

## **Klinische und grundlagenwissenschaftliche Forschung über die seltene Erkrankung: X-Chromosomalen Hypophosphatämie (XLH)**

Prof. Dr. rer. nat. Katrin M. Marcus, Medizinisches Proteom-Center

Prof. Dr. med. Annette Richter-Unruh, Klinik für Kinder und Jugendliche, Kinderendokrinologie und Diabetologie (Ansprechperson)

Prof. Dr. rer. nat. Carsten Theiss, Institut für Anatomie, Abteilung für Cytologie

### **1. Zusammenfassung des gemeinsamen Forschungsvorhabens**

Die X-chromosomal erbliche hypophosphatämische Rachitis (XLH) ist eine seltene Erkrankung und stellt die häufigste Form einer hereditären Rachitis dar, deren Prävalenz auf 1:20.000 geschätzt wird (1). Die Erkrankung ist durch stark erhöhte Serumspiegel des phosphaturischen Hormons Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) gekennzeichnet, die zu einem vermehrten renalen Phosphatverlust, Hypophosphatämie und reduzierten Synthese von aktivem Vitamin D führt. Die klinischen Folgen sind eine Wachstumsretardierung, rachitische Knochenveränderungen, Zahnabszesse, Nierenverkalkungen und Osteomalazie, beginnend in den ersten beiden Lebensjahren. Betroffene leiden oft lebenslang unter der schwerwiegenden Beeinträchtigung des Knochenstoffwechsels (Kleinwuchs, schwere Knochendeformitäten) und damit verbundenen chronischen Schmerzen.

Beim Phosphatdiabetes (XLH) kommt es durch eine genetische Veränderung im sogenannten PHEX-Gen zur vermehrten Bildung und Sekretion von FGF23 in bzw. aus den Knochenzellen. Diese führt zu einer Störung der Rückresorption und zu einer überproportional starken Ausscheidung von Phosphat über die Niere in den Urin und im Blut zu einem niedrigen Phosphat-Spiegel.

Wie es zu einem erhöhten FGF23 Spiegel kommt, d.h. die exakte Pathophysiologie der XLH, ist leider bisher noch nicht aufgeklärt worden. Ein Zusammenhang zwischen PHEX und FGF23 wurde beschrieben, allerdings sind die genauen molekularen Zusammenhänge noch nicht bekannt. Die gegenwärtige Standard-Therapie erfolgt durch eine orale Substitution mit Phosphat sowie der Gabe von aktivem Vitamin D und setzt damit nicht an der Ursache der XLH an. Im Jahr 2018 wurde für Kinder im Wachstum (mit offenen Wachstumsfugen) ein rekombinanter humaner monoklonaler Antikörper Burosumab (Crysvita®) (2) zugelassen, der durch die Bindung an FGF23 dessen Aktivität hemmt, und somit in den Pathomechanismus eingreift, obwohl dieser noch nicht hinreichend geklärt ist. Außerdem gibt es in der klinischen Ausprägung und der subjektiven Wahrnehmung der Einschränkung der Lebensqualität trotz einer gleichen Mutation große Unterschiede. Am 2. Oktober 2020 wurde durch die Europäische Kommission eine Zulassungserweiterung für die Behandlung von älteren Jugendlichen sowie Erwachsenen mit X-chromosomaler hypophosphatämischer Rachitis erteilt (3). Dadurch ist die Behandlung mit Burosumab nun auch für Jugendliche mit radiologischem Nachweis der Knochenerkrankung unabhängig vom Wachstumsstatus möglich.

Wir wollen in diesem Kooperationsprojekt/Graduiertenkolleg in der klinischen Promotionsarbeit in einer großen Querschnittsstudie die Skelett- und Körpergesundheit, die Pharmakotherapie/ chirurgische Eingriffe, funktionelle und andere schwere Einschränkungen/ Komplikationen sowie ursächlichen genetischen Veränderungen erfassen und mit dem sozialen Status, der Krankheitsbelastung und der Lebensqualität korrelieren. Zusätzlich möchten wir ein partizipatives interdisziplinäres diagnosespezifisches Informationsmanagementkonzept für Eltern, Kinder und Jugendliche entwickeln und evaluieren. In den grundlagenwissenschaftlichen Arbeiten möchten wir klären, ob Mutationen im PHEX-Gen zu einem deregulierten Transport von FGF23 durch den Golgi-Apparat führen und wie die molekularen Zusammenhänge zwischen einem Knock out bzw. einer Inaktivierung im PHEX-Gen und einer fehlerhaften FGF23 Prozessierung aussehen.

## **2. Stand der Forschung**

### **Klinische Forschung:**

Für die Pathogenese der XLH spielt das FGF23 eine zentrale Rolle. Ursächlich ist eine Mutation im PHEX (Phosphat-regulierende Endopeptidase homolog, X-linked) -Gen, die zu einem erhöhten FGF23 Spiegel in den Osteozyten sowie im Blut führt. Hier sind ca. 350 verschiedene Nonsense-, Missense-, Frameshift-, Deletions- und Duplikations-mutationen bekannt (4). Die klinischen Ausprägungen variieren stark von scheinbar asymptomatisch bis hin zu schwerwiegenden Knochendeformitäten (5). Das Geschlecht scheint keinen Einfluss auf den Schweregrad zu haben (6). Genotyp-Phänotyp Korrelationen sind nicht beschrieben (1). Die erhöhten FGF23 Level führen zu einem Phosphatmangel, was sich wiederum in einer Mineralisationsstörung der Knochen und Zähne, sowie vielfältigen körperlichen Probleme sowohl durch den Mangel, als auch die Therapie (5,7-10) ausdrückt. Die bisherige Therapie mit 3-5 Einzelgaben von oralem Phosphat und aktivem Vitamin D ist neben der häufig begrenzten Wirksamkeit mit Nebenwirkungen (u.a. abdominelle Beschwerden) verbunden und führt oft zu einer ungenügenden Therapieadhärenz (7). Seit der weltweiten Zulassung eines monoklonalen Antikörpers gegen FGF23, Burosumab, steht erstmals seit 2018 eine kausale Therapieoption für pädiatrische Patienten mit XLH zur Verfügung (2). In Deutschland ist Burosumab (Crisvita®) für Kinder seit 2018 und seit Oktober 2020 auch für Jugendliche nach der Skelettwachstumsphase mit röntgenologischem Nachweis einer Knochenerkrankung und Erwachsene zugelassen (3, 11). Basis für die Zulassung war eine doppel-blind, Placebo-kontrollierten Phase 3 - Studie mit Burosumab im Erwachsenenalter von Menschen mit XLH (12). In der mit Burosumab behandelten Gruppe kam es schon nach 24 Wochen zu einer Konsolidierung der Frakturen von 43,1 % gegenüber 7,7 % in der Placebogruppe. Aktuell wird in den deutschen Expertengruppen diskutiert, welche Patienten von einer kausalen Therapie am meisten profitieren könnten.

### **Grundlagenforschung:**

Das 32 kDa lange Glykoprotein FGF23 ist ein wesentlicher Akteur bei der Mineralienhomöostase, der Knochenmineralisierung und der Vitamin-D-Produktion (13,14). Unter physiologischen Bedingungen wird FGF23 von Osteoblasten/Osteozyten über den ER-Golgi-Apparat-Weg sekretiert. Seine Aktivität wird durch proteolytische Spaltung moduliert, wobei nach Abspaltungen eines Signalpeptids zunächst die reife Form des FGF23-Proteins (227 Aminosäuren) entsteht (15). Die reife Form wird entweder sekretiert oder in ein N- und ein C-terminales Fragment gespalten. Beide Fragmente können ebenfalls sekretiert werden, allerdings wird angenommen, dass sie keine biologische Aktivität aufweisen (16). Die Spaltung von FGF23 wird im Golgi-Apparat durch ein Interplay von Phosphorylierung durch FAM20c und Glykosylierung durch GalNAC-T3 posttranslational reguliert (17,18). Aktives FGF23 kann autokrin auf Osteoblasten/Osteozyten einwirken, indem es an den FGF-Rezeptor 1 (FGFR1) und  $\alpha$ -Klotho bindet, die MAPK- und PI3K-Signalkaskade aktiviert, und somit die FGF23-Expression und die FGF23-Phosphorylierung initiiert. Parakrin wirkt es v.a. an der Niere und dem Darm, wo es durch die eine Suppression des Spiegels von 1,25-Dihydroxyvitamin D im Serum die Phosphatreabsorption einschränkt bzw. die Phosphatabsorption senkt (19). Neben dem reifen Protein wurde im Serum auch das C-terminale Fragment von FGF23 nachgewiesen. Es ist immer noch unbekannt, wie das Verhältnis von reifem zu C-terminalem Fragment bei Gesundheit und Krankheit moduliert wird. Es wurde beschrieben, dass PHEX, eine membranständige Metalloendopeptidase, an der Regulierung der FGF23-Spiegel in Abhängigkeit vom Mineralisierungsstatus des Knochens beteiligt ist. Bisher wird angenommen, dass PHEX die Expression von FGF23 und nicht dessen Degradation beeinflusst (20,21). Der molekulare Zusammenhang zwischen einer inaktivierenden PHEX Mutation und der FGF23-Regulation bzw. gestörten Freisetzung ist bislang nicht vollständig geklärt. Eine inaktivierende PHEX-Mutation führt dazu, dass der FGF23-Spiegel in Osteoblasten und nach Freisetzung im Serum ansteigt, was wiederum die renale Phosphatexkretion und die intestinale Phosphatabsorption limitiert (22). Auch die XLH entsteht durch die Inaktivierung von Mutationen des PHEX-Gens. Für weiterführende Untersuchungen z.B. zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation wurden verschiedene XLH Mausmodelle mit sechs verschiedenen Mutationen der PHEX Gene entwickelt (Gy (23), Hyp (24), Hyp-Duk (25), Hyp-2J, Ska1 (26), Jrt (27)), von denen die hyp-Maus am besten charakterisiert ist. Nur wenige Studien untersuchen die Effekte von PHEX in Zellmodellen (28).

### **3. Vorarbeiten der einzelnen Arbeitsgruppen**

In einer multizentrischen Studie konnten wir zeigen, dass eine Wachstumshormonbehandlung bei Kindern mit XLH keinen signifikanten Gewinn für die Endlänge bringt (29). Eine enge klinische Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Rödl (Chefarzt der Kinderorthopädie am UKM) besteht seit September 2013. Gemeinsam werden Kinder und Jugendliche mit XLH betreut. Frau Prof. Dr. Richter-Unruh arbeitet mit der Phosphatdiabetes Selbsthilfe e.V. eng zusammen, die die geplante klinische Studie unterstützen wollen. Als Studienzentrum nimmt die Universitätskinderklinik der RUB an der Studie

„Wachstum und Komorbidität bei Kindern mit hypophosphatämischer Rachitis: eine prospektive multizentrische Beobachtungsstudie“ teil. Die Studie wurde von der Ethikkommission der RUB im Januar 2020 genehmigt. Für das Katholische Klinikum Bochum hat sich die Kinderklinik im Dezember 2019 mit einem Antrag auf Aufnahme in das Europäische Referenzwerk (ERN) um die Teilnahme im ERN BOND (seltene Knochenerkrankungen) beworben.

Die **Abteilung für Cytologie** verfügt über komplett ausgestattete Labore für die Gewebeaufbereitung, sowohl für die Elektronenmikroskopie als auch für die Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie, sowie über eine große Erfahrung in der morphologischen Analyse unterschiedlichster Gewebe (30-34). Darüber hinaus erlaubt die apparative Ausstattung in der Abteilung für Cytologie sowie am Institut für Anatomie die komplette Durchführung der Versuche. Die folgenden Großgeräte werden im Rahmen der Gewebeanalysen eingesetzt: konfokales Laser Scanning Mikroskop (LSM 800 Zeiss); konfokales Spinning Disk Mikroskop (Nikon, Visitron); Inversmikroskop mit Phasenkontrast-Fernoptik (Axiovert 35, Zeiss, Deutschland); Olympus BX61VS Mikroskop (Olympus, Germany), Elektronenmikroskop Philips EM 420 inklusive Gatan-Digitalkamera.

Am **MPC** sind alle für das Projekt benötigten Labore und Techniken bzw. Geräte vorhanden. Neben der Ausstattung für eine umfassende Proteomanalytik inkl. Massenspektrometrie (QExactive HF und Orbitrap Fusion LUMOS, beide Thermo Scientific), Aminosäureanalyse (Acquity UPLC, Waters GmbH), Elektrophorese (verschiedene Firmen), HPLC (Ultimate 3000, Thermo Scientific), IT-Infrastruktur (Dell) etc. verfügt das MPC über ein molekularbiologisches sowie Zellkultur-Labor mit S1-Zulassung sowie ein L2-Labor für die Arbeiten mit menschlichem Probenmaterial. Wir haben Erfahrung in der Präparation und Analytik unterschiedlichster Zellkultursysteme (35,36), Gewebe (37-40), Körperflüssigkeiten (41,42) sowie die Etablierung von Zellmodellen (43-45) (u.a. auch einem Saos-2 Knochenzellmodell). Wir haben bereits primäre Osteoblasten in Kultur genommen und proteomisch charakterisiert (unveröffentlichte Ergebnisse).

#### **4. Themen der Promotionsarbeiten**

*Promotionsarbeit 1:* Hereditäre hypophosphatämische Rachitis: Diagnose, Therapie, klinischer Verlauf, Komorbidität und Lebensqualität in einer multizentrischen Querschnittstudie, sowie Entwicklung eines partizipativen interdisziplinären diagnosespezifischen Informationsmanagementkonzeptes für Eltern, Kinder und Jugendliche („Empower-XLH“)

*Promotionsarbeit 2:* Analyse der Zellorganell-spezifischen Lokalisation von FGF23 im Femur humaner XLH-Patientenproben

*Promotionsarbeit 3:* Erstellung und proteomische Charakterisierung eines XLH-Zellmodells

#### **5. Ziele der Promotionsarbeiten**

1 In einer großen Querschnittsstudie von Patienten mit XLH soll untersucht werden, ob Skelett- und Körpergesundheit, Pharmakotherapie/chirurgische Eingriffe, funktionelle und andere schwere

Einschränkungen/Komplikationen, sozialer Status mit der Krankheitsbelastung, der Lebensqualität und den ursächlichen genetischen Veränderungen korrelieren. Diese Studie soll den IST-Zustand der XLH-Kohorte 2021 erfassen und als Grundlage für eine Evaluation nach Einführung einer kausalen Behandlung mit Burosumab dienen. Weiterhin soll ein partizipatives diagnosespezifisches Informations-Managementkonzept für Eltern, Kinder und Jugendliche entwickelt und evaluiert werden

2 In dieser experimentellen Doktorarbeit soll untersucht werden, ob sich die XLH-Pathophysiologie in einem gestörten Proteintransport durch PHEX-Proteinsequestrierung in Osteozyten/Osteoblasten manifestiert.

Dazu werden Knochenbiopsien des Femurs von weiblichen XLH-Patienten, die sich einer Osteotomie unterziehen, für (1) elektronenmikroskopische und (2) fluoreszenzmikroskopische Analysen aufbereitet. Aufgrund der X-chromosomalen Stummschaltung gibt es bei weiblichen XLH-Patienten statistisch gesehen 50% der Osteozyten/Osteoblasten, die Transportdefekte aufweisen, während bei 50% der Osteozyten/Osteoblasten das normale PHEX-Gen exprimiert wird; Letztere fungieren als interne Kontrollen.

3 Ziel dieser experimentellen Doktorarbeit ist die Erstellung eines Zellmodells und dessen proteomische Charakterisierung. So sollen die Fragen zum Zusammenhang zwischen einer gestörten PHEX-Aktivität und einer fehlgesteuerten FGF23 Prozessierung beantwortet werden. Dafür wird ein bereits etabliertes humanes Osteosarcom Modell (Saos-2 Zellen) proteomisch charakterisiert (Sekretom und Proteom), das als Grundlage für die Geneditierung von PHEX mittels CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) dient.

## 6. Referenzen

### Referenzen

(1) Beck-Nielsen SS et al (2012) J Hum Genet. 57(7):453-8; (2) Carpenter ad al NEJM (2018) 124:378 (21)1987-1998; (3) <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/crysvita#product-information-section>; (4) McGill University. The PHEX database, [https://web.archive.org/web/20180127031217/ http://www.phexdb.mcgill.ca/](https://web.archive.org/web/20180127031217/http://www.phexdb.mcgill.ca/); (5) Lingart A et al (2014) endocr Connect 3:497; (6) Beck-Nielsen SS et al (2009) 160:491-497; (7) AWMF Leitlinie (2016) Hereditäre hypophosphatämische Rachitiden; (8) Che H et al (2016) J Endocrinol 174:325-333; (9) Fishman G et al (2004) J Pediatr 163:622-623; (10) Lingart A et al (2015) Bone Abstracts 4:198 (11) Fachinformation Crysvita®, Stand 2018; (12) Insogna KL et al (2018) J Bone Miner Res 33:1383–93; (13) Bhattacharyya N et al (2012) Trends Endocrinol Metab. 23:610–618; (14) Farrow EG & White KE (2010) Nat Rev Nephrol. 6:207–217; (15) Wolf M & White KE (2014) Curr Opin Nephrol Hypertens. 23:411-419; (16) Shimada et al (2002) Endocrinology 143:3179–3182; (17) Tagliabracci VS et al (2014) PNAS 111:5520-5525; (18) Beck-Nielsen SS et al (2019) 26;14(1):58; (19) Shimada T et al (2004) Bone Miner Res. 19:429-435; (20) Liu S et al (2003) J Biol Chem. 278:37419–37426; (21) Benet-Pages A et al (2004) Bone 35:455–462; (22) Imel EA et al (2010) J Clin Endocrinol Metab. 95:1846–1850; (23) Lorenz B et al (1998) Hum Mol Genet. 7:541–547; (24) Sabbagh Y et al (2002) Cytogenet Genome Res. 99:344–349; (25) Han F et al (2012) PLoS One 7:43010; (26) Carpinelli MR et al (2002) Am J Pathol. 161:1925–1933; (27) Owen C et al (2012) J Cell Biochem. 113:2432–2441; (28) Shih NR et al (2002) J Am Soc Nephrol. 2002 13(2):394-399; (29) Meyerhoff N et al Pediatr Nephrol. 2018 Mar;33:447-456; (30) Abel F et al (2020) Plos One 15:e0228948; (31) Klatt CL et al (2019) Cells 8(9), E1077; (32) Peischarde S et al (2019) Cell Physiol Biochem, 53(1):121-140; (33) Röderer P et al (2018) Mol Neurobiol. 55:8414-8424; (34) Krause M et al (2016) Ann Anat.

206:27-33; (35) Minakaki G et al (2018) *Autophagy* 14(1):98-119; (36) Herrfurth L et al (2017), *Front Mol Neurosci.* 10:2; (37) Großerueschkamp F et al (2017) *Sci Rep.* 7:44829; (38) Güttches AK et al (2017) *Annals Neurol*, 81(2):227-239; (39) Plum S et al (2016) *Sci Rep.* 6:37139; (40) Plum S et al (2013) *J Proteomics*, 94C:202-206; (41) Barkovits K et al (2020) *Cells*, im Druck; (42) Barkovits K et al (2018) *J Proteome Res.* 17:3418-3430; (43) Bukhari H et al (2016) *Cellular Signalling*, 28(11):1725-1734; (44) Loosse C et al (2016) *Cell Signal.* 100-109; (45) Schroetter A et al (2013) *J Cell Sci.*, 126(Pt 11):2480-2492; (46) Ubaidus et al (2009) *J Electron Microsc (Tokyo)* 58(6):381-392; (47) Zelenchuk LV et al (2015) *Bone* 23-33; (48) Yu L et al (2020) *Life Sci.* 242:117229; (49) May C et al (2020) *Methods in Mol Biol*, im Druck; (50) Barkovits K et al (2020) *MCP* 19(1):181-197; (51) Barkovits K et al (2020), *Methods in Mol Biol*, im Druck; (52) Maerkens A et al (2013) *J Proteomics* 90:14-27;