

Aus der Universitäts- Kinder und Jugendklinik

Direktor: Prof. Dr. med. M. Wigger (k)

Dissertation

**Hereditäre Hypophosphatämische Rachitis und Zahnmineralisierung:
Untersuchungen an der *Hyp*-Maus**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae dentariae

(Dr. med. dent.)

der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Kadidja Maria Neumann

Rostock, im Februar 2013

Einreichungsdatum: 04.02.2013

Verteidigungsdatum: 12.11.2013

Dekan: Prof. Dr. med. habil. E. C. Reisinger

- Gutachter:
1. Prof. Dr. med. D. Haffner
Medizinische Hochschule Hannover
Zentrum Kinderheilkunde und Jugendmedizin
Klinik für Pädiatrische Nieren-, Leber- und Stoffwechselerkrankungen
 2. Prof. Dr. med. dent. H. Lang
Universitätsmedizin Rostock
Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
 3. Prof. Dr. med. Dominik Müller
Charité Universitätsmedizin bei Campus Virchow Klinikum
Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Nephrologie

I	Inhaltsverzeichnis	
II	Verzeichnis der Abkürzungen	
III	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	
1	Einleitung	
1.1	Physiologie des Phosphatstoffwechsels	1
1.1.1	Regulation der Phosphathomöostase und die Rolle von FGF-23	2
1.1.1.1	Die Struktur von FGF-23	4
1.2	Formen der Rachitis	4
1.2.1	Erworbene Formen der Rachitis	5
1.2.1.1	Die Vitamin-D ₃ -Mangel-Rachitis	5
1.2.1.2	Die Tumor-induzierte Osteomalazie (TIO)	6
1.2.2.3	Die medikamenteninduzierte Rachitis/ Osteomalazie	6
1.2.2	Angeborene Formen der Rachitis	7
1.2.2.1	Die autosomal rezessive hypophosphatämische Rachitis: ARHR1 und ARHR2	7
1.2.2.2	Die autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis (ADHR)	7
1.2.2.3	Die X-chromosomal dominante Hypophosphatämie (XLH)	8
1.2.2.3.1	Klinisches Bild der XLH	8
1.2.2.3.2	Allgemeine Therapie der XLH	11
1.2.2.3.3	Dentale Behandlungsmöglichkeiten	12
1.3	Mausmodelle der Hypophosphatämischen Rachitis	12
1.3.1	Die <i>Hyp</i> -Maus als Tiermodell der XLH	13
1.4	Anatomie der murinen Zahngewebe	13
1.5	Histologie der Zahngewebe	15
1.5.1	Der Schmelz (Enamelum)	15
1.5.2	Das Dentin (Dentinum)	17
1.5.3	Das Zement (Cementum)	19
1.5.4	Die Zahnpulpa (Pulpa dentis)	20
1.5.5	Die Wurzelhaut (Periodontium)	21
1.5.6	Der Alveolarknochen	21
2	Ziel der Arbeit	22
3	Material und Methoden	23
3.1	Material	23

3.2	Methoden	23
3.2.1	Beschreibung des Tierversuchs	23
3.2.2	Tierhaltung	23
3.2.3	Präparation und Lagerung der Mäuseschädel mit fotographischer Dokumentation	24
3.2.4	Röntgentomographie <i>in-vivo</i> und <i>ex-vivo</i>	25
3.2.4.1	Aufnahmen der vorderen Extremitäten und des Schädels <i>in-vivo</i>	25
3.2.4.2	Untersuchungen der isolierten Unterkiefer	25
3.2.4.3	Analyse der Röntgentomographien	25
3.2.5	Histologische Charakterisierung der Kiefer	25
3.2.5.1	Herstellung der Zahnschnitte für die Histologie	25
3.2.5.1	Histomorphologische Charakterisierung entmineralisierter Kieferpräparate	26
3.2.5.2.1	Hämatoxylin-Eosin Färbung	26
3.2.5.2.2	Übersichtsfärbung nach Masson-Goldner	27
3.2.6	Quantitative Analyse von Blut und Urin	28
3.3	Statistische Auswertung	28
4	Ergebnisse	29
4.1	Phänotyp der <i>Hyp</i> -Mäuse	29
4.2	Morphologische Besonderheiten der Schädel	30
4.2.1	Morphologische Besonderheiten der Unterkiefer und Molaren	32
4.2.2	Die röntgentomographische Bestimmung der Mineralisierungs- dichte in Kieferknochen und Molaren	33
4.3	Histologische Untersuchungen	34
4.4	Biochemische Parameter in Serum und Urin	36
5	Diskussion	38
6	Zusammenfassung	43
7	Thesen	44
8	Literaturverzeichnis	45

II Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADHR	Autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis
ARHR	Autosomal rezessive hypophosphatämische Rachitis
Ca	Calcium
CaSR	Calcium-Sensing Rezeptor
CNI	Chronische Niereninsuffizienz
CT	Computertomograph
DMP-1	Dentin-Matrix-Protein 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dL	Deziliter
ELMI	Elektronenmikroskop
ENPP1	Ectonucleotid Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1
FGF-23	Fibroblast-Growth-Factor-23
HE	Hematoxylin und Eosin Färbung
HHRH	Hereditäre hypophosphatämische Rachitis
<i>HYP</i> -Maus	Mausmodell der hypophosphatämischen Rachitis
IGF-1	Insuline-Like Growth Factor 1
mM	Millimol
MW	Mittelwert
Na	Natrium
NaPi-IIa/b/c	Natriumabhängige Phosphattransporter Typ IIa/b/c
Pi	anorganisches Phosphat
PHEX	Phosphate regulating endopeptidase on the X-chromosome
PTH	Parathormon
Stdd	Standardabweichung
TEM	Tranmissionsselektronenmikroskop
ROI	Region of Interest
RNA	Ribonukleinsäure
WT	Wildtyp
XLH	X-linked hypophosphatemic rickets

III Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1:	Regulation und Funktion von FGF-23	3
Abb. 2:	Schematische Darstellung von FGF-23	4
Abb. 3	Charakteristische Verbiegungen des Femurs (A) und typische rachitische Schädelveränderungen (B)	10
Abb. 4:	Zahnformel der Maus	14
Abb. 5:	Aufbau des Zahn und Zahnhalteapparats	15
Abb. 6:	Schmelzstruktur	16
Abb. 7:	Zusammensetzung der Dentinstruktur	18
Abb. 8:	Darstellung der Region of Interest (ROI)	26
Abb. 9:	Gewichtszunahme bei <i>BL₆</i> - und <i>Hyp</i> -Mäusen	29
Abb. 10:	Röntgenaufnahmen (μ -CT) des Schädels einer <i>BL₆</i> (A) und <i>Hyp</i> (B)-Maus nach Isoflurananästhesie	31
Abb. 11:	Fotographische Darstellung (A) und Röntgenaufnahmen (B) der Schädel von <i>BL₆</i> - (links) und <i>Hyp</i> -Mäusen (rechts)	31
Abb. 12:	Maßstabsgetreue Fotografie von Unterkiefer und Schädel einer <i>BL₆</i> -Maus (A) und <i>Hyp</i> -Maus (B)	32
Abb. 13:	Unterkiefer und Molaren von <i>BL₆</i> (A)- und <i>Hyp</i> -Maus (B)	32
Abb. 14:	Typische Rekonstruktion nach hochauflösender röntgentomographischer Untersuchung (μ -CT) (A) mit anschließender quantitativer Bestimmung der Mineraleichte im alveolaren Knochen (BMD; B) bzw. Schmelzdichte (C) der Molaren von <i>BL₆</i> - und <i>Hyp</i> -Mäusen	33
Abb. 15:	Längsschnitt durch einen entkalkten Molaren von <i>BL₆</i> -Maus (A,B) und <i>Hyp</i> -Maus (C,D) nach HE-Färbung	34
Abb. 16:	Histologische Darstellung (HE-Färbung) des Interglobulardentins von <i>BL₆</i> (A) und <i>Hyp</i> -Mäusen (B)	35
Abb. 17:	Querschnitt durch einen juvenilen Zahn einer <i>BL₆</i> -(A) und <i>Hyp</i> -Maus (B) (HE-Färbung)	35
Abb. 18:	Die Plasmakonzentrationen von Calcium (A), Phosphat (B) und FGF-23 (C) bei <i>BL₆</i> (□)- und <i>Hyp</i> -Mäusen (■)	36
Abb. 19:	Die renale Ausscheidung von Calcium (A, B) und Phosphat (C, D) bei <i>BL₆</i> (□)- und <i>Hyp</i> -Mäusen (■)	37
Tab. 1:	Formen der hereditären hypophosphatämischen Rachitis	9
Tab. 2:	Durchschnittliche tägliche Futter- und Wasseraufnahme von <i>BL₆</i> - und <i>Hyp</i> -Mäusen	30
Tab. 3:	Übersicht der bisher publizierten Studien zur Zahnentwicklung der <i>Hyp</i> -Maus	40

1 Einleitung

1.1 Physiologie des Phosphatstoffwechsels

Phosphor kommt in der unbelebten Natur bevorzugt als Bestandteil von Mineralien wie den Apatiten und Phosphoriten vor (Löffler G et al. 2006). Darüber hinaus ist es ein für den Menschen unentbehrliches Element und im Organismus als anorganisches oder organisches Phosphat vorhanden. Es ist in Form von Apatit für die Stabilität des Skeletts, als Adenosin-triphosphat für den Energiestoffwechsel aller Zellen, in Form der Nukleotide für die DNA- und RNA-Synthese, sowie intrazelluläre Signalkaskaden essentiell und kommt in Form von Phospholipiden als Bestandteil von Zellmembranen nahezu ubiquitär vor (Lehnert H 2009). Der menschliche Körper enthält etwa 700g elementarem Phosphor, davon sind 85% in Form von Hydroxylapatit im Knochen und den Zähnen gebunden, 6% sind in Muskelzellen und 9% im übrigen Gewebe enthalten (Parfitt AM 1987). Der tägliche Phosphorbedarf beträgt etwa 0,8-1,5 g und sollte bevorzugt durch Milchprodukte, Getreide und Fleisch gedeckt werden (Löffler G et al. 2006). Etwa 70% des aufgenommenen Phosphats wird im Dünndarm nach enzymatischer Hydrolyse als anorganisches Phosphat absorbiert und entweder in Form von organischen Verbindungen in den Zellstoffwechsel integriert oder in Form von Hydroxylapatit in den Knochen eingebaut. Dabei findet im Knochen ein ständiger Auf- und Abbau statt, d.h. Phosphat (Pi) wird sowohl vom Skelett aufgenommen als auch von dort wieder abgegeben, so dass die auf das Skelett bezogene Netto-Bilanz Null ist (Löffler G et al. 2006). Für die Aufrechterhaltung der Phosphathomöostase sind Niere und Darm verantwortlich (Löffler G et al. 2006; Wagner C and Murer H 2008). Sowohl die gastrointestinale Absorption aus der Nahrung als auch die Ausscheidung in der Niere werden entscheidend durch Natrium-abhängige Phosphattransporter (NaPi) vermittelt und reguliert. In der Niere finden sich hauptsächlich NaPi-IIa und NaPi-IIc, im Dünndarm ist es im wesentlichen NaPi-IIb. Die Expression und Aktivität dieser Transporter wird kurz- und langfristig durch Parathormon (PTH), Insuline-Like Growth Factor 1 (IGF-1), 1,25-Dihydroxy-cholecalciferol (1,25-(OH)₂ Vitamin D₃, Calcitriol), durch Phosphat selbst und durch die erst vor wenigen Jahren beschriebene Klasse der Phosphatonine reguliert. Zu dieser Gruppe von Hormonen gehören neben dem Fibroblast-Growth-Factor-23 (FGF-23) auch das "Phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome" (PHEX) (Löffler G et al. 2006; Wagner C and Murer H 2008).

1.1.1 Regulation der Phosphathomöostase und die Rolle von FGF-23

Sowohl im Skelettwachstum als auch bei physiologischem Knochenumbau ("Bone turnover") werden Calcium und Phosphat zur Bildung von Hydroxylapatit und weiteren mineralischen Komponenten benötigt (Lehnert H 2009). Noch vor einigen Jahren ist man davon ausgegangen, dass der Calciummetabolismus aktiv und im wesentlichen durch das Wechselspiel von Parathormon (PTH) und Calcitriol ($1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$) reguliert wird, während sich der Phosphatspiegel passiv und dem Calciumspiegel nachlaufend einstellt. Dieses Modell wurde durch die Identifizierung des im Knochen gebildeten FGF-23 obsolet und es ist heute unumstritten, dass sowohl der Ca- als auch P_i - Metabolismus durch einen aus PTH, Calcitriol und FGF-23 gebildeten Regelkreis aktiv reguliert werden (Berndt T and Kumar R 2009; Emmett M 2008; Liu S et al. 2006a; Shaikh A and Berndt T 2008). Störungen dieses Regelkreises führen zu Beeinträchtigungen im Knochen- und Mineralhaushalt (Haffner D and Fischer DC 2010; Martin A et al. 2012).

Vitamin D_3 wird in der Leber zu 25-Hydroxy-Vitamin D_3 (25(OH)D_3) und anschließend im proximalen Nierentubulus durch ein mitochondriales Enzymsystem zum aktiven Vitamin- D_3 -Hormon (Calcitriol) hydroxyliert. Diese Umwandlung wird durch Hypokalzämie, Hypophosphatämie und Hyperparathyreoidismus stimuliert und durch Hyperkalzämie, Hyperphosphatämie und niedrige PTH-Spiegel sowie Calcitriol gehemmt. Zu hohe Calcitriol-Spiegel stimulieren zudem die Bildung von $24,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ (Löffler G et al. 2006). Parathormon wird in der Nebenschilddrüse gebildet und nach Stimulation des Calcium-sensing Rezeptors (CaSR) als Folge niedriger Calciumspiegel in die Zirkulation abgegeben. In der Niere hemmt PTH die Calciumausscheidung innerhalb einiger Minuten und fördert die Calcitriol-Synthese. Im Skelett stimuliert es gemeinsam mit Calcitriol die Freisetzung von Calcium und Phosphat innerhalb einiger Stunden. Im Darm fördert Parathormon indirekt innerhalb mehrerer Tage über eine vermehrte Bildung von Calcitriol die Calcium- und Phosphataufnahme. Ein paralleler Anstieg der Phosphatkonzentration im Serum wird durch eine PTH- induzierte renale Phosphatausscheidung verhindert. Gleichzeitig stimulieren sowohl Calcitriol als auch der Anstieg der Phosphatkonzentration im Serum die Freisetzung des von Osteoblasten und Osteozyten gebildeten FGF-23. FGF-23 hemmt, ähnlich wie PTH, die Phosphatrückresorption im proximalen Tubulus und führt damit zu einer Phosphaturie (Liu S et al. 2006a; Liu S et al. 2006b). Sowohl FGF-23 als auch PTH hemmen die Natrium-Phosphat-Co-transporter NaPi-IIa und NaPi-IIb. Dabei sind die renalen Effekte von FGF-23

vermutlich an die Interaktion mit Klotho gebunden. Das Protein Klotho wurde nach der griechischen Göttin, die den Lebensfaden spinnt, benannt. Es ist ein großes (120 - 135 kDa) Typ I Membranprotein mit einer Transmembrandomäne in der Nähe des zytoplasmatischen C-Terminus. Es wird fast ausschließlich im distalen Nierentubuli, in der Nebenschilddrüse und im Plexus Choroideus im Gehirn gefunden (Haffner D and Fischer DC 2010; Kuro-o M 2010; Martin A et al. 2012; Razzaque MS 2009; Razzaque MS 2011; Razzaque MS and Lanske B 2007). Ein Absinken des Phosphatspiegels durch "überschießende" Freisetzung von FGF-23 wird durch kompensatorische Steigerung der Vitamin-D₃-Synthese verhindert, d.h. PTH, Calcitriol und FGF-23 bilden einen komplexen Regelkreis, in dem sich jeweils zwei der drei Hormone durch feedback-Inhibition und über die Calcium- bzw. Phosphatspiegel kontrollieren. Die FGF-23-Bildung wird über Calcitriol und die Serumkonzentration von Phosphat kontrolliert. Vitamin D₃ stimuliert die FGF-23-Synthese, während FGF-23 seinerseits die Bildung von Calcitriol supprimiert (Abb.1) (Fukagawa M and Kazama JJ 2006; Razzaque MS and Lanske B 2007; Wagner C and Murer H 2008).

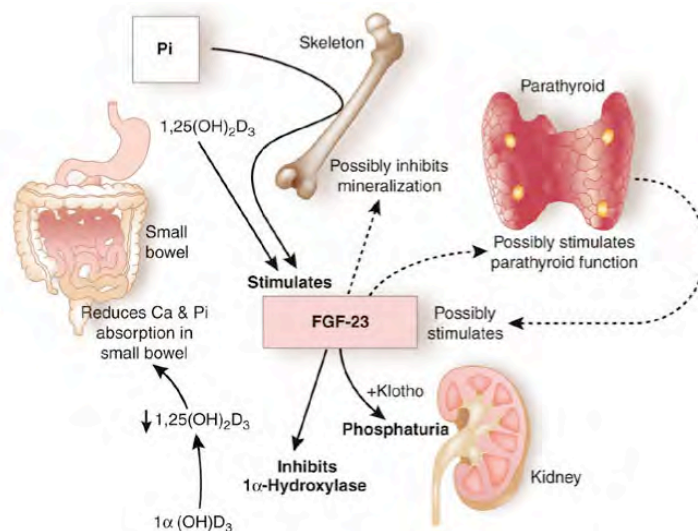


Abb. 1: Regulation und Funktion von FGF-23 (modifiziert nach (Emmett M 2008))

FGF-23 wird aus dem Knochen ausgeschüttet, wenn die Phosphatspiegel im Serum auf supraphysiologische Werte ansteigen. FGF-23 reduziert die Expression der renalen (NaPi-IIa und NaPi-IIc) und intestinalen (NaPi-IIb) Phosphattransporter und hemmt die Bildung von Calcitriol. Erhöhte Calcitriol Spiegel stimulieren die FGF-23-Synthese, während umgekehrt hohe FGF-23 Spiegel die Calcitriol-Synthese hemmen (Fukagawa M and Kazama JJ 2006; Razzaque MS and Lanske B 2007; Wagner C and Murer H 2008).

1.1.1.1 Die Struktur von FGF-23

Der Fibroblast-Growth-Factor-23 ist ein aus 251 Aminosäuren bestehendes Protein, mit einem Molekulargewicht von ca. 30-32 kDa. FGF-23 wird von Osteoblasten sezerniert und ist in anderen osteogenen Zellen, wie Osteozyten und Chondrozyten zu finden. Das Protein FGF-23 besitzt in seiner Aminosäurekette eine Domäne (RXXR-Sequenz), an der es durch die zinkabhängige Metalloprotease (PHEX) proteolytisch gespalten und damit inaktiviert werden kann (Abb.2). Das *PHEX* Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und wird vor allem in Osteoblasten, Osteozyten und Odontoblasten exprimiert. Mutationen von PHEX führen zu einem verlangsamten Abbau von FGF-23 (Fukagawa M and Kazama JJ 2006; Razzaque MS and Lanske B 2007; Wagner C and Murer H 2008) .

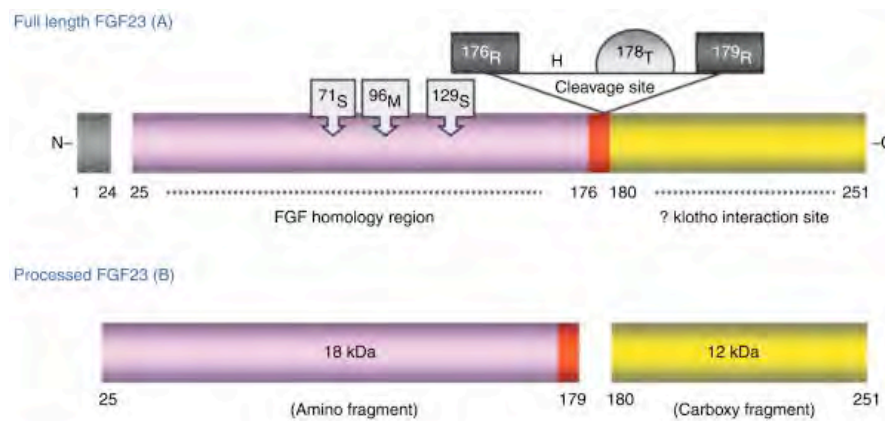


Abb. 2: Schematische Darstellung von FGF-23 (modifiziert nach Razzaque MS and Lanske B 2007))

FGF-23 besteht aus einem Signalpeptid (AS 1-24), dem amino-terminalen Ende mit Homologien zu anderen FGFs (AS 25-179; ca. 18 kDa), und einer carboxy-terminalen Domäne (AS 180-251; ca. 12 kDa). Zwischen beiden Domänen (AS 176-179) befindet sich die Spaltungsstelle.

1.2 Formen der Rachitis

Rachitis ist als eine gestörte Mineralisation, die zur Desorganisation der Wachstumsfugen führt, definiert. Ursache der Rachitis ist ein herabgesetztes Calcium-Phosphatprodukt. Die Diagnose kann in der Regel klinisch aufgrund von Beindeformitäten und einer Wachstumsstörung gestellt werden, verlangt jedoch eine detaillierte radiologische und laborchemische Abklärung, um die zugrunde

liegenden Erkrankung zu identifizieren. Man unterscheidet in angeborene (hereditärer) und erworbene Formen bzw. calcipenische und phosphopenische Rachitis (Schnabel D and Haffner D 2005). Eine Rachitis kann grundsätzlich auch zu einer Mineralisationsstörung der Zähne führen.

1.2.1 Erworbene Formen der Rachitis

1.2.1.1 Die Vitamin-D₃-Mangel-Rachitis

Die Vitamin-D₃-Mangel-Rachitis bezeichnet eine calcipenische Störung des Knochenstoffwechsels, die im Kindesalter auftritt. Sie führt zu einer Demineralisation der wachsenden Knochen und dadurch zu Veränderungen an den Wachstumsfugen. Der Knochen verfügt nicht mehr über die notwendige Stabilität, wird weich und biegsam (Lentze MJ and Schaub J 2007). Als Leitsymptome der Vitamin-D₃-Mangelrachitis werden Verkrümmungen der knöchernen Wirbelsäule, Auftreibungen der metaphysären Wachstumsfugen und Achsenabweichungen der Kniee genannt. Darüber hinaus sind auch das Wachstum der Muskulatur und die Zahnbildung bei Jugendlichen negativ beeinflusst. Als weitere Symptome können Glockenthorax, rachitischer Rosenkranz, Craniotabes, Quadratschädel und Gingivahyperplasien auftreten (Lentze MJ and Schaub J 2007; Misra M et al. 2008). Das vergleichbare Krankheitsbild bei Erwachsenen wird als Osteomalazie bezeichnet und ist durch eine gestörte Mineralisierung von Spongiosa und Kompakta gekennzeichnet (Hiort O and Danne T 2010). Die Ursache einer Vitamin-D₃-Mangel-Rachitis ist die eingeschränkte physiologische Vitamin-D₃-Bildung in der Haut durch herabgesetzte Sonneneinwirkung in Kombination mit einer zu geringen Vitamin-D₃ Zufuhr mit der Nahrung bzw. mit einer unzureichenden Vitamin-D₃ Prophylaxe im Kindesalter (Lentze MJ and Schaub J 2007). Der Vitamin-D₃ Mangel führt zur verminderten intestinalen Absorption von Calcium (Lentze MJ and Schaub J 2007; Misra M et al. 2008). Wird eine Vitamin-D₃-Mangel-Rachitis außerhalb des Säuglings-/Kleinkindalters bzw. der Pubertät diagnostiziert, so kommen differentialdiagnostisch u.a. chronische Malabsorptions, reduzierte hepatische Metabolisierung der Vorstufen, Gallenwegserkrankungen oder eine chronische Niereninsuffizienz als Ursache in Betracht. Die Therapie besteht in der Verabreichung von hochdosierten Vitamin-D₃, begleitend sollte Calcium in ausreichender Menge gegeben werden, da sonst in der Initialphase der Behandlung die Gefahr eines hypokalzämischen Krampfanfalls besteht (Lentze MJ and Schaub J 2007; Misra M et al. 2008).

1.2.1.2 Die Tumor-induzierte Osteomalazie (TIO)

Die Tumor-induzierte Osteomalazie ist eine sehr seltene, erworbene Form der Hypophosphatämie. Charakteristisch für die TIO ist niedriges Serum-Calcitriol bei Normalwerten für Calcium, 25(OH)-D₃ und PTH (Strom T and Lorenz-Depiereux B 2001). Die Erkrankung manifestiert sich meist im Erwachsenenalter, es sind jedoch auch Fälle bei Jugendlichen beschrieben. Der Beginn der Erkrankung ist oftmals durch Müdigkeit und Muskelschwäche gekennzeichnet. Leitsymptome sind Knochenschmerzen mit Hypophosphatämie und Nephrokalzinose (Strom T and Lorenz-Depiereux B 2001). Pathophysiologisch besteht eine Hemmung der renalen Phosphatresorption und der Calcitriol-Bildung durch FGF-23 (Blumsohn A 2004; de Beur SM 2005). Bei vielen, aber nicht bei allen Patienten mit klinisch gesicherter TIO lassen sich erhöhte FGF-23 Spiegel bestimmen, die in der Regel auf den mesenchymalen Tumoren zurückzuführen sind. Diese Tumore können prinzipiell überall im Weichgewebe und Knochen lokalisiert sein. Typische Beispiele sind Hämangioperizytome, Angiofibrome, odontogene Tumoren der Maxilla, Fibrome und Myome (Strom T and Lorenz-Depiereux B 2001). Die Therapie besteht bis zum Auffinden und Entfernen des Tumors in der Substitution von Calcitriol und Phosphat. Nach Tumorresektion wird eine vollständige Remission der Erkrankung erreicht. Die renale Phosphatresorption normalisiert sich und es kommt zur Ausheilung von Rachitis oder Osteomalazie (De Beur SM et al. 2002; Pettifor JM 2008; Strom T and Lorenz-Depiereux B 2001).

1.2.2.3 Die Medikamenten-induzierte Rachitis/ Osteomalazie

Eine Vielzahl verschiedener Medikamente greift als „Nebenwirkung“ in den Knochenstoffwechsel und -umbau ein und kann Mineralisationsstörungen verursachen. Hier sind alle Medikamente zu nennen, die im Prinzip entweder direkt einen Einfluss auf den Stoffwechsel von Vitamin-D₃ haben, also mit Cytochrom P450 interferieren, oder den Calcium- bzw. Phosphatmetabolismus beeinflussen. Diese Medikamente können klinische Bilder einer Osteomalazie auslösen (Bartl R et al. 2009; Bartl R and Gradinger R 2009). Antikonvulsiva wie Carbamazepin, Phenobarbital oder Phenytoin interferieren mit dem Vitamin-D₃-Stoffwechsel, in dem sie in der Leber die Produktion von Enzymen induzieren, die verstärkt Vitamin D₃ und seine Metaboliten abbauen (Bartl R et al. 2009). Antazida können die Phosphatresorption inhibieren. Dies gilt insbesondere für aluminiumhaltige Präparate, die, wie im Fall der inzwischen nicht mehr zugelas-

senen aluminiumhaltigen Phosphatbindern, zu schwerer Osteomalazie führen können. Auch Zytostatika wie Ifosfamid können die renale Phosphatresorption reduzieren und damit zu einer Hypophosphatämie führen (Bartl R et al. 2009; Bartl R and Grading R 2009).

1.2.2 Angeborene Formen der Rachitis

Neben diesen erworbenen Formen existieren eine Reihe angeborener Syndrome, die mit einer reduzierten Phosphatresorption im proximalen Tubulus im Sinne einer phosphopenischen Rachitis einhergehen (Tab.1). Hierbei liegt bei 90% der Patienten eine x-chromosomal dominante Hypophosphatämie (XLH) vor

1.2.2.1 Die autosomal rezessiven hypophosphatämischen Rachitiden ARHR Typ-1 und ARHR Typ-2

Die ARHR ist eine seltene Form der hypophosphatämischen Rachitis, die entweder auf Mutationen im Matrix-Protein-1 (*DMP-1*; Chromosom 4q21; ARHR Typ-1) oder auf Mutationen im renalen NaPi Co-Transporter *ENPP1* (Chromosom 6q22-23; ARHR Typ-2) zurückzuführen ist. Bei Patienten mit ARHR Typ-2 liegt eine gesteigerte renale Synthese von Calcitriol mit konsekutiv gesteigerter gastrointestinaler Calciumresorption und Hypercalciämie vor (Gerok W 2007). Die Betroffenen zeigen im Kindesalter die Symptome einer Rachitis und im Erwachsenenalter die einer Osteomalazie. Typisch für beide Formen sind ausgeprägte Muskelschmerzen, Zahndefekte (besonders bei Patienten mit *DMP-1* Mutationen) und Kleinwuchs (Baker LR and Stamp TC 1989; Gerok W 2007; Jiang B et al. 2010; Lorenz-Depiereux B et al. 2006a; Lorenz-Depiereux B et al. 2006b).

1.2.2.2 Die autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis (ADHR)

Die ADHR ist eine weitere seltene, vererbte Funktionsstörung der Phosphathomöostase. Als klinische und biochemische Parameter finden sich ein isolierter renaler Phosphatverlust und eine Hypophosphatämie bei normalen Serumkonzentrationen von Calcium, 1,25-(OH)₂D₃ und PTH (Strom T and Lorenz-Depiereux B 2001). Je nach Alter bei Manifestation bestehen Rachitis und/oder Osteomalazie. Die Muskelschwäche ist geringer ausgeprägt als beim autosomal rezessiv vererbten Typ (De Beur SM et al. 2002; Gerok W 2007; Shaikh A and

Berndt T 2008). Bei der ADHR betrifft der genetische Defekt nicht den NaPi-Transporter, sondern FGF-23, das nicht mehr proteolytisch inaktiviert werden kann (De Beur SM et al. 2002; Gerok W 2007; Shaikh A and Berndt T 2008).

1.2.2.3 Die X-chromosomal dominante Hypophosphatämie (XLH)

Die X-chromosomal dominante Hypophosphatämische Rachitis („X-linked hypophosphatemic rickets“, XLHR) hat eine Inzidenz von 1: 20.000 Neugeborenen, betrifft bevorzugt Mädchen und ist in mehr als 90% aller Fälle die häufigste der erblichen Rachitisformen (De Beur SM et al. 2002; Hillmann G and Geurtsen W. 2005; Meyer RA. 1985; Pereira CM et al. 2004). 1935 beschrieb McCune diese refraktäre, hartnäckige Form der Rachitis bei Patienten, die nach Gabe von Vitamin D₃ keine Verbesserung des Krankheitsbildes zeigten (McCune D 1935). Zwei Jahre später beschrieben Albright et al. diesen Zustand als vererbare „Vitamin-D-resistente-Rachitis“ (Albright F and Butler AM 1937). Bei der XLH führen Mutationen im *PHEX* Gen zu sekundärer Akkumulation von FGF-23. *PHEX* (Chromosom Xp22.2-p22.1) wird im Knochen und in den Zähnen nicht jedoch in der Niere exprimiert. Das Gen besteht aus 22 Exonen und codiert ein Protein mit 749 Aminosäuren (Gerok W 2007; De Beur SM and Levine MA 2002; Strom T and Lorenz-Depiereux B 2001). Mutationen des *PHEX*- Gens können den Abbau von FGF-23 verzögern und so zu einer Hemmung der renalen Phosphatresorption in der Niere mit konsekutiver Unterdrückung der Calcitriol-Synthese führen (Hillmann G and Geurtsen W. 2005; Hiort O and Danne T 2010). Der genaue Mechanismus ist allerdings noch nicht genau aufgeklärt worden. Die übrigen Parameter des Knochenstoffwechsels liegen im Normalbereich (Gerok W 2007; De Beur SM and Levine MA 2002).

1.2.2.3.1 Klinisches Bild der XLH

Eine XLH wird klinisch meist erst mit dem 2. bis 3. Lebensjahr mit zunehmendem Kleinwuchs, Wachstumsverzögerungen und Rachitis symptomatisch (Hiort O and Danne T 2010; Strom and Lorenz-Depiereux B2001). Bei der klinischen Untersuchung fallen bei den Kindern ausgeprägte femorale und /oder tibiale Verbiegungen (Abb.3A) und ein typischer "Watschelgang" auf. Insbesondere beim Laufenlernen, also bei mechanischer Belastung, kommt es zu einer zunehmenden Varusstellung der Beine. Es treten außerdem Abweichungen der Schädelgeometrie, wie „frontal bossing“ (Abb.3B) und eine Abflachung des Schädels auf (Pereira CM et al. 2004).

Tab. 1: Formen der hereditären hypophosphatämischen Rachitis (modifiziert nach (Lorenz-Depiereux B et al. 2010; Patzer L 2000 ; Pettifor JM 2008)

Erkrankung	Chromosom / Gen	Serum -Spiegel von		Wichtige Besonderheiten im Vergleich zur XLHR-1
		FGF-23	1,25(OH) ₂ D ₃	
XLHR-1 X-chromosomal-dominante HR (Typ 1; OMIM #307800)	Xp22.2-p22.1 / <i>PHEX</i>	allgemein erhöht	normal oder verringert	
XLHR-2 X-chromosomal-rezessive HR (Typ 2; OMIM #300554)	Xp11.23-p11.22 / <i>CLCN5</i>		erhöht	Hyperkalziurie, Proteinurie, Nephrokalzinose, Progression zu CN1 möglich
ADHR Autosomal-dominante HR (OMIM #193100)	12p13.32 / <i>FGF-23</i>	variabel;während symptomatischer Erkrankung mglw. erhöht	verringert	Klinisch und laborchemisch identisch zu XLHR-Typ 1, event. spätere Manifestation
ARHR-1 und -2 Autosomal-rezessive HR (Typ1; OMIM #241520), (Typ2; OMIM # 613312)	Typ 1: 4q21 / <i>DMP-1</i> Typ 2: 6q22-q23 / <i>ENPP1</i>	erhöht	normal	Kombination mit Schwerhörigkeit oder intrazerebralen Verkalkungen und verkürzten distalen Phalangen beschrieben
HHRH Hereditäre HR mit Hyperkalziurie (OMIM #241530)	9q34 / <i>SLC34A3</i>	unbekannt	erhöht	Hyperkalziurie, Nephrolithiasis, supprimiertes PTH

Bei positiver Familienanamnese kann die Diagnose meist bereits im Säuglingsalter anhand einer deutlich erhöhten Aktivität der im Serum vorliegenden alkalischen Phosphatase gestellt werden.

Der Kleinwuchs, der sich meist vor der Pubertät manifestiert, kann auch durch die symptomatische Behandlung während der pubertären Wachstumsphase nicht mehr aufgeholt werden (Sochett E et al. 2004).

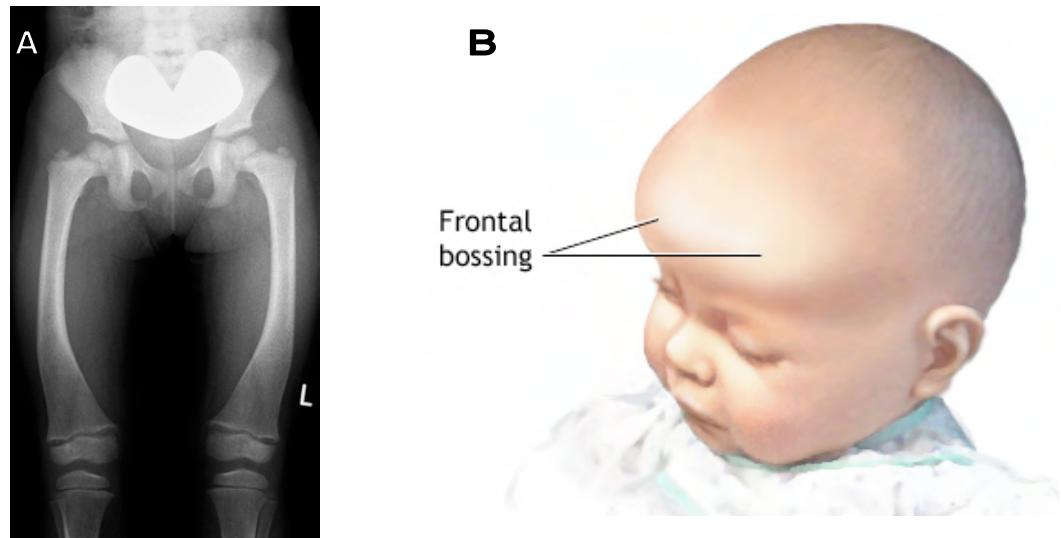


Abb. 3: Charakteristische Verbiegungen des Femurs (A) und typische rachitische Schädelveränderungen (B)

Die Aufnahme (A) wurde freundlicherweise vom Institut für Interventionelle Radiologische Diagnostik (Direktor: Prof. Dr. K. Hauenstein) der Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung gestellt.

Abbildung B zeigt ausgeprägte Stirnwölbung mit Überlagerung der Nasenwurzel (modifiziert nach (Kaneshiro NK 2009))

Weitere charakteristische Krankheitsmerkmale sind motorische Retardierung und eine generalisierte muskuläre Hypotonie. Selten kommen Missbildungen des Thorax, wie der „rachitische Rosenkranz“ und die „Harrison Furche“ vor (Pereira CM et al. 2004).

Bei betroffenen Erwachsenen, die z.T. auch völlig beschwerdefrei sein können, treten oftmals Symptome wie Knochenschmerzen, Osteoarthritis und Osteomalazie auf (Strom T and Lorenz-Depiereux B. 2001). Des Weiteren sind Verkalkungen von Sehnen, Gelenkkapseln und Ligamenten (Enthesopathie) als mutmaßliche Folgen der Calcitriolbehandlung, sowie Innenohrschwerhörigkeit beschrieben worden (Pettifor JM 2008).

Zu den dentalen Abnormitäten, erstmals 1960 von Harris und Sullivan beschrieben, gehören charakteristische Hypokalzifikationen und Interglobulärdentin in beiden Dentitionen (Harris R and Sullivan H. 1960). Außerdem wird von vergrößerten Pulpakammern mit erweiterten Pulpahörnern bis zur Schmelz-Dentin-Grenze sowie spontanen Zahnabzessen ohne Einwirkung von Karies oder Traumen berichtet (Abe K et al. 1988; Douyere D et al. 2009). Die auffälligsten charakteristischen dentalen Erscheinungsbilder der XLH sind heute multiple periapikale Läsionen und Abszesse, die vor allem durch das Eindringen von Mikroorganismen in die Zähne verursacht werden (Hillmann G and Geurtsen W 2005; Pereira CM et al. 2004). Darüber hinaus sind hypomineralisiertes Dentin, irreguläre Dentinkanälchen und weites Prädentin ein typisches Merkmal der X-chromosomal dominanten Hypophosphatämische Rachitis (Boukpepsi T et al. 2006; Onishi T et al. 2008; Pereira CM et al. 2004).

1.2.2.3.2 Allgemeine Therapie der XLH

Die heute übliche Therapie besteht in der Substitution von Phosphat und hochdosierter Calcitriolgabe. Die Therapie mit Phosphat und Calcitriol sollte so früh wie möglich, bei positiver Familienanamnese schon in den ersten Lebensmonaten erfolgen, da sie sich günstig auf die Endkörpergröße auswirkt (Mäkitie O and Doria A 2003) und hierdurch schwere Knochendeformationen verhindert werden können (Lentze MJ and Schaub J 2007). Bei ausgeprägten und im Wachstumsalter nicht selten progredienten Fehlstellungen sind Korrekturosteotomien bislang nicht zu umgehen. Die Behandlung mit Phosphat erfolgt mit 4-6 über den Tag verteilten Dosen. Je nach Lebensalter werden etwa 40-50(-70) mg pro kg Körpergewicht und Tag elementarer Phosphor in Form von Phosphaten gegeben. Um eine phosphatinduzierte Tendenz zur Hypokalzämie mit sekundärem oder tertiärem Hyperparathyreoidismus entgegenzuwirken, erfolgt zusätzlich die orale Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Hier wird üblicherweise mit einer Initialdosis von 15-20 ng pro kg Körpergewicht und Tag begonnen und diese Dosis wird langsam auf die Erhaltungsdosis von 20 – 40(60) ng pro kg und Tag gesteigert (Lentze MJ and Schaub J 2007). Die Phosphatdosis sollte bei herabgesetzter Wachstumsrate und/oder erhöhter Aktivität der Alkalischen Phosphatase gesteigert werden. Dies ist auf Grund des sekundärem Hyperparathyreoidismus jedoch nicht immer möglich (Lentze MJ and Schaub J 2007). Generell muss auf die Entwicklung einer Nephrokalzinose als wesentliche Komplikation der Therapie geachtet werden (Glorieux FH 1991; Glorieux FH et al. 1972; Verge CF et al. 1991).

Bei einem Teil der erwachsenen Patienten ist eine Fortsetzung der Therapie nicht notwendig, während andere durch erneut auftretende Symptome ein Leben lang behandelt werden müssen (Lentze MJ and Schaub J 2007). Insgesamt wird bei Erwachsenen die Indikation zu einer Behandlung kontrovers diskutiert, denn es wurde bisher nicht bewiesen, dass durch eine Therapie Enthesopathien vermieden werden können. Empfohlen wird eine Behandlung beim Vorliegen von Pseudofrakturen, bei Knochenschmerzen und nach Osteotomien (DiMeglio LA and Econs MJ 2001; Strom T and Lorenz-Depiereux B 2001). Die Behandlung der XLH ist insgesamt sehr aufwendig und fordert die Zusammenarbeit von pädiatrischen Endokrinologen, pädiatrischen Nephrologen, Kinderorthopäden, Kinderzahnärzten und pädiatrischen Radiologen. Dennoch sind die Behandlungsergebnisse nicht immer zufriedenstellend und daher werden weitere Behandlungsmöglichkeiten, wie z.B. die Anwendung von Wachstumshormon und von 24,25(OH)2D untersucht (Baroncelli GI et al. 2001; Haffner D et al. 1995; Hanna JD et al. 1991; Zivicnjak M et al. 2011).

1.2.2.3 Dentale Behandlungsmöglichkeiten

Dentale therapeutische Maßnahmen beinhalten prophylaktische Behandlungen, periodische Kontrollen der oralen Situation, Fluoridierungsmaßnahmen und die Aufklärung über die Notwendigkeit von guter Mundhygiene bei bestehenden Mineralisierungsdefekten im Milchgebiss (Pereira CM et al. 2004). Damit kann bei Kindern das Auftreten von kariösen Läsionen und somit der vorzeitige Verlust von Milchzähnen verhindert werden. Dies schafft eine Voraussetzung für die normale Entwicklung von Muskeln und Knochen des Gesichtsschädels (Pereira CM et al. 2004).

1.3 Mausmodelle der Hypophosphatämischen Rachitis

Zum Verständnis der Pathophysiologie der Hypophosphatämischen Rachitis haben wesentlich die 1976 beschriebene *Hyp*-Maus und die 1986 beschriebene *Gy*-Maus beigetragen. Beide Stämme gehen auf spontane Mutationen im *PHEX* Gen zurück (Eicher EM et al. 1976; Lyon MF and Scriver CR 1986).

1.3.1 Die *Hyp*-Maus als Tiermodell der XLH

Dieses Tiermodell (C57BL/6J-*Phex*^{Hyp}/Y; neue Bezeichnung B6.Cg-*Phex*^{Hyp}/J; Kurzbezeichnung *Hyp*-Maus) wurde 1976 erstmals von Eicher et al. beschrieben (Boukpepsi T et al. 2006; Eicher EM et al. 1976; Meyer RA 1985; Scriver CR and Tenenhouse HS 1992; Strom T and Lorenz-Depiereux B 2001). Bei der *Hyp*-Maus sind die Exone 16-22 des *Phex*-Gens deletiert, was sekundär zur Akkumulation von FGF-23 mit Supprimierung des renalen NaPi-II führt (Liu S et al. 2006b; Strom T and Francis F.1996; Strom T and Lorenz-Depiereux B 2001; Strom TM and Juppner H 2008; Tenenhouse HS et al. 1995; Tenenhouse HS et al. 2001). Charakteristisch für die betroffenen Tiere sind Kleinwuchs, Rachitis und Osteomalazie, ein niedriger Serum-Phosphat Spiegel, bedingt durch eine verminderte tubuläre Phosphatresorption und ein trotz Hypophosphatämie niedriges 1,25-(OH)₂D₃ (Ecarot B et al. 1995; Miao D et al. 2001; Strom T and Lorenz-Depiereux B 2001; Strom TM and Juppner H 2008).

Die typischen Zahnveränderungen der erkrankten Mäuse sind: Dentin mit weiten Pulpenkammern und dünnen Dentinwänden, erweitertes Prädentin, sowie Ansammlungen von Interglobulärdentin (Abe K et al. 1992; Abe K et al. 1989)

Damit sind *Hyp*-Mäuse ein gutes Modell für Untersuchungen zur Therapie und Pathophysiologie der XHL. Des Weiteren sind die Tiere prädestiniert dazu, neue therapeutische Ansätze zur Behandlung der FGF-23 getriggerten Phosphaturie mit Hypophosphatämie, konsekutivem Hyperparathyreoidismus und Calcitriol-Mangel als Folge der supprimierten renalen 1 α -Hydroxylase zu prüfen.

1.4 Anatomie der murinen Zahngewebe

Charakteristisches Merkmal am Gebiss der Nagetiere (Rodentia) sind die vergrößerten mittleren Incisivi im Ober- und im Unterkiefer. Das Mäusegebiss ist im Unterkiefer sehr kräftig ausgebildet. Das bleibende Gebiss umfasst 16 oder 20 Zähne. In jedem Quadranten des Ober- und Unterkiefers befindet sich ein Dens incisivus, sowie drei Molaren (Abb. 4). Die Nagezähne des Unterkiefers sind meist länger als die des Oberkiefers. Zwischen den paarigen Schneidezähnen und den ersten Molaren liegt im adulten Gebiss ein zahnloser Bereich, das Diastema. Hier ist der Kieferknochen gleichmäßig abgerundet. Eckzähne sind, ebenso wie Prämolaren, nicht ausgebildet. Die Nagezähne sind wurzellos, haben eine zum Zahnfach hin offene Zahnhöhle (Pulpahöhle) und wachsen zeitlebens. Die Schneidezähne der Nager sind durch ein besonderes, eisenoxxydhaltiges Pigment ausgezeichnet und gelblich verfärbt (Leydig F 1857).

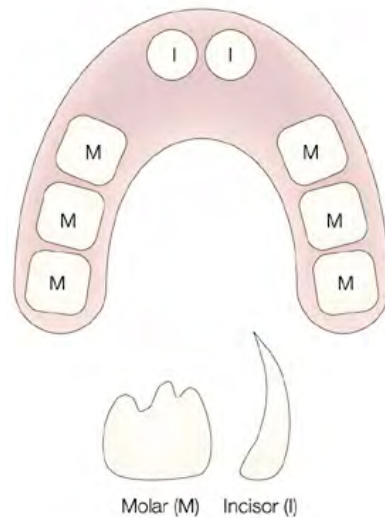


Abb. 4: Zahnformel der Maus (modifiziert nach (Abigail T and Sharpe P 2004))

Ober- und Unterkiefer enthalten je Quadrant: 1 Inzisivi 0 Canini 0 Prämolaren und 3 Molaren.

Die Molaren haben dagegen bei den meisten Nagern ein begrenztes Wachstum. Darüber hinaus besteht bei der Maus eine Monophyodontie (Keränen S and Aberg T 1999; Moss-Salentijn 1978; Peterková R and Peterka M.1995). Als Besonderheit treten bei allen Nagetieren, und so auch bei der Maus, im Unter- und Oberkiefer die Schmelzbeläge nur auf der labialen Seite der Schneidezähne auf (Peyer B 1968). Da Dentin weniger hart ist als Schmelz, entsteht durch den uneinheitlichen Zahnabrieb eine schneidende Kante. Das unterschiedliche Wachstum von Schmelz und Dentin begründet die gekrümmte Form der Schneidezähne. Die Mahlbewegung der Nagetiere ist von vorne nach hinten und von hinten nach vorne. Dieser Bewegungstyp kommt durch die Anordnung der Zähne im Kiefer zustande. Im Oberkiefer ist der Abstand der gegenüberliegenden Molaren im Verhältnis kleiner als im Unterkiefer. Dadurch werden die Kauflächen im Oberkiefer nach lingual abgerieben während sie nach labial länger sind. Durch Abrieb des Schneidezahns bei der Nahrungsaufnahme wird der Zahn immer auf gleicher Länge gehalten (Peyer B 1963).

1.5 Histologie der Zahngewebe

Die Zähne der Säugetiere setzen sich aus den drei mineralisierten Anteilen Schmelz, Dentin und Zement zusammen. Der Schmelz ist an der Zahnkrone dem Dentin aufgelagert, das Dentin im Wurzelbereich von Zement umgeben und über die Wurzelhaut ist der Zahn mit dem Kieferknochen verbunden (Abb.5). Seine Versorgung erfährt der Zahn über die Zahnpulpa (Liebich HG 2004).

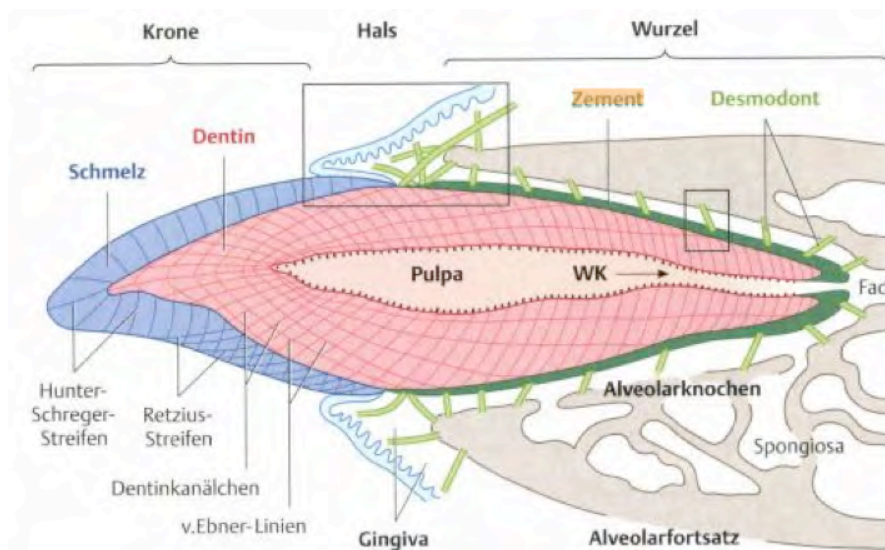


Abb. 5: Aufbau des Zahn und Zahnhalteapparats (modifiziert nach Lüllmann-Rauch R 2009)

Dargestellt ist der Längsschnitt eines Zahns, unterteilt in Zahnkrone, Zahnhals und Zahnwurzel. Fad: Foramen apicis dentis, WK: Wurzelkanal

1.5.1 Der Schmelz (Enamelum)

Der Schmelz ist das härteste Gewebe im Organismus und wird von den Ameloblasten gebildet. Sie differenzieren sich während der Embryonalentwicklung aus dem Mundhöhlenepithel und bilden die Schmelzmatrix, die aus nichtkollagenen Proteinen, Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen aufgebaut ist. Durch nachfolgende Einlagerung von anorganischen Calciumphosphaten transformiert sich unter Mitwirkung der Ameloblasten die Schmelzmatrix zu Schmelzkristallen, die zur Grundlage der Schmelzprismen werden (Liebich HG 2004).

Der Schmelz ist zellfrei und besteht relativ zu seinem Gewicht zu ca. 95% aus Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), zu ca. 1% aus organischer Matrix und zu ca. 4%

aus Wasser. Die Apatitkristalle bilden ein hexagonales Schmelzprisma mit einem Durchmesser von 5- 9 μm (Abb.6).

Verlaufen gebündelte Schmelzprismen quer zur Oberfläche, so werden sie als Diazonien bezeichnet, ist ihr Verlauf schräg oder senkrecht dazu, so spricht man Parazonien. Schmelzprismen weisen oberflächlich eine Kannelierung auf und sind durch eine organische Substanz verbunden (Strub JR and Kern M 2010).

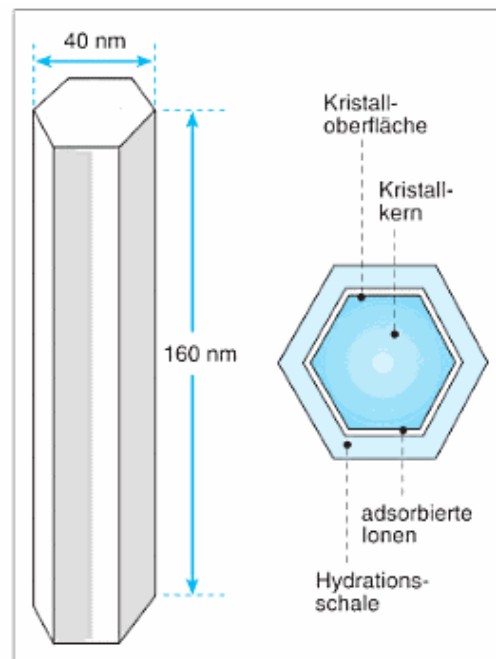


Abb. 6: Schmelzstruktur (modifiziert nach (Hellwig E and Klimek 2009))
Schematische Darstellung eines Hydroxylapatitkristalls mit der typischen hexagonalen Symmetrie.

Die Bildung des Schmelzes geht während der Entwicklung schubweise von staten, so dass sich in histologischen Präparaten die Retzius- Linien erkennen lassen. Diese sind Ausdruck periodischer Ruhephasen der Ameloblasten während der Schmelzbildung, sind meistens hypomineralisiert und entsprechen in etwa den Jahresringen eines Baumes. Die Hunter-Schreger-Faserstreifung tritt als polarisationsoptisches Phänomen in Zahnschliffen auf. Im Längsschnitt lassen sich in den inneren zwei Dritteln des Zahnschmelzes von koronal nach zervikal abwechselnd dunkle und helle Streifen unterscheiden. Da die Schmelzprismen sowohl in horizontaler als auch vertikaler Richtung geschwungen verlaufen, werden sie im Schnitt an einigen Stellen quer an anderen längs zur Verlaufs-

richtung getroffen. So entsteht im polarisationsmikroskopischen Bild die angesprochene Streifung. Pro Millimeter Schmelz-Dentin-Grenze befinden sich 6 bis 7,5 Hunter-Schreger-Streifen (Hellwig E and Klimek 2009; Strub JR and Kern M 2010).

1.5.2 Das Dentin (Dentinum)

Der größte Teil des Zahns besteht aus Dentin, welches die Pulpa umgibt. Das koronale Dentin ist von Schmelz, das Wurzeldentin von Zahnzement bedeckt.

Dentin ist im Gegensatz zu Schmelz ein lebendes und weniger stark mineralisiertes Gewebe. Es besteht bezogen auf sein Gewicht zu 70% aus anorganischem Calciumphosphat und zu 20% aus organischem Material (Kollagen und Grundsubstanz) und Wasser (Hellwig E and Klimek 2009; Strub JR and Kern M 2010).

Durch den relativ hohen Anteil an organischer Matrix stellt das gelbliche Dentin eine elastische, poröse und durchlässige Masse dar, die weniger hart als Schmelz, jedoch härter als Zement und Knochen ist (Schumacher GS and Börnig H 1990). Das anorganische Material liegt ebenso wie im Zahnschmelz, Zahnzement und im Knochen in kristalliner Form als Apatit und zusätzlich auch als amorphes Calciumphosphat vor. Die Kristalle des Dentins sind allerdings erheblich kleiner und dünner als im Zahnschmelz (Hellwig E and Klimek 2009; Liebich HG 2004). Dentin wird von mesenchymalen Odontoblasten der Zahnpulpa gebildet. Diese formieren sich und entlassen ausgeprägte Zytoplasmafortsätze (Tomes-Fasern). Über Dentinkanälchen, in denen die langen Fortsätze (Tomes Fasern) der säulenförmigen Odontoblasten verlaufen, wird eine Verbindung von der Pulpa bis zum Schmelz hergestellt. Ihr Verlauf ist dabei geradlinig bis S-förmig. In Längsschnitten gibt die Krümmung Anlass für Streifenbildungen (Schreger-Linien) (Hellwig E and Klimek 2009).

Das Dentin lässt sich in verschiedene Zonen einteilen: die Odontoblasten liegen an der Pulpa-Dentin-Grenze, dann folgt nach peripher das nicht mineralisierte Prädentin, das Zwischendentin, das zirkumpulpale Dentin und schließlich bis zur Schmelz-Dentin-Grenze das Manteldentin (Abb.7) (Strub JR and Kern M 2010). Die Wand der Dentinkanälchen wird von einem stark mineralisiertem peritubulären Dentin ausgekleidet, während das zwischen den Kanälchen liegende Intertubulärdentin weniger mineralisiert ist und große Mengen kollagener Fasern enthält (Hellwig E and Klimek J 2009).

Im Bereich der Zahnkrone befinden sich mehr Dentinkanälchen pro Flächeneinheit als im Bereich der Zahnwurzel. Auch zur Zahnpulpa sind vier mal mehr

Dentinkanälchen ausgebildet als zum Schmelz hin. Nahe der Zahnpulpa sind die Dentinkanäle weiter als zur Peripherie hin (Heydecke G and Kern M 2010).

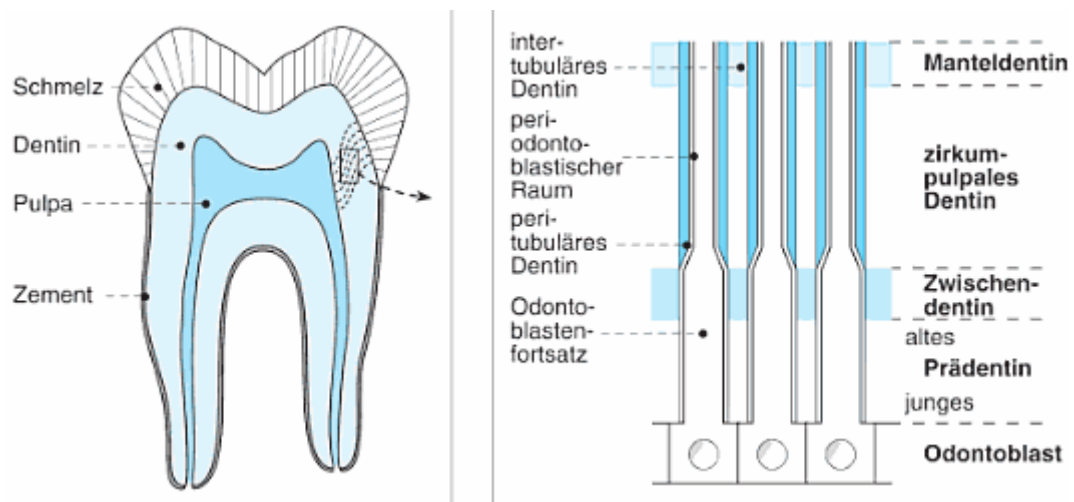


Abb. 7: Zusammensetzung der Dentinstruktur (modifiziert nach (Hellwig E and Klimek J 2009))

Schematische Darstellung der Dentinstruktur und Dentinkanälchen. Die gestrichelten Linien zeigen den Verlauf der Dentinkanälchen. Im zweiten Teil der Abbildung werden die verschiedenen Zonen des Dentins dargestellt.

In histologischen Präparaten lassen sich Wachstumslinien (Von Ebner-Linien), die auf eine schubweise verlaufende Mineralisierung des Dentins hinweisen, feststellen. Es handelt sich dabei um hypomineralisierte Bereiche, die die Ruhephasen der Odontoblasten während der Dentinentwicklung widerspiegeln (Lüllmann-Rauch R 2009). Nichtmineralisierte Prädentinbereiche (Interglobulardentin) kommen im äußeren Drittel des Kronen- und Wurzeldentins vor und weisen oft eine kugelförmige Gestalt auf (Liebich HG 2004). Die Dentinkanälchen besitzen in diesen Bereichen kein peritubuläres Dentin. Es handelt sich wahrscheinlich um nicht-regulär mineralisierte Bereiche (Hellwig E and Klimek J 2009). Einige der Interglobularräume enthalten wenig verkalktes, organisches Material, und manche haben eine Verbindung zu den Dentinkanälchen (Schumacher GS and Börnig H 1990). Dicht unter der Oberfläche des Wurzeldentins, von der Schmelz-Zement-Grenze zur Wurzelspitze hin, befindet sich eine schmale Zone in der eine Vielzahl kleinerer Interglobularräume auffallen. Sie wird nach ihrem Entdecker Tomes-Körnerschicht genannt (Schumacher GS and Börnig H 1990). Dentin, das bis zum Abschluss des Wurzelwachstums gebildet wird, bezeichnet man als primäres Dentin. Danach gebildetes Sekundär-

dentin unterscheidet sich hinsichtlich seiner Struktur nur dann vom zirkumpulpa-
len Dentin, wenn Irritationen zur Dentinbildung geführt haben. Dann weist das
Dentin nur noch wenige Kanälchen auf und zeigt einen stärker gewellten Ver-
lauf (Lüllmann-Rauch R 2009).

1.5.3 Das Zement (Cementum)

Das Zement ähnelt in seinem Bau und Struktur der geflechtartigen Knochen-
substanz (Liebich HG 2004) und enthält im Gegensatz zum knöchernen Gewe-
be keine Blutgefäße (Schumacher GS and Börnig H 1990). Es gehört zum
Zahnhalteapparat, da an ihm die Parodontalfasern haften, die die Zähne in der
Aveole beweglich befestigen. Es ist in seiner Zusammensetzung und Dicke we-
niger konstant als Schmelz und Dentin und ist die am wenigsten mineralisierte
Zahnhartsubstanz. Sein Mineralgehalt (im wesentlichen Apatit) beträgt bezogen
auf das Gewicht ca. 65%, die organische Komponente (überwiegend Kollagen)
trägt 23% und Wasser trägt ca. 12% zum Gesamtgewicht bei (Hellwig E and
Klimek 2009; Strub JR and Kern M 2010).

Beim Wurzelzement unterscheidet man: (Rateitschak K 2003; Schroeder H
1997)

- azelluläres, afibrilläres Zement (AAZ)
- azelluläres Fremdfaserzement (AFZ)
- zelluläres Eigenfaserzement (ZEZ)
- zelluläres Gemischtfaserzement (ZGZ)

Das Zement legt sich durch appositionelles Wachstum außen dem Zahn auf.
Entsprechend der Struktur sind Zementzellen (Zementozyten), Fibroblasten und
mineralisierte Grundsubstanz an der Bildung des Zements beteiligt (Liebich HG
2004). Zementozyten entstehen aus den Zementoblasten, die während der Ze-
mentogenese in das Zement eingeschlossen werden, und folglich in zellulären
Gemischtfaserzement und häufig im zellulären Eigenfaserzement zu finden
sind. Desmondontale Fibroblasten bilden azelluläres Fremdfaserzement. Ze-
mentoblasten bilden zelluläres Eigenfaserzement und Teile des zellulären Ge-
mischtfaserzements, eventuell auch azelluläres, afibrilläres Zement
(Rateitschak K 2003). Azellulär-afibrilläres Zement befindet sich im Grenzbe-
reich zwischen Schmelz und Zement, dort enthält das Zement weder Zellen
noch kollagene Fibrillen (Schroeder H 1997). Erst im mittleren und unteren
Wurzeldrittel treten Zementozyten und zahlreiche Kollagenfibrillen (zelluläres
Gemischtfaserzement) auf. Die Seitenflächen der Zahnwurzel im oberen Drittel

verfügen über eine weitere Form des Zements, das azelluläres Fremdfaserzement. Dies ist hauptverantwortlich für die Verankerung des Zahns in der Alveole. Es enthält keine Zellen, jedoch zahlreiche kollagene Fibrillen. Sie sind Ausdruck der inserierenden parodontalen Fasern (Sharpey-Fasern). Die Sharpey Faser verbinden das Wurzelzement mit der knöchernen Zahnalveole und geben dem Zahn den nötigen Halt im Kiefer (Hellwig E and Klimek J 2009; Rateitschak K 2003).

1.5.4 Die Zahnpulpa (Pulpa dentis)

Der Weichgewebekern eines Zahns (Zahnpulpa) besteht aus gut vaskularisiertem und innerviertem Bindegewebe. Der häufigste Zelltyp der Pulpa sind die Fibroblasten. Sie sind verantwortlich für die Produktion der Grundsubstanz und der Kollagenfasern (TypIII) bildet das Grundgerüst der Zahnpulpa, in das Retikulumzellen und oberflächlich Odontoblasten eingelagert sind. Die Grundsubstanz der Pulpa hat eine gelartige Konsistenz und enthält neben den anderen molekularen Komponenten in der Hauptsache Glykosaminoglykane und Proteoglykane (Liebich HG 2004).

Odontoblasten bilden die äußerste Zellschicht zum Zahnbein. Das Prädentin wird von dentinbildenden Odontoblasten bedeckt, deren Fortsätze (Odontoblastenforsatz) in die Dentinkanälchen hereinragen und sich bis zur Peripherie des Dentinmantels erstrecken. Häufig, aber nicht immer, befindet sich unter der Odontoblastenschicht eine schmale zellulose bzw. zellarme Schicht, die Weilschicht. Sie wird von einer zellreichen Schicht unterlagert (Lüllmann-Rauch R 2009).

Das Pulpagewebe kommuniziert durch das Foramen apicale, die Seitenkanäle, akzessorische Kanäle und Pulpaperiodontalkanäle mit dem Parodontium (Hellwig E and Klimek J 2009). Die Aufgaben der Pulpa bestehen in der Dentinbildung, Ernährung und Innervation des Zahns sowie in der Abwehr infektiöser Erreger. Die Neubildung von Dentin erfolgt zeitlebens. Dadurch verengt sich allmählich die Zahnpulpa, ein Vorgang, der mit der Reduktion des Stoffwechsel und der Versorgung verbunden ist (Hellwig E and Klimek J 2009; Liebich HG 2004; Lüllmann-Rauch R 2009).

1.5.5 Die Wurzelhaut (Periodontium)

Die Wurzelhaut bildet sich aus den Sharpey-Kollagenfasern, die den Raum zwischen der knöchernen Alveolarwand und dem Zement ausfüllen. Diese elastischen Bindegewebsfibrillen, welche zu Bündeln angeordnet sind, verbinden die Zahnwurzel mit den Alveolen des Kiefers. Die Sharpey-Fasern entspringen dem Knochen und ziehen teilweise schräg in Richtung Zahnhals, teilweise horizontal zur Zahnwurzel hin. Der horizontale Faserzug (Ligamentum circulare) ist stark ausgeprägt. Das Ligamentum verhindert das Eindringen von Fremdmaterial und bewirkt eine elastische Befestigung der Zähne im Kiefer (Lüllmann-Rauch R 2009). Neben Kollagenfasern sind in die Wurzelhaut Fibroblasten eingelagert, die der ständigen Erneuerung des Halteapparats dienen. Diese Zellen sind pluripotent und können sich zu Zementoblasten, Zementozyten, Osteoblasten und Osteoklasten transformieren. Die Wurzelhaut ist vaskularisiert und schließt freie Nervenendigungen als Druck- und Schmerzrezeptoren ein (Liebich HG 2004).

1.5.6 Der Alveolarknochen

Der Alveolarknochen ist Teil des Alveolarfortsatzes und durch Sharpey-Fasern eng mit dem Periodontium verbunden. Dieser meist lamellären Knochen gleicht einem Becher mit stellenweise durchlöcherter Wand (Lamina cribiformis). Diese Perforationen (Volkmann-Kanäle) ermöglichen den Durchtritt von Nerven, Blut- und Lymphgefäßen in den desmodontalen Raum und bilden ein dichtes Korbgewebe um die Zahnwurzel (Liebich HG 2004;Lüllmann-Rauch R 2009).

2 Ziel der Arbeit

Die *Hyp*-Maus ist ein etabliertes Modell der hypophosphatämischen Rachitis und damit prinzipiell auch geeignet, neue Therapieformen für diese Erkrankung zu evaluieren. Dem steht entgegen, dass diese Maus nur in wenigen Laboratorien gezüchtet wird und auch kommerziell nur eingeschränkt verfügbar ist.

Daher wurde 2009 in der Universitätsmedizin Rostock (Institut für Experimentelle Chirurgie mit Zentraler Versuchstierhaltung; Direktorin: Prof. Dr. B. Vollmar) mit dem Aufbau einer *Hyp*-Maus Kolonie begonnen. Aus früheren Studien an der *Hyp*-Maus ist bekannt, dass eine tägliche subcutane Zufuhr von Calcitriol und ein erhöhter Phosphatgehalt im Futter die Knochenmineralisierung bessern oder gar normalisieren können. Diese Studien wurden aber schon vor rund 20 Jahren und unmittelbar nach Beschreibung dieser Mauslinie durchgeführt.

Darüberhinaus sind die Versuchsbedingungen leider nicht immer vollständig beschrieben worden. Daher war es erforderlich, in der von uns neu etablierten Kolonie sowohl den Phänotyp als auch frühere Befunde zu bestätigen und damit die Basis für weitere Studien mit dieser Zuchtlinie der *Hyp*-Maus zu schaffen.

Ziel dieser Arbeit war daher,

den Phänotyp der in Rostock neu etablierten Zucht, insbesondere die Morphologie der Molaren und des umgebenden alveolären Knochens männlicher *Hyp*-Mäuse zu charakterisieren

die Ergebnisse mit publizierten Befunden zu vergleichen,

zu überprüfen, ob die Applikation von Calcitriol mit dem Trinkwasser zu ähnlichen Ergebnissen führt, wie für die subcutane Gabe in der Literatur beschrieben.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Die Präparation der Mausschädel erfolgte mit feinchirurgischem Besteck der Firma Aesculap (Tutlingen, Deutschland). Photographien wurden mit einer digitalen Spiegelreflex-Kamera (Canon EOS 40 D) mit lichtstarkem Makro-Objektiv (70 mm Brennweite Sigma, Rödermark, Deutschland) bei einer Blendeneinstellung von 2,8 aufgenommen. Für die mikroskopische Beurteilung stand ein inverses Mikroskop (Leica DMI 4000B, Leica, Wetzlar, Deutschland) mit digitaler Kamera (DFC 320 RS, Leica, Wetzlar, Deutschland) und entsprechender Software zur Verfügung. Computertomographische Röntgen-Analysen (μ -CT) des vollständigen Mäuseschädels (*in-vivo* Untersuchungen) und isolierter Unterkiefer erfolgten mit einem Gerät von Skyscan (1076 *in-vivo* Mikro CT) mit zugehöriger Software für Rekonstruktion und Bildanalyse (CT Analyser, N-Recon; Skyscan, Kontich, Belgien). Alle Grund-Chemikalien hatten mindestens p.a. Qualität und wurden im Allgemeinen bei Merck (Merck KG Darmstadt, Deutschland) oder Roth (Carl Roth GmbH & Co KG; Karlsruhe, Deutschland) gekauft.

3.2 Methoden

3.2.1 Beschreibung des Tierversuchs

Die Versuche wurden vom Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Rostock unter dem Aktenzeichen LALLF M-V/TSD-7221.3-1.1-042/10 genehmigt und im Institut für Experimentelle Chirurgie mit Zentraler Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock (Direktor: Prof. Dr. med. B. Vollmar) durchgeführt. Im Sommer 2009 wurde dort mit dem Aufbau einer *Hyp*-Maus Kolonie durch Verpaarung weiblicher C57BL6*Phex*^{Hyp}/J- mit männlichen C57/BL6/J-Mäusen begonnen. Heterozygote weibliche Tiere wurden in die Zucht eingesetzt und männliche Tiere repräsentierten entweder den gesunden oder den betroffenen Phänotyp (C57/BL6/J; C57BL6*Phex*^{Hyp}/J).

3.2.2 Tierhaltung

Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen (24°C Raumtemperatur; 12-stündiger Wechsel von Licht und Dunkelheit) in Makrolonkäfigen gehalten. Wurfgeschwister blieben, getrennt nach Genotyp, als Gruppe zusammen. Die Käfige wurden wöchentlich gewechselt. Alle Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und pelletiertem, mit Phosphat angereichertem Futter (1% Phosphor

und 1% Calcium; V1534 ssniff, Soest, Deutschland).

Alle Tiere wurden ca. 25 Tage nach der Geburt abgesetzt und ab diesem Zeitpunkt über einen Zeitraum von mindestens 7 Tagen (Jungtiere bis max.110 Tage) beobachtet. Im Beobachtungszeitraum wurden Futter- und Wasseraufnahme sowie Gewichtszunahme protokolliert. Definierte Menge Wasser und Futter wurden vorgelegt und die pro Käfig in 24 h aufgenommen Menge durch zurückwiegen ermittelt.

Bei jeweils 4 *Hyp*-Mäusen und 4 Kontrolltieren wurde der Effekt von Calcitriol auf die Mineralisierung überprüft. Hierzu erhielten die Tiere während der letzten 7 Tage vor Versuchsende 450 µg/kg/d Calcitriol mit dem Trinkwasser. Unter der Annahme, dass die tägliche Wasseraufnahme pro Tag und Maus etwa 3,5 ml beträgt, wurden unter Berücksichtigung des Körpergewichtes und der Tierzahl pro Käfig, 40 ml Trinkwasser präpariert. Die Wasserflaschen wurden täglich kontrolliert und nach 2 Tagen erneuert. Am Ende der Beobachtungszeit wurden die Tiere in tiefer Allgemeinanästhesie (Ketamin/Xylazin 75/25 mg/kg Körpergewicht) durch offene cardiale Punktion entblutet, die Schädel entnommen und zunächst in 70%-igem Ethanol gelagert. Wenn möglich, wurde Urin durch Blasenpunktion asserviert. Bei vier Tieren wurden noch vor Versuchsende unter Sedierung mit Isofluran Röntgentomographien des Schädels angefertigt. Alle weiteren Untersuchungen der Schädel erfolgten *ex-vivo* an entsprechend präparierten Organen.

3.2.3 Präparation und Lagerung der Mäuseschädel mit fotografischer Dokumentation

Am Versuchsende wurden alle Schädel entnommen. Nach grober Präparation und Fixierung für 24 Stunden in 70%-iger Ethanol wurden die Schädel sorgfältig von anhaftendem Weichteilgewebe gesäubert. Nach ausführlicher fotografischer Dokumentation erfolgte die Trennung von Ober- und Unterkiefer, die ebenfalls fotografisch dokumentiert wurde. Alle Präparate wurde mit einem Makroobjektiv maßstabsgetreu in kranialer, kaudaler, lateraler, mesialer und dorsaler Ansicht fotografiert. Ein Ringblitz sorgte für gleichmäßige Ausleuchtung. Nach fotografischer Dokumentation erfolgte die Lagerung der Präparate bis zur weiteren Bearbeitung in 70% Ethanol (4C°).

3.2.4 Röntgentomographie *in-vivo* und *ex-vivo*

Mit hochauflösender Röntgentomographie (μ CT) wurde nach Kalibrierung mit einem Prüfkörper (Knochenphantom der Maus), die auf das Volumen bezogene Mineraleichte im Knochen und Zahnschmelz bestimmt.

3.2.4.1 Aufnahmen der vorderen Extremitäten und des Schädels *in-vivo*

Die Anästhesie der Mäuse erfolgte in einem geschlossenen Inkubator mit 2 % Isofluran in der Atemluft. Im Mikro-CT wurde die Anästhesie mit einer kleinen Mund-Nasenmaske fortgeführt. Die gesamten Köpfe wurden gescannt. Über eine Videokamera im Gerät konnten die Tiere während des Röntgenvorgangs beobachtet werden. Der Scannvorgang erfolgte mit den gleichen Parametern mit denen auch die *ex-vivo* Untersuchungen durchgeführt wurden (siehe unter Punkt 3.2.4.2).

3.2.4.2 Untersuchungen der isolierten Unterkiefer

Für den Scannvorgang wurden die isolierten Kiefer in ein Polypropylen Röhrchen gelegt und dann im Styroporbett positioniert und fixiert. Die Präparate wurden unter folgenden Bedingungen gescannt: Filter: Titanfilter 0,025 mm; Rotationswinkel: 0,5°; Auflösung: 9 μ m; Spannung/ Stromstärke: 59 kV/ 167 mA.

3.2.4.3 Analyse der Röntgentomographien

Nach dem Scannvorgang wurde der Datensatz rekonstruiert und in den Schnittbildern die zu rekonstruierenden Regionen ("region of interest", ROI) innerhalb der Molaren bzw. des die Molaren umgebenden Unterkiefers festgelegt (Abb.8). Um Strahlungsartefakte zu beheben wurde eine Korrektur von 5% eingestellt. Nach Kalibrierung mit Phantomen eines Mäuseknochens wurde die Dichte des Schmelzes bzw. des alveolären Knochens berechnet.

3.2.5 Histologische Charakterisierung der Kiefer

3.2.5.1 Herstellung der Zahnschnitte für die Histologie

Nach Abschluss der makroskopischen und mikroskopischen Untersuchungen wurden die Unterkiefer halbiert und entkalkt (200ml Titriplex III; 64,5ml 10M Natronlauge; ad 1000ml Wasser; pH 7,4; 15ml/Kieferfragment). Die Entkalkungslösung wurde solange täglich gewechselt, bis der Knochen weich geworden

war. Dies dauerte je nach Präparat 1-2 Wochen. Wiederholend, alle 2 Tage, erfolgte eine Spülung mit Aqua dest.. Nach vollständiger Entkalkung, wurden die Präparate im Institut für Pathologie (Direktor: Prof Dr. A. Erbersdobler) der Universitätsmedizin Rostock in Paraffin eingebettet.

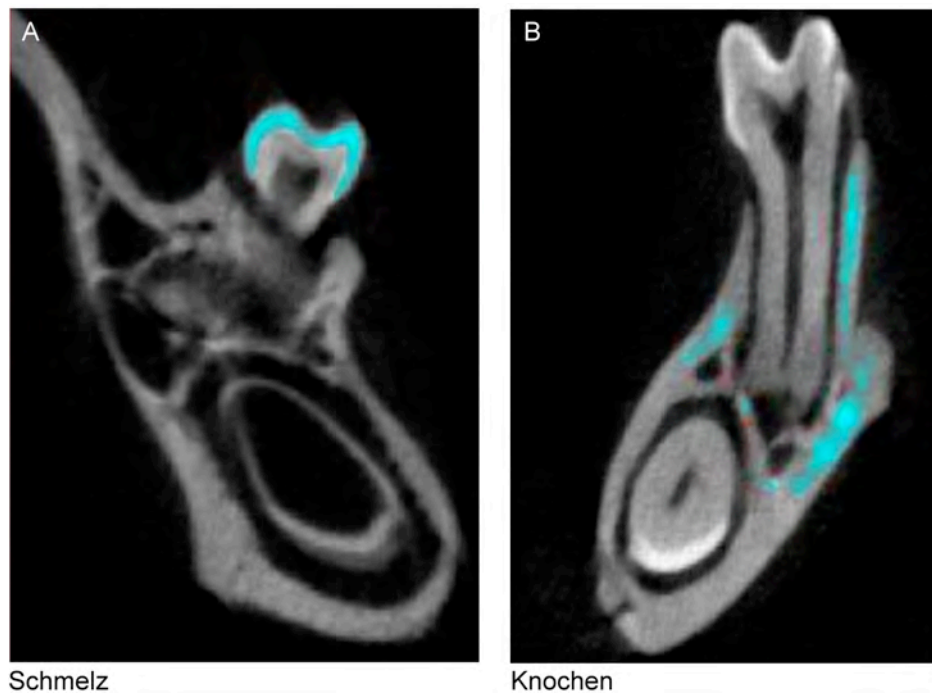


Abb.8: Darstellung der Region of Interest (ROI)

A: hellblau der markierte Schmelz eines Molaren; B: hellblau gekennzeichnet der alveoläre Knochen

3.2.5.2 Histomorphologische Charakterisierung entmineralisierter Kieferpräparate

Für die morphologische Charakterisierung wurden Dünnschnitte (ca. 4 μm) auf Objektträgern aufgezogen. Nach Entparaffinierung mit Xylol (2 * 10 min) und Rehydratisierung mit Ethanol in absteigenden Konzentrationen (je 2 min in 100 %, 96 %, 80 %, und 70 % Ethanol mit abschließenden Spülen in Aqua dest.) erfolgten Übersichtsfärbungen mit Hämatoxylin-Eosin und nach Masson-Goldner.

3.2.5.2.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Herstellung der Farbstofflösung:

- 1.) Mayers saures Hämalaun (Merck Katalog-Nr. 1.09249, gebrauchsfertig; pH 3-4)

2.) Eosin G (Merck Katalog-Nr, 1.15935)

- 1 g Eosin G in 1 l Aqua dest. lösen
- 1,6 ml 100 % Essigsäure zugeben
- vor Gebrauch filtrieren

Die Schnitte durchliefen folgende Färbeschritte:

1. Mayers Hämalan (5 – 10 Min.)
2. Abspülen und Bläuen in lauwarmen Leitungswasser (ca. 10 Min.)
3. Eosin (2 – 4 Min.)
4. Spülen in Aqua dest.
5. aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 96 %, je kurz eintauchen)
6. Präparate zw. Filterpapier trocknen
7. Einstellen in Xylol (ca. 5 Min.)
8. Eindecken mit Entellan®

3.2.5.2.2 Übersichtsfärbung nach Masson-Goldner

Die Färbung gilt als eine Standardübersichtsfärbung für die Zahn- und Knochenmorphometrie (Lang G 2006).

Die Schnitte durchliefen folgende Färbeschritte:

1. Weigert's Eisenhämatoxylin (2-3min)
2. Spülen in fließendem Wasser (5min)
3. Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin (4min)
4. Abspülen in 2 Positionen 1% Essigsäure (schwenken)
5. Differenzieren in Orange G bis zur völligen Entfärbung des Bindegewebes (6min)
6. Abspülen in 2 Positionen 1% Essigsäure (schwenken)
7. Gegenfärbung mit Lichtgrün (20min)
8. Auswaschen in 1% Essigsäure (2 Positionen, in der 2. Position 5 min stehen lassen)
9. Rasch entwässern in aufsteigender Alkoholreihe
10. Einstellen in Xylol (ca. 5 Min.)
11. Eindecken mit Entellan®

3.2.6 Quantitative Analyse von Blut und Urin

Im Plasma und ggf. auch im Urin der Tiere wurden Creatinin, Calcium, Phosphat und FGF-23 (nur im Plasma) mit photometrischen (Crea, Ca und P; alles Fa. R. Greiner, Flach, Deutschland) bzw. immunochemischen (cFGF-23; Immutoxics, San Clemente, CA USA) Assays bestimmt. Die photometrischen Assays waren zuvor an die geringen Probenmengen angepasst und für die manuelle Durchführung auf Mikrotiter-Platten optimiert worden (Fischer DC et al. 2011). Richtigkeitskontrollen (Trulab N und Trulab P für die Bestimmung von Crea, Ca und P; Kiteigene Kontrollen bei der Bestimmung von cFGF-23) wurden jeweils mitgeführt. Alle Bestimmungen wurden als Doppelbestimmungen angesetzt.

3.3 Statistische Auswertung

Alle Berechnungen und statistischen Analysen wurden mit SPSS, Version 15.0 (SPSS, Chicago, United States of America) durchgeführt und im Allgemeinen sind Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Gruppenvergleiche erfolgten mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Für die graphische Darstellung wurde Sigma Plot (Version 10.0; Jandel Scientific, Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) verwendet.

4 Ergebnisse

Das Ziel war die Charakterisierung der in Rostock neu etablierten Zucht der *Hyp*-Mäuse. In dieser Arbeit wurden 28 Mäuse untersucht, dabei stand die Morphologie der Molaren und des umgebenden alveolären Knochens männlicher *Hyp*-Mäuse im Vordergrund.

4.1 Phänotyp der *Hyp*-Mäuse

Die *Hyp*-Mäuse waren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen kleinwüchsig und wiesen ein deutlich geringeres Körpergewicht auf (Abb.9). Bereits im Alter von wenigen Tagen waren sie von ihren gesunden Wurfgeschwistern durch verkürzte Hinterbeine und einen kürzeren Schwanz zu unterscheiden. Später fiel eine Kyphose der Brustwirbelsäule, Deformationen des Nasen- und Gesichtsskeletts, sowie eine ausgeprägte O-förmige Verbiegung der Extremitäten auf.

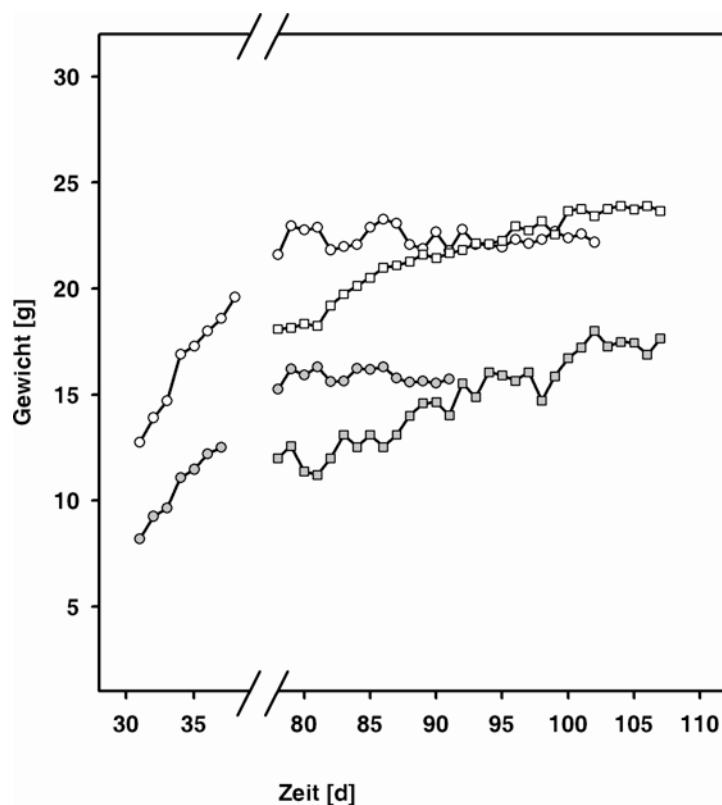


Abb.9: Gewichtszunahme bei BL_6 ($n=17$) - und *Hyp*-Mäusen ($n=11$)

Gewichtszunahme von juvenilen ($n=6$) und adulten ($n=7$) unbehandelten BL_6 -Mäusen (offene Symbole) und unbehandelten juvenilen ($n=3$) bzw. adulten ($n=4$) *Hyp*-Mäusen (gefüllte Symbole). Vier adulte BL_6 - und 4 adulte *Hyp*-Mäuse erhielten während der letzten 7 Tage des Beobachtungszeitraums zusätzlich Calcitriol mit dem Trinkwasser ($450 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$).

Der Gewichtsunterschied zwischen jungen *BL₆*- und *Hyp*-Mäusen beträgt im Mittel 5,8g und ist bei adulten Tieren mit 6,6 g sogar noch ausgeprägter (jeweils $p < 0,001$). Nach Behandlung adulter Tiere mit Calcitriol reduziert sich dieser Gewichtsunterschied wieder auf 5,84g. Diese Unterschiede im Körpergewicht spiegeln sich auch in der unterschiedliche Futteraufnahme der Tiere wider (Tab.2).

Tab. 2: Durchschnittliche tägliche Futter- und Wasseraufnahme von *BL₆*- und *Hyp*-Mäusen

Wasseraufnahme		
	BL₆-Maus	Hyp-Maus
jung	5,14 ± 1,03	4,38 ± 1,03
alt	3,16 ± 0,80	3,07 ± 1,01
alt ⁺	3,34 ± 0,60	3,39 ± 0,70
Futteraufnahme		
jung	3,90 ± 0,48	2,60 ± 0,31
alt	3,00 ± 0,45	2,90 ± 0,54
alt ⁺	3,15 ± 0,72	2,43 ± 0,61

*Alle Daten sind als Mittelwert und Standardabweichung angegeben; die Unterschiede zwischen *BL₆* und *Hyp*-Mäusen sind signifikant (jeweils $p < 0,01$). alt⁺, Calcitriol-Gabe*

4.2 Morphologische Besonderheiten der Schädel

Die morphologischen Veränderungen der Schädel von *BL₆*- und *Hyp*-Mäusen sind in Abb.10, 11 und 12 dargestellt.

Während bei den erkrankten Jungtieren vor allem der Größenunterschied imponiert, fallen bei älteren *Hyp*-Mäusen ausgeprägte Deformationen des Oberkiefers und des Nasenskeletts auf, die sich unter Calcitriol-Behandlung zumindest teilweise zurück bilden. In den Röntgenuntersuchungen stellen sich die Schädel der *Hyp*-Mäuse deutlich transparenter dar (Abb.11)

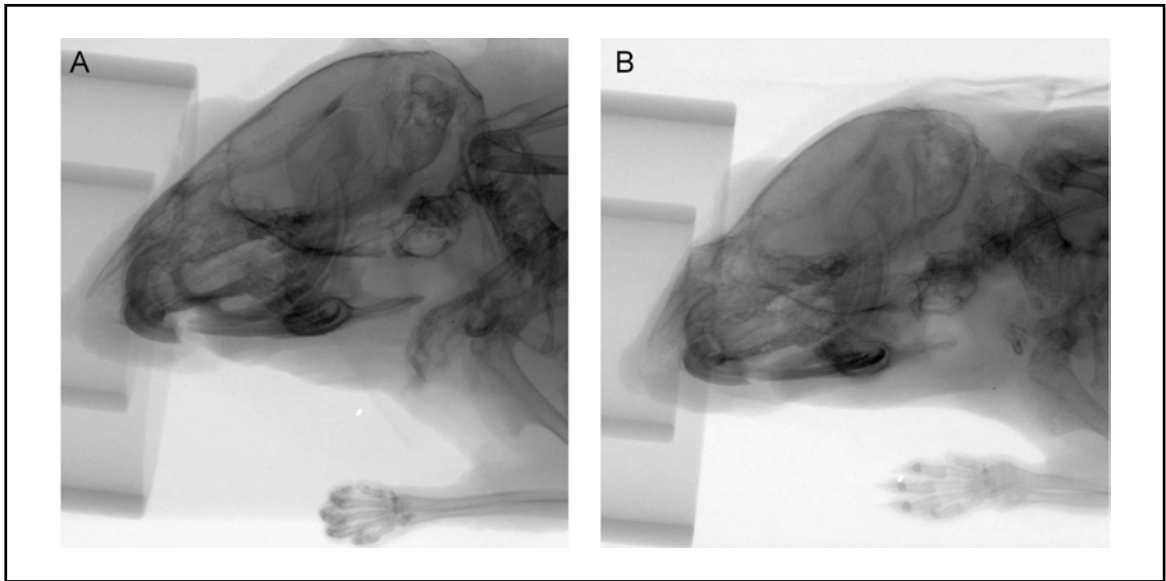


Abb. 10: Röntgenaufnahmen (μ -CT) des Schädels einer BL_6 (A) und Hyp - (B) Maus nach Isoflurananästhesie.

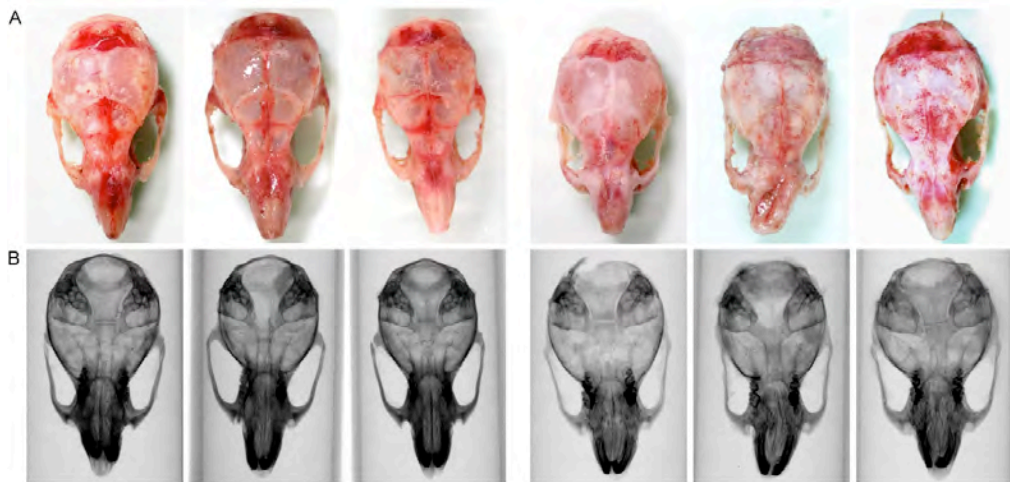


Abb. 11: Photographische Darstellung (A) und Röntgenaufnahmen (B) der Schädel von BL_6 -Mäusen (links) und Hyp - Mäusen (rechts)

Die Schädel von juvenilen, adulten und mit Calcitriol-behandelten Tieren sind exemplarisch dargestellt.

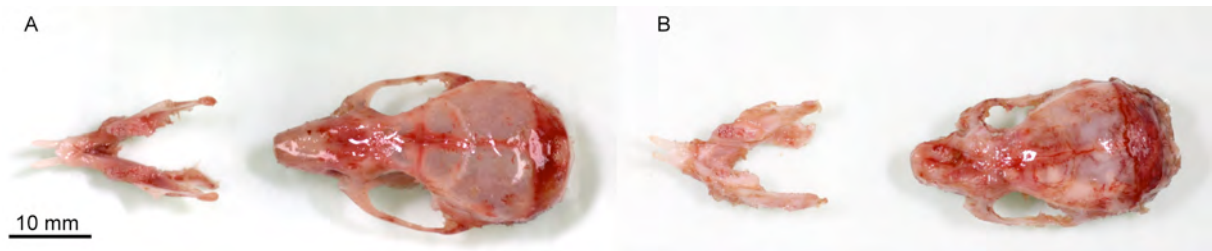


Abb. 12: Maßstabgetreue Fotografie von Unterkiefer und Schädel einer unbehandelten BL₆-Maus (A) und *Hyp*-Maus (B).

4.2.1 Morphologische Besonderheiten der Unterkiefer und Molaren

Auch die isolierten Unterkiefer wurden zunächst makroskopisch charakterisiert (Abb. 13). Im Gegensatz zur gesunden Maus sind die Molaren der *Hyp*-Mäuse deutlich dunkler gefärbt, tiefer gefurcht und weisen eine rauhere Oberfläche auf. Typischerweise fanden sich bei den *Hyp*-Mäusen vermehrt opake und dunkle Zähne (Abb.13, Ausschnittsvergrößerungen). Diese Hypomineralisation führt auch zu stärkerem Abrieb und ist als Verschleiß an den Inzisalkanten ebenfalls sichtbar (Abb.13).

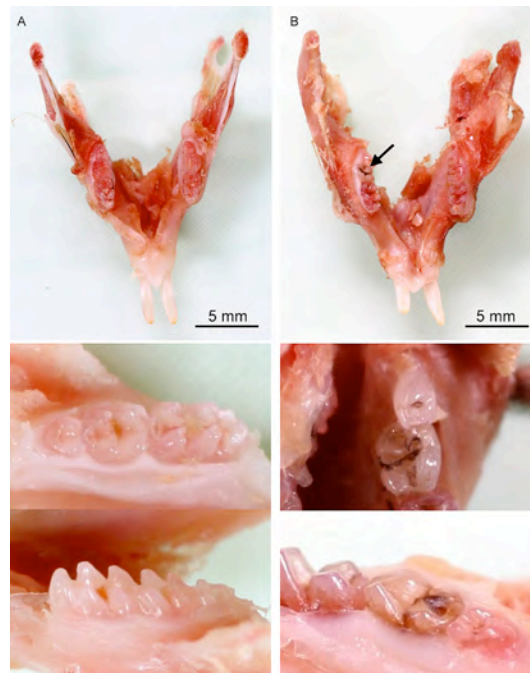


Abb. 13: Unterkiefer und Molaren von BL₆ (A) - und *Hyp*-Maus (B)

Die Ausschnittsvergrößerungen (unteres Panel) zeigen deutlich die Unterschiede zwischen den Molaren von unbehandelten gesunden (links) und unbehandelten erkrankten Mäusen (rechts).

4.2.2 Die röntgentomographische Bestimmung der Mineralisierungsdichte in Kieferknochen und Molaren

Röntgentomographische Untersuchungen der isolierten Unterkiefer bestätigten den Mineralisierungsdefekt bei der *Hyp*-Maus. Unterkiefer von gesunden und kranken Mäusen wurden mit einer Auflösung von 9 μm gescannt, 3 dimensional rekonstruiert und die Mineraldichte, im Knochen und Zahnschmelz berechnet (Abb.14).

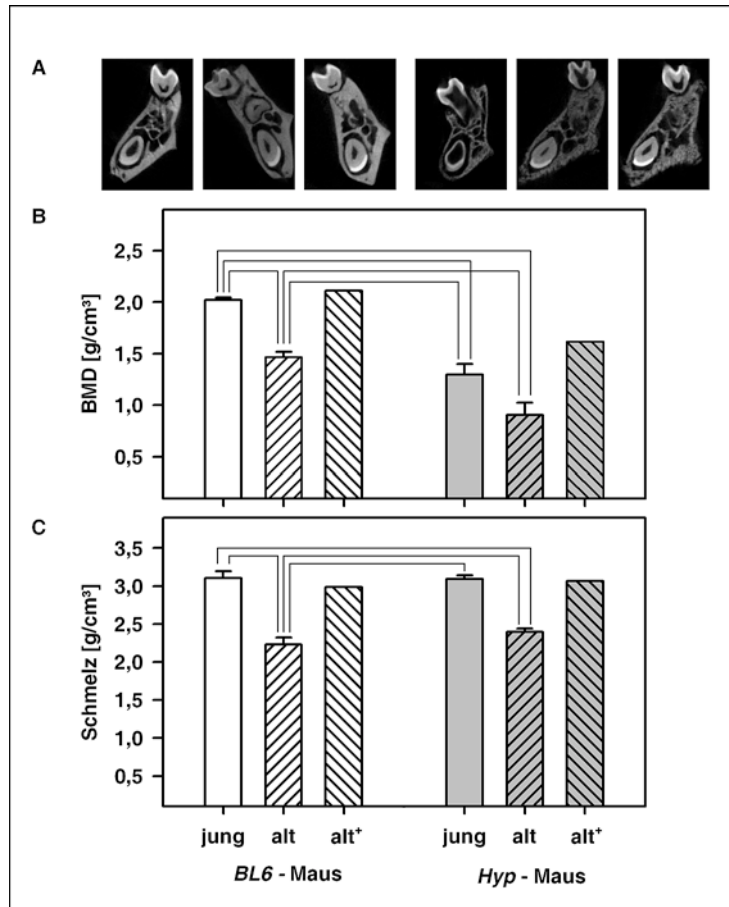


Abb. 14: Typische Rekonstruktion nach hochauflösender röntgentomographischer Untersuchung ($\mu\text{-CT}$) (A) mit anschließender quantitativer Bestimmung der Mineraldichte in alveolarem Knochen (BMD; B) bzw. Schmelzdichte (C) der Molaren von *BL₆* - und *Hyp*-Mäusen.

Mineraldichte in Knochen (B) und Zahnschmelz (C) von *BL₆* (\square) - und *Hyp*-Maus (\blacksquare). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen sind angegeben. (*BL₆*-Mäuse: jung, $n=6$; alt, $n=7$; alt*, $n=4$; *Hyp*-Mäuse: jung, $n=3$; alt, $n=4$; alt*, $n=4$; alt*, Calcitriol-Gabe).

Während bei den *BL₆*-Mäusen der Knochen dicht und homogen aufgebaut ist, zeigt er sich bei den *Hyp*-Mäusen porös und zerklüftet. Weiterhin zeigt sich, dass eine 7-tägige Behandlung mit Calcitriol nicht ausreicht, um diese Mineralisierungsdefekt zu beheben, auch wenn bereits nach dieser verhältnismäßig kurzen Behandlungszeit die Mineraleichte in Knochen und Schmelz zunimmt.

4.3 Histologische Untersuchungen

Die histologische Untersuchung der entkalkten und in Paraffin eingebetteten Präparate zeigte ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen *BL₆*- und *Hyp*-Maus (Abb. 15-17). Das Kollagengerüst, in dem der alveoläre Knochen eingebettet war, erscheint bei der *Hyp*-Maus grobporiger als bei *BL₆*-Mäus. (Abb.15) Verglichen mit den Zahnschnitten der *BL₆*-Mäuse konnte außerdem Interglobulärden-
 tin (Abb.16) und erweitertes Prädentin (Abb. 17) nachgewiesen werden.

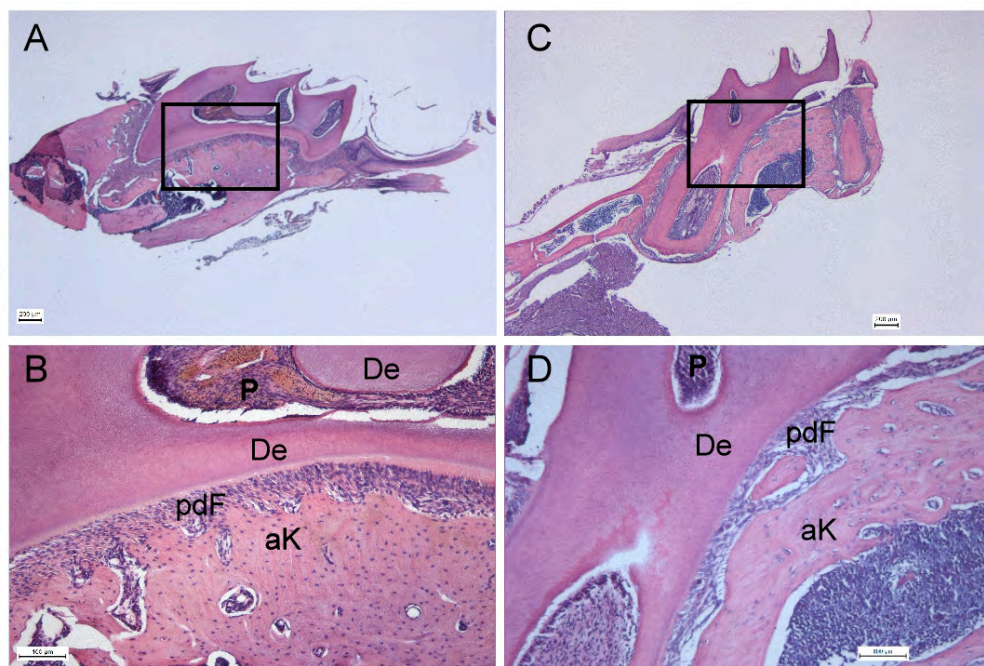


Abb.15: Längsschnitt durch einen entkalkten Molaren von *BL₆*-Maus (A,B) und *Hyp*-Maus (C,D) nach HE-Färbung

Vergrößerung: A,C: 25x; B,D: 100x; P: Pulpa; De: Dentin; pdf: peridontale Fasern; ak: alveolärer Knochen

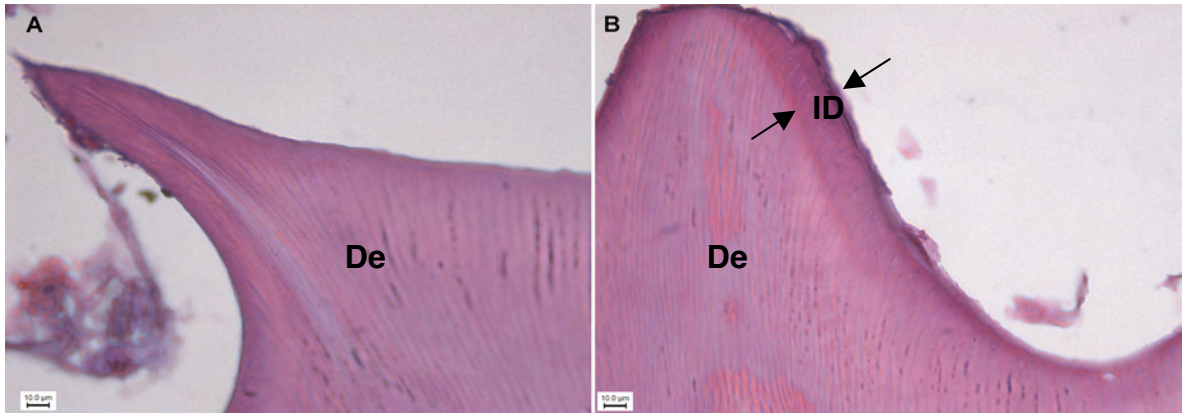


Abb.16: Histologische Darstellung (HE-Färbung) des Interglobulardentins von *BL₆* - (A) und *Hyp*-Mäusen (B)

Der Pfeil weist auf einen Bereich von interglobulärem (fehlerhaft aufgebautem) Dentin. Vergrößerung: 400x; De: Dentin; ID: Interglobulardentin

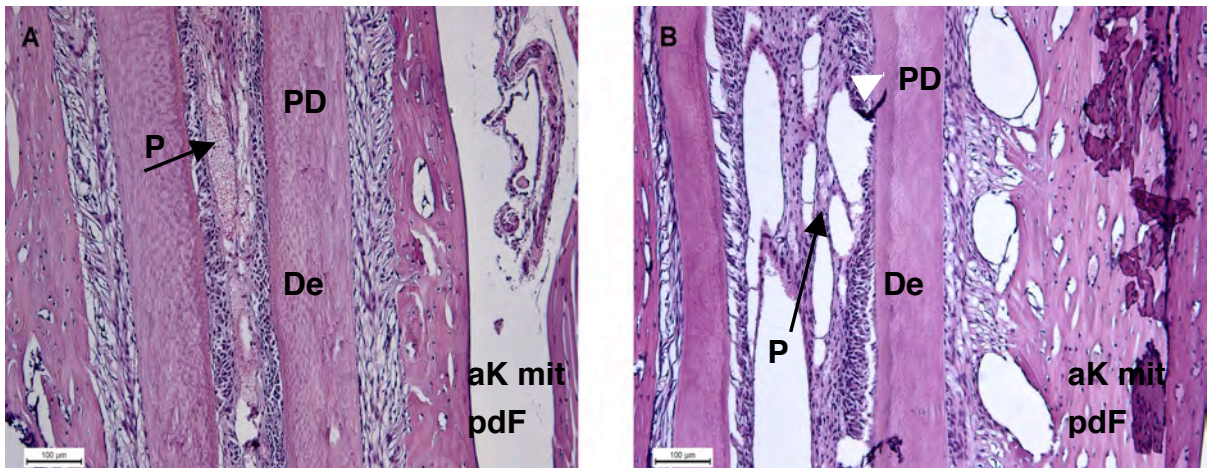


Abb. 17: Querschnitt durch einen juvenilen Zahn einer *BL₆* -(A) und *Hyp*-Maus (B) (HE-Färbung)

*Pfeile weisen auf Pulpa (P) und Prädentin (PD) hin. De: Dentin; pdF: periodontale Fasern; aK: alveolärer Knochen. Die Zone des Prädentins ist bei der *Hyp*-Maus auffällig erweitert.*

4.4 Biochemische Parameter in Serum und Urin

Im Serum zeigten sich bei *Hyp*-Mäusen im Vergleich mit *BL₆*-Mäusen leicht erniedrigte Calciumspiegel und deutlich erniedrigte Phosphatspiegel (Abb. 18). Gleichzeitig waren die Konzentrationen von FGF-23 bei adulten älteren *Hyp*-Mäusen mit und ohne Calcitriol-Behandlung gegenüber gesunden *BL₆*-Mäusen signifikant erhöht.

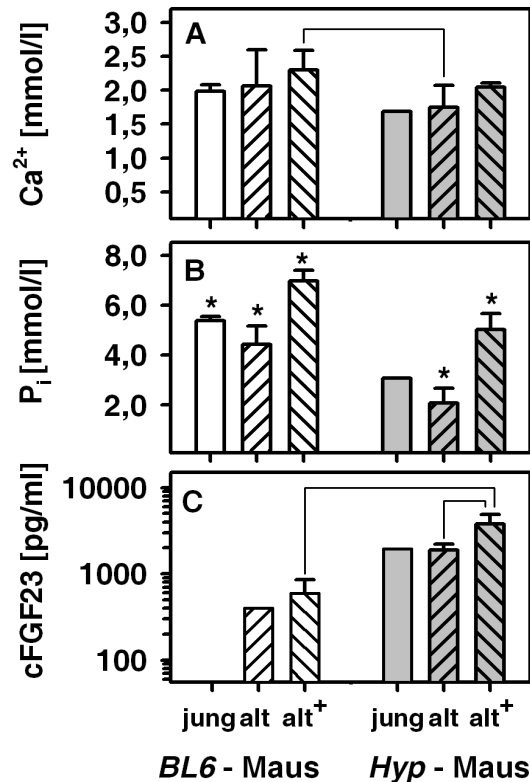


Abb. 18: Die Plasmakonzentration von, Calcium (A), Phosphat (B) und FGF-23 (C) bei *BL₆* (□) - und *Hyp*-Mäusen (■).

Die Daten sind als Mittelwert und Standardabweichung angegeben und beziehen sich auf die Bestimmungen bei 28 Tieren. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen sind angegeben. (*BL₆*-Mäuse: jung, $n=6$; alt, $n=7$; alt⁺, $n=4$; *Hyp*-Mäuse: jung, $n=3$; alt, $n=4$; alt⁺, $n=4$; alt⁺, Calcitriol-Gabe).

Die Calcium-Ausscheidung mit dem Urin ist bei *Hyp*-Mäusen höher als bei *BL₆*-Mäusen und steigt unter Calcitriol-Behandlung weiter an (Abb. 19).

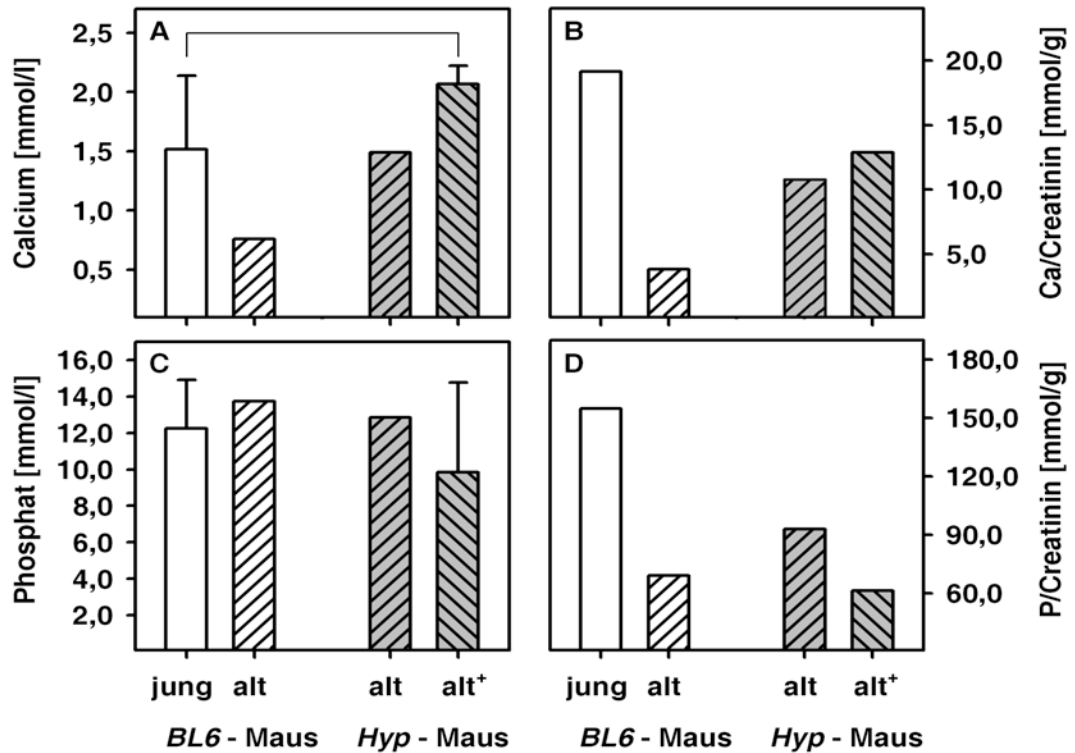


Abb. 19: Die renale Ausscheidung von Calcium (A, B) und Phosphat (C, D) bei BL₆ (□) - und Hyp-Mäusen (■) .

Es sind sowohl die absoluten Konzentrationen (A, C) als auch die auf Kreatinin normierten Werte/(B, D) angegeben. Diese Untersuchung konnte bei insgesamt 15 Tieren durchgeführt werden. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen sind angegeben. (BL₆-Mäuse: jung, n=6; alt, n=3; alt⁺, n=0; Hyp-Mäuse: jung, n=0; alt, n=2; alt⁺, n=4; alt⁺, Calcitriol-Gabe).

5 Diskussion

Hypophosphatämische Rachitiden sind eine heterogene Gruppe hereditärer und erworbener Erkrankungen. Sie beruhen meist auf einer gestörten Phosphatrückresorption in der Niere und werden in der Regel symptomatisch behandelt. Dieses kann im Fall einer erworbenen Rachitis zur Heilung führen, ist jedoch bei den hereditären Formen nicht kurativ. Für Patienten mit einer XLH, der häufigsten hereditären Form, bedeutet dies nicht nur die lebenslange Substitution mit Phosphat und Calcitriol sondern auch das permanente Risiko der Nebenwirkungen. Hier ist an erster Stelle sicher die Gefahr der Entstehung einer chronischen Niereninsuffizienz auf dem Boden einer Nephrokalzinose zu nennen (Hanna JD et al. 1991; Patzer L 2000; Seow WK 1984; Tenenhouse HS and Scriver CR 1992). Weiterhin ist die oben genannte "Standardtherapie" in der Regel nicht ausreichend, um den Kleinwuchs als das im Kindes- und Jugendalter bestimmende Leitsymptom zu lindern. Alternative, zumindest ansatzweise kausale oder wenigstens auf die Pathophysiologie der XLH abgestimmte Therapien könnten am PTH oder FGF-23 ansetzen. Um solche Konzepte einer "targeted therapy" zu entwickeln und zu prüfen, ist man in der Regel auf Tiermodelle, wie zum Beispiel die hier untersuchten *Hyp*-Maus angewiesen. Dieses Tiermodell wurde Ende der 1970-er Jahre erstmals beschrieben und die bisher mit diesen Tieren durchgeführten Studien beziehen sich zum größten Teil auf den von Mineralisationsdefekten betroffenen Knochen, während den Zahnveränderungen bislang wenig Bedeutung eingeräumt wurde. Da der Zahnschmelz die härteste Struktur im Organismus ist, machen sich Schwankungen im Calcium/Phosphat-Haushalt weniger und später bemerkbar als im Knochen.

Dennoch ist es wichtig, vor allem jungen Patienten möglichst früh prophylaktische Kontrollen und kariespräventive Maßnahmen mit Nachdruck anzubieten. Nur so lassen sich später aufwendige, kostenintensive und unter Umständen schmerzhaft eingriffe wie z.B. die Behandlung von Zahnabzessen und Wurzelkanälen ersparen (Breen GH 1986; Chaussain-Miller C et al. 2003; Yasufuku Y et al. 1983).

Die *Hyp*-Maus ist ein zwar anerkanntes, aber kommerziell nur eingeschränkt verfügbares Tiermodell der XLH (Azam N et al. 2003; Eicher EM et al. 1976; Strom T and Francis F 1996). Dieses liegt zunächst daran, dass es sich bei der XLH um eine relativ seltene und daher kommerziell auch weniger interessante Erkrankung mit entsprechend geringerer Nachfrage nach diesen Tieren handelt. Darüber hinaus ist die Fertilität der erkrankten Tiere beeinträchtigt, homozygote Tiere sind infertil und auch bei heterozygoter Verpaarung (F_xM: C57BL6*Phex*^{Hyp}/J x C57BL6/J) sind die Trächtigkeitsraten und Wurfgrößen

deutlich geringer als bei Verpaarung gesunder Tiere. Weiterhin waren die Erfahrungen mit Kryokonservierung und anschließendem Embryotransfer bei Jackson bzw. Charles River Laboratories sehr entmutigend, so dass hier nur eine "Erhaltungszucht" stattfindet (Angaben Jackson - Charles River; www.criver.com). Damit sind de facto alle Arbeitsgruppen, die mit diesen Mäusen arbeiten wollen, gezwungen, eigene Kolonien aufzubauen. Das bedeutet aber auch, dass bei jeder neu aufgebauten Kolonie nicht nur der Genotyp (Deletion von Exon 16-22 des *Phex*-Gens), sondern auch phänotypische Charakteristika bestätigt werden sollten, um eine Vergleichbarkeit zwischen neu erarbeiteten und historischen Daten zu gewährleisten. Daher konzentriert sich diese Arbeit darauf, die in Rostock seit Sommer 2009 aufgebaute Kolonie mit Blick auf die in der Literatur beschriebenen Eigenschaften zu beschreiben. Die Deletion der Exone 16-22 des *Phex*-Gens war bei allen Tieren, die auch die phänotypischen Veränderungen zeigten (kurzer Schwanz, verkürzte Extremitäten), nachzuweisen. Weiterhin wiesen alle untersuchten Tieren, unabhängig vom Alter eine erhöhte FGF-23 Serum Konzentrationen, einen renalen Phosphatverlust mit Hypophosphathämie und Phosphaturie und ein deformiertes Nasenskelett auf. Shetty et al. Berichteten ebenfalls von Craniofazialen Abnormalitäten bei der *Hyp*-Maus (Shetty NS and Meyer RA 1991). Die hier im Mittelpunkt stehende Zahnmorphologie wurde mit den in der Literatur beschriebenen Befunden verglichen (Tab. 3). Die klassischen dentalen Defekte, wie Mineralisationsdefekte, Attritionen des Schmelzes, kariöse Läsionen und unregelmäßige Dentin/Pulpa Verhältnisse (vergrößertes Prädentin, Interglobulardentin) konnten bei unserer Kolonie bestätigt werden. Auch die - wenn auch nur über einen begrenzten Zeitraum durchgeführte - Behandlung mit Calcitriol erzielte die in der Literatur beschriebenen Effekte, allerdings wurde hier Calcitriol über Alzet-Minipumpen und nicht wie in unserer Studie über das Trinkwasser verabreicht. Diese Pumpen werden in der Regel subkutan zwischen den Schulterblättern implantiert und geben Osmose-getrieben, je nach gewählter Größe über einen Zeitraum von drei bis sieben Tagen kontinuierlich Wirkstoff in die Zirkulation ab. Wenn das Reservoir erschöpft ist, muss die Pumpe extern befüllt oder gewechselt werden, was mit einem erneuten operativen Eingriff verbunden ist. Daher entspricht in nahezu allen bisher durchgeführten Studien die Behandlungsdauer der "Reichweite" einer Pumpenfüllung (Ecarot B et al. 1995; Halstead LR et al. 1996; Marie PJ et al. 1982a; Marie PJ et al. 1982b; Meyer MH and Meyer RA 1988).

Tab. 3: Übersicht der bisher publizierten Studien zur Zahnentwicklung der *Hyp*-Maus

Studie	Zahntyp	Untersuchungsmethode	Ergebnisse
Abe 1989	Molaren /Inzisivi	Elektronenmikroskopie (ELMI) Transmissionselektronen- mikroskopie (TEM) Röntgenstrukturanalyse (Pulver / Kristalle)	Breite Pulpakammern, weites Prädentin, dünnes Dentin am Pulpakammerboden, multiples Vorkommen von Interglobulardentin Mehr und größere Hydroxydapatit Kristalle im Globulardentin der Hyp-Maus Inzisivi als bei den Wildtyp-Mäusen
Abe 1992	Inzisivi	Elektronenmikroskopie, Biochemische Parameter Normales vs. Ca-Phosphat angereichertes Futter	Keine signifikanten Unterschiede im Dentin der Inzisivi der Hyp-Maus in Abhängigkeit von der Ernährung, Interglobulardentin ist weiterhin aufgetreten --> Ausbildung von Interglobulardentin wird in der Hyp-Maus nicht durch eine kurze Normalisierungsphase des Serum- Phosphat- Spiegels beeinflusst
Ogawa 2005	Inzisivi	Immun-ELMI Biochemische Parameter, Quantitative RT-PCR Analyse	Überexpression von Osteocalcin in den Odontoblasten der Hyp-Maus Hypomineralisation des Dentin ist bei der Hyp-Maus nicht vom Serum- Phosphat- Spiegel abhängig, sondern Folge des Osteoblastendefekts
Onishi 2007 a/b	Zahnkeime	Quantitative RT-PCR Analyse In situ Hybridisierung	a) NaPi-IIb (Natrium/Phosphat-Cotransporter II(b)) mRNA war in Hyp-Maus Zahnkeimen signifikant geringer als in Wildtyp-Mäusen b) FGF-23 mRNA in Hyp-Maus Zähnen ist signifikant höher als die in Wildtyp-Mäusen
Fong 2009	Molaren	Licht- und TEM Immunhistochemie	Die Kombination von Immunhistochemie und TEM führte zur Entdeckung eines Zement Phänotyps, der durch eine schmalere BSP(bone sialoprotein) positive Zone sowie eine diskontinuierliche Mineralisation und das Auftreten von Globulardentin gekennzeichnet ist.

Ob dieser Zeitraum ausreichend ist, eine unter Umständen lebenslange Therapie korrekt im Modell abzubilden sei dahin gestellt. Wir haben bewusst auf den Einsatz dieser Minipumpen verzichtet, da selbst die kleinste dieser Minipumpen mit einer Länge von 1cm und einem Durchmesser von ca. 5 mm selbst relativ zur Körperlänge einer adulten *Hyp*-Maus eine noch immer beachtliche Größe aufweist und die Implantation eine unverhältnismäßig große Belastung für die jungen, und folglich auch kleinen *Hyp*-Mäuse dargestellt hätte. Zudem standen uns für die Injektion vorgesehene Ethanolhaltige Calcitriol-Lösungen zur Verfügung, die sich problemlos mit Wasser verdünnen und dann dem Trinkwasser zusetzen ließen.

Auch bei einer solchen Applikationsform stieg die Mineraldichte im Alveolarknochen der *Hyp*-Mäuse von durchschnittlich $1,1 \text{ g/cm}^3$ auf $1,7 \text{ g/cm}^3$ an, erreichte jedoch innerhalb der Behandlungszeit von nur 7 Tagen nie die Werte vergleichbarer gesunder Tiere ($2,2 \text{ g/cm}^3$). Beim Schmelz verhielt es sich ähnlich. Dies zeigte uns, dass eine 7-tägige Behandlung mit Calcitriol den in der Literatur beschriebenen Effekt hat, aber die Behandlungszeit zu kurz war, um eine vollständige Normalisierung von Zahn- und Knochenmineralisierung zu erreichen.

Die Aufnahme des in Ethanol gelösten und dann dem Trinkwasser zugesetzten Calcitriols war unproblematisch. Trotzdem bleibt gegenüber der Implantation einer Pumpe der Nachteil, dass die tatsächliche im Tier applizierte Dosis durch die Gruppenhaltung relativ unscharf definiert ist. Dieser Nachteil wird aber durch die Vorteile (Möglichkeiten zu längerer Behandlungszeit, höherer Dosierungen, weniger Stress für die Tiere) bei weitem aufgewogen.

Wenn man unsere Befunde zusammengefasst als Basis für den "richtigen" Phänotyp nimmt, können wir davon ausgehen, dass auch die in Rostock gezüchteten *Hyp*-Mäuse dem "Standard" – zumindest im Hinblick auf die Zahnmorphologie – entsprechen. Das impliziert, dass man mit großer Wahrscheinlichkeit Angaben aus früheren Therapiestudie übernehmen kann und die Ergebnisse lediglich stichprobenartig an wenigen Tieren überprüfen muss. Das ist sicher ein Vorteil, denn auch in dieser Arbeit wurden relativ wenige, bei strenger Betrachtung sogar zu wenige Tiere untersucht. Letzteres ist nicht zuletzt auf die oben erwähnten Schwierigkeiten bei der Zucht dieser Tiere zurückzuführen.

Für einen aussagekräftigen Tierversuch sind optimale, und tiergerechte Haltungsbedingungen Voraussetzung. Hierzu gehören je nach Fragestellung ein ausreichendes bzw. sogar uneingeschränktes Angebot von Futter und Wasser, ausreichender Platz pro Tier, wenn möglich eine Haltung in Gruppen und die Aufrechterhaltung des circadianen Rhythmus werden angestrebt. Diese Bedingungen lassen sich bei Versuchen mit Mausböcken nicht immer einhalten, da dieses nur bei Wurfgeschwistern möglich ist und sonst relativ große Käfige erfordert, da Mausböcke ein ausgeprägtes Revier-

verhalten besitzen (Institute of Laboratory Animal Resources Commission Council 1996). Weiterhin ist es wünschenswert, dass alle Tiere einer Therapiegruppe parallel und unter wirklich gleichen äußeren Bedingungen (Jahreszeit, Wetter etc.) behandelt werden. In unserem Falle bedeutete das, dass Wurfgeschwister zwar nach Genotyp getrennt, dann aber doch nach Möglichkeit in Gruppen gehalten wurden. Pro Käfig wurden die aufgenommen Futter- und Wassermengen registriert und diese Mengen auf die Zahl der Tiere pro Käfig bezogen. Demgegenüber wurde das individuelle Gewicht jedes Tieres täglich registriert. Anhand der individuellen Gewichtsveränderungen wurde abgeschätzt, ob alle Tiere gleichmäßig an der Futteraufnahme beteiligt waren. Um eine sichere statistische Auswertung zu ermöglichen, wäre es wünschenswert gewesen, mindestens 6 Tiere (BL₆/J Kontrollen, unbehandelte *Hyp*-Mäuse) pro Gruppe einzusetzen. Dem standen die relativ geringen Wurfgrößen (häufig nur 2-5 Mäuse/Wurf) und die damit verbundene geringe "Ausbeute" an *Hyp*-Mäusen entgegen. Die sukzessive Ausweitung der Zucht, d.h. der Einsatz weiterer Zuchtpaare, fand parallel zu den hier beschriebenen Untersuchungen statt, so dass für zukünftige Studien in vertretbarer Zeit ausreichende Tierzahlen zur Verfügung stehen werden.

Trotz aller Einschränkungen, die bei der Beurteilung der hier vorgestellten Ergebnisse zu machen sind, entsprechen sowohl Genotyp als auch der Zahnphänotyp der in Rostock etablierten Kolonie den in der Literatur beschriebenen Merkmalen und auch die Calcitriol-Gabe über das Trinkwasser führte zu den erwarteten Effekten. Damit ist die in Rostock etablierte Kolonie für die Durchführung weiterer Studien zur Therapie der XLH geeignet.

6 Zusammenfassung

Die X-chromosomal dominante Hypophosphatämie ist mit 1.20.000 Neugeborenen die häufigste Form der erblichen Rachitiden und wird durch Mutationen im *PHEX*-Gen (Phosphatregulierende Endopeptidase auf dem X-Chromosom) hervorgerufen. Die Erkrankung geht mit Wachstumsretardierung, Kleinwuchs, Knochendeformitäten und klassischen dentalen Defekten, wie z.B. Zahnabszessen einher. Therapeutisch wird eine Substitution mit Phosphat und Calcitriol durchgeführt, wobei sich eine Frühbehandlung positiv auf die Endgröße und den Schweregrad der Knochendeformitäten auswirkt.

Im Sommer 2009 wurde im Institut für Experimentelle Chirurgie mit Zentraler Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock mit dem Aufbau einer *Hyp*-Maus Kolonie durch die Verpaarung heterozygoter weiblicher C57/BL6*PheX*^{Hyp}/J (*Hyp*-Maus) mit gesunden männlichen C57/BL6/J Mäusen begonnen. Ziel der Arbeit war die Charakterisierung, insbesondere der Zahnmorphologie und damit eine Validierung der neu etablierten Zucht. Hierfür standen insgesamt 11 *Hyp*- und 17 Kontrolltiere mit einem mittleren Alter von 80 Tagen (8 *Hyp*-Mäuse und 11 Kontrolltiere) und 30 Tagen (3 *Hyp*-Mäuse und 6 Kontrolltiere) zur Verfügung. Jeweils 4 *Hyp*-Mäuse und Kontrolltiere im Alter von 74 bzw. 78 Tagen erhielten während der letzten 7 Tage vor Versuchsende täglich Calcitriol über das Trinkwasser (450 ng/kg Körpergewicht und Tag).

Anhand von Untersuchungen der isolierten Unterkiefer im Röntgentomographen (μ -CT), photographischen Ablichtungen der Schädel, histologischer Präparaten sowie der Analyse biochemischer Parameter konnten die typischen Charakteristika der *Hyp*-Maus verifiziert werden. Die *Hyp*-Mäuse waren von ihren gesunden Wurfgeschwistern durch verkürzte Hinterbeine und einen kürzeren Schwanz zu unterscheiden. Während bei den erkrankten Jungtieren vor allem der Größenunterschied imponierte, fiel bei älteren *Hyp*-Mäusen eine ausgeprägte Deformationen des Oberkiefers und des Nasenskeletts auf, die sich jedoch unter der Calcitriol-Behandlung zumindest teilweise zurück bildete. Außerdem fanden sich makroskopisch im Einklang mit dem erwarteten Mineralisationsdefekten bei den *Hyp*-Mäusen vermehrt opake und dunkle Zähne als bei den Wildtypen. Die Mineraldichte im Alveolarknochen der *Hyp*-Mäuse war durch Calcitriol wesentlich stärker zu beeinflussen als die Mineraldichte im Schmelz. Möglicherweise ist hierfür die Tatsache verantwortlich, dass der Zahnschmelz die härteste Struktur im Organismus ist und sich Schwankungen im Calcium/Phosphat- Haushalt daher weniger und später bemerkbar machen als im Knochen. Weiterhin wurde deutlich, dass eine 7-tägige Behandlung mit Calcitriol nicht ausreichend ist, um diese Mineralisierungsdefekte vollständig zu beheben.

7 Thesen

1. *Hyp*-Mäuse sind im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen kleinwüchsig und weisen ein geringeres Körpergewicht auf. Bereits im Alter von wenigen Wochen unterscheiden sie sich durch verkürzte Hinterbeine sowie einen kürzen Schwanz von ihren gesunden Wurfgeschwistern. Die unterschiedliche Futteraufnahme der Tiere spiegelt die Unterschiede im Körpergewicht wieder (im Alter von 80 Tagen: *Hyp*-Maus: 14g / Wildtyp-Maus: 22g).
2. Die durchschnittliche Minereraldichte ist im alveolären Knochen und Zahnschmelz bei der *Hyp*-Maus mit 1,2 g/cm³ (Knochen) und 2,7 g/cm³ (Zahn) deutlich geringer als bei gesunden Kontrolltieren mit 1,7 g/cm³ im Knochen) und 2,8 g/cm³ bei den Zähnen.
3. Calcitriol verbessert die Mineralisierung im Alveolarknochen und Zahnschmelz bereits nach 7-tägiger Behandlung, diese Zeit ist aber für eine vollständige Normalisierung der Mineraldichten nicht ausreichend.
4. Serum-Werte für Calcium sind bei *Hyp*- und *BL₆*-Mäusen annähernd gleich, die Serum-Phosphatwerte der *Hyp*-Mäuse sind deutlich geringer und beweisen die Hypophosphatämie.
5. Im Alter von ca. 85 Tagen sind die FGF-23 Spiegel bei *Hyp*-Mäusen 4,7 x höher als bei *BL₆*-Mäusen. Durch Calcitriol steigen die FGF-23 Spiegel noch weiter an und sind bei 80 Tage alten *Hyp*-Mäusen nach 7-tägiger Calcitriol-Behandlung etwa 1/3 höher als bei unbehandelten Tieren.
6. Die Merkmale der in Rostock gezüchteten *Hyp*-Mäuse stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Charakteristika überein. Damit sind Tiere dieser Kolonie für weitere Untersuchungen geeignet.

8 Literaturverzeichnis

- Abe, K, Y Masatomi, Y Nakajima, S Shintani, Y Moriwaki, S Sobue T Ooshima (1992). "The occurrence of interglobular dentin in incisors of hypophosphatemic mice fed a high-calcium and high-phosphate diet." *J Dent Res* **71**(3): 478-83.
- Abe, K, T Ooshima, TS Lily, Y Yasufuku S Sobue (1988). "Structural deformities of deciduous teeth in patients with hypophosphatemic vitamin D-resistant rickets." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **65**(2): 191-8.
- Abe, K, T Ooshima, Y Masatomi, S Sobue Y Moriwaki (1989). "Microscopic and crystallographic examinations of the teeth of the X-linked hypophosphatemic mouse." *J Dent Res* **68**(11): 1519-24.
- Abigail, T, Sharpe, P. (2004). "The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth." *Nature Reviews Genetics* **5**: 499-508.
- Albright, F, Butler, A.M. Bloomberg, E. (1937). "Rickets resistant to vitamin D therapy." *Am J Dis Child* **54**: 529-547.
- Azam, N, Zhang, MY, Wang, X, Tenenhouse, HS, Portale, AA (2003). "Disordered regulation of renal 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase gene expression by phosphorus in X-linked hypophosphatemic (hyp) mice." *Endocrinology* **144**(8): 3463-8.
- Baker, LRTC Stamp (1989). "Autosomal recessive hypophosphataemia." *Arch Dis Child* **64**(8): 1209.
- Baroncelli, GI, Bertelloni, S, Ceccarelli, C, Saggese, G (2001). "Effect of growth hormone treatment on final height, phosphate metabolism, and bone mineral density in children with X-linked hypophosphatemic rickets." *J Pediatr* **138**(2): 236-43.
- Bartl, R, Bartl C, Gradinger, R (2009). "[Drug-induced osteopathies. Drugs, pathogenesis, forms, diagnosis, prevention and therapy]." *Orthopade* **38**(12): 1245-60; quiz 1261.
- Bartl, RR, Gradinger (2009). "[Current diagnosis and therapy of osteoporosis on the basis of "European guidance 2008"]." *Orthopade* **38**(4): 365-79; quiz 380.
- Berndt, TR, Kumar (2009). "Novel mechanisms in the regulation of phosphorus homeostasis." *Physiology (Bethesda)* **24**: 17-25.

- Blumsohn, A (2004). "What have we learnt about the regulation of phosphate metabolism?" *Curr Opin Nephrol Hypertens* **13**(4): 397-401.
- Boukpepsi, T, Septier, D, Bagga, S, Garabedian, M, Goldberg, M, Chaussain-Miller, C (2006). "Dentin alteration of deciduous teeth in human hypophosphatemic rickets." *Calcif Tissue Int* **79**(5): 294-300.
- Breen, GH (1986). "Prophylactic dental treatment for a patient with vitamin D-resistant rickets: report a case." *ASDC J Dent Child* **53**:38-43.
- Chaussain-Miller, C, Sinding, C, Wolikow, M, Lasfargues, JJ, Godeau, G, Garabedian, M (2003). "Dental abnormalities in patients with familial hypophosphatemic vitamin D-resistant rickets: prevention by early treatment with 1-hydroxyvitamin D." *J Pediatr* **142**(3): 324-31.
- Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Science National Research Council, (1996). *Leitfaden zur Pflege und Nutzung von Labortieren*, National Academy Press.
- De Beur, SM (2005). "Tumoral calcinosis: a look into the metabolic mirror of phosphate homeostasis." *J Clin Endocrinol Metab* **90**(4): 2469-71.
- De Beur, SM, Finnegan, RB, Vassiliadis, J, Cook, B, Barberio, D, Estes, S, Manavalan, P, Petroziello, J, Madden, SL, Cho, JY, Kumar, R, Levine, MA, Schiavi, SC (2002). "Tumors associated with oncogenic osteomalacia express genes important in bone and mineral metabolism." *J Bone Miner Res* **17**(6): 1102-10.
- DiMeglio, LAMJ, Econs (2001). "Hypophosphatemic rickets." *Rev Endocr Metab Disord* **2**(2): 165-73.
- Douyere, D, C Joseph, C, Gaucher, C, Chaussain F, Courson (2009). "Familial hypophosphatemic vitamin D-resistant rickets--prevention of spontaneous dental abscesses on primary teeth: a case report." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **107**(4): 525-30.
- Ecarot, B, FH Glorieux, M, Desbarats, R, Travers, L, Labelle (1995). "Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ treatment on bone formation by transplanted cells from normal and X-linked hypophosphatemic mice." *J Bone Miner Res* **10**(3): 424-31.
- Eicher, EM, JL Southard, CR, Scriver, FH, Glorieux (1976). "Hypophosphatemia: mouse model for human familial hypophosphatemic (vitamin D-resistant) rickets." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(12): 4667-71.
- Emmett, M (2008). "What does serum fibroblast growth factor 23 do in hemodialysis patients?" *Kidney Int* **73**(1): 3-5.

- Fischer, DC, C Jensen, A Rahn, B Salewski, G Kundt, GJ Behets, P D'HaeseD Haffner (2011). "Ibandronate affects bone growth and mineralization in rats with normal and reduced renal function." *Pediatr Nephrol* **26**(1): 111-7.
- Fukagawa, MJJ Kazama (2006). "FGF23: its role in renal bone disease." *Pediatr Nephrol* **21**(12): 1802-6.
- Gerok, W (2007). *Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt*. Stuttgart, Schattauer Verlag.
- Glorieux, FH (1991). "Rickets, the continuing challenge." *N Engl J Med* **325**(26): 1875-7.
- Glorieux, FH, CR Scriver, TM Reade, H GoldmanA Roseborough (1972). "Use of phosphate and vitamin D to prevent dwarfism and rickets in X-linked hypophosphatemia." *N Engl J Med* **287**(10): 481-7.
- Haffner, D,DC Fischer (2010). "Bone cell biology and pediatric renal osteodystrophy." *Minerva Pediatr* **62**(3): 273-84.
- Haffner, D, E Wuhl, WF Blum, F SchaeferO Mehls (1995). "Disproportionate growth following long-term growth hormone treatment in short children with X-linked hypophosphataemia." *Eur J Pediatr* **154**(8): 610-3.
- Haffner, D, Schnabel, D (2005) "Diagnostik und Therapie der Rachitis" *Monatsschrift Kinderheilkunde* 1
- Halstead, LR, RS Weinstein, SL Cheng, L RifasLV Avioli (1996). "Comparison of 22-oxacalcitriol and 1,25(OH)₂D₃ on bone metabolism in young X-linked hypophosphatemic male mice." *Am J Physiol* **270**(1 Pt 1): E141-7.
- Hanna, JD, K NiimiJC Chan (1991). "X-linked hypophosphatemia. Genetic and clinical correlates." *Am J Dis Child* **145**(8): 865-70.
- Harris, R, Sullivan, H.R. (1960). "Dental sequelae in deciduous dentition in vitamin D resistant rickets " *Aust Dent J* 5:200-3.
- Hellwig, E, Klimek, J.; Attin, T. (2009). *Einführung in die Zahnerhaltung*. Freiburg, Gießen, Zürich, Deutscher Zahnärzte Verlag.
- Heydecke, G, Kern, M., Strub, J.R. (2010). *Prothetik Band 1*. Berlin, Quintessenz Verlag.
- Hillmann, G, Geurtsen, W. (2005). "Histopathologische Untersuchungen nicht entkalkter Milchzähne bei Vitamin-D-resistenter Rachitis." *Familiäre Hypophosphatämische Rachitis* Klaus Mohnike, Kalr-Heinz Klingebiel(ABW Wissenschaftsverlag GmbH).

- Hiort, O, Danne Thomas, Wabitsch Martin (2010). _Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie, Springer Verlag.
- Jan de Beur, SMMA Levine (2002). "Molecular pathogenesis of hypophosphatemic rickets." *J Clin Endocrinol Metab* **87**(6): 2467-73.
- Jiang, B, Z Cao, Y Lu, C Janik, S Lauziere, Y Xie, A Poliard, C Qin, LM WardJQ Feng (2010). "DMP1 C-terminal mutant mice recapture the human ARHR tooth phenotype." *J Bone Miner Res* **25**(10): 2155-64.
- Kaneshiro, NK (2009). from <http://health.allrefer.com/pictures-images/frontal-bossing.html>.
- Keränen, S, Aberg,T., Kettunen, P., Thesleff, I., Jernvall, J. (1999). "Gene Expression patterns associated with suppression of odontogenesis in mouse and vole diastema regions." *Dev Genes Evol* **209**: 495-506.
- Kuro-o, M (2010). "Overview of the FGF23-Klotho axis." *Pediatr Nephrol* **25**(4): 583-90.
- Lang, G (2006). _Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik, Springer Wien New York.
- Lehnert, H (2009). _Rationelle Diagnostik und Therapie in Endokrinologie, Diabetologie und Stoffwechsel, Georg Thieme Verlag.
- Lentze, MJ, Schaub,J. F.-J.Schulte, Spranger,J. (2007). _Pädiatrie, Springer.
- Leydig, F (1857). _Lehrbuch der Histologie des Menschen und der Thiere. Frankfurt a.M.; Hamm, Verlag von Meidinger Sohn und Comp.; digitalisiert von google.
- Liebich, H-G (2004). _Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. München.
- Liu, S, W Tang, J Zhou, JR Stubbs, Q Luo, M PiLD Quarles (2006a). "Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D." *J Am Soc Nephrol* **17**(5): 1305-15.
- Liu, S, J Zhou, W Tang, X Jiang, DW RoweLD Quarles (2006b). "Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**(1): E38-49.
- Löffler, G, P PetridesP Heinrich (2006). _Biochemie und Pathobiochemie, Springer
- Lorenz-Depiereux, B, M Bastepe, A Benet-Pages, M Amyere, J Wagenstaller, U Muller-Barth, K Badenhop, SM Kaiser, RS Rittmaster, AH Shlossberg, JL Olivares, C Loris, FJ Ramos, F Glorieux, M Vikkula, H JuppnerTM Strom (2006a). "DMP1 mutations in autosomal recessive hypophosphatemia

- implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis." *Nat Genet* **38**(11): 1248-50.
- Lorenz-Depiereux, B, A Benet-Pages, G Eckstein, Y Tenenbaum-Rakover, J Wagenstaller, D Tiosano, R Gershoni-Baruch, N Albers, P Lichtner, D Schnabel, Z HochbergTM Strom (2006b). "Hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria is caused by mutations in the sodium-phosphate cotransporter gene SLC34A3." *Am J Hum Genet* **78**(2): 193-201.
- Lorenz-Depiereux, B, D Schnabel, D Tiosano, G HauslerTM Strom (2010). "Loss-of-function ENPP1 mutations cause both generalized arterial calcification of infancy and autosomal-recessive hypophosphatemic rickets." *Am J Hum Genet* **86**(2): 267-72.
- Lüllmann-Rauch, R (2009). *Histologie*. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.
- Lyon, MF, C.R. Scriver, L.R.I. Baker, H.S. Tenenhouse, J. Kronick and S. Mandla, (1986). "The Gy mutation: another cause of X-linked hypophosphatemia in mouse." *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 4899-4903.
- Mäkitie, O, Doria, A., Kooh,S.W., Cole, W.G. (2003). "Early Treatment Improves Growth and Biochemical and Radiographic Outcome in X-linked Hypophosphatemic Rickets." *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 3591-97.
- Marie, PJ, R TraversFH Glorieux (1982a). "Bone response to phosphate and vitamin D metabolites in the hypophosphatemic male mouse." *Calcif Tissue Int* **34**(2): 158-64.
- Marie, PJ, R TraversFH Glorieux (1982b). "Healing of bone lesions with 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the young X-linked hypophosphatemic male mouse." *Endocrinology* **111**(3): 904-11.
- Martin, A, V DavidLD Quarles (2012). "Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways." *Physiol Rev* **92**(1): 131-55.
- McCune, D (1935). "Refractory rickets." *J Pediatr* **6**:872-3.
- Meyer, MHRA Meyer, Jr. (1988). "Increased intestinal absorption of calcium in young and adult X-linked hypophosphatemic mice after the administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3." *J Bone Miner Res* **3**(2): 151-7.
- Meyer, RA, Jr. (1985). "X-linked hypophosphatemia (familial or sex-linked vitamin-D-resistant rickets). X-linked hypophosphatemic (Hyp) mice." *Am J Pathol* **118**(2): 340-2.
- Miao, D, X Bai, D Panda, M McKee, A KaraplisD Goltzman (2001). "Osteomalacia in hyp mice is associated with abnormal phex expression and with altered bone matrix protein expression and deposition." *Endocrinology* **142**(2): 926-39.

- Misra, M, D Pacaud, A Petryk, PF Collett-SolbergM Kappy (2008). "Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations." *Pediatrics* **122**(2): 398-417.
- Moss-Salentijn (1978). "Vestigal Teeth in the Rabbit, Rat and Mouse; their Relationship to the Problem of Lacteal Dentitions." Academic Press, London, New York, San Francisco(In „Development, Function and Evolution of Teeth“): pp. 13-29.
- Onishi, T, S Umemura, S ShintaniT Ooshima (2008). "Phex mutation causes overexpression of FGF23 in teeth." *Arch Oral Biol* **53**(2): 99-104.
- Parfitt, AM (1987). "Bone and plasma calcium homeostasis." *Bone* **8 Suppl 1**: S1-8.
- Patzer, L (2000). "X-chromosomal vererbte hypophosphatämische Rachitis (Phosphatdiabetes)." *Monatsschrift Kinderheilkunde* 6-2000 **6-2000**: 564-571.
- Pereira, CM, CR de Andrade, PA Vargas, RD Coletta, OP de AlmeidaMA Lopes (2004). "Dental alterations associated with X-linked hypophosphatemic rickets." *J Endod* **30**(4): 241-5.
- Peterková, R, Peterka, M., Vonesch, JL., Ruch, JV. (1995). "Contribution of 3-D computer-assisted reconstructions to the study of the initial steps of mouse odontogenesis." *Int J Dev Biol* 39:239-247.
- Pettifor, JM (2008). "What's new in hypophosphatemic rickets?" *Eur J pediatr* 167: 493-499.
- Peyer, B (1963)._Die Zähne: ihr Ursprung, ihre Geschichte und ihre Aufgabe, Springer Verlag OHG Berlin, Göttingen , Heidelberg.
- Peyer, B (1968). "Comparative Odontology." University of Chicago Press, Chicago and London.
- Rateitschak, K, Wolf, H. (2003)._Farbatlant der Zahnmedizin 1 Parodontologie. Zürich.
- Razzaque, MS (2009). "The FGF23-Klotho axis: endocrine regulation of phosphate homeostasis." *Nat Rev Endocrinol* **5**(11): 611-9.
- Razzaque, MS (2011). "Osteo-renal regulation of systemic phosphate metabolism." *IUBMB Life* **63**(4): 240-7.
- Razzaque, MSB Lanske (2007). "The emerging role of the fibroblast growth factor-23-klotho axis in renal regulation of phosphate homeostasis." *J Endocrinol* **194**(1): 1-10.

- Schroeder, H (1997). Pathobiologie oraler Strukturen. Basel.
- Schumacher, GS, H. Börnig, H., Richter w. (1990). Anatomie und Biochemie der Zähne. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.
- Scriver, CRHS Tenenhouse (1992). "X-linked hypophosphataemia: a homologous phenotype in humans and mice with unusual organ-specific gene dosage." *J Inher Metab Dis* **15**(4): 610-24.
- Seow, WK (1984). "X-linked hypophosphataemic vitamin D-resistant rickets." *Aust Dent J* **29**(6): 371-7.
- Shaikh, A, Berndt, T., Kumar, R. (2008). "Regulation of phosphate homeostasis by the phosphatonins and other novel mediators." *Pediatr Nephrol* **23**: 1203-1210.
- Shetty, NSRA Meyer, Jr. (1991). "Craniofacial abnormalities in mice with X-linked hypophosphatemic genes (Hyp or Gy)." *Teratology* **44**(4): 463-72.
- Sochett, E, AS Doria, F Henriques, SW Kooh, A Daneman O Makitie (2004). "Growth and metabolic control during puberty in girls with X-linked hypophosphataemic rickets." *Horm Res* **61**(5): 252-6.
- Strom, T-M, Francis, F., Lorenz, B., Böddrich, A. Econs, M.J. Lehrach, H. (1996). "Pex gene deletions in Gy and Hyp mice provide mouse models for X-linked hypophosphatemia." *Human Molecular Genetics* **6**(2): 165-172.
- Strom, T-M, Lorenz-Depiereux, B. (2001). Monogen vererbte Hypophosphatämien. Springer Verlag Berlin Heidelberg, D. Ganten und K. Ruckpaul.
- Strom, TMH Juppner (2008). "PHEX, FGF23, DMP1 and beyond." *Curr Opin Nephrol Hypertens* **17**(4): 357-62.
- Strub, JR, Kern, M., Türp, J.C., Witkowski, S. (2010). Curriculum Prothetik Band I. Berlin, Quintessent Verlag.
- Tenenhouse, HS, J Martel, J Biber H Murer (1995). "Effect of P(i) restriction on renal Na(+)-P(i) cotransporter mRNA and immunoreactive protein in X-linked Hyp mice." *Am J Physiol* **268**(6 Pt 2): F1062-9.
- Tenenhouse, HS, J Martel, C Gauthier, MY Zhang AA Portale (2001). "Renal expression of the sodium/phosphate cotransporter gene, Npt2, is not required for regulation of renal 1 alpha-hydroxylase by phosphate." *Endocrinology* **142**(3): 1124-9.
- Tenenhouse, HSCR Scriver (1992). "X-linked hypophosphatemia. A phenotype in search of a cause." *Int J Biochem* **24**(5): 685-91.

Verge, CF, A Lam, JM Simpson, CT Cowell, NJ HowardM Silink (1991). "Effects of therapy in X-linked hypophosphatemic rickets." N Engl J Med **325**(26): 1843-8.

Wagner, CH Murer (2008). "Phosphatonine-neuartige Phosphathormone." Schweiz Med Forum: 8-10.

Yasufuku, Y, N Kohno, N Tsutsumi, T Ooshima, S Sobue, Y MurakamiH Ikari (1983). "Dental management of familial hypophosphatemic vitamin D-resistant rickets: report of case." ASDC J Dent Child **50**(4): 300-4.

Zivicnjak, M, D Schnabel, H Billing, H Staude, G Filler, U Querfeld, M Schumacher, A Pyper, C Schroder, J BramswigD Haffner (2011). "Age-related stature and linear body segments in children with X-linked hypophosphatemic rickets." Pediatr Nephrol **26**(2): 223-31.