertung von 116 pädiatrischen Patienten konnte keine Korrelation von Phänotyp und Geschlecht, Rasse, väterlichen oder mütterlichen Ursprungs der Mutation festgestellt werden. Bei den 18,3 % (von 116) de novo Mutationen konnte kein Zusammenhang mit dem Alter der Eltern bei Geburt des Kindes ermittelt werden. Abgesehen von niedrigeren nüchtern Serum Phosphat Werten bei sporadischer XLH besteht kein Unterschied zwischen familiärer und sporadischer Hypophosphatämie. (Whyte et al., 1996)

Auch in einer anthropometrischen Untersuchung von 82 XLH Patienten sind in Bezug auf kraniofaziale Parameter wie Kopflänge, okzipitale Breite und Proportionen keine Unterschiede im Vergleich von Patienten mit familiärer XLH zu Patienten mit sporadischer XLH aufgefallen. (Pronicka et al., 2004)

Eine südafrikanische Studie hat Rassen - Unterschiede im Hinblick auf den Phänotyp bei 31 Schwarzen, 17 Weißen und 2 Indern untersucht und konnte bis auch eine erhöhte Prävalenz von sporadischen XLH Fällen bei Schwarzen (64 % gegenüber 41 % bei Weißen) keine klinischen oder biochemischen Auffälligkeiten entdecken. (Basu et al., 2004)

Auch wenn keine genaue Genotyp / Phänotyp Korrelation gefunden wurde, so scheinen Hörprobleme am Anfang des Gens (Exon 1 - 5, analog zur Gy Maus), Zahnprobleme und ein vergrößerter Kopfumfang am Anfang (Transmembran Domäne) und Ende des Gens (Substratbindung, katalytisches Zentrum) durch Mutationen hervorgerufen zu werden. Es wird angenommen, daß alternatives Splicing zu mehreren aktiven Formen des PHEX Genes führt, einige seien mehr für den Knochenstoffwechsel, andere mehr für Dentin, die renale Phosphat - Resorption oder den Vitamin D Metabolismus zuständig. (Popowska et al. 2001)

Die Entdeckung der Spontanmutationen Hyp 2 J und Hyp Duk im Mausmodell, mit den zusätzlichen Symptomen der Taubheit, kranialen Dysmorphie und dem Circling Behaviour bei Hyp Duk Mäusen mit Deletionen bei Exon 13 - 14 könnten die unterschiedlichen genotypischen Facetten beim Menschen mit erklären. (Lorenz Depiereux et al., 2004)

Außerdem glaubt man, daß bei Unterbrechung des PHEX Gen Produktes der Phänotyp schwerwiegender ist. (Whyte et al., 1999)

Da die frühzeitige Gabe von Phosphat und Vitamin D Präparaten die Wachstumsretardierung und Knochendeformitäten und damit den Phänotyp verbessert, scheint sie für den Krankheitsverlauf bedeutender zu sein als der Ort und die Art der Mutation auf dem PHEX Gen. (Popowska et al., 2001)

4.8 Ausblick

Die SSCP Methode ist eine einfache, schnelle und preiswerte Methode, die durch einen Multiplex Ansatz bei gleichbleibender Sensitivität noch effektiver wird.

Dieser Multiplex Ansatz konnte bereits bei den Exons 3 + 6, 2 + 7, 5 + 10 und 12 + 16 eingeführt werden, aufgrund der gleichen PCR Bedingungen für Exon 21 und 22 würde ich empfehlen auch hier ein Multiplex Verfahren zu testen.

In der Studie von Yamanoshita et al., 2005 wird die DHPLC Methode (denaturing high performance liquid chromatography) gegenüber der SSCP Methode bei p53 Mutationsanalysen empfohlen, aufgrund der höheren Sensitivität von 97 % gegenüber 81 % bei SSCP. Die DHPLC Methode soll kleinere Nukleotidänderungen (Punktmutationen) besser erkennen können. Es ist fraglich, ob diese Methode in unserer Arbeitsgruppe bei etablierter SSCP Verfahren große Vorteile bringt. Andererseits bleibt zu überlegen, ob bei heterozygoten Frauen bei negativer Mutationsanalyse auf dem PHEX und FGF 23 Gen nicht ein Southern Blot Verfahren zusätzlich zum Ausschluß von Deletionen durchgeführt werden sollte.

In unserer Studie konnten aufgrund nicht ausreichender Informationen über möglicherweise weitere erkrankte Familienangehörige keine Stammbäume erstellt werden, was Aussagen über familiäre und sporadische XLH Fälle erschwert. Hier wäre es bei Folgearbeiten nützlich weitere Informationen diesbezüglich zu beschaffen, um auch eine Aussage über die Prävalenz sporadischer Fälle treffen zu können.

5 Zusammenfassung

Die X - chromosomal dominante Hypophosphatämie ist die häufigste Form der erblichen Rachitiden und geht mit Symptomen der Wachstumsretardierung, Kleinwuchs, Knochendeformitäten und Zahnabszessen einher. Zur Behandlung wird eine Substitution mit Phosphat und Calcitriol durchgeführt, wobei sich eine Frühbehandlung positiv auf die Endgröße und den Schweregrad der Knochendeformitäten auswirkt.

Ursächlich für dieses Krankheitsbild sind Mutationen auf dem PHEX Gen (phosphatregulierende Endopeptidase auf dem X-Chromosom) in der Region Xp22 auf dem X - Chromosom, wie anhand von Untersuchungen an Mausmodellen und anderen Mutationsanalysen bewiesen werden konnte. Dieses Gen besteht aus 22 Exons und umfaßt ca. 220 kb.

In dieser Arbeit sind PCR / Multiplex PCR (Exon 3+6, 2+7, 5+10 und 12+16) und SSCP Verfahren für 21 der 22 Exons (ausgenommen Exon 19) des PHEX Gens etabliert worden und 69 Patienten aus 52 unterschiedlichen Familien auf Mutationen gescreent worden.

Von diesen 69 Proben bestand bei 61 Patienten aufgrund von klinischen und laborchemischen Befunden der Verdacht auf XLH, die weiteren 8 Proben, waren die von nächsten Angehörigen. Mittels SSCP Elektrophorese sind 35 Auffälligkeiten bei den 52 Familien entdeckt worden, was einer Aufdeckungsrate von 67 % entsprechen würde und anderen internationalen Daten entspricht. Von diesen Auffälligkeiten konnten bis jetzt 27 Mutationen durch Sequenzierung bestätigt werden, einer Detektionsrate von 52 % entsprechend. Hierbei handelt es sich um 7 Deletionen, 4 Insertionen und 16 Replacement Mutationen. Da einige Mutationen mehrfach aufgetreten sind, unterscheiden sich nur 19 Mutationen. Hiervon waren sieben bereits beschrieben, bei den weiteren 12 handelt es sich um hier erstbeschriebene Mutationen.

In Bezug auf die sehr variablen Ausprägungen der XLH ist es schwierig eine Genotyp / Phänotyp Korrelation zu beschreiben. Da die Frühbehandlung für einen milden Phänotyp bedeutender sei als ein bestimmter Genotyp, soll durch die Etablierung dieser schnellen, effizienten und sensiblen molekulargenetischen Screening - Methode eine frühe Diagnosesicherung erfolgen und gegebenenfalls eine frühe Therapie zur Verhinderung von Komplikationen durchgeführt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. The ADHR Consortium, Group 1 : K.E. White, W.E. Evans, J.L.H.O'Riordan, M.C. Speer, M.J. Econs, Group 2 : B. Lorenz-Depiereux, T. Meitinger, T.M. Strom : Autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) is caused by mutations in a gene encoding a novel member of the fibroblast growth factor family (FGF 21). *Na. Genet* 26, 345 - 8 (2000)
2. D. Basu, J.M. Pettifor, J. Kromberg : X - linked hypophosphatemia in South Africa. *S Afr Med J* 94, 460 - 4 (2004)
3. L. Beck, Y Soumounou, J. Martel, G. Krishnamurthy, C. Gauthier, C.G. Goodyer, H.S. Tenenhouse : Pex/PEX tissue distribution and evidence for a deletion in the 3' region of the Pex gene in X-linked hypophosphatemic mice. *J Clin Invest* 99,1200 - 9 (1997)
4. A. Benet - Pages, B. Lorenz - Depiereux, H. Zischka, K.E. White, M.J. Econs, T.M. Strom : FGF 23 is processed by proprotein convertases but not by PHEX. *Bone*. 35, 455 - 62 (2004)
5. S.M. Jan de Beur, M.A. Levine: Perspective, Molecular Pathogenesis of Hypophosphatemic Rickets. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 2467 - 2473 (2002)
6. A. Blumsohn : What have we learnt about the regulation of phosphate metabolism ? *Curr. Opin Nephrol. Hypertens.*13, 397 - 401 (2004)
7. T.D. Blydt-Hansen, H.S. Tenenhouse, P. Goodyer : PHEX Expression in parathyroid gland and parathyroid hormone dysregulation in x-linked hypophosphatemia. *Pediatr. Nephrol* 13, 607 - 611 (1999)
8. G. Boileau, H.S. Tenenhouse, L. Desgroseillers, P. Crine : Characterization of Phex endopeptidase catalytic activity : identification of parathyroid - hormone related peptide 107 - 139 as a substrate and osteocalcin, PPi and phosphate as inhibitors. *Biochem. J.* 355, 707 - 13 (2001)

9. A.E. Bowe, R. Finnegan, S.M. Jan de Beur, J. Cho, M.A. Levine, R. Kumar, S.C. Schiavi : FGF 23 inhibits renal tubular phosphate transport and is a phex substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 284, 977 - 81 (2001)
10. L.A. Brame, K.E. White, M.J. Econs : Renal phosphate wasting disorders : clinical features and pathogenesis. *Semin Nephrol.* 24, 39 - 47 (2004)
11. A.J. Brewer, L. Canaff, G.N. Hendy, H.S. Tenenhouse : Differential regulation of PHEX expression in bone and parathyroid gland by chronic renal insufficiency and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Am J Physiol Renal Physiol* 286, 739-48 (2004)
12. C. Chaussain-Miller, C. Sinding, M. Wolikow, J.-J. Lasfargues, G. Godeau, M. Garabédian : Dental Abnormalities in Patients with familial hypophosphatemic Vitamin D resistant Rickets: Prevention by Early Treatment with 1 Hydroxyvitamin D. *J Pediatr* 142, 324 - 331 (2003)
13. P.T. Christie, B. Harding, M.A. Nesbit, M.P. White, R.V. Thakker : X-linked hypophosphatemia attributable to pseudoexons of the PHEX gene. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 3840 - 4 (2001)
14. P.H. Dixon, P.T. Christie, C. Wooding, D. Trump, M. Grieff, I. Holm, J.M. Gertner, J. Schmidtke, B. Shah, N. Shaw, C. Smith, C. Tau, D. Schlessinger, M.P. Whyte, R.V. Thakker : Mutational Analysis of PHEX Gene in X - linked Hypophosphatemia *J Clin Endocrinol Metab* 83, 3615 - 23 (1998)
15. M.K. Drezner : PHEX Gene and hypophosphatemia. *Kidney int.* 57, 9 - 18 (2000)
16. L. Du, M. Desbarats, J. Viel, F.H. Glorieux, C. Cawthorn, B. Ecarot : cDNA Cloning of the Murine Pex Gene Implicated in X - Linked Hypophosphatemia and Evidence for Expression in Bone. *Genomics* 36, 22 - 28 (1996)

17. B. Ecarot, M. Desbarats : (OH)₂D₃ Down Regulates Expression of Phex, a Marker of the Mature Osteoblast. *Endocrinology* 140, 1192 - 1199 (1999)
18. M.J. Econs, F. Francis : Positional cloning of the PEX gene : new insights into the pathophysiology of x – linked hypophosphatemic rickets, *Am J Physiol* 273; 489 - 98 (1997)
19. M.J. Econs, P.T. McEnery : Autosomal Dominant Hypophosphatemic Rickets / Osteomalacia : Clinical Characterization of a Novel Renal Phosphate-Wasting Disorder. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 674 - 681 (1997)
20. M.J. Econs, N.E. Friedman, P.S.N. Rowe, M.C. Speer, F. Francis, T.M. Strom, C. Oudet, J.A. Smith, J.T. Ninomiya, B.E. Lee, H. Bergen : A PHEX Gene mutation is responsible for adult-onset vitamin D resistant hypophosphatemic osteomalacia - evidence that the disorder is not a distinct entity from x - linked hypophosphatemic rickets. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 3459 - 3462 (1998)
21. M.J. Econs und K.E. White : Inherited Phosphate Wasting Disorders, Chapter 7 : The Genetics of Osteoporosis and Metabolic Bone Disease, Humana Press Inc, Totowa, NJ, 111 - 32 (2000)
22. D. Filisetti, G. Ostermann, M. von Bredow, T. Strom, G. Filler, J. Ehrich, S. Pannetier, J.M. Garnier, P. Rowe, F. Francis, A. Julienne, A. Hanauer, M.J. Econs, C. Oudet : Non-random distribution of mutations in the PHEX gene, and under-detected missense mutations at non-conserved residues. *European Journal of Human Genetics* 7, 615 - 19 (1999)
23. F. Francis, T.M. Strom, S. Hennig, A. Böddrich, B. Lorenz, O. Brandau, K.L. Mohnike, M. Cagnoli, C. Steffens, S. Klages, K. Borzym, T. Pohl, C. Oudet, M.J. Econs, P.S.N. Rowe, R. Reinhardt, T. Meitinger, H. Lehrach : Genomic Organization of the Human PEX Gene Mutated in X-Linked Dominant Hypophosphatemic Rickets. *Genome Research* 7, 573 - 585 (1997)

24. S. Fukumoto, K. Nakahara : Establishment of assay system for fibroblast growth factor (FGF) 23 and pathophysiological roles of FGF 23 in the development of hypophosphatemic diseases. *Rincho Byori* 52, 51 - 4 (2004)
25. D. Ganten und K. Ruckpaul, O.E. Hansen und A.E. Heufelder, *Molekularmedizinische Grundlagen von Endokrinopathien*, Kapitel 11: T. M. Strom, B.Lorenz - Depiereux, Springer Berlin, 365 – 379 (2001)
26. G. Ghaddar, A. F. Ruchon, M. Carpentier, M Marcinkiewicz, N.G. Seidah, P. Crine, L. Degroiseurs, G. Boileau : Molecular Cloning and biochemical characterization of a new mouse testis soluble zinc metalloproteinase of the neprilysin family. *Biochem. J.* 347, 419 - 429 (2000)
27. M. Grieff, S. Mumm, P. Waeltz, R. Mazarella, M.P. Whyte, R.V. Thakker, D. Schlessinger : Expression and cloning of the human X-linked hypophosphatemia gene cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 231, 635-639 (1997)
28. R. Guo, L.D. Quarles : Cloning and Sequencing of human PEX from a bone cDNA library : evidence for its developmental stage-specific regulation in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 12, 1009 - 17 (1997)
29. A. Gupta, S. Agarwal : Efficiency and cost effectiveness : PAGE - SSCP, versus MDE and Phast Gels for the identification of unknown beta thalassemia mutations. *Mol Pathol* 56, 237-9 (2003)
30. A. Gupta, K. Winer, M.J. Econs, S.J. Marx, M.T. Collins : FGF 23 is Elevated by Chronic Hyperphosphatemia. *J. Clin Endocrinol Metab* 89, 4489 - 4492 (2004)
31. D. Haffner, R. Nissel, E. Wühl, O. Mehls : Effects of Growth Hormone Treatment on Body Proportions and Final Height Among Small Children with X-linked Hypophosphatemic Rickets. *Pediatrics* 113, 593-6 (2004)

32. K. Hayashi, D.W. Yandell, How sensitive is PCR SSCP ? *Hum. Mutat.* 2, 338 - 46 (1993)
33. E.R. Hines, O.I. Kolek, M.D. Jones, S.H. Serey, N.B. Sirjani, P.R. Kiela, P.W. Jurutka, M.R. Haussler, J.F. Collins, F.K. Ghishan : 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 promotor. *J Biol Chem* 279, 46406-14 (2004)
34. A. Holm, X. Huang, L.M. Kunkel : Mutational Analysis of the PEX Gene in Patients with X - Linked Hypophosphatemic Rickets. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 790 - 797 (1997)
35. A. Holm, A. E. Nelson, B. G. Robinson, R.S. Mason, D.J. Marsh, C. T. Cowell, T. O. Carpenter : Mutational Analysis and Genotyp - Phenotyp Correlation of the PHEX Gene in X-linked Hypophosphatemic Rickets. *J.Endocrinol Metab* 86, 3889 - 3899 (2001)
36. Y. Huimin, W. Chaomin : Recombinant growth hormone therapy for X-linked hypophosphatemia in children. *Cochrane Database Syst Rev* 1 : CD004447 (2005)
37. The Hyp Consortium
(Group 1 F. Francis, S. Henning, B. Korn, R. Reinhardt, P. de Jong, A. Poustka, H. Lehrach, Group 2 : P. S.N . Rowe, J.N. Goulding, T. Summerfield, R. Mountford, A.P. Read, E. Popowska, E. Pronicka, K.E. Davies, J.L.H O’Riordan, Group 3 : M.J. Econs, T. Nesbitt, M.K. Drezner, Group 4 : C. Oudet, S. Pannetrier, A. Hanauer, Group 5 : T. M. Strom, A. Meindl, B. Lorenz, M. Cagnoli, K.L. Mohnicke, J. Murken, T. Meitingner) : A Gene (Pex) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Nat Genet* 11, 130 - 6 (1995)

38. K.B. Johnsson, R. Zahradnik, T. Larsson, K.E. White, T. Sugimoto, Y. Imanishi, T. Yamamoto, G. Hampson, H. Koshiyama, Ö. Ljunggren, K. Oba, I.M. Yang, A. Miyauchi, M.J. Econs, J. Lavigne, H. Jüppner, Fibroblast Growth Factor 23 in Oncogenic Osteomalacia and X-linked Hypophosphatemia. *The New England Journal of Medicine* 348, 1656 - 1663 (2003)
39. B. Koletzko; von Harnack, *Kinderheilkunde*, Springer Verlag, Hrsg. B. Koletzko, 11. Auflage, 180 - 186, Autor des Artikels : B. Koletzko (2000)
40. P. Kozlowski, W.J. Krzyzosiak : Structural factors determining DNA length limitations in conformation-sensitive mutation detection methods. *Electrophoresis* 26, 71 - 81 (2005)
41. K. Kruse, Kapitel 4 in G. Dörr, A. Grüters, R. Holl, W. Kiess, K. Kruse, G.H.G Sinnecker : *Pädiatrische Endokrinologie*, Hrsg.: K.Kruse, Thieme Stuttgart, 2. Auflage, 146 - 166 (1999)
42. K. Kruse, D. Woelfel, T.M. Strom : Loss of Renal Phosphate Wasting in a Child with Autosomal Dominant Hypophosphatemic Rickets Caused by a FGF 23 Mutation. *Horm Res* 55, 305 - 8 (2001)
43. M. L. Lipman, D. Panda, H.P.J.Bennett, J.E. Henderson, E. Shane, Y. Shen, D. Goltzman, A. C. Karaplis : Cloning of Human PEX cDNA – Expression, subcellular Localisation and Endopeptidase Activity. *The Journal of biological chemistry* 273, 13729 - 13737 (1998)
44. S. Liu, R. Guo, Q. Tu, L.D. Quarles : Overexpression of phex in osteoblasts fails to rescue the hyp mouse phenotype. *J Biol Chem* 277, 3686 - 97 (2002)
45. S. Liu, R. Guo, L.G.Simpson, Z.-S.Xiao, C.E. Burnham, L.D. Quarles : Regulation of Fibroblastic Growth Factor 23 Expression but not Degradation by PHEX. *J Biol Chem* 278, 37419 - 37426 (2003)

46. G. Löffler, P.E. Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie* 6. Auflage, Springer, Berlin, 1998, Kapitel 9 G. Löffler S. 229 - 230 (1998)
47. Lorenz - Depiereux, V.E. Guido, K.R. Johnson, Q.Y. Zheng, L.H. Gagnon, J.D. Bauschatz, M.T. Davisson, L.L Washburn, L.R. Donahue, T.M. Strom, E.M. Eicher : New intragenic deletions in the Phex gene clarify X-linked hypophosphatemia-related abnormalities in mice. *Mamm Genome* 15, 151 - 61 (2004)
48. O. Mäkitie, A. Doria, S.W. Kooh, W.G. Cole, A. Daneman, E. Sochett : Early Treatment Improves Growth and Biochemical and Radiographic Outcome in X-linked Hypophosphatemic Rickets. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 3591-97 (2003)
49. R.A. Jr. Meyer, C.G. Young, M.H. Meyer, P.L. Garges, D.K. Price : Effect of age on the expression of Pex (Phex) in the mouse. *Calcif Tissue Int* 66, 282 - 7 (2000)
50. Miao, X. Bai, D. Panda, M. McKee, A. Karaplis, D. Goltzmann : Osteomalacia in hyp mice is associated with abnormal phex expression and with altered bone matrix protein expression and deposition. *Endocrinology* 142, 926 - 39 (2001)
51. D. Miao, X. Bai, D.K. Panda, A.C. Karaplis, D. Goltzmann, M.D. McKee : Cartilage abnormalities are associated with abnormal Phex expression and with altered matrix protein and MMP-9 localisation in Hyp mice. *Bone* 34, 638-47 (2004)
52. M. Mirams, B.G. Robinson, R.S. Mason, A.E. Nelson : Bone as a source of FGF 23 : regulation by phosphate ? *Bone* 35, 1192-9 (2004)
53. T. Nesbitt, I Fujiwara, R. Thomas, Z.S. Xiao, L.D. Quarles, M.K. Drezner : Coordinated maturational regulation of PHEX and renal phosphate transport inhibitory activity : evidence for the pathophysiological role of PHEX in X-linked hypophosphatemia. *J Bone Miner Res* 14, 2027 - 35 (1999)

54. M. Orita, H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi, T. Sekiya : Detection of polymorphisms of human DNA by Gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 86, 2766-2770 (1989)
55. E. Passarge : *Color Atlas of Genetics*, 2nd Edition, Thieme, NY, 164 - 165 (2001)
56. phexdb.mcgill.ca (1999)
57. Popowska, E. Pronicka, A. Sulek, D. Jurkiewicz, P. Rowe, E. Rowinska, M. Krajewska - Walasek : X - linked hypophosphatemia in Polish Patients. 1. Mutations in the PHEX Gene. *J Appl. Genet.* 41, 293 - 302 (2000)
58. Popowska, E. Pronicka, A. Sulek, D. Jurkiewicz, E. Rowinska, J. Sykut-Cegielska, Z. Rump, E. Arasimowicz, M. Krajewska - Walasek : X- linked hypophosphatemia in Polish Patients. 2. Analysis of clinical features and genotype - phenotype correlation. *J. Appl. Genet.* 42, 73 - 88 (2001)
59. E. Pronicka, E. Popowska, E. Rowinska, E. Arasimowicz, M. Syczewska, D. Jurkiewicz, M. Lebedowski : Anthropometric characteristics of X-linked hypophosphatemia. *Am J Med Genet* 126, 141 - 9 (2004)
60. L.D. Quarles : FGF 23, PHEX, and MEPE regulation of phosphate homeostasis and skeletal mineralization. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285, 1 - 9 (2003)
61. L.D. Quarles, M.K. Drezner : Editorial : Pathophysiology of X-linked Hypophosphatemia, Tumor-Induced Osteomalacia, and Autosomal Dominant Hypophosphatemia : A PerPHEXing Problem. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 494 - 96 (2001)
62. Z.Q. Qiu, R. Travers, F. Rauch, F.H. Glorieux, C.R. Scriver, H.S. Tenenhouse : Effect of gene dose and parental origin on bone histomorphometry in x-linked hyp mice. *Bone.* 34, 134 -9 (2004)

63. G.S. Reusz, G. Miltényi, G. Stubnya, A. Szabó, C. Horváth, D.J. Byrd, F. Péter, T. Tulassay : X-linked hypophosphatemia : effects of treatment with recombinant human growth hormone. *Pediatr Nephrol* 11, 573 - 577 (1997)
64. G. Reusz : Familial hypophosphatemic rickets. *Orv Hetil* 142, 2659 -65 (2001)
65. E. Ritz, V. Haxsen, M. Zeier : Disorders of phosphate metabolism - pathomechanisms and management of hypophosphatemic disorders. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 17, 547 - 58 (2003)
66. P.S. Rowe : The wrinkled pathway of FGF23, MEPE and PHEX. *Crit Rev Oral Biol Med* 15, 264 - 81 (2004)
67. P.S.N. Rowe, C.L. Oudet, F. Francis, C. Sinding, S. Pannetier, M.J. Econs, T.M. Strom, T. Meitinger, M. Garabedian, A. David, M.A. Macher, E. Questiaux, E. Popowska, E. Pronicka, A.P. Rad, A. Mokrzycki, F.H. Glorieux, M.K. Drezner, A. Hanauer, H. Lehrach, J.N. Goulding and J.L.H.O Riordan : Distribution of mutations in the PEX gene in families with x linked hypophosphatemic rickets (HYP) *Human Molecular Genetics* 6, 539 - 549 (1997)
68. P.S. Rowe, I.R. Garrett, P.M. Schwarz, D.L. Carmen, E.M. Lafer, G.R. Mundy, G.E. Gutierrez : Surface plasmon resonance (SPR) confirms that MEPE binds to PHEX via the MEPE-ASARM motif : a model for impaired mineralization in X-linked rickets (HYP). *Bone* 36, 33 - 46 (2005)
69. Y. Sabbagh, A.O. Jones, H.S. Tenenhouse : PHEXdb, a locus specific database for mutations causing X-linked hypophosphatemia. *Human Mutat.* 16, 1 - 6 (2000)
70. Y. Sabbagh, G. Boileau, L. DesGrosseillers, H.S. Tenenhouse : Disease causing missense mutations in the PHEX gene interfere with membrane targeting of the recombinant protein. *Hum Mol Genet* 10, 1539 - 46 (2001)

71. Y. Sabbagh, C. Gauthier, H.S. Tenenhouse : The X Chromosome deletion in HYP mice extends into the intergenic region but does not include the SAT gene downstream from Phex. *Cytogenet Genome Res* 99, 344-9 (2002)
72. Y. Sabbagh, G. Boileau, M. Campos, A.K. Carmona, H.S. Tenenhouse : Structure and function of disease causing missense mutations in the PHEX gene. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2213 - 22 (2003)
73. G. Saggese, G. Baroncelli : Hypophosphataemic Rickets. *Horm Res* 53, 57 - 60 (2000)
74. K.Sato, T. Tajima, J. Nakae, M. Adachi, Y. Asakura, K. Tachibana, S. Suwa, N. Katsumata, T. Tanaka, Y. Hayashi, S. Abe, M. Murashita, K. Okuhara, N. Shinohara, K. Fujieda : Three Novel Phex Gene Mutations in Japanese Patients with X - linked Hypophosphatemic Rickets, *Pediatric Research* 48, 536 - 539 (2000)
75. P. Scheinert, B. Behrens, D. Kahle: Optimierungsstrategien bei der DNA-Amplifikation Sonderdruck : Laborpraxis Nr. 10 Vogel Verlag (1995)
76. S.C. Schiavi, R. Kumar : The phosphatonin pathway : new insights in phosphate homeostasis. *Kidney Int.* 65, 1 - 14 (2004)
77. C.P. Schmitt, O. Mehls : The enigma of hyperparathyroidism in hypophosphatemic rickets. *Pediatr Nephrol* 19, 473 - 7 (2004)
78. E. Schönau : Phosphorpenische Rachitisformen / Phosphatdiabetes (Kap. 39) in B. Allolio, H. Schulte : *Praktische Endokrinologie*, Urban Schwarzenberg, Minden, 310 - 315 (1996)
79. S. M. Schütt, M. Schumacher, P.M. Holterhus, S. Felgenhauer, O. Hiort : Effect of GH replacement therapy in two male siblings with combined X- linked hypophosphatemia and partial GH deficiency. *Eur J Endocrinol.* 149, 317 - 21 (2003)

80. M.G. Seikaly, R. Brown, M. Baum : The Effect of Recombinant Human Growth Hormone in Children With X-linked Hypophosphatemia. *Pediatrics* 100, 879 - 884 (1997)
81. N.R. Shih, O.D. Jo, N. Yanagawa : Effects of PHEX Antisense in Human Osteoblast Cells. *J Am Soc Nephrol* 13, 394-9 (2002)
82. S. Silbernagel, F. Lang : Taschenatlas der Pathophysiologie, F. Lang Thieme, Stuttgart, New York, 128 – 133 (1998)
83. E. Sochett, A.S. Doria, F. Henriques, S.W. Kooh, A. Daneman, O. Makitie : Growth and metabolic control during puberty in girls with X-linked hypophosphatemic rickets. *Horm Res* 61, 252 - 6 (2004)
84. G.E. Strewler : FGF 23, hypophosphatemia and rickets : Has phosphatonin been found? *Proc Natl Sci USA* 98, 5945 - 46 (2001)
85. T.M Strom, F. Francis, B. Lorenz, A. Boddich, M.J. Econs, H. Lehrach, T. Meitinger : Pex Gene deletions in Gy and Hyp mice provide mouse models for X-linked hypophosphatemia. *Human Mol Genet* 6, 165 - 71 (1997)
86. E.H. Stukenbrock, S. Rosendahl : Development and amplification of multiple co-dominant genetic markers from single spores of arbuscular mycorrhizal fungi by nested multiplex PCR. *Fungal Genet. Biol* 42, 73 - 80 (2005)
87. P. Sunnucks, A.C. Wilson, L.B. Beheregaray, K. Zenger, J. French, A.C. Taylor : SSCP is not so difficult : the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol Ecol* 9, 1600 - 710 (2000)
88. E. Takeda, Y. Taketani, N. Sawada, T. Sato, H. Yamamoto : The regulation and function of phosphate in the human body. *Biofactors* 21, 345 - 55 (2004a)

89. E. Takeda, H. Yanamoto, K. Nashiki, T. Sato, H. Arai, Y. Taketani : Inorganic phosphate homeostasis and the role of dietary phosphorus. *J Cell Mol Med* 8, 191 - 200 (2004b)
90. H.S. Tenenhouse : X - linked hypophosphatemia : a homologous disorder in humans and mice. *Nephrol Dial Transplant* 13 : 333 - 341 (1999)
91. H.S. Tenenhouse, J. Martel, C. Gauthier, H. Segawa, K. Miyamoto : Differential effects on Npt2a gene ablation and X-linked Hyp mutation on renal expression of Npt2c. *Am J Renal Physiol.* 285, 1271 - 8 (2003)
92. D.L. Thompson, Y. Sabbagh, H.S. Tenenhouse, P.C. Roche, M.K Drezner, J.L Salisbury, J.P. Grande, E.M. Poeschla, R. Kumar : Ontogeny of Phex/ PHEX protein expression in mouse embryo and subcellular localization in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 17, 311 - 20 (2002)
93. Tyynismaa I. Kaitila, K. Nanto-Salonen, M. Ala-Houhala, T. Alitalo : Identification of fifteen novel PHEX Gene mutations in finnish patients with hypophosphatemic rickets. *Hum Mutat* 15, 383 - 4 (2000)
94. L. Wang, L. Du, B. Ecarot : Evidence for PHEX haploinsufficiency in murine X - linked hypophosphatemia. *Mamm. Genome* 10, 385 - 9 (1999)
95. T.J. Weber, S. Liu, O.S. Indridason, L.D. Quarles : Serum FGF 23 levels in normal and disordered phosphorus homeostasis. *J Bone Miner Res.*18, 1227 - 34 (2003)
96. N. Weiss, I. Eggersdorfer, C. Keller : Multiplex-PCR-based single-strand conformation polymorphism protocol for simultaneous of up to five fragments of the low-density-lipoprotein receptor gene. *Biotechniques* 20, 438-9 (1996)

97. K.E. White, K. B. Johnsson, G. Carn, G. Hampson, T.D. Spector, M. Mannstadt, B. Lorenz-Depiereux, A. Miyauchi, I. M. Yang, Ö. Ljunggren, T. Meitinger, T. M. Strom, H. Jüppner, M.J. Econs : The autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) gene is a secreted polypeptide overexpressed by tumors that cause phosphate wasting.
J Clin Endocrinol Metab 86, 497 - 500 (2001a)
98. K.E. White, G. Carn, B. Lorenz - Depiereux, A. Benet-Pages, T.M. Strom, M.J. Econs: Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF 23.
Kidney Int. 60, 2079 - 86 (2001b)
99. M.P. Whyte, F.W. Schranck, R. Armamento-Villareal : X-linked hypophosphatemia : a search for gender, race, anticipation, or parent of origin effect on disease expression in children. J Clin Endocrinol Metab 81, 4075 - 80 (1996)
100. M.P Whyte, P.T. Christie, M.N. Podgornik, P.H. Dixon, M.C. Eddy, C. Wooding, D. Trump, M. Grieff, S. Mumm, D. Schlessinger, R.V. Thakker : X-linked Hypophosphatemia (XLH): Mutations Compromising PHEX Structure Reflect A Severe Phenotype, <http://www.faseb.org/genetics/ashg99/f607.htm> (1999)
101. O. Yamanoshita, T. Kubota, J. Hou, Y.M. Ping, X.L Zhang, X.P. Li, S.S. Li, X.X. Li, D.C. Zhu, Y. Fukushima, T. Nakajima : DHPLC is superior to SSCP in screening p53 mutations in esophageal cancer tissues. Int J Cancer 114 (1) 74 - 9 (2005)
102. S.P.Yip, L.F. Fung, S.T. Lo: Rapid detection of common southeast Asian beta - thalassemia mutations by nonisotopic multiplex PCR-SSCP analysis. Genet. Test 8, 104 - 8 (2004)
103. E. Zoidis, J. Zapf, C. Schmid : Phex cDNA cloning from rat bone and studies on phex mRNA expression : tissue-specificity, age-dependency, and regulation by insulin-like growth factor (IGF) I in vivo. Mol Cell Endocrinol 168, 41 - 51 (2000)

104. E. Zoidis, M. Gosteli-Peter, C. Ghirlanda-Keller, L. Meinel, J. Zapf, C. Schmid : IGF 1 and GH stimulate Phex mRNA expression in lungs and bones and 1,25-dihydroxyvitamin D3 production in hypophysectomized rats. *Eur J Endocrinol* 146, 97 - 105 (2002)

7 Anhang

Tabelle 4 : Laborparameter der Patienten bei (laborchemischer)Erstuntersuchung in der Kinderklinik in Lübeck

P Nr.	Alter bei Untersuchung (Monate)	Serum P mg/dl	Serum Ca mg/dl	Serum 1,25 Dihydroxy vitamin D3 ng/ml	Serum 25 OHD ng/ml	Serum PTH pg/ml	Serum A P U/l	TRP %	Temp/GFR mg/dl	Urin P mg/dl	Urin Ca mg/dl	Anmerkung
P1	32	3,2	9,68		23,9	32	740	90,3	3,3	14	0,88	
P2	2	3,41	8,36	40	48.2	53	1216	88,55	3,3	19	1,6	VSD, PDA im Verlauf : Crus varum
P3	2	4,09	8,72	59,1	32.6	70	1002	90,5	4,1	16	1,28	leichter Hyperparathyreoidismus, im Verlauf radiolog. Rachitiszeichen
P 5	62,5	2,6				45	1697	89,76		13		12 cm < 3. Perzentile
P7	0,75	4,2	9,84	23,4		76	1155	82,01	3,5	23	4,32	<3. Perzentile Hyperparathyreoidismus
P10	3	3,6	9,56	34,7	50,1	26	930	98,27	4,9	1,6	1,32	50. Perzentile radiolog. Rachitiszeichen
P11	3	5,9	10,32			7	359	98,07	8,1	5,0	7,32	
P13	100	1,55				57	589	74,78		109		7 cm < 3. Perzentile radiolog. Rachitiszeichen
P14	142	3,35	10,28			36	576	60,53	2,0	58	4,76	
P16	24	2,51				58	1206	77,22		81		3. - 10. Perzentile
P17	12,5	3,0			16.9	44	668	63,85		141		1cm < 3. Perzentile im Verlauf: Varusstellung, Zahnabzesse, Wachstums hormonmangel
P19	119	3,2	10,16			17	668	43	1,4	425	6,4	
P21	62	4,0	9,92			9	588	81,04	3,3	223	5,12	
P22	17	2,0	9,62			36,6	170	84,24	1,7	150	17,6	
P36	44	3,3	10,04		43,2	12	282	81,9	2,7	64	2,88	
P39	91	3,0	9,96			39	674	33,79	1,0	433	4,96	
P40	49	6,2	11,6			10,0	221	45,85	2,9	79	6,84	

P Nr.	Alter bei Untersuchung (Monate)	Serum P mg/dl	Serum Ca mg/dl	Serum 1,25 Dihydroxy vitamin D3 ng/ml	Serum 25 OHD ng/ml	Serum PTH pg/ml	Serum A P U/l	TRP %	Tmp/ GFR mg/dl	Urin P mg/dl	Urin Ca mg/dl	Anmerkung
P41	2 11 /12	3,1	10,04			2,0	716	79,21	2,5	116	2,16	
P51	23	2,7	9,8	47,2	33,5	40	1309	82	2,2	103	0,78	
P67	42	3,3				48	489	79,33		41		

P : Phosphat, Ca : Calcium, AP : Alkalische Phosphatase, PTH : Parathormon, TPR tubuläre Phosphatrückresorption, Tmp : Transportmaximum für Phosphat, GFR Glomeruläre Filtrationsrate, VSD : Ventrikelseptumdefekt, PDA : Persistierender Ductus arteriosus

Diese Zusammenfassung ist aufgrund fehlender Informationen von einigen sich auswärts in Behandlung befindenden Patienten nicht ganz vollständig.

Tab 5: Primerverdünnungen (Arbeitsverdünnung)

Exon 1 – 22

Exon	Primer	Stocklösung (µg / µl)	Arbeitsverdünnung 1 x TE + Stock 20 pM
1	1A	16,70	110,00 µl + 1µl
1	1S	8,73	66,14 µl + 1µl
2	2A	14,16	107,30 µl + 1µl
2	2S	17,89	129,00 µl + 1µl
3	3A	14,71	106,10 µl + 1µl
3	3S	16,56	114,00 µl + 1µl
4	4A	19,45	117,80 µl + 1µl
4	4S	9,77	64,40 µl + 1µl
5	5A	14,62	110,80 µl + 1µl
5	5S	15,63	107,60 µl + 1µl
6	6A	10,61	84,60 µl + 1µl
6	6S	13,66	103,50 µl + 1µl
7	7A	11,99	82,60 µl + 1µl
7	7S	18,35	126,40 µl + 1µl
8	8A	15,99	115,40 µl + 1µl
8	8S	20,74	142,90 µl + 1µl
9	9A	17,43	125,80 µl + 1µl
9	9S	13,75	94,70 µl + 1µl
10	10A	13,91	91,60 µl + 1µl
10	10S	13,07	90,00 µl + 1µl
11	11A	14,89	94,00 µl + 1µl
11	11S	12,19	80,30 µl + 1µl
12	12A	17,06	107,70 µl + 1µl
12	12S	22,38	154,00 µl + 1µl
13	13A	15,23	100,30 µl + 1µl
13	13S	18,54	140,50 µl + 1µl
14	14A	6,27	45,50 µl + 1µl
14	14S	16,09	101,60 µl + 1µl
15	15A	10,94	75,30 µl + 1µl
15	15S	10,77	74,20 µl + 1µl
16	16A	15,31	96,60 µl + 1µl
16	16S	14,20	89,6 µl + 1µl
17	17A	13,82	83,7 µl + 1µl
17	17S	29,41	193,7 µl + 1µl
18	18A	17,13	129,8 µl + 1µl
18	18S	9,44	71,5 µl + 1µl
19	19A	17,49	110,4 µl + 1µl
19	19S	11,69	73,8 µl + 1µl
20	20A	11,27	68,3 µl + 1µl
20	20S	15,78	95,6 µl + 1µl
21	21A	23,33	141,4 µl + 1µl
21	21S	12,09	70,4 µl + 1µl
22	22A	16,52	104,2 µl + 1µl
22	22S	14,17	85,9 µl + 1µl

8 Danksagung

In Gedenken an Herrn Prof. Dr. Kruse, der dieses Thema vorgeschlagen hat, möchte ich Herrn Prof. Dr. Hiort für die Übernahme der Betreuung, sein Interesse an der Fortführung und die Unterstützung während dieser Arbeit danken. Weiterhin danke ich meinem Betreuer Dr. Schumacher für seine Anregungen und Unterstützung, sowie den Mitarbeiterinnen der molekularendokrinologischen Arbeitsgruppe für die Einarbeitung in die verschiedenen Arbeitstechniken, die Bereitstellung des Materials und die Fortführung der Sequenzierungen. Außerdem geht mein Dank an die Ärzte, die uns die Proben der Patienten zur Verfügung gestellt haben, ohne die eine Studie dieses Umfanges nicht möglich gewesen wäre.

9 Lebenslauf

Stefanie Brigitte Felgenhauer

geb. 29. Mai 1979, in Hamburg, Deutschland

ledig

Ausbildung

1984 - 1985 Vorschule am Weiher, Hamburg

1985 - 1989 Grundschule am Weiher, Hamburg

1989 - 1998 Helene Lange Gymnasium, Hamburg, Abitur (1,5)

1998 - 2004 Medizin - Studium an der Universität zu Lübeck

2000 Physikum

2001 1. Staatsexamen

2002 USMLE Step 1

2002 - 2003 Auslandssemester an der Universität in Bergen, Norwegen

2003 2. Staatsexamen

2004 3. Staatsexamen, Abschluß der Ärztlichen Prüfung mit 2,16

Praktisches Jahr

20.10.03 - 14.12.03 Chirurgie am Haukeland Sykehus, Bergen, Norwegen

15.12.03 - 08.02.04 Innere am Sykehuset Innlandet, Hamar, Norwegen

09.02.04 - 04.04.04 Innere an der Royal Lancaster Infirmary, Lancaster, GB

05.04.04 - 30.05.04 Chirurgie am Regionalspital Sta. Maria, Visp, Schweiz

31.05.04 - 19.09.04 Pädiatrie an der Hochgebirgsklinik, Davos - Wolfgang, Schweiz

Veröffentlichungen

S. M. Schütt, M. Schumacher, P.M. Holterhus, S. Felgenhauer, O. Hiort

Effect of GH replacement therapy in two male siblings with combined X-linked hypophosphatemia and partial GH deficiency.

Eur J Endocrinol. 2003 Oct; 149(4) : 317 - 21

Poster : M. Schumacher, S. Schütt, S. Nissen, S. Felgenhauer, O. Hiort

X - chromosomal dominant vererbte hypophosphatämische Rachitis : Genotyp - Phänotyp Korrelation und Frühbehandlungsstrategie