

**Aus dem Institut für Physiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. Manfred Heckmann**

Funktionelle Charakterisierung einer primären Zahndurchbruchstörung

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Julia Christine Sturm
aus Bad Mergentheim**

Würzburg, April 2016

Referent: Prof. Dr. Erhard Wischmeyer

Korreferent: Prof. Dr. Martin Eigenthaler

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 04. April 2017

Die Promovendin ist Zahnärztin

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Primary Failure of Eruption	1
1.1.1 Symptome der PFE	1
1.1.2 Epidemiologie.....	2
1.1.3 Kombination von PFE mit anderen Erkrankungen.....	2
1.1.4 Molekularbiologische Ursache.....	3
1.1.5 Bisherige Therapieoptionen.....	4
1.1.6 Ausblick.....	4
1.2 Membranrezeptoren und Ionenkanäle	5
1.2.1 Aufbau von biologischen Membranen und die Rolle von Transportproteinen.....	5
1.2.2 Die Familie der Tandemporenkaliumkanäle (K _{2P} -Kanäle)	5
1.2.3 Vorkommen der TRESK Kanäle.....	5
1.2.4 Struktur der TRESK Kanäle.....	6
1.2.5 Funktion der TRESK Kanäle	6
1.2.6 Unterscheidung mTRESK und hTRESK	7
1.2.7 Parathormonrezeptor	8
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	9
2 Material und Methoden.....	10
2.1 Reagenzien, Puffer und Lösungen	10
2.1.1 Badlösung zur Aufbewahrung von Oozyten	10
2.1.2 Messlösung.....	10

2.1.3	Waschlösung.....	11
2.1.4	Parathormon.....	11
2.1.5	5x MOPS Laufpuffer.....	12
2.1.6	Auftragspuffer.....	12
2.1.7	50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer).....	12
2.1.8	TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer).....	13
2.2	Nukleinsäuren.....	13
2.3	Oligonukleotide.....	13
2.4	Enzyme.....	14
2.5	Antibiotika.....	14
2.6	Hormon.....	15
2.7	Verwendete Reaktionskits.....	15
2.8	Verwendete Lösungen und Chemikalien.....	15
2.9	Verwendete Geräte.....	16
2.10	Verbrauchsmaterial.....	17
2.11	Computerprogramme.....	18
2.12	Molekularbiologische Methoden.....	18
2.12.1	Mutagenese.....	18
2.12.2	Picken von Mutantenkolonien.....	19
2.12.3	Präparation von Plasmid DNA.....	20
2.12.4	Spektrale Konzentrationsbestimmung.....	20
2.12.5	Midi Prep.....	21
2.12.6	<i>In vitro</i> Transkription von c-RNA für die Expression.....	22
2.12.7	Aufreinigung der RNA.....	24
2.12.8	Agarosegel zur Überprüfung der Transkription.....	25
2.12.9	Ansätze für das Agarosegel.....	26

2.13	Elektrophysiologische Methoden.....	26
2.13.1	<i>Xenopus laevis</i> als heterologes Expressionssystem	26
2.13.2	Vorbereitung der <i>Xenopus</i> -Oozyten	27
2.13.3	Injektion von RNA.....	27
2.13.4	Kultivierung der Oozyten	28
2.13.5	Herstellung der Injektions- und Messpipetten.....	28
2.13.6	Ganzzellenableitung mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	28
2.13.7	Aufbau des Messstandes	29
2.13.8	Messprotokoll	29
2.14	Statistische Methoden	31
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Kontrolle des Verdaus nach der <i>in vitro</i> Transkription	33
3.2	Gelelektrophorese zur Überprüfung der Transkription.....	34
3.3	Spektrale Konzentrationsbestimmung	35
3.4	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	35
3.4.1	Wirkung von Parathormon auf den PTHR1-Wildtyp	35
3.4.2	Wirkung von Parathormon auf die PTHR1-Mutation G452E	38
3.4.3	Wirkung von Parathormon auf die PTHR1-Mutation W339*	41
3.4.4	Wirkung von Parathormon auf die PTHR1-Mutation G452A	44
3.4.5	Zusammenfassung der TEVC-Messungen mit TRESK und PTHR1	46
3.4.6	Reproduktion der TEVC-Ergebnisse mit dem Expressionssystem TASK	50
4	Diskussion.....	54
4.1	Ursachen der PFE	54
4.1.1	Die PTHR1-Mutante G452E und ihre Rolle bei der PFE	54

4.1.2 Die PTHR1-Mutante W339* und ihre Rolle bei der PFE	55
4.1.3 Die PTHR1-Mutante G452A und ihre Rolle bei der PFE	56
4.2 Ionenkanäle als Monitor für Rezeptorstörungen	57
4.3 Therapie der PFE	58
4.4 Möglichkeiten der Diagnostik der PFE	60
5 Zusammenfassung	62
6 Literaturverzeichnis	65
Danksagung.....	IX
Lebenslauf	XI
Persönliche Daten.....	XI
Schulischer und akademischer Werdegang	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Elektrophysiologische Messprotokolle	31
Abbildung 2: Definition der Messpunkte	31
Abbildung 3: Agarose-Gel zur Kontrolle des Verdaus der DNA.....	33
Abbildung 4: Agarose-Gel zur Überprüfung der <i>in vitro</i> Transkription nach RNeasy®	34
Abbildung 5: TEVC-Ableitungen von TRESK-Strömen mit PTHR1 Wildtyp	36
Abbildung 6: TEVC-Ableitungen von TRESK-Strömen mit PTHR1 G452E	39
Abbildung 7: TEVC-Ableitungen von TRESK-Strömen mit PTHR1 W339*	41
Abbildung 8: TEVC-Ableitungen von TRESK-Strömen mit PTHR1 G452A.....	44
Abbildung 9 Zusammenfassung der Aktivierung von TRESK mit PTHR1.....	46
Abbildung 10: TEVC-Ableitungen von TASK-Strömen mit PTHR1 Wildtyp.....	50
Abbildung 11: TEVC-Ableitungen von TASK-Strömen.....	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Badlösung ND96+	10
Tabelle 2: Zusammensetzung von ND96	11
Tabelle 3: Zusammensetzung von ND96-Ca²⁺	11
Tabelle 4: Zusammensetzung 5x MOPS Laufpuffer	12
Tabelle 5: Auftragspuffer	12
Tabelle 6: Zusammensetzung TAE 50x.....	12
Tabelle 7: Zusammensetzung TE-Puffer.....	13
Tabelle 8: Zusammensetzung der Transkriptionsansätze	23

Abkürzungsverzeichnis

A

4-AP	4-Aminopyridine
A	Ausgangswert
AK.....	Aktivierung
Ala	Alanin
AS.....	Aminosäuren

B

Ba ²⁺	Barium
------------------------	--------

C

Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid

D

DAG.....	Diacylglycerol
ddH ₂ O.....	Demineralisiertes Wasser
DEPC.....	Diethylpyrocarbonat
DNA.....	Deoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease

E

E	Glutamat/Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA.....	Ethylendiamintetraacetat

G

Glu.....	Glutamat/Glutaminsäure
Gly	Glycin
GTP	Guanosintriphosphat

H

HEPES2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hTRESK.....human TWIK-related spinal cord K⁺-channel

I

IP3Inositoltriphosphat

K

K⁺Kalium
K_{2P} Two-pore-domain potassium channel
kb.....Kilobasenpaare
KCl..... Kaliumchlorid

L

LB Lysogeny broth

M

M Mol/Liter
Maju..... Many-Jumps-Messprotokoll
MgCl₂.....Magnesiumchlorid
Min..... Minuten
ml.....Milliliter
mM Millimol/Liter
MOPS..... 3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA..... messengerRNA
mTRESK..... mice TWIK-related spinal cord K⁺-channel
mV Millivolt

N

n Anzahl der durchgeführten Messungen
Na⁺ Natrium
NaAc..... Natriumacetat
NaCl..... Natriumchlorid

NaPyr..... Natriumpyruvat
NFAT Nuclear Factor of Activated T cells
nM Nanomolar

P

P Prozentuale Veränderung
PBS. Phosphate buffered saline
PCR..... Polymerasekettenreaktion
PFE..... Primary Failure of Eruption, Primäre Durchbruchstörung
PIP2.....Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PLCPhospholipase C
pmol..... Pikomol
PTH Parathormon
PTH LH Parathormon-ähnliches Hormon
PTH1R..... Parathormonrezeptor

R

Rampen Spannungsrampe
RNA.....Ribonucleic acid
RNase..... Ribonukleasen
rpm rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT.....Raumtemperatur
RT-PCR reverse transcription Polymerasekettenreaktion

T

TAE..... TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TASK-1 TWIK-related acid-sensitive K⁺- channel 1
TE TRIS-EDTA-Puffer
TEA..... Tetraethylammonium
TEVC Two-electrode-voltage-clamp, Zwei-Elektroden-Spannungsklemme
t-Plasmid-DNA..... transfer-Plasmid-DNA
TRESK..... TWIK-related spinal cord K⁺-channel, KCNK18
Tris Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

U

µgMikrogramm

µl..... Mikroliter

U.....Unit, Enzymeinheit

W

W1Erster Messwert

W2Messwert zu Beginn der PTH-Zugabe

WT Wildtyp

X

X. laevis..... *Xenopus laevis*

Zur besseren Lesbarkeit werden in dieser Arbeit personenbezogene Bezeichnungen, die sich zugleich auf Frauen und Männer beziehen, generell nur in der im Deutschen üblichen männlichen Form angeführt.

Dies soll jedoch keinesfalls eine Geschlechtsdiskriminierung oder eine Verletzung des Gleichheitsgrundsatzes zum Ausdruck bringen.

1 Einleitung

1.1 Primary Failure of Eruption

Unter *Primary Failure of Eruption* (PFE, Primäre Durchbruchstörung) wird das Vorliegen eines oder mehrerer primär nicht ankylosierter Zähne, welche bedingt durch eine Störung des Durchbruchmechanismus nicht oder nur teilweise eigenständig durchbrechen, verstanden. Auch nach Resorption des koronal gelegenen Alveolarknochens brechen diese Zähne nicht durch, obwohl kein mechanisches Durchbruchshindernis vorhanden ist (Proffit & Vig, 1981).

1.1.1 Symptome der PFE

Durch eine vergleichende Studie mit klinischen und molekulargenetischen Daten konnten Pilz et al. (2014) zeigen, dass folgende sechs der von Proffit und Vig (1981) beschriebenen Charakteristika bei Patienten mit nachgewiesenen Mutationen des Parathormonrezeptor-1 (PTH1R) mit einer Übereinstimmung von 100% vorliegen. Hierzu zählt die Tatsache, dass posteriore Zähne häufiger betroffen sind und dass, sofern ein anterior gelegener Zahn eine Durchbruchstörung aufweist, auch die posterioren Zähne betroffen sind. Die von PFE betroffenen Zähne resorbieren den koronal gelegenen Alveolarknochen und es können sowohl Milch- als auch bleibende Zähne betroffen sein. Aufgrund der PFE kommt es zu einer Wachstumsbeeinträchtigung des Alveolarfortsatzes in vertikaler Richtung und zu einem schwergradig lateral offenen Biss (Pilz et al., 2014).

In der Klinik sind häufig gravierende Auswirkungen der PFE zu verzeichnen, wie beispielsweise Beeinträchtigungen des Alveolarfortsatzwachstums. Auch sind Dilazerationen, ein Abwinkeln der Krone im Verhältnis zur Wurzel, häufig nachzuweisen. Ebenso ist zu beobachten, dass die betroffenen Zähne häufig im basalen Teil von großen vertikalen Defekten vorliegen (Stellzig-Eisenhauer et al., 2010).

Die Anwendung von orthodontischen Kräften beim Versuch der Extrusion bleibt stets erfolglos und führt zu ankylosierten Zähnen (Decker et al., 2008; Proffit & Vig, 1981; Raghoebar et al., 1989).

1.1.2 Epidemiologie

Nach Bacetti (2000) beträgt die Prävalenz der PFE in einer Normalbevölkerung 0,06%, die Geschlechtsverteilung beläuft sich auf männlich zu weiblich M 1:W 2,25.

1.1.3 Kombination von PFE mit anderen Erkrankungen

Der von Aruna et al. (2014) vorgestellte Patientenfall eines achtzehnjährigen männlichen Patienten, der neben einer PFE im rechten unteren Quadranten auch einen bukkal verlagerten Eckzahn sowie Mesiodens (zusätzliche, überzählige Zahnanlagen) im Oberkieferfrontzahnbereich hat, zeigt, dass eine PFE auch in Kombination mit anderen Durchbruchstörungen vorkommen kann. Das Vorliegen einer definitionsgemäßen PFE in einem Quadranten schließt somit nicht aus, dass es in anderen Kieferabschnitten zu weiteren Zahndurchbruchstörungen in Form von mechanischen Hindernissen oder Verlagerungen kommen kann.

Obgleich die Diagnose einer PFE hinsichtlich der dentalen Prognose eher schlecht ist, sind keine Fälle bekannt, bei denen die PFE-Patienten mit einer PTHR1-Mutation andere skelettale Probleme aufweisen (Frazier-Bowers et al., 2014). Bei den die PFE verursachenden Mutationen des PTHR1 liegt ein autosomal dominantes Erbschema vor (Decker et al., 2008; Frazier-Bowers, Puranik, et al., 2010). Im Gegensatz dazu können autosomal rezessive sowie dominante Mutationen des PTHR1 auch schwergradige Folgen wie die Blomstrand Osteochondrodysplasie (BOCD) (OMIM: 215045), Metaphysäre Chondrodysplasie Typ Jansen (OMIM: 156400), Enchondromatosis (OMIM:166000) und das Eiken-Syndrom (OMIM: 600002) verursachen. Alle diese Krankheiten beinhalten Knorpel oder Knochendysplasien (Duchatelet, 2005; Jobert et al., 1998).

Von Frazier-Bowers et al. (2014) wurden jedoch im Zusammenhang mit der Suche nach PTHR1-Mutationen unter 54 Patienten auch insgesamt fünf Patienten aus zwei Familien gefunden, die neben der PFE verursachenden PTHR1-Mutation auch eine Arthrose-Erkrankung (engl. *osteoarthritis*) aufwiesen. Diese Erkrankungen wurden von Ärzten diagnostiziert und manifestierten sich um das zweite bis dritte Lebensjahrzehnt im Rücken und/oder in der Hüftregion (Frazier-Bowers et al., 2014). Dies ließ die Vermutung aufkommen, dass die an der Entstehung der PFE beteiligten PTHR1-Mutationen auch mit der Entstehung von Arthrose vergesellschaftet sind.

Es zeigte sich, dass Familienangehörige von PFE-Patienten mit einem normalen Zahndurchbruch trotz allem dieselbe PTHR1-Mutation in ihrem Genom trugen. Hierbei handelte es sich um eine Mutante bei der es an der Basensequenzstelle 572 zu einer Deletion des Adenin kam. Daraus resultierte ein Frameshift, da alle folgenden Basen um je eine Position nach vorne verschoben wurden. Mit Ausnahme eines Probanden wurde bei Trägern dieser PTHR1-Mutation ausnahmslos die Diagnose Arthrose gestellt oder es waren um das zweite oder dritte Lebensjahrzehnt Arthrose-ähnliche Beschwerden aufgetreten (Frazier-Bowers et al., 2014).

Als mögliche Ursache für das Vorliegen einer isolierten PFE ohne Arthrose wurde ein dosisabhängiges Modell diskutiert. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der biochemischen und radiologischen Untersuchung von Frazier-Bowers (2014), welche den Schluss zulassen, dass für einen funktionstüchtigen PTHR1 immer die Bildung eines Dimers nötig ist, welches zumindest im Zahnbereich aus zwei regulären PTHR1 bestehen muss, um einen normalen Zahndurchbruch zu gewährleisten. Für sonstiges Gewebe könnte bereits ein Dimer mit nur einem regulären PTHR1 ausreichend sein und so das Auftreten von Arthrose beeinflussen. Dies könnte auch erklären, warum es bei PTHR1-Mutationsträger nicht immer zur phänotypischen Ausprägung der PFE kommt.

Als weitere mögliche Ursache der Arthrose wurde eine herabgesetzte Expression des PTHR1 in Chondrozyten von Ratten wissenschaftlich belegt (Becher et al., 2010).

Eine abschließende Beurteilung des Zusammenhanges zwischen PFE und Arthrose steht noch aus.

1.1.4 Molekularbiologische Ursache

Mehrere Studien gehen von einem autosomal dominanten Erbgang als Ursache der PFE aus (Bosker et al., 1978; Brady, 1990; Dibiasi & Leggat, 2000; Raghoobar et al., 1992; Shokeir, 1974).

Diese Annahme wurde durch die von Decker et al. (2008) durchgeführte Studie belegt, darüber hinaus kamen sie zu dem Ergebnis, dass es sich um eine Mutation im PTHR1-Gen (MIM 168468) handelt. Dieses ist ein Mitglied der G-Protein-gekoppelten Rezeptorfamilie 2, welcher Parathormon (PTH, MIM 168450) und Parathormon-ähnliches Hormon (PTH LH, MIM 168470) mit gleicher Affinität als Rezeptor dient. Weitere Studien von Frazier-Bowers et al. (2010; 2009; 2010) bestätigten dieses

Ergebnis. Das Gen liegt auf dem Chromosom 3p21.31 (Decker et al., 2008; Stellzig-Eisenhauer et al., 2010).

1.1.5 Bisherige Therapieoptionen

Aufgrund der sich ausbildenden Ankylose bei versuchter Mobilisierung durch orthodontische Kräfte (Proffit & Vig, 1981; Raghoobar et al., 1989) sind die Therapieoptionen stark eingeschränkt (Frazier-Bowers et al., 2007; A. C. O'Connell & Torske, 1999; Proffit & Vig, 1981). Eine Bewegung der betroffenen Zähne um 1-2 mm konnte im günstigsten Fall erreicht werden (Stellzig-Eisenhauer et al., 2010).

Nach Yatani et al. (1998) ist nach Abschluss des vertikalen Wachstums eine prothetische Versorgung mit Onlays und Kronen zum Aufbau der Zähne möglich. Dies trifft allerdings nur für die leichten Fälle der PFE zu, bei der die durchgebrochenen Zähne die Okklusionsebene nicht komplett erreicht haben. Frazier-Bowers et al. (2007) schlägt für schwierigere Fälle die Extraktion bzw. Osteotomie der betroffenen Zähne als Behandlungsoption vor. Im Anschluss sollte, nach eventuell benötigter Knochentransplantation, eine implantat-prothetische Versorgung erfolgen.

Bei chirurgisch gut zugänglicher Situation ist eine Segmentosteotomie in Betracht zu ziehen, um auf diese Weise die betroffenen Zähne in die Okklusionsebene zu bringen (Piattelli & Eleuterio, 1991; Proffit & Vig, 1981).

Zum Schluss eines extrem offenen Bisses im posterioren Bereich kann des Weiteren die Option einer Distractionsosteogenese diskutiert werden (Kater et al., 2004).

In einigen Fällen erweist sich aufgrund von großen alveolären Defekten die Versorgung mit einem herausnehmbaren prothetischen Zahnersatz als sinnvoll (Siegel & O'Connell, 1999).

1.1.6 Ausblick

Mit der bekannten Sequenzveränderung im PTHR1-Gen eröffnet sich die Möglichkeit eines genetischen Nachweises der Mutation im PTHR1-Gen und damit verbunden eine Diagnosesicherung, welche unnötige Mobilisierungsversuche mit resultierender Ankylose verhindern kann (Stellzig-Eisenhauer et al., 2010). Dieses erleichtert zusammen mit der radiologischen und klinischen Beurteilung der oben genannten Symptome (siehe 1.1.1) eine gesicherte Diagnose.

1.2 Membranrezeptoren und Ionenkanäle

1.2.1 Aufbau von biologischen Membranen und die Rolle von Transportproteinen

Um Zellen oder Organellen als Einheit aufrechtzuerhalten, sind diese von Membranen umgeben. Diese müssen für den kontrollierten Stoffaustausch durchlässig sein, da ein diffusionsbasierter Stoffaustausch nur in beschränktem Maße möglich ist (Rassow, 2012). Diese hydrophoben Plasmamembranen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht und trennen den Extra- und den Intrazellularraum voneinander ab (Pape, 2010). In der Membran befinden sich Proteine, welche für den Stoffaustausch und die Kommunikation zwischen Zellen zuständig sind (Rassow, 2012). Zu diesen Proteinen zählen die Transportproteine, wie etwa Ionenkanäle, Carrier oder Pumpen, aber auch Rezeptorproteine für die Kommunikation und Adhäsionsmoleküle, wie Integrine und Cadherine (Pape, 2010).

1.2.2 Die Familie der Tandemporenkaliumkanäle (K_{2P}-Kanäle)

Der Name Tandemporenkaliumkanal (engl. *two-pore domain background potassium channel*) ist auf den Aufbau des Kanals zurückzuführen: die α -Untereinheit wird aus vier Transmembransegmenten mit je zwei Porenschleifen gebildet (Enyedi et al., 2012).

Aufgrund ihrer funktionellen und strukturellen Eigenschaften können die 15 bei Säugetieren bekannten K_{2P}-Kanäle in sechs Unterfamilien eingeteilt werden (Mathie, 2007). Hierzu zählt die TRESK Unterfamilie, sowie in alphabetischer Reihenfolge TALK (TALK1, TALK2 und TASK2), die TASK-Familie mit TASK1, TASK3 und TASK5 sowie THIK (THIK1 und THIK2), ebenso wie TREK (TREK1, TREK2 und TRAAK) und TWIK (TWIK1, TWIK2 und KCNK7) (Goldstein et al., 2001; A. D. O'Connell et al., 2002).

1.2.3 Vorkommen der TRESK Kanäle

TRESK ist ein stammesgeschichtlich früh auftretendes Protein, das sowohl im Genom von dreizehn Säugetierarten, wie auch von zwei Vogelarten und einer Amphibienart nachgewiesen wurde (Enyedi et al., 2012).

Zunächst wurden TRESK-Kanäle von Sano et al. (2003) nur im Rückenmark dokumentiert. Mit der Zeit kamen jedoch weitere Studien hinzu, welche das Vorliegen dieser Kanäle auch in weiteren neuronalen Regionen des zentralen Nervensystems sowie im peripheren Nervensystem belegten, Beispiele hierfür sind das Kleinhirn (lat. *Cerebellum*), die Spinalganglien (lat. *Ganglion spinale*) und die Großhirnrinde (lat. *Cortex cerebri*) (Czirjak et al., 2004; Kang & Kim, 2006; Kang et al., 2004). Darüber hinaus konnte TRESK in anderen Geweben nachgewiesen werden, hierzu zählen Dünndarm (lat. *Intestinum tenue*), Herz (lat. *Cor*), Hoden (lat. *Testis*), Leber (griech. *Hepar*) und Lunge (lat. *Pulmo*) sowie Milz (lat. *Lien*) und Niere (lat. *Ren*) (Dobler et al., 2007).

1.2.4 Struktur der TRESK Kanäle

TRESK verfügt über vier Transmembransegmente, wobei zwischen dem zweiten und dritten Segment eine, im Vergleich zu anderen K_{2P} Kanälen bei Säugetieren außergewöhnlich lange intrazelluläre Schleife vorliegt (Enyedi et al., 2012).

Im Gegensatz dazu ist das C-terminale Ende besonders kurz. Da dieser Bereich bei den Mitgliedern der TASK und TREK Unterfamilie eine wichtige regulatorische Funktion hat, ist diese strukturelle Besonderheit beachtenswert (Enyedi et al., 2012; Kang et al., 2005; Maingret, 2002; Noel et al., 2009; Patel et al., 1998; Washburn et al., 2002). Die funktionelle Bedeutung des kurzen C-terminalen Endes wurde noch nicht abschließend untersucht (Enyedi et al., 2012).

Für die lange intrazelluläre Schleife liegen hingegen Daten vor. Sie stellt eine wichtige regulatorische Region dar und dient zwei Partnerproteinen als Bindungsstelle (Enyedi et al., 2012).

1.2.5 Funktion der TRESK Kanäle

Die allgemeinen Eigenschaften von TRESK entsprechen denen der anderen Mitglieder der K_{2P} -Familie (Enyedi et al., 2012). In heterologen Expressionssystemen wird den TRESK Kanälen die Funktion eines schwachen auswärts-gerichteten spannungsunabhängigen Hintergrundstromes zu eigen, der das Ruhemembranpotenzial aufrecht erhält (Enyedi et al., 2012). Des Weiteren spielt TRESK eine wichtige Rolle für den Kaliumtransport durch die Membran und ist an der Regulierung der Erregbarkeit sowie an der Gegenregulation der Depolarisation

beteiligt (Enyedi et al., 2012). Unter symmetrischen Kaliumbedingungen erzeugt er eine annähernd lineare Strom-Spannungskurve aufgrund der nahezu spannungs- und zeitunabhängigen Erzeugung von Ionenströmen (Patel & Honore, 2001).

Im Gegensatz zu andern K_{2P} -Kanälen wird TRESK in heterologen Expressionssystemen durch Calcium aktiviert (Enyedi et al., 2012). Es liegen Daten vor, wonach die TRESK Unterfamilie, ebenso wie die TASK und TREK Unterfamilien, von G-Protein-Rezeptor gekoppelten Prozessen reguliert wird (Mathie, 2007). Resultierend aus der Aktivierung des $G\alpha_q$ -Pfades werden TRESK-Kanäle, beruhend auf der Stimulierung von Calcineurin stimuliert (Mathie, 2007).

Die Bindung von Calcineurin, einer calcium/calmodulin-abhängige Proteinphosphatase, und dem Transkriptionsfaktor NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) verläuft analog zum Bindungsmechanismus von Calcineurin mit TRESK. TRESK ist der einzige bekannte Ionenkanal, der Calcineurin auf diese Weise bindet (Li et al., 2004). Bei allen Säugetieren bindet Calcineurin analog direkt an einer spezifischen Bindungsstelle (Czirjak & Enyedi, 2006). Die Dephosphorylierung der TRESK-Kanäle führt zur Aktivierung (Mathie, 2007).

Die klassischen Kanalblocker von spannungsabhängigen Kaliumkanälen, wie Tetraethylammonium (TEA) und 4-Aminopyridine (4-AP), führen nicht zu einer Hemmung der Ströme des TRESK, eine Reduzierung wird jedoch durch nichtselektive Kaliumkanalinhibitoren wie Ba^{2+} und Chinidine erzielt (Enyedi et al., 2012).

1.2.6 Unterscheidung mTRESK und hTRESK

Aufgrund der Tatsache, dass die Aminosäuresequenz von TRESK weniger als 20 % Übereinstimmung mit den Aminosäuresequenzen der anderen K_{2P} Unterfamilien aufweist, stellt TRESK eine eigene Unterfamilie dar (Dobler et al., 2007; Sano et al., 2003). Es liegt eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von 65 % zwischen *Mus musculus* (m) und *Homo sapiens* (h) vor, wobei jede Spezies im gesamten Genom nur über eine Anlage für TRESK verfügt, weshalb es sich ungeachtet der niedrigen Übereinstimmungsrate um orthologe Untereinheiten der Kanäle handelt (Dobler et al., 2007).

Ein entscheidender Unterschied zwischen den Spezies liegt jedoch in der pH-Sensitivität. Während hTRESK nicht durch Änderungen des extrazellulären pH-Wertes

beeinflusst wird, reagiert mTRESK sensibel darauf, indem bei niedrigerem pH-Wert die Aktivität des Kanals abnimmt (Dobler et al., 2007).

1.2.7 Parathormonrezeptor

Das PTHR1-Gen codiert für ein 593 Aminosäuren (AS) langes Protein, welches einer Klasse II *secretin-like* G-Protein-Rezeptor darstellt. Dieser enthält ein 28 AS langes Signalpeptid sowie eine 150 AS große extrazelluläre Domäne, welche die Hormonbindungsstelle enthält (Roth et al., 2014). Der Rezeptor bindet PTH und PTHLH mit gleicher Affinität (Decker et al., 2008). Des Weiteren verfügt der Rezeptor über sieben Transmembrandomänen mit Verbindungsschleifen sowie über eine intrazelluläre Domäne mit einem Reaktionsangriffspunkt (Roth et al., 2014).

Der PTHR1 verfügt über zwei unterschiedliche Wirkmechanismen. Er kann entweder über ein G_s -Protein die Adenylatzyklase aktivieren oder über ein G_q -Protein zur Stimulation des Phospholipase-C-Weges führen (Rassow, 2012).

Die Hauptansatzpunkte des PTH stellen Knochen und Niere dar. So werden die Osteoklasten im Knochen durch PTH aktiviert, wodurch es zur Knochenauflösung und damit verbundener Ca^{2+} - und Phosphat-Freisetzung kommt. In der Niere wird hingegen die Ca^{2+} -Resorption gesteigert und die Phosphat-Resorption gehemmt. Im gleichen Zuge wird die Synthese von 1,25-Dihydroxycholecalciferol stimuliert (Rassow, 2012).

Das PTHLP ist ein weiterer Ligand des PTHR1, es ist für den Mineralhaushalt sowie das normale Skelettwachstum relevant (Mannstadt, 1999; Rassow, 2012). Während es sich bei PTH um einen endokrinen Faktor handelt, ist PTHLP ein autokrines/parokrines Hormon, welches für die chondrale Knochenentwicklung sowie das Zusammenspiel von epithelialelem und mesenchymalem Gewebe während der Bildung der Brustdrüse (lat. *Glandula mamaria*) und Zähne (lat. *Dens*) verantwortlich ist (Cormier et al., 2003).

In der Zahnentwicklung ist der PTHR1 sowohl im benachbarten Mesenchym der Zahnanlage als auch im Alveolarknochen nachweisbar, wohingegen die Expression von PTHLH auf die Epithelschicht begrenzt ist (Calvi et al., 2004; Philbrick et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die für den Zahndurchbruch benötigte Alveolarknochenresorption nur bei funktionstüchtigem Zahnfollikel erfolgreich stattfinden kann. Gleiches gilt für die Osteosynthese, welche die aus der

Zahnwanderung resultierende Krypte im Kieferknochen von basal wieder auffüllt (Cahill & Marks, 1980; Cielinski et al., 1995; Craddock & Youngson, 2004; Marks et al., 1983; Wang & McCauley, 2011; Wise & Fan, 1989; Wise & King, 2008).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Roth et al. (2014) konnten mit ihrer Sequenzierungsanalyse von 70 PFE-Patienten insgesamt 30 Variationen des PTHR1 Genes isolieren, von denen zwölf heterozygote Varianten als pathogen klassifiziert wurden. Darüber hinaus wurden sechzehn Variationen entdeckt, welche noch nicht genauer klassifiziert sind und deren Einfluss auf die Krankheitsausprägung noch unbekannt ist. Bei den zwei verbleibenden Variationen handelt es sich um verbreitete Polymorphismen.

Die isolierte Variante W339* (1016G>A) mit einer Abbruchmutante von p.(Trp339*) wurde im Rahmen dieser Studie als pathogen klassifiziert. Zu den noch nicht genauer klassifizierten Varianten mit unklarer Auswirkung auf die Krankheitsausprägung zählt G452E (1355G>A) mit einem AS-Austausch von p.(Gly452Glu), einer *missense*-Mutation (Roth et al., 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit sollen elektrophysiologisch die Auswirkungen der Mutationen auf das Verhalten und die Funktionsfähigkeit des PTHR1 gezeigt werden, um so eine eventuelle Pathogenität von G452E (1355G>A) nachzuweisen.

Auch die bereits durch die Sequenzierungsergebnisse als pathogen klassifizierte Variante W339* (1016G>A) wird einer elektrophysiologischen Prüfung unterzogen.

Durch die Erzeugung einer neuen, nicht im Patientenkollektiv von Roth et al. vorgefundenen Mutante G452A (1355G>C) soll überprüft werden, ob sich durch die strukturelle Ähnlichkeit der substituierten AS die Funktion des PTHR1 wieder herstellen lässt.

Der Nachweis der Pathogenität von G452E (1355G>A) würde die Zuordnung von Patienten mit dieser Variation des PTHR1-Genes zum Kollektiv der PFE-Patienten erlauben. Dies hätte Auswirkungen auf die Therapie, da aufgrund der genetischen Analyse unnötige, nicht zielführende Therapieversuche unterlassen werden könnten. Dies würde dem Patienten wie auch dem Behandler viele zeitraubende und frustrierende Fehltherapien ersparen.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien, Puffer und Lösungen

2.1.1 Badlösung zur Aufbewahrung von Oozyten

Die Oozyten von *Xenopus laevis* (*X. laevis*) wurden in einer Badlösung aufbewahrt, deren Zusammensetzung der Extrazellularlösung von *X. laevis* entspricht (siehe Tabelle 1). Durch das Antibiotikum Gentamycin soll die Ansiedlung und das Wachstum von Bakterien und Pilzen während der Kultivierung verhindert werden. Das hinzugefügte Natriumpyruvat (NaPyr) ermöglicht die Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels der Oozyten.

Substanz	Menge [mM]
NaCl	96,0
KCl	2,0
CaCl ₂	1,8
MgCl ₂	1,0
HEPES	5,0
NaPyr	2,5
Gentamycin	100 µg/ml
Es wurde mit 1 M NaOH auf pH 7,4 titriert.	

Tabelle 1: Zusammensetzung der Badlösung ND96⁺

2.1.2 Messlösung

Da die Zusammensetzung von ND96 der Extrazellularflüssigkeit von *X. laevis* entspricht, wurde diese als Messlösung eingesetzt (siehe Tabelle 2). Die Zusammensetzung entspricht im Wesentlichen der Zusammensetzung der Badlösung. Bei der Verwendung als Messlösung wurde auf die Zugabe von Gentamycin und Natriumpyruvat verzichtet.

Substanz	Menge [mM]
NaCl	96,0
KCl	2,0
CaCl ₂	1,8
MgCl ₂	1,0
HEPES	5,0
Es wurde mit 1 M NaOH auf pH 7,4 titriert.	

Tabelle 2: Zusammensetzung von ND96

2.1.3 Waschlösung

Zum Vereinzeln der Oozyten wurde ND96 ohne Ca²⁺ (pH 7,4) zusammen mit Worthington Collagenase verwendet.

Substanz	Menge [mM]
NaCl	96,0
KCl	2,0
MgCl ₂	1,0
HEPES	5,0
Es wurde mit 1 M NaOH auf pH 7,4 titriert.	

Tabelle 3: Zusammensetzung von ND96-Ca²⁺

2.1.4 Parathormon

Um die Aktivität des Parathormonrezeptors zu testen, wurden 50 ml der Messlösung ND96 mit 0,1 mM PTH bis auf eine Endkonzentration von 100 nM versetzt. Zur homogenen Vermengung wurde die Mischung eine Minute (Min) mittels maschinellen Schüttelns vermengt.

2.1.5 5x MOPS Laufpuffer

Substanz	Menge
NaAc	3,28 g
MOPS	20,90 g
0,5 M EDTA (pH 8)	10,00 ml
DEPC-H ₂ O	800,00 ml
Es wurde auf 1 Liter aufgefüllt und ein pH-Wert von 7,0 eingestellt. Der Laufpuffer wurde steril filtriert und lichtgeschützt aufbewahrt.	

Tabelle 4: Zusammensetzung 5x MOPS Laufpuffer

2.1.6 Auftragspuffer

Substanz	Menge
1x MOPS Laufpuffer	
Formaldehyd	6,5%
Formamide	50,0%
Glycerol	5,0%
EDTA	0,1 mM
BPB	0,025%

Tabelle 5: Auftragspuffer

2.1.7 50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)

Substanz	Menge
Tris	121,00 g
Essigsäure, rein	28,55 ml
0,5 M EDTA	50,00 ml
Mit ddH ₂ O wurde auf 500 ml aufgefüllt und ein pH-Wert von 8,0 eingestellt.	

Tabelle 6: Zusammensetzung TAE 50x

2.1.8 TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)

Substanz	Menge [mM]
Tris pH 7,4	10,0
EDTA	1,0
Es wurde ein pH-Wert von 8 eingestellt.	

Tabelle 7: Zusammensetzung TE-Puffer

2.2 Nukleinsäuren

Für die Experimente wurden folgende Ionenkanäle der Spezies *Mus musculus* (m) und *Homo sapiens* (h) verwendet.

mTRESK NM_207261 pSGEM 51 c-DNA

rTASK1 pSGEM 29 c-DNA

PTHR1(WT) pSGEM 165

PTHR1(G452E) pSGEM 166

PTHR1(W339*) pSGEM 167

PTHR1(G452A) pSGEM 172

2.3 Oligonukleotide

Primer für die Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) von mTRESK:

Sense-Sequenz: 5'-ggggaaggccaggggatgc-3'

Antisense-Sequenz: 5'-agagcgctcaggaaggaccagt-3'

Größe 303 bp

Mutageneseprimer für die PTHR1-Mutante G452A:

Sense-Sequenz: 5'-cttcaactccttccaggcattttttgtcgcaatcat-3'

Antisense-Sequenz: 5'-atgattgcgacaaaaaatgcctggaaggagttgaag-3'

- dNTPs Deoxinucleotide Solution Set (New England BioLabs Inc., Ipswich, USA)
Bestellnummer: N0446S
- m7G(5')ppp(5') G-cap (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)
Bestellnummer: 10904988001
- Ribonucleoside triphosphate Set (Boehringer, Mannheim, Deutschland)
Bestellnummer: 1277057
- ssRNALadder (New England BioLabs Inc., Ipswich, USA) Bestellnummer: N0362S
- t-Plasmid-DNA (eurofins MWG operon, Ebersberg, Deutschland)

2.4 Enzyme

- Collagenase Typ 2 (Cell Systems Biotechnologie Vertrieb GmbH, Troisdorf, Deutschland) Bestellnummer:4177
- DNaseI recombinant (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)
Bestellnummer: 04716728001
- PfuTurbo DNA Polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA)
Bestellnummer: 600252
- Restriktionsenzym Dpn1 (New England BioLabs Inc., Ipswich, USA)
Bestellnummer: R0176S
- RNase Inhibitor (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)
Bestellnummer: 0335402001
- T7 RNA-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)
Bestellnummer: 10881775001

2.5 Antibiotika

- Ampicillin sodium salt (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA)
Bestellnummer: A-9518
- Gentamycin sulfate salt (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA)
Bestellnummer: G055000-1EA

2.6 Hormon

- Parathormon (PTH) (Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien) Bestellnummer: 411775

2.7 Verwendete Reaktionskits

- NucleoBond Xtra Midi 50 (Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren, Deutschland) Bestellnummer 740410.50
- NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren, Deutschland) Bestellnummer 740588.250
- QuikChange™ Mutagenese (Aligent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA) Bestellnummer: 200523
- RNeasy® MinElute™ Cleanup Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) Bestellnummer: 74204

2.8 Verwendete Lösungen und Chemikalien

- 3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA) Bestellnummer: M-1254BPB
- Bromphenolblau (USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA) Bestellnummer: 12370
- Calciumchloriddihydrate (CaCl₂) (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA) Bestellnummer: C3881
- Chloroform (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA) Bestellnummer: 32211
- Diethylpyrocarbonat (DEPC) (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA) Bestellnummer: D5758
- Ethanol (J.T. Baker, Center Valley, Pennsylvania, USA) Bestellnummer: 8006
- Ethidiumbromidlösung 0,025% (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) Bestellnummer: HP 47.1
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA) Bestellnummer: E5134
- Formaldehydesolution 37% (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA) Bestellnummer: 252549
- Formamid (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA) Bestellnummer: F-9037

- Glycerol (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA) Bestellnummer: G5516
- Guanosintriphosphat (GTP) (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA) Bestellnummer: G9002
- HEPES (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA) Bestellnummer: H3375
- Kaliumchlorid (KCl) (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA) Bestellnummer: P4504
- LB-Medium (Lennox) (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) Bestellnummer: X964.1
- LE-Agarose (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) Bestellnummer: 840004
- Magnesiumchloride (MgCl₂) (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA) Bestellnummer: M9272
- Midonigreen (Ethidiumbromid 0,025) (Nipon Genetics, Düren, Deutschland) Bestellnummer:MG 02
- Natriumacetat (NaAc) (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA) Bestellnummer: S8750
- Natriumchlorid (NaCl) (Riedel den Hean, Seelze, Deutschland) Bestellnummer: 31434
- Natriumpyruvat (NaPyr) (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA) Bestellnummer: P2256
- Roti Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Carl Roth GmbH Co KG, Karlsruhe, Deutschland) Bestellnummer: A 156.3
- Tris Base (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA) Bestellnummer: T1503

2.9 Verwendete Geräte

- ALA Scientific Instrument 12031041 (ALA Scientific Instruments, Inc., Farmingdale, New York, USA)
- Binokular Stemi SV11 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- Binokular Wild Heerbrugg 204946 (Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, Schweiz)
- Biofuge Pico (Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland)
- Brutschrank Memmert IPP 30 (Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland)
- Feinwaage Shinko Denshi Modell PF (Vibra Shinko Denshi Co., Ltd., Tokyo, Japan)

- Gelkammern (verschiedene) (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)
- Gene Quant pro RNA/DNA Calculator (Biochrom Ltd., Cambridge, Großbritannien)
- HEKA Sutter Instrument Co Model-97 (Novota, USA)
- Memmert Modell IPP 30 (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland)
- Multiimage TM Light Cabinet (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, Kalifornien, USA)
- Nanoliter 2010 (World Precision Instruments Inc., Sarasota, USA)
- pH-Meter Hanna HI991001 (Hanna Instruments, Inc., Woonsocket, Rhode Island, USA)
- Power Supply Consort E861 (Clever Scientific Ltd., Warwickshire, Großbritannien)
- Rotamax 120 (Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland)
- Schüttelbrutschrank Edmund Bühler Modell TH 15 (Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland)
- Schüttelbrutschrank Innova 4330 (New Brunswick Scientific, Hamburg, Deutschland)
- Sprout Minizentrifuge (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland)
- Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland).
- VortexGenie2 (Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York, USA)

2.10 Verbrauchsmaterial

- Deckgläschen 12 mm Hartenstein Bestellnummer: DKRO
- Elektrodenglas, GB150F-8P with Filament 0,86x1,5x80 mm (Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland)
- Elektrodenglas 3,5 Drummond #3-000-203-G/X Replacement Tubes (Schuett24 GmbH, Göttingen, Deutschland)
- Pasteurpipetten aus Glas (Brand, Wertheim, Deutschland) Bestellnummer: 747720
- Eppis verschieden Größen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- 12-Well-Platten Cellstar® (greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) Bestellnummer: 665180
- Pipettenspitzen verschiedene Größen und Ausführungen (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf und Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Pipetten 5-25 ml (greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)

- PCR SoftTubes (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Bestellnummer: 711080
- Falco Tube Cellstar® 50 ml (greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
Bestellnummer: 227261

2.11 Computerprogramme

- Macintosh Computer (Apple Inc., Cupertino, USA)
- Pulse/Pulsfit (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland)
- IGOR Pro 6.3 (Wavemetrics, Portland, USA)
- Statistica (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA)
- Microsoft Office Word und Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)

2.12 Molekularbiologische Methoden

2.12.1 Mutagenese

Um gezielt Mutationen in die bekannte PTH-Rezeptorsequenz einzubringen, wurde eine Mutagenese nach QuikChange™ Mutagenese Protokoll durchgeführt. Als Template diente t-Plasmid-DNA.

Durch die *pfu*-Polymerase können mittels PCR sequenzexakte DNA-Amplifikate erzielt werden.

Ansatz der Polymerisierungsreaktion:

5 µl 10x *pfu*-Polymerase Reaktionspuffer

x µl (20 bzw. 50ng) Template Plasmid-DNA

1,4 µl Mutagenese Primer #1 (10 pmol/µl)

1,4 µl Mutagenese Primer #2 (10 pmol/µl)

1 µl dNTPs (je 2,5 mM)

Mit ddH₂O wurde auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Dann wurde 1 µl *pfu*-Polymerase (2,5 U/µl) hinzugefügt und die Ansätze wurden zentrifugiert. Rechnerisch wurde die Menge an benötigter Template Plasmid-DNA ermittelt.

Folgende Temperaturzyklen wurden im Thermocycler angesetzt:

Einleitende Denaturierung 95 °C 1 Minute

16 Temperaturschleifen wie folgt:

Denaturierung 95 °C 30 Sekunden

Anlagerung 55 °C 1 Minute

Elongation 68 °C 10 Minuten (=2 Min/1 kb Plasmidlänge)

Nach abgeschlossener PCR wurden die Reaktionsansätze zum Verdau mit 1 µl Restriktionsenzym Dpn1 versetzt. Die Ansätze wurden vermengt und zentrifugiert und es erfolgte eine Inkubation im Brutschrank für eine Stunde bei 37 °C. Durch Dpn1 wurde spezifisch nur die Template Plasmid DNA verdaut. Es blieben die *in vitro* polymerisierten DNA-Stränge zurück.

Zur Transformation wurden 2 µl der verdauten Mutagenese-Ansätze in *E. coli* transformiert. Hierzu wurden kompetente *E. coli* Zellen in der log-Phase verwendet, in welcher eine exponentielle Vermehrung stattfindet und die Zelle die hinzugefügte DNA gut verwenden. 2 µl der DNA wurden zügig auf die Zellen pipettiert und vorsichtig gemischt.

Nach 30 Minuten Inkubationszeit auf Eis kamen die Ansätze für 45 Sekunden bei 42 °C in den Thermomixer. Es folgte die sofortige Lagerung auf Eis für eine Minute. Nach Zugabe von 400 µl LB-Medium ohne Antibiotikum wurden die Reaktionsgefäße für exakt eine Stunde im Schüttelbrutschrank geschüttelt.

Im Anschluss wurden für jede Mutante je ein Ansatz mit 100 µl bzw. 400 µl auf vorgewärmten Agar-Antibiotikaplatten (Ampicillin) ausgestrichen. Die umgedrehten Platten inkubierten bei 37 °C über Nacht im Dunkeln.

2.12.2 Picken von Mutantenkolonien

Mithilfe eines sterilen Zahnstochers wurde eine Kolonie aufgenommen, isoliert und in das vorbereitete Medium gegeben. Für das Medium wurden 4 µl Ampicillin mit 4 ml LB-Medium vermengt. Der Deckel des Reaktionsgefäßes wurde nicht vollständig verschlossen, sondern nur aufgelegt, damit ein Sauerstoffaustausch gewährleistet war. Es folgten 10 Stunden Inkubation im Schüttelbrutschrank.

2.12.3 Präparation von Plasmid DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Protokoll „Nucleon Spin® Plasmid: Isolation of high-copy plasmid DNA from *E.-Coli*“ der Firma Macherey-Nagel. Die heute als Standard geltende Minilysat-Methode wurde dabei angewandt, um Plasmid-DNA ohne Hydrathülle zu erzeugen.

Es wurden zweimal 1,5 ml der gesättigten *E. Coli*-LB-Kultur aus 2.12.2 in ein gemeinsames Reaktionsgefäß gegeben. Dieses wurde 30 Sekunden bei 11.000 Umdrehungen in der Minute (rpm) bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert.

Das Pellet wurde in 250 µl Buffer A1 gelöst. Nach anschließender Zugabe von 250 µl Buffer A2 wurde die Probe durch achtmaliges invertieren gut vermengt. Nach fünf Minuten Inkubationszeit bei RT folgte die Zugabe von 300 µl Buffer A3. Erneut wurde die Probe achtmal invertiert und im Anschluss fünf Minuten mit 11.000 rpm bei RT zentrifugiert.

750 µl des Überstands wurden auf ein NucleonSpin® Plasmid Column gegeben. Dieser wurde dann unter RT in einer Minute bei 11.000 rpm durch die Membran zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.

Nach Zugabe von 600 µl Buffer A4 auf die Membran wurde erneut eine Minute unter RT bei 11.000 rpm zentrifugiert und der durchgeflossene Überschuss entfernt. Durch zweiminütiges Zentrifugieren bei 11.000 rpm unter RT wurde die Membran getrocknet.

Die NucleonSpin® Plasmid Column wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert und mit 50 µl Buffer AE versetzt. Es erfolgte eine Inkubation für eine Minute bei RT und im Anschluss die abschließende Zentrifugation für eine Minute bei 11.000 rpm unter RT.

Die DNA befand sich nun im 1,5 ml Reaktionsgefäß.

2.12.4 Spektrale Konzentrationsbestimmung

Zur Vorbereitung für die spektrale Konzentrationsbestimmung mit dem Gene Quant pro RNA/DNA Calculator wurden die Proben mit DEPC-H₂O im Verhältnis 1:50 verdünnt. Nach Kalibrierung des Gerätes mit ddH₂O erfolgten die Messungen. Eventuell vorhandene Luftblasen wurden durch leichtes Aufstoßen des Messkörpers auf die Arbeitsplatte zuvor entfernt.

2.12.5 Midi Prep

Für die Midi Prep nach dem Protokoll von Macherey-Nagel GmbH & Co KG erfolgte das Anlegen einer Über-Tag-Kultur der Mutanten gefolgt von einer Über-Nacht-Kultur.

Das Medium für die Über-Tag-Kultur entstand durch Vermengen von 4 ml LB-Puffer mit 4 µl Ampicillin. Die Kultur wurden wie bereits unter 2.12.2 beschrieben mit einer Kolonie angeimpft und für sechs Stunden im Schüttelbrutschrank inkubiert.

Nach dieser Zeit wurde 1 ml der jeweils trübsten Über-Tag-Kultur in ein Medium aus 40 ml LB Puffer mit 40 µl Ampicillin gegeben. Das Becherglas wurde mit abgedeckter Öffnung über Nacht im Schüttelbrutschrank inkubiert.

Die Über-Nacht-Kultur wurde am nächsten Morgen in ein Falcon Tube überführt und zehn Minuten bei 4.000 rpm bei einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 8 ml RES mit RNase gelöst.

Nach Zugabe von 8 ml LYS folgte das fünfmalige Invertieren des Falcon. Die folgende Inkubationszeit betrug fünf Min bei RT. Das Hinzupipettieren von 8 ml NEU wurde gefolgt von 10- bis 15-maligem invertieren.

Zum Auffangen der Flüssigkeit beim Waschen der Säulen wurde ein großes Auffangbehältnis installiert. Die 12 ml EQU wurden langsam über den Filterrand hinzugefügt, nachdem die Säulen kurz zuvor noch dreimal invertiert worden waren.

Nach vollständigem Durchlauf der vorangegangenen Flüssigkeit wurden erneut 5 ml EQU auf die Filter gegeben. Im Anschluss wurden die Filter entfernt und entsorgt und die Säulen mit 8 ml WASH gewaschen. Die Elution erfolgte mit 5 ml ELU.

Zur gesammelten Flüssigkeit wurden 3,5 ml Isopropanol hinzugegeben und dann gemischt. Es folgte eine zweiminütige Inkubationszeit bei RT.

Nach 50 Min Zentrifugation mit 4.000 rpm bei 4 °C wurde der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde mit 2 ml 70%igem eiskaltem EtOH gewaschen. Der anschließenden zehnminütigen Zentrifugation mit 4.000 rpm bei 4 °C folgte die vorsichtige vollständige Entfernung des Überstandes. Das Pellet wurde 10 bis 15 Min luftgetrocknet bevor es in 500 µl TE gelöst wurde.

Für die folgende spektrale Konzentrationsbestimmung wurde eine fünfzigfache Verdünnung mit autoklaviertem H₂O erstellt.

2.12.6 *In vitro* Transkription von c-RNA für die Expression

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Transkripte wurden unter der Kontrolle der T7-Polymerase synthetisiert, mit deren Hilfe spezifisch die Protein-codierende cDNA-Sequenz hinter dem Promotor im Klonierungsvektor kloniert werden konnte. Die entsprechende RNA-Polymerase synthetisierte im Anschluss die gewünschte mRNA.

Für die Linearisierung wurde die klonierte DNA mit dem Restriktionsenzym *NheI* geschnitten. Der Linearisierungsansatz (100 µl) war wie folgt zusammengesetzt:

$$20 \mu\text{l DNA} + 5 \mu\text{l NheI} + 10 \mu\text{l Puffer 2} + 65 \mu\text{l DEPC} - \text{H}_2\text{O}$$

Es erfolgte die einstündige Inkubation bei 37 °C im Brutschrank. Durch Zugabe von Chloroformphenol wurde die Reaktion gestoppt. Auf das Durchmischen mittels mechanischem Schütteln folgte die fünfminütige Zentrifugation.

Um den Erfolg des Verdauens zu kontrollieren, wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Für die Herstellung des Agarosegels wurden 56 mg Agarose in 70 ml TAE Laufpuffer im Becherglas in der Mikrowelle unter gelegentlichem schwenken gelöst. Nach Zugabe von 2,8 µg Midonigreen folgte das luftblasenfreie Ausgießen des Agarosegels. Nach Einsetzen des Rechens wurde das Gel abgedeckt, um es vor Licht zu schützen.

Für das Gel zur Kontrolle des Verdauens wurden zu 2 µl der geschnittenen bzw. ungeschnittenen DNA, noch 2 µl Bromphenolblau-Puffer und 8 µl DEPC-H₂O hinzugegeben.

Nach dem Auftragen der Ansätze auf das Gel wurde dieses bei 120 mV für eine Stunde unter Lichtausschluss laufen gelassen.

Die obere Phase des Ansatzes wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur verbleibenden Phenolphase wurden 100 µl DEPC-H₂O hinzugefügt. Es folgte das erneute Vermengen und fünfminütige Zentrifugieren. Die Nachextraktion wurde zum bereits gesammelten Überstand hinzugefügt.

Durch Zugabe von 400 µl Chloroform, vermengen und erneut zentrifugieren wurde die DNA gereinigt. Es erfolgte die Abnahme des Überstands mit anschließender Volumenbestimmung.

Für die Lagerung bei -18 °C über Nacht wurde folgende Fällung angewendet:

$$\text{Überstand} + \frac{1}{10} \text{ Volumen NaAc} + (2,75 \times \text{Volumen}) \text{ Ethanol absolut}$$

Hierfür wurde 3 M NaAc mit einem pH von 5,2, sowie eiskaltes Ethanol (100%) verwendet.

Zu Beginn des zweiten Arbeitstages der *in vitro* Transkription erfolgte die dreißigminütige Zentrifugation der Fällungen. Nach dem Waschen der Ansätze mit 500 µl Ethanol (70%, kalt) erfolgte die nochmalige Zentrifugation für zehn Minuten. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Pellet durch Inkubation bei 40 °C mit offenem Deckel getrocknet.

Das getrocknete Pellet wurde in 25 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und gelöst. Es folgte die spektrale Konzentrationsbestimmung. Hierfür wurde eine 2%ige Verdünnung erzeugt.

Nach Bestimmung der Konzentration der DNA erfolgte die Mischung der Transkriptionsansätze. Hierfür wurde eine DNA-Konzentration von 300 µg benötigt. Die Bestimmung der Menge an benötigter DNA ergab sich rechnerisch, basierend auf den ermittelten DNA-Konzentrationswerten der Ansätze.

Substanz	Menge [µl]
DNA-Template	x
DEPC-H ₂ O	20-x
ATP (10mM)	5
CTP (10mM)	5
UTP (10mM)	5
GTP + m7 G (5')ppp(5')G-cap	5
10x Transkriptionspuffer	5
RNase-Inhibitor	2,5
RNA-Polymerase T7	2,5

Tabelle 8: Zusammensetzung der Transkriptionsansätze

Um die gewünschte Konzentration von 10 mM für die RNA-Nukleotide zu erzielen wurden diese im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Das von der Firma Roche Diagnostics GmbH bezogene 5' Ende mit Phosphorylierung und G-cap wurde vor der Verwendung mit 5 µl 10 mM GTP sowie 45 µl DEPC-H₂O vermengt.

Die zusammengestellten Transkriptionsansätze wurden vermengt und zentrifugiert. Es folgte die einstündige Inkubation bei 37 °C.

Anschließend wurden 5 µl DNase hinzugefügt und nach gründlichem Vermengen und Zentrifugieren erneut für 15 Minuten im 37 °C Brutschrank inkubiert.

Der Reaktionsstopp der Transkription erfolgte durch Zugabe von 200 µl Phenolchloroform. Die Transkripte wurden gemischt und nach fünfminütigem Zentrifugieren wurde der Überstand abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt. Zur Nachextraktion wurden 100 µl DEPC-H₂O zum Transkriptat gegeben, welches erneut gemischt und fünf Minuten zentrifugiert wurde. Nach Abnahme des Überstandes und Hinzufügen zum bereits gesammelten Überstand wurde die Menge des Überstandes bestimmt.

Für die Lagerung bei -18 °C über Nacht wurde erneut folgende Fällung angewendet:

$$\text{Überstand} + \frac{1}{10} \text{ Volumen NaAc} + (2,75 \times \text{Volumen}) \text{ Ethanol absolut}$$

Hierfür wurde 3 M NaAc mit einem pH von 5,2, sowie eiskaltes Ethanol absolut (100%) mit -18 °C verwendet.

Zu Beginn des dritten Arbeitstages der *in vitro* Transkription erfolgte die dreißigminütige Zentrifugation der Fällungen bei RT. Nach dem Waschen der Ansätze mit 200 µl Ethanol (70%, kalt) erfolgte erneut eine Zentrifugation für zehn Minuten. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Pellet bei 40 °C mit offenem Deckel getrocknet.

Das getrocknete Pellet wurde in 10 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und gelöst.

2.12.7 Aufreinigung der RNA

Zur Aufreinigung der in der *in vitro* Transkription erzeugten RNA wurde das RNeasy® MinElute™ Cleanup Kit der Firma Qiagen verwendet. Es erfolgte das Vorgehen entsprechend der Anleitung des Herstellers.

Die bei der *in vitro* Transkription erzeugte und in 10 µl RNase-freiem Wasser vorliegende RNA wurde durch Zugabe von weiteren 90 µl RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Es wurden 350 µl Buffer RLT hinzugefügt und der Ansatz gut vermischt. Zu der so verdünnten RNA wurden 250 µl kaltes Ethanol (100%) hinzugefügt und gut vermengt.

Der Ansatz wurde auf ein RNeasy® MinElute spin column gegeben, welches in einem 2 ml Reaktionsgefäß platziert worden war. Der Ansatz wurde für 15 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss entsorgt und das RNeasy® MinElute spin column in einem neuen Reaktionsgefäß platziert. Nach Zugabe von 500 µl Buffer RPE wurde der Ansatz erneut für 15 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert, um die Membran zu reinigen. Die durchgeflossene Flüssigkeit wurde verworfen.

Nach Zugabe von 500 µl 80%igem kaltem Ethanol wurde der Ansatz für zwei Minuten bei 10 000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Durchfluss wurde samt Reaktionsgefäß entsorgt. Das RNeasy® MinElute spin column wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert. Durch Zugabe von 14 µl RNase-freiem Wasser direkt auf die Membran wurde beim einminütigen Zentrifugieren auf Höchstgeschwindigkeit mit geschlossenem Deckel die RNA aus der Membran gelöst und befand sich daraufhin im Durchfluss.

2.12.8 Agarosegel zur Überprüfung der Transkription

Zum Abschluss der *in vitro* Transkription bzw. nach der Aufreinigung der RNA wurde ein Agarosegel zur Überprüfung durchgeführt.

Für das Agarosegel wurden 0,6 g analytischer Agarose abgewogen und mit Milipore auf 30 ml aufgefüllt. Unter Erhitzen und gelegentlichem Schwenken wurde die Agarose gelöst und anschließend bei 65 °C im Wasserbad gelagert.

Nach Zugabe von 8 ml 5x MOPS wurden unter dem Abzug 7 ml Formaldehyd (37%) hinzugefügt und zügig vermischt. Es folgte das luftblasenfreie Ausgießen des Agarosegels.

2.12.9 Ansätze für das Agarosegel

Zunächst wurde der Auftragspuffer (Tabelle 5) hergestellt. Hierfür wurden zum Auftragspufferaliquot 2 Tropfen Ethidiumbromid hinzugefügt.

Die Ansätze wurden wie folgt gemischt:

$$2 \mu\text{l RNA} + 8 \mu\text{l Auftragspuffer} = 10 \mu\text{l}$$

Des Weiteren wurde ein Ansatz mit RNA Marker wie folgt gemischt:

$$3 \mu\text{l RNA Marker} + 8 \mu\text{l Auftragspuffer} = 11 \mu\text{l}$$

Die Ansätze wurden anschließend für zehn Minuten im Thermomixer bei 65 °C inkubiert.

Nach Abschluss der zehn Minuten wurden die Ansätze auf das Gel aufgebracht und bei 80 mV für eine Stunde laufen gelassen.

2.13 Elektrophysiologische Methoden

2.13.1 *Xenopus laevis* als heterologes Expressionssystem

Die Verwendung von Oozyten des Modellorganismus *X. laevis* als Expressionssystem bietet viele Vorteile. Ein grundlegender liegt in der einfachen Gewinnung der selbigen. Ebenso ermöglicht ihrer Größe von 1,3-1,5 mm eine einfache Handhabung. Durch die große Anzahl an freien und gebundenen Ribosomen wird eine hohe Translationsrate erzielt. Hierdurch wird die Untersuchung von exogenen, über mRNA künstlich eingebrachten und dann eingebauten Proteinen wie z.B. Ionenkanälen begünstigt. Es liegt jedoch eine Latenzzeit von einem bis zu mehreren Tagen vor.

Durch Agonisten induzierte Stimulation können in den Oozyten sehr schnelle elektrische Antworten ausgelöst werden, welche abhängig sind vom Milieu in welchem sich die Oozyten befinden, ebenso wie vom Zustand der Oozyten. Oozyten im Stadium IV-V der Prophase, mit klar ausgeprägter animaler und vegetativer Hemisphäre, eignen sich besonders gut.

2.13.2 Vorbereitung der *Xenopus*-Oozyten

Die Operation von *X. laevis* Weibchen, sowie die Entnahme der Oozyten wurden von einem Mitglied der Arbeitsgruppe Wischmeyer durchgeführt.

Zur Aufreinigung der Oozyten wurden 0,04 g der Collagenase Typ 2 mit 20 ml ND96 ohne CaCl₂ vermenget. Das 50 ml Reaktionsgefäß wurde gut durchmischt bevor es in eine Petrischale entleert wurde. Der Überstand der Oozyten wurde abgekippt. Die Oozyten wurden in die Collagenase-Lösung hinzugegeben und die Petrischale auf dem Plattformschüttler für 2,5 bis 3 Stunden bei RT geschüttelt, bis sie defollikuliert und vereinzelt waren.

Zum Waschen der Oozyten wurde die Collagenase-Lösung mit einer 25 ml serologischen Pipette abgesaugt. Im Anschluss wurde frisches ND96-Ca²⁺ Waschlösung auf die Oozyten gegeben. Nach mehrmaligem Schwenken, wurde die Flüssigkeit erneut abgesaugt. Der Vorgang wurde viermal wiederholt. Beim fünften Waschen wurden die ND96⁺ Badlösung verwendet. Die Oozyten wurden in eine frische Petrischale überführt. Die Lagerung erfolgte im Brutschrank bei 19 °C.

2.13.3 Injektion von RNA

Zur Injektion der RNA in die wie oben beschrieben vorbereiteten Oozyten (siehe 2.13.2) wurden die RNAs zunächst in einem Gefäß vermenget, es erfolgte die Zusammenführung von je 1 µl mTRESK-RNA mit je 1 µl PTHR1-Mutanten-RNA. Vier Ansätze wurden vorbereitet: PTHR1-WT, PTHR1-Mutante G452E, PTHR1-Mutante W339* und PTHR1-Mutante G452A.

Die Kombinationen wurden gemischt und anschließend zentrifugiert. Die hergestellten Injektionspipetten (siehe 2.13.5) wurden mit Mineralöl gefüllt in den Nanoliter 2010 eingebracht. Hiermit wurde die RNA aufgesogen. Unter Verwendung des Stereomikroskops wurden die Oozyten manuell selektiert und nur Oozyten mit einem klar definierten Pol wurden zur Injektion herangezogen. Die RNA wurde durch vorsichtiges Einstechen in oberen Bereich der Oozyten injiziert. Pro Oozyte erfolgte eine Abgabe von 32,2 nl RNA.

2.13.4 Kultivierung der Oozyten

Nach erfolgter Injektion wurden die Oozyten mit Hilfe einer Glaspipette in 12-Well-Platten mit ND96⁺ Badlösung gegeben. Es erfolgte eine gleichmäßige Verteilung, sodass pro Vertiefung circa 10 Oozyten aufbewahrt wurden. Die Aufbewahrung erfolgte bis zum Tag der Messung im 19 °C Brutschrank.

Schadhafte oder geplatzte Oozyten wurden im Rahmen der visuellen Kontrolle aussortiert. Gegebenenfalls wurde das ND96⁺ mit NaPyr und Gentamycin, ausgetauscht.

2.13.5 Herstellung der Injektions- und Messpipetten

Die für die Injektion benötigten Pipetten wurden mit Hilfe des Gerätes HEKA Sutter Instrument Co Model-97 hergestellt. Dafür wurden die Glaskapillaren mit oben genanntem Gerät erhitzt und auseinander gezogen. Für die Messpipetten wurden analog die aus Borsilikat mit Filament bestehenden Röhrchen verwendet. Die so gewonnenen zwei Pipettenspitzen wurden mit einer Federschere unter dem Binokular eingekürzt. Der Durchmesser an der Spitze betrug dann 1-3 µm.

Vor Verwendung wurden die Injektionspipetten luftblasenfrei mit Mineralöl gefüllt, die Messpipetten wurden analog mit 3 M KCl gefüllt.

2.13.6 Ganzzellenableitung mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (Two-electrode-voltage clamp = TEVC) wurden sämtliche elektrophysiologischen Messungen dieser Arbeit durchgeführt.

Diese von Hodgkin et al (1952) weiterentwickelte Technik, basierend auf der Entwicklung von Marmont, Cole und Hodgkin et al. (1949), ermöglicht die Messung von Leitfähigkeit und Ionenströmen an elektrisch erregbaren Zellen. Die Ableitung des Stromes erfasst die gesamte Zellmembran und ermöglicht die Messung der auftretenden Ionenströme.

Für die Messung befand sich die Oozyte in einer ND96-Lösung, ebenso wie zwei Referenzelektroden. Nacheinander wurden eine Spannungselektrode und eine Stromelektrode auf die Membran aufgesetzt. Durch leichtes Klopfen auf die Halterung der Messelektrode wurde ein Einstechen in die Zellmembran herbeigeführt. Die

Spannungselektrode dient zur Messung des vorherrschenden Membranpotentials (Ist-Wert), während über die zweite Elektrode Spannung angelegt werden kann. Hierdurch wird das gewünschte Membranpotenzial (Soll-Wert) erreicht. So kann indirekt der Strom gemessen werden, welcher über die Zellmembran fließt. Er entspricht der Strommenge, die zur Aufrechterhaltung des Soll-Wertes benötigt wird. Mit der TEVC ist es möglich, sehr stabil den induzierten Strom über mehrere Minuten zu messen.

2.13.7 Aufbau des Messstandes

Der Messplatz für das TEVC befand sich auf einem schwingungsgedämpften Tisch und setzte sich aus den folgenden Geräten zusammen:

Ein Stereomikroskop, über welches das Einstechen der Elektroden in die Oozyten kontrolliert werden konnte, sowie zwei Mikromanipulatoren, welche die dreidimensionale Bewegung der Glaselektroden ermöglichten.

Des Weiteren Pipetten und eine Plexiglasschale mit Vertiefung zur Fixierung der zu messenden Oozyte sowie ein Perfusionssystem. Das Perfusionssystem erlaubte die Umspülung der Oozyte mit verschiedenen Lösungen und bestand aus 35 ml Spritzen, welche ND96 bzw. PTH enthielten. Durch den Drei-Wege-Hahn an der Spitze der Spritzen konnte der Abfluss aus dem Perfusionssystem geregelt werden. Polyethylen-Schläuche stellten die Verbindung zwischen Perfusionssystem und Messkammer dar. Um mechanische Irritationen der Oozyte zu vermeiden, betrug der Abstand zwischen Schlauchende und Oozyte fixationsbedingt circa 1 cm. Durch eine Pumpe wurde die überschüssige Flüssigkeit kontinuierlich abgesaugt. Als Verstärker wurde der TURBO TEC-10 C verwendet.

2.13.8 Messprotokoll

Alle Messungen erfolgten bei RT. Es wurden die folgenden Messprotokolle für die TEVC-Messung an *X. laevis* Oozyten verwendet:

Zu Beginn jeder Messung wurden Spannungsrampen (Rampen) gefahren, welche die Storm-Spannungsbeziehung darstellen (siehe Abbildung 1 A). Dazu wurde das Haltepotential innerhalb von 2000 ms kontinuierlich von einer Hyperpolarisation von -150 mV auf eine Depolarisation von 60 mV erhöht. Auf diese Weise konnte überprüft werden, ob der charakteristische TRESK-Strom vorhanden und ausreichend stark

exprimiert wurde, bevor die weiteren Messungen gestartet wurden. Bei ungenügender Expression wurde die Oozyte verworfen.

Es folgten einfache „Many Jumps“-Messungen (Maju), ausgehend von einem Haltepotenzial von -60 mV (siehe Abbildung 1 C). Hierbei wurden im Abstand von 3 s Messwerte bei +30 mV erhoben. Diese Messungen wurden unter Zugabe von ND96 begonnen. Nachdem sich stabile Messwerte eingependelt hatten, wurde für eine feste Zeitspanne PTH in der Konzentration 100 nM auf die Oozyte gegeben, der ND96 Zufluss wurde solange durch das Perfusionssystem unterbunden. Nach Beendigung der PTH-Zugabe erfolgte mit ND96 ein Auswaschen des zuvor zugefügten PTH.

Im Detail stellte sich der Messablauf wie folgt dar: Zu Beginn wurde je eine Rampen-Messung durchgeführt. Es folgte eine Maju-Messung, diese wurde zuerst für 30 s (20 Messwerte) unter Zugabe von ND96 durchgeführt. Es folgten 210 s (70 Messwerte) unter Zugabe von PTH. Die Messreihe wurde mit 360s (120 Messwerte) unter ND96 Zugabe abgeschlossen.

Es wurden ebenfalls Rampen unter der Zugabe von PTH angelegt, um das Vorhandensein des charakteristischen TRESK- Stromes zu überprüfen und die Aktivierung darzustellen. Auch nach erfolgreichem Auswaschen des PTH erfolgte die Ableitung von Rampen, um die Rückkehr zum Ausgangszustand darzustellen.

Dies geschah in folgender Reihenfolge: Nach 90 s (20 Messwerte) unter ND96 wurde die erste Rampen-Messung durchgeführt. Eine weiteren folgte nach 90 s unter PTH (30 Messwerte). Dies wurde nach 120 s (40 Messwerte) unter PTH sowie nach abschließender Zugabe von ND96 für 360 s (120 Messwerte) wiederholt.

Des Weiteren wurden IV-Messungen durchgeführt, welche die Strom-Spannungs-Beziehung darstellen (siehe Abbildung 1 B). Hierfür wurden die Oozyten ausgehend vom Haltepotenzial auf bestimmte Spannungsstufen geklemmt und für 500 ms gehalten. Diese erfolgten ebenfalls sowohl unter der Zugabe von ND96, als auch unter PTH wodurch ebenfalls die Aktivität abgeleitet werden konnte.

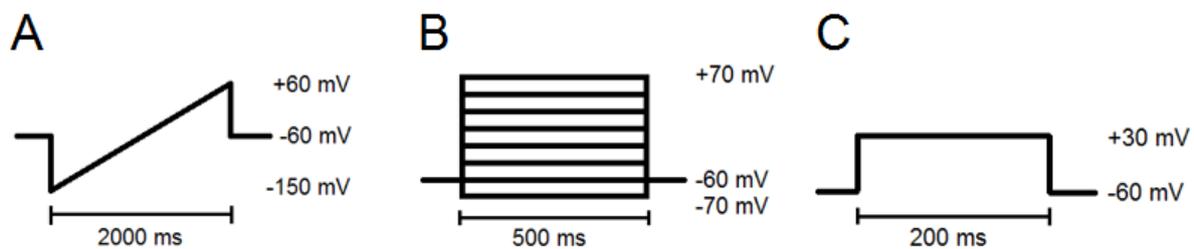


Abbildung 1: Elektrophysiologische Messprotokolle

(A) Rampen: Unter konstanter Potentialänderung wurden die Oozyten innerhalb von 2000 ms ausgehend von einer Hyperpolarisation von -150 mV auf +60 mV depolarisiert; (B) IV: Ausgehend vom Haltepotential wurden die Oozyten auf bestimmte Spannungsstufen geklemmt und für 500 ms gehalten. Es wurden 10 mV-Schritte von -70 mV bis +70 mV durchlaufen; (C) Maju: Ausgehend vom Haltepotential (-60 mV) wurde im 3-s-Abstand das Potenzial sprunghaft auf +30 mV erhöht.

2.14 Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung wurde als Ausgangswert (A) ein arithmetisches Mittel gewählt. Dieses wurde aus dem Wert zu Beginn der PTH-Zugabe (W2) und dem allerersten gemessenen Wert (W1) ermittelt. Auf diese Weise sollen schwankungsbedingte falsch hohe bzw. niedrige Werte ausgeglichen werden.

$$A = \frac{(W2 - W1)}{2}$$

Als Maximum (M) wurde stets der Wert angenommen, welcher 60 s nach Zugabe von PTH gemessen wurde, hierdurch sollten falsch positive Werte durch einzelne überschießende Werte verhindert werden.

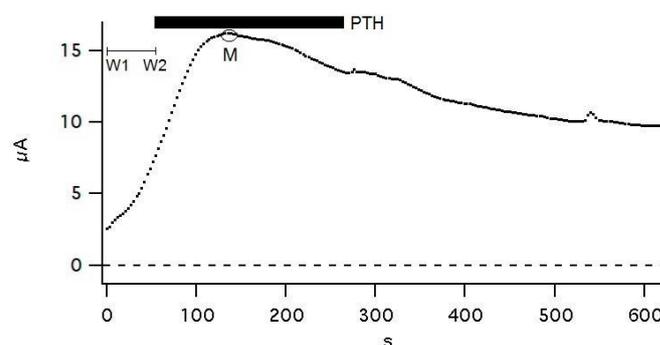


Abbildung 2: Definition der Messpunkte

Die Strecke setzt sich zusammen aus dem ersten gemessenen Wert (W1) und dem zu Beginn der PTH-Zugabe gemessenen Wert (W2). Das Maximum (M) ist durch einen Kreis markiert. Der schwarze dicke Balken gibt den Zeitraum der PTH-Zugabe an.

Die Aktivierung (AK) wurde ausgehend von A in Relation zu M ermittelt, selbiges gilt für die ermittelte prozentuale Veränderung (P).

$$AK = M - A$$

$$P = \frac{M}{A - 1}$$

Für die weitere statistische Auswertung wurde das Programm Statistica verwendet. Durch Anwendung des Kolomogorov-Smirnov-Tests wurde überprüft, ob eine Normalverteilung der Messwerte vorliegt. Wenn keine Normalverteilung vorlag, wurden im Anschluss der Kruskal-Wallis-Test sowie der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Kontrolle des Verdaus nach der *in vitro* Transkription

Aufgrund der unterschiedlichen Mobilität geladener Moleküle in einem homogenen elektrischen Feld kommt es zu unterschiedlicher Auftrennung der Moleküle in der Gelmatrix. Da die Ladungsdichte von Nukleinsäuren weitestgehend identisch ist, wirkt sich primär die Gesamtladung auf die Wanderungsgeschwindigkeit aus. Diese steht in direkter Relation zur Struktur und Größe des Moleküls.

Aufgrund der daraus resultierenden unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten von geschnittener und ungeschnittener DNA wurde dieses Prinzip nach durchgeführter *in vitro* Transkription zur Kontrolle des erfolgreichen Verdaus angewandt.

Die dafür angelegten Proben (siehe 2.12.6) wurden mit Bromphenolblau-Puffer versetzt, um in der abschließenden Untersuchung des Gels mittels Absorption die Banden sichtbar zu machen.

Abbildung 3 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Gelelektrophorese zur Verdaukontrolle. Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Verdaue wurden durch Gelelektrophorese kontrolliert.

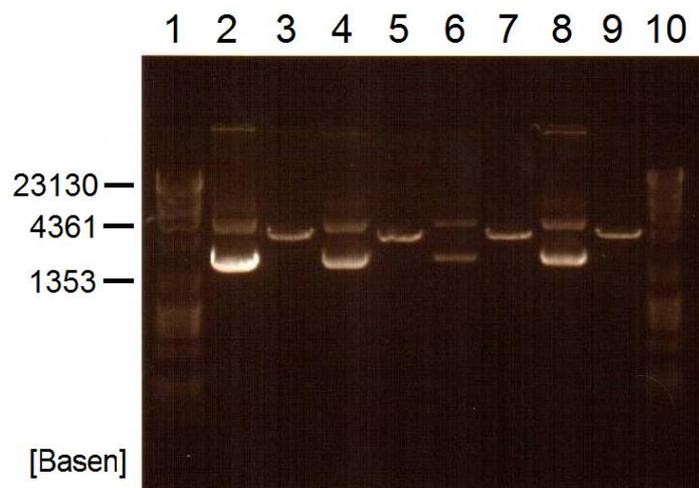


Abbildung 3: Agarose-Gel zur Kontrolle des Verdaus der DNA

Das Gel zeigt: DNA-Marker (1), PTHR1(WT) ungeschnitten (2), PTHR1 (WT) geschnitten (3), PTHR1 (W339*) ungeschnitten (4), PTHR1 (W339*) geschnitten (5), PTHR1 (G452E) ungeschnitten (6), PTHR1 (G452E) geschnitten (7), PTHR1 (G452A) ungeschnitten (8), PTHR1 (G452A) geschnitten (9), DNA-Marker (10).

Das Gel zeigt neben den zwei Banden für die DNA-Marker (siehe Abbildung 3 Nummer 1 und 10) die Banden der unterschiedlichen DNA-Ansätze des PTHR1-WT sowie der PTHR1-Mutanten.

Die jeweiligen geschnittenen Proben weisen exakt eine Bande auf die in ihrer zurückgelegten Laufstrecke aufgrund ihrer Größe, in allen Fällen hinter den Banden der ungeschnittenen Proben zurückbleibt.

Dies bestätigt den erfolgreichen Verdau der unterschiedlichen Ansätze, was in der Unterteilung der Bande aufgrund der unterschiedlichen Molekülgrößen deutlich wird.

Die entsprechende RNA-Polymerase synthetisierte im Anschluss an eine positiv ausgewertete Gelelektrophorese durch die weiteren Arbeitsschritte die gewünschte mRNA (siehe 2.12.6).

3.2 Gelelektrophorese zur Überprüfung der Transkription

Nach abgeschlossener *in vitro* Transkription wurde die erzeugte RNA mittels eines Reaktionskits gereinigt, bevor diese im weiteren Verlauf für die Injektion in die *X. laevis* Oozyten verwendet wurde. Um den Erfolg der *in vitro* Transkription sicherzustellen, erfolgte die Prüfung von Proben der aufgereinigten RNA mittels Gelelektrophorese.

Durch die Verdünnung der Proben mit einem ethidiumbromidhaltigen Auftragspuffer konnten die bei der Gelelektrophorese erzeugten Banden mittels Fluoreszenz sichtbar gemacht werden.

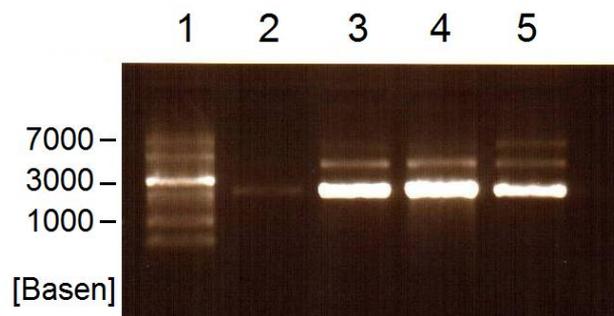


Abbildung 4: Agarose-Gel zur Überprüfung der *in vitro* Transkription nach RNeasy®

Von links nach rechts: RNA-Marker (1), PTHR1 (WT) (2), PTHR1 (W339*) (3), PTHR1 (G452E) (4), PTHR1 (G452A) (5)

Abbildung 4 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Gelelektrophorese mittels Agarosegel nach abgeschlossener *in vitro* Transkription mit angeschlossener Aufreinigung der RNA.

Durch den aufgebrauchten RNA-Marker (siehe Abbildung 4 Nummer 1) ist eine Größenbestimmung der Proben-RNA aufgrund der Lage der Bande möglich. Die Lage

der Banden entspricht der zu erwarteten Größe nach erfolgreich durchgeführter *in vitro* Transkription.

Die Stärke der Fluoreszenz lässt Rückschlüsse auf die Konzentration der aufgetragenen Proben zu. Während die Banden der Proben drei, vier und fünf stark fluoreszieren, ist dies bei der zweiten Probe schwächer ausgeprägt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Probe des PTHR1-WT (2) anteilig weniger RNA enthält als die Proben der Mutanten.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte separat mittels spektraler Konzentrationsbestimmung.

3.3 Spektrale Konzentrationsbestimmung

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten spektralen Konzentrationsbestimmungen dienten als Zwischenschritte für die verschiedenen durchgeführten molekularbiologischen Methoden (siehe 2.12). Hierzu erfolgte eine Verdünnung der Proben.

Die ermittelten Ergebnisse wurden im Anschluss unter anderem für die Berechnung der benötigten Menge an DNA für die Fortsetzung der *in vitro* Transkription herangezogen.

3.4 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Der Parathormonrezeptor1-Wildtyp und die drei unterschiedlichen Mutanten wurden zusammen mit TRESK in *X. laevis* Oozyten injiziert. Nach Expression wurden sie mit Hilfe von TEVC elektrophysiologisch untersucht. Hierfür wurden Rampen-, Maju- und IV-Messungen an insgesamt 62 Oozyten durchgeführt. Die unterschiedlichen Ergebnisse werden in den folgenden Unterkapiteln dargestellt.

3.4.1 Wirkung von Parathormon auf den PTHR1-Wildtyp

Um die Rolle des PTHR1 im Zusammenhang mit PFE genauer klären zu können, wurde der Rezeptor zusammen mit mTRESK in *X. laevis* Oozyten exprimiert um auf diesem Wege die elektrophysiologische Reaktion des G-Protein-gekoppelten Rezeptors auf die Zugabe von PTH zu untersuchen.

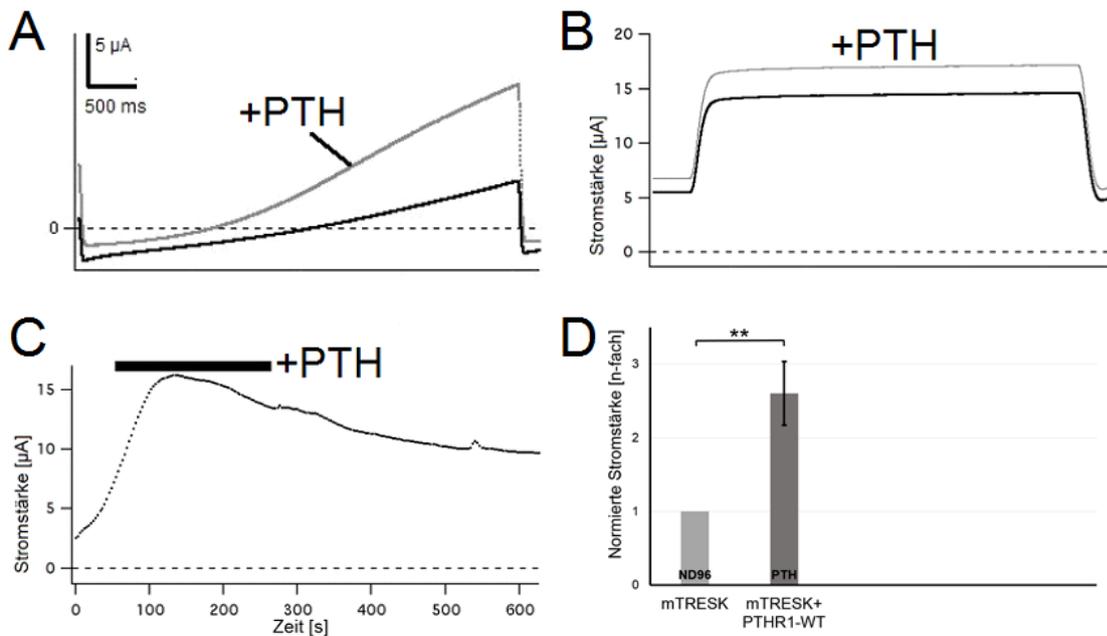


Abbildung 5: TEVC-Ableitungen von TRESK-Strömen mit PTHR1 Wildtyp

(A) Rampe von -150 bis +60 mV vor (schwarz) und nach Zugabe von 100 nM PTH (grau); (B) Spannungssprung nach +30 mV ausgehend vom Haltepotenzial (-60 mV) zeigt Aktivierung von TRESK, Verstärkung nach Zugabe von 100 nM PTH (grau); (C) Langzeitableitung (10 Min) zeigt den Zeitverlauf der verstärkten Aktivierung von TRESK durch PTH-Applikation; (D) Quantifizierung der PTH-induzierten TRESK-Ströme, hellgraue Säule unter ND96-Zugabe, dunkelgraue Säule unter PTH-Zugabe, der Querbalken gibt die Signifikanz an (n=17).

Bei TRESK handelt es sich um ein Mitglied der K_{2P} -Ionenkanalfamilie, welcher einen leichten auswärtsgerichtenden und spannungsunabhängigen Kaliumkanal darstellt (Kang et al., 2004; Sano et al., 2003). TRESK kann über einen G-Protein-gekoppelten Sieben-Helix-Rezeptor aktiviert werden. Dieser Effekt wurde bisher für muskarinische M3-Rezeptoren und für weitere an G_q -gekoppelte Rezeptoren beschrieben (Czirjak et al., 2004; Fink et al., 1996). Die Aktivierung über den G_q -Signalweg verursacht einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels sowie eine Dephosphorylierung des Kanals (Czirjak & Enyedi, 2006; Czirjak et al., 2004). Durch Zugabe von Agonisten des Rezeptors kann es zu einer vielfachen Erhöhung der TRESK-Strömen kommen (Enyedi et al., 2012).

Mittels TEVC wurden diese Ströme elektrophysiologisch untersucht. In diesem Rahmen wurden zuerst Rampen-Messungen (n=17) durchgeführt, mit welchen die erfolgreiche Expression von TRESK überprüft wurde.

Durch Erhöhung des Haltepotenzials von -150 mV auf 60 mV innerhalb von 2000 ms wurde eine charakteristische Spannungsrampe erzeugt, welche den auswärtsgerichteten Strom bei positivem Membranpotenzial zeigt. Dies ist exemplarisch in Abbildung 5 A dargestellt. Hier wurde sowohl der Ausgangszustand (schwarze Werte),

als auch der Zustand nach Zugabe von 100 nM PTH dargestellt (graue Werte). Es zeigt sich, dass es nach Zugabe von PTH zu einer starken Erhöhung des auswärtsgerichteten TRESK-Stromes kam. Die charakteristische Form des TRESK-Stromes blieb erhalten.

Auch nach Abschluss der Maju- und IV-Messungen (siehe unten) wurden weitere Rampen-Messungen (n=3) durchgeführt (Daten nicht dargestellt), auch hier blieb der typische TRESK-Strom erhalten und ging nach dem Auswaschen des PTH auf sein Ausgangsniveau zurück.

Die in Abbildung 5 B dargestellte IV-Messung (n=3) soll als Beispiel für die durchgeführte Untersuchung der Strom-Spannungs-Beziehung dienen, welche sowohl im nicht aktivierten Zustand unter Zugabe von ND96 (schwarze Werte) als auch im aktivierten Zustand unter 100 nM PTH (graue Werte) abgebildet ist. Hierbei ist ein klarer Anstieg der Messwerte zu verzeichnen.

Im weiteren Verlauf wurden Maju-Messungen (n=17) als Messprotokoll verwendet (siehe 2.13.8). Bei diesen Messungen wurde ausgehend vom Haltepotenzial (-60 mV), im 3-s-Abstand das Potenzial sprunghaft auf +30 mV erhöht. Dieses Potenzial wurde für 200 ms gehalten. Abbildung 5 C zeigt eine exemplarische Messkurve bei TRESK-Aktivierung unter Zugabe von 100 nM PTH sowie das Verhalten nach Unterbindung des PTH-Zuflusses und der erneuten Zugabe von ND96.

Bei der Messlösung ND96 handelt es sich um eine Flüssigkeit, deren Zusammensetzung der physiologischen Extrazellulärflüssigkeit von *X. laevis* entspricht.

In Abbildung 5 D ist die Aktivierung von TRESK mit PTHR1-WT unter Zugabe von 100 nM PTH im Vergleich zu TRESK unter ND96 in einem Säulendiagramm zusammengefasst. Es zeigt sich somit eine signifikante Verstärkung des auswärtsgerichteten Stromes unter PTH-Zugabe im Vergleich zu Messungen des Membranpotenzials in physiologischer Extrazellulärlösung.

Auch die Zeitkonstante der Aktivierung, welche mit Hilfe der IV-Messungen ermittelt wurde, bleibt erhalten (siehe Abbildung 5 B), was darauf schließen lässt, dass durch PTH selektiv der TRESK-Strom aktiviert wird. Auch bei Klemmung des Membranpotenziales auf +30 mV für längere Zeit zeigt sich nach der Applikation des Agonisten (100 nM PTH) eine Aktivierung des TRESK-Stromes über einen Zeitraum von circa 30 s. Die sich anschließende Inaktivierung unter ND96 beansprucht einen

wesentlich längeren Zeitraum. Nach Auswaschen des Agonisten kehrt der Auswärtsstrom auch nach 10 Minuten nicht vollständig auf das Ausgangsniveau zurück (siehe Abbildung 5 B).

Durch die Zugabe von PTH ist eine Aktivierung von TRESK zusammen mit PTHR1-WT um 260,47% (n=17, $p < 0,01$ Mann-Whitney-U-Test) ausgehend vom Ausgangszustand erzielt worden. Dies entspricht einer Steigerung um $6,95 \mu\text{A} \pm 1,74 \mu\text{A}$ bei einem Standardfehler von 43,25%. Nach Unterbindung des PTH-Zuflusses und Auswaschen des selbigen mit ND96 war ein klarer Rückgang der Messwerte auf Werte von $4,49 \mu\text{A} \pm 3,32 \mu\text{A}$ mit Annäherung an die Ausgangswerte (durchschnittlich $2,51 \mu\text{A} \pm 0,11 \mu\text{A}$) zu beobachten.

Dieses Experiment zeigt, dass der PTH-Rezeptor nicht nur an G_s -Proteine ankoppelt, sondern parallel auch über G_q -Proteine aktiviert werden kann, wie es auch für andere, vorwiegend G_q -gekoppelte Rezeptoren gezeigt werden konnte (Kollert, 2015).

3.4.2 Wirkung von Parathormon auf die PTHR1-Mutation G452E

Zur genaueren Klärung der Auswirkungen der PTHR1-Mutation G452E auf das Verhalten und die Funktionsfähigkeit des Rezeptors und den Nachweis einer möglichen Pathogenität, wurde die Rezeptormutation zusammen mit mTRESK in *X. laevis* Oozyten exprimiert und mittels TEVC elektrophysiologisch untersucht.

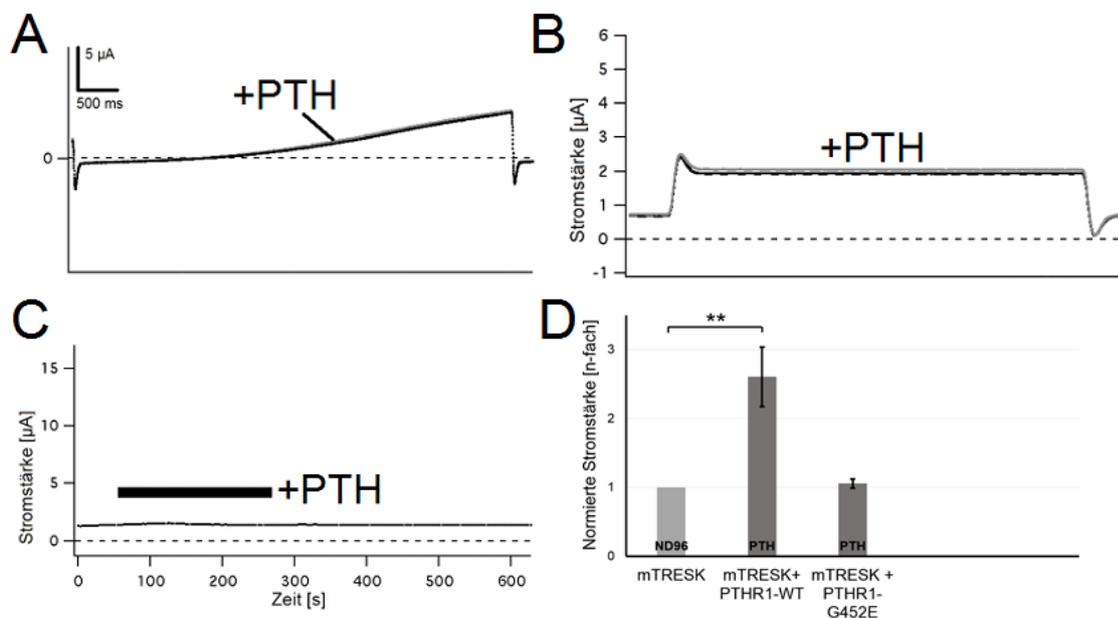


Abbildung 6: TEVC-Ableitungen von TRESK-Strömen mit PTHR1 G452E

(A) Rampe von -150 bis +60 mV vor (schwarz) und nach Zugabe von 100 nM PTH (grau); (B) Spannungssprung nach +30 mV ausgehend vom Haltepotenzial (-60 mV) zeigt keine Aktivierung von TRESK nach Zugabe von 100 nM PTH (grau); (C) Langzeitableitung (10 Min) zeigt den Zeitverlauf der Reaktion von TRESK nach PTH-Applikation; (D) Quantifizierung der PTH-induzierten TRESK-Ströme, hellgraue Säule unter ND96-Zugabe, dunkelgraue Säulen unter PTH-Zugabe, der Querbalken gibt die Signifikanz an (n=14).

Die im Rahmen der Studie von Roth et al. (2014) durchgeführte Sequenzierungsanalyse von 70 PFE-Patienten resultierte in der Isolierung von 30 Variationen des PTHR1-Rezeptors. Darunter befanden sich sechzehn Variationen, welche noch nicht genauer klassifiziert wurden und deren Einfluss auf das Krankheitsbild noch unbekannt ist. Zu diesen zählt G452E (1355G>A) mit einem AS-Austausch, eine *missense*-Mutation (Roth et al., 2014). Diese Mutation ist in der Transmembrandomäne der siebten Helix des G-Protein-gekoppelten Rezeptors lokalisiert.

Hierbei ist die mittlere Base des Tripletts 452 (Basensequenzstelle 1355) mutiert. Die Basensequenz des im WT vorkommenden Glycins (GGG, GGA, GGC oder GGU) wurde so verändert, dass anstelle der Base Guanin ein Adenin eingebaut wurde. Dies hatte die neue Basensequenz des Glutamat (GAG oder GAA) zur Folge.

Die ersetzte AS Glycin zeichnet sich durch ihre strukturelle Einfachheit, fehlende Seitenkette sowie ihr hydrophiles Verhalten aus. Im Vergleich dazu verfügt das Glutamat über eine lange Seitenkette, hat die doppelte molare Masse von Glycin und ist schlecht in Wasser löslich (Rassow, 2012).

Die primär durchgeführten Rampen-Messungen (n=14) zeigten durch die Ableitung der charakteristischen Spannungsrampe die Expression von TRESK und dienten als

Voraussetzung für die weiteren Messungen. Dieser auswärtsgerichtende Strom bei positivem Membranpotenzial ist exemplarisch in Abbildung 6 A dargestellt. Es erfolgte die Darstellung des Ausgangszustands (schwarze Werte), ebenso wie des Zustandes nach Zugabe von 100 nM PTH (graue Werte). Es zeigt sich, dass die Werte nach Zugabe von PTH kaum zu erkennen sind, da diese mit den Werten unter ND96 fast übereinstimmen, was sich auch im Erhalt der charakteristischen Form des TRESK-Stromes widerspiegelt.

Auch nach Abschluss der Maju- und IV-Messungen (siehe unten) wurde eine weitere Rampen-Messung (n=5) durchgeführt (Daten nicht dargestellt), auch hier blieb der typische TRESK-Strom erhalten und es zeigte sich keine Erhöhung der Werte.

Abbildung 6 B zeigt eine exemplarische IV-Messung (n=5). Auch hier sind aufgrund einer fehlenden Aktivitätssteigerung die Werte unter Zugabe von PTH (graue Werte) nicht signifikant verschieden zu den Werten unter physiologischem ND96 (schwarze Werte).

Zur weiteren Quantifizierung der Ergebnisse wurden Maju-Messungen (n=14) nach dem unter 2.13.8 beschriebenen Messprotokoll durchgeführt. Ein Ergebnis dieser Messungen ist exemplarisch in Abbildung 6 C dargestellt. Trotz der sprunghaften Erhöhung des Potenzials auf 30 mV, ausgehend vom Haltepotenzial (-60 mV), im Abstand von 3 s, welches dann für 200 ms gehalten wurde, zeigt die exemplarische Messkurve keine Steigerung der Messwerte unter der Zugabe von PTH (100 nM) für 210 s. Auch die anschließende Zugabe der physiologischen Messlösung ND96 führt nicht zu Änderungen.

Das Säulendiagramm in Abbildung 6 D stellt die Aktivität der PTHR1-Mutante G452E in Relation zu TRESK und TRESK mit PTHR1-WT unter Zugabe von 100 nM PTH dar. Es zeigt sich, dass es bei der Mutante G452E zu keiner signifikanten Verstärkung des auswärts-gerichteten Stromes unter PTH-Zugabe kommt.

Da auch im Falle von G452E die Zeitkonstante der Aktivierung, die durch die IV-Messungen gezeigt wurde, erhalten blieb (siehe Abbildung 6 B), ist davon auszugehen, dass der TRESK-Strom weiter vorliegt, aber aufgrund der Mutation im Rezeptor nicht aktiviert wird. In den durchgeführten Maju-Messungen zeigt sich trotz Applikation von PTH für 210 s keine Steigerung der Aktivität und die Werte bleiben auch in der folgenden Zeit bis zur Beendigung der Messung konstant im Bereich des Ausgangsniveaus (siehe Abbildung 6 C).

Die gemessene Amplitude weist durch die Zugabe von PTH eine prozentuale Veränderung der Aktivität von TRESK zusammen mit der PTHR1-Mutante G452E von 5,77% +/-6,56% (n=14, p>0,01 Mann-Whitney-U-Test) auf, was quantitativen Messwerten von 0,21 μA entspricht. Während der gesamten Messung werden ausgehend von Ausgangswerten im Bereich von 2,05 μA +/- 0,16 μA durchschnittlich maximal Werte von 2,15 μA +/-0,18 μA gemessen.

Dieses Experiment zeigt, dass es bei der PTHR1-Mutante G452E nicht zu einer Aktivierung unter der Zugabe von 100 nM PTH kommt, und der vorhandene TRESK Strom erhalten bleibt.

3.4.3 Wirkung von Parathormon auf die PTHR1-Mutation W339*

Um die Pathogenität dieser PTHR1-Variation auch auf elektrophysiologischer Ebene zu bestätigen wurde die PTHR1-Mutante W339* ebenfalls zusammen mit mTRESK in *X. laevis* Oozyten zur Expression gebracht und im Anschluss die Reaktion auf PTH-Zugabe untersucht.

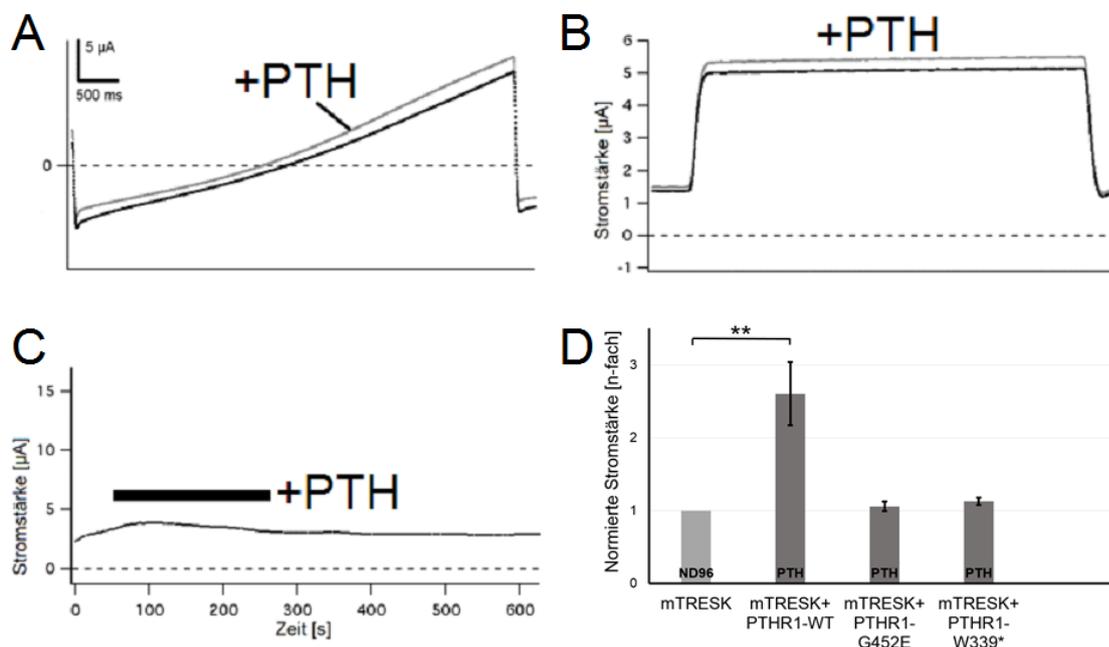


Abbildung 7: TEVC-Ableitungen von TRESK-Strömen mit PTHR1 W339*

(A) Rampe von -150 bis +60 mV vor (schwarz) und nach Zugabe von 100 nM PTH (grau); (B) Spannungssprung nach +30 mV ausgehend vom Haltepotenzial (-60 mV) zeigt kaum Aktivierung von TRESK nach Zugabe von 100 nM PTH (grau); (C) Langzeitableitung (10 min) zeigt den Zeitverlauf der Reaktion von TRESK auf PTH-Applikation; (D) Quantifizierung der PTH-induzierten TRESK-Ströme, hellgraue Säule unter ND96-Zugabe, dunkelgraue Säulen unter PTH-Zugabe, der Querbalken gibt die Signifikanz an (n= 13).

Zu den von Roth et al. (2014) isolierten pathogenen Variationen des PTHR1-Genes zählt die Variante W339*, bei welcher es zu einem AS-Austausch kommt. Aufgrund des Austauschs von Alanin zu Guanin an der Basensequenzstelle 1016 befindet sich an der zuvor für das Tryptophan (UGG) codierenden Stelle nun die Sequenz für einen Abbruch der Translation (UGA), der zu einem Abbruch des Peptids führt. Es handelt sich somit um eine *nonsense*-Mutation durch Einbau eines Stopcodons, welche auf einem einfachen AS-Austausch basiert. Diese Mutation liegt ebenfalls in der Transmembrandomäne einer Helix vor. Allerdings nicht wie G452E in der siebten Helix sondern bereits in der vierten Helix des G-Protein-gekoppelten Rezeptors mit seinen insgesamt sieben Transmembrandomänen.

Um die Pathogenität dieser Variation auch auf elektrophysiologischer Ebene zu bestätigen, wurde die PTHR1-Mutante W339* ebenfalls zusammen mit mTRESK in *X. laevis* Oozyten zur Expression gebracht, um im Anschluss die Reaktion auf die PTH-Zugabe zu untersuchen.

Nach den einleitend durchgeführten Rampen-Messungen (n=13) mit Ableitung der für TRESK-Ströme charakteristischen Ströme (siehe exemplarisch Abbildung 7 A) wurde deutlich, dass es auch bei der PTHR1-Mutante W339* zu keiner Aktivitätssteigerung kam.

Unter Erhalt der typischen Spannungsrampe zeigt sich kaum ein Unterschied zwischen den schwarzen Ausgangswerten und den unter Zugabe von 100 nM PTH ermittelten grauen Werten. Der auswärts-gerichtete TRESK-Strom blieb nahezu konstant.

Die nicht dargestellten Rampen-Messungen nach Abschluss der erfolgreich durchgeführten Maju- und IV-Messungen (n=3) zeigten ebenfalls charakteristische TRESK-Ströme ohne gesteigerte Aktivität.

Die Überprüfung der Strom-Spannungs-Beziehung wurde auch bei dieser Variante der PTHR1-Mutation mit Hilfe von IV-Messungen (n=3) durchgeführt. Die Abbildung 7 B stellt sowohl den Zustand unter physiologischer Messlösung ND96 (schwarze Werte) wie auch den Zustand unter Zugabe von PTH 100 nM (graue Werte) für 210 s dar. Es ist ein leichter, nicht signifikanter Anstieg der Aktivität unter PTH-Zugabe im Vergleich zum Ausgangszustand im physiologischen Milieu zu verzeichnen.

Die im weiteren Verlauf des Messprotokolls (siehe 2.13.8) durchgeführten Maju-Messungen (n=13) zeigen bei der sprunghaften Erhöhung des Potentials auf +30 mV

im 3-s-Abstand, eine nicht signifikante Reaktion der PTHR1-Mutante W339* auf die Zugabe von PTH (100 nM). Eine exemplarische Messkurve ist mit Abbildung 7 C gegeben. Hier ist auch ersichtlich, dass es nach einem nicht signifikanten Anstieg der Messwerte zu einem schnellen Rückgang auf das Ausgangsniveau kommt. Die sich der 210 s langen PTH-Zugabe anschließende Auswaschung mit der physiologischen Messlösung ND96 zeigt konstant Werte im Bereich der Ausgangswerte.

Abbildung 7 D stellt in einem Säulendiagramm die ermittelten Werte der als pathogen klassifizierten PTHR1-Mutante W339* (Roth et al., 2014), dem PTHR1-WT sowie der noch nicht genauer klassifizierten PTHR1-Mutante G452E gegenüber. Im Vergleich zu G452E liegt bei W339* eine leicht gesteigerte Aktivität des auswärtsgerichteten Stromes unter PTH-Zugabe vor. In Relation zu den von PTHR1-WT unter PTH-Zugabe erzielten Werten, wird die beobachtete Aktivität der PTHR1-Mutante W339* relativiert.

Durch die IV-Messungen (siehe Abbildung 7 B) kann bestätigt werden, dass die Zeitkonstante der Aktivierung erhalten bleibt, was den Schluss zulässt, dass der durch PTH selektiv aktivierte TRESK-Strom auch bei der PTHR1-Mutante W339* vorhanden ist.

Bei der Klemmung des Membranpotenziales für längere Zeit auf +30 mV (siehe Abbildung 7 C) ist nach Applikation von PTH (100 nM) eine nicht signifikante Aktivierung zu verzeichnen, welche jedoch durch ND96 sehr schnell inaktiviert wird und im Anschluss konstant niedrige Messwerte liefert.

Durch die Zugabe von PTH ist eine Änderung der Aktivität von TRESK zusammen mit der PTHR1-Mutante W339* um 12,54% \pm 5,09% (n=13, p>0,01 Mann-Whitney-U-Test) erzielt worden. Die gemessenen Werte lagen ausgehend von den durchschnittlichen Ausgangswerten von 1,92 μ A \pm 0,15 μ A im Mittel über alle durchgeführten Messungen maximal bei 2,15 μ A \pm 0,15 μ A. Zum Abschluss der Messung wurden durchschnittliche Werte im Bereich von 1,84 μ A \pm 1,89 μ A gemessen.

Diese Messreihe zeigt, ebenso wie die vorangegangenen, die Kopplung der PTHR1-Mutante an den TRESK-Kanal. Die ermittelten Messwerte bestärken die von Roth et al. vorgenommene Zuordnung der PTHR1-Mutante W339* zu den für PFE pathogenen Gen-Variationen.

3.4.4 Wirkung von Parathormon auf die PTHR1-Mutation G452A

Als Kontrolle zu den erfolgten Messungen der im Patientenkollektiv der PFE-Patienten isolierten PTHR1-Mutante G452E, wurde die PTHR1-Mutante G452A erzeugt und auf elektrophysiologischer Ebene mittels Expression von mTRESK zusammen mit der Mutante in *X. laevis* Oozyten zur Expression gebracht, um im Anschluss die Reaktion auf PTH-Zugabe zu untersuchen.

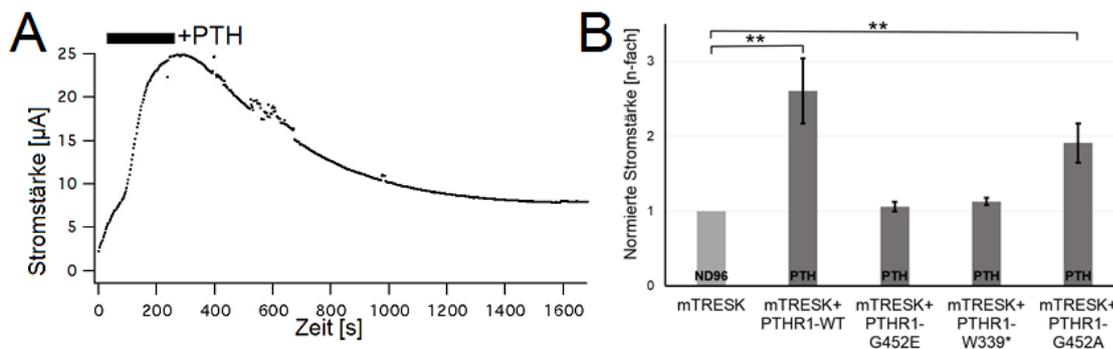


Abbildung 8: TEVC-Ableitungen von TRESK-Strömen mit PTHR1 G452A

(A) Langzeitableitung (27 Min) zeigt den Zeitverlauf der verstärkten Aktivierung von TRESK durch PTH-Applikation; (B) Quantifizierung der PTH-induzierten TRESK-Ströme, hellgraue Säule unter ND96-Zugabe, dunkelgraue Säulen unter PTH-Zugabe, der Querbalken gibt die Signifikanz an (n=18).

Bei der PTHR1-Mutante G452A handelt es sich nicht um eine von Roth et al. isolierte Mutante, diese Mutation wurde ausschließlich im Labor erzeugt und bisher nicht im Kollektiv der PFE-Patienten nachgewiesen.

Nach erfolgreicher Durchführung von Messungen der PTHR1-Mutante G452E mit den unter 3.4.2 beschriebenen Ergebnissen, stellte sich die Frage, in wieweit der Austausch einer einzelnen AS an der AS-Sequenzstelle 452 im PTHR1 die Funktionalität des PTHR1-Rezeptors beeinflussen kann und ob durch diesen AS-Austausch die Funktionalität des PTHR1-WT wieder hergestellt werden kann.

Mit Hilfe der Mutagenese wurde deshalb ein AS-Austausch an der AS-Sequenzstelle 452 in der siebten Transmembrandomäne des PTHR1 vorgenommen, sodass im Gegensatz zum natürlich vorkommenden Glycin nunmehr ein Alanin eingebaut wurde.

Die Mutation fand an der mittleren Base des Triplets 452 statt (Basensequenzstelle 1355). Hierbei wurde die Basensequenz des Glycins (GGG, GGA, GGC oder GGU) so verändert, dass anstelle der Base Guanin ein Cytosin eingebaut wurde. Dies hatte die neue Basensequenz des Alanin (GCG, GCA, GCC oder GCU) zur Folge.

Während die ersetzte AS Glycin keine Seitenkette vorzuweisen hat, verfügt das durch die Mutation eingebaute nicht-essenzielle Alanin über eine kurze Seitenkette und ein

chirales Zentrum. Sie ist darüber hinaus genauso wie das Glycin gut in Wasser löslich (Rassow, 2012). Im Vergleich zu dem Glutamat, welches bei G452E eingebaut wurde, liegt hier ein nicht so großer Unterschied zwischen den eingebauten AS vor.

Um nun die Auswirkungen dieser künstlich geschaffenen Mutation auf das Verhalten und die Funktionalität des PTHR1 zu untersuchen, wurde die Mutante in *X. laevis* Oozyten zur Expression gebracht, welche mithilfe von Rampen-Messungen (n=18) überprüft wurde.

Durch Erhöhung des Haltepotenzials von -150 mV auf 60 mV innerhalb von 2000 ms wurde eine charakteristische Spannungsrampe erzeugt, welche den auswärtsgerichteten Strom bei positivem Membranpotenzial zeigt (Daten nicht dargestellt). Es ist eine leichte Erhöhung des auswärtsgerichteten TRESK-Stromes unter Zugabe von PTH nachzuweisen.

Auch nach Abschluss der Maju- und IV-Messungen (siehe unten) wurde eine weitere Rampen-Messung (n=7) durchgeführt (Daten nicht dargestellt), auch hier blieb der typische TRESK-Strom erhalten und ging nach dem Auswaschen des PTH auf sein Ausgangsniveau zurück.

Nach dem unter 2.13.8 beschriebenen Messprotokoll wurden die Maju-Messungen (n=18) durchgeführt. Abbildung 8 A zeigt exemplarisch ein Ergebnis dieser Messungen, hierbei wird ein Anstieg der Messwerte zum Zeitpunkt der Zugabe von 100 nM PTH ersichtlich, der nach Unterbindung des PTH-Zuflusses und anschließender Zugabe der physiologischen Messlösung ND96 in einem erneuten Absinken der Messwerte resultiert. Diese Messung dauerte insgesamt 1600 s, wobei für 210 s PTH (100 nM) zugegeben wurde.

Das Säulendiagramm in Abbildung 8 B stellt die ermittelten Aktivierungen unter Zugabe von 100 nM PTH des PTHR1-WT und der unterschiedlichen PTHR1-Mutationen anschaulich gegenüber. Hier zeigt sich bei der PTHR1-Mutante G452A im Vergleich zur im Patientenkollektiv der PFE-Patienten vorkommenden Variante G452E eine deutliche Steigerung der Aktivierung. Im Vergleich zum PTHR1-WT fällt diese jedoch geringer aus. Von den drei getesteten PTHR1-Mutanten stellt G452A diejenige mit der größten Aktivierung dar.

Durch die Zugabe von PTH ist eine Aktivierung von TRESK zusammen mit der PTHR1-Mutante G452A von durchschnittlich 91,02% (n=18, $p < 0,01$ Mann-Whitney-U-Test) erzielt worden. Der Standardfehler der Aktivierung lag bei $\pm 26,17\%$. Die maximalen

gemessenen Werte zum Zeitpunkt M (siehe Abbildung 2) lagen im Rahmen von $8,48 \mu\text{A} \pm 0,37 \mu\text{A}$. Nach Unterbindung des PTH-Zuflusses und Auswaschen mit ND96 war ein klarer Rückgang der Messwerte auf Werte von $5,24 \mu\text{A} \pm 3,02 \mu\text{A}$ mit einer Annäherung an die Ausgangswerte (durchschnittlich $4,61 \mu\text{A} \pm 0,16 \mu\text{A}$) zu beobachten.

3.4.5 Zusammenfassung der TEVC-Messungen mit TRESK und PTHR1

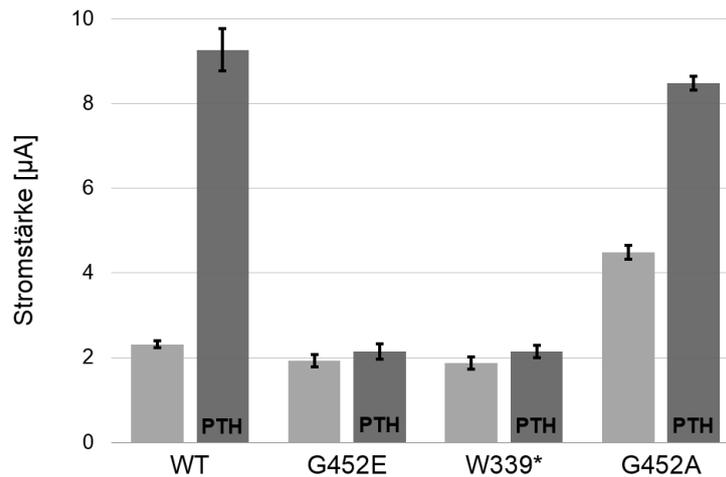


Abbildung 9 Zusammenfassung der Aktivierung von TRESK mit PTHR1

Die hellen Säulen geben je die durchschnittliche Aktivität unter ND96 zu Beginn der Messung an, bei den dunklen Säulen handelt es sich um die durchschnittliche Aktivität nach Zugabe von PTH zum Zeitpunkt M (siehe Abbildung 2). Die Standardfehler sind durch die dünnen Balken abgebildet (n=62).

Die obenstehende Abbildung 9 fasst noch einmal die in den vorangegangenen Abschnitten dargestellten Ergebnisse zusammen. Handelte es sich in den bisherigen Abbildungen zur Aktivierung immer um die Darstellung des n-fachen Wertes im Vergleich zu mTRESK, so sind hier die bei den Messungen erzielten Stromstärken [μA] dargestellt.

Die Säulen sind paarweise angeordnet, wobei jedes Säulenpaar für eine Variante des PTHR1 steht. Die linke helle Säule gibt den jeweiligen durchschnittlichen gemessenen Wert zum Zeitpunkt A (siehe Abbildung 2) unter Zugabe des physiologischen ND96 an. Durch die rechte dunkle Säule werden die im weiteren Verlauf der Maju-Messungen erzielten Messwerte zum Zeitpunkt M (siehe Abbildung 2) unter Zugabe von 100 nM PTH verdeutlicht. Der jeweils zugehörige Standardfehler ist durch den dünnen Balken am oberen Ende der Säule angegeben.

Bei dem Vergleich der Ausgangswerte unter ND96 fällt auf, dass diese für die im Patientenkollektiv der PFE-Patienten vorkommenden Variationen wie den PTHR1-WT

und die PTHR1-Mutanten G452E sowie W339* auf einem ähnlichen Niveau im Bereich von 1,88 bis 2,31 μA liegen. Nur die zur Kontrolle erzeugte PTHR1-Mutante G452A weist deutlich höhere Stromstärken im Bereich von 4,49 μA \pm 0,16 μA auf. Die Standardfehler dieser Ausgangsmesswerte liegen bei allen PTHR1-Mutanten im Bereich von 0,14 bis 0,16 μA , wohingegen der PTHR1-WT mit 0,08 μA einen fast 50% niedrigeren Standardfehler vorzuweisen hat. Somit weisen die im Patientenkollektiv vorkommenden Variationen im angewandten Expressionssystem ein analoges Ausgangsverhalten bezüglich ihrer Stromstärken auf.

Bei Betrachtung der unter Zugabe von 100 nM PTH erzielten Werte der Maju-Messungen fallen sofort große Unterschiede zwischen PTHR1-WT und den natürlichen PTHR1-Mutanten G452E und W339* auf. Die PTHR1-Mutante G452A, welche nicht im Patientenkollektiv isoliert wurde, besticht durch ein abweichendes Verhalten im Vergleich zu den anderen Mutanten. Das Expressionssystem mit Koexpression des zu überprüfenden Rezeptors zusammen mit dem Ionenkanal mTRESK zeigt, dass ihr Verhalten dem des PTHR1-WT entspricht.

Durch den Kolmogorov-Smirnov-Test wurden die ermittelten Daten auf Normalverteilung überprüft, hierbei wurden sowohl für die PTHR1-WT-Messungen ($n=17$) als auch für die Messungen der unterschiedlichen PTHR1-Mutanten ($n\geq 13$) Werte von $p\leq 0,05$ ermittelt. Bei einem p -Wert $\leq 0,05$ kann nicht von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden.

Mit dem Kruskal-Wallis-Test wurde aufgrund der fehlenden Normalverteilung ein gleichzeitiger Vergleich aller vier Gruppen bezüglich der Signifikanz durchgeführt. Es wurde ein Ergebnis von $p<0,01$ erzielt was hoch signifikant belegt, dass sich die Gruppen unterscheiden.

Die Betrachtung der paarigen Säulen des PTHR1-WT im Vergleich zu den anderen drei Säulenpaaren verdeutlicht, dass es sich hierbei um das Säulenpaar mit der stärksten Veränderung der Stromstärke handelt. Dies zeigt sich auch in den experimentell erzielten Werten. Die zum Zeitpunkt M gemessenen maximalen Werte lagen im Bereich von 9,27 μA \pm 0,50 μA . Diese stehen den niedrigen Ausgangswerten von 2,32 μA \pm 0,08 μA gegenüber. Wie unter 3.4.1 bereits dargestellt, werden nach Unterbindung der Zugabe von PTH und Auswaschen des selbigen mit ND96 für 360 s zum Abschluss der Maju-Messungen wieder Werte im Bereich von 4,49 μA \pm 3,32 μA erzielt, was einer Annäherung an die Ausgangswerte deutlich macht; diese werden jedoch nicht ganz erreicht.

Im Vergleich dazu ist die Änderung der Säulen der von Roth et al. im Patientenkollektiv isolierten PTHR1-Mutante G452E deutlich geringer. Bei dieser noch nicht genauer klassifizierten Variante mit unklarer Auswirkung auf die Krankheitsausprägung konnte lediglich eine Aktivitätsänderung um $0,22 \mu\text{A}$ ermittelt werden, wobei der Standardfehler bei $\pm 0,22 \mu\text{A}$ lag. Die maximal gemessenen Werte zum Zeitpunkt M lagen hier bei $2,15 \mu\text{A} \pm 0,18 \mu\text{A}$, was noch unter dem Niveau der Ausgangswerte des PTHR1-WT lag. Zum Ende der Maju-Messungen wurden Werte von $1,86 \mu\text{A} \pm 1,84 \mu\text{A}$ erzielt. Dies verdeutlicht die signifikante Auswirkung der *missense*-Mutation, welche die Funktionsfähigkeit des PTHR1, durch Einbau eines Glutamat unterbindet.

Ein ähnliches Verhalten zeigte auch die von Roth et al. im Patientenkollektiv isolierte und als pathogen klassifizierte PTHR1-Mutante W339*. Hier lag eine durchschnittliche Aktivitätsänderung von $0,22 \mu\text{A}$ vor, wobei sich der Standardfehler auf $0,11 \mu\text{A}$ belief. Ausgehend vom ermittelten durchschnittlichen Ausgangswert zum Zeitpunkt A von $1,88 \mu\text{A} \pm 0,14 \mu\text{A}$ wurden im weiteren Verlauf der Messungen maximal Werte von $2,15 \mu\text{A} \pm 0,15 \mu\text{A}$ erhoben. Der letzte erhobene Messwert, nach erfolgter Auswaschung des zuvor zugegebenen PTH durch Zugabe von ND96 für 360 s, lag im Bereich von $1,84 \mu\text{A} \pm 1,89 \mu\text{A}$, was wie bereits bei der PTHR1-Mutante G452E beobachtet, unter dem Ausgangsniveau der Messreihe lag. Diese Werte verdeutlichen, dass resultierend aus dem Einbau eines Stopcodons die Funktion des PTHR1 nicht mehr aufrechterhalten werden kann.

Im Vergleich dazu weist die künstlich erzeugte PTHR1-Mutante G452A, welche nicht bei PFE-Patienten isoliert wurde, ein interessante Reaktion auf die Zugabe von 100 nM PTH auf. Ausgehend von Messwerten im Bereich von $4,49 \mu\text{A} \pm 0,16 \mu\text{A}$ werden unter der Zugabe von PTH im weiteren Verlauf steigende Werte erfasst. Diese beliefen sich zum Zeitpunkt M auf maximale Werte von bis zu $8,48 \mu\text{A} \pm 0,37 \mu\text{A}$, was einer Aktivitätsänderung um $3,98 \mu\text{A} \pm 1,23 \mu\text{A}$ entspricht. Im Vergleich zum PTHR1-WT werden also, was die Stromstärke betrifft, ähnlich hohe Werte erzielt. Zum Vergleich, beim PTHR1-WT lagen die maximalen Werte bei $9,27 \mu\text{A} \pm 0,50 \mu\text{A}$. Bei Betrachtung der ermittelten Abschlussmesswerte nach erfolgter Auswaschung des PTH durch Zugabe von ND96 wird deutlich, dass sich diese mit $5,24 \mu\text{A} \pm 3,03 \mu\text{A}$ wieder den ermittelten Ausgangswerten annähern, das Ausgangsniveau von $4,49 \mu\text{A} \pm 0,16 \mu\text{A}$ jedoch nicht ganz erreichen. Dies verdeutlicht, dass es aufgrund der durchgeführten Mutation wieder zu einer Funktionsfähigkeit des Rezeptors kommt und die Aktivitätssteigerung aufgrund der PTH-Zugabe reversibel ist.

Nach Betrachtung des Verhaltens der verschiedenen PTHR1-Mutanten und des PTHR1-WT wird deutlich, dass sich zwei Gruppen mit unterschiedlichen Reaktionen auf die Zugabe von 100 nM PTH bilden lassen. Dies wären zum einen die beim Patienten nachgewiesenen PTHR1-Mutanten G452E und W339*, zum anderen der PTHR1-WT und die künstlich erzeugten PTHR1-Mutante G452A.

Der Vergleich der PTHR1-Mutanten G452E mit der PTHR1-Mutante W339* verdeutlicht, dass sie nicht nur ähnliche Ausgangswerte haben, sondern auch die Änderung der Aktivität fast gleich ausfällt. Bei den zum Zeitpunkt M gemessenen Werten wurde mit 2,15 μ A der identische Wert ermittelt. Auch das Verhalten nach der Unterbindung der PTH-Zugabe und der abschließenden Umspülung der Oozyte mit physiologischem ND96 zeigt bei beiden Mutanten ein Absinken der Werte unter das Niveau der Ausgangswerte.

Im Gegensatz dazu unterschieden sich der PTHR1-WT und die PTHR1-Mutante G452A stark in ihren Ausgangswerten. Bei der PTHR1-Mutante G452A waren diese fast doppelt so hoch wie beim PTHR1-WT und lagen damit tendenziell im Bereich der zwei im vorangegangenen Absatz beschriebenen Mutanten. Jedoch rechtfertigt die Reaktion auf die Zugabe von 100 nM PTH die Zusammenfassung der zwei PTHR1-Varianten zu einer Gruppe. So weisen beide zum Zeitpunkt M eine klare Steigerung ihrer Aktivität auf. Die künstliche PTHR1-Mutation G452A hatte im Vergleich zum PTHR1-WT zwar eine deutlich geringere Änderung vorzuweisen, doch lag diese weit über dem Niveau der Änderungen der anderen gemessenen PTHR1-Mutanten. Auch die maximal gemessenen Werte lagen nah beieinander. Bei der Analyse des Verhaltens nach Beendigung der PTH-Zugabe und anschließender Auswaschung desselben mit ND96 für 360 s zeigt sich, dass sich die abschließend erfassten Messwerte bei beiden PTHR1-Varianten wieder dem Ausgangsniveau annähern, wobei die Annäherung bei der PTHR1-Mutante G452A stärker ausgeprägt ist. Hier wurden abschließende Werte erzielt, die nur 0,75 μ A über dem mittleren Ausgangswert lagen, wohingegen beim PTHR1-WT noch fast doppelt so hohe Werte wie zu Beginn der Messung vorlagen.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass es bei den im Kollektiv der PFE-Patienten isolierten Mutanten G452E und W339* aufgrund der *missense*- und *nonsense*-Mutationen kaum zu einer Änderung der Aktivität nach Zugabe von 100 nM PTH kam, wohingegen beim PTHR1-WT ebenso wie bei der künstlich erzeugte PTHR1-Mutante G452A eine deutliche Aktivitätsänderung nachweisbar war.

3.4.6 Reproduktion der TEVC-Ergebnisse mit dem Expressionssystem TASK

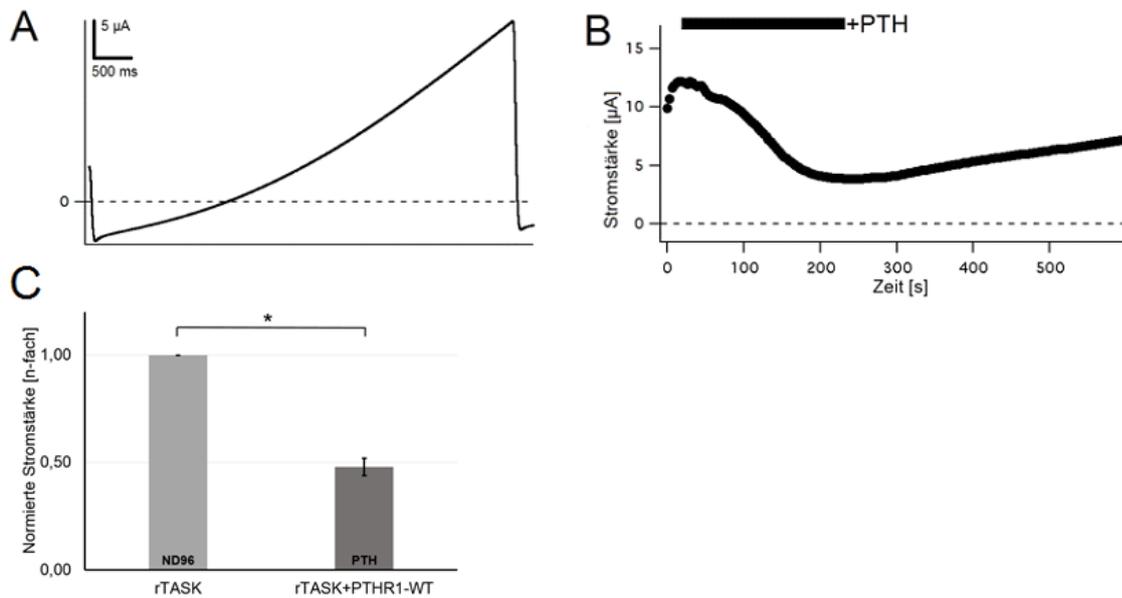


Abbildung 10: TEVC-Ableitungen von TASK-Strömen mit PTHR1 Wildtyp

(A) Rampe von -150 bis +60 mV; (B) Langzeitableitung (10 Min) zeigt den Zeitverlauf der verstärkten Inhibition von TASK1 durch PTH-Applikation; (C) Quantifizierung der PTH-induzierten TASK-Ströme (n=11).

Neben der Verwendung von TRESK als Expressionssystem für die Überprüfung der Reaktion des PTHR1 auf 100 nM PTH, gibt es noch weitere mögliche Ionenkanäle die als Expressionssysteme angewandt werden können. Exemplarisch wurden Messungen mit dem Ionenkanal TASK durchgeführt, welcher im Gegensatz zum TRESK inhibiert wird.

Bei TASK1 handelt es sich ebenfalls um ein Mitglied der K_{2P} -Familie, das selektiv für K^{+} -Ionen ist und so Hintergrund- oder Leckströme von Zellen bildet (Lotshaw, 2007). Darüber hinaus lässt sich TASK durch Änderungen des extrazellulären pH-Wertes beeinflussen, diese Sensitivität liegt bereits in einem Bereich nahe des physiologischen pH-Wertes vor (Duprat et al., 1997). Auch besteht die Möglichkeit, den K_{2P} -Kanal über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zu regulieren, dies geschieht über die Verwendung von Neurotransmittern (Mathie, 2007). Ein Beispiel hierfür stellt der Neurotransmitter Serotonin dar, der voraussichtlich über die Aktivierung der α -Untereinheit des G_{aq} -gekoppelten Rezeptors zur Hemmung der TASK-Ströme führt (Chen et al., 2006; Washburn et al., 2002).

Für die Untersuchung des Verhaltens von TASK zusammen mit PTHR1 wurden alle Protokolle und Messungen analog zu denen in dieser Arbeit bereits für das Vorgehen bei TRESK beschriebenen Weise durchgeführt.

Die entsprechenden RNAs wurden in Oozyten von *X. laevis* im Verhältnis 1:1 injiziert und für zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Um die erfolgreiche Expression zu überprüfen, wurden zu Beginn der TEVC-Messungen Spannungsrampen von -150mV bis +60mV durchgeführt, diese dienten der Darstellung der Strom-Spannungsbeziehung. Für die weiteren Messungen wurden nur diejenigen Oozyten herangezogen, die ein konstantes Umkehrpotenzial zwischen -60 mV und -100 mV aufwiesen und somit den TASK-Strom ausreichend stark exprimierten.

Bei den folgenden Maju-Messungen wurden ausgehend vom einem Haltepotenzial von -60 mV in Abständen von 3 s, Messwerte mit den Veränderungen bei einem Potenzial von +30 mV erhoben. Ebenso wie bei den TRESK-Messungen wurden diese zuerst unter physiologischem ND96 durchgeführt bevor für 90 s 100 nM PTH zugegeben wurde. Zum Auswaschen des PTH wurde abschließend wieder ND96 zugegeben.

Die Ergebnisse dieser Messungen mit PTHR1-WT sind exemplarisch in **Abbildung 10 A** dargestellt. Es zeigte sich, dass es unter der Zugabe von 100 nM PTH zu einem Absinken der erhobenen Messwerte aufgrund der Inhibierung von TASK um durchschnittlich 52,02% +/-3,98% kam. Durch das Auswaschen mit ND96 konnte im Anschluss ein Wiederanstieg der Messwerte auf 4,81 μ A +/-1,52 μ A erzielt werden. Dies entspricht einer Annäherung an die Ausgangswerte, welche im Bereich von 5,28 μ A +/-1,67 μ A lagen. Im Verlauf der gesamten Messungen wurden resultierend aus der Inhibierung der TASK-Ströme die minimalsten Werte mit durchschnittlich 2,41 μ A +/-1,67 μ A erfasst.

Dieser Versuchsaufbau wurden analog auch mit den PTHR1-Mutanten G452E, W339* sowie G452A getestet.

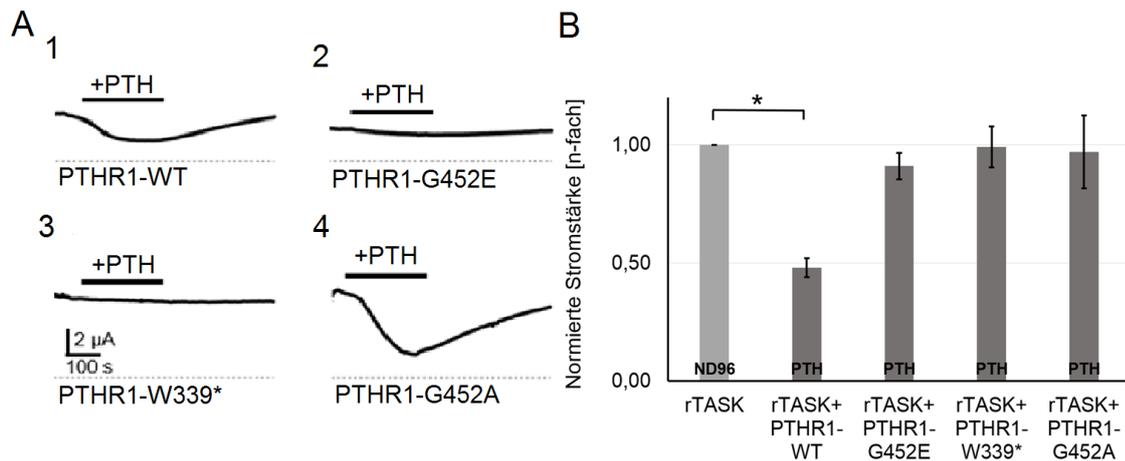


Abbildung 11: TEVC-Ableitungen von TASK-Strömen

(A) Langzeitableitung (10 Min) zeigt den Zeitverlauf der verstärkten Inhibition von TASK1 durch PTH-Applikation bei den unterschiedlichen PTHR1-Variationen; (B) Quantifizierung der PTH-induzierten TASK-Ströme (n=58).

Die obenstehende Abbildung 11 A gibt einen Überblick über die erzielten Ergebnisse der Maju-Messungen bei den unterschiedlichen PTHR1-Variationen. In Abbildung 11 A (1) ist ein deutliches Absinken der gemessenen Stromstärke nach Zugabe von 100 nM PTH zu erkennen. Nach Beendigung der PTH-Zugabe ist ein Wiederanstieg der Messwerte zu verzeichnen.

Bei den Messungen der PTHR1-Mutante G452E zusammen mit TASK (siehe Abbildung 11 A (2)) ist ein solches Absinken der Messwerte nicht zu erkennen. Die prozentuale Veränderung im Vergleich zum Ausgangswert lag durchschnittlich bei 9,33% +/-5,55%, dieser befand sich in einem Bereich von 3,53 μ A +/-1,18 μ A. Das beim Betrachten der obenstehenden exemplarischen Maju-Messung beobachtete Ausbleiben des Absinkens der Kurve lässt sich auch statistisch belegen. So wurden im Verlauf der Messungen unter PTH-Zugabe nur minimale Werte von 3,12 μ A +/-1,04 μ A gemessen, welche somit knapp unter dem Ausgangswert liegen. Ein Absinken der Werte, welche den Rückschluss auf eine Inhibition des TASK-Stromes zur Folge hätte, blieb somit aus.

Ein ähnliches Verhalten zeigte die in Abbildung 11 A (3) dargestellte PTHR1-Mutante W339*. Hier lag die prozentuale Veränderung zum Ausgangswert bei durchschnittlich 0,80%. Die ermittelten Werte lagen zu Beginn bei 4,51 μ A +/-1,13 μ A und veränderten sich im weiteren Verlauf unter PTH-Zugabe auf Werte von 4,52 μ A +/-1,13 μ A um am Ende der Messung Werte von 4,69 μ A +/-1,17 μ A vorzuweisen. Das Vorliegen eines ausreichend starken TASK-Stromes, war zuvor durch Rampen-Messungen überprüft worden.

Im Gegensatz dazu zeigt der Verlauf der PTHR1-Mutante G452A ein Absinken der Messwerte unter der Zugabe von 100 nM PTH. Dieses Verhalten spiegelt sich aufgrund der großen Standardabweichung von 15,39% nicht eindeutig im Säulendiagramm (siehe Abbildung 11 B) wieder. Es wurden jedoch in den durchgeführten Messungen Inhibierungen des TASK-Stromes um bis zu 38,96% erzielt.

Dies steht im Gegensatz zu den ermittelten Werten der PTHR1-Mutanten G452E und W339* bei denen lediglich Werte von 0,80 bis 9,33% Inhibierung, bei Standardfehlern von 5,55 bis 8,66%, erzielt wurden.

Durch die Verwendung von TASK als weiteres Expressionssystem konnten gezeigt werden, dass die mit TRESK erzielten Ergebnisse auch unter Verwendung des von TASK genutzten G_s-Signalweges reproduzierbar sind.

4 Diskussion

4.1 Ursachen der PFE

Durch die von Frazier-Bowers und Roth et al. durchgeführten Studien, zur Analyse der Genstruktur des PTHR1 bei Patienten mit, nach den Kriterien von Proffit und Vig (1981), diagnostizierter PFE, konnten zahlreiche PTHR1-Mutationen isoliert werden. Diese Mutationen standen im Verdacht für die Entstehung der PFE verantwortlich zu sein.

Während einige PTHR1-Mutationen bereits als pathogen klassifiziert sind, wie die PTHR1-Mutante W339*, so bedürfen andere noch der Abklärung bezüglich ihrer Pathogenität und ihres Einflusses auf die Entstehung und Ausprägung einer PFE. Für die *missense*-Mutation G452E des PTHR1, welche von Roth et al. (2014) im Patientenkollektiv isoliert wurde, erfolgte der Nachweis im Rahmen dieser Arbeit.

Darüber hinaus wurde elektrophysiologisch das Verhalten der bereits als pathogen klassifizierten PTHR1-Mutation W339* untersucht und mit Hilfe der künstlich erzeugten PTHR1-Mutante G452A erfolgte eine Kontrolle der Messungen mit der PTHR1-Mutante G452E.

4.1.1 Die PTHR1-Mutante G452E und ihre Rolle bei der PFE

Die Ergebnisse der TEVC-Messungen der PTHR1-Mutante G452E, welche einen AS-Austausch von Glycin zu Glutamat zur Folge hat, zeigen einen signifikanten Unterschied bei der Reaktion auf 100 nM PTH im Vergleich zum PTHR1-WT.

Die geringe Änderung der Aktivität des TRESK-Stromes um lediglich 5,77% machen deutlich, dass der RTHR1 aufgrund der Mutation nicht mehr funktionstüchtig ist. Eine Reaktion in Form einer Aktivierung des mTRESK blieb aus. In den durchgeführten Maju-Messungen konnte kein Anstieg der Messwerte durch einen auswärtsgerichteten K⁺-Strom aufgezeichnet werden. Selbiges gilt für die Rampen- und IV-Messungen.

Aufgrund der Mutation im siebten Transmembranbereich des PTHR1 kam es zu einem kompletten Funktionsverlust des Rezeptors. Eine mögliche Ursache hierfür liegt in der ausgetauschten AS. War zuvor an der AS-Sequenzstelle der Code für die einfache AS Glycin vorhanden, die nicht über Seitenketten verfügt und hydrophil ist, so wurde diese durch Glutamat ersetzt. Das Glutamat weist in seiner Struktur eine lange Seitenkette

auf und verfügt über die doppelte molare Masse wie das Glycin. Hinzu kommt, dass die neu eingebaute AS nur schlecht wasserlöslich ist. Diese Unterschiede in Struktur und Eigenschaften der AS machen deutlich, weshalb sich das Verhalten des PTHR1 hin zum völligen Funktionsverlust geändert hat.

Die analog mit TASK durchgeführten Messungen der PTHR1-Mutante G452E bekräftigen dieses Ergebnis, da auch bei diesem Versuchsaufbau nur eine prozentuale Veränderung der Aktivität um 9,33% im Vergleich zu den Ausgangswerten erzielt wurde.

Diese Ergebnisse bestätigen somit die Vermutung, dass es sich bei der PTHR1-Mutante G452E um eine pathogene Variante handelt. Die Austauschmutation G452E war bereits bei PFE-Patienten nachgewiesen worden und konnte somit im Rahmen dieser Arbeit als eindeutig pathogen klassifiziert werden. Dies geht auch aus den von Subramanian et al. (eingereicht 2016) durchgeführten Messungen an HEK-Zellen hervor.

4.1.2 Die PTHR1-Mutante W339* und ihre Rolle bei der PFE

Mit der PTHR1-Mutante W339* wurde eine bereits in der Literatur als pathogen klassifizierte Variante des PTHR1 untersucht (Roth et al., 2014). Die natürlich vorkommende proteinogene AS Tryptophan verfügt über in ihrer Seitenkette über ein aromatisches Indol-Ringsystem und zeichnet sich durch ihr lipophiles Verhalten aus. Da es sich bei der PTHR1-Mutante W339* um eine Mutante mit Abbruch der Translation in der vierten Transmembrandomäne des Rezeptors handelt, ist es nicht verwunderlich, dass dies zu einem kompletten Funktionsverlust des PTHR1 führt.

Dieses Ergebnis wurde mit den TEVC-Messungen bestätigt. Zwar wies die PTHR1-Mutante W339* eine Änderung der Messwerte um 12,54% auf, doch lag auch hier mit 5,09% ein verhältnismäßig großer Standardfehler vor. Bei Betrachtung der unter 3.4.3 aufgeführten realen Messwerte wird deutlich, dass die Prozentangabe einen falschen Eindruck vermittelt und die Änderung der Aktivität der Kombination von mTRESK mit PTHR1-Mutante W339* sehr gering ausfällt.

Bei der Betrachtung der Maju-Messungen wird deutlich, dass es nicht zu einem K⁺-Auswärtsstrom bedingten Anstieg der Werte kommt. Auch die Rampen- und IV-Messungen verhalten sich entsprechend.

Identische Beobachtungen konnten auch bei den durchgeführten Messungen mit TASK-Strömen erzielt werden, bei denen die Inhibierung lediglich 0,80% betrug, was Messwerten von 0,18 μ A entspricht.

Diese Ergebnisse bestätigen die bereits in der Literatur veröffentlichte Annahme, dass es sich bei der PTHR1-Mutante W339* um eine pathogene Variation des PTHR1 handelt und werden ebenfalls durch die HEK-Zellmessungen von Subramanian et al. (eingereicht 2016) bestätigt.

4.1.3 Die PTHR1-Mutante G452A und ihre Rolle bei der PFE

Während es sich bei den anderen untersuchten PTHR1-Mutationen um natürlich vorkommende Variationen handelt, wurde die PTHR1-Mutante G452A im Labor erzeugt, um die Ergebnisse von G452E zu überprüfen.

Die natürlich vorkommende AS Glycin wurde durch eine AS mit ähnlichen Eigenschaften ersetzt. Zwar besitzt Alanin eine kurze Seitenkette, doch unterscheidet diese sich nur um ein CH_3 -Gruppe von der Struktur des regulär vorkommenden Glycins. Auch hinsichtlich der Löslichkeit in Wasser liegen keine Unterschiede vor, beide AS sind gut in Wasser löslich. Gleiches gilt für die Molare Masse, welche sich bei den beiden AS nicht wesentlich unterscheidet.

Aufgrund des hier vorliegenden AS-Austausches von Glycin zu Alanin im Vergleich zum PTHR1-WT konnte ein Anstieg der Aktivität des PTHR1 in Kombination mit mTRESK unter Zugabe von 100 nM PTH erzielt werden. Dieser lag mit 91,02% signifikant über den Ergebnissen der anderen untersuchten PTHR1-Mutanten. Die Maju-Messungen zeigen deutlich einen K^+ -Auswärtsstrom bedingten Anstieg der ermittelten Messwerte sowie ein erneutes Absinken der Aktivität nach Unterbindung der PTH-Zugabe mit Annäherung an die Ausgangswerte.

Dies lässt den Schluss zu, dass die PTHR1-Mutante G452A trotz AS-Austausches zu einem funktionstüchtigen PTHR1 führt, obgleich die Aktivität deutlich hinter dem PTHR1-WT mit 260,47% zurückbleibt.

Bei den Messungen der TASK-Ströme konnte dieses Ergebnis aufgrund einer großen Standardabweichung von 15,39% nicht eindeutig bestätigt werden. Es wurden aber Messungen mit prozentualen Veränderungen von bis zu 38,96% erzielt, welche somit ein analoges Verhalten der PTHR1-Mutante G452A zu ihrem Verhalten bei Messungen unter Verwendung von TRESK aufweist.

Im Hinblick auf die oben dargestellten sehr ähnlichen Eigenschaften der beiden ausgetauschten AS ist dieses Verhalten des PTHR1 darauf zurückzuführen, dass dieser AS-Austausch kaum einen Einfluss auf die Proteinstruktur des Rezeptors hat und somit dessen Funktionalität nicht beeinflusst.

Dies steht im Gegensatz zur PTHR1-Mutante G453E, bei der durch den Einbau einer wesentlich größeren AS die Proteinstruktur stärker beeinflusst wird und es so zu einem Funktionsverlust des Rezeptors kommt. Mit dem Vergleich der PTHR1-Mutanten G452E und G452A wird deutlich, wie sehr eine Punktmutation die Funktion eines kompletten Rezeptors zerstört und so zum Krankheitsbild der PFE führen kann.

4.2 Ionenkanäle als Monitor für Rezeptorstörungen

Die Ergebnisse dieser Arbeiten machen deutlich, wie sich Aussagen über Rezeptorstörungen durch eine Koexpression von zu überprüfenden Rezeptoren zusammen mit Ionenkanälen erzielen lassen.

Enyedi (2012) zeigte, dass sich TRESK-Ströme durch Agonisten von G_q-Protein-gekoppelten Rezeptoren um ein vielfaches erhöhen lassen, als Beispiel wurde eine Aktivierung des M1-cholinergen-Rezeptors genannt.

Die Daten von Mathie (2007) zeigen, dass die TRESK-, TREK und TASK-Familien von G-Protein-Rezeptor-gekoppelten Prozessen reguliert werden können. Da TRESK-Kanäle durch eine Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels aktiviert werden, führen Prozesse, die einen solchen Anstieg nach sich ziehen, zu einer Aktivierung von TRESK.

Dies kann durch G_q-gekoppelte Rezeptoren geschehen (Czirjak et al., 2004; Mathie, 2007). Nachdem der Ligand an den Rezeptor gebunden hat, kommt es zur Konformationsänderung des Rezeptors mit Abspaltung der G_q-Untereinheit. Dies führt zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC), welche im weiteren Verlauf das Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) spaltet. Es entstehen Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). Das erzeugte IP₃ führt zur Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern, welches im weiteren Verlauf Calcineurin, eine Calcium/Calmodulin-abhängige Phosphatase, aktiviert, welche den TRESK-Kanal dephosphoryliert (Czirjak & Enyedi, 2006; Czirjak et al., 2004).

Mathie (2007) zeigte, dass auch für TASK, neben der Regulation der Aktivität durch Änderung des extrazellulären pH-Wertes, die Möglichkeit einer Regulation über G-

Proteine-gekoppelte Rezeptoren besteht (Duprat et al., 1997). Der Neurotransmitter Serotonin stellt hierfür ein Beispiel dar. Die Hemmung der TASK-Ströme resultiert hier vermutlich aus der Aktivierung der G_q-Untereinheit des G-Protein-gekoppelten Rezeptors (Chen et al., 2006; Washburn et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Klasse II *secretin-like* G-Protein-Rezeptor für das Parathormon zusammen mit TRESK beziehungsweise TASK exprimiert. Da die Hauptaufgabe von G-Protein-Rezeptoren in der Signaltransduktion von extra- nach intrazellulär liegt, führte die Stimulation des PTHR1, durch extrazelluläres PTH, intrazellulär über G_s-Proteine zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase beziehungsweise über G_q-Proteine zur Stimulation des Phospholipase-C-Weges (Rassow, 2012). Basierend auf der Tatsache, dass TRESK über den G_q-gekoppelten Rezeptor aktiviert werden kann, resultiere eine Aktivierung des PTHR1 durch die Zugabe von 100 nM PTH in einer Aktivierung des TRESK- beziehungsweise in einer Inhibierung des TASK-Stromes (Czirjak & Enyedi, 2006; Czirjak et al., 2004; Kollert, 2015).

Die verwendeten Ionenkanäle TRESK und TASK aus der K_{2P}-Familie, konnten auf diesem Wege dazu beitragen, die Mutation im Parathormonrezeptor funktionell zu überprüfen. So wurden die Pathogenität, wie auch die fehlende Pathogenität der verschiedenen PTHR1-Mutationen nachgewiesen, wodurch der Weg für eine eindeutige Diagnostik und zielführende Therapie der PFE geebnet wird.

4.3 Therapie der PFE

Die erfolgreiche Therapie der PFE setzt eine interdisziplinäre Zusammenarbeit voraus um für den Patienten ein zufriedenstellendes Ergebnis zu erzielen (Stellzig-Eisenhauer et al., 2010).

Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft stellt die Extrusionstherapie keine Therapieoption bei der PFE mehr dar, da es aufgrund der angewandten orthodontischen Kräfte zu einer Ankylose des betroffenen Zahnes kommt (Proffit & Vig, 1981; Raghoobar et al., 1989). Dadurch wird das Knochenwachstum des betroffenen Kieferknochenabschnittes noch mehr gehemmt, als dies ohnehin schon aufgrund der PFE der Fall ist. Die Tatsache, dass die Zähne nicht auf Extrusionskräfte reagieren, lässt zu dem Schluss kommen, dass es sich bei der durch die PTHR1-

Mutation verursachte PFE um ein dauerhaftes Problem handelt, welches nicht nur zum Zeitpunkt des physiologischen Zahndurchbruches vorliegt (Aruna et al., 2014).

Unabhängig von der zu unterlassenden Extrusionstherapie sollte aber dennoch, vor allem aufgrund der durch die PFE verursachten Wachstumshemmung, eine frühzeitige kieferorthopädische Überwachung und Behandlung stattfinden.

Auch wenn eine kieferorthopädische Behandlung von Kindern und Jugendlichen, die sich noch im Wachstum befindlichen, vorerst nicht zu einer Wiederherstellung der vollständigen Kaukraft und der Einstellung der Zähne in die Okklusionsebene führt, so kann doch bis zum Abschluss des vertikalen Wachstums bereits mittels Funktionskieferorthopädie das Wachstum der Kiefer angeregt werden und so die intermaxilläre Beziehung hin zu einer Skelettale Klasse I angestrebt werden. Auf diese Weise werden die Grundlagen für eine physiologische Entwicklung des stomatognathen Systems geschaffen.

Durch eine interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen Kieferorthopädie, Prothetik, Mund-Kiefer-Gesichts- und Oralchirurgie kann ein individuell auf den Patienten abgestimmter Therapieplan erstellt werden, der auf dessen Bedürfnisse und Wünsche hinsichtlich Funktionalität, Kaukomfort und Art der prothetischen Versorgung ausgerichtet ist. Die Einbeziehung des Patienten in die Therapieplanung trägt hierbei wesentlich zur Akzeptanz des Ergebnisses bei.

Eine mögliche chirurgische Therapie stellt die Repositionierung des gesamten Alveolarsegmentes samt der betroffenen Zähne unter Vermeidung eines *Nervus-alveolaris-inferior*-Traumas dar (Piattelli & Eleuterio, 1991). Diese Gefahr besteht vor allem im Hinblick auf die Tatsache, dass die von PFE betroffenen Zähne meist im basalen Teil der Mandibula angelegt sind.

Hinsichtlich prothetischer Versorgung ist es in nicht so schwergradigen Fällen möglich die Zahnkronen, sofern diese das Gingivaniveau erreicht haben und die Gingiva durchbrochen wurde, mit Onlays, Kronen und/oder Brücken oder durch Teleskoparbeiten so zu versorgen, dass mithilfe der prothetischen Versorgung eine durchgängige Okklusionsebene geschaffen werden kann. Dabei muss auch hier auf ein abgeschlossenes vertikales Wachstum geachtet werden, bevor die definitive Versorgung vorgenommen werden kann (Yatani et al., 1998).

Auch die Extraktion der betroffenen Zähne mit anschließendem Knochenaufbau oder Segmentosteotomie und anschließender implantat-prothetischer Versorgung kann eine Therapieoption darstellen (Frazier-Bowers et al., 2007; Piattelli & Eleuterio, 1991).

4.4 Möglichkeiten der Diagnostik der PFE

Grundlage für sämtliche Behandlungs- und Therapieoptionen ist die richtige und frühzeitige Diagnose der PFE. Pilz et al. (2014) konnten zeigen, dass bereits das Vorliegen von sechs der von Proffit und Vig im Jahre 1981 aufgestellten Merkmale einer PFE eine eindeutige Zuordnung der Erkrankung ermöglichen.

Aufgrund der von Roth et al. sowie Frazier-Bowers erzielten Isolierung von zahlreichen mit PFE assoziierten PTHR1-Mutationen im Genom der betroffenen Patienten ist es nun möglich, eine gesichertere Diagnose zu stellen (2014; 2014). Dies erlaubt bei neuen Patienten, bei denen die von Proffit und Vig aufgestellten Kriterien hinsichtlich oralem und röntgenologischem Befund zutreffen, die Sicherung der Diagnose mittels Genanalyse. Dies hat zur Folge, dass aussichtslose kieferorthopädische Therapien unterlassen werden und die Patienten von vornherein entsprechend der Diagnose PFE zielführend therapiert werden könnten.

Die Diagnose mittels Genanalyse kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht alle PFE-Fälle eindeutig diagnostizieren, da es unter denen von Roth et al. (2014) aufgezeigten PTHR1-Mutationen noch Varianten gibt, die noch nicht hinsichtlich ihrer Pathogenität getestet wurden. Diese wurden zwar bei PFE-Patienten isoliert, bedürfen aber noch einer weiteren Überprüfung. Des Weiteren konnte Frazier-Bowers (2014) Fälle aufzeigen, bei denen zwar im Genom eine PFE-spezifische Mutation des PTHR1 vorlag, es jedoch nicht zur phänotypischen Ausprägung kam.

Es ist somit fraglich, ob bereits jetzt alle PFE-Fälle eindeutig mittels Genanalyse diagnostiziert werden können. Für die PTHR1-Mutationen G452E und W339* konnte in dieser Arbeit ein signifikanter Funktionsverlust des PTHR1 nachgewiesen werden. Somit ist nach erfolgter Detektion dieser Mutanten in der Genanalyse die klare Diagnose einer PFE zu stellen.

Ob es neben den bekannten PTHR1-Mutationen noch Variationen oder gar noch andere Ursachen für die Entstehung einer PFE gibt, muss noch abschließend geklärt werden. Diese Vermutung wurde bereits von Frazier-Bowers (2014) aufgestellt, da

unter den untersuchten PFE-Patienten auch Patienten ohne funktionelle Mutationen des PTHR1 waren, die dennoch eine PFE aufwiesen.

5 Zusammenfassung

Die von Proffit und Vig (1981) als Primary Failure of Eruption (PFE, Primäre Durchbruchstörung) klassifizierte Zahndurchbruchstörung resultiert klinisch häufig in schwergradigen Auswirkungen. Hierbei handelt es sich um Beeinträchtigungen des Wachstums des Alveolarfortsatzes, ebenso wie Dilazationen, große vertikale Defekte und schwergradige lateral offene Bisse.

Die eindeutige Diagnostik und Abgrenzung der PFE von anderen Zahndurchbruchstörungen gestaltete sich bis zur Bestimmung der zugrunde liegenden Ursachen als sehr schwierig. Aufgrund von Fehldiagnosen kam es häufig zu Behandlungsmisserfolgen.

Um die PFE schneller und spezifischer diagnostizieren zu können, ist das Wissen über die zugrunde liegenden Mutationen des Parathormonrezeptor 1- Genes (PTHR1-Genes), welche bei PFE-Patienten isoliert wurden, von großer Bedeutung.

Im Zuge vorangegangener Studien wurden bereits einige Mutationen des PTHR1 als pathogen klassifiziert, hierzu zählt die PTHR1-Mutante W339*, eine Abbruchmutante, welche auf einem Basenaustausch beruht. Darüber hinaus liegen Daten zu potenziell pathogenen Genvariationen, wie die PTHR1-Mutante G452E, eine Aminosäureaustausch-Mutante, vor. Der Nachweis ihrer Pathogenität würde die Diagnosestellung sichern.

Um die Pathogenität der PTHR1-Variationen nachweisen zu können, wurde ihre RNA in *X. laevis* Oozyten injiziert. Der PTHR1 wurde zusammen mit mTRESK, einem Kaliumkanal, exprimiert und im Anschluss auf sein Verhalten bei Zugabe von 100 nM Parathormon (PTH) mit elektrophysiologischen Messungen untersucht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die bei nicht an PFE erkrankten Menschen vorkommende Variante des PTHR1 (PTHR1-WT) eine Aktivierung von 260,47% im Vergleich zu den Ausgangswerten unter einer physiologischen Lösung (ND96) zeigte. Im Gegensatz dazu konnte bei der bereits als pathogen klassifizierten PTHR1-Variation W339* kein signifikanter Anstieg der Aktivität unter PTH-Zugabe nachgewiesen werden. Für die potenziell pathogene PTHR1-Mutante G452E konnte ebenfalls keine signifikante Aktivitätssteigerung als Reaktion auf die Zugabe des Agonisten PTH nachzuweisen ermittelt werden.

Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei der PTHR1-Mutante G452E ebenfalls um eine pathogene Variation des PTHR1-Genes handelt, genauso wie bei

der als pathogen klassifizierten Variation W339* des PTHR1, da beide in den durchgeführten Messungen dasselbe Verhalten zeigen.

Die als Kontrollgruppe künstlich erzeugte Mutante G452A des PTHR1 zeigte hingegen eine signifikante Aktivierung von 91,02% im Vergleich zu den gemessenen Ausgangswerten unter physiologischem ND96. Durch einen einfachen Aminosäureaustausch wurde die Basensequenz des Rezeptors so verändert, dass die Funktion trotz der Mutation wieder hergestellt werden konnte. Dies geschah durch den Einbau eines Alanins anstelle des natürlich vorkommenden Glycins. Im Gegensatz zu dem Einbau von Glutamat, bei der im Patientenkollektiv isolierten PTHR1-Mutante G452E, bei welcher die Funktionsfähigkeit nicht mehr vorliegt.

Die gemessene Aktivität ist zwar geringer als beim WT, legt aber nahe, dass es im Falle dieser künstlichen Mutation nicht zu einer Krankheitsausprägung kommt, da die Reaktion in ihrer Gesamtheit der des PTHR1-WT entspricht. Dies wird auch durch die signifikante Erhöhung des auswärts-gerichteten K⁺-Stromes deutlich, der sich analog zum gesunden PTHR1 verhält. Es konnte somit die Funktionsfähigkeit der künstlichen PTHR1-Mutante G452A nachgewiesen werden. Die gesamten erzielten Ergebnisse waren durch die Abbildung von klinischen Befunden auf molekularer Ebene in Oozyten möglich. Durch die Kombination eines Kalium-Kanals mit dem krankheitsspezifischen Rezeptor konnte das Verhalten des Rezeptors anhand des mittels TEVC-Messungen ermittelten Verhaltens des Kalium-Kanals abgebildet werden.

Bei dem verwendeten Kalium-Kanal handelte es sich um mTRESK, welcher mit dem Parathormonrezeptor 1 zusammen exprimiert wurde. Durch die Zugabe des spezifischen Rezeptoragonisten PTH kam es bei den funktionsfähigen Variationen des Rezeptors zu einer Konformationsänderung des G-Proteins. Diese resultierte im weiteren Verlauf in einem Anstieg des intrazellulären Calcium-Spiegels und einer Aktivierung von Calcineurin. Die Dephosphorylierung des Kalium-Kanals mTRESK, welche zu einer Aktivitätssteigerung des Kanals führte, war die Folge.

Dies verdeutlicht, wie auch zukünftig durch die Kooexpression von krankheitsspezifischen Rezeptoren und elektrophysiologisch ableitbaren Strömen, die Bedeutungen und Auswirkungen von Mutationen auf molekularer Ebene funktionell nachgewiesen werden können.

Die vorliegende Arbeit erbringt somit unter Verwendung dieses Expressionssystems den Nachweis dafür, dass es sich bei der im Patientenkollektiv isolierten PTHR1-

Mutante G452E um eine pathogene Variation des PTHR1-Genes handelt. Zudem konnten die vorangegangenen Ergebnisse, wonach es sich bei der ebenfalls im Patientenkollektiv isolierten PTHR1-Mutante W339* um eine pathogene Mutation handelt bestätigt werden.

Patienten mit diesen Genvariationen können somit eindeutig die Diagnose PFE erhalten und entsprechend zielführend therapiert werden.

6 Literaturverzeichnis

- Aruna, U., Annamalai, P. R., Nayar, S. & Bhuminathan, S. (2014).** Primary failure of eruption- a case report with cone beam computerized tomographic imaging. *J Clin Diagn Res*, 8(4), ZD14-16. doi:10.7860/JCDR/2014/8606.4306
- Baccetti, T. (2000).** Tooth anomalies associated with failure of eruption of first and second permanent molars. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 118(6), 608-610. doi:10.1067/mod.2000.97938
- Becher, C., Szuwart, T., Ronstedt, P., Ostermeier, S., Skwara, A., Fuchs-Winkelmann, S. & Tibesku, C. O. (2010).** Decrease in the expression of the type 1 PTH/PTHrP receptor (PTH1R) on chondrocytes in animals with osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 5, 28. doi:10.1186/1749-799X-5-28
- Bosker, H., ten Kate, L. P. & Nijenhuis, L. E. (1978).** Familial reinclusion of permanent molars. *Clin Genet*, 13(3), 314-320.
- Brady, J. (1990).** Familial primary failure of eruption of permanent teeth. *Br J Orthod*, 17(2), 109-113.
- Cahill, D. R. & Marks, S. C., Jr. (1980).** Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. *J Oral Pathol*, 9(4), 189-200.
- Calvi, L. M., Shin, H. I., Knight, M. C., Weber, J. M., Young, M. F., Giovannetti, A. & Schipani, E. (2004).** Constitutively active PTH/PTHrP receptor in odontoblasts alters odontoblast and ameloblast function and maturation. *Mechanisms of Development*, 121(4), 397-408. doi:10.1016/j.mod.2004.02.004
- Chen, X., Talley, E. M., Patel, N., Gomis, A., McIntire, W. E., Dong, B., . . . Bayliss, D. A. (2006).** Inhibition of a background potassium channel by Gq protein alpha-subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(9), 3422-3427. doi:10.1073/pnas.0507710103
- Cielinski, M. J., Jolie, M., Wise, G. E. & Marks, S. C., Jr. (1995).** The contrasting effects of colony-stimulating factor-1 and epidermal growth factor on tooth eruption in the rat. *Connect Tissue Res*, 32(1-4), 165-169.
- Cormier, S., Delezoide, A. L. & Silve, C. (2003).** Expression patterns of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) and parathyroid hormone receptor type 1 (PTHR1) during human development are suggestive of roles specific for each gene that are not mediated through the PTHrP/PTHR1 paracrine signaling pathway. *Gene Expr Patterns*, 3(1), 59-63.
- Craddock, H. L. & Youngson, C. C. (2004).** Eruptive tooth movement--the current state of knowledge. *British Dental Journal*, 197(7), 385-391. doi:10.1038/sj.bdj.4811712

- Czirjak, G. & Enyedi, P. (2006).** Targeting of calcineurin to an NFAT-like docking site is required for the calcium-dependent activation of the background K⁺ channel, TRESK. *J Biol Chem*, 281(21), 14677-14682. doi:10.1074/jbc.M602495200
- Czirjak, G., Toth, Z. E. & Enyedi, P. (2004).** The two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is activated by the cytoplasmic calcium signal through calcineurin. *J Biol Chem*, 279(18), 18550-18558. doi:10.1074/jbc.M312229200
- Decker, E., Stellzig-Eisenhauer, A., Fiebig, B. S., Rau, C., Kress, W., Saar, K., . . . Weber, B. H. (2008).** PTHR1 loss-of-function mutations in familial, nonsyndromic primary failure of tooth eruption. *Am J Hum Genet*, 83(6), 781-786. doi:10.1016/j.ajhg.2008.11.006
- Dibiase, A. T. & Leggat, T. G. (2000).** Primary failure of eruption in the permanent dentition of siblings. *Int J Paediatr Dent*, 10(2), 153-157.
- Dobler, T., Springauf, A., Tovornik, S., Weber, M., Schmitt, A., Sedlmeier, R., . . . Doring, F. (2007).** TRESK two-pore-domain K⁺ channels constitute a significant component of background potassium currents in murine dorsal root ganglion neurones. *J Physiol*, 585(Pt 3), 867-879. doi:10.1113/jphysiol.2007.145649
- Duchatelet, S., Ostergaard, E., Cortes, D., Lemainque, A., Julier, C. (2005).** Recessive mutations in PTHR1 cause contrasting skeletal dysplasias in Eiken and Blomstrand syndromes. *Hum Mol Genet*, 14(1), 1-5. doi:10.1093/hmg/ddi001
- Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C. & Lazdunski, M. (1997).** TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO Journal*, 16(17), 5464-5471. doi:10.1093/emboj/16.17.5464
- Enyedi, P., Braun, G. & Czirjak, G. (2012).** TRESK: the lone ranger of two-pore domain potassium channels. *Mol Cell Endocrinol*, 353(1-2), 75-81. doi:10.1016/j.mce.2011.11.009
- Fink, M., Duprat, F., Lesage, F., Reyes, R., Romey, G., Heurteaux, C. & Lazdunski, M. (1996).** Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *EMBO Journal*, 15(24), 6854-6862.
- Frazier-Bowers, S. A., Hendricks, H. M., Wright, J. T., Lee, J., Long, K., Dibble, C. F. & Bencharit, S. (2014).** Novel mutations in PTH1R associated with primary failure of eruption and osteoarthritis. *J Dent Res*, 93(2), 134-139. doi:10.1177/0022034513513588
- Frazier-Bowers, S. A., Koehler, K. E., Ackerman, J. L. & Proffit, W. R. (2007).** Primary failure of eruption: further characterization of a rare eruption disorder.

Am J Orthod Dentofacial Orthop, 131(5), 578 e571-511.
doi:10.1016/j.ajodo.2006.09.038

Frazier-Bowers, S. A., Puranik, C. P. & Mahaney, M. C. (2010). The etiology of eruption disorders - further evidence of a 'genetic paradigm'. *Semin Orthod*, 16(3), 180-185. doi:10.1053/j.sodo.2010.05.003

Frazier-Bowers, S. A., Simmons, D., Koehler, K. & Zhou, J. (2009). Genetic analysis of familial non-syndromic primary failure of eruption. *Orthod Craniofac Res*, 12(2), 74-81. doi:10.1111/j.1601-6343.2009.01440.x

Frazier-Bowers, S. A., Simmons, D., Wright, J. T., Proffit, W. R. & Ackerman, J. L. (2010). Primary failure of eruption and PTH1R: the importance of a genetic diagnosis for orthodontic treatment planning. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 137(2), 160 e161-167; discussion 160-161. doi:10.1016/j.ajodo.2009.10.019

Goldstein, S. A., Bockenbauer, D., O'Kelly, I. & Zilberberg, N. (2001). Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nature Reviews: Neuroscience*, 2(3), 175-184. doi:10.1038/35058574

Jobert, A. S., Zhang, P., Couvineau, A., Bonaventure, J., Roume, J., Le Merrer, M. & Silve, C. (1998). Absence of functional receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Blomstrand chondrodysplasia. *J Clin Invest*, 102(1), 34-40. doi:10.1172/JCI2918

Kang, D., Choe, C. & Kim, D. (2005). Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and TRAAK. *J Physiol*, 564(Pt 1), 103-116. doi:10.1113/jphysiol.2004.081059

Kang, D. & Kim, D. (2006). TREK-2 (K2P10.1) and TRESK (K2P18.1) are major background K⁺ channels in dorsal root ganglion neurons. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 291(1), C138-146. doi:10.1152/ajpcell.00629.2005

Kang, D., Mariash, E. & Kim, D. (2004). Functional expression of TRESK-2, a new member of the tandem-pore K⁺ channel family. *J Biol Chem*, 279(27), 28063-28070. doi:10.1074/jbc.M402940200

Kater, W. M., Kawa, D., Schafer, D. & Toll, D. (2004). Treatment of posterior open bite using distraction osteogenesis. *J Clin Orthod*, 38(9), 501-504; quiz 487-508.

Kollert, S., Dombert, B., Doring, F., Wischmeyer, E. (2015). Activation of TRESK channels by the inflammatory mediator lysophosphatidic acid balances nociceptive signalling. *Scientific Reports*, 5, 12548. doi:10.1038/srep12548

Li, H., Rao, A. & Hogan, P. G. (2004). Structural delineation of the calcineurin-NFAT interaction and its parallels to PP1 targeting interactions. *Journal of Molecular Biology*, 342(5), 1659-1674. doi:10.1016/j.jmb.2004.07.068

- Lotshaw, D. P. (2007).** Biophysical, pharmacological, and functional characteristics of cloned and native mammalian two-pore domain K⁺ channels. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 47(2), 209-256.
- Maingret, F., Honore, E., Lazdunski, M., Patel, A. J. (2002).** Molecular basis of the voltage-dependent gating of TREK-1, a mechano-sensitive K⁽⁺⁾ channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292(2), 339-346. doi:10.1006/bbrc.2002.6674
- Mannstadt, M., Juppner, H., Gardella, T. J. (1999).** Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *Am J Physiol*, 277(5 Pt 2), F665-675.
- Marks, S. C., Jr., Cahill, D. R. & Wise, G. E. (1983).** The cytology of the dental follicle and adjacent alveolar bone during tooth eruption in the dog. *Am J Anat*, 168(3), 277-289. doi:10.1002/aja.1001680303
- Mathie, A. (2007).** Neuronal two-pore-domain potassium channels and their regulation by G protein-coupled receptors. *J Physiol*, 578(Pt 2), 377-385. doi:10.1113/jphysiol.2006.121582
- Noel, J., Zimmermann, K., Busserolles, J., Deval, E., Alloui, A., Diochot, S., . . . Lazdunski, M. (2009).** The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO Journal*, 28(9), 1308-1318. doi:10.1038/emboj.2009.57
- O'Connell, A. C. & Torske, K. R. (1999).** Primary failure of tooth eruption: a unique case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 87(6), 714-720.
- O'Connell, A. D., Morton, M. J. & Hunter, M. (2002).** Two-pore domain K⁺ channels-molecular sensors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1566(1-2), 152-161.
- Pape, H.-C. K., Rainer; Silbernagl, Stefan; et al. (2010).** Physiologie. *Thieme*.
- Patel, A. J. & Honore, E. (2001).** Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends in Neurosciences*, 24(6), 339-346.
- Patel, A. J., Honore, E., Maingret, F., Lesage, F., Fink, M., Duprat, F. & Lazdunski, M. (1998).** A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *EMBO Journal*, 17(15), 4283-4290. doi:10.1093/emboj/17.15.4283
- Philbrick, W. M., Dreyer, B. E., Nakchbandi, I. A. & Karaplis, A. C. (1998).** Parathyroid hormone-related protein is required for tooth eruption. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(20), 11846-11851.

- Piattelli, A. & Eleuterio, A. (1991).** Primary failure of eruption. *Acta Stomatol Belg*, 88(3), 127-130.
- Pilz, P., Meyer-Marcotty, P., Eigenthaler, M., Roth, H., Weber, B. H. & Stellzig-Eisenhauer, A. (2014).** Differential diagnosis of primary failure of eruption (PFE) with and without evidence of pathogenic mutations in the PTHR1 gene. *J Orofac Orthop*, 75(3), 226-239. doi:10.1007/s00056-014-0215-y
- Proffit, W. R. & Vig, K. W. (1981).** Primary failure of eruption: a possible cause of posterior open-bite. *Am J Orthod*, 80(2), 173-190.
- Raghoobar, G. M., Boering, G., Jansen, H. W. & Vissink, A. (1989).** Secondary retention of permanent molars: a histologic study. *J Oral Pathol Med*, 18(8), 427-431.
- Raghoobar, G. M., Ten Kate, L. P., Hazenberg, C. A. & Boering, G., Vissink, A. (1992).** Secondary retention of permanent molars: a report of five families. *J Dent*, 20(5), 277-282.
- Rassow. (2012).** Duale Reihe - Biochemie (3. Auflage). *Thieme*.
- Roth, H., Fritsche, L. G., Meier, C., Pilz, P., Eigenthaler, M., Meyer-Marcotty, P., . . . Weber, B. H. (2014).** Expanding the spectrum of PTH1R mutations in patients with primary failure of tooth eruption. *Clin Oral Investig*, 18(2), 377-384. doi:10.1007/s00784-013-1014-3
- Sano, Y., Inamura, K., Miyake, A., Mochizuki, S., Kitada, C., Yokoi, H., . . . Furuichi, K. (2003).** A novel two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is localized in the spinal cord. *J Biol Chem*, 278(30), 27406-27412. doi:10.1074/jbc.M206810200
- Shokeir, M. H. (1974).** Complete failure of eruption of all permanent teeth: an autosomal dominant disorder. *Clin Genet*, 5(4), 322-326.
- Siegel, S. C. & O'Connell, A. (1999).** Oral rehabilitation of a child with primary failure of tooth eruption. *J Prosthodont*, 8(3), 201-207.
- Stellzig-Eisenhauer, A., Decker, E., Meyer-Marcotty, P., Rau, C., Fiebig, B. S., Kress, W., . . . Weber, B. H. (2010).** Primary failure of eruption (PFE)--clinical and molecular genetics analysis. *J Orofac Orthop*, 71(1), 6-16. doi:10.1007/s00056-010-0908-9
- Subramanian, H., Kollert, Sina, Rukoyatkina, Natalia, Sturm, Julia, Gambaryan, Stepan, Stellzig-Eisenhauer, Angelika, Meyer-Marcotty, Philipp, Döring, Frank , Eigenthaler, Martin, Wischmeyer, Erhard (eingereicht 2016).** Disruption of G-protein signaling by PTH receptor mutants isolated from patients with primary failure of tooth eruption. *Eingereicht bei PLOS ONE*.

- Wang, Z. & McCauley, L. K. (2011).** Osteoclasts and odontoclasts: signaling pathways to development and disease. *Oral Dis*, 17(2), 129-142. doi:10.1111/j.1601-0825.2010.01718.x
- Washburn, C. P., Sirois, J. E., Talley, E. M., Guyenet, P. G. & Bayliss, D. A. (2002).** Serotonergic raphe neurons express TASK channel transcripts and a TASK-like pH- and halothane-sensitive K⁺ conductance. *Journal of Neuroscience*, 22(4), 1256-1265.
- Wise, G. E. & Fan, W. (1989).** Changes in the tartrate-resistant acid phosphatase cell population in dental follicles and bony crypts of rat molars during tooth eruption. *J Dent Res*, 68(2), 150-156.
- Wise, G. E. & King, G. J. (2008).** Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res*, 87(5), 414-434.
- Yatani, H., Watanabe, E. K., Kaneshima, T., Yamashita, A. & Suzuki, K. (1998).** Etched-porcelain resin-bonded onlay technique for posterior teeth. *J Esthet Dent*, 10(6), 325-332.

Danksagung

Herrn Prof. Wischmeyer möchte ich für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes herzlich danken. Ich verdanke ihm darüber hinaus jede erdenkliche, hilfreiche Unterstützung und viele anregende Diskussionen. Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihm intensiv, professionell und warmherzig begleitet. Sein kompetenter Rat und seine Hilfe kamen mir stets sehr zugute.

Mein besonderer Dank gilt auch Sina Kollert, die mich während der praktischen Phase der vorliegenden Arbeit stets unterstützte. Ihre sachkundigen Hilfestellungen und die geduldige Beantwortung meiner Fragen, haben wesentlich zur Erstellung der Arbeit beigetragen. Dank der von ihr durchgeführten Operationen der Frösche standen mir immer Oozyten für meine Messungen zur Verfügung. Dankbar anerkennen möchte ich auch die unermüdliche und professionelle Einführung in sämtliche molekularbiologische und elektrophysiologischen Anwendungen.

Für seine sachkundige und erfahrene Unterstützung bei der Planung und Durchführung dieser Arbeit und konstruktive Gespräche gilt mein Dank Dr. Frank Döring.

Darüber hinaus gilt mein Dank Katharina Gerber, die mich tatkräftig und herzlich bei der Durchführung der Mutagenese und weiteren molekularbiologischen Aufgaben unterstützte. Jederzeit war sie geduldig und freundlich bereit mir die Methodik näher zu bringen.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Riekje Winzer bedanken, die mir mit zahlreichen Tipps und Anregungen das Schreiben und damit die Fertigstellung der Dissertation unendlich erleichterte hat. Ihre gnadenlose Korrektur und konstruktive Kritik haben wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen. Herzlichen Dank für deine Freundschaft über viele hundert Kilometer hinweg.

Darüber hinaus gilt mein Dank Ole Johanns der mir zu jeder Tageszeit jede noch so abwegig erscheinende biochemische Frage hilfreich beantwortet hat und mir stets ein wertvoller und unterstützender Beistand bei auftretenden Problemen war.

Für die erfolgreiche Umsetzung sämtlicher Formatierungsvorschriften und die Beseitigung sonstiger computertechnischer Probleme gilt mein besonderer Dank meinem Bruder, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Trotz eines für sie komplett fremden Themas hat Janina Albrecht die Korrektur dieser Arbeit sehr gewissenhaft angetreten und mir wertvolle Anmerkungen zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Darüber hinaus stand sie mir stets mit freundschaftlicher Unterstützung zur Seite. Vielen Dank für die jahrelange Freundschaft.

Mein besonderer Dank gilt außerdem all denen, die mich während der gesamten Zeit immer wieder motiviert und unterstützt haben. Ohne diese Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Doch all dies wäre ohne das Vertrauen und die Unterstützung meiner Eltern nicht möglich gewesen, sie haben mir das Studium der Zahnmedizin ermöglicht und deshalb gilt ihnen der größte Dank.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Julia Christine Sturm

Publikationen

Subramanian, H., Kollert, S., Rukoyatkina, N., **Sturm, Julia**, Gambaryan, S., Stellzig-Eisenhauer, A., Meyer-Marcotty, P., Döring, F. , Eigenthaler, M., Wischmeyer, E. (2016). Disruption of G-protein signaling by PTH receptor mutants isolated from patients with primary failure of tooth eruption. Eingereicht bei PLoS ONE.