

Aus dem Physiologischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. med. Markus Bleich)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Der Einfluss von Fam20a auf die Calciumkonzentration, die
Calciumaktivität und den scheinbaren
Calciumaktivitätskoeffizienten im Zellkulturmedium von LLC-PK₁-
Zellen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Carolin Sandmann

aus Vechta

Kiel 2015

1. Berichtstatter:	Prof. Dr. Markus Bleich
2. Berichtstatter:	Prof. Dr. Christof Dörfer
Tag der mündlichen Prüfung:	16. Mai 2017
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	16. Mai 2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Enamel-Renal-Syndrom und Fam20a	1
1.2	Physiologie und Pathophysiologie von Calcifizierungsprozessen	4
1.2.1	Calciumkonzentration und Calciumaktivität	4
1.2.2	Ionenstärke, Temperatur und pH	5
1.2.3	Calciumpuffer – Glykosaminoglykane und andere Makromoleküle	6
1.2.4	Zahnbildung	8
1.2.5	Ektope pathologische Verkalkungen	10
1.3	Vorarbeiten und Zielsetzung der Arbeit	11
2	Material und Methoden	14
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	14
2.2	Methoden	15
2.2.1	Kultivierung von LLC-PK ₁ Zelllinien	15
2.2.2	Kryokonservierung und Rekultivierung	15
2.3	Kontrolle der Knockdown- Effizienz	16
2.3.1	RNA Isolierung	16
2.3.2	cDNA-Synthese	17
2.4	Messung der absoluten Calciumkonzentration mittels Flammenphotometrie	17
2.5	Messung der Calciumaktivität mittels Calcium-selektiver Elektrode	18
2.5.1	Aufbau der Messapparatur	18
2.5.2	Physiologische Grundlagen und Berechnung	18
2.5.3	Versuchsdurchführung	22
3	Ergebnisse	24
3.1	Fam20a Expression in den Zelllinien	24

3.2	Calciumaktivität und Calciumkonzentration in Zellkulturüberständen	24
3.3	Calciumpufferkapazität	26
3.4	Einfluss von Chondroitinsulfat A auf den Aktivitätskoeffizienten	27
3.5	Einfluss von Chondroitinase ABC (Proteus vulgaris) auf den scheinbaren Calciumaktivitätskoeffizienten	29
4	Diskussion	32
4.1	Methodik	32
4.1.1	Die Auswahl des „Modell-Gewebes“	32
4.1.2	Die Auswahl der Manipulation	32
4.1.3	Die Calcium-Elektrode	33
4.2	Fam20a und extrazelluläre Ca ²⁺ -Pufferkapazität	33
4.2.1	Was bedeutet eine erhöhte Calciumaktivität?	33
4.2.2	Auswirkung der Änderung der extrazellulären Calciumaktivität	35
4.2.3	Die Rolle der Chondroitinsulfate in der extrazellulären Matrix	37
4.3	Ausblick	40
5	Zusammenfassung	41
6	Literaturverzeichnis	42
7	Anhang	47
7.1	Danksagung	47
7.2	Erklärung	48
7.3	Lebenslauf	49

1 Einleitung

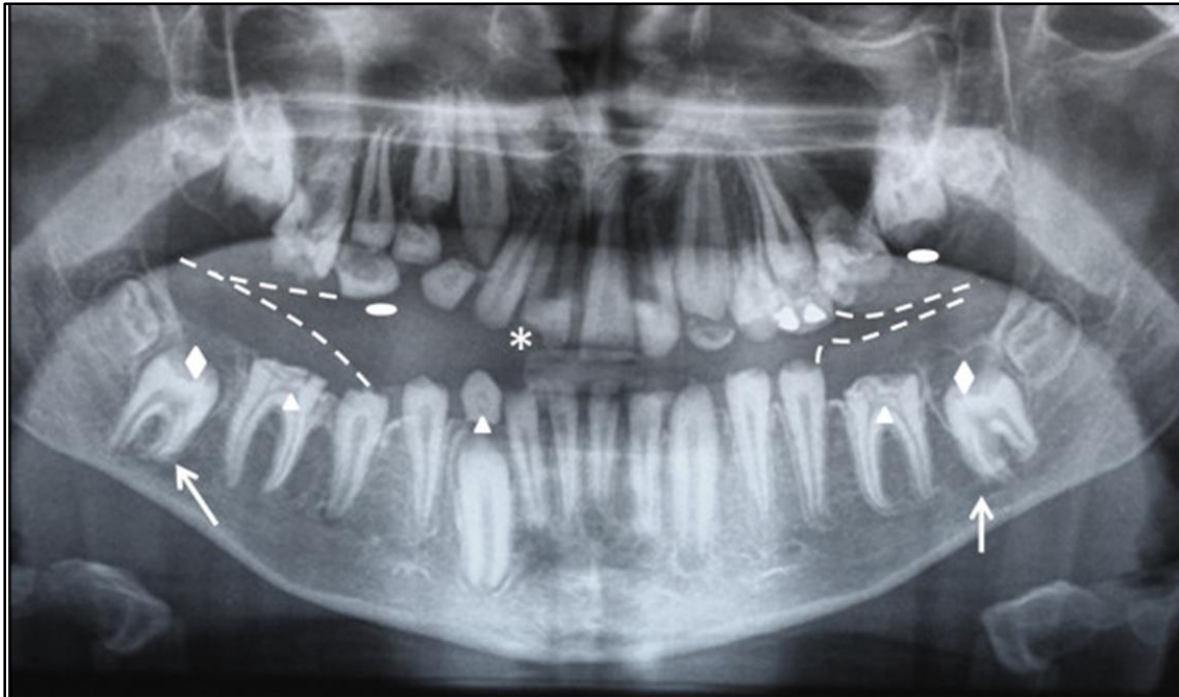
1.1 Das Enamel-Renal-Syndrom und Fam20a

In den letzten Jahren wurde es durch ständig weiter verbesserte molekularbiologische Methoden möglich, immer wieder Mutationen einzelner Proteine als ursächlich für Krankheitsbilder bzw. Symptomkomplexe zu identifizieren.

Dabei wurde kürzlich auch eine seltene genetische Erkrankung entdeckt, bei der Patienten auf der einen Seite ein Krankheitsbild mit Zahnfehlbildungen aufweisen, die Amelogenesis Imperfecta (AI). Auf der anderen Seite konnten bei diesen Patienten ektope pathologische Verkalkungen, unter anderem in der Niere als interstitielle Nephrocalcinose (NC), diagnostiziert werden. Auf Grund dieser Symptome wird die Erkrankung als Enamel-Renal-Syndrom bezeichnet (ERS, *engl. enamel*: Zahnschmelz, *renal*: zu den Nieren gehörig) (Abb. 1).

Mit Hilfe von gentechnischen Methoden konnten 20 verschiedene Mutationen in dem Gen *FAM20A* auf Chromosom 17 an der Stelle q24.2 als eine Ursache für das ERS nachgewiesen werden (Jaureguiberry et al., 2012). Dabei wurden 25 Patienten aus 16 Familien identifiziert, bei denen sowohl eine AI als auch eine NC diagnostiziert werden konnte. Mutationen im *FAM20A* Gen können auch das „Amelogenesis Imperfecta and Gingival Fibromatosis Syndrom“ (AIGFS) verursachen, dessen klinisches Erscheinungsbild der Patienten ähnlich zum ERS ist, allerdings ohne zusätzliche NC (Wang et al., 2013).

Was die Zahnfehlbildung betrifft, so ist sowohl die erste als auch die zweite Dentition der Patienten durch einen dünnen und aplastischen Schmelz gekennzeichnet, der nicht mehr seinen so typischen prismatischen Aufbau zeigt. Außerdem sind Pulpasteine vorhanden, d.h. es kommt zu Hartsubstanzbildungen in der Pulpa. Der Durchbruch der Zähne erfolgt häufig zu einem zu späten Zeitpunkt oder unterbleibt völlig (Wang et al., 2013). Zusätzlich können Gingiva-Hyperplasien auftreten (Normand de la Tranchade et al., 2003).



Dentaler Phänotyp

- * Halbmondförmige Form der Schneidekanten von den großen Schneidezähnen im Oberkiefer
- Dilazeration der Wurzel
- ▲ Kalzifizierung in der Pulpa

Gingivaler Phänotyp

- ◆ Hyperplasie der Zahnfollikel bei retinierten Zähnen
- Hyperplasie der Gingiva

Abbildung 1: Orthopantomogram eines Patienten mit einer rezessiven FAM20A Mutation (de la Dure-Molla et al., 2014).

Die NC ist sonographisch durch gut sichtbare Kalkablagerungen gekennzeichnet (Abb. 2) und zeichnet sich dadurch aus, dass sie nicht von einer Hypercalciämie oder Hypercalciurie begleitet ist.



Abbildung 2: Ultraschall Aufnahme eines ERS Patienten mit einer NC. Auf der rechten Seite der gelben Linie befindet sich die rechte Niere des Patienten. Abbildung modifiziert nach (Wang et al., 2013).

Das Protein Fam20a gehört zu einer Proteinfamilie mit 3 Mitgliedern, die im Rahmen der Sequenzierung des humanen Genoms identifiziert wurde und den offiziellen Namen „family with sequence similarity 20“ erhielt (Nalbant et al., 2005). Die Funktion dieser Proteine ist aber zurzeit nur sehr bruchstückhaft aufgeklärt (Tabelle 1). So spielen z.B. alle 3 Proteine eine Rolle bei Differenzierungs- und Zellteilungsprozessen im Rahmen der Hämatopoese (Nalbant et al., 2005). Fam20a ist tatsächlich das Mitglied der Familie, über das neben der Phänomenologie des ERS und der Zuordnung zur Hämatopoese am wenigsten bekannt ist.

	Bekannte Expressionsorte	Funktion
Fam20a	Lunge, Leber, Thymus, Niere, Ovar, Hoden, Nebenschilddrüse	Rolle bei der Hämatopoese; Mutation führt zum ERS, keine molekulare Funktion bekannt
Fam20b	Lunge, Leber, Herz, Muskel, Milz, Pankreas, Niere, Ovar, Dünndarm, Lymphknoten, Knochenmark	Rolle bei Hämatopoese; Kinase, die Xylose an der Glykosaminoglykan-Verbindungs-Region phosphoryliert
Fam20c	Herz, Gehirn, Lunge, Leber, Muskel, Niere, Pankreas, Milz, Thymus, Hoden, Ovar, Dünndarm, Leukozyten, Tonsillen, Lymphknoten, Knochenmark	Rolle bei Hämatopoese und Biomineralisation; Kinase, die sezernierte Phosphoproteine phosphoryliert, Mutation führt zum Raine- Syndrom

Tabelle 1 zeigt bekannte Fam20a, Fam20b und Fam20c Expressionsorte und Funktionen nach (Nalbant et al., 2005, Wang et al., 2014, Koike et al., 2009, Ishikawa et al., 2012.).

Hingegen ist bekannt, dass Fam20b eine Kinase ist, die Xylose in Glykosaminoglykanen phosphorylieren kann (Wang et al., 2014). Glykosaminoglykane gehören zu den Proteoglykanen und sind interstitielle Makromoleküle (siehe auch 1.2.3). Bei einer vermehrten Fam20b-Expression erhöht sich auch die Menge an Glykosaminoglykanen (Koike et al., 2009).

Fam20c ist eine Kinase, die an der Phosphorylierung von sezernierten Proteinen beteiligt ist, z.B. von Mitgliedern der Sibling Protein Familie (Small Integrin-Binding

Ligand N-linked Glycoproteins). Gemeinsam ist allen Proteinen, die von Fam20c phosphoryliert werden, dass sie eine wichtige Rolle in Prozessen spielen, die die Biomineralisation betreffen (Ishikawa et al., 2012). So wird z.B. bei Hühnern die Fam20c Expression hochreguliert wenn Eier produziert werden (Ishikawa et al., 2012). Die enzymatische Funktion von Fam20c kann noch genauer beschrieben werden, da Fam20c auch das Phosphoprotein Casein phosphorylieren kann und die Funktion einer Golgi Casein-Kinase übernimmt (Ishikawa et al., 2012).

Mutationen im Fam20c Gen führen zum sehr seltenen Raine Syndrom. Bei diesem Syndrom treten kranio-faziale Fehlbildungen auf und die Neugeborenen überleben meistens nur einige Stunden nach der Geburt (Raine et al., 1989). Einige Patienten mit einer Mutation im Fam20c-Gen weisen eine Hypophosphatämie auf und zeigen eine Erhöhung des Fibroblasten-Wachstumsfaktors FGF 23 (engl. *Fibroblast Growth Factor*) (Tagliabracci et al., 2014). FGF23 kann zum Beispiel durch die Hemmung der Phosphatresorption in der Niere eine Rolle in Biomineralisationsprozessen spielen (Quarles 2012). Es konnte gezeigt werden, dass Fam20c ein Regulator von FGF23 ist und durch die Phosphorylierung von FGF23 den Phosphatstoffwechsel beeinflussen kann (Tagliabracci et al., 2014).

1.2 Physiologie und Pathophysiologie von Calcifizierungsprozessen

1.2.1 Calciumkonzentration und Calciumaktivität

Die absolute Menge des Calciums in einer Lösung lässt sich unterteilen in das Protein gebundene Calcium, das elektrostatisch gebundene Calcium und in das „effektive“ Calcium, das sind die freien Calcium-Ionen (Abb.3, (Moore 1970)). Die Konzentration dieser freien Calcium-Ionen d.h. die Calciumaktivität, ist der Anteil des Calciums, der letztendlich biologisch bzw. chemisch aktiv ist. Dies gilt z.B. für die Passage durch Calcium-Kanäle und somit für die Signaltransduktion in vielen elektrisch gekoppelten Prozessen. Intrazellulär dient Ca^{2+} als second messenger. Chemisch fällt Ca^{2+} in Verbindung mit z.B. PO_4^{2-} aus, wenn das Löslichkeitsprodukt

überschritten wird. Die Calciumaktivität lässt sich mit Hilfe einer Calcium-selektiven Elektrode bestimmen (Moore 1970).

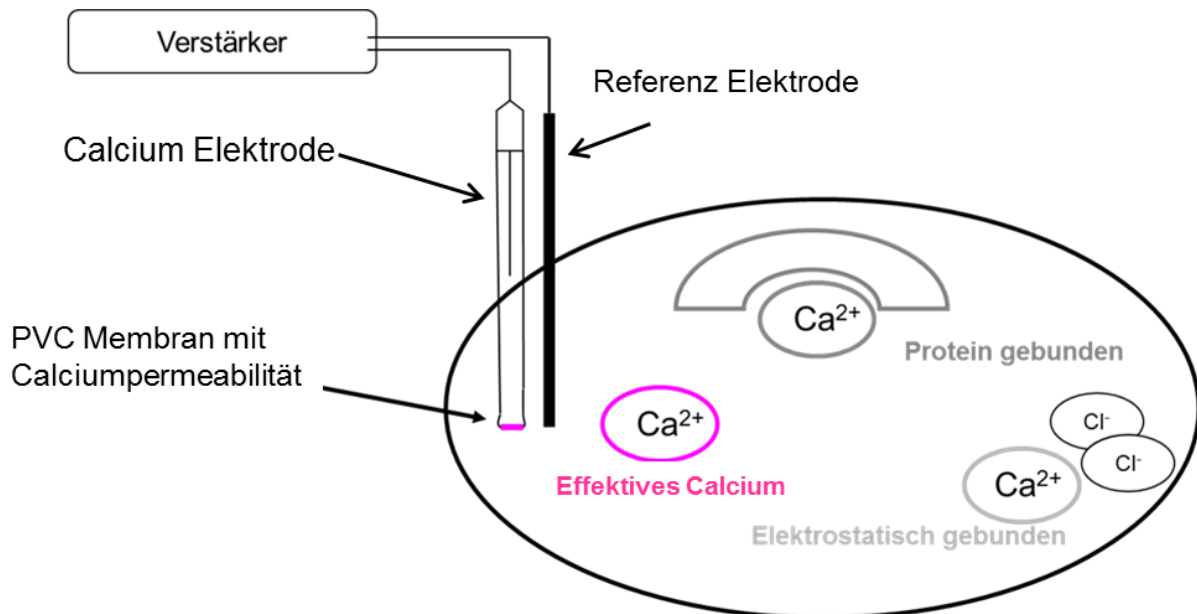


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Gesamtcalciums. Die Calcium Elektrode misst die Calciumaktivität.

Die absolute Calciumkonzentration lässt sich flammenphotometrisch bestimmen.

In den folgenden Abschnitten sollen physikalische und biologische Faktoren erläutert werden, die das Verhältnis der Calciumaktivität zur Calciumkonzentration beeinflussen und modifizieren.

1.2.2 Ionenstärke, Temperatur und pH

Lässt man das an Proteine oder andere Makromoleküle gebundene Calcium zunächst beiseite, sind es vor allem die ionale Zusammensetzung, die Temperatur und der pH-Wert, die die Calciumaktivität einer Lösung im physikalischen Sinne bestimmen (Brown and Rydqvist 1981). Die Ionenstärke bestimmt den Anteil der stochastisch zu jedem Zeitpunkt elektrostatisch gebundenen Ca^{2+} Ionen und den sich daraus ergebenden Aktivitätskoeffizienten (Moore 1970). Die Temperatur geht über die Beweglichkeit der Teilchen ebenfalls in den Aktivitätskoeffizienten ein und muss bei Messungen deshalb konstant gehalten werden. Der pH-Wert hat einen starken

Einfluss auf das Löslichkeitsprodukt von Calciumphosphat und Calciumcarbonat und muss deshalb ebenfalls berücksichtigt werden (Moore 1970).

1.2.3 **Calciumpuffer – Glykosaminoglykane und andere Makromoleküle**

Wie in Abb.3 gezeigt, können auch Proteine und andere Makromoleküle Calcium binden und damit, im Sinne der Verfügbarkeit für biologische Prozesse, faktisch aus der Lösung herausnehmen und puffern. Im Blut wird Calcium dabei hauptsächlich an Proteine gebunden, in Geweben spielen hingegen Proteoglykane und Glykosaminoglykane eine wichtige Rolle.

Proteoglykane sind Makromoleküle, die aus einem Proteinanteil und einem Kohlenhydratanteil aufgebaut sind. Letzterer überwiegt mit 85-95 % und besteht aus unterschiedlich vielen negativ geladenen Glykosaminoglykanketten (Abb.4). Die Proteoglykane gibt es, je nach Gewebe und Funktion, in vielen verschiedenen Formen und Größen (Hardingham and Fosang 1992). Das Rückgrat der Proteoglykane besteht häufig aus Hyaluronsäure, an die dann die sogenannten *core*-Proteine gebunden sind. An die *core*-Proteine wiederum sind dann Keratinsulfat- und Chondroitinsulfatketten geknüpft. Proteoglykane werden am rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und dann posttranslational im Golgi-Apparat modifiziert.

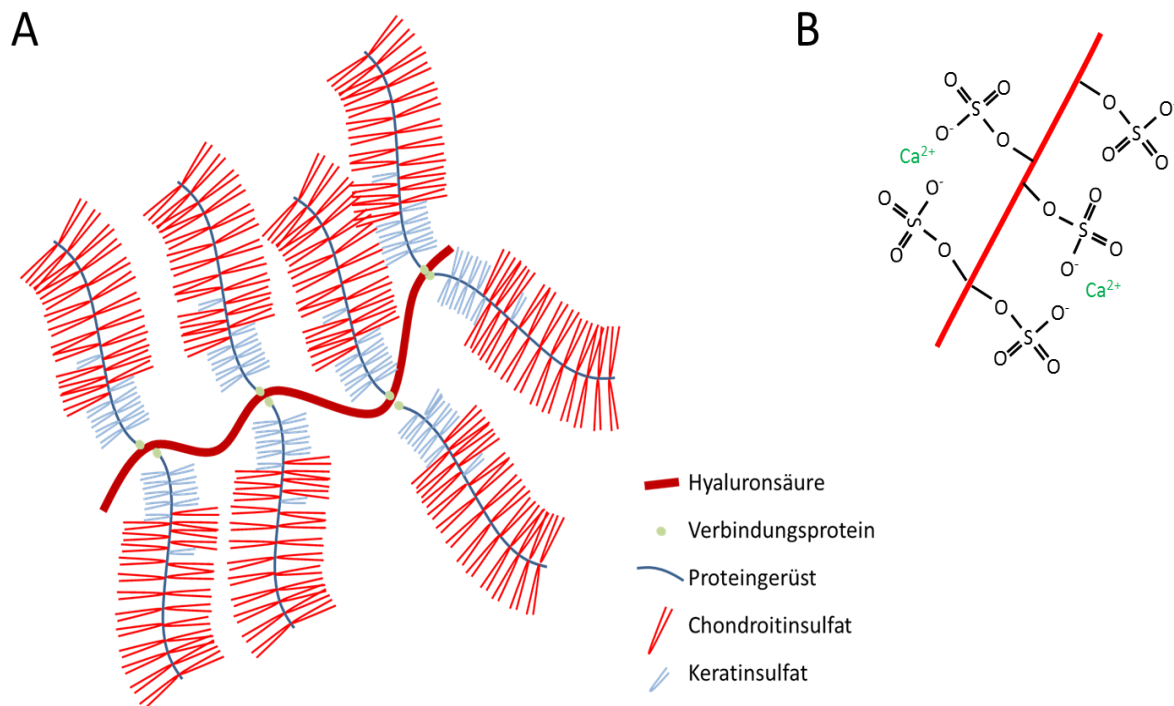


Abbildung 4: **A** Typischer Aufbau eines Proteoglykans mit Hyaluronhauptkette und damit über core-Proteine verbundene Chondroitinsulfat- und Keratinsulfatreste. **B** Calciumbindung durch Sulfatreste.

Die Glykosaminoglykane haben keinen Proteinanteil und lassen sich in folgende Gruppen einteilen: Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat und Hyaluronat.

Glykosaminoglykanketten sind aus einzelnen Disaccharidketten aufgebaut, die jeweiligen Disaccharid-Bausteine sind 1-4 glykosidisch miteinander verbunden. Die einzelnen Disaccharid-Bausteine selbst bestehen meist aus einer Uronsäure und aus einem Aminozucker wie N-Acetylgalactosamin oder N-Acetylglucosamin. Die Monosaccharide innerhalb der Disaccharid-Bausteine sind 1-3 glykosidisch verknüpft (Heinrich et al., 2014).

Auch die für diese Arbeit besonders wichtigen Chondroitinsulfate bestehen aus N-Acetylgalactosamin und Glucuronsäure. Im Falle von Chondroitin-6-sulfat ist ein Sulfatrest an das C6-Atom vom N-Acetylgalactosamin verbunden und bei Chondroitin-4-sulfat an C4 (Pomin et al., 2012). Die Glucuronsäure kann in L-Iduronsäure umgewandelt werden, geschieht dies in mehr als 10% der Fälle, dann bezeichnet man das Polysaccharid als Dermatansulfat (Li et al., 2013). Chondroitin-

Sulfate können enzymatisch durch die Chondroitinase ABC abgebaut werden (Zeng et al., 2012).

Viele Polysaccharide und Proteine, sowie andere große geladene Moleküle, sind aufgrund ihres polaren Charakters in der Lage mit Calcium-Ionen zu interagieren und beeinflussen damit die Calciumaktivität. Hierbei führt die komplexe Struktur von biologischen Geweben und Lösungen dazu, dass sich veränderte Ionenstärken nicht in einfach vorhersagbarer Weise auf die Calciumaktivitäten auswirken und die Calciumaktivität nicht nur von der Ionenstärke bestimmt wird (Spitzer and Poolman 2009). Den wahren Calciumaktivitätskoeffizienten können wir also nicht mehr berechnen, sondern nur den scheinbaren Calciumaktivitätskoeffizienten durch Messung bestimmen, da dieser z.B. durch Protein-Protein und Interaktionen beeinflusst wird (McBride and Rodgers 2013).

1.2.4 **Zahnbildung**

Unter physiologischen Bedingungen kommt es im Körper nur an sehr definierten Stellen und unter stark kontrollierten Bedingungen zur Calcifizierung. Neben der Knochenbildung ist hier die Zahnbildung bzw. die Schmelzbildung zu nennen, auf die hier näher eingegangen werden soll, da sie im Rahmen des ERS betroffen ist.

Der Schmelz des Zahnes ist die härteste Substanz im menschlichen Körper. Er bildet die äußerste Schicht der Zahnkrone und liegt dem Dentin auf. Im Inneren des Zahnes befindet sich die Zahnpulpa in der sich Nerven und Blutgefäße befinden. Der Zahnschmelz besteht zu 95% aus anorganischen Verbindungen wobei Hydroxylapatit den größten Anteil ausmacht. Nur zu 1% besteht der Schmelz aus organischer Matrix und zu 4% aus Wasser (Schroeder 2000).

Der Zahnschmelz ist ein kristallines Gefüge und besteht aus Kristalliten. Zu Beginn der Schmelzbildung liegen sich die schmelzbildenden Zellen, die Ameloblasten und die Odontoblasten, direkt gegenüber. Getrennt voneinander werden sie durch eine Membran, die Membrana preaformativa (Lüllmann-Rauch 2009) (Abb.5).

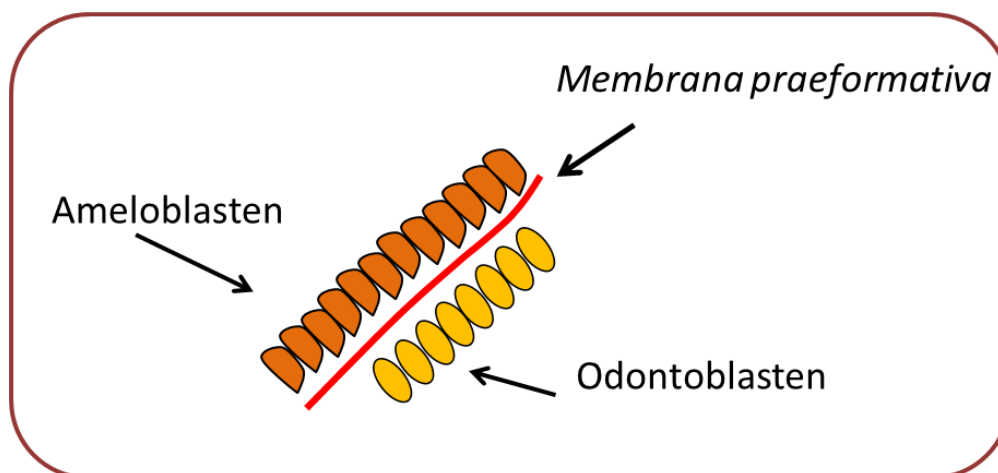


Abbildung 5: Am Anfang der Schmelz- und Dentinbildung liegen sich Odontoblasten und Ameloblasten noch getrennt durch eine Membran direkt gegenüber.

Die Bildung des Zahnschmelzes beginnt mit einer Sekretionsphase. Die Ameloblasten bilden einen Fortsatz aus, den Tomes-Fortsatz und produzieren eine Schmelzmatrix (Abb.6). Bei diesem Prozess entfernen sich die Ameloblasten von der Schmelz-Dentin-Grenze.

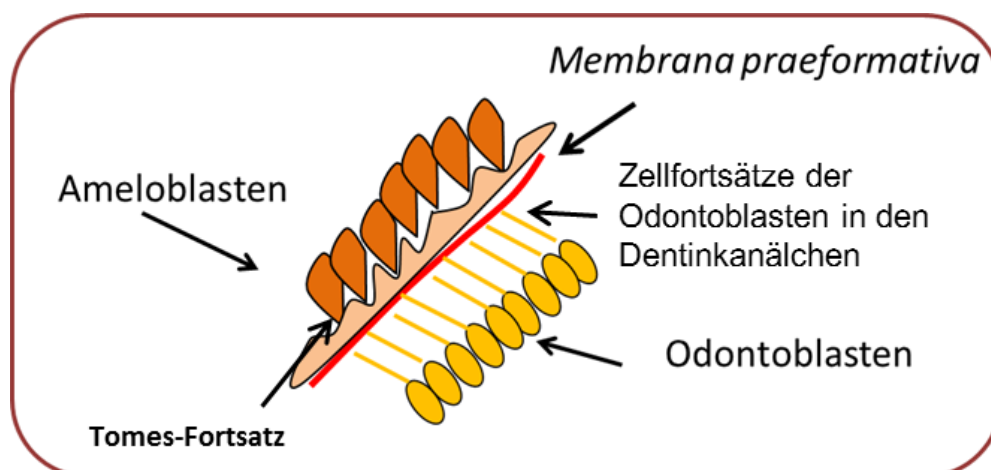


Abbildung 6: In der sekretorischen Phase produzieren die Ameloblasten unter anderem Schmelzmatrix-Proteine und verändern ihre Form, dabei weichen sie von der Schmelz-Dentin-Grenze zurück.

Auf die Sekretionsphase folgt die Phase der Mineralisation mit der Bildung sogenannter Kristallisationskeime. Hierbei wirken die Schmelzmatrixproteine wie z.B. Enamelin und Amelogenin als Katalysatoren für die Kristallbildung (Lüllmann-Rauch, 2009). Die Ameloblasten werden zu resorbierenden Ameloblasten und sezernieren

Proteasen, die die Schmelzmatrix-Proteine spalten, während die Schmelzprismen an Umfang zunehmen. Die Schmelzbildung wird abgeschlossen, in dem Mineralien wie Calcium-, Phosphat- und Fluorid-Ionen aus dem Speichel in den Zahnschmelz eingelagert werden. Wenn die endgültige Dicke des Schmelzes erreicht ist, geht der Ameloblast an der Oberfläche des Zahnes verloren. Der Schmelz ist daher ein zellfreies Gewebe und besitzt nicht die Fähigkeit der Regeneration.

Die Bildung des Schmelzes ist dabei ein sehr komplexer Prozess, bei dem sowohl die Schmelzmatrixproteine wie Amelogenin, Tuftelin, Ameloblastin, Amelotin und Enamelin als auch Enzyme wie Kallikrein 4 und die Matrixmetalloproteinase 20 eine wichtige Rolle spielen (Crawford et al., 2007). Ist der Schmelz entweder hypoplastisch oder hypomineralisiert (Crawford et al., 2007) spricht man von AI und das ERS ist folglich nur eine von vielen möglichen genetischen Ursachen.

1.2.5 ***Ektope pathologische Verkalkungen***

Außerhalb von Knochen- und Zahngewebe wird das Ausfallen von Calciumsalzen im Interstitium unter physiologischen Bedingungen verhindert (siehe auch 1.2.3). Pathologische Verkalkungen treten z.B. im Rahmen einer Nephrocalcinose (NC) auf. Als eine NC bezeichnet man Verkalkungen im Nierenparenchym, das aus Cortex und Medulla besteht. Bekannt ist, dass 98% der Nephrocalcinosen in der Medulla auftreten (Sayer et al., 2004). Verkalkungen auf der Harnseite, d.h. in den Nierenkelchen und Nierenbecken führen zu Nierensteinen, diese sind im Gegensatz zur NC häufig früher symptomatisch (Boyce et al., 2013).

Vom filtrierten Calcium werden 98 % im Tubulussystem rückresorbiert (Dellow et al., 1998). Calcium verlässt das Lumen über das Tubulusepithel und wird dann basolateral wieder ins Gefäßsystem aufgenommen. Pathologische Veränderungen der Permeabilitäten für Calcium im Tubulussystem können Verkalkungen im Nierenparenchym begünstigen (Breiderhoff et al., 2012). In diesem Beispiel führt der Verlust des *Tight junction* Proteins Claudin 10 im aufsteigenden Teil der Henle Schleife zu einer massiv gesteigerten Calcium Rückresorption im Bereich des Marks mit ausgeprägten interstitiellen Verkalkungen.

Die extrazelluläre Calciumaktivität wird durch Hormone wie das Parathormon sehr genau reguliert. Bei endokrinen Störungen, wie z.B. beim primären

Hyperparathyreoidismus sind betroffene Patienten prädestiniert für eine NC, da höhere Mengen an Parathormon zu einer Hyperkalzämie führen können (Bandeira et al., 2014, de Arruda et al., 2014).

Der tubuläre pH-Wert ist ein sehr wichtiger Faktor. Gerät dieser wie bei einer renal-tubulären Azidose aus dem Gleichgewicht kann es ebenfalls zu einer Nephrocalcinose kommen. Bei der distalen renal-tubulären Azidose ist dies der Fall, weil zu wenig H^+ Ionen ausgeschieden werden und es zu einer Demineralisation des Knochens mit einer Hypercalciurie kommt. Eine unzureichende Pufferung im Tubulus kann somit auch pathologische ektope Calcifizierungen begünstigen (Pereira et al., 2009).

Zu Veränderungen der interstitiellen Pufferkapazität, d.h. Änderung der Konzentration und Komposition interstitieller Makromoleküle, ist in diesem Zusammenhang jedoch bis jetzt relativ wenig bekannt.

1.3 Vorarbeiten und Zielsetzung der Arbeit

Vorarbeiten zum Expressionsprofil von Fam20a in der Niere ergaben ein sehr niedriges Expressionsniveau in der gesamten Niere. Abbildung 7A zeigt das Expressionsniveau im Vergleich zu Fam20b und c, standardisiert auf ein Vergleichsgen.

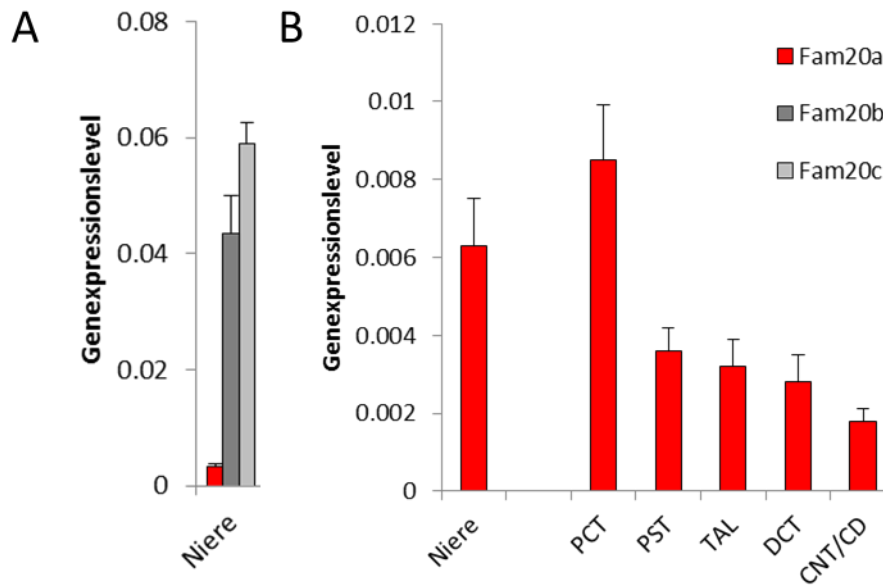


Abbildung 7: A Semiquantitative PCR. Genexpression von Fam20a, b und c in der Niere. Die Fam20a Expression ist vergleichsweise niedrig. **B** Genexpressionsanalyse entlang des Nierentubulus mit leicht stärkerer Genexpression im PCT. PCT, proximales Convolut; PST, dicker absteigender Ast der Henle-Schleife; TAL, dicker aufsteigender Ast der Henle-Schleife; DCT, distales Convolut; CNT/CS, Verbindungstubulus und Sammelrohr.

Bei genauerer Analyse von Fam20a, standardisiert auf ein ebenfalls sehr niedrig exprimiertes Vergleichsgen (Abbildung 7B), ergab sich eine leicht höhere Expression im proximalen Tubulus entlang des Nephrons. Zusätzlich ließ sich Fam20a mRNA auch im vaskulär-interstitiellen Kompartiment der Niere nachweisen (nicht abgebildet).

In der vorliegenden Arbeit wurden auf Grund der proximal tubulären Expression deshalb zwei gentechnisch veränderte Linien der etablierten renalen Zellkultur-Linie LLC-PK₁ untersucht, die uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Robert Kleta (Nephrology, University College London, GB) zur Verfügung gestellt wurde. Bei den LLC-PK₁ Zellen (ATCC®CL-101™) handelt es sich ursprünglich um proximale Tubuluszellen vom Schwein.

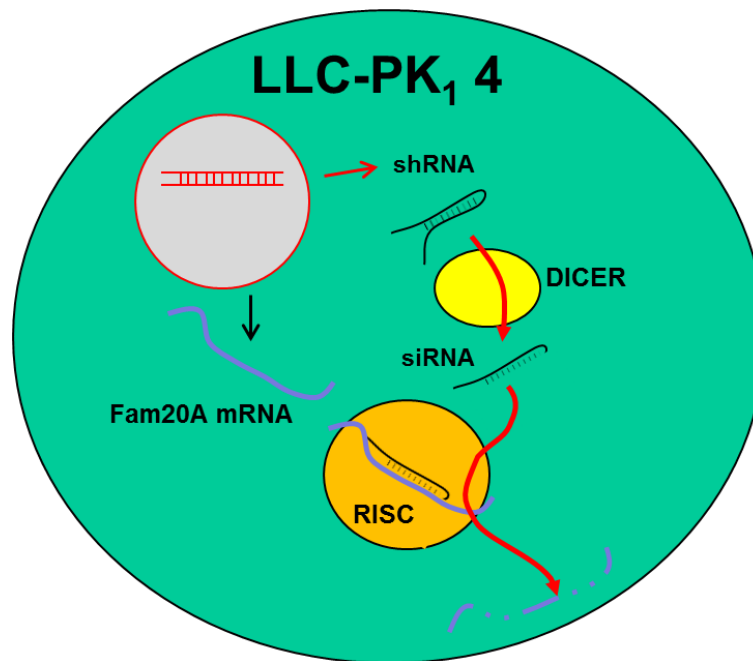


Abbildung 8: Fam20a Knockdown in der LLC-PK₁ Linie Nummer 4: Die Fam20a spezifische small hairpin RNA (shRNA) wird am DICER Komplex zur reifen small interference RNA (siRNA) prozessiert und führt am RISC Komplex zur Degradierung der Fam20a mRNA, die so der Translation nicht mehr zur Verfügung steht.

Bei der im Folgenden als Linie 4 bezeichneten Kultur handelt es sich um eine stabil transfizierte sogenannte Fam20a-Knockdown-Zelllinie (Abb.7) mit gegen Fam20a mRNA gerichteter small interference RNA (siRNA) Die im Folgenden als Linie 1 bezeichnete Kultur wurde mit nicht spezifischen siRNA-Sequenzen transfiziert und diente als Kontrolle.

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung und Funktion von Fam20a für die Calciumaktivität und die Calciumkonzentration in der extrazellulären Matrix am LLC-PK₁-Zellkulturmodell untersucht werden.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- Gibt es Unterschiede zwischen den LLC-PK₁-Zellkultur-Linien 1 und 4 in Bezug auf den scheinbaren Calciumaktivitätskoeffizienten?
- Beeinflussen Chondroitinsulfate den scheinbaren Calciumaktivitätskoeffizienten?
- Welche Auswirkungen hat eine enzymatische Spaltung der Chondroitinsulfate durch Chondroitinase ABC?

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Firma
Autoklav (Systec V95)	Systec GmbH, Labor-Systemtechnik, Wettenberg, D
Dri-Ref Elektrode (Referenz)	World Precision Instruments, Sarasota, USA
Gasbrenner nach Teclu mit Hahn und Sparflamme (#1393/1)	Hecht-Assistent, Sondheim, D
Magnetrührer (IKA-Combi MAG RCT)	IKA, Staufen, D
Flammenphotometer	Eppendorf, Hamburg, D
Heizblock, Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg, D
Kwik-Tip Calcium Elektrode	World Precision Instruments, Sarasota, USA
Kombischüttler KI-2	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, D

Tabelle 2: Geräte und Verbrauchsmaterialien mit Angabe der Firma.

Geräte für die Zellkultur	Firma
Mikroskop (Olympus CK2)	Olympus, Tokio, J
pH-Meter	Schott-Instruments, Mainz, D
Heracell CO ₂ Inkubator	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Infrarot CO ₂ Gastester CD98	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Sterilbank (Hera safe, Typ HS 18)	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Wasserbad (Sonoprex Super RK 103H)	PCE Deutschland GmbH, Meschede, D
Zentrifugen (Biofuge vito und Labofuge 400R)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D

Tabelle 3: Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur mit Angabe der Firma.

Alle Verbrauchsmaterialien und Chemikalien, die nicht speziell aufgelistet wurden, sind von den Firmen Sigma-Aldrich, Sarstedt, GE-Healthcare oder Merck bezogen worden.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von LLC-PK₁ Zelllinien

Die LLC-PK₁-Zelllinien wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) bei 37°C, 5% CO₂ Atmosphäre und Wasserdampfsättigung in Kulturflaschen kultiviert. Dem Medium war zusätzlich 8% fetales Kälberserum (FCS Gold), 2 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml) zugesetzt. Um den Selektionsdruck in den permanent transfizierten Kulturen aufrecht zu erhalten, enthielt das Medium zusätzlich das Antibiotikum Puromycin (3 µg/ml). Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

Bei Erreichen von 80% Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das Medium entfernt und für weitere Versuche aufbewahrt. Die Zellen wurden 2-3-mal mit PBS (NaCl 139 mM), Na₂HPO₄ (8,2 mM), KCL (2,7 mM), KH₂PO₄ (1,5 mM), pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurde auf 37°C vorgewärmte Accutase auf die Zellen (3 ml/Kulturflasche) pipettiert und die Flaschen wurden für 25 min zurück in den Brutschrank gestellt. Dann wurde 10 ml PBS hinzugegeben und die Zellen durch Pipettieren und Schwenken von der Plastikoberfläche gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1000 U/min (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden mit 1 ml auf 37°C vorgewärmtem Medium resuspendiert und in einer Dichte von 200.000 Zellen/75 cm² der Flasche ausgesät. Alle Arbeitsschritte mit den Zellkulturen und den Zellkulturmedien wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

2.2.2 Kryokonservierung und Rekultivierung

Zum Einfrieren von Zellmaterial wurde ein Teil der beim Passagieren gewonnenen Zellen mit 0,75 ml Medium mit 20% DMSO versetzt und anschließend in einem Einfriergefäß bei -80°C stehend und schonend eingefroren. Nach einem Tag wurden

die so konservierten Zellen dann in die Gasphase eines flüssigen Stickstofftanks zur Dauerlagerung überführt.

Zum Auftauen der in flüssigem Stickstoff gelagerten LLC-PK₁-Zelllinien 1 und 4 wurden die Zellen langsam auf Raumtemperatur aufgetaut. Durch wiederholte Waschschrte mit Medium wurde das Einfriermedium entfernt. Hierzu wurden die Zellen zweimal in 10 ml Medium resuspendiert und anschließend mit 1000 U/min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Nach dem zweiten Waschschrte wurde das Zellpellet in warmem Medium resuspendiert und die Zellen wurden, wie unter Abschnitt 2.2.1 beschrieben, ausgesät. Erst nach mindestens einer weiteren Zellpassage wurde das Material für Versuche verwendet.

2.3 Kontrolle der Knockdown- Effizienz

Die Expressionsrate von FAM20a bei den LLC-PK₁-Zelllinien 1 und 4, d.h. die siRNA- Effizienz, wurde mit einer semiquantitativen PCR überprüft. Die Vorbereitung des Materials bis zur Generierung der cDNA wurde in Kiel durchgeführt. Dann wurde die cDNA nach London geschickt und die semiquantitative PCR wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Robert Kleta durchgeführt.

2.3.1 RNA Isolierung

Ein Teil der beim Passagieren gewonnenen Zellen wurde nach der Resuspension durch Zentrifugation pelletiert und bis zur weiteren Aufbereitung in flüssigem Stickstoff weggefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, NL) nach Angaben des Herstellers und soll hier nur in gekürzter Form beschrieben werden. Die Zellen wurden in den dafür vorgesehenen, mit β - Mercaptoethanol versehenen Puffer resuspendiert und lysiert. Die Zellrückstände wurden anschließend durch Zentrifugation entfernt und die RNA in Anwesenheit von 50% Ethanol an eine Säule (Wasserstoffbrückenbindung zwischen RNA und Silikagelmembran) gebunden.

Nun folgten mehrere Waschschrte mit den im RNeasy Mini Kit enthaltenen Puffern. Anschließend wurde die gereinigte RNA mit dem Hinzufügen von RNA-se freiem

Wasser unter Zentrifugation bei 10.000 U/min für 1 min eluiert. Die Lagerung der RNA bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte auf Eis.

Mit dem Nanodrop-Spektrophotometer erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration.

2.3.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde der Quiagen Quantitect RT Kit nach Angaben des Herstellers verwendet und die einzelnen Schritte sind hier kurz beschrieben. Durch die Zugabe von Wipeout-Puffer für 2 min bei 42°C wurde die eventuell vorhandene genomische DNA entfernt. Mit Hilfe reverser Transkriptase (RT) und den entsprechenden Puffern und Primern wurde die RNA in sogenannte copy-DNA (cDNA) überführt, die Enzyme anschließend hitzeinaktiviert und die cDNA bis zum Versand nach London bei -80°C gelagert.

2.4 Messung der absoluten Calciumkonzentration mittels Flammenphotometrie

Bei der Flammenphotometrie werden die Proben in eine nicht leuchtende Flamme geleitet und ein Teil der Metallionen wird hierbei in einen angeregten Zustand versetzt. Bei Rückkehr in den Grundzustand wird Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Die Intensität ist dabei proportional zur Menge der Metallionen. Das Licht trifft auf eine Photodiode, die das optische Signal in ein elektrisches umwandelt. Die Calcium-Ionen werden bei einer Wellenlänge von 622 nm gemessen.

Für die Ermittlung der absoluten Kalium-, Natrium- und Calciumkonzentrationen wurde ein Flammenphotometer mit Acetylen als Brenngas verwendet und mit Hilfe eines Lithiumstandards kalibriert. Es wurden Doppelbestimmungen in jeweils 100 µl Probenvolumen durchgeführt.

2.5 Messung der Calciumaktivität mittels Calcium-selektiver Elektrode

2.5.1 *Aufbau der Messapparatur*

Es wurde die Kwik-Tip Elektrode der Firma WPI verwendet. Der calcium-selektive Teil der Elektrode besteht aus einer dünnen PVC-Membran, die einen Calcium-Ionenaustauscher enthält und sich am Ende eines ca. 2 mm dicken, flexiblen Plastikröhrchens befindet. Das Innere dieser Elektrode ist mit 2 M CaCl_2 Lösung gefüllt. Ein feiner, chlorierter Silberdraht ist in diese Lösung getaucht und erlaubt die elektrische Verbindung zum Verstärker. Als Referenzelektrode diente die Dri-Ref Elektrode, ebenfalls von WPI.

Beide Elektroden wurden an einen Verstärker (Eigenbau Physiologisches Institut) angeschlossen. Ein Papierschreiber zeichnete die Spannungsunterschiede zwischen der Calcium-selektiven Elektrode und der Referenzelektrode mit 2,5 mV/cm und 0,2 mm/s auf.

Die Calciumaktivität ist, zusätzlich zur Abhängigkeit der Ionenstärke und dem Proteingehalt der Lösung, abhängig von der Temperatur und vom pH-Wert. Die zu messende Probe wurde deshalb mit Hilfe einer durch ein Wasserbad und eine durch ein Schlauchsystem ermöglichten Wasserummantelung auf 37°C erwärmt und die Temperatur wurde während der Messung überprüft. Außerdem wurde die Probe mit vorher wasserdampfgesättigtem und auf 37°C erhitztem CO_2 (5%) begast und der pH-Wert wurde mit einem pH-Meter kontrolliert.

2.5.2 *Physiologische Grundlagen und Berechnung*

Das Potenzial, das sich bei gegebenen Ca^{2+} -Aktivitäten über die Calcium-selektive Elektrode ausbildete und auf Schreiberpapier aufgezeichnet wurde, lässt sich mit der Nernst-Gleichung beschreiben (Formel 1).

Formel 1:

$$E = \frac{R * T}{z * F} * \ln \frac{[Ca^{2+}]_{lsg}}{[Ca^{2+}]_{el}}$$

R = universale Gaskonstante, $8,31 \text{ J} * \text{K}^{-1} * \text{mol}^{-1}$
 T = absolute Temperatur, 310 K bei 37°C
 F = Faraday Konstante $9,6584 * 10^4 \text{ C} * \text{mol}^{-1}$
 Z = Ladung des Ions (hier +2)
 $[Ca^{2+}]_{el}$ = Calciumaktivität in der Elektrode
 $[Ca^{2+}]_{lsg}$ = Calciumaktivität in der zu messenden Lösung

Bei der Änderung der Calciumaktivität um den Faktor 10 (z.B. von 0,5 M auf 5 M) ändert sich das Potenzial der Elektrode um +30,77 mV bei einer Temperatur von 37°C. Diese Potenzialänderung der Elektrode in mV pro Dekade Konzentrationsunterschied beschreibt die Steigung der entsprechenden Konzentrations/Spannungs-Beziehung der Elektrode und soll hier Englisch als *slope* (Formel 2) bezeichnet werden. Er beschreibt die Qualität der Elektrode und der Messbedingungen.

Formel 2:

$$slope [in Volt] = \frac{R * T}{z * F} * 2,3$$

Zur Kalibrierung der Elektrode dienen Lösungen mit einer Dekade Aktivitätsunterschied um den *slope* einfach ablesen zu können z.B. 0,5 mM Calcium und 5 mM Calcium. Die eingesetzte absolute Calciumkonzentration sowie die zugrundeliegende Ionenstärke (Formel 3) der Kalibrierungslösung wurden berechnet

und flammenphotometrisch verifiziert. Die Ionenstärke definiert sich über die Ladungszahl der Ionen und über ihre Konzentrationen.

Formel 3:

$$I = \frac{1}{2} * \sum ci * Zi^2$$

I = Ionenstärke C_i = Ionenkonzentration Z_i = Ladungszahl der Ionen
--

Die Aktivitätskoeffizienten bzw. Aktivitäten wurden aus diesen Angaben für die aktuell verwendeten Kalibrierungslösungen dann entsprechend errechnet. Formel 4 zeigt die Berechnung des Logarithmus zur Basis 10 des Aktivitätskoeffizienten γ_i .

Formel 4:

$$\lg(\gamma_i) = -\frac{A * (Z_i)^2 * \sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}}$$

$A = 0,509 \text{ kg}^{1/2} \text{ mol}^{-1/2}$ wenn Wasser bei 25°C als Lösungsmittel verwendet wurde Z_i = Ladungszahl der Ionen I = Ionenstärke γ_i = Aktivitätskoeffizient

Der Faktor A in der Formel 4 ist sowohl von der Temperatur als auch von der Art des Lösungsmittels abhängig. Diese Abhängigkeit von der Temperatur muss in die Formel 4 mit einbezogen werden, der Vorfaktor A ist nur bei 25°C gültig. Bei

abweichenden Temperaturen oder anderen Lösungsmitteln muss der Vorfaktor A nach Formel 5 neu errechnet werden.

Formel 5:

$$A = \left(\sqrt{\frac{e^2}{4 * \varepsilon * k_B * T}} \right)^3 * \frac{\sqrt{2} N_A}{\pi * \ln 10}$$

e = Elementarladung
 T = Temperatur
 k_B = Boltzmannkonstante
 ε = Permittivität des Lösungsmittels
 N_A = Avogadro-Konstante

Nach dem Messen der Kalibrierlösungen konnte der Abstand der Messpunkte auf dem Schreiberpapier gemessen und der *slope* einfach abgelesen werden. Formel 6 verdeutlicht den Zusammenhang.

Formel 6:

$$E^{5''} - E^{0,5''} = slope * \lg \left(\frac{[Ca^{2+}]^{5''}}{[Ca^{2+}]^{0,5''}} \right)$$

Um die Calciumaktivität in einer Probe zu bestimmen, wurde der Abstand von dem Potenzial der Kalibrierlösung mit der höheren Calciumaktivität zum Potenzial der Probe gemessen.

$$\text{Formel 7-1: } E^{5''} - E^{probe''} = slope * \lg \left(\frac{[Ca^{2+}]^{5''}}{[Ca^{2+}]^{probe}} \right)$$

$$\text{Formel 7-2: } \lg([Ca^{2+}]^{probe}) = \lg([Ca^{2+}]^{5''}) - \frac{E^{5''} - E^{probe''}}{slope}$$

$$\text{Formel 7-3: } [Ca^{2+}]^{probe} = 10^{\left(\lg[Ca^{2+}]^{5''} - \frac{E^{5''} - E^{probe''}}{slope} \right)}$$

Nach dem Errechnen der Calciumaktivität (Formel 7-1 – 7-3) in der Probe wurde der scheinbare Aktivitätskoeffizient der Lösungen berechnet. Der Aktivitätskoeffizient ergab sich aus der Division von der mittels Elektrode gemessenen Calciumaktivität durch die flammenphotometrisch bestimmte Calciumkonzentration.

Verwendung fanden nur Elektroden bzw. Messungen mit einem *slope* zwischen 25 mV und 33 mV.

2.5.3 Versuchsdurchführung

Zuerst erfolgten die Messungen der Kalibrierlösungen und dann die der einzelnen Proben. Hierbei wurde darauf geachtet, Proben der Zelllinien 1 und 4 immer im Wechsel zu untersuchen. Nach ca. 4-5 Proben wurden erneut die Kalibrierlösungen gemessen und damit die Elektrode überprüft. Während der Messung erfolgte die Kontrolle des pH-Wertes und der Temperatur. Außerdem versetzte ein Magnetrührer das Medium konstant in Bewegung.

2.5.3.1 Versuch mit Zugabe von Chondroitinsulfat

Es wurde Zellkulturmedium (DMEM mit FCS) ohne vorherigen Zellkontakt verwendet. Von einer angesetzten Stammlösung mit 10 mg/ml Chondroitinsulfat wurden Medienproben mit den Konzentrationen 33 µg/ml, 100 µg/ml, 330 µg/ml und 500 µg/ml angesetzt und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ äquilibriert. Am nächsten Tag erfolgten die Messungen der Calciumaktivitäten mit der Calcium-Elektrode und die Bestimmungen der Calciumkonzentration mit dem Flammenphotometer.

2.5.3.2 Versuch mit Zugabe von Chondroitinase

Es wurde eine Stammlösung mit 5 U/ml von der Chondroitinase ABC (*Proteus vulgaris*) angesetzt.

Verwendung fanden die, wie unter 2.2 beschrieben, aufbewahrten Zellkulturüberstände, diese wurden mit Chondroitinase ABC mit 50 mU/ml Endkonzentration versetzt. Für den enzymatischen Verdau lagerten die Überstände erneut für 1-2 Stunden im Brutschrank. Anschließend konnten die Calciumaktivitäten mit der Calcium-Elektrode und die Calciumkonzentrationen mit dem Flammenphotometer bestimmt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Fam20a Expression in den Zelllinien

Die Effizienz des Fam20a Knockdowns wurde mit Hilfe der semiquantitativen PCR untersucht. Das Fam20a Expressionsniveau war in der Zelllinie 4 um ca. 70% niedriger als in Zelllinie 1. (Abb. 9)

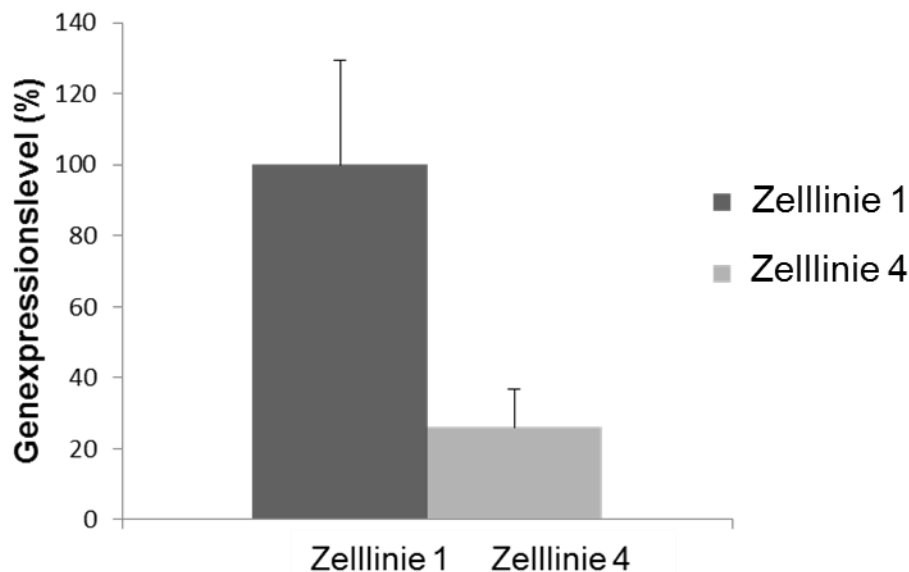


Abbildung 9 zeigt die Expression von Fam20a in den LLC-PK₁ Zellen. Die PCR wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Robert Kleta in London durchgeführt.

3.2 Calciumaktivität und Calciumkonzentration in Zellkulturüberständen

Die Verwendung einer Calcium-Elektrode ermöglichte die Untersuchung der freien Calcium-Ionen unter kontrollierten Bedingungen bei 37°C und einer Begasung mit wasserdampfgesättigtem CO₂ (5%). Bei den gleichen Proben erfolgte die Bestimmung der Calciumkonzentration im Flammenphotometer und die scheinbaren Calciumaktivitätskoeffizienten wurden berechnet.

Zellkulturüberstände der LLC-PK₁ Zelllinien 1 und 4 nach 3-4 Tagen in Kultur wurden in Bezug auf die Calciumaktivität, die Calciumkonzentration und den Calciumaktivitätskoeffizienten untersucht.

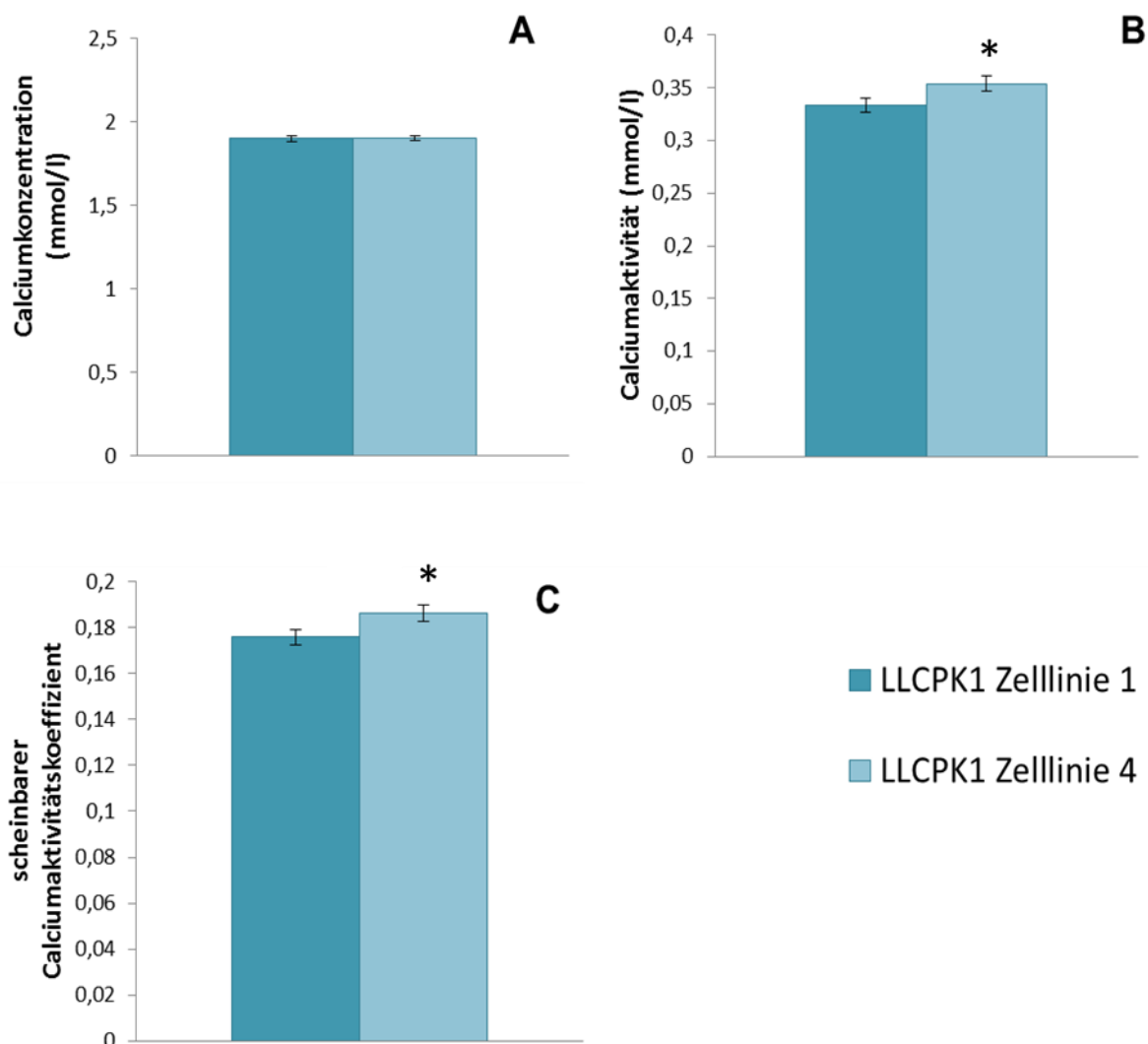


Abbildung 10: **A** Calciumkonzentrationen in den Zellkulturüberständen der LLC-PK₁ Zelllinien 1 und 4 bei 37°C und wasserdampfgesättigtem 5% CO₂. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien 1 und 4. (n=42) **B** Calciumaktivitäten der Zellkulturüberstände der LLC-PK₁ Zelllinien 1 und 4. Zelllinie 4 zeigte hier eine leichte Erhöhung im ional vorliegenden Calcium. **C** Scheinbare Calciumaktivitätskoeffizienten der Zellkulturüberstände der LLC-PK₁-Zelllinien 1 und 4. Es zeigte sich, dass der scheinbare Calciumaktivitätskoeffizient bei den Überständen der Zelllinie 4 höher war als bei der Zelllinie 1 *, p<0,05, n=42, 42.

Bei den Calciumkonzentrationen zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien ($1,9 \pm 0,016$ mM bei der Zelllinie 1 vs. $1,9 \pm 0,015$ mM bei der Zelllinie 4).

Die Calciumaktivitäten hingegen unterschieden sich signifikant zwischen den LLC-PK₁ Zelllinien 1 und 4 ($0,33 \pm 0,007$ mM bei der Zelllinie 1 vs. $0,35 \pm 0,007$ mM bei der Zelllinie 4)

Der aus diesen beiden Messungen berechnete scheinbare Calciumaktivitätskoeffizienten war bei der Zelllinie 4 entsprechend signifikant höher als bei der Zelllinie 1 ($0,18 \pm 0,003$ bei der Zelllinie 1 vs. $0,19 \pm 0,004$ bei der Zelllinie 4). Die verminderte FAM20A Expression führte im Zellkulturmodell somit zu höheren Calciumaktivitäten und scheinbaren Calciumaktivitätskoeffizienten im extrazellulären Medium der Zelllinie nach mehreren Tagen Kultur.

3.3 Calciumpufferkapazität

Um die Calciumpuffereigenschaften der Zellkulturüberstände zu untersuchen, wurde den Überständen nachträglich, d.h. nach Zellkontakt, aber nicht während der Kultur, höhere CaCl₂ Konzentrationen zugesetzt und die Calciumkonzentration und die Calciumaktivität bestimmt.

In Abbildung 10 sind die entsprechenden scheinbaren Calciumaktivitätskoeffizienten zu den nominellen jeweils zugegebenen Calciumkonzentrationen in Bezug gesetzt. Der Unterschied im scheinbaren Calciumaktivitätskoeffizienten zwischen den Überständen der Zelllinien 1 und 4 blieb nach der Erhöhung um 3 mM Calcium weiter bestehen. Hingegen glichen sich die scheinbaren Calciumaktivitätskoeffizienten nach der Erhöhung um 6, 9 und 12 mM Calcium einander an, d.h. die Calciumpufferkapazität war sättigbar. Da die Zugabe von CaCl₂ die Ionenstärke der Überstände erhöhte, nahmen die Koeffizienten insgesamt ab.

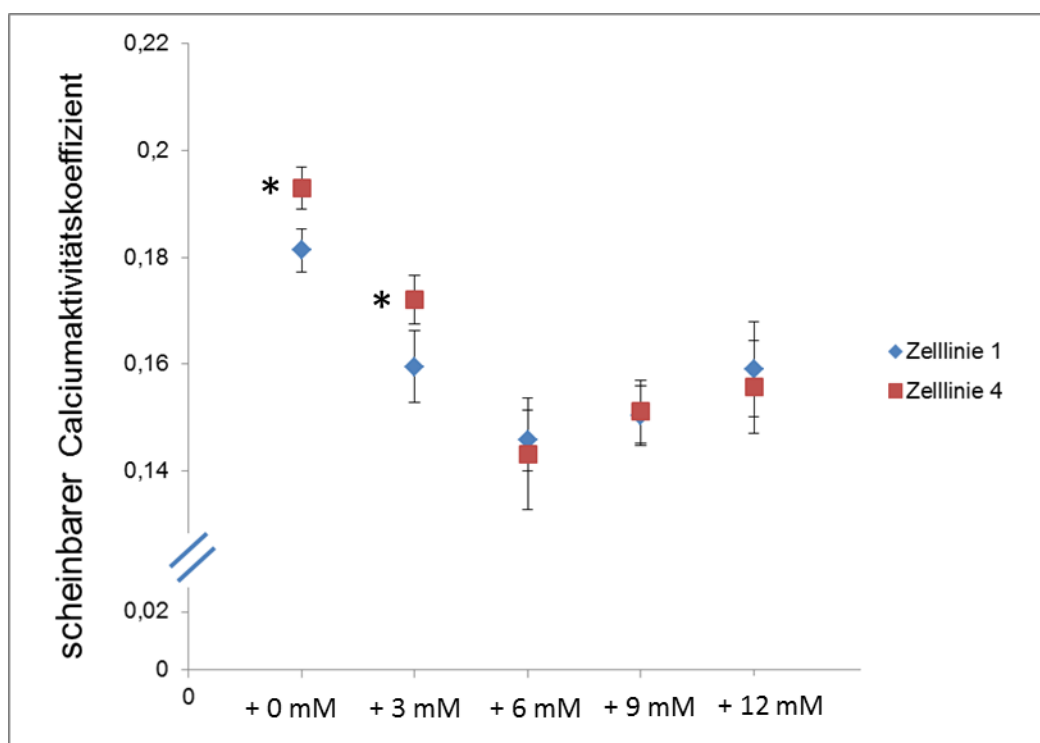


Abbildung 11 zeigt die Veränderung des Calciumaktivitätskoeffizienten bei der Erhöhung um verschiedene CaCl_2 Konzentrationen. Es zeigten sich signifikante Unterschiede bei „+0 mM“ und bei „+3 mM“, diese wurde mit Sternchen gezeichnet. („+0 mM“ n= 11/13, „+3 mM“ n= 11/11, „+6 mM“ n= 9/10, „+9 mM“ n= 10/10, „+12 mM“ n= 9/9) $p < 0,05$

3.4 Einfluss von Chondroitinsulfat A auf den Aktivitätskoeffizienten

Als Bestandteil von Proteoglykanen sind Chondroitinsulfate ein großer Teil der extrazellulären Matrix. Es sollte experimentell untersucht werden ob Chondroitinsulfat A (Chondroitin-4-sulfat) im Zellkulturmedium in der Lage ist, die freie Calciumkonzentration zu beeinflussen.

Zellkulturmedium ohne vorherigen Zellkontakt wurde in fünf unterschiedlichen Gruppen mit jeweils n=5 betrachtet. Die Gruppen unterschieden sich in ihrer Chondroitinsulfat-A-Konzentration. Die Chondroitinsulfat-A-Konzentration beim reinen Zellkulturmedium wurde mit Null angenommen. Bei den anderen Gruppen wurde Chondroitinsulfat-A mit Konzentrationen von 33 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 330 $\mu\text{g/ml}$ und 500 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt.

Bei den Calciumkonzentrationen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (1,86±0,02 mM bei [0 µg/ml] vs. 1,81±0,03 mM bei [500 µg/ml]) (Abb.12).

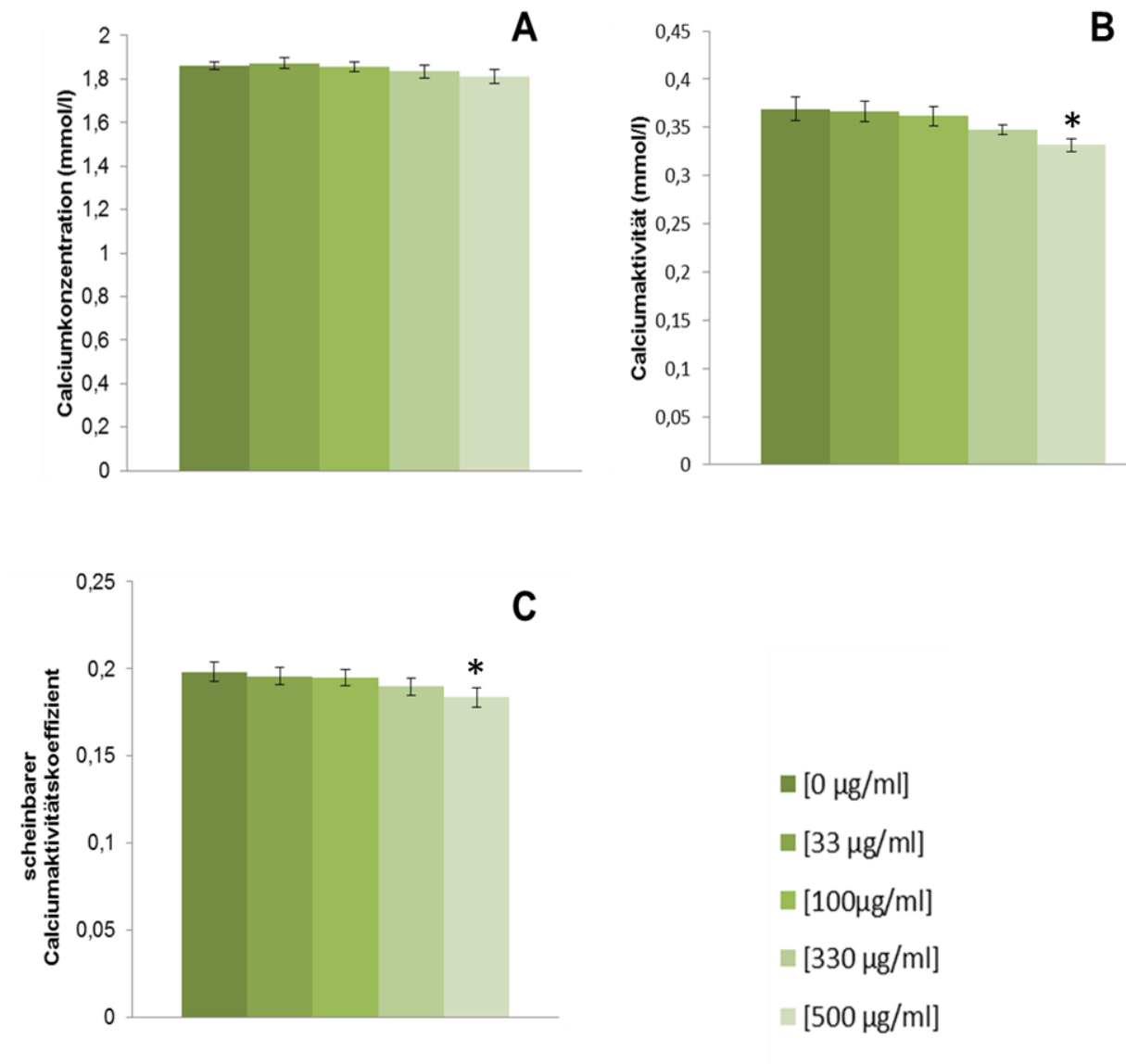


Abbildung 12: **A** Calciumkonzentration in Zellkulturmedium nach der Zugabe von Chondroitinsulfat-A. **B** Calciumaktivitäten. Nur nach Zugabe der höchsten Chondroitinsulfat-A –Konzentration war ein signifikanter Abfall der Aktivität nachweisbar. **C** Der scheinbare Calciumaktivitätskoeffizient war beim reinen Medium entsprechend höher als bei dem Medium mit der höchsten Chondroitinsulfat-A-Konzentration, *, $p < 0,05$, $n = 5$.

Bei den Calciumaktivitäten zeigte sich nur ein signifikanter Unterschied zwischen dem reinen Zellkulturmedium und dem Zellkulturmedium, das mit der höchsten Chondroitinsulfat-A-Konzentration von 500 µg/ml versetzt worden war (0,37±0,01 mM bei [0 µg/ml] vs. 0,33±0,01 mM bei [500 µg/ml]) (Abb 12).

Beim reinen Zellkulturmedium lag der Mittelwert der scheinbaren Calciumaktivitätskoeffizienten bei $0,20 \pm 0,01$, dies war signifikant höher als bei den scheinbaren Calciumaktivitätskoeffizienten der Zellkulturmedien mit einer Chondroitinsulfat-A-Konzentration von $500 \mu\text{g/ml}$. Hier lag der scheinbare Calciumaktivitätskoeffizient bei $0,18 \pm 0,01$.

Insgesamt war der Einfluss von Chondroitinsulfat-A nach Zugabe zum Zellkulturmedium unter diesen Bedingungen sehr gering.

3.5 Einfluss von Chondroitinase ABC (*Proteus vulgaris*) auf den scheinbaren Calciumaktivitätskoeffizienten

In diesem Versuch wurde überprüft, ob der Unterschied in der Calciumpufferfunktion der Kulturen 1 und 4 durch die unterschiedliche Chondroitinsulfatzusammensetzung des Überstandes begründet war, demgemäß ob die Zellen Chondroitinsulfate in unterschiedlicher Weise sekretieren und inwiefern dies enzymatisch beeinflusst werden kann. Hierzu wurde das vorhandene, gegebenenfalls modifizierte Chondroitin-Sulfat enzymatisch abgebaut. Chondroitinase ABC (*Proteus vulgaris*) spaltet die Polysaccharide Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat und Dermatan-sulfat.

Die Überstände der jeweiligen Zellkulturflaschen der beiden Zelllinien wurden halbiert und einer Hälfte wurde jeweils das Enzym Chondroitinase ABC zugefügt und in den parallel untersuchten Ansätzen anschließend die Konzentrationen bestimmt.

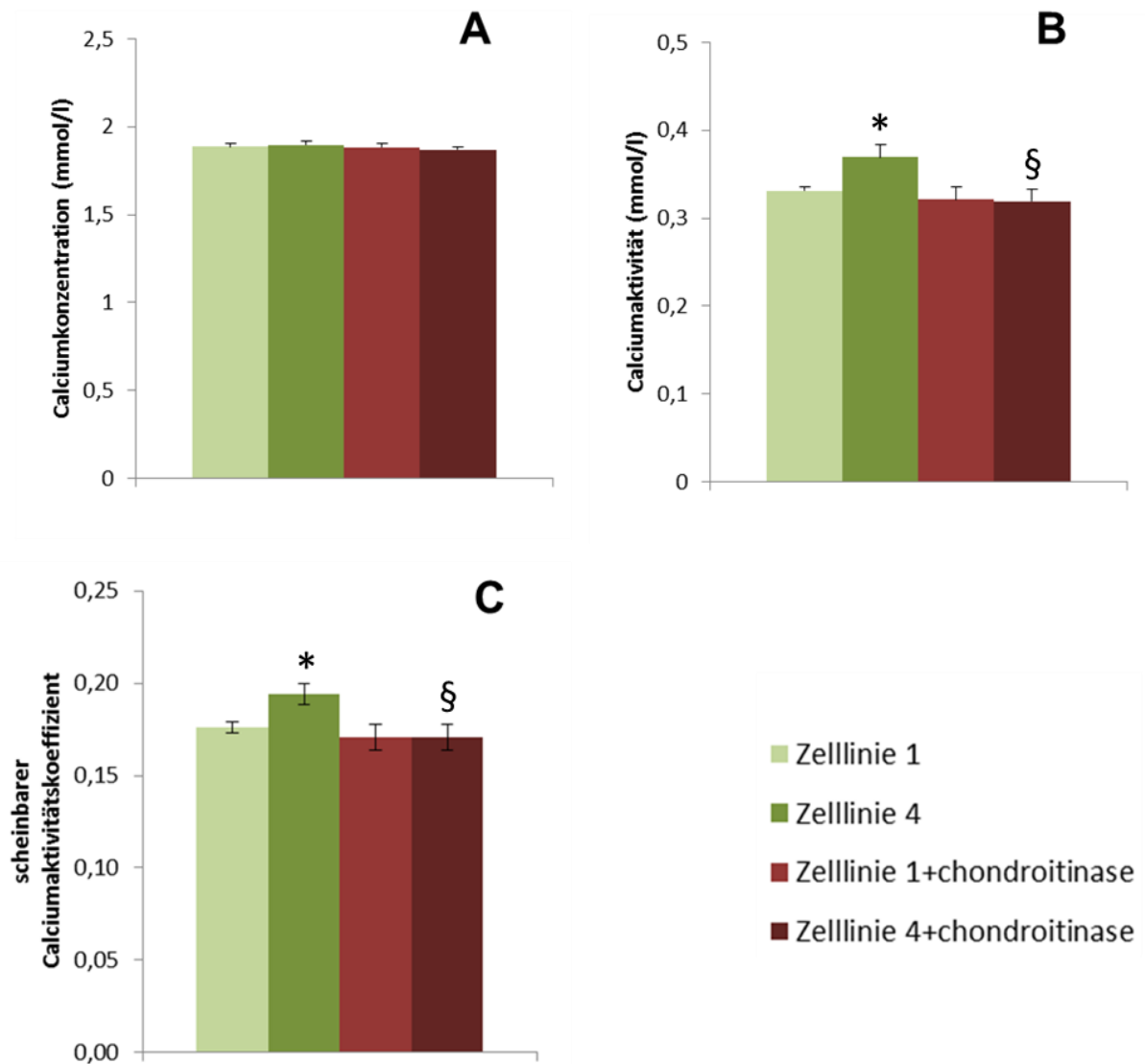


Abbildung 13: A Calciumkonzentrationen mit und ohne die Zugabe von Chondroitinase. **B** Calciumaktivitäten mit und ohne Zugabe von Chondroitinase. Die leicht erhöhte Aktivität in unbehandelten Zellkulturüberständen der Zelllinie 1 konnte bestätigt werden. Nach der Zugabe des Enzyms befanden sich die Aktivitäten bei beiden Zelllinien auf dem Niveau von der Zelllinie 1. **C** zeigt die scheinbaren Calciumaktivitätskoeffizienten von den LLC-PK₁ Zelllinien 1 und 4 ohne Chondroitinase und nach der Zugabe des Enzyms. *, $p < 0,05$ Zelllinie 1 vs. 4; §, $p < 0,05$, unbehandelte vs. behandelte Überstände; $n = 6, 6, 6, 6$.

In der Calciumkonzentrationen zeigte sich kein Unterschied zwischen den LLC-PK₁ Zelllinien 1 und 4 ($1,89 \pm 0,02$ mM bei der Zelllinie 1 vs. $1,90 \pm 0,02$ mM bei der Zelllinie 4) (Abb. 13 A). Auch die Überstände, denen die Chondroitinase ABC hinzugefügt worden war, wiesen keine Unterschiede zwischen den zwei Zelllinien auf ($1,88 \pm 0,02$ mM bei der Zelllinie 1 vs. $1,87 \pm 0,02$ bei der Zelllinie 4) und keinen Unterschied zu den unbehandelten Überständen.

Die Untersuchung der Calciumaktivität in den Zellüberständen bestätigte die leichte Aktivitätserhöhung bei der Zelllinie 4 ($0,33 \pm 0,00$ mM bei der Zelllinie 1 vs. $0,37 \pm 0,01$ mM bei der Zelllinie 4). Durch die Zugabe von Chondroitinase ABC wurden die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien aufgehoben ($0,32 \pm 0,01$ mM bei der Zelllinie 1 mit Chondroitinase ABC vs. $0,32 \pm 0,01$ mM bei der Zelllinie 4 mit Chondroitinase ABC). Außerdem zeigten beide Zelllinien ähnliche Aktivitäten wie in den unbehandelten Zellkulturüberständen der Zelllinie 1 (Abb.13).

Beim Vergleich der scheinbaren Calciumaktivitätskoeffizienten der Zellkulturüberstände zwischen den beiden Zelllinien ergaben sich somit signifikante Unterschiede ($0,18 \pm 0,00$ bei der Zelllinie 1 vs. $0,19 \pm 0,01$ bei der Zelllinie 4). Nach Zugabe der Chondroitinase ABC befanden sich die Aktivitätskoeffizienten auf dem gleichen Niveau ($0,17 \pm 0,01$ bei der Zelllinie 1 vs. $0,17 \pm 0,01$ bei der Zelllinie 4).

4 Diskussion

4.1 Methodik

4.1.1 *Die Auswahl des „Modell-Gewebes“*

Hull et al. haben aus den Nierenzellen eines Ebers die Grundlage einer heute sehr gut charakterisierten Zelllinie geschaffen, der LLC-PK₁-Zelllinie (Gstraunthaler et al., 1985). Bei der Wahl eines „Modell-Gewebes“ stellt sich immer die Frage, ob die Zellen in der Zellkultur dem Gewebe im lebenden Organismus nahe kommen und zum Beispiel in der Lage sind, ein funktionsfähiges Epithel zu bilden (Prozialeck et al., 2006). Zu einem funktionsfähigen Epithel gehört auch die Ausbildung einer Diffusionsbarriere, die unter anderem durch *Tight junctions* (engl. dichte Verbindung) geschaffen wird. Als Maßeinheit der Dichtigkeit dieser Diffusionsbarriere kann der transepitheliale Widerstand (R_{te}) dienen. Sehr leckere Epithelien haben einen niedrigen R_{te} . Im proximalen Tubulus liegt der R_{te} im menschlichen Organismus in einer Größenordnung von 5 bis 12 Ωcm^2 ; dies ist relativ niedrig (Prozialeck et al., 2006).

Denise Rühmann aus unserer Arbeitsgruppe konnte beobachten, dass unsere LLC-PK₁ Zellen mit ca. 200-250 Ωcm^2 einen deutlich höheren R_{te} zeigen (unveröffentlichte Daten), also in diesem Punkt höhere Werte aufweisen als die Zellen im proximalen Tubulus bei Menschen. Allerdings haben Verkoelen et al. LLC-PK₁ Zellen für Untersuchungen von Transportvorgängen genutzt und diese zeigten ein ähnliches Verhalten in der Aufbereitung einer Primärharn-ähnlichen Lösung wie im menschlichen proximalen Tubulus (Verkoelen et al., 1999).

4.1.2 *Die Auswahl der Manipulation*

Zellkulturmodelle sind ein wichtiger Bestandteil der heutigen Grundlagenforschung. Grundsätzlich bietet eine Zellkultur die Möglichkeit kontrollierte Versuchsbedingungen und ausreichendes Material zu schaffen. Auch ist es möglich auf genetischer Ebene einzugreifen und Zelllinien zu generieren, die sich in bestimmten Eigenschaften unterscheiden. Dieser Eingriff kann zum Beispiel durch einen Gen-Knockdown (KD) erfolgen.

Für einen KD wird die Technik der RNA-Interferenz verwendet. Die entsprechende genetische Information für die *small interfering* RNA (siRNA, engl. kleine eingreifende RNA) wird mit einem Vektor in den Wirtsorganismus eingebracht. Heute ist eine RNA-Interferenz zu einer bedeutenden Möglichkeit geworden, um unter anderem in der Grundlagenforschung neue Erkenntnisse zu gewinnen (Grayson et al., 2006).

Durch eine siRNA wird die Expression von Genen gemindert. Gene können stillgelegt werden; dies wird auch als „Gen-silencing“ bezeichnet. Der Erfolg dieses KD ist sehr variabel, d.h. eine Restfunktion ist zu erwarten, hierbei gibt es verschiedene Komponenten die den Erfolg eines KD bestimmen; z.B. die Transfektionsbedingungen und die verwendete Zelllinie (Grayson et al., 2006). Dies führt dazu, dass die Wahl eines Knockdowns kein perfektes Modell schaffen kann. Wir haben deshalb in Zusammenarbeit mit unseren Kooperationspartnern die KD Effizienz in unserem Zellkulturmodell überprüft. Diese zeigte mit 30% Restexpression keinen optimalen, jedoch deutlichen Abfall der Fam20a Genexpression.

4.1.3 **Die Calcium-Elektrode**

In dieser Arbeit wurden Messungen mit einer Calcium-Elektrode als grundlegende Methode verwendet. Die Messungen sind hierbei methodisch (Alterung der ionenselektiven Membran, schlechte Durchmischung der Lösungen) und physikalisch (pH, Temperatur, (Moore 1970)) anfällig für Fehler. Beide Fehlerquellen wurden durch sorgfältige Kontrolle der physikalischen Parameter und durch Qualitätskontrolle der Elektrode sowie der Messbedingungen über die wiederholte Bestimmung des *slopes* weitestgehend minimiert.

4.2 Fam20a und extrazelluläre Ca²⁺-Pufferkapazität

4.2.1 **Was bedeutet eine erhöhte Calciumaktivität?**

Wir haben vermutet, dass das Protein Fam20a Calcifizierungsprozesse im extrazellulären Raum beeinflusst und die biologisch aktive Konzentration des Calciums verändert.

Thode et al. haben beobachtet, dass sich die Calciumaktivität im Urin von Patienten mit Nierensteinen nicht signifikant von der Calciumaktivität im Urin von Personen ohne Steinbildung unterscheidet, allerdings ist der pH-Wert im Urin bei den Patienten höher. Interessanter noch war der Befund, dass sich die Änderung der Calciumaktivität pro titrierter pH Einheit deutlich zwischen dem Urin der Patienten mit Nierensteinen und der gesunden Vergleichsgruppe unterschied, d.h. die Calcium Pufferkapazität verändert war (Thode et al., 1993). Allerdings muss an dieser Stelle zwischen der Entstehung von Nierensteinen und der Pathogenese einer NC beim ERS differenziert werden.

Primär geht es bei der hier untersuchten NC nicht direkt um Veränderungen im Urin, da für das ERS keine Hypercalciurie charakteristisch ist, sondern eher niedrigere Calcium-Werte im Urin beschrieben sind (Kala Vani et al., 2012). Außerdem sind primär auch keine Änderungen für den pH-Wert im Urin beschrieben worden (Dellow et al., 1998).

Beim ERS und Fam20a Mutationen kommt es wahrscheinlich im Interstitium zu Calciumpräzipitationen. In der Niere macht das Interstitium jedoch nur einen geringen Anteil aus (Lüllmann-Rauch 2009). D.h. wir unterschätzen wahrscheinlich den Effekt, den wir in unseren Versuchen beobachten konnten, da die Zellen in der Kulturflasche ein im Vergleich zur Zellmasse riesiges Kulturmediumvolumen verändern können, in der Niere jedoch nur die Calciumpufferkapazität des sehr begrenzten interstitiellen Raumes beeinflusst werden muss.

In der TAL (engl. *thick ascending limb*, dicke aufsteigende Schleife) wird der Ionentransport stark von den Eigenschaften des parazellulären Transports bestimmt (Breiderhoff et al., 2012). Breiderhoff et al. konnten mit Hilfe von Claudin 10 KO Mäusen zeigen, dass Claudin 10 die parazelluläre Natrium Permeabilität beeinflusst. Bei den Claudin 10 KO Mäusen hat sich die Natrium-Permeabilität vermindert und die relative Permeabilität von Calcium und Magnesium war erhöht. Bei diesen Mäusen kam es zu einer Hypermagnesiämie und einer NC. Das Fehlen eines *Tight junctions*-Proteins, in diesem Fall von Claudin 10, und der damit verbundene relative Anstieg der Magnesium- und Calcium-Permeabilität scheint zu pathologischen Calcifizierungen zu führen und lässt vermuten, dass schon der Anstieg der interstitiellen Calciumaktivität per se zu Präzipitation führen kann. Für an ERS

leidende Patienten ist, außer dass keine Hypercalciurie vorliegt, bis jetzt wenig über den tubulären Calciumtransport bekannt. Untersuchungen in einem Knock-out-Mausmodell sollen in Zukunft über diesen pathophysiologischen Aspekt weitere Erkenntnisse liefern.

4.2.2 *Auswirkung der Änderung der extrazellulären Calciumaktivität*

Veränderungen der extrazellulären Calcium-Konzentration, und damit der biologisch wirksamen Aktivität, beeinflussen verschiedene biologische Prozesse wie Sekretion, Neurotransmission und Kontraktionsprozesse im Muskel (Chang et al., 2008).

Der CaSR (Calcium-sensing Receptor) ist ein G-Protein-gekoppelter-sieben-Transmembran-umspannender Rezeptor. Über die Bindung von Calciumionen an den CaSR wird ein hemmender Einfluss auf die Synthese und Sekretion des Parathormons (PTH) genommen (Goodman and Quarles 2008). Somit hat der CaSR eine wichtige Funktion in der Regulation der extrazellulären Calciumaktivität. Wenn die Aktivität des extrazellulären Calciums unter einen bestimmten Wert fällt, steigt die Freisetzung von PTH. Dies führt zu einer vermehrten Freisetzung von Calcium aus dem Knochen und zur vermehrten Resorption von Calcium in der Niere (Changu et al., 2008). Außerdem wird der CaSR in zahlreichen anderen Geweben des menschlichen Organismus exprimiert, unter anderem relativ stark in der TAL, und er konnte auch in der luminalen Membran im proximalen Tubulus nachgewiesen werden (Toka et al., 2012).

Allerdings ist die Bedeutung vom extraparathyreoidalen CaSR im Calcium-Stoffwechsel noch nicht hinreichend geklärt (Loupy et al., 2012). In der TAL scheint der CaSR die Calcium-Ausscheidung lokal, als schützende Funktion für die Entstehung einer Hyperkalziämie zu regulieren, (Toka et al., 2012).

Es ist bekannt, dass der CaSR in der Niere exprimiert wird und hier den Transport vom tubulärem Calcium, Natrium, Wasser und Wasserstoff-Ionen beeinflusst (Loupy et al., 2012). Loupy et al. konnten zeigen, dass CaSR- Antagonisten in Ratten zu einem anhaltenden Anstieg der Calciumkonzentration, mit einem unveränderten oder vermindertem PTH, führen können.

Breitwieser et al. konnten zeigen das schon kleine Erhöhungen der extrazellulären Calcium-Konzentrationen zu intrazellulären Calcium-Oszillationen führen (Breitwieser and Gama 2001). Schon kleine Änderungen der Calciumaktivität, so wie von uns für die LLC-PK₁ Kultur für den Fam20a KD gezeigt, könnten somit über eine veränderte Rezeptorantwort am CaSR zu ausgeprägten (patho)physiologischen (Folge-)Veränderungen führen.

Es gibt verschiedene Agonisten, die eine Reaktion beim CaSR hervorrufen können, wie zum Beispiel L-Aminosäuren (Riccardi and Brown 2010).

Die Bedeutung der Stimulation des CaSR durch Aminosäuren ist noch nicht hinreichend geklärt, aber ist physiologisch nicht unbedeutend und könnte eine Rolle im Aminosäuren/Protein/Calcium-Stoffwechsel spielen (Riccardi and Brown 2010). Bisher bekannt ist, dass die Aktivierung des CaSR durch L-Aminosäuren einen Einfluss auf die intrazelluläre Calcium Mobilisation nehmen kann (Conigrave al., 2007). Die L-Aminosäuren scheinen die Fähigkeit zu besitzen die Sensitivität des CaSR zu verändern, so dass eine Reaktion des CaSR mit weniger Calciumionen ausgelöst werden kann, beim Fehlen der Aminosäuren werden mehr Calciumionen benötigt (Conigrave et al., 2007). Es könnte auch spekuliert werden, dass Fam20a eine Rolle in diesem Stoffwechsel spielt und zum Beispiel als ein Verstärker bei intrazellulären Signalwegen fungiert.

Für Veränderungen des Löslichkeitsprodukts und zur Bildung von Calcifizierungen scheinen die Veränderungen der extrazellulären Calciumaktivität durch den KD an sich jedoch sehr klein zu sein. Die Ausbildung einer pathologischen Calcifizierung könnte aber auch einen zusätzlichen Impuls oder einen Triggerfaktor voraussetzen, wie zum Beispiel ein entzündlicher Prozess vergleichbar mit der Arterioskleroseentstehung (Libby 2012). Dieser Zusammenhang könnte für das relativ späte Eintreten der NC in ERS Patienten mitverantwortlich sein, da es erst im Laufe des Lebens neben der primären Veränderung in der Calciumpufferkapazität zu weiteren, die Präzipitation fördernden Faktoren kommt. Und tatsächlich wird bei den Patienten mit dem ERS-Syndrom die NC relativ spät diagnostiziert. In betroffenen Kindern ist die NC zwar schon vorhanden, bleibt aber im Kindesalter noch asymptomatisch (de la Dure-Molla et al., 2014).

4.2.3 **Die Rolle der Chondroitinsulfate in der extrazellulären Matrix**

Chondroitinsulfate sind Bestandteil des Interstitiums und der mesangialen Matrix (Ehara et al., 1994). Bei einer renalen interstitiellen Fibrose kommt es im Allgemeinen zum fibrotischen Umbau im Parenchym der Rinde (Koshiishi et al., 2002). Die Bestandteile der extrazellulären Matrix verändern sich bei einem chronischen Nierenschaden (Koshiishi et al., 2002). Chondroitinsulfate als Teil der extrazellulären Matrix sind somit am Ort des Geschehens und können hier als Calciumpuffer fungieren, deren Eigenschaften pathophysiologisch verändert wären.

Hunter et al. konnten zeigen, dass die Zugabe von hohen Chondroitin-4-sulfat-Konzentrationen die Bildung von Hydroxylapatit hemmt und zu einer geringeren Menge an Präzipitaten führt (Hunter et al., 1985). Auch in unseren Experimenten konnten wir einen zusätzlichen Pufferungseffekt durch weitere Zugabe von Chondroitinsulfat, allerdings nur bei der höchsten zugegebenen Menge an Chondroitinsulfat feststellen. Die im Zellkulturmedium tatsächlich vorhandene Chondroitinsulfat-Menge war uns dabei nicht bekannt, da zusätzlich über den Zusatz des bovinen Kälberserums eine uns unbekannt Menge Chondroitinsulfat zugesetzt wurde (Nganvongpanit et al., 2008). Durch das Experiment mit Chondroitinase konnten wir hingegen die Beteiligung von Chondroitinsulfat an der durch Fam20a KD verursachten Änderung des scheinbaren Aktivitätskoeffizienten in unserem Zellkulturmodell belegen.

Bei den Zellkulturüberständen der beiden LLC-PK₁-Zelllinien, denen unterschiedliche CaCl₂ Konzentrationen hinzugefügt wurden, wurde deutlich, dass bei einer Zugabe von 3 mM CaCl₂ der Calciumaktivitätskoeffizient der Zelllinie 4 höher war als bei der Zelllinie 1. Dieser Unterschied bestand bei der Zugabe höherer CaCl₂ Konzentrationen wie 6 mmol, 9 mM und 12 mM nicht mehr. Dies legt nahe, dass der Faktor, den Fam20a bei der Calcifizierung ausmacht, die Pufferung von Calcium verändert und dieser Effekt sättigbar ist. Diese Funktion eines Puffers könnte in Zusammenhang mit der Fähigkeit der Chondroitin-sulfate, Calcium-Präzipitationen zu hemmen stehen (Hunter et al., 1985).

Im Weiteren ist auffällig, dass das Fam20a Expressionsniveau sehr niedrig ist (Abb. 7). Sollte sich dies auch auf Proteinebene widerspiegeln, müsste die Wirkung von Fam20a bei Calcifizierungsprozessen über mehrere Verstärkungsstufen, z.B. in

Signalkaskaden oder Enzymkaskaden erreicht werden. Für die anderen beiden Familienmitglieder Fam20b und Fam20c konnten Kinase-Aktivitäten nachgewiesen werden, bei der Phosphorylierungen von Proteinen eine Rolle spielen, die auch an der extrazellulären Matrix beteiligt sind (Wang et al., 2014), (Koike et al., 2009). Diese beiden Proteine sind in der Niere deutlich stärker exprimiert (Abb.7). Für Fam20a konnte die Kinase-Aktivität bis jetzt noch nicht sicher bestätigt werden, bzw. die sind Zielproteine für die Phosphorylierung nicht bekannt (Hiroshi Kitagawa (Kyoto University, Graduate School of Science), persönliche Kommunikation). Auf Grund der sehr niedrigen Expression von Fam20a liegt hier demgemäß die Vermutung nahe, dass eventuell ein Protein oder mehrere andere Proteine Ziel der Fam20a Regulation sein könnten, z.B. andere Kinasen, die wiederum in einer verstärkenden Kinasen-Signal-Kaskade eine Rolle spielen.

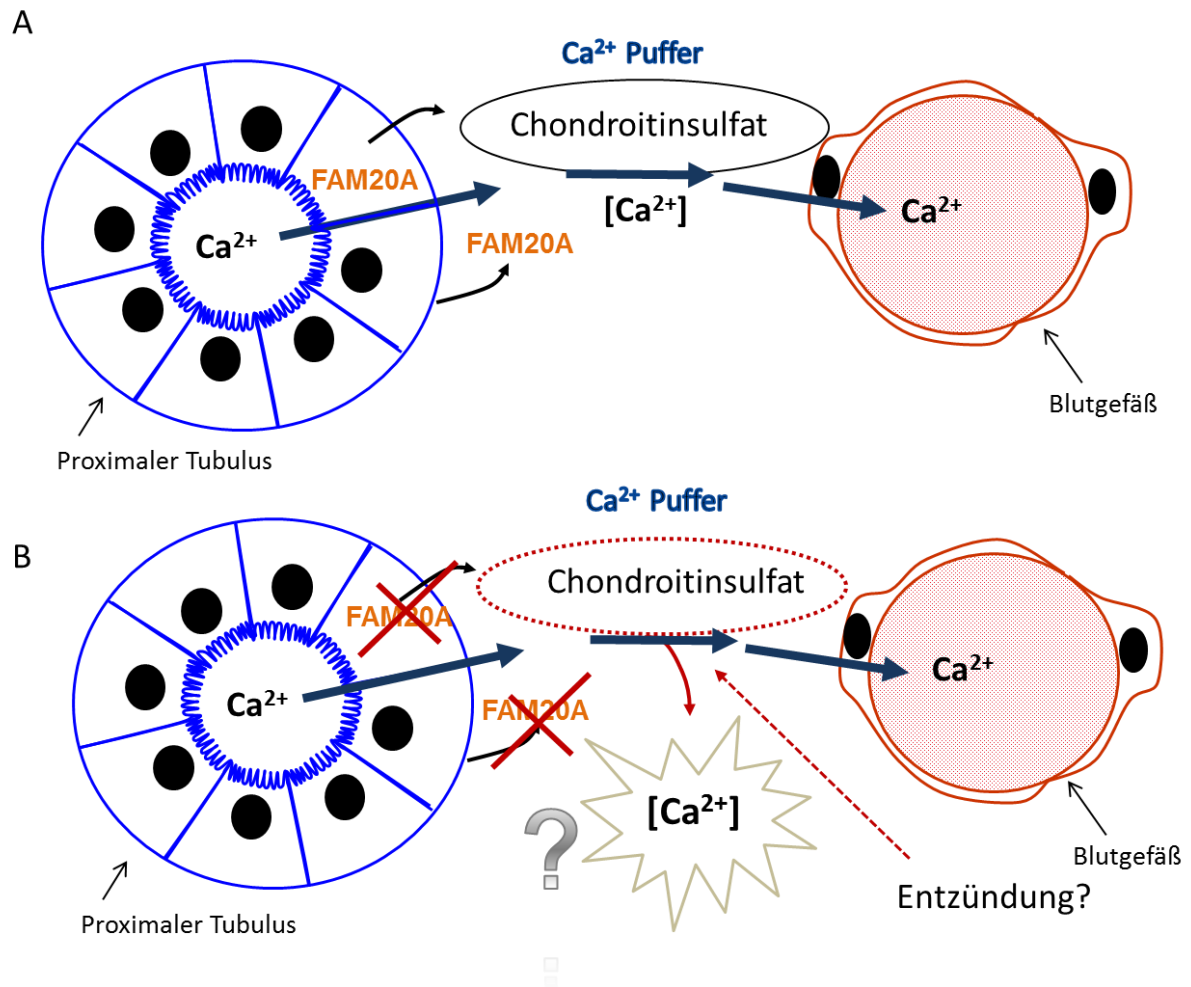


Abbildung 14: **A** Schematische Darstellung einer, mit den Daten dieser Arbeit denkbaren physiologischen Rolle von Fam20a für den Calciumhaushalt des Interstitiums. **B** Pathophysiologie und Fehlen von Fam20a.

Abbildung 14 soll unsere aktuellen Hypothesen graphisch zusammenfassen. Fam20a wird unter anderem von proximal tubulären Zellen gebildet. Ob es seine Wirkung bereits intrazellulär oder erst nach Abgabe in den interstitiellen Raum entfaltet und wie genau und über welche Zwischenschritte diese Wirkung erfolgt, ist noch nicht geklärt. Wir spekulieren jedoch, dass letztendlich die Menge und molekulare Struktur der Matrix-Proteine wie Chondroitinsulfat dergestalt verändert werden, dass sie das Calcium, das das Tubulusepithel passiert hat, aber noch nicht in die Kapillaren übergetreten ist, nicht mehr adäquat puffern können. Dies wäre die Basis zur Präzipitation und NC (Abb. 14 A vs. Abb. 14B).

4.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe eines Zellkulturmodells gezeigt werden, dass Fam20a in der Lage ist, die Calciumaktivitäten und den scheinbaren Calciumaktivitätskoeffizienten im Zellkulturmedium zu beeinflussen. Hierbei zeigte sich auch, dass ein KD ein gutes Modell für Untersuchungen und Experimente in der Zellkultur darstellen kann, allerdings fehlt eine absolute Negativkontrolle. In diesem Punkt ist der KO ein besseres Modell. Es steht nun eine Fam20a KO Maus zur Verfügung und demzufolge kann die Funktion von Fam20a in nativem KO Gewebe näher charakterisiert werden.

Außerdem können die Ergebnisse aus der Zellkultur bestätigt werden und zusätzlich kann der tubuläre Transport untersucht werden. Interessant ist zudem die genaue Lokalisation von Fam20a. Diese kann mit dem zur Verfügung stehenden nativen Negativgewebe durch Western Blots oder Immunfluoreszenz-Untersuchungen dargestellt werden, sobald selektive Antikörper zur Verfügung stehen.

5 Zusammenfassung

Die Amelogenesis Imperfecta ist ein Krankheitsbild mit Fehlbildungen der Zähne, Gingivahyperplasie, Durchbruchstörungen der Zähne oder Calcifizierungen in der Pulpa der Zähne. Eine Untergruppe von Patienten mit dieser Erkrankung ist zudem von pathologischen interstitiellen Calcifizierungen der Niere betroffen. Für dieses sogenannte ERS (Enamel-Renal-Syndrom) konnte die krankheitsverursachende Mutation und das entsprechende betroffene Gen *FAM20A* identifiziert werden. Beim ERS zeigen Patienten eine Kombination von zwei ganz unterschiedlichen Symptomen, deren gemeinsamer Nenner eine gestörte Kontrolle der Calciumpräzipitation ist. Auf der einen Seite sind diese Patienten von pathologischen Calcifizierungen in der Niere betroffen, auf der anderen Seite hat der Zahnschmelz einen nicht korrekten Aufbau.

Diese Arbeit untersucht die Funktion von Fam20a für die extrazelluläre Calciumaktivität, die Calciumkonzentration und den scheinbaren Calciumaktivitätskoeffizienten. Hierfür wurde das gut charakterisierte Zellkulturmodell LLC-PK₁ verwendet. Eine LLC-PK₁- Zelllinie diente als Kontrolle, die andere Zelllinie unterschied sich von der Kontrollzelllinie durch einen Fam20a-knockdown. Durch diesen knockdown wurde die Fam20a-Genexpression um ca. 70% gemindert. Es konnte gezeigt werden, dass Fam20a das Verhältnis von Calciumaktivität zu Calciumkonzentration im Kulturmedium in der Zellkultur beeinflussen kann. In der knockdown-Zelllinie war der scheinbare Calciumaktivitätskoeffizient signifikant höher als in der Kontrollzelllinie. Durch Zugabe des Enzyms Chondroitinase ABC zu den Zellkulturmedien der beiden Zelllinien wurde der Unterschied zwischen den beiden Zelllinien wieder aufgehoben. Weiter konnte der Unterschied durch Sättigung der Calciumpufferwirkung des Zellkulturüberstandes aufgehoben werden. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass Fam20a ein zellulärer Faktor oder auch sezernierter Faktor ist, der die extrazelluläre Matrix modifiziert und damit über eine veränderte Calciumaktivität einen Einfluss auf Calcifizierungsprozesse haben könnte.

6 Literaturverzeichnis

- Bandeira, F., Cusano, N. E., Silva, B. C., Cassibba, S., Almeida, C. B., Machado, V. C., & Bilezikian, J. P. (2014). Bone disease in primary hyperparathyroidism. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, *58*(5), 553-561.
- Boyce, A. M., Shawker, T. H., Hill, S. C., Choyke, P. L., Hill, M. C., James, R., . . . Gafni, R. I. (2013). Ultrasound is superior to computed tomography for assessment of medullary nephrocalcinosis in hypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, *98*(3), 989-994.
- Breiderhoff, T., Himmerkus, N., Stuiver, M., Mutig, K., Will, C., Meij, I. C., . . . Muller, D. (2012). Deletion of claudin-10 (Cldn10) in the thick ascending limb impairs paracellular sodium permeability and leads to hypermagnesemia and nephrocalcinosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(35), 14241-14246.
- Breitwieser, G. E., & Gama, L. (2001). Calcium-sensing receptor activation induces intracellular calcium oscillations. *Am J Physiol Cell Physiol*, *280*(6), C1412-1421.
- Brown, H. M., & Rydqvist, B. (1981). Arsenazo III-Ca²⁺. Effect of pH, ionic strength, and arsenazo III concentration on equilibrium binding evaluated with Ca²⁺ ion-sensitive electrodes and absorbance measurements. *Biophys J*, *36*(1), 117-137.
- Chang, W., Tu, C., Chen, T. H., Bikle, D., & Shoback, D. (2008). The extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) is a critical modulator of skeletal development. *Sci Signal*, *1*(35), ra1.
- Conigrave, A. D., Mun, H. C., & Brennan, S. C. (2007). Physiological significance of L-amino acid sensing by extracellular Ca²⁺-sensing receptors. *Biochem Soc Trans*, *35*(Pt 5), 1195-1198.
- Crawford, P. J., Aldred, M., & Bloch-Zupan, A. (2007). Amelogenesis imperfecta. *Orphanet J Rare Dis*, *2*, 17.
- de Arruda, P. F., Gatti, M., de Arruda, J. G., Facio, F. N., Jr., Spessoto, L. C., de Arruda, L. F., . . . Godoy, M. F. (2014). Familial mixed nephrocalcinosis as a cause of chronic kidney failure: two case reports. *J Med Case Rep*, *8*, 355.
- de la Dure-Molla, M., Quentric, M., Yamaguti, P. M., Acevedo, A. C., Mighell, A. J., Vikkula, M., . . . Bloch-Zupan, A. (2014). Pathognomonic oral profile of Enamel Renal Syndrome (ERS) caused by recessive FAM20A mutations. *Orphanet J Rare Dis*, *9*, 84.
- Dellow, E. L., Harley, K. E., Unwin, R. J., Wrong, O., Winter, G. B., & Parkins, B. J. (1998). Amelogenesis imperfecta, nephrocalcinosis, and hypocalciuria

- syndrome in two siblings from a large family with consanguineous parents. *Nephrol Dial Transplant*, 13(12), 3193-3196.
- Ehara, T., Carone, F. A., McCarthy, K. J., & Couchman, J. R. (1994). Basement membrane chondroitin sulfate proteoglycan alterations in a rat model of polycystic kidney disease. *Am J Pathol*, 144(3), 612-621.
- Goodman, W. G., & Quarles, L. D. (2008). Development and progression of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease: lessons from molecular genetics. *Kidney Int*, 74(3), 276-288.
- Grayson, A. C., Ma, J., & Putnam, D. (2006). Kinetic and efficacy analysis of RNA interference in stably and transiently expressing cell lines. *Mol Pharm*, 3(5), 601-613.
- Gstraunthaler, G., Pfaller, W., & Kotanko, P. (1985). Biochemical characterization of renal epithelial cell cultures (LLC-PK1 and MDCK). *Am J Physiol*, 248(4 Pt 2), F536-544.
- Hardingham, T. E., & Fosang, A. J. (1992). Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J*, 6(3), 861-870.
- Heinrich, P. C., Müller, M., Graeve, L., Löffler, G., & Petrides, P. E. (2014). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (9., vollst. überarb. Aufl. ed.). Berlin [u.a.]: Springer.
- Hunter, G. K., Allen, B. L., Grynopas, M. D., & Cheng, P. T. (1985). Inhibition of hydroxyapatite formation in collagen gels by chondroitin sulphate. *Biochem J*, 228(2), 463-469.
- Ishikawa, H. O., Xu, A., Ogura, E., Manning, G., & Irvine, K. D. (2012). The Raine syndrome protein FAM20C is a Golgi kinase that phosphorylates biomineralization proteins. *PLoS One*, 7(8), e42988.
- Jaureguiberry, G., De la Dure-Molla, M., Parry, D., Quentric, M., Himmerkus, N., Koike, T., . . . Kleta, R. (2012). Nephrocalcinosis (enamel renal syndrome) caused by autosomal recessive FAM20A mutations. *Nephron Physiol*, 122(1-2), 1-6.
- Kala Vani, S. V., Varsha, M., & Sankar, Y. U. (2012). Enamel renal syndrome: a rare case report. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*, 30(2), 169-172.
- Koike, T., Izumikawa, T., Tamura, J., & Kitagawa, H. (2009). FAM20B is a kinase that phosphorylates xylose in the glycosaminoglycan-protein linkage region. *Biochem J*, 421(2), 157-162.
- Koike, T., Izumikawa, J., Tamura and H. Kitagawa (2009). "FAM20B is a kinase that phosphorylates xylose in the glycosaminoglycan-protein linkage region." *Biochem J* 421(2): 157-162.

- Koshiishi, I., Hasegawa, T., & Imanari, T. (2002). Quantitative and qualitative alterations of chondroitin/dermatan sulfates accompanied with development of tubulointerstitial nephritis. *Arch Biochem Biophys*, 401(1), 38-43.
- Li, H. P., Komuta, Y., Kimura-Kuroda, J., van Kuppevelt, T. H., & Kawano, H. (2013). Roles of chondroitin sulfate and dermatan sulfate in the formation of a lesion scar and axonal regeneration after traumatic injury of the mouse brain. *J Neurotrauma*, 30(5), 413-425.
- Libby, P. (2012). Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32(9), 2045-2051.
- Loupy, A., Ramakrishnan, S. K., Wootla, B., Chambrey, R., de la Faille, R., Bourgeois, S., . . . Houillier, P. (2012). PTH-independent regulation of blood calcium concentration by the calcium-sensing receptor. *J Clin Invest*, 122(9), 3355-3367.
- Lüllmann-Rauch, R. (Ed.) (2009). *Taschenlehrbuch Histologie* (3., vollst. überarb. Aufl. ed.). Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- McBride, D. W., & Rodgers, V. G. (2013). Predicting the activity coefficients of free-solvent for concentrated globular protein solutions using independently determined physical parameters. *PLoS One*, 8(12), e81933.
- Moore, E. W. (1970). Ionized calcium in normal serum, ultrafiltrates, and whole blood determined by ion-exchange electrodes. *J Clin Invest*, 49(2), 318-334.
- Nalbant, D., Youn, H., Nalbant, S. I., Sharma, S., Cobos, E., Beale, E. G., . . . Williams, S. C. (2005). FAM20: an evolutionarily conserved family of secreted proteins expressed in hematopoietic cells. *BMC Genomics*, 6, 11.
- Nganvongpanit, K., Itthiarbha, A., Ong-Chai, S., & Kongtawelert, P. (2008). Evaluation of serum chondroitin sulfate and hyaluronan: biomarkers for osteoarthritis in canine hip dysplasia. *J Vet Sci*, 9(3), 317-325.
- Normand de la Tranchade, I., Bonarek, H., Marteau, J. M., Boileau, M. J., & Nancy, J. (2003). Amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis: a new case of this rare syndrome. *J Clin Pediatr Dent*, 27(2), 171-175.
- Pereira, P. C., Miranda, D. M., Oliveira, E. A., & Silva, A. C. (2009). Molecular pathophysiology of renal tubular acidosis. *Curr Genomics*, 10(1), 51-59.
- Pomin, V. H., Park, Y., Huang, R., Heiss, C., Sharp, J. S., Azadi, P., & Prestegard, J. H. (2012). Exploiting enzyme specificities in digestions of chondroitin sulfates A and C: production of well-defined hexasaccharides. *Glycobiology*, 22(6), 826-838.
- Prozialeck, W. C., J. R. Edwards, P. C. Lamar and C. S. Smith (2006). "Epithelial barrier characteristics and expression of cell adhesion molecules in proximal tubule-derived cell lines commonly used for in vitro toxicity studies." *Toxicol In Vitro* 20(6): 942-953.

- Quarles, L. D. (2012). Role of FGF23 in vitamin D and phosphate metabolism: implications in chronic kidney disease. *Exp Cell Res*, 318(9), 1040-1048.
- Raine, J., Winter, R. M., Davey, A., & Tucker, S. M. (1989). Unknown syndrome: microcephaly, hypoplastic nose, exophthalmos, gum hyperplasia, cleft palate, low set ears, and osteosclerosis. *J Med Genet*, 26(12), 786-788.
- Riccardi, D., & Brown, E. M. (2010). Physiology and pathophysiology of the calcium-sensing receptor in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 298(3), F485-499.
- Sayer, J. A., Carr, G., & Simmons, N. L. (2004). Nephrocalcinosis: molecular insights into calcium precipitation within the kidney. *Clin Sci (Lond)*, 106(6), 549-561.
- Schroeder, H. E. (2000). *Orale Strukturbiologie. Entwicklungsgeschichte, Struktur und Funktion normaler Hart- und Weichgewebe der Mundhöhle und des Kiefergelenks* (5., unveränd. Aufl ed.). Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Spitzer, J., & Poolman, B. (2009). The role of biomacromolecular crowding, ionic strength, and physicochemical gradients in the complexities of life's emergence. *Microbiol Mol Biol Rev*, 73(2), 371-388.
- Tagliabracci, V. S., Engel, J. L., Wiley, S. E., Xiao, J., Gonzalez, D. J., Nidumanda Appaiah, H., . . . Dixon, J. E. (2014). Dynamic regulation of FGF23 by Fam20C phosphorylation, GalNAc-T3 glycosylation, and furin proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(15), 5520-5525.
- Thode, J., Holgersen, R. B., & Gerstenberg, T. (1993). Variability of the calcium ion activity with pH in stone-forming and non-stone-forming urine. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 214, 121-126. Toka, H. R., Al-Romaih, K., Koshy, J. M., DiBartolo, S., 3rd, Kos, C. H., Quinn, S. J., . . . Pollak, M. R. (2012). Deficiency of the calcium-sensing receptor in the kidney causes parathyroid hormone-independent hypocalciuria. *J Am Soc Nephrol*, 23(11), 1879-1890.
- Toka, H. R., K. Al-Romaih, J. M. Koshy, S. DiBartolo, 3rd, C. H. Kos, S. J. Quinn, G. C. Curhan, D. B. Mount, E. M. Brown and M. R. Pollak (2012). "Deficiency of the calcium-sensing receptor in the kidney causes parathyroid hormone-independent hypocalciuria." *J Am Soc Nephrol* 23(11): 1879-1890.
- Verkoelen, C. F., Kok, D. J., van der Boom, B. G., de Jonge, H. R., Schroder, F. H., & Romijn, J. C. (1999). LLC-PK1 cells as a model system to study proximal tubule transport of water and other compounds relevant for renal stone disease. *Urol Res*, 27(2), 109-115.
- Wang, S. K., Aref, P., Hu, Y., Milkovich, R. N., Simmer, J. P., El-Khateeb, M., . . . Hu, J. C. (2013). FAM20A mutations can cause enamel-renal syndrome (ERS). *PLoS Genet*, 9(2), e1003302.

Wang, S. K., Reid, B. M., Dugan, S. L., Roggenbuck, J. A., Read, L., Aref, P., . . . Hu, J. C. (2014). FAM20A mutations associated with enamel renal syndrome. *J Dent Res*, 93(1), 42-48.

Zeng, Y., Ebong, E. E., Fu, B. M., & Tarbell, J. M. (2012). The structural stability of the endothelial glycocalyx after enzymatic removal of glycosaminoglycans. *PLoS One*, 7(8), e43168.

7 Anhang

7.1 Danksagung

Zuerst möchte ich ganz herzlich Herrn Prof. Dr. Markus Bleich danken für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Ganz besonders möchte ich ihm hierbei für seine wertvolle fachliche Beratung, seinen Humor, sein stets offenes Ohr und seine großartige und tatkräftige Betreuung danken.

Bei Frau Dr. Nina Himmerkus möchte ich mich bedanken für ihre Herzlichkeit, ihre Hilfsbereitschaft, die Zeit für eine kurze Pause in der Küche im Institut mit aufschlussreichen fachlichen Gesprächen, die Motivation und Geduld auch bei Problemen und Rückschlägen bei der vorliegenden Arbeit.

Ganz herzlich danke ich der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Robert Kleta für die zur Verfügung gestellten LLC-PK₁ Zellen.

Außerdem gilt mein Dank allen Mitarbeitern im Physiologischen Institut für ihre Freundlichkeit, die große Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen und für die gute Arbeitsatmosphäre. Ein ganz besonderer Dank gilt hierbei meinen lieben Mitdoktoranden und Sandra Grüssel und Michaela Unmack.

Vera Wulfmeyer sei herzlich gedankt für ihre Freundschaft in der gemeinsamen Zeit im Labor – bleib so wie du bist.

Ganz besonders möchte ich meiner ehemaligen Mitbewohnerin Annika Boels danken für ihre stets offene Tür und ihr Verständnis. Darüber hinaus danke ich Josephine Drenck, Kerrin Eggers, Magda Kleinke und Teresa Schöne – danke, für eure Freundschaft.

Mein größter Dank geht an meine Familie. Ich möchte mich ganz lieb bei meinen Eltern und bei meinen Geschwistern für die unendlich große Unterstützung und ihren Rückhalt bedanken.

7.2 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation „Der Einfluss von Fam20a auf die Calciumkonzentration, die Calciumaktivität und den scheinbaren Calciumaktivitätskoeffizienten im Zellkulturmedium von LLC-PK₁-Zellen“ noch an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen hat. Die Anfertigung der Arbeit erfolgte von mir selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln, Quellen und mit Beratung des Betreuers.

Carolin Sandmann

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

- Name: Carolin Sandmann
- Geburtsdatum: 28.10.1988
- Geburtsort: Vechta
- Anschrift : Landwehrstraße 8, 49377 Vechta

Schulische Bildung/ Studium

- 1995 – 1999 Grundschule Hagen
- 1999 – 2001 Schulzentrum Süd, Orientierungsstufe in Vechta
- 2001 – 2008 Gymnasium Antonianum Vechta

- 2008 – 2014 Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
 - 2009 Vorphysikum
 - 2011 Physikum
 - 2014 Staatsexamen

Promotion

- Seit Januar 2012 Arbeit an der Dissertation am Physiologischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Bleich

Beruflicher Werdegang

- Seit Oktober 2014 Assistenz Zahnärztin bei der Praxis Dr. Kurwinkel-Krapp & Buschmann

