

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

**Funktionelle Charakterisierung von
Parathormon-Rezeptor Mutanten
im Xenopus Oozyten-Expressionssystem**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Stephanie Hasse

aus Erligheim

Würzburg, September 2017

Referent: Prof. Dr. Erhard Wischmeyer

Koreferent: Prof. Dr. Dr. Dr. Dipl.-Phys. Andreas Bahmer

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 19.03.2019

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Überblick.....	1
1.2 G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	1
1.2.1 Signaltransduktion über G-Proteine.....	2
1.2.2 Klassifizierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren	4
1.3 Parathormon-Rezeptoren.....	7
1.3.1 Parathormon-Rezeptor Typ 1 (PTH1R)	7
1.3.1.1 <i>Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung</i>	9
1.3.1.2 <i>Signaltransduktion</i>	10
1.3.2 Parathormon-Rezeptor Typ 2 (PTH2R)	12
1.3.3 Parathormon-Rezeptor Typ 3 (PTH3R)	12
1.4 Liganden der Parathormon-Rezeptoren.....	13
1.4.1 Parathormon (PTH)	13
1.4.2 Parathormon-verwandtes Protein (PTHrP)	15
1.4.3 Tuberoinfundibuläres Peptid aus 39 Aminosäuren (TIP39)	18
1.5 Kaliumkanäle.....	19
1.5.1 Tandemporen-Kaliumkanäle.....	20
1.5.2 TASK-1	23
1.5.3 TRESK.....	25
1.6 Zielsetzung.....	27
2. Material und Methoden	28
2.1 Materialien.....	28

2.1.1	Chemikalien.....	28
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	28
2.1.3	Verwendete Geräte und Apparaturen.....	29
2.1.4	Rezepte für Nährmedien, Puffer, Gele und Lösungen.....	30
2.1.5	Reagenziensets (Kits).....	32
2.1.6	Biologische Materialien.....	32
2.1.7	Molekularbiologische Materialien.....	33
2.1.8	Computerprogramme.....	35
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	36
2.2.1	Herstellung der Parathormon-Rezeptor Mutanten.....	36
2.2.1.1	<i>Mutagenese</i>	36
2.2.1.2	<i>Transformation</i>	38
2.2.1.3	<i>Plasmid DNA-Präparation aus 4 ml Bakterienkulturen - MINI</i>	38
2.2.1.4	<i>Sequenzierung</i>	40
2.2.1.5	<i>Plasmid DNA-Präparation aus 40 ml Bakterienkulturen - MIDI</i>	40
2.2.2	RNA-Synthese.....	41
2.2.2.1	<i>Linearisierung des Expressionsvektors</i>	41
2.2.2.2	<i>Phenol-Chloroform-Extraktion und Fällung</i>	41
2.2.2.3	<i>In-vitro Transkription</i>	42
2.3	Elektrophysiologische Methoden.....	44
2.3.1	Xenopus laevis-Oozyten als heterologes Expressionssystem.....	44
2.3.2	Vorbereitung der Xenopus laevis Oozyten.....	45
2.3.3	Das Prinzip der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC).....	46
2.3.4	Aufbau des Messplatzes.....	47
2.3.5	Spannungsprotokolle der Pulsmessungen.....	48

2.4	Auswertung der Daten	50
2.4.1	Statistik	50
2.4.2	Graphische Darstellung	50
3.	Ergebnis	51
3.1	Molekularbiologie	51
3.1.1	Herstellung der Parathormon-Rezeptor Mutanten	51
3.1.2	DNA-Sequenzierung.....	52
3.1.3	RNA-Synthese	53
3.2	Elektrophysiologie	56
3.2.1	Inhibition von TASK-1 durch den G _q -gekoppelten Rezeptor PTH1R	56
3.2.2	Koexpression von TASK-1 mit der Mutante PTH1R [P119L].....	60
3.2.3	Koexpression von TASK-1 mit der Mutante PTH1R [H442D]	62
3.2.4	Koexpression von TASK-1 mit der Mutante PTH1R [L232R] und der Mutante PTH1R [L292P]	65
3.2.5	Funktionsverlust des Parathormon-Rezeptors durch den Austausch von Aminosäuren.....	68
3.2.6	Aktivierung von TRESK durch den G _q -gekoppelten Rezeptor PTH1R	70
3.2.7	Koexpression der PTH1R-Mutanten mit TRESK	72
4.	Diskussion	74
4.1	Ursachen des Funktionsverlusts der Parathormon-Rezeptor Mutanten....	74
4.1.1	Funktionsverlust der Mutante PTH1R [P119L]	74
4.1.2	Funktionsverlust der Mutante PTH1R [H442D].....	76
4.1.3	Funktionsverlust der Mutante PTH1R [L232R]	77

4.1.4	Funktionsverlust der Mutante PTH1R [L292P]	78
4.2	Regulation von K_{2P} -Kanälen durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren	79
4.2.1	Inhibition von TASK-1 durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	79
4.2.2	Aktivierung von TRESK durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	80
4.3	Mutationen im PTH1R-Gen führen zu primären Zahndurchbruchsstörungen	82
4.3.1	Mechanismus des physiologischen Zahndurchbruchs.....	82
4.3.2	Die primäre Zahndurchbruchsstörung (PFE)	83
4.3.3	Differentialdiagnosen von Zahndurchbruchsstörungen.....	85
4.3.4	Mutationen im PTH1-Rezeptor als Ursache der primären Zahndurchbruchsstörung	85
4.3.5	Therapie der primären Zahndurchbruchsstörung	88
4.4	Weitere mit PTH1R-Mutationen vergesellschaftete Erkrankungen	89
4.4.1	Blomstrand Osteochondrodysplasie (BOCD)	89
4.4.2	Metaphysäre Chondrodysplasie Typ Jansen (JMC)	90
4.4.3	Ollier-Krankheit.....	90
4.4.4	Eiken-Syndrom	91
4.5	Ausblick.....	92
5.	Zusammenfassung	93
6.	Literaturverzeichnis	96
7.	Abbildungsverzeichnis.....	111

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
as	anti-sense
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy-DNA
cRNA	copy-RNA
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
CTP	Cytidintriphosphat
DAG	Diacylglycerol
ddH ₂ O	Reinstwasser (<i>double distilled H₂O</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DNAse	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GABA	γ-Aminobuttersäure (<i>Gamma-Aminobutyric Acid</i>)
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor (<i>G-Protein Coupled Receptor</i>)
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	<i>Homo sapiens</i>

HEK	Humane embryonale Nierenzellen (<i>Human Embryonic Kidney Cells</i>)
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K ⁺	Kalium
K _{2P}	Tandemporen-Kaliumkanal
KCl	Kaliumchlorid
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth</i> Medium
M	molare Masse
MAPK / MAP-Kinase	<i>Mitogen-Aktivated Protein-Kinase</i>
min	Minute
ml	Milliliter
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (<i>Messenger RNA</i>)
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
N-Terminus	Amino-Terminus
P	Porendomäne
PFE	primäre Durchbruchsstörung (<i>Primary Failure of Eruption</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen-Konzentration in wässriger Lösung
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic Acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>Rotations per Minute</i>)
SD	Standardabweichung (<i>Standard Deviation</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>Standard Error of the Mean</i>)
sog.	sogennant
ss	sense
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TALK	<i>TWIK-related Alkaline pH activated K⁺-channel</i>

TASK	<i>TWIK-related Acid-Sensitive K⁺-channel</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEVC	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (<i>Two-Electrode Voltage Clamp</i>)
THIK	<i>Tandem-pore domain Halothane Inhibited K⁺-channel</i>
TIP39	Tuberoinfundibuläres Peptid aus 39 Aminosäuren
TM / TMD	Transmembrandomäne
TRAAK	<i>TWIK-Related Arachidonic Acid stimulated K⁺-channel</i>
TREK	<i>TWIK-Related K⁺-channel</i>
TRESK	<i>TWIK-Related Spinal cord K⁺-channel</i>
Tricain	Ethyl3-aminobenzoate methansulfonate
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TWINK	<i>Tandem of P domains in Weak Inward rectifying K⁺-channel</i>
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>

Die Abkürzung der Aminosäuren erfolgt im Einbuchstabencode:

A Alanin	G Glycin	M Methionin	S Serin
C Cystein	H Histidin	N Asparagin	T Threonin
D Asparaginsäure	I Isoleucin	P Prolin	V Valin
E Glutaminsäure	K Lysin	Q Glutamin	W Tryptophan
F Phenylalanin	L Leucin	R Arginin	Y Tyrosin

Grundsätzlich werden die international üblichen Abkürzungen der SI-Einheiten und ihre Ableitungen verwendet.

Alle weiteren Abkürzungen werden im Text erläutert.

1. Einleitung

1.1 Überblick

Rezeptoren sind Proteinkomplexe, die sowohl über eine Erkennungs- als auch über eine Signalfunktion verfügen und so einer Zelle ermöglichen, extrazelluläre Reize zu empfangen und mit einer spezifischen Antwort auf diese zu reagieren. Auf diese Weise ist es einer Zelle in einem multizellulären Organismus möglich, Zellkommunikation mit anderen Zellen oder mit ihrer Umwelt zu betreiben und damit die physiologische Homöostase des Organismus aufrecht zu erhalten.

In eukaryotischen Zellen werden zytosolische und membranständige Rezeptoren unterschieden. Die Parathormon-Rezeptoren sind membranständige Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Zudem sind sie an G-Proteine gekoppelt und gehören zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Bis heute sind drei Parathormon-Rezeptor-Typen bekannt, ihre Liganden PTH, PTHrP und TIP39 sind Peptide bzw. Peptidhormone.

1.2 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) stellt die größte membranständige Rezeptorfamilie dar. Im menschlichen Genom wurden über 800 Gene, die für GPCRs codieren, identifiziert (Pierce et al. 2002, Hill 2006). Sie vermitteln die Effekte von vielen, sehr unterschiedlichen Liganden wie Lichtquanten, Ionen, Duftstoffen, kleinen Molekülen und Proteinen (Bockaert und Pin 1999). Diese Vielfalt spiegelt die Bedeutung der GPCRs in vielen verschiedenen physiologischen Prozessen wider und erklärt die zentrale Rolle, die GPCRs in der Medizin spielen: Viele Erkrankungen lassen sich auf Mutationen in GPCR-Genen zurückführen und etwa die Hälfte aller modernen Medikamente wirken auf GPCRs (Gilchrist 2010, Pape et al. 2014).

Obwohl GPCRs sehr unterschiedliche Primärstrukturen aufweisen, teilen sie einige gemeinsame Strukturmerkmale: Die hochkonservierte Grundstruktur wird von sieben 20-25 Aminosäuren umfassenden hydrophoben Domänen gebildet, die die Plasmamembran α -helikal durchspannen und durch je drei alternierende intra- und extrazelluläre Schleifen verbunden sind. Der Amino-Terminus befindet sich extrazellulär, der Carboxyl-Terminus intrazellulär. (Strader et al. 1994, Strader et al. 1995)

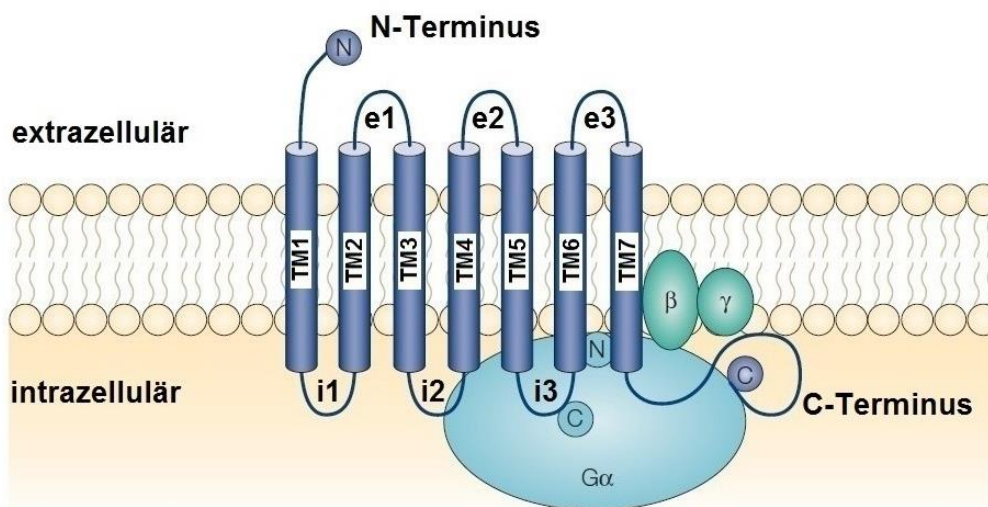


Abb. 1-1: Schematische Darstellung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors

Die Grundstruktur eines G-Protein gekoppelten Rezeptors besteht aus sieben Transmembrandomänen (TM1-TM7), welche durch je drei intra- und extrazelluläre Schleifen (i1-i3, e1-e3) verbunden sind. Weiter besitzen GPCRs einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus. Die α -Untereinheit des G-Proteins ist mit dem Rezeptor verbunden, die β - und γ -Untereinheiten sind membranständig.

Abbildung modifiziert nach Nature Reviews Drug Discovery GPCR Questionnaire Participants (2004), adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [Nat Rev Drug Discovery] Nature Reviews Drug Discovery GPCR Questionnaire Participants (2004), copyright 2004

1.2.1 Signaltransduktion über G-Proteine

GPCRs vermitteln ihre Zellantworten nicht direkt, sondern lösen über heterotrimere G-Proteine eine intrazelluläre Signalkaskade aus. Dabei werden Effektorproteine aktiviert, die ihrerseits sekundäre Botenstoffe, sog. Second Messenger, freisetzen. Erst diese vermitteln die zelluläre Antwort. Der Vorteil dieser mehrstufigen Signaltransduktion liegt in der Verstärkung des

ursprünglichen Signals. So kann ein einzelner aktivierter Rezeptor eine Vielzahl nachgeschalteter Effektoren aktivieren und damit zu einer Signalamplifikation beitragen. Zudem wird die Komplexität der Signaltransduktion durch unterschiedliche Kombination der Komponenten gesteigert. (Löffler et al. 2007)

Die membranständigen heterotrimeren G-Proteine bilden eine Unterfamilie der G-Proteine und bestehen aus einer α -, β - und γ -Untereinheit. Mindestens 37 Gene für die verschiedenen G-Proteinuntereinheiten sind in Säugertieren bekannt (Neves et al. 2002). Die β - und die γ -Untereinheit bilden eine funktionelle Einheit, die sich nur unter denaturierenden Bedingungen voneinander trennen lässt (Hamm 1998).

G-Proteine besitzen die Fähigkeit, GTP zu binden und dessen Hydrolyse in GDP zu katalysieren. Bei der Signaltransduktion dienen sie als molekulare Zeitschalter, da sie zwischen einem inaktiven und aktiven Zustand hin- und herschalten können. (Simon et al. 1991)

Im inaktiven Zustand ist das intrazellulär an den Rezeptor gebundene heterotrimere G-Protein an seiner α -Untereinheit mit GDP beladen. Wird der Rezeptor durch einen extrazellulären Liganden aktiviert, bewirkt dieser eine Konformationsänderung des Rezeptors, die zum Austausch von GDP gegen GTP an der α -Untereinheit führt. Das G-Protein wird dadurch aktiviert, dissoziiert in seine α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten und löst sich vom Rezeptor. Sowohl $G\alpha$ als auch $G\beta\gamma$ sind nun unabhängig voneinander in der Lage, synergistisch oder auch antagonistisch mit verschiedenen Effektorproteinen zu interagieren. Die Aktivierung oder Inaktivierung des Effektorproteins erfolgt durch kovalente Modifikationen, häufig durch Phosphorylierung, und führt zur Bildung von Second Messengern. Diese bewirken schließlich die zelluläre Antwort, bei der es sich beispielsweise um eine Veränderung der Genexpression, des Stoffwechsels, der Zelldifferenzierung, des Zytoskeletts und der Proliferation und Apoptose handelt.

(Simon et al. 1991, Strader et al. 1994, Löffler et al. 2007)

Die Art der zellulären Effekte hängt wesentlich vom Typ des G-Proteins ab, wobei die Effekte sowohl über G α als auch über G $\beta\gamma$ vermittelt werden können (Neves et al. 2002). Nach den unterschiedlichen α -Untereinheiten werden die heterotrimeren G-Proteine in vier Familien eingeteilt: G_s, G_{i/o}, G_{q/11} und G_{12/13} (Hepler und Gilman 1992, Hamm 1998). Diese besitzen je nach Klasse unterschiedliche Effektoren und Second Messenger, die vereinfacht in der folgenden Tabelle zusammengefasst wurden:

G-Protein Familie	Effektorprotein	Second Messenger	Beispiele Liganden
G _s -Familie	Adenylatcyclase \uparrow	cAMP \uparrow	Glucagon, Prostaglandin E2
G _i -Familie	Adenylatcyclase \downarrow	cAMP \downarrow	Glutamat, Angiotensin
G _q -Familie	Phospholipase C β \uparrow	IP ₃ \uparrow , DAG \uparrow , Ca ²⁺ \uparrow	Angiotensin, Serotonin
G _{12/13} -Familie	Rho-GEF \uparrow	Rho-Kinasen \uparrow	Thromboxan A2, Bradykinin,

Abkürzungen: cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat; IP₃: Inositol-1,4,5-trisphosphat; DAG: Diacylglycerol; Rho-GEF: Rho GTPase nucleotide exchange factor; \uparrow Aktivierung/Bildung; \downarrow Inaktivierung/Abbau
Zusammengefasst nach Löffler et al. (2007) und Siehler (2009).

1.2.2 Klassifizierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Es existieren verschiedene Klassifizierungen der GPCRs, die meist auf Sequenzhomologien innerhalb der Klassen und phylogenetischen Analysen basieren. Eine bekannte Klassifizierung ist die A-F-Klassifizierung, bei der man sechs Familien unterscheidet, wobei die Familien A-C die drei Hauptfamilien darstellen. Pheromon-Rezeptoren von Hefen bilden die kleineren Familien D (STE2-Rezeptor) und E (STE3-Rezeptor), Familie F beinhaltet wenige cAMP-Rezeptoren des Schleimpilzes *Dictyostelium Discoideum*. (Kolakowski 1994, Gether 2000)

Familie A

Die Familie der Rhodopsin / β_2 -adrenerger Rezeptor-ähnlichen Rezeptoren ist die größte und bisher am besten untersuchte GPCR-Familie. Rezeptoren dieser Familie werden von sehr unterschiedlichen Liganden aktiviert, weshalb die Mitglieder weiter in sechs Untergruppen gegliedert werden (Kolakowski 1994). Die Homologie innerhalb der Familie A ist gering und beschränkt sich auf wenige hoch konservierte Aminosäuren. Bei allen Mitgliedern findet man das DRY-Motiv am cytoplasmatischen Ende von TM3, das an der G-Protein-Aktivierung beteiligt ist (Wilbanks et al. 2002). Weitere hochkonservierte Aminosäuren liegen innerhalb der Transmembrandomänen (s. Abb. 1-2). Darüber hinaus besitzen die meisten Rezeptoren ein oder mehrere palmitoylierte Cysteinreste innerhalb des C-Terminus. Durch diese zusätzliche Membranverankerung entsteht eine 4. intrazelluläre Schleife. (Gether 2000)

Familie B

Die Familie der Glucagon-verwandten Rezeptoren umfasst etwa 20 verschiedene Rezeptoren für eine Vielzahl von Peptidhormonen und Neuropeptiden wie Glucagon, PTH, PTHrP, Calcitonin, Sekretin und VIP (vasoaktives intestinales Peptid) (Gether 2000).

Charakteristisch ist der lange, etwa 100 AS umfassende N-Terminus, der sechs hochkonservierte Cystein-Reste für die Ausbildung von Disulfidbrücken enthält (Ulrich et al. 1998). Außer der Disulfidbrücke zwischen e1 und e2, haben Rezeptoren der Familie B keine weiteren gemeinsamen Merkmale mit der Familie A, die hochkonservierten Aminosäuren innerhalb der Transmembrandomänen liegen an anderen Positionen als in Familie A (s. Abb. 1-2).

Familie C

Die Familie der metabotropen Neurotransmitter-Rezeptoren ist durch einen besonders langen N-Terminus (500-600 AS) gekennzeichnet. Weiter finden sich zwei disulfidbrückenbildende Cysteinreste zwischen e1 und e2, die die einzigen gemeinsamen konservierten Bereiche mit den Familien A und B

darstellen. Zur Familie C gehören unter anderem die metabotropen Glutamat- und GABA-Rezeptoren, Kalzium-Rezeptoren, sowie Pheromon-Rezeptoren von Säugern.

(Kolakowski 1994, Gether 2000)

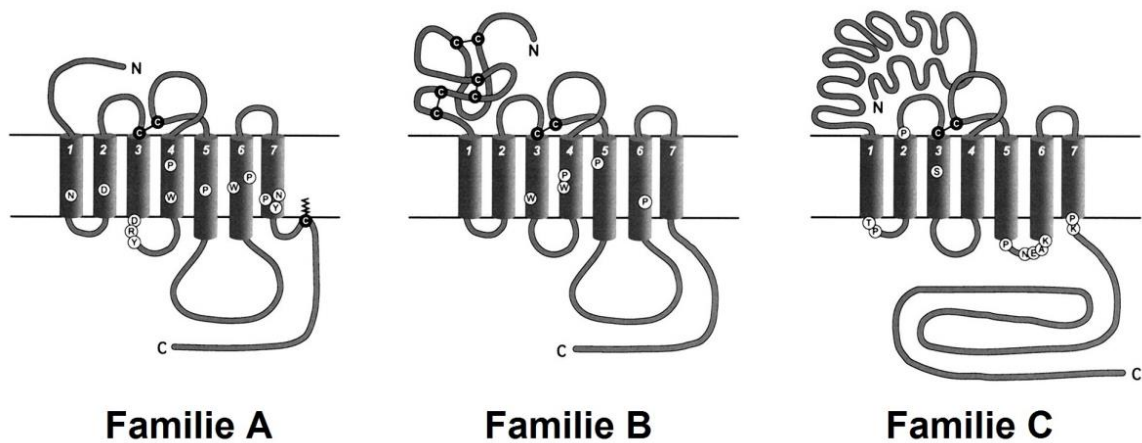


Abb. 1-2: Schematische Darstellung der drei großen GPCR-Familien A, B und C

Gekennzeichnet sind hoch konservierte Positionen (schwarze Buchstaben in weißen Kreisen), konservierte Disulfidbrücken (weiße Buchstaben in schwarzen Kreisen) und die Palmitoylierungsstelle am C-Terminus der Familie A.

Abbildung entnommen aus Gether (2000), DOI: 10.1210/edrv.21.1.0390, reprinted with permission of Oxford University Press on behalf of the Endocrine Society

1.3 Parathormon-Rezeptoren

1.3.1 Parathormon-Rezeptor Typ 1 (PTH1R)

Der Parathormon-Rezeptor Typ 1 (PTH1R), auch PTH/PTHrP-Rezeptor genannt, gehört zur Familie B der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Er wurde erstmals 1991 von Jüppner und Mitarbeitern aus Nierenzellen des Opossums geklont und charakterisiert (Jüppner et al. 1991).

Exprimiert wird der PTH1-Rezeptor vor allem in Knochen- und Nierenzellen, wo er die Kalzium- und Phosphatwirkungen des PTHs vermittelt. Aber auch in sich entwickelnden Geweben wird PTH1R exprimiert und vermittelt dort die morphogenetischen Wirkungen von PTHrP. So konnte eine PTH1R-Expression unter anderem auch in folgenden Geweben nachgewiesen werden: Aorta, Harnblase, Haut, Herz, Hirn- und Kleinhirn, Hoden, Leber, Lunge, Nebennieren, Ovar und Skelettmuskel (Urena et al. 1993).

Das PTH1R-Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 lokalisiert und besteht aus 14 kodierenden Exons. Das Rezeptorprotein wird von 593 Aminosäuren gebildet, wovon 22 Aminosäuren auf die N-terminale Signalsequenz entfallen, die jedoch während der intrazellulären Prozessierung entfernt wird. (Gardella und Vilardaga 2015)

Die N-terminale Extrazellulärdomäne ist mit etwa 190 AS (Pioszak et al. 2009, Pioszak et al. 2010) - wie für GPCRs der Familie B üblich - relativ lang, der C-Terminus umfasst etwa 130 AS (Gardella und Vilardaga 2015).

Die innerhalb der Familie B typischen sechs hochkonservierten Cysteinreste für die Ausbildung der Disulfidbrücken in der Extrazellulärdomäne liegen an den Positionen C48/C117, C108/C148 und C131/C170 (Gensure et al. 2005, Pioszak und Xu 2008). Sie stabilisieren die Sekundärstrukturelemente der Extrazellulärdomäne, welche in einer dreilagigen α - β - β α Konformation angeordnet ist und dadurch eine Tasche für die Ligandenbindung bildet (Pioszak und Xu 2008).

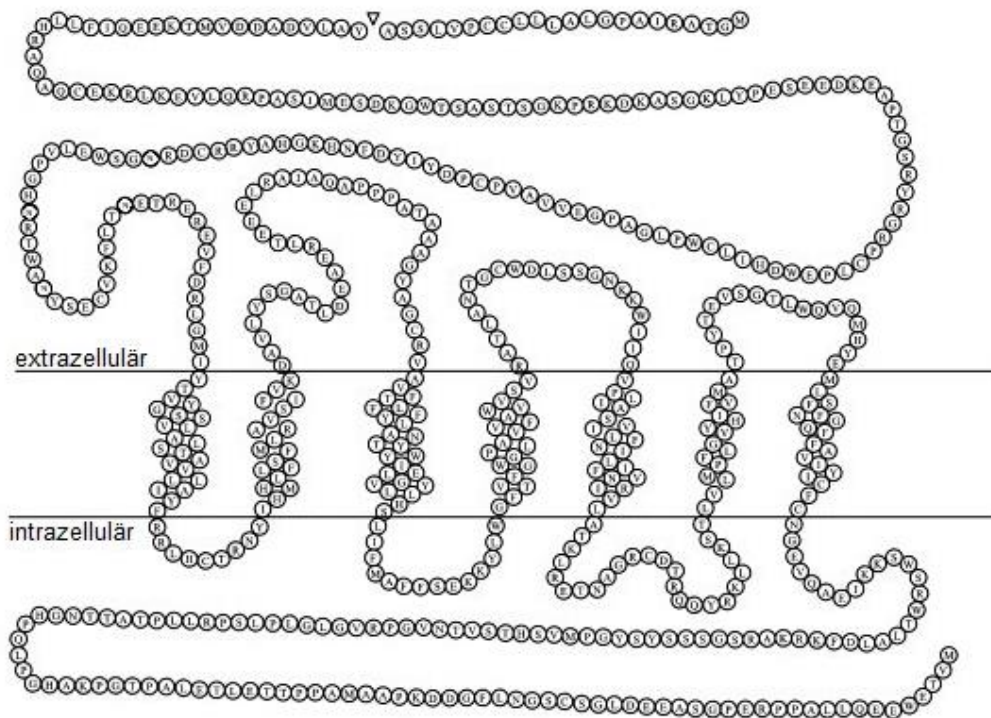


Abb. 1-3: Primärstruktur des humanen Parathormon-Rezeptor Typ 1

Dargestellt ist die Primärstruktur des hPTH1R mit der prognostizierten Lage der sieben Transmembrandomänen. Der N-Terminus befindet sich extrazellulär, der C-Terminus intrazellulär. Das Dreieck markiert die Stelle, an der die Signalsequenz abgespalten wird. Abbildung modifiziert nach Gensure et al. (2005): Reprinted from Gensure et al. (2005), Copyright (2005), with permission from Elsevier

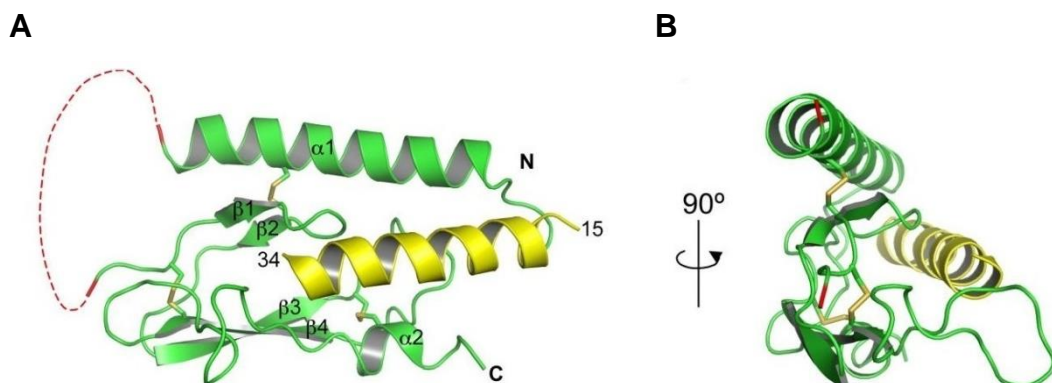


Abb. 1-4: Tertiärstruktur der Extrazellulärdomäne des hPTH1Rs mit gebundenem PTH(15-34)

Die PTH1R-Extrazellulärdomäne (grün) bildet eine dreilagige α - β - α -Konformation, in der dadurch entstehenden länglichen Tasche bindet der Ligand PTH(15-34) (gelb). Die Disulfidbrücken sind ebenfalls gelb dargestellt, die gestrichelte rote Linie deutet den nicht dreidimensional dargestellten Bereich der Extrazellulärdomäne zwischen den Aminosäuren 57 und 105 an. Abb. B entspricht der um 90° gedrehten Abb. A. Abbildung entnommen aus Pioszak und Xu (2008), Copyright (2008) National Academy of Sciences, U.S.A.

1.3.1.1 Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung

Zur Aktivierung des PTH1-Rezeptors sind die 34 Aminosäuren langen N-terminalen Fragmente von PTH als auch von PTHrP ausreichend. Sie binden mit hoher Affinität an den Rezeptor und bewirken eine komplette Signalantwort. (Mannstadt et al. 1999, Gardella und Juppner 2000)

Durch Studien an mutierten und trunkierten Liganden konnte herausgefunden werden, welche Bereiche für die Bindung und Aktivierung des Rezeptors verantwortlich sind. So sind Bereiche innerhalb des Fragments (15-34) entscheidend für die Rezeptorbindung, während dem Fragment (1-14) die Rezeptoraktivierung zugeschrieben wird (Gardella und Vilardaga 2015).

Das Fragment (7-34) stellte sich dagegen als effektivster Antagonist heraus, welcher zwar mit hoher Affinität an den Rezeptor bindet, aber keine Signalantwort auslöst (Horiuchi et al. 1983, Rosenblatt 1986, Nutt et al. 1990).

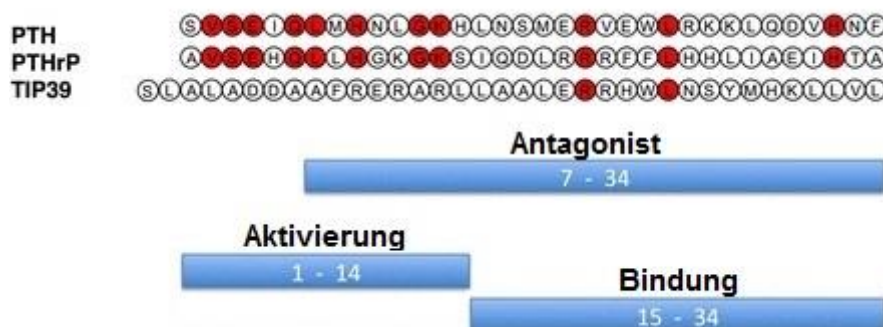


Abb. 1-5: Aminosäuresequenzen der Liganden PTH, PTHrP und TIP39

Dargestellt sind die N-terminalen Aminosäuresequenzen von PTH, PTHrP und TIP39, sowie die Mindestlängen der PTH-Fragmente, die für die Aktivierung des PTH1-Rezeptors (PTH(1-14)), die Bindung an den Rezeptor (PTH(15-34)) und die Hemmung des Rezeptors (PTH(7-34)) nötig sind. Farblich hervorgehoben sind des Weiteren alle homologen Aminosäuren. Abbildung modifiziert nach Gardella und Vilardaga (2015), with permission from The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics

Die Bindung der Liganden an den Rezeptor erfolgt in zwei Schritten und kann in einem vereinfachten Modell, dem „Two-Site“-Bindungsmodell, beschrieben werden: So bindet als erstes der C-terminale Abschnitt des Fragments (1-34), der die Bindungsdomäne darstellt, an den N-terminalen Bereich der Extrazellulärdomäne (sog. N-Domäne). Im zweiten Schritt interagiert der

N-terminale Abschnitt des Liganden, der die Bereiche der Rezeptoraktivierung beinhaltet, mit den sieben Transmembrandomänen und den extrazellulären Schleifen (sog. J-Domäne) des PTH1Rs. (Castro et al. 2005, Gardella und Vilardaga 2015)

PTH und PTHrP binden dabei als amphipatische α -Helices in der länglichen Rezeptor-Tasche, die durch die oben beschriebene α - β - β - α -Konformation der Extrazellulärdomäne entsteht. Die Bindung erfolgt bei PTH und PTHrP zwar nicht identisch, aber sehr ähnlich. (Pioszak und Xu 2008, Pioszak et al. 2009)

Die initiale Bindung des Agonisten erfolgt sehr schnell (140 ms), während die Aktivierung des Rezeptors einer langsameren Kinetik (~ 1 s) folgt (Castro et al. 2005).

Die Aktivierung des Rezeptors führt schließlich zu einer komplexen Konformationsänderung der Transmembrandomänen und der intra- und extrazellulären Schleifen, die zur Folge hat, dass die zytoplasmatischen Abschnitte des Rezeptors für G-Proteine zugänglicher werden (Gether 2000).

Für die Transmembrandomänen und die verbindenden Schleifen konnte die Kristallstruktur im Gegensatz zur Extrazellulärdomäne bis heute noch nicht aufgeklärt werden.

1.3.1.2 Signaltransduktion

Der aktivierte PTH1-Rezeptor löst nun eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die vorrangig über die α -Untereinheit eines stimulierenden G-Proteins, $G\alpha_s$, eingeleitet wird (Schwindinger et al. 1998, Gensure et al. 2005, Gardella und Vilardaga 2015). $G\alpha_s$ aktiviert die membranständige Adenylatcyclase, welche die Bildung des Second Messengers cAMP aus ATP katalysiert. Schließlich kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). (Löffler et al. 2007)

Der PTH1R nutzt jedoch auch weitere Signalwege: Dazu gehört der Signalweg über $G\alpha_q$ (Offermanns et al. 1996, Pines et al. 1996), welches die Phospholipase C β aktiviert, wodurch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) hydrolysiert wird. Dies führt zur Freisetzung intrazellulär gespeicherten Kalziums durch IP₃

sowie zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch DAG und Ca^{2+} (Löffler et al. 2007).

Auch der $\text{G}\alpha_{12}$ - und $\text{G}\alpha_{13}$ -Signalweg, bei der RhoA-abhängig die Phospholipase D (PLD) aktiviert wird (Singh et al. 2005), sowie MAP-Kinase-Signalkaskaden (Gesty-Palmer et al. 2006) gehören zu den von PTH1R genutzten Signalwegen, letztere über G-Protein-abhängige als auch -unabhängige Mechanismen.

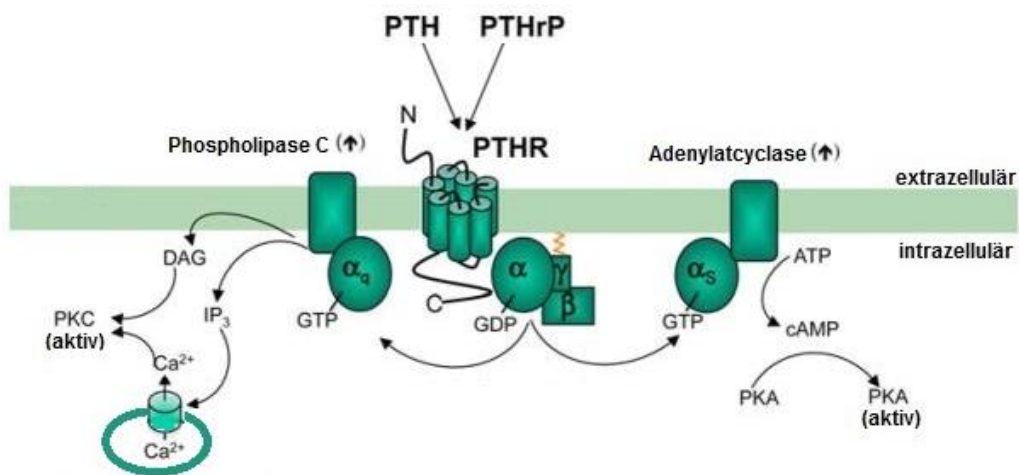


Abb. 1-6: Schema der intrazellulären Signalkaskaden des PTH1R

PTH1-Rezeptor koppelt nach Bindung von PTH oder PTHrP sowohl an $\text{G}\alpha_s$ (links abgebildet) als auch $\text{G}\alpha_q$ (rechts abgebildet), welche die klassischen Signalwege des PTH1R darstellen. Die Signalkaskaden sind im Text erläutert.

Abbildung modifiziert nach Vilardaga et al. (2011), Fig. 2; with permission of Springer

1.3.2 Parathormon-Rezeptor Typ 2 (PTH2R)

Mit dem PTH2-Rezeptor wurde 1995 von Usdin und Mitarbeitern ein weiterer Parathormon-Rezeptor entdeckt, der ebenfalls zur Familie B der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehört. Northern Blots von humaner mRNA zeigen, dass PTH2R vor allem im Gehirn, Pankreas, Hoden und der Plazenta exprimiert wird (Usdin et al. 1995).

Vergleicht man die Aminosäuresequenz des PTH1-Rezeptors mit der des PTH2-Rezeptors, so ist der PTH2R mit 550 AS um 43 AS kürzer und zeigt eine Sequenzübereinstimmung von etwa 50% (Usdin et al. 1995, Mannstadt et al. 1999). Erste funktionelle Studien an humanen PTH2-Rezeptoren in HEK-293 und COS-7 Zellen zeigten eine Aktivierung durch PTH, nicht aber durch PTHrP (Usdin et al. 1995, Behar et al. 1996). Nachfolgende Untersuchungen an PTH2-Rezeptoren, die aus der Ratte isoliert wurden, zeigten jedoch, dass PTH am PTH2-Rezeptor der Ratte ein schwächerer Ligand ist, als am humanen PTH2R (Hoare et al. 1999). Dies führte zu dem Schluss, dass es einen weiteren endogenen Liganden für PTH2R geben muss, welcher noch im selben Jahr mit der Entdeckung von TIP39 (Usdin et al. 1999) gefunden wurde.

1.3.3 Parathormon-Rezeptor Typ 3 (PTH3R)

Der PTH3-Rezeptor wurde 1999 von Rubin und Jüppner aus dem Zebrafisch isoliert: Der Rezeptor besteht aus 542 Aminosäuren und zeigt eine Homologie von 67% mit hPTH1R und 59% mit hPTH2R. Er interagiert bevorzugt mit hPTHrP statt mit hPTH. (Rubin und Jüppner 1999)

Der PTH3-Rezeptor kommt nur in Vögeln und Fischen vor, nicht aber in Säugern. Weiter konnte bislang auch weder eine biologische Funktion, noch ein entsprechender Ligand identifiziert werden. (Gardella und Vilaradaga 2015)

1.4 Liganden der Parathormon-Rezeptoren

1.4.1 Parathormon (PTH)

Das Parathormon (PTH, Synonym: Parathyrin) ist der namensgebende Ligand des Parathormon-Rezeptors. Es ist ein Peptidhormon aus 84 AS, das in den Hauptzellen der Nebenschilddrüsen (*Glandulae parathyroideae*) gebildet wird. Sein Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 lokalisiert (Philbrick et al. 1996).

Die PTH-Synthese erfolgt, wie auch bei anderen Peptidhormonen üblich, zunächst als 115 AS langes Prä-Pro-PTH. Durch die cotranslationale Abspaltung der 25 AS langen Prä-Sequenz am N-Terminus im rauen endoplasmatischen Retikulum und anschließend der 6 AS umfassenden Pro-Sequenz im Golgi-Apparat entsteht schließlich das intakte PTH (PTH(1-84)). (Habener et al. 1978, Mannstadt et al. 1999, Friedman 2004)

Die Sekretion wird abhängig von der Konzentration an ionisiertem Kalzium im Blutplasma über sog. Ca^{2+} -Sensing Rezeptoren auf den Nebenschilddrüsenzellen reguliert (Brown et al. 1993). Dabei handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die bei niedrigen Plasmakalziumspiegeln aktiviert werden und in der Folge die PTH-Synthese und die Exozytose der Sekretvesikel steigern. Bei einem hohen Plasmakalziumspiegel wird die PTH-Sekretion dagegen entsprechend einer negativen Rückkopplung gehemmt. (Löffler et al. 2007)

Die Halbwertszeit von intaktem PTH im Blutkreislauf beträgt durch den Abbau in den Kupffer'schen Zellen der Leber und den Tubuluszellen der Nieren nur wenige Minuten (Hruska et al. 1981, Bringhurst et al. 1988), unter *in-vitro* Bedingungen ist PTH dagegen über 72h stabil (Rickard et al. 2006).

Die physiologische Wirkung erfolgt schließlich über PTH-Rezeptoren, wobei zur Rezeptoraktivierung das 34 AS lange N-terminale Fragment (PTH (1-34)) ausreichend ist (Mannstadt et al. 1999).

In Säugern ist PTH der wichtigste Regulator der Kalziumhomöostase. Die Konzentration des Gesamtkalziums im Serum beträgt 2,1-2,6 mmol/l, davon liegt etwa die Hälfte ionisiert vor (Silbernagl und Despopoulos 2007). Über verschiedene Mechanismen in Niere, Darm und Knochen bewirkt PTH die Wiederanhebung eines zuvor abgesunkenen Kalziumspiegels:

Im distalen Tubulus der Nieren stimuliert PTH die Rückresorption von Kalzium aus dem Primärharn. Gleichzeitig hemmt PTH auch die Rückresorption von Phosphat im proximalen Tubulus. Der Abfall der Phosphatkonzentration im Plasma führt dadurch zu einem Anstieg der Kalziumkonzentration, da die Konzentrationen von freiem Kalzium und freiem Phosphat mit ihrem Produkt Kalziumphosphat im reversiblen Gleichgewicht stehen. (Lüllmann-Rauch 2006, Löffler et al. 2007)

In der Niere aktiviert PTH die 1α -Hdroxylase, ein Enzym der Calcitriol-Biosynthese, und verstärkt damit indirekt die Calcitriol-abhängige Kalziumresorption im Dünndarm (Lüllmann-Rauch 2006, Pape et al. 2014).

Im Knochen, der mit 99% fast das gesamte Kalzium des Körpers enthält, steigert PTH die Resorption von mineralisiertem Knochenmaterial, was zur Kalziumfreisetzung führt (Silbernagl und Despopoulos 2007). Die Hauptwirkung wird dabei jedoch nicht von den Knochen-abbauenden Osteoklasten vermittelt, sondern vielmehr von den Osteoblasten, die die Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen zu Osteoklasten stimulieren: So sezernieren Osteoblasten, die den PTH-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren, PTH-abhängig den Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL), ein Protein aus der Familie der Tumornekrosefaktoren. Dieser bindet an seinen Rezeptor RANK, der von den Osteoklasten-Vorläuferzellen exprimiert wird, was die Differenzierung der Osteoklasten-Vorläufer zu Osteoklasten induziert.

(Teitelbaum 2000, Keck und Pecherstorfer 2003)

Neben dieser osteokatabolen Wirkung, kann PTH auch osteoanabol wirken. Dieser Effekt wurde bereits 1932 von Selye beschrieben und wird ausschließlich durch eine intermittierende Gabe von PTH hervorgerufen. Der

genaue Mechanismus ist noch immer nicht vollständig geklärt, zu Grunde liegt aber eine Zunahme der Osteblastenzahl. Pharmakologisch wird dieser Effekt zur Behandlung von schwerer Osteoporose genutzt. Seit 2003 ist PTH(1-34) dafür unter der Wirkstoffbezeichnung Teriparatid in Deutschland zugelassen. (Dobnig 2004)

1.4.2 Parathormon-verwandtes Protein (PTHrP)

Das Parathormon-verwandte Protein (Parathyroid Hormone-related Protein, PTHrP) ist ein weiterer Ligand des PTH1-Rezeptors. Es trägt seinen Namen aufgrund seiner hohen strukturellen Homologie zu PTH im N-terminalen Aminosäurenbereich, sowie durch seine PTH-ähnliche Wirkung auf Knochen und Nieren.

Das PTHrP-Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 lokalisiert und besteht aus acht Exons, deren Expression von drei unterschiedlichen Promotoren reguliert wird (Philbrick et al. 1996). Durch alternatives Spleißen entstehen unterschiedliche mRNA-Transkripte, die für drei verschiedene humane PTHrP-Isoformen mit 139, 141 oder 173 Aminosäuren codieren (Yasuda et al. 1989).

PTHrP zeigt zu PTH eine Sequenzhomologie von acht Aminosäuren im Bereich (1-14) und drei Aminosäuren im Bereich (15-34) (s. Abb. 1-5). Im weiteren Sequenzverlauf liegen keine weiteren Übereinstimmungen vor (Philbrick et al. 1996).

Wie auch beim PTH ist für eine vollständige Aktivierung des PTH1-Rezeptors das N-terminale Fragment (1-34) ausreichend (Kemp et al. 1987). Es konnte gezeigt werden, dass die Bindungsaffinität zum Rezeptor für PTHrP (1-36) und PTH (1-34) identisch ist und eine Ligandenbindung in beiden Fällen dieselben intrazellulären Signalwege auslöst (Abou-Samra et al. 1992). In der Vergangenheit wurde daher für diese Abschnitte eine gemeinsame Tertiärstruktur angenommen (Philbrick et al. 1996), neuere Röntgenstrukturanalysen zeigen, dass PTH und PTHrP im Aminosäurenbereich (15-34) tatsächlich ähnliche Konformationen, nämlich eine amphipatische

α -Helix, einnehmen, wenn sie an den Rezeptor binden (Pioszak und Xu 2008, Pioszak et al. 2009, Gardella und Vilardaga 2015).

PTHrP wurde 1987 erstmals in Verbindung mit Untersuchungen am Syndrom der Tumorhyperkalzämie aus Karzinomzellen isoliert (Burtis et al. 1987, Moseley et al. 1987, Strewler et al. 1987). Bei der Tumorhyperkalzämie (Humoral Hypercalcemia of Malignancy, HHM) handelt es sich um ein paraneoplastisches Syndrom, bei dem solide Tumoren PTHrP in den Kreislauf sezernieren, welches dann durch seine PTH-ähnliche Wirkung eine Hyperkalzämie und die damit verbundenen klinischen Symptome hervorruft (Kanaji et al. 2014). Eine HHM tritt bei etwa 5-10% aller Tumorpatienten auf (Strewler und Nissenson 1990).

Neben dieser pathologischen Funktion, die endokrin vermittelt wird, finden sich auch physiologische Funktionen von PTHrP, die überwiegend parakrin oder autokrin vermittelt werden. Eine Vielzahl verschiedener Gewebe synthetisiert und exprimiert PTHrP. Dazu gehören die Haut, Blutgefäße, glatte Muskulatur, Zahnknospen, Chondrozyten der Wachstumsfugen, Knochen, Nieren, Neuronal- und Gliagewebe (Datta und Abou-Samra 2009). Andere Autoren sprechen davon, dass PTHrP im Laufe des Lebens in jedem Gewebe und Organ des Körpers zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Fetalentwicklung oder im Erwachsenenleben einmal exprimiert wird (Philbrick et al. 1996).

Auf die bedeutende Rolle von PTHrP in der Entwicklung weisen unter anderem die Studien an Knock-out Mäusen von Karaplis und Mitarbeitern (1994) hin: Mäuse, die homozygot auf PTHrP-Null-Mutationen waren, starben nach ihrer Geburt und zeigten skelettale Deformierungen mit vorzeitiger Chondrozytendifferenzierung und akzelerierter Knochenbildung.

Im Skelett ist PTHrP an der Regulation der enchondralen Ossifikation beteiligt. Das von unreifen Chondrozyten sezernierte PTHrP aktiviert die auf proliferierenden Chondrozyten exprimierten PTH1-Rezeptoren. In der Folge werden die Chondrozyten länger in der Proliferationsphase gehalten und ihre Differenzierung in hypertrophe Zellen wird verzögert. Dabei resultiert ein

Längenwachstum der Röhrenknochen an der epiphysären Wachstumsfuge. (Kronenberg 2006)

Die aus zahnärztlicher Sicht wichtigste Funktion hat PTHrP beim Zahndurchbruch, dem Herauswachsen des vollständig von Knochen umgebenen Zahns in die Mundhöhle (Philbrick et al. 1998). Zwar ist der genaue Mechanismus noch unklar, die Voraussetzung, dass Osteoklasten, den Knochen über der Zahnkrone resorbieren müssen, um einen Durchbruchsweg zu schaffen, ist dagegen unbestritten (Marks und Schroeder 1996).

So konnten Philbrick und Mitarbeiter zu Beginn des Zahndurchbruchs erhöhte Expressionen von PTHrP im Schmelzepithel und von PTH1R im angrenzenden Zahnmesenchym und Alveolarknochen nachweisen. Bei PTHrP-Knock-out-Mäusen, bei denen PTHrP ausschließlich in den Chondrozyten exprimiert wird um letale Fehlbildungen zu verhindern, bildete sich dagegen kein Durchbruchsweg. (Philbrick et al. 1998). Nakchbandi und Mitarbeiter konnten zeigen, dass PTHrP für die Formierung der Osteoklasten erforderlich ist. Fehlt PTHrP oder führt die Bindung von PTHrP an seinen Rezeptor nicht zu der gewünschten Rezeptorantwort, so formieren sich im weiteren Verlauf des Zahndurchbruchs keine Osteoklasten, der Zahndurchbruch misslingt und der Zahn bleibt impaktiert. (Nakchbandi et al. 2000)

Warum dieser PTHrP-Funktionsverlust bei betroffenen Patienten nur auf den Zahndurchbruch beschränkt ist, während andere Funktionen von PTHrP und PTH1R physiologisch ablaufen, ist derzeit noch unklar.

Eine weitere Rolle spielt PTHrP unter anderem beim Wachstum und der Differenzierung der Haut (Wysolmerski et al. 1994) und der Brustdrüse (Hens und Wysolmerski 2005), bei der Regulation des transepithelialen Kalziumtransports in der Plazenta, wobei dieser nicht durch PTH1R vermittelt wird (Kovacs et al. 1996), sowie bei der Relaxation von glatter Muskulatur, wo PTHrP als Antwort auf mechanische Dehnung exprimiert wird (Yamamoto et al. 1992). In Blutgefäßen wird so durch eine PTHrP-vermittelte Muskelrelaxation eine Vasodilatation hervorgerufen, die zur Senkung des Blutdrucks führt (Massfelder und Helwig 1999).

1.4.3 Tuberoinfundibuläres Peptid aus 39 Aminosäuren (TIP39)

Das dritte Mitglied der PTH-Ligandenfamilie ist das Tuberoinfundibuläre Peptid aus 39 Aminosäuren (TIP39), welches auch als PTH2 bezeichnet wird. Es wurde 1999 von Usdin und Mitarbeitern aus dem Hypothalamus des Rindes isoliert, 2002 wurde das humane TIP39-Gen von John und Mitarbeitern identifiziert. Obwohl TIP39 nur eine begrenzte Sequenzhomologie zu PTH zeigt, ist die dreidimensionale Struktur ähnlich (Piserchio et al. 2000).

TIP39 ist ein PTH2-Rezeptor-Agonist und bindet auch an den PTH1-Rezeptor, wirkt an diesem jedoch als schwacher Antagonist (Gensure et al. 2005). Auch die Bindungsaffinität ist an PTH2R etwa 20fach höher als an PTH1R (Hoare et al. 2000a).

Eine hohe Genexpression wurde beim Menschen im Gewebe des zentralen Nervensystems, in der Trachea und der fetalen Leber, sowie in geringerem Maße in Herz und Niere nachgewiesen (Hansen et al. 2002). Sezerniert wird TIP39 im adulten Gehirn der Ratte von Zellen des Thalamus, Hypothalamus und des Truncus cerebri (Dobolyi et al. 2003). Hinweise auf mögliche biologische Funktionen von TIP39 geben Untersuchungen am Ratten- und Mausmodell: So wird TIP39 unter anderem eine neuroendokrine Rolle in der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren- und der Hypothalamus-Hypophysen-Gonadenachse (Ward et al. 2001), sowie eine auto- oder parakrine Rolle in der Spermatogenese (Usdin et al. 2008) zugeschrieben. Weitere Studien deuten auch auf eine Rolle in der Nozizeption (Dobolyi et al. 2002) und Thermoregulation (Dimitrov et al. 2011) hin.

1.5 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle sind Transmembranproteine, die Poren durch die lipophile und hydrophobe Zellmembran bilden. Sie ermöglichen so selektiv den passiven Transport von Kalium-Ionen entlang eines elektrochemischen Gradienten von einer Membranseite zur anderen.

Kaliumkanäle sind mit ca. 80 Kanalproteinen (Pape et al. 2014) die größte und zugleich vielfältigste Gruppe aller bekannten Ionenkanäle. Sie kommen sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Zellen vor und stammen phylogenetisch von einer gemeinsamen Urform ab (Derst und Karschin 1998).

Im menschlichen Organismus finden sich Kaliumkanäle in jeder einzelnen Zelle (Sano et al. 2003). Sie sind daher an einer Vielzahl von Prozessen im Körper beteiligt. Dazu gehören außer der Kaliumhomöostase und Membranerregbarkeit beispielsweise auch die Osmoregulation, Signaltransduktion und Sekretionsprozesse (Derst und Karschin 1998).

Allen bisher geklonten Kaliumkanälen gemeinsam ist, dass ihre Untereinheiten eine konservierte Sequenz von acht Aminosäuren (TXXTXGY/FG) besitzen, die als Selektivitätsfilter den spezifischen Kaliumtransport ermöglicht (Heginbotham et al. 1994). Sie ist Teil der Porendomäne (P), welche sich stets neben zwei Transmembrandomänen (TM) befindet. Nach der Anzahl weiterer Transmembrandomänen lassen sich Kaliumkanäle in drei Strukturklassen einteilen (Gutman et al. 2003):

Die Untereinheiten der ersten Klasse bestehen aus sechs Transmembrandomänen und einer Porendomäne (6TM/1P). Es handelt sich um spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_v) und Kalzium-aktivierte Kaliumkanäle (K_{Ca}).

Die zweite Klasse umfasst die einwärtsgerichteten (K_{ir}), die ATP-sensitiven (K_{ATP}) und die G-Protein-gekoppelten Kaliumkanäle. Ihre Untereinheiten bestehen aus zwei Transmembrandomänen und einer Porendomäne (2TM/1P). Funktionelle Kanäle entstehen dabei erst durch die Zusammenlagerung von vier Untereinheiten zu Tetrameren.

Bei der dritten Klasse handelt es sich um die sogenannten Tandemporen- oder auch Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle (K_{2P} -Kanäle), deren Untereinheiten aus vier Transmembrandomänen und zwei Porendomänen (4TM/2P) bestehen. Funktionelle Kanäle entstehen hier aus Dimeren. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kanäle TASK-1 und TRESK sind Mitglieder dieser Strukturklasse.

1.5.1 Tandemporen-Kaliumkanäle

Durch die Analyse verschiedener Prokaryotengenome wurde 1995 mit TOK1 der erste Tandemporen-Kanal in der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt. Besonders war, dass die Untereinheiten des Kanals erstmals in einem Protein zwei P-Domänen mit der für Kaliumkanäle typischen konservierten Aminosäuresequenz, sowie acht Transmembrandomänen aufwies. Die Expression des TOK1-Gens in *Xenopus laevis* Oozyten zeigte funktionell einen auswärts gleichgerichteten Kaliumstrom. (Ketchum et al. 1995)

Im folgenden Jahr konnten die Gene für ähnliche Untereinheiten (4TM/2P) aus dem neuromuskulären Gewebe der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Goldstein et al. 1996) und mit TWIK-1 auch die Gene für den ersten K_{2P} -Kanal beim Säuger geklont und untersucht werden (Lesage et al. 1996a).

Die humanen Tandemporen-Kaliumkanalproteine bestehen aus 307 bis 499 Aminosäuren (Lesage und Lazdunski 2000), besitzen jedoch nur eine geringe Sequenzhomologie von 19-58% (Lesage und Lazdunski 2000, Sano et al. 2003). Ihre gemeinsamen Strukturmerkmale sind die vier Transmembrandomänen und zwei Porendomänen mit der Anordnung TM1-P1-TM2-TM3-P2-TM4. Weiter besitzen sie einen kurzen zytosolischen N-Terminus und einen langen, ebenfalls zytosolischen C-Terminus. (Karschin 2001)

Zwischen den Segmenten TM1 und P1 befindet sich ein auffallend großer, konservierter extrazellulärer Aminosäureabschnitt, der bei der Dimerisation von Bedeutung ist, da diese über Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten dieses extrazellulären Loops erfolgt (Lesage et al. 1996b).

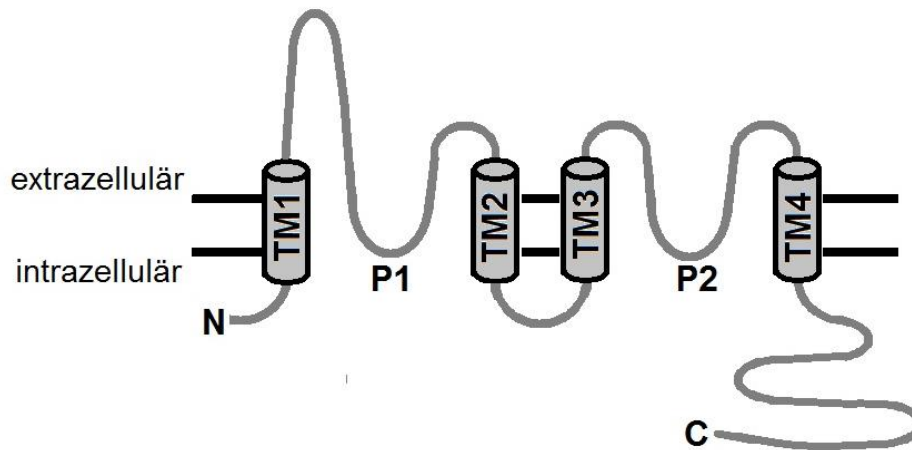
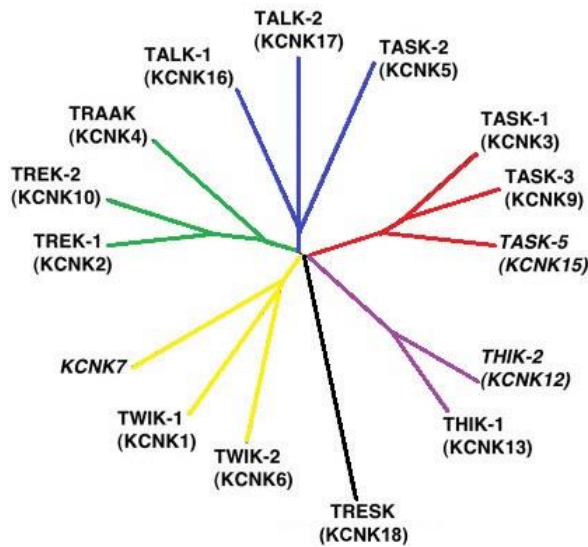


Abb. 1-7: Membrantopologie eines Tandemporen-Kaliumkanals

Schematische Darstellung einer Untereinheit. Die beiden porenbildenden Domänen P1 und P2 werden je von zwei als graue Zylinder dargestellte Transmembrandomänen (TM1-TM4) flankiert.

Bis heute sind beim Menschen 15 verschiedene Gene für K_{2P} -Kanäle bekannt. Die Nomenklatur dieser K^+ -Kanal-Klasse ist jedoch uneinheitlich. Gängig sind sowohl die Gen-basierten Namen KCNK 1-18 der Human Genome Organization (HUGO), die die Reihenfolge ihrer Entdeckung wiedergeben, als auch die in der Literatur häufig verwendeten Akronyme, die sich auf pharmakologische und funktionelle Eigenschaften der einzelnen Kanäle beziehen (O'Connell et al. 2002). Hier werden weiter die sechs Untergruppen TWIK, TREK, TASK, TALK, THIK und TRESK unterschieden. Die Einteilung erfolgt dabei entsprechend der Sequenzhomologie (Lotshaw 2007), weshalb beispielsweise TASK-2, der nur 33% Sequenzübereinstimmung mit TASK-1 besitzt (Buckingham et al. 2005), trotz seiner Säuresensitivität nicht zur TASK-Untergruppe, sondern zur TALK-Untergruppe gehört.

A**B**

TWIK -	Tandem of P domains in W eak I nward rectifying K ⁺ -channel
TREK -	T WIK-Related K ⁺ -channel
TASK -	T WIK-related A cid- S ensitive K ⁺ -channel
TALK -	T WIK-related A lkaline pH activated K ⁺ -channel
THIK -	T andem-pore domain H alothane I nhibited K ⁺ -channel
TRESK -	T WIK-Related S pinal cord K ⁺ -channel
TRAAK -	T WIK-Related A rachidonic A cid stimulated K ⁺ -channel *

Abb. 1-8: Phylogenetischer Stammbaum der humanen Tandemporen-Kaliumkanäle und Decodierung der Akronyme

A: Die 15 humanen K_{2P} -Kanäle werden in die farblich gekennzeichneten Untergruppen (s. Text) unterteilt. Es sind sowohl die Akronyme als auch die Gen-basierten Namen angegeben. Die Kanäle KCNK8, KCNK11 und KCNK14 existieren nicht (Enyedi und Czirjak 2010). Das Genprodukt von KCNK7 hat sich bisher nicht als funktionaler Kanal erwiesen (Goldstein et al. 2005)
Abbildung erstellt in Anlehnung an Liu et al. (2004) und Kindler und Yost (2005)

B: Decodierung der Akronyme nach Lotshaw (2007); * TRAAK gehört zur TREK-Gruppe und stellt selbst keine Untergruppe der K_{2P} -Kanäle dar.

Tandemporen-Kaliumkanäle werden besonders stark in Neuronen exprimiert, kommen aber auch in vielen anderen erregbaren und nicht-erregbaren Zellen von Eukaryoten vor (Talley et al. 2001, O'Connell et al. 2002 (Tab. 1)).

Mit ihrer Entdeckung wurde das molekulare Korrelat der bereits Mitte des 20. Jahrhunderts beschriebenen Hintergrundströme in erregbaren Membranen gefunden (Hodgkin et al. 1952). Hintergrundleitfähigkeiten beeinflussen die Erregbarkeit von Zellmembranen, indem sie die Länge, Frequenz und Amplitude von Aktionspotentialen kontrollieren und entscheidend zur Stabilisation des Ruhemembranpotentials beitragen (Goldstein et al. 2001).

K_{2P} -Kanäle erzeugen einen spannungs- und zeitunabhängigen Strom, der unter symmetrischen Kaliumkonzentrationen beidseits der Membran eine lineare Strom-Spannungskurve zeigt (Patel und Honore 2001). Unter physiologischen Bedingungen, also bei hoher intrazellulärer und niedriger extrazellulärer K^+ -Konzentration, lässt sich die Strom-Spannungskurve dagegen mit der

Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung für offene Gleichrichter beschreiben, der Kaliumfluss ist dann entsprechend dem Konzentrationsgefälle auswärtsgerichtet. K_{2P} -Kanäle verhalten sich also wie ein K^+ -selektives Loch in einem elektrischen Feld, weshalb sie auch „Leak Channels“ genannt werden. (Goldstein et al. 2001, Hille 2001, O'Connell et al. 2002)

Untersuchungen zeigen jedoch, dass die „offenen Gleichrichter“ nicht immer offen sind, sondern ihre Aktivität auf sehr komplexe Weise regulieren. Es bestehen zwar Unterschiede zwischen den verschiedenen Untergruppen, als wichtige Regulatoren sind jedoch unter anderem zu nennen:

- pH-Änderungen (Duprat et al. 1997, Rajan et al. 2000),
- Änderung des Sauerstoffpartialdrucks (Buckler et al. 2000, Kim et al. 2009)
- Wärme (Maingret et al. 2000a, Kang et al. 2005),
- mechanische Dehnung der Zellmembran (Patel et al. 1998, Xian Tao et al. 2006),
- ungesättigte Fettsäuren und Lysophospholipide (Lesage et al. 2000, Maingret et al. 2000b),
- Inhalations- und Lokalanästhetika (Kindler et al. 1999, Patel et al. 1999, Talley und Bayliss 2002) oder
- Neurotransmitter über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (s. Kapitel 1.5.2 und 1.5.3)

1.5.2 TASK-1

Der TASK-1 Kanal (TWIK-related Acid Sensitive K⁺-channel) umfasst 395 Aminosäuren und wurde erstmals 1997 von Duprat und Mitarbeitern beschrieben.

Unter physiologischen Bedingungen zeigt TASK-1 mit einem auswärtsgleichrichtenden zeit- und spannungsunabhängigen Strom die typischen Eigenschaften eines K_{2P} -Kanals. Sein Name leitet sich von seiner Säuresensitivität ab, da der Kanal bereits innerhalb physiologischer Bereiche hochsensibel auf extrazelluläre pH-Änderungen reagiert: So erreicht TASK-1

bei einem extrazellulären pH-Wert von 7,7 90 % seiner maximalen Stromstärke, bei pH 6,7 jedoch nur noch 10 %. (Duprat et al. 1997)

TASK-1 lässt sich zudem durch Hypoxie inhibieren (Buckler et al. 2000), aktiviert wird er dagegen durch extrazelluläre Alkalisierung (Duprat et al. 1997) und durch klinisch relevante Konzentrationen von Inhalationsanästhetika wie Halothan und Isofluran (Patel et al. 1999, Sirois et al. 2000, Talley und Bayliss 2002).

Entscheidend für die Auswahl von TASK-1 für die vorliegende Arbeit ist die Tatsache, dass auch verschiedene Neurotransmitter über G-Protein gekoppelte Rezeptoren in der Lage sind, den TASK-Strom zu hemmen. Dies konnte für eine Vielzahl von Rezeptoren gezeigt werden, die alle an G-Proteine der $G\alpha_q$ -Familie koppeln, darunter die TRH-, Serotonin- und Glutamat-Rezeptoren (Talley et al. 2000, Chemin et al. 2003).

Über welche Signalwege das aktivierte $G\alpha_q$ -Protein letztendlich mit dem Kanal interagiert, konnte bisher nicht geklärt werden. Diskutiert werden unter anderem eine durch die Hydrolyseprodukte von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) vermittelte Kanalinhibition, sowie eine durch den PIP_2 -Abbau vermittelte, als auch eine direkte Kanalinhibition durch das aktivierte $G\alpha_q$ -Protein (Mathie 2007 (Abb. 2)). Für andere Autoren ist auch ein alternativer, bisher unentdeckter Signalweg vorstellbar (Karschin 2001, Bayliss et al. 2003).

TASK-1 ist im menschlichen Körper weit verbreitet, seine mRNA konnte unter anderem in Gehirn, Lunge, Prostata, Herz, Niere, Uterus, Pankreas, Plazenta und Darm nachgewiesen werden (Duprat et al. 1997). Physiologisch bzw. pathophysiologisch wird TASK-1 eine Rolle in der Chemorezeption im Glomus caroticum (Buckler et al. 2000, Kim et al. 2009), in der Regulation der Aldosteronsekretion (Davies et al. 2008), in der Modulation autoimmuner Entzündungen (Bittner et al. 2009), sowie in der Entwicklung und Zonierung der Nebennierenrinde, bei der ein TASK-1-Knock-out zu einem primären Hyperaldosteronismus führt (Heitzmann et al. 2008), zugeschrieben.

1.5.3 TRESK

Der TRESK-Kanal (TWIK-Related Spinal cord K⁺-channel) wurde als letztes Mitglied der Tandemporen-Kaliumkanäle 2003 von Sano und Mitarbeitern (2003) entdeckt: Er umfasst 385 Aminosäuren, zeigt aber nur eine geringe Sequenzübereinstimmung (13,5-19,7%) mit anderen K_{2P}-Kanälen und bildet daher eine eigene Untergruppe. Sein Name lässt sich auf seine damalige Klonierung aus dem Rückenmark (engl., spinal cord) zurückführen (Sano et al. 2003).

Tatsächlich findet sich die stärkste Expression in den Hinterwurzel- und Trigeminalganglien, TRESK wird aber auch in mehreren Ganglien des vegetativen Nervensystems, wie beispielsweise in den Grenzstrangganglien und im Ganglion stellatum, exprimiert (Dobler et al. 2007, Lafreniere und Rouleau 2011). Seine mRNA konnte bei der Maus auch außerhalb neuronaler Gewebe wie Leber, Hoden, Milz, Herz und Lunge nachgewiesen werden, humane TRESK-Kanäle finden sich dagegen nur in neuronalem Gewebe (Dobler et al. 2007).

Die physiologische Rolle von TRESK liegt in der Modulation der Nozizeption (Chae et al. 2010, Tulleuda et al. 2011, Kollert et al. 2015). Eine Mutation im TRESK-Gen wird in Verbindung mit dem Krankheitsbild der Migräne mit Aura gebracht (Lafreniere et al. 2010).

Untersuchungen zeigen, dass TRESK-Kanäle leicht auswärtsgerichtete, spannungsunabhängige Hintergrundströme erzeugen, die durch ungesättigte freie Fettsäuren, intrazelluläre pH-Änderungen, nicht-selektive Kaliumkanalblocker, Ba²⁺ und Quinidin gehemmt werden können, nicht aber von den klassischen K_V-Kanalblockern Tetraethylammonium (TEA) und 4-Aminopyridin (4-AP) (Sano et al. 2003, Enyedi et al. 2012).

Weiter ist TRESK der einzige K_{2P}-Kanal, der durch die Änderung von intrazellulärem Kalzium reguliert werden kann (Czirjak et al. 2004). Diese Eigenschaft ermöglicht es auch, dass Gα_q-Proteine TRESK-Kanäle aktivieren, was ebenfalls einzigartig unter den K_{2P}-Kanälen ist. Dabei führt die Bindung eines Agonisten an seinen G_q-gekoppelten Rezeptor zur Abspaltung der Gα_q-Untereinheit, die in der Folge die Phospholipase C (PLC) aktiviert. Diese spaltet

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3). IP_3 setzt intrazelluläres Kalzium frei, wodurch Calcineurin aktiviert wird. Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin bindet nun direkt an die PQIVID-Sequenz einer intrazellulären Schleife des TRESK-Proteins und dephosphoryliert dieses, was schließlich zur Aktivierung des TRESK-Kanals führt (Czirják und Enyedi 2006).

Czirják und Mitarbeiter (2004) zeigten, dass Agonisten G_q -Protein gekoppelter Rezeptoren und anderer Kalzium-mobilisierender Rezeptoren den TRESK-Strom um das 5-15fache steigern können. Diese Eigenschaft wurde in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der Mutanten des G-Protein gekoppelten Rezeptors PTH1R genutzt.

1.6 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit basiert auf den Untersuchungen von Roth und Mitarbeitern (2014), die 30 Parathormon-Rezeptor-Mutationen bei Patienten mit dem Krankheitsbild der primären Zahndurchbruchsstörung (Primary Failure of Eruption, PFE) identifizierten. Dafür wurden die PTH1R-Gene von 70 Patienten mit klinisch und röntgenologisch diagnostizierter PFE sequenziert.

Im Folgenden wurden Pathogenitäts-Vorhersagen der Mutationen getroffen. Nur 12 Mutationen konnten dabei als eindeutig pathogen und PFE-verursachend identifiziert werden. Ausgehend davon sollen in der vorliegenden Arbeit nun vier Mutationen, die in der Pathogenitäts-Vorhersage als "wahrscheinlich schädlich" eingestuft wurden, funktionell charakterisiert werden. Bei den vier Mutationen handelt es sich jeweils um eine *missense*-Mutation, bei der der Austausch einer einzelnen Base in der DNA-Sequenz zum Einbau einer abweichenden Aminosäure im Protein führt.

Ziel der vorliegenden Arbeit soll es sein, die Aktivität der Parathormon-Rezeptor Mutanten unter Verwendung des *Xenopus* Oozyten-Expressionssystems mittels dem Prinzip der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme indirekt über die Kopplung an Tandemporen-Kaliumkanäle zu messen, um so Aussagen über ihre Funktion treffen zu können.

Es erfolgt eine Unterteilung der vorliegenden Arbeit in drei Teilabschnitte:

Der erste Teilabschnitt beschäftigt sich mit der Herstellung der Mutanten.

Im zweiten Teilabschnitt wird die Aktivität der Parathormon-Mutanten im Vergleich zum Parathormon-Wildtyp durch Kopplung an den Tandemporen-Kaliumkanal TASK-1 gemessen.

Dieses Ergebnis wird im dritten Teil durch die Kopplung an einen weiteren Tandemporen-Kaliumkanal überprüft. Hierzu wird der Kanal TRESK verwendet.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Standardchemikalien wurden von den Herstellerfirmen Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim am Albuch) und Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf) in Analysequalität bezogen.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
12-Well-Zellkulturplatten CELLSTAR®	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Einmal-Injektionskanüle	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Handschuhe SensiCare Ice®	Medline Industries, Inc., Mundelein, IL, USA
Injektionskapillaren 3.5“Drummond #3-000-203-GX Replacement Tubes	Drummond Scientific Co., Broomall, PA, USA
Messkapillaren GB150F-8P 0.86x1.50x80mm with filament	Science Products GmbH, Hofheim
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Petrischalen 92x16mm, 35x10mm	Sarstedt AG & Co, Nürnbrecht
Pipettenspitzen SafeSeal-Tips®	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Röhrchen CELLSTAR® Tubes 15ml, 50ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten CELLSTAR® 5ml, 10ml, 50ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Verschlussfolie Parafilm® M	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA

2.1.3 Verwendete Geräte und Apparaturen

Gerät	Hersteller
<u>Brutschränke:</u>	
Brutschrank Typ 400HY	Bachofer GmbH, Reutlingen
Peltier-Kühlbrutschrank IPP 30	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
Schüttelbrutschrank Innova™ 4330	New Brunswick Scientific Co., Inc., Enfield, CT, USA
<u>Eisbereiter</u>	
AF 200	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL, USA
<u>Elektrophysiologie:</u>	
Computer Power Mac G4	Apple Inc., Cupertino, CA, USA
Kaltlichtquelle KL 1500	Schott AG, Mainz
Micropipette Puller P-97 Flaming/Brown	Sutter Instruments Co., Novato, CA, USA
Mikroinjektionspumpe Nanoliter 2010	World Precision Instruments, Inc. Sarasota, FL, USA
Patch clamp EPC 9	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht
Pumpe	ALA Scientific Instruments, Farmingdale, NY, USA
Verstärker Turbo Tec-C	npi electronic GmbH, Tamm
<u>Geldokumentation:</u>	
Multimage™ Light Cabinet	Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA
Digital Graphic Printer UP-D890	Sony Corporation, Minato, Tokio, Japan
<u>Heizblock:</u>	
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
<u>Magnetrührer:</u>	
PCT B	IKA GmbH & Co KG, Staufen im Breisgau
<u>Mikroskope:</u>	
Binokular Stemi SV 11	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Wild M3Z	Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, Schweiz
<u>pH-Meter:</u>	
HI 991001	HANNA instruments, Woonsocket, RI, USA
<u>Photometer:</u>	
GeneQuant pro RNA/DNA Calculator	Biochrom Ltd., Cambridge, England

Pipetten und Pipettierhilfen:

Accu-jet© pro	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
Eppendorf Reference 2	Eppendorf AG, Hamburg

Schüttler:

Rotamax 120	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach
-------------	---

Spannungsgerät:

Electrophoresis Power Supply E861	Consort bvba, Turnhout, Belgien
-----------------------------------	---------------------------------

Thermocycler:

T Professional Trio Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
----------------------------------	--------------------------

Vortexer:

Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA
----------------	--

Waage:

PF-R150	Shinko Denshi Co., Ltd., Tokio, Japan
---------	---------------------------------------

Wasserbad:

WB 10	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
-------	----------------------------------

Zentrifugen:

Biofuge pico	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau
sprout™ mini-centrifuge	Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, USA

2.1.4 Rezepte für Nährmedien, Puffer, Gele und Lösungen

Als Lösungsmittel wurde Reinstwasser (ddH₂O) aus der Anlage Milli-Q® Synthesis A10 (Merck KGaA, Darmstadt) verwendet, welches zusätzlich mit dem Millipak® 0,22µm Membran-Filter (Merck KGaA, Darmstadt) gefiltert wurde. Für Lösungen, die mit RNA in Kontakt treten, wurde 1%iges DEPC-H₂O (1 ml DEPC ad 1l ddH₂O) verwendet.

Nährmedien und Lösungen für die Molekularbiologie wurden autoklaviert oder steril filtriert.

Nährmedien für *E. coli* und *Xenopus laevis* Oozyten

Bezeichnung	Inhaltsstoffe
LB-Medium	20 g LB Broth Base ad 1l ddH ₂ O
LB-Platten	28 g LB Agar ad 800 ml ddH ₂ O
ND 96-Oozyteninkubationslösung	96 mM NaCl 2 mM KCl 1 mM MgCl ₂ • 6H ₂ O 1 mM CaCl ₂ • 6H ₂ O 5 mM HEPES 2 mM Natriumpyruvat 100 µg/ml Gentamicin mit NaOH auf pH 7,4 einstellen

Agarose-Gelelektrophorese

Bezeichnung	Inhaltsstoffe
1x MOPS	40 ml 5x MOPS 160 ml ddH ₂ O
5x MOPS	0,1 M MOPS (pH 7) 40 mM Natriumacetat 5 mM EDTA (pH 8)
6x Brompuffer	2,5 ml Bromphenolblau (1%) 3 ml Glycerol (30%) ad 10 ml ddH ₂ O
50x TAE-Puffer	2 M Tris 1 M Acetat 50 mM EDTA (pH 8)
RNA-Auftragspuffer	10 ml 5xMOPS 8,5 ml Formaldehyd (37%) 25 ml Formmide 2,5 ml Glycerol 20 µl EDTA (250 mM, pH 8) 1,25 ml Bromphenolblau (1%) ad 50 ml DEPC-H ₂ O

Lösungen für Elektrophysiologische Arbeiten an *Xenopus laevis* Oozyten

Bezeichnung	Inhaltsstoffe
Kollagenase-Lösung	20 ml ND 96-Lösung ohne Ca ²⁺ 0,04 g Kollagenase Typ 2 (385 U/mg) (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA)
ND 96-Lösung (Badlösung)	96 mM NaCl 2 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ 5 mM HEPES mit NaOH auf pH 7,4 einstellen
ND 96 ohne Ca ²⁺	96 mM NaCl 2 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 5 mM HEPES mit NaOH auf pH 7,4 einstellen
PTH-Lösung (Messlösung)	entsprechend gewünschter Konzentration: PTH(1-34), human (Tocris Bioscience, Bristol, England) ad ND 96-Lösung

2.1.5 Reagenziensets (Kits)

Kit	Hersteller
NucleoBond® Xtra Midi/Maxi	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

2.1.6 Biologische Materialien

- *Escherichia coli* (*E. coli*)
- *Xenopus laevis* Oozyten

2.1.7 Molekularbiologische Materialien

Antibiotika

- Ampicillin (50 µg/ml)
- Gentamicin (100 µg/ml)

cDNA-Klone

Die cDNA-Klone von hTASK-1 und hTRESK wurden in der Arbeitsgruppe Molekulare Elektrophysiologie (Physiologisches Institut, Universität Würzburg) isoliert und in den Oozyten-Expressionsvektor pSGEM subkloniert. Der humane PTH1R cDNA-Klon wurde von Herrn Professor Lohse (Pharmakologisches Institut, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt und von der Arbeitsgruppe Molekulare Elektrophysiologie in den Vektor pSGEM subkloniert.

Die für die vorliegende Arbeit benötigten Mutationen im PTH1R-Protein wurden wie in Kapitel 2.2 beschrieben hergestellt.

Enzyme, Inhibitoren und Puffer

Name	Hersteller
Apa I (50 U/µl)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
DNAse (10 U/µl)	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim
Dpn I (20 U/µl)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Eco RI (20 U/µl)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
NEB 2-Puffer (10x)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
NEB 4-Puffer (10x)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Nhe I (10 U/µl)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
PfuTurbo DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA
PfuTurbo Polymerase Reaktionspuffer (10x)	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA
RNAse-Inhibitor (40 U/µl)	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim
T7 RNA-Polymerase (20 U/µl)	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim
Transkriptionspuffer (10x)	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim

Marker und Nukleotide

Name	Hersteller
Desoxyribonukleotid-Triphosphate dATP, dCTP, dUTP, dGTP je 100 mM	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
M ⁷ G(5')ppp(5')G-cap	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim
Ribonukleosid-Triphosphate ATP, CTP, UTP, GTP je 100 mM	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim
RNA-Marker ssRNA Ladder	New England Biolabs GmbH, Frankfurt

Bezeichnung	Inhaltsstoffe
DNA-Marker	30 µl Phi X 174 DNA-Hae III Digest (New England Biolabs GmbH, Frankfurt) 60 µl Lamda DNA-Hind III Digest (New England Biolabs GmbH, Frankfurt) 70 µl TE-Puffer 40 µl 6x Brompuffer
TE-Puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA ad 100 ml ddH ₂ O mit NaOH auf pH 7,4 einstellen

Plasmidvektor

In der vorliegenden Arbeit wurde der Vektor pSGEM verwendet.

Dieser wurde vom pGEMHE-Vektor (Liman et al. 1992) abgeleitet und besitzt 3118 Basenpaare, einen T7 und einen SP6 Promotor, 3' und 5' UTRs eines *Xenopus* β -Globin Gens, sowie einen Polylinker, der von der multiple cloning site des pBluescript Vektors abgeleitet wurde. Stromaufwärts des SP6 Promotors befinden sich vier Restriktionsstellen (Sph I, Pac I, Sfi I, Nhe I), die zur Vektorlinearisierung genutzt werden können. Weiter besitzt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz-Kassette, die zur Selektion genutzt werden kann.

Der Vektor wurde 1994 von Dr. Michael Hollmann (Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen) hergestellt.

Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen.

Die Sequenzen der Mutagenese-Primer sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Name		Sequenz
PTH1R [P119L]	sense	5'-ccacatcctgtgctggctgctgggggcaccagg-3'
	antisense	5'-cctggtgccccagcagccagcacaggatgtgg-3'
PTH1R [H442D]	sense	5'-gctctggcaagtccagatggactatgagatgc-3'
	antisense	5'-gcatctcatagtccatctggactgcccagagc-3'
PTH1R [L232R]	sense	5'-cctgtccttcatgcgccgcccgtga-3'
	antisense	5'-gctcacggcgcgccgatgaaggacagg-3'
PTH1R [L292P]	sense	5'-tccttactcccggccaccaactac-3'
	antisense	5'-gtagttggtggccgggaagtaaagg-3'

2.1.8 Computerprogramme

- ApE - A plasmid Editor v1.17, Wayne Davis, University of Utah, USA
- EndNote X.7.0.2, Thomson Reuters, New York City, NY, USA
- IBM SPSS Statistics 22, IBM, Armonk, NY, USA
- IGOR Pro 4.1, WaveMetrics Inc., Lake Oswego, OR, USA
- Microsoft Office® 2010 (Word, Excel, PowerPoint), Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
- Microsoft Paint, Windows-8-Version, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
- PULSE + PULSEFIT, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht

2.2 Molekularbiologische Methoden

Um den Parathormon-Rezeptor PTH1R und vier seiner Mutanten im *Xenopus* Oozyten-Expressionssystem elektrophysiologisch untersuchen zu können, wurden zunächst ausgehend vom cDNA-Klon des PTH1R Wildtyps die benötigten DNA-Konstrukte hergestellt. Hierfür wurde jeweils eine Base ausgetauscht, was zum Einbau einer abweichenden Aminosäure in das Rezeptorprotein führte:

Name der Mutante	Basenaustausch
PTH1R [P119L]	c356t
PTH1R [H442D]	c1324g
PTH1R [L232R]	t695g
PTH1R [L292P]	t875c

Zur Expression in *Xenopus laevis* Oozyten wurden sowohl diese DNA-Konstrukte als auch die cDNA-Klone der K_{2P} -Kanäle TASK-1 und TRESK in injizierbare cRNA transkribiert.

2.2.1 Herstellung der Parathormon-Rezeptor Mutanten

2.2.1.1 Mutagenese

Für den gezielten Austausch der Nukelotidbasen in der DNA des PTH1R-Wildtyps wurde das QuikChange™ Mutagenese Protokoll verwendet. Hierbei wird das komplette doppelsträngige DNA-Plasmid mit zwei komplementär liegenden Primern amplifiziert. Die Sequenzen der verwendeten Primer beinhalten bereits den Basenaustausch und sind Kapitel 2.1.7 zu entnehmen. Als Polymerase wurde die PfuTurbo DNA-Polymerase gewählt, da diese eine proof-reading-Funktion besitzt und glatte Enden („blunt-ends“) produziert. Der Ansatz der Polymerisierungsreaktion für die Mutagenese wurde wie folgt pipettiert:

5 µl	PfuTurbo Polymerase-Reaktionspuffer
x µl	Template Plasmid-DNA (20 oder 50 ng)
1,4 µl	Mutagenese-Primer sense (10 pmol/µl)
1,4 µl	Mutagenese-Primer antisense (10 pmol/µl)
je 1 µl	Desoxyribonukleotid-Triphosphate (je 2,5 mM)
ad 50 µl	ddH ₂ O
1 µl	PfuTurbo Polymerase (2,5 U/µl)

Es wurden die folgenden Temperaturschleifen im Thermocycler gewählt:

Einleitende Denaturierung	95°C	1 min
14 Temperaturschleifen:		
Denaturierung	95°C	30 s
Anlagerung	55°C	1 min
Elongation	68°C	8 min

Im Denaturierungsschritt werden die Wasserstoffbrücken der komplementären Basenpaare durch Erhitzen auf 95°C zerstört. Es entstehen Einzelstränge, an welche sich die Primer nach dem Abkühlen auf 55°C durch Wasserstoffbrückenbildung anlagern (Anlagerungsschritt). Im Elongationsschritt wird schließlich die DNA synthetisiert. Bei ihrem Temperaturoptimum von 68°C katalysiert die Pfu-Polymerase sukzessive die Anknüpfung der jeweils zum Einzelstrang komplementären Desoxynukleotide an das 3'-Ende des Primers bzw. an das zuvor angeknüpfte Nukleotid. Diese Schritte werden 14 Mal wiederholt, um eine hohe Anzahl neu synthetisierter DNA-Stränge zu erhalten.

Nach Beendigung der Mutagenese im Thermocycler wurden die Reaktionsansätze mit 1 µl Dpn I Restriktionsenzym versetzt und eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dpn I schneidet nur an seiner Erkennungssequenz gatc, wenn das Adenosin methyliert ist. Da die Template

Plasmid-DNA aus Bakterien stammt und somit methyliert ist, bleiben nur die nicht-methylierten *in-vitro* polymerisierten DNA-Stränge zurück.

2.2.1.2 Transformation

Bei der Transformation werden Plasmide zur natürlichen Vervielfältigung in Bakterien eingebracht. Hierfür wurden *E. coli*-Bakterien gewählt. Die Zellen wurden von Katharina Gerber (Physiologisches Institut, Universität Würzburg) durch Behandlung mit Kalziumchlorid kompetent gemacht und in Glycerin bei -80°C gelagert. Dadurch werden die *E. coli* Bakterien zur Aufnahme freier Plasmid-DNA aus dem sie umgebenden Medium befähigt.

Die langsam auf Eis aufgetauten Zellsuspensionen wurden nun mit je 2 µl DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42°C im Heizblock, welcher zur Aufnahme der Plasmide in die Zellen führt. Danach wurden die Zellen erneut für 1 min auf Eis gestellt. Zur weiteren Inkubation wurden 400 µl LB-Medium zugegeben und im Schüttelbrutschrank (150 rpm, 37°C) für eine Stunde gelagert. Durch eine Schräglagerung und das Schütteln erhielten die *E. coli*-Bakterien ausreichend Sauerstoff.

Mit einem Drigalskispatel, der mit 70%igem vergälltem Alkohol abgeflammt wurde, wurden je Ansatz 100 µl oder 400 µl Suspension auf vorgewärmte Agar-Platten mit Ampicillin ausplattiert und diese über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.3 Plasmid DNA-Präparation aus 4 ml Bakterienkulturen - MINI

Zur Präparation der Plasmid-DNA aus *E. coli* musste zunächst eine Flüssigkultur angelegt werden. Dafür wurde je eine Einzelkolonie des Plasmid-tragenden Bakterienstamms ausgewählt und diese mit einem autoklavierten Zahnstocher in 4 ml LB-Medium mit Ampicillin geimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelbrutschrank (150 rpm) inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde zunächst ein Ösenausstrich zur Aufbewahrung der plasmidtragenden Bakterien auf einer LB-Platte mit Ampicillin vorgenommen,

bevor die Bakteriensuspension dann zentrifugiert (10 min, 4000 rpm) und das Bakteriensediment mit Hilfe des Kits „NucleoSpin® Plasmid“ (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) nach Herstellerangaben weiterverarbeitet wurde. Dabei erfolgt die Plasmidisolierung über eine alkalische Lyse der Bakterienzellwand, die Plasmid-DNA wird an einer Silica-Säule gebunden und durch Waschschriffe von Proteinen, RNA und anderen Verunreinigungen befreit. Schließlich wird die Plasmid-DNA aus der Säule eluiert. Alle verwendeten Puffer und Säulen wurden mitgeliefert.

Die Konzentration der gewonnenen Plasmid-DNA wurde anschließend mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Basierend auf der Lichtabsorption einer 1:50 verdünnten DNA-Lösung, erfolgt die automatische Berechnung der Konzentration nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Die Konzentration wird in ng/µl angegeben.

Weiter lässt sich die Reinheit der DNA auf dem Gerät ablesen: Da das Absorptionsmaximum für Proteine bei 280 nm liegt, kann durch Berechnung des Quotienten OD_{260}/OD_{280} eine Aussage über die Verunreinigung der Probe durch Proteine getroffen werden. Ein Verhältnis von 1,8 spricht für eine reine DNA-Isolierung, ist die DNA kontaminiert, so ist dieser Wert kleiner. Analoges gilt für den Quotienten OD_{260}/OD_{230} , der ein Indikator für weitere Verunreinigungen, z.B. mit Polysacchariden ist. Auch dieser Wert wird automatisch vom Gerät angezeigt.

Zusätzlich wurde zur Kontrolle der Präparation ein Testverdau mit den Restriktionsenzymen Apa I und Eco RI und eine anschließende Gelelektrophorese des Verdau durchgeföhrt.

Dazu wurde folgender Ansatz pipettiert:

0,5 µl	Plasmid-DNA
1 µl	NEB 4-Puffer
7,5 µl	ddH ₂ O
0,5 µl	Restriktionsenzym Apa I

Der Ansatz wurde für 50 min bei 25°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 65°C im Wasserbad deaktiviert. Es folgte die Inkubation des Verdau mit dem Restriktionsenzym Eco RI für 25 min bei 37°C im Brutschrank.

Für die Gelelektrophorese wurde ein 1%iges Agarose-Gel mit 1 µl Ethidiumbromid-Lösung in TAE-Puffer verwendet. Die Beladung erfolgte je mit dem vollständigen Verdau und 2 µl 6x Brompuffer. Als Marker wurden 4 µl DNA-Marker verwendet. Die Laufzeit betrug 40 min bei 100 V angelegter Spannung.

2.2.1.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Klone erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon in Ebersberg.

Die DNA-Proben wurden als Premixed Samples, bestehend aus je 1500 ng DNA und 1,5 µl eines Primers in einem Gesamtvolumen von 15 µl, versandt. Als Primer dienten pSGEMreverse, PTHSeq1 und T7.

2.2.1.5 Plasmid DNA-Präparation aus 40 ml Bakterienkulturen - MIDI

Nachdem die Ergebnisse der Sequenzierung zeigten, dass alle Klone ihre Mutation an der gewünschten Stelle enthalten, wurde zur Gewinnung größerer Plasmid-DNA-Mengen eine Präparation aus 40 ml Bakterienkulturen durchgeführt.

Dazu wurde zunächst eine Vorkultur (4 ml LB-Medium mit Ampicillin) aus dem Ösenausstrich der Plasmidpräparation aus 4 ml Bakterienkulturen angelegt, die etwa 7 h bei 37°C im Schüttelbrutschrank (150 rpm) inkubiert wurde. Anschließend wurde 1 ml dieser Vorkultur in 40 ml LB-Medium mit Ampicillin gebracht und über Nacht im Schüttelbrutschrank (37°C, 150 rpm) inkubiert.

Die Isolation der Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte schließlich mit dem Kit „NucleoBond® Xtra Midi/Maxi“ (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren). Auch

hier richtete sich die Vorgehensweise nach den Herstellerangaben. Es wurden die mitgelieferten Puffer und Säulen verwendet.

2.2.2 RNA-Synthese

Die cDNA der hergestellten Klone sowie des PTH1R [WT] und der K_{2P}-Kanäle TASK-1 und TRESK musste nun in eine mRNA umgeschrieben werden, um später zur Expression in *Xenopus laevis* Oozyten verwendet werden zu können.

2.2.2.1 Linearisierung des Expressionsvektors

Zunächst wurde der Expressionsvektor pSGEM an seiner Restriktionsstelle Nhe I linearisiert. Dazu wurde folgender Ansatz pipettiert und drei Stunden im Brutschrank (37°C) inkubiert:

x µl	15 µg klonierte DNA
5 µl	Restriktionsenzym Nhe I
10 µl	NEB 2-Puffer
ad 100 µl	ddH ₂ O

Anschließend erfolgte eine Gelelektrophorese zur Kontrolle des kompletten Verdau. Dazu wurde ein 0,8%iges Agarose-Gel mit 1 µl Ethidiumbromid-Lösung in TEA-Puffer verwendet. Die Beladung erfolgte mit je 2 µl Verdau, 2 µl 6x Brompuffer und 8 µl ddH₂O. Als Marker wurden 4 µl DNA-Marker verwendet. Die Laufzeit betrug 40 min bei 100 V.

2.2.2.2 Phenol-Chloroform-Extraktion und Fällung

Um die linearisierte DNA von Proteinfragmenten zu reinigen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurden dem Restriktionsverdau 200 µl Phenol-Chloroform im Verhältnis 1:1 hinzugefügt, das Gemisch gevortext und zentrifugiert (13000 rpm, 5 min). Hierbei sammeln sich

Proteine in der unteren, organischen Phenolphase und werden denaturiert. Die obere wässrige Phase enthält die DNA. Diese wurde vorsichtig abgenommen. Es folgte eine zweite Extraktion mit 100 µl DEPC-H₂O (13000 rpm, 5 min). Die gesamte gewonnene wässrige Phase wurde einer Nachextraktion mit 400 µl Chloroform unterzogen, um restliches Phenol aus der Lösung zu entfernen. Zur Rückgewinnung der DNA wurde die Lösung anschließend bei -20°C über Nacht gefällt. Dazu wurden dem Volumen 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und das 2,75x Volumen Ethanol (100%, -20°C) zugegeben. So entsteht eine saure, wenig polare Umgebung, die die Löslichkeit der DNA verringert. Die DNA fällt aus und bildet nach dem Zentrifugieren (13000 rpm, 30 min) am folgenden Tag ein Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Dieses wurde mit 500 µl Ethanol (70% in DEPC-H₂O, -20°C) gewaschen, luftgetrocknet und in 25 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Es erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung.

2.2.2.3 *In-vitro* Transkription

Der Ansatz für die Transkription der linearisierten DNA wurde wie folgt pipettiert:

x µl	3 µg linearisierte DNA
20-x µl	DEPC-H ₂ O
5 µl	ATP (10 mM)
5 µl	CTP (10 mM)
5 µl	UTP (10 mM)
5 µl	GTP+m ⁷ G(5')ppp(5')G-cap (10 mM)
5 µl	Transkriptionspuffer
2,5 µl	RNAse-Inhibitor
2,5 µl	T7 RNA-Polymerase

Die Verwendung des GTP Cap-Analogons GTP+m⁷G(5')ppp(5')G-cap dient der Stabilisierung der mRNA im Zytoplasma der *Xenopus* Oozyte und schützt diese so vor dem Abbau durch Endonukleasen. Weiter spielt die Cap eine Rolle in der

Initiation der Translation. Die Verwendung führt somit zu einer Steigerung der Translationsrate der mRNA-Produkte.

Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Für weitere 15 min wurden 5 µl DNase zugegeben, die den Abbau der DNA-Matrize katalysiert.

Die neu synthetisierte mRNA wurde anschließend wie bereits zuvor beschrieben mit einer Phenol-Chloroform-Extraktion und Fällung aufgereinigt.

Das gewaschene RNA-Pellet wurde in 10 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

Zur Konzentrationskontrolle wurde eine Gelelektrophorese mit einem 1,5%igen RNA-Agarose-Gel durchgeführt. Dafür wurden 0,6 g Agarose mit 30 ml ddH₂O aufgeköcht und auf 65°C im Wasserbad abgekühlt. Nach Zugabe von 8 ml 5x MOPS und 7 ml Formaldehyd (37%) konnte das Gel ausgegossen werden. Der RNA-Auftragspuffer (200 µl) wurde mit 1 µl Ethidiumbromid-Lösung versetzt. Die Beladung erfolgte schließlich mit je 2 µl Transkript und 8 µl RNA-Auftragspuffer, sowie 3 µl RNA-Marker und 8 µl RNA-Auftragspuffer, wobei alle Proben zuvor für 10 min auf 65°C erhitzt wurden. Als Laufpuffer diente 1x MOPS, die Laufzeit betrug eine Stunde bei 100 V.

Die Konzentrationen der RNA-Proben ließen sich nun durch den Vergleich mit dem Marker grob abschätzen.

Die RNA wurde bis zu ihrer Injektion in *Xenopus laevis* Oozyten bei -20°C gelagert und bei Bedarf aus der bei der Midi-Präparation gewonnenen cDNA analog der hier beschriebenen Vorgehensweise neu transkribiert.

2.3 Elektrophysiologische Methoden

Die funktionelle Charakterisierung von Parathormon-Rezeptor Mutanten wurde im Oozyten-Expressionssystem des südafrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) durchgeführt.

2.3.1 *Xenopus laevis*-Oozyten als heterologes Expressionssystem

Die Verwendung von Oozyten des Südafrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* als heterologes Expressionssystem geht auf den Entwicklungsbiologen John Gurdon (Gurdon et al. 1971) zurück und stellt heute eine etablierte Technik für Untersuchungen an Membranproteinen wie Ionenkanälen, Transportern und Rezeptoren dar.

Eine heterologe Expression bezeichnet die Proteinbiosynthese von Genen einer Spezies in einem Fremdorganismus. Humane Parathormon-Rezeptoren und Kaliumkanäle können so in der *Xenopus*-Oozyte synthetisiert, posttranslational modifiziert und in die Zellmembran eingebaut werden.

Bei *Xenopus*-Oozyten handelt es sich um Keimzellen, die in der Prophase I arretiert sind. Dumont (1972) teilt sie in sechs Stadien innerhalb dieser Phase ein. Zur Injektion von cRNA eignen sich die Stadien V und VI, die über ausreichend endogene Proteine verfügen, um exogene Proteine zu exprimieren. Sie zeichnen sich durch eine Größe von 1,0-1,3 mm aus und besitzen weiter eine optische Polarisierung in eine dunkle, zytoplasma- und ribosomenreiche, animale und eine helle, hauptsächlich dotterhaltige, vegetative Hemisphäre.

Die weitgehend undifferenzierten, omnipotenten Oozyten zeigen aufgrund ihrer großen Anzahl an Ribosomen hohe Translationsraten, die eine schnelle Proteinbiosynthese ermöglichen. Weitere Vorteile, *Xenopus*-Oozyten als zelluläres Expressions- und Translationssystem injizierter, *in-vitro* transkribierter cRNA zu nutzen, liegen in der Größe der Oozyten, welche Mikroinjektionen und ein relativ leichtes Anstechen mit Messelektroden erlauben, sowie die einfache

Gewinnung der Oozyten und die weitgehend unkomplizierte, unsterile Haltung der Krallenfrösche.

Letztendlich spielt die Tatsache, dass die Oozyten nur wenige störende endogene Ionenkanäle exprimieren und über die Second Messenger Systeme cAMP und IP₃ verfügen, für die vorliegende Arbeit eine entscheidende Rolle.

2.3.2 Vorbereitung der *Xenopus laevis* Oozyten

Die Oozyten von *Xenopus laevis* befinden sich in lobusartigen Gebilden, den so genannten Mesovarien, im Bauchraum des Krallenfroschs. Die Operation zur Entnahme von Teilen dieses Ovariensacks erfolgte unter Tricaine-Narkose durch Sina Kollert (Physiologisches Institut, Universität Würzburg).

Da sich die Oozyten in Gewebe aus Bindegewebe, Follikel- und Ovarienepithel befinden, wurden sie anschließend einer enzymatischen Defollikulierung unterzogen. Dazu wurde das Gewebe mittels Pinzette und Schere manuell in Stücke, die etwa 15 Oozyten enthielten, separiert und dann in Kollagenase-Lösung für 2 Stunden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Oozyten durch mehrmaliges Waschen in ND 96-Lösung von dem Enzym und Geweberesten gereinigt, in ND 96-Oozyteninkubationslösung überführt und bis zur Injektion mit cRNA am selben Tag im Brutschrank bei 19°C aufbewahrt.

Zur Injektion mit cRNA wurden Oozyten der Stadien V und VI, die gleichmäßig rund und unversehrt waren, eine scharfe farbliche Grenze zwischen dem animalen und vegetativen Pol zeigten und eine gleichmäßige Farbe der jeweiligen Hemisphäre ohne Marmorierung aufwiesen, unter mikroskopischer Sichtkontrolle ausgewählt.

Die Injektionskapillaren wurden jeweils unmittelbar vor dem Gebrauch mit einem Mikropipetten-Puller aus dünnwandigen Borosilikatglaskapillaren automatisch hergestellt. Die Spitzen wurden so gekappt, dass ihr Außendurchmesser ca. 2-5 µm betrug. Die Injektionskapillare wurde dann mit Mineralöl luftblasenfrei befüllt und in eine Mikroinjektionpumpe eingespannt.

Unter mikroskopischer Sichtkontrolle wurde cRNA in die Kapillare aufgesogen und eine definierte Menge von 32,2 nl in die Oozyte injiziert. Als Hilfsmittel dienten dabei ein in drei Ebenen beweglicher Mikromanipulator und ein kammartiger Einsatz in der Injektionskammer, der eine sichere Positionierung der Oozyten ermöglichte. Die cRNA wurde zuvor bereits im Verhältnis Rezeptor : Kaliumkanal = 1:1 gemischt und so verdünnt, dass ca. 5-8 pg cRNA pro Oozyte injiziert wurden.

Die Oozyten wurden nach der Injektion in ND 96-Inkubationslösung im Brutschrank bei 19°C gelagert. Die Expressionsdauer betrug etwa 48 Stunden.

2.3.3 Das Prinzip der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC)

Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (Two-electrode voltage clamp, TEVC) ist eine in den 1940er Jahren entwickelte Methode, die auf Kenneth Cole und George Marmont zurückgeht (Guan et al. 2013) und es ermöglicht, elektrische Ströme über Zellmembranen indirekt zu messen.

Zur Durchführung werden zwei Elektroden benötigt, die durch die Zellmembran gestochen werden: Die erste Elektrode ist die Spannungselektrode (E_v). Sie misst das Membranpotential gegen eine Referenzelektrode (E_R) in der Badlösung. Im Rückkopplungsverstärker wird das gemessene Potential mit einem zuvor festgelegten Sollpotential verglichen. Bei einem Abweichen von diesem Sollpotential wird über die Stromelektrode (E_i) genau so viel Strom (Kompensationsstrom I_{comp}) in die Oozyte appliziert, dass das Sollpotential wieder erreicht wird. Die Zelle wird also auf ein bestimmtes Membranpotential "geklemmt", ihr Membranpotential bleibt konstant.

Ändert sich nun die Membranleitfähigkeit und es kommt zu Ionenbewegungen durch die Zellmembran, so entspricht der generierte Kompensationsstrom exakt dem Strom, der durch die Membran fließt, jedoch mit umgekehrter Polarität. Der Membranstrom ist somit indirekt bestimmbar und ermöglicht Aussagen über die Aktivität von Ionenkanälen.

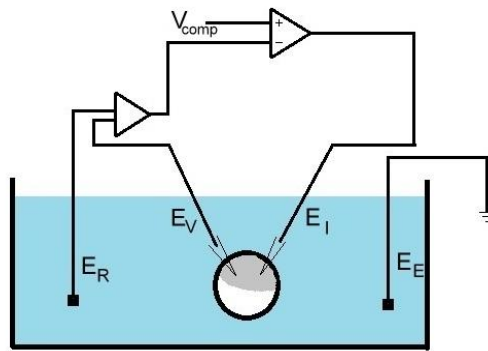


Abb. 2-1: Prinzip der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Das Membranpotential der Oozyte wird von der Spannungselektrode E_V gegen die Referenzelektrode E_R gemessen und vom Verstärker aufgenommen. Das Membranpotential wird im Rückkopplungsverstärker mit dem Sollpotential verglichen, bei einem Abweichen wird eine Kompensationsspannung V_{comp} erzeugt, die einen Kompensationsstrom über die Stromelektrode E_I , in die Oozyten appliziert. Weiter wird eine Erdungselektrode E_E benötigt.

2.3.4 Aufbau des Messplatzes

Der Messplatz setzte sich aus einem Stereomikroskop zur Betrachtung der Messkammer, zwei Mikromanipulatoren, mit denen die Elektroden in die Oozyte eingestochen wurden, einem Rückkopplungsverstärker und einem Pulsgenerator, sowie einem Computer mit der entsprechenden Messplatzsoftware, zusammen.

Die Messkammer bestand aus Kunststoff. Mittig war eine Vertiefung zur Aufnahme der Oozyte eingelassen und seitlich eine weitere für die Referenz- und Erdungselektroden. Weiter endeten in der Messkammer das Zu- und das Ableitsystem für die Bad- und Messlösungen.

Als Zuleitsystem wurden 50 ml Spritzen als Vorratsbehälter für Lösungen verwendet, die je mit einem Drei-Wege-Hahn reguliert werden konnten. Über ein Schlauchsystem flossen die Lösungen mit einer Geschwindigkeit von etwa 2 ml/min in die Messkammer. Das Ableitsystem bestand aus einem in die Messkammer hineinragenden Röhrchen und einer daran angeschlossenen Saugpumpe. So konnten die Lösungen kontinuierlich langsam abgesaugt werden. Die Bad- und Messlösungen in der Messkammer wurden so alle 20 s vollständig ausgetauscht.

Als Badlösung diente stets ND 96-Lösung, die in ihrer Elektrolytzusammensetzung in etwa der extrazellulären Flüssigkeit im Froschorganismus entspricht. Nach Applikation der Messlösung wurde ND 96-Lösung auch als Auswaschlösung verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurde als Messlösung eine 100 nM PTH-Lösung verwendet.

Für die Messelektroden wurden Borosilikatglaskapillaren mit Filament mittels eines Mikropipetten-Pullers automatisch gezogen und ihre Spitzen gekürzt, so dass ihr Widerstand später 1-3 M Ω betrug. Die fertigen Glaselektroden wurden mit 3 M Kaliumchlorid luftblasenfrei befüllt. Chlorierte Silberdrähte wurden in die Glaselektroden eingeführt und dienten als Elektrodendrähte. Über entsprechende Halter wurden die Elektroden an den Mikromanipulatoren befestigt.

Die Elektroden wurden jeweils zu Beginn einer Messreihe hergestellt und konnten für mehrere Messungen verwendet werden.

Die Herstellernachweise der verwendeten Geräte und Materialien sind im Kapitel 2.1 aufgeführt.

2.3.5 Spannungsprotokolle der Pulsmessungen

Für die Messungen wurde die Software Pulse und Pulse fit (HEKA) verwendet, mit welcher der Ablauf der elektrophysiologischen Messungen gesteuert und die gewonnenen Daten zeitgleich graphisch dargestellt werden konnten. Dabei gilt, dass auswärtsgerichteter Strom stets mit positivem Vorzeichen und einwärtsgerichteter Strom stets mit negativem Vorzeichen dargestellt wurden. Das Klemmpotential wurde vor Beginn jedes Versuchs auf -60 mV eingestellt. Dieser Wert entspricht in etwa dem Membranpotential nativer Oozyten.

Folgende Messprotokolle wurden zur Steuerung der in der vorliegenden Arbeit angewandten Messungen verwendet: Spannungsrampen, Spannungssprünge und kontinuierliche Spannungssprünge.

Spannungsrampe:

Bei diesem Protokoll wurde die Zellmembran auf -100 mV hyperpolarisiert und dann mit konstanter Potentialänderung innerhalb von zwei Sekunden auf +60 mV depolarisiert.

Spannungssprünge:

Vom Klemmpotential (-60 mV) ausgehend wurde die Zellmembran auf bestimmte Spannungsstufen geklemmt, die jeweils für 500 ms gehalten wurden. In 20 mV-Schritten wurden die Klemmpotentiale von -100 mV bis +60 mV durchlaufen.

Kontinuierliche Spannungssprünge:

In Abständen von drei Sekunden wurde die Zellmembran ausgehend vom Klemmpotential (-60 mV) für die Dauer von 200 ms auf +30 mV depolarisiert. Mit diesem Protokoll konnte der Membranstrom über die gesamte Versuchszeit bestimmt werden.

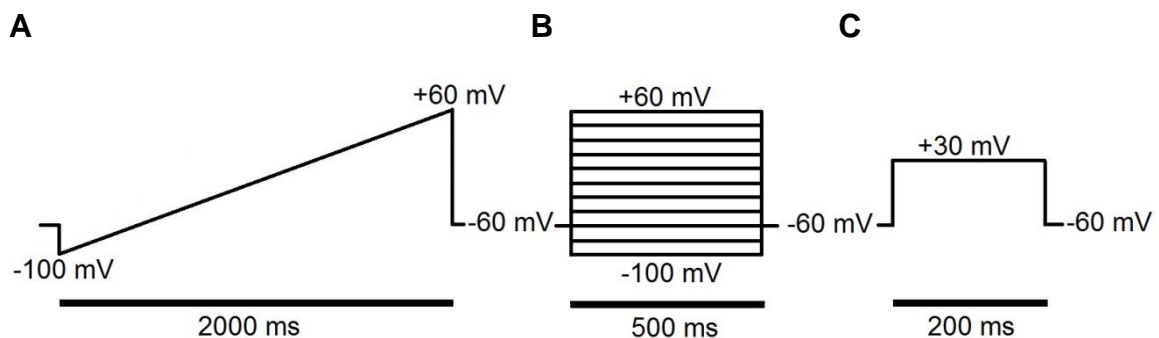


Abb. 2-2: Spannungsprotokolle

Alle Spannungsprotokolle wurden ausgehend von einem Klemmpotential von -60 mV durchgeführt.
A: Spannungsrampe von -100 bis +60 mV über 2000 ms.
B: Spannungssprünge über je 500 ms bei Spannungsstufen von -100 bis +60 mV in 20 mV-Schritten.
C: kontinuierliche Spannungssprünge alle 3 s über 200 ms bei +30 mV.

2.4 Auswertung der Daten

2.4.1 Statistik

Soweit nicht anders bezeichnet, werden alle gewonnenen Daten im Text als arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) für n Messungen angegeben. Auch in Diagrammen wird zusätzlich zum arithmetischen Mittelwert der SEM eingezeichnet. Die Formulierung „durchschnittlich“ bezieht sich stets auf den arithmetischen Mittelwert.

In jeder Versuchsreihe wurde wenn nicht anders angegeben für n eine Anzahl >10 gewählt, um verschiedene Einflussgrößen wie die Qualität der Oozyten, äußere Einflüsse (z.B. Temperatur, Luftdruck, Materialermüdung etc.) und technische Fehler zu berücksichtigen.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS. Die Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf ihre Normalverteilung getestet und anschließend mit der Bonferroni-Methode auf Signifikanz geprüft. Dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit p für $p < 0,05$ als signifikant angenommen. Ist also $p < 0,05$, so ist die getestete Hypothese mit 95% Wahrscheinlichkeit zutreffend.

2.4.2 Graphische Darstellung

Die Originalableitungen aus Pulse & Pulse fit wurden in die Software IGOR Pro® importiert, bearbeitet und graphisch dargestellt. Säulendiagramme wurden mit Microsoft Excel erstellt. Für schematische Darstellungen und Modifizierungen von Abbildungen wurde Microsoft Paint verwendet.

3. Ergebnis

3.1 Molekularbiologie

3.1.1 Herstellung der Parathormon-Rezeptor Mutanten

Zur Herstellung der Parathormon-Rezeptor Mutanten wurde die cDNA des Parathormon-Rezeptor Wildtyps auf dem Plasmid-Vektor pSGEM genutzt. Es folgte die Mutagenese mit Primern, die den jeweiligen in den Mutanten gewünschten Basenaustausch in ihrer Sequenz bereits beinhalteten. Die neu synthetisierte DNA wurde zur Vervielfältigung in *E. coli* transferiert. Anschließend folgte die DNA-Präparation aus der Bakterienkultur.

Zur Kontrolle der Präparation wurde ein Testverdau mit den Restriktionsenzymen Apa I und Eco RI sowie eine anschließende Gelelektrophorese des Verdau durchgeföhrt.

Das Verfahren der Elektrophorese ermöglicht es, Gemische ionischer Substanzen wie negativ geladene DNA in einem elektrischen Feld zu trennen. Bei der Gelelektrophorese wird als Trägermaterial eine Gelmatrix genutzt, durch deren Poren die zu trennenden Proben wandern.

Kleinere DNA-Fragmente wandern dabei schneller zur Anode als größere. Moleküle ähnlicher Größe lagern sich zu Banden zusammen, die durch die Zugabe von Ethidiumbromid, welches mit Nukleinsäuren interkaliert, unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Als Referenz dient ein Marker aus DNA-Molekülen, deren Länge bekannt ist.

Abb. 3-1 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese. Aufgrund der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit verdauter und unverdauter DNA, wurde die Elektrophorese zur Kontrolle des Testverdau nach der DNA-Präparation verwendet. Das Gel zeigt neben den Banden des DNA-Markers (M)

die Banden der mit Apa I und Eco RI geschnittenen DNA einer jeweiligen Mutante (a), sowie die Banden der jeweiligen unverdauten DNA (b).

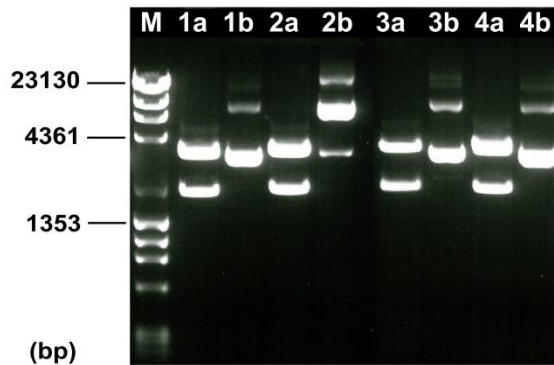


Abb. 3-1: Agarose-Gel zur Kontrolle des Testverdaus nach DNA-Präparation

1%iges Agarose-Gel mit 1 µl Ethidiumbromid-Lösung in TAE-Puffer bei 100 V angelegter Spannung und 40 min Laufzeit. Die Plasmid-DNA wurde von den Restriktionsenzymen Apa I und Eco RI geschnitten (jeweils Bande **a** einer Mutante). Zum Vergleich dienen die jeweils als **b** gekennzeichneten Banden mit unverdauter DNA.

M: DNA-Marker, **1:** PTH1R [P119L], **2:** PTH1R [H442D], **3:** PTH1R [L232R], **4:** PTH1R [L292P]

Die Proben der zweifach geschnittenen Plasmide zeigen zwei hell leuchtende Banden, wobei je eine Bande klar weiter als die Bande des dazugehörigen ungeschnittenen Plasmids gewandert ist, was den erfolgreichen Verdau der jeweiligen Probe bestätigt.

3.1.2 DNA-Sequenzierung

Die nach der Plasmid-Präparation erhaltenen DNA-Klone wurden im Folgenden sequenziert. Die Ergebnisse der DNA-Sequenzierung der verschiedenen Parathormon-Rezeptor Mutanten zeigen, dass der Austausch einer einzelnen Nukleinbase in der DNA je zum Einbau einer anderen Aminosäure im Rezeptorprotein führt:

Der Austausch von Cytosin an Position 356 der Nukleinbasensequenz durch Thymin führt dazu, dass aus dem für die Aminosäure Prolin codierenden Basentriplett ccg das für Leucin codierende Triplett ctg wird.

Wird an Position 1324 Cytosin durch Guanin ersetzt, so wird statt Histidin Asparaginsäure in die Aminosäuresequenz des PTH1R eingebaut.

Aus der Aminosäure Leucin wird durch den Einbau von Guanin statt Thymin an Position 695 die Aminosäure Arginin.

Wird an der Basensequenzposition 875 Thymin gegen Cytosin getauscht, so codiert der Abschnitt für Prolin statt für Leucin.

PTH1R [P119L] → c356t

	C	W	P	L	G	
349	tgc	tgg	ccg	ctg	ggg	363
349	tgc	tgg	ctg	ctg	ggg	363
	C	W	L	L	G	

PTH1R [H442D] → c1324g

	Q	M	H	Y	E	
1318	cag	atg	cac	tat	gag	1332
1318	cag	atg	gac	tat	gag	1332
	Q	M	D	Y	E	

PTH1R [L232R] → t695g

	F	M	L	R	A	
688	ttc	atg	ctg	cgc	gcc	702
688	ttc	atg	cgg	cgc	gcc	702
	F	M	R	Y	E	

PTH1R [L292P] → t875c

	Y	F	L	A	T	
868	tag	ttc	ctg	gcc	acc	882
868	tag	ttc	cctg	gcc	acc	882
	Y	F	P	A	T	

Abb. 3-2: Sequenzierung der Nukleinbasen der Parathormon-Rezeptor-Mutanten

Dargestellt sind die Aminosäuren- und Nukleinbasensequenzen des Wildtyps und unterhalb die Sequenzen der jeweiligen Mutante. Die betreffenden Basen und Aminosäuren sind grau unterlegt.

Bei den durch Mutagenese herbeigeführten Punktmutationen handelt es sich somit um *missense*-Mutationen.

3.1.3 RNA-Synthese

Um die DNA des Parathormon-Rezeptors, seiner Mutanten, sowie die DNA der K_{2P}-Kanäle in die für die Injektion in *Xenopus* Oozyten benötigte RNA zu transkribieren, wurde die Plasmid-DNA zunächst durch das Restriktionsenzym Nhe I linearisiert. Zur Kontrolle des Verdau erfolgte abermals eine Gelelektrophorese.

Abb. 3-3 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese: Die Gele zeigen neben den Banden des DNA-Markers (M) die Banden der jeweiligen unverdauten Plasmid-

DNA (a), sowie die Banden der mit Nhe I geschnittenen DNA einer jeweiligen Probe (b).

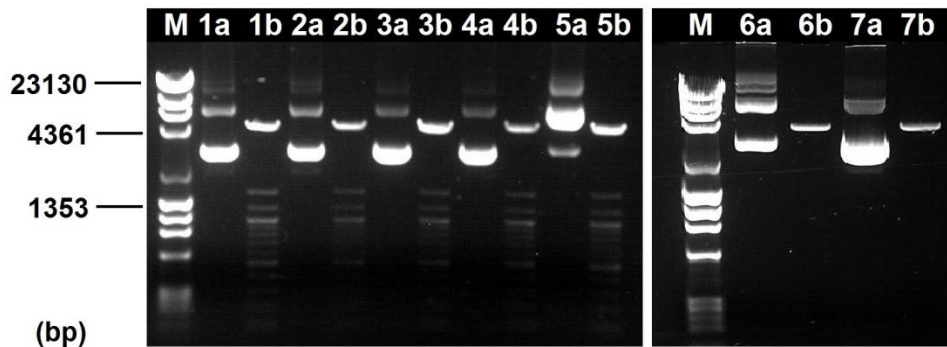


Abb. 3-3: Agarose-Gel zur Kontrolle der Vektor-Linearisierung

0,8%iges Agarose-Gel mit 1 µl Ethidiumbromid-Lösung in TAE-Puffer bei 100 V angelegter Spannung und 40 min Laufzeit. Die Plasmid-DNA wurde vom Restriktionsenzym Nhe I geschnitten (jeweils Bande **b**). Zum Vergleich dienen die jeweils als **a** gekennzeichneten Banden mit unverdauter Plasmid-DNA.

M: DNA-Marker, **1:** PTH1R [WT], **2:** PTH1R [P119L], **3:** PTH1R [L292P], **4:** PTH1R [L292P], **5:** PTH1R [H442D], **6:** TASK-1, **7:** TRESK

Die linearisierten Proben weisen je nur eine Bande auf, die eine kürzere Laufstrecke zurückgelegt hat als die Banden der ungeschnittenen Plasmid-DNA. Dies bestätigt den erfolgreichen Verdau der Proben.

Es folgte die Herstellung der RNA durch *in-vitro* Transkription nach zuvor beschriebenem Protokoll. Die Überprüfung der aufgereinigten RNA erfolgte mittels Gelelektrophorese, bevor die RNA schließlich zur heterologen Expression in *Xenopus* Oozyten injiziert wurde.

Abb. 3-4 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese: Die Gele zeigen neben den Banden des RNA-Markers (M) die Banden der hergestellten RNA (1-7).

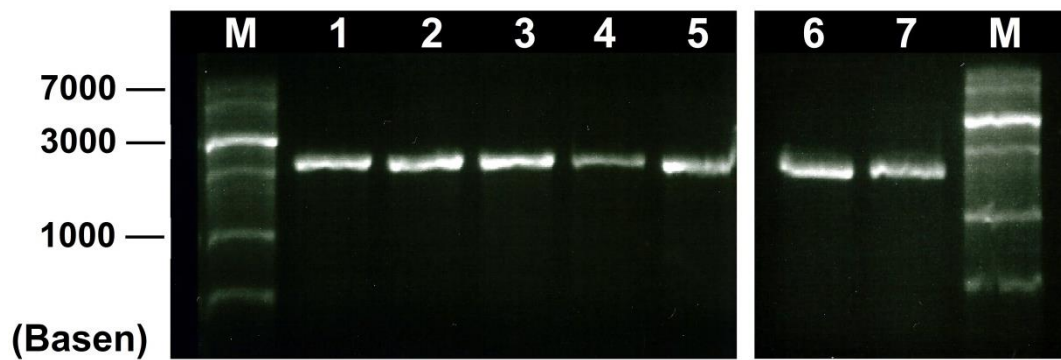


Abb. 3-4: Agarose-Gel zur Kontrolle der *in-vitro* Transkription

1,5%iges Agarose-Gel mit 1 µl Ethidiumbromid-Lösung in 1xMOPS-Puffer bei 100 V angelegter Spannung und einer Stunde Laufzeit.

M: RNA-Marker, **1:** PTH1R [WT], **2:** PTH1R [P119L], **3:** PTH1R [L292P], **4:** PTH1R [L292P], **5:** PTH1R [H442D], **6:** TASK-1, **7:** TRESK

Die Banden der RNA des Parathormon-Rezeptors und seiner Mutanten legen eine kürzere Strecke zurück als die der K_{2P} -Kanäle, was der unterschiedlichen Basenlänge der Transkripte entspricht.

Aus der Stärke der Fluoreszenz der Banden lässt sich weiter die RNA-Konzentration der jeweiligen Probe ableiten, wobei eine starke Fluoreszenz für eine hohe Konzentration steht.

3.2 Elektrophysiologie

3.2.1 Inhibition von TASK-1 durch den G_q -gekoppelten Rezeptor PTH1R

Das erste Ziel des elektrophysiologischen Teils dieser Arbeit bestand in der Überprüfung der Sensitivität des K_{2P} -Kanals TASK-1 auf die Aktivierung des Parathormon-Rezeptors durch die Bindung seines Liganden Parathormon.

Hierfür wurden TASK-1 Kanäle und Parathormon-Rezeptoren zeitgleich heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und anschließend mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) elektrophysiologisch untersucht.

Die Messungen erfolgten nach den zuvor beschriebenen Messprotokollen (Spannungsrampen, Spannungssprünge und kontinuierliche Spannungssprünge) und je Oozyte zunächst in ND 96-Badlösung (kurz: ND 96), dann in PTH-haltiger Messlösung (kurz: PTH) und anschließend nach dem Auswaschen des PTHs zur Kontrolle ein weiteres Mal in ND 96-Badlösung.

Für eine Vielzahl G_q -gekoppelter Rezeptoren, konnte bereits gezeigt werden, dass ihre Aktivierung zu einer Hemmung des TASK-1 Stroms führt (Talley et al. 2000, Chemin et al. 2003). Auch PTH1R nutzt den Signalweg über G_{α_q} : Die Phospholipase $C\beta$ wird aktiviert, wodurch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) hydrolysiert wird. Es kommt zur Freisetzung intrazellulär gespeicherten Kalziums durch IP_3 sowie zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch DAG und Ca^{2+} . (s. Abb. 3-5 A)

An welcher Stelle der G_{α_q} -Signalweg nun mit dem TASK-1 Kanal interagiert, konnte jedoch bisher nicht geklärt werden.

Nach 48-stündiger Inkubation der koexprimierenden Oozyten konnte zunächst anhand des Messprotokolls für Spannungsrampen gezeigt werden, dass die Oozyten den TASK-1 Kanal exprimierten (s. Abb. 3-5 B). Dafür wurde die Zellmembran auf -100 mV hyperpolarisiert und dann mit konstanter Potentialänderung innerhalb von zwei Sekunden auf $+60$ mV depolarisiert. Die

dabei gemessene Strom-Spannungskurve folgt dem für einen auswärtsgerichteten K^+ -Strom typischen Verlauf und zeigt einen immer größer werdenden Strom. Bei Membranpotentialen oberhalb des K^+ -Umkehrpotentials werden Auswärtsströme beobachtet, wobei die Amplitude unter Zugabe der PTH-haltigen Messlösung im Vergleich zur Badlösung ND 96 sichtbar kleiner ist. Die Charakteristik des Stromes bleibt jedoch erhalten. Da die K^+ -Konzentration in den *Xenopus* Oozyten deutlich größer ist, als in der Bad- und der Messlösung (je 2 mM), ist der gemessene Auswärtsstrom deutlich größer als der Einwärtsstrom. ND 96-Lösung entspricht in ihrer Elektrolytzusammensetzung in etwa der extrazellulären Flüssigkeit des Froschorganismus.

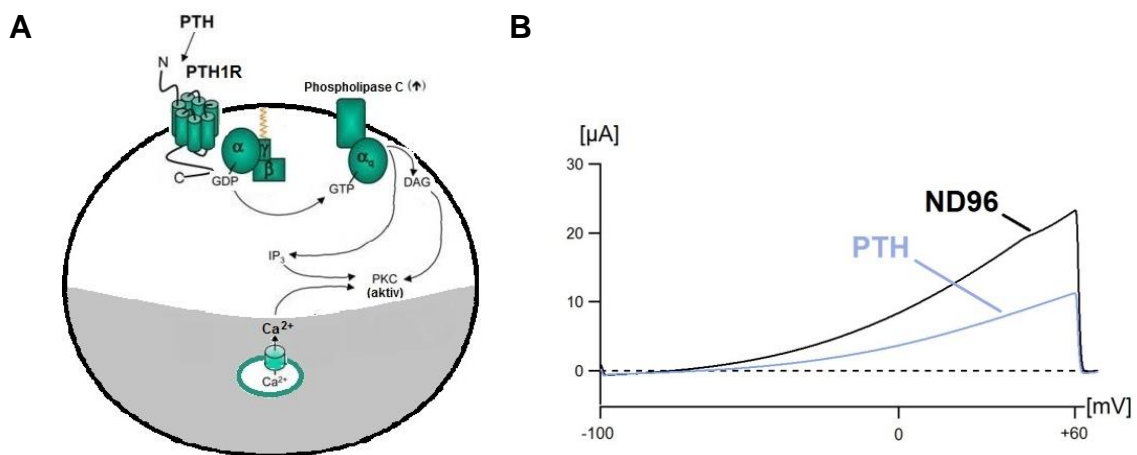


Abb. 3-5: Koexpression von TASK-1 mit PTH1R [WT]

TASK-1-Kanäle und Parathormon-Rezeptoren vom Wildtyp wurden zeitgleich heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimiert.

A: Schematische Darstellung der Kopplung des PTH1-Rezeptors an den $G\alpha_q$ -Signalweg: Der durch Bindung von PTH aktivierte PTH1-Rezeptor koppelt an die α -Untereinheit eines G_q -Proteins. Dieses dissoziiert von der $\beta\gamma$ -Untereinheit und aktiviert die Phospholipase C β , wodurch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu DAG und IP_3 hydrolysiert wird. Dies führt zur Freisetzung intrazellulär gespeicherten Kalziums durch IP_3 sowie zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch DAG und Ca^{2+} . Teile der Abbildung entnommen aus Vilardaga et al. (2011), Fig. 2; with permission of Springer

B: Spannungsrampen von -100 mV bis +60 mV über 2 s in ND 96-Badlösung (schwarz) und PTH-haltiger Messlösung (blau). Der K^+ -Auswärtsstrom wird durch Zugabe von PTH gehemmt.

Es folgte die weitere funktionelle Charakterisierung des Parathormon-Rezeptor Wildtyps mit dem Spannungssprünge-Protokoll:

Hierfür wurde das Membranpotential ausgehend vom Haltepotential von -60 mV in 20 mV-Sprüngen für je 500 ms auf -100 bis +60 mV geklemmt, wodurch die Spannungsabhängigkeit der TASK-1 Ströme gezeigt werden konnte.

Während Spannungen von -60 mV und höher Auswärtsströme hervorrufen, überwiegen bei Spannungen von -80 und -100 mV die Einwärtsströme (s. Abb. 3-6 A). Wird die PTH-haltige Messlösung appliziert und das Messprotokoll neu gestartet, so verringern sich die Stromamplituden deutlich gegenüber der Messung in ND 96-Badlösung, wobei auch hier Membranspannungen von -60 mV und höher Auswärtsströme erzeugen.

Wird das PTH durch ND 96-Badlösung wieder ausgewaschen, so steigt der inhibierte Strom wieder an, die Hemmung durch PTH ist damit reversibel.

Depolarisiert man TASK-1 und PTH1R [WT] koexprimierende Oozyten ausgehend vom Haltepotential (-60 mV) auf +30 mV, so zeigen diese einen eindeutig sichtbaren Auswärtsstrom. Das Membranpotential von +30 mV wurde gewählt, da TASK-1 Kanäle in diesem Spannungsbereich hohe, messbare Auswärtsströme generieren. Bei der Zugabe von PTH wurden deutlich geringere Auswärtsströme gemessen, der TASK-1 Strom wurde durch PTH gehemmt. (s. Abb. 3-6 B)

Diese Depolarisierung der Oozytenmembran auf +30 mV wurde beim Messprotokoll der kontinuierlichen Spannungssprünge alle 3 s wiederholt. So konnte das Verhalten der Auswärtsströme über einen längeren Zeitpunkt beobachtet werden (s. Abb. 3-6 C): In ND 96-Badlösung zeigt TASK-1 zunächst einen hohen, stabilen Auswärtsstrom. Wird PTH-haltige Messlösung (100 nM) hinzugegeben, kommt es zu einer raschen Hemmung des Stromes. Die Strom-Zeitkurve fällt steil ab. Wird PTH durch Zugabe der Badlösung wieder ausgewaschen, so erreicht die Stromstärke nach wenigen Minuten wieder ihren Ausgangswert.

Im Mittel ergab sich eine TASK-1 Inhibition durch PTH auf $52,11 \% \pm 3,60 \%$ (n=28) des zuvor unter ND 96 gemessenen Ausgangsstroms (s. Abb. 3-6 D).

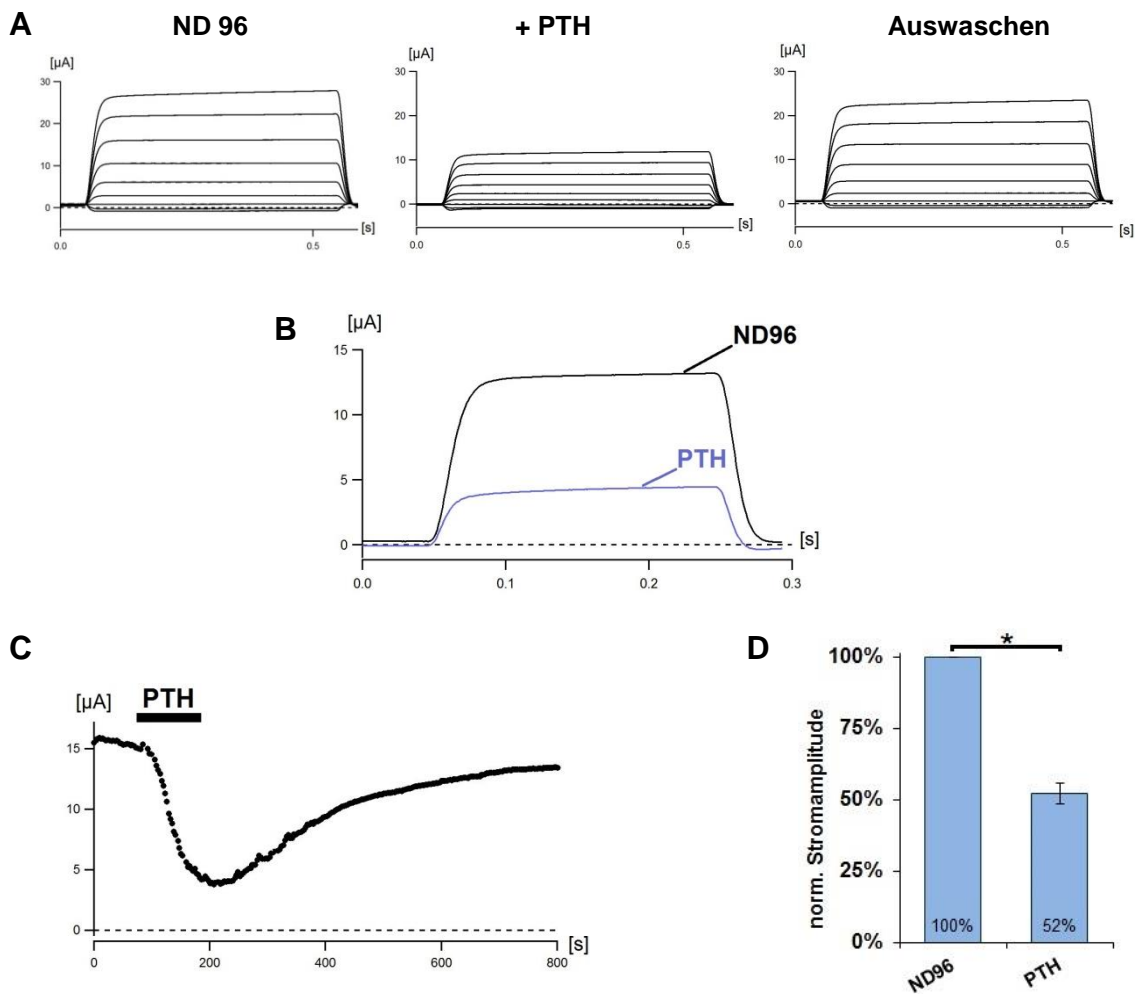


Abb. 3-6: Funktionelle Charakterisierung des Parathormon-Rezeptor Wildtyps durch Kopplung an den TASK-1 Kanal

Die Aktivierung des PTH1R [WT] durch PTH führt zu einer deutlichen Inhibition von TASK-1.

A: Spannungssprünge von +60 bis -100mV in 20 mV-Sprüngen für je 500 ms in ND 96-Badlösung, bei Zugabe von PTH und nach dem Auswaschen des PTHs mit Badlösung.

B: Spannungssprung von -60 mV auf +30 mV über 200 ms in ND 96-Badlösung (schwarz) und unter Zugabe der PTH-haltigen Messlösung (blau).

C: Repräsentative Messung einer TASK-1 und PTH1R [WT] koexprimierenden Oozyte. Während kontinuierlichen Membranpotentialsprüngen auf +30 mV wurde PTH hinzugegeben, was zu einer reversiblen Hemmung des TASK-1 Stroms führte.

D: Darstellung der quantitativ zusammengefassten Messungen im Säulendiagramm. Unter Zugabe von PTH reduziert sich die TASK-1 Stromamplitude auf durchschnittlich 52 % des unter ND 96 gemessenen Ausgangswertes.

Basierend auf den Untersuchungen von Roth und Mitarbeitern (2014) sollten nun die zuvor hergestellten Parathormon-Rezeptor Mutanten, die durch den Austausch einer einzelnen Base in der DNA-Sequenz zum Einbau einer anderen Aminosäure im Rezeptorprotein führen, funktionell charakterisiert und mit den Ergebnissen des Wildtyp-Rezeptors verglichen werden.

3.2.2 Koexpression von TASK-1 mit der Mutante PTH1R [P119L]

Bei dem durch Mutagenese hergestellten und durch Basensequenzierung überprüften Parathormon-Rezeptor [P119L] wurde die Nukleinbase Cytosin an Position 356 durch Thymin ersetzt. Dies führt zum Austausch der Aminosäure Prolin durch Leucin an Position 119 der Aminosäuresequenz. Die Lage dieser Mutation befindet sich in der prognostizierten Primärstruktur nach Gensure et al. (2005) in der Extrazellulardomäne des Rezeptors (s. Abb. 3-7 A).

Nach 48-stündiger Inkubation der TASK-1 und PTH1R [P119L] koexprimierenden Oozyten wurden zunächst TASK-1 Ströme anhand von Spannungsrampen nachgewiesen. Die Strom-Spannungskurve zeigte bei konstanter Potentialänderung von -100 mV bis +60 mV einen für TASK-1 typischen Verlauf mit hohen Auswärtsströmen oberhalb des Umkehrpotentials. Führt man das Messprotokoll mit denselben Oozyten in PTH-haltiger Messlösung statt in ND 96-Badlösung durch, so ändert sich die Strom-Spannungskurve der einzelnen Oozyten nicht, die gemessene Stromstärke hat für jede Oozyte in den unterschiedlichen Lösungen denselben Betrag (s. Abb. 3-7 B).

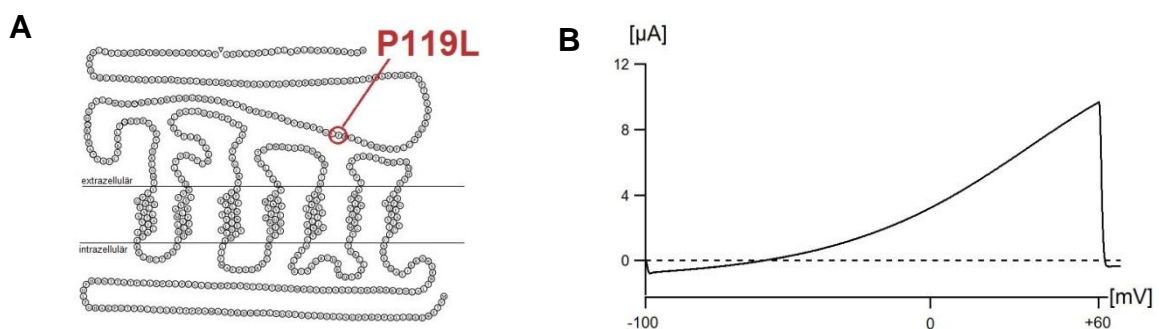


Abb. 3-7: Koexpression von TASK-1 mit PTH1R [P119L]

TASK-1 und PTH1R [P119L] wurden zeitgleich heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimiert.

A: Darstellung der Primärstruktur des PTH1-Rezeptors. Die Mutationsstelle ist gekennzeichnet. Abbildung modifiziert nach Gensure et al. (2005): Reprinted from Gensure et al. (2005), Copyright (2005), with permission from Elsevier

B: Spannungsrampe von -100 mV bis +60 mV über 2 s. Die Strom-Spannungskurve zeigt einen für TASK-1 typischen Verlauf mit hohen K^+ -Auswärtsströmen oberhalb des Umkehrpotentials.

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung der Mutante PTH1R [P119L] wurde auch hier zunächst das Spannungssprünge-Protokoll herangezogen.

Beim Durchlaufen der Spannungssprünge von -100 bis +60 mV in 20 mV-Schritten konnte die selbe Spannungsabhängigkeit der TASK-1 Ströme gezeigt werden wie zuvor beim Wildtyp: Bei Spannungen von -60 mV und höher überwiegen Auswärtsströme, bei Spannungen von -80 und -100 mV Einwärtsströme (s. Abb. 3-8 A).

Die Zugabe von PTH-haltiger Messlösung ändert das Verhalten der TASK-1 Kanäle nicht, die gemessenen Stromstärken sind nahezu identisch.

Depolarisiert man die Oozytenmembran ausgehend vom Haltepotential von -60 mV auf +30 mV, so zeigen auch die TASK-1 und PTH1R [P119L] koexprimierenden Oozyten einen eindeutig sicht- und messbaren Nettoauswärtsstrom. Dieser bleibt jedoch bei Zugabe von PTH nahezu unverändert (s. Abb. 3-8 B). Es ist keine eindeutige Inhibition des TASK-1 Stroms wie bei den Wildtyp-Rezeptoren exprimierenden Oozyten erkennbar.

Um das Verhalten der Auswärtsströme über einen längeren Zeitpunkt zu beobachten, wurde gemäß dem Messprotokoll der kontinuierlichen Spannungssprünge die Depolarisierung der Oozytenmembran auf +30 mV alle 3 s wiederholt. In ND 96-Badlösung zeigte TASK-1 dabei einen hohen, stabilen Auswärtsstrom, welcher durch die Zugabe der PTH-haltigen Messlösung nicht beeinflusst wurde. Auch das anschließende Auswaschen des PTHs durch ND 96 zeigte keine Änderung des TASK-1 Stroms (s. Abb. 3-8 C).

Quantitativ zusammengefasst ergab sich unter PTH-Zugabe eine durchschnittliche TASK-1 Stromamplitude von $104,71\% \pm 2,60\%$ ($n=14$) des zuvor unter ND 96 gemessenen Ausgangswerts (s. Abb. 3-8 D).

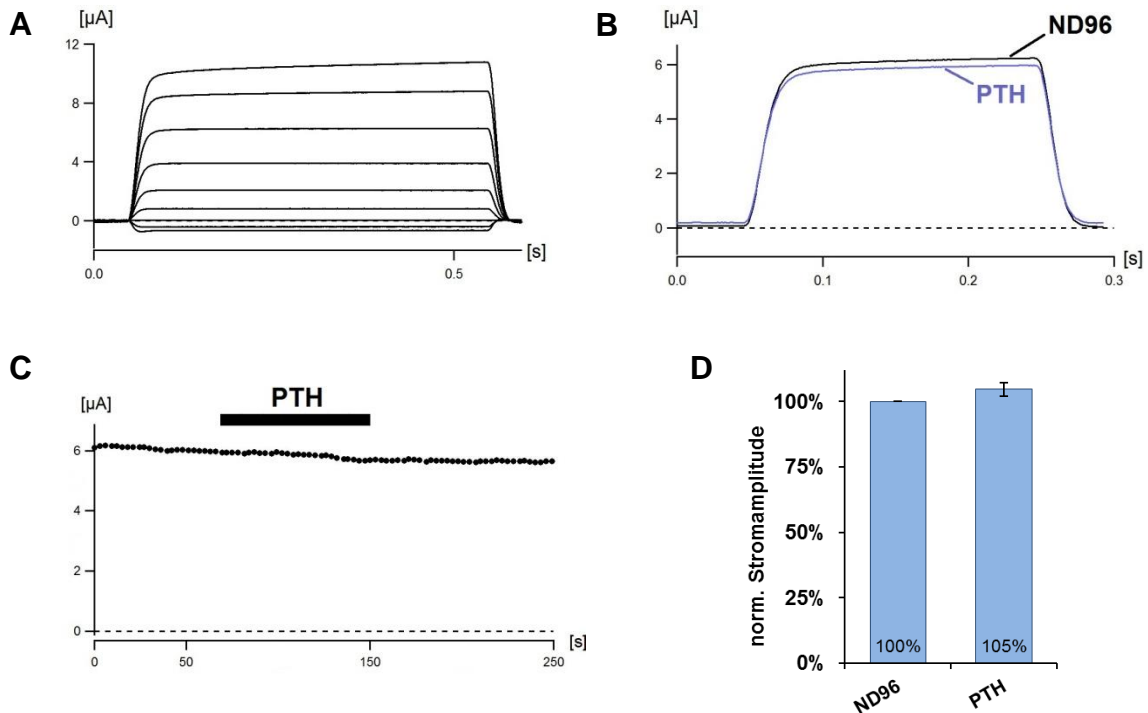


Abb. 3-8: Funktionelle Charakterisierung der Mutante PTH1R [P119L] durch Kopplung an TASK-1

Die Aktivierung von PTH1R [P119L] durch PTH führt nicht zur Inhibition von TASK-1.

A: Spannungssprünge von +60 bis -100mV in 20 mV-Sprüngen für je 500 ms in ND 96-Badlösung. Die Zugabe von PTH ändert die gemessenen Stromstärken nicht (nicht dargestellt).

B: Spannungssprung von -60 mV auf +30 mV über 200 ms in ND 96-Badlösung (schwarz) und unter Zugabe der PTH-haltigen Messlösung (blau).

C: Repräsentative Messung einer TASK-1 und PTH1R [P119L] koexprimierenden Oocyte. Während kontinuierlichen Membranpotentialsprüngen auf +30 mV wurde PTH hinzugegeben, welches das Verhalten des TASK-1 Stroms jedoch nicht beeinflusste.

D: Darstellung der quantitativ zusammengefassten Messungen im Säulendiagramm. Unter Zugabe von PTH beträgt die TASK-1 Stromamplitude durchschnittlich 105 % des unter ND 96 gemessenen Ausgangswertes.

3.2.3 Koexpression von TASK-1 mit der Mutante PTH1R [H442D]

Der Parathormon-Rezeptor [H442D] trägt seine Mutation aufgrund des herbeigeführten Austauschs von Cytosin durch Guanin an Position 1324 seiner Nukleinbasensequenz. Folglich wird statt Histidin Asparaginsäure an Position 442 in die Aminosäuresequenz des Rezeptorproteins eingebaut.

In der prognostizierten Primärstruktur des PTH1R nach Gensure et al. (2005) liegt die Mutation in der dritten extrazellulären Schleife des heptahelikalen Rezeptors (s. Abb. 3-9 A).

Auch bei dieser Mutante wurde zunächst nach 48-stündiger Inkubation der koexprimierenden Oozyten der TASK-1 Strom anhand des Spannungsrampen-Messprotokolls nachgewiesen. Bei der Hyperpolarisation der Oozytenmembran auf -100 mV und anschließender konstanter Potentialänderung bis auf +60 mV zeigten auch Oozyten, die diese Mutante exprimierten, die für TASK-1 typische Strom-Spannungskurve mit hohen Kaliumauswärtsströmen oberhalb des Umkehrpotentials (s. Abb. 3-9 B). Die Kurven änderten sich bei Zugabe von PTH nicht.

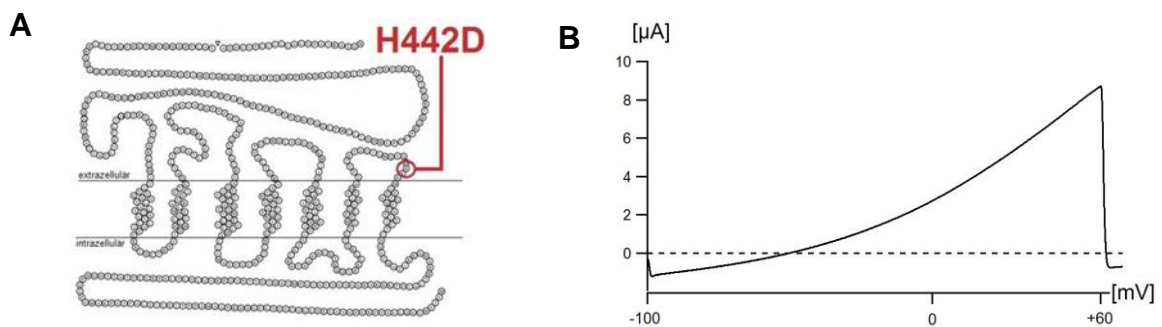


Abb. 3-9: Koexpression von TASK-1 mit PTH1R [H442D]

TASK-1 und PTH1R [H442D] wurden zeitgleich heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimiert.

A: Darstellung der Primärstruktur des PTH1-Rezeptors. Die Mutationsstelle ist gekennzeichnet. Abbildung modifiziert nach Gensure et al. (2005): Reprinted from Gensure et al. (2005), Copyright (2005), with permission from Elsevier

B: Spannungsrampe von -100 mV bis +60 mV über 2 s. Die Strom-Spannungskurve zeigt einen für TASK-1 typischen Verlauf mit hohen K⁺-Auswärtsströmen oberhalb des Umkehrpotentials.

Durch das Spannungssprünge-Protokoll konnte auch die Mutante PTH1R [H442D] weiter funktionell charakterisiert werden. Es zeigte sich dieselbe Spannungsabhängigkeit der TASK-1 Ströme beim Durchlaufen der Spannungssprünge von -100 bis +60 mV in 20 mV-Schritten wie zuvor beim Wildtyp: Bei Spannungen von -60 mV und höher überwiegen in der Regel Auswärtsströme, bei Spannungen von -80 und -100 mV Einwärtsströme. Das Umkehrpotential der abgebildeten Oozyte war jedoch höher, so dass auch eine angelegte Spannung von -60 mV Nettoeinwärtsströme zeigten (s. Abb. 3-10 A). Die Zugabe von PTH-haltiger Messlösung ruft ein identisches Verhalten der TASK-1 Kanäle hervor wie zuvor in ND 96-Badlösung. Die Stromamplituden je angelegter Spannung sind in beiden Lösungen vergleichbar.

Die Depolarisation der Oozytenmembran auf +30 mV führt auch bei TASK-1 und PTH1R [H442D] koexprimierenden Oozyten zu einem eindeutig sicht- und messbaren Nettoauswärtsstrom, welcher sich jedoch bei Zugabe von PTH nicht signifikant ändert (s. Abb. 3-10 B).

Auch bei dieser Mutante wurde das Verhalten des Auswärtsstroms über einen längeren Zeitraum und in verschiedenen Lösungen durch die Anwendung des Protokolls der kontinuierlichen Spannungssprünge (Depolarisation auf +30 mV alle 3 s) beobachtet: In ND 96-Badlösung zeigte TASK-1 einen hohen gleichmäßigen Auswärtsstrom. Die Zugabe von PTH-haltiger Messlösung sowie das anschließende Auswaschen des PTHs durch ND 96 veränderte diesen nicht, die Strom-Zeit Kurve beschreibt annähernd eine Gerade (s. Abb. 3-10 C). Im Mittel ergab sich unter PTH-Zugabe eine TASK-1 Stromamplitude von $96,17\% \pm 2,70\%$ (n=15) des zuvor unter ND 96 gemessenen Ausgangswerts (s. Abb. 3-10 D).

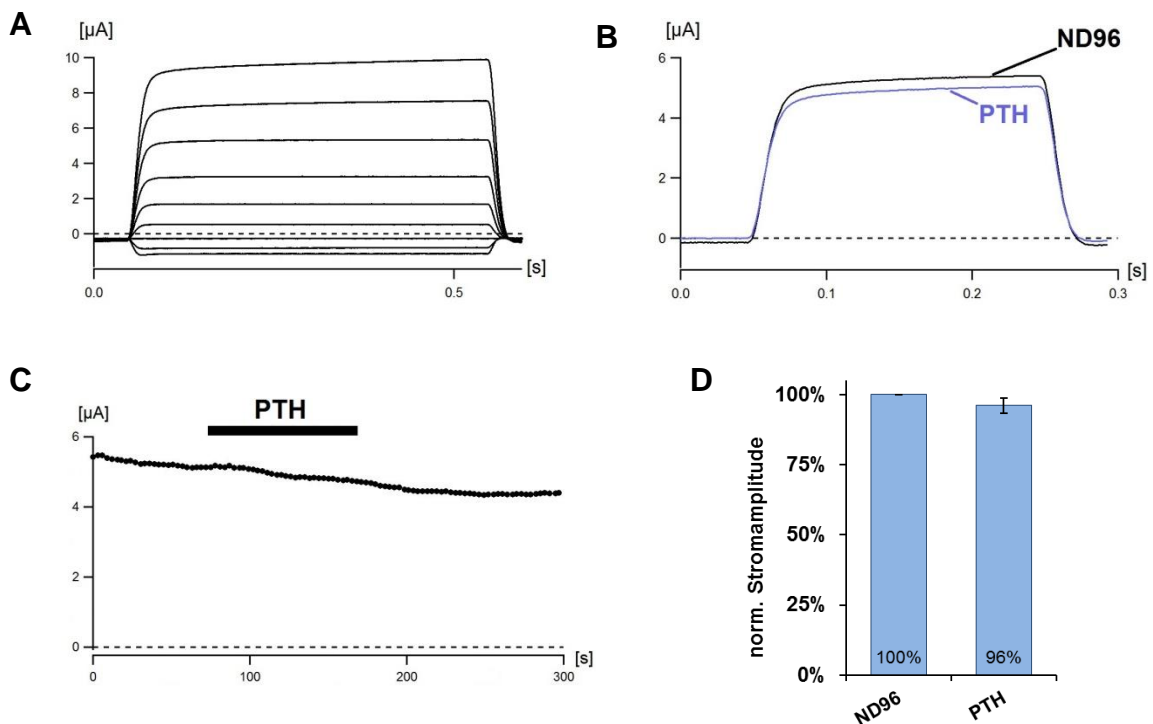


Abb. 3-10: Funktionelle Charakterisierung der Mutante PTH1R [H442D] durch Kopplung an TASK-1

Die Aktivierung von PTH1R [H442D] durch PTH führt nicht zur Inhibition von TASK-1.

A: Spannungssprünge von +60 bis -100 mV in 20 mV-Sprüngen für je 500 ms in ND 96-Badlösung.

B: Spannungssprung von -60 mV auf +30 mV über 200 ms in ND 96-Badlösung (schwarz) und unter Zugabe der PTH-haltigen Messlösung (blau).

C: Repräsentative Messung einer TASK-1 und PTH1R [H442D] koexprimierenden Oozyte. Während kontinuierlichen Membranpotentialsprüngen auf +30 mV wurde PTH hinzugegeben, welches das Verhalten des TASK-1 Stroms jedoch nicht beeinflusste.

D: Darstellung der quantitativ zusammengefassten Messungen im Säulendiagramm. Unter Zugabe von PTH beträgt die TASK-1 Stromamplitude durchschnittlich 96 % des unter ND 96 gemessenen Ausgangswertes.

3.2.4 Koexpression von TASK-1 mit der Mutante PTH1R [L232R] und der Mutante PTH1R [L292P]

Die Parathormon-Rezeptor Mutante [L232R] wurde durch den Einbau von Guanin statt Thymin an Position 695 ihrer Nukleinbasensequenz hergestellt. Das betroffene Basentriplet codiert dadurch nicht mehr für Leucin, stattdessen wird Arginin an die Position 232 des Rezeptorproteins eingebaut.

In der prognostizierten Primärstruktur des PTH1R nach Gensure et al. (2005) liegt die Mutation in der zweiten Transmembrandomäne des sieben Transmembrandomänen umfassenden Rezeptors (s. Abb. 3-11 A1).

Auch die Mutante PTH1R [L292P] liegt innerhalb einer Transmembrandomäne, jedoch in der dritten (s. Abb. 3-11 A2).

Für ihre Herstellung wurde an der Basensequenzposition 875 Thymin gegen Cytosin getauscht, sodass in das Rezeptorprotein die Aminosäure Prolin statt Leucin an Position 292 eingebaut wird.

Zum Nachweis des TASK-1 Stroms wurde auch bei den Oozyten, die TASK-1 und eine dieser beiden Mutanten koexprimierten, nach 48 Stunden gemäß dem Spannungsrampen-Protokoll die Oozytenmembran auf -100 mV hyperpolarisiert und mit konstanter Potentialänderung bis auf +60 mV depolarisiert. Auch hier zeigt sich für beide Untersuchungsgruppen die für TASK-1 typische Strom-Spannungskurve mit immer höher werdenden Auswärtsströmen oberhalb des Umkehrpotentials. Die Amplitude ändert sich bei Zugabe von PTH bei beiden Mutanten nicht (s. Abb. 3-11 B1&2).

Dies wird durch die Beobachtung je eines einzelnen Spannungspulses von -60 mV auf +30 mV bestätigt: Für beide Untersuchungsgruppen ist ein hoher stabiler Auswärtsstrom in ND 96-Badlösung zu beobachten, der sich durch Zugabe der PTH-haltigen Messlösung nicht signifikant änderte (s. Abb. 3-11 C1&2).

Auch bei kontinuierlichen Spannungssprüngen auf +30 mV zeigte sich für beide Mutanten ein Auswärtsstrom, der unabhängig von der Bad- und Messlösung war (s. Abb. 3-11 D1&2).

In der quantitativen Auswertung ergab sich schließlich im Mittel für die Mutante PTH1R [L232R] unter PTH-Zugabe eine TASK-1 Stromamplitude von $97,80\% \pm 2,76\%$ (n=16) und für die Mutante PTH1R [L292P] eine Stromamplitude von $100,77\% \pm 1,97\%$ (n=18) des jeweils zuvor unter ND 96 gemessenen Ausgangswerts (s. Abb. 3-12).

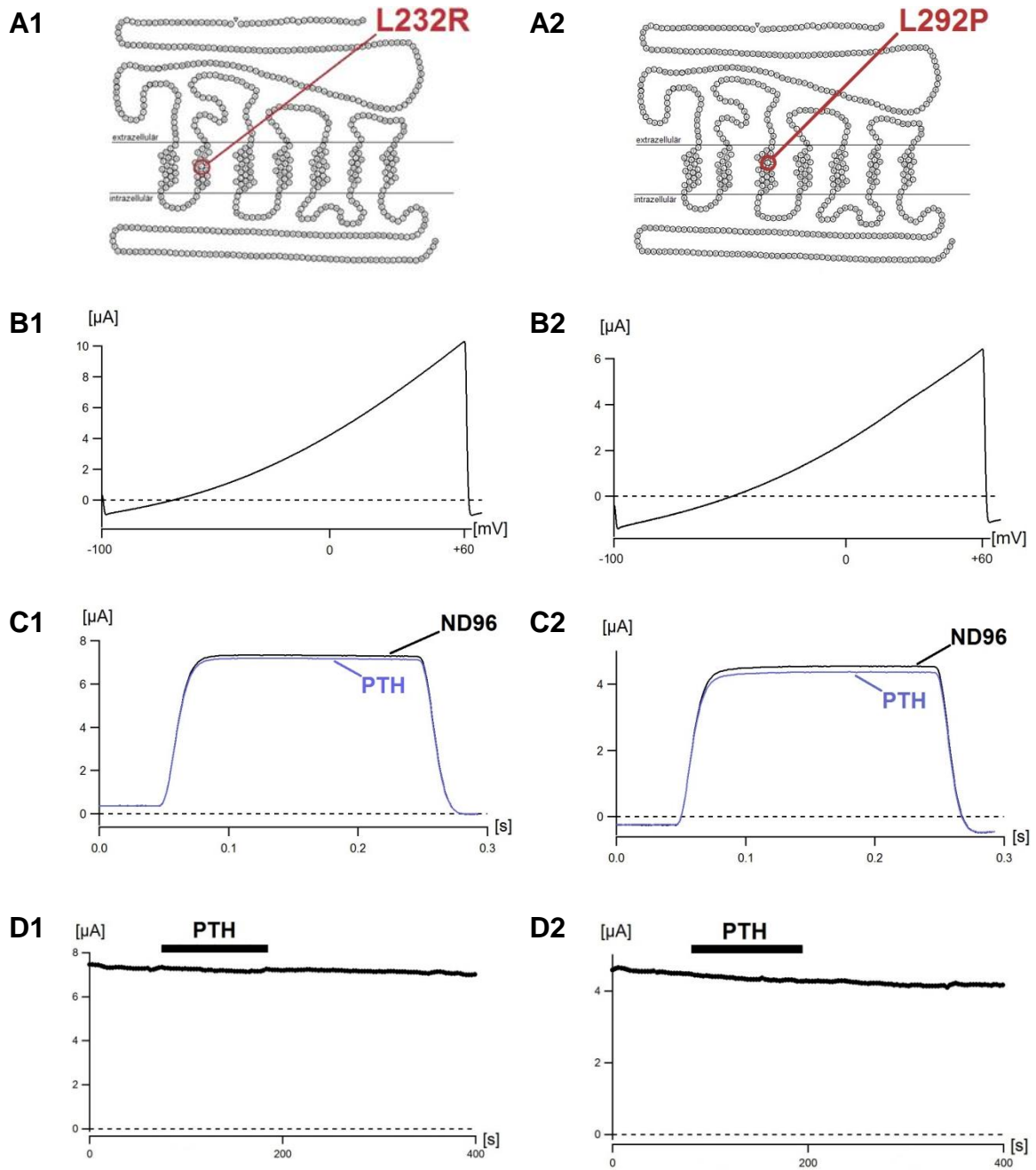


Abb. 3-11: Funktionelle Charakterisierung der Mutanten PTH1R [L232R] und PTH1R [L292P] durch Kopplung an TASK-1

TASK-1 und PTH1R [L232R] sowie TASK-1 und PTH1R [L292P] wurden zeitgleich heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimiert. Die Aktivierung von PTH1R [L232R] und PTH1R [L292P] durch PTH führt nicht zur Inhibition von TASK-1. Die Abbildungen der Mutante PTH1R [L232R] sind links, die der Mutante PTH1R [L292P] rechts dargestellt:

A1 & A2: Darstellung der Primärstruktur des PTH1-Rezeptors. Die Mutationsstelle ist jeweils gekennzeichnet. Abbildungen modifiziert nach Gensure et al. (2005): Reprinted from Gensure et al. (2005), Copyright (2005), with permission from Elsevier

B1 & B2: Spannungsrampen von -100 mV bis +60 mV über 2 s. Die Strom-Spannungskurven zeigen einen für TASK-1 typischen Verlauf.

C1 & C2: Spannungssprung von -60 mV auf +30 mV über 200 ms in ND 96-Badlösung (schwarz) und unter Zugabe der PTH-haltigen Messlösung (blau).

D1 & D2: Repräsentative Messung einer TASK-1 und PTH1R [L232R] bzw. PTH1R [L292P] koexprimierenden Oozyte. Während kontinuierlichen Membranpotentialsprüngen auf +30 mV wurde PTH hinzugegeben, welches das Verhalten des TASK-1 Stroms jeweils nicht beeinflusste.

3.2.5 Funktionsverlust des Parathormon-Rezeptors durch den Austausch von Aminosäuren

Wie den oben dargestellten Untersuchungen zu entnehmen ist, führt ein Austausch bestimmter Aminosäuren im Parathormon-Rezeptor zu einem Funktionsverlust des Rezeptorproteins. Die Messdaten der elektro-physiologischen Untersuchungen dieser Mutanten zeigen bei der Zugabe von PTH einen signifikanten Unterschied zu denen des Wildtyps:

Unter Verwendung des Messprotokolls der kontinuierlichen Spannungssprünge, bei dem das Membranpotential alle 3 s für 0,2 s auf +30 mV depolarisiert wurde, wurde die Stromamplitude einer Oozyte in ND 96-Badlösung - gleich welche PTH1R-Variante diese exprimiert - als 100 % definiert. Nach Zugabe PTH-haltiger Messlösung wurde eine durchschnittliche Stromamplitude je PTH1R-Variante für n Messungen berechnet.

Dabei wurden die natürlich vorkommenden sog. run-up- und down-Effekte der Oozyten berücksichtigt, indem durch die Messpunkte zu den Zeitpunkten 30 s und 3 s vor Beginn der PTH-Applikation eine Gerade gelegt wurde, wobei an allen Punkten auf der Geraden die Stromamplitude definitionsgemäß 100 % beträgt.

So ergibt sich für den PTH1-Rezeptor Wildtyp eine durchschnittliche Stromamplitude nach PTH-Zugabe von $52,11\% \pm 3,60\%$ (n=28). Der TASK-1 Strom reduziert sich also um 47,89 % und hat sich somit verglichen mit seinem Ausgangswert nahezu halbiert.

Dagegen zeigen sich für die Mutanten keine signifikanten Änderungen der Stromamplituden nach Zugabe der PTH-haltigen Messlösung:

Für die Mutante PTH1R [P119L] erhöht sich der durchschnittliche Strom auf $104,71\% \pm 2,60\%$ (n=14), für die Mutante PTH1R [H442D] ergibt sich eine durchschnittliche Stromamplitude von $96,17\% \pm 2,70\%$ (n=15), auch bei Mutante PTH1R [L232R] reduziert sich der Strom in geringem Ausmaß auf durchschnittlich $97,80\% \pm 2,76\%$ (n=16). Nahezu konstant mit durchschnittlich

100,77% ± 1,97% (n=18) bleibt die Stromamplitude von Mutante PTH1R [L292P].

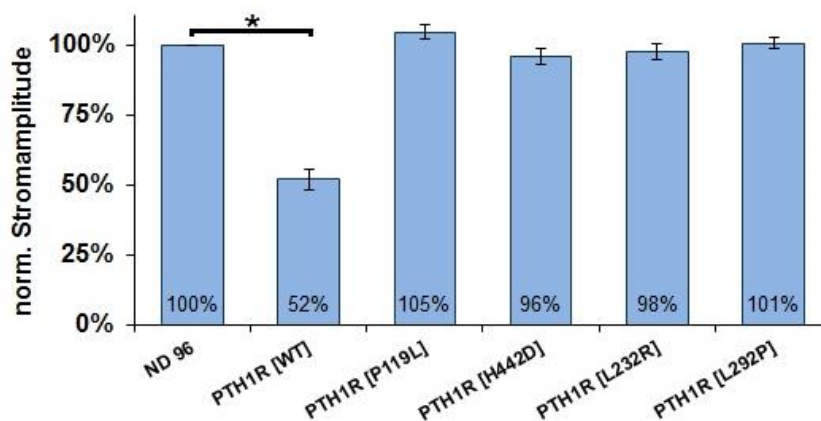


Abb. 3-12: Quantitative Zusammenfassung der normierten Stromamplituden im Säulendiagramm

Zusammenfassende Darstellung der Messergebnisse im Säulendiagramm: Beträgt die Amplitude des auswärtsgerichteten Kaliumstroms durch den TASK-1 Kanal einer Oozyte in der Badlösung ND 96 100 %, so sinkt die Stromamplitude nach Zugabe von PTH bei Oozyten mit Wildtyp-Rezeptoren auf durchschnittlich nur noch 52 %, während die Stromamplituden der Mutanten-exprimierenden Oozyten keine signifikante Änderungen unter PTH zeigen. Die Stromamplituden wurden je bei einem Membranpotential von +30 mV mit dem Protokoll der kontinuierlichen Spannungssprünge gemessen.

Innerhalb der einzelnen Untersuchungsgruppen ergibt sich für die Messdaten nach dem Shapiro-Wilk-Test jeweils eine Normalverteilung ($p > 0,05$).

Nach der Bonferroni-Methode bestehen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ zwischen jeder einzelnen untersuchten Mutante und dem Wildtyp signifikante Unterschiede, nicht aber zwischen den verschiedenen Mutanten. Die getestete Hypothese, dass sich die Mutanten PTH1R [P119L], PTH1R [H442D], PTH1R [L232R] und PTH1R [L292P] bei Zugabe von PTH jeweils signifikant anders verhalten als PTH1R [WT], ist somit mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% zutreffend.

Ein Austausch dieser entsprechenden Aminosäuren führt also zu einem Funktionsverlust des Parathormon-Rezeptors Typ 1, wenn man die deutliche Reduzierung des TASK-1 Stroms bei Kopplung an den Wildtyp nach PTH-Applikation als Verhalten bei voller Rezeptorfunktion definiert. Bei den untersuchten Mutationen handelt es sich somit Loss-of-function-Mutationen.

3.2.6 Aktivierung von TRESK durch den G_q-gekoppelten Rezeptor PTH1R

Um die durch die Kopplung mit dem TASK-1 Kanal gewonnenen Messergebnisse zu überprüfen, wurden die Messreihen mit einem weiteren Tandemporen-Kaliumkanal wiederholt. Dafür wurde TRESK verwendet, der durch die Kopplung an einen G_q-gekoppelten Rezeptor im Gegensatz zu TASK-1 aktiviert wird:

Die Aktivierung von TRESK durch G_q-gekoppelte Rezeptoren erfolgt über einen intrazellulären Signalweg, der sich an die Bindung von PTH an PTH1R anschließt und über die Aktivierung der PLC zur Spaltung von PIP₂ in DAG und IP₃ führt. IP₃ setzt intrazelluläres Kalzium frei, wodurch Calcineurin aktiviert wird. Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin bindet nun direkt an die PQIVID-Sequenz einer intrazellulären Schleife des TRESK-Proteins und dephosphoryliert dieses, was schließlich zur Aktivierung des TRESK-Kanals führt (Czirjak und Enyedi 2006).

Das Vorgehen erfolgte analog zu den Untersuchungen an TASK-1 und begann mit der Überprüfung der Sensitivität des TRESK-Kanals auf die Aktivierung des Parathormon-Rezeptors durch die Bindung seines Liganden Parathormon: Für die Messungen wurden TRESK-Kanäle und Parathormon-Rezeptoren des Wildtyps zeitgleich heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimiert und mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) elektrophysiologisch untersucht. Die Messreihen dienen zur qualitativen Überprüfung der durch Koexpression des Rezeptors mit dem TASK-1 Kanal gewonnenen Messergebnisse, nicht jedoch zur quantitativen Überprüfung.

Es wurde auch hier zunächst anhand des Messprotokolls der Spannungsrampe überprüft, ob die Oozyten den TRESK-Kanal exprimierten. Dabei zeigte sich eine für TRESK typische Strom-Spannungskurve mit einem mit zunehmendem Membranpotential immer größer werdenden Strom. Die Stromamplituden bei Membranpotentialen oberhalb des Umkehrpotentials waren dabei sichtbar

größer als die Amplituden unterhalb des Umkehrpotentials. Unter Zugabe von PTH vergrößerten sich die Amplituden deutlich (s. Abb. 3-13 A).

Durch kontinuierliche Spannungssprünge ausgehend vom Haltepotential von -60 mV auf +30 mV alle 3 s konnte die Änderung des Auswärtsstroms unter Ein- und Auswaschung PTH-haltiger Messlösung beobachtet werden. Auch hier wurde ein Potential von +30 mV gewählt, da TRESK als K_{2P} -Kanal bei diesem Potential hohe Kaliumauswärtsströme zeigt.

Eine PTH-Zugabe führte zu einer raschen und deutlichen Erhöhung des Kaliumauswärtsstroms. Diese ist vollständig reversibel, der Auswaschvorgang und das damit verbundene Absinken der Stromstärke erfolgte jedoch langsamer (s. Abb. 3-13 B).

Es konnte auch gezeigt werden, dass die Aktivierung konzentrationsabhängig ist. Die Sättigungskonzentration ist mit 10 nM fast erreicht. Mit höherer Konzentration von 100 nM ist eine stärkere Aktivierung des Kaliumauswärtsstroms kaum erreichbar. Alle folgenden Messungen wurden mit einer PTH-Konzentration von 100 nM durchgeführt, um den höchstmöglichen Auswärtsstrom zu erreichen.

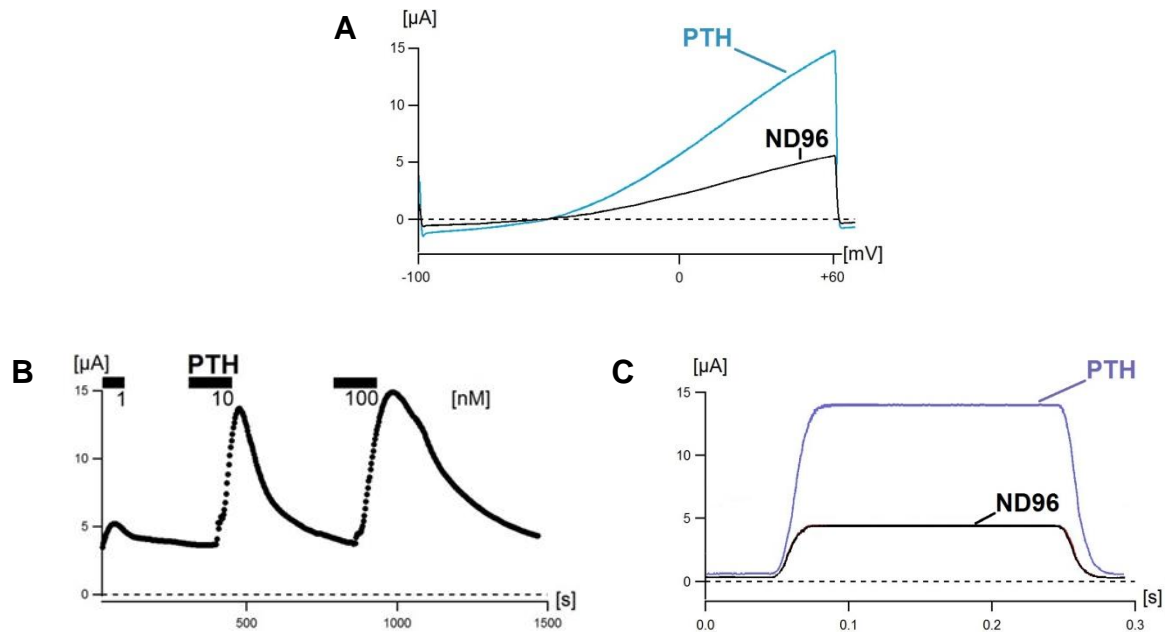


Abb. 3-13: Funktionelle Charakterisierung des Parathormon-Rezeptor Wildtyps durch Kopplung an den TRESK-Kanal

TRESK-Kanäle und Parathormon-Rezeptoren des Wildtyps wurden zeitgleich heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimiert. Die Aktivierung von PTH1R durch PTH führt zu einer deutlichen Aktivierung von TRESK.

A: Spannungsrampen von -100 mV bis +60 mV in An- und Abwesenheit von PTH. Der basale Auswärtsstrom wurde durch Zugabe von PTH stark erhöht.

B: Repräsentative Messung einer Oozyte mit dem Protokoll der kontinuierlichen Spannungssprünge auf +30 mV alle 3 s während des Ein- und Auswaschens unterschiedlicher PTH-Konzentrationen. Die PTH-Zugaben sind konzentrationsabhängig und vollständig reversibel.

C: Einzelner Spannungspuls über 200 ms auf +30mV unter PTH (blau) und ND 96 (schwarz).

3.2.7 Koexpression der PTH1R-Mutanten mit TRESK

Im Folgenden wurden die Parathormon-Rezeptor Mutanten jeweils mit TRESK-Kanälen zeitgleich heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimiert.

Die Spannungsrampen zeigten auch hier die für TRESK typischen Strom-Spannungskurven mit hohen und zunehmenden Auswärtsströmen oberhalb des Umkehrpotentials. Eine Zugabe von PTH änderte die Kurven aber nicht.

Auch bei den kontinuierlichen Spannungssprüngen zeigten die Oozyten zwar einen hohen Kaliumauswärtsstrom bei angelegten Membranspannungen von +30 mV, beim Einwaschen der PTH-haltigen Messlösung änderte sich dieser jedoch nicht. Die Stromamplituden blieben konstant, von kleineren run up- oder down-Effekten abgesehen.

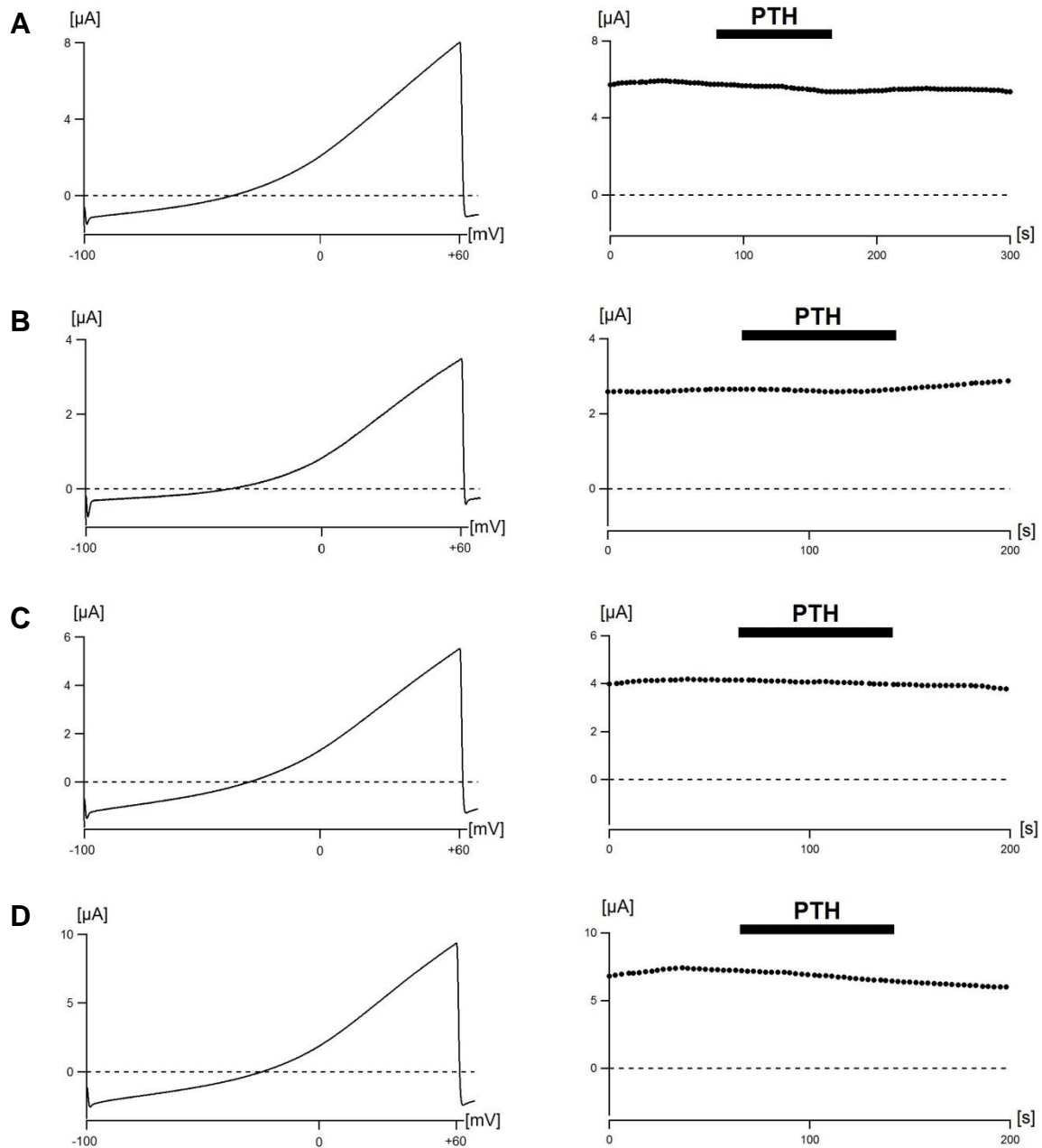


Abb. 3-14: Koexpression der Parathormon-Rezeptor Mutanten mit TRESK

Dargestellt sind links die Spannungsrampen von -100 bis +60 mV über 2000 ms, die die typischen Strom-Spannungskurven eines TRESK-Stroms zeigen, sowie rechts die kontinuierlichen Spannungssprünge alle 3 s über 200 ms bei +30 mV je einer repräsentativen Oozyte der einzelnen Mutanten. Die Spannungsmessungen zeigen, dass das Einwaschen der PTH-haltigen Messlösung die Stromamplitude nicht ändert.

A: Mutante PTH1R [P119L]; **B:** Mutante PTH1R [H442D]; **C:** Mutante PTH1R [L232R]; **D:** Mutante PTH1R [L292P]

Diese Ergebnisse bestätigen, dass die hier untersuchten Mutationen Loss-of-function-Mutationen sind. Der Austausch einer bestimmten Aminosäure im Rezeptorprotein führt zu einem Funktionsverlust des Parathormon-Rezeptors.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird nachgewiesen, dass es sich bei den untersuchten Mutationen im Parathormon-Rezeptor um Loss-of-function-Mutationen handelt.

Durch Koexpression der Rezeptoren mit Tandemporen-Kaliumkanälen und anschließender elektrophysiologischer Untersuchung mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) konnte gezeigt werden, dass eine Bindung von Parathormon an den Rezeptor nur beim Wildtyp-Rezeptor eine Rezeptorantwort hervorruft, nicht jedoch bei den Parathormon-Rezeptor Mutanten.

Die Untersuchungen von Roth und Mitarbeitern (2014) stellen den Zusammenhang zwischen diesen Gen-Mutationen und dem Krankheitsbild der primären Zahndurchbruchsstörung (PFE) her, welcher im Folgenden diskutiert werden soll. So wurden alle vier untersuchten *missense*-Mutationen von Roth und Mitarbeitern in ihrer Pathogenität als „wahrscheinlich schädlich“ eingestuft. Durch die vorliegende Arbeit können diese Mutationen nun als „pathogen“ und damit PFE-verursachend bezeichnet werden.

4.1 Ursachen des Funktionsverlusts der Parathormon-Rezeptor Mutanten

4.1.1 Funktionsverlust der Mutante PTH1R [P119L]

Die durchgeführten TEVC-Messungen bestätigen einen Funktionsverlust des Rezeptors PTH1R [P119L], der einzig auf den Austausch der Aminosäure Prolin gegen Leucin an Position 119 zurückgeführt werden kann.

Während eine Aktivierung der Wildtyp-Rezeptoren durch PTH eine Inhibition des auswärtsgerichteten K⁺-Stroms von TASK-1 Kanälen auf 52,11 % ± 3,60 % ihres Ausgangswertes hervorruft, kann eine TASK-1 Inhibition bei

PTH1R [P119L] exprimierenden Oozyten nicht festgestellt werden. Der durchschnittliche Strom erhöhte sich sogar auf $104,71\% \pm 2,60\%$ des Ausgangswertes. Dabei kann eine Aktivierung von TASK-1 ausgeschlossen werden, die leichte Erhöhung gegenüber dem Ausgangsstrom ist mit endogenen Effekten der Oozyten zu erklären.

Zwischen den Messwerten des Wildtyps und der Mutante besteht ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), wodurch die Hypothese des Funktionsverlustes der Mutante mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% zutreffend ist.

Messungen mit den Messprotokollen der Spannungsrampen und Spannungssprüngen, sowie schließlich die Wiederholung der Messreihe mit dem K_{2P} -Kanal TRESK bestätigten dieses Ergebnis.

Bei der Mutante PTH1R [P119L] erfolgt der Austausch von Prolin gegen Leucin an Position 119 der Aminosäuresequenz, welche sich in der Extrazellulärdomäne des Rezeptors befindet (Gensure et al. 2005).

Chemisch handelt es sich bei Prolin eigentlich nicht um eine Aminosäure, sondern um eine Iminosäure, da sie einen Pyrrolidinring enthält. Prolin ist unpolar, gut wasserlöslich und mit einer molaren Masse von 115 g/mol leichter als Leucin (131 g/mol). Leucin ist dagegen auch unpolar, jedoch schlecht wasserlöslich und trägt eine aliphatische, verzweigte Seitenkette.

(Löffler et al. 2007, Horn 2009)

Für eine Erklärung des Funktionsverlustes ist auch ein Vergleich mit der Mutante [L292P] hinweisgebend, die dem gegensätzlichen Austausch von Prolin und Leucin entspricht. Wichtig sind dabei die unterschiedlichen Mutationsstellen. So befindet sich Aminosäure 119 in der Extrazellulärdomäne und damit in einer hydrophilen Umgebung, Aminosäure 292 dagegen in der lipophilen dritten Transmembrandomäne (Gensure et al. 2005).

Wird das gut wasserlösliche Prolin nun in der Extrazellulärdomäne durch das schlecht wasserlösliche Leucin ersetzt, so kann das die Struktur des

Rezeptorproteins nachhaltig stören. Auch die unterschiedliche molare Masse kann eine Rolle spielen.

Dagegen hat Leucin in der Transmembrandomäne die Aufgabe, durch seine lipophile Eigenschaft das Protein in der Membran zu verankern. Diese Aufgabe kann das hydrophile Prolin nicht leisten, was ein Grund für den Funktionsverlust von PTH1R [L292P] sein kann.

4.1.2 Funktionsverlust der Mutante PTH1R [H442D]

Auch bei der Mutante PTH1R [H442D] konnte durch TEVC-Messungen gezeigt werden, dass sich die durchschnittliche Stromamplitude nach Zugabe von PTH im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant ändert. Der durchschnittliche Strom der Mutante betrug nach PTH-Zugabe $96,17\% \pm 2,70\%$ des Ausgangswerts, was einen Funktionsverlust des Rezeptorproteins bestätigt.

Die Mutationsstelle dieser Mutante befindet sich in der dritten extrazellulären Schleife (Gensure et al. 2005), wo an Position 442 der Aminosäuresequenz Histidin gegen Asparaginsäure ausgetauscht wird.

Histidin und Asparaginsäure gehören beide zu den geladenen Aminosäuren, sind beide polar und schlecht wasserlöslich. Während Histidin jedoch als Seitenkette einen stickstoffhaltigen Imidazolring hat, bei physiologischem pH-Wert ein Proton aufnimmt und basisch ist, ist Asparaginsäure mit einem pKs-Wert von 4,0 sehr sauer, gibt bei physiologischem pH-Wert ein Proton ab und enthält eine kurze, unverzweigte aliphatische Seitenkette mit nur zwei C-Atomen, was mit 133 g/mol zu einer geringeren molaren Masse führt, als das Histidin (155 g/mol).

(Löffler et al. 2007, Horn 2009)

Verantwortlich für den Funktionsverlust des Rezeptors ist vermutlich, neben den weiteren oben aufgeführten unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Aminosäuren, hauptsächlich die Azidität der Asparaginsäure: Diese führt bei einem physiologischen pH-Wert zu einer negativ geladenen Seitenkette im

Gegensatz zur positiv geladenen Seitenkette des Histidins, was einen bedeutenden Unterschied zwischen den beiden getauschten Aminosäuren darstellt.

4.1.3 Funktionsverlust der Mutante PTH1R [L232R]

Die durchschnittliche Stromamplitude bei TEVC-Messungen der Mutante PTH1R [L232R] betrug nach PTH-Zugabe $97,80\% \pm 2,76\%$ des Ausgangswerts. Dies stellt im Vergleich zum Wildtyp keine signifikante Rezeptorantwort auf die Ligandenbindung dar, was einen Funktionsverlust der Mutante bestätigt.

Bei dieser Mutante wird Leucin an Position 232 der Aminosäuresequenz gegen Arginin ausgetauscht. Die Mutationsstelle befindet sich in der zweiten Transmembrandomäne des Rezeptorproteins (Gensure et al. 2005).

Während Leucin wie zuvor beschrieben eine unpolare, schlecht wasserlösliche Aminosäure ist, handelt es sich bei Arginin um eine gut wasserlösliche, geladene Aminosäure, die polar und mit einem pKs-Wert von 12,5 sehr basisch ist und unter physiologischen Bedingungen ein Proton aufnimmt. Als Besonderheit trägt Arginin eine Guanidinogruppe in ihrer Seitenkette, wohingegen Leucin eine aliphatische, verzweigte Seitenkette besitzt. Auch die molare Masse unterscheidet sich: Arginin ist mit 174 g/mol schwerer als Leucin (131 g/mol).

(Löffler et al. 2007, Horn 2009)

Für die Erklärung des Funktionsverlust der Mutante PTH1R [L232R] spielen auch hier die gegensätzlichen Eigenschaften der ausgetauschten Aminosäuren und die Mutationsstelle eine Rolle. Die unterschiedliche Polarität scheint dabei der entscheidendste Aspekt zu sein: Während das Leucin des Wildtyps unpolar ist, ist das Arginin der Mutante sehr polar. Arginin gilt dabei als die hydrophilste aller Aminosäuren. Betrachtet man dies vor dem Hintergrund der Mutationsstelle, die sich in der dritten Transmembrandomäne und somit in der

hydrophoben Doppellipidschicht befindet, könnte das die entscheidende Ursache des Funktionsverlusts darstellen.

4.1.4 Funktionsverlust der Mutante PTH1R [L292P]

Auch die Ergebnisse der TEVC-Messungen der Mutante [L292P] ergeben im Vergleich zum Wildtyp einen signifikanten Unterschied bei der Reaktion auf die Zugabe von PTH. Der TASK-1 Strom wurde bei mutantenexprimierenden Oozyten nicht inhibiert und betrug nach PTH-Zugabe durchschnittlich $100,77\% \pm 1,97\%$ des Ausgangswerts.

Bei dieser Mutante wird Leucin an Position 292 der Aminosäuresequenz gegen Prolin ausgetauscht, was dem gegensätzlichen Austausch zur Mutante [P119L] entspricht. Die Mutationsstelle befindet sich in der dritten Transmembrandomäne (Gensure et al. 2005).

Eine mögliche Erklärung für den Funktionsverlust des Rezeptorproteins ist die geringere Membranverankerung durch den Austausch des lipophilen Leucins gegen das hydrophile Prolin, was unter 4.1.1 bereits erläutert wurde.

Ein weiterer Grund ist vermutlich die Tatsache, dass Transmembrandomänen in der Regel aus einer α -Helix bestehen, Prolin jedoch durch seinen Pyrrolidinring als „Helixbrecher“ gilt: Es lässt sich nicht ohne weiteres in eine α -Helix einbauen und führt so zu großen Abweichungen in der Sekundärstruktur des Proteins an der Mutationsstelle.

4.2 Regulation von K_{2P} -Kanälen durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Die in der vorliegenden Arbeit vorgenommene funktionelle Charakterisierung des Parathormon-Rezeptors und seiner Mutanten basiert auf einer indirekten Messung der Rezeptoraktivität. Direkt gemessen wurden dabei die Kaliumströme der Tandemporen-Kaliumkanäle TASK-1 und TRESK, wobei in früheren Studien bereits gezeigt werden konnte, dass diese durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren reguliert werden können.

Mit den Untergruppen TASK, TREK und TRESK, verfügt die Klasse der Tandemporen-Kaliumkanäle über mehrere, durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren regulierbare Kanalproteine (Mathie 2007): So werden TASK- und TREK-Ströme durch GPCRs inhibiert, TRESK-Ströme dagegen aktiviert.

Die heterologe Koexpression von Rezeptor und Ionenkanal in *Xenopus*-Oozyten ermöglicht es zudem die Second Messenger Systeme cAMP und IP_3 der Oozyten zu nutzen. Gleichzeitig exprimieren die Oozyten nur wenige, die Messungen störende, endogene Ionenkanäle.

4.2.1 Inhibition von TASK-1 durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Für eine Vielzahl G_q -gekoppelter Rezeptoren konnte bereits gezeigt werden, dass ihre Aktivierung zu einer Hemmung des TASK-1 Stroms führt. Dazu gehören unter anderem die Rezeptoren von TRH (Thyrotropin Releasing Hormon), Serotonin und Glutamat (Talley et al. 2000, Chemin et al. 2003), sowie Angiotensin II (Czirjak et al. 2000) und Acetylcholin (Millar et al. 2000).

Der Parathormon-Rezeptor Typ 1, der zur Familie B der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehört, koppelt nach seiner Aktivierung zwar vorrangig an G_{α_s} , nutzt aber auch den Signalweg über G_{α_q} (Offermanns et al. 1996, Pines et al. 1996). Hierbei wird die Phospholipase $C\beta$ aktiviert, wodurch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Diacylglycerol (DAG) und

Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) hydrolysiert wird. Es kommt zur Freisetzung intrazellulär gespeicherten Kalziums durch IP_3 , sowie zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch DAG und Ca^{2+} . (Löffler et al. 2007)

Die Mechanismen, über welche $G\alpha_q$ oder eine Komponente der intrazellulären Signalkaskade mit dem TASK-1 Kanal interagieren, sind noch nicht aufgeklärt und werden kontrovers diskutiert:

Nach Mathie (2007) ist es sowohl denkbar, dass die Kanalinhibition entweder durch die Hydrolyseprodukte von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) oder durch den PIP_2 -Abbau vermittelt wird, als auch dass die Kanalinhibition direkt durch das aktivierte $G\alpha_q$ -Protein vermittelt wird.

Besana und Mitarbeiter (2004) kommen zum dem Schluss, dass die TASK-1 Inhibition abhängig von der Proteinkinase C (PKC) sei.

Die Untersuchungen von Schiekel und Mitarbeitern (2013) legen dagegen nahe, dass die Inhibition von TASK-1 durch die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) vermittelt ist.

Für andere Autoren ist auch ein alternativer, bisher unentdeckter Signalweg vorstellbar (Karschin 2001, Bayliss et al. 2003).

Trotz des unklaren Kopplungsmechanismus von TASK-1 und PTH1R, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Kopplung eines G_q -gekoppelten Rezeptors an den Tandemporen-Kaliumkanal TASK-1 ein geeignetes Instrument darstellt, um einen GPCR funktionell zu untersuchen.

4.2.2 Aktivierung von TRESK durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Im Gegensatz zum TASK-1 Kanal werden TRESK-Kanäle durch den G_q -Signalweg aktiviert, wobei TRESK der einzige K_{2P} -Kanal ist, der durch die Änderung von intrazellulärem Kalzium reguliert werden kann (Czirjak et al. 2004, Mathie 2007).

Der Kopplungsmechanismus von TRESK mit G_q -gekoppelten Rezeptoren konnte bereits vollständig aufgeklärt werden:

Durch Untersuchungen von Czirjak und Mitarbeiter (2004) konnte anhand des muskarinischen M1-Rezeptors, des Angiotensin II-Rezeptors und des Lysophospholipid- (LPA-) Rezeptors, die alle an G_q -Proteine koppeln, gezeigt werden, dass eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} zu einer Aktivierung des in *Xenopus* Oozyten koexprimierten TRESK-Kanals führt. Für den G_i -gekoppelten muskarinischen M2-Rezeptor, der eine inhibierende Signalkaskade auslöst, trafen diese Beobachtungen jedoch nicht zu. Die Aktivierung von TRESK ist spezifisch für Kalzium-mobilisierende Rezeptoren und betrug in dieser Studie das 5-15fache des Ausgangswerts.

Weiter konnte herausgefunden werden, dass die TRESK-Aktivierung nicht durch direkte Ca^{2+} -Bindung hervorgerufen wird, sondern durch Calcineurin, welches den TRESK-Kanal dephosphoryliert:

Die Bindung eines Agonisten an seinen G_q -gekoppelten Rezeptor führt zur Abspaltung der G_{α_q} -Untereinheit, die in der Folge die Phospholipase C (PLC) aktiviert. Diese spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3). IP_3 setzt intrazelluläres Kalzium frei, wodurch Calcineurin aktiviert wird. Die Kalzium/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin bindet nun direkt an die PQIVID-Sequenz einer intrazellulären Schleife des TRESK-Proteins und dephosphoryliert dieses, was schließlich zur Aktivierung des TRESK-Kanals führt (Czirjak und Enyedi 2006).

Die Tatsache, dass man den Kopplungsmechanismus von TRESK und G_q -gekoppelten Rezeptoren bereits aufklären konnte, macht TRESK im Vergleich zu TASK-1 zwar auf den ersten Blick interessanter als Instrument zur Charakterisierung von G_q -gekoppelten Rezeptoren. Jedoch macht es durchaus Sinn beide Kanäle zu nutzen, da mit TASK-1 und TRESK sowohl ein inhibierender als auch ein aktivierender Kanal zur Verfügung steht und Ergebnisse mit einem zweiten Kanal verifiziert werden können.

4.3 Mutationen im PTH1R-Gen führen zu primären Zahndurchbruchsstörungen

4.3.1 Mechanismus des physiologischen Zahndurchbruchs

Um das Krankheitsbild der primären Zahndurchbruchsstörung (PFE) verstehen zu können, soll im Folgenden zunächst der physiologische Zahndurchbruch erläutert werden:

Der Zahndurchbruch ist definiert als die Bewegung eines Zahnes vom Ort seiner Entwicklung im Alveolarfortsatz bis zu seiner funktionellen Position in der Mundhöhle (Massler und Schour 1941). Im Rahmen der physiologischen Zahnentwicklung bildet sich zunächst innerhalb des Kieferknochens die Zahnkrone aus, erst danach bildet sich die Wurzel (Proffit und Frazier-Bowers 2009). Der Zahndurchbruch beginnt während des Wurzelwachstums, wobei noch nicht abschließend geklärt werden konnte, durch welche Mechanismen dieser gesteuert wird (Proffit und Frazier-Bowers 2009). Verschiedene Hypothesen wurden dazu diskutiert, viele davon konnten jedoch bereits widerlegt werden.

Cahill und Marks (1980) konnten zeigen, dass das Vorhandensein des Zahnfollikels, welcher durch biochemische Signalwege die Resorption des koronalen Alveolarknochens zur Schaffung des Durchbruchswegs und die Knochenapposition am basalen Rand der entstehenden Krypte reguliert, für den Zahndurchbruch zwingend notwendig ist.

Konkret bedeutet dies, dass Retikulumzellen im Zahnfollikel PTHrP sezernieren, das seinerseits eine Überexpression zweier anderer Peptide veranlasst: CSF-1 (Colony Stimulating Factor-1) und RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) (Yao et al. 2007, Frazier-Bowers et al. 2010a). CSF-1 und RANKL veranlassen Monozyten dazu, sich zu Osteoklasten auszudifferenzieren. CSF-1 führt gleichzeitig – im Sinne einer negativen Rückkopplung – über seine Bindung an den Rezeptor CSF-1R zu einer

Verringerung der RANKL-Expression, sodass die übermäßige Ausdifferenzierung von Osteoklasten verhindert wird (Wittrant et al. 2009).

Auch die Studien von Philbrick und Mitarbeitern (1998) bestätigen die Rolle von PTHrP bei der Bildung des Durchbruchswegs: bei PTHrP-Knock-out-Mäusen, bei denen PTHrP ausschließlich in den Chondrozyten exprimiert wird um letale Fehlbildungen zu vermeiden, bildete sich kein Durchbruchsweg, die Zähne blieben impaktiert.

Ein weiterer Regelkreis beeinflusst das vorübergehende Überwiegen der Osteoklasten- über die Osteoblastentätigkeit: die Expression des Osteoprotegerins (OPG), eines Zytokins, welches die Osteoklastentätigkeit hemmt. Dieses ist im Zahnfollikel vorübergehend herunterreguliert, während der Durchbruchsweg geschaffen wird (Wise et al. 2002b, Heinrich et al. 2005).

Die Knochenapposition am basalen Rand der alveolären Krypte setzt eine Stimulierung der Aktivität der Osteoblasten voraus. Diese wird durch die Expression von BMP2 (bone morphogenetic protein 2) vermittelt, welches vor allem in der basalen Region des Zahnfollikels nachgewiesen wurde (Wise und Yao 2006, Yao et al. 2007, Yao et al. 2010).

Sobald die Zahnkrone die Mundhöhle erreicht, beginnt der präfunktionale Wachstumsschub. Dieser endet, sobald der Zahn die Okklusionsebene erreicht hat. (Proffit und Frazier-Bowers 2009)

4.3.2 Die primäre Zahndurchbruchsstörung (PFE)

Die primäre Zahndurchbruchsstörung (Primary Failure of Eruption, PFE, MIM #125350) wurde 1981 erstmals von Proffit und Vig als eigenständiges Krankheitsbild beschrieben, bei dem ein primär nicht ankylosierter Zahn aufgrund einer Störung im Durchbruchmechanismus selbst nicht oder nicht vollständig durchbricht. Dies führt zu zahlreichen klinischen Symptomen, die in einem lateral offenen Biss resultieren.

Die Prävalenz beträgt nach Baccetti etwa 0,06 %, wobei Frauen häufiger (M 1 : W 2,25) betroffen sind (Grover und Lorton 1985, Baccetti 2000).

Aktuellere Studien unter Einbeziehung molekulargenetischer Untersuchungen stehen jedoch aus.

Die klinischen und radiologischen Befunde der PFE können wie folgt zusammengefasst werden (Proffit und Vig 1981, Frazier-Bowers et al. 2007, Pilz et al. 2014):

- der posteriore Bereich ist stärker betroffen als der anteriore Bereich,
- wenn ein anterior gelegener Zahn betroffen ist, sind auch die posterior von ihm gelegenen Zähne betroffen,
- der koronal gelegene Alveolarknochen wird resorbiert, doch der Zahn bricht nicht oder unvollständig durch,
- Milch- und bleibende Zähne können betroffen sein,
- es kommt zu Wachstumsbeeinträchtigungen des Alveolarknochens, vor allem in der Vertikalen,
- es resultiert ein lateral offener Biss,
- oft ist das Gebiss asymmetrisch betroffen; die Manifestation kann uni- oder bilateral sein,
- die betroffenen Molaren liegen meist am basalen Kieferrand und
- oft zeigen die Wurzeln der betroffenen Molaren Dilazerationen.

Als Ursache der PFE wurden erstmals von Decker und Mitarbeitern (2008) Mutationen im PTH1R-Gen identifiziert, die seitdem von weiteren Arbeitsgruppen um weitere Mutationen ergänzt werden konnten. Während zunächst angenommen wurde, dass es sich um ein isoliertes, nicht syndromales Krankheitsbild handelt, deuten neuere Untersuchungen auf ein erhöhtes Risiko für eine frühzeitige Osteoarthritis bei Mutationsträgern hin (Frazier-Bowers et al. 2014), wobei eine abschließende Beurteilung noch aussteht.

4.3.3 Differentialdiagnosen von Zahndurchbruchsstörungen

Von der primären Durchbruchsstörung sind sowohl die lokale als auch die systemische Durchbruchsstörung zu unterscheiden.

Die meisten Fälle von Durchbruchsstörungen sind lokalen Faktoren zuzuschreiben, welche sich aber meist nur auf einzelne Zähne beschränken (Raghoobar et al. 1989, Raghoobar et al. 1991). Dabei sind die Weisheitszähne und die Eckzähne am häufigsten betroffen (Raghoobar et al. 1991), während die ersten und zweiten Molaren nur selten betroffen sind (Farman et al. 1978), was ein Unterschied zur PFE darstellt. Die ursächlichen Faktoren sind vielfältig und reichen unter anderem von einer Barriere im Durchbruchweg durch beispielsweise überzählige Zähne, Odontome oder Zysten, über abnorme Zahnkeimlagen, Platzmangel und Dilazeration bis zur Ankylose (O'Connell und Torske 1999, Proffit und Frazier-Bowers 2009, Pilz et al. 2014).

Systemische Faktoren findet man vor allem bei Patienten mit Syndromen. Hierbei sind meist mehrere Zähne betroffen. Als Beispiele sind die Syndrome Dysostosis cleidocranialis, ektodermale Dysplasie, Gardener-Syndrom, Down-Syndrom und das Apert-Syndrom zu nennen. (Wise et al. 2002a, Pilz et al. 2014)

4.3.4 Mutationen im PTH1-Rezeptor als Ursache der primären Zahndurchbruchsstörung

Die molekulargenetische Ursache der primären Zahndurchbruchsstörung (PFE) sind heterozygote Mutationen im PTH1R-Gen. Diese ursächliche Rolle konnte 2008 erstmals von Decker und Mitarbeitern durch eine Linkage-Analyse in vier Familien mit jeweils mindestens zwei Betroffenen nachgewiesen werden.

Seitdem wurden weitere Mutationen im PTH1R-Gen bei Patienten mit PFE beschrieben, bei denen es sich um Spleiß-, Frameshift-, *nonsense*- und *missense*-Mutationen handelt (Decker et al. 2008, Frazier-Bowers et al. 2010b, Risom et al. 2013, Roth et al. 2014).

Die hier genannten Mutationen sind Loss-of-function-Mutationen. In japanischen Patienten wurden zudem auch *missense*-Mutationen beschrieben, bei denen nicht näher charakterisiert wurde, ob es sich hierbei um Loss-of-function- oder Gain-of-function-Mutationen handelt (Yamaguchi et al. 2011).

Die von Yamaguchi und Mitarbeitern nachgewiesenen *missense*-Mutationen wurden jedoch von ihnen selbst und später von Roth und Mitarbeitern (2014) als nicht sicher pathogen eingestuft, wobei nun durch die vorliegende Arbeit mit [P119L] eine dieser Mutationen als Loss-of-function-Mutation charakterisiert werden konnte. Auch in späteren Studien wurden PTH1R-Varianten unklarer Pathogenität bei betroffenen Patienten nachgewiesen (Frazier-Bowers et al. 2014, Roth et al. 2014). Dazu gehören die Mutationen [H442D], [L232R] und [L292P], welche ebenfalls in der vorliegenden Arbeit als Loss-of-function-Mutationen charakterisiert werden konnten.

Im Falle der PFE deutet somit die Studienlage darauf hin, dass verschiedene Klassen von Loss-of-function-Mutationen des PTH1R-Gens ursächlich sind.

Der Funktionsverlust einer Genkopie führt hierbei zu einer Haploinsuffizienz des PTH1-Rezeptors (Frazier-Bowers et al. 2014, Roth et al. 2014).

Bindet ein Ligand an den PTH1-Rezeptor, so lagert sich dieser mit einem weiteren Rezeptor zu einem Dimer zusammen, wodurch zwei Signalkaskaden ausgelöst werden: die Aktivierung der Adenylatcyclase und der Phospholipase C, wobei die Aktivierung der Phospholipase C eine wesentlich höhere Ligandenkonzentration erfordert als die Aktivierung der Adenylatcyclase (Offermanns et al. 1996).

Frazier-Bowers und Mitarbeiter (2014) vermuten daher, dass die Aktivierung über die Phospholipase C nur in Geweben mit höchster PTHrP-Konzentration wie beispielsweise im Zahnkeim abläuft. Dies würde erklären, warum nur in diesen Geweben eine Haploinsuffizienz des mutierten PTH1R besteht. In allen anderen Geweben genügt eine niedrigere Dichte intakter Rezeptoren, wie sie auch durch eine einzelne intakte Genkopie erzeugt werden kann. In diesen

Gewebe - beispielsweise dem Knochen - kommt es erst dann zu Krankheitsmanifestationen, wenn auch die zweite Genkopie inaktiviert wird.

Es wurde schon vor Aufklärung der genetischen Ursache beschrieben, dass die PFE oft familiär auftritt und die Stammbäume mit autosomal-dominanten Erbgängen vereinbar sind (Frazier-Bowers et al. 2007). Es treten jedoch auch Simplex-Fälle auf (Pilz et al. 2014), vereinbar mit *de-novo*-Mutationen. In Familien mit autosomal-dominanter Vererbung von pathogenen PTH1R-Mutationen weisen jedoch nicht alle Mutationsträger klinische Zeichen einer PFE auf (Frazier-Bowers et al. 2014). Dies deutet auf die unvollständige Penetranz einzelner Mutationen hin.

Zudem wurde bei einigen Mutationsträgern in betroffenen Familien eine frühzeitige - im zweiten bis dritten Lebensjahrzehnt auftretende - Arthrose von Wirbelsäule und Hüftgelenken beschrieben (Frazier-Bowers et al. 2014). Dies ist ein Hinweis auf eine variable Expressivität von PFE und Arthrose bei pathogenen PTH1R-Mutationen. Da eine Verbindung zwischen PTH1R-Mutationen und frühzeitiger Arthrose bisher nur in zwei Familien nachgewiesen wurde, kann die Arthrose noch nicht definitiv zum Krankheitsbild hinzugezählt werden. Um zu entscheiden, ob eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation besteht - ob bestimmte Mutationen im PTH1R-Gen also eher zu einer Arthrose oder eher zu einer PFE führen -, sind weitere Analysen der klinischen und genetischen Daten Betroffener notwendig (Frazier-Bowers et al. 2014).

Schließlich wurde kürzlich erstmals ein autosomal-rezessiver Vererbungsmodus für PTH1R-Mutationen in einer einzigen konsanguinen Familie mit PFE beschrieben – hier ist ebenfalls noch abzuwarten, ob ein solcher durch weitere Daten bestätigt wird (Jelani et al. 2016).

4.3.5 Therapie der primären Zahndurchbruchsstörung

Im Allgemeinen werden retinierte Zähne kieferorthopädisch extrudiert und harmonisch in den Zahnbogen eingestellt, oft ist zuvor eine chirurgische Freilegung des Zahns notwendig. Im Falle einer primären Durchbruchsstörung stellt die kieferorthopädische Extrusion jedoch keine Behandlungsoption dar, da die betroffenen Zähne unter Applikation kieferorthopädischer Kräfte ankylosieren und weitere Zahnbewegungen unmöglich machen, die Okklusionsebene wird daher nicht erreicht (Proffit und Vig 1981, Frazier-Bowers et al. 2010b). Bestenfalls lassen sich die Zähne um 1-2 mm bewegen (Proffit und Vig 1981). Somit ist eine gesicherte Diagnose PFE vor Beginn einer Therapie wichtig, welche durch eine Genanalyse erfolgen kann (Frazier-Bowers et al. 2010b).

Obwohl eine kieferorthopädische Behandlung nicht zum Erfolg führt, empfiehlt es sich dennoch Kinder, die sich noch im Wachstum befinden, funktionskieferorthopädisch zu überwachen, da die PFE mit einer Wachstumshemmung der betroffenen Kieferknochenregion einhergeht. So kann frühzeitig das skelettale Wachstum in Richtung einer Klasse I begünstigt werden, was zur physiologischen Entwicklung des cranio-mandibulären Systems beiträgt und für eine spätere Versorgung einen prothetischen Vorteil darstellt.

Die Wahl der geeigneten Therapie hängt schließlich weitestgehend vom Ausmaß der Durchbruchsstörung und des alveolären Knochendefekts ab und ist in der Regel erst nach Abschluss des vertikalen Wachstums realisierbar.

Eine konservative Behandlung ist in leichten Fällen angezeigt: Zum Ausgleich von Infrapositionen können Onlays und Kronen eingesetzt werden, sobald das vertikale Wachstum abgeschlossen ist (Yatani et al. 1998).

In moderateren Fällen ist die Extraktion mit anschließender Implantatversorgung und gegebenenfalls vorherigem Knochenaufbau angezeigt (Frazier-Bowers et al. 2007), wobei Zahnimplantate grundsätzlich erst gesetzt werden sollen, wenn das gesamte Kieferwachstum weitgehend abgeschlossen ist (Koeck und Wagner 2005).

Weiter können in chirurgisch gut zugänglichen Regionen eine Segmentosteotomie (Proffit und Vig 1981, Piattelli und Eleuterio 1991, Frazier-Bowers et al. 2007), sowie bei einem posterior extrem offenen Biss eine Distractionsosteogenese (Kater et al. 2004) diskutiert werden.

In Fällen mit großem alveolärem Knochendefizit ist herausnehmbarer Zahnersatz schließlich oft die einzig realisierbare Behandlungsoption (Siegel und O'Connell 1999).

4.4 Weitere mit PTH1R-Mutationen vergesellschaftete Erkrankungen

Neben der PFE gibt es weitere Erkrankungen, die auf Mutationen im PTH1R-Gen zurückzuführen sind. Ihre Ausprägung ist im Gegensatz zur PFE jedoch syndromal, was bedeutet, dass mehrere Gewebe bzw. Organe betroffen sind.

4.4.1 Blomstrand Osteochondrodysplasie (BOCD)

Die Blomstrand Osteochondrodysplasie (BOCD, MIM #215045) ist eine seltene autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die mit Loss-of-function-Mutationen im PTH1R-Gen assoziiert ist. Beschrieben wurden sowohl Genmutationen, die zu verändertem mRNA-Splicing, zu einem Frameshift oder zu dem Aminosäureaustausch [P132L] führen.

BOCD manifestiert sich in einem schweren Fehlbildungssyndrom mit extrem verkürzten Gliedmaßen (Mikromelie) und zeigt röntgenologisch eine erhöhte Knochendichte im gesamten Skelett und ein akzeleriertes Knochenalter.

Der Ausfall des PTHrP-Signals beschleunigt die Differenzierung der Chondrozyten und somit auch die Knochenformation. Durch die akzelerierte Differenzierung verkürzt sich die Proliferationszeit, was zur Verkürzung der Röhrenknochen führt.

Weitere Symptome sind unter anderem ein ossifizierter Larynx, kurze dicke Rippen, Mikrogenie, Makroglossie, vorzeitige Dentition, Hydrops fetalis, intestinale Malrotation und eine Lungenhypoplasie. Die betroffenen Kinder versterben perinatal.

(Blomstrand et al. 1985, Jobert et al. 1998, Zhang et al. 1998, Karperien et al. 1999, Hoogendam et al. 2007, Witkowski et al. 2013)

4.4.2 Metaphysäre Chondrodysplasie Typ Jansen (JMC)

Die metaphysäre Chondrodysplasie vom Typ Jansen (JMC, MIM #156400) ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die auf Gain-of-function-Mutationen im PTH1R-Gen zurückzuführen ist. Bisher wurden dafür die Mutationen [H223R], [T410P], [T410R], [I458K] und [I458R] identifiziert, die zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung des cAMP-Signalwegs führen.

JMC manifestiert sich in den ersten Lebensjahren und führt sowohl zu Störungen in der Kalzium- und Phosphationenhomöostase, sowie zu Störungen in der Entwicklung der Epiphysenfugen bei den betroffenen Patienten. Es resultieren ein disproportionaler Kleinwuchs und Knochendeformationen mit kurzen, gebogenen Extremitäten und vergrößerten Gelenken. Der radiologische Befund zeigt eine generalisierte Demineralisierung, die zu Frakturen führen kann, sowie zu rachitisähnlichen Veränderungen in den Metaphysen. Im Labor lassen sich eine Hyperkalzämie und eine Hypophosphatämie nachweisen. Im Gegensatz zur Blomstrand Osteochondrodysplasie ist JMC nicht letal.

(Schipani et al. 1995, Schipani et al. 1996, Schipani et al. 1999, Bastepe et al. 2004, Savoldi et al. 2013, Witkowski et al. 2013)

4.4.3 Ollier-Krankheit

Die multiple Enchondromatose (MIM 166000), nach der WHO-Terminologie auch Ollier-Krankheit genannt, ist eine Entwicklungsstörung, die sich durch das Auftreten multipler Enchondrome definiert. Enchondrome sind intraossäre, benigne Knorpeltumore, die sich in unmittelbarer Nähe zum Knorpel der

Epiphysenfugen, wo die enchondrale Ossifikation stattfindet, bilden. Die klinischen Symptome treten meist bereits in der ersten Lebensdekade, asymmetrisch und sehr variabel auf und führen unter anderem zu Deformierungen des Skeletts und Längenunterschieden der Gliedmaßen. Weiter besteht ein Risiko einer malignen Transformation zu Chondrosarkomen. (Silve und Juppner 2006, Witkowski et al. 2013)

Bislang konnten die vier PTH1R-Mutationen [G121E], [A122T], [R150C] und [R255H] mit der Enchondromatose in Verbindung gebracht werden. Sie vermindern die Rezeptorfunktion, indem sie entweder die Ligandenbindung oder die Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche beeinträchtigen. (Hopyan et al. 2002, Couvineau et al. 2008)

4.4.4 Eiken-Syndrom

Das Eiken-Syndrom (MIM #600002) ist eine sehr seltene autosomal-rezessiv vererbte Skelettdysplasie, die sich auf die *nonsense*-Mutation [R485*] zurückführen lässt.

Klinisch äußert sich das Syndrom in einer multiplen epiphysären Dysplasie und einer extrem retardierten Ossifikation, vor allem der Epiphysen, des Beckens, der Füße und der Hände. Die Erkrankung konnte bisher nur bei Mitgliedern einer einzigen Familie diagnostiziert werden.

(Eiken et al. 1984, Duchatelet et al. 2005)

4.5 Ausblick

In den letzten Jahren vollzog sich auch in der Zahnmedizin ein Wandel von der phänotypischen Charakterisierung hin zur genotypischen Entschlüsselung eines Krankheitsbildes. Das alleinige Wissen um die ursächlichen Gene bringt die Zahnmedizin jedoch nur bedingt voran. Die Übertragung der Laborergebnisse in die praktische Zahnmedizin und insbesondere in die Therapie muss weiter vorangetrieben werden. Eine korrekte und genetisch verifizierte Diagnose PFE kann dem Patienten, aber auch dem Kieferorthopäden, eine jahrelange und frustrierende Behandlung ersparen. Bei Zahnretentionen, denen keine genetischen Ursachen zugrunde liegen, ist dagegen die kieferorthopädische bzw. die kombinierte kieferorthopädisch-chirurgische Behandlung Mittel der Wahl und auch erfolgsversprechend.

Es bleiben jedoch noch offene Fragen, die es in der Zukunft zu beantworten gilt: So muss geklärt werden, wie eine eindeutig nachweisbare Mutation in einem Rezeptor, der für die Regulation der Kalzium-Homöostase, den Knochenmetabolismus und der Skelettentwicklung verantwortlich ist, trotzdem nur selektiv Einfluss auf die Entwicklung hat.

Warum brechen bei einer PFE-verursachenden Mutation im PTH1R-Gen nur einzelne Zähne nicht durch, während sich die betroffenen Patienten - von der betreffenden Kieferregion abgesehen - ansonsten normal entwickeln?

Legt man das Phänomen der Haploinsuffizienz zur Beantwortung dieser Fragen zu Grunde, so bleibt weiter die Frage, weshalb bleibende Frontzähne und meist auch das Milchgebiss nicht betroffen sind.

Es stellt sich weiter die Frage, weshalb von PFE betroffene Zähne ankylosieren, sobald eine kieferorthopädische Kraft ausgeübt wird? Sollte man dies aufklären können, so ergeben sich daraus gegebenenfalls neue Behandlungsoptionen.

Die zukünftige Forschung am Krankheitsbild der PFE eröffnet außerdem die Möglichkeit, neue Erkenntnisse über den bislang nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus des physiologischen Zahndurchbruchs zu sammeln.

5. Zusammenfassung

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) regulieren eine Vielzahl physiologischer als auch pathophysiologischer Prozesse im menschlichen Körper. Verankert in der Zellmembran vermitteln sie die Transduktion äußerer Stimuli zur Aktivierung nachgeschalteter Signalwege.

Durch die Aktivierung Adenylatcyclasen-, Phospholipasen C- und Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)- abhängiger Signalwege, vermittelt der zur Familie B der GPCRs gehörige Parathormon-Rezeptor PTH1R die endokrine und parakrine Wirkungen des Parathormons (PTH) und des Parathormon-verwandten Proteins (PTHrP). Diese sind die Regulation der Kalzium-Homöostase, des Knochenmetabolismus und der Skelettentwicklung.

In dieser Arbeit wurden vier Mutationen im PTH1-Rezeptor untersucht, die durch Roth und Mitarbeiter (2014) in den Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der primären Zahndurchbruchsstörung (PFE) gebracht wurden.

Die nach Proffit und Vig (1981) als „Primary Failure of Eruption“ benannte Durchbruchsstörung bezeichnet den Befund, bei dem ein primär nicht ankylosierter Zahn aufgrund einer Störung im Durchbruchmechanismus selbst nicht oder nicht vollständig durchbricht. Als molekulargenetische Ursache konnten erstmals von Decker und Mitarbeitern (2008) Mutationen im PTH1R-Gen festgestellt werden, die seitdem von weiteren Arbeitsgruppen um weitere Mutationen ergänzt werden konnten.

Die vier untersuchten Mutanten sind PTH1R [P119L], PTH1R [H442D], PTH1R [L232R] und PTH1R [L292P]: Bei den durch Mutagenese herbeigeführten Punktmutationen handelt es sich jeweils um eine *missense*-Mutation, bei der der Austausch einer einzelnen Base in der DNA-Sequenz zum Einbau einer anderen Aminosäure im Protein führt.

Es folgte die funktionelle Charakterisierung des Parathormon-Rezeptors und seiner Mutanten, welche auf einer indirekten Messung der Rezeptoraktivität basierte. Direkt gemessen wurden dabei die Kaliumströme der Tandemporen-Kaliumkanäle TASK-1 und TRESK, wobei in früheren Studien bereits gezeigt werden konnte, dass diese durch G_q-Protein gekoppelte Rezeptoren reguliert werden können: So werden TASK-Ströme durch GPCRs inhibiert, TRESK-Ströme dagegen aktiviert (Mathie 2007).

TASK-1 Kanäle und Parathormon-Rezeptoren wurden zeitgleich heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und anschließend mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) elektrophysiologisch untersucht.

Nach Zugabe von PTH (100 nM) ergab sich nach Kopplung an den TASK-1 Kanal für den PTH1R-Wildtyp eine durchschnittliche Stromamplitude von 52,11 % ± 3,60 % (n=28). Der TASK-1 Strom reduzierte sich somit um 47,89 %, was in etwa einer Halbierung des Ausgangswertes entsprach.

Dagegen zeigten sich für die PTH1R-Mutanten keine signifikanten Änderungen der Stromamplituden nach Zugabe der PTH-haltigen Messlösung.

Die Untersuchungen wurden mit dem TRESK-Kanal wiederholt. Hier zeigte sich eine deutliche TRESK-Aktivierung durch Kopplung an den PTH1R-Wildtyp beim Einwaschen von PTH. Bei den Mutanten kam es ebenfalls nicht zu einer signifikanten Änderung der Stromamplitude durch PTH-Zugabe.

Ein Austausch dieser entsprechenden Aminosäuren führt somit zu einem Funktionsverlust des Parathormon-Rezeptors Typ 1, wenn man das Verhalten des PTH1R-Wildtyps bei Kopplung an den entsprechenden K_{2P}-Kanal als Verhalten bei voller Rezeptorfunktion definiert. Bei den untersuchten Mutationen handelt es sich daher um Loss-of-function-Mutationen.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die von Roth und Mitarbeitern in ihrer Pathogenität als „wahrscheinlich schädlich“ eingestuft Mutationen durch die vorliegende Arbeit nun als „pathogen“ und damit PFE-verursachend bezeichnet werden können.

Die zahnmedizinische Relevanz dieser Ergebnisse liegt darin begründet, dass durch eine genetisch gesicherte Diagnose PFE, die korrekte und erfolgversprechendste Behandlungsoption gewählt werden kann. Von PFE betroffene Zähne ankylosieren nach Applikation kieferorthopädischer Kräfte und können nicht weiter bewegt werden. Somit kann nach der Diagnose PFE ein individuelles Behandlungskonzept erstellt werden, das sich nach dem Ausmaß der Durchbruchsstörung richtet. Langjährige und frustrierende kieferorthopädische Behandlungen bleiben dem Patienten, aber auch dem Kieferorthopäden erspart.

6. Literaturverzeichnis

Abou-Samra AB, Jüppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani E, Urena P, Richards J, Bonventre JV, Potts JT, Jr. und et al. (1992): *Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium.* Proc Natl Acad Sci U S A 89(7): 2732-2736.

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.

Bastepe M, Raas-Rothschild A, Silver J, Weissman I, Wientroub S, Juppner H und Gillis D (2004): *A form of Jansen's metaphyseal chondrodysplasia with limited metabolic and skeletal abnormalities is caused by a novel activating parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor mutation.* J Clin Endocrinol Metab 89(7): 3595-3600.

Bayliss DA, Sirois JE und Talley EM (2003): *The TASK family: two-pore domain background K⁺ channels.* Mol Interv 3(4): 205-219.

Behar V, Pines M, Nakamoto C, Greenberg Z, Bisello A, Stueckle SM, Bessalle R, Usdin TB, Chorev M, Rosenblatt M und Suva LJ (1996): *The human PTH2 receptor: binding and signal transduction properties of the stably expressed recombinant receptor.* Endocrinology 137(7): 2748-2757.

Besana A, Barbuti A, Tateyama MA, Symes AJ, Robinson RB und Feinmark SJ (2004): *Activation of protein kinase C epsilon inhibits the two-pore domain K⁺ channel, TASK-1, inducing repolarization abnormalities in cardiac ventricular myocytes.* J Biol Chem 279(32): 33154-33160.

Bittner S, Meuth SG, Gobel K, Melzer N, Herrmann AM, Simon OJ, Weishaupt A, Budde T, Bayliss DA, Bendszus M und Wiendl H (2009): *TASK1 modulates inflammation and neurodegeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system.* Brain 132(Pt 9): 2501-2516.

Blomstrand S, Claesson I und Save-Soderbergh J (1985): *A case of lethal congenital dwarfism with accelerated skeletal maturation.* Pediatr Radiol 15(2): 141-143.

Bockaert J und Pin JP (1999): *Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success.* Embo j 18(7): 1723-1729.

Bringhurst FR, Stern AM, Yotts M, Mizrahi N, Segre GV und Potts JT, Jr. (1988): *Peripheral metabolism of PTH: fate of biologically active amino terminus in vivo.* Am J Physiol 255(6 Pt 1): E886-893.

Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J und Hebert SC (1993): *Cloning and characterization of*

an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. Nature 366(6455): 575-580.

Buckingham SD, Kidd JF, Law RJ, Franks CJ und Sattelle DB (2005): *Structure and function of two-pore-domain K⁺ channels: contributions from genetic model organisms. Trends Pharmacol Sci* 26(7): 361-367.

Buckler KJ, Williams BA und Honore E (2000): *An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. J Physiol* 525 Pt 1: 135-142.

Burtis WJ, Wu T, Bunch C, Wysolmerski JJ, Insogna KL, Weir EC, Broadus AE und Stewart AF (1987): *Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. J Biol Chem* 262(15): 7151-7156.

Cahill DR und Marks SC, Jr. (1980): *Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. J Oral Pathol* 9(4): 189-200.

Castro M, Nikolaev VO, Palm D, Lohse MJ und Vilardaga JP (2005): *Turn-on switch in parathyroid hormone receptor by a two-step parathyroid hormone binding mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A* 102(44): 16084-16089.

Chae YJ, Zhang J, Au P, Sabbadini M, Xie GX und Yost CS (2010): *Discrete change in volatile anesthetic sensitivity in mice with inactivated tandem pore potassium ion channel TRESK. Anesthesiology* 113(6): 1326-1337.

Chemin J, Girard C, Duprat F, Lesage F, Romey G und Lazdunski M (2003): *Mechanisms underlying excitatory effects of group I metabotropic glutamate receptors via inhibition of 2P domain K⁺ channels. EMBO J* 22(20): 5403-5411.

Couvineau A, Wouters V, Bertrand G, Rouyer C, Gerard B, Boon LM, Grandchamp B, Vikkula M und Silve C (2008): *PTHr1 mutations associated with Ollier disease result in receptor loss of function. Hum Mol Genet* 17(18): 2766-2775.

Czirjak G und 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.

Czirjak G, Fischer T, Spat A, Lesage F und Enyedi P (2000): *TASK (TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. Mol Endocrinol* 14(6): 863-874.

Czirjak G, Toth ZE und 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.

Datta NS und Abou-Samra AB (2009): *PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. Cell Signal* 21(8): 1245-1254.

Davies LA, Hu C, Guagliardo NA, Sen N, Chen X, Talley EM, Carey RM, Bayliss DA und Barrett PQ (2008): *TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism. Proc Natl Acad Sci U S A* 105(6): 2203-2208.

- Decker E, Stellzig-Eisenhauer A, Fiebig BS, Rau C, Kress W, Saar K, Ruschendorf F, Hubner N, Grimm T und Weber BH** (2008): *PTH1R1 loss-of-function mutations in familial, nonsyndromic primary failure of tooth eruption*. Am J Hum Genet 83(6): 781-786.
- Derst C und Karschin A** (1998): *Evolutionary link between prokaryotic and eukaryotic K⁺ channels*. J Exp Biol 201(Pt 20): 2791-2799.
- Dimitrov EL, Kim YY und Usdin TB** (2011): *Regulation of hypothalamic signaling by tuberoinfundibular peptide of 39 residues is critical for the response to cold: a novel peptidergic mechanism of thermoregulation*. J Neurosci 31(49): 18166-18179.
- Dobler T, Springauf A, Tovornik S, Weber M, Schmitt A, Sedlmeier R, Wischmeyer E und Döring 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.
- Dobnig H** (2004): *Teriparatid - das erste knochenanabole Behandlungsprinzip für Patienten mit fortgeschrittener Osteoporose: Grundlagen und Überblick über die klinischen Ergebnisse*. Journal für Mineralstoffwechsel Sonderheft 2: 4-11.
- Dobolyi A, Palkovits M und Usdin TB** (2003): *Expression and distribution of tuberoinfundibular peptide of 39 residues in the rat central nervous system*. J Comp Neurol 455(4): 547-566.
- Dobolyi A, Ueda H, Uchida H, Palkovits M und Usdin TB** (2002): *Anatomical and physiological evidence for involvement of tuberoinfundibular peptide of 39 residues in nociception*. Proc Natl Acad Sci U S A 99(3): 1651-1656.
- Duchatelet S, Ostergaard E, Cortes D, Lemainque A und Julier C** (2005): *Recessive mutations in PTH1R cause contrasting skeletal dysplasias in Eiken and Blomstrand syndromes*. Hum Mol Genet 14(1): 1-5.
- Dumont JN** (1972): *Oogenesis in Xenopus laevis (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals*. J Morphol 136(2): 153-179.
- Duprat F, Lesage F, Fink M, Reyes R, Heurteaux C und Lazdunski M** (1997): *TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH*. EMBO J 16(17): 5464-5471.
- Eiken M, Prag J, Petersen KE und Kaufmann HJ** (1984): *A new familial skeletal dysplasia with severely retarded ossification and abnormal modeling of bones especially of the epiphyses, the hands, and feet*. Eur J Pediatr 141(4): 231-235.
- Enyedi P, Braun G und Czirjak G** (2012): *TRESK: the lone ranger of two-pore domain potassium channels*. Mol Cell Endocrinol 353(1-2): 75-81.
- Enyedi P und Czirjak G** (2010): *Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels*. Physiol Rev 90(2): 559-605.
- Farman AG, Eloff J, Nortje CJ und Joubert JJ** (1978): *Clinical absence of the first and second permanent molars*. Br J Orthod 5(2): 93-97.

- Frazier-Bowers SA, Hendricks HM, Wright JT, Lee J, Long K, Dibble CF und Bencharit S** (2014): *Novel mutations in PTH1R associated with primary failure of eruption and osteoarthritis*. J Dent Res 93(2): 134-139.
- Frazier-Bowers SA, Koehler KE, Ackerman JL und Proffit WR** (2007): *Primary failure of eruption: further characterization of a rare eruption disorder*. Am J Orthod Dentofacial Orthop 131(5): 578.e571-511.
- Frazier-Bowers SA, Puranik CP und Mahaney MC** (2010a): *The etiology of eruption disorders - further evidence of a 'genetic paradigm'*. Semin Orthod 16(3): 180-185.
- Frazier-Bowers SA, Simmons D, Wright JT, Proffit WR und Ackerman JL** (2010b): *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.
- Friedman PA** (2004): *PTH revisited*. Kidney Int Suppl(91): S13-19.
- Gardella TJ und Juppner H** (2000): *Interaction of PTH and PTHrP with their receptors*. Rev Endocr Metab Disord 1(4): 317-329.
- Gardella TJ und Vilardaga JP** (2015): *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIII. The parathyroid hormone receptors-family B G protein-coupled receptors*. Pharmacol Rev 67(2): 310-337.
- Gensure RC, Gardella TJ und Jüppner H** (2005): *Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide, and their receptors*. Biochem Biophys Res Commun 328(3): 666-678.
- Gesty-Palmer D, Chen M, Reiter E, Ahn S, Nelson CD, Wang S, Eckhardt AE, Cowan CL, Spurney RF, Luttrell LM und Lefkowitz RJ** (2006): *Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation*. J Biol Chem 281(16): 10856-10864.
- Gether U** (2000): *Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors*. Endocr Rev 21(1): 90-113.
- Gilchrist A** (Hrsg.). (2010): *GPCR molecular pharmacology and drug targeting: shifting paradigms and new directions*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Goldstein SA, Bayliss DA, Kim D, Lesage F, Plant LD und Rajan S** (2005): *International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels*. Pharmacol Rev 57(4): 527-540.
- Goldstein SA, Bockenhauer D, O'Kelly I und Zilberberg N** (2001): *Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits*. Nat Rev Neurosci 2(3): 175-184.
- Goldstein SA, Price LA, Rosenthal DN und Pausch MH** (1996): *ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from Drosophila melanogaster by expression in Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A 93(23): 13256-13261.

Grover PS und Lorton L (1985): *The incidence of unerupted permanent teeth and related clinical cases.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol 59(4): 420-425.

Guan B, Chen X und Zhang H (2013): *Two-electrode voltage clamp.* Methods Mol Biol 998: 79-89.

Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR und Marbaix G (1971): *Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells.* Nature 233(5316): 177-182.

Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarriubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, McKinnon D, Nichols CG, O'Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun MM, Vandenberg CA, Wei A, Wulff H und Wymore RS (2003): *International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels.* Pharmacol Rev 55(4): 583-586.

Habener JF, Rosenblatt M, Kemper B, Kronenberg HM, Rich A und Potts JT, Jr. (1978): *Pre-proparathyroid hormone; amino acid sequence, chemical synthesis, and some biological studies of the precursor region.* Proc Natl Acad Sci U S A 75(6): 2616-2620.

Hamm HE (1998): *The many faces of G protein signaling.* J Biol Chem 273(2): 669-672.

Hansen IA, Jakob O, Wortmann S, Arzberger T, Allolio B und Blind E (2002): *Characterization of the human and mouse genes encoding the tuberoinfundibular peptide of 39 residues, a ligand of the parathyroid hormone receptor family.* J Endocrinol 174(1): 95-102.

Heginbotham L, Lu Z, Abramson T und MacKinnon R (1994): *Mutations in the K⁺ channel signature sequence.* Biophys J 66(4): 1061-1067.

Heinrich J, Bsoul S, Barnes J, Woodruff K und Abboud S (2005): *CSF-1, RANKL and OPG regulate osteoclastogenesis during murine tooth eruption.* Arch Oral Biol 50(10): 897-908.

Heitzmann D, Derand R, Jungbauer S, Bandulik S, Sterner C, Schweda F, El Wakil A, Lalli E, Guy N, Mengual R, Reichold M, Tegtmeier I, Bendahhou S, Gomez-Sanchez CE, Aller MI, Wisden W, Weber A, Lesage F, Warth R und Barhanin J (2008): *Invalidation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis.* Embo j 27(1): 179-187.

Hens JR und Wysolmerski JJ (2005): *Key stages of mammary gland development: molecular mechanisms involved in the formation of the embryonic mammary gland.* Breast Cancer Res 7(5): 220-224.

Hepler JR und Gilman AG (1992): *G proteins.* Trends Biochem Sci 17(10): 383-387.

Hill SJ (2006): *G-protein-coupled receptors: past, present and future.* Br J Pharmacol 147 Suppl 1: S27-37.

Hille B (2001): *Ion Channels of Excitable Membranes* (3. Aufl.). Sunderland: Sinauer Associates.

Hoare SR, Bonner TI und Usdin TB (1999): *Comparison of rat and human parathyroid hormone 2 (PTH2) receptor activation: PTH is a low potency partial agonist at the rat PTH2 receptor.* *Endocrinology* 140(10): 4419-4425.

Hoare SR, Clark JA und Usdin TB (2000a): *Molecular determinants of tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39) selectivity for the parathyroid hormone-2 (PTH2) receptor. N-terminal truncation of TIP39 reverses PTH2 receptor/PTH1 receptor binding selectivity.* *J Biol Chem* 275(35): 27274-27283.

Hoare SR, Rubin DA, Juppner H und Usdin TB (2000b): *Evaluating the ligand specificity of zebrafish parathyroid hormone (PTH) receptors: comparison of PTH, PTH-related protein, and tuberoinfundibular peptide of 39 residues.* *Endocrinology* 141(9): 3080-3086.

Hodgkin AL, Huxley AF und Katz B (1952): *Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo.* *J Physiol* 116(4): 424-448.

Hoogendam J, Farih-Sips H, Wynaendts LC, Lowik CW, Wit JM und Karperien M (2007): *Novel mutations in the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor type 1 causing Blomstrand osteochondrodysplasia types I and II.* *J Clin Endocrinol Metab* 92(3): 1088-1095.

Hopyan S, Gokgoz N, Poon R, Gensure RC, Yu C, Cole WG, Bell RS, Juppner H, Andrusis IL, Wunder JS und Alman BA (2002): *A mutant PTH/PTHrP type I receptor in enchondromatosis.* *Nat Genet* 30(3): 306-310.

Horiuchi N, Holick MF, Potts JT, Jr. und Rosenblatt M (1983): *A parathyroid hormone inhibitor in vivo: design and biological evaluation of a hormone analog.* *Science* 220(4601): 1053-1055.

Horn F (2009): *Biochemie des Menschen* (4. Aufl.). Stuttgart: Thieme.

Hruska KA, Korkor A, Martin K und Slatopolsky E (1981): *Peripheral Metabolism of Intact Parathyroid Hormone: ROLE OF LIVER AND KIDNEY AND THE EFFECT OF CHRONIC RENAL FAILURE.* *J Clin Invest* 67(3): 885-892.

Jelani M, Kang C, Mohamoud HS, Al-Rehaili R, Almramhi MM, Serafi R, Yang H, Al-Aama JY, Naeem M und Alkhiary YM (2016): *A novel homozygous PTH1R variant identified through whole-exome sequencing further expands the clinical spectrum of primary failure of tooth eruption in a consanguineous Saudi family.* *Arch Oral Biol* 67: 28-33.

Jobert AS, Zhang P, Couvineau A, Bonaventure J, Roume J, Le Merrer M und 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.

John MR, Arai M, Rubin DA, Jonsson KB und Juppner H (2002): *Identification and characterization of the murine and human gene encoding the tuberoinfundibular peptide of 39 residues.* *Endocrinology* 143(3): 1047-1057.

Jüppner H, Abou-Samra AB, Freeman M, Kong XF, Schipani E, Richards J, Kolakowski LF, Jr., Hock J, Potts JT, Jr., Kronenberg HM und et al. (1991): *A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide.* Science 254(5034): 1024-1026.

Kanaji N, Watanabe N, Kita N, Bandoh S, Tadokoro A, Ishii T, Dobashi H und Matsunaga T (2014): *Paraneoplastic syndromes associated with lung cancer.* World J Clin Oncol 5(3): 197-223.

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

Karaplis AC, Luz A, Glowacki J, Bronson RT, Tybulewicz VL, Kronenberg HM und Mulligan RC (1994): *Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene.* Genes Dev 8(3): 277-289.

Karperien M, van der Harten HJ, van Schooten R, Farih-Sips H, den Hollander NS, Kneppers SL, Nijweide P, Papapoulos SE und Lowik CW (1999): *A frame-shift mutation in the type I parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor causing Blomstrand lethal osteochondrodysplasia.* J Clin Endocrinol Metab 84(10): 3713-3720.

Karschin A (2001): *K⁺ Kanäle mit zwei Porendomänen: funktionelle Bedeutung einer neuen Proteinfamilie im Nervensystem.* Neuroforum 7(3): 81-87.

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

Keck A-V und Pecherstorfer M (2003): *Knochenstoffwechsel bei malignen Erkrankungen.* Journal für Mineralstoffwechsel 10(2): 6-11.

Kemp BE, Moseley JM, Rodda CP, Ebeling PR, Wettenhall RE, Stapleton D, Diefenbach-Jagger H, Ure F, Michelangeli VP, Simmons HA und et al. (1987): *Parathyroid hormone-related protein of malignancy: active synthetic fragments.* Science 238(4833): 1568-1570.

Ketchum KA, Joiner WJ, Sellers AJ, Kaczmarek LK und Goldstein SA (1995): *A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem.* Nature 376(6542): 690-695.

Kim D, Cavanaugh EJ, Kim I und Carroll JL (2009): *Heteromeric TASK-1/TASK-3 is the major oxygen-sensitive background K⁺ channel in rat carotid body glomus cells.* J Physiol 587(Pt 12): 2963-2975.

Kindler CH und Yost CS (2005): *Two-pore domain potassium channels: new sites of local anesthetic action and toxicity.* Reg Anesth Pain Med 30(3): 260-274.

Kindler CH, Yost CS und Gray AT (1999): *Local anesthetic inhibition of baseline potassium channels with two pore domains in tandem.* Anesthesiology 90(4): 1092-1102.

Koeck B und Wagner W (Hrsgg.). (2005): *Praxis der Zahnheilkunde. Implantologie* (2. Aufl.). München: Elsevier.

- Kolakowski LF, Jr.** (1994): *GCRDb: a G-protein-coupled receptor database*. *Receptors Channels* 2(1): 1-7.
- Kollert S, Dombert B, Döring F und Wischmeyer E** (2015): *Activation of TRESK channels by the inflammatory mediator lysophosphatidic acid balances nociceptive signalling*. *Sci Rep* 5: 12548.
- Kovacs CS, Lanske B, Hunzelman JL, Guo J, Karaplis AC und Kronenberg HM** (1996): *Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) regulates fetal-placental calcium transport through a receptor distinct from the PTH/PTHrP receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(26): 15233-15238.
- Kronenberg HM** (2006): *PTHrP and skeletal development*. *Ann N Y Acad Sci* 1068: 1-13.
- Lafreniere RG, Cader MZ, Poulin JF, Andres-Enguix I, Simoneau M, Gupta N, Boisvert K, Lafreniere F, McLaughlan S, Dube MP, Marcinkiewicz MM, Ramagopalan S, Ansorge O, Brais B, Sequeiros J, Pereira-Monteiro JM, Griffiths LR, Tucker SJ, Ebers G und Rouleau GA** (2010): *A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura*. *Nat Med* 16(10): 1157-1160.
- Lafreniere RG und Rouleau GA** (2011): *Migraine: Role of the TRESK two-pore potassium channel*. *Int J Biochem Cell Biol* 43(11): 1533-1536.
- Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G und Barhanin J** (1996a): *TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure*. *EMBO J* 15(5): 1004-1011.
- Lesage F und Lazdunski M** (2000): *Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels*. *Am J Physiol Renal Physiol* 279(5): F793-801.
- Lesage F, Maingret F und Lazdunski M** (2000): *Cloning and expression of human TRAAK, a polyunsaturated fatty acids-activated and mechano-sensitive K⁽⁺⁾ channel*. *FEBS Lett* 471(2-3): 137-140.
- Lesage F, Reyes R, Fink M, Duprat F, Guillemare E und Lazdunski M** (1996b): *Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfide bridge*. *EMBO J* 15(23): 6400-6407.
- Liman ER, Tytgat J und Hess P** (1992): *Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs*. *Neuron* 9(5): 861-871.
- Liu C, Au JD, Zou HL, Cotten JF und Yost CS** (2004): *Potent activation of the human tandem pore domain K channel TRESK with clinical concentrations of volatile anesthetics*. *Anesth Analg* 99(6): 1715-1722, table of contents.
- Löffler G, Petrides PE und Heinrich PC** (Hrsgg.). (2007): *Biochemie & Pathobiochemie* (8. Aufl.). Heidelberg: Springer Medizin
- Lotshaw DP** (2007): *Biophysical, pharmacological, and functional characteristics of cloned and native mammalian two-pore domain K⁺ channels*. *Cell Biochem Biophys* 47(2): 209-256.

- Lüllmann-Rauch R** (2006): *Taschenlehrbuch Histologie* (2. Aufl.). Stuttgart: Thieme.
- Maingret F, Lauritzen I, Patel AJ, Heurteaux C, Reyes R, Lesage F, Lazdunski M und Honore E** (2000a): *TREK-1 is a heat-activated background K(+) channel*. *Embo j* 19(11): 2483-2491.
- Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M und Honore E** (2000b): *Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K(+) channels TREK-1 and TRAAK*. *J Biol Chem* 275(14): 10128-10133.
- Mannstadt M, Juppner H und Gardella TJ** (1999): *Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties*. *Am J Physiol* 277(5 Pt 2): F665-675.
- Marks SC, Jr. und Schroeder HE** (1996): *Tooth eruption: theories and facts*. *Anat Rec* 245(2): 374-393.
- Massfelder T und Helwig JJ** (1999): *Parathyroid hormone-related protein in cardiovascular development and blood pressure regulation*. *Endocrinology* 140(4): 1507-1510.
- Massler M und Schour I** (1941): *Studies in tooth development: theories of eruption*. *Am J Orthodont Oral Surg* 27(10): 552-576.
- Mathie A** (2007): *Neuronal two-pore-domain potassium channels and their regulation by G protein-coupled receptors*. *J Physiol* 578(Pt 2): 377-385.
- Millar JA, Barratt L, Southan AP, Page KM, Fyffe RE, Robertson B und Mathie A** (2000): *A functional role for the two-pore domain potassium channel TASK-1 in cerebellar granule neurons*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3614-3618.
- Moseley JM, Kubota M, Diefenbach-Jagger H, Wettenhall RE, Kemp BE, Suva LJ, Rodda CP, Ebeling PR, Hudson PJ, Zajac JD und et al.** (1987): *Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(14): 5048-5052.
- Nakchbandi IA, Weir EE, Insogna KL, Philbrick WM und Broadus AE** (2000): *Parathyroid hormone-related protein induces spontaneous osteoclast formation via a paracrine cascade*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13): 7296-7300.
- Nature Reviews Drug Discovery GPCR Questionnaire Participants** (2004): *The state of GPCR research in 2004*. *Nat Rev Drug Discov* 3(7): 575, 577-626.
- Neves SR, Ram PT und Iyengar R** (2002): *G protein pathways*. *Science* 296(5573): 1636-1639.
- Nutt RF, Caulfield MP, Levy JJ, Gibbons SW, Rosenblatt M und McKee RL** (1990): *Removal of partial agonism from parathyroid hormone (PTH)-related protein-(7-34)NH₂ by substitution of PTH amino acids at positions 10 and 11*. *Endocrinology* 127(1): 491-493.

- O'Connell AC und Torske KR** (1999): *Primary failure of tooth eruption: a unique case*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 87(6): 714-720.
- O'Connell AD, Morton MJ und Hunter M** (2002): *Two-pore domain K⁺ channels-molecular sensors*. Biochim Biophys Acta 1566(1-2): 152-161.
- Offermanns S, Iida-Klein A, Segre GV und Simon MI** (1996): *G alpha q family members couple parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide and calcitonin receptors to phospholipase C in COS-7 cells*. Mol Endocrinol 10(5): 566-574.
- Pape H-C, Kurtz A und Silbernagl S** (Hrsgg.). (2014): *Physiologie* (7. Aufl.). Stuttgart: Thieme.
- Patel AJ und Honore E** (2001): *Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels*. Trends Neurosci 24(6): 339-346.
- Patel AJ, Honore E, Lesage F, Fink M, Romey G und Lazdunski M** (1999): *Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels*. Nat Neurosci 2(5): 422-426.
- Patel AJ, Honore E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F und Lazdunski M** (1998): *A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel*. Embo j 17(15): 4283-4290.
- Philbrick WM, Dreyer BE, Nakchbandi IA und Karaplis AC** (1998): *Parathyroid hormone-related protein is required for tooth eruption*. Proc Natl Acad Sci U S A 95(20): 11846-11851.
- Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH, Vasavada RC, Weir EC, Broadus AE und Stewart AF** (1996): *Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology*. Physiol Rev 76(1): 127-173.
- Piattelli A und Eleuterio A** (1991): *Primary failure of eruption*. Acta Stomatol Belg 88(3): 127-130.
- Pierce KL, Premont RT und Lefkowitz RJ** (2002): *Seven-transmembrane receptors*. Nat Rev Mol Cell Biol 3(9): 639-650.
- Pilz P, Meyer-Marcotty P, Eigenthaler M, Roth H, Weber BH und 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.
- Pines M, Fukayama S, Costas K, Meurer E, Goldsmith PK, Xu X, Muallem S, Behar V, Chorev M, Rosenblatt M, Tashjian AH, Jr. und Suva LJ** (1996): *Inositol 1-,4-,5-trisphosphate-dependent Ca²⁺ signaling by the recombinant human PTH/PTHrP receptor stably expressed in a human kidney cell line*. Bone 18(4): 381-389.
- Pioszak AA, Harikumar KG, Parker NR, Miller LJ und Xu HE** (2010): *Dimeric arrangement of the parathyroid hormone receptor and a structural mechanism for ligand-induced dissociation*. J Biol Chem 285(16): 12435-12444.

Pioszak AA, Parker NR, Gardella TJ und Xu HE (2009): *Structural basis for parathyroid hormone-related protein binding to the parathyroid hormone receptor and design of conformation-selective peptides*. J Biol Chem 284(41): 28382-28391.

Pioszak AA und Xu HE (2008): *Molecular recognition of parathyroid hormone by its G protein-coupled receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A 105(13): 5034-5039.

Piserchio A, Usdin T und Mierke DF (2000): *Structure of tuberoinfundibular peptide of 39 residues*. J Biol Chem 275(35): 27284-27290.

Proffit WR und Frazier-Bowers SA (2009): *Mechanism and control of tooth eruption: overview and clinical implications*. Orthod Craniofac Res 12(2): 59-66.

Proffit WR und Vig KW (1981): *Primary failure of eruption: a possible cause of posterior open-bite*. Am J Orthod 80(2): 173-190.

Raghoobar GM, Boering G, Jansen HW und Vissink A (1989): *Secondary retention of permanent molars: a histologic study*. J Oral Pathol Med 18(8): 427-431.

Raghoobar GM, Boering G, Vissink A und Stegenga B (1991): *Eruption disturbances of permanent molars: a review*. J Oral Pathol Med 20(4): 159-166.

Rajan S, Wischmeyer E, Xin Liu G, Preisig-Muller R, Daut J, Karschin A und Derst C (2000): *TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histidine as pH sensor*. J Biol Chem 275(22): 16650-16657.

Rickard DJ, Wang FL, Rodriguez-Rojas AM, Wu Z, Trice WJ, Hoffman SJ, Votta B, Stroup GB, Kumar S und Nuttall ME (2006): *Intermittent treatment with parathyroid hormone (PTH) as well as a non-peptide small molecule agonist of the PTH1 receptor inhibits adipocyte differentiation in human bone marrow stromal cells*. Bone 39(6): 1361-1372.

Risom L, Christoffersen L, Daugaard-Jensen J, Hove HD, Andersen HS, Andresen BS, Kreiborg S und Duno M (2013): *Identification of six novel PTH1R mutations in families with a history of primary failure of tooth eruption*. PLoS One 8(9): e74601.

Rosenblatt M (1986): *Peptide hormone antagonists that are effective in vivo. Lessons from parathyroid hormone*. N Engl J Med 315(16): 1004-1013.

Roth H, Fritsche LG, Meier C, Pilz P, Eigenthaler M, Meyer-Marcotty P, Stellzig-Eisenhauer A, Proff P, Kanno CM und Weber BH (2014): *Expanding the spectrum of PTH1R mutations in patients with primary failure of tooth eruption*. Clin Oral Investig 18(2): 377-384.

Rubin DA und Jüppner H (1999): *Zebrafish express the common parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor (PTH1R) and a novel receptor (PTH3R) that is preferentially activated by mammalian and fugu fish parathyroid hormone-related peptide*. J Biol Chem 274(40): 28185-28190.

Sano Y, Inamura K, Miyake A, Mochizuki S, Kitada C, Yokoi H, Nozawa K, Okada H, Matsushima H und Furuichi K (2003): *A novel two-pore domain K⁺*

channel, *TRESK*, is localized in the spinal cord. *J Biol Chem* 278(30): 27406-27412.

Savoldi G, Izzi C, Signorelli M, Bondioni MP, Romani C, Lanzi G, Moratto D, Verdoni L, Pinotti M, Prefumo F, Superti-Furga A und Pilotta A (2013): *Prenatal presentation and postnatal evolution of a patient with Jansen metaphyseal dysplasia with a novel missense mutation in PTH1R*. *Am J Med Genet A* 161a(10): 2614-2619.

Schiekel J, Lindner M, Hetzel A, Wemhoner K, Renigunta V, Schlichthorl G, Decher N, Oliver D und Daut J (2013): *The inhibition of the potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle by endothelin-1 is mediated by phospholipase C*. *Cardiovasc Res* 97(1): 97-105.

Schipani E, Kruse K und Juppner H (1995): *A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia*. *Science* 268(5207): 98-100.

Schipani E, Langman C, Hunzelman J, Le Merrer M, Loke KY, Dillon MJ, Silve C und Juppner H (1999): *A novel parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor mutation in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia*. *J Clin Endocrinol Metab* 84(9): 3052-3057.

Schipani E, Langman CB, Parfitt AM, Jensen GS, Kikuchi S, Kooh SW, Cole WG und Juppner H (1996): *Constitutively activated receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia*. *N Engl J Med* 335(10): 708-714.

Schwindinger WF, Fredericks J, Watkins L, Robinson H, Bathon JM, Pines M, Suva LJ und Levine MA (1998): *Coupling of the PTH/PTHrP receptor to multiple G-proteins. Direct demonstration of receptor activation of Gs, Gq/11, and Gi(1) by [alpha-32P]GTP-gamma-azidoanilide photoaffinity labeling*. *Endocrine* 8(2): 201-209.

Selye H (1932): *On the stimulation of new bone-formation with parathyroid extract and irradiated ergosterol*. *Endocrinology* 16(5): 547-558.

Siegel SC und O'Connell A (1999): *Oral rehabilitation of a child with primary failure of tooth eruption*. *J Prosthodont* 8(3): 201-207.

Siehler S (2009): *Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors*. *Br J Pharmacol* 158(1): 41-49.

Silbernagl S und Despopoulos A (2007): *Taschenatlas Physiologie* (7. Aufl.). Stuttgart: Thieme.

Silve C und Juppner H (2006): *Ollier disease*. *Orphanet J Rare Dis* 1: 37.

Simon MI, Strathmann MP und Gautam N (1991): *Diversity of G proteins in signal transduction*. *Science* 252(5007): 802-808.

Singh AT, Gilchrist A, Voyno-Yasenetskaya T, Radeff-Huang JM und Stern PH (2005): *G alpha12/G alpha13 subunits of heterotrimeric G proteins mediate parathyroid hormone activation of phospholipase D in UMR-106 osteoblastic cells*. *Endocrinology* 146(5): 2171-2175.

- Sirois JE, Lei Q, Talley EM, Lynch C, 3rd und Bayliss DA** (2000): *The TASK-1 two-pore domain K⁺ channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalation anesthetics.* J Neurosci 20(17): 6347-6354.
- Strader CD, Fong TM, Graziano MP und Tota MR** (1995): *The family of G-protein-coupled receptors.* Faseb j 9(9): 745-754.
- Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D und Dixon RA** (1994): *Structure and function of G protein-coupled receptors.* Annu Rev Biochem 63: 101-132.
- Strewler GJ und Nissenson RA** (1990): *Hypercalcemia in malignancy.* West J Med 153(6): 635-640.
- Strewler GJ, Stern PH, Jacobs JW, Eveloff J, Klein RF, Leung SC, Rosenblatt M und Nissenson RA** (1987): *Parathyroid hormonelike protein from human renal carcinoma cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone.* J Clin Invest 80(6): 1803-1807.
- Talley EM und Bayliss DA** (2002): *Modulation of TASK-1 (Kcnk3) and TASK-3 (Kcnk9) potassium channels: volatile anesthetics and neurotransmitters share a molecular site of action.* J Biol Chem 277(20): 17733-17742.
- Talley EM, Lei Q, Sirois JE und Bayliss DA** (2000): *TASK-1, a two-pore domain K⁺ channel, is modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons.* Neuron 25(2): 399-410.
- Talley EM, Solorzano G, Lei Q, Kim D und Bayliss DA** (2001): *Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family.* J Neurosci 21(19): 7491-7505.
- Teitelbaum SL** (2000): *Bone resorption by osteoclasts.* Science 289(5484): 1504-1508.
- Tulleuda A, Cokic B, Callejo G, Saiani B, Serra J und Gasull X** (2011): *TRESK channel contribution to nociceptive sensory neurons excitability: modulation by nerve injury.* Mol Pain 7: 30.
- Ulrich CD, 2nd, Holtmann M und Miller LJ** (1998): *Secretin and vasoactive intestinal peptide receptors: members of a unique family of G protein-coupled receptors.* Gastroenterology 114(2): 382-397.
- Urena P, Kong XF, Abou-Samra AB, Juppner H, Kronenberg HM, Potts JT, Jr. und Segre GV** (1993): *Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acids are widely distributed in rat tissues.* Endocrinology 133(2): 617-623.
- Usdin TB, Gruber C und Bonner TI** (1995): *Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor.* J Biol Chem 270(26): 15455-15458.
- Usdin TB, Hoare SR, Wang T, Mezey E und Kowalak JA** (1999): *TIP39: a new neuropeptide and PTH2-receptor agonist from hypothalamus.* Nat Neurosci 2(11): 941-943.

- Usdin TB, Paciga M, Riordan T, Kuo J, Parmelee A, Petukova G, Camerini-Otero RD und Mezey E** (2008): *Tuberoinfundibular Peptide of 39 residues is required for germ cell development*. *Endocrinology* 149(9): 4292-4300.
- Vilardaga JP, Romero G, Friedman PA und Gardella TJ** (2011): *Molecular basis of parathyroid hormone receptor signaling and trafficking: a family B GPCR paradigm*. *Cell Mol Life Sci* 68(1): 1-13.
- Ward HL, Small CJ, Murphy KG, Kennedy AR, Ghatei MA und Bloom SR** (2001): *The actions of tuberoinfundibular peptide on the hypothalamo-pituitary axes*. *Endocrinology* 142(8): 3451-3456.
- Wilbanks AM, Laporte SA, Bohn LM, Barak LS und Caron MG** (2002): *Apparent loss-of-function mutant GPCRs revealed as constitutively desensitized receptors*. *Biochemistry* 41(40): 11981-11989.
- Wise GE, Frazier-Bowers S und D'Souza RN** (2002a): *Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption*. *Crit Rev Oral Biol Med* 13(4): 323-334.
- Wise GE und Yao S** (2006): *Regional differences of expression of bone morphogenetic protein-2 and RANKL in the rat dental follicle*. *Eur J Oral Sci* 114(6): 512-516.
- Wise GE, Yao S, Zhang Q und Ren Y** (2002b): *Inhibition of osteoclastogenesis by the secretion of osteoprotegerin in vitro by rat dental follicle cells and its implications for tooth eruption*. *Arch Oral Biol* 47(3): 247-254.
- Witkowski R, Prokop O, Ullrich E und Thiel G** (2013): *Lexikon der Syndrome und Fehlbildungen: Ursachen, Genetik, Risiken* (7. Aufl.). Berlin Heidelberg: Springer
- Wittrant Y, Gorin Y, Mohan S, Wagner B und Abboud-Werner SL** (2009): *Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) directly inhibits receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) expression by osteoblasts*. *Endocrinology* 150(11): 4977-4988.
- Wysolmerski JJ, Broadus AE, Zhou J, Fuchs E, Milstone LM und Philbrick WM** (1994): *Overexpression of parathyroid hormone-related protein in the skin of transgenic mice interferes with hair follicle development*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(3): 1133-1137.
- Xian Tao L, Dyachenko V, Zuzarte M, Putzke C, Preisig-Muller R, Isenberg G und Daut J** (2006): *The stretch-activated potassium channel TREK-1 in rat cardiac ventricular muscle*. *Cardiovasc Res* 69(1): 86-97.
- Yamaguchi T, Hosomichi K, Narita A, Shirota T, Tomoyasu Y, Maki K und Inoue I** (2011): *Exome resequencing combined with linkage analysis identifies novel PTH1R variants in primary failure of tooth eruption in Japanese*. *J Bone Miner Res* 26(7): 1655-1661.
- Yamamoto M, Harm SC, Grasser WA und Thiede MA** (1992): *Parathyroid hormone-related protein in the rat urinary bladder: a smooth muscle relaxant produced locally in response to mechanical stretch*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(12): 5326-5330.

Yao S, Pan F und Wise GE (2007): *Chronological gene expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in the stellate reticulum of the rat: implications for tooth eruption.* Arch Oral Biol 52(3): 228-232.

Yao S, Prpic V, Pan F und Wise GE (2010): *TNF-alpha upregulates expression of BMP-2 and BMP-3 genes in the rat dental follicle--implications for tooth eruption.* Connect Tissue Res 51(1): 59-66.

Yasuda T, Banville D, Hendy GN und Goltzman D (1989): *Characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene. Functional and evolutionary aspects.* J Biol Chem 264(13): 7720-7725.

Yatani H, Watanabe EK, Kaneshima T, Yamashita A und Suzuki K (1998): *Etched-porcelain resin-bonded onlay technique for posterior teeth.* J Esthet Dent 10(6): 325-332.

Zhang P, Jobert AS, Couvineau A und Silve C (1998): *A homozygous inactivating mutation in the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor causing Blomstrand chondrodysplasia.* J Clin Endocrinol Metab 83(9): 3365-3368.

7. **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1-1:	Schematische Darstellung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors.....	2
Abb. 1-2:	Schematische Darstellung der drei großen GPCR-Familien A, B und C	6
Abb. 1-3:	Primärstruktur des humanen Parathormon-Rezeptor Typ 1.....	8
Abb. 1-4:	Tertiärstruktur der Extrazellulärdomäne des hPTH1Rs mit gebundenem PTH(15-34)	8
Abb. 1-5:	Aminosäuresequenzen der Liganden PTH, PTHrP und TIP39	9
Abb. 1-6:	Schema der intrazellulären Signalkaskaden des PTH1R.....	11
Abb. 1-7:	Membrantopologie eines Tandemporen-Kaliumkanals	21
Abb. 1-8:	Phylogenetischer Stammbaum der humanen Tandemporen- Kaliumkanäle und Decodierung der Akronyme	22
Abb. 2-1:	Prinzip der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme	47
Abb. 2-2:	Spannungsprotokolle	49
Abb. 3-1:	Agarose-Gel zur Kontrolle des Testverbaus nach DNA- Präparation	52
Abb. 3-2:	Sequenzierung der Nukleinbasen der Parathormon-Rezeptor- Mutanten	53
Abb. 3-3:	Agarose-Gel zur Kontrolle der Vektor-Linearisierung.....	54
Abb. 3-4:	Agarose-Gel zur Kontrolle der <i>in-vitro</i> Transkription	55
Abb. 3-5:	Koexpression von TASK-1 mit PTH1R [WT].....	57
Abb. 3-6:	Funktionelle Charakterisierung des Parathormon-Rezeptor Wildtyps durch Kopplung an den TASK-1 Kanal.....	59
Abb. 3-7:	Koexpression von TASK-1 mit PTH1R [P119L]	60
Abb. 3-8:	Funktionelle Charakterisierung der Mutante PTH1R [P119L] durch Kopplung an TASK-1	62
Abb. 3-9:	Koexpression von TASK-1 mit PTH1R [H442D]	63
Abb. 3-10:	Funktionelle Charakterisierung der Mutante PTH1R [H442D] durch Kopplung an TASK-1	64

Abb. 3-11: Funktionelle Charakterisierung der Mutanten PTH1R [L232R] und PTH1R [L292P] durch Kopplung an TASK-1	67
Abb. 3-12: Quantitative Zusammenfassung der normierten Stromamplituden im Säulendiagramm	69
Abb. 3-13: Funktionelle Charakterisierung des Parathormon-Rezeptor Wildtyps durch Kopplung an den TRESK-Kanal	72
Abb. 3-14: Koexpression der Parathormon-Rezeptor Mutanten mit TRESK.....	73

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich stets unterstützt haben.

Ein besonderer Dank geht an:

- Prof. Dr. Erhard Wischmeyer für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, sowie für die Einarbeitung in die Elektrophysiologie und die hilfreiche Unterstützung und Anregung zu jeder Zeit
- Prof. Dr. Dr. Dr. Dipl.-Phys. Andreas Bahmer für die kurzfristige und zügige Übernahme des Zweitgutachtens
- Priv.-Doz. Dr. Frank Döring für die Unterstützung bei der Planung und der Durchführung der Arbeit, sowie für die Einführung in die molekularbiologischen Methoden
- Dr. Sina Kollert für die Bereitstellung der Oozyten und die Unterstützung im Labor
- Katharina Gerber für die Einarbeitung und Unterstützung im Labor
- meine Familie und Freunde

Ein besonderer letzter Gruß geht an meine Lieben, die die Fertigstellung dieser Arbeit nicht mehr miterleben durften.

~ Begrenz ist das Leben – unendlich die Erinnerung ~

Lebenslauf

Name: Stephanie Hasse