

**Funktionelle Charakterisierung einer neuartigen Mutation  
des Calcium-Sensing-Rezeptors bei Patienten  
mit Autosomal-Dominanter Hypocalcämie**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**Natalia Baran**  
aus Strzelin/Polen  
2015

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr.med. U. Schmitz
2. Gutachter: Prof. Dr. med. N. Werner

Tag der Mündlichen Prüfung: 09.03.2015

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
Ehem. Direktor: Prof.Dr.med. T. Sauerbruch  
Amtierender Direktor: Prof. Dr. med. Strassburg

Diese Arbeit ist meinen Eltern  
Helena und Włodzimierz Baran  
gewidmet,  
die mir immer zur Seite standen  
und mir mein Studium ermöglichten.



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>11</b>
1.1 Einführung	11
1.2 Calciumhomöostase	12
1.2.1 Calcium	12
1.2.2 Die Rolle des CaSR	12
1.2.3 Das CaSR-Gen	13
1.2.4 Proteinstruktur des CaSR	13
1.2.5 CaSR-Signalkaskade	15
1.2.6 Funktion	17
1.2.7 Hormonelle Regulation des Calciumhaushalts	18
1.2.7.1 Parathormon	18
1.2.7.2 Calcitonin	19
1.2.7.3 Vitamin D	19
1.2.8 Hypoparathyreoidismus und Pseudohypoparathyreoidismus	20
1.2.9 Genetische Störungen des CaSR	23
1.2.9.1 Hypocalcämischer Hypoparathyreoidismus	24
1.2.9.2 Familiäre benigne hypocalciurische Hypercalcämie	26
1.2.9.3 Neonataler Hyperparathyreoidismus	26
1.2.9.4 Familiäre Hypomagnesiämie mit Hypercalciurie und Nephrocalcinose	27
1.2.9.5 Bartter-Syndrom	28
1.2.10 Therapie	29
<b>2. Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>35</b>
<b>3. Material</b>	<b>37</b>
3.1 EDV	37
3.2 Geräte	37
3.3 Verbrauchsmaterialien	38
3.4 Chemikalien	38
3.5 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	38
3.6 Reaktionssysteme (Kits)	38
3.7 Verwendete Bakterienstämme, Plasmide, Ziellinien	38
3.7.1 <i>Escherichia coli</i>	38
3.7.2 Zelllinien	39

3.7.3	Plasmide	39
3.8	Molekulargewichtsstandards	40
3.9	Verwendete Enzyme	40
3.10	Primer	40
3.11	Lösungen und Puffer	42
3.12	Nährmedien	43
3.12.1	Medien für Bakterien	43
3.12.2	Medien und Lösungen für Zellkultur	44
<b>4.</b>	<b>Methoden</b>	<b>45</b>
4.1	Direkte Sequenzierung des CASR	45
4.2	Molekularbiologische Methoden	45
4.2.1	Handhabung von Bakterienstämmen und Transformation von E. coli	45
4.2.2	Ortsspezifische Mutagenese	46
4.2.3	Sequenzierung von Plasmid-DNA	47
4.2.4	Auswertung der Nukleotid- und Proteinsequenzen	47
4.2.5	Plasmidisolierung	48
4.2.5.1.	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	48
4.2.5.2.	Midi- und Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	49
4.2.6	Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen	50
4.2.7	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	50
4.2.8	Aufkonzentration der Plasmid-DNA	51
4.2.9	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	51
4.3	Zellbiologische Methoden	52
4.3.1	Auftauen und Revitalisieren von HEK293-Zellen	52
4.3.2	Passagieren von HEK293-Zellen	52
4.3.3	Transfektion von Zellen	53
4.3.4	Passagieren von Zellen für die Immundetektion	53
4.3.5	Passagieren von Zellen für die Analyse der Signalwege	54
4.3.6	Messung des intrazellulären Calciums	54
4.3.7	Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen	55
4.4	Proteinbiologische Methoden	56
4.4.1	Gewinnung der Proteinlysate	56
4.4.2	Proteinbestimmung	56
4.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen	57
4.4.4	Western-Blot-Analyse	58
4.5	Proteinbiologische Methoden	59
4.5.1	Immunfluoreszenz, Zellfärbungen, Fluoreszenzmikroskopie	59

<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>60</b>
5.1	Klinische Angaben zu den Patienten	60
5.2	Sequenzanalyse des CASR	62
5.3	Ortsspezifische Mutagenese und Nachweis der Plasmide	63
5.4	Nachweis des CaSR durch Immunfluoreszenz	65
5.5	Nachweis des CaSR in der Western-Blot-Analyse	66
5.6	Intrazelluläre Detektion von mobilisiertem Calcium	67
5.7	Aktivierung der MAP-Kinasen durch den Wildtyp- und den P136L-CaSR	68
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>71</b>
6.1	Charakteristika des Patientenkollektivs	71
6.2	CASR-Sequenzanalyse	73
6.3	Nachweis des CaSR durch Immunfluoreszenz	74
6.4	Intrazelluläre Detektion von mobilisiertem Calcium	74
6.5	Aktivierung der MAPK durch wt-CaSR und P136L-CaSR	75
6.6	Ausblick	76
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>77</b>
<b>8.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>9.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>82</b>
<b>10.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>104</b>
<b>12.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>105</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$[Ca^{2+}]_o$	extrazelluläres Calcium
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläres Calcium
1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin D <sub>3</sub>	1,25-Dihydroxycholecalciferol
25-(OH)-Vitamin D <sub>3</sub>	25-Hydroxy-Vitamin D <sub>3</sub>
ACTH	Adrenocortikotropes Hormon
AD	autosomal dominant
ADH	Adiuretin
ADH	Autosomal dominante Hypocalcämie
Al <sup>3+</sup>	Aluminiumion
APECED	Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy
AR	autosomal rezessiv
ATP	Adenosintriphosphat
Ba <sup>2+</sup>	Bariumion
bp	Basen Paar
BS	Bartter-Syndrome
Ca <sup>2+</sup>	Calciumion
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CaSR	Calcium- Sensing- Receptor
CASR	Calcium- Sensing- Receptor- Gen
CCT	Kopf Computertomographie
Cl	Chlorid- Ion
CMV	Cytomegalovirus
Cr	Creatinin
Ct	Calcitonin
cTAL	dicker Schenkel der Henle'schen Schleife
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
ECD	extrazelluläre Domäne
ECL	extrazelluläre Schlingen
ED	Erst Diagnose
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FHH	Familiäre benigne hypokalziurische Hyperkalziämie



FHHNC	Familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose
Gd <sup>3+</sup> ,	Gadoliniumion
GH	Somatotropin, Wachstumshormon
G <sub>i</sub>	inhibitorisches G-Protein
GNAS-1	Gen für die Einheit alfa der G-Protein
GPCR	G- Protein gekoppelter Rezeptor
G <sub>q/11</sub> , G <sub>i/o</sub> , G <sub>12/13</sub> , G <sub>s</sub>	G-Proteine
GS	Gitelman- Syndrom
GTP	Guanosintriphosphat
H <sup>+</sup>	Wasserstoff- Ion
HP	Hypoparathyreoidismus
HPS	Hyperprostaglandin-E-Syndrom
ICD	intrazelluläre Domäne
ICL	intrazellulären Schlingen
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
kb	Kilobasenpaare
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen
MELAS	Mitochondriale Encephalomyopathie, Lactatacidose, Schlaganfall-ähnliche Episoden
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium- Ion
mM	Milimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Na <sup>+</sup>	Natrium- Ion
NSHPT	neonatal severe hyperparathyroidism
OD	Optische Dichte
PCLN1	Gens für Paracellin-1,
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E2
PHP	Pseudohypoparathyreoidismus
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PNS	Peripheres Nervensystem

PTH	Parathormon
rpm	Rotation pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standart deviation
TM	transmembranen Schleifen
TMD	transmembranäre Domäne
ZNS	zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

### 1.1 Einführung

Die biochemische und molekulare Diagnostik hat in den letzten Jahren dank vieler neuer Erkenntnisse zur Aufklärung der Pathogenese von Nebenschilddrüsenerkrankungen beigetragen (Kruse, 1988). Insbesondere wurden die genetisch bedingten Formen des angeborenen Hypoparathyreoidismus (HP) und des Pseudohypoparathyreoidismus (PHP) charakterisiert. Der HP ist auf eine verminderte Sekretion und der PHP auf eine verminderte Wirkung von Parathormon (PTH) zurückzuführen. Als häufigste Ursache des HP gilt die Zerstörung oder Entfernung der Nebenschilddrüsen im Rahmen eines Schilddrüsen- oder Nebenschilddrüsen-eingriffs (Raue et al., 2011; Shoback, 2008). Die andere Gruppe der Erkrankungen mit HP und PHP äußert sich meist im Kindesalter und kann bei zu später Erkennung folgeschwer verlaufen (Kruse, 1988). Dank der neueren molekularbiologischen Erkenntnisse konnten in dieser Gruppe unter anderem Mutationen im Calcium-Sensing-Rezeptor (CaSR) als Ursache für die dem HP zugrunde liegende autosomal-dominante Hypocalcämie (ADH) identifiziert werden (Egbuna und Brown, 2008; Lienhardt et al., 2001; Raue et al., 2011; Thakker, 2004). Der CaSR spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Calciumhomöostase (Brown, 1991; Brown et al., 1993; Nemeth und Scarpa, 1987). Er ist in Nebenschilddrüsen und in anderen an der Calciumhomöostase beteiligten Organen wie den C-Zellen der Schilddrüse, in den Nieren, im Knochen und im Dünndarm zu finden (Brown et al., 1994a; Brown et al., 1994b; Goldsmith et al., 1999). Durch seine Präsenz können Calciumionen (als klassische Botenstoffe) ihre Wirkung wie calcitrope Hormone entfalten. Seine Eigenschaften zur Regulation des Calciumhaushalts beruhen auf seiner Fähigkeit, die Sekretion des Nebenschilddrüsenhormons PTH zu überwachen und die Reabsorption der Calciumionen aus dem Primärharn in den Nierentubuli zu steuern (Rus et al., 2008). Veränderungen in dem für den CaSR kodierenden Gen (CASR) können unterschiedliche Krankheitsbilder zu Folge haben. Die aktivierenden Mutationen führen zur ADH. Die familiäre benigne hypocalciurische Hypercalcämie (FHH) oder der neonatale primäre Hyperparathyreoidismus werden durch inaktivierende Mutationen des CaSR-Gens verursacht.

## 1.2 Calciumhomöostase

### 1.2.1 Calcium

Calciumionen spielen eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase. Es wurden zahlreiche physiologische Prozesse beschrieben, in denen Calcium entweder direkt oder indirekt die extra- und intrazellulären Überwachungsmechanismen lenkt (Brown, 1991). Intrazellulär findet man zahlreiche Signalwege, die über Calciumionen als sogenannte sekundäre Messenger aktiviert werden. Calcium agiert außerdem als notwendiger Cofaktor in vielen enzymatischen Reaktionen. Auf zellulärer Ebene ist das bivalente Kation an der Regulation der Zelldifferenzierung, der Zellproliferation sowie der Apoptose beteiligt. Für die Sekretion von Hormonen und Neurotransmittern, die Motilität von Zellen oder die Kontraktion von Muskelzellen wird ebenfalls Calcium benötigt (Brown et al., 1993). Calcium gilt als Bestandteil der Gerinnungskaskade in den Gefäßen und mindert die neuromuskuläre Erregbarkeit. Die Studien von Brown et al. weisen darauf hin, dass das Calcium eine hormonähnliche Wirkung haben kann (Brown und Sanders, 1991). Der Calciumspiegel im Serum zeichnet sich durch einen sehr schmalen Schwankungsbereich aus (2,2–2,65 mmol/l). Dieser Wertebereich bezieht sich auf das gesamte Calcium im Serum, von dem der größte Teil aus der ionisierten, biologisch aktiven Calciumfraktion besteht. Das restliche Calcium bleibt an Proteine gebunden. Die Aufrechterhaltung des Calciumspiegels wird über hormonelle Regulation gesteuert.

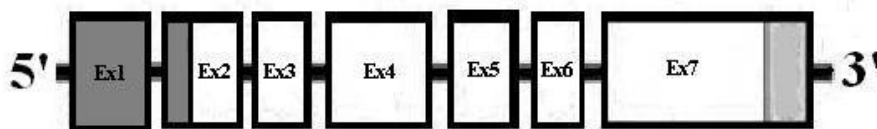
### 1.2.2 Die Rolle des CaSR

Die Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase wird durch die calcitropen Hormone PTH, Calcitonin und Calcitriol (aktiviertes Vitamin D) gewährleistet. Die Regulation des extrazellulären Calciumspiegels erfolgt durch eine negative Rückkopplung der Nebenschilddrüsen, des Darms, der Nieren und der Knochen untereinander. Den Zusammenhang zwischen den calcitropen Hormonen und Calcium hat Brown mit seinen Untersuchungen geliefert. Das Gen, das für den CaSR kodiert, wurde erstmals aus den Nebenschilddrüsen isoliert, kloniert und beschrieben (Brown, 1991; Brown et al., 1993; Brown et al., 1994a; Brown et al., 1994b). Bald darauf wurde der Rezeptor auch in anderen, nicht nur an der Calciumhomöostase beteiligten Organen gefunden (Brown et al., 1999a; Brown, 1999; 2002). Der CaSR gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten

Rezeptoren (GPCR) (Bai et al., 1997a; Bai et al., 1997b; Bai et al., 1996). Die zu dieser Familie gehörenden Proteine zeichnen sich durch einen ähnlichen Aufbau und eine zu mindestens 20% identische Aminosäuresequenz aus. Der CaSR gehört neben den Pheromonrezeptoren und den vomeronasalen Rezeptoren zur Subgruppe II der Gruppe C der GPCR (Brown, 2000; 2002; 2004; 2007b; Brown und MacLeod, 2001).

### 1.2.3 Das CaSR-Gen

Das 103 kb umfassende humane CASR ist auf dem langen Arm des Chromosoms 3 lokalisiert (3q13,3-q21) und besteht aus 7 Exons, wobei die Exons 2–7 für den CaSR kodieren, während Exon 1 nicht exprimiert wird (Bai et al., 1997a; Bai et al., 1997b; Bai et al., 1996; Brown et al., 1994a; Chattopadhyay, 2000; Janicic et al., 1995). Die mRNA des Rezeptors ist 3783 bp lang.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der genomischen Struktur des CaSR-Gens. Das humane CASR umfasst mehr als 45 kb genomischer DNA und ist in 7 Exons organisiert. Abbildung, modifiziert nach Pearce et al.; 1995.

Die Exons 2–6 enthalten die Information über die lange aminoterminal extrazelluläre Domäne (ECD). Dem Exon 7 ist die Information über die Transmembrandomäne (TMD) sowie die intrazelluläre Domäne (ICD) inklusive des C-terminalen Schwanzes zu entnehmen (Chattopadhyay, 2000).

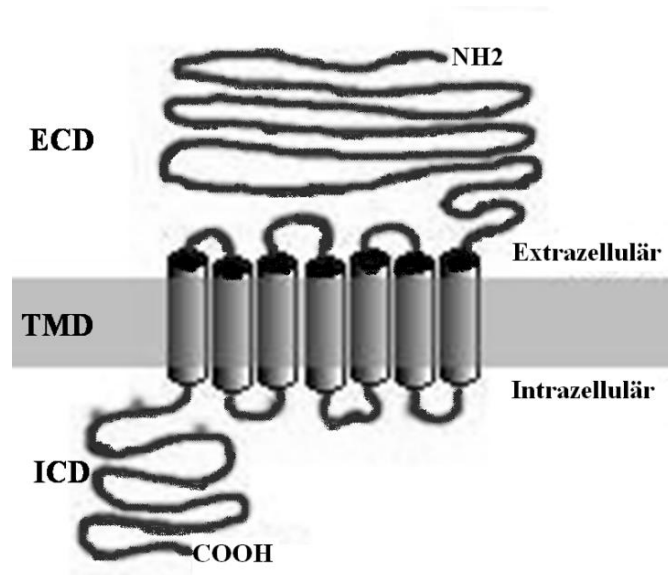
### 1.2.4 Proteinstruktur des CaSR

Der Rezeptor ist ein Transmembranprotein, das aus 1078 Aminosäuren zusammengesetzt ist und ein Molekulargewicht von 120–130 kDa hat. Im Gegensatz zu anderen GPCRs, die auf dem sekretorischen Weg sehr schnell die Kontrollschranke des endoplasmatischen Retikulums (ER) überqueren, ist der CaSR überwiegend im intrazellulären Kompartiment lokalisiert (Breitwieser, 2012; 2013a; 2013b; Huang und Breitwieser, 2007; Huang et al., 2009). Als Antwort auf Aktivierungssignale durch Calcium oder

andere allosterische Agonisten steigt das Expressionslevel auf der Zelloberfläche und erreicht ein stabiles Niveau (Grant et al., 2012).

Der CaSR besteht aus drei Hauptdomänen (**Abb. 2**) (Bai et al., 1997a):

- einer großen, 612 Aminosäuren langen, hydrophilen extrazellulären N-terminalen Domäne (ECD); diese Domäne ist an den kotranslationalen Prozessen, der Dimerisierung und an der Bindung der Liganden an den Rezeptor beteiligt (Brauner-Osborne et al., 1999; Brown et al., 1993; Hannan und Thakker; Jiang et al., 2004; Mun et al., 2004; Pidasheva et al., 2005; Pidasheva et al., 2006; Quinn et al., 1997; Ray et al., 2007)
- einer 250 Aminosäuren langen, membrangängigen Domäne (TMD); sie beinhaltet die Aminosäuren 613–862 und besteht aus sieben transmembranen Schleifen (TM1–7), drei extrazellulären Schlingen (ECL1–3) und drei intrazellulären Schlingen (ICL1–3)(Chattopadhyay, 2000); ihre Rolle liegt in der Übertragung der aktivierenden Signale von der ECD zur ICD
- einer 217 Aminosäuren langen, zytoplasmatischen, carboxyterminalen Domäne (ICD), die die Aminosäuren 863–1078 beinhaltet (Goldsmith et al., 1999)

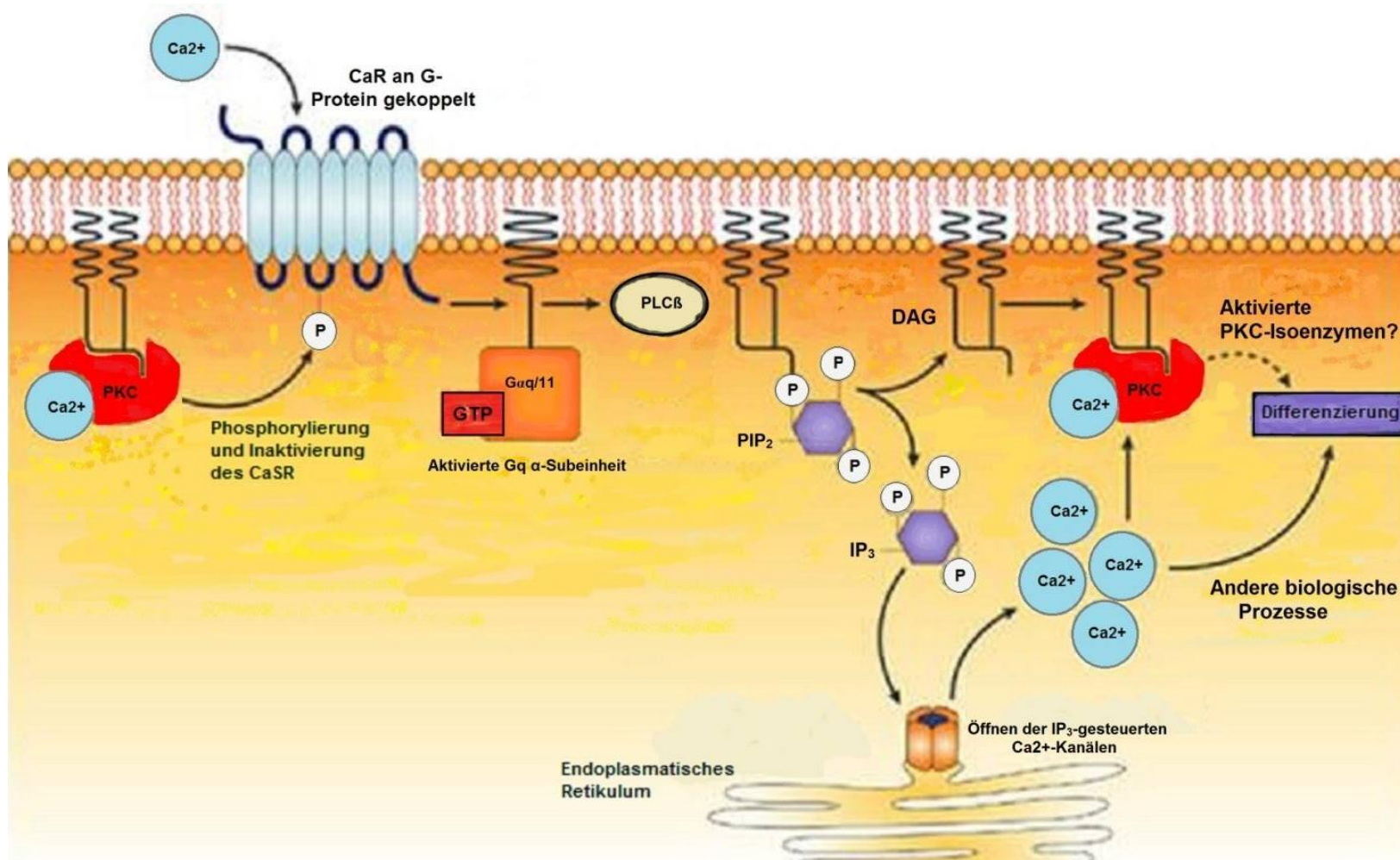


**Abb. 2:** Die Struktur des CaSR-Proteins. Der Rezeptor besteht aus 3 Domänen: einer großen extrazellulären N-terminalen Domäne (ECD), einer membrangängigen Domäne (TMD) sowie einer zytoplasmatischen, carboxyterminalen Domäne (ICD).

### 1.2.5 CaSR-Signalkaskade

Veränderungen in der Calciumkonzentration werden durch den CaSR überwacht und über unterschiedliche Signalkaskaden gewebe- und ligandenspezifisch gesteuert (Brown, 2004; Brown et al., 1994a; Brown et al., 1999b; Moller et al., 2001; Rus et al., 2008). Es wurde jedoch nachgewiesen, dass der Rezeptor nicht nur Calciumsignale vermittelt, sondern auch anderen Liganden gegenüber Aktivität zeigt. Neben bivalenten Ionen wie Calcium oder Magnesium wurden auch andere Moleküle als Agonisten des Rezeptors beschrieben. Zu dieser Gruppe zählen Spermine, Kationen wie  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  und  $\text{Gd}^{3+}$ , Antibiotika wie Neomycin, Aminosäuren wie Alanin oder Polypeptide wie Poly-L-Arginin, Amyloid- $\beta$ -Peptid und Polyamine (Bai et al., 1997a; Bai et al., 1997b; Jensen und Brauner-Osborne, 2007; Jensen et al., 2000). Der Rezeptor wird über die allosterische Bindung eines Liganden an die ECD oder TMD aktiviert (Brown und MacLeod, 2001; Huang und Miller, 2007a; 2007b; Huang et al., 2009).

Bei der Bindung des Ligandes an den Rezeptor kommt es zur Aktivierung des an den Rezeptor gekoppelten heterotrimeren G-Proteins. Zuerst erfolgt die Bindung von GTP an die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins. Daraufhin kommt es zur Ablösung der  $\alpha$ -Untereinheit von den  $\beta\gamma$ -Untereinheiten des Trimers, die dadurch aktiviert werden und zur Aktivierung der Phospholipase C,  $A_2$  und D (PLC,  $\text{PLA}_2$ , PLD) führen. Die durch die PLC-Wirkung gebildeten Moleküle von Phosphatidylinositolbisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ), Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat ( $\text{IP}_3$ ) vermitteln als „sekundäre Messenger“ die zellulären Effekte der Liganden. Daraufhin kommt es über das  $\text{IP}_3$ -Signal zur Freisetzung des intrazellulär gespeicherten Calciums aus dem rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Brown und MacLeod, 2001; Hofer und Brown, 2003; Hofer et al., 2000). Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration löst einen Einstrom von extrazellulärem Calcium in die Zelle aus. Gleichzeitig wird durch DAG die Proteinkinase C (PKC, wobei C für Calcium steht) aktiviert. Die PKC steuert die weitere intrazelluläre Steigerung von  $\text{IP}_3$  und wirkt einem weiteren intrazellulären Calciumanstieg entgegen. Über ein inhibitorisches G-Protein ( $\text{G}_i$ ) wird die Adenylatcyclase gehemmt, die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) gefördert und anschließend die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) gehemmt (**Abb. 3**).



**Abb. 3:** Signalkaskade des CaSR. Die Bindung von Calcium an den CaSR führt zur Aktivierung der PLC und zur Entstehung von IP $_3$ . Daraufhin werden die zytoplasmatischen Calciumspeicher über IP $_3$  geöffnet und das Calcium intrazellulär freigesetzt. Der Anstieg des Calciumlevels in der Zelle bedingt das Ausscheiden von PTH in den Nebenschilddrüsen und die Resorption von Calcium in den Nieren. Abbildung modifiziert nach Lamprecht und Lipkin (Lamprecht und Lipkin, 2003).



Durch den sinkenden cAMP-Spiegel und den steigenden Calciumspiegel in der Zelle wird in den Nebenschilddrüsen die PTH-Sekretion gehemmt und die renale Calciumresorption reduziert. Über eine Aktivierung der PLA<sub>2</sub> wird außerdem die Produktion von Arachidonsäure stimuliert.

Die intrazytoplasmatische Domäne des Rezeptors besitzt fünf Phosphorylierungsstellen, über die der Rezeptor nach der Ligandenbindung wirkt (Brown und MacLeod, 2001). Veränderungen in dieser Region können entweder eine verminderte oder eine verstärkte Freisetzung des intrazellulären Calciums zur Folge haben (Brown und MacLeod, 2001).

### 1.2.6 Funktion

Als multifunktionaler Rezeptor reguliert der CaSR ein breites Spektrum an biologischen Prozessen. Diese Funktionsdiversität ist durch liganden- und gewebespezifische Bindung an unterschiedliche G-Proteine (G<sub>q/11</sub>, G<sub>i/o</sub>, G<sub>12/13</sub>, G<sub>s</sub>) und somit durch die Induktion verschiedener Signalwege möglich (Brennan und Conigrave, 2009; Conigrave und Ward, 2013; Leach et al., 2013; Magno et al.).

**Tab. 1:** Expression des CaSR in verschiedenen Organen und seine Funktionen

Organ	Funktion
Nebenschilddrüsen	PTH-Sekretion
Gastrointestinaltrakt	„Nährstoff-Sensing“, Freisetzung gastrointestinaler Hormone (Gastrin, Cholecystokinin), Hemmung der Flüssigkeitssekretion Stimulierung und Steigerung der Zelldifferenzierung Hemmung der Proliferation
Placenta	Ca <sup>2+</sup> -Transport von der Mutter zum Fötus
Knochen	Förderung der Differenzierung, Aktivierung und Proliferation der Osteoblasten, Mineralisierung
Gefäße	Öffnung Ca <sup>2+</sup> -sensitiver Kaliumkanäle
Herz	Regulation der Calciumkonzentration in Kardiomyozyten
Bindegewebe	Proliferation der Fibroblasten
Niere	Reninsekretion
Pankreas	Exokrine Sekretion von Bicarbonat-Ionen
Nebennieren	Sekretion von ACTH und GH
PNS und ZNS	Aktivierung von Ca <sup>2+</sup> -abhängigen Kaliumkanälen im enterischen Nervensystem; Steuerung der enterischen Motilität
Blut	Differenzierung und Anbindung der hematopoetischen Zellen in der Knochenmarknische
Tumoren	Verlust des CaSR als Tumorsuppressor (Brustkrebs, Prostatakrebs)

Ebenso hat der CaSR eine bedeutende Rolle hinsichtlich der Kontrolle der Zellproliferation, der Differenzierung, der Chemotaxis und der Apoptose sowie der Regulation der Genexpression (Breitwieser, 2012; 2013a; Brennan und Conigrave, 2009; Brown, 1997; Brown et al., 1998a; Brown und MacLeod, 2001; Brown et al., 1998b; Brown et al., 1999b; Brown et al., 1994b; Chakravarti et al., 2012; Chattopadhyay, 2000; 2006; Chattopadhyay et al., 1996; Chattopadhyay und Brown, 2006; Hammond et al., 2007; Kifor et al., 2001; Nagase et al., 2002; Nemeth und Scarpa, 1987; Pearce et al., 1996a; Shoback et al., 1988; Tfelt-Hansen et al., 2004; Tfelt-Hansen et al., 2003b). In **Tab. 1** sind die bis jetzt untersuchten Funktionen des CaSR in verschiedenen Zellarten zusammengestellt (Brown und MacLeod, 2001).

#### 1.2.7 Hormonelle Regulation des Calciumhaushalts

Der Calciumhaushalt wird im Wesentlichen durch drei Hormone reguliert: PTH, Calcitonin (Ct) und 1,25-Dihydroxycholecalciferol (1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D3).

##### 1.2.7.1 Parathormon

Das PTH wird in den Hauptzellen der Nebenschilddrüsen synthetisiert und gespeichert. Die genetische Information für das PTH liegt zentromernah auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 (11p15) (Kruse, 1988). Aus einem zunächst im rauen ER der Hauptzellen synthetisierten Vorläufermolekül des PTH, dem Prä-Pro-PTH, entsteht durch enzymatische Spaltung das endgültige PTH-Molekül (intaktes PTH, 84 Aminosäuren lang) (Kruse, 1988). Die Senkung des Calciumspiegels im Serum verursacht die Abgabe von PTH aus dem Hauptzellspeicher ins Serum. Bei einer Senkung des Calciumspiegels wird PTH vermehrt abgesondert. Im Serum kommen zwei PTH-Formen vor: das intakte PTH und das aminoternale Fragment (Aminosäuren 1–34). Der Wirkmechanismus des PTH zeichnet sich durch die Mobilisierung des Calciums aus dem Knochengewebe über die Stimulation der Osteoklasten aus. Gleichzeitig steigt die Resorption von Calcium aus dem glomerulären Filtrat, wodurch die Ausscheidung des Calciums über die Niere gesenkt wird. Der indirekte Anstieg des Calciumspiegels erfolgt über die Steigerung der 1- $\alpha$ -Hydroxylase mit 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin-D3-Synthese und anschließend durch die vermehrte Absorption von Calcium über den Darm, sodass eine erhöhte PTH-Aktivität

zur Erhöhung des Calciumspiegels im Serum führt (Maeda et al., 2006). Der CaSR beeinflusst regulativ die PTH-Sekretion in den Nebenschilddrüsen und die PTH-Wirkung in den tubulären Zellen der Niere (Brown und MacLeod, 2001). Die Regulation des PTH findet über die Aktivierung der PLC und die Inhibition von cAMP in den Epithelkörperchen statt (Chattopadhyay, 2000). Der CaSR reguliert nicht nur die Synthese des PTH, sondern er beeinflusst auch die Proliferation der Nebenschilddrüsenzellen (Brown und MacLeod, 2001). Neben dem PTH spielt Calcitonin eine regulatorische Rolle im Calciumstoffwechsel.

#### 1.2.7.2 Calcitonin

Die Bildung von Calcitonin erfolgt in den C-Zellen der Schilddrüse. Im Gegensatz zum PTH spielt Calcitonin in der Aufrechterhaltung des Plasmacalciumspiegels nur eine untergeordnete Rolle (Janner und Mullis, 2007). Calcitonin ist ein 32 Aminosäuren langes Peptid. Die Absonderung des Hormons aus den C-Zellen wird durch steigende Mengen von Serumcalcium über den CaSR gefördert. Calcitonin führt durch die Hemmung der enteralen und renalen Resorption sowie durch die Förderung des Einbaus in Knochen zur Senkung des Calcium- und Phosphatspiegels im Serum. Die osteolysehemmende Wirkung von Calcitonin sowie die Verstärkung der Knochenmineralisierung deuten auf einen dem PTH gegenüber antagonistischen Wirkmechanismus hin. Auf der Zellebene kommt es zuerst zur Aktivierung der PLC. Das infolgedessen entstandene DAG stimuliert einen nichtselektiven Kationenkanal und führt zum Einströmen von Natrium und Calcium in die Zelle. Die daraus resultierende Depolarisation öffnet die spannungsabhängigen Calciumkanäle vom L-Typ und bewirkt so eine weitere Steigerung des intrazellulären Calciums und anschließend die Calcitoninsekretion (Brown und MacLeod, 2001).

#### 1.2.7.3 Vitamin D

Vitamin D (Cholecalciferol) wird hauptsächlich in der Epidermis synthetisiert oder über den Darm aufgenommen. Die Umwandlung von Vitamin D<sub>3</sub> zur aktiven Form, 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D<sub>3</sub>, hängt vom PTH-Spiegel im Blut ab und wird durch einen PTH-Anstieg stimuliert. In der Leber wird Vitamin D<sub>3</sub> zu 25-(OH)-Vitamin D<sub>3</sub> hydroxyliert. In der Niere stimuliert PTH die Bildung des Enzyms 1- $\alpha$ -Hydroxylase, die das 25-(OH)-Vitamin D<sub>3</sub> in das aktive 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin-D-Hormon Calcitriol umwandelt (Holick, 1996). Die Wirkung

von Vitamin D ist synergistisch zu der von PTH. Vitamin D sorgt für die Aufrechterhaltung des Calciumspiegels in physiologischen Grenzen. Zu den Angriffspunkten von Vitamin D gehören das Dünndarmepithel, wo es zur Erhöhung der Calciumresorption beiträgt, und die Knochenstammzellen, die zur osteoklastischen Differenzierung und anschließender Freisetzung von Calcium aktiviert werden (Heaney, 2000a; 2000b; Heaney et al., 2000a; Heaney et al., 2000b). Die durch Vitamin D erhöhte Osteoklastenaktivität äußert sich in einer gesteigerten Synthese von Proteinen wie Osteocalcin, Osteopontin und Osteonectin, einer erhöhten Aktivität der alkalischen Phosphatase und der Hemmung der Kollagensynthese (Holick, 1996; Holick et al., 1996). Ist der Calciumspiegel gestiegen, wandelt die 24- $\alpha$ -Hydroxylase das 1,25(OH) $_2$ D $_3$  in das Calcitriol um. 1,25(OH) $_2$ -Vitamin D $_3$  hemmt die PTH-Sekretion und die Proliferation der Nebenschilddrüsenzellen (Brown und MacLeod, 2001). Die Hemmung der PTH-Absonderung führt zur Normalisierung des Calciumspiegels. Im Normbereich hemmt das Calcium selbst, durch Aktivierung des CaSR, die weitere PTH-Sekretion und Calcitriolbildung, sodass die Entstehung einer Hypercalcämie vermieden wird.

#### 1.2.8 Hypoparathyreoidismus und Pseudohypoparathyreoidismus

Als Hypoparathyreoidismus (HP) versteht man eine Unterfunktion der Nebenschilddrüse, infolge derer eine mangelnde oder nicht ausreichende PTH-Sekretion zu niedrigen Calciumspiegeln im Blut führt. Der Pseudohypoparathyreoidismus (PHP) ist auf eine verminderte PTH-Wirkung zurückzuführen (Shoback, 2008). Man unterscheidet den primären und sekundären HP. Der sekundäre Hypoparathyreoidismus ist auf eine Schädigung der Nebenschilddrüsen zurückzuführen, während der primäre HP mit unterschiedlichen genetischen Ursachen einhergeht (De Sanctis et al., 2012; Michels und Kelly, 2013). Der PHP wird autosomal-dominant vererbt und ist durch die Störungen der Rezeptor- oder Postrezeptorfunktionen bedingt (Brandi, 2011; Maeda et al., 2006). Die genauere Unterteilung ist den **Tab. 2** und **Tab. 3** zu entnehmen. Eine Hypocalcämie ist definiert als ein Absinken des Gesamtcalciums unter den Normbereich von 2,1-2,6 mmol/l oder ein Absinken des ionisierten Calciums unter den Bereich von 1,1-1,3 mmol/l bei Erwachsenen und als ein Absinken des Gesamtcalciums unter den Normwert von 1,75 mmol/l und des ionisierten Calciums auf weniger als 1,0 mmol/l bei

Kindern. Die Symptomatik des HP oder PHP ist geprägt durch eine Hypocalcämie, Hyperphosphatämie sowie einen relativ niedrigen PTH-Spiegel und dadurch auftretende Tetanie mit tonisch schmerzhaften Muskelkrämpfen, Muskelschmerzen, Taubkeitsgefühl und Parästhesien, die sich chronisch zu Verkrampfungen mit Karpopedalspasmen entwickeln können. Unter anderem kommt es dabei zu einer Pfötchenstellung der Hände. Als klinische Zeichen fallen das Chvostek-Zeichen und das Trousseau-Zeichen positiv aus. Die Muskelpasmen können auch zu intestinalen Spasmen mit Bauchschmerzen und Erbrechen, Dysphagien, Bronchospasmen, laryngealem Stridor, Frühgeburten und zu einer Dysfunktion des Detrusormuskels führen.

**Tab. 2:** Ursachen des Hypoparathyreoidismus nach klinischen Signifikanz (De Sanctis et al., 2012; Michels und Kelly, 2013)

<p><b>Zerstörung der Nebenschilddrüsengewebe</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Schilddrüsen- und Nebenschilddrüsen-Operationen</li> <li>- Bestrahlung</li> <li>- Autoimmunsyndrome</li> <li>• Isoliert</li> <li>• aktivierende Antikörper gegen CaSR</li> <li>• Polyendokrine Autoimmunerkrankungen (APECED) <ul style="list-style-type: none"> <li>- Infiltrative Erkrankungen: Tumore, Sarkoidose</li> <li>- Ablagerung von Schwermetallen: Morbus Wilson, Hämochromatose</li> </ul> </li> </ul> <p><b>Reversible Schädigung der PTH Sekretion oder Wirkung</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hypomagnesiämie</li> <li>- Medikamente</li> <li>• Cinalcet</li> <li>• Radioiodtherapie</li> </ul> <p><b>Resistenz auf die Wirkung des PTH</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pseudohypoparathyreoidismus Typ 1a (Albright Osteodystrophie)</li> <li>• Pseudohypoparathyreoidismus Typ 1b</li> <li>• Chondrodysplasie Blomstrand</li> </ul> <p><b>Genetische Störungen der PTH Synthese/Sekretion</b></p>
--

Die Patienten leiden oft unter generalisierten tonisch-klonischen Krampfanfällen mit einer erhöhten Serumaktivität der Kreatinkinase. Es kommen kognitive Schäden im Sinne einer subkortikalen Demenz, Psychosen, geistige Verwirrtheit, Halluzinationen, extrapy-

ramidale Störungen oder psychomotorische Retardierungen vor, die am ehesten mit Calcifikationen der Basalganglien assoziiert sind. Als weitere zerebrale Veränderungen kann man Kopfschmerzen, erhöhte Reizbarkeit, Ängstlichkeit, Schulschwierigkeiten oder depressive Verstimmungen bis hin zur Depression nennen (Brown, 2007a; Ward et al., 2012). Andere, nicht konstant auftretende Symptome sind unter anderem intrakranielle Verkalkungen, Katarakt, Zahnanomalien, Alopezie, trockene, spröde Haut und Brüchigkeit der Fingernägel. Darüber hinaus werden oft bei Patienten mit HP Innenohrschwerhörigkeit, Kleinwuchs, Muskelhypotonie, Ptosis, Polyautoimmunendokrinopathie, Nephropathie, Nephrocalcinose oder Nephrolithiasis diagnostiziert. Bei Patienten mit PHP stellt man oft Kleinwuchs, subkutane Verkalkungen, Brachymetakarpien oder geistige Retardierung fest. Zu den kardialen Symptomen gehört die Verlängerung des QT-Intervalls und in seltenen Fällen eine Herzinsuffizienz.

**Tab. 3:** Genetische Störungen der PTH Synthese/ Sekretion

<b>Isoliert</b>	<b>Mit anderen Symptomen kombiniert</b>
<u>autosomal-dominanter HP</u>	Kearns-Sayre-Syndrom
Mutationen im PTH-Gen (11p15)	Pseudo MELAS-Syndrom
Mutationen im CaSR-Gen (3q13) (ADH, FHH)	DiGeorge-Syndrom (CATCH22)
	APECED (AR)
<u>autosomal-rezessiver HP</u>	HRD-Syndrom (Nephropathie und/oder Innenohrschwerhörigkeit) (AD/AR)
Mutationen im PTH-Gen (11p15)	
<u>X-chromosomal rezessiver HP</u>	Kenny-Caffey-Syndrom (AD)
Mutationen des Chromosoms Xq26–27	Mikrodeletionssyndrom (22q11.2)

Bei Verdacht auf HP oder PHP werden zum Nachweis der Hypocalcämie und des Fehlens der PTH-Wirkung laborchemische und bildgebende Untersuchungen durchgeführt. Meist werden Röntgenaufnahmen zum Nachweis von Verkalkungen erstellt und eine craniale Computertomographie (CCT), Echokardiographie, Audiometrie sowie eine Nierenultraschalluntersuchung durchgeführt. Im Blut werden Calcium, Phosphat, intaktes PTH, Magnesium, Serumkreatinin, Vitamin D und Vitamin-D-Metabolite gemessen. Zur Abklärung der Hypercalciurie wird die Urinprobe auf den Calcium/Kreatinin-Quotienten untersucht.

Bei Verdacht auf Vorliegen eines PHP wird außerdem die molekulargenetische Diagnostik des GNAS-1-Gens (V.a. PHP 1a) oder des CaSR-Gens bei Verdacht auf ADH initiiert. Die Diagnose PHP wird durch die Konstellation von Hypocalcämie, Hyperphosphatämie und erhöhten Serum-PTH-Spiegel gestellt, nachdem eine Hypomagnesiämie, eine exzessive Zufuhr oder endogene Freisetzung von Phosphat und eine Niereninsuffizienz ausgeschlossen wurden.

#### 1.2.9 Genetische Störungen des CaSR

Die Schlüsselrolle des Rezeptors manifestiert sich insbesondere durch die Störungen in der Regulation des Calciumhaushaltes und die Entwicklung des HP (Brown et al., 1993). Hier sind besonders die molekularen Ursachen des HP zu erwähnen. In den folgenden Abschnitten werden die Aspekte der Pathogenese des HP, insbesondere die Mutationen des CaSR und die zugrunde liegende ADH, näher erläutert. Die molekulare und biochemische Charakterisierung der CaSR-Mutationen war im Rahmen dieser Arbeit von Bedeutung und wird in den folgenden Abschnitten der Arbeit näher erläutert. Störungen in der CaSR-Funktion durch genetische Mutationen haben abhängig von den Auswirkungen der Mutation auf die Rezeptoraktivität diverse Krankheitsbilder zu Folge. Bis jetzt wurden etwa 250 verschiedene Mutationen des CaSR beschrieben (D'Souza-Li et al., 2002; Hannan und Thakker; Hauache, 2001; Hendy et al., 2000; Kifor et al., 2001; Lienhardt et al., 2001; Nagase et al., 2002; Okazaki et al., 1999; Watanabe et al., 1998). Darunter wurden 95 verschiedene Mutationen bei Patienten mit ADH identifiziert. Die aktivierenden Mutationen wurden am häufigsten in den Genregionen, die für die ECD (51%), TCD (41%) und ICD (8%) kodieren, gefunden (Baron et al., 1996; D'Souza-Li et al., 2002; Hannan und Thakker; Hauache, 2001; Hendy et al., 2000; Lienhardt et al., 2001; Okazaki et al., 1999; Pearce, 2002; Pearce et al., 1996b; Pollak et al., 1994a; Tan et al., 2003; Watanabe et al., 1998; Yamamoto et al., 2000). Inaktivierende Mutationen des CaSR zeichnen sich durch Resistenz des Rezeptors gegenüber  $[Ca^{2+}]_0$  aus. Ein durch Mutationen im CASR bedingter Verlust der Funktion (Loss-of-Function) führt zur FHH und zu schwerem neonatalen primären Hyperparathyreoidismus (Hendy et al., 2000; Hendy et al., 2009; Hendy et al., 2003; Pollak et al., 1994b). Aktivierende Mutationen (Gain-of-Function) können zum hypocalcämischen HP (ADH mit

Hypercalciurie) führen (D'Souza-Li et al., 2002; Hendy et al., 2000; Kruse, 1988; Okazaki et al., 1999; Pearce und Brown, 1996; Pearce und Thakker, 1997; Pearce et al., 1995; Pearce et al., 1996b; Pearce et al., 1996c). Des Weiteren wurden unter anderem von Watanabe und Brown Zusammenhänge und Analogien des Phänotypes zwischen den bekannten hereditären Tubulopathien, den CaSR-bedingten Erkrankungen und der familiären Hypomagnesiämie mit Hypercalciurie und Nephrocalcinose (FHHN) beschrieben (Brown et al., 1993; Vargas-Poussou et al., 2002; Watanabe und Fukumoto, 2002; Watanabe et al., 2002; Watanabe et al., 1998).

#### 1.2.9.1 Hypocalcämischer Hypoparathyreoidismus

Der autosomal-dominante HP ist durch eine inaktivierende Mutation des PTH-Gens auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (11p15) oder durch eine aktivierende Mutation des CaSR-Gens auf Chromosom 3 (3q13) bedingt (Baumber et al., 2005; Kruse, 1988; Raue et al., 2011). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass entweder spontane oder familiär bedingte heterozygote Mutationen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 (3q13) für die Entstehung des autosomal-dominanten HP (der ADH) verantwortlich sind (Finogold et al., 1994; Hendy et al., 2000; Hendy et al., 2009; Hendy et al., 2003; Kruse, 1988; Pollak et al., 1994a; Pollak et al., 1994b; Raue et al., 2006; Raue et al., 2011). Die konstitutiv aktivierenden Mutationen führen zur Veränderung der Proteinstruktur, sodass eine Dysfunktion des Rezeptors im Sinne einer erhöhten Sensitivität der Nebenschilddrüse und Nieren gegenüber dem Calciumspiegel entsteht. Demzufolge wird der Rezeptor trotz eines normwertigen Calciumspiegels die Signale einer Hypercalcämie vermitteln. Dies führt zur Suppression der PTH-Sekretion in den Nebenschilddrüsen sowie zur Reduktion der Calciumresorption in den Nieren trotz niedriger Calciumkonzentration und gesteigerten Verlusten von Calcium und Magnesium über den Urin (Chattopadhyay, 2000; Chattopadhyay und Brown, 2006). Die ADH tritt mit einer geschätzten Inzidenz von 1:80 000 auf. Der Verdacht auf ADH kann geäußert werden, wenn HP-Patienten nur geringe Hypocalcämiesymptome und einen messbaren PTH-Spiegel zeigen. Bei ungefähr der Hälfte der Patienten geht die Hypocalcämie mit Hyperphosphatämie, Hypomagnesiämie und Hypermagnesiurie einher (Okazaki et al., 1999; Pearce, 1998; 2002; Pearce et al., 1996a; Pearce und Brown, 1996; Pearce und



Thakker, 1997; Pearce et al., 1995; Pearce et al., 1996b; Pearce et al., 1996c; Pollak et al., 1994a; Raue et al., 2011). Die klinische Präsentation der ADH variiert von der asymptomatischen Hypocalcämie über hypocalcämische Spasmen und Parästhesie bis zum schweren Verlauf mit Tetanie oder Laryngospasmen (D'Souza-Li et al., 2002; Raue et al., 2006; Raue et al., 2011; Tan et al., 2003). Als häufige Komplikation im Verlauf der ADH wird über die Nephrocalcinose und Nephrolithiasis berichtet, die durch eine abnorme Hemmung der Calciumrückresorption bei normalem Serumcalciumspiegel bedingt ist (Lienhardt et al., 2001; Lienhardt et al., 2000; Pearce und Brown, 1996; Pearce und Thakker, 1997; Raue et al., 2011; Sorheim et al., 2010). Neurologisch zeigen sich außerdem zerebrale Anfälle und Tetanien, die durch die Calcifikation der basalen Ganglia verursacht werden und die einzige Indikation zur Behandlung mit Vitamin D stellen (Brown und MacLeod, 2001; D'Souza-Li et al., 2002; Hauache, 2001; Lienhardt et al., 2001; Pearce et al., 1996b; Watanabe et al., 1998; Yamamoto et al., 2000). Die Assoziation der ADH mit dem Bartter-Syndrom (als BS V-Genotyp bezeichnet) wird durch spezifische, besonders stark aktivierende CaSR-Mutationen (L125P, C131W und A843E) verursacht (Hannan et al., 2012; Kinoshita et al., 2014; Sorheim et al., 2010). Differenzialdiagnostisch müssen auch andere Ursachen von HP und bei Patienten mit renalem Salzverlust das Bartter-Syndrom erwogen werden. Ziel der Behandlung ist es, eine Balance zwischen den klinischen Zeichen der Hypocalcämie und einer niedrig gehaltenen Urinausscheidung des Calciums zu finden. Zielparameter der Therapie ist nicht der Blutspiegel, sondern die Konzentration des Calciums im Urin. Die Behandlung besteht in der Gabe von Vitamin D, wobei von den Patienten nicht selten über Durst und Polyurie als Folge der Therapie berichtet wird. Eine sorgfältige Überwachung der Calciumausscheidung im Urin und regelmäßige Ultraschalluntersuchungen der Nieren sind notwendig (D'Souza-Li et al., 2002; Hendy et al., 2000; Kruse, 1988; Okazaki et al., 1999; Pearce und Brown, 1996; Pearce et al., 1996b). Die Prognose wird durch den Schweregrad der Hypocalcämie und mögliche Konsequenzen unzureichender Behandlung bestimmt (Hannan et al., 2012).

### 1.2.9.2 Familiäre benigne hypocalciurische Hypercalcämie

Eine andere autosomal-dominant vererbte Erkrankung des CaSR ist die FHH. Obwohl die FHH mit fast 100 % Penetranz vererbt wird, kann die Ausprägung der Symptome breit variieren (D'Souza-Li et al., 2002; Felderbauer et al., 2003; Hendy et al., 2000; Hendy et al., 2009). Die FHH zeichnet sich durch eine überwiegend asymptomatische Hypercalcämie und inadäquat normwertige PTH-Spiegel im Serum aus (Bai et al., 1997a; Brown, 1997; 2007a; Brown et al., 1998a; Cetani et al., 2003). Der FHH liegen inaktivierende Mutationen im CaSR-Gen zugrunde. Meistens handelt es sich um eine einzelne heterozygote Punktmutation, infolge derer ein Austausch einer Aminosäure in der ECD oder ICD stattfindet. Die daraus resultierende Konformationsveränderung einer dieser konservierten Domänen führt zur ihrer Dysfunktion mit einer reduzierten Sensitivität des Rezeptors (Cetani et al., 2003; Hendy et al., 2000; Lietman et al., 2009; Nanjo et al.). Der mutierte Rezeptor registriert somit trotz Normocalcämie eine niedrige Calciumkonzentration, sodass trotz einer Hypercalcämie weder die Resorptionshemmung in der Niere induziert wird noch die Absonderung des PTH steigt (Heath, 1998). Trotz Hypercalcämie bleibt die Magnesium- und Calciumresorption hoch. Die Calcitonin- und Vitamin-D-Spiegel bleiben bei normaler Morphologie der Nebenschilddrüse im Normbereich oder zeigen sich leicht erniedrigt (Law und Heath, 1985; Marx et al., 1981a; Marx et al., 1981b; Thorgeirsson et al., 1981). Klinisch zeigen sich ein vermehrtes Auftreten von Gallensteinen bis zur Pankreatitis und eine Chondrocalcinose (Doumith et al., 1980). In der Urinuntersuchung liegt der  $\text{Ca}^{2+}$ /Kreatinin-Quotient bei Patienten mit FHH niedrig (meistens unterhalb von 0,01) (Marx et al., 1981a; Marx et al., 1981b). Die geschätzte Inzidenz von FHH liegt bei 1:78.000 (Hinnie et al., 2001).

### 1.2.9.3 Neonataler Hyperparathyreoidismus

Der neonatale Hyperparathyreoidismus (neonatal severe hyperparathyroidism, NSHPT) wird autosomal-rezessiv vererbt. Die Erkrankung manifestiert sich bereits bei Neugeborenen und ist durch eine ausgeprägte Hypercalcämie, Hypermagnesiämie sowie hohe PTH-Werte im Serum geprägt. Hyperplasie der Nebenschilddrüsen, Knochendemineralisation, Hypotonie und eine Ateminsuffizienz führen oft zu einem letalen Verlauf des NSHPT (Blair und Carachi, 1991; Garcia Soblechero et al., 2013; Hendy et al., 2000;

Kobayashi et al., 1997; Miyashiro et al., 2004; Pidasheva et al., 2004; Pollak et al., 1994b; Thakker, 1998; Toke et al., 2007; Ward et al., 2006a). Ursache des NSHPT sind inaktivierende Mutationen im CaSR-Gen (Blair und Carachi, 1991; Hendy et al., 2000; Kobayashi et al., 1997; Miyashiro et al., 2004; Pidasheva et al., 2004; Pollak et al., 1994b; Thakker, 1998; Toke et al., 2007; Ward et al., 2006a). Der Schweregrad der Symptome hängt davon ab, ob von der Mutation nur ein Allel oder beide Allele betroffen sind. Nur die heterozygote Form wird als FHH bezeichnet. Die homozygote Form wird als „Gen-Dosierung der FHH“ bezeichnet, sodass der NSHPT die homozygote Form der FHH darstellt (Cole et al., 1997; D'Souza-Li et al., 2001; Garcia Soblechero et al., 2013; Ho et al., 1995; Pearce et al., 1995; Pollak et al., 1994b; Ward et al., 2006a; Ward et al., 2006b; Ward et al., 2004; Zajickova et al., 2007).

#### 1.2.9.4 Familiäre Hypomagnesiämie mit Hypercalciurie und Nephrocalcinose

Die Manifestation der familiären Hypomagnesiämie mit Hypercalciurie und Nephrocalcinose (FHHNC) ist phänotypisch dem Krankheitsbild der ADH ähnlich und führt differenzialdiagnostisch als Ausschlussdiagnose zur ADH. Der Erkrankung liegen Veränderungen des Gens *PCLN1* auf dem Chromosom 3q27 zugrunde, das für Paracellin-1, ein Tight Junction-Protein, kodiert und dem eine regulatorische Rolle bei parazellulären  $Mg^{2+}$ - und  $Ca^{2+}$ -Transportprozessen zugewiesen wird (Kuwertz-Broking et al., 2001; Loris Pablo et al., 2004; Sanjad et al., 2007; Weber et al., 2001; Wolf et al., 2002). Die FHHNC wird durch eine Hypomagnesiämie mit stark ausgeprägter Hypermagnesiurie und Hypercalciurie, eine Nephrocalcinose und eine progrediente Verschlechterung der Nierenfunktion charakterisiert (Michelis et al., 1972; Praga et al., 1995; Tajima et al., 2003; Weber et al., 2001). Die Erkrankung tritt mit einer geschätzten Inzidenz von 1:50 000 bis 1:100 000 auf und manifestiert sich bereits bei Kindern (Al-Shibli et al., 2013; Weber et al., 2001). Laborchemisch zeigt sich Hypomagnesiämie, Hypermagnesiurie und Hypercalciurie. Darüber hinaus fallen erhöhte PTH-Spiegel, Acidose, Hypozitraturie und Hyperurikämie auf. Aufgrund der seit dem Kindesalter manifesten Nephrocalcinose und Nierenfunktionseinschränkung kommt es im adoleszenten Alter zur terminalen Niereninsuffizienz; somit geht die FHHNC mit einer wesentlich schlechteren Prognose einher (Weber et al., 2001).

### 1.2.9.5 Bartter-Syndrom

Das Bartter-Syndrom umfasst mehrere Erkrankungen bzw. Störungen, die zu den hereditären Tubulopathien gehören. Darunter wird differenziert: das antenatale Bartter-Syndrome (Bartter Typ 1, Typ 2 und Typ 4 (BS Typ 1, 2, 4), das klassische Bartter-Syndrom (cBS, BS Typ 3) und die Hauptgruppen des Gitelman-Syndroms (Barakat und Rennert, 2001; Cha et al.; Colussi et al., 1994; Egbuna und Brown, 2008; Gamba und Friedman, 2009; Konrad et al., 2000). In seltenen Fällen wurde über einen Zusammenhang zwischen aktivierenden Mutationen im CaSR und dem Bartter-Syndrom berichtet (Bartter Typ 5). Bei diesen Patienten wurde sowohl eine aktivierende Mutation im CaSR (z.B. L125P) mit ADH-typischen Symptomen wie Hypercalciurie, Hypocalcämie und Hypomagnesiämie als auch Bartter-ähnliche Symptome wie Hypokaliämie mit metabolischer Alkalose und Hyperreninismus nachgewiesen (Barakat und Rennert, 2001; Cha et al.; Colussi et al., 1994; Egbuna und Brown, 2008; Gamba und Friedman, 2009; Konrad et al., 2000; Stechman et al., 2009; Vargas-Poussou et al., 2002).

#### Antenatales Bartter-Syndrom

Die Ursache für den Typ 1 des antenatalen Bartter-Syndroms ist ein autosomal-rezessiv vererbter Defekt eines  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ -Kotransporters (NKCC2) im dicken Teil des aufsteigenden Schenkels der Henle-Schleife (cTAL). BS Typ 2 ist durch einen Defekt des apikalen Kaliumkanals ROMK bedingt. Der BS-Typ-4-Störung liegt ein Defekt in den ClC-K-Kanälen zugrunde: ClC-Kb und ClC-Ka (Seyberth, 2008). Die Veränderungen in der Struktur der Kanälen führen in unterschiedlich starker Ausprägung zu Störungen der Natriumresorption im cTAL (Gamba und Friedman, 2009). Dies hat eine Hypernatriurie und Hyperchloriurie mit Hyperkaliämie und Alkalose zur Folge. Der Natriumverlust führt zum Verlust von Wasser und dies wiederum zur Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und zur Steigerung der Synthese von Prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ), als Hyperprostaglandin-E-Syndrom (HPS) (Seyberth, 2008). Das antenatale Bartter-Syndrom ist durch eine hypokaliämische Alkalose und einen hyperreninämischen Hyperaldosteronismus mit Hypercalciurie und eine früh auftretende Nephrocalcinose charakterisiert. Pränatal weist ein Polyhydramnion mit fetaler Polyurie auf diese Tubulopathie hin. Die oft zu früh geborenen Kinder zeigen schwere Dehydration und

Polyurie, bedingt durch Wasser- und Salzverluste. Darüber hinaus wird bei den Kindern Wachstumsstörung mit Osteopenien, Muskelkrämpfe und Muskelschwäche beobachtet. Zusätzlich zeigt sich eine ausgeprägte  $\text{PGE}_2$ -Synthese mit Fieber sowie frühe Nephrocalcinose (Gamba und Friedman, 2009; Seyberth, 2008; Watanabe et al., 2002).

#### Klassisches Bartter-Syndrom

Dem BS Typ 3 liegt ein Defekt des basolateralen Chloridkanals  $\text{Cl}^-$ -Kb zugrunde. Die Erstmanifestation des cBS erfolgt meistens im ersten Lebensjahr.

#### Gitelman-Syndrom

Dem Gitelman-Syndrom liegt ein Defekt des  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -Symporters NCCT zugrunde. Infolgedessen kommt es im distalen Tubulus zur Minderung der Natriumresorption aus dem Lumen sowie zur Erhöhung der Calciumresorption über die spannungsabhängigen apikalen Calciumkanäle. Darüber hinaus kommt es zu einer Hypomagnesiämie mit Hypermagnesiurie und Hypocalciurie. Die Störung manifestiert sich in der späten Kindheit durch Muskelschwäche, tetanische Krämpfe und Müdigkeit. Aufgrund der niedrigen Magnesium- und Calciumwerte kommt es häufig zu malignen, oft lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen (Barakat und Rennert, 2001; Colussi et al., 1994; Gitelman et al., 1966; Gjata et al., 2007; Hampson et al., 2008; Konrad et al., 2000; Zarraga Larrondo et al., 1992).

#### 1.2.10 Therapie

Der CaSR wird durch eine Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration aktiviert und fördert die Entstehung einer Normocalcämie durch die Regulation der PTH-Sekretion und der renalen Calciumausscheidung. Derzeit gibt es keine offiziellen Leitlinien, die sich mit dem Management des HP beschäftigen. Das therapeutische Vorgehen basiert auf der klinischen Beurteilung und ist auf die Bedürfnisse der Patienten ausgerichtet (De Sanctis et al., 2012; Khan et al., 2009; Shoback, 2008). Eine akute Hypocalcämie sollte wie ein Notfall behandelt werden, wobei sich die Therapie in diesem Fall leicht durchführbar gestaltet. Im Gegenteil dazu bereitet die Behandlung der chronischen Hypocalcämie wesentliche therapeutische Schwierigkeiten. Die aktuellen Langzeittherapieoptionen bestehen aus Calciumgaben, Vitamin-D-Metaboliten,

Thiaziddiuretika, phosphatbindenden Substanzen sowie einer phosphat- und salzarmen Diät. Ziel der Therapie bei Patienten mit primärem HP ist es, den Calciumspiegel zu normalisieren sowie die klinische Manifestation zu optimieren (Bilezikian et al., 2009; Khan et al., 2009).

Die primären Ziele der Behandlung beinhalten die Kontrolle der Symptome und die Erhöhung des Calciumspiegels im Serum bis zur unteren Normgrenze, die Überwachung des Phosphatspiegels im Serum innerhalb des normalen Bereiches, die Überwachung der Calciumausscheidung im Urin über 24 h mit der Zielgrenze von <7.5 mmol/Tag (300 mg/Tag) sowie die Überwachung von Calciumphosphat-Produkten zur Vermeidung der Nephrolithiasis, der Nephrocalcinose und der Calcifikation der Weichgewebe (Khan et al., 2009). Die Mehrheit der pädiatrischen Fälle von HP bleibt mit konventionellen Therapeutika wie Calcium und Vitamin-D-Analoga unter Kontrolle. Dennoch könnte diese Art der Behandlung im Falle von Patienten mit (u.a.) aktivierenden Mutationen des CaSR Schwierigkeiten bereiten.

Die aktivierenden Mutationen des CaSR, die zur ADH führen, verursachen eine erhöhte Sensitivität für das extrazelluläre Calcium und beeinträchtigen die Fähigkeit, eine Hypocalcämie zu erkennen und zu korrigieren (De Sanctis et al., 2012; Pearce, 1998; 2002; Raue et al., 2011). Versuche, ADH-Patienten mittels Vitamin-D- und Calciumgaben zu behandeln, führen häufig zur Exazerbation der Hypercalciurie mit Nephrocalcinose, Nephrolithiasis und chronischer Niereninsuffizienz (Pearce, 1998; Pearce et al., 1996a; Pearce und Brown, 1996; Pearce und Thakker, 1997; Pearce et al., 1995; Pearce et al., 1996b; Pearce et al., 1996c). Daher ist es besonders wichtig, die Gruppe der Patienten mit ADH zu erkennen und sie durch eine genetische Untersuchung zu definieren. Zahlreiche klinische Studien haben sich mit der Beurteilung der Behandlung mit PTH(1–34) und PTH(1–84) als Ersatztherapie bei HP befasst (Rejnmark et al., 2013; Rolighed et al., 2014; Sikjaer et al., 2013; Sikjaer et al., 2011a; Sikjaer et al., 2011b; Winer et al., 2003; Winer et al., 2010). Wiener et al. verglichen die Monotherapie mit PTH(1–34) versus Calcitriol und Calcium, um die Langzeitwirkung von PTH nachzuweisen (Winer et al., 2003; Winer et al., 2010). Die Studie an 27 erwachsenen Patienten zeigte, dass die durchschnittliche Calciumausscheidung bei der Gruppe mit

der herkömmlichen Therapie erhöht blieb, während sich die Calciumausscheidung in der PTH(1–34)-Gruppe innerhalb der normalen Bandbreite bewegte (Winer et al., 2003; Winer et al., 2010). Mittelman et al. zeigten, dass die Verwendung von humanem PTH für die Behandlung von Patienten mit PTH-Mangel und Menschen mit aktivierenden CaSR-Mutationen im Vergleich zur konventionellen Behandlung mit Calcium und Calcitriol den Calciumspiegel im unteren Bereich halten und die renale Calciumausscheidung vermindern kann (Mittelman et al., 2006). Fünf randomisierte klinische Studien mit Kindern und Erwachsenen mit HP unterschiedlicher Ursachen inklusive der Ursachen von ADH wurden von Sikjaer et al. (Sikjaer et al., 2011b) evaluiert. Die Therapie mit PTH(1–34) konnte nach diesen Studien den Calciumspiegel auf einem annehmbaren Niveau stabilisieren, sodass auf die Behandlung mit Vitamin D verzichtet werden konnte. Dennoch zeigten sich diskrepante Ergebnisse hinsichtlich der Calciumausscheidung in den Urin als Antwort auf PTH. In den meisten Studien war kein signifikanter Effekt der PTH-Behandlung festzustellen (Sikjaer et al., 2011b). In anderen Studien konnten Wiener et al. bei 14 Kindern mit HP im Alter von 4–17 Jahren zeigen, dass eine zweimal tägliche Gabe von PTH(1–34) verglichen mit einer einmal täglichen Gabe eine effektivere Behandlung bietet, da die Schwankungen der Serumcalciumwerte mit niedrigeren PTH(1–34)-Dosen deutlicher reduziert werden konnten als mit höheren Dosen. (Winer et al., 2003; Winer et al., 2010). Darüber hinaus war die Gesamtdosis an verabreichtem PTH(1–34) bei einer zweimaligen Gabe niedriger als bei einer einmaligen Gabe (Winer et al., 2003; Winer et al., 2010; Winer et al., 2012). In der Studie von Linglart et al. wurde die Verabreichung von PTH über eine Pumpe im Vergleich zur oralen Gabe zweimal täglich untersucht (Linglart et al., 2011). Die kontinuierliche Gabe über die Pumpe verursachte geringere Fluktuationen im Serumcalciumspiegel und führte zu einer über 50%igen Reduktion des Calciumspiegels im Urin sowie zur Reduktion der PTH-Dosierung, die notwendig wäre, um die Normocalcämie zu erreichen. Drei Patienten mit HP, von denen zwei gegenüber der konventionellen Therapie refraktär waren, konnten mit langfristigen, kontinuierlichen subkutanen Gaben von PTH(1–34) behandelt werden (Linglart et al., 2011). Problematisch erweisen sich die Kontraindikationen der Behandlung. Das rekombinante humane PTH(1–34) ist bei Kindern aufgrund

eines potenziell erhöhten Risikos für Osteosarkome kontraindiziert und bei Erwachsenen auf eine Therapiedauer von maximal zwei Jahren beschränkt. Dennoch wurden von Theman et al. sowie Diaz-Soto et al. Einzelfälle beschrieben, bei denen zwei Patienten (ein sechs Jahre altes Mädchen mit erworbenem HP sekundär zu einer aktivierenden Mutation im CaSR und eine 53 Jahre alte Frau mit refraktärem HP) für insgesamt 13,5 bzw. fünf Jahre mit rekombinantem PTH komplikationslos behandelt wurden (Diaz-Soto et al., 2012; Theman und Collins, 2009; Theman et al., 2009). In den klinischen Studien mit PTH(1–84) wurde beobachtet, dass die Verabreichung des intakten PTH jeden zweiten Tag über zwei Jahre den Bedarf an Vitamin D und Calcium zur Normalisierung der Calciumwerte senkte (Rubin et al., 2010). Ähnliche Erkenntnisse konnte man den sechs Monate dauernden Studien von Sikjaer et al. entnehmen (Sikjaer et al., 2011b). In den Beobachtungsstudien von Cusano et al. wurde gezeigt, dass die Therapie mit PTH(1–84) mit guter Verträglichkeit den Bedarf an Calcium und 1,25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D signifikant senkt und zu stabilen Calciumwerten und zur Reduktion der Calciumausscheidung in den Urin führt (Cusano und Bilezikian, 2013; Cusano et al., 2013a; Cusano et al., 2013b; Cusano et al., 2013c; Cusano et al., 2012; Cusano et al., 2013d).

Während hypocalciurische Substanzen wie PTH und Thiazide schon verwendet werden, um mögliche Komplikationen der Behandlung mit Calcium und Vitamin D zu umgehen, wird die neue Gruppe von sogenannten allosterischen Modulatoren erst in klinischen Studien getestet (Letz et al.; Mittelman et al., 2006; Sato et al., 2002). Pharmakologische Modulatoren der CaSR-Funktion zielen auf die überlappenden allosterischen Bindungsorte innerhalb der TMD und beinhalten sowohl allosterische Agonisten (Calcimimetika) als auch allosterische Antagonisten (Calcilytika) (Breitwieser, 2013a; 2013b). Cinacalcet (Sensipar/Mimpara) ist der erste zugelassene allosterische Agonist für GPCR und wird für die Behandlung des sekundären Hyperparathyreoidismus bei chronischer Niereninsuffizienz oder Adenomen in den Nebenschilddrüsen angewendet (Breitwieser, 2013b). In beiden Fällen kommt es zur Reduktion der CaSR-Funktion und/oder -Expression. Cinacalcet kann die Signalübertragung über den CaSR steigern und die Expression des CaSR erhöhen (Breitwieser, 2013b; Grant et al., 2012).



CaSR-Inhibitoren (Calcilytika) haben die Eigenschaft, den CaSR zu antagonisieren und somit die Freisetzung von PTH zu stimulieren und den Calciumverlust über die Nieren zu senken. Diese Gruppe von Molekülen bietet eine neue Alternative für Erkrankungen mit intakten, aber unterfunktionierenden Nebenschilddrüsen (Letz et al.). Eine andere neue Therapieoption stellen die Pharmakoperonen dar. Die Expression des Wildtyp-Rezeptors und der Mutanten kann während der Biosynthese durch die Behandlung der Zellen mit Proteasom-Inhibitoren gesteigert werden, was darauf schließen lässt, dass infolge von erkennbaren Defekten eine variable Fraktion der neu synthetisierten Rezeptoren durch die Kontrollschranke des ER direkt zur Degradation weitergeleitet wird (Breitwieser, 2013b; Cavanaugh et al.; Huang und Breitwieser, 2007; White et al., 2009). Eine Blockade der proteasomalen Degradation kann die Menge an Membranproteinen erhöhen, indem sie zusätzliche Zeit für die erneute Chaperon-assistierte Proteinfaltung zur Verfügung stellt (Breitwieser, 2013b). Das Blockieren der proteasomalen Degradation über längere Zeit führt zu einem Anstieg des Wildtyp-CaSR mit erhöhter Expression auf der Zelloberfläche (Huang und Breitwieser, 2007; Huang et al., 2006; White et al., 2009). Denselben Mechanismus kann man auch bei FHH/NSHPT-Mutanten beobachten, die auf die proteasomale Inhibierung ebenfalls mit einem Anstieg der Gesamt Rezeptorzahl auf der Zelloberfläche antworten.

Die Heraufregulierung der Gesamtexpression in der Zellmembran wurde auch nach der Behandlung mit allosterischen Modulatoren beobachtet. Für viele verschiedene FHH/NSHPT-Mutationen erhöht die Behandlung mit NPS R-568 oder Cinacalcet die Anzahl an vollständig glykosylierten Rezeptoren und fördert sowohl die Zielausrichtung auf die Membran als auch die Signalübertragung. Die Tatsache, dass die Calcimimetika direkt an den Rezeptor binden und seine Struktur stabilisieren, liefert Hinweise darauf, dass diese Moleküle wie Pharmakoperonen direkt an der ER-Kontrollschranke wirken. Somit kommt es zur Erhöhung des Rezeptorlevels auf der Membranoberfläche und die Zielausrichtung der Signale zur Membran steigt.

Erste Studien definieren Unterschiede zwischen den Wirkmechanismen von Pharmakoperonen und Calcimimetika am ER. Erstere führen zur CaSR-Stabilisierung, während die Calcilytika inaktive Konformation bevorzugen, die zu reduzierten CaSR-

Leveln führen (Huang und Breitwieser, 2007). Leider ist zurzeit noch zu wenig über die Zusammenhänge zwischen der Aktivierung des Rezeptors auf der Membranoberfläche und der Wirkung der Pharmakoperonen in Bezug auf die Normalisierung der Funktion bekannt. Weitere Erkenntnisse zu den Wirkmechanismen auf der Oberfläche sowie an den intrazytoplasmatischen Anbindungsstellen könnten einen potenziellen Ansatz in der Therapie u.a. der ADH bilden.

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit setzt sich mit der autosomal-dominanten Hypocalcämie und einer zugrunde liegenden neuen Mutation im Calcium-Sensing-Rezeptor (P136L) klinisch, biochemisch und molekular-biologisch auseinander. In einem ersten Schritt wurden molekulargenetische Untersuchungen an einer Familie durchgeführt, bei deren Mitgliedern eine Hypocalcämie über drei Generationen nachgewiesen wurde und die gemäß Verdacht auf familiären Hypoparathyreoidismus symptomatisch behandelt wurde. Mit der Genomsequenzierung wurde der Nachweis der Mutation unternommen, gegebenenfalls sollte der genetische Stammbaum der Familie abgebildet werden.

Ziel der Arbeit war es zu prüfen, ob das potenzielle Vorhandensein einer aktivierenden Mutation im CaSR-Gen die Ursache der Hypocalcämie im Rahmen eines idiopathischen Hypoparathyreoidismus bei diesen Patienten sein könnte. Im zweiten Schritt sollte eine klinische und biochemische Charakterisierung der Familie erarbeitet werden und ggf. das Ausmaß der Erkrankung in der Familie beurteilt werden. Im dritten Schritt wurden die Aktivität der neuartigen CaSR-Mutante und ihre unterschiedlichen Krankheitsausprägungen anhand der klinischen und biochemischen Eigenschaften der Familienmitglieder tabellarisch dargestellt und analysiert.

Um die Frage zu beantworten, ob und wie die aktivierende Mutation die Calciumhomöostase beeinflusst, wurden nach der Herstellung von entsprechenden Vektoren durch Mutagenese transient transfizierte HEK293-Zellen funktionellen Untersuchungen nach Calciumstimulation mittels FURA-2/AM-Bestimmung und Signalkaskadenmapping unterzogen. Die beiden Formen des Rezeptors wurden mittels der Zellyse gewonnen und anschließend durch einen Westerblot nachgewiesen. Da insbesondere die Calciumhomöostase im Bezug auf CaSR klinisch relevant ist, wurden als Modell zur Mapping der Signalkaskaden die HEK-293 Zellen ausgewählt. Der Vorteil der HEK293 Zellen basiert auf der Tatsache, dass in den HEK293 kein CaSR Rezeptor exprimiert wird und die Zellen als leicht transfizierbar gelten. Der Einfluss des Calciums auf CaSR erlaubt weitere Rückschlüsse auf die durch Calciumionen induzierte Aktivierung des intrazellulären Calciums und ermöglicht Vergleiche mit den MAP-Kinasen-Aktivierung. Damit sollte die Schlussfolgerung genotypischer Ursachen für die

phänotypischen Symptome der CaSR-assoziierten Erkrankungen gewonnen werden. Hierbei wurden die Folgen der aktivierenden Mutation mit der Aktivität des Wildtyp-CaSR-Gens verglichen.

### 3. Material

#### 3.1 EDV

Software Cell^P  
 Software Chromas 2.4  
 Software CodonCode Aligner  
 Software DNA Baser  
 Software EndNote X2  
 Software ImageJ  
 Software OligoPerfect™ Designer  
 Software PrimerX  
 Software ImageLab

#### 3.2 Geräte

Analysenwaage BP 2100S	Sartorius
Begasungsbrutschrank	Memmert
Blotkammer	Bio-Rad
Dampfsterilisator Varioklav	H+P Labortechnik
Digitale Geldokumentation	Bio-Rad
DNA-Elektrophoresekammer	Bio-Rad
Horizontalschüttler	Eppendorf
Inkubator	Heraeus
Lichtmikroskop	Zeiss
Heiz-Magnetrührer	Gerhard
Heizblock	Eppendorf
PCR-Express Thermocycler	Biometra
pH-Meter pH DIGI 520	WTW
Schüttelinkubator	Innova 4000
SDS-Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad
Spektralphotometer/Spektrophotometer	Bio-Rad
Sterilbank	Heraeus
Überkopfschüttler	Eppendorf
Schüttelwasserbad	Kättermann Labortechnik
Zentrifuge CPKR (Bakterien)	Beckman
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein
Pipettenboy accu-jet boy	Brand
Kühlschrank 4, -25, -80 °C	Bosch

### 3.3 Verbrauchsmaterialien

Die Verbrauchsmaterialien wurden über die Firmen BD Falcon, Brand, Costar, GE Healthcare, Gilson, Greiner, Eppendorf, Ilmabor, Millipore, Sarstedt, Schott Duran und Whatman bezogen.

### 3.4 Chemikalien

Chemikalien wurden über die Firmen Applichem (Darmstadt), Biomol (Ilvesheim), Bio-Rad (München), Invitrogen (San Diego, CA, USA), Merck (Darmstadt), Promega, Qiagen (Hilden), Sigma-Aldrich GmbH (München) und Stratagene bezogen.

### 3.5 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Die Antikörper lieferten die Firmen Santa Cruz Biotechnology, Cell Signalling Technology und Imagenex. Es wurden folgende Antikörper verwendet:  $\alpha$ -ERK1 (E-6): sc-271271;  $\alpha$ -pERK (E-4): sc-7383;  $\alpha$ -p38 $\alpha$  (F-9): sc-271120;  $\alpha$ -pp38 (D-8): sc-7973;  $\alpha$ -JNK (D-2): sc-7345;  $\alpha$ -pJNK (G-7): sc-6254;  $\alpha$ -CaSR (F-19): sc-32181;  $\alpha$ -CaSR (6D4): sc-47741; Ziege anti-Maus IgG; Maus anti-Kaninchen IgG; Rind anti-Kaninchen IgG; Huhn anti-Maus IgG; Rind anti-Ziege IgG. Es wurden folgende Fluoreszenzfarbstoffe der Firma Invitrogen verwendet: FURA-2/AM, DAPI.

### 3.6 Reaktionssysteme (Kits)

Wenn nicht anders angegeben, wurden bei der Verwendung von Kits stets die Angaben des Herstellers befolgt:

FuGENE Transfection Reagent (Promega)

QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)

S.N.A.P. MiniPrep Kit (Invitrogen)

Plasmid Midi Kit, Plasmid Maxi Kit (Qiagen)

### 3.7 Verwendete Bakterienstämme, Plasmide, Ziellinien

#### 3.7.1 *Escherichia coli*

Zur Vermehrung und Gewinnung größerer Mengen an Plasmiden wurden *E. coli*-Kulturen eingesetzt. Der Stamm DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> wurde zur Vermehrung der leeren pcDNA3.1-

Plasmide verwendet, während der Stamm XL1-Blue zum Klonieren der Plasmide mit dem Wildtyp-Insert bzw. mit der codierenden Sequenz für den mutierten CaSR diente.

**Tab. 4:** Charakteristika der *Escherichia coli*-Stämme

XL1-Blue supercompetent cells (Stratagene): <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr)]
<i>E. coli</i> DH5α <sup>TM</sup> (Invitrogen): F <sup>-</sup> Φ80 <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)</i> U169 <i>recA1 endA1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) phoA supE44 thi-1gyrA96 relA1 λ</i>
One Shot TOP10F' (Invitrogen): F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>

### 3.7.2 Zelllinien

HEK293-Zellen

HEK293T-Zellen

### 3.7.3 Plasmide

**pcDNA3.1(+)** (Invitrogen): Dieser Vektor wird für die hochpotente, stabile und transiente konstitutive Expression in verschiedenen Zelllinien hergestellt. Der 5.4 kb große Vektor beinhaltet: den Cytomegalovirus (CMV)-Promotor für die konstitutive Expression einklonierter cDNA-Sequenzen, ein Resistenzgen für Ampicillin und Geneticin<sup>®</sup>, einen Polylinker (Multiple Cloning Site), eine Signalsequenz für die Polyadenylierung zur Erhöhung der mRNA-Stabilität, eine Transkriptionsterminierungssequenz, den SV40-Replikationsursprung, den pUC-Replikationsursprung zur Selektion und Transformation in *E. coli*.

**pcDNA3.1-CaSR:** pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor, in den die humane cDNA-Sequenz des CaSR mithilfe der *KpnI*- und *XbaI*-Restriktionsstellen einkloniert wurde. pcDNA3-CaSR wurde freundlicherweise von Frau Dr. Mei Bai und Dr. Ed Brown (Endocrine-Hypertension Division, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA) zur Verfügung gestellt (Bai et al., 1996).

**pUC18/19** (Invitrogen/Stratagene): Ein Plasmid zur Transfektions- bzw. Transformationskontrolle mit einer Größe von 2,7 kb; es beinhaltet zahlreiche Klonierungsstellen und ein Resistenzgen für Ampicillin.

**pWhitescript 4.5-kb** (Stratagene): Das Plasmid wird zur Kontrolle der Effizienz der Mutagenese verwendet. Es enthält ein Stopkodon (TAA) in der Position, wo normaler-

weise das Kodon für Glutamin (CAA) liegt, und somit ist die Funktion der  $\beta$ -Galactosidase unterbrochen. Die mit dem Plasmid transformierten XL1-Blue superkompetenten Zellen bilden weiße Kolonien auf den LB-Ampicillin-Agarplatten mit dem IPTG- und X-Gal-Zusatz. War die Mutagenese mit den Kontrollprimern erfolgreich, sind die gewachsenen Kolonien blau gefärbt.

### 3.8 Molekulargewichtsstandards

DNA Standard 1-kBp DNA Ladder (Serva)

Precision Protein Standards (Bio-Rad)

### 3.9 Verwendete Enzyme

*Pst*I, *Sca*I, *Xba*I, *Kpn*I (Invitrogen)

*Pfu*Turbo DNA-Polymerase und Restriktionsenzym *Dpn*I (Kit von Stratagene)

### 3.10 Primer

Für die In-vitro-Mutagenese des CaSR-Gens zur Herstellung der P136L-Mutante wurden die Oligonukleotide passend zur cDNA CASR hum. 4924 bp, Access No. NM\_000388.3 bezogen (**Abb. 4**).

**Tab. 5:** Verwendete Plasmide und Primer

Plasmid	Primer: F = forward, R = reverse
pcDNA3.1.	F: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' R: 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGGC-3'
pUC18/19	F: 5'-CCATGATTACGC CAAGCGCGCAATTAACCCTCAC-3' R: 5'-GTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGCGTAATCATG G-3'
CaSR-P136L	F: 5'-CTGCTCAGAGCACATTCTCTCTACGATTGCTGTG-3' R: 5'-CACAGCAATCGTAGAGAGAATGTGCTCTGAGCAG-3'

Die Primer wurden über die NCBI- und GenEmbl-Datenbanken auf ihre Spezifität für die kodierende Sequenz des CaSR-Gens überprüft. Folgende Oligonukleotide wurden als Primer für die PCR zur ortsspezifischen Mutagenese eingesetzt (**Tab. 5**). Die Primer wurden von den Firmen Invitrogen und MWG Eurofines synthetisiert. Die Primerssequenzen für die Insert-Sequenzierung wurden mit der Primer-Designer-Software entworfen und von Invitrogen hergestellt (**Tab. 6**).





**Tab. 6:** Verwendete Primer

<b>CaSR-Gen-Primers</b>	<b>Primer-Sequenz</b>
CASR for 1	GGA GAG TGG AAG GAG GGA
CASR for 2	TGG GTT TCG CTG GTT ACA
CASR for 3	ATC AAG GAG ATT GTC CGG
CASR for 4	TCC ATC ATC AAC TGG CAC
CASR for 5	CAT GCA TCC TGG TGA AAA C
CASR for 6	CCC AGA TGC AAG CAG AAG
CASR rev 1	AGC AAC AAA ACT CAG GGT G
CASR rev 2	ACG TGG AAG TAC TGA GGC AT
CASR rev 3	ATG AAG AGT CTT TCT CCC TTC TT
CASR rev 4	AAG GTG CAG AGG AAA ACC A
CASR rev 5	GCT GCT GCT GAG ATC GTT
CASR rev 6	TGC AGA CCT GTT TCC TGG

### 3.11 Lösungen und Puffer

1 M Tris/HCl: 121,1 g Tris, pH 7,5, ad 1000 ml, autoklaviert.

4 % Paraformaldehyd (PFA)-Lösung: 4 g PFA ad 100 ml PBS.

Permeabilisationslösung für die Immunfluoreszenz: 0,2 ml Triton X 100 in 100 ml PBS

TE: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5.

TBE: 90 mM Tris/HCl, 90 mM Borsäure, 10 mM EDTA, pH 8,0.

TAE: 40 mM Tris/Essigsäure, 2 mM EDTA, pH 8,5.

Agarosegel-Probenpuffer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 50 % (w/v) Glycerin, 0,05 % (w/v)

Bromphenolblau, Xylencyanol, pH 7,5.

10 x PBS: 80 g NaCl, 1,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / 800 ml H<sub>2</sub>O bidest., pH 7,4 ad 1000 ml.

PBS pH 7,2–7,4: 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl.

50 x TAE: 2 M Tris, 1 M Essigsäure, 100 mM EDTA, pH 8,1.

Zellyse-Puffer: 50 mM NaF, 2,5 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 20 mM Tris pH 7,5, 10 % Glycerin, 1 % Na-Deoxycholat, 0,1 % SDS, 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; Proteaseinhibitor-Cocktail und 50 µM Natriumorthovanadat.

50 x Proteaseinhibitor-Cocktail: 1 Tablette Complete™, 1 ml H<sub>2</sub>O bidest; 100 µl Stock-Lösung / 10 ml Zellyse-Puffer.

1 M Tris pH 8,8: 121 g Tris-Base, mit HCl<sub>konz.</sub> pH-Wert bei RT einstellen, ad 1000 ml.

2 M Tris pH 6,7: 121 g Tris-Base, 400 ml H<sub>2</sub>O, mit HCl<sub>konz.</sub> pH bei RT, ad 500 ml.

10 % SDS: 10 g Natriumdodecylsulfat, 100 ml H<sub>2</sub>O bidest.

10 % APS: 0,4 g Ammoniumpersulfat, 4,0 ml H<sub>2</sub>O bidest.

10 x Running-Puffer, Stocklösung: 720 g Glycin, 150 g Tris-Base, ddH<sub>2</sub>O ad 5 l, 4 °C .

1 x Running-Puffer: 50 ml 10 x Running-Puffer, 5 ml 10 % SDS, ddH<sub>2</sub>O ad 500 ml.

1 x Transfer-Puffer: 100 ml 10 x Running-Puffer, 200 ml 100 % Methanol, 10 ml 10 % SDS, 690 ml ddH<sub>2</sub>O.

3 x Probenpuffer: 7 ml 1 M Tris/HCl pH 6,8, 11,9 ml 25 % SDS, 14 ml 100 % Glycerin, 0,05 % Bromphenolblau, 2 ml 2-Mercaptoethanol oder DDT, pH 6,8.

10 x TBS: 84,15 g NaCl, 100 ml 1 M Tris/HCl pH 8,0, ddH<sub>2</sub>O ad 1000 ml.

1 x TBS: 100 ml 10 x TBS, Aqua bidest. ad 1000 ml.

TBST: 1 x TBS, 0,05 % Tween-20.

TBST-4 % BSA Blocking-Puffer: TBST, 4 g BSA/100 ml.

TBST-3 % BSA: TBST, 3 g BSA/100 ml.

TBST-0,5 % BSA: TBST, 0,5 g BSA/100 ml.

### 3.12 Nährmedien

#### 3.12.1 Medien für Bakterien

LB-Medium: 10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefe-Extrakt, 10 g NaCl, ad 1000 ml H<sub>2</sub>O bidest., pH 7,5, autoklavieren (20 min, 121 °C).

LB-Agar: 1000 ml LB-Medium, 20 g Agar, pH 7,0, autoklavieren (20 min, 121 °C); danach die Ampicillinlösung zugeben, Endkonzentration 200 µg / ml.

LB-Ampicillin-Agarplatten: Es wurden je 25 ml LB-Agar-Lösung in der Sterilbank auf Petrischalen mit 10 cm Ø gegossen und anschliessend bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

SOC-Medium (Invitrogen) oder NZY Broth: für 1000 ml pH 7,5: 20 mM Glucose, 20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>.

Glycerinlösung für die Kryokonservierung: 65 % v/v Glycerin, 0,1 M MgSO<sub>4</sub>, 0,025 M Tris/HCl.

### 3.12.2 Medien und Lösungen für Zellkultur

Kulturmedium: DMEM High Glucose, 10 % FCS, 0,5 % 10 mg/ml Gentamicin, 2 mM L-Glutamin.

Medium für die Kryokonservierung: 20 % DMEM, 60 % fetales Kälberserum, 20 % DMSO.

Medium für die Kultivierung nach dem Auftauen: 293 SFM II-Medium, 10 ml PenStrep, 20 ml GlutaMAX.

Trypsin-EDTA-Lösung: 0,05 % (w/v) Trypsin, 0,02 % (w/v) EDTA in PBS.

## 4. Methoden

### 4.1 Direkte Sequenzierung des CASR

Zur Untersuchung wurden Leukozyten aus dem peripheren Blut verwendet. Die DNA-Proben wurden nach Standardprotokoll isoliert (Tan et al., 2003). Die Exons 2–7 (verantwortlich für die Proteinkodierung) des CASR wurden mittels PCR amplifiziert (D'Souza-Li et al., 2002; Hendy et al., 2003; Janicic et al., 1995; Lienhardt et al., 2000; Pearce et al., 1995; Pollak et al., 1993; Zajickova et al., 2007). Die Produkte der Amplifizierung wurden aufgereinigt und die Nukleotidsequenzen beider DNA-Stränge wurden durch direkte Sequenzierung bestimmt und mit der Standard-DNA-Sequenz verglichen. Diese Untersuchungen wurden in der Praxis für Humangenetik in Hamburg-Altona bei Dr. med. Elke Kaminsky, Humangenetische Beratung und Diagnostik, durchgeführt.

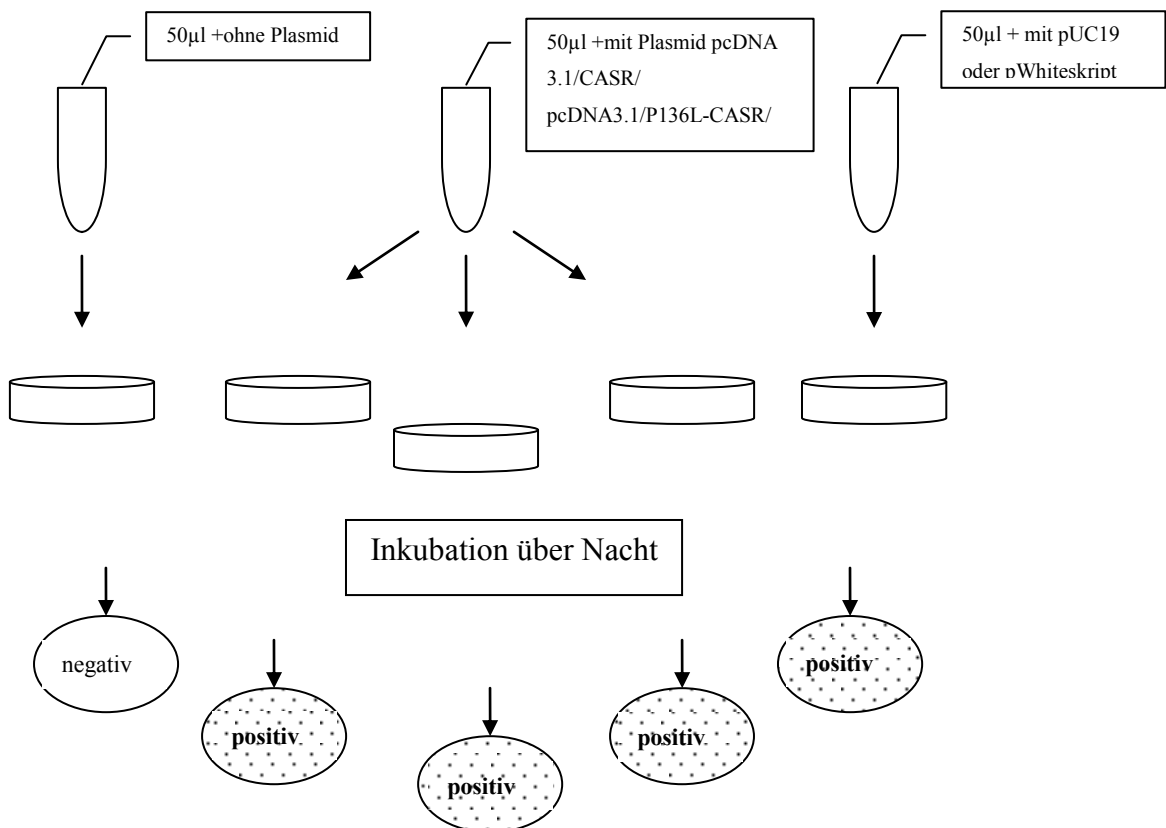
### 4.2 Molekularbiologische Methoden

#### 4.2.1 Handhabung von Bakterienstämmen und Transformation von *E. coli*

Um die Eigenschaften des Gens *in vitro* zu untersuchen, wurde die Transformation nach den Angaben des Protokolls des Herstellers (Stratagene) zum Einschleusen des Gens in die Bakterien durchgeführt. Für die Transformation wurden kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>-Zellen oder XL10-Gold<sup>®</sup> Ultracompetent Cells (Stratagene, La Jolla, CA, USA) verwendet (**Tab. 4**). Die bei –80 °C gelagerten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und kurz auf dem Vortexmixer gemischt. Jeweils 200  $\mu$ l Bakterien wurden in den 1,5-ml-Reaktionsgefäßen eingesetzt und entsprechend mit den Plasmiden pcDNA3.1, pcDNA3.1-CASR oder P136L-CASR-Mutant für 5 min auf Eis versetzt und inkubiert. Zur Transformationskontrolle wurden die Bakterien mit pWhitescript und pUC18/19 inkubiert. Die Inkubation ermöglichte die Anlagerung der Plasmide an die Bakterienwand. Das pcDNA3.1-Plasmid mit der einklonierten cDNA für den Wildtyp des humanen CASR wurde von Dr. M. Bai zur Verfügung gestellt (Bai et al., 1997b; Bai et al., 1998).

Zum Einschleusen der Plasmide wurde die Bakterienwand durch einen „Hitzeschock“ bei 42 °C für 60 s kurzzeitig destabilisiert und für die Plasmide durchgängig gemacht. Anschließend erfolgte ein 2-minütiger Inkubationsschritt auf Eis. Danach wurden dem Transformationsansatz 250  $\mu$ l des vorgewärmten NZY-Mediums zugegeben und dann

unter starkem Schütteln im Schüttelinkubator bei 37 °C und 225 rpm für 1 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die transformierten Zellen auf im Inkubator aufgewärmte LB-Agar-Ampicillin-Platten (100 µg/ml) mit Pasteurpipetten ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert, bis die Einzelkolonien sichtbar wurden (**Abb. 5**).



**Abb. 5:** Der Ablauf der Transformation in schematischer Darstellung.

#### 4.2.2 Ortsspezifische Mutagenese

Zur funktionellen Charakterisierung des mutierten CaSR wurden ortsspezifisch Mutationen im CASR-Insert generiert. Ausgehend vom pcDNA3.1-Wildtyp-CASR-Plasmid (GenBank Accession No. U20759) erfolgte die Mutagenese mithilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis-Kits und den in **Tab. 5** angegebenen Oligonukleotiden. Die Mutagenese führte zur Generierung einer Punktmutation (CCC gegen CTC), die den Austausch der Aminosäure Prolin gegen Leucin in Kodon 136 in Exon 3 zur Folge hatte. Dabei wurde nach der vom Hersteller mitgelieferten Arbeitsanweisung verfahren. In ei-

nem 50- $\mu$ l-Ansatz waren folgende Komponenten enthalten: dNTPs (200  $\mu$ M je Nukleotid), 10  $\times$  PCR-Puffer, Plasmid pcDNA3.1-CASR (18 ng), das Oligonukleotidpaar mit der P136L-Mutation, 2,5 U *Pfu*Turbo DNA-Polymerase und destilliertes Wasser ad 50  $\mu$ l. Bis auf die Polymerase, die unmittelbar vor dem Beginn der Reaktion zugegeben wurde, wurden sämtliche Komponenten zusammenpipettiert, abzentrifugiert und in den Mastercycler gestellt.

Das PCR-Programm bestand aus den in **Tab. 7** aufgeführten Schritten. Die Plasmide wurden nach der Mutagenese aufgereinigt. Zur Bestätigung der korrekten Sequenz wurde die mutierte DNA anschließend sequenziert. Nach der Verifizierung der Sequenz erfolgte die Vervielfältigung des mutierten Plasmides. Die Plasmidproben mit einer Konzentration von ca. 30  $\mu$ g/ml wurden in den weiteren Experimenten verwendet.

**Tab. 7:** PCR-Programm

PCR-Schritte		Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung		95 °C	1 min
2. Zyklen 20 $\times$	Denaturierung	95 °C	50 s
	Primeranlagerung	60–70 °C	50 s
	Kettenverlängerung	68 °C	9 min 15 s
3. Finale Kettenverlängerung		68 °C	7 min
4. Lagerung		4 °C	bis zur Entnahme

#### 4.2.3 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Überprüfung der Mutageneserate und zum Ausschluss neu entstandener Mutationen wurde die Basensequenz der Plasmid-DNA bestimmt. Die doppelsträngige Sequenzierung erfolgte durch die Firma Qiagen. Zur Sequenzierungsreaktion wurden jeweils 10  $\mu$ g der gewonnenen Plasmid-DNA-Proben sowie die kodierenden Primer für jedes Exon des *CaR*-Gens mitgeliefert (**Tab. 6**).

#### 4.2.4 Auswertung der Nukleotid- und Proteinsequenzen

Nach Ablauf der PCR folgte eine Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Anhand der Fragmentgröße konnte die richtig inserierte cDNA identifiziert werden. Die detaillierte Überprüfung der Basensequenz im Plasmid und die Auswertung erfolgten mithilfe des CodonCode Aligner-Programms. Die weiteren Experimen-

te wurden mit den Proben fortgesetzt, die nur die gewünschte Punktmutation zeigten. Die positiven Plasmide wurden zur präparativen Vervielfältigung in *E. coli*-Bakterien herangezogen.

#### 4.2.5 Plasmidisolierung

Die angewendete Methode zur Präparation der Plasmide mit der cDNA für den humanen CaSR beruht auf einer Abwandlung der Methode der alkalischen Lyse. Je nach benötigter Menge erfolgte die Plasmidisolierung mit einem der folgenden Kits: S.N.A.P. MiniPrep Kit (Invitrogen), Plasmid Midi Kit (Qiagen) oder Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Die isolierten Plasmide wurden entweder direkt zur Transfektion verwendet oder mit Restriktionsendonukleasen inkubiert, um die enthaltenen Fragmente zu analysieren.

##### 4.2.5.1. Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präzipitation und Isolierung der Plasmide wurde das S.N.A.P.<sup>TM</sup> MiniPrep Kit von Invitrogen nach den Angaben des Herstellers verwendet. Für die Vorbereitung der Minikultur wurden die Einzelkolonien der über Nacht auf den Petrischalen kultivierten Bakterien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt.

Die Minikultur wurde mit 3 ml flüssigem LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) in einem 5-ml-Falcon-Röhrchen vorbereitet. Die gepickten Kolonien wurden einzeln im LB-Medium im Reagenzgefäß resuspendiert und über Nacht für ca. 16 h bei 37 °C in einem Schüttelinkubator bei 225 rpm herangezogen. Nach Erreichen einer im Spektralphotometer gemessenen optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) von 1,0–1,5 wurde aus jeder Minikultur 1 ml Medium entnommen, mit 1 ml 80 %-iger Glycerinlösung in einem Kryoröhrchen gemischt und bei –80 °C für weitere Experimente eingefroren. Die verbleibenden 2 ml Bakterienkultur wurden für 10 min bei 2700 × g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, die Flüssigkeit mit Zellresten wurde vom Pellet entfernt, und aus dem Bakterienpellet wurde die Plasmid-DNA aufgereinigt. Das Pellet wurde in 150 µl eines RNase A enthaltenden Resuspensionspuffers aufgelöst. Zunächst wurden die Zellen in Suspension mit 150 µl Lysis-Puffer für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Nach Zugabe von 150 µl eiskalter Salzlösung zur Präzipitation bzw. Neutralisationspuffer erfolgte eine anschließende Zentrifugation von 5 min bei 13400 × g und 24 °C. Der Überstand wurde in ein frisches steriles Mikrozentrifugenröhrchen überführt und mit 600 µl



Binding-Puffer gemischt. Das Ganze wurde auf eine Minisäule gegeben und für 30 s bei 3000 × g zentrifugiert. Der Binding-Puffer wurde nach der Zentrifugation verworfen, 500 µl Waschpuffer wurde auf die Säule gegeben und diese wieder für 30 s bei 3000 × g zentrifugiert. Der Durchbruch wurde erneut verworfen. Dann wurden 900 µl 1× Final Wash auf die Säule gegeben und wieder für 30 s bei 3000 × g und dann noch einmal bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min zum Abtrocknen zentrifugiert. Die Elution der an der Säule gebundenen Plasmid-DNA erfolgte mit 60 µl H<sub>2</sub>O bidest. in neue sterile Mikrozentrifugenröhrchen, indem nach 3 min Inkubation die Säulen noch einmal bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert wurden. Die Konzentration der gewonnenen Plasmid-DNA wurde im Spektrophotometer gemessen.

#### 4.2.5.2. Midi- und Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Aufreinigung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde das Plasmid Midi oder Maxi Kit entsprechend der mitgelieferten Gebrauchsanweisung des Herstellers Qiagen (Hilden) verwendet. Dazu wurden 500 µl einer Minikultur in 50 ml LB-Medium für Midi-Kulturen und in 200 ml LB-Ampicillin-Medium für Maxi-Kulturen gegeben und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von >1 inkubiert. Zur Plasmidisolierung wurden die in **Tab. 8** aufgelisteten Pufferlösungen verwendet.

Die Bakteriensuspension mit OD<sub>600</sub> >1 wurde zuerst bei 8500 × g (8000 rpm) im JA 10-Rotor (Beckmann, München) für 10 min abzentrifugiert.

**Tab. 8:** Plasmidpräparationspuffer in der Reihenfolge ihrer Verwendung

P1	50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0,
P2	0,2 M NaOH, 1 % SDS
P3	3 M Kaliumacetat (KAc) pH 5,5
QBT-Puffer	750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15 % Ethanol, 0,15 % Triton X-100
QC-Puffer	1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% Ethanol
QF-Puffer	1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8,5, 15% Ethanol

Das Bakterienpellet wurde in Puffer P1 resuspendiert, anschließend mit Puffer P2 versetzt, vorsichtig durch Invertieren gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von eiskaltem Puffer P3 und sofortiges Invertieren wurde das entstehende Präzipitat

neutralisiert und anschließend 10–15 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde 30 min bei 30000 × g (18 000 rpm) im JA 20-Rotor (Beckmann, München) zentrifugiert (4 °C) und der Überstand wurde sofort auf eine mit QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen Plasmid-Prep-Säule mit einem Volumen von 4 ml gegeben. Die Plasmid-DNA wurde an das Silikagel-Anionenaustauscher-Säulenmaterial gebunden. Die Säule wurde zweimal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde mit 5 ml QF-Puffer eluiert und in einem 50-ml-Röhrchen aufgefangen. Die DNA wurde mit 0,7 Volumina an Isopropanol gefällt und bei 4 °C und 4400 × g für mindestens 45 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in 0,5 ml H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen. Die Plasmid-DNA-Konzentration wurde photometrisch durch eine Messung der OD bei 260 nm bestimmt. Die Plasmid-DNA wurde anschließend für weitere Experimente (Subklonierung, Sequenzierungen, Transfektionen) in doppelt destilliertem Wasser bei –20 °C gelagert.

#### 4.2.6 Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Durch die Restriktionsanalyse wurde untersucht, ob das Fragment der gewünschten Größe in den pcDNA3.1-Vektor kloniert wurde. Dafür wurde jeweils 1 µg der durch Mini-präparation aufgereinigten Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *XbaI*, *BamHI* und *XhoI* bzw. *HindIII* in einem Reaktionsansatz wie in **Tab. 9** dargestellt gespalten. Für die Restriktionsansätze wurde das New England Biolabs (NEB)-Puffersystem verwendet. Die Ansätze wurden für 2 h bei 37 °C inkubiert, anschließend wurden die Verdauprodukte im Agarosegel aufgetrennt und analysiert.

**Tab. 9:** Restriktionsansatz

1 µg Plasmid-DNA
3 µl geeigneter 10× NEB-Puffer
1 µl Restriktionsendonuklease: <i>KpnI</i> + <i>XbaI</i> , <i>BamHI</i> + <i>XhoI</i> bzw. <i>HindIII</i>
ad 30 µl H <sub>2</sub> O bidest.

#### 4.2.7 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Trennung von Restriktionsverdauprodukten erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. Für den Trennbereich von 0,1 bis 3,0 kb wurde die 2 % (w/v) Agarose-

segel-Lösung vorbereitet. Die errechnete Menge an Agarose wurde in 300 ml 1 × TAE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle bis zur klaren Lösung aufgeköcht. Nach Abkühlen auf etwa 65 °C wurde die Agaroselösung mit Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration 0,5 µg/ml) versetzt. Anschließend wurde das Gel in einen Gelträger gegossen, bei RT abgekühlt und nach 2 h vollständiger Auspolymerisation in die mit 1 × TAE gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Je 1 µl der DNA-Verdaumischung wurde mit 8 µl Aqua bidest. und 1 µl 10 × Auftragspuffer gemischt. Die vorbereiteten Proben wurden in die vorgeformten Geltaschen aufgetragen und in dem 2 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Als Standard wurde in den meisten Fällen 0,5 µg der DNA Standard 1-kBp DNA Ladder (Serva) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80 V für etwa 30–45 min. Durch das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid wurden die DNA-Fragmente nach Beendigung der Elektrophorese unter UV-Licht als Banden auf dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und gegebenenfalls photographisch aufgenommen (Sofortbildkamera Polaroid MP 4).

#### 4.2.8 Aufkonzentration der Plasmid-DNA

Das Volumen der DNA-Lösung wurde bestimmt, die Konzentration auf 0,3 M Na-Acetat eingestellt, dann wurde mit 2 Volumina Ethanol versetzt und gemischt. Die Präzipitation erfolgte entweder für 20 min bei –70 °C, für 10 min auf Trockeneis oder über Nacht bei –20 °C. Die DNA wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 12000 × g pelletiert, anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 5 min zentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde anschließend luftgetrocknet und in 50 µl Wasser aufgenommen.

#### 4.2.9 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration und der Reinheitsgrad der Plasmid-DNA wurden photometrisch in Quarzküvetten mit einem UV-Spektrometer bei 260 nm gegen TE bzw. H<sub>2</sub>O bestimmt. Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/µl doppelsträngiger DNA und 31 µg/ml Oligonukleotiden. Reine DNA weist einen  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ -Quotienten zwischen 1,8 und 1,9 auf.

### 4.3 Zellbiologische Methoden

#### 4.3.1 Auftauen und Revitalisieren von HEK293-Zellen

Die auf Trockeneis gelieferten adhärent wachsenden HEK293-Zellen wurden im Kryoröhrchen zuerst für 1 min bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde vorsichtig entnommen, in 20 ml kaltes (4 °C) Medium (mit 20 % FCS, ohne Antibiotika) überführt und in der Zentrifuge für 5 min bei 1200 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde erneut in 10 ml kaltem Medium (mit 20 % FCS, ohne Antibiotika) resuspendiert, in eine Zellkulturflasche überführt und in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Die zu 80 % konfluenten Zellen wurden anschließend 1:3 mit dem Kultivierungsmedium passagiert. Alle Arbeiten mit den Zellen wurden in einer sterilen Werkbank mit steril verpackten Einwegmaterialien vorgenommen.

#### 4.3.2 Passagieren von HEK293-Zellen

Das Passagieren von HEK293-Zellen wurde routinemäßig alle 3 Tage nach Erreichen der 80 %-igen Konfluenz durchgeführt. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in der Kulturflasche mit 5 ml PBS zweimal gewaschen. Zur Ablösung der Zellen wurde 0,05 % (v/v) Trypsin/EDTA in PBS-Lösung für 5 min bei 37 °C verwendet, bis die Zellen sich unter dem Mikroskop abgerundet hatten. Die Ablösung der Zellen vom Boden wurde durch mechanischen Reiz beendet und die Trypsinaktivität durch Zugabe des kompletten Mediums gestoppt. Die Zellsuspension wurde dann in ein 15-ml-Reagenzröhrchen überführt und für 5 min bei 1800 rpm bei RT sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde durch mechanischen Reiz gelockert und die Zellen in neuem Medium resuspendiert. Die Zellzahl und Zelldichte wurden manuell mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die Zelldichte wurde durch Zugabe von Medium zur Zellsuspension eingestellt. Anschließend wurde die Zellsuspension in der gewünschten Dichte in neuen Zellkultur-schalen ausgesät. Die HEK293 wurden in wassergesättigter Atmosphäre unter 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C kultiviert und alle 2–4 Tage mit frischem Medium versorgt.

#### 4.3.3 Transfektion von Zellen

Bei der Transfektion handelt es sich um eine Methode der Einschleusung heterologer DNA in Zielzellen. In den hier durchgeführten Experimenten wurde ausschließlich mit der transienten Transfektion gearbeitet. Es wurde gezeigt, dass HEK293-Zellen den CaSR nicht endogen exprimieren können (Galitzer et al., 2009). Um die Funktion der P136L-Mutanten zu prüfen, wurden die HEK293-Zellen mit den Expressionsvektoren für den Wildtyp-CASR und die P136L-Mutante transfiziert (Bai et al., 1996; Lienhardt et al., 2001; Okazaki et al., 1999). Die HEK293-Zellen wurden zuerst im Expandierungsmedium kultiviert. Je nach Art des Experiments wurden die Zellen 18 h vor der Transfektion auf verschieden große Träger gesplittet, um am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 80 % zu erreichen: für die Experimente zur Messung des intrazellulären Calciums auf 10-cm-Schalen, für die Proteinexpression in 6-Well-Zellkulturplatten und für die Immunfluoreszenzexperimente auf 1 cm große Deckgläschen. Die Transfektion wurde mit dem FuGENE-Transfektionsreagenz vorbereitet und nach Angaben des Herstellers mit entweder Wildtyp-CASR oder P136L-CASR durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde auf eine Konzentration von 1 µg/µl verdünnt. Die Transfektionsmischung wurde im Verhältnis FuGENE-Reagenz/Plasmid-DNA von 3:1 vorbereitet, um die optimale Bildung der DNA-FuGENE-Liposomen zu ermöglichen. Die DNA-Lösung wurde mit dem FuGENE-Reagenz gemischt, für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gleichmäßig auf die Zellen verteilt. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und für die nächsten 48 h durch Hungermedium ersetzt. Danach wurden die transfizierten Zellen in verschiedenen Experimenten weiterverwendet.

#### 4.3.4 Passagieren von Zellen für die Immundetektion

HEK293-Zellen wurden für die Darstellung des Rezeptors auf der Zelloberfläche und zur Bestimmung der Transfektionseffizienz in 24-Well-Platten auf Deckgläschen ausgesät. Anschließend wurde die Transfektion wie oben beschrieben durchgeführt. Die Plasmide führten zu Expression des Wildtyp- oder des mutierten Rezeptors auf der Zelloberfläche. Pro Transfektion wurden insgesamt 0,5 µg Plasmid pro Well verwendet. Nach 72 h wurden die Zellen mit kaltem PBS zweimal gewaschen und zur Immundetektion vorbereitet.

#### 4.3.5 Passagieren von Zellen für die Analyse der Signalwege

HEK293-Zellen wurden für die Durchführung von Calciumstimulationsexperimenten in 6-Well-Platten ausgesät. Anschließend wurde die Transfektion wie oben beschrieben durchgeführt. Die Plasmide führten zu Expression des Wildtyp- oder mutierten Rezeptors. Pro Transfektion wurden insgesamt 5 µg Plasmid verwendet. Nach 72 h erfolgte die Stimulation der transfizierten Zellen mit verschiedenen Calciumlösungen in Konzentrationen von 1–10 mM über 30 min. Danach wurden die Zellen schnell mit kaltem PBS zweimal gewaschen und lysiert.

#### 4.3.6 Messung des intrazellulären Calciums

Die Calcium-Bildgebung ist eine verbreitete Technik zur Messung der intrazellulären Calciumsignale in kultivierten Zellen. Dafür werden Calcium-Indikatorfarbstoffe wie FURA-2/AM verwendet, die ihre spektralen Eigenschaften durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ändern. Farbstoffe wie FURA-2/AM können sich intrazellulär anreichern und ihre Exzitations- oder Emissionsspektren in Reaktion auf Calcium ändern, sodass die Konzentration des intrazellulären Calciums aus dem Verhältnis der Fluoreszenzemissions- oder -absorptionswerte bei verschiedenen Wellenlängen ermittelt werden kann. FURA-2/AM hat ein charakteristisches Emissionsmaximum bei 505 nm, der Anregungsspitzenwert variiert von 340 bis 380 nm als Reaktion auf die Calciumbindung. Der freie Farbstoff hat sein Exzitationsmaximum bei 360 nm. Durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen verschiebt sich das Exzitationsmaximum zu einer Wellenlänge von 340 nm (Grynkiewicz et al., 1985). Die Fluoreszenzintensität steigt mit zunehmender Calciumkonzentration bei 340 nm an und erreicht bei 380 nm das Maximum. Da die Emissionsstärke der beiden Farbstoffvarianten bei 360 nm gleich ist, wird für den freien Farbstoff eine Anregungswellenlänge von 380 nm genommen. So erreicht man eine maximale dynamische Spannweite zwischen den beiden Farbstoffanteilen. Da die Dissoziationskonstante  $K_d$  für  $\text{Ca}^{2+}$  von FURA-2/AM 224 nmol/l beträgt, liegt der optimale Messbereich für  $\text{Ca}^{2+}$  zwischen 22,4 und 2240 nmol/l, um einen Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei Entleerung der intrazellulären Speicher zu erfassen. Zur funktionellen Charakterisierung der neuen Mutante P136L-CaR wurden die HEK293-Zellen in 75-cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit Wildtyp-CASR- oder mit P136L-CASR-

Plasmiden transfiziert. Die Mobilisierung des intrazellulären Calciums wurde mit FURA-2/AM bestimmt (Bai et al., 1996; D'Souza-Li et al., 2002). Nach 72 h wurden die Zellen in 20 mM HEPES, pH 7,4, resuspendiert und mit FURA-2/AM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen, abzentrifugiert und erneut in HEPES resuspendiert. Die Messungen des intrazellulären Calciums wurden mit dem Hitachi F2000-Spektrofluorometer durchgeführt. Aliquots der Zellsuspension wurden in die Quarzküvetten für die Fluoreszenzmessung nach dem modifizierten Protokoll überführt (Fajtova et al., 1991; Hofer et al., 2000).

Der CaSR wurde durch mehrfache Zugabe der  $\text{Ca}^{2+}$ -Lösung bis zum Erreichen der gewünschten Konzentration (0–100 mM) stimuliert. Die Zellen wurden mit den Wellenlängen 340 und 380 nm angeregt. Das Emissionsmaximum wurde durch einen Breitbandfilter bei  $510 \pm 40$  nm gemessen. Der Emissionsspitzenwert nach jeder Calciumgabe wurde als die maximale Signalzunahme gegenüber dem Grundsignal gemessen. In den meisten Experimenten wurde der Spitzenwert nach den ersten 60–80 s ab Stimulationsbeginn beobachtet. Aus den gemessenen Emissionsintensitäten bei den beiden Anregungswellenlängen 340 und 380 nm wird der Quotient gebildet. Dieser Quotient spiegelt das Verhältnis von gebundenem zu freiem Indikator wieder. Das 340/380-Anregungsverhältnis wurde genutzt, um die Konzentration der freien Calciumionen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zu errechnen. Zur Messung des  $\text{EC}_{50}$  wurden die Quotienten für  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  als Antwort auf die Stimulation durch Calciumgaben im Konzentrationsbereich von 0,5–7,0 mM  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  aufgenommen. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert wurde aus der graphischen Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Abhängigkeit von der Menge an zugegebenem extrazellulärem Calcium  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  abgeleitet. Der Mittelwert der  $\text{EC}_{50}$ -Werte (mittlere effektive Konzentration) wurde aus sechs unabhängigen Experimenten mit dem Wildtyp- und dem P136L-Mutanten-CaSR erfasst.

#### 4.3.7 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Die Zellen wurden trypsinisiert, in Medium aufgenommen und in der Zentrifuge sedimentiert (5 min, 1800 rpm). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden in 1 ml kaltem Medium aufgenommen. Jeweils 900  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurde in beschriftete, vorgekühlte Kryoröhrchen überführt. Dann wurde 900  $\mu\text{l}$  Einfriermedium zugegeben,

sodass pro Kryoröhrchen ein Zellvolumen von 1,8 ml vorlag. Die Zellen wurden zunächst bei -80 °C in einer Kryobox eingefroren und am nächsten Tag bei -160 °C in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 4.4 Proteinbiologische Methoden

##### 4.4.1 Gewinnung der Proteinlysate

Aus den bewachsenen Zellkulturschälchen wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Die folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Nach dem Absagen der PBS-Lösung wurde den Zellen 0,1 ml Lysepuffer (mit Complete™-Proteaseinhibitor-Cocktail und Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) pro Well einer 6-Well-Multiplatte zugegeben und über 30 min inkubiert. Die fast vollständig abgelösten Zellen wurden mit einem Zellschaber in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß je Well überführt und 30 min bei 14000 rpm und 4 °C in einer Minizentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt und die Zelltrümmer wurden verworfen. Der Überstand stellte das totale Zelllysate dar. Er wurde nochmals für 30 min bei 14000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Aus jedem Zelllysate wurde eine 5-µl-Probe für die Proteinmessung entnommen. Bis zu den folgenden Versuchen wurden die Lysate bei -20 °C gelagert.

##### 4.4.2 Proteinbestimmung

Der Bio-Rad Protein-Assay basiert auf der Beobachtung, dass das Absorptionsmaximum für eine saure Lösung von Coomassie Brilliant Blue G-250 nach Bindung an ein Protein von 465 nm (braun) nach 595 nm (blau) verschoben wird. Die Amplitude der Absorption bei 595 nm ist der Menge an Protein in einem großen Bereich direkt proportional. 400 µl von der verdünnten Bio-Rad-Lösung (Stammlösung/H<sub>2</sub>O 1:5) wurde mit 100 µl der zu messenden Menge an verdünnter Proteinlösung gemischt und in Plastikküvetten im Photometer bei 595 nm gemessen. Für die Proteinbestimmung wurde 5 µl des klaren Lysats verwendet und mit 95 µl ddH<sub>2</sub>O versetzt. Als Standard diente eine BSA-Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 50, 100, 200, 300, 400 und 500 mg/ml in dem Puffersystem, das dem zu bestimmenden Protein entsprach. Die Proben und Standards wurden mit 400 µl Bio-Rad-Assay BCA-Reagenz versetzt



und umgehend im Spektrophotometer gemessen. Anschließend wurden die Proteinkonzentrationen mittels der anhand von Standardlösungen ermittelten Kurven bestimmt.

#### 4.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970; Laemmli et al., 1970a; Laemmli et al., 1970b). Zur Trennung und Detektion geringer Proteinmengen wurde eine „Minigelelektrophorese“ durchgeführt. Es kamen Minigele der Größe 80 x 85 x 0,75 mm (H x B x T) zum Einsatz. Die Lösungen für die Sammel- und Trenngele setzten sich wie in **Tab. 10** gezeigt zusammen.

**Tab. 10:** Reaktionsansätze für SDS-Polyacrylamid-Trenn- und -Sammelgele

7,5 % Trenngel		Sammelgel	
dH <sub>2</sub> O	5,5 ml	dH <sub>2</sub> O	6,0 ml
1 M Tris pH 8,8	5,6 ml	2 M Tris pH 6,7	2,0 ml
30 % Acrylamid	3,75 ml	30 % Acrylamid	3,75 ml
10 % SDS	150 µl	10 % SDS	150 µl
TEMED	10 µl	TEMED	10 µl
10 % APS	100 µl	10 % APS	100 µl

Die Elektrophorese wurde in einem Bio-Rad-System mit vertikal ausgerichteten Platten durchgeführt. Das flüssige Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Nach 30-minütiger Polymerisation wurde das Butanol abgegossen, das flüssige Sammelgel eingegossen und der Probenkamm eingefügt. Nach vollständiger Polymerisation wurde der Probenkamm entfernt, die Probenaschen mit Running-Puffer gespült und Gelreste aus den Taschen entfernt. Die Proben wurden mit 4 x SDS-Probenpuffer bis auf ein Gesamtvolumen von 20 µl versetzt, 4 min bei 95°C erhitzt und nach Zentrifugation (1 min, 14000 rpm) in die Taschen des Gels aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker dienten die Precision Protein Standards Protein-Markers (Bio-Rad). Die Elektrophorese erfolgte zuerst mit einer Spannung von 60 V bei 4 °C, um eine effiziente Konzentrierung der Proteine im Sammelgel zu erreichen. Zur Kontrolle des Fortschritts der Auftrennung diente der im

Probenpuffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau. Sobald die Proben den Anfang des Trenngels erreicht hatten, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Lauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hatte. Anschließend erfolgten das Proteinblotting und die Immundetektion.

#### 4.4.4 Western-Blot-Analyse

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Sammelgel vom Trenngel entfernt und Letzteres für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Die für 1 min mit Methanol benetzte Nitrozellulosemembran von der Größe des Gels und vier Lagen Whatman-Papier wurden mit zwei Schwämmen in Transferpuffer eingelegt. Für den Elektrotransfer der Proteine wurden das Trenngel und die Nitrozellulosemembran luftblasenfrei zwischen die in Transferpuffer getränkten Whatman-Papiere gelegt und diese mit den Schwämmen bedeckt. Der Transfer erfolgte nach dem Tank-Blotting-Verfahren mit 200 mA über 1 h auf Eis. Nach Abschluss des Transfers erfolgte die Absättigung freier Bindungsstellen auf der Membranoberfläche durch Inkubation mit 10 ml Blocking-Puffer (TBS-T 0,5 % / 4 % Trockenmilch) für 1 h bei RT. Die Nitrozellulosemembran wurde zur Immunodetektion von Proteinen wie folgt unter kontinuierlicher Bewegung auf einem Schüttler inkubiert.

Der Inkubationsschritt mit dem Primärantikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht. Es wurden folgende Primärantikörper verwendet: Anti-CaSR-Antikörper (6D4, Maus) 1:1000 verdünnt, Anti-ERK1/2-, -JNK- und -p38-Antikörper (Maus) 1:500 verdünnt oder monoklonale Anti-pERK- (E-4) und -pJNK-Antikörper (G-7) (Maus) sowie monoklonale Anti-p38-Antikörper (Kaninchen) 1:500 verdünnt. Die Nitrozellulosemembran wurde dreimal mit TBST-0,5 % BSA bei RT gewaschen, gefolgt von einer 2-stündigen Inkubation mit dem sekundären Antikörper bei RT. Es standen folgende sekundäre Antikörper zur Verfügung: Rind-anti-Maus sekundäre Antikörper, Ziege-anti-Maus oder Ziege-anti-Kaninchen sekundäre Antikörper, alle 1:1000 verdünnt. Nach erneutem dreifachen Waschen mit 15 ml TBST-0,5 % BSA für 15 min bei RT wurde die Membran gemäß den Angaben des Herstellers mit dem Enhanced Chemiluminescence-System für 1 min versetzt. Die Lumineszenz wurde durch das Auflegen eines Röntgenfilms für 10 s bis zu 1 h dokumentiert. Die quantitative Auswertung der Phosphorylierungssignale wurde durch Scannen der Röntgenfilme und densitometrische Messung der Signalstärke mit ImageJ

Software durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Zunahme des Signals im Vergleich zum Kontrollsignal dargestellt.

#### 4.5 Proteinbiologische Methoden

##### 4.5.1 Immunfluoreszenz, Zellfärbungen, Fluoreszenzmikroskopie

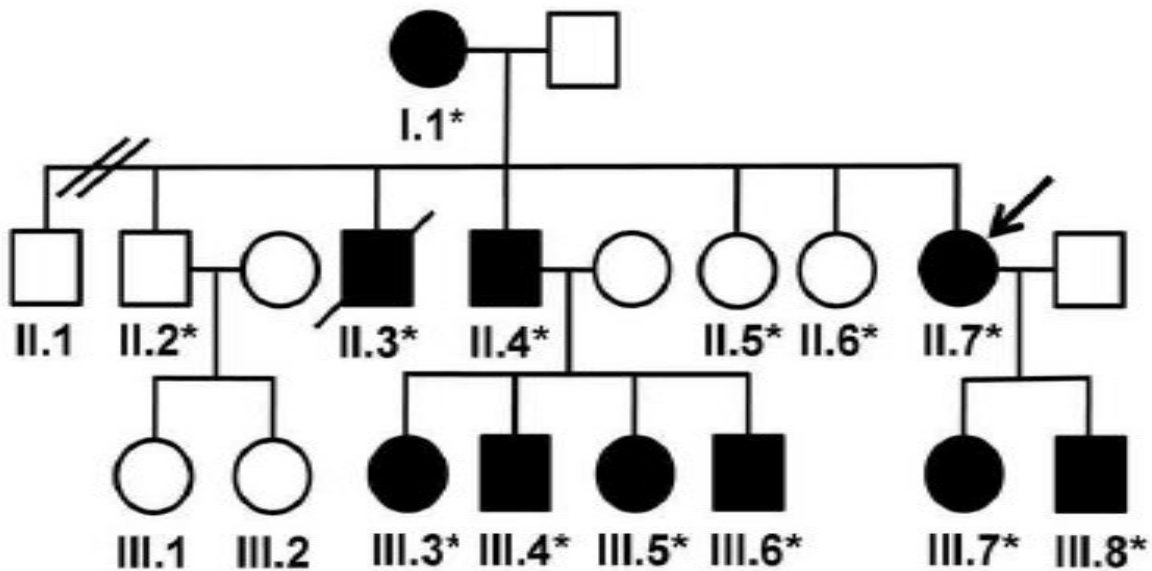
Für die fluoreszenzmikroskopischen Experimente mit HEK293-Zellen wurden Deckgläschen in Ethanol gewaschen, abgeflammt und auf dem Boden je einer Einzelkammer einer 24-Well-Zellkulturplatte unter sterilen Bedingungen abgelegt. Anschließend wurden 20000 Zellen/Well ausgesät und in 2 ml Zellkulturmedium inkubiert. Die Zellen wurden nach dem Protokoll mit 2 µg Plasmid-DNA transient transfiziert (Bai et al., 1996). Nach 72 h wurden die Zellen in PBS gewaschen, in 1 ml 100 %-igem Methanol für 20 min bei -20 °C fixiert und permeabilisiert sowie nach zweimaligem Waschen für 30 min mit Blocking-Puffer (PBS-4 % FCS) zur Absättigung der unspezifischen Bindungen inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Anti-CaSR-Antikörper 6D4) für über 1 h bei RT. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen und mit dem sekundären, mit Alexa Fluor 488 gekoppelten Antikörper zusammen mit Hoechst 33258 inkubiert. Hoechst 33258 ermöglicht die Kernfärbung. Die mit Antikörpern markierten Zellen auf den Deckglässchen wurden gewaschen und mit Fluoromount-G auf einem Objektträger eingebettet, getrocknet und mithilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Olympus IX70) dargestellt. Das Mikroskop ist mit einer Colorview-III-Kamera ausgestattet sowie einem Objektiv mit 20-facher Vergrößerung. Die Bilder wurden bei konstanter Kontrast- und Helligkeitseinstellung aufgenommen und unter Kontrolle der Cell<sup>^</sup>P-Software analysiert.

Die relative Zahl an transfizierten Zellen wurde über das Auszählen aller Zellen mit Oberflächenfärbung im Verhältnis zur Gesamtzahl an mit Hoechst 33258 gefärbten Zellkernen im gegebenen Aufnahmebereich ermittelt. Die nicht transfizierten Zellen zeigten keine Oberflächenfärbung mit dem Anti-CaSR-Antikörper.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Klinische Angaben zu den Patienten

In der Klinik und Poliklinik für Endokrinologie der Universitätsklinik Bonn befand sich eine Familie mit ADH in Betreuung. Die genetische Untersuchung der Familie wurde aufgrund der symptomatischen Hypocalcämie bei Probandin II-7, (Index-Patientin; **Abb. 6**) initiiert. Bei der Index-Patientin wurde mit 10 Jahren nach der Anamnese mit Muskelschmerzen und -krämpfen der „idiopathische Hypoparathyreoidismus“ diagnostiziert.



**Abb. 6:** Schematische Darstellung der Mitglieder der Familie mit ADH. Die römischen Zahlen weisen auf die jeweilige Generation hin. Schwarze Symbole bezeichnen Träger der Mutation im CaSR im heterozygoten Status. Die leeren Symbole repräsentieren Familienmitglieder ohne Mutation. Der Pfeil zeigt die Index-Patientin. Das Sternchen weist auf Familienmitglieder hin, von denen die Ergebnisse der Blutuntersuchung vorlagen.

In der laborchemischen Untersuchung präsentierte sie niedrige Calciumwerte und wurde zur Therapieevaluation in die Klinik überwiesen. Die körperliche Untersuchung des Mädchens gestaltete sich unauffällig. Die weiteren Untersuchungen zeigten eine Hypocalcämie bei neun Familienmitgliedern, die sich über drei Generationen verteilten (**Abb. 6**). Die Mutter der Patientin (I-1) und der ältere Bruder (II-2) hatten keine klinischen Beschwerden und zeigten lediglich in der Blutuntersuchung niedrige Calciumwerte. Alle vier Kinder des Bruders (II-4) waren betroffen und litten unter

schweren Muskelkrämpfen. Die durchschnittlichen Calciumwerte der betroffenen Mitglieder betragen  $1,92 \pm 0,1$  mM (Mittelwert  $\pm$  SD; Normbereich 2,12–2,52 mM). Der Spiegel des intakten PTH im Serum lag überwiegend im unteren Normbereich, auch der Magnesiumspiegel war erniedrigt. Der basale 24-h-Calciumquotient im Urin lag bei  $2,97 \pm 1,5$  mmol/Tag (Mittelwert  $\pm$  SD; Normbereich 1,0–8,8 mmol/Tag). Die klinische Charakterisierung und die Laborwerte sind in **Tab. 11** zusammengefasst.

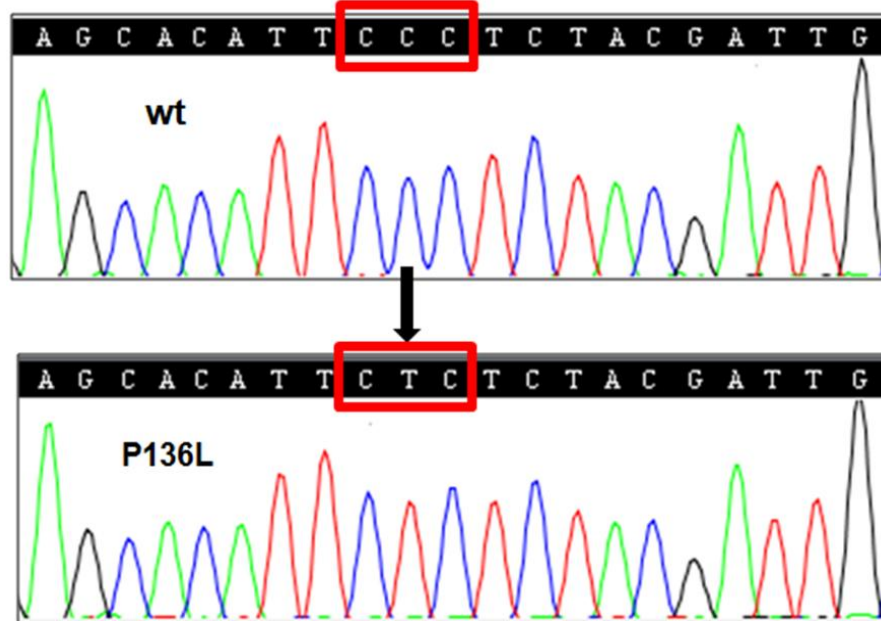
**Tab. 11:** Biochemische Charakterisierung der zehn Patienten mit ADH.

Stammbaum-Nr.	Alter bei ED	Serum-Ca (mmol/l)	Serum-P (mg/dl)	Serum-Cr (mg/dl)	Serum-Mg (mmol/l)	Serum-PTH (pg/ml)	Urin-Ca-Clearance (mmol/24 h)	Urin-Cr-Clearance (g/24 h)	Symptom
I-1	64	1,74	4,37	0,8	NA	26	3,1	0,87	BGC, K
II-3	37	1,84	4,22	0,8	0,69	19	2,6	1,68	K, M
II-4	32	1,97	3,07	0,8	0,67	18	1,5	0,86	K
II-7	10	2,03	3,63	0,9	0,56	1	5,2	1,08	S, NC, NL
III-3	11	1,97	1,88	0,48	0,73	9	4,9	NA	MS
III-4	6	1,87	1,99	0,5	NA	11	0,6	1,23	NS
III-5	4	2,06	1,87	0,6	NA	9	3,64	1,34	NS
III-6	2	1,98	2,03	0,37	NA	10	2,24	0,49	M, MS, K,
III-7	1	1,9	2,83	0,6	NA	12	2,9	1,5	NS
III-8	2	1,87	2,5	0,43	NA	9	NA	NA	NS
<b>Mittelwert <math>\pm</math> SD</b>		1,92 $\pm$ 0,1	2,84 $\pm$ 1,01	0,63 $\pm$ 0,19	0,66 $\pm$ 0,07	12,4 $\pm$ 7,35	2,97 $\pm$ 1,58	1,07 $\pm$ 0,38	
<b>Normbereich</b>		2,12–2,52	2,50–4,90	0,8–1,3	0,74–0,99	11–60	1,0–8,8	>1,50	

BGC=Calcifikation der Basalganglien, K=Krämpfe, M=Myoklonien, NC=Nephrocalcinose, NL=Nephrolithiasis, MS=Muskelschmerzen, NS=keine Symptome

## 5.2 Sequenzanalyse des CASR

Bei insgesamt 16 Familienmitgliedern wurde eine DNA-Analyse durchgeführt, darunter neun von der Hypocalcämie betroffene Familienmitglieder und die drei nicht betroffenen Geschwister der Index-Patientin (II-7). Die Ergebnisse der DNA-Sequenzierung der Index-Patientin zeigten eine neuartige heterozygote Punktmutation, durch die in Kodon 136 in Exon 3 (CCC) das mittlere Cytosin durch Thymin ersetzt wurde (CTC), was eine Aminosäuresubstitution von Prolin zu Leucin (P136L) in der extrazellulären Domäne zur Folge hat (**Abb. 7**).

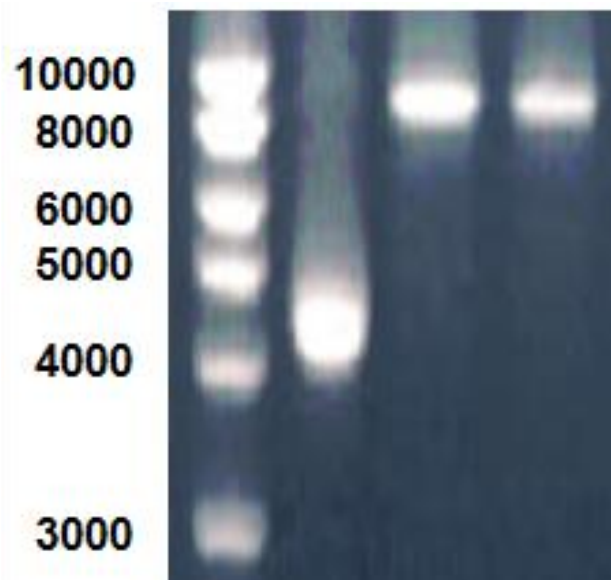


**Abb. 7:** Ausschnitte aus den Elektropherogrammen der CASR-DNA-Sequenzen aus dem DNA-Material der Probanden mit der nachgewiesenen Mutation. (eines asymptomatischen (wt) und eines hypocalcämischen Familienmitgliedes (P136L))

Diese Mutation wurde außer bei der Index-Patientin auch bei acht hypocalcämischen Familienmitgliedern gefunden, während keiner der asymptomatischen Patienten diese Mutation aufwies. Somit konnte bestätigt werden, dass die Hypocalcämie mit der P136L-Mutation vererbt wurde.

### 5.3 Ortsspezifische Mutagenese und Nachweis der Plasmide

Für die Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen der Proteinstruktur/-funktion und der Genexpression wurde die Methode der ortsspezifischen Mutagenese angewendet. Nach der Transformation der XL10-Gold<sup>®</sup> ultrakompetenten Zellen mit den Produkten der ortsspezifischen Mutagenese sowie mit den Kontrollplasmiden (pcDNA3.1(-) und pWhitescript) wurden die Kolonien gepickt und in LB-Ampicillin-Medium kultiviert. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von  $>1,1 \pm 0,1$  wurden die Plasmide aus der Bakteriensuspension isoliert. Die Verifizierung der Mutagenese erfolgte mittels Gelelektrophorese (**Abb.8**) und doppelsträngigen Sequenzierung (**Abb.9**).



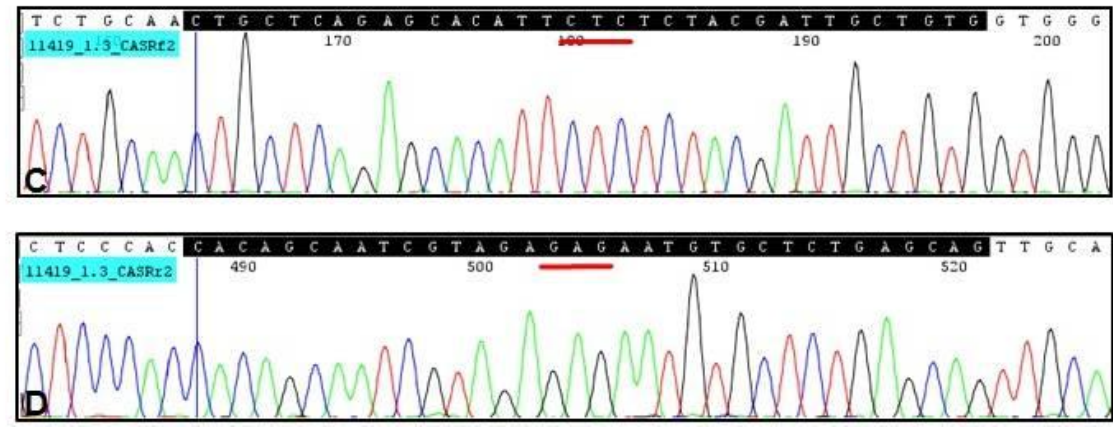
**Abb. 8:** Standard-Agarosegel (2%) gefärbt mit Ethidiumbromid zur Darstellung der Produkte der ortsspezifischen Mutagenese. Von links nach rechts: Molekulargewichtstandart (in bp), Positivkontrolle mit pWhitescript (4300 bp), pcDNA-CASR und CASR-P136L (jeweils 9000 bp).

Der Nachweis des spezifischen CASR-Inserts erfolgte mittels Produktverdau mit Restriktionsenzymen.

5'-AAAATCTTATAAAAAAACAGCAGTCCAACCCCTTCCCACTTGACGCTGGGATACAGGATAT  
 TTGACCCCTTTAAACACCCTTTCTAAGGCCCTGGAGCCACCCCTGAGTTTTGTGCTCAAAACAAA  
 TTGATCTTTGAACCTTGATGAGTTCTGCAACCTGCACAGACACATTCTCTACGATTGCTGTG  
 GCTCAGAGCACATTCTCTACGATTGCTGTGGCTCAGAGCACATTCTCTACGATTGCTGTG  
 CAGAGCACATTCTCTACGATTGCTGTGCTCAGAGCACATTCTCTACGATTGCTGTGTCAGA  
 GCACATTCTCTACGATTGCTGTGTCAGATCACATTCTCTACGATTGCTGTGTCAGAGCACAT  
 TCTCTACGATTGCTGTGTCAGATCACATTCTCTACGATTGCTGTGTCAGAGCACATTCTCT  
 TACGATTGCTGTGCTCATAGCACATTCTCTACGATTGCTGTGGCTCAGAGCACATTCTCTAC  
 GATTGCTGTGGCTCAAAGCACATTCTCTACGATTGCTGTGGCTCAGAGCACATTCTCTACG  
 ATTGCTGTGCTCACAGCACATTCTCTACTATGCTGTGGCTCAGACCACATTCTCTACGATT  
 GCTGTGGCTCAGAGCACATTCTCTACAATTGCTGTGGCTCAGAGCACATTCTCTACTATTGC  
 TGTGGCTCAGAGCACATTCTCTACGATTGCTGTGGCTCAGAACACATCTCTCTACCAATTG  
 CTGGGATCAAAGCACATTCTCTTACAATTGCTGTGGCTCAGAACACATTCTCTTACAAT  
 TGGCTGGCTCAGAACACATTCTCTTACAATTGCTGTGGCTCAGAACACATTCTCTTCAAAAT  
 TGCTGGGCTCAAAGCACATTGCTCTACTAATTGCTGTGGCTGTGAGCAATTGGGCTCTGTATCC  
 TCCCTGGAATGAAAAATCTGCTGGGCCCTTCAAATTTCCCAATCAAATATGCCTCTC  
 CCGCAAACCCCATACATCAAGATCCACTTCCAGTCTCTCCCGAACATTCCAAATGAGCA  
 CCACCCAGACATCGGCCATGGTCTAAAATCCTCCAGTATTTCCCGTTGAAACAGGGTTGGGAC  
 CAATTTGCAACTAAATATACCTAATATGGACCGGCCCGGGCTATAAAAAATTTCCAAAAAGAAA  
 CTTTAAAGAAAAGGGTAAATAGCCTTCAACTCCGTCAAAAACTCTTTCTCCCTCACCCCTT  
 GGTAAGGCAATAAAAACTCATTGTTTGTAAATGTTAATATCAAAAAATCCACAAGGCT  
 CCAAAATCTCCCTGGGTGTTTTTCCCGCAGGGGGGCCCAATATCTTTTTGACCCCGCC  
 CCATCTCTGAGAGAAAGATTGGTCCGGGGGGCCACATTAATTTCCCGCAGGTATAATATA  
 ATATTCTCGCTGCCGGTGGCCCGCCACGAACACGTGGGGTCTCTCTTGAGTGAATCATCTCTC  
 TTTTCTCCCGCCCGCTCGGCTCGGACTCACCGT-3'

**A**

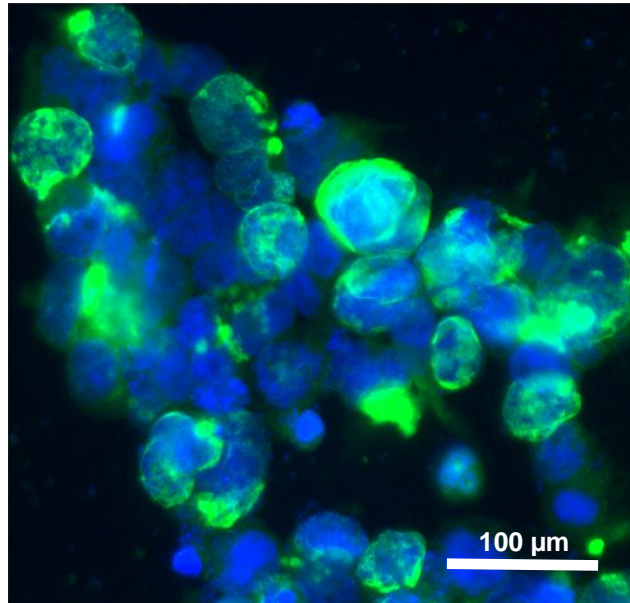
5'-AGTAAGTACTGCCAGGCCTCGCTGGCCAGCCAGATCTTGCCCGTGATATTGCCCGGACAA  
 TCTCCTTGATGAGGGGCTCAAGATCTGGGCCACTGGAGAAAAACCAGGATGACTTTGGCCGTGGA  
 ATTTTGAATCACCTCTACCACATGCTGGATCTTCTCTCATCAGACTGGGAGATGAGTTCACT  
 GAAGTCGATCGAGATATCCCTTTCTCACTTCTCTCGGAATTTCTCAATCCCGGCCCGCCATA  
 GTCGTATCAGTCAATTGTGCCACCCAGTCCAGCGGAAATCTGATGATGTCTGCCATGG  
 CAGTGGCTGGTGTCTCAATTGGGGATGGTTCGGAGGAAAGACTTGAATGATTTCTGTTGCTG  
 AGGAGTCTGCTGGAGAGGCATAACTGACCTGGGGAATGTAGAAGAGCCCGCAGCAGATTTGCCA  
 CTGCCGTGGAGACTCCGGAGCCAGTGTGCCACCACAGCAATCGTAGAGAGAATGTGCTCTG  
**AGCAG**TTGCAGAATCATCAAGTTCAAAGAATCAATTTGTTTTGAGCAACAAAACCTCAGGGTG  
 GCTTCCAAGGCCTTAGAACCGGTGTGCAAGTGTCAAATATCCTGTATCCCAGCGTCAAGTTGGG  
 AAGAAGGGCTGGGCTGCTGTTTATCTCTCTATGGCAAATATCATAGCCTGTAACCAGCGAAACC  
 CACGAAATATACCTGATACATCCACAGACTCCGGCCCTTGATTTGAGATCTTGATCTTTAGCTG  
 CTACTCCAAAATGAATAGGAAAGAGCCCGCCCAAGGATAATGTCCCTCTTTTGGGCTCGCTGG  
 TCTGGCCGTANGCAGAGGTGTGCCAGGTGAGTGCCAAAGAGACCAGCAGCAGCTATAAAATG  
 CCATGGTGGCCCGGCCCGGTACCAAGCTTTGGTCTCCCTATAGTGAAGTCTGATTAATTCGATA  
 AGCCAGTAGCAGTGGGTTCTAGTATGCCAGAGAGCTCTGCTTATATAGACCTCCACCCTGAC  
 ACGCTTACCGCCATTTGCTCAATGGGGCGGAAAGTTGTACGACATTTGGAAAAGTCCGTTGAT  
 TTTGGTTCAAAACAACTCCATTGACGTCAAGGGGTGGAACCTTGAAAATCCCGTGAAGTCAA  
 ACCGCTATCACGCCATTGATGACTGCCAAAACCGATTCACATGGGTATAGCGATGACTAATAC  
 GTAAATGTACCGCCAAGAAAGGAAAGTCCCTTAAGGCCAGGTACGGGGGCAAAAAGGCCCGG  
 CGGGGCCAAATTTACCGCCTTTGAATCCAAATAGGGGGGGGAACTTTGGGAAATAAGAAACAC  
 CTTTGGAAATGGTCCGGGCCAAAGGGGGGGCAGTTTTTACCAGAAAATAAACCCCGCCCGCC  
 TTTTGACCTCCAAGGGGGGAAAAACCCCGCTTTTTTGGGGGGTTTTTCTAATTGGGGG  
**B**AAAAACAATAAATCGCTCTTTATTTTTTGTGGAACGCCTGCAAGAAGAG-3'



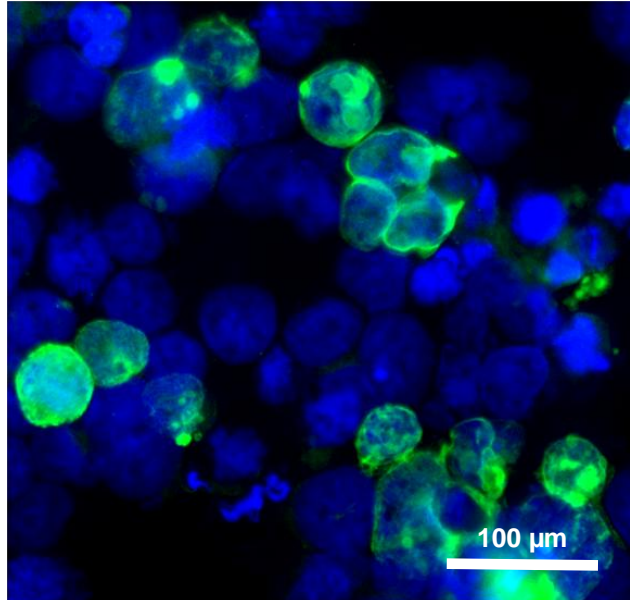
**Abb. 9:** Ergebnisse der doppelsträngigen Sequenzierungsanalyse mit den Primern CASR for 2 (A) und CASR rev 2 (B). Beide Fragmente kodieren das Exon 3 und enthalten die eingeführte durch ortsspezifische Mutagenese Punktmutation CCC>CTC im Kodon 136. Die Chromatogramme zeigen schwarz markierte Stelle von Primer CaSR-P136L und bestätigen die Mutation in beiden Richtungen: (C) 5'→3' und (D) 3'→5', rot unterstrichen.



#### 5.4 Nachweis des CaSR durch Immunfluoreszenz



**Abb. 10:** Immunfluoreszenz des Wildtyp-CaSR.



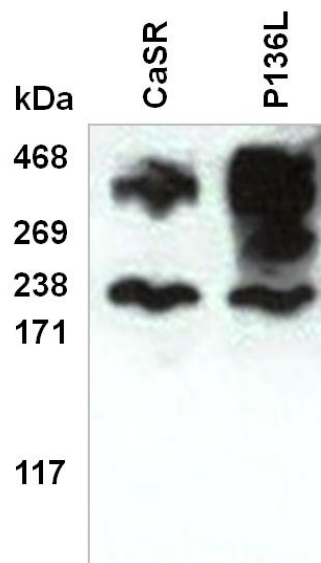
**Abb. 11:** Immunfluoreszenz des P136L-CaSR.

Die transient transfizierten HEK293-Zellen zeigten die Expression sowohl des Wildtyp- als auch des mutierten CaSR. Die Expression auf der Oberfläche der Zellen wurde auf ca. 70 % aller Zellen geschätzt. Eine starke Immunfärbung wurde auf der Oberfläche aller nicht permeabilisierten Zellen beobachtet. Nach der Permeabilisation zeigte sich

auch eine perinukläere Färbung, die auf das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat hinweist, wie auch von D'Souza-Li et al. berichtet wurde (D'Souza-Li et al., 2002). Sowohl die nicht permeabilisierten als auch die permeabilisierten Zellen, die mit dem Wildtyp- oder dem P136L-CaR transfiziert waren, zeigten eine ähnliche Antikörperfärbung und somit ähnliche Expressionsmuster (**Abb.10; Abb.11**).

### 5.5 Nachweis des CaSR in der Western-Blot-Analyse

Die im Western-Blot nachgewiesene Expression des mutierten Rezeptors und des Wildtyp-Rezeptors war auf ungefähr gleichem Niveau und vergleichbar mit den Ergebnissen der konfokalen Mikroskopie. Der CaSR kann entweder in Form eines Monomers oder als Dimer auf der Oberfläche exprimiert werden, was dem nicht aktivierten bzw. aktivierten Zustand des Rezeptors entspricht.



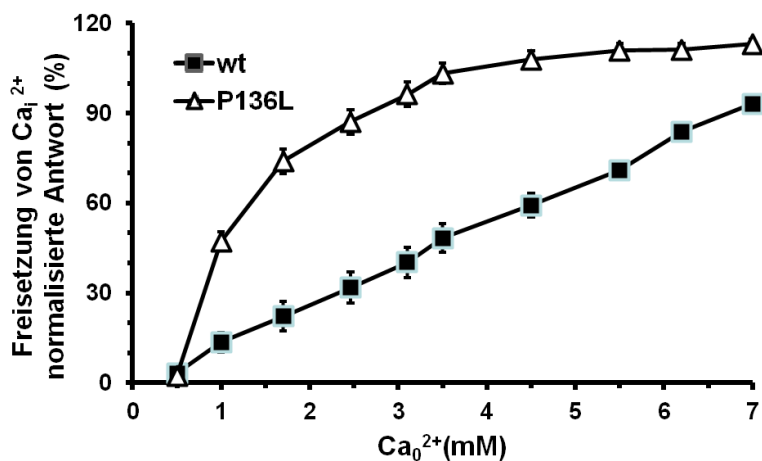
**Abb. 12:** Western-Blot mit Lysat aus transient transfizierten HEK293-Zellen, inkubiert mit dem Anti-CaSR-Antikörper (6D4, sc-47741). Die mit den Plasmiden pcDNA3.1-CASR oder pcDNA3.1-P136L transfizierten Zellen zeigten eine Bande bei 238 kDa, die auf die dimere Form des Rezeptors hinweist.

Das Monomer kann in drei verschiedenen Formen detektiert werden: kernglykosyliert mit einer Größe von 120 kDa, in nicht ausgereifter Form mit 140 kDa und in der reifen Form mit einer Größe von 160 kDa (Bai et al., 1996; D'Souza-Li et al., 2002). Wie bereits von Bai et al. beschrieben, wurde in den Zelllysaten überwiegend die

monomerische Form des Rezeptors (140 kDa) beobachtet, die reife Form (160 kDa) dagegen in nur geringen Mengen (Bai et al., 1996). Dies gilt für die mit dem Wildtyp wie auch für die mit der Mutante transfizierten Zellen. Auf den Western-Blots wurden hier überwiegend Rezeptordimere in der Größe zwischen 240 und 280 kDa nachgewiesen, die auf den aktivierten Zustand der Rezeptoren zurückzuführen sind (**Abb.12**). Die mit Hitze und SDS behandelten Lysate zeigten überwiegend monomerische Form des Rezeptors.

### 5.6 Intrazelluläre Detektion von mobilisiertem Calcium

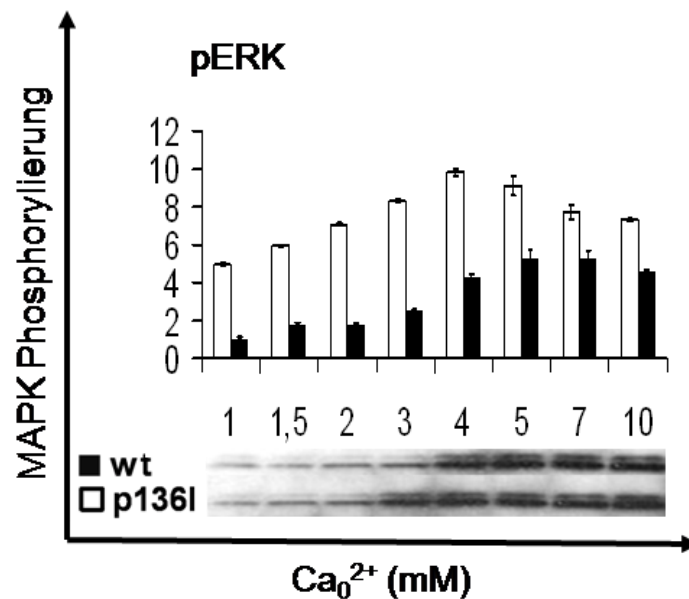
Die mit dem Plasmid CaSR-P136L transient transfizierten HEK293-Zellen zeigten im Vergleich zu den mit dem Vektor für den Wildtyp-Rezeptor transfizierten Zellen eine wesentlich geringere halbmaximale Antwort auf die Stimulation mit extrazellulärem Calcium  $EC_{50} (Ca_0^{2+}) = 1,3 \pm 0,2 \text{ mM}$  ( $n = 6$ ) für P136L versus  $EC_{50} (Ca_0^{2+}) = 3,7 \pm 0,2 \text{ mM}$  ( $n = 6$ ) für den Wildtyp (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (S.E.));  $p < 0,05$ ), gemessen mit FURA/2-AM (**Abb. 13**).



**Abb. 13:** Messung des intrazellulären Calciums mittels Fura-2/AM. Die Abbildung zeigt die Zunahme des FURA2/AM-Signals nach der Stimulation mit Calcium-Lösung in der steigenden Konzentration. Das FURA-Signal entspricht dem freigesetzten intrazellulären Calciumspiegel. Die Signale wurden im Bezug auf das maximale Signal des Wildtyp-Rezeptors normalisiert, bei einer basalen Konzentration von 0,5 mM. Die  $EC_{50}$ -Werte waren für den Wildtyp-Rezeptor und die P136L-Mutante signifikant unterschiedlich und zeigten in dem Kurvenverlauf eine deutliche Verschiebung nach links.

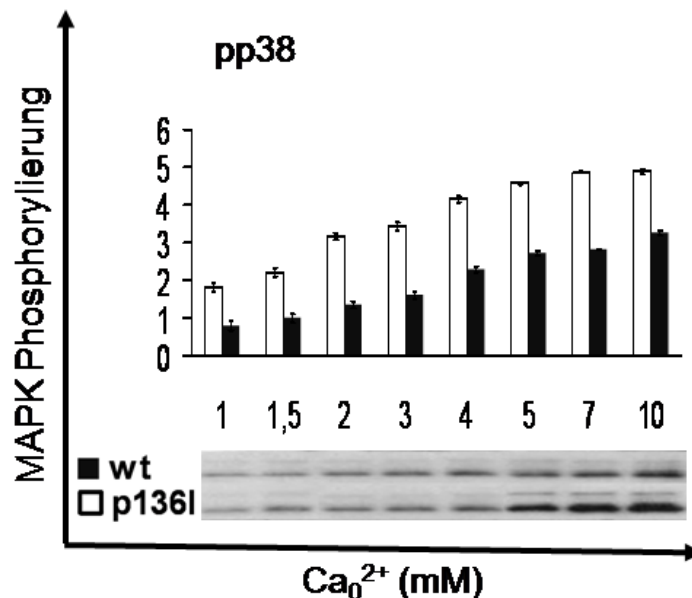
### 5.7 Aktivierung der MAP-Kinasen durch den Wildtyp- und den P136L-CaSR

Eine gesteigerte Stimulation der MAP-Kinasen (MAPK) bedingt durch aktivierende Mutationen im CaSR wurde in verschiedenen Arbeiten beschrieben (Arthur et al., 2000; Brown, 2004; Huang und Miller, 2007a; McNeil et al., 1998a; Sakwe et al., 2004; Tfelt-Hansen et al., 2003a; Tfelt-Hansen et al., 2003c). Um die eventuelle Aktivierung der MAPK ERK1/2, p38 oder JNK durch die neuartige Mutation P136L-CaSR zu bestimmen, wurden HEK293-Zellen mit den Vektoren für den Wildtyp-CASR oder die P136L-Mutante transient transfiziert und durch die extrazelluläre Zugabe von Calciumlösungen verschiedener Konzentrationen für 30 min behandelt. Die Aktivierung von ERK1/2, p38, and JNK wurde über das Phosphorylierungssignal der Anti-pERK-, -pp38- and -pJNK-Antikörper in der Western-Blot-Analyse der Zelllysate gemessen.



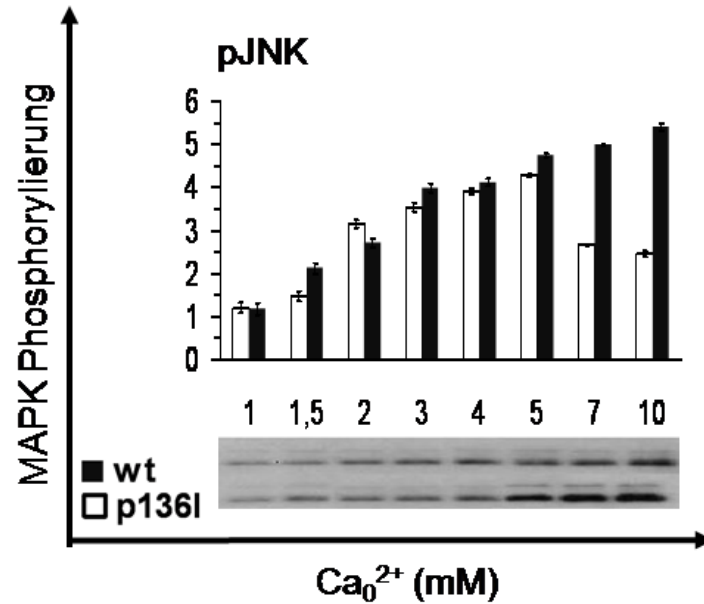
**Abb. 14:** Darstellung der Kinetik der ERK-Phosphorylierung in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration. Das Balkendiagramm zeigt die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung. Man erkennt eine konzentrationsabhängige Stimulation von ERK vermittelt über den durch Calcium aktivierten CaSR. Es zeigt sich wesentlich frühere und stärkere Phosphorylation von ERK vermittelt über den P136L-CaSR versus Wildtyp-CaSR, pERK:  $EC_{50} = 3,0 \pm 0,1$  mM für den Wildtyp vs.  $EC_{50} = 1,5 \pm 0,1$  mM für die P136L-Mutante,  $p < 0,05$ , Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 6$ .

In den HEK293-Zellen mit dem P136L-CaSR konnte früher als beim Wildtyp eine Stimulation von ERK1/2, JNK und p38 bei wesentlich niedrigeren extrazellulären  $[Ca^{2+}]_0$ -Werten beobachtet werden (**Abb. 14, Abb. 15, Abb. 16**)(pERK:  $EC_{50} = 3,0 \pm 0,1$  mM für den Wildtyp vs.  $EC_{50} = 1,5 \pm 0,1$  mM für die P136L-Mutante,  $p < 0,05$ ; pJNK:  $EC_{50} = 3,5 \pm 0,5$  mM für den Wildtyp vs.  $EC_{50} = 1,8 \pm 0,2$  mM für die P136L-Mutante,  $p < 0,05$ ; pp38:  $EC_{50} = 3,5 \pm 0,5$  mM für den Wildtyp vs.  $EC_{50} = 2,0 \pm 0,2$  mM für die P136L-Mutante,  $p < 0,05$ ; Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 6$ ).



**Abb. 15:** Darstellung der Kinetik der p38-Phosphorylierung in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration. Das Balkendiagramm zeigt die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung. Man erkennt eine konzentrationsabhängige Stimulation von p38 vermittelt über den durch Calcium aktivierten CaSR. Es zeigt sich bereits bei niedrigen Calciumkonzentrationen stärkere Phosphorylation von ERK zugunsten des P136L-CaSR versus Wildtyp-CaSR, pp38:  $EC_{50} = 3,5 \pm 0,5$  mM für den Wildtyp vs.  $EC_{50} = 2,0 \pm 0,2$  mM für die P136L-Mutante,  $p < 0,05$ ; Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 6$ .

Darüber hinaus war die Stimulation aller drei Kinasen in den Zellen mit dem mutierten Rezeptor deutlich erhöht. Die Expression der nicht phosphorylierten ERK1/2, p38 und JNK war nach der Calciumstimulation gleich, sodaß es von der gleichen Transfektionseffizienz auszugehen ist.



**Abb. 16:** Westernblotting und densytometrische Darstellung der Kinetik der JNK-Phospholierung in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration. Auf dem Balkendiagramm lässt sich eine wesentlich schwächere gegenüber den p38 und ERK stattgehabte Stimulation von JNK vermittelt über den durch Calcium aktivierten CaSR, pJNK:  $EC_{50} = 3,5 \pm 0,5$  mM für den Wildtyp vs.  $EC_{50} = 1,8 \pm 0,2$  mM für die P136L-Mutante,  $p < 0,05$ , Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 6$ .

## 6. Diskussion

In dieser Arbeit konnte eine neuartige Mutation des CaSR bei einer Familie mit ADH charakterisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass alle Familienmitglieder, die in der Blutuntersuchung eine Hypocalcämie aufwiesen, Träger der neuartigen Mutation waren. Dem Pathomechanismus der ADH liegt eine Punktmutation im CASR zugrunde und als Folge davon die Substitution einer Aminosäure, die zur Veränderung der Proteinkonformation führt. Der Ersatz von Prolin durch Leucin führt zur konstitutiven Aktivierung des Rezeptors und zur Aktivierung der mit ihm verbundenen MAPK-Signalkaskade. Die Aktivierung des Rezeptors hat außerdem die frühzeitige Sensibilisierung des Rezeptors auf extrazelluläres Calcium zur Folge und führt zu konstant niedrigen Calciumwerten im Blut. Die Expression des mutierten Rezeptors in HEK293-Zellen zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant erhöhte Mobilisierung von intrazellulärem Calcium. Darüber hinaus war die intrazelluläre Signalübertragung in den mit der mutierten cDNA transfizierten HEK293-Zellen deutlich gesteigert, wie anhand der Stimulation der MAPK ERK1/2, JNK und p38 demonstriert werden konnte. Das Vorhandensein des mutierten CASR korrelierte mit dem klinischen und biochemischen Bild aller betroffenen Familienmitglieder. Die vererbte Mutation zeichnete sich durch die Substitution der Aminosäure 136, einem Prolin, gegen die Aminosäure Leucin im proximalen extrazellulären Teil des Rezeptors aus (P136L).

### 6.1 Charakteristika des Patientenkollektivs

Die Familie mit der P136L-Mutation wies bei jedem Familienmitglied deutliche Abweichungen im klinischen Bild der Hypocalcämie auf. Innerhalb der Familie konnten vier asymptomatische Fälle und sechs Fälle mit Symptomen unterschieden werden. Die asymptomatischen Patienten gehörten in der Mehrzahl zur dritten Generation (zwei Kinder des Mitglieds II-4 und beide Kinder der Index-Patientin). In allen übrigen Fällen wurden folgende klinische Manifestationen der Hypocalcämie beschrieben: Calcifizierung der Basalganglien (I-1), intermittierende schwere Muskelkrämpfe (III-3 und III-6), Myoklonie (II-3) sowie Nephrocalcinose und Nephrolithiasis (II-7). Die heterogene klinische Präsentation der ADH wurde bereits durch andere Arbeitsgruppen beschrieben (Bai et al., 1997a; Bai et al., 1997b; Bai et al., 1996; D'Souza-Li, 2006; Lienhardt et al., 2001;

Watanabe et al., 1998; Yamamoto et al., 2000; Zhao et al., 1999). Raue et al. haben in ihrer multizentrischen Studie 25 Patienten mit HP und Verdacht auf ADH beschrieben, von denen 20 Patienten zu 11 Familien gehörten und die 5 übrigen als Einzelfälle galten (Raue et al., 2011). Unter insgesamt 14 Männern und 11 Frauen wurden 9 verschiedene Missense-Mutationen im CaSR charakterisiert, inklusive einer neuen Variante der M734T-Mutation. Die klinische und biochemische Charakteristik zeigte, dass die Mittelwerte des Serumcalciums mit  $1,87 \pm 0,13$  mM erniedrigt waren. Die PTH-Konzentration war entweder erniedrigt (19/25 Patienten) oder inadäquat normal. Bei den symptomatischen Patienten (50 %) lag der Calciumspiegel bei  $1,8 \pm 0,12$  mM versus  $1,95 \pm 0,11$  mM bei den asymptomatischen Patienten. Unter den symptomatischen Patienten wiesen neun (36 %) eine Calcifizierung der Basalganglien (BGC) und drei (12 %) eine Nephrocalcinose auf. Das Auftreten der Symptome konnte auf den Grad der Hypocalcämie zurückgeführt werden, obwohl das Vorkommen der BGC oder der Nephrocalcinose nicht mit dem Schweregrad der Hypocalcämie oder dem Alter korreliert war. Während der Behandlung mit Calcitriol mit einer mittleren Dauer der Behandlung von 7,1 Jahren traten die Episoden der Hypocalcämie seltener auf und die Rate der Calcifizierung der Nieren wurde deutlich niedriger (12 %). Álvarez-Hernández et al. berichteten über eine Familie mit ADH, die durch die G604L-Mutation bedingt war. Eines der Familienmitglieder litt als Kind unter schweren Muskelkrämpfen und Nephrocalcinose, während zwei andere Familienmitglieder symptomlos blieben (Alvarez-Hernandez et al., 2003).

In der Diagnostik des unklaren HP müssen genetische Störungen als mögliche Ursachen der Hypocalcämie berücksichtigt werden. In den letzten Jahren konnten dank der Anwendung der molekularen Diagnostik wichtige Fortschritte in der endokrinen Diagnostik gemacht werden (De Sanctis et al., 2012; Hannan et al., 2012; Hannan und Thakker; Nakajima et al., 2009; Raue et al., 2011). Diese Untersuchungen halfen nicht nur, die Rolle mutierter Gene als Ursache mancher angeborener Störungen zu demonstrieren, sondern sie zeigten auch, dass die chromosomale Lokalisation der Genveränderung ein individuelles Risiko darstellt und die Prädisposition für das Auftreten solcher Störungen wie die familiäre Hypocalcämie beeinflusst. Das Auftreten des



familiären isolierten HP, der autosomal-dominant, autosomal-rezessiv oder X-gekoppelt rezessiv vererbt wird, wurde untersucht. Die autosomalen Formen des HP sind durch Mutationen in den Genen geprägt, die für das PTH, GCMB2 oder den CaSR kodieren, während für die meisten idiopathischen Ursachen des HP die genetische Lokalisation weiterhin unklar bleibt.

Wegen der möglichen Folgen der Hypocalcämie ist die Indikation zur Therapie gegeben und ein molekulares Screening der Patienten wird empfohlen (De Sanctis et al., 2012). Das bessere Verständnis der molekularen Ursachen der Erkrankung sowohl bei den Patienten als auch bei deren Familien hat das Potenzial für eine maßgeschneiderte genetische Beratung, ein familiäres Screening und die entsprechende Behandlung erhöht (Brandi, 2011; Shoback, 2008). Außerdem liefert die Erkennung der genetischen Ursachen des angeborenen HP zusätzliche Hinweise für die klinische Betreuung von Patienten, insbesondere wenn sich die Erkrankung in der neonatalen Phase manifestiert, wie von Nakajima et al. berichtet (Nakajima et al., 2009). Die Autoren fanden unter 15 Patienten mit idiopathischer Hypocalcämie und niedrigen PTH-Werten zwei neuartige Missense-Mutationen im CaSR-Gen.

## 6.2 CASR-Sequenzanalyse

Pollak et al. haben im Jahr 1994 die erste aktivierende Mutation im CaSR-Gen in einer Familie mit ADH beschrieben (Pollak et al., 1994a). Bis jetzt wurden mehr als 230 verschiedene krankheitsassoziierte Mutationen im CaSR-Gen identifiziert, davon etwa 70 aktivierende Mutationen des CaSR, die ADH verursachen (Hannan und Thakker; Raue et al., 2011). In der Arbeit von Raue et al. wurden insgesamt neun verschiedene Mutationen in sechs Familien und fünf Einzelpersonen detektiert (Raue et al., 2011). Die Mutationen wurden jeweils im den Exons 3, 4, 6 und 7 des CASR lokalisiert. Die Mutationen P221L und E767Q traten in zwei verschiedenen Familien auf. Vier Mutationen fanden sich in der transmembranösen Domäne des CaSR (TMD), während fünf andere Mutationen in der extrazellulären Domäne (ECD) lokalisiert wurden. In der Arbeit von Lazarus et al. wurde die neue Mutation T888M in der PKC-Phosphorylierungsstelle des Rezeptors beschrieben (Lazarus et al.). Die am häufigsten auftretenden Mutationen (95 %) haben den Charakter einer Missense-Mutation und sind heterozygot, wie auch die

Mutation P136L; nur 4 % sind Frameshift-Mutationen und lediglich 1 % sind In-Frame-Deletionen oder Insertionen (Hannan et al., 2012; Hannan und Thakker). Die Mutationen treten meist in der ECD-Region (51 %) auf, insbesondere in der Region zwischen den Aminosäuren 116 und 136, wo auch die neu beschriebene P136L-Mutation liegt. Diese Lokalisation der Mutationen beeinflusst die Dimerisierungsaffinität des Rezeptors (Hannan und Thakker; Hu, 2008; Hu et al., 2002; Hu et al., 2004; Hu und Spiegel, 2007). Es wird postuliert, dass das Auftreten der Mutation in Schleife 2 der ECD die Sensitivität für Calcium durch die Förderung von strukturellen und konformationellen Veränderungen, wie z.B. eine Drehung der Dimeren, erhöht, was wiederum die Aktivierung des Rezeptors unterstützt. Die restlichen Mutationen sind in der TMD lokalisiert, insbesondere in der 6. und 7. Domäne eingreifend die dritte extrazelluläre Schleife (Aminosäuren 819–837) (41 %), sowie in der ICD (8 %) (Hannan et al., 2012; Hannan und Thakker; Hu und Spiegel, 2007).

### 6.3 Nachweis des CaSR durch Immunfluoreszenz

Wie bereits in Abschnitt 1.3.2. beschrieben, besteht der G-Protein-gekoppelte CaSR aus drei Domänen. Der in den Untersuchungen verwendete Anti-CaSR-Antikörper (6D4: sc-47741; Abschnitt 3.5.) bindet an die ECD in der Region zwischen den Aminosäuren 15–29. Da der Nachweis des Rezeptors durch die Immunfluoreszenz erfolgte, konnten die Antikörper durch die Permeabilisierung der Zellmembran sowohl an den auf der Zellmembran befindlichen CaSR als auch an die intrazellulären CaSR-Moleküle binden; Letztere sind insbesondere im ER lokalisiert (Baron et al., 1996; Chattopadhyay und Brown, 2006; Egbuna und Brown, 2008; Garrett et al., 1995; Hu und Spiegel, 2007; Lienhardt et al., 2001). Der Nachweis des Rezeptors im ER sowie der Weg des Rezeptors vom ER zur Membran wurden bereits beschrieben (Baron et al., 1996; Chattopadhyay und Brown, 2006; Egbuna und Brown, 2008; Garrett et al., 1995; Hu und Spiegel, 2007; Lienhardt et al., 2001).

### 6.4 Intrazelluläre Detektion von mobilisiertem Calcium

Bivalente Kationen wie Calcium binden an die extrazelluläre Domäne des CaSR. Die funktionelle Analyse der Stimulation des Rezeptors zeigte eine enge Korrelation mit der Mobilisierung von intrazellulärem Calcium ( $\text{Ca}_i^{2+}$ ) (Brown et al., 1994a; D'Souza-Li et al.,

2002; Pearce et al., 1996a). Die Charakterisierung der neuen Mutation P136L bestätigte die erhöhte Sensitivität des mutierten Rezeptors für die Stimulation durch extrazelluläres Calcium. Mit  $EC_{50}$ -Werten von  $3,3 \pm 0,1$  mM im Vergleich zu  $4,2 \pm 0,1$  mM für den Wildtyp-Rezeptor demonstrierten Bai et al. die erhöhte Calciumsensitivität der CaSR-Mutante E127A (Bai et al., 1996). Interessanterweise weisen die Ergebnisse von Jensen et al. und Lienhardt et al. darauf hin, dass Mutationen, die innerhalb der extrazellulären Domäne zwischen den Aminosäuren Ala116 und Pro136 lokalisiert sind, die Aufrechterhaltung der inaktiven Konformation des Rezeptors stören (Jensen und Brauner-Osborne, 2007; Jensen et al., 2002; Lienhardt et al., 2001; Lienhardt et al., 2000). Die von Pearce et al. beschriebenen und charakterisierten Mutationen im CaSR lieferten ähnliche  $EC_{50}$ -Werte zwischen 2,2 und 2,8 mM für die aktivierenden Mutationen F128L, T151M und E191K, wobei der  $EC_{50}$ -Wert für den Wildtyp 4,0 mM betrug (Pearce et al., 1996a). Deshalb bestätigen die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse eine entscheidende Rolle des Abschnittes Ala116 bis Pro136 in der ECD des CaSR für die Affinität der Calciumbindung. Darüber hinaus wurde demonstriert, dass der Teil der ECD mit der hier beschriebenen P136L-Mutation eine kritische Rolle bei der Signaltransduktion des intrazellulären Teils des Rezeptors spielt (Bai et al., 1996; Hammerland et al., 1999; Lienhardt et al., 2001).

#### 6.5 Aktivierung der MAPK durch wt-CaSR und P136L-CaSR

Der am besten charakterisierte Signalweg ist mit der Aktivierung der PLC verbunden und damit mit der Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels und der Aktivierung der PKC (Chattopadhyay und Brown, 2006; Egbuna und Brown, 2008; Hu und Spiegel, 2007). Wie andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert der mit extrazellulärem  $Ca^{2+}$  komplexierte CaSR zahlreiche intrazelluläre Signalwege, die unter anderem zur Aktivierung von MAPK führen (Brauner-Osborne et al., 1999; Davis, 1993; Gutkind, 1998). Eine hohe  $[Ca^{2+}]_i$  ruft außerdem die über den CaSR vermittelte Stimulation der ERK1/2 in Rattenfibroblasten, Nebenschilddrüsenzellen aus Rindern und in transfizierten HEK293-Zellen hervor (Hendy et al., 2003; Kifor et al., 2001; McNeil et al., 1998a; McNeil et al., 1998b; Tan et al., 2003). Ähnliche Effekte wurden für die aktivierenden Mutationen im CaSR beobachtet (Kifor et al., 2001; McNeil et al., 1998b).

Analog zu den Daten von Kifor wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass durch die hohe  $[Ca^{2+}]_0$  der MAPK-Signalweg in den CaSR-exprimierenden HEK293-Zellen dosisabhängig aktiviert wird (Kifor et al., 2001; McNeil et al., 1998b). Darüber hinaus führt die aktivierende Mutation P136L im CaSR trotz niedriger extrazellulärer Calciumwerte abhängig von der Calciumkonzentration zu einem Anstieg der MAPK-Aktivität. Somit waren die Kurven für die  $[Ca^{2+}]_0$  abhängig von der Calciumkonzentration im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor nach links verschoben.

## 6.6 Ausblick

Mit den neuen Erkenntnissen zur Aufklärung und Charakterisierung der Wirkmechanismen von CaSR wird für die Zukunft zu erhoffen, neue innovative therapeutische Strategien in der Anwendung von allosterische Modulatoren des Rezeptors zu entwickeln. Als ein Beispiel gilt die Einführung von Cinacalcet zur Therapie des sekundären Hyperparathyreoidismus. Durch allosterische Modulation erhöht Cinacalcet die Empfindlichkeit des CaSR für Calcium. Möglicherweise ergeben sich durch ein differenziertes Verständnis des intrazellulären CaSR-Mappings weitere therapeutische Ansätze der ADH.

## 7. Zusammenfassung

Der Autosomal dominanten Hypocalcämie (ADH) liegen aktivierende Mutationen im Calcium-sensing Rezeptor-Gen (CaSR) zugrunde. Die Erkrankung charakterisiert sich in den meisten Fällen als asymptomatische, milde Hypocalcämie mit nicht adäquatem niedrigen Parathormon (PTH) Spiegel im Blut. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse präsentieren die biochemischen und funktionellen Charakteristika der neuartigen aktivierenden Mutation des CaSR P136L bei einer Familie mit primären Hypoparathyreoidismus. Bei der Index-Patientin wurde mit 10 Jahren nach der Anamnese mit Muskelschmerzen und -krämpfen der „idiopathische Hypoparathyreoidismus“ diagnostiziert. Es wurde in den darauf folgenden genetischen Untersuchungen bei der Patientin und neun anderen die neuartige Mutation des CaSR identifiziert. Es wurde vermutet, dass die neue Mutation potenziell den Funktionsgewinn im CaSR verursacht. Die biochemischen Untersuchungen der Familie zeigten eine signifikante Hypocalcämie (mean  $\pm$  SD: 1,91  $\pm$  0,1 mmol/l) sowie anamnestisch Hinweise auf moderate Muskelkrämpfe mit rezidivierenden Symptomen von Nephrolithiasis. Die Ergebnisse der DNA-Sequenzierung der Index-Patientin zeigten eine neuartige heterozygote Punktmutation, durch die in Kodon 136 in Exon 3 (CCC) das mittlere Cytosin durch Thymin ersetzt wurde (CTC), was eine Aminosäuresubstitution von Prolin zu Leucin (P136L) in der extrazellulären Domäne zur Folge hat. Diese Mutation wurde außer bei der Index-Patientin auch bei acht hypocalcämischen Familienmitgliedern gefunden, während keiner der asymptomatischen Patienten diese Mutation aufwies. Somit konnte bestätigt werden, dass die Hypocalcämie mit der P136L-Mutation vererbt wurde.

Zur funktionellen Charakterisierung des mutierten CaSR wurde die ortsspezifische Mutation zur Generierung des P136L-CaSR Rezeptors verwendet. Um die Eigenschaften des Gens *in vitro* zu untersuchen wurde die transiente Transfektion zum Einschleusen des Gens in die HEK293 Zellen durchgeführt.

Die extrazelluläre Stimulation der transient transfizierten mit Wildtyp- oder mit P136L-CASR HEK293 Zellen zeigte eine deutlich erhöhte Mobilisierung des intrazellulären Calciums sowie eine gesteigerte Aktivität von MAPK für den Mutanten gegenüber den Wildtyp-Rezeptor. Diese Arbeit befasst sich mit einer Familie mit der Hypocalcämie als

Hauptzeichen einer ADH, der als Ursache eine neuartige Mutation im CaSR zugrunde liegt. Die funktionelle Aktivierung des CaSR durch die vorliegende Mutation wurde durch die erhöhte Sensitivität des Rezeptors auf Veränderungen des extrazellulären Calciumspiegels und die folgende gesteigerte Freisetzung von intrazellulärem Calcium und die erhöhte Aktivierung der MAPK-Signalwege in transfizierten HEK293-Zellen demonstriert. Die experimentellen Ergebnisse liefern neue Erkenntnisse über die neuartige aktivierende Mutation des CaSR, bestätigen die Rolle der neuen Mutation in der Pathogenese der ADH bei untersuchten Familie und ergänzen das Wissen über die intrazelluläre Signalkaskade dieses Rezeptors.

## 8. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Schematische Darstellung der genomischen Struktur des CaSR-Gens. Das humane CASR umfasst mehr als 45 kb genomischer DNA und ist in 7 Exons organisiert. Abbildung, modifiziert nach Pearce et al.; 1995. 13
- Abb. 2: Die Struktur des CaSR-Proteins. Der Rezeptor besteht aus 3 Domänen: einer großen extrazellulären N-terminalen Domäne (ECD), einer membrangängigen Domäne (TMD) sowie einer zytoplasmatischen, carboxyterminalen Domäne (ICD). 14
- Abb. 3: Signalkaskade des CaSR. Die Bindung von Calcium an den CaSR führt zur Aktivierung der PLC und zur Entstehung von  $IP_3$ . Daraufhin werden die zytoplasmatischen Calciumspeicher über  $IP_3$  geöffnet und das Calcium intrazellulär freigesetzt. Der Anstieg des Calciumlevels in der Zelle bedingt das Ausscheiden von PTH in den Nebenschilddrüsen und die Resorption von Calcium in den Nieren. Abbildung modifiziert nach Lamprecht und Lipkin (Lamprecht und Lipkin, 2003). 16
- Abb. 4: Sequenz von cDNA CASR hum. 4924 bp, Access No. NM\_000388.3, mit der rot markierten Stelle der Mutagenese Reaktion. 41
- Abb. 5: Der Ablauf der Transformation in schematischer Darstellung. 46
- Abb. 6: Schematische Darstellung der Mitglieder der Familie mit ADH. Die römischen Zahlen weisen auf die jeweilige Generation hin. Schwarze Symbole bezeichnen Träger der Mutation im CaSR im heterozygoten Status. Die leeren Symbole repräsentieren Familienmitglieder ohne Mutation. Der Pfeil zeigt die Index-Patientin. Das Sternchen weist auf Familienmitglieder hin, von denen die Ergebnisse der Blutuntersuchung vorlagen. 60
- Abb. 7: Ausschnitte aus den Elektropherogrammen der CASR-DNA-Sequenzen aus dem DNA-Material der Probanden mit der nachgewiesenen Mutation. (eines asymptomatischen (wt) und eines hypocalcämischen Familienmitgliedes (P136L)) 62
- Abb. 8: Standard-Agarosegel (2%) gefärbt mit Ethidiumbromid zur Darstellung der Produkte der ortsspezifischen Mutagenese. Von links nach rechts: Molekulargewichtstandart (in bp), Positivkontrolle mit pWhitescript (4300 bp), pcDNA-CASR und CASR-P136L (jeweils 9000 bp). 63

Abb. 9: Ergebnisse der doppelsträngigen Sequenzierungsanalyse mit den Primern CASR for 2 (A) und CASR rev 2 (B). Beide Fragmente kodieren das Exon 3 und enthalten die eingeführte durch ortsspezifische Mutagenese Punktmutation CCC>CTC im Kodon 136. Die Chromatogramme zeigen schwarz markierte Stelle von Primer CaSR-P136L und bestätigen die Mutation in beiden Richtungen: (C) 5'→3' und (D) 3'→5', rot unterstrichen. 64

Abb. 10: Immunfluoreszenz des Wildtyp-CaSR. 65

Abb. 11: Immunfluoreszenz des P136L-CaSR. 65

Abb. 12: Western-Blot mit Lysat aus transient transfizierten HEK293-Zellen, inkubiert mit dem Anti-CaSR-Antikörper (6D4, sc-47741). Die mit den Plasmiden pcDNA3.1-CASR oder pcDNA3.1-P136L transfizierten Zellen zeigten eine Bande bei 238 kDa, die auf die dimere Form des Rezeptors hinweist. 66

Abb. 13: Messung des intrazellulären Calciums mittels Fura-2/AM. Die Abbildung zeigt die Zunahme des FURA2/AM-Signals nach der Stimulation mit Calcium-Lösung in der steigenden Konzentration. Das FURA-Signal entspricht dem freigesetzten intrazellulären Calciumspiegel. Die Signale wurden im Bezug auf das maximale Signal des Wildtyp-Rezeptors normalisiert, bei einer basalen Konzentration von 0,5 mM. Die  $EC_{50}$ -Werte waren für den Wildtyp-Rezeptor und die P136L-Mutante signifikant unterschiedlich und zeigten in dem Kurvenverlauf eine deutliche Verschiebung nach links. 67

Abb. 14: Darstellung der Kinetik der ERK-Phosphorylierung in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration. Das Balkendiagramm zeigt die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung. Man erkennt eine konzentrationsabhängige Stimulation von ERK vermittelt über den durch Calcium aktivierten CaSR. Es zeigt sich wesentlich frühere und stärkere Phosphorylation von ERK vermittelt über den P136L-CaSR versus Wildtyp-CaSR, pERK:  $EC_{50} = 3,0 \pm 0,1$  mM für den Wildtyp vs.  $EC_{50} = 1,5 \pm 0,1$  mM für die P136L-Mutante,  $p < 0,05$ , Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 6$ . 68

Abb. 15: Darstellung der Kinetik der p38-Phosphorylierung in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration. Das Balkendiagramm zeigt die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung. Man erkennt eine konzentrationsabhängige Stimulation von p38 vermittelt über den durch Calcium aktivierten CaSR. Es zeigt sich bereits bei niedrigen



Calciumkonzentrationen stärkere Phosphorylation von ERK zugunsten des P136L-CaSR versus Wildtyp-CaSR, pp38:  $EC_{50} = 3,5 \pm 0,5$  mM für den Wildtyp vs.  $EC_{50} = 2,0 \pm 0,2$  mM für die P136L-Mutante,  $p < 0,05$ ; Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 6$ . 69

Abb. 16: Westernblotting und densytometrische Darstellung der Kinetik der JNK-Phospholierung in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration. Auf dem Balkendiagramm lässt sich eine wesentlich schwächere gegenüber den p38 und ERK stattgehabte Stimulation von JNK vermittelt über den durch Calcium aktivierten CaSR, pJNK:  $EC_{50} = 3,5 \pm 0,5$  mM für den Wildtyp vs.  $EC_{50} = 1,8 \pm 0,2$  mM für die P136L-Mutante,  $p < 0,05$ , Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 6$ . 70

## 9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Expression des CaSR in verschiedenen Organen und seine Funktionen	17
Tab. 2: Ursachen des Hypoparathyreoidismus nach klinischen Signifikanz (De Sanctis et al., 2012; Michels und Kelly, 2013)	21
Tab. 3: Genetische Störungen der PTH Synthese/ Sekretion	22
Tab. 4: Charakteristika der <i>Escherichia coli</i> -Stämme	39
Tab. 5: Verwendete Plasmide und Primer	40
Tab. 6: Verwendete Primer	42
Tab. 7: PCR-Programm	47
Tab. 8: Plasmidpräparationspuffer in der Reihenfolge ihrer Verwendung	49
Tab. 9: Restriktionsansatz	50
Tab. 10: Reaktionsansätze für SDS-Polyacrylamid-Trenn- und -Sammelgele	57
Tab. 11: Biochemische Charakterisierung der zehn Patienten mit ADH.	61

## 10. Literaturverzeichnis

Al-Shibli A, Konrad M, Altay W, Al Masri O, Al-Gazali L, Al Attrach I. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis (FHHNC): report of three cases with a novel mutation in CLDN19 gene. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2013; 24: 338-344

Alvarez-Hernandez D, Santamaria I, Rodriguez-Garcia M, Iglesias P, Delgado-Lillo R, Cannata-Andia JB. A novel mutation in the calcium-sensing receptor responsible for autosomal dominant hypocalcemia in a family with two uncommon parathyroid hormone polymorphisms. *J Mol Endocrinol* 2003; 31: 255-262

Arthur JM, Lawrence MS, Payne CR, Rane MJ, McLeish KR. The calcium-sensing receptor stimulates JNK in MDCK cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 538-541

Bai M, Janicic N, Trivedi S, Quinn SJ, Cole DE, Brown EM, Hendy GN. Markedly reduced activity of mutant calcium-sensing receptor with an inserted Alu element from a kindred with familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *J Clin Invest* 1997a; 99: 1917-1925

Bai M, Pearce SH, Kifor O, Trivedi S, Stauffer UG, Thakker RV, Brown EM, Steinmann B. In vivo and in vitro characterization of neonatal hyperparathyroidism resulting from a de novo, heterozygous mutation in the Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor gene: normal maternal calcium homeostasis as a cause of secondary hyperparathyroidism in familial benign hypocalciuric hypercalcemia. *J Clin Invest* 1997b; 99: 88-96

Bai M, Quinn S, Trivedi S, Kifor O, Pearce SH, Pollak MR, Krapcho K, Hebert SC, Brown EM. Expression and characterization of inactivating and activating mutations in the human Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor. *J Biol Chem* 1996; 271: 19537-19545

Bai M, Trivedi S, Brown EM. Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 23605-23610

Barakat AJ, Rennert OM. Gitelman's syndrome (familial hypokalemia-hypomagnesemia). *J Nephrol* 2001; 14: 43-47

- Baron J, Winer KK, Yanovski JA, Cunningham AW, Laue L, Zimmerman D, Cutler GB, Jr. Mutations in the Ca(2+)-sensing receptor gene cause autosomal dominant and sporadic hypoparathyroidism. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 601-606
- Baumber L, Tufarelli C, Patel S, King P, Johnson CA, Maher ER, Trembath RC. Identification of a novel mutation disrupting the DNA binding activity of GCM2 in autosomal recessive familial isolated hypoparathyroidism. *J Med Genet* 2005; 42: 443-448
- Bilezikian JP, Khan AA, Potts JT, Jr., Third International Workshop on the Management of Asymptomatic Primary H. Guidelines for the management of asymptomatic primary hyperparathyroidism: summary statement from the third international workshop. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 335-339
- Blair JW, Carachi R. Neonatal primary hyperparathyroidism--a case report and review of the literature. *Eur J Pediatr Surg* 1991; 1: 110-114
- Brandi ML. Genetics of hypoparathyroidism and pseudohypoparathyroidism. *J Endocrinol Invest* 2011; 34: 27-34
- Brauner-Osborne H, Jensen AA, Sheppard PO, O'Hara P, Krosgaard-Larsen P. The agonist-binding domain of the calcium-sensing receptor is located at the amino-terminal domain. *J Biol Chem* 1999; 274: 18382-18386
- Breitwieser GE. Minireview: the intimate link between calcium sensing receptor trafficking and signaling: implications for disorders of calcium homeostasis. *Mol Endocrinol* 2012; 26: 1482-1495
- Breitwieser GE. The calcium sensing receptor life cycle: trafficking, cell surface expression, and degradation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013a; 27: 303-313
- Breitwieser GE. Pharmacoperones and the calcium sensing receptor: Exogenous and endogenous regulators. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 2013b:
- Brennan SC, Conigrave AD. Regulation of cellular signal transduction pathways by the extracellular calcium-sensing receptor. *Curr Pharm Biotechnol* 2009; 10: 270-281

- Brown AJ, Ritter CS, Finch JL, Slatopolsky EA. Decreased calcium-sensing receptor expression in hyperplastic parathyroid glands of uremic rats: role of dietary phosphate. *Kidney Int* 1999a; 55: 1284-1292
- Brown AJ, Sanders EJ. Interactions between mesoderm cells and the extracellular matrix following gastrulation in the chick embryo. *J Cell Sci* 1991; 99 ( Pt 2): 431-441
- Brown EM. Extracellular Ca<sup>2+</sup> sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca<sup>2+</sup> and other ions as extracellular (first) messengers. *Physiol Rev* 1991; 71: 371-411
- Brown EM. Mutations in the calcium-sensing receptor and their clinical implications. *Horm Res* 1997; 48: 199-208
- Brown EM. Physiology and pathophysiology of the extracellular calcium-sensing receptor. *Am J Med* 1999; 106: 238-253
- Brown EM. The extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor: central mediator of systemic calcium homeostasis. *Annu Rev Nutr* 2000; 20: 507-533
- Brown EM. The calcium-sensing receptor (CaR) and its disorders. *Hormones (Athens)* 2002; 1: 10-21
- Brown EM. Calcium sensing by endocrine cells. *Endocr Pathol* 2004; 15: 187-219
- Brown EM. The calcium-sensing receptor: physiology, pathophysiology and CaR-based therapeutics. *Subcell Biochem* 2007a; 45: 139-167
- Brown EM. Clinical lessons from the calcium-sensing receptor. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007b; 3: 122-133
- Brown EM, Chattopadhyay N, Vassilev PM, Hebert SC. The calcium-sensing receptor (CaR) permits Ca<sup>2+</sup> to function as a versatile extracellular first messenger. *Recent Prog Horm Res* 1998a; 53: 257-280; discussion 280-251
- Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC. Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 1993; 366: 575-580
- Brown EM, MacLeod RJ. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev* 2001; 81: 239-297

Brown EM, Pollak M, Hebert SC. The extracellular calcium-sensing receptor: its role in health and disease. *Annu Rev Med* 1998b; 49: 15-29

Brown EM, Pollak M, Riccardi D, Hebert SC. Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from parathyroid and kidney: new insights into the physiology and pathophysiology of calcium metabolism. *Nephrol Dial Transplant* 1994a; 9: 1703-1706

Brown EM, Vassilev PM, Quinn S, Hebert SC. G-protein-coupled, extracellular Ca(2+)-sensing receptor: a versatile regulator of diverse cellular functions. *Vitam Horm* 1999b; 55: 1-71

Brown PM, Debanne MT, Grothe S, Bergsma D, Caron M, Kay C, O'Connor-McCourt MD. The extracellular domain of the epidermal growth factor receptor. Studies on the affinity and stoichiometry of binding, receptor dimerization and a binding-domain mutant. *Eur J Biochem* 1994b; 225: 223-233

Cavanaugh A, McKenna J, Stepanchick A, Breitwieser GE. Calcium-sensing receptor biosynthesis includes a cotranslational conformational checkpoint and endoplasmic reticulum retention. *J Biol Chem* 285: 19854-19864

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; 58: 199-206

Cha SK, Huang C, Ding Y, Qi X, Huang CL, Miller RT. Calcium-sensing receptor decreases cell surface expression of the inwardly-rectifying K channel Kir4.1. *J Biol Chem*:

Chakravarti B, Chattopadhyay N, Brown EM. Signaling through the extracellular calcium-sensing receptor (CaSR). *Advances in experimental medicine and biology* 2012; 740: 103-142

Chattopadhyay N. Biochemistry, physiology and pathophysiology of the extracellular calcium-sensing receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 789-804

- Chattopadhyay N. Effects of calcium-sensing receptor on the secretion of parathyroid hormone-related peptide and its impact on humoral hypercalcemia of malignancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290: E761-770
- Chattopadhyay N, Baum M, Bai M, Riccardi D, Hebert SC, Harris HW, Brown EM. Ontogeny of the extracellular calcium-sensing receptor in rat kidney. *Am J Physiol* 1996; 271: F736-743
- Chattopadhyay N, Brown EM. Role of calcium-sensing receptor in mineral ion metabolism and inherited disorders of calcium-sensing. *Mol Genet Metab* 2006; 89: 189-202
- Cole DE, Janjic N, Salisbury SR, Hendy GN. Neonatal severe hyperparathyroidism, secondary hyperparathyroidism, and familial hypocalciuric hypercalcemia: multiple different phenotypes associated with an inactivating Alu insertion mutation of the calcium-sensing receptor gene. *Am J Med Genet* 1997; 71: 202-210
- Colussi G, Rombola G, De Ferrari ME. Distal nephron function in familial hypokalemia-hypomagnesemia (Gitelman's syndrome). *Nephron* 1994; 66: 122-123
- Conigrave AD, Ward DT. Calcium-sensing receptor (CaSR): pharmacological properties and signaling pathways. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013; 27: 315-331
- Cusano NE, Bilezikian JP. Comparative effectiveness of combination osteoanabolic and antiresorptive therapy for osteoporosis: an update. *Journal of comparative effectiveness research* 2013; 2: 511-513
- Cusano NE, Rubin MR, Irani D, Sliney J, Jr., Bilezikian JP. Use of parathyroid hormone in hypoparathyroidism. *J Endocrinol Invest* 2013a; 36: 1121-1127
- Cusano NE, Rubin MR, McMahon DJ, Irani D, Tulley A, Sliney J, Jr., Bilezikian JP. The effect of PTH(1-84) on quality of life in hypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2013b; 98: 2356-2361
- Cusano NE, Rubin MR, McMahon DJ, Zhang C, Ives R, Tulley A, Sliney J, Jr., Cremers SC, Bilezikian JP. Therapy of hypoparathyroidism with PTH(1-84): a prospective four-year investigation of efficacy and safety. *J Clin Endocrinol Metab* 2013c; 98: 137-144
- Cusano NE, Rubin MR, Sliney J, Jr., Bilezikian JP. Mini-review: new therapeutic options in hypoparathyroidism. *Endocrine* 2012; 41: 410-414

- Cusano NE, Silverberg SJ, Bilezikian JP. Normocalcemic primary hyperparathyroidism. *Journal of clinical densitometry : the official journal of the International Society for Clinical Densitometry* 2013d; 16: 33-39
- D'Souza-Li L. The calcium-sensing receptor and related diseases. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006; 50: 628-639
- D'Souza-Li L, Canaff L, Janicic N, Cole DE, Hendy GN. An acceptor splice site mutation in the calcium-sensing receptor (CASR) gene in familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Hum Mutat* 2001; 18: 411-421
- D'Souza-Li L, Yang B, Canaff L, Bai M, Hanley DA, Bastepe M, Salisbury SR, Brown EM, Cole DE, Hendy GN. Identification and functional characterization of novel calcium-sensing receptor mutations in familial hypocalciuric hypercalcemia and autosomal dominant hypocalcemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1309-1318
- Davis RJ. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 1993; 268: 14553-14556
- De Sanctis V, Soliman A, Fiscina B. Hypoparathyroidism: from diagnosis to treatment. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 2012; 19: 435-442
- Diaz-Soto G, Mora-Porta M, Nicolau J, Perea V, Halperin I, Puig-Domingo M. Efficacy and safety of long term treatment of unresponsive hypoparathyroidism using multipulse subcutaneous infusion of teriparatide. *Horm Metab Res* 2012; 44: 708-710
- Doumith R, Ulmann A, Biclet P, Rieu M, Dubost C. [An unrecognised cause of hypercalcaemia: hypercalcaemia-hyocalcluria syndrome]. *Nouv Presse Med* 1980; 9: 1157-1159
- Egbuna OI, Brown EM. Hypercalcaemic and hypocalcaemic conditions due to calcium-sensing receptor mutations. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008; 22: 129-148
- Fajtova VT, Quinn SJ, Brown EM. Cytosolic calcium responses of single rMTC 44-2 cells to stimulation with external calcium and potassium. *Am J Physiol* 1991; 261: E151-158
- Felderbauer P, Hoffmann P, Einwachter H, Bulut K, Ansorge N, Schmitz F, Schmidt WE. A novel mutation of the calcium sensing receptor gene is associated with chronic pancreatitis in a family with heterozygous SPINK1 mutations. *BMC Gastroenterol* 2003; 3: 34



- Finegold DN, Armitage MM, Galiani M, Matisse TC, Pandian MR, Perry YM, Deka R, Ferrell RE. Preliminary localization of a gene for autosomal dominant hypoparathyroidism to chromosome 3q13. *Pediatr Res* 1994; 36: 414-417
- Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Nechama M, Meir T, Silver J, Naveh-Many T. The calcium-sensing receptor regulates parathyroid hormone gene expression in transfected HEK293 cells. *BMC Biol* 2009; 7: 17
- Gamba G, Friedman PA. Thick ascending limb: the Na(+):K (+):2Cl (-) co-transporter, NKCC2, and the calcium-sensing receptor, CaSR. *Pflugers Arch* 2009; 458: 61-76
- Garcia Soblechero E, Ferrer Castillo MT, Jimenez Crespo B, Dominguez Quintero ML, Gonzalez Fuentes C. Neonatal hypercalcemia due to a homozygous mutation in the calcium-sensing receptor: failure of cinacalcet. *Neonatology* 2013; 104: 104-108
- Garrett JE, Capuano IV, Hammerland LG, Hung BC, Brown EM, Hebert SC, Nemeth EF, Fuller F. Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs. *J Biol Chem* 1995; 270: 12919-12925
- Gitelman HJ, Graham JB, Welt LG. A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. *Trans Assoc Am Physicians* 1966; 79: 221-235
- Gjata M, Tase M, Gjata A, Gjergji Z. Gitelman's syndrome (familial hypokalemia-hypomagnesemia). *Hippokratia* 2007; 11: 150-153
- Goldsmith PK, Fan GF, Ray K, Shiloach J, McPhie P, Rogers KV, Spiegel AM. Expression, purification, and biochemical characterization of the amino-terminal extracellular domain of the human calcium receptor. *J Biol Chem* 1999; 274: 11303-11309
- Grant MP, Stepanchick A, Breitwieser GE. Calcium signaling regulates trafficking of familial hypocalciuric hypercalcemia (FHH) mutants of the calcium sensing receptor. *Mol Endocrinol* 2012; 26: 2081-2091
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260: 3440-3450
- Gutkind JS. The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 1998; 273: 1839-1842

- Hammerland LG, Krapcho KJ, Garrett JE, Alasti N, Hung BC, Simin RT, Levinthal C, Nemeth EF, Fuller FH. Domains determining ligand specificity for Ca<sup>2+</sup> receptors. *Mol Pharmacol* 1999; 55: 642-648
- Hammond CM, White D, Tomic J, Shi Y, Spaner DE. Extracellular calcium sensing promotes human B-cell activation and function. *Blood* 2007; 110: 3985-3995
- Hampson G, Konrad MA, Scoble J. Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis (FHHNC): compound heterozygous mutation in the claudin 16 (CLDN16) gene. *BMC Nephrol* 2008; 9: 12
- Hannan FM, Nesbit MA, Zhang C, Cranston T, Curley AJ, Harding B, Fratter C, Rust N, Christie PT, Turner JJ, Lemos MC, Bowl MR, Bouillon R, Brain C, Bridges N, Burren C, Connell JM, Jung H, Marks E, McCredie D, Mughal Z, Rodda C, Tollefsen S, Brown EM, Yang JJ, Thakker RV. Identification of 70 calcium-sensing receptor mutations in hyper- and hypo-calcaemic patients: evidence for clustering of extracellular domain mutations at calcium-binding sites. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 2768-2778
- Hannan FM, Thakker RV. Calcium-sensing receptor (CaSR) mutations and disorders of calcium, electrolyte and water metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 27: 359-371
- Hauache OM. Extracellular calcium-sensing receptor: structural and functional features and association with diseases. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34: 577-584
- Heaney RP. Lead in calcium supplements. *JAMA* 2000a; 284: 3126
- Heaney RP. Vitamin D: how much do we need, and how much is too much? *Osteoporos Int* 2000b; 11: 553-555
- Heaney RP, Berner B, Louie-Helm J. Dosing regimen for calcium supplementation. *J Bone Miner Res* 2000a; 15: 2291
- Heaney RP, Dowell MS, Rafferty K, Bierman J. Bioavailability of the calcium in fortified soy imitation milk, with some observations on method. *Am J Clin Nutr* 2000b; 71: 1166-1169
- Heath DA. Clinical manifestations of abnormalities of the calcium sensing receptor. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; 48: 257-258

- Hendy GN, D'Souza-Li L, Yang B, Canaff L, Cole DE. Mutations of the calcium-sensing receptor (CASR) in familial hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia. *Hum Mutat* 2000; 16: 281-296
- Hendy GN, Guarnieri V, Canaff L. Chapter 3 calcium-sensing receptor and associated diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2009; 89: 31-95
- Hendy GN, Minutti C, Canaff L, Pidasheva S, Yang B, Nouhi Z, Zimmerman D, Wei C, Cole DE. Recurrent familial hypocalcemia due to germline mosaicism for an activating mutation of the calcium-sensing receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3674-3681
- Hinnie J, Bell E, McKillop E, Gallacher S. The prevalence of familial hypocalciuric hypercalcemia. *Calcif Tissue Int* 2001; 68: 216-218
- 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
- Hofer AM, Brown EM. Extracellular calcium sensing and signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2003; 4: 530-538
- Hofer AM, Curci S, Doble MA, Brown EM, Soybel DI. Intercellular communication mediated by the extracellular calcium-sensing receptor. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 392-398
- Holick MF. Vitamin D and bone health. *J Nutr* 1996; 126: 1159S-1164S
- Holick MF, Chen ML, Kong XF, Sanan DK. Clinical uses for calciotropic hormones 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and parathyroid hormone-related peptide in dermatology: a new perspective. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1996; 1: 1-9
- Hu J. Allosteric modulators of the human calcium-sensing receptor: structures, sites of action, and therapeutic potentials. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2008; 8: 192-197
- Hu J, Mora S, Colussi G, Proverbio MC, Jones KA, Bolzoni L, De Ferrari ME, Civati G, Spiegel AM. Autosomal dominant hypocalcemia caused by a novel mutation in the loop 2 region of the human calcium receptor extracellular domain. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 1461-1469

- Hu J, Mora S, Weber G, Zamproni I, Proverbio MC, Spiegel AM. Autosomal dominant hypocalcemia in monozygotic twins caused by a de novo germline mutation near the amino-terminus of the human calcium receptor. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 578-586
- Hu J, Spiegel AM. Structure and function of the human calcium-sensing receptor: insights from natural and engineered mutations and allosteric modulators. *J Cell Mol Med* 2007; 11: 908-922
- Huang C, Miller RT. The calcium-sensing receptor and its interacting proteins. *J Cell Mol Med* 2007a; 11: 923-934
- Huang C, Miller RT. Regulation of renal ion transport by the calcium-sensing receptor: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007b; 16: 437-443
- Huang Y, Breitwieser GE. Rescue of calcium-sensing receptor mutants by allosteric modulators reveals a conformational checkpoint in receptor biogenesis. *J Biol Chem* 2007; 282: 9517-9525
- Huang Y, Niwa J, Sobue G, Breitwieser GE. Calcium-sensing receptor ubiquitination and degradation mediated by the E3 ubiquitin ligase dorfins. *J Biol Chem* 2006; 281: 11610-11617
- 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
- Janicic N, Soliman E, Pausova Z, Seldin MF, Riviere M, Szpirer J, Szpirer C, Hendy GN. Mapping of the calcium-sensing receptor gene (CASR) to human chromosome 3q13.3-21 by fluorescence in situ hybridization, and localization to rat chromosome 11 and mouse chromosome 16. *Mamm Genome* 1995; 6: 798-801
- Janner M, Mullis PE. [Impaired calcium homeostasis, clinical impact]. *Ther Umsch* 2007; 64: 271-275
- Jensen AA, Brauner-Osborne H. Allosteric modulation of the calcium-sensing receptor. *Curr Neuropharmacol* 2007; 5: 180-186
- Jensen AA, Hansen JL, Sheikh SP, Brauner-Osborne H. Probing intermolecular protein-protein interactions in the calcium-sensing receptor homodimer using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Eur J Biochem* 2002; 269: 5076-5087

- Jensen AA, Spalding TA, Burstein ES, Sheppard PO, O'Hara PJ, Brann MR, Krosgaard-Larsen P, Brauner-Osborne H. Functional importance of the Ala(116)-Pro(136) region in the calcium-sensing receptor. Constitutive activity and inverse agonism in a family C G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 2000; 275: 29547-29555
- Jiang Y, Minet E, Zhang Z, Silver PA, Bai M. Modulation of interprotomer relationships is important for activation of dimeric calcium-sensing receptor. *J Biol Chem* 2004; 279: 14147-14156
- Khan AA, Bilezikian JP, Potts JT, Jr., Guest Editors for the Third International Workshop on Asymptomatic Primary H. The diagnosis and management of asymptomatic primary hyperparathyroidism revisited. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 333-334
- Kifor O, MacLeod RJ, Diaz R, Bai M, Yamaguchi T, Yao T, Kifor I, Brown EM. Regulation of MAP kinase by calcium-sensing receptor in bovine parathyroid and CaR-transfected HEK293 cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F291-302
- Kinoshita Y, Hori M, Taguchi M, Watanabe S, Fukumoto S. Functional activities of mutant calcium-sensing receptors determine clinical presentations in patients with autosomal dominant hypocalcemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: E363-368
- Kobayashi M, Tanaka H, Tsuzuki K, Tsuyuki M, Igaki H, Ichinose Y, Aya K, Nishioka N, Seino Y. Two novel missense mutations in calcium-sensing receptor gene associated with neonatal severe hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2716-2719
- Konrad M, Vollmer M, Lemmink HH, van den Heuvel LP, Jeck N, Vargas-Poussou R, Lakings A, Ruf R, Deschenes G, Antignac C, Guay-Woodford L, Knoers NV, Seyberth HW, Feldmann D, Hildebrandt F. Mutations in the chloride channel gene *CLCNKB* as a cause of classic Bartter syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1449-1459
- Kruse K. [Hypoparathyroidism and pseudohypoparathyroidism. New aspects of the pathogenesis, diagnosis and therapy]. *Monatsschr Kinderheilkd* 1988; 136: 652-666
- Kuwert-Broking E, Frund S, Bulla M, Kleta R, August C, Kisters K. Familial hypomagnesemia-hypercalciuria in 2 siblings. *Clin Nephrol* 2001; 56: 155-161
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685

- Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *Journal of molecular biology* 1970a; 47: 69-85
- Laemmli UK, Molbert E, Showe M, Kellenberger E. Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *Journal of molecular biology* 1970b; 49: 99-113
- Lamprecht SA, Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nature reviews. Cancer* 2003; 3: 601-614
- 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
- Lazarus S, Pretorius CJ, Khafagi F, Campion KL, Brennan SC, Conigrave AD, Brown EM, Ward DT. A novel mutation of the primary protein kinase C phosphorylation site in the calcium-sensing receptor causes autosomal dominant hypocalcemia. *Eur J Endocrinol*:
- Leach K, Sexton PM, Christopoulos A, Conigrave AD. Engineering biased signalling from the calcium-sensing receptor for the pharmacotherapy of diverse disorders. *British journal of pharmacology* 2013:
- Letz S, Rus R, Haag C, Dorr HG, Schnabel D, Mohlig M, Schulze E, Frank-Raue K, Raue F, Mayr B, Schofl C. Novel activating mutations of the calcium-sensing receptor: the calcilytic NPS-2143 mitigates excessive signal transduction of mutant receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 95: E229-233
- Lienhardt A, Bai M, Lagarde JP, Rigaud M, Zhang Z, Jiang Y, Kottler ML, Brown EM, Garabedian M. Activating mutations of the calcium-sensing receptor: management of hypocalcemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5313-5323
- Lienhardt A, Garabedian 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

- Lietman SA, Tenenbaum-Rakover Y, Jap TS, Yi-Chi W, De-Ming Y, Ding C, Kussiny N, Levine MA. A novel loss-of-function mutation, Gln459Arg, of the calcium-sensing receptor gene associated with apparent autosomal recessive inheritance of familial hypocalciuric hypercalcemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 4372-4379
- Linglart A, Rothenbuhler A, Gueorgieva I, Lucchini P, Silve C, Bougneres P. Long-term results of continuous subcutaneous recombinant PTH (1-34) infusion in children with refractory hypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 3308-3312
- Loris Pablo C, Martin de Vicente C, Abio Albero S, Justa Roldan M, Ferrer Novella C. [Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. Association with ocular abnormalities]. *An Pediatr (Barc)* 2004; 61: 502-508
- Maeda SS, Fortes EM, Oliveira UM, Borba VC, Lazaretti-Castro M. Hypoparathyroidism and pseudohypoparathyroidism. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006; 50: 664-673
- Magno AL, Ward BK, Ratajczak T. The Calcium-Sensing Receptor: A Molecular Perspective. *Endocr Rev*:
- 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 (Baltimore)* 1981a; 60: 397-412
- Marx SJ, Attie MF, Stock JL, Spiegel AM, Levine MA. Maximal urine-concentrating ability: familial hypocalciuric hypercalcemia versus typical primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1981b; 52: 736-740
- McNeil L, Hobson S, Nipper V, Rodland KD. Functional calcium-sensing receptor expression in ovarian surface epithelial cells. *Am J Obstet Gynecol* 1998a; 178: 305-313
- McNeil SE, Hobson SA, Nipper V, Rodland KD. Functional calcium-sensing receptors in rat fibroblasts are required for activation of SRC kinase and mitogen-activated protein kinase in response to extracellular calcium. *J Biol Chem* 1998b; 273: 1114-1120
- 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

Michels TC, Kelly KM. Parathyroid disorders. *American family physician* 2013; 88: 249-257

Mittelman SD, Hendy GN, Fefferman RA, Canaff L, Mosesova I, Cole DE, Burkett L, Geffner ME. A hypocalcemic child with a novel activating mutation of the calcium-sensing receptor gene: successful treatment with recombinant human parathyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 2474-2479

Miyashiro K, Kunii I, Manna TD, de Menezes Filho HC, Damiani D, Setian N, Hauache OM. Severe hypercalcemia in a 9-year-old Brazilian girl due to a novel inactivating mutation of the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5936-5941

Moller AP, Merino S, Brown CR, Robertson RJ. Immune defense and host sociality: a comparative study of swallows and martins. *Am Nat* 2001; 158: 136-145

Mun HC, Franks AH, Culverston EL, Krapcho K, Nemeth EF, Conigrave AD. The Venus Fly Trap domain of the extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor is required for L-amino acid sensing. *J Biol Chem* 2004; 279: 51739-51744

Nagase T, Murakami T, Tsukada T, Kitamura R, Chikatsu N, Takeo H, Takata N, Yasuda H, Fukumoto S, Tanaka Y, Nagata N, Yamaguchi K, Akatsu T, Yamamoto M. A family of autosomal dominant hypocalcemia with a positive correlation between serum calcium and magnesium: identification of a novel gain of function mutation (Ser(820)Phe) in the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2681-2687

Nakajima K, Yamazaki K, Kimura H, Takano K, Miyoshi H, Sato K. Novel gain of function mutations of the calcium-sensing receptor in two patients with PTH-deficient hypocalcemia. *Intern Med* 2009; 48: 1951-1956

Nanjo K, Nagai S, Shimizu C, Tajima T, Kondo T, Miyoshi H, Yoshioka N, Koike T. Identification and functional analysis of novel calcium-sensing receptor gene mutation in familial hypocalciuric hypercalcemia. *Endocr J* 57: 787-792

Nemeth EF, Scarpa A. Are changes in intracellular free calcium necessary for regulating secretion in parathyroid cells? *Ann N Y Acad Sci* 1987; 493: 542-551

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. Calcium homeostasis and disorders of the calcium-sensing receptor. *J R Coll Physicians Lond* 1998; 32: 10-14
- Pearce SH. Clinical disorders of extracellular calcium-sensing and the molecular biology of the calcium-sensing receptor. *Ann Med* 2002; 34: 201-206
- Pearce SH, Bai M, Quinn SJ, Kifor O, Brown EM, Thakker RV. Functional characterization of calcium-sensing receptor mutations expressed in human embryonic kidney cells. *J Clin Invest* 1996a; 98: 1860-1866
- Pearce SH, Brown EM. Calcium-sensing receptor mutations: insights into a structurally and functionally novel receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1309-1311
- Pearce SH, Thakker RV. The calcium-sensing receptor: insights into extracellular calcium homeostasis in health and disease. *J Endocrinol* 1997; 154: 371-378
- Pearce SH, Trump D, Wooding C, Besser GM, Chew SL, Grant DB, Heath DA, Hughes IA, Paterson CR, Whyte MP, et al. Calcium-sensing receptor mutations in familial benign hypercalcemia and neonatal hyperparathyroidism. *J Clin Invest* 1995; 96: 2683-2692
- 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* 1996b; 335: 1115-1122
- Pearce SH, Wooding C, Davies M, Tollefsen SE, Whyte MP, Thakker RV. Calcium-sensing receptor mutations in familial hypocalciuric hypercalcaemia with recurrent pancreatitis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996c; 45: 675-680
- Pidasheva S, Canaff L, Simonds WF, Marx SJ, Hendy GN. Impaired cotranslational processing of the calcium-sensing receptor due to signal peptide missense mutations in familial hypocalciuric hypercalcemia. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1679-1690
- Pidasheva S, D'Souza-Li L, Canaff L, Cole DE, Hendy GN. CASRdb: calcium-sensing receptor locus-specific database for mutations causing familial (benign) hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia. *Hum Mutat* 2004; 24: 107-111

- Pidasheva S, Grant M, Canaff L, Ercan O, Kumar U, Hendy GN. Calcium-sensing receptor dimerizes in the endoplasmic reticulum: biochemical and biophysical characterization of CASR mutants retained intracellularly. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 2200-2209
- Pollak MR, Brown EM, Chou YH, Hebert SC, Marx SJ, Steinmann B, Levi T, Seidman CE, Seidman JG. Mutations in the human Ca(2+)-sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Cell* 1993; 75: 1297-1303
- Pollak MR, Brown EM, Estep HL, McLaine PN, Kifor O, Park J, Hebert SC, Seidman CE, Seidman JG. Autosomal dominant hypocalcaemia caused by a Ca(2+)-sensing receptor gene mutation. *Nat Genet* 1994a; 8: 303-307
- Pollak MR, Chou YH, Marx SJ, Steinmann B, Cole DE, Brandi ML, Papapoulos SE, Menko FH, Hendy GN, Brown EM, et al. 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
- Quinn SJ, Ye CP, Diaz R, Kifor O, Bai M, Vassilev P, Brown E. The Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor: a target for polyamines. *Am J Physiol* 1997; 273: C1315-1323
- Raue F, Haag C, Schulze E, Frank-Raue K. The role of the extracellular calcium-sensing receptor in health and disease. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006; 114: 397-405
- Raue F, Pichl J, Dorr HG, Schnabel D, Heidemann P, Hammersen G, Jaursch-Hancke C, Santen R, Schofl C, Wabitsch M, Haag C, Schulze E, Frank-Raue K. Activating mutations in the calcium-sensing receptor: genetic and clinical spectrum in 25 patients with autosomal dominant hypocalcaemia - a German survey. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011; 75: 760-765
- Ray K, Adipietro KA, Chen C, Northup JK. Elucidation of the role of peptide linker in calcium-sensing receptor activation process. *J Biol Chem* 2007; 282: 5310-5317

- Rejnmark L, Sikjaer T, Underbjerg L, Mosekilde L. PTH replacement therapy of hypoparathyroidism. *Osteoporos Int* 2013; 24: 1529-1536
- Rolighed L, Rejnmark L, Sikjaer T, Heickendorff L, Vestergaard P, Mosekilde L, Christiansen P. Vitamin D Treatment in Primary Hyperparathyroidism: a Randomized Placebo Controlled Trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2014: jc20133978
- Rubin MR, Sliney J, Jr., McMahon DJ, Silverberg SJ, Bilezikian JP. Therapy of hypoparathyroidism with intact parathyroid hormone. *Osteoporos Int* 2010; 21: 1927-1934
- Rus R, Haag C, Bumke-Vogt C, Bahr V, Mayr B, Mohlig M, Schulze E, Frank-Raue K, Raue F, Schofl C. Novel inactivating mutations of the calcium-sensing receptor: the calcimimetic NPS R-568 improves signal transduction of mutant receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 4797-4803
- Sakwe AM, Larsson M, Rask L. Involvement of protein kinase C-alpha and -epsilon in extracellular Ca(2+) signalling mediated by the calcium sensing receptor. *Exp Cell Res* 2004; 297: 560-573
- Sanjad SA, Hariri A, Habbal ZM, Lifton RP. A novel PCLN-1 gene mutation in familial hypomagnesemia with hypercalciuria and atypical phenotype. *Pediatr Nephrol* 2007; 22: 503-508
- Sato K, Hasegawa Y, Nakae J, Nanao K, Takahashi I, Tajima T, Shinohara N, Fujieda K. Hydrochlorothiazide effectively reduces urinary calcium excretion in two Japanese patients with gain-of-function mutations of the calcium-sensing receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3068-3073
- Seyberth HW. An improved terminology and classification of Bartter-like syndromes. *Nat Clin Pract Nephrol* 2008; 4: 560-567
- Shoback D. Clinical practice. Hypoparathyroidism. *N Engl J Med* 2008; 359: 391-403
- Shoback DM, Membreno LA, McGhee JG. High calcium and other divalent cations increase inositol trisphosphate in bovine parathyroid cells. *Endocrinology* 1988; 123: 382-389
- Sikjaer T, Amstrup AK, Rolighed L, Kjaer SG, Mosekilde L, Rejnmark L. PTH(1-84) replacement therapy in hypoparathyroidism: a randomized controlled trial on

- pharmacokinetic and dynamic effects after 6 months of treatment. *J Bone Miner Res* 2013; 28: 2232-2243
- Sikjaer T, Rejnmark L, Mosekilde L. PTH treatment in hypoparathyroidism. *Current drug safety* 2011a; 6: 89-99
- Sikjaer T, Rejnmark L, Rolighed L, Heickendorff L, Mosekilde L, Hypoparathyroid Study G. The effect of adding PTH(1-84) to conventional treatment of hypoparathyroidism: a randomized, placebo-controlled study. *J Bone Miner Res* 2011b; 26: 2358-2370
- Sorheim JI, Husebye ES, Nedrebo BG, Svarstad E, Lind J, Boman H, Lovas K. Phenotypic variation in a large family with autosomal dominant hypocalcaemia. *Hormone research in paediatrics* 2010; 74: 399-405
- Stechman MJ, Loh NY, Thakker RV. Genetic causes of hypercalciuric nephrolithiasis. *Pediatr Nephrol* 2009; 24: 2321-2332
- Tajima T, Nakae J, Fujieda K. Two heterozygous mutations of CLDN16 in a Japanese patient with FHHNC. *Pediatr Nephrol* 2003; 18: 1280-1282
- Tan YM, Cardinal J, Franks AH, Mun HC, Lewis N, Harris LB, Prins JB, Conigrave AD. Autosomal dominant hypocalcemia: a novel activating mutation (E604K) in the cysteine-rich domain of the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 605-610
- Tfelt-Hansen J, Chattopadhyay N, Yano S, Kanuparthi D, Rooney P, Schwarz P, Brown EM. Calcium-sensing receptor induces proliferation through p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase but not extracellularly regulated kinase in a model of humoral hypercalcemia of malignancy. *Endocrinology* 2004; 145: 1211-1217
- Tfelt-Hansen J, MacLeod RJ, Chattopadhyay N, Yano S, Quinn S, Ren X, Terwilliger EF, Schwarz P, Brown EM. Calcium-sensing receptor stimulates PTHrP release by pathways dependent on PKC, p38 MAPK, JNK, and ERK1/2 in H-500 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003a; 285: E329-337
- Tfelt-Hansen J, Schwarz P, Brown EM, Chattopadhyay N. The calcium-sensing receptor in human disease. *Front Biosci* 2003b; 8: s377-390

- Tfelt-Hansen J, Schwarz P, Terwilliger EF, Brown EM, Chattopadhyay N. Calcium-sensing receptor induces messenger ribonucleic acid of human securin, pituitary tumor transforming gene, in rat testicular cancer. *Endocrinology* 2003c; 144: 5188-5193
- Thakker RV. Disorders of the calcium-sensing receptor. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1448: 166-170
- Thakker RV. Diseases associated with the extracellular calcium-sensing receptor. *Cell Calcium* 2004; 35: 275-282
- Theman TA, Collins MT. The role of the calcium-sensing receptor in bone biology and pathophysiology. *Curr Pharm Biotechnol* 2009; 10: 289-301
- Theman TA, Collins MT, Dempster DW, Zhou H, Reynolds JC, Brahim JS, Roschger P, Klaushofer K, Winer KK. PTH(1-34) replacement therapy in a child with hypoparathyroidism caused by a sporadic calcium receptor mutation. *J Bone Miner Res* 2009; 24: 964-973
- Thorgeirsson U, Costa J, Marx SJ. The parathyroid glands in familial hypocalciuric hypercalcemia. *Hum Pathol* 1981; 12: 229-237
- Toke J, Czirjak G, Patocs A, Enyedi B, Gergics P, Csakvary V, Enyedi P, Toth M. Neonatal severe hyperparathyroidism associated with a novel de novo heterozygous R551K inactivating mutation and a heterozygous A986S polymorphism of the calcium-sensing receptor gene. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007; 67: 385-392
- Vargas-Poussou R, Huang C, Hulin P, Houillier P, Jeunemaitre X, Paillard M, Planelles G, Dechaux M, Miller RT, Antignac C. Functional characterization of a calcium-sensing receptor mutation in severe autosomal dominant hypocalcemia with a Bartter-like syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2259-2266
- Ward BK, Cameron FJ, Magno AL, McDonnell CM, Stuckey BG, Ratajczak T. A novel homozygous deletion in the calcium-sensing receptor ligand-binding domain associated with neonatal severe hyperparathyroidism. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2006a; 19: 93-100
- Ward BK, Magno AL, Blitvich BJ, Rea AJ, Stuckey BG, Walsh JP, Ratajczak T. Novel mutations in the calcium-sensing receptor gene associated with biochemical and

functional differences in familial hypocalciuric hypercalcaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006b; 64: 580-587

Ward BK, Magno AL, Davis EA, Hanyaloglu AC, Stuckey BG, Burrows M, Eidne KA, Charles AK, Ratajczak T. Functional deletion of the calcium-sensing receptor in a case of neonatal severe hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3721-3730

Ward BK, Magno AL, Walsh JP, Ratajczak T. The role of the calcium-sensing receptor in human disease. *Clin Biochem* 2012; 45: 943-953

Watanabe S, Fukumoto S. [Familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism caused by inactivating mutations of calcium-sensing receptor]. *Nippon Rinsho* 2002; 60: 325-330

Watanabe S, 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

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

Weber S, Schneider L, Peters M, Misselwitz J, Ronnefarth G, Boswald M, Bonzel KE, Seeman T, Sulakova T, Kuwertz-Broking 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

White E, McKenna J, Cavanaugh A, Breitwieser GE. Pharmacochaperone-mediated rescue of calcium-sensing receptor loss-of-function mutants. *Mol Endocrinol* 2009; 23: 1115-1123

Winer KK, Ko CW, Reynolds JC, Dowdy K, Keil M, Peterson D, Gerber LH, McGarvey C, Cutler GB, Jr. Long-term treatment of hypoparathyroidism: a randomized controlled study comparing parathyroid hormone-(1-34) versus calcitriol and calcium. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4214-4220

- Winer KK, Sinaii N, Reynolds J, Peterson D, Dowdy K, Cutler GB, Jr. Long-term treatment of 12 children with chronic hypoparathyroidism: a randomized trial comparing synthetic human parathyroid hormone 1-34 versus calcitriol and calcium. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 2680-2688
- Winer KK, Zhang B, Shrader JA, Peterson D, Smith M, Albert PS, Cutler GB, Jr. Synthetic human parathyroid hormone 1-34 replacement therapy: a randomized crossover trial comparing pump versus injections in the treatment of chronic hypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 391-399
- Wolf MT, Dotsch J, Konrad M, Boswald M, Rascher W. Follow-up of five patients with FHHNC due to mutations in the Paracellin-1 gene. *Pediatr Nephrol* 2002; 17: 602-608
- 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
- Zajickova K, Vrbikova J, Canaff L, Pawelek PD, Goltzman D, Hendy GN. Identification and functional characterization of a novel mutation in the calcium-sensing receptor gene in familial hypocalciuric hypercalcemia: modulation of clinical severity by vitamin D status. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 2616-2623
- Zarraga Larrondo S, Vallo A, Gainza J, Muniz R, Garcia Erauzkin G, Lampreabe I. Familial hypokalemia-hypomagnesemia or Gitelman's syndrome: a further case. *Nephron* 1992; 62: 340-344
- Zhao XM, Hauache O, Goldsmith PK, Collins R, Spiegel AM. A missense mutation in the seventh transmembrane domain constitutively activates the human Ca<sup>2+</sup> receptor. *FEBS Lett* 1999; 448: 180-184

## 11. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. T. Sauerbruch danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I anfertigen zu können.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr.med. Udo Schmitz , der mir die Aufgabenstellung gab und der mich während meiner Arbeit hervorragend betreut hat. Ich danke für die intensive Betreuung der Arbeit, für seine ausdauernde Diskussionsbereitschaft und für sein stetiges Engagment, Voraussetzungen zur Durchführung der Experimente zu schaffen. Von seiner Erfahrungen und ständigen Hilfsbereitschaft habe ich sehr profitiert.

Bedanken möchte ich mich bei:

Frau Maria Hardt, Frau Solveig Daecke und Frau Angela Lenze für die Anleitung und Einarbeitung bei den Labortätigkeiten, für die immer vorhandene Hilfsbereitschaft und technische Unterstützung im Labor,

Meinen Kooperanten aus Bonn, Essen und Heidelberg: Herrn Dr. rer. nat. Michael ter Braak, Herrn Dr. rer. nat. Rainer Saffrich und Herrn Prof. Wölfle für die Unterstützung und Hilfe bei der FURA-Messungen, Fluoreszenzaufnahmen sowie bei Gewinnung der Patientendaten,

Frau Dr. Dr. med. Katinka Kansy und Frau Dr. med. Barbara Vienenkötter für das kritische Lesen des Manuskriptes.

Auch den anderen Mitgliedern der Medizinischen Klinik und Poliklinik I in Bonn sowie Medizinischen Klinik in Heidelberg möchte ich für die Hilfsbereitschaft und angenehme Atmosphäre danken.

Mein besonderer Dank gilt:

meinen Eltern und meiner Schwester sowie meinen Freuden.



## 12. Lebenslauf

Name Baran, Natalia  
Geburtsdatum/Ort 25.09.1981 in Strzelin/Polen

### Schulische Ausbildung

09/1988–06/1996 Besuch der Grundschule, Olesnica/Polen  
09/1996–05/2000 Besuch des privaten allgemeinbildenden Mädchengymnasiums der Ursulinerinnen, Wroclaw/Polen

### Schulabschluss

05/2000 Abitur mit Notendurschnitt :sehr gut

### Studium

10/2000–03/2006 Biotechnologiestudium, Technische Universität Wroclaw/Polen  
10/2001–06/2007 Humanmedizinstudium, Piastów-Śląskich-Universität Wroclaw/Polen  
10/2005–03/2006 experimentelle Magister-Ingenieur-Arbeit, Institut für Klinische Immunologie, Prof. Dr. J. K. Bar, Universitätsklinik Wroclaw/Polen („Die Bedeutung von ‚E-Cadherin‘ bei Eierstockkrebs unter Beachtung der klinisch-pathologischen Parameter“)  
03/2006 Abschluss des Biotechnologiestudiums mit Notendurschnitt: gut  
06/2007 Abschluss des Medizinstudiums mit Notendurschnitt:gut  
07/2007–09/2007 Molekularbiologisches Praktikum an der Medizinischen Klinik I, PD Dr. med. U. Schmitz, Universitätsklinik Bonn  
10/2007–09/2008 DAAD-Promotionsstipendium, Medizinische Klinik I, Direktor Prof. Dr. T. Sauerbruch, Betreuung: PD Dr. med. Udo Schmitz, Universitätsklinik Bonn („Funktionelle Charakterisierung der neuartigen Mutation des Calcium-Sensing-Rezeptors bei Patienten mit Autosomal Dominanter Hypocalcämie“)

### Beruf

10/2008–07/2010 Ärztin in Praktikum in der Medizinischen Klinik III, Klinik für Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinik Bonn, Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Peter Brossart  
02/2009 Medizinisches Staatsexamen  
08/2010–09/2010 Gastärztin in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Kantonspital Aarau/Schweiz, Chefarzt Prof. Dr. med. Gabriel Schär  
11/2010 Erteilung der Ärztlichen Approbation  
seit 1/2011 Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik V, Klinik für Hämatologie, Onkologie und Rheumatologie, Universitätsklinik Heidelberg, Direktor Prof. Dr. med. A. D. Ho

**Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht in:**

Baran N, ter Braak M, Saffrich R, Woelfle J, Schmitz U: Novel Activating Mutation of Human Calcium-Sensing Receptor in a Family with Autosomal Dominant Hypocalcaemia; Mol Cell Endocrinol 2015