

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Abteilung für Kinderneurologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. R. F. Maier
des Fachbereichs Medizin der Philipps- Universität Marburg

Funktionelle und klinische Relevanz von Mutationen des Calcium- Sensing- Receptors

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin
der Philipps- Universität Marburg
vorgelegt von

Philipp Romero
Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps- Universität Marburg am:
05.11.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. S. Waldegger

1. Korreferent: Prof. Dr. A. Brehm

Abkürzungen

AA	Arachidonsäurederivat
ADH	Adiuretin
ADH	autosomal dominant hypocalcemia, Hypokalzämischer Hypoparathyreoidismus
AQP2	Aquaporin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSC1	Bartter- Syndrom Typ 1
BSC2	Bartter- Syndrom Typ 2
Ca ²⁺	Kalzium- Ion
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CASR	Calcium- Sensing- Receptor- Gen
CaSR	Calcium- Sensing- Receptor
cBS	klassisches Bartter-Syndrom, Bartter Type 3
Cl ⁻	Chlorid- Ion
cTAL	dicker aufsteigender Schenkel der Henle'schen Schleife
CT	Calcitonin
DAG	Diacylglycerol
DCT	distales Convolut , distaler Tubulus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECD	extrazelluläre Domäne
FHH	Familiäre benigne hypokalziurische Hyperkalziämie
FHHNC	Familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose
GPCR	G- Protein gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guanyl-bindendes Peptid
GoVNs	vomeronasale Rezeptoren
GS	Gitelman- Syndrom
H ⁺	Wasserstoff- Ion
ICD	intrazelluläre Domäne
IP3	Inositoltriphosphat
K ⁺	Kalium- Ion
Mg ²⁺	Magnesium- Ion
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Na ⁺	Natrium- Ion
NKCC2	K ⁺ -2Cl ⁻ -Transporter
NSHPT	Neonatal severe hyperparathyroidism, Neonataler Hyperparathyreoidismus
PCLN1	Paracelin1
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGE2	Prostaglandin E2
PiP2	Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLA2	Phospholipase A2
p. o.	per os
PT	proximaler Tubulus
PTH	Parathormon
rSK4	kalziumsensitiver Kaliumkanal
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism
TMD	transmembranäre Domäne
VRs	Pheromonrezeptoren
20-HETE	20-hydroxyeicosatetraenoic acid

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1. Einführung.....	7
1.2. CaSR	
1.2.1. Entdeckung.....	9
1.2.2. Gruppeneinteilung.....	10
1.2.3. Gen.....	10
1.2.4. Proteinstruktur.....	11
1.2.5. Signalübertragung.....	12
1.2.6. Funktion	14
1.2.6.1. Allgemein.....	14
1.2.6.2. Hormonelle Regulation des Calcium-Haushalts.....	15
1.2.6.3. Transportmechanismen in der Niere.....	16
1.2.6.3.1. Proximaler Tubulus.....	16
1.2.6.3.2. Henle-Schleife.....	18
1.2.6.3.3. Distaler Tubulus.....	19
1.2.6.3.4. Sammelrohr.....	20
1.3. Angeborene Defekte des CaSR	
1.3.1. Hypokalzämischer Hypoparathyroidismus.....	21
1.3.1.1. Symptome.....	21
1.3.1.2. Pathogenese.....	21
1.3.2. Familiäre benigne hypokalziurische Hyperkalziämie.....	22
1.3.2.1. Symptome.....	22
1.3.2.2. Pathogenese.....	22
1.3.3. Neonataler Hyperparathyroidismus.....	23
1.3.3.1. Symptome.....	23
1.3.3.2. Pathogenese.....	23
1.3.4. Familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose.....	24
1.3.4.1. Symptome.....	24
1.3.4.2. Pathogenese.....	25
1.3.5. Bartter Syndrom.....	26

2 Material und Methoden

2.1. Gesamtübersicht über die verwendete Methodik.....	29
2.2. Allgemeine Materialien	
2.2.1. Geräte und Hilfsmittel.....	29
2.2.2. Chemikalien und Reagenzien.....	30
2.3. DNA-Gewinnung	
2.3.1. Material.....	31
2.3.1.1. Geräte.....	31
2.3.1.2. Chemikalien.....	31
2.3.2. DNA-Isolierung aus Vollblut.....	32
2.4. Gelelektrophorese.....	33
2.5. PCR	
2.5.1. Beschreibung.....	33
2.5.2. Material.....	34
2.5.2.1. Geräte.....	34
2.5.2.2. Chemikalien.....	34
2.5.3. Durchführung.....	34
2.6. SSCP	
2.6.1. Beschreibung.....	36
2.6.2. Material.....	37
2.6.2.1. Geräte.....	37
2.6.2.2. Chemikalien.....	37
2.6.3. Durchführung.....	38
2.6.4. Auswertung.....	38
2.7. DNA- Sequenzierung.....	39
2.8. Ortsspezifische Mutagenese.....	40
2.9. Zwei- Elektroden- Voltage- Clamp- Methode.....	42
2.9.1. Einleitung.....	42
2.9.2. Coexpression von SK4 und CaSR.....	43
2.9.3. Durchführung.....	44
2.9.4. Statistik.....	45

3 Ergebnisse	
3.1. Mutationsanalyse.....	46
3.1.1. Patienten.....	46
3.1.2. Untersuchung des CaSR-Gens (CASR)	47
3.1.2.1. Einführung.....	47
3.1.2.2. Ergebnisse der Mutationsanalyse.....	47
3.2. Untersuchung der Kausalpathogenese aktivierender und inaktivierender Mutationen des CaSR.....	51
3.2.1. Einführung.....	51
3.2.2. Auswahl der zu untersuchenden Mutationen im CaSR.....	52
3.2.3. Ergebnisse der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Methode.....	53
4 Diskussion	
4.1. Einführung.....	60
4.2. Mutationsanalyse.....	60
4.3. Untersuchung der Kausalpathogenese aktivierender und inaktivierender Mutationen des CaSR	
4.3.1. CaSR E127K.....	62
4.3.2. CaSR E127A.....	63
4.3.3. CaSR L125P.....	65
4.3.4. CaSR T138M.....	70
4.4. Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Methode.....	72
5 Zusammenfassung	74
6 Literaturverzeichnis	78

1 Einleitung

1.1. Einführung

Fast alle physiologischen Prozesse im menschlichen Körper sind direkt oder indirekt auf intra - bzw. extrazelluläres Ca^{2+} angewiesen [Brown 1991]. Ca^{2+} -Ionen agieren als enzymatische Cofaktoren, intrazelluläre 'second messenger' und Koordinatoren zellulärer Funktionen wie Muskelkontraktion, Hormonsekretion, Proliferation, Motilität, sowie zellulärer Differenzierung [Brown et al. 1993]. Verschiedene Studien haben nun eindeutig bewiesen, dass Ca^{2+} neben seiner Funktion als intrazellulärer second messenger auch eine hormonähnliche Wirkung als extrazellulärer „first messenger“ aufweist [Brown 1991]. In der Tat gelang die Identifizierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors, der von Ca^{2+} als Ligand aktiviert wird und daher als Calcium-Sensing- Receptor (CaSR) bezeichnet wird. Niere, Nebenschilddrüse und Darm registrieren mit Hilfe des CaSR kleinste Schwankungen des extrazellulären Ca^{2+} und reagieren mit einer für die Calciumhomöostase entscheidenden regulativen Antwort [Brown et al. 1993]. Der CaSR ist damit zentrales Element in der Regulation der Calciumhomöostase und steuert indirekt die calciotropen Hormone Parathormon, Calcitonin und Calcitriol. Störungen in der Funktion des CaSR durch genetische Mutationen führen in Abhängigkeit von der Auswirkung der Mutation auf die Aktivität des CaSR zu unterschiedlichen Krankheitsbildern. Aktivierende Mutationen führen zum Hypokalzämischen Hypoparathyreoidismus [Pearce et al. 1996], während inaktivierende Mutationen die Familiäre benigne hypokalziurische Hyperkalzämie [Hendy et al. 2000] und den Neonatalen Hyperparathyreoidismus [Pollak et al. 1994b] hervorrufen. Darüber hinaus wurden Zusammenhänge und phänotypische Ähnlichkeiten zwischen den schon bekannten hereditären Tubulopathien wie dem Bartter- Syndrom oder der Familiären Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose (FHHN) und den CaSR-assoziierten Erkrankungen beobachtet und beschrieben [Vargas-Poussou et al. 2002], [Watanabe et al. 2002].

Die vorliegende Arbeit setzt sich mit angeborenen Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Verlusterkrankungen der Niere auseinander. In einem ersten Schritt wurden molekulargenetische Untersuchungen einer Patientengruppe durchgeführt, die alle unter renalen $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Verlusten litten. Die Patienten wurden aus einem Patientenkollektiv übernommen, bei denen sich der initiale Verdacht der Familiären Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose (FHHNC) nicht bestätigt hatte. Zum Ausschluss der FHHNC wurde bei dem genannten Patientenkollektiv das krankheitsauslösende Gen PCLN1 sequenziert. PCLN1 kodiert für das Tight-junction-Protein Paracellin-1 [Weber et al. 2001]. Die Ursache der $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Verlustsymptomatik der Patienten war also unklar. In der Literatur beschriebene Zusammenhänge zwischen Mutationen im CaSR- Gen und $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Verlustsymptomen [Brown et al. 1995] führten zu der Vermutung, dass die Ursache der Symptome in einer Dysfunktion des CaSR infolge einer aktivierenden Mutation liegen könnte. Ziel der Untersuchung war es also, eine aktivierende Mutation im CaSR- Gen dieser Patienten zu finden oder auszuschließen.

Von besonderem Interesse schien hierbei die Frage, ob und wie aktivierende Mutationen die $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ - Homöostase beeinflussen. So befasst sich die Arbeit im zweiten Abschnitt, nach Anwendung von Mutagenese und der Messverfahren durch die Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp Methodik, mit der Beweisführung genotypischer Ursachen für die phänotypischen Symptome der CaSR assoziierten Erkrankungen. Hierbei wurden die Folgen sowohl aktivierender als auch inaktivierender Mutationen im CaSR- Gen mit denen des Wildtyps verglichen.

1.2. CASR

1.2.1. Entdeckung

Die calcitropen Hormone Parathormon (PTH), Calcitonin (CT) und 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ spielen eine Schlüsselrolle in der Regulation der Ca²⁺/Mg²⁺- Homöostase.

Der Zusammenhang zwischen extrazellulärem Ca²⁺ und der regulativen Hormonantwort erbrachte Brown die wegweisenden Hinweise zur Entdeckung des CaSR. Der entscheidende Regulationsmechanismus war der 1991 schon bekannte Einfluss der Serumcalciumkonzentration auf die PTH- Inkretion, nachgewiesen an Zellen der Nebenschilddrüse von Rindern: Niedrige Ca²⁺-Serum-Konzentrationen stimulieren, hohe Konzentrationen hemmen die PTH- Inkretion. Diese Beziehung stellte Brown in einer umgekehrt sigmoidalen Kurve dar (Abb. 1) [Brown et al. 1991].

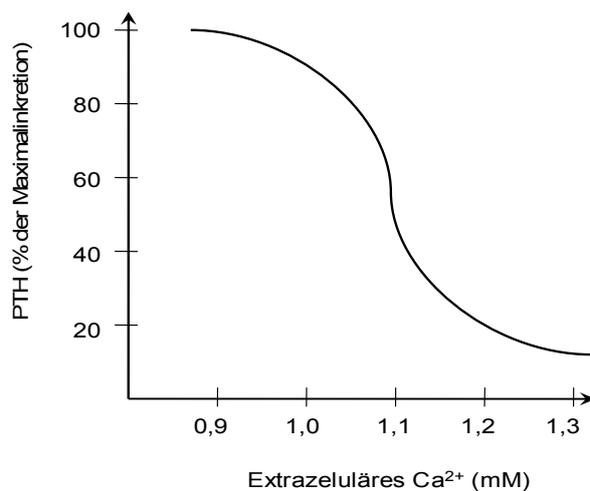


Abb. 1: Zusammenhang zwischen Ca²⁺-Serum-Konzentrationen und PTH- Inkretion. Ein Ansteigen der freien Ca²⁺-Ionen im Serum führt zur Reduktion der PTH- Konzentration, ein Absinken zur Stimulation.

Der Zusammenhang zwischen Ca²⁺-Serum-Konzentrationen und PTH- Inkretion könnte durch das Vorhandensein einer Interaktion zwischen Ca²⁺ und einem Ca²⁺-Ionen messenden Rezeptor erklärt werden [Brown et al. 1991]. Mit dieser Hypothese identifizierte EM Brown et al. 1993 einen extrazelluläres Calcium messenden Rezeptor (Calcium sensing Receptor, CaSR) aus Rinderzellen durch Klonieren und Expression in *Xenopus laevis* Oozyten. Bald darauf wurde der CaSR auch in Zellen diverser humaner Organe sowie bei verschiedenen Säugetieren identifiziert.

1.2.2. Gruppeneinteilung

Der CaSR ist ein G- Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR) und wird der Klassifizierung nach der Gruppe C der GPCR's zugeteilt. Die Gruppe C unterteilt sich ihrerseits in drei Subgruppen: In der Gruppe I werden die metabotropen Glutamaterzeptoren (mGluRs 1-8) zusammengefasst. In der Gruppe II befinden sich neben dem CaSR die Pheromonrezeptoren (VRs) oder auch vomeronasale Rezeptoren (GoVNs). Die GABA_B Rezeptoren bilden letztendlich die Gruppe III. Die Klassifizierung basiert auf der Gemeinsamkeit der oben genannten Rezeptoren. Mehr als 20 % der Aminosäuren (AS) sind in der Aminosäuresequenz der Rezeptoren identisch. Darüber hinaus sind alle Rezeptoren durch sieben transmembranäre Schleifen charakterisiert [Brown et al. 2001].

1.2.3. Gen

Das Gen des CaSR (CASR) befindet sich auf dem langen Arm des Chromosom 3 an der Position 3q13.3-q21 [Janicic et al. 1995]. Sechs der sieben Exone codieren den CASR [Chattopadhyay N et al. 2000]. Die Exone II- VI und Anfang von VII codieren die extrazelluläre Domäne (ECD). Das Exon VII codiert sowohl die transmembranäre Domäne (TMD), bestehend aus sieben transmembranären Schleifen (TM1- TM7), drei extrazellulären Schlingen (ECL1-3) und drei intrazellulären Schlingen (ICL1-3), als auch die gesamte intrazelluläre Domäne (ICD) inklusive des C-terminalen Schwanzes [Chattopadhyay N et al. 2000].

1.2.4. Proteinstruktur

Der CaSR setzt sich aus 1078 AS zusammen und besitzt drei Hauptdomänen bestehend aus:

1. Einer großen extrazellulären Domäne (ECD), welche den N-Terminus bildet und für die Ligandenbindung verantwortlich ist. Die hydrophile ECD besteht aus 612 AS.
2. Einer hydrophobischen 250 AS großen transmembranären Domäne (TMD) mit sieben transmembranären Schleifen.
3. Einer zytosolischen 217 AS langen intrazellulären Domäne (ICD), die den Carboxy-Terminus bildet.
4. Der humane CaSR ist mehrfach N-glykosyliert, wobei die Kohlenhydrat-Seitenketten wohl für die Expression an der Zelloberfläche, aber nicht für die Funktion von Bedeutung zu sein scheinen [Chattopadhyay N et al. 2000].

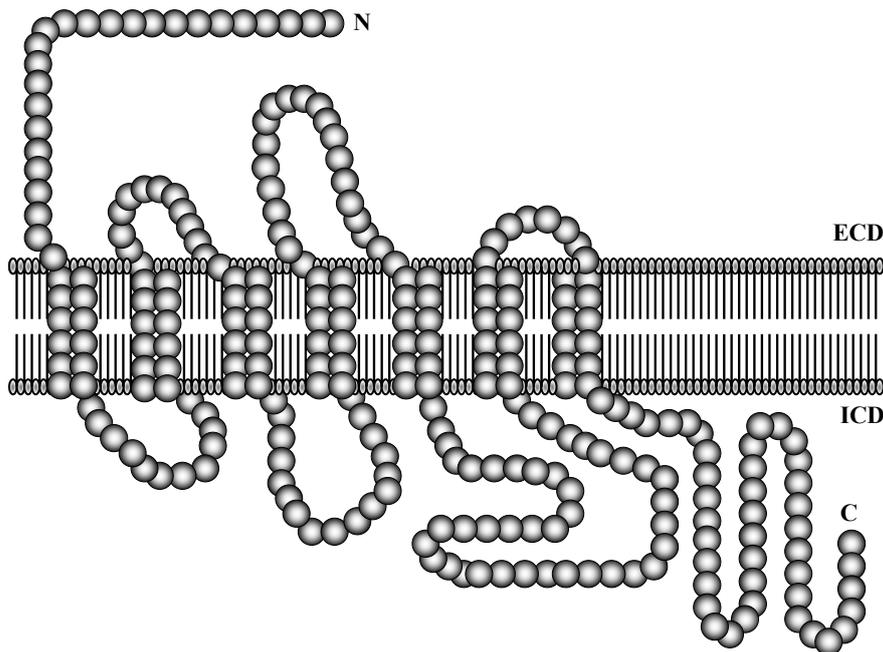


Abb. 2: Schematische Darstellung des CaSR mit dem extrazellulär gelegenen N-Terminus (N), dem intrazellulär gelegenen Carboxy-Terminus (C) und den sieben transmembranären Schleifen.

1.2.5. Signalübertragung

Durch die Bindung eines Liganden an die ECD [Brown et al. 2001] oder TMD [Huang 2009] kommt es über einen allosterischen Mechanismus zur Aktivierung des CaSR. Die genauen Bindungsstellen sind noch nicht endgültig bekannt und Gegenstand der aktuellen Forschung [Huang 2009]. Zu den CaSR stimulierenden Agonisten zählen neben den für diese Arbeit zu fokussierenden Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen auch Liganden wie Spermine, Amyloid-Beta-Peptide, trivalente Kationen, Neomycin und bestimmte AS [Jensen 2007]. Daneben führen eine Erhöhung der extrazellulären totalen Ionenkonzentration [Brown et al. 2001] oder des extrazellulären pHs [Doroszewicz 2005] zu einer Senkung der Rezeptorsensitivität des CaSR. Es handelt sich beim CaSR folglich um einen multimodalen Rezeptor, dessen Teilaspekt der Ca^{2+} - bzw. Mg^{2+} -Sensitivität Inhalt der hier durchgeführten Untersuchungen ist [Chattopadhyay N et al. 2000].

Durch die Aktivierung des CaSR via CaSR-Agonisten (first messenger) werden intrazelluläre second messenger-Systeme aktiviert:

G-Protein (= Guanyl-bindendes Peptid) vermittelt kommt es zu Aktivierung der Phospholipasen C, A₂ und D. Die aktivierte Phospholipase C katalysiert die Bildung von Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) aus dem membranständigen Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat (PIP_2). IP_3 ist in der Lage, Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern (z.B. glattes endoplasmatisches Retikulum) freizusetzen [Brown et al. 2001]. DAG kann seinerseits sowohl die Proteinkinase C (PKC) aktivieren, als auch zum Arachidonsäurederivat (AA) werden.

Die PKC reduziert gegenregulatorisch die intrazelluläre Steigerung von IP_3 und damit auch die Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} . In der ICD des CaSR befinden sich fünf PKC- Phosphorylierungsstellen über welche die PKC möglicherweise durch phosphorylierende Modulation der ICD des CaSR wirkt [Brown et al. 2001]. Bekannt ist, dass es bei Deletion von mehr als zwei dieser PKC- Phosphorylierungsstellen zu einem reduzierten PKC- Effekt, also einer verstärkten Freisetzung intrazellulären Calciums kommt [Brown et al. 2001].

Neben der Aktivierung der Phospholipasen C hemmt der CaSR ebenfalls G-Protein vermittelt die Bildung des unter Einwirkung der Adenylatcyklase aus ATP gebildete cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP). cAMP spielt als second messenger eine zentrale Rolle in der Vermittlung intrazellulärer Wirkungen glandulärer Hormone wie z.B. dem Parathormon (PTH). Bei der CaSR-vermittelten Hemmung der Akkumulation von cAMP ist noch nicht endgültig geklärt, ob der Rezeptor entweder über eine inhibitorische Isoform des G-Proteins (G_i) die Adenylatcyklase direkt hemmt oder der intrazelluläre Anstieg von cAMP auf einem indirekten Weg verhindert wird [Brown et al. 2001].

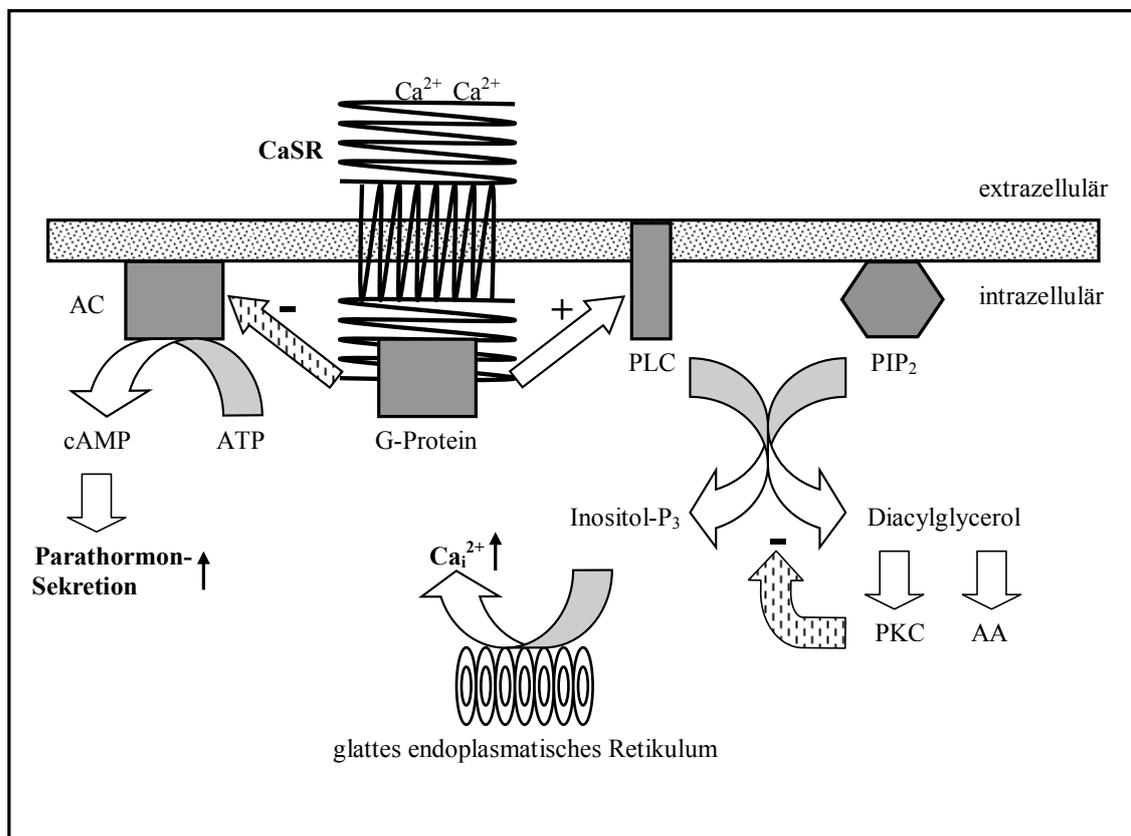


Abb. 3: Schematische Darstellung der intrazellulären Kaskadewege nach Aktivierung des CaSR durch extrazelluläres Ca^{2+} .

1.2.6. Funktion

1.2.6.1. Allgemein

Wie eingangs schon erwähnt ist der CaSR in verschiedenen Zellen diverser Organe exprimiert. Hauptexpressionsorte bilden die für die $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Homöostase relevanten Organen wie Niere, Mukosazellen des Darms, Epithelkörperchen der Nebenschilddrüse und C- Zellen der Schilddrüse [Brown et al. 2001]. Darüber hinaus kennt man heute eine Vielzahl von zellulären Prozessen, an denen der CaSR regulativ beteiligt ist, dazu zählen:

Die Proliferation von Fibroblasten, die hormonelle Sekretion z.B. von ACTH oder GH, zelluläre Proliferation, Zell-Differenzierung und Apoptose, Genexpression, sowie die exokrine Sekretion z.B. von Bicarbonat-Ionen in Mukosazellen des Pankreas und die Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanälen z.B. im Epithel der Linse, der Neuronen, der Oligodendrozyten oder Microgliazellen im ZNS [Brown et al. 2001].

Im Gastrointestinaltrakt ist der CaSR an wichtigen physiologischen Prozessen beteiligt: Im Magen ist er in den Parietalzellen und G- Zellen exprimiert und steigert nach Aktivierung durch Stimulation der $\text{H}^+ -\text{K}^+$ - ATPase (HKA) und Gastrinfreisetzung die Magensäureproduktion. Im Kolon vermindert der in der Mukosa nachweisbare Rezeptor nach Aktivierung die Flüssigkeitssekretion. Kirchhoff vermutet durch die Expression des CaSR im Plexus myentericus und submucosus im enterischen Nervensystem, dass der CaSR eine zentrale Rolle in der Koordination enterischer Motilität spielt [Kirchhoff 2006]. Im Bezug auf den Einfluss des CaSR auf Zell- Differenzierung konnten Chakrabarty S et al. eine verminderte Expression des CaSR im Bereich von Kolonkarzinomen im Vergleich zu gesundem Kolongewebe nachweisen. Je weniger ein Kolonkarzinom differenziert war, desto geringer war die Expressionsrate des CaSR im betroffenen Gewebe [Chakrabarty 2005]. Außerdem ist der CaSR auch in hämatopoetischen Zellen wie Monozyten [Chattopadhyay 2000], B- Lymphozyten, Erythrozyten, Makrophagen vorhanden, wobei seine Funktion hier noch Bestandteil aktueller Forschung ist [Hammond 2007].

Die große Verbreitung des CaSR inklusive seiner regulativen Funktion weist wiederum darauf hin, dass sich der CaSR nicht auf eine die $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Homöostase regulierenden Einheit reduzieren lässt.

1.2.6.2. Hormonelle Regulation des Calcium-Haushaltes

Der Calcium-Haushalt wird im Wesentlichen durch drei Hormone reguliert:

Parathormon (PTH), Calcitonin (CT) und 1,25-Dihydroxycholecalciferol (1,25(OH)₂-Vitamin D₃). Das von der Epithelkörperchen der Nebenschilddrüse produzierte **Parathormon** stimuliert indirekt über Osteoblasten die Osteoklastenaktivität im Knochen und bewirkt durch Abbau des Knochens eine Freisetzung von Calcium. Gleichzeitig wird die Aufnahme von Calcium aus dem Darm in Anwesenheit von 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ und die Resorption von Calcium aus dem Urin gefördert, so dass eine erhöhte PTH-Aktivität zu einer Steigerung des Calcium-Serumspiegels führt.

Der CaSR beeinflusst regulativ die PTH-Sekretion in der Parathyroidea und die PTH-Wirkung in den tubulären Zellen der Niere. Hohe Calcium-Serumspiegel und **1,25(OH)₂-Vitamin D₃** hemmen die PTH-Sekretion in der Nebenschilddrüse. Studien mit Knockout-Mäusen, in denen der CaSR in den Epithelkörperchen fehlte, zeigten, dass die Nebenschilddrüse 10-20% weniger sensibel gegenüber extrazellulärem Calcium wurde. Die Folge waren erhöhte PTH-Serumwerte und schwere Hypercalziämien, die mit Calcium-Serumwerten von mehr als 50% über dem Normalwert einhergingen [Brown et al. 2001].

Der genaue regulative Weg der PTH-Sekretion in den Epithelkörperchen durch CaSR ist noch ungeklärt. Eine Aktivierung der Phospholipase C und die Inhibition von cAMP via CaSR-Aktivierung in den Epithelkörperchen scheinen dabei aber von Bedeutung zu sein [Chattopadhyay N et al. 2000]. Neben der PTH-Freisetzung wird auch die PTH-Synthese CaSR-abhängig reguliert. Verschiedene Studien zeigten, dass sich mit steigender Calcium-Serumkonzentration die mRNA des Parathormons in den Nebenschilddrüsenzellen reduziert [Brown et al. 2001].

Ferner scheint der CaSR auf die Proliferation der Nebenschilddrüsenzellen zu wirken, wobei hier direkte und indirekte Effekte postuliert werden. Der indirekte Effekt kommt bei einer durch das Fehlen (Knockout des CaSR z.B. in Mäusen) des CaSR verursachten Hypercalziämie zustande. Erhöhtes Serum-Calcium hemmt die 1-alpha-Hydroxylase in den Nierentubuli. 1-alpha-Hydroxylase wandelt 25(OH)-Vitamin D₃ in das wirksame 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ um. 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ hemmt seinerseits sowohl die PTH-Sekretion als auch die Proliferation der Nebenschilddrüsenzellen. Umgekehrt fördert die Abwesenheit von 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ die Proliferation der Nebenschilddrüsenzellen [Brown et al. 2001].

Calcitonin ist ein von den C-Zellen der Schilddrüse gebildetes Polypeptid und ein direkter Gegenspieler des in den Epithelkörperchen entstammenden Parathormons.

Anders als bei den Epithelkörperchen wird die Sekretion von Calcitonin durch steigendes Serum-Calcium gefördert. Der CaSR misst auch hier die Konzentration extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen und setzt nach Aktivierung eine second messenger-Kaskade in Gang: Die aktivierte Phospholipase C spaltet aus dem Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat (PIP_2) Diacylglycerol (DAG). DAG stimuliert seinerseits einen nichtselektiven Kationenkanal. Durch diesen strömt nun Natrium und Calcium ins Zellinnere, was zu einer Depolarisation der Zelle führt. Durch die Depolarisation öffnet sich ein spannungsabhängiger Calciumkanal (L-Type) und die daraufhin folgende Konzentrationssteigerung intrazellulären Calciums stimuliert die CT-Sekretion [Brown et al. 2001].

1.2.6.3. Transportmechanismen in der Niere

1.2.6.3.1. Proximaler Tubulus

Im proximalen Tubulus (PT) werden ca. 60% des primär gefilterten Calciums rückresorbiert.

In den ersten 25% des PT entsteht durch die Rückgewinnung der Na^+ -Ionen vom Lumen ins Interstitium zunächst ein lumen negatives transepitheliales Potential von etwa -2mV. Die Rückresorption von Na^+ geschieht primär aktiv über die an der basolateralen Seite liegende Na^+ - K^+ -ATPase und sekundär aktiv über einen Na^+ - H^+ -Antiporter und eine Vielzahl von Na^+ -Substrat-Cotransporter. Das Wasser folgt hier den Soluten, vorwiegend parazellulär osmotisch. Ca^{2+} und Mg^{2+} gelangen durch den dabei entstehenden „solvent Drag“ über die parazellulären Shuntwege vom Lumen ins Interstitium. Durch die Wasserresorption steigt in den folgenden 75% des PT die luminale Cl^- -Konzentration auf bis zu 30% im Vergleich zum Plasma. Diesem Konzentrationsgradienten folgen die Chloridionen parazellulär und es entsteht zusammen mit der HCO_3^- -Resorption nun ein lumen positives transepitheliales Potential von etwa +2mV. Diese Spannung fördert die parazelluläre Diffusion der Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} .

Der CaSR befindet sich im PT auf der dem Lumen zugewandten apicalen Seite. Der CaSR greift im PT an mindestens drei Stellen in die Regulation der $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Homöostase ein:

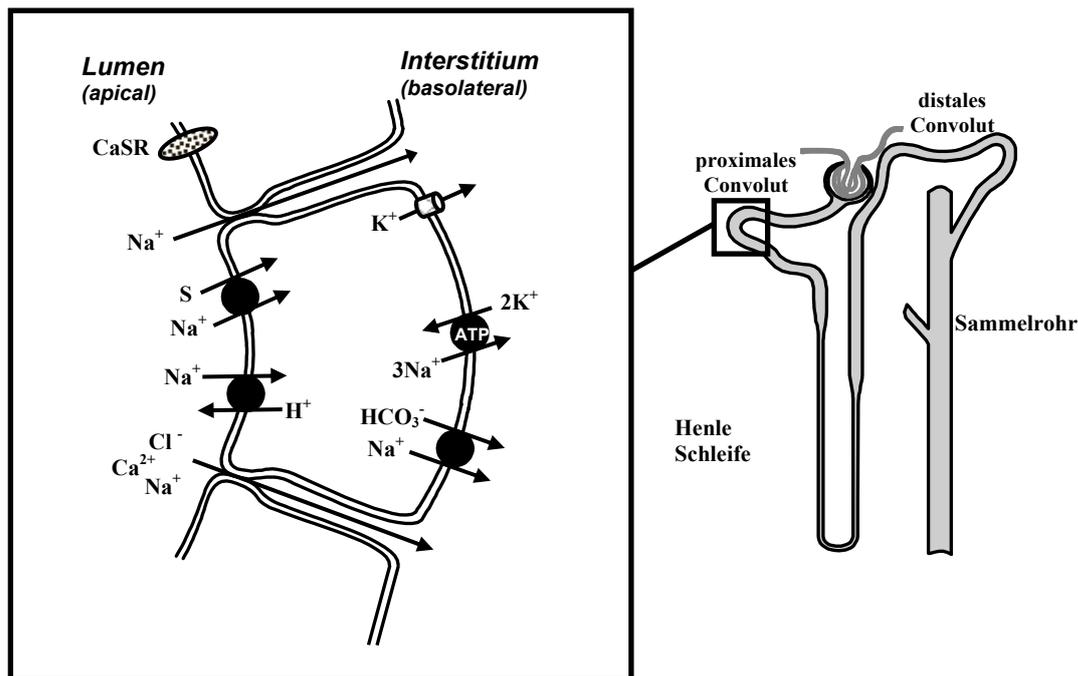


Abb. 4: Schematische Darstellung der Transportvorgänge im proximalen Tubulus.

- 1.) PTH wirkt über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor durch Erhöhung der cAMP-Konzentration inhibitorisch auf die Phosphatresorption über einen der apicalen Na⁺-Substrat-Cotransporter (NaPi-2-Cotransporter). Es ist sehr wahrscheinlich, dass der durch erhöhtes extrazelluläres Ca²⁺ (hier im Harn) aktivierte CaSR, G_i-Protein vermittelt den Anstieg von cAMP vermindert und damit die Wirkung von PTH antagonisiert [Ward et al. 2002].
- 2.) Im PT induzieren hohe PTH- Serumkonzentrationen die Expression der für die 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ -Produktion verantwortlichen 1-alpha-Hydroxylase. Ratten, bei denen die Nebenschilddrüsen entfernt worden waren, unterlagen im Bezug auf die 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ -Produktion immer noch einem regulativen Mechanismus, der im Zusammenhang mit der Ca²⁺-Serumkonzentration stand. Erhöhtes Serum-Calcium hemmt, wahrscheinlich über den CaSR vermittelt, direkt die 1-alpha-Hydroxylase in den Nierentubuli [Ward et al. 2002].
- 3.) Der CaSR spielt außerdem eine entscheidende Rolle in der Regulation der Volumenresorption des PT. CaSR-Agonisten hemmen signifikant die Aktivität der Na⁺-K⁺-ATPase und vermindern dadurch das lumenegative transepitheliale Potential und damit die treibende Kraft der Volumenresorption [Ward et al. 2002].

1.2.6.3.2. Henle-Schleife

Im dicken aufsteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife (cTAL) werden 20-25% des gefilterten Calciums und ca. 60% des Magnesiums rückresorbiert. Die treibende Kraft für die Resorption im cTAL bildet im Gegensatz zum PT ein lumenpositives transepitheliales Potential, welches durch die Resorption von Na^+ , K^+ und Cl^- aus dem Lumen über den $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ -Transporter (NKCC_2), die Rückdiffusion von K^+ -Ionen ins Lumen und die Aufnahme von Cl^- -Ionen ins Interstitium über einen basolateral gelegenen Chloridkanal zustande kommt. Ca^{2+} und Mg^{2+} folgen wie Na^+ dem transepithelialen Potential über parazelluläre Shunts vom Lumen ins Interstitium.

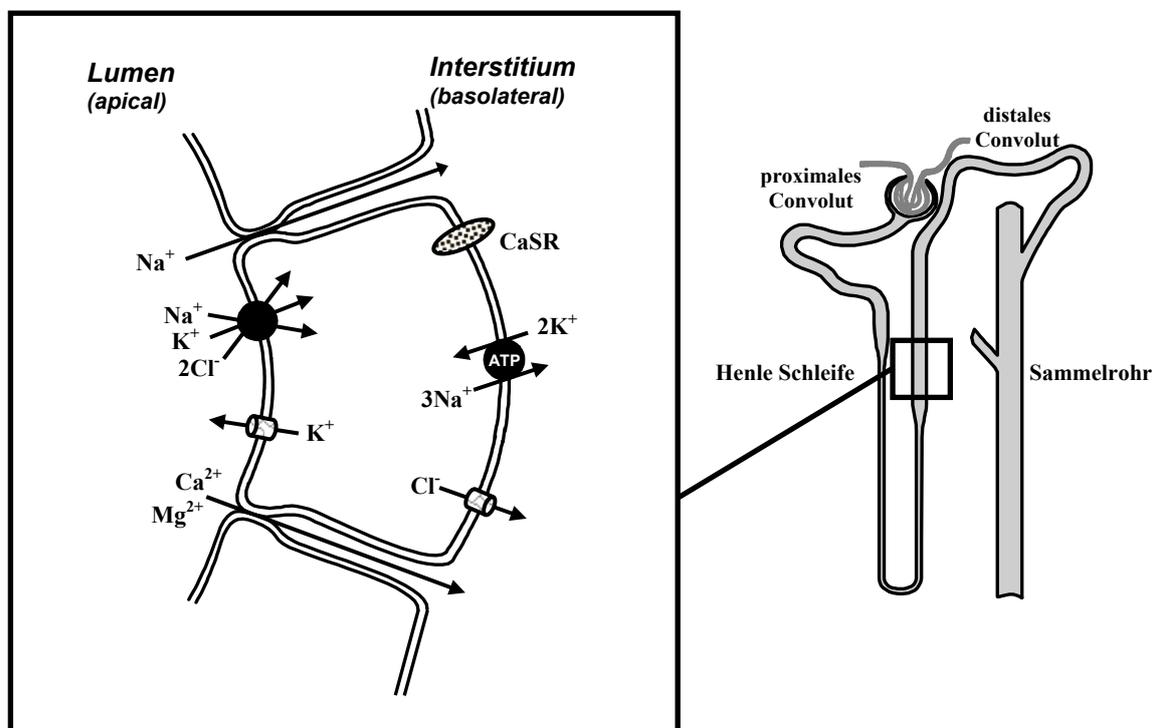


Abb. 5: Schematische Darstellung der Transportvorgänge im cTAL.

Der CaSR ist im cTAL auf der basolateralen Seite exprimiert. Die Hormone Adiuoretin (ADH), PTH, Calcitonin und Glucagon steigern im cTAL die NaCl -Resorption und damit auch die Rückgewinnung von Ca^{2+} und Mg^{2+} . Die Hormonwirkung wird auch hier über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, welche cAMP generieren, vermittelt.

Steigende Serum-Calcium-Konzentrationen verhindern über die bekannte CaSR vermittelte cAMP-Inhibition den NaCl retinierenden Effekt dieser Hormone [Ward et al. 2002]. Des Weiteren vermutet man einen direkten Regulationsmechanismus zwischen dem von CaSR -Agonisten aktivierten CaSR und dem NKCC_2 sowie dem apicalen Kaliumkanal.

Vermutlich erhöht der aktivierte CaSR eine PLA₂ vermittelte Arachidonsäureproduktion. Katalysiert durch Cytochrom P₄₅₀ könnte ein entstehendes Arachidonsäurederivat wie 20-HETE (20-hydroxyeicosatetraenoic acid) inhibitorisch sowohl auf den NKCC2 als auch auf den Kaliumkanal wirken [Ward et al. 2002].

1.2.6.3.3. Distaler Tubulus

Im distalen Convolut (DCT) werden ungefähr 10% des gefilterten Calciums und Magnesiums rückresorbiert. Die Calciumaufnahme in die Zelle geschieht im DCT aktiv über einen apicalen Ca²⁺-Kanal (ECaC) auch gegen den elektrischen Gradienten und unabhängig von der Natriumresorption. Der Transport durch die Zelle geschieht mit Unterstützung von Proteinen wie dem Calbinding-D_{28K}-Protein. Ca²⁺ gelangt basolateral ins Interstitium, sekundär aktiv über einen Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (NCX) und primär aktiv über eine plasmamembranständige Ca²⁺-ATPase (PMCA) [Ward et al. 2002].

Im DCT ist der CaSR sowohl apical als auch basolateral und intrazellulär lokalisiert.

Es benötigt weitere Studien, um die genauen Zusammenhänge der regulativen Funktion des CaSR erkennen zu können, nicht desto trotz erhärten sich die Anzeichen, dass extrazelluläres Ca²⁺ mit Hilfe des CaSR auch im DCT die Wirkung der calcitropen Hormone vermindern kann und durch Modulation des Ca²⁺-Transporters sowie Hemmung der PMCA direkt auf die Resorption von Ca²⁺ wirkt [Ward et al. 2002].

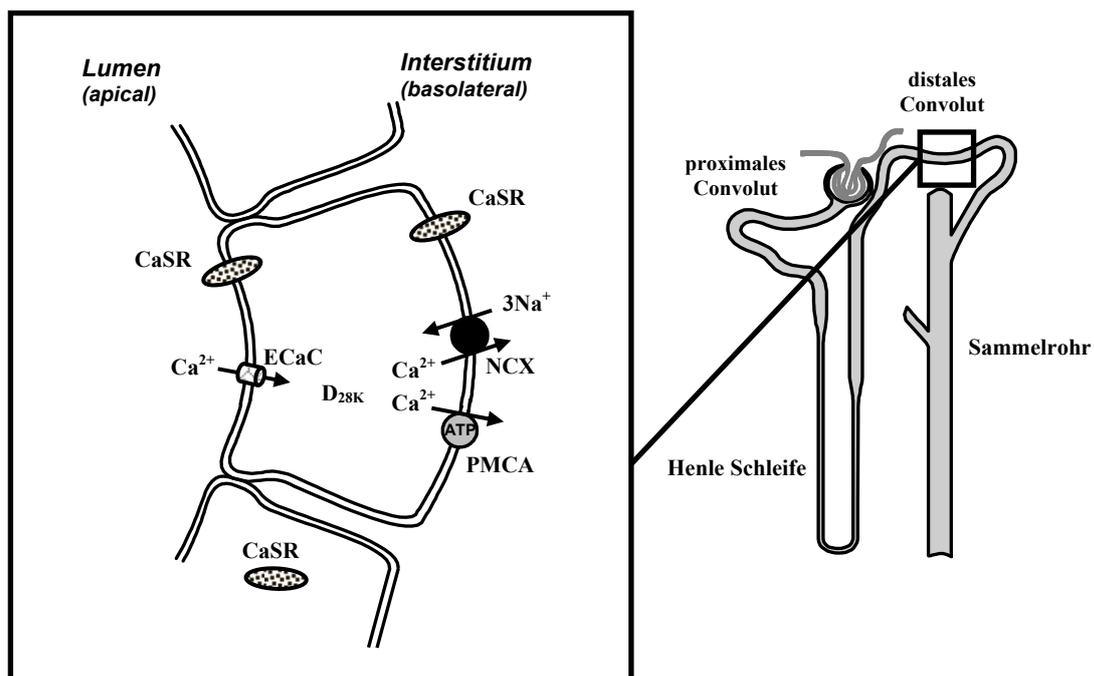


Abb. 6: Schematische Darstellung der Transportvorgänge im cTAL.

1.2.6.3.4. Sammelrohr

Die wichtigste Aufgabe der Sammelrohre ist die Harnkonzentrierung durch Resorption von Wasser. Da die Sammelrohre zur Papillenspitze führen, wo das Interstitium hyperten ist, baut sich zwischen dem Harn im Sammelrohr und dem Interstitium ein osmotischer Gradient auf, der Wasser aus dem Lumen des Sammelrohrs in das hyperosmolare Interstitium zieht. Der entscheidende Faktor in der Regulation der Wasserausscheidung ist das ADH, das die Durchlässigkeit der Sammelrohre für Wasser durch Induktion des Einbaus der Aquaporine AQP2 steuert. Der in den Sammelrohren apical und basolateral liegende CaSR hemmt mit steigender luminaler und interstitieller Ca^{2+} -Konzentration die Wirkung von ADH. Isolierte Nierenzellen von Ratten (IMCD's) wurden steigenden Konzentrationen von Ca^{2+} an der apicalen Membran ausgesetzt, was zu einer ungefähr 30 %igen Reduktion der ADH vermittelten Wasserpermeabilitätssteigerung führte [Ward et al. 2002].

1.3. Angeborene Defekte des CaSR

1.3.1. Hypokalzämischer Hypoparathyreoidismus

1.3.1.1. Symptome

Der Hypokalzämische Hypoparathyreoidismus ist charakterisiert durch eine Hypokalzämie bei gleichzeitiger Hyperkalziurie und inadäquat niedrigen Serum PTH-Konzentrationen. In etwa der Hälfte der Fälle kommt es darüber hinaus zur Hypomagnesiämie [Pearce et al. 1996]. Diese ist häufig asymptomatisch und nur selten substituitionsbedürftig [Okazaki et al. 1999].

Die Hypokalziämie kann bei klinischer Symptomatik mit Vitamin D3 behandelt werden, aufgrund der gesteigerten Ca^{2+} - Ausscheidung ist jedoch auf die Entwicklung einer Nephrokalzinose sowie einer Nephrolithiasis zu achten [Lienhardt et al. 2001].

Die Erkrankung manifestiert sich im Kleinkindalter.

1.3.1.2. Pathogenese

Der Hypokalzämische Hypoparathyreoidismus geht mit autosomal dominant vererbten Mutationen im CaSR- Gen einher (autosomal dominant hypocalcemia, ADH).

Es handelt sich hierbei um aktivierende Mutationen. Aktivierende Mutationen führen zu einer Dysfunktion des Rezeptors im Sinne einer erhöhten Sensitivität. Das bedeutet im übertragenen Sinne, dass der CaSR trotz normalem Serum- Ca^{2+} - Spiegels eine Hypercalciämie signalisiert. Dies führt dann zu einer verminderten PTH- Sekretion und gesteigerten renalen Exkretion von Ca^{2+} und Mg^{2+} . Die Ausprägung der Erkrankung scheint nach verschiedenen Studien der letzten Jahre abhängig vom Genotyp zu sein. Diese sehr seltene Erkrankung besitzt eine geschätzte Inzidenz von 1:80 000.

1.3.2. Familiäre benigne hypokalziurische Hyperkalziämie

1.3.2.1. Symptome

Die Familiäre benigne hypokalziurische Hyperkalziämie (FHH) ist charakterisiert durch eine lebenslange, meist symptomlose, leichte Hyperkalziämie (gewöhnlich nicht mehr als 10% über dem Normwert), wobei die PTH- Werte im Serum im Referenzbereich, also inadäquat hoch, liegen.

Bei normaler Morphologie der Epithelkörperchen und normaler Knochenmasse liegen die Plasmawerte für Calcitonin und Calcitriol im normalen, selten im subnormalen Bereich [Law 1985], [Marx et al. 1981]. Beschrieben sind neben dem vermehrten Auftreten von Gallensteinen seltene Fälle von Pankreatitis und Chondrokalzinose [Doumith et al. 1980]. Eine weitere wichtige Charakteristik der FHH ist die ungewöhnlich hohe tubuläre Resorption in der Niere von Mg^{2+} und Ca^{2+} [Heath 1989]. Bei der Mehrheit der Patienten mit FHH liegt der Ca^{2+} /Kreatinin - Quotient bei weniger als 0.01, wobei er normalerweise bei Patienten mit einem primären Hyperparathyreoidismus oder anderen hyperkalzämischen Erkrankungen viel höher ist [Marx et al. 1981].

1.3.2.2. Pathogenese

Die Familiäre benigne hypokalziurische Hyperkalziämie wird autosomal dominant, mit annähernd 100% Penetranz aber variabler Ausprägung vererbt [Hendy et al. 2000].

Die FHH geht mit inaktivierenden Mutationen im CaSR- Gen einher. Die meisten inaktivierenden Mutationen sind einzelne heterozygote Punktmutationen, die zu einem Aminosäureaustausch in der extrazellulären Mg^{2+}/Ca^{2+} -bindenden sowie der intrazellulären signalübertragenden Domäne führen. Diese Domänen sind universell konservierte Regionen, die modifiziert zu einer Dysfunktion des Rezeptors im Sinne einer erniedrigten Sensitivität führen [Cetani et al. 2003]. Übertragen heißt dies, dass der mutierte CaSR trotz normwertigem Serum- Ca^{2+} eine Hypokalziämie registriert, oder anders gedacht, dass der mutierte CaSR trotz hohem Serum- Ca^{2+} -Spiegels keine Mg^{2+}/Ca^{2+} -Resorptionshemmung in der Niere induziert.

Die Inzidenz der FHH wird auf zumindest 1:78 000 geschätzt [Hinnie et al. 2001].

1.3.3. Neonataler Hyperparathyreoidismus

1.3.3.1. Symptome

Der Neonatale Hyperparathyreoidismus (Neonatal severe hyperparathyroidism, NSHPT) manifestiert sich schon in der Neugeborenenzeit und ist gekennzeichnet durch eine ausgeprägte Hyperkalziämie, Hypermagnesiämie, Epithelkörperchenhyperplasie, hohe PTH- Werte im Serum, Knochendemineralisation, Hypotonie und Ateminsuffizienz [Blair et al. 1991]. Ohne Intervention und Entfernung der Epithelkörperchen ist der Verlauf der Erkrankung in der Regel letal [Pollak et al. 1994b].

1.3.3.2. Pathogenese

Der Neonatale Hyperparathyreoidismus (Neonatal severe hyperparathyroidism, NSHPT) wird autosomal rezessiv vererbt.

Der NSHPT geht wie die FHH mit inaktivierenden Mutationen im CaSR- Gen einher.

Der Pathomechanismus unterscheidet sich im Prinzip nicht von dem der FHH, nur dass der Schweregrad der Erkrankung beim NSHPT wesentlich höher ist. Der Schweregrad der Erkrankung ist abhängig davon, ob nur ein Allel (FHH) oder beide Allele (NSHPT) betroffen sind, man spricht in diesem Fall auch von einem Gen-Dosis-Effekt [Konrad 2002]. Für die inaktivierenden Mutationen gibt es auch ein Knock- out- Modell der Maus, in dem das CaSR-Gen ausgeschaltet ist [Ho et al. 1995]. Die Knock- out Mäuse zeigen im heterozygoten Zustand einen der FHH und im homozygoten Zustand einen dem NSHPT vergleichbaren Phänotyp und unterstützen somit die Bedeutung des CaSR- Gens für die Pathogenese dieser Krankheitsformen [Konrad 2002].

Weitere genetische Analysen in Familien mit FHH und elterlicher Konsanguinität demonstrierten, dass der NSHPT die homozygote Form der FHH darstellt [Pollak et al. 1994b].

1.3.4. Familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose

Die Beschreibung der Familiären Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose (FHHNC) ist für die Arbeit von Bedeutung, da phänotypische Gemeinsamkeiten zwischen ihr und dem Hypokalzämischen Hypoparathyreoidismus (ADH) bestehen. Ein Patientenkollektiv mit typischer $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Verlustsymptomatik, bei welchem sich der Verdacht der FHHNC nicht bestätigte, führte zu der Vermutung, dass die Ursache der Symptome in einer Dysfunktion des CaSR, infolge einer aktivierenden Mutation liegen könnte.

1.3.4.1. Symptome

Von Michelis et al. wurde 1972 erstmalig eine Mg^{2+} -Verlusterkrankung beschrieben, die neben einer stark erhöhten renalen Mg^{2+} -Ausscheidung durch eine ausgeprägte Hyperkalziurie, eine Nephrokalzinose und eine progrediente Verschlechterung der Nierenfunktion gekennzeichnet ist (familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose, FHHNC) [Michelis et al. 1972]. Seitdem sind mehrere Einzelfallberichte und eine klinische Studie mit 25 betroffenen Familien publiziert worden, die in der Gesamtheit das klinische Bild dieser Tubulopathie charakterisieren und eine Abgrenzung gegenüber den zuvor beschriebenen Krankheitsformen ermöglichen [Benigno et al. 2000], [Praga et al. 1995], [Simon et al. 1999], [Weber et al. 2000], [Weber et al. 2001]. Die Inzidenz beläuft sich schätzungsweise auf 1: 50 000 bis 1: 100 000. Die FHHNC manifestiert sich typischerweise im frühen Kindesalter [Weber et al. 2001]. Häufige Manifestationssymptome sind rezidivierende Harnwegsinfektionen, Polyurie und Polydipsie, Isosthenurie und Nephrolithiasis. Ein Teil der Kinder fällt durch Gedeihstörungen, Erbrechen, Abdominalbeschwerden, Tetanien und zerebrale Krampfanfälle auf. Bei der diagnostischen Abklärung zeigen sich die charakteristischen Symptome Hypomagnesiämie ($< 0,65 \text{ mmol/l}$), Hypermagnesiurie, Hyperkalziurie und Nephrokalzinose und häufig eine beginnende Nierenfunktionseinschränkung. Fakultativ lassen sich erhöhte Serum-PTH-Spiegel (schon vor Beginn einer Nierenfunktionsverschlechterung), eine inkomplette distale tubuläre Acidose, eine Hypozitraturie und/oder eine Hyperurikämie nachweisen. Bei einem Teil der in der Literatur beschriebenen Patienten wird auf eine zusätzliche Augenbeteiligung hingewiesen, die das Auftreten von Iriskolobomen, horizontalen Nystagmen und ausgeprägten Myopien umfasst. Die Therapieansätze der FHHNC

beinhalten unter anderem die kontinuierliche Mg^{2+} - Substitution, in der Regel p. o., und die Behandlung der Patienten mit Thiaziden zur Reduktion der Hyperkalzurie, um die Progression der Nierenverkalkung aufzuhalten und die Steinbildung zu vermindern. Wichtig ist ferner die Prophylaxe und konsequente Behandlung von Harnwegsinfektionen. Trotz kontinuierlicher Mg^{2+} -Substitution persistiert die Hypomagnesiämie, da sich die renale Mg^{2+} -Ausscheidung während der Substitution erhöht und die Erfolge der Thiazidbehandlung sind variabel. Retrospektive Untersuchungen zeigen, dass sich die progrediente Nierenfunktionsverschlechterung durch diese Maßnahmen nicht wesentlich beeinflussen lässt. Etwa ein Drittel der retrospektiv erfassten Patienten war schon im Adoleszentenalter terminal niereninsuffizient [Weber et al 2001]. Die FHHNC unterscheidet sich aufgrund der progredienten Niereninsuffizienz deutlich von den anderen Mg^{2+} -Verlusterkrankungen und hat somit insgesamt eine wesentlich schlechtere Prognose [Konrad 2002].

1.3.4.2. Pathogenese

In experimentellen Perfusionstudien wurde versucht, den renalen Resorptionsdefekt von Mg^{2+} und Ca^{2+} bei der FHHNC zu lokalisieren. Nach den erzielten Ergebnissen wurde eine Störung der parazellulären Mg^{2+} -Rückresorption im dicken Teil der aufsteigenden Henle'schen Schleife (TAL) vermutet [Quamme GA 1997].

Die in den letzten Jahren durchgeführten genetischen Untersuchungen ermöglichten die Lokalisation des verantwortlichen Genortes auf Chromosom 3q27 und die Identifikation des krankheitsauslösenden Gens PCLN1 [Simon et al. 1999], [Weber et al. 2000]. PCLN1 kodiert für ein neues Tight-junction-Protein, Paracellin-1, welches im TAL exprimiert wird und dort im Proteinverband des Schlussleistennetzes an der Regulation der parazellulären Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Transportprozesse beteiligt ist. Mittlerweile bestätigten mehrere Arbeiten die Bedeutung von PCLN1-Mutationen für die Pathogenese der FHHNC [Blanchard et al. 2001], [Simon et al. 1999], [Weber et al. 2001]. In Familien deutscher und osteuropäischer Herkunft zeigt die PCLN1-Mutationsanalyse die Häufung einer bestimmten Mutation (Leu151Phe), welche vermutlich auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückzuführen ist („Foundereffekt“). Dies ermöglicht eine schnelle genetische Diagnostik der FHHNC bei einem Großteil der Patienten aus diesen Ländern, da nur ein einzelner kodierender Genabschnitt zur Diagnosesicherung analysiert werden muss. Die Untersuchung von Familienangehörigen der FHHNC-Patienten zeigte eine auffällige Häufung von

Nierensteinleiden in Kombination mit einer erhöhten renalen Ca^{2+} -Ausscheidung (in 12 von 23 Familien) [Weber et al. 2001]. Bei nahezu allen Patienten mit Nierensteinen ließen sich heterozygote PCLN1-Mutationen nachweisen, so dass man spekulieren kann, ob PCLN1-Mutationen, wenn sie nur ein Allel betreffen, an der Genese der familiären Hyperkalzurie und des familiären Nierensteinleidens beteiligt sein könnten. Zur Zeit sind verschiedene Studien damit befasst, diesen Zusammenhang zu klären.

1.3.5. Bartter Syndrom

In experimentellen Studien wird ein Zusammenhang zwischen aktivierenden Mutationen im CaSR und dem Bartter Syndrom vermutet [Vargas-Poussou et al. 2002], [Stechman 2008]. Vargas Poussou beschreibt den Fall eines ADH- Patienten mit einer aktivierenden Mutation im CaSR (CaSR L125P), der neben den für die ADH typischen Symptomen wie Hyperkalziurie, Hypokalziämie und Hypomagnesiämie auch Bartter-ähnliche Symptome wie Hypokaliämie mit metabolischer Alkalose und Hyperreninismus aufwies. Im Zusammenhang der kausalen Pathogenität des mutierten CaSR, wie sie im zweiten Teil dieser Arbeit diskutiert wird, war dieser Fall für uns von großem Interesse.

Das Bartter Syndrom steht aus historischen Gründen als Oberbegriff für ein Spektrum hereditärer Tubulopathien, die sich in drei Hauptgruppen aufteilen lassen:

Das Antenatale Bartter-Syndrome wird in sich noch mal in Bartter Typ 1 (BS Typ 1), Bartter Typ 2 (BS Typ 2) und Bartter Typ 4 (BS Typ 4) unterschieden. Das klassische Bartter-Syndrom (cBS, Bartter Typ 3) und die Hauptgruppen des Gitelman- Syndroms [Konrad et al 2000].

Antenatales Barttersyndrom

Das Antenatale Barttersyndrom wird autosomal rezessiv vererbt. Ursächlich für das BS Typ 1 ist ein Defekt des im dicken Teil des aufsteigenden Schenkels der Henle-Schleife exprimierten Na^+ - 2Cl^- - K^+ - Kotransporters (NKCC2). Die Ursache des BS Typ 2 liegt in einem Defekt des ebenfalls dort exprimierten apicalen Kaliumkanals ROMK. BS Typ 4 ist durch einen Defekt in Barttin gekennzeichnet. Barttin ist essentieller Bestandteil (β -Untereinheit) der ebenfalls im cTAL basolateral exprimierten Cl^- - K^+ - Kanäle Cl^- -Kb und Cl^- -Ka [Seybert 2008]. Entlang dieses Nephron-Abschnittes werden 20-25% des gefilterten Calciums und ca. 60% des Magnesiums rückresorbiert. Die treibende Kraft

für die Resorption im cTAL bildet ein lumenpositives transepitheliales Potential, welches durch die Resorption von Na^+ , K^+ und Cl^- aus dem Lumen über den Na^+ - K^+ - 2Cl^- -Transporter (NKCC2), die Rückdiffusion von K^+ -Ionen via ROMK ins Lumen und die Aufnahme von Cl^- -Ionen ins Interstitium über einen basolateral gelegenen Chloridkanal ClC-Kb und ClC-Ka zustande kommt. Ca^{2+} und Mg^{2+} folgen wie Na^+ dem transepithelialen Potential über parazelluläre Shunts vom Lumen ins Interstitium.

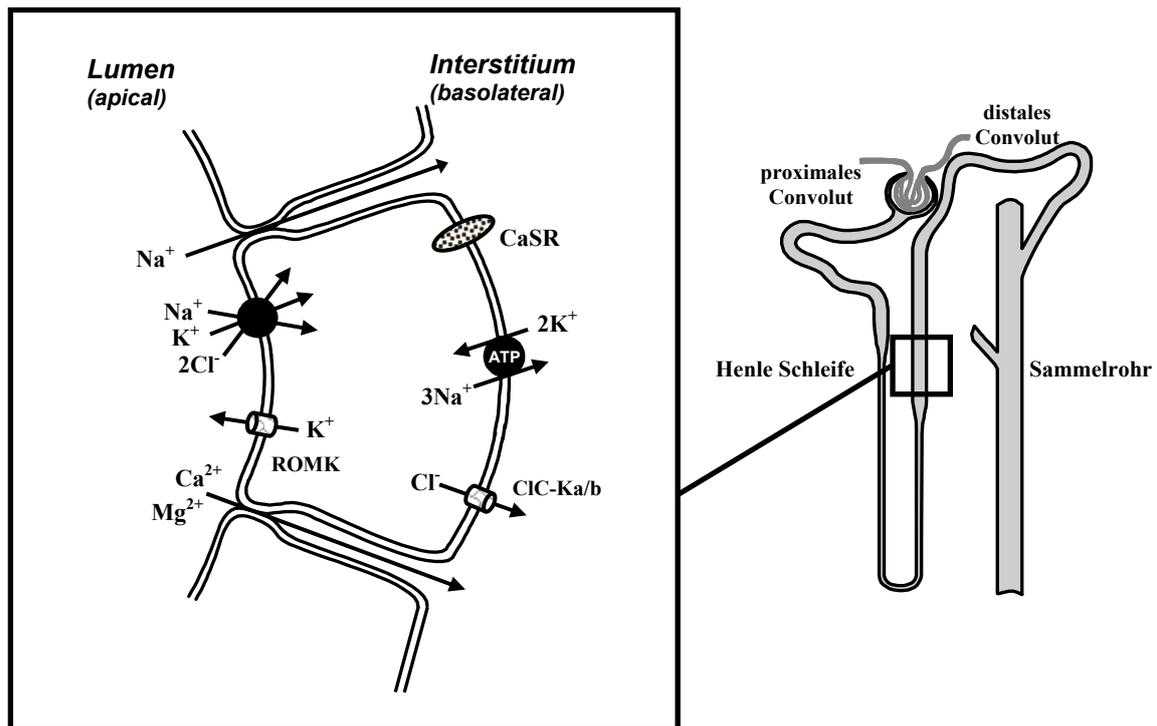


Abb. 7: Schematische Darstellung der Transportvorgänge im cTAL.

Defekte des NKCC2, des ROMK oder des ClC-Ka/b -Chloridkanals bzw. deren Untereinheit Barttin führen in unterschiedlich starker Ausprägung zum selben Ergebnis: Die Natriumresorption im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (cTAL) wird gestört. Das transepitheliale elektrische Potential sinkt, wodurch die treibende Kraft für die Elektrolytresorption wegfällt. Die im Urin erhöhte Konzentration von Natrium und Chlorid, die den distalen Tubulus erreicht, führt zu einer gesteigerten Sekretion von Kalium und Wasserstoffionen, um Natrium zurückzugewinnen, was zur krankheitstypischen hypokaliämischen Alkalose führt.

Der Verlust der Nierenfunktion die Elektrolyte aus dem Urin zu resorbieren, führt zusätzlich zu einem Wasserverlust. Das Sinken des intravasalen Volumens stimuliert das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Angiotensin II stimuliert seinerseits die

Prostaglandin E₂ – Synthese (PGE₂). Als Synonym für das Antenatale Barttersyndrom wird der Begriff des Hyperprostaglandin- E- Syndrom (HPS) verwendet.

Charakteristisch für das Antenatale Barttersyndrom ist neben einer hypokaliämischen Alkalose und einem hyperreninämischen Hyperaldosteronismus eine Hypercalciurie mit Frühmanifestation einer Nephrokalzinose. Pränatal kann ein Polyhydramnion Hinweis auf diese Tubulopathie sein. Ursache ist die fetale Polyurie. Das Risiko für Frühgeburtlichkeit ist hoch. Betroffene Frühgeborene zeigen schwere Wasser- und Salzverluste mit Dehydration und Polyurie, Gedeihstörungen, Osteopenien, Muskelkrämpfe, Muskelschwäche, eine ausgeprägte PGE₂- Synthese mit Fieber und frühe Zeichen einer Nephrokalzinose.

Klassisches Bartter- Syndrom (cBS)

Ursache des klassischen Bartter- Syndrom, auch Bartter- Syndrom Typ 3 genannt, ist ein Defekt des basolateralen Chloridkanal Cl⁻-Kb. Die Pathogenese wurde bereits beim Antenatale Barttersyndrom beschrieben. Die symptomatische Ausprägung variiert allerdings zum Antenatale Barttersyndrom. Die Erstmanifestation des cBS, der im vorigen Kapitel beschriebenen Symptome, erfolgt meistens im ersten Lebensjahr. Eine späte Manifestation nach dem 8. Lebensjahr ist äußerst selten, ebenso die Entstehung einer ausgeprägten Nephrocalcinose.

Gitelman- Syndrom (GS)

Beim Gitelman Syndrom liegt die Ursache in einem Defekt des im distalen Tubulus (DT) exprimierten Na⁺-Cl⁻-Symporter NCCT [Seybert 2008]. Durch diesen Defekt wird die Natriumresorption aus dem Lumen in die Zelle vermindert. Gleichzeitig wird die Resorption von Ca²⁺ durch die spannungsabhängigen apicalen Kalziumkanäle gefördert und die Rückresorption von Magnesium vermindert, es kommt zu einer Hypokalziurie und hypermagnesiurischen Hypomagnesiämie. Die Manifestation des GS erfolgt üblicherweise in der späten Kindheit / frühen Jugend. Typische Symptome sind Muskelschwäche, tetanische Krämpfe und Müdigkeit, welche auf die Hypokaliämie und die Hypomagnesiämie zurückzuführen sind. Maligne Herzrhythmusstörungen werden durch die Elektrolytveränderungen besonders begünstigt und stellen die größte Bedrohung dieser Erkrankung dar.

2 Material und Methoden

2.1. Gesamtübersicht über die verwendete Methodik

Fragmente der aus den Blutzellen der Patienten gewonnenen DNA wurden mit der PCR- Methode unter zu Hilfenahme spezifischer Primer vervielfältigt (Kap. 2.5.). In einer das ausgewählte Patientenkollektiv umfassenden Mutationsanalyse wurden alle codierenden Exone des CASR mittels SSCP untersucht (Kap. 2.6.). Suspekte SSCP-Befunde wurden durch Sequenzierung abgeklärt (Kap. 2.7.). Um kausalpathogenetische Aussagen über die mutierten CaSRen treffen zu können, wurde die entsprechende cDNA, die mittels Mutagenese in bestimmten Plasmiden geklont vorlag, durch in vitro-Synthese in die entsprechende cRNA umgewandelt. (Kap. 2.8.). Diese wurde am Tag nach Präparation von frischen *Xenopus* Oozyten mit der cRNA eines Calciumsensitiven Kaliumkanals rSK4 in diese injiziert und dort in die entsprechenden Proteine translatiert (Kap. 2.9.2.). Fünf bis acht Tage nach Injektion konnten mit der Zwei-Mikroelektroden-Voltage-Clamp-Methode elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt werden (Kap. 2.9.3.).

2.2. Allgemeine Materialien

2.2.1. Geräte und Hilfsmittel

Die Liste der allgemein verwendeten Hilfsmittel und Geräte, auf die im weiteren Text nicht mehr gesondert verwiesen wird:

- Kühlzentrifuge Biofuge fresco (Fa. Heraeus, Osterode)
- Tischzentrifuge (Fa. Qualitron, Korea)
- Vakuumzentrifuge DNAplus (Fa. Heto, Allerød/Dänemark)
- Power Supply-EPS 200 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Power Supply-EPS 600 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Analysewaage Modell 501 (Fa. Kern, Albstadt)
- Feinwaage Modell R180D (Fa. Sartorius, Göttingen)
- Milli-Q-Water System (Fa. Millipore, Eschborn)
- Centrifuge/Vortex Combi-Spin FVL-2400 (Fa. Kobe, Marburg)
- pH-Meter Mettler Toledo MP 220 (Fa. Kobe, Marburg)

- Magnetrührer MR 3001 K (Fa. Heidolph, Kelheim)
- Mikrowellenofen Modell R-7180 (Fa. Sharp, England)
- Photodokumentationssystem Bio-Print V.96 (Fa. Vilber Lourmat, Marne/Frankreich)
- UV-Flächenstrahler TFX (Fa. Vilber Lourmat, Marne/Frankreich)
- Plattformschwenker (Eigenbau der Werkstatt der Universität Marburg)
- Pipetten und Spitzen (Fa. Eppendorf, Hamburg und Fa. Abimed, Düsseldorf)
- Pasteurpipetten (Fa. Brand, Wertheim)
- Röhrchen und Tubes (Fa. Eppendorf, Hamburg und Fa. Greiner, Nürtingen)
- Spritzen (Fa. Becton Dickinson, Dublin/Irland)

2.2.2. Chemikalien und Reagenzien

Die aufgeführten Chemikalien entsprechen alle dem Reinheitsgrad p.A.

- Borsäure Kat. Nr. M202.11 (Fa. GATC, Konstanz)
- Bromphenolblau Na-Salz Kat. Nr. A512.1 (Fa. Roth, Karlsruhe)
- DEPC Kat. Nr. D-5758 (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Essigsäure 100% Kat. Nr. 1.00063 (Fa. Merck, Darmstadt)
- Ethidiumbromid Kat. Nr. 1.11615 (Fa. Merck, Darmstadt)
- Ficoll 400 Kat. Nr. F-4375 (Fa. Sigma, Deisenhofen)
- Na-EDTA Kat. Nr. 03677 (Fa. Fluka Biochemika, Neu-Ulm)
- Natriumhydroxid Kat. Nr. 0402 (Fa. Mallinckrodt Baker, Deventer/Holland)
- Tris Kat. Nr. 17-1321-01 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Xylencyanol Kat. Nr. A513.1 (Fa. Roth, Karlsruhe)
- 100 Base-pair Ladder Kat. Nr. 27-4001-01 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- DEPC-H₂O
- 1M Tris-HCl, pH 8,0
- 0,5M EDTA, pH 8,0
- TAE-Puffer 50x, pH 8,0 (242 g Tris Base (FW = 121.14), 750 mL deionisiertes Wasser, 57.1 ml AcOH, 100 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0), auf 1 Liter auffüllen)
- TBE-Puffer 5x (54 g Tris Base (FW = 121.14), 27.5 g Borsäure (FW = 61.83),

- 900 mL deionisiertes Wasser, 20 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0) auf 1 Liter auffüllen)
- Agarosegel 6x DNA- Probenpuffer “Loading buffer” (0,5% Bromphenolblau, 0,5% Xylencyanol FF, 60% Glycerin)

2.3. DNA-Gewinnung

2.3.1. Material

2.3.1.1. Geräte

- Spektral-Photometer GeneQuant II Kat. Nr. 80-2105-98 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- Quarzglas-Küvette Kat. Nr. 105.202.008-QS (Fa. Hellma, Mühlheim)

2.3.1.2. Chemikalien

- Nucleon® BACC2 Extraction Kit Kat. Nr. SL-8502 (Fa. Scotlab Bioscience, Coatbridge/Schottland) beinhaltet

Lösung A: 10 mM Tris-HCl
320 mM Sucrose
5 mM MgCl₂
1% Triton X-100
pH 8,0 mit 40% NaOH, autoklaviert

Lösung B: 400 mM Tris-HCl
60 mM EDTA
150 mM NaCl
pH 8,0 mit 40% NaOH, autoklaviert
1% SDS
5 M Natrium-Perchlorat
Nucleon® Resin Silica-Lösung

- Ethanol absolut Kat. Nr. 32205 (Fa. Riedel-de Haën, Seelze)
- Chloroform Kat. Nr. 1.02445 (Fa. Merck, Darmstadt)

2.3.2. DNA-Isolierung aus Vollblut

Für die DNA-Isolierung werden 5-10 ml EDTA-Blut benötigt. Um eine vorzeitige Zellschädigung zu umgehen, sollte das Blut innerhalb eines kurzen Zeitintervalles weiterverarbeitet oder bei -80°C eingefroren werden. Das Blut wird in ein 50ml-Röhrchen überführt und mit 4 Volumenanteilen von Lösung A versetzt. Nachdem das Gemisch für 4 Minuten im Überkopfdreher geschüttelt wurde, wird es für weitere 4 Minuten bei 1300g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig dekantiert und das verbleibende Pellet in 2ml Lösung B resuspendiert. Es folgt die Entproteinisierung, für welche die Zellsuspension in ein 5ml-Röhrchen überführt wird, anschließend mit 500 μl Natrium-Perchlorat versetzt wird und einige Male vorsichtig in den Händen geschüttelt wird. Die DNA wird extrahiert, indem man 2ml Chloroform hinzupipettiert, das Gemisch wiederum einige Minuten vorsichtig schüttelt, 300 μl Nucleon® Resin Silica-Lösung hinzufügt und für mindestens 3 Minuten bei 1300g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 50ml-Röhrchen gegeben, während das Proteinpellet verworfen wird. Anschließend wird der Überstand mit gekühltem Ethanol absolut im Verhältnis 1:2 versetzt. Nach behutsamem Schütteln der Tubes präzipitiert die DNA als feines Netzwerk. Die gewonnene DNA wird mittels einer Pasteurpipette aus der Lösung isoliert und mindestens zweimal in gekühltem 70%igem Ethanol gewaschen. Über Nacht erfolgt die Trocknung der DNA in einem 1,5ml-Eppendorfröhrchen bei Raumtemperatur und anschließend in einer Vakuumzentrifuge. Die trockene DNA wird entsprechend der Ausbeute in TE-Puffer (100-500 μl) resuspendiert und bei 4°C aufbewahrt. Die Konzentrationsmessung der vollständig resuspendierten DNA erfolgt mit Hilfe eines Spektralphotometers, und zwar durch Messung der Extinktion bei 260nm, dem Absorptionsmaximum heterozyklischer, stickstoffhaltiger Basen der Nukleinsäuren. Eine Extinktion [E] von 1,0 oder 1 OD (optische Dichte Einheit) entspricht hierbei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doppelsträngiger DNA. Zusätzlich wird die Extinktion bei 280nm bestimmt. Proteine weisen bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum auf, so dass durch diese Bestimmung eine mögliche Verunreinigung der Probe durch Proteine nachgewiesen werden kann. Die Reinheit der Probe wird durch Bildung des Quotienten E260/280 ermittelt. Dieses Verhältnis sollte bei einer sauberen DNA-Präparation zwischen 1,5 und 2,0 liegen. Indem drei unabhängige Messungen durchgeführt werden und daraus der Mittelwert gebildet wird, kann die Genauigkeit der Messwerte erhöht werden. Durch Verdünnen mit DEPC- H_2O wird die Stammlösung auf eine Konzentration von 10ng/ μl eingestellt.

2.4. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Trennung von Nukleinsäure-Molekülen und wird in Agarose-Gelen durchgeführt. In ihrer Grundform besteht die Elektrophorese aus einer Elektrophoreseeinheit und einer Spannungsversorgung (Gleichstrom). Die Elektrophoreseeinheit besteht aus einem Puffertank, in dem das Gel vollständig eingetaucht ist. Zwischen Start- und Stopseite wird nun mittels Elektroden eine Gleichspannung angelegt. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern Richtung Anode. Kleine Moleküle bewegen sich schnell und große langsamer in dem Gel. Die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld hängt von den gewählten Laufbedingungen, also von Stromstärke, Pufferbedingungen und der Konzentration des Trägermediums ab. In Agarose-Gelen mit einer Konzentration von 0,5% (w/v) lassen sich DNA-Fragmente im Bereich von 1000-15000bp gut auftrennen. Gele mit höherer Agarose-Konzentration sind zur Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 100-2000bp geeignet.

2.5. PCR

2.5.1. Beschreibung

Ziel der Polymerase-Kettenreaktion ist es, selektiv DNA-Abschnitte mittels eines Systems aufeinander folgender DNA-Synthesen zu amplifizieren. Das Prinzip ist eine enzymatische Vermehrung eines vorliegenden DNA-Abschnittes durch das Enzym DNA-Polymerase, durch welches der jeweilige DNA-Abschnitt millionenfach angereichert wird und somit in ausreichender Menge für Untersuchungen, wie z.B. Mutationsnachweise, zur Verfügung steht. Zur Initiierung der enzymatischen DNA-Synthese binden im Verlauf der zyklischen Reaktion immer wieder Oligonukleotid-Primer an Abschnitte außerhalb des gewünschten Abschnittes, wofür die Nukleotid-Sequenzen beiderseits des zu vermehrenden DNA-Abschnittes bekannt sein müssen. Diese Primer sind Oligonukleotid-Paare, die gegenläufig an komplementäre Stränge binden und so den gewünschten Abschnitt flankieren. Der eigentliche Reaktionsablauf besteht aus sich wiederholenden Zyklen der Denaturierung, Hybridisierung der Primer und DNA-Synthese. Da bei der Denaturierung und bei der Hybridisierung sehr hohe

Temperaturen notwendig sind, wird eine thermostabile DNA-Polymerase eingesetzt, um den Einsatz einer neuen Enzymprobe nach jedem Amplifikationsschritt zu vermeiden. Der wichtigste Typ der Enzymklasse ist die Taq-Polymerase von *Thermus aquaticus*.

2.5.2. Material

2.5.2.1. Geräte

- GeneAmp[®] PCR System 2400 (Fa. Perkin Elmer, Ueberlingen)
- GeneAmp[®] PCR System 9600 (Fa. Perkin Elmer, Ueberlingen)
- MikroAmp[™] Reaction Tubes Kat. Nr. N801-0540 (Fa. Perkin Elmer, Ueberlingen)
- MikroAmp[™] Base Kat. Nr. N801-5531 (Fa. Perkin Elmer, Ueberlingen)
- MikroAmp[™] Tray/Retainer Assembly Kat. Nr. N801-5530 (Fa. Perkin Elmer, Ueberlingen)
- Elektrophoresekammer (Fa. MWG-Biotech)

2.5.2.2. Chemikalien

- Taq DNA Polymerase Kat. Nr. D-6677 (Fa. Sigma, Steinheim)
- PCR-Puffer 10x Kat. Nr. P-2192 (Fa. Sigma, Steinheim) beinhaltet 100mM Tris-HCl, pH 8,3 bei 25°C; 500mM KCl; 15mM MgCl₂; 0,01% Gelatin
- Polymerization Mix Kat. Nr. 27-2094-01 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden) (20mM dNTP)
- Oligonukleotid-Primer (Fa. Life Technologies, Eggenstein)
- DEPC-H₂O
- Seakem[®] LE Agarose Kat. Nr. 50004 (Fa. Cambrex, Rockland/USA)
- 100 Base-pair Ladder-Lösung
- Ethidiumbromid
- TAE-Puffer 1x

2.5.3. Durchführung

Die Sequenzen der synthetischen Oligonukleotid-Primer werden entweder aus Publikationen entnommen oder mittels der DNA-Sequenzen eigenständig entwickelt. Der Forward-Primer besteht aus einer antegraden DNA-Basensequenz des Forward-

Stranges im 5'-Bereich des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes, der Reverse-Primer hingegen aus einer retrograden Sequenz des Reverse-Stranges im 3'-Bereich.

Zuerst wird ein Reaktionsgemisch angesetzt, welches anschließend im PCR-Gerät zur Reaktion gebracht wird. Die wesentlichen Inhaltsstoffe des Reaktionsansatzes sind Forward- und Reverse-Primer im Überschuss, Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP), Reaktionspuffer, Taq-Polymerase und DNA.

In einem Gesamtvolumen von 20µl werden angesetzt:

0,5 µM Forward-Primer

0,5 µM Reverse-Primer

100 µM dNTP

50 mM KCl

1,5 mM MgCl₂

10 mM Tris-HCl, pH 9,0

50 ng DNA

1 U Taq-Polymerase

Der erste Schritt der Reaktion ist die initiale Denaturierung bei 94°C für 5 Minuten. Es folgt die aus drei zeitlich aufeinander abgestimmten Reaktionen bestehende Zyklusphase, für die jeweils unterschiedliche Temperaturen benötigt werden. In jedem dieser Zyklen erfolgt eine Verdopplung der vorliegenden DNA-Menge. Die erste dieser Reaktionen ist die Denaturierung bei 94°C für 45 Sekunden, die zweite beinhaltet die Abkühlung und Hybridisierung mit den Oligonukleotid-Primern (Annealing oder Anheften) für 30 Sekunden bei für das jeweilige Primer-Paar spezifischen Temperatur (meist zwischen 50°C bis 65°C) und die dritte Reaktion umfasst die Elongation (DNA-Synthese) bei 72°C für 45 Sekunden. Diese Synthese erfolgt, indem die Taq-Polymerase Nukleotide an die 3'-OH-Primer-Enden heftet und zwei komplementäre DNA-Stränge herstellt. Diese Zyklen werden ca. 30mal wiederholt. Den Abschluss der Reaktion bildet der Kettenverlängerungsschritt bei 72°C für 5 Minuten. Das PCR-Produkt wird dann bei 4°C bis -20°C gelagert.

Zur Überprüfung, ob durch die PCR genügend DNA angereichert wurde, wird eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Zuerst wird ein Agarose-Gel mit einer Konzentration von 1,5% (w/v) in TAE-Puffer 1× gegossen und in einer Elektrophoresekammer bereitgestellt. Das Gel wird vollständig von dem als Laufpuffer

dienenden TAE-Puffer 1× umspült. Zunächst pipettiert man jeweils 8µl des PCR-Produktes zusammen mit 3µl Loading buffer 6× und 4µl DEPC-H₂O in eine Gel-Tasche, schließt eine Spannungsquelle an und lässt die DNA für ungefähr eine Stunde bei 100V und 100mA wandern. Auf eine der Laufspuren wird in gleicher Menge wie ein PCR-Produkt ein Standard (100 Base-pair Ladder-Lösung) gegeben und mitgeführt, durch welchen später die Fragmentgröße abgeschätzt werden kann. Ein hinzugeführter Farbstoffpuffer ermöglicht eine Orientierung über die bereits zurückgelegte Laufstrecke. Anschließend wird das Gel für ungefähr 15 Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung (ca. 10µg Ethidiumbromid auf 100ml Milli-Q-H₂O) gebadet und hiernach unter fließendem Wasser abgespült. Die Funktion des Ethidiumbromids ist, die DNA-Banden durch Interkalierung zwischen die Basenpaare der DNA anzufärben, indem es orange fluoresziert. Die fluoreszierenden Banden können dann mittels eines UV-Flächenstrahlers sichtbar gemacht und die Ergebnisse notiert werden.

2.6. Single-Strand Conformation Polymorphism- Analyse (SSCP)

2.6.1. Beschreibung

Die SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism)- Analyse ist ein Verfahren, das zur Feststellung eines Unterschiedes in der Nukleotid-Basensequenz durch Mutation bzw. Polymorphismus dient. Ziel der SSCP-Analyse ist es, Veränderungen an Genen aufzuspüren, die sich im Austausch, in Einfügung oder Verlust einer einzelnen Base manifestieren. Es wird geprüft, ob sich gleiche Bereiche denaturierter DNA-Abschnitte in Laufgeschwindigkeit oder Laufverhalten in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter verschiedenen Bedingungen (Temperatur, pH-Wert) unterscheiden. Hierzu muss die Basensequenz des Gens bekannt sein und eine Generierung von DNA-Fragmenten mittels PCR erfolgen, da diese eine Länge von 300bp nicht überschreiten sollte. Um die gesamte kodierende Sequenz und die dazugehörigen Splice-Sites abzudecken, werden Primer benötigt, die im Bereich der Introns liegen. Bei grossen Exon-Bereichen müssen mehrere Fragmente mit überlappenden Sequenzen gewählt werden. Das Verfahren beinhaltet eine Überführung der PCR-Produkte in Einzelstrang-DNA durch Erhitzen und eine anschließende nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese der PCR-Produkte. Nach Beendigung des Laufes folgt die Auswertung der Banden durch Färbung des Gels mit Silbernitrat.

2.6.2. Material

2.6.2.1. Geräte

- Thermomixer Modell 5436 (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Kühlgenerator Multi Temp[®] III Kat. Nr. 18-1102-78 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- ElektrophoresisUnit Multiphor[®] II Kat. Nr. 18-1018-06 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- GelPool Kat. Nr. 18-1031-58 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)
- PaperPool Kat. Nr. 18-1031-59 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)

2.6.2.2. Chemikalien

- CleanGel DNA Analysis Kit Kat. Nr. 17-1198-06 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden) beinhaltet
 - CleanGel 48S Sammelgel (5%)
 Trenngel (10%)
 - Gelpuffer Puffer pH 8,45
 0,001% Bromphenolblau
 0,001% Orange G
 - Elektrodenpuffer Puffer pH 7,9
 - Papierelektrodenstreifen
- Formamid Kat. Nr. 1.09684 (Fa. Merck, Darmstadt)
- PlusOne[™] DNA Silver Staining Kit Kat. Nr. 17-6000-30 (Fa. Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden) beinhaltet

Fixierlösung 5x	Benzschwefelsäure	3,0% w/v in 24% Ethanol
Silbernitratlösung 5x	Silbernitrat	1,0% w/v
	Benzschwefelsäure	0,35% w/v in H ₂ O
Entwicklerlösung 5x	Natriumkarbonat	12,5% w/v in H ₂ O
Stop-Lösung 5x	Essigsäure	5% v/v
	Natriunazetat	25% w/v
	Glycerol	50% v/v in H ₂ O

Formaldehyd 37% w/v in H₂O, Natriumthiosulfat 2% w/v in H₂O

2.6.3. Durchführung

Nach der Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR werden die PCR-Produkte (2,5µl bis 4µl) und Formamid zu gleichen Teilen in je ein Eppendorf-Röhrchen pipettiert, geschüttelt und kurz zentrifugiert. Parallel wird das Polyacrylamid-Gel mit 25ml Gelpuffer mindestens eine Stunde lang unter Vermeidung von Luftblasen rehydriert und die Flüssigkeit durch einen Schüttler gleichmäßig verteilt. Das fertige Gel wird auf die zur Haftung mit 70%igem Ethanol beschichtete Kühlplatte der Elektrophoreseeinheit gelegt, wobei wiederum eine Blasenbildung zu vermeiden ist. Die Enden des Gels werden ca. 5mm breit mit in je 22ml Elektrophoresepuffer getränkten Papierelektrodenstreifen bedeckt. Die vorbereiteten Proben werden in einem Heizblock bei 95°C für 5 Minuten denaturiert und direkt danach zur Abkühlung für weitere 5 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend werden die Proben dann auf das Gel in die dafür vorgesehenen Taschen aufgetragen. Zur Kontrolle werden eine denaturierte Wildtypprobe und eine native, nicht denaturierte Wildtypprobe mitgeführt.

Nachdem die Papierelektrodenstreifen mit Elektroden versehen wurden und eine Spannungsquelle angeschlossen wurde, kann das Gel gestartet werden. In dieser Arbeit wurde eine Lauftemperatur von 15°C gewählt. Die Proben laufen 10 Minuten lang bei 200V, 23mA und 5W in das Sammelgel und wandern danach ungefähr 60 Minuten lang bei 600V, 30mA und 18W durch das Trenngel.

2.6.4. Auswertung

Nach Beendigung der Elektrophorese wird eine Silbernitratfärbung durchgeführt, die sich durch hohe Sensitivität in der Darstellung und durch gute Reproduzierbarkeit ausweist. Während aller Färbevorgänge wird das Gel auf einer Plattform automatisch geschwenkt, um eine gleichmäßige Färbung zu erreichen.

Der erste Schritt besteht in einer Inkubation des Gels in einem Metallbecken mit 250ml Fixierlösung 1× für mindestens 30 Minuten. Nach Verwerfen der Fixierlösung erfolgt die Silberimprägnierung durch Zugabe von 250ml Silbernitratlösung 1× für weitere 30 Minuten. Anschließend wird diese dekantiert und das Gel einige Minuten lang mit deionisiertem Wasser gewaschen. Kurz vor Gebrauch wird die Entwicklungslösung angesetzt, die aus 50ml Entwicklungslösung 5×, 250µl Natriumthiosulfat und deionisiertem Wasser (bis 250ml auffüllen) besteht. Diese wird dann auf das Gel gegeben und unter Beobachtung der Färbung für 3 bis 6 Minuten dort belassen. Nach Verwerfen der Entwicklungslösung wird 250ml Stop-Lösung zu dem Gel hinzugeführt,

welche mindestens 30 Minuten lang einwirken sollte. Zum Schluss kann das Gel mit Filterpapier getrocknet und in Ruhe ausgewertet werden. Hierzu vergleicht man die Banden mit den Kontrollen und achtet auf Abweichungen im Bandenmuster. Einen sicheren Nachweis über auffällige DNA-Abschnitte erhält man nur durch Sequenzierung.

2.7. DNA- Sequenzierung

Zur Sequenzanalyse der DNA bedienen wir uns dem von Sanger F 1965 entwickelten Verfahren der Kettenabbruch- Methode.

Bei dieser enzymatischen DNA-Sequenzierung dienen synthetische Oligonukleotide als Startpunkt oder "Primer" einer in vitro-DNA-Synthese. Bei dieser Synthese stellt der zu sequenzierende Strang die Matrize dar. Das synthetisierte DNA-Molekül wird dabei radioaktiv oder mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Zu einem statistisch möglichst gleichmäßigen, basenspezifischen Kettenabbruch kommt es durch Einbau eines 2',3'-Dideoxynukleosidtriphosphats (ddNTPs). Diesen Nukleotiden fehlt die zur weiteren Kettenverlängerung notwendige 3'-Hydroxylgruppe.

So werden vier verschiedene Reaktionen benutzt, die jeweils eines der vier ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP) neben den üblichen dNTPs enthalten. Das statistische Auftreten der Kettenabbruch-Reaktionen an der entsprechenden Position der DNA (ddTTP gegenüber A; ddCTP gegenüber G und so weiter) führt zu unterschiedlich großen DNA-Fragmenten. Durch die Größenauftrennung in einer denaturierenden Polyacrylamid- Gelelektrophorese und Sichtbarmachen der einzelnen Banden durch Autoradiographie oder Fluorographie werden die Positionen des Kettenabbruchs sichtbar gemacht. Das Ablesen dieser Sequenzleitern führt zu den entsprechenden Sequenzinformationen. Das enzymatische Sequenzierverfahren eignet sich besonders gut zur Automatisierung. Die fluoreszenzmarkierten Reaktionsprodukte werden bei automatischer oder halbautomatischer Sequenzierung nach Anregung durch einen Laserstrahl detektiert und mit Hilfe von Computern als eine Folge von farbigen Kurven dargestellt. Bei der DNA- Sequenzierung verwandten wir das genetische Analysierungssystem von ABI PRISM 310 (Applied Biosystem) mit Hilfe des ABI PRISM BigDye Terminator cycle sequencing kit. Nach der PCR, bei der jeweils nur ein Vorwärts- oder Rückwärtsprimer verwendet eingesetzt wurde, konnte die DNA durch Ethanol- Ausfällung extrahiert werden. Gelöst mit 20 µl TSR- Lösung (ABI PRISM

310) konnte die Sequenzierungsprobe nach 3 min. Denaturierung bei 95°C auf Eis zur automatischen Sequenzauslesung versandt werden.

Sequenzierungsansatz:

- 11 µl DNA (50-100ng)
- 2 µl Sequenziermix (Termination mix)
- 1 µl Primer
- 10 µl DEPC- Wasser steril

Sequenzierungsprotokoll:

- 94° C, 10 sek. Denaturierung
- 50° C, 5 sek. Annealing- Sequenz
- 60° C, 4 min. Elongations- Sequenz

Ausfällungsansatz:

- 80 µl MQ- H₂O
- 10 µl 3M NaAc, pH 4,8
- 250 µl EtOH 100%
- Kompletter PCR- Ansatz

2.8. Ortsspezifische Mutagenese

Bei der ortsspezifischen Mutagenese können in vitro Mutationen mit Hilfe spezieller Oligonucleotide an jeder beliebigen Stelle der DNA eingebaut werden.

Zunächst wurde aus homogenisierten Rattennieren RNA extrahiert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers des verwendeten TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Die cDNA wurde durch reverse Transkription aus der isolierten RNA gewonnen. Verwendet wurde dazu die SuperScript® Reverse Transcriptase von Invitrogen. Die Durchführung der ortsspezifischen Mutagenese erfolgte mit Hilfe des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Es wurde nach der vom Hersteller angegebenen Arbeitsvorschrift verfahren. In der Basisprozedur wird ein Doppelstrang DNA (dsDNA) Vektor (parentales Template) und zwei oligonucleotide Primer, welche die erwünschte Mutation enthalten (Tab. 1) verwendet. Die beiden oligonucleotiden Primer, jeder komplementär zum gegenläufigen

DNA Strang, binden in einem temperaturabhängigen Sequenzierungs- Zyklus zunächst an den parentalen dsDNA Vektor. Durch die *PfuTurbo* DNA Polymerase (Stratagene) werden die Primer dann in ein neues Plasmid eingebaut. Durch den Einbau der Primer entsteht das gewünschte mutierte Plasmid.

Sequenzierungsansatz:

- 5 µl 10x Reaktionspuffer
- 20 µl dsDNA Matrize
- 1,5 µl Oligonukleotid- Primer (Forward- Primer)
- 1,5 µl Oligonukleotid- Primer (Reverse- Primer)
- 1 µl dNTP- Mix
- 17,5 µl ddH₂O
- 2,5 µl DMSO
- 1 µl PfuTurbo DNA polymerase

Sequenzierungsprotokoll:

1.) Segment:

- 95° C, 30 sek. 1x Durchlauf

2.) Segment:

- 95° C, 30 sek. Denaturierung
- 55° C, 1 min. Annealing- Sequenz
- 68° C, 14,4 min. Elongations- Sequenz

Anschließend wird das parentale Template, die ursprüngliche methylierte Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym DpnI (20U/µl), welches nur methylierte DNA spaltet, abgebaut. Dies geschieht bei 37°C in 1,5 Stunden. Das neue mutierte Plasmid bleibt isoliert übrig. Danach wird das mutierte Plasmid in Bakterien (*E. coli*) transformiert. In den Bakterien werden die amplifizierten Plasmide innerhalb von 24 h vermehrt. Im Anschluss wird mit Hilfe des QIAprep® Miniprep System zur Reinigung von Plasmid-DNA (Qiagen, Valencia, CA, USA) die mutierte monoklonale Plasmid-DNA aus den Bakterien extrahiert und gereinigt.

Tabelle 1: *Primer-Sequenzen für die Mutagenese*

Primer Name	Forward-Primer 5' - 3'	Reverse-Primer 5' - 3'
CASR-E125K	CTTTGAACCTGGACAAGTTCTGCAACTGCTCTG	CAGAGCAGTTGCAGAACTTGCCAGGTTCAAAG
CASR-E127A	TCTTTGAACCTGGACGCGTTGTGCAACTGCTGT	AGAGCAGTTGCAGAACGCGTCCAGGTTACAAGA
CASR-T138M	GAGCACATCCCTTCGATGATTGCCGTGGTGGGA	TCCCACCACGGCAATCATCGAAGGGATGTGCTC
CASR-L125P	ATCGATTCTTTGAACCCGGACGAGTTCTGCAAC	GTTGCAGAACTCGTCCGGGTTCAAAGAATCGAT

Die Annealing Temperatur betrug bei allen Primer-Paaren 68°C.

2.9. Expression in *Xenopus laevis* Oozyten

Die gewonnene Plasmid- DNA wurde nun in vitro mit Hilfe des mMessage mMachinTM High Yield Capped RNA Transcription Kit (Ambion, Austin, TX, USA) in cRNA umgeschrieben.

10 ng dieser in vitro transkribierten cRNA des CaSR wurde in *Xenopus laevis* Oozyten zusammen mit 1 ng der rSK4 cRNA injiziert. Die *Xenopus laevis* Oozyten wurden bei 16° C in einer physiologischen Lösung bestehend aus ND96 Lösung mit 96 mmol/L NaCl, 2 mmol/L KCl, 1.8 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L HEPES (pH 7.4), 2.5 mmol/L Sodium Pyruvat, 0.5 mmol/L Theophylline, and 20 lg/mL Gentamicin gelagert.

fünf Tage nach Injektion konnte mit den transfizierten Oozyten die Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Methode durchgeführt werden.

2.9. Zwei- Elektroden- Voltage- Clamp- Methode

2.9.1. Einleitung

Mit der Zwei- Elektroden- Voltage- Clamp- Methode wird das Zellmembranpotential auf einem ausgewählten Wert, dem Haltepotential gehalten („geklemmt“) und der Kompensationsstroms („Klemmstrom“) gemessen, der benötigt wird, um das gewünschte Potential zu halten [Halliwell 1987].

Bei der Zwei- Elektroden- Voltage- Clamp- Methode wird mit zwei intrazellulären Mikroelektroden gearbeitet, eine Elektrode V, die die Spannung in den Oozyten misst und einer Elektrode I, über die der Klemmstrom appliziert werden kann. Das gemessene

Potential (V_m) wird von einem Rückkopplungsverstärker (FAB) mit dem gewünschten Spannungspuls (V_{com}) verglichen. Nun wird die Differenz der Signale als Strom durch die Elektrode I appliziert.

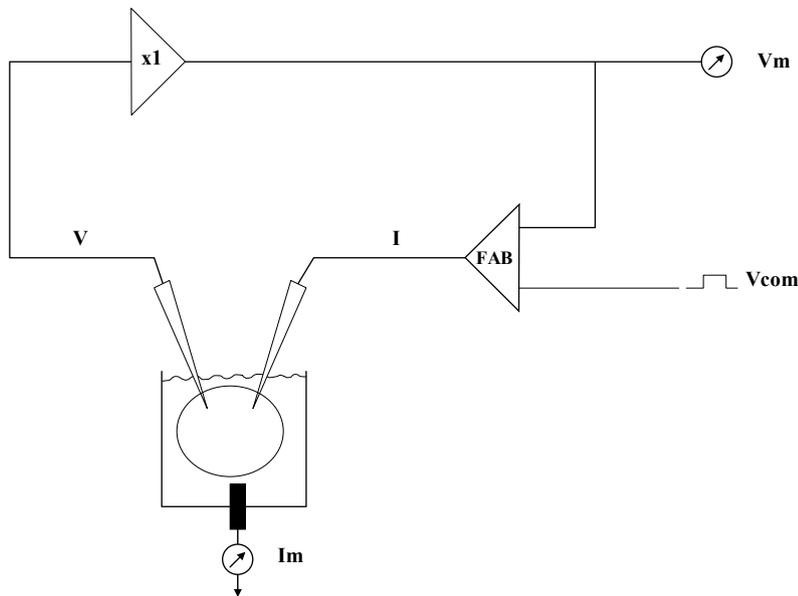


Abb. 8: Schematische Darstellung der Lösungskammer incl. Oozyt und der Stromkreis der Zwei-Elektroden- Voltage- Clamp- Methode.

2.9.2. Coexpression von rSK4 und CaSR

Um den Aktivierungsgrad und damit die Funktion des CaSR durch die Zwei-Elektroden- Voltage- Clamp- Methode darstellen zu können bedienen wir uns der Coexpression eines calciumsensitiven Kaliumkanals (rSK4) und des CaSR in den *Xenopus laevis* Oozyten. Das Grundprinzip wird im Folgenden zusammengefasst:

Der Aktivierungsgrad des CaSR hängt von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen ab. Die Aktivierung des CaSR durch extrazelluläres Ca^{2+} korreliert mit der Freisetzung intrazellulären Ca^{2+} . Die Freisetzung intrazellulären Ca^{2+} korreliert mit dem Aktivierungsgrad des calciumsensitiven Kaliumkanals (rSK4) und damit mit dem Kaliumauswärtsstrom aus den Oozyten. Somit korreliert der Kaliumauswärtsstrom und der damit zu messende Kompensationsstrom mit dem Aktivierungsgrad des CaSR.

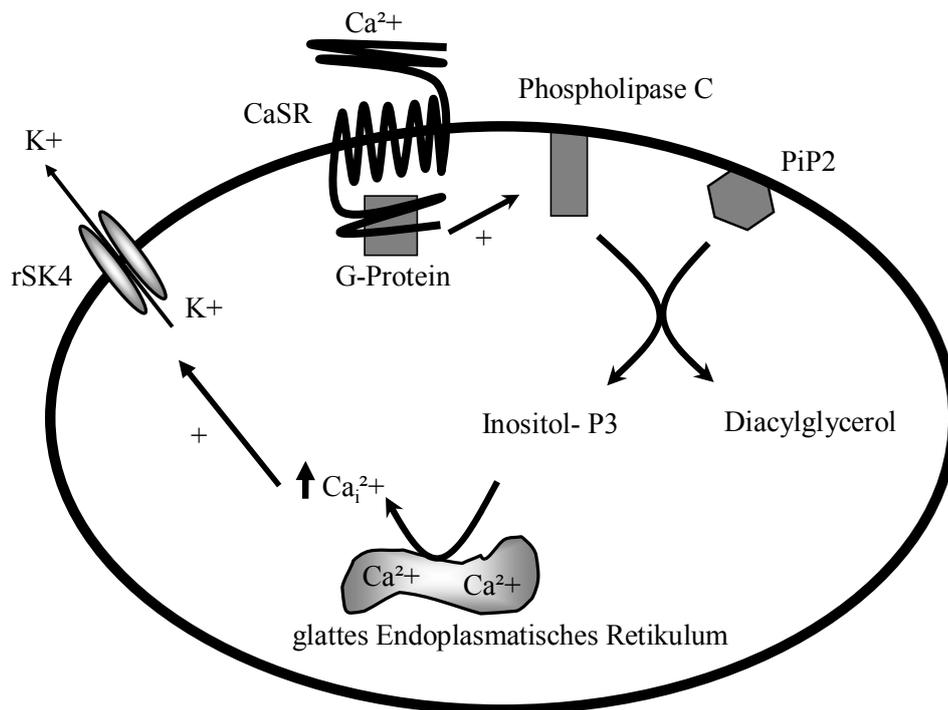


Abb. 9: Schematische Darstellung der Interaktion der intrazellulären second-messenger-Kaskade nach Aktivierung des CaSR mit dem calciumsensitiven Kaliumkanal (rSK4).

2.9.3. Durchführung

Alle Messungen erfolgten an den *Xenopus laevis* Oozyten fünf Tage nach Injektion der cRNA des CaSR- Wildtyps oder der Mutante und des SK4 bei Raumtemperatur. Während der Messung wurde die Oozyte in einer Messkammer ständig mit der jeweils benötigten Lösung umspült. Die Flussgeschwindigkeit der jeweiligen Badlösung betrug 20 ml/min, so dass in 10-15 s die Messkammerflüssigkeit komplett ausgetauscht war. Die neutrale Basislösung ND96 (96 mmol/L NaCl, 2 mmol/L KCl, 1mmol/L MgCl_2 , 5 mmol/L HEPES, pH 7.45) umspülte die Oozyte nur in Abwesenheit der Calcium-Chlorid-Lösung (CaCl_2 -Lösung). Die Erdung der Badlösung erfolgte aktiv durch 2 Agar/3 M KCL- Brücken über den VG- 2A Bath Clamp Headstage von Axon Instruments. Das intrazelluläre Einbringen der Microelektroden in die zu messende Oozyte erfolgte in der neutralen Badlösung. In die eigens aus Borosilikatglas gezogenen Microelektroden wurde vorher eine 3M KCL- Lösung und ein Ag/AgCl- Elektrodendraht eingebracht. Der benötigte Klemmstrom wird mit Hilfe des

GeneClamp 500 amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA), einem MacLab Interface und der Chart software generiert, aufgezeichnet und ausgewertet. Das Haltepotential betrug -30mV . Die Oozyte wurde alle 15 s einer neuen, in der Ca^{2+} -Konzentration steigenden Messkammerflüssigkeit (CaCl_2 -Lösung) ausgesetzt. Die Ca^{2+} -Konzentration der CaCl_2 -Lösungen betrug anfänglich $0,5\text{ mM}$ und steigerte sich über 1 mM , $1,5\text{ mM}$, 2 mM , 3 mM , und 5 mM zu letztlich 10 mM . Um sicher zu gehen, dass der SK4 nicht durch extrazelluläres, sondern ausschließlich durch intrazelluläres Ca^{2+} aktiviert wird, wurde vor der Messreihe mit den steigenden Ca^{2+} -Konzentrationen in Abwesenheit von Ca^{2+} eine Messung mit Magnesiumlösung (10 mmol/L) durchgeführt. Magnesium ist ein Agonist, der den CaSR, aber nicht den calciumsensitiven SK4 stimuliert. Eine messbare Amplitude bei Stimulation des CaSR durch Magnesium bewies die Stimulation des SK4 über den vom CaSR initialisierten intrazellulären Kaskadeweg. Eine komplette Untersuchung für eine der jeweiligen Mutationen beinhaltete die Zwei- Elektroden- Voltage- Clamp- Messung von mindestens sieben Oozyten, in denen der jeweilig klonierte CaSR exprimiert war. Alle in Tabelle 6 aufgeführten Mutationen des CaSR wurden mit der elektrophysiologischen Messung zweimal untersucht, wobei eine Messreihe statistisch ausgewertet wurde.

2.9.4. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 15.0 und SAS. Von den Versuchsergebnissen einer Messreihe wurden Mittelwerte und die Standardabweichungen bestimmt. Signifikanzen wurden in einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung errechnet.

Die Ergebnisse der Messung und der statistischen Auswertung werden in Kapitel 3.2. dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Mutationsanalyse

3.1.1. Patienten

Die vorliegende Arbeit umfasst für jeden der beiden Abschnitte (Mutationsanalyse und Untersuchung der Kausalpathogenese aktivierender und inaktivierender Mutationen des CaSR) eine unterschiedliche Anzahl Patienten, die in den vergangenen Jahren im Rahmen der Kollaboration der Universitäts-Kinderklinik Marburg mit anderen europäischen Zentren für die Forschungsarbeiten zur Aufklärung hereditärer Tubulopathien zu Verfügung standen.

Kriterium für die Aufnahme zur Mutationsanalyse waren die klinischen Parameter, die bereits in Abschnitt 1.3.1 als typisch oder hinweisend für eine kausalpathologisch mit dem CaSR assoziierten $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Verlusterkrankung aufgezeigt wurden. Zu Verfügung stand eine Gruppe von Patienten mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Verlustsymptomen, bei der sich der Verdacht der Familiären Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose (FHHN) nicht bestätigt hatte. Die Tabelle 2 gibt eine Übersicht:

Tabelle 2: Anzahl der Patienten für die Mutationsanalyse

Herkunft	Insgesamt	Hyperkalziurie/ Hypermagnesiurie	Hypokalziämie / Hypomagnesiämie	Nephrokalzinose	Nephrolithiasis	Hypoparathyroidismus
Marburg	16	15	16	4	1	-
Clermont	1	1	1	-	-	-
Toulouse	1	1	1	-	-	-
Hamburg	1	1	1	1	-	-
Erlangen	1	1	1	1	-	1
Köln	1	1	1	1	-	1
Spanien	6	6	6	-	-	-
	27	26	27	7	1	2

Die Tabelle zeigt wie viele der insgesamt untersuchten Patienten unter den aufgezeigten klinischen Symptomen litten. Hypokalziämie: Serum- $\text{Ca}^{2+} < 2,1\text{mmol/l}$; Hypomagnesiämie: Serum- $\text{Mg}^{2+} < 0,7\text{mmol/l}$; Hyperkalziurie bei Kindern: Urin- $\text{Ca}^{2+} > 6\text{mg/kg/24h}$ (SI, $\text{Ca}^{2+} > 0,15\text{mmol/kg/d}$); Hypermagnesiurie: Urin- $\text{Mg}^{2+} > 210\text{mg/24h}$ (SI, $\text{Mg}^{2+} > 8,5\text{mmol/d}$).

Als Kontrollgruppe für die Mutationsanalyse diente ein Kollektiv von 50 gesunden Personen.

3.1.2. Untersuchung des CaSR-Gens (CASR)

3.1.2.1. Einführung

In die Untersuchungen des CaSR-Gens (CASR) sind sämtliche in der Tabelle 2 aufgeführten Patienten eingeflossen. SSCP-Analysen wurden bei einer Temperatur von 15°C durchgeführt. Bei allen Patienten sind die kodierenden Exons des CASR (II-VII) untersucht worden. Suspekte SSCP-Befunde wurden durch Sequenzierung aufgeklärt. Die Primer-Sequenzen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Primer-Sequenzen für SSCP und Sequenzierung des CASR

Primer Name	Exon	Forward-Primer 5' - 3'	Reverse-Primer 5' - 3'
CASRex2	II	TCCCTTGCCCTGGAGAGACGGCAGA	AGAGAAGAGATTGGCAGATTAGGCC
CASRex3.1	III	AGCTTCCCATTTTCTTCCACTTCTT	TTTGTTTTGAGCAACAAAACCTCAGG
CASRex3.2	III	ATTTGACACTTGCAACACCGTTT	CCCGCCTGAGAAGGCTTGAGTAC
CASRex4.1	IV	ACTCATTACCATGTTCTTGTTCT	GCTGGATCTCTTCCTCATCAGAGTA
CASRex4.2	IV	GCTGAGGAAAGGGATATCTGCATCG	GAATTCCTCGGAAGCCTGGGATCTGC
CASRex4.3	IV	CGACTTCAGTGAACCTCATCTCCAG	AAGTACTGAGGCATGGCGATCAGG
CASRex4.4	IV	CGGCGCAATATCACGGGCAAGAT	CCTTTTGCACCTTCTTGAGGTGGC
CASRex4.5	IV	ATCCCAGGAAGTCTGTCCACAATGG	AAGGGGTCTCGACACTGCTGATGTT
CASRex4.6	IV	ACAGGTTTAGCAACAGCTCGAC	CCCAACTCTGCTTTATTATACAGCA
CASRex5	V	GGCTTGTACTCATTCTTTGCTCCTC	GACATCTGGTTTTCTGATGGACAGC
CASRex6	VI	CAAGGACCTCTGGACCTCCCTTTGC	GACCAAGCCCTGCACAGTGCCCAAG
CASRex7.1	VII	AGTCTGTGCCACACAATAACTCACTC	GGTAGGAGAGCTCTCGGTTGGTGGC
CASRex7.2	VII	TTCCGCAACACACCATTGTCAAGG	CTGGTGGGGATCTTGGCCTCAAACA
CASRex7.3	VII	GGCATCAGCTTCGTGCTCTGCATCT	CGATCAGGAAGCCCAGGGCCATGAG
CASRex7.4	VII	GGAGGATGAGATCATCTTCATCACG	TCACCTCTACGGCAGAGACAAACTT
CASRex7.5	VII	GCATGCTCATCTTCTTCATCGTCTGG	GGATCCCGTGGAGCCTCCAAGGCTG
CASRex7.6	VII	GCAACGTCTCCGCAAGCGGTCCAGCA	CCATGGCGTTCTTCTGAGGCTCATC
CASRex7.7	VII	CAGAAGGTCATCTTTGGCAGCGGCA	CTCCACCTCTGGCCGCTGGTCTCC
CASRex7.8	VII	GGGGAAACGGACTTAGATCTGACC	TCTTCCTCAGAGGAAAGGAGTCTGG

Die Annealing Temperatur betrug bei allen Primer-Paaren 65°C.

3.1.2.2. Ergebnisse der Mutationsanalyse

Insgesamt konnten zwei Mutationen und zwei Polymorphismen identifiziert werden. Bei einer der gefundenen Mutationen handelt es sich um eine heterozygote Substitutionsmutation, die zweite stellt eine neutrale Mutation (silent mutation) dar. Die zwei unterschiedlichen Polymorphismen wurden bei vier verschiedenen Patienten gefunden. Die Patientendaten und die Ergebnisse werden im Folgenden übersichtlich dargestellt (Tabelle 4/5).

Tabelle 4: Klinische Daten der betroffenen Patienten, bei denen eine Mutation bzw. ein Polymorphismus im CASR identifiziert werden konnte.

Patienten	Hyperkalziurie/ Hypermagnesiurie	Hypokalziämie/ Hypomagnesiämie	Nephrokalzinose	Nephrolithiasis	Besonderheiten
Marburg 7590	+	+	-	-	
Toulouse 8100	+	+	-	-	
Köln 8178	-	+	+	-	V.a. Pseudohypoparathyroidismus Typ Ia
Spanien 8201	+	+	-	-	
Spanien 8205	+	+	-	-	

Hypokalziämie: Serum-Ca²⁺ < 2,1mmol/l; Hypomagnesiämie: Serum-Mg²⁺ < 0,7mmol/l; Hyperkalziurie bei Kindern: Urin-Ca²⁺ > 6mg/kg/24h (SI, Ca²⁺ >0,15mmol/kg/d); Hypermagnesiurie: Urin-Mg²⁺ > 210mg/24h (SI, Mg²⁺ > 8,5mmol/d).

Tabelle 5: Ergebnisse der Mutationsanalyse: Mutationen und Polymorphismen

Patienten	Mutationsname	Exon	Nukleotid-Austausch	Codon-Sequenz	Konsequenz	Polymorphismus	Transversion/Transition
Marburg 7590	G990R	VII	c.2968A>G	AGG/GGG	Gly oder Arg	ja	Transition
	A986S	VII	c.2956G>T	GCC/TCC	Ala oder Ser	ja	Transversion
Toulouse 8100	E127K	III	c.379G>A	GAG/AAG	Glu zu Lys	nein	Transition
	A986S	VII	c.2956G>T	GCC/TCC	Ala oder Ser	ja	Transversion
Spanien 8201	A986S	VII	c.2956G>T	GCC/TCC	Ala oder Ser	ja	Transversion
Spanien 8205	A986S	VII	c.2956G>T	GCC/TCC	Ala oder Ser	ja	Transversion
Köln 8178	P747P	VII	-	-	Pro zu Pro	-	-

Mutationsname: Einfache Bezeichnung des Aminosäure-Austauschs. Die Nummer gibt die Aminosäure-Position im Protein an. Vor der Nummer steht die originale, dahinter die ersetzte Aminosäure (AS).

Exon: Nummer des Exons, in dem die Mutation stattfand.

Nukleotid-Austausch: "c." steht für cDNA, gefolgt von der Nukleotidnummer an welcher der Basenaustausch (z.B. Guanin nach Cytosin, G>C) stattfand.

Codon-Sequenz: zeigt die drei original Nukleotide und die ersetzen Nukleotide.

Konsequenz: gibt AS-Austausch mit Kürzel für die entsprechenden AS an.

Transition: Austausch einer Purinbase gegen eine Purinbase.

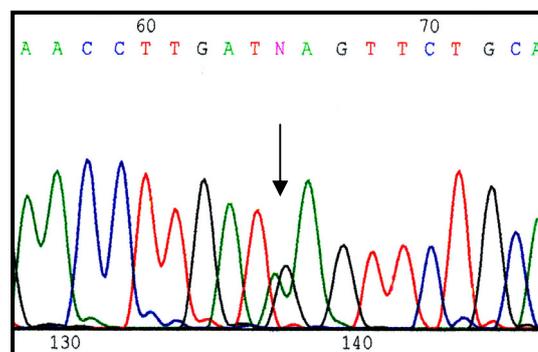
Transversion: Austausch einer Purinbase gegen eine Pyrimidinbase.

Die Positionsangaben der Nukleotide beziehen sich auf die humane CASR-Sequenz (PCAR1) der Genbank emb/X81086/HSPCAR1 (www.casrdb.mcgill.ca)

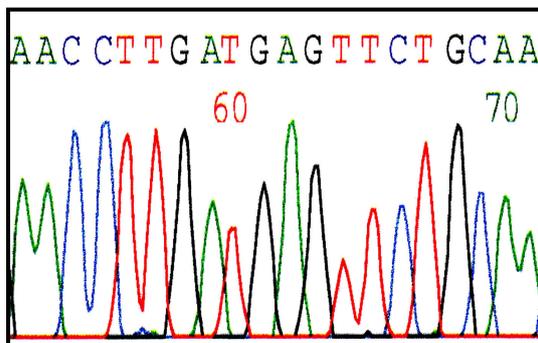
Im Folgenden werden die Ergebnisse beschrieben und die Befunde der SSCP-Analyse und der Sequenzierung dargestellt.

Toulouse 8100 – Der betroffene Patient hat klinisch unauffällige Eltern. Die SSCP-Analysen zeigten, dass sowohl die Mutter, als auch der Vater keinerlei Auffälligkeiten im CASR aufwiesen. Die Sequenzierungsergebnisse des 3. Exons im CASR der Eltern bestätigten, dass sie die Mutation des Sohnes (E127K) selbst nicht tragen. Bei der heterozygoten Substitutions-Mutation im CASR des betroffenen Patienten, die zu einem Aminosäureaustausch von Glutamat zu Lysin an Position 127 der Aminosäuresequenz des CaSR-Proteins (in der ECD) führte, handelt es sich also um eine neu aufgetretene Mutation. Des Weiteren konnte bei dem Patienten ein Alanin (Ala) zu Serin (Ser) Polymorphismus (A986S) entdeckt werden.

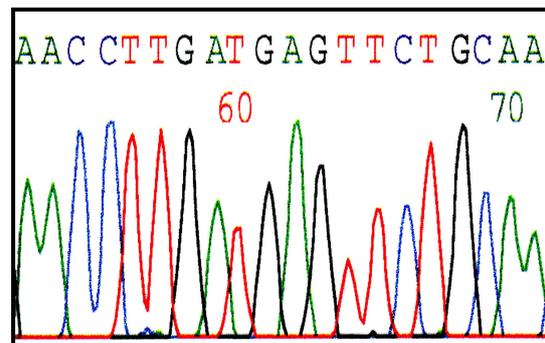
Dieser aus der Literatur bekannte Polymorphismus [Heath et al. 1996] befindet sich in der ICD des CaSR.



Patient Toulouse 8100



Mutter des Patienten Toulouse 8100



Vater des Patienten Toulouse 8100

Abb. 10: Darstellung der Sequenzierungsergebnisse. Die fluoreszenzmarkierten Reaktionsprodukte werden bei automatischer oder halbautomatischer Sequenzierung nach Anregung durch einen Laserstrahl detektiert und mit Hilfe von Computern als eine Folge von farbigen Kurven dargestellt. Der Pfeil markiert den Basenaustausch Guanin nach Adenin im Nukleotid 379, der zu einem Austausch von Glutamat zu Lysin an der Position 127 der Aminosäuresequenz des CaSR- Proteins führt.

Marb.8178 – Der Patient wies in Exon VII des CASR eine neutrale Mutation (silent Mutation) auf. Die Mutation führte zwar im Triplet des CASR, das die AS an Position 747 des CaSR-Proteins bestimmt, zu einem Basenaustausch von Cytosin (C) zu Guanin (G), welcher jedoch nicht zu einem Aminosäureaustausch führte, da sowohl die Codon-Sequenz-varianten CCC, als auch CCG gleichermaßen für die AS Prolin codieren.

Marb.7590 – Bei diesem Patienten konnten zwei Polymorphismen identifiziert werden. Beim genetischen Polymorphismus gibt es für ein Gen mehrere Zustandsformen (Allele). Bei dem Patienten konnte sowohl ein heterozygoter Alanin zu Serin Polymorphismus (A986S), als auch ein heterozygoter Glycin (Gly) zu Arginin (Arg) Polymorphismus (G990R) im CASR entdeckt werden. Der Serin anstatt Alanin Polymorphismus (A986S) kommt durch die Basensequenzvariante TCC (Thymin, Cytosin, Cytosin; codierend für Serin) anstatt GCC (Guanin, Cytosin, Cytosin; codierend für Alanin) zustande. Beim Glycin (Gly) zu Arginin (Arg) Polymorphismus (G990R) ist das Triplet GGG (codierend für Glycin) durch das Triplet AGG (codierend für Arginin) ersetzt. Beide Polymorphismen sind aus der Literatur bekannt [Heath et al. 1996] und befinden sich in der ICD des CaSR .

Marb.8201 und Marb.8205 – Bei beiden Patienten konnte der oben beschriebene Alanin zu Serin Polymorphismus (A986S) entdeckt werden.

3.2. Untersuchung der Kausalpathogenese aktivierender und inaktivierender Mutationen des CaSR

3.2.1. Einführung

Mit Hilfe der elektrophysiologischen Untersuchung durch die Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Methode konnte eine Aussage darüber gewonnen werden, ob im Bezug auf seine extrazellulären Agonisten aktivierende Mutationen im CaSR den Rezeptor tatsächlich sensibler, bzw. inaktivierende Mutationen den Rezeptor unempfindlicher machen. Um aktivierende und inaktivierende Mutationen des CaSR mit dem Wildtyp vergleichen zu können, wurden die im Folgenden nochmals kurz zusammengefassten Arbeitsschritte unternommen:

Nacheinander wurde jeweils eine der zu vergleichenden Mutationen (siehe Abschnitt 3.2.1) mit Hilfe der Mutagenese in das CaSR-Gen (CASR) eingebaut. Zur Vervielfältigung des Untersuchungsmaterials wurde die mutierte Plasmid-DNA durch Transfektion in Bakterien eingebracht. Nach Gewinnung der vervielfältigten monoklonalen Plasmid-DNA wurde sie gereinigt und linearisiert, um dann durch sie, mit zu Hilfenahme der *in vitro* Transkription, die entsprechende cRNA zu erhalten. Diese wurde am Tag nach Präparation von frischen *Xenopus* Oozyten inklusive der cRNA eines Calcium-sensitiven Kaliumkanals (rSK4) in diese injiziert und dort in die entsprechenden Proteine translatiert. Das Gleiche geschah mit dem CaSR-Wildtyp. Fünf bis acht Tage nach Injektion konnten die elektrophysiologische Untersuchungen mit der Zwei-Mikroelektroden-Voltage-Clamp-Methode (TEVC) durchgeführt werden.

Das Prinzip dieser elektrophysiologischen Untersuchung sei ebenfalls nochmals erläutert:

Der Aktivierungsgrad des CaSR in den Oozyten hängt von der extrazellulären Agonisten-Konzentration ab. Die Aktivierung des CaSR durch Agonisten wie dem extrazellulären Calcium korreliert mit der Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} . Die Freisetzung des intrazellulären Ca^{2+} korreliert mit der Öffnung der calciumsensitiven Kaliumkanäle (rSK4). Somit korreliert der Kaliumauswärtsstrom und der damit zu messende elektrische Strom mit dem Aktivierungsgrad des CaSR.

3.2.1. Auswahl der zu untersuchenden Mutationen im CaSR

Um die Auswirkungen aktivierender bzw. inaktivierender Mutationen des CaSR mit dem Wildtyp vergleichen zu können, wurden neben der in Abschnitt 3.1. beschriebenen aktivierenden Mutation (E127K) weitere repräsentative Mutationen des CaSR aus der Literatur ausgewählt. Die Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die ausgewählten Mutationen. Die Primer-Sequenzen für die Mutagenese sind in Tabelle 7 dargestellt:

Tabelle 6: Auswahl der Mutationen des CaSR die mit der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Methode untersucht wurden

Mutationsname	Exon	Nukleotid-Austausch	Codon-Sequenz	Konsequenz	Mutationstyp	Transversion/Transition	Entdecker	Referenzen
E127K	III	c.379G>A	GAG/AAG	Glu zu Lys	aktivierend	Transition	Lienhardt	Lienhardt et al. 2001
E127A	III	c.380A>C	GAC/GCG	Glu zu Ala	aktivierend	Transversion	Pollak	Pollak et al. 1994
T138M	III	c.413C>T	ACG/ATG	Thr zu Met	inaktivierend	Transition	Chou	Chou et al. 1995
L125P	III	c.374T>C	CTT/CCT	Leu zu Pro	aktivierend	Transition	Nakae	Nakae et al. 1997 Lienhardt et al. 2001 Vargas-P. et al. 2002

Die Positionsangaben der Nukleotide beziehen sich auf die humane CaSR-Sequenz (PCAR1) der Genbank emb/X81086/HSPCAR1 (www.casrdb.mcgill.ca)

Mutationsname: Einfache Bezeichnung des Aminosäure-Austauschs. Die Nummer gibt die Aminosäure-Position im Protein an. Vor der Nummer steht die originale, dahinter die ersetzte Aminosäure (AS).

Exon: Nummer des Exons, in dem die Mutation stattfand.

Nukleotid-Austausch: "c." steht für cDNA, gefolgt von der Nukleotidnummer an welcher der Basenaustausch (z.B. Guanin nach Cytosin, G>C) stattfand.

Codon-Sequenz: zeigt die drei original Nukleotide und die ersetzen Nukleotide.

Konsequenz: gibt AS-Austausch mit Kürzel für die entsprechenden AS an.

Mutationstyp: aktivierende Mutationen im CaSR machen den Rezeptor, im Bezug zu seinen Agonisten und im Vergleich zum CaSR Wildtyp sensibler; inaktivierende Mutationen machen den Rezeptor unempfindlicher.

Transition: Austausch einer Purinbase gegen eine Purinbase.

Transversion: Austausch einer Purinbase gegen eine Pyrimidinbase.

Entdecker: Nachname des Entdeckers der entsprechenden Mutation.

Referenzen: Autor und Veröffentlichungs-Datum der entsprechenden Publikationen

Tabelle 7: *Primer-Sequenzen für die Mutagenese*

Primer	Forwar -Primer 5' - 3'	Revers -Primer 5' - 3'
CASR-E125	CTTTGAACCTGGACAAGTTCTGCAACTGCTCT	CAGAGCAGTTGCAGAACTTGCCAGGTTCAAA
CASR-E127	TCTTTGAACCTGGACGCGTTGTGCAACTGCTG	AGAGCAGTTGCAGAACGCGTCCAGGTTACAAG
CASR-T138M	GAGCACATCCCTTCGATGATTGCCGTGGTGGG	TCCCACCACGGCAATCATCGAAGGGATGTGCT
CASR-L125P	ATCGATTCTTTGAACCCGGACGAGTTCTGCAA	GTTGCAGAACTCGTCCGGGTTCAAAGAATCGA

Die Annealing Temperatur betrug bei allen Primer-Paaren 68°C.

Der Phänotyp der ausgewählten Mutationen entspricht für die aktivierenden Mutationen E127K und E127A dem in Abschnitt 1.3.1 beschriebenen Krankheitsbild (Hypokalzämischer Hypoparathyreoidismus, ADH). Die inaktivierende Mutation T138M geht mit dem im Abschnitt 1.3.3 beschriebenen Krankheitsbild (Neonataler Hyperparathyreoidismus) einher. In einem von Vargas-Poussou et al. 2002 veröffentlichten Bericht litten Patienten, welche die Mutation L125P im CaSR trugen, neben den typischen Symptomen der ADH (Abschnitt 1.3.1) unter Bartter-ähnlichen Symptomen (Abschnitt 1.3.5); zu diesen zählten Hypokaliämie mit metabolischer Alkalose, Hyperreninismus und sekundärer Hyperaldosteronismus.

3.2.3. Ergebnisse der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Methode

Alle Messungen erfolgten an den *Xenopus laevis* Oozyten fünf Tage nach Injektion der cRNA des CaSR- Wildtyps oder der Mutante und des SK4 bei Raumtemperatur.

Die Oozyte wurde alle 15s einer neuen, in der Ca^{2+} -Konzentration steigenden Messkammerflüssigkeit (CaCl_2 -Lösung) ausgesetzt. Die Ca^{2+} -Konzentration der CaCl_2 -Lösungen betrug anfänglich 0,5 mM und steigerte sich über 1 mM, 1,5mM, 2mM, 3mM, und 5mM zu letztlich 10mM. Eine komplette Untersuchung für eine der jeweiligen Mutationen beinhaltete die Zwei- Elektroden- Voltage- Clamp- Messung von mindestens sieben Oozyten in denen der jeweilig klonierte CaSR exprimiert war (n= 7). So beschreibt n die Anzahl der Messwiederholungen.

Die Ergebnisse der Messung und der statistischen Auswertung werden im folgenden dargestellt.

CaSR Wildtyp

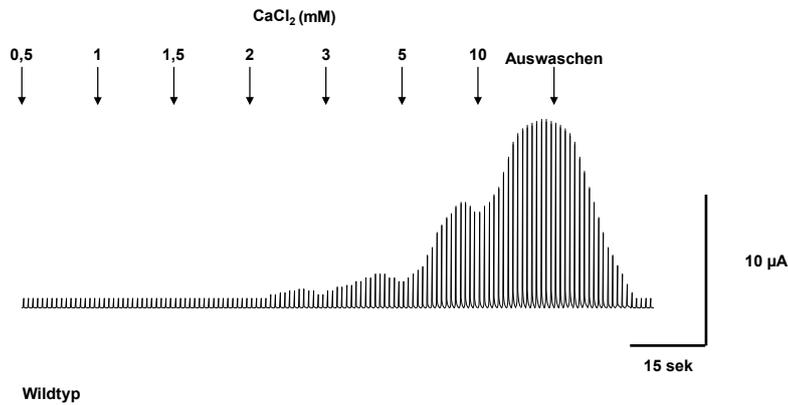


Abb. 11: Schematische Darstellung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung zwischen extrazellulärem Ca^{2+} und der Aktivierung des CaSR. Die Spikes repräsentieren nur die positiven Stromamplituden bei repetitiver Stimulation. CaCl_2 -Lösungen wurden in ständig steigender Konzentration (Pfeile) zugegeben.

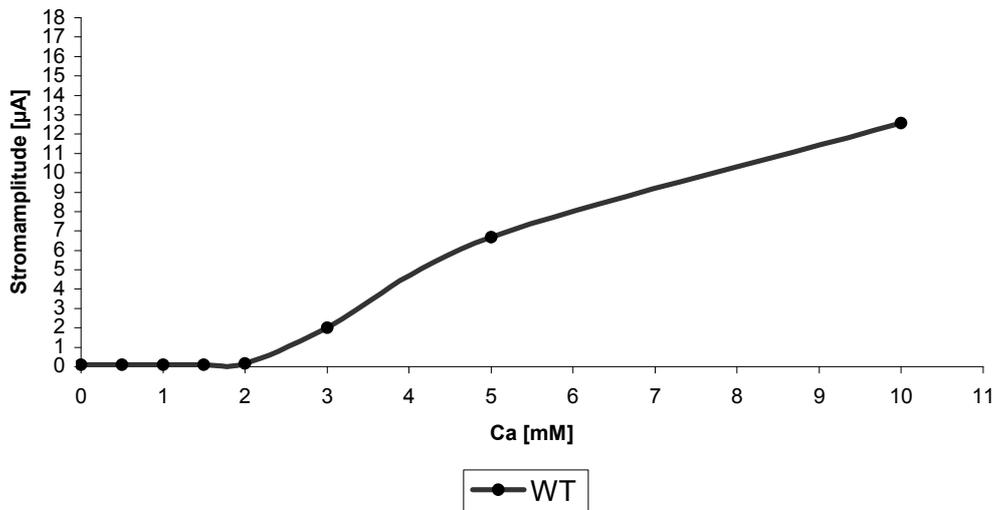


Abb. 12: Konzentrationsabhängigkeit der CaSR-Aktivierung durch extrazelluläres Ca^{2+} am Tag 5 der Expression. Darstellung der Mittelwerte einer Messreihe, $n=7$. WT= Wildtyp.

CaSR Wildtyp - Die Überspülung der Oozyten mit den jeweiligen CaCl_2 -Lösungen (Abb. 11) ergab eine Aktivierung des CaSR bei einer Ca^{2+} -Konzentration in der Messkammerflüssigkeit von 2mM, die sich nach Erreichen des Schwellenwertes mit steigender Ca^{2+} -Konzentration erhöhte und nach 10-15s Auswaschen vollständig reversibel war.

CaSR E127K

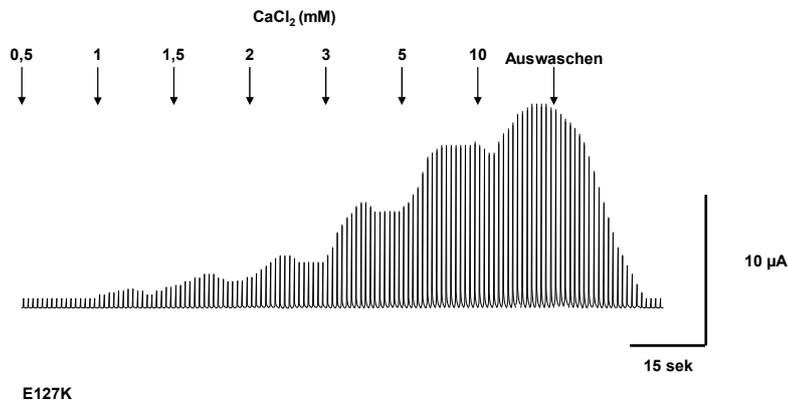


Abb. 13: Schematische Darstellung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung zwischen extrazellulärem Ca²⁺ und der Aktivierung des CaSR. Die Spikes repräsentieren nur die positiven Stromamplituden bei repetitiver Stimulation. CaCl₂-Lösungen wurden in ständig steigender Konzentration (Pfeile) zugegeben.

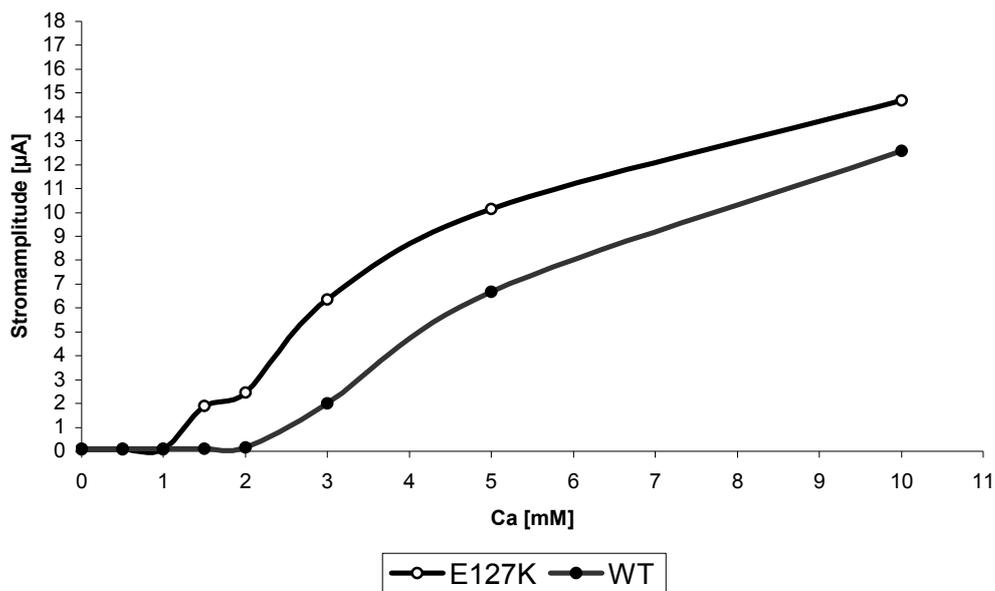


Abb. 14: Konzentrationsabhängigkeit der CaSR-Aktivierung durch extrazelluläres Ca²⁺ am Tag 5 der Expression. Darstellung der Mittelwerte einer Messreihe, n=7. WT= Wildtyp.

CaSR E127K - Der Schwellenwert, der zu einer Aktivierung des CaSR führte, lag nach Überspülung der Oozyten mit den jeweiligen CaCl₂-Lösungen bei einer Ca²⁺-Konzentration in der Messkammerflüssigkeit von ungefähr 1mM. Der Aktivierungsgrad des CaSR und die damit zu messende Stromamplitude erhöhte sich nach Übertreten des Schwellenwertes mit steigender Ca²⁺-Konzentration. Nach 10-15s Auswaschen war die Aktivierung des CaSR vollständig reversibel.

CaSR E127A

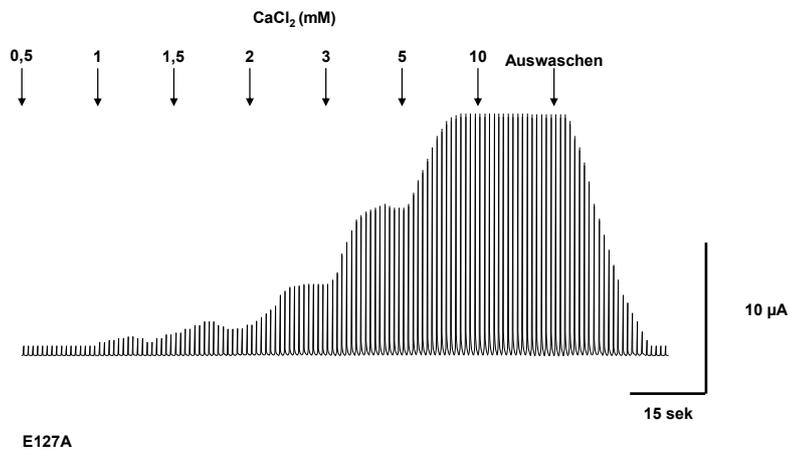


Abb. 15: Schematische Darstellung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung zwischen extrazellulärem Ca^{2+} und der Aktivierung des CaSR. Die Spikes repräsentieren nur die positiven Stromamplituden bei repetitiver Stimulation. CaCl_2 -Lösungen wurden in ständig steigender Konzentration (Pfeile) zugegeben.

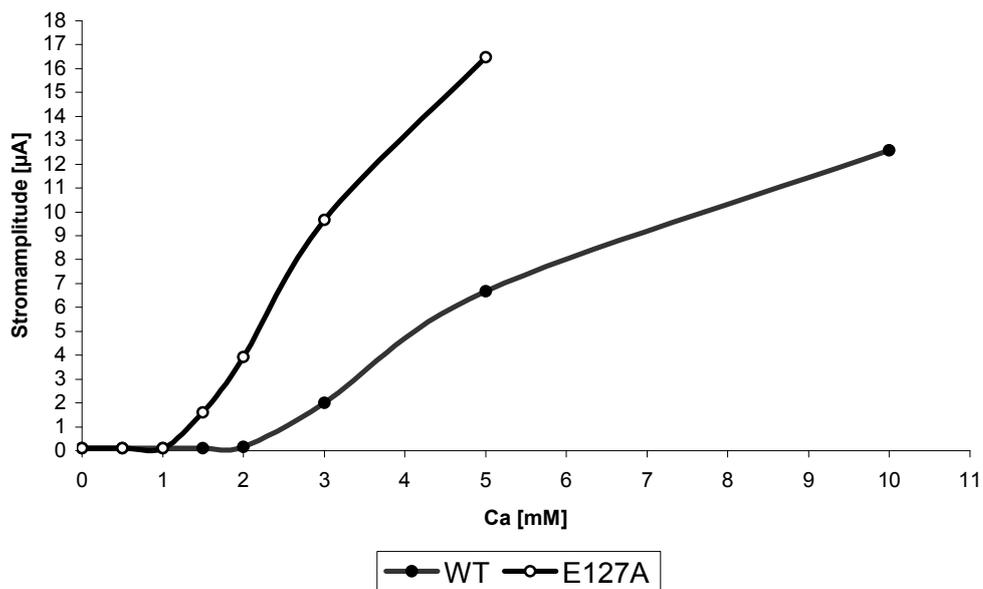


Abb. 16: Konzentrationsabhängigkeit der CaSR-Aktivierung durch extrazelluläres Ca^{2+} am Tag 5 der Expression. Darstellung der Mittelwerte einer Messreihe, $n=7$. WT= Wildtyp.

CaSR E127A - Der Schwellenwert, der zu einer Aktivierung des CaSR führte, lag nach Überspülung der Oozyten mit den jeweiligen CaCl_2 -Lösungen bei einer Ca^{2+} -Konzentration in der Messkammerflüssigkeit von ungefähr 1mM. Nach 10-15s Auswaschen war die Aktivierung des CaSR vollständig reversibel.

CaSR L125P

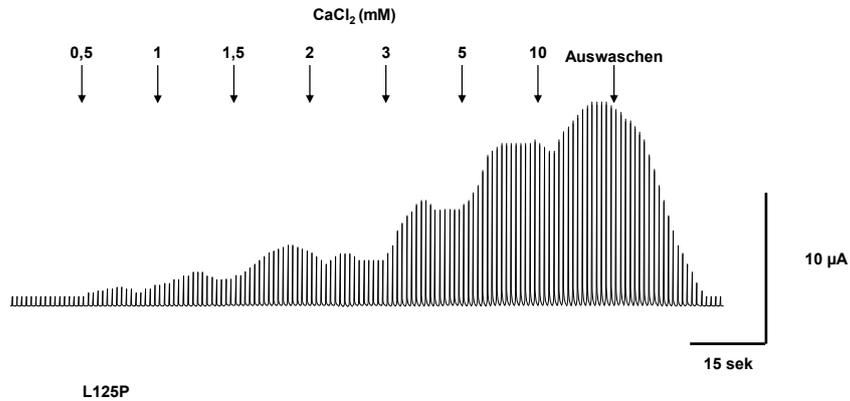


Abb. 17: Schematische Darstellung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung zwischen extrazellulärem Ca^{2+} und der Aktivierung des CaSR. Die Spikes repräsentieren nur die positiven Stromamplituden bei repetitiver Stimulation. CaCl_2 -Lösungen wurden in ständig steigender Konzentration (Pfeile) zugegeben.

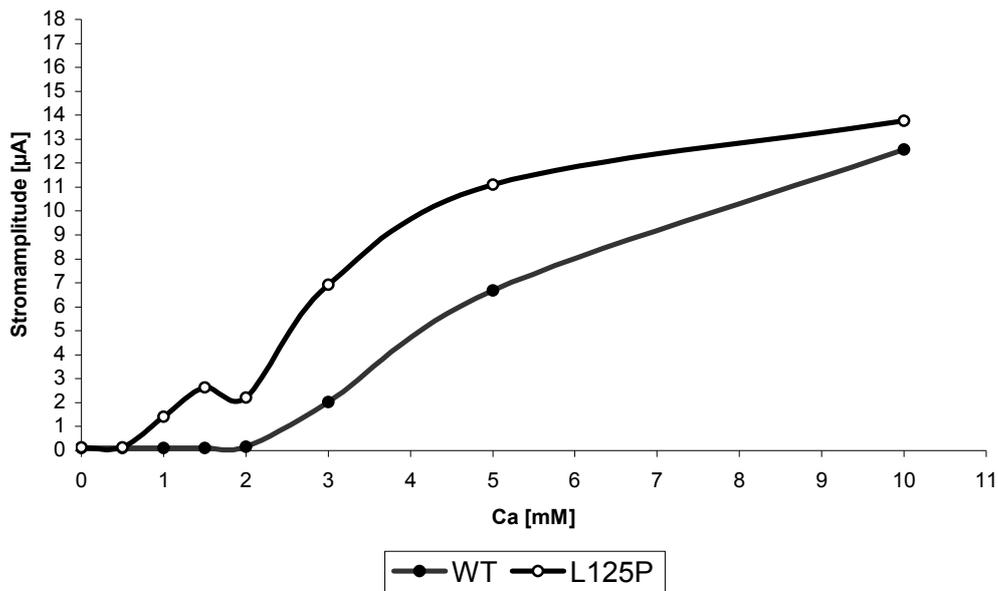


Abb. 18: Konzentrationsabhängigkeit der CaSR-Aktivierung durch extrazelluläres Ca^{2+} am Tag 5 der Expression. Darstellung der Mittelwerte einer Messreihe, $n=7$. WT= Wildtyp.

CaSR L125P - Der Schwellenwert, der zu einer Aktivierung des CaSR führte, lag nach Überspülung der Oozyten mit den jeweiligen CaCl_2 -Lösungen bei einer Ca^{2+} -Konzentration in der Messkammerflüssigkeit von ungefähr 0,5mM. Der Aktivierungsgrad des CaSR und die damit zu messende Stromamplitude erhöhte sich nach Übertreten des Schwellenwertes mit steigender Ca^{2+} -Konzentration. Nach 10-15s Auswaschen war die Aktivierung des CaSR vollständig reversibel.

CaSR T138M

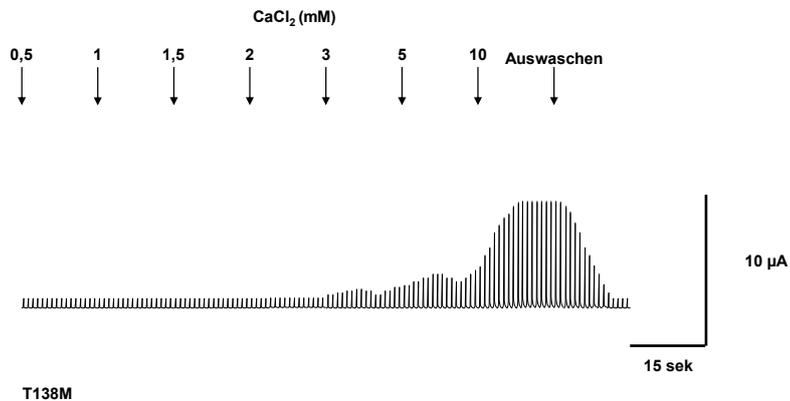


Abb. 19: Schematische Darstellung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung zwischen extrazellulärem Ca²⁺ und der Aktivierung des CaSR. Die Spikes repräsentieren nur die positiven Stromamplituden bei repetitiver Stimulation. CaCl₂-Lösungen wurden in ständig steigender Konzentration (Pfeile) zugegeben.

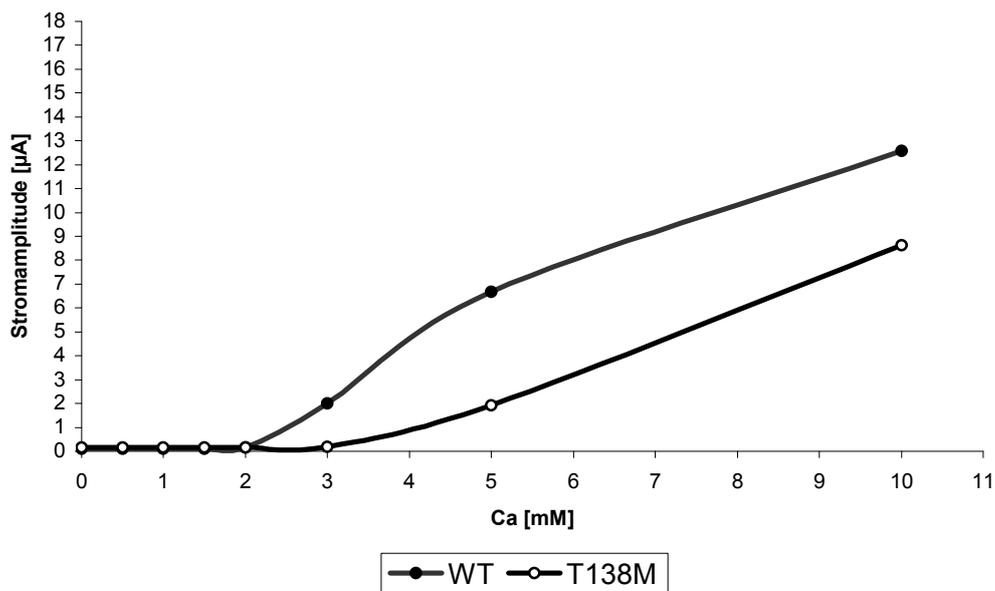


Abb. 20: Konzentrationsabhängigkeit der CaSR-Aktivierung durch extrazelluläres Ca²⁺ am Tag 5 der Expression. Darstellung der Mittelwerte einer Messreihe, n=7. WT= Wildtyp.

CaSR T138M - Der Schwellenwert, der zu einer Aktivierung des CaSR führte, lag nach Überspülung der Oozyten mit den jeweiligen CaCl₂-Lösungen bei einer Ca²⁺-Konzentration in der Messkammerflüssigkeit von ungefähr 3mM. Der Aktivierungsgrad des CaSR und die damit zu messende Stromamplitude erhöhte sich nach Übertreten des Schwellenwertes mit steigender Ca²⁺-Konzentration. Nach 10-15s Auswaschen war die Aktivierung des CaSR vollständig reversibel.

Tabelle 8: Übersicht der statistischen Auswertung einer Messreihe aller CaSR- Typen

Ca [mM]		0	0,5	1	1,5	2	3	5	10
WT	Mittelwert	0,1	0,22	0,1	0,24	0,15	2	6,68	12,56
	Standardabweichung	0,02	0,29	0,03	0,3	0,08	1,14	2,73	2,54
E127K	Mittelwert	0,07	0,07	0,07	1,88	2,46	6,34	10,15	14,69
	Standardabweichung	0,01	0	0	0,68	0,74	2,1	2,8	2,55
E127A	Mittelwert	0,1	0,1	0,1	1,58	3,91	9,65	16,48	
	Standardabweichung	0,02	0,02	0,02	1,08	1,9	3,04	1,19	
L125P	Mittelwert	0,12	0,14	1,41	2,62	2,22	6,93	11,1	13,77
	Standardabweichung	0,03	0,05	0,77	1,46	1,36	2,96	3,28	2
T138M	Mittelwert	0,14	0,14	0,14	0,17	0,14	0,17	1,93	8,63
	Standardabweichung	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,06	1,53	2,01
p- Werte*		0,15	0,13	0,0006	0,0003	0,0001	<,0001	<,0001	0,0012

* Varianzanalyse mit Messwiederholung

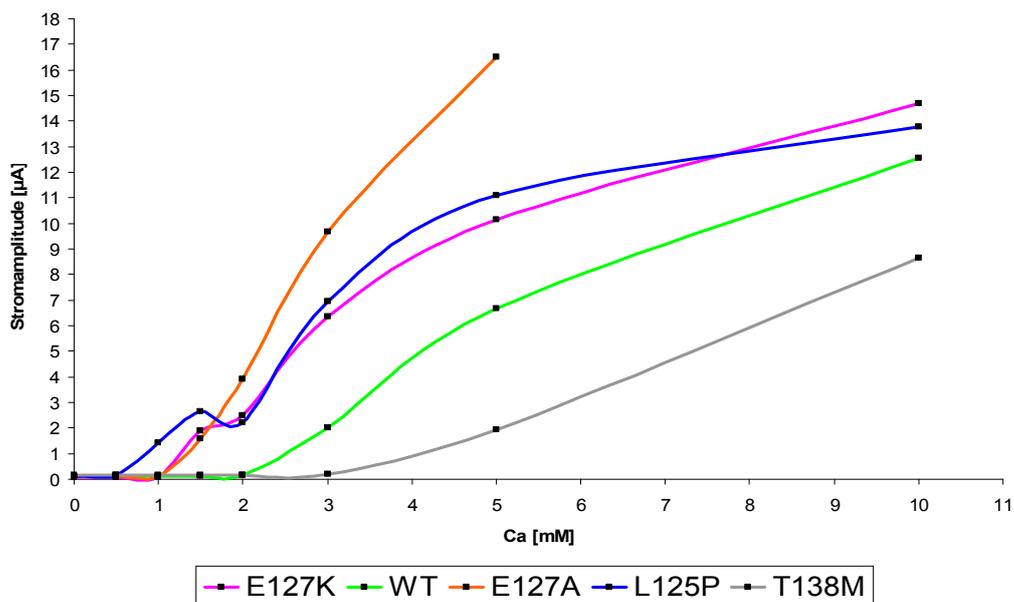


Abb. 21: Darstellung der Mittelwerte einer Messreihe aller CaSR- Typen, n= 7.

Bei Betrachtung der p- Werte der Varianzanalyse zeigt sich in Tabelle 8 ein signifikanter Unterschied der CaSR- Typen im Bezug auf den Aktivierungsgrad der Rezeptoren bei einer Ca^{2+} -Konzentration ab 1mM. Signifikanzen zeigen sich auch im Globaltest der Varianzanalyse ($p < 0,001$) und im Interaktionsterm der Ca^{2+} -Konzentration zu den Rezeptorgruppen ($p < 0,001$).

4. Diskussion

4.1. Einführung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde bei 27 Kindern (Tabelle 2) mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Verlustsymptomatik nach Ausschluss von PCLN1 Mutationen eine Mutationsanalyse des CaSR- Gens durchgeführt. Die Ursache der $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ - Verlustsymptomatik war bei allen Kindern unklar. In der Literatur beschriebene Zusammenhänge zwischen Mutationen im CaSR- Gen und $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ - Verlustsymptomen führten zu der Vermutung, dass die Ursache der Symptome in einer Dysfunktion des CaSR infolge einer aktivierenden Mutation liegen könnte [Brown et al. 1995].

Ziel der Untersuchung war es also, eine aktivierende Mutation im CaSR- Gen dieser Patienten zu finden oder auszuschließen.

Von besonderem Interesse war darüber hinaus die Frage, ob und wie aktivierende Mutationen die $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ - Homöostase beeinflussen. So befasste sich die Arbeit in einem zweiten Schritt, unter Anwendung von Mutagenese und der Messverfahren durch die Voltage- Clamp- Methodik, mit der Beweisführung genotypischer Ursachen für die phänotypischen Symptome der CaSR assoziierten Erkrankungen.

Ein besonderes Augenmerk fiel auf die von uns identifizierte Mutation des CaSR E127K. Ziel dieser Untersuchung war es, zunächst zu überprüfen, ob es sich bei der von uns entdeckten Mutation (E127K) um eine aktivierende Mutation handelte.

Des Weiteren wurden die Folgen ausgewählter aktivierender und inaktivierender Mutationen im CaSR- Gen mit denen des Wildtyp verglichen (Tabelle 6). Es sollte hiermit die krankheitsauslösende Bedeutung der Mutationen im CASR dargestellt werden.

4.2. Mutationsanalyse

Wie im Ergebnisteil beschrieben, konnten bei der Mutationsanalyse zwei Mutationen identifiziert werden. Bei den entdeckten Mutationen handelt es sich um eine heterozygote, neu aufgetretene Substitutionsmutation (E127K) und um eine neutrale Mutation (silent mutation), welche unter klinischen oder phänotypischen Aspekten von keiner weiteren Bedeutung war. Bei 26 von 27 Patienten konnte eine Mutation im CaSR als Ursache der $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ - Verlustsymptomatik ausgeschlossen werden.

Die Mutation des CaSR E127K ist bereits als aktivierende Mutation aus der Literatur bekannt und wurde erstmals von Lienhard et al. 2001 beschrieben.

Lienhardt führte bei einem Patientenkollektiv von 19 unverwandten Patienten mit isolierten Hypoparathyreoidismus eine Mutationsanalyse des CASR durch. Hintergrund der Untersuchung war auch hier die Erkenntnis, dass aktivierende Mutationen im CaSR einen hypokalzämischen Hypoparathyreoidismus auslösen können. Aktivierende Mutationen führen zu einer Dysfunktion des Rezeptors im Sinne einer erhöhten Sensitivität. Das bedeutet, dass der CaSR trotz eines normalen Serum- Ca^{2+} - Spiegels eine Hypercalciämie signalisiert. Dies führt zu einer verminderten PTH- Sekretion und gesteigerten renalen Exkretion von Ca^{2+} und Mg^{2+} .

Bei der von Lienhardt durchgeführten Mutationsanalyse konnten bei 8 von 19 Patienten Mutationen im CaSR nachgewiesen werden. Mit unter auch die von uns entdeckte Mutation E127K, die zu einem Aminosäureaustausch von Glutamat zu Lysin an Position 127 der Aminosäuresequenz des CaSR-Proteins führt.

Einen ersten Hinweis, dass es sich bei den von Lienhardt gefundenen Mutationen tatsächlich um aktivierende handeln könnte, lieferte die Lokalisation der entdeckten Mutationen. Die Mutation E127K liegt in der großen extrazellulären Domäne des CaSR, welche den N-Terminus bildet und für die Ligandenbindung verantwortlich ist. Bis Ende 2006 sind 15 aktivierende Mutationen in der ECD erkannt worden, wobei sich die meisten zwischen den AS Alanin der Position 116 und Prolin der Position 136 befinden. Man vermutet hier eine Schlüsselstelle, die bei Veränderung der Aminosäuresequenz zu einer veränderten Tertiärstruktur des Proteins und damit zu einer Dysfunktion führt [Lienhardt 2001].

Weitere Hinweise, dass es sich bei den von Lienhardt gefundenen Mutationen um die Ursache des hypokalzämischen Hypoparathyreoidismus handeln könnte, waren die eindeutigen klinischen Daten der Patienten, die allesamt durch eine aktivierende Mutation im CaSR erklärt werden könnten. Dazu zählten neben der Hypocalciämie, der Hypoparathyreoidismus, die Hypercalciurie, auch Parästhesien, Krämpfe und karpopedale Spasmen.

Den Beweis, dass es sich bei der Mutation E127K tatsächlich um eine aktivierende Mutation handelt, erbrachte Lienhardt experimentell. Die Durchführung und die Ergebnisse werden im folgenden Kapitel erläutert.

4.3. Untersuchung der Kausalpathogenese aktivierender und inaktivierender Mutationen des CaSR

4.3.1. CaSR E127K

In der graphischen Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit der CaSR-Aktivierung mit der Mutation E127K durch extrazelluläres Ca^{2+} (Abb. 22) erkennt man eine erste Reaktion, d.h. beginnende Aktivierung (Set point) des Rezeptors bei etwa 1mM extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration. Im Vergleich zum Wildtyp, der bei etwa 2 mM extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration aktiviert wird, reagiert der CaSR mit der Mutation E127K auf extrazelluläres Ca^{2+} sensibler. Damit erfüllt die von uns gefundene Mutation die Voraussetzungen für eine aktivierende Mutation. Der Aktivierungsgrad des CaSR erhöht sich nach Übertreten des Schwellenwertes mit steigender extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration ebenso wie die des Wildtyps, nur mit einer deutlichen Linksverschiebung der Kurve. Erst mit steigender extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration über 3mM kommt es zur Abflachung beider Kurven. Bei einer extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration von 5 mM ist der Aktivierungsgrad des CaSR mit der Mutation E127K noch doppelt so hoch wie der des Wildtyps. Bis zu einer extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration von 10 mM nähern sich die Kurven immer weiter an. Erklärt werden könnte dies durch einen Sättigungseffekt des CaSR. Man kann sich vorstellen, dass bei so hohen unphysiologischen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen alle Ligandenbindungsstellen der ECD besetzt werden und weitere Ca^{2+} -Ionen keinen Einfluss auf den Aktivierungsgrad des CaSR haben.

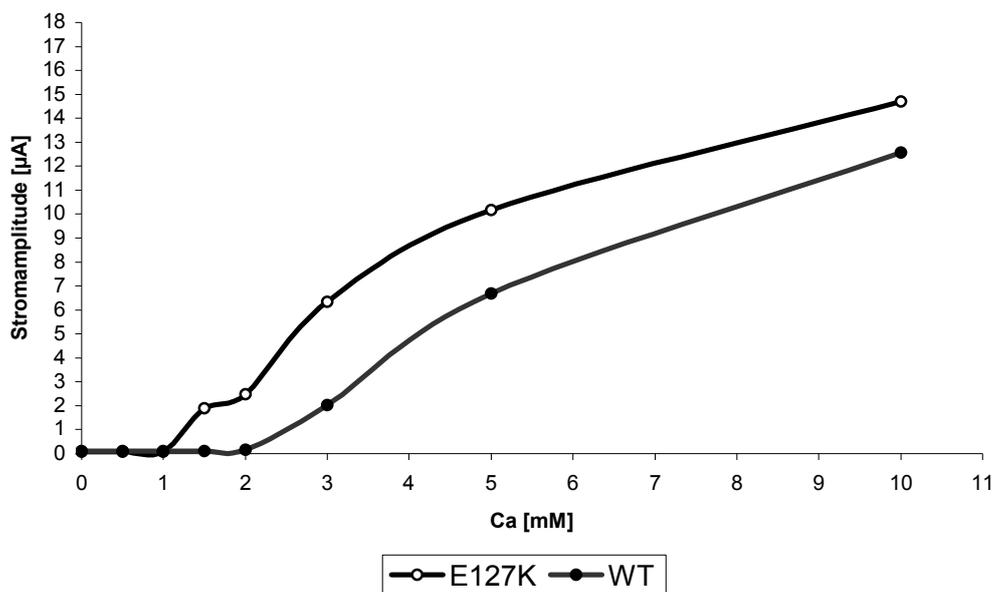


Abb. 22: Konzentrationsabhängigkeit der CaSR-Aktivierung durch extrazelluläres Ca^{2+} am Tag 5 der Expression.

Lienhardt konnte durch in vitro Expression des CaSR in humanen embryonalen Nierenzellen (human embryonic kidney cells, HEK293) nachweisen, dass es sich bei der Mutation E127K des CaSR um eine aktivierende Mutation handelt.

Dazu wurden sowohl die mutierten Rezeptoren (hierunter auch E127K), als auch der Wildtyp in die HEK293-Zellen transfiziert. Nach einer Inkubationszeit wurden die transfizierten Zellen einer steigenden extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ausgesetzt. Im Anschluss wurde die Calciumkonzentration im Zytosol gemessen und ausgewertet. Wie in Kap. X beschrieben, korreliert der Aktivierungsgrad des CaSR mit der Freisetzung intrazellulären Calciums.

Das Ergebnis war, dass die Mutante E127K im Vergleich zum Wildtyp eine geringere extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration für die Hälfte der maximalen intrazellulären Calcium-Antwort benötigte:

- CaSR E127K : $2,9 \pm 0,1 \text{ EC}_{50}$ (mmol/liter), (n=4)
- Wildtyp: $4,1 \pm 0,1 \text{ EC}_{50}$ (mmol/liter), (n=4)

(EC_{50} = Maß der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen bei der die Hälfte der maximalen intrazellulären Calcium- Antwort besteht)

Im Vergleich zum Wildtyp reagiert der CaSR mit der Mutation E127K demnach auf extrazelluläres Ca^{2+} sensibler. Damit erfüllt die Mutation die Voraussetzungen für eine aktivierende Mutation.

4.3.2. CaSR E127A

Die Mutation des CaSR E127A wurde erstmals 1994 von Pollak beschrieben [Pollak 1994]. Pollak führte bei einem Patientenkollektiv von 14 miteinander verwandten Patienten mit Ca^{2+} -Verlustsymptomatik bei 9 Familienmitgliedern eine Mutationsanalyse des CaSR durch. Bei allen 9 Patienten konnte die Mutation E127A im CaSR nachgewiesen werden. Wir wählten diese Mutation zum Vergleich aus, da sie sich an der gleichen Position der Aminosäuresequenz wie die von uns gefundene Mutation E127K befindet und ebenfalls als aktivierende Mutation bekannt ist. Der Unterschied liegt im AS- Austausch der bei E127A im Vergleich zu E127K nicht von Glutamat zu Lysin, sondern von Glutamat nach Alanin besteht. Uns interessierte, wie sich unterschiedliche aktivierende Mutationen an der gleichen AS- Position auswirken. In der graphischen Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit der CaSR-Aktivierung mit der Mutation E127A durch extrazelluläres Ca^{2+} (Abb. 23) erkennt man eine Aktivierung des Rezeptors bei etwa 1mM extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration. Im

Vergleich zum Wildtyp, der bei etwa 2 mM extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration aktiviert wird, reagiert der CaSR mit der Mutation E127A auf extrazelluläres Ca^{2+} sensibler. Der Aktivierungspunkt ist zu der Mutation E127K identisch. Bei Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration steigt dagegen die Kurve der Mutation CaSR E127A im Vergleich zu der Mutation CaSR E127K steiler an. Bei einer extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von 3mM zeigt der Rezeptor mit der Mutation E127A mit einem Wert der Stromamplitude von ca. 10 μA eine fast doppelt so starke Aktivierung wie der Rezeptor mit der Mutation E127K und eine fünf mal so starke Reaktion im Vergleich zum Wildtyp. Außerdem erkennt man hier keine deutliche Abflachung der Kurve. Die Reaktion des mutierten Rezeptors bei einer extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von 10 mM war so stark, dass sie nicht mehr mit unserer Apparatur darzustellen war. Im Unterschied zur Mutation CaSR E127K konnte keine Sättigungstendenz bis zu einer extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von 10mM nachgewiesen werden. Trotz der identischen AS- Position 127 im CaSR reagieren die zwei verschiedenen Mutationen bei höheren extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen unterschiedlich. Interessant ist, dass der Set point der Aktivierung bei beiden Mutationen identisch ist. Vergleicht man nun die klinischen Daten der 14 untersuchten Patienten von Pollak mit denen von uns oder Lienhardt, so findet man hier keine gravierenden Unterschiede. Die Laborwerte des Gesamtkalziums im Serum aller Patienten befinden sich in einem Bereich von 1,8- 2,0 mmol/l. Das heißt unter physiologischen Bedingungen in vivo kommen die Unterschiede der zwei Mutationen nicht zum Tragen. In vivo werden nie extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen von über 5mM erreicht.

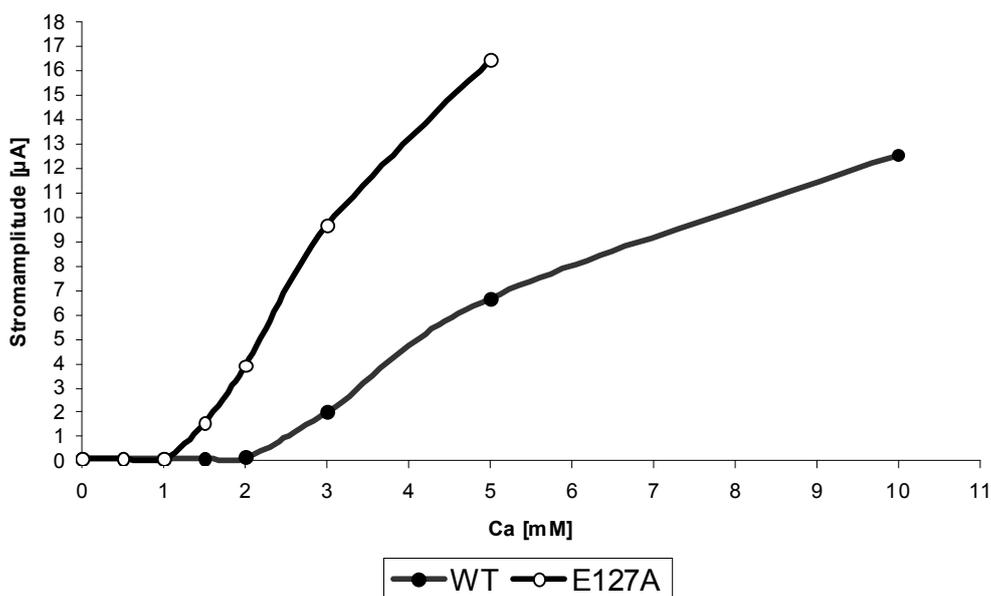


Abb. 23: Konzentrationsabhängigkeit der CaSR-Aktivierung durch extrazelluläres Ca^{2+} am Tag 5 der Expression.

Zur funktionellen Analyse der Mutation E127A im CaSR verwandte Pollak ein Verfahren, bei dem zunächst die mRNA mit der Information der Mutation E127A und die mRNA des Wildtyps in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert wurden. Nach einer Latenzzeit, in der die Expression der Rezeptoren stattfand, setzte Pollak die Oozyten einer steigenden extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von zuerst 0,5mM und dann 5mM aus. Im Anschluss wurde die IP_3 -Konzentration im Zytosol gemessen und ausgewertet. Zur Erinnerung, durch die Aktivierung des CaSR via CaSR-Agonisten kommt es G-Protein vermittelt zu Aktivierung der Phospholipasen C. Die aktivierte Phospholipase C katalysiert die Bildung von Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) aus dem membranständigen Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat (PIP_2). Das heißt die zytosolische IP_3 -Konzentration korreliert mit dem Aktivierungsgrad des CaSR. Pollak konnte in allen Versuchen nach Aktivierung des CaSR durch extrazelluläres Ca^{2+} eine höhere zytosolische IP_3 -Konzentration in den Oozyten mit eingebautem mutierten CaSR im Vergleich zum Wildtyp nachweisen. Tabelle mit Darstellung der Zytosolische IP_3 -Konzentration der Mutante und dem Wildtyp in [pmoles]:

Ca (mM)	Wildtyp	Mutante	p-Wert
0,5	$0,52 \pm 0,14$	$2,46 \pm 0,77$	$< 0,025$
5,0	$6,85 \pm 1,99$	$11,68 \pm 1,47$	0,05

Im Vergleich zum Wildtyp reagiert der CaSR mit der Mutation E127A auf extrazelluläres Ca^{2+} sensibler. Damit erfüllt die Mutation die Voraussetzungen für eine aktivierende Mutation.

4.3.3. CaSR L125P

Die Mutation des CaSR L125P wurde erstmals 1998 von Nakae beschrieben und von Vargas- Poussou 2002 als aktivierende Mutation deklariert [Nakae 1998], [Vargas-Poussou 2002]. Bei der Mutation L125P des CaSR kommt es durch einen Basenaustausch von Thymin nach Cytosin (CTT \rightarrow CCT) zu einem AS- Austausch von Leucin zu Prolin an der Position 125 der AS- Sequenz (L125P). Wir wählten diese Mutation zum Vergleich aus, da sie bis dato als die am stärksten aktivierende Mutation bekannt war. Außerdem zeigte sich bei den Patienten, die Träger der Mutation des CaSR L125P sind, neben der ADH Symptome, die dem Bartter- Syndrom ähnelten. Dazu gehören die Hypokaliämie mit metabolischer Alkalose, eine negative NaCl Bilanz, der Hyperreninismus und der sekundäre Hyperaldosteronismus. Uns

interessierte, ob wir mit unserer Methode die ausgeprägte Sensibilität der CaSR mit der Mutation L125P nachweisen konnten und ob ein Zusammenhang zwischen dieser Mutation und dem Bartter- ähnlichen Syndrom erkennbar ist. Vargas- Poussou transfizierte 2002 sowohl den mutierten Rezeptor L125P als auch den Wildtyp in HEK 293- Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 36 Stunden wurden die transfizierten Zellen nach 30 min. Bad in einer Ringer Lösung mit Fura-2 AM (Molecular Probes, Eugene, OR) steigenden extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen (0- 5mM Ca^{2+}) ausgesetzt. In einem Fluoreszenz- Spectrometer konnte unmittelbar die Emissions- Rate gemessen und im Anschluss ausgewertet werden. Die zu messende Reaktion auf die steigenden extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen korrelierte mit der intrazellulären Freisetzung von Ca^{2+} .

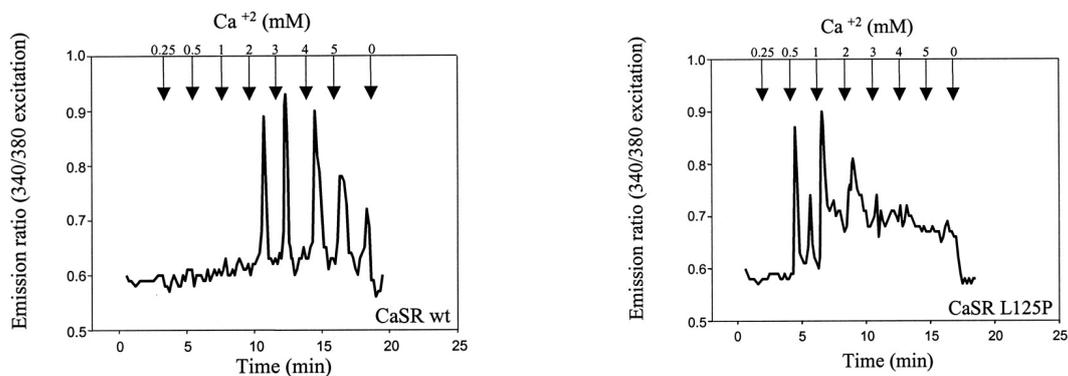


Abb. 24: Fluoreszenz-Antwort der CaSR transfizierten HEK-293 Zellen bei ansteigenden extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen vergleichend Wildtyp mit dem mutierten CaSR (L125P).

In der Konzentrationsabhängigkeit der CaSR- Aktivierung mit der Mutation L125P durch extrazelluläres Ca^{2+} (Abb. 24) erkennt man eine erste Reaktion bei etwa 0,5 mM extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration. Im Vergleich zum Wildtyp, der bei etwa 2 mM extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration aktiviert wird, reagiert der CaSR mit der Mutation L125P auf extrazelluläres Ca^{2+} sensibler. Im Vergleich zu unserem Versuch sind diese Daten fast identisch. In der Konzentrationsabhängigkeit der CaSR- Aktivierung mit der Mutation L125P durch extrazelluläres Ca^{2+} (Abb. 25) erkennt man die primäre Aktivierung des Rezeptors ebenfalls bei etwa 0,5 mM und die des Wildtyps bei 2mM extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration. Im Vergleich zu den beiden anderen von uns untersuchten aktivierenden Mutationen E127A und E127K reagiert der CaSR mit der Mutation L125P somit am sensibelsten auf extrazelluläres Ca^{2+} . Der weitere Verlauf der Kurve bei steigenden extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen der Mutation L125P ist nicht kontinuierlich (Abb. 25). Bei 2mM extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration ist der Wert

der Stromamplitude von ca. 2 μA geringer als bei 1,5mM mit 32 μA . Ab 2mM extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration kommt es bis 3mM zu einer kontinuierlichen Steigerung und dann zur Abflachung der Kurve. Bei 3mM extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration zeigt der CaSR mit der Mutation L125P eine etwa dreifach so starke Reaktion als der Wildtyp, bei 10mM ist die Reaktion mit 12 μA (WT) und 13 μA (L125P) Stromamplitude fast identisch. Abschließend lässt sich feststellen, dass im Vergleich zu den beiden anderen von uns untersuchten aktivierenden Mutationen E127A und E127K der CaSR mit der Mutation L125P bei der niedrigsten extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert wurde (0,5mM), bei höheren extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen über 3mM allerdings die Reaktion des CaSR E127K stärker ausgeprägt war. Das lässt darauf schließen, dass der Set- Point der Aktivierung des Rezeptors eine entscheidende Rolle für die Funktion bzw. Dysfunktion des Rezeptors spielt. Die Patienten die Träger der Mutation des CaSR L125P sind, haben im Vergleich zu den Patienten mit der Mutation des CaSR E127K eine signifikant stärker ausgeprägte Klinik und deutlicher abweichende Laborparameter. Wenn die Klinik nun mit dem Dysfunktionsgrad des CaSR korreliert, wie kann man sich dann erklären, dass die Reaktion der Mutante E127K bei höheren extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen über 3mM ausgeprägter ist als die der Mutante L125P (bei 5mM extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration L125P: 12 μA Stromamplitude; E127K: 17 μA Stromamplitude). Die Laborwerte des Gesamtkalziums im Serum aller Patienten mit der Mutation im CaSR L125P oder E127K befinden sich in einem Bereich bis max. 2,0 mmol/l.

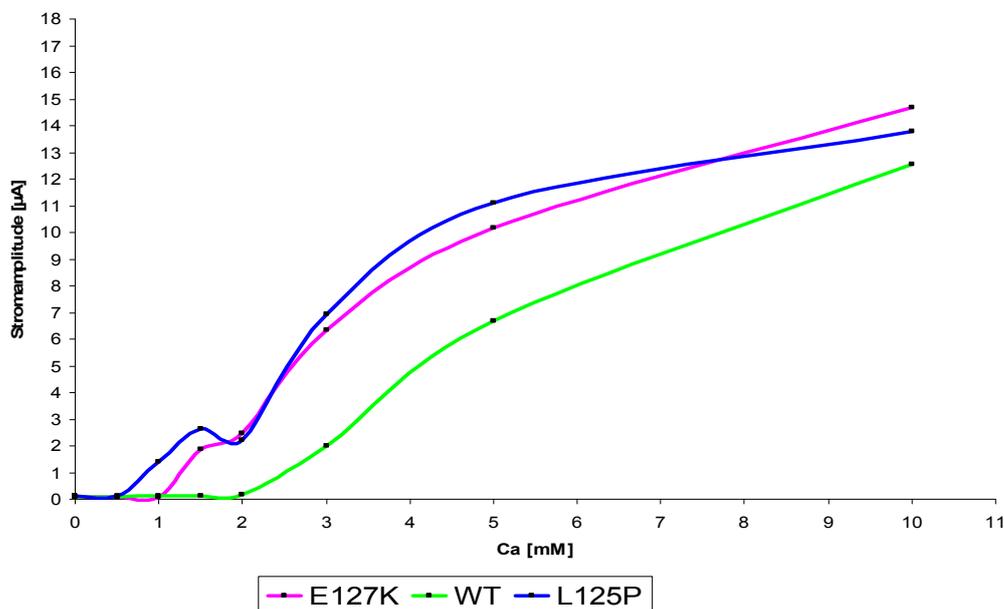


Abb. 25: Konzentrationsabhängigkeit der CaSR-Aktivierung durch extrazelluläres Ca^{2+} am Tag 5 der Expression.

D.h. unter physiologischen Bedingungen *in vivo* werden vermutlich nie extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen von über 5mM erreicht. Der Unterschied zwischen den Mutanten bei extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen über 3mM wie sie *in vitro* nachgewiesen werden können haben vermutlich klinisch keine Relevanz. Der Unterschied der Mutante L125P zu den zwei anderen von uns untersuchten aktivierenden Mutationen liegt in der frühzeitigen Aktivierung. Hier vermuten wir den Schlüssel zur Ausprägung der Dysfunktion des CaSR: Je niedriger der set- point der Aktivierung des CaSR und damit die Sensitivität gegenüber dem Agonisten Ca^{2+} , desto ausgeprägter die Klinik. Entscheidend scheint im Bezug auf die Klinik mehr wann und nicht wie stark der Rezeptor aktiviert wird. Man kann sich vorstellen, dass eine Aktivierung des CaSR bei niedriger Ca^{2+} -Serumkonzentration schon frühzeitig alle in Kapitel 1.2.5. beschriebenen Kaskaden in Gang setzt und damit frühzeitig die Calciumhomöostase beeinflusst und aus dem Gleichgewicht bringt. Den Zusammenhang zwischen der durch eine aktivierende Mutation im CaSR verursachten ADH und dem Bartter- Syndrom sieht Vargas- Poussou in der möglichen Beeinflussung des Pathomechanismus des Bartter Syndroms auf zellulärer Ebene durch die Aktivierung des CaSR. Als Ursache des Bartter-Syndroms zählen Mutationen in den Genen des im TAL zu findenden Na^+ - K^+ - 2Cl^- - Kotransporter (NKCC2), des im TAL luminal gelegenen Kaliumkanals KJN1 (ROMK) und des basolateral gelegenen Chloridkanals CLC-kb (CLCNKB). Vargas- Poussou vermutet eine direkte Inhibition des Na^+ - K^+ - 2Cl^- -Kotransporters oder bzw. und des Kaliumkanals durch Aktivierung des CaSR.

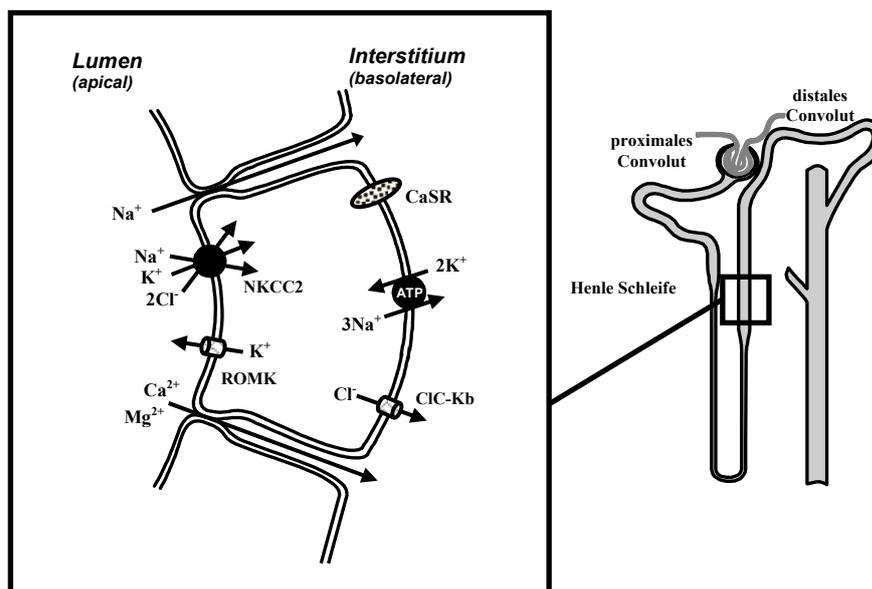


Abb. 26: Schematische Darstellung der Transportvorgänge im cTAL.

Ward unterstützt im gleichen Jahr diese These und vermutet, dass der aktivierte CaSR eine PLA₂ vermittelte Arachidonsäureproduktion erhöht. Katalysiert durch Cytochrom P₄₅₀ könnte ein entstehendes Arachidonsäurederivat wie 20-HETE (20-hydroxyeicosatetraenoic acid) inhibitorisch sowohl auf den NKCC2 als auch auf den Kaliumkanal wirken [Ward et al. 2002]. Wie in Kapitel 1.2.6.3.2. beschrieben ist die treibende Kraft für die Resorption der Elektrolyte im TAL das lumenpositive transepitheliale Potential, welches durch die Resorption von Na⁺, K⁺ und Cl⁻ aus dem Lumen über den Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Transporter (NKCC₂), die Rückdiffusion von K⁺-Ionen ins Lumen und die Aufnahme von Cl⁻-Ionen ins Interstitium über einen basolateral gelegenen Chloridkanal zustande kommt. Wird dieser „Motor“ gehemmt, führt das zu einem Verlust der Elektrolyte wie sie sowohl beim Bartter- Syndrom und dem ADH vorkommen. Unklar ist weiterhin, warum nur bei Trägern der Mutante L125P und nicht bei Trägern anderer aktivierender Mutationen im CaSR Bartter- ähnliche Symptome auftreten.

4.3.4. T138M

Die Mutation des CaSR T138M wurde erstmals 1995 von Chou beschrieben [Chou 1995]. Chou führte bei Mitgliedern aus 22 unverwandten Familien mit möglicher FHH oder NSHPT eine Mutationsanalyse des CASR durch. Die Diagnose FHH basierte auf der Kombination aus symptomloser leichter Hyperkalziämie bei normalen PTH-Werten im Serum. Die Diagnose der FHH wurde durch die Manifestation im Neugeborenenalter, durch eine ausgeprägte Hyperkalziämie, Hypermagnesiämie und hohe PTH- Werte im Serum gestellt. Chou konnte fünf neue Mutationen im CaSR nachweisen, unter anderem auch T138M. Wir wählten diese Mutation zum Vergleich aus, da sie sich wie alle von uns untersuchten Mutationen in der ECD befindet und als inaktivierende Mutation bekannt ist. Bei der Mutation T138M des CaSR kommt es durch einen Basenaustausch von Cytosin nach Thymin (ACG→ATG) zu einem AS-Austausch von Threonin zu Methionin an der Position 138 der AS- Sequenz (T138M). Einen experimentellen Beweis, dass es sich bei der gefundenen Mutation T138M tatsächlich um eine inaktivierende Mutation handelt, welche die Ursache der FHH oder des NSHPT sein könnte, erbrachte Chou 1995 nicht. Dennoch erarbeitete Chou Hinweise auf die Richtigkeit seiner These:

1. Alle von Chou entdeckten Mutationen waren Substitutionsmutationen mit einem einzigen AS- Austausch.
2. Diese Mutationen wurden in der Kontrollgruppe von 50 gesunden Individuen nicht gefunden.
3. Es zeigte sich innerhalb der Familien eine Verbindung zwischen Trägern einer Mutation im CaSR und stärker ausgeprägten Symptomen.

Bai konnte 1996 durch *in vitro* Expression des CaSR in humanen embryonalen Nierenzellen (human embryonic kidney cells 293, HEK293) nachweisen, dass es sich bei der Mutation T138M des CaSR um eine inaktivierende Mutation handelt. Dazu wurden sowohl der mutierte Rezeptor als auch der Wildtyp in die HEK 293-Zellen transfiziert. Nach einer Inkubationszeit wurden die transfizierten Zellen einer steigenden extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ausgesetzt. Im Anschluss wurde die intrazelluläre Calciumkonzentration gemessen und ausgewertet.

Ergebnis des Versuchs war, dass die Mutante T138M im Vergleich zum Wildtyp eine höhere extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration für die Hälfte der maximalen intrazellulären Calcium- Antwort benötigte:

- CaSR T138M: $12,4 \pm 0,4 \text{ EC}_{50} [\text{mM}]$
- Wildtyp: $4,1 \pm 0,1 \text{ EC}_{50} [\text{mM}]$

(EC_{50} = Maß der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen bei der die Hälfte der maximalen intrazellulären Calcium- Antwort besteht)

Im Vergleich zum Wildtyp reagiert der CaSR mit der Mutation T138M auf extrazelluläres Ca^{2+} weniger sensibel. Damit erfüllt die Mutation die Voraussetzungen für eine inaktivierende Mutation. Wir konnten dies mit unserem Verfahren bestätigen:

In der graphischen Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit der CaSR-Aktivierung mit der Mutation T138M durch extrazelluläres Ca^{2+} (Abb. 27) erkennt man eine Aktivierung des Rezeptors bei etwa 3mM extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration. Im Vergleich zum Wildtyp, der bei etwa 2 mM extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration aktiviert wird, reagiert der CaSR mit der Mutation T138M auf extrazelluläres Ca^{2+} weniger sensibel. Bei Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration steigt die Kurve der Mutation CaSR T138M stetig an, eine Sättigungstendenz konnte bis zu einer extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von 10mM nicht nachgewiesen werden. Bei einer extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von 5mM zeigt der Wildtyp im Vergleich zum Rezeptor mit der Mutation T138M eine etwa dreifach so starke Aktivierung.

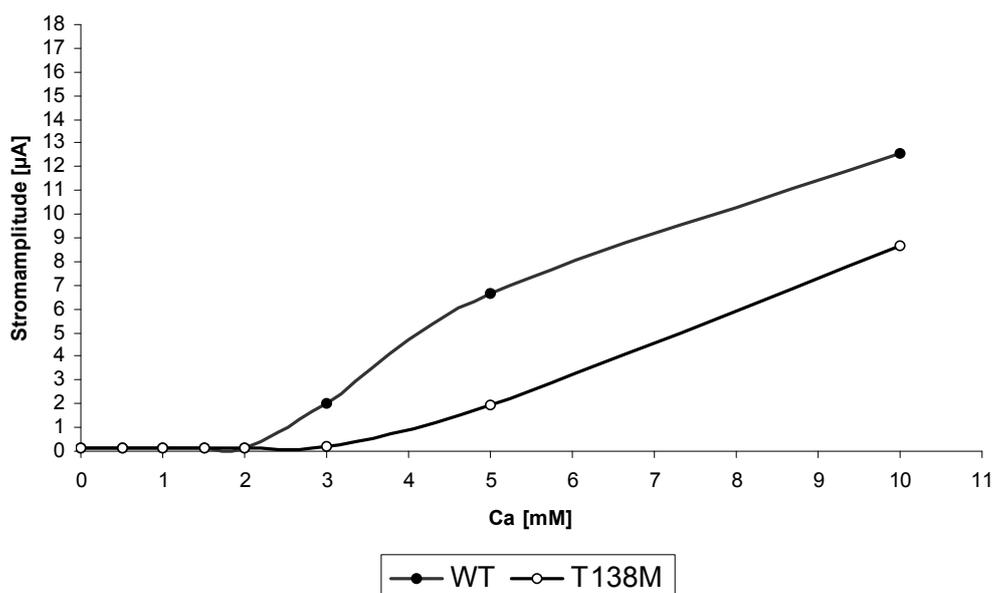


Abb. 27: Konzentrationsabhängigkeit der CaSR-Aktivierung durch extrazelluläres Ca^{2+} am Tag 5 der Expression.

4.4. Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Methode

Die Ergebnisse der Messreihe mit aktivierenden und inaktivierenden Mutationen im CaSR zeigten signifikante Unterschiede im Bezug auf den Aktivierungsgrad der verschiedenen CaSR- Typen (Globaltest der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung, $p < 0,001$). Eine Dysfunktion der mutierten CaSR- Typen und damit eine krankheitsauslösende Bedeutung der Mutationen im CaSR konnte somit nachgewiesen werden.

Den funktionellen Nachweis aktivierender bzw. inaktivierender Mutationen im CaSR erbrachten Lienhardt und Bai, Pollak, und Vargas- Poussou jeweils mit unterschiedlichen Verfahren. Wie schon beschrieben verwandten Lienhardt und auch Bai das gleiche Verfahren, bei dem die intrazelluläre Ca^{2+} - Konzentration gemessen wurde, nachdem die mit den mutierten CaSR transfizierten HEK 293- Zellen steigenden extrazellulären Ca^{2+} - Konzentrationen ausgesetzt waren. Als vergleichbare Größe zeigt sich bei diesem Verfahren das Maß der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, bei der die Hälfte der maximalen intrazellulären Calcium- Antwort besteht (EC_{50}). Auch Vargas- Poussou bediente sich transfizierter HEK 293- Zellen, die ebenfalls extrazellulären Ca^{2+} - Konzentrationen ausgesetzt waren. In einem Fluoreszenz-Spektrometer konnte unmittelbar die Emissions- Rate gemessen und im Anschluss ausgewertet werden. Die zu messende Reaktion auf die steigenden extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen korrelierte mit der intrazellulären Freisetzung von Ca^{2+} .

Pollak verglich die zytosolischen Inositoltriphosphat- Konzentrationen transfizierter *Xenopus laevis* Oozyten nachdem diese steigenden extrazellulären Ca^{2+} - Konzentrationen ausgesetzt waren. Die Entstehung von zytosolischem IP_3 als Folge des durch den CaSR aktivierten intrazellulären Kaskadeweg geschieht noch vor der intrazellulären Ca^{2+} - Freisetzung (siehe Kapitel 1.2.5.). In den beschriebenen Verfahren konnte erstmals die Funktion des CaSR gemessen werden. Bei Dysfunktion des CaSR durch Mutation zeigen alle genannten Verfahren einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp.

Mit unserem Verfahren konnten wir die Ergebnisse von Lienhardt, Bai, Vargas- Poussou und Pollak bestätigen. Wir bewiesen mit der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Methode, dass der CaSR durch aktivierende Mutationen sensibler bzw. durch inaktivierende Mutationen unempfindlicher gegenüber extrazellulärem Ca^{2+} wird.

Im Unterschied zu den Verfahren von Lienhardt, Bai und Pollak ist in dem von uns verwendeten Verfahren die direkte Reaktion auf das extrazelluläre Ca^{2+} in Form von

unmittelbar messbaren Stromamplituden zu sehen. So kann man die Dynamik der Aktivierung des CaSR unmittelbar nach Gabe eines Agonisten beobachten. Bei Lienhardt, Bai und Pollak erfolgt die Auswertung sekundär. Lediglich bei dem Verfahren von Vargas- Poussou ist ebenfalls der zeitbezogene Aktivierungsgrad des CaSR im Fluoreszenz- Spectrometer zu sehen. Was für ein Vorteil könnte die unmittelbar messbare Reaktion des CaSR auf Agonisten im Vergleich zu den beschriebenen Verfahren von Lienhardt, Bai und Pollak haben?

Voraussehend lässt sich in der Durchführung der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Methode vorstellen, dass man eine Vielzahl an Agonisten im Verlauf eines Versuches testen kann. Eine Darstellung der Interaktion von Agonisten und Medikamenten ist ebenfalls denkbar. Konzentrationen von möglichen Agonisten, bei denen der CaSR gerade aktiviert oder sogar gehemmt wird, kann man schnell erfassen. Da sowohl die *Xenopus laevis* Oozyten als auch die HEK 293- Zellen nach Transfizierung nur eine gewisse Zeit zur Messung verwendbar sind, spielt der Faktor Zeit in der Erforschung der Funktionalität des CaSR eine wichtige Rolle. Dynamische Verfahren wie die Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Methode bieten hier große Vorteile und ein großes Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten.

5. Zusammenfassung

Der Calcium sensing Receptor (CaSR) ist ein gegenüber extrazellulärem Ca^{2+} sensibler G- Protein gekoppelter Rezeptor, der in allen für die $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ - Homöostase entscheidenden Organen des Körpers exprimiert wird. So ist er in den Epithelkörperchen der NSD, den C-Zellen der SD, dem Tubulären System der Niere [Brown et al. 2001] und den Mukosazellen des Gastrointestinaltraktes nachgewiesen worden [Kirchhoff 2006]. Der CaSR wird durch einen Konzentrationsanstieg von extrazellulärem Ca^{2+} aktiviert und initialisiert G-Protein (= Guanyl-bindendes Peptid) vermittelt eine intrazelluläre second messenger Kaskade. Mit dieser intrazellulären Antwort greift der CaSR regulativ auf zwei Ebenen in die $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ - Homöostase ein. Erstens wird die Freisetzung von PTH gehemmt und die Sekretion von Calcitonin gefördert. Zweitens wird in der Niere die Rückresorption von Calcium aus dem Ultrafiltrat gehemmt. Das heißt, dass bei zunehmender extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Aktivierung des CaSR über das vermehrte Ausscheiden von Ca^{2+} über den Urin und Hemmung der PTH-Inkretion einem Anstieg der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration entgegenwirkt [Brown et al. 2001]. Wichtig ist in der Regulation der $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ - Homöostase durch den CaSR der Punkt (set point), d.h. die Konzentration an extrazellulären Agonisten, bei der die Aktivierung des CaSR einsetzt. Der set point ist entscheidend für die Funktion des Rezeptors. Bei Dysfunktion des CaSR kommt die Regulation der $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ - Homöostase aus dem Gleichgewicht. Eine erhöhte Sensitivität des CaSR mit erniedrigtem set point führt zu einer $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Verlustsymptomatik, eine verminderte Sensitivität zu einer Hyperkalziämie. Heute weiß man, dass Mutationen im CaSR- Gen (CASR) zu Dysfunktionen des Rezeptors führen. Mutationen im CASR führen zur Veränderung der Tertiärstruktur des Proteins und damit zur Dysfunktion des Rezeptors. Bekannt sind aktivierende Mutationen, die zu einer erhöhten Sensitivität des Rezeptors führen und inaktivierende Mutationen, welche mit einer erniedrigten Sensitivität des Rezeptors einhergehen. Drei Erkrankungen sind mit dem CaSR assoziiert, der Hypokalzämische Hypoparathyreoidismus (autosomal dominant hypocalcemia, ADH), die Familiäre benigne hypokalziurische Hyperkalziämie (FHH) und der Neonatale Hyperparathyreoidismus (Neonatal severe hyperparathyroidism, NSHPT).

Bei den vom Hypokalzämischen Hypoparathyreoidismus betroffenen Individuen kommt es neben einer hyperkalziurischen Hypokalziämie mit Polyurie zum hypokalzämischen

Hypoparathyreoidismus mit verminderten PTH- Werten im Serum. In etwa der Hälfte der Fälle kommt es darüber hinaus zur Hypomagnesiämie [Pearce et al. 1996].

Individuen, die unter der Familiären benignen hypokalziurischen Hyperkalziämie (FHH) leiden, weisen eine lebenslange, meist symptomlose, leichte Hyperkalziämie (gewöhnlich nicht mehr als 10% über dem Normwert) bei normalen PTH- Werten im Serum auf. Der Neonatale Hyperparathyreoidismus (Neonatal severe hyperparathyroidism, NSHPT) manifestiert sich schon in der Neugeborenenzeit und ist gekennzeichnet durch eine ausgeprägte Hyperkalziämie, Hypermagnesiämie, Epithelkörperchenhyperplasie, hohe PTH- Werte im Serum, Knochendemineralisation, Hypotonie und Ateminsuffizienz [Blair et al. 1991]. Ohne Intervention und Entfernung der Epithelkörperchen ist der Verlauf der Erkrankung in der Regel letal [Pollak et al. 1994b].

Fragestellung:

Die vorliegende Arbeit setzt sich mit angeborenen Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Verlusterkrankungen der Niere auseinander. In einem ersten Schritt wurden molekulargenetische Untersuchungen einer Patientengruppe durchgeführt, die alle unter renalen $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Verlusten litten. Die Patienten wurden aus einem Patientenkollektiv übernommen, bei denen sich der initiale Verdacht der Familiären Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose (FHHNC) nicht bestätigt hatte. Die Ursache der $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Verlustsymptomatik der Patienten war also unklar. In der Literatur beschriebene Zusammenhänge zwischen Mutationen im CaSR- Gen und $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Verlustsymptomen [Brown et al. 1995] führten zu der Vermutung, dass die Ursache der Symptome in einer Dysfunktion des CaSR infolge einer aktivierenden Mutation liegen könnte. Ziel der Untersuchung war es also, eine aktivierende Mutation im CaSR- Gen dieser Patienten zu finden oder auszuschließen.

Von besonderem Interesse schien hierbei die Frage, ob und wie aktivierende Mutationen die $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ - Homöostase beeinflussen. So befasst sich die Arbeit im zweiten Abschnitt, nach Anwendung von Mutagenese und der Messverfahren durch die Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp Methodik, mit der Beweisführung genotypischer Ursachen für die phänotypischen Symptome der CaSR assoziierten Erkrankungen. Hierbei wurden die Folgen sowohl aktivierender als auch inaktivierender Mutationen im CaSR- Gen mit denen des Wildtyps verglichen.

Die Frage war zunächst, ob es sich bei der von uns gefundenen Mutation CaSR E127K tatsächlich um eine aktivierende Mutation handelt, die als Ursache für die $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Verlustsymptomatik des Patienten zu werten wäre. Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob sich mit der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Methode Unterschiede zwischen aktivierenden und inaktivierenden Mutationen im Vergleich zum Wildtyp nachweisen lassen. Es sollte hiermit die krankheitsauslösende Bedeutung der Mutationen im CASR dargestellt werden. Dazu wählten wir aus der Literatur bekannte aktivierende (CaSR E127K, CaSR E127A, CaSR L125P) und inaktivierende (CaSR T138M) Mutationen aus, die mit Hilfe der Mutagenese in *Xenopus laevis* Oozyten transfiziert wurden. Die transfizierten *Xenopus laevis* Oozyten wurden nach einer Inkubationszeit steigenden extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen ausgesetzt und die Auswirkungen mit der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Methode erfasst. Während der Messung wurde die Oozyte in der Messkammer ständig mit der jeweils benötigten Lösung umspült. Die Ca^{2+} -Konzentration der CaCl_2 -Lösungen betrug anfänglich 0,5 mM und steigerte sich über 1 mM, 1,5mM, 2mM, 3mM, und 5mM zu letztlich 10mM. Eine komplette Untersuchung für eine der jeweiligen Mutationen beinhaltete die Messung von mindestens sieben Oozyten in denen der jeweilig klonierte CaSR exprimiert war. Von den Versuchsergebnissen einer Messreihe wurden Mittelwerte bestimmt und statistischen ausgewertet.

Ergebnisse und Schlussfolgerungen:

In der vorliegenden Arbeit konnten zwei Mutationen und zwei Polymorphismen identifiziert werden. Die zwei unterschiedlichen Polymorphismen (CaSR G990R und CaSR A986S) wurden bei vier verschiedenen Patienten gefunden. Bei den entdeckten Mutationen handelt es sich um eine heterozygote neu aufgetretene Substitutionsmutation (CaSR E127K) und um eine neutrale Mutation (silent mutation, CaSR P747P), welche unter klinischen oder phänotypischen Aspekten von keiner weiteren Bedeutung war. Bei 26 von 27 Patienten konnte eine Mutation im CaSR als Ursache der $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Verlustsymptomatik ausgeschlossen werden.

Die Mutation des CaSR E127K ist bereits als aktivierende Mutation aus der Literatur bekannt und wurde erstmals von Lienhard et al. 2001 beschrieben.

In der Auswertung der Ergebnisse der Messreihen durch die Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Methode konnten wir nachweisen, dass die von uns untersuchten aktivierenden Mutationen tatsächlich eine erhöhte Sensitivität gegenüber extrazellulärem Ca^{2+} im Vergleich zum Wildtyp hatten. Der set point war bei allen Mutationen im Vergleich zum Wildtyp erniedrigt. Die beginnende Aktivierung (set point) der Mutation E127K des Rezeptors konnte bei etwa 1mM extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Wildtyp, der bei etwa 2 mM extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration aktiviert wird, reagiert der CaSR mit der Mutation E127K auf extrazelluläres Ca^{2+} sensibler. Damit erfüllt die von uns gefundene Mutation die Voraussetzungen für eine aktivierende Mutation.

Der Rezeptor mit der Mutation CaSR E127A wurde ebenfalls bei etwa 1mM extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration aktiviert. Der set point der Mutante CaSR L125P lag bereits bei etwa 0,5 mM extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration.

Neben den drei aktivierenden Mutationen konnten wir auch bei der inaktivierenden Mutation CaSR T138M nachweisen, dass der so mutierte CaSR eine erniedrigte Sensitivität gegenüber extrazellulärem Ca^{2+} im Vergleich zum Wildtyp aufwies. Eine Aktivierung des Rezeptors mit der Mutation CaSR T138M konnte bei etwa 3mM extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Wildtyp reagierte die Mutante damit auf extrazelluläres Ca^{2+} weniger sensibel. Die Ergebnisse der Messreihe mit aktivierenden und inaktivierenden Mutationen im CaSR zeigten signifikante Unterschiede im Bezug auf den Aktivierungsgrad der verschiedenen CaSR-Typen (Globaltest der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung, $p < 0,001$). Eine Dysfunktion der mutierten CaSR-Typen und damit eine krankheitsauslösende Bedeutung der Mutationen im CASR konnte somit nachgewiesen werden.

6. Literaturverzeichnis

Baron J, Winer KK, Yanovski JA, Cunningham AW, Laue L, Zimmerman D, Cutler Jr GB: *Mutations in the Ca^{2+} -sensing receptor gene cause autosomal dominant and sporadic hypoparathyroidism*. Hum Mol Genet 1996; 5: 601–606

Benigno V, Canonica CS, Bettinelli A, von Vigier RO, Truttmann AC, Bianchetti MG: *Hypomagnesaemia-hypercalciuria-nephrocalcinosis: a report of nine cases and a review*. Nephrol Dial Transplant 2000; 15: 605–610

Blair JW, Carachi R: *Neonatal primary hyperparathyroidism-a case report and review of the literature*. Eur J Pediatr Surg 1991; 1: 110–114

Blanchard A, Jeunemaitre X, Coudol P, Dechaux M, Froissart M, May A, Demontis R, Fournier A, Paillard M, Houillier P: *Paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle*. Kidney Int 2001; 59: 2206–2215

Brown EM: *Extracellular Ca^{2+} sensing, regulation of parathyroid cell funktion, and role of Ca^{2+} and other Ions as extracellular (first) messenger*. Physiol. Rev. 1991;71:371-411

Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi D, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC: *Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} – sensing receptor from bovine parathyroide*. Nature 1993;366:575-580

Brown EM, Pollak M, Seidman CE, Seidman JG, Chou YH, Riccardi D, Hebert SC: *Calcium-ion-sensing cellsurface receptors*. NEJM. 1995;333:234-240

Brown EM, MacLeod J: *Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling*. Physiol Rev. 2001 Jan;81(1):239-297

Cetani F, Pardi E, Borsari S, Tonacchera M, Morabito E, Pinchera A, Marcocci C, Dipollina G: *Two Italian kindreds with familial hypocalciuric hypercalcaemia caused by loss-of-function mutations in the calcium-sensing receptor (CaR) gene: functional characterization of a novel CaR missense mutation*. Clin Endocrinol (Oxf). 2003 Feb;58(2):199-206

Chakrabarty S, Wang H, Canaff L, Hendy GN, Appelman H, Varani : *Calcium sensing receptor in human colon carcinoma: interaction with $Ca(2+)$ and 1,25-dihydroxyvitamin D(3)*. Cancer Res. 2005 Jan 15;65(2):493-8

Chattopadhyay N, Brown EM: *Cellular "sensing" of extracellular calcium ($Ca(2+)(o)$): emerging roles in regulating diverse physiological functions*. Cell Signal. 2000 Jun;12(6):361-366

Chou YH, Pollak MR, Brandi ML, Toss G, Arnqvist H, Atkinson AB, Papapoulos SE, Marx S, Brown EM, Seidman JG, Seidman CE: *Mutations in the human Ca²⁺-sensing-receptor gene that cause familial hypocalciuric hypercalcemia*. Am J Hum Genet 1995; 56: 1075–1079

Conley YP, Finegold DN, Peters DG, Cook JS, Oppenheim DS, Ferrell RE: *Three novel activating mutations in the calcium-sensing receptor responsible for autosomal dominant hypocalcemia*. Mol Genet Metab 2000; 71:591–598

De Luca F, Ray K, Mancilla EE, Fan GF, Winer KK, Gore P, Spiegel AM, Baron J: *Sporadic hypoparathyroidism caused by de novo gain-of-function mutations of the Ca²⁺-sensing receptor*. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82:2710–2715

Doroszewicz J, Waldegger P, Jeck N, Seyberth H, Waldegger S: *pH dependence of extracellular calcium sensing receptor activity determined by a novel technique*. Kidney International 2005; 67:187-192

Doumith R, Ullmann A, Biclet P, Rieu M, Dubost CL: *Syndrom d'hypercalcemic-hypocalciurie: une cause meconnue d'hypercalcemia*. Nouv Press Med 1980; 9:1157-1158

D'Souza-Li L, Cole DEC, Goodyer PR, Rozen R, Juppner H, Hendy GN: *Novel calcium-sensing receptor mutations in familial hypocalciuric hypercalcemia and autosomal dominant hypocalcemia*. Am J Hum Genet 1998; 63S:2070 (Abstract)

Janicic N, Soliman E, Pausova Z, Seldin MF, Riviere M, Szpirer J, Szpirer C, Hendy GN: *Mapping of the calcium-sensing gene (CASR) to human chromosome 3q13.3-21 by fluorescence in situ hybridization, and localization to rat chromosome 11 and mouse chromosome 16*. Mammalian Genome 1995; 6: 798-801

Jensen AA, Bräuner-Osborne H: *Allosteric Modulation of the Calcium-Sensing Receptor*. Current Neuropharmacology 2007; 5:180-186

Halliwel JV, Plant TD, Staden NB: *Microelectrode techniques and plant cells*. In Staden NB, Gray PTA, Whitaker, eds. Microelectrode techniques 1987, The company of biologists, Cambridge, England; 13- 28

Hammond CM, White D, Tomic J, Shi Y, Spaner DE: *Extracellular calcium sensing promotes human B-cell activation and function*. Blood 2007 Dec 1;110(12):3985-95

Heath DA: *Familial benign hypercalcemia*. TEM 1989; 1:6-9

Hebert SC, Brown EM, Harris HW: *Role of the Ca(2+)-sensing receptor in divalent mineral ion homeostasis*. J Exp Biol. 1997 Jan; 200 (Pt 2):295-302

Hendy, G. N.; D'Souza-Li, L.; Yang, B.; Canaff, L.; Cole, D. E. C. : *Mutations of the calcium-sensing receptor (CASR) in familial hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia*. Hum. Mutat. 2000; 16: 281-296

- Hinnie J, Bell E, McKillop E, Gallacher S: *The prevalence of familial hypocalciuric hypercalcemia*. *Calcif Tissue Int* 2001; 68: 216–218
- Hirai H, Nakajima S, Miyauchi A, Nishimura K, Shimizu N, Shima M, Michigami T, Ozono K, Okada S: *A novel activating mutation (C129S) in the calcium-sensing receptor gene in a Japanese family with autosomal dominant hypocalcemia*. *J Hum Genet* 2000; 46:41–44
- Ho C, Conner DA, Pollak MR, Ladd DJ, Kifor O, Warren HB, Brown EM, Seidman JG, Seidman CE: *A mouse model of human familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism*. *Nat Genet* 1995; 11: 389–394
- Huang Y, Zhou Y, Castiblanco A, Yang W, Brown EM, Yang JJ: *Multiple Ca^{2+} -Binding Sites in the Extracellular Domain of the Ca^{2+} -Sensing Receptor Corresponding to Cooperative Ca^{2+} -Response*. *Biochemistry* 2009; 48:388-398
- Inoue D, Saika M, Ikeda Y, Matsumoto T: *Successful treatment of hypoparathyroidism caused by a novel calcium-sensing mutation with thiazide diuretics and low dose alfacalcidol*. *Bone* 1998; 23S:S382
- Kirchhoff P, Geibel JP: *Role of calcium and other trace elements in the gastrointestinal physiology*. *World J Gastroenterol*. 2006 May 28;12(20):3229-36
- Konrad M, Weber S: *Angeborene Magnesiumverlustkrankungen*. *Deutsches Ärzteblatt* 2002; Jg.99; 18:A1230-A1238
- Konrad M, Vollmer M, Lemmink HH, Van Den Heuvel LPWJ, Jeck N, Vargas-Poussou R, Lakings A, Ruf R, Deschenes G, Antignac, Guay-Woodford L, Knoers NVAM, Seybert HW, Feldmann D, Hildebrandt F : *Mutations in the Chlorid Channal Gene *CLCNKB* as a Cause of Classic Bartter Syndrome*. *J Am Soc Nephrol* 2000 ; 11 :1449-1459
- Law WM Jr, Heath H 3rd: *Familial benign hypercalcemia (hypocalciuric hypercalcemia)*. *Clinical and pathogenetic studies in 21 families*. *Ann Intern Med* 1985; 102: 511–519
- Lienhardt A, Bai M, Lagarde JP, Rigaud M, Zhang Z, Jiang Y, Kottler ML, Brown EM, Garabédian M: *Activating Mutations of the Calcium-Sensing Receptor: Management of Hypocalcemia*. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5313–5323
- Lienhardt A, Garabédian M, Bai M, Sinding C, Zhang Z, Lagarde JP, Boulesteix J, Rigaud M, Brown EM, Kottler ML: *A large homozygous or heterozygous in-frame deletion within the calcium-sensing receptor's carboxylterminal cytoplasmic tail that causes autosomal dominant hypocalcemia*. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:1695–1702
- Mancilla EE, De Luca F, Ray K, Winer KK, Fan GA, Baron J: *A Ca^{2+} -sensing receptor mutation causes hypoparathyroidism by increasing receptor sensitivity to Ca^{2+} and maximal signal transduction*. *Pediatr Res* 1997; 42:443–447

- Marx SJ, Attie MF, Levine MA, Spiegel AM, Downs RW Jr, Lasker RD: *The hypocalciuric or benign variant of familial hypercalcemia: clinical and biochemical features in fifteen kindreds*. *Medicine* 1981; 60: 397–412
- Michelis MF, Drash AL, Linarelli LG, De Rubertis FR, Davis BB: *Decreased bicarbonate threshold and renal magnesium wasting in a sibship with distal renal tubular acidosis. (Evaluation of the pathophysiological role of parathyroid hormone)*. *Metabolism* 1972; 21: 905–920
- Nakae J, Shinohara N, Tanahashi Y, Murashita M, Abe S, Hasegawa T, Hasegawa Y, Fujieda K: *New mutations of calcium-sensing receptor gene in two Japanese patients with sporadic hypoparathyroidism with hypercalciuria*. *Horm Res (Suppl)* 1998; 48:179
- Okazaki R, Chikatsu N, Nakatsu M, Takeuchi Y, Ajima M, Miki J, Fujita T, Arai M, Totsuka Y, Tanaka K, Fukumoto S: *A novel activating mutation in calcium-sensing receptor gene associated with a family of autosomal dominant hypocalcemia*. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:363–366
- Pearce SH, Williamson C, Kifor O, Bai M, Coulthard MG, Davies M, Lewis-Barned N, McCredie D, Powell H, Kendall-Taylor P, Brown EM, Thakker RV: *A familial syndrome of hypocalcemia with hypercalciuria due to mutations in the calcium-sensing receptor*. *N Engl J Med* 1996; 335:1115–1122
- Perry YM, Finegold DN, Armitage MM, Ferrell RE: *A missense mutation in the Ca sensing receptor causes familial autosomal dominant hypoparathyroidism*. *Am J Hum Genet* 55 (Suppl) 1994:A17 (Abstract)
- Pollak MR, Brown EM, Estep HL, McLaine PN, Kifor O, Park J, Hebert SC, Seidman CE, Seidman JG: *Autosomal dominant hypocalcemia caused by a Ca^{2+} -sensing receptor gene mutation*. *Nat Genet* 1994a; 8:303–307
- Pollak MR, Chou YH, Marx SJ, Steinmann B, Cole DEC, Brandi M, Seidman JG: *Familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. Effects of mutant gene dosage on phenotype*. *J Clin Invest* 1994b; 93: 1108–1112
- Praga M, Vara J, Gonzalez-Parra E, Andres A, Alamo C, Araque A, Ortiz A, Rodicio JL: *Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis*. *Kidney Int* 1995; 47: 1419–1425
- Quamme GA: *Renal magnesium handling: new insights in understanding old problems*. *Kidney Int* 1997; 52: 1180–1195
- Sato K, Nakae J, Okuhara K, Abe S, Tajima T, Hasegawa Y, Fujida K: *New mutations of Ca^{2+} -sensing receptor gene in two Japanese patients with sporadic forms of hypoparathyroidism and hypercalciuria*. *Proceedings of the 81st Annual Meeting of The Endocrine Society, San Diego, CA, 1999; Abstract P3-42*
- Seybert HW: *An improved terminology and classification of Bartter- like syndromes*. *Nat Clin Pract Nephrol* 2008; 4(10):560-567

Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP: *Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption*. Science 1999; 285: 103–106

Stechman MJ, Loh NY, Thakker RV: *Genetic causes of hypercalciuric nephrolithiasis*. Pediatr Nephrol 2008 ; DOI 10.1007/s00467-008-0807-0

Vargas-Poussou R, Huang C, Hulin P, Houillier P, Jeunemaitre X, Paillard M, Planelles G, Dechaux M, Miller T, Antignac C : *Functional Characterization of a Calcium-Sensing Receptor Mutation in Severe Autosomal Dominant Hypocalcemia with a Bartter-Like Syndrome* Journal of the American Society of Nephrology 2002; 13:2259-2266

Ward DT, Riccardi D: *Renal physiology of the extracellular calcium-sensing receptor*. Pflugers Arch - Eur J Physiol 2002; 445(2):169-76

Watanabe T, Bai M, Lane CR, Matsumoto S, Minamitani K, Minagawa M, Niimi H, Brown EM, Yasuda T: *Familial hypoparathyroidism: identification of a novel gain-of-function mutation in transmembrane domain 5 of the calcium-sensing receptor*. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83:2497–2502

Watanabe T, Fukumoto S, Chang H, Takeuchi Y, Hasegawa Y, Okazaki R, Chikatsu N, Fujita T: *Association between activating mutations of calcium-sensing receptor and Bartter's syndrome*. Lancet 2002; 360:692-694

Weber S, Hoffmann K, Jeck N, Saar K, Boeswald M, Kuwertz-Broeking E, Meij II, Knoers NV, Cochat P, Sulakova T, Bonzel KE, Soergel M, Manz F, Schaerer K, Seyberth HW, Reis A, Konrad M: *Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis maps to chromosome 3q27 and is associated with mutations in the PCLN-1 gene*. Eur J Hum Genet 2000; 8: 414–422

Weber S, Schneider L, Peters M, Misselwitz J, Ronnefarth G, Boswald M, Bonzel KE, Seeman T, Sulakova T, Kuwertz-Broeking E, Gregoric A, Palcoux JB, Tasic V, Manz F, Scharer K, Seyberth HW, Konrad M: *Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis*. J Am Soc Nephrol 2001; 12: 1872–1881

Yamamoto M, Akatsu T, Nagase T, Ogata E: *Comparison of hypocalcemic hypercalciuria between patients with idiopathic hypoparathyroidism and those with gain-of-function mutations in the calcium sensing receptor: is it possible to differentiate the two disorders?* J Clin Endocrinol Metab 2000; 85:4583–4591

Zhao XM, Hauache O, Goldsmith PK, Collins R, Spiegel AM: *A missense mutation in the seventh transmembrane domain constitutively activates the human Ca²⁺ receptor*. FEBS Lett 1999; 448:180–184

