

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

**ATP-induzierte intrazelluläre Kalzium-Signaltransduktion in
primär kultivierten Fam20a-defizienten proximalen
Tubuluszellen und renalen mesenchymalen Zellen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Dorothea Maria Winkler (geb. Debert)

aus Karansebesch

Kiel 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Bleich, Physiologisches Institut

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Kunzendorf, Klinik für Innere Medizin IV mit den
Schwerpunkten Nieren- und Hochdruckkrankheiten

Tag der mündlichen Prüfung: 07.09.2020

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 26.03.2020

gez. Prof. Dr. Johann P. Kuhtz-Buschbeck

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Die Niere	1
1.1.1 Der proximale Tubulus	3
1.1.2 Mesenchymale Zellen im renalen Interstitium	5
1.1.3 Renale interstitielle Extrazellulärmatrix	8
1.1.4 Epithelial-mesenchymale Transition	9
1.2 Kalziumhomöostase	9
1.2.1 Regulation der intrazellulären freien Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$	10
1.3 Purinerge Signaltransduktion	13
1.4 Fam20a und das Enamel-Renal-Syndrome	15
1.4.1 Fam20b und Fam20c	16
1.4.2 Molekulare Funktion von Fam20a	17
1.5 Zielsetzung der Arbeit	19
2. Material & Methoden	20
2.1 Chemikalien	20
2.2 Lösungen	20
2.2.1 Tubuluspräparation	20
2.2.2 Fura 2-AM Messungen	21
2.3 Zellkultur LLC-PK₁ Zellen	22
2.4 Tubuluspräparation	23
2.4.1 Zellkultur muriner primärer proximal tubulärer Epithelzellen (mpPTEC)	25
2.4.2 Zellkultur muriner primär renaler Mesenchymzellen (mprMC)	26
2.5 Fura 2-AM Messungen	27
2.5.1 Fura 2-AM	27
2.5.2 Fluoreszenzmikroskopie	28
2.5.3 Inkubation	29
2.5.4 Durchführung ATP-Experimente	31

2.5.5	Experimente unter Ca^{2+} freien Bedingungen	32
2.5.6	Kalibrierung des Fluoreszenzsignals	33
2.5.7	Auswertung der Fura-2 Messungen	36
2.6	Immunfluoreszenz	36
2.7	Statistische Datenanalyse.....	38
3.	Ergebnisse	39
3.1	Etablierung der Primärzellkulturen.....	39
3.1.1	Wachstum und Morphologie der proximal tubulären Primärkultur mpPTEC.....	39
3.1.2	Wachstum und Morphologie der renalen interstitiellen Zellkultur mprMC.....	41
3.2	Differenzierung und Expression epithelialer und mesenchymaler Markerproteine	44
3.2.1	Immunhistochemische Untersuchung der mprMC Kulturen	44
3.2.2	Differenzierung der mpPTEC	48
3.3	Einfluss von Fam20a auf die intrazelluläre Kalziumaktivität ...	54
3.3.1	Erste Versuche an einer etablierten Zellkulturlinie	54
3.3.2	Fam20a Verlust in differenzierten SmpPTEC erhöht primär die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unabhängig von einer Chondroitinasebehandlung	55
3.3.3	Dedifferenzierte LmpPTEC werden von Fam20a-Defizienz nicht in ihrem Kalziumhaushalt beeinflusst	57
3.3.4	Primäre renale Mesenchymzellen zeigen durch Fam20a-Verlust ein verstärktes Ca^{2+} -Signal, das durch Chondroitinasewirkung aufgehoben wird.....	57
3.4	Einfluss des extrazellulären Ca^{2+} auf den ATP-induzierten Ca^{2+}-Transienten und Auswirkung des Fam20a Verlusts	59
3.4.1	Fam20a-abhängige Unterschiede sind unter kalziumfreien Bedingungen in SmpPTEC deutlich attenuiert	59
3.4.2	LmpPTEC zeigen keine Unterschiede unter extrazellulär kalziumfreien Bedingungen	60
3.4.3	Fam20a defiziente mprMC haben einen vermehrten Kalziumeinstrom nach Kalziumdepletion	60

4. Diskussion	63
4.1 Methodik.....	63
4.1.1 Zellkulturen als Modellgewebe	63
4.1.2 Fura-2 Messungen	66
4.2 Fam20a verändert die Kalziumhomöostase renaler Zellen.....	67
4.2.1 Verstärkter Kalziumtransient in renalen Mesenchymzellen und Einfluss von Chondroitinase	67
4.2.2 Fam20a-Defizienz führt zu einer erhöhten basalen intrazellulären Kalziumkonzentration in proximal tubulären Epithelzellen und in renalen Mesenchymzellen.....	69
4.2.3 Überlegungen zur Rolle von Fam20a bei Kalzifizierungsprozessen im Rahmen des ERS.....	73
5. Zusammenfassung.....	75
6. Literaturverzeichnis	77
7. Anhang	83
8. Danksagung	84

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AI	Amelogenesis imperfecta
AIGFS	engl. <i>Amelogenesis imperfecta and gingival fibromatosis syndrome</i>
α SMA	engl. <i>alpha smooth muscle actin</i>
aTL	engl. <i>ascending thin limb</i> , dünner aufsteigender Schenkel der Henle-Schleife
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum-Albumin
CBP	engl. calcium-binding protein
CD	engl. <i>collecting duct</i> , Sammelrohr
CNT	engl. <i>connecting tubule</i> , Verbindungstubulus
CRAC	engl. <i>calcium release activated calcium channel</i>
DAG	Diacylglycerol
DCT	engl. <i>distal convoluted tubule</i> , distaler Tubulus pars convoluta
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
dTL	engl. <i>descending thin limb</i> , dünner absteigender Schenkel der Henle-Schleife
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EPO	Erythropoetin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERS	engl. <i>Enamel</i> (dt. Zahnschmelz)- <i>Renal</i> (dt. Niere)- <i>Syndrome</i>
EZM	Extrazellulärmatrix
EZR	Extrazellulärraum
FSP-1	engl. fibroblast specific protein 1
GAG	Glykosaminoglykane
GLOM	Glomerulus
GPCR	engl. <i>G-Protein coupled receptor</i> , G-Protein gekoppelter Rezeptor
IP ₃	Inositoltriphosphat
IP ₃ R	IP ₃ -Rezeptor(en)
IZR	Intrazellulärraum
KD	Knockdown
KO	Knockout
LLC-PK ₁	Lilly Laboratories Cell-Porcine Kidney ₁

mprMC	engl. <i>murine primary renal mesenchymal cells</i> , primäre renale Mesenchymzellen der Maus
mpPTEC	engl. <i>murine primary proximal tubular epithelial cells</i> , primäre proximal tubuläre Epithelzellen der Maus
SmpPTEC	engl. <i>small murine primary proximal tubular epithelial cells</i> , kleine primäre proximal tubuläre Epithelzellen der Maus
LmpPTEC	engl. <i>large murine primary proximal tubular epithelial cells</i> , große primäre proximal tubuläre Epithelzellen der Maus
NC	Nephrokalzinose
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCT	engl. <i>proximal convoluted tubule</i> , proximaler Tubulus pars convoluta
PDGFR- β	engl. <i>platelet-derived growth factor receptor-β</i>
PFA	Paraformaldehyd
PG	Proteoglykane
PMCA	engl. <i>plasma membrane Ca^{2+}-ATPase</i>
PST	engl. <i>proximal straight tubule</i> , proximaler Tubulus, pars recta
PT	Proximaler Tubulus, proximale Tubuli
ROCs	engl. <i>receptor operated channels</i> , rezeptorgekoppelte Kanäle
ROI	engl. <i>region of interest</i> , Bereich von Interesse
U/min	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	engl. <i>real time polymerase chain reaction</i> , Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RyR	Ryanodinrezeptor(en)
SERCA	engl. <i>sarko-/endoplasmatic reticulum Ca^{2+}-ATPase</i>
siRNA	engl. <i>small interference RNA</i>
SOCE	engl. <i>store operated calcium entry</i>
SOCs	engl. <i>store operated channels</i> , speichergekoppelte Kanäle
SPCA	engl. <i>secretory pathway Ca^{2+}-ATPase</i>
TAL	engl. <i>thick ascending limb</i> , distaler Tubulus pars recta, dicker aufsteigender Schenkel der Henle-Schleife
TGF- β_1	engl. <i>transforming growth factor β_1</i>
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
VOCs	engl. <i>voltage operated channels</i> , spannungsabhängige Kanäle
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Die Niere

Die Niere hat als lebenswichtiges Organ zahlreiche unterschiedliche Aufgaben. Dazu gehören neben der Ausscheidung harnpflichtiger Stoffwechselprodukte die Aufrechterhaltung der extrazellulären Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushaltes sowie die Blutdruckregulation über das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem. Daneben besitzt die Niere auch endokrine Funktion. Als Aktivierungs- und Wirkort von Vitamin D nimmt sie eine herausragende Stellung bei der Kalziumhomöostase ein. Des Weiteren wird die Blutbildung im Knochenmark durch die renale Produktion von Erythropoetin gefördert [1].

Makroskopisch wird die Niere in Kortex und Medulla unterteilt, wobei die Medulla nochmals in äußeres und inneres Mark unterteilt wird. Beim äußeren Mark selbst werden nochmals Außenstreifen und Innenstreifen unterschieden [2].

Das Nephron stellt die Funktionseinheit der Niere dar. Es gliedert sich in den Glomerulus, der den Primärharn bildet und ein angeschlossenes System aus Nierenkanälchen, den sogenannten Tubuli, die die Zusammensetzung des Primärharns verändern. Im Sammelrohr wird der Harn aus mehreren Nephronen aufgefangen und über größere Gänge schließlich ins Nierenbecken geleitet [2].

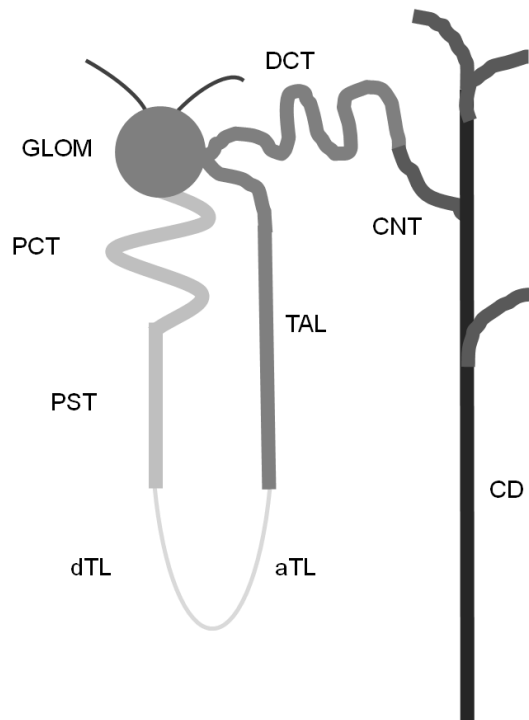


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Nephrons. GLOM=Glomerulus, PCT=proximal convoluted tubule (Proximaler Tubulus, pars convoluta), PST=proximal straight tubule (Proximaler Tubulus, pars recta), dTL=descending thin limb (Intermediärtubulus, dünner absteigender Schenkel der Henle-Schleife), aTL=ascending thin limb (Intermediärtubulus, dünner aufsteigender Schenkel der Henle-Schleife), TAL=thick ascending limb (Distaler Tubulus pars recta, dicker aufsteigender Schenkel der Henle-Schleife), DCT=distal convoluted tubule (Distaler Tubulus pars convoluta), CNT=connecting tubule (Verbindungstubulus), CD=collecting duct (Sammelrohr)

Das Nephron als epitheliale Funktionseinheit ist eng mit dem Gefäßsystem der Niere verbunden und zeigt ebenfalls anatomische und physiologische Besonderheiten [1]. Dies ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Das peritubuläre Kapillarnetz umgibt dabei die resorbierenden, bzw. sezernierenden Epithelien der Nephronabschnitte als enges Netzwerk, um Wasser und Stoffe an- und abzutransportieren. Ein spezialisiertes Interstitium mit differenzierten mesenchymalen Zellen stützt die Funktionseinheiten der Niere, bildet die Extrazellulärmatrix, erfüllt aber auch spezielle parakrine und endokrine Funktionen.

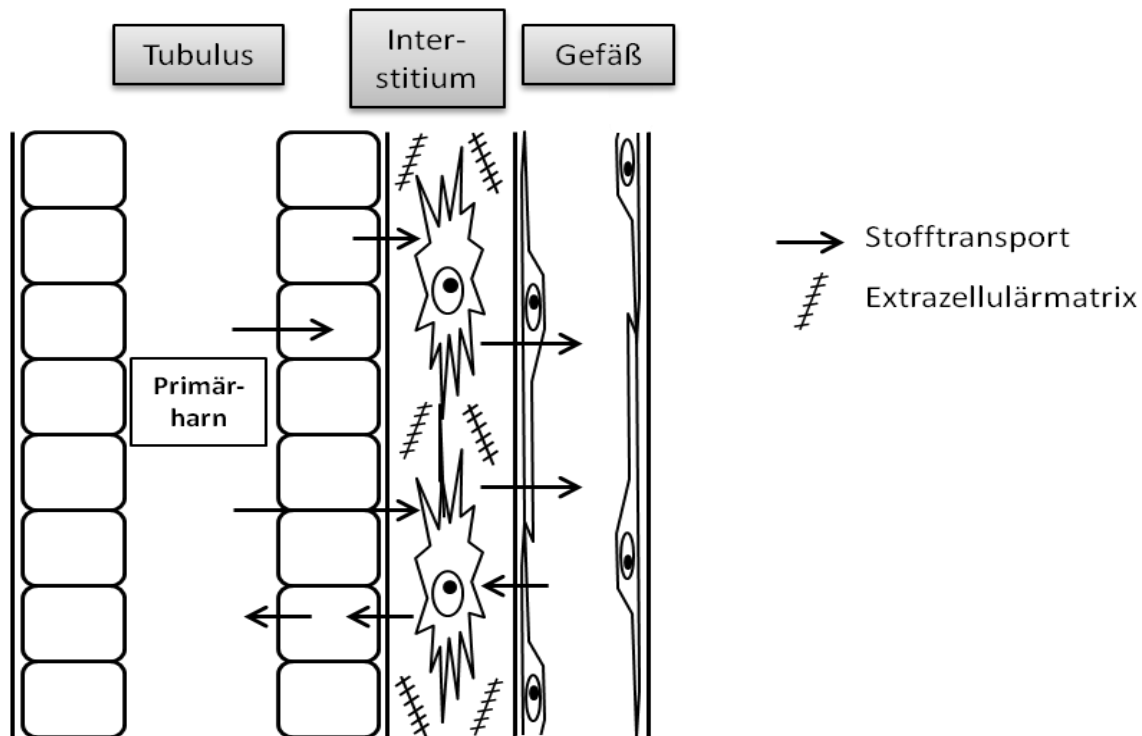


Abbildung 2: Schematische Darstellung des renalen Stofftransports. Die im Primärharn gelösten Stoffe werden trans- und parazellulär rückresorbiert und durch das Interstitium ins Kapillarsystem geleitet. Gleichzeitig findet eine Sekretion bestimmter gelöster Stoffe in den Primärharn statt. Zwischen Tubulus- und Kapillarsystem befindet sich das Interstitium mit spezialisierten mesenchymalen Zellen, die u.a. die Extrazellulärmatrix produzieren.

In den nächsten Abschnitten soll der proximale Tubulus (PT) und das Interstitium mit seinen Zellen, beziehungsweise die gebildete Extrazellulärmatrix (EZM) detaillierter erläutert werden.

1.1.1 Der proximale Tubulus

Im PT werden ca. 70 % des filtrierten Wassers, der filtrierten Elektrolyte sowie bis zu 100 % an organischen Molekülen (Glucose, Aminosäuren, Bikarbonat, Phosphat, etc.) rückresorbiert [1]. Dies geschieht sowohl transzellulär als auch parazellulär durch Tight Junctions. Tight Junctions, oder Zonula occludens, sind Zell-Zell-Verbindungen zwischen Epithelzellen. Sie unterteilen eine Zelle in eine apikale und eine basolaterale Membran, zwischen denen sich die Tight Junctions als mechanische Diffusionsbarriere befinden. Hauptbestandteile der Tight Junctions sind Proteine der Claudin- und Occludin-Familie [3].

Der proximale Tubulus bildet mit seinem gewundenen Teil das erste Tubulussegment nach dem Glomerulus. Hier findet der Hauptteil der Rückresorption von Salz und Wasser aus dem Primärharn statt [1]. Dies spiegelt sich im histologischen Aufbau der Epithelzellen wider, wie schematisch in Abbildung 3 dargestellt. Luminal ist die Zellmembran durch Mikrovilli, also Ausstülpungen in Form eines Bürstensaums, stark vergrößert. Basolateral finden sich analog dazu ausgeprägte Einfaltungen der Zellmembran, in denen sich unzählige Mitochondrien befinden, die den „Motor“ der Reabsorption, die Na^+/K^+ -ATPase, mit Energie versorgen. Im geraden Teil des PT ist dies weniger stark ausgeprägt [2].

Vereinfacht dient der durch die Na^+/K^+ -ATPase erzeugte Natriumgradient zahlreichen Symport- und Antiport-Carriern als Triebkraft für die transzelluläre Rückresorption der genannten Stoffe. Gleichzeitig wird dadurch die transzelluläre Wasserresorption über Aquaporin 1 sowie der parazelluläre Transport über die Tight Junctions osmotisch und elektrochemisch angetrieben. Dadurch wird die Resorptionsleistung und Effizienz des proximalen Tubulus weiter gesteigert [1].

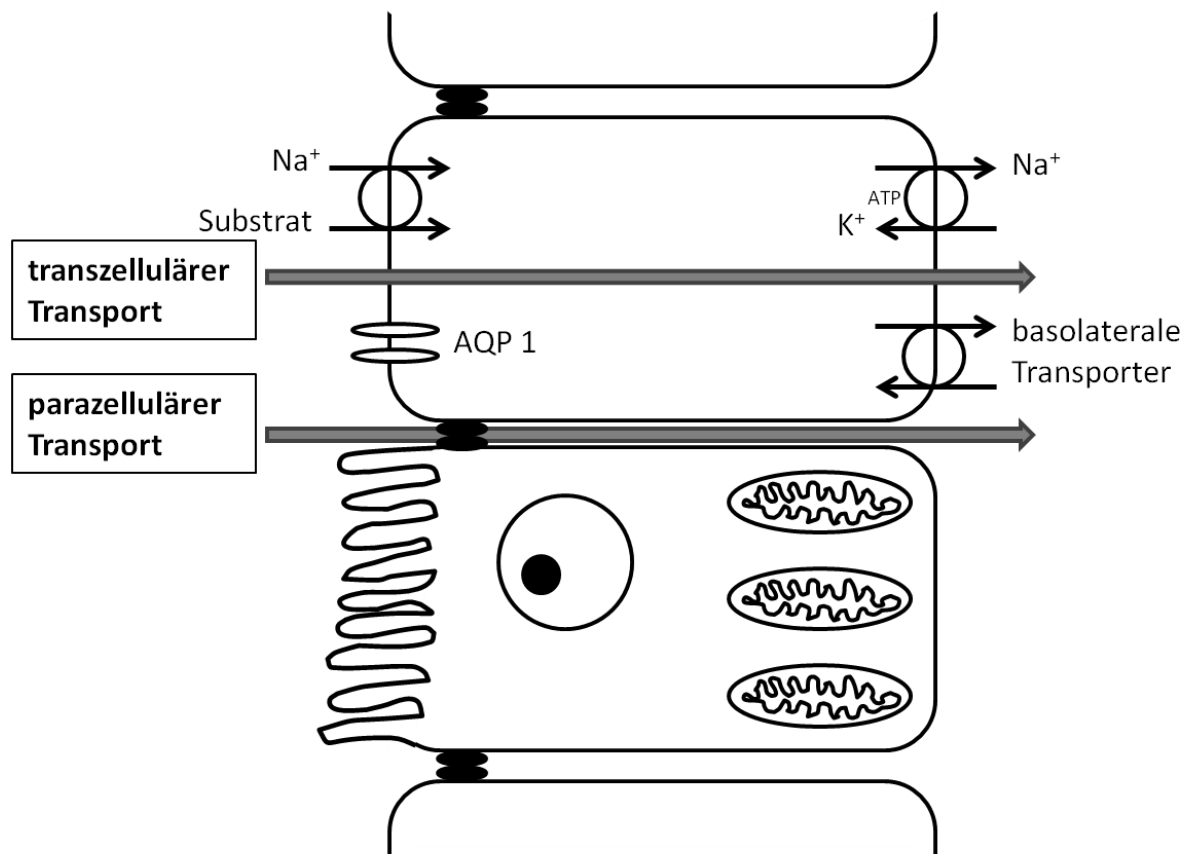


Abbildung 3: Transepithelialer transzellulärer und parazellulärer Transport im PT. Links lumbales, rechts basolaterales Kompartiment. Die Rückresorption gelöster Stoffe aus dem Primärharn erfolgt hauptsächlich mittels Natrium-abhängiger Symporter als transzellulärer Transport. Triebkraft hierfür ist die basolaterale Na^+-K^+ -ATPase, welche unter hohem Energieverbrauch einen Natriumgradienten über die Membran aufbaut. Hierfür ist eine hohe Dichte an Mitochondrien erforderlich (untere Zelle). Zur Oberflächenvergrößerung dienen Mikrovilli an der apikalen Zellmembran. Der parazelluläre Transport erfolgt hauptsächlich passiv durch Tight Junctions und zieht neben Wasser weitere Elektrolyte mit sich.

1.1.2 Mesenchymale Zellen im renalen Interstitium

Das Interstitium der Niere wird definiert als Raum zwischen der Basalmembran der tubulären Epithelzellen und der endothelialen Basalmembran der Kapillaren [4]. Es beherbergt eine Vielzahl unterschiedlicher Zellarten mesenchymalen Ursprungs, die an der Synthese und dem Umsatz der EZM beteiligt sind. Dazu gehören unter anderem insbesondere Fibroblasten, aber auch Myofibroblasten und Perizyten [4].

Fibroblasten sind als Zellen mesenchymalen Ursprungs definiert, welche in der EZM parenchymatöser Organe vorkommen und zu deren Aufbau und Umsatz durch Produktion und Sekretion spezifischer EZM-Proteine beitragen. Fibroblasten weisen eine spindel- bis sternförmige Morphologie auf und besitzen ein ausgedehntes

Endoplasmatisches Retikulum (ER) als Korrelat der hohen Proteinbiosyntheserate [4]. Sie bilden zahlreiche Zellfortsätze zu benachbarten interstitiellen Zellen wie dendritischen Zellen und der Basalmembran von Tubulusepithelzellen und Endothelzellen aus [5]. Im physiologischen Zustand sind Fibroblasten die Hauptproduzenten der EZM.

Was die Differenzierung der einzelnen mesenchymalen Zellarten untereinander jedoch so schwierig macht, ist das Fehlen spezifischer Oberflächenmarker, die die Zellen eindeutig unterscheidbar machen [6]. In der Literatur werden eine Reihe verschiedener mesenchymaler Marker beschrieben, die jedoch für sich genommen nicht spezifisch für einen einzelnen mesenchymalen Zelltyp sind, sondern nur in der Kombination und per Ausschlussverfahren eine annähernde Zuordnung ermöglichen, da sie von verschiedenen Zellarten zugleich exprimiert werden. Zudem ist die Expression eines Markers innerhalb derselben Zellart nicht konstant, sondern vom Funktionszustand der jeweiligen Zelle abhängig [6]. Tabelle 1 zeigt eine Auswahl der bekanntesten mesenchymalen Marker. Daraus wird die eben beschriebene Problematik bei der Unterscheidung der verschiedenen Zellarten ersichtlich.

Zur grundsätzlichen immunhistochemischen Unterscheidung von mesenchymalen und epithelialen Zellen kann die Expression unterschiedlicher Intermediärfilamente herangezogen werden. So exprimieren mesenchymale Zellen das Intermediärfilament Vimentin, während Epithelzellen Cytokeratine exprimieren [6, 7].

Vimentin	α SMA	FSP-1	PDGFR- β	CD 73	Desmin
<ul style="list-style-type: none"> • Fibroblasten • Myofibroblasten • Perizyten • Mesenchymale Stammzellen • glatte Muskelzellen • Mesangiumzellen • Podozyten • Verletzte Tubuli 	<ul style="list-style-type: none"> • Myofibroblasten • Perizyten • Glatte Muskelzellen • Verletzte Podozyten 	<ul style="list-style-type: none"> • Fibroblasten • Myofibroblasten • Glatte Muskelzellen • Tubuluszellen • Inflammatorische Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • Fibroblasten • Myofibroblasten • Perizyten • Mesenchymale Stammzellen • Mesangiumzellen • Makrophagen 	<ul style="list-style-type: none"> • Fibroblasten • Myofibroblasten • Perizyten • T-Lymphozyten • Tubuluszellen 	<ul style="list-style-type: none"> • Glatte Muskelzellen • Perizyten • Verletzte Podozyten

Tabelle 1: Auswahl gängiger mesenchymaler Marker [6]

Im Kortex der Niere findet sich wenig extrazelluläres Bindegewebe. Die Tubuli sind hier lediglich von einem feinen Netz aus retikulären Fasern umgeben [2]. Die im Kortex residenten Fibroblasten sind neben der Aufrechterhaltung der Parenchymstruktur und EZM-Produktion hauptverantwortlich für die Produktion von Erythropoetin (EPO) und damit maßgeblich an der Erythropoese beteiligt [8, 9].

Im inneren Mark dagegen befindet sich reichlich EZM mit einer hohen Konzentration an sulfatierten Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen (GAG) und Hyaluronan. In den interstitiellen Fibroblasten finden sich hier viele Lipideinschlüsse (Vitamin A-haltige Granula). Des Weiteren synthetisieren sie Prostaglandine, die bei der Regulation des GAG-Gehalts eine Rolle spielen [2, 4].

Bei Erkrankungen der Niere mit struktureller Veränderung des Nierenparenchyms wie der renalen Fibrose kommt es zu einer exzessiven Zunahme von interstitiellem kollagenen Bindegewebe bei deutlich vermehrter Anzahl von Myofibroblasten, welche in gesundem Gewebe fast nicht vorkommen [7]. Diese Myofibroblasten gelten im pathologischen Zustand als Hauptproduzenten der EZM was bei fortschreitender Fibrose des Parenchyms zu konsekutivem Verlust der Organfunktion führt [7]. Sie

exprimieren dabei α SMA, welches im physiologischen Zustand in der Niere kaum nachweisbar ist [6]. Der Ursprung dieser Myofibroblasten wird in der Literatur kontrovers diskutiert [10-12].

1.1.3 Renale interstitielle Extrazellulärmatrix

Die renale Extrazellulärmatrix besteht hauptsächlich aus Kollagenfibrillen vom Typ I, III und VI, Glykosaminoglykanen (GAG) und Proteoglykanen (PG). Daneben zählen auch interstitielle Flüssigkeit, Adhäsionsproteine und Basalmembranen zur EZM [4].

Glykosaminoglykane bestehen aus langen Disaccharid-Ketten, deren Grundbaustein eine Uronsäure und Aminosucker sind, die je nach GAG ein bis drei negative Ladungen tragen. Die meisten GAG sind proteingebunden und sulfatiert. Insgesamt zeichnen sie sich durch ihre stark negative Ladung aus. Dadurch und durch ihre teils enorme Größe binden sie elektrostatisch viele Kationen, insbesondere Kalzium und üben somit eine Pufferfunktion im Interstitium aus [13]. Aus osmotischen Gründen binden GAG zudem viel Wasser, womit ihnen große Bedeutung für die mechanische Stabilität des Parenchyms zukommt. Je nach Gewebe, in dem sie entdeckt wurden, werden GAG unterschiedlich bezeichnet, z.B. Chondroitinsulfat aus dem Knorpel, Dermatansulfat aus der Dermis, Keratansulfat aus der Kornea oder Heparansulfat aus der Leber. Prinzipiell kommen jedoch alle GAG-Arten in allen Geweben vor [2].

Chondroitinsulfat, das für diese Arbeit von besonderer Bedeutung ist, kann enzymatisch durch das Enzym Chondroitinase ABC aus *Proteus vulgaris* in seine Einzelbausteine Glucuronsäure und N-Acetylgalactosamin gespalten werden [14].

Hyaluronan ist eines der größten GAG und im Gegensatz zu anderen weder sulfatiert noch proteingebunden. Es bildet durch sein enormes Volumen eine gelartige Struktur in wässrigem Milieu und hat vor allem mechanische Pufferfunktion [2].

Proteoglykane bestehen als Makromoleküle aus einem geringen Proteinanteil, dem zentralen *core*-Protein, an das viele GAG (Kohlenhydratanteil) kovalent gebunden sind. PG sind nicht nur essentieller Bestandteil der EZM, sondern auch von Basallaminae und spielen als Zelloberflächenmoleküle eine wichtige Rolle in verschiedensten biologischen Prozessen [2].

1.1.4 Epithelial-mesenchymale Transition

Epithelial-mesenchymale Transition beschreibt den Prozess der biochemischen und morphologischen Konversion von Epithelzellen in mesenchymale Zellen, der vor allem *in vitro* ausführlich beschrieben wurde [15-17]. Dabei kommt es zu einem Verlust epithelialer Grundeigenschaften, wie z.B. der Zellpolarität oder der Anheftung an die Basalmembran sowie zur Herunterregulation epithelialer Marker wie Cytokeratin oder E-Cadherin. Gleichzeitig akquirieren die Zellen morphologisch sowie funktionell mesenchymale Eigenschaften, wie z.B. ein fibroblastenähnliches Aussehen, eine verstärkte Migrationsfähigkeit, EZM Produktion oder die Expression mesenchymaler Marker wie Vimentin, α SMA und FSP-1 [16, 17].

Die Frage, ob EMT als Ursprung von Myofibroblasten in pathologischen Prozessen wie der tubulointerstitiellen Fibrose *in vivo* eine Rolle spielt oder lediglich ein *in vitro* Phänomen ist, ist in der Literatur derzeit Gegenstand intensiver Debatte [12, 18, 19].

1.2 Kalziumhomöostase

Kalzium (Ca^{2+}) erfüllt im Organismus verschiedenste wichtige Funktionen. So ist es Hauptbestandteil der mineralischen Knochensubstanz sowie der Zähne und wichtiger Kofaktor bei der Blutgerinnung. Intrazellulär dient Kalzium der Signaltransduktion als Second messenger und spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Aktin- und Myosinfilamenten im Rahmen der Muskelkontraktion sowie bei der Freisetzung von Vesikeln in Synapsen oder beim Prozess des programmierten Zelltodes. Auch bei der Erregungsweiterleitung ist Kalzium von Bedeutung, beispielsweise bei der Entstehung der Plateauphase des Aktionspotentials in Herzmuskelzellen. Ermöglicht wird diese Vielfalt an Funktionen durch einen sehr großen Konzentrationsgradienten von freiem Kalzium im EZR (1 mmol/l) im Vergleich zum IZR (10^{-4} mmol/l), was nur durch fein abgestimmte Regulationsmechanismen aufrecht erhalten werden kann [1].

Etwa die Hälfte des extrazellulären Kalziums liegt proteingebunden vor, die andere Hälfte steht als freies, biologisch aktives Kalzium für biochemische Reaktionen zur Verfügung [20]. Das Zusammenwirken von Knochen, Darm und Niere gewährleistet eine konstante Kalziumhomöostase. Der Knochen dient hierbei als Hauptspeicherort für Kalzium, während Niere und Darm sowohl für die Aufnahme als auch die

Ausscheidung von Kalzium verantwortlich sind. Einen wesentlichen Einfluss auf diese Prozesse haben die Hormone Calcitriol (aus dem Vitamin D), Parathormon sowie Calcitonin [21].

In der Niere stellt der oben beschriebene proximale Tubulus den Hauptresorptionsort für Kalzium dar [21]. Hier werden bereits ca. 65 % des filtrierten Kalziums aus dem Primärharn auf parazellulärem Wege resorbiert, was enorme Anforderungen an das umgebende Interstitium stellt. Bereits bei geringfügigen Veränderungen kann es hier zu Präzipitation von Kalzium und Phosphat und somit zu einer Nephrokalzinose kommen, was letztlich zu irreversibler Parenchymschädigung bis hin zu einer Niereninsuffizienz führen kann [22].

1.2.1 Regulation der intrazellulären freien Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$

Auf intrazellulärer Ebene bildet das endoplasmatische Retikulum (ER) neben den Mitochondrien den Hauptspeicherort für Ca^{2+} [23]. Die Regulation der intrazellulären freien Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ erfolgt durch zwei verschiedene Mechanismen: 1. durch membranständige Kanäle und Transportproteine, die Ca^{2+} direkt über Membranen entweder zwischen EZR und IZR oder zwischen IZR und Kompartimenten der Zelle transportieren; 2. über (lösliche) kalziumbindende Proteine, die sowohl Pufferfunktion als auch Signalfunktion haben, sogenannte Kalziumsensoren oder EF-Hand Proteine [24]. Aus letzterem wurde das Konzept abgeleitet, dass nicht Kalzium selbst Signale überträgt, sondern die Vermittlung über einen Kalziumsensor, welcher nach Konformationsänderung an die Zielstruktur bindet, für die Signaltransduktion entscheidend ist [24].

1.2.1.1 Membranständige Kalziumkanäle und Transporter

Ein Kalziumsignal bezeichnet eine kurzzeitige reversible Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ (Kalziumtransient) entweder durch Kalziumeinstrom aus dem EZR oder durch Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} Speicher. Man unterscheidet drei Hauptarten von Kalziumkanälen in der Zellmembran, durch die Ca^{2+} in den IZR gelangen kann: spannungsabhängige Kanäle (engl. *voltage operated channels*, VOCs), rezeptorgekoppelte Kanäle (engl. *receptor operated channels*, ROCs) und speichergekoppelte Kanäle (engl. *store-operated channels*, SOC) (Abbildung 4) [25].

VOCs kommen hauptsächlich in erregbaren Zellen der Muskulatur und des Nervensystems vor.

Zu den ROCs zählen beispielsweise P2X-Rezeptoren, die durch ATP-Bindung eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ auslösen. Eine genauere Erläuterung hierzu erfolgt in Kapitel 1.3.

Abbildung 4 zeigt exemplarisch eine Auswahl der verschiedenen Transporter und Kanäle, die an der Entstehung und Beendigung eines intrazellulären Kalziumsignals beteiligt sind.

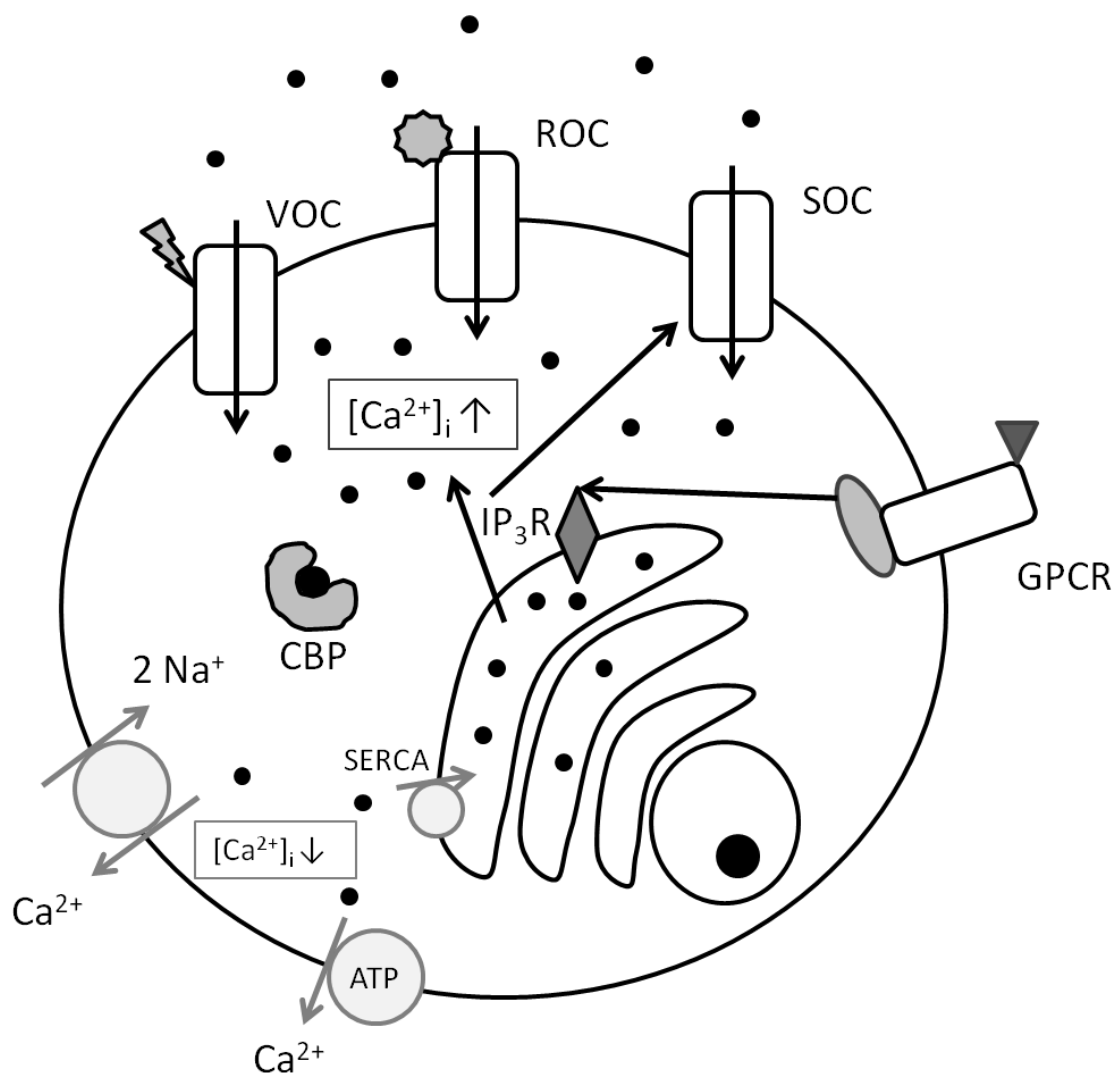


Abbildung 4: Auswahl verschiedener Kanäle und Transporter, die an der intrazellulären Kalziumsignaltransduktion beteiligt sind. Obere Bildhälfte: Die Entstehung eines intrazellulären Kalziumsignals ist entweder durch VOC (voltage operated channels), ROC (receptor operated channels), SOC (store operated channels) oder GPCR (G-protein coupled receptors) möglich. Letztere aktivieren IP₃R (Inositoltriphosphat-Rezeptoren) am ER und führen dadurch zum Kalziumeinstrom ins Cytosol. CBPs (Calcium binding proteins) übersetzen die Kalziumsignale durch Bindung an weitere Zielstrukturen und üben zusätzlich Pufferfunktion für Kalzium aus. Untere Bildhälfte: Beendigung eines intrazellulären Kalziumsignals durch verschiedene, teils ATP-abhängige Mechanismen, wie z.B. SERCA (sarco-/endoplasmatisches reticulum Ca²⁺-ATPase). Die schwarzen Punkte stellen Kalziumionen dar.

Der Hauptmechanismus für Kalziumeinstrom aus dem EZR in nicht erregbaren Zellen, wie z.B. Epithelzellen, erfolgt sekundär getriggert nach Entleerung intrazellulärer Speicher und wird als *store-operated calcium entry* (SOCE) bezeichnet [26]. SOCE wird durch eine Reihe verschiedener Ca^{2+} permeabler Kanäle mit unterschiedlichen Eigenschaften ermöglicht, darunter *store-operated calcium channels* (SOCCs) und *calcium release-activated calcium channels* (CRAC) [27]. Da SOCC- und CRAC-Kanäle durch Depletion intrazellulärer Kalziumspeicher aktiviert werden, dient der Einstrom von Ca^{2+} aus dem EZR (früher als kapazitiver Kalziumeinstrom bezeichnet) unter anderem zur Wiederauffüllung der intrazellulären Kalziumspeicher [25, 28]. Dabei dient das Protein STIM als Ca^{2+} Sensor und übermittelt das Signal an die Kanäle der Plasmamembran über die Untereinheit Orai [26, 28-30].

Ca^{2+} Freisetzung aus intrazellulären Speichern (ER) wird in nicht-erregbaren Zellen durch Inositoltriphosphat-Rezeptoren (IP_3R) vermittelt, die zu den second messenger-gesteuerten Kalziumkanälen zählen und durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (*GPCR*, *G-Protein coupled receptors*) aktiviert werden (siehe Abbildung 4) [23].

Um die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach einem Kalziumsignal wieder auf normale Ruhewerte zu senken stehen der Zelle mehrere Mechanismen zur Verfügung. Dazu gehören neben dem sekundär aktiven $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter der Plasmamembran verschiedene Ca^{2+} -ATPasen (siehe Abbildung 4), die an unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle lokalisiert sind. Bislang sind drei Arten von Ca^{2+} -ATPasen bekannt: SERCA, SPCA und PMCA. SERCA (*sarco-/endoplasmatic reticulum Ca^{2+} -ATPase*) ist in der Membran des sarkoplasmatischen/endoplasmatischen Retikulums lokalisiert, SPCA (*secretory pathway Ca^{2+} -ATPase*) befindet sich in der Membran des Golgi-Apparates und PMCA (*plasma membrane Ca^{2+} -ATPase*) in der Plasmamembran. Alle drei befördern Ca^{2+} aktiv unter ATP-Verbrauch aus dem IZR in das entsprechende Kompartiment und senken so die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [24].

1.2.1.2 Intrazelluläre kalziumbindende Proteine

Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch ein Kalziumsignal (Ca^{2+} -Transient) bewirken eine Reihe unterschiedlicher zellulärer Veränderungen. Eine Schlüsselrolle bei der Übersetzung solcher Signale spielen kalziumbindende Proteine (engl. *calcium-binding proteins*, *CBPs*) [31]. Daneben haben CBPs auch eine wichtige Pufferfunktion für

intrazelluläres freies Kalzium (siehe auch Abbildung 4). Zu den CBPs gehören unter anderem Calmodulin, Calbindin, Calretinin, Parvalbumin und viele weitere [32].

1.3 Purinerge Signaltransduktion

Membranständige Purinrezeptoren (P2-Rezeptoren) werden ubiquitär auf nahezu allen Zellen (sowohl erregbaren als auch nicht erregbaren) exprimiert und sind in einer Vielzahl von biologischen Prozessen involviert. In transportierenden Epithelien spielen sie u.a. bei der Regulation von epithelialem Transport oder dem Zellvolumen eine wichtige Rolle [33]. Man unterscheidet zwei Arten von P2-Rezeptoren: P2X-Rezeptoren und P2Y-Rezeptoren. Für beide Arten sind die Nukleotide ATP, ADP, UTP und UDP Agonisten von jeweils unterschiedlicher Affinität [34].

Bislang sind sieben verschiedene Arten von ionotropen P2X-Rezeptoren bekannt. P2X-Rezeptoren gehören als ligandengesteuerte Ionenkanäle zur Klasse der ROCs (siehe Kapitel 1.2.1.1), die fast ausschließlich auf ATP als Stimulus reagieren. Nach ATP-Bindung werden sie unselektiv permeabel für mono- und divalente Kationen, z.B. Na^+ , K^+ , Ca^{2+} . Daraus resultiert ein Anstieg des Membranpotentials und eine Erhöhung der freien intrazellulären Kalziumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [35, 36]. In erregbaren Zellen (Nerven- und Muskelzellen) ist dies jedoch nur zum Teil bedingt durch den Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} durch den geöffneten P2X-Rezeptor. Den Hauptanteil am Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ besitzen bei diesen Zellen sekundär aktivierte VOCs, die einen Ca^{2+} Einstrom aus dem EZR hervorrufen [34].

Metabotrope P2Y-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die hauptsächlich auf ATP, jedoch auch auf andere Nukleotide reagieren (s.o.). Bislang sind acht verschiedene Subtypen von P2Y-Rezeptoren bekannt. Bei G_q -gekoppelten P2Y-Rezeptoren (P2Y_1 , P2Y_2 , P2Y_4 , P2Y_6 , P2Y_{11}) wird durch Aktivierung der Phospholipase C Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) gebildet [37]. IP_3 führt zu einer Kalziumausschüttung aus dem ER und DAG aktiviert die Proteinkinase C, welche weitere Zielstrukturen phosphoryliert.

Nach Aktivierung von P2X- und P2Y-Rezeptoren in Epithelzellen durch ATP kommt es zu einer reversiblen Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Dabei zeigt der entstehende Ca^{2+} -Transient einen biphasischen Verlauf, wie in Abbildung 5 dargestellt. Zunächst kommt es zu

einem schnellen, steilen Anstieg bis zu einem Maximum (engl. *peak response*) durch Entleerung intrazellulärer Kalziumspeicher durch P2Y-Rezeptorstimulation sowie durch Kalziueinstrom aus dem EZR durch P2X-Rezeptoren [38]. Darauf folgt ein moderater Abfall der $[Ca^{2+}]_i$, die sich dann auf einem erhöhten Niveau für die restliche Dauer der ATP-Gabe einpendelt. Diese Plateauphase resultiert hauptsächlich aus dem Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum durch SOCE. Nach Beendigung der ATP-Applikation sinkt die $[Ca^{2+}]_i$ wieder annähernd auf den Ausgangswert [38]. Dies wird durch die oben beschriebenen Ca^{2+} -ATPasen und Antiporter realisiert.

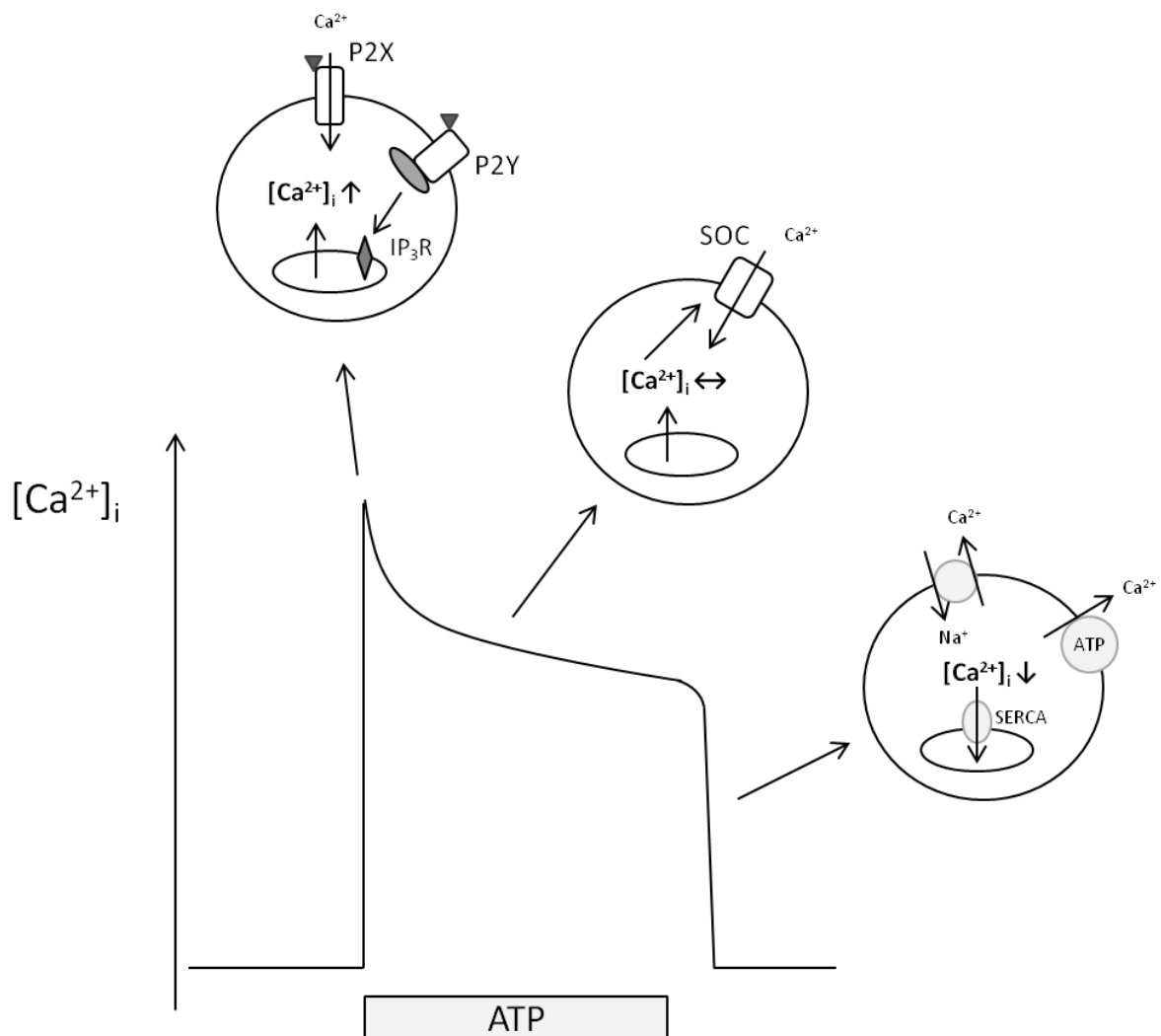


Abbildung 5: Typischer ATP-induzierter Kalziumtransient in nicht-erregbaren Zellen. Zu Beginn der Stimulation kommt es zu einem schnellen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ bis zu einem Maximum durch P2X-abhängigen Kalziueinstrom aus dem EZR und Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} Speicher nach Aktivierung G-Protein-gekoppelter P2Y-Rezeptoren. Darauf fällt die $[Ca^{2+}]_i$ wieder etwas ab um auf einem annähernd konstanten Plateau zu verharren (SOCE). Erst nach Entzug des Agonisten kehrt die $[Ca^{2+}]_i$ wieder auf das Ausgangsniveau zurück durch verschiedene Exportmechanismen für Kalzium.

1.4 Fam20a und das Enamel-Renal-Syndrome

Das Protein Fam20a ist ein sezerniertes Glykoprotein aus einer hochkonservierten Proteinfamilie mit dem offiziellen Namen Fam20 (engl. *family with sequence similarity 20*), zu der auch die Proteine Fam20b und Fam20c gehören. Allen gemeinsam ist eine große Ähnlichkeit in einer konservierten Kinase-Aminosäuredomäne am C-terminalen Ende der Proteine [39].

Die Expression von Fam20a wurde erstmals in einer myeloischen Zelllinie beschrieben, wo dem Protein eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Proliferation während der Hämatopoese zugeschrieben wird [39]. Auch in anderen Geweben wird Fam20a in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert, u.a. in Lunge, Leber, Thymus, Ovar, Hoden und in der Niere [39, 40]. Entlang des Nephrons ist die Fam20a Expression im proximalen Tubulus am größten (unveröffentlichte Daten, Physiologisches Institut der CAU Kiel, AG Bleich).

Aus funktioneller Sicht war über Fam20a bislang deutlich weniger bekannt, als über Fam20b und Fam20c. Durch molekulargenetische Untersuchungen ist es in den letzten Jahren gelungen, Mutationen im Fam20a-Gen als eine Ursache des Krankheitsbildes der Amelogenesis imperfecta (AI) zu identifizieren [41]. AI kann isoliert oder syndromal entweder als sogenanntes *Amelogenesis imperfecta and gingiva fibromatosis syndrome* (AIGFS) oder als *Enamel-Renal-Syndrome* (engl. *enamel*: Zahnschmelz) (ERS) auftreten [40-43]. Das sehr seltene Enamel-Renal-Syndrome beschreibt einen Symptomkomplex aus Amelogenesis imperfecta und Nephrokalzinose (NC), während beim AIGFS die Nierenbeteiligung fehlt [43]. Bislang sind über 20 verschiedene Mutationen im Fam20a-Gen bekannt, die diese autosomal-rezessiven Syndrome verursachen [40-42, 44, 45].

Symptome der AI sind u.a. Zahnfehlbildungen, die sich in fehlerhafter Zahnschmelzbildung, gestörtem Zahndurchbruch, Gingivahyperplasie, ektooper Kalzifizierung der Pulpa und Gingiva äußern und bereits in der Kindheit zu Tage treten [43]. Die Nephrokalzinose manifestiert sich bei Patienten mit ERS hingegen erst in der Adoleszenz bis ins junge Erwachsenenalter, wobei die Blutwerte für Kalzium und Phosphat jedoch normal bleiben [43, 44]. Interessanterweise kommt es auch nicht zu gesteigerter Kalziumausscheidung im Urin, sondern vielmehr zu einer Hypokalziurie

[43]. Die NC bei Patienten mit ERS stellt sich sonographisch oder CT-morphologisch als bilaterale medulläre interstitielle Nephrokalzinose dar. Bei Biopsien des renalen Kortex zeigten sich fokal sklerosierte Glomeruli, periglomeruläre Fibrose sowie Infiltrate des renalen Interstitiums durch Lymphozyten und Plasmazellen [43].

Zur genaueren Untersuchung der Proteinfunktion und für weiterführende funktionelle Studien wurden in den letzten Jahren Fam20a KO-Mausmodelle gezüchtet. Die Befunde bezüglich ektoper Kalzifizierungen der Gingiva bei ERS Patienten, die sich vergleichbar in Fam20a-KO Mäusen wiederfanden, weisen auf die potentielle Rolle von Fam20a bei der Biomineralisation hin [42, 44, 46, 47]. Interessanterweise ist die Nephrokalzinose jedoch im Mausmodell nicht nachweisbar (eigene Beobachtung).

1.4.1 Fam20b und Fam20c

Fam20b ist eine Xylose Kinase im Golgi-Apparat, welche Xylose-Reste an Glykosaminoglykanen phosphoryliert und so deren Anheftung an Proteine ermöglicht. Dadurch reguliert Fam20b sowohl das Sulfatierungsmuster von Chondroitinsulfatketten als auch die Gesamtmenge der produzierten GAGs in einer Zelle [48]. Fam20b interagiert weder mit Fam20a noch mit Fam20c [49].

Fam20c ist der am besten erforschte Vertreter der Fam20 Proteinfamilie. Fam20c (auch Golgi Casein Kinase genannt) ist die wichtigste Proteinkinase im Golgi Apparat, die ca. 80 % des gesamten sezernierten Phosphoproteoms phosphoryliert [50]. Substrate von Fam20c sind in ein weites Spektrum von biologischen Prozessen involviert, darunter die Bildung von Knochen und Zähnen [51]. Erstmals beschrieben wurde die Kinasefunktion von Fam20c für die Phosphorylierung Ca^{2+} bindender sezernierter Proteine, die von essentieller Bedeutung für die Biomineralisation sind, z.B. SIBLINGs (*small Integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins*) [51, 52]. Daneben ist Fam20c auch für die Regulierung des Phosphathaushaltes über FGF23 verantwortlich, einem Protein, das die renale Phosphatausscheidung entscheidend kontrolliert [53]. Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Fam20c in KO Mäusen zu einer signifikanten Hypophosphatämie bei starker Hochregulation von FGF23 führt [53].

Autosomal rezessive Genmutationen im Fam20c-Gen verursachen sehr seltene Formen von osteosklerotischer Knochendysplasie, auch als Raine Syndrom bekannt.

In der letalen Form des Raine Syndroms kommt es zu schweren kraniofazialen Missbildungen sowie Deformität des Thorax mit konsekutiver respiratorischer Insuffizienz, wodurch die Neugeborenen nur wenige Stunden überleben [54]. Ursächlich hierfür sind eine radiologisch nachgewiesene generelle Erhöhung der Knochendichte aller Knochen sowie eine verstärkte Ossifikation des Schädels [54, 55]. Bei Patienten, die an der nicht-letalen Form des Raine Syndroms leiden, zeigen sich zum Teil ähnliche Symptome wie beim ERS, z.B. Zahnanomalien im Sinne einer AI sowie ektope intrakranielle, renale und gingivale Kalzifizierungen [56].

Die Ähnlichkeit der Zahnfehlbildungen bei Fam20a und Fam20c Mutationen ließ sich auch bei Vergleichen von Fam20a und Fam20c KO im Mausmodell beobachten [46]. Jedoch konnten Vogel und Hansen et al. zeigen, dass sich bei Fam20a KO Mäusen ektope Kalzifizierungen insbesondere in den renalen Blutgefäßen und in der Lunge fanden, was hingegen bei Fam20c KO Mäusen nicht nachweisbar war [46]. Ebenso zeigten Fam20c KO Mäuse eine hypophosphatämische Rachitis, welche sich bei Fam20a KO Mäusen nicht fand [46, 53]. Im Gegenteil, die Blutwerte der Fam20a KO Mäuse für Ca^{2+} und Phosphat waren durchweg normal [46].

1.4.2 Molekulare Funktion von Fam20a

Noch bis vor kurzem war die molekulare Funktion von Fam20a unbekannt. 2015 konnten Cui et al. zeigen, dass Fam20a eine Pseudokinase ist, die einen Komplex mit Fam20c bildet, dieses dadurch aktiviert und so die Fam20c-abhängige Phosphorylierung sezernierter Proteine verstärkt [49]. Fam20a hat selbst keine intrinsische katalytische Aktivität, kann ATP binden aber nicht hydrolysieren. Die Bindung von ATP erfolgt hierbei im Unterschied zu allen anderen bekannten Kinasen in inverser Ausrichtung des Moleküls sowie kationenunabhängig [57]. Zusammen mit Fam20c bildet Fam20a einen heterotetrameren Komplex aus je zwei Molekülen Fam20c und Fam20a. Dieser Komplex ist in der Lage, die Phosphorylierung von Proteinen des sekretorischen Weges deutlich effektiver zu katalysieren als Fam20c allein [49]. Es konnte sogar *in vitro* gezeigt werden, dass die Überexpression von Fam20a Mutationen des Fam20c Proteins stabilisieren kann und so die katalytische Aktivität selbst von defektem Fam20c-Protein erhöhen kann. Dies wäre ein möglicher therapeutischer Ansatz für Patienten, die an solchen Fam20c Mutationen im Sinne

eines nicht-letalen Raine Syndroms leiden [49]. Umgekehrt konnte Fam20c jedoch bei Vorliegen von defektem oder ganz fehlendem Fam20a weder aktiviert noch sezerniert werden [49, 58].

In der Literatur herrscht aktuell eine kontroverse Debatte darüber, ob Fam20 Proteine, insbesondere Fam20c, tatsächlich unter physiologischen Bedingungen sezerniert werden, oder ob dies nur ein Artefakt durch ektope Expression und Überexpressionsexperimente ist [59, 60]. Zudem ist bislang nicht geklärt, ob Fam20c auch extrazellulär Kinasefunktion ausübt, oder ob die Proteinphosphorylierung nur im Golgi-Apparat stattfindet [60]. Nun konnte eine neue Studie zeigen, dass Fam20a tatsächlich die Sekretion von Fam20c in den EZR kontrolliert und damit eine wichtige Funktion bei der Regulation der Fam20c-Lokalisation hat [58]. Gemäß diesen Ergebnissen trägt Fam20a entscheidend zur extrazellulären Funktion von Fam20c in mineralisierten Geweben bei, zu der u.a. die Förderung der Differenzierung von Osteoblasten und die Osteoblasten-vermittelte Knochenmineralisation gehört [53, 58].

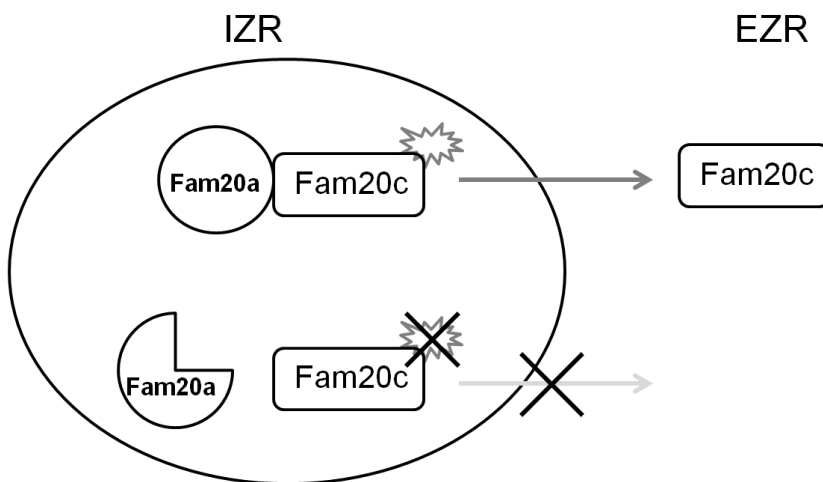


Abbildung 6: schematische Darstellung der Fam20a-Fam20c-Interaktion und Fam20c Sekretion [58]. Fam20a bindet Fam20c und aktiviert dadurch dessen Kinasefunktion. Durch die Bindung von Fam20a wird zudem die Sekretion von Fam20c ermöglicht. Ist Fam20a durch Mutation defekt oder fehlt es ganz, wie im KO-Mausmodell, unterbleibt sowohl die Aktivierung als auch die Sekretion von Fam20c.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Oft dienen seltene genetische Erkrankungen der Erforschung grundlegender physiologischer Mechanismen in der Zellbiologie [42]. Exemplarisch hierfür kann die Entdeckung von Mutationen im Fam20a Gen bei der autosomal-rezessiven genetischen Erkrankung des Enamel-Renal-Syndroms angesehen werden, die auf neue Erkenntnisse im Bereich der Biomineralisation und Kalziumhomöostase hoffen lässt. Dabei kommt es vereinfacht zur Fehlregulation von Kalzifizierungsprozessen mit der Folge einer interstitiellen Nephrokalzinose.

Aus dem bisherigen Stand der Literatur und vorangegangener, noch nicht veröffentlichter Experimente ergeben sich folgende übergeordnete Hypothesen:

Fam20a beeinflusst die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (EZM) im renalen Interstitium und deren Kalziumbindungskapazität.

Fam20a als intrazelluläre Pseudokinase beeinflusst die intrazelluläre Kalziumhomöostase und Signaltransduktion.

In der vorliegenden Arbeit sollen daher folgende Unterhypothesen untersucht werden:

Die geringere Kalziumpufferkapazität der EZM in Abwesenheit von Fam20a wirkt sich auf den Kalziumhaushalt der Zelle und die intrazelluläre Ca^{2+} Signaltransduktion aus.

Als Modellgewebe dienten hierfür Fam20a KO- und WT-Primärzellkulturen sowohl des epithelialen als auch des mesenchymalen Anteils der Niere und eine etablierte Zelllinie des proximalen Tubulus mit supprimierter Fam20a-Expression. Als experimenteller Ansatz wurden intrazelluläre Kalziummessungen in den Modellgeweben durchgeführt. Folgende Fragen sollten mit Experimenten an diesen Zellkulturen beantwortet werden:

Bestehen primär Unterschiede in der $[\text{Ca}^{2+}]_i$?

Gibt es einen Unterschied in der ATP-induzierten Signaltransduktion?

Verändert sich der Kalziumtransient in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} ?

Hat die enzymatische Veränderung der EZM mit Chondroitinase einen Einfluss auf die genannten Parameter?

2. Material & Methoden

2.1 Chemikalien

Die nachfolgend verwendeten Chemikalien stammen, falls nicht anderweitig gekennzeichnet, von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland).

2.2 Lösungen

2.2.1 Tubuluspräparation

Tabelle 2 Basis-Lösung

Stoff	Konzentration [mmol/l]
NaCl	140
KH ₂ PO ₄	0,4
K ₂ HPO ₄	1,6
MgSO ₄	1
Na-Acetat	10
α-Ketoglutarat	1
Ca-Glukonat	1,3
In H ₂ O	
pH-Einstellung auf 7,4 mittels NaOH/HCl	

Tabelle 3 Inkubationslösung

Stoff	Konzentration [mg/100 ml]
DNAse I	2,5
Glycin	37,5
Trypsin-Inhibitor	4,8
In Basis-Lösung, steril filtriert	

Tabelle 4 Sortierlösung

Stoff	Konzentration [mg/100 ml]
Albumin	50
In Inkubationslösung, sterilfiltriert	

2.2.2 Fura 2-AM Messungen

Tabelle 5 Kontroll-Lösung

Stoff	Konzentration [mmol/l]
NaCl	145
KH ₂ PO ₄	0,4
K ₂ HPO ₄	1,6
Glucose	5
MgCl ₂	1
Ca-Gluconat	1,3
pH-Einstellung auf 7,4 mittels NaOH/HCl	

Tabelle 6 kalziumfreie Lösung

Stoff	Konzentration [mmol/l]
NaCl	145
KH ₂ PO ₄	0,4
K ₂ HPO ₄	1,6
Glucose	5
MgCl ₂	1
EGTA	5
pH-Einstellung auf 7,4 mittels NaOH/HCl	

2.3 Zellkultur LLC-PK₁ Zellen

LLC-PK₁ Zellen, eine aus Schweinenieren präparierte und etablierte proximale Tubulus-Zelllinie, wurde bei 37 °C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ in einem Heracell CO₂ Inkubator (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) kultiviert. Die verwendeten LLC-PK₁ Zellen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Robert Kleta (Nephrology, University College London, GB) stabil mit einem siRNA-Konstrukt transfiziert und in Selektionsmedium (s.u.) kultiviert. Linie 1 diente als Kontrolle mit unspezifischer siRNA, Linie 4 wurde mit Fam20a-spezifischer siRNA transfiziert und diente als Knockdown (KD).

Die Kontrolle der KD-Effizienz erfolgte durch Expressionsanalyse von Fam20a in beiden Zelllinien und wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Robert Kleta in London mittels semiquantitativer RT-PCR (*engl. real time polymerase chain reaction*) durchgeführt.

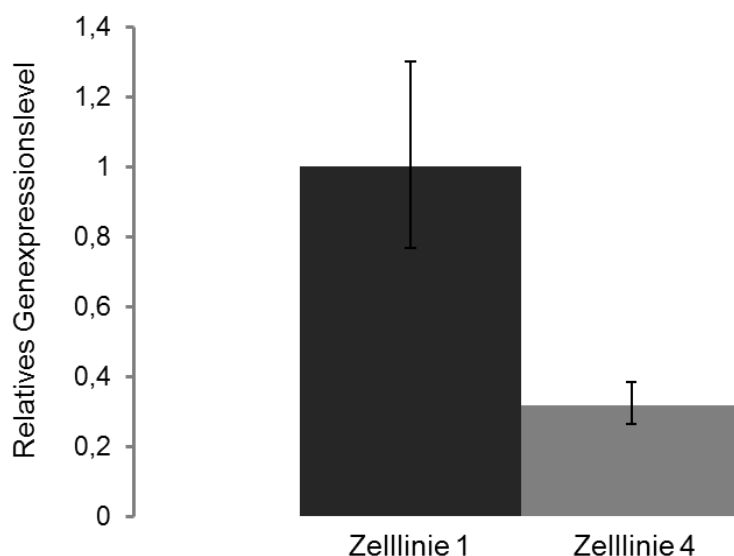


Abbildung 7: Ergebnis RT-PCR: die relative Genexpression von Fam20a in KD-Zellen (Zelllinie 4) ist im Vergleich zu Kontrollzellen (Zelllinie 1) um ca. 70 % vermindert

Wie in Abbildung 7 erkennbar, ist das Expressionsniveau von Fam20a in Zelllinie 4 um ca. 70 % reduziert im Vergleich zu Zelllinie 1. Zelllinie 4 stellt somit zwar kein optimales Modell dar, jedoch wird die Reduktion der Fam20a Expression als ausreichend angesehen, um die Zellen für experimentelle Zwecke als KD-Modell zu verwenden.

Als Kulturmedium wurde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) high glucose glutamax (4,5 g/l Glucose, PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D) mit folgenden Zusätzen verwendet: 10 % fetales Kälberserum (FCS Gold), 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 3 % Puromycin. Letzteres diente der Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks auf die permanent transfizierten KD-Kulturen. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

Nach Erreichen von 90 % Konfluenz wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen (Sterilbank Herasafe, Heraeus, Hanau, D) passagiert. Hierfür wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit vorgewärmter kalzium- und magnesiumfreier DPBS-Lösung (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D) gewaschen und anschließend mit der Enzymlösung Accutase (PAN-Biotech) für ca. 15 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen in 8 ml DPBS-Lösung aufgenommen, in dem sie geschwenkt und auf- und abpipettiert wurden, um sie vom Boden der Kulturflasche zu lösen. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 800 U/min (Umdrehungen pro Minute) 11 min lang zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das entstandene Zellpellet in vorgewärmtem Medium resuspendiert. Zur Kulturerhaltung wurden die Zellen mit einer Dichte von ca. 400.000 Zellen in eine 75 cm² Kulturflasche ausgesät.

Für Fura 2-AM Messungen wurden die Zellen in 35 x 10 mm Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht, D) auf Deckgläser (22 mm Ø) mit einer Dichte von ca. 54.000 Zellen ausgesät und bis zum Erreichen von 50-70 % Konfluenz kultiviert.

2.4 Tubuluspräparation

Als Versuchstiere dienten weibliche 12-20 Wochen alte Fam20a Wildtyp- (WT) und Knockout- (KO) Mäuse.

Die Präparation und Isolation der proximalen Tubuli (PT) wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Nina Himmerkus (Physiologisches Institut, CAU Kiel) durchgeführt.

Nach Betäubung des Versuchstiers mit 5 % Isofluran (Abbott GmbH, Wiesbaden, D) erfolgte eine mediane Laparotomie mit Eröffnung der infrarenalen Aorta und Einlage eines Perfusionskatheters. Darüber wurde eine Perfusion beider Nieren mit erwärmter Enzymlösung A (Collagenase II 1 mg/ml PAN-Biotech, in Inkubationslösung) vorgenommen, wobei ein deutliches Abblassen des Nierenparenchyms zu sehen war.

Nach bilateraler Nephrektomie wurde der Exitus mittels medianer Thorakotomie und Entbluten herbeigeführt. Die Nierenkapsel wurde entfernt und mittels Skalpell dünne Transversalschnitte des Parenchyms angefertigt, wobei die Nierenpole verworfen wurden.

Zum weiteren enzymatischen Verdau wurde das Material 10 min bei 37 °C in einem Thermomixer (Compact, Eppendorf, Hamburg, D) bei 850 Schwingungen pro Minute inkubiert und der Überstand mit den darin enthaltenen Tubuli in 1 ml gekühlte Sortierlösung überführt (Ansatz 1). Durch Zugabe von wiederholt je 1 ml frischer erwärmter Inkubationslösung zum verbliebenen Verdauansatz erfolgte ein weiterer enzymatisch-mechanischer Aufschluss in 3 fünfminütigen Zyklen (Ansatz 2-4), wobei jedes Mal der Überstand abgenommen und in 1 ml frische Sortierlösung überführt und auf Eis gekühlt wurde.

Anschließend wurde die Tubulussuspension zweimal für 5 min gewaschen. Schwerkraftbedingt sanken die Tubulussegmente und kleine Bruchstücke wie z.B. kleine Tubulusfragmente oder Gefäßreste dabei schneller ab als Einzelzellen (Erythrozyten, Fibroblasten, Epithelzellen...). Für die mprMC Kultur (*engl. mprMC = murine primary renal mesenchymal cells*, siehe 2.4.2) wurde nach fünfminütiger Wartezeit der erste Überstand von Ansatz 1-3 asserviert und in einem 2 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Die restlichen Überstände, sowie Ansatz 1 wurden verworfen. Die Ansätze 2-4 wurden bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Die Isolierung der proximalen Tubuli erfolgte aus Ansatz 2-4 nach morphologischen Kriterien unter einem Stereomikroskop (MZ16, Leica, Wetzlar, D) unter kontinuierlicher Kühlung des Objekttisches auf 4 °C. Dazu wurde das heterogene Gemisch aus Tubulussegmenten in den Deckel einer 35 x 10 mm Petrischale in 3 ml Sortierlösung überführt. Mithilfe einer geschliffenen Pinzette wurden die proximalen Tubuli vorsichtig isoliert und mit einer Transferpipette zum weiteren Verdau in Enzymgemisch B überführt. Der Tubulus-Enzymansatz wurde kontinuierlich bei 37 °C mit 850 Schwingungen pro Minute geschüttelt. Enzymgemisch B setzte sich zusammen aus 2,2 mg/ml Collagenase II (Roche Diagnostics GmbH) sowie 2,5 mg/ml Hyaluronidase (Serva, Heidelberg, D) in vorgewärmter Inkubationslösung. Insgesamt wurden über einen Zeitraum von 2 Stunden proximale Tubuli gesammelt und die so entstandene

Tubulussuspension zur finalen enzymatischen Aufarbeitung für weitere 30 min bei 37 °C in Enzymlösung B geschüttelt.

Anschließend wurden die angedauten PT-Fragmente dreimal bei Raumtemperatur gewaschen, wobei der Überstand jeweils nach zehnminütiger Sedimentationszeit verworfen und durch Sortierlösung ersetzt wurde. Im letzten Schritt wurden ca. 200 µl Sortierlösung mit den darin enthaltenen proximalen Tubuli zurückbehalten.

2.4.1 Zellkultur muriner primärer proximal tubulärer Epithelzellen (mpPTEC)

Die 200 µl Lösung mit den darin enthaltenen proximalen Tubulusfragmenten wurde gleichmäßig à 9 µl auf 20 vorbereitete Kulturschälchen verteilt. In jedem Schälchen befanden sich 2 ml Kulturmedium und ein rundes Deckglas am Boden, auf dessen Mitte das Tubulusgemisch pipettiert wurde.

Das Kulturmedium für mpPTEC bestand aus DMEM low glucose (1 g/l Glucose, PAN-Biotech), dem 10 % fetales Kälberserum, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 1 % ITS 1 (ITS 1 100x = Insulin-Transferrin-Natriumselenit, PAN-Biotech) zugesetzt wurden. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 8 % CO₂.

Um eine ungestörte Desintegration der Basalmembran mit Auswachsen der Tubulusfragmente zu Einzelzellen in der Mitte des Deckglases zu gewährleisten, wurden die Petrischalen für 48 h ungestört im Inkubator belassen und nicht bewegt. Nach 2 Tagen wurde erstmals eine optische Erfolgskontrolle am Mikroskop vorgenommen und das Auswachsverhalten in verschiedenen Stadien fotodokumentiert. Die Zellen werden nun als mpPTEC (*engl. murine primary proximal tubular epithelial cells*) bezeichnet.

Nach 5-6 Tagen war das Auswachsen so weit vorangeschritten, dass Messungen der intrazellulären Kalziumaktivität mittels Fura-2 mit den Zellen durchgeführt werden konnten.

2.4.2 Zellkultur muriner primär renaler Mesenchymzellen (mprMC)

Wie in 2.4 beschrieben, wurde direkt nach dem ersten enzymatischen Verdau ein Gemisch aus verschiedensten Zellarten aus der Niere gewonnen, z.B. Epithelzellen, Mesangiumzellen, Endothelzellen und Fibroblasten.

Nach Resuspension mit 2 ml gekühlter Sortierlösung und einer zehnminütigen Wartezeit, in der die Einzelzellen auf den Boden des Reaktionsgefäßes absanken, wurde jeweils der obere 1 ml durch frische gekühlte Sortierlösung ersetzt. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein zuvor autoklaviertes Netz mit 64 µm Maschenweite mithilfe einer 1 ml Spritze filtriert, um größere Tubulusfragmente zurückzuhalten und bei 500 U/min 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellpellet in 1 ml erwärmtem Kulturmedium (Zusammensetzung wie bei mpPTEC, siehe 2.4.1) resuspendiert und komplett in eine vorbereitete 75 cm² Kulturflasche ausgesät.

Um eine reine mprMC-Kultur zu erhalten wurden die Zellen nach Erreichen von ca. 90 % Konfluenz unter sterilen Bedingungen, wie in 2.3 beschrieben, insgesamt mindestens fünfmal passagiert. Dabei wurden alle folgenden Passagen 1 bis 5 je nach Wachstumsverhalten einer Kultur entweder in kleinen 25 cm² Kulturflaschen oder bei geringer Zellzahl und -dichte zwischenzeitlich auch in 35 x 10 mm Petrischalen kultiviert. Durch den Vorgang des mehrmaligen Passagierens sollten nach und nach alle weniger robusten nicht-mesenchymalen Zellen in den Kulturen zugrunde gehen, sodass schließlich bei Passage 5 nur noch mesenchymale Zellen, insbesondere Fibroblasten vorherrschten [61]. Während dieses Prozesses, der je nach Kultur 1-3 Monate in Anspruch nahm, wurden regelmäßige Fotodokumentationen durchgeführt.

Ab Passage 5 - 9 wurden die Zellen auf Deckgläschen in Petrischalen ausgesät und für Fura 2-AM Messungen eingesetzt. Zudem wurden von einigen Kulturen Zellen für immunhistochemische Nachweise mesenchymaler und epithelialer Marker auf kleine Deckgläschen (13 mm Ø) in 24-Well-Platten ausgesät. Nach Erreichen von 50 – 80 % Konfluenz wurden diese für 10 min in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend bei 4° C in PBS bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.5 Fura 2-AM Messungen

2.5.1 Fura 2-AM

Zur Bestimmung der intrazellulären Kalziumaktivität der LLC-PK₁ Zellen, mpPTEC und mprMC wurden fluoreszenzmikroskopische Messungen mit dem intrazellulären Farbstoff Fura 2-AM durchgeführt.

Fura-2 ist ein ratiometrischer Farbstoff, der mit Ca²⁺-Ionen Chelatkomplexe bildet. Die an Carboxylatgruppen gebundenen Acetoxymethylester (AM) von Fura 2-AM ermöglichen durch Lipophilitätserhöhung die passive Diffusion des Moleküls durch die Zellmembran. Im Zytosol erfolgt deren Hydrolyse durch unspezifische Esterasen, wodurch Fura-2 seine Membrangängigkeit einbüßt und intrazellulär in anionischer Form gefangen bleibt.

Das Anregungsspektrum von Fura-2 ist abhängig von der umgebenden Kalziumkonzentration. Bei Ca²⁺ gesättigtem Fura-2 liegt das Absorptionsmaximum bei 340 nm, ohne gebundenes Ca²⁺ dagegen bei 380 nm. Bei Anregung mit 340 nm steigt die Emissionsintensität (bei gleichbleibender Wellenlänge von 510 nm) proportional zur Kalziumaktivität. Bei Anregung mit 380 nm verhält sich dies umgekehrt: die Emissionsintensität sinkt mit steigender Kalziumaktivität. Bei 360 nm liegt der isosbestische Punkt, an dem die Emissionsintensität unabhängig von der Kalziumkonzentration ist.

Bildet man den Quotienten der Emissionsintensität aus 340 nm/380 nm ergibt sich daraus die sogenannte Ratio, ein Maß für die intrazelluläre Kalziumaktivität. Diese ist von möglichen Störgrößen, wie z.B. uneinheitlicher Beladung, geringfügiger lokaler Unterschiede in der Farbstoffkonzentration, Zelldicke, Leckage oder Ausbleichen des Farbstoffs weitestgehend unabhängig.

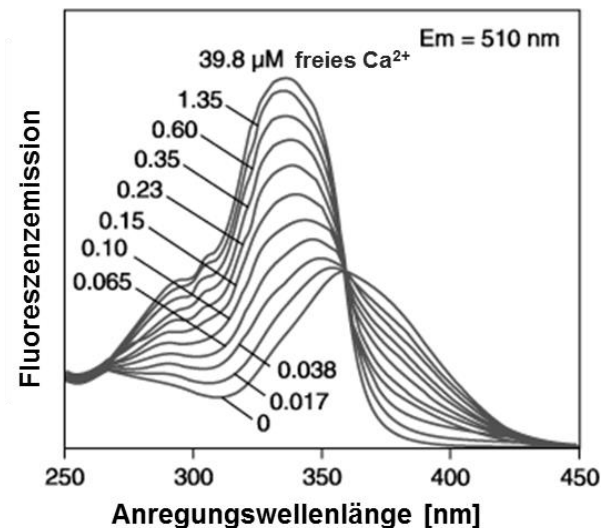


Abbildung 8: Fluoreszenzspektrum des Farbstoffs Fura-2. Emission bei 510 nm als Funktion der Anregungswellenlänge bei verschiedenen Ca^{2+} Aktivitäten. (modifiziert nach: Fura-2 Ca^{2+} Indicator, Thermo Fisher Scientific Inc.)

2.5.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Messungen wurden in einem abgedunkelten Raum an einem Axio Observer.D1 Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, D) durchgeführt. Als Lichtquelle wurde eine Xenonlampe verwendet. Ein Monochromator (Visichrome high speed polychromator system, Visitron Systems GmbH, Puchheim, D) isolierte dabei Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm aus deren Spektrum. Dieses wurde abwechselnd durch einen dichroischen Spiegel auf das Präparat geleitet und führte dort zur Fluoreszenzanregung von Fura-2. Das dabei emittierte Licht der Wellenlänge 510 nm wurde durch den dichroischen Spiegel und einen nachgeschalteten Breitband-Emissionsfilter (ET 510/80 m, Chroma Technology Corp.) geleitet und von einer CCD-Kamera (CoolSNAP HQ², Photometrics, Tucson, US) aufgezeichnet. Als Objektiv diente ein Fluar 20x/0,75 Objektiv (Carl Zeiss AG, Oberkochen, D). Am Computer konnte das Experiment in Echtzeit unter Verwendung des Programms MetaFluor (Visitron Systems, GmbH, Puchheim, D) verfolgt und gespeichert werden. Die eigentliche Analyse erfolgte nachträglich mit Hilfe der MetaFluor Software.

2.5.3 Inkubation

2.5.3.1 Standardinkubationslösung

Es wurde eine Standardinkubationslösung entwickelt, welche bei allen Fura-2 Messungen verwendet wurde. Die Vor- und Nachbehandlung sowie Inkubationsdauer variierte geringfügig je nach Zelllinie und geplantem Experiment und wird in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

Die Standardinkubationslösung, basierend auf dem jeweiligen Kulturmedium der Zellen, enthielt stets 4,15 μM Fura 2-AM (life technologies, Eugene, USA), 2,5 mM Probenecid, sowie 0,08 % Pluronic F-127.

Probenecid, ein Hemmstoff des organischen Anionentransporters 1 (OAT 1) des proximalen Tubulus, dient hierbei der Vorbereitung auf die Behandlung mit Fura 2-AM, indem es dessen aktiven Export aus der Tubuluszelle hemmt [62]. Als nichtionisches Detergens fungiert Pluronic als Lösungsvermittler des lipophilen Farbstoffs Fura 2-AM [63], welcher durch passive Diffusion in den Intrazellulärraum der Tubuluszellen gelangt.

2.5.3.2 Inkubationsprotokoll LLC-PK₁ Zellen

Zunächst wurde das Kulturmedium aus den für die Experimente bestimmten Kulturschälchen der LLC-PK₁ Zellen ersetzt durch eine Lösung aus frischem, erwärmtem Kulturmedium, das zusätzlich 2,5 mM Probenecid enthielt. Die Zellen wurden darin für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Deckglas mit den sich darauf befindlichen Zellen in eine Perfusionskammer überführt, die schematisch in Abbildung 9 dargestellt ist. Das Deckglas wurde mit einem dünnen randständigen Silikonfilm an deren Unterseite befestigt. Die Perfusionskammer bestand aus einer Kunststoffscheibe mit zentraler muldenartiger Aussparung und seitlich zwei Öffnungen für den Zu- und Abfluss der Perfusionslösung.

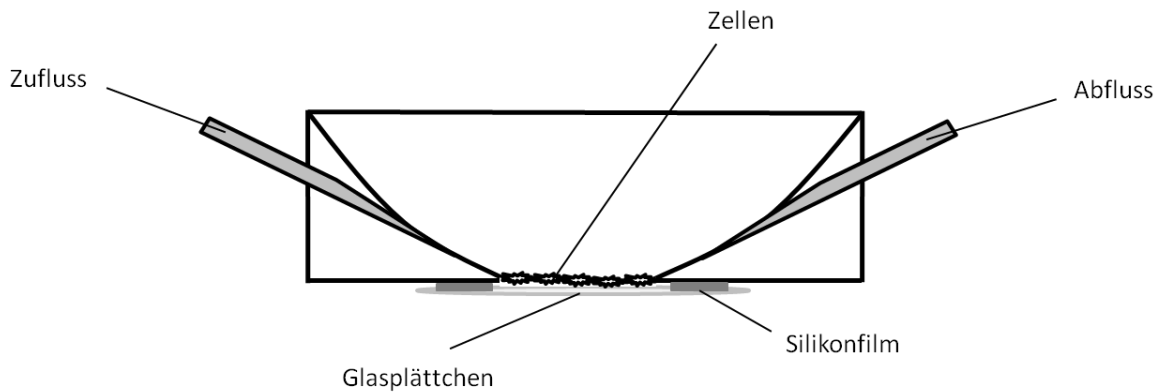


Abbildung 9: Perfusionskammer schematisch (Querschnitt)

Die weitere Inkubation erfolgte in der oben beschriebenen Standardinkubationslösung für 60 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur und 5 % CO₂.

Im letzten Schritt wurde die Lösung erneut durch Kulturmedium mit 2,5 mM Probenecid ersetzt und lichtgeschützt für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Dabei erfolgt intrazellulär die Hydrolyse der Acetoxymethylester (AM) von Fura-2.

2.5.3.3 Inkubationsprotokoll mpPTEC und mprMC

Für die nativen mpPTEC und mprMC Kulturen wurde ein separates Inkubationsprotokoll entwickelt. Es wurden jeweils zwei Subpopulationen innerhalb der WT- und KO-Kulturen der mpPTEC und mprMC gebildet, die unterschiedlichen Behandlungen unterzogen wurden.

Gruppe 1, nachfolgend als „Standard“ bezeichnet, erhielt die normale Standardinkubationslösung (siehe 2.5.3.1). Bei Gruppe 2, nachfolgend als „Chondroitinase“ bezeichnet, wurde zusätzlich das Enzym Chondroitinase ABC (*Proteus vulgaris*) in der Endkonzentration 50 mU/ml zugesetzt.

Die Inkubation erfolgte sowohl für mpPTEC, als auch für mprMC für ca. 40 min bei 37 °C und 8 % CO₂. Die Deckgläser mit den Zellen wurden dabei jeweils schon vor Inkubationsbeginn in die Perfusionskammern überführt, in denen die vollständige Inkubation zwecks Materialeinsparung stattfand.

2.5.4 Durchführung ATP-Experimente

Bei allen Messungen garantierte ein beheizbares Wasserbad eine konstante Temperatur der Perfusionslösung von 37 °C. Die Fließgeschwindigkeit des Zuflusses betrug 6-8 ml/min. Die Absaugung erfolgte durch eine Aquariumpumpe mit Wasserfalle.

Für Versuche mit LLC-PK₁ Zellen wurde eine Belichtungszeit von 900 ms für 340 nm und von 300 ms für 380 nm gewählt. Die daraus resultierende basale Ratio, die die intrazelluläre $[Ca^{2+}]_i$ vor Stimulation der Zellen widerspiegelt (nachfolgend als Basisratio bezeichnet) lag bei den LLC-PK₁ Zellen bei einem Wert von ca. 2,6. Bei Experimenten mit mpPTEC und mprMC wurden die Belichtungszeiten geringfügig variiert: für 340 nm wurden 800 ms gewählt und für 380 nm 600 ms. Damit betrug die Basisratio bei den mpPTEC ca. 1,3 und bei den mprMC bei ca. 0,9.

Zunächst wurde die Perfusionskammer mit den Zellen für 200 s mit Kontrolllösung (siehe 2.2.2) perfundiert. Dann erfolgte eine Stimulation mit 30 μ M ATP in Kontrolllösung, um eine Signalkaskade zu provozieren, welche eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumaktivität bewirkt. Dies äußert sich durch eine verstärkte Emissionsintensität und führt zu einem Anstieg der Ratio 340 nm/380 nm, die den Kalziumtransienten repräsentiert, wie exemplarisch in Abbildung 10 gezeigt wird.

Nach ca. 150 s wurde die ATP-Gabe beendet und für weitere 200-300 s mit Kontrolllösung nachgespült, bis die Ratio wieder annähernd dem Ausgangswert entsprach.

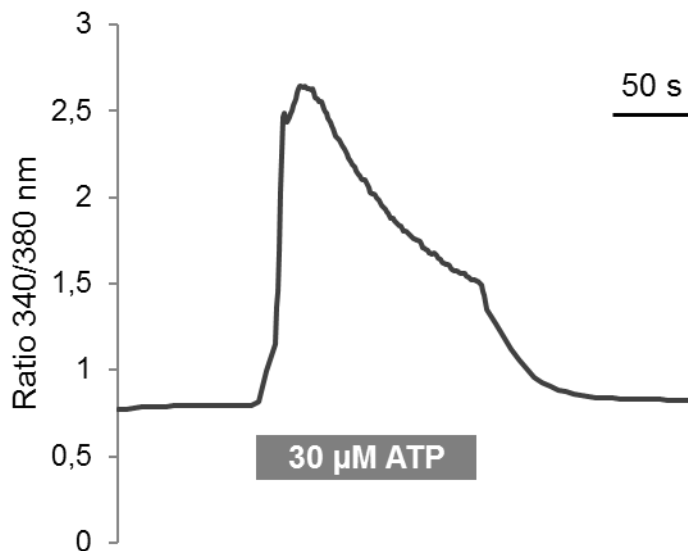


Abbildung 10: Beispiel ATP-Experiment mit mprMC: typischer Kalziumtransienten nach Stimulation mit ATP

2.5.5 Experimente unter Ca^{2+} freien Bedingungen

Um den Anteil der intrazellulären Kalziumspeicher, z.B. des endoplasmatischen Retikulums, am ATP-induzierten Kalziumtransienten zu ermitteln, wurden separate Experimente gemäß der unter 2.5.3.1 bis 2.5.3.3 beschriebenen Inkubationsprotokolle mit mpPTEC und mprMC unter nahezu Ca^{2+} freien Bedingungen (Lösung siehe 2.2.2) durchgeführt. Ein solches Experiment wird beispielhaft in Abbildung 11 gezeigt.

Nach Spülung mit Kontrolllösung wurde für 200 s kalziumfreie Lösung zur Gewöhnung der Zellen appliziert.

Darauf erfolgte die Stimulation zur Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher mit 30 μM ATP in Ca^{2+} freier Lösung für die Dauer von 150 s. Unter kontinuierlicher ATP Gabe wurde wieder auf Kontrolllösung mit normaler extrazellulärer Kalziumkonzentration von 1,3 mM umgestellt. Es folgte ein Einstrom von Ca^{2+} aus dem EZR, was als erneuter Anstieg der Ratio beobachtet werden konnte. Am Ende des Experiments wurde mit Kontrolllösung ohne ATP bis zur Stabilisierung der Ratio nachgespült.

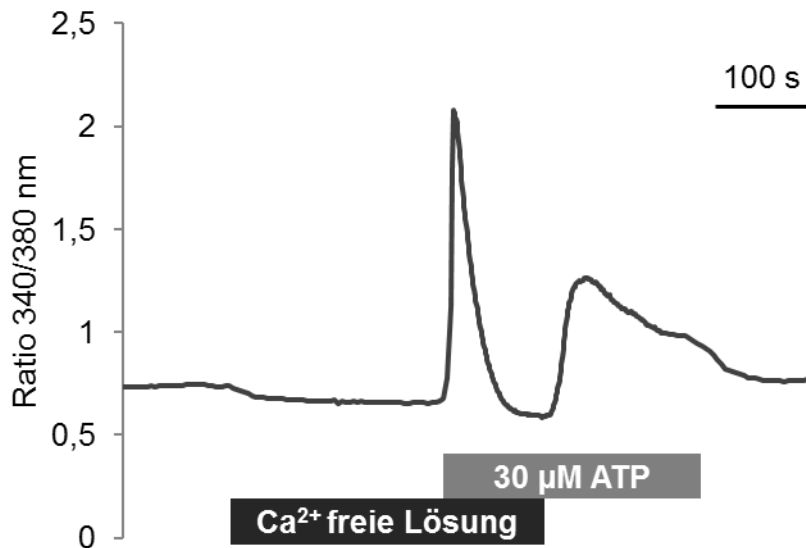


Abbildung 11: Beispiel-Experiment mit mprMC unter kalziumfreien Bedingungen. ATP Gabe erfolgte zuerst in Ca^{2+} freier Lösung, dann unter normaler extrazellulärer Ca^{2+} Konzentration.

2.5.6 Kalibrierung des Fluoreszenzsignals

Bei der Kalibrierung von Fura-2 Messungen werden den Zellen intrazellulär definierte Kalziumkonzentrationen mithilfe des Ca^{2+} Ionophors Ionomycin (*Streptomyces globatus*) aufgezwungen, da dieses die Zellmembran für Ca^{2+} Ionen durchlässig macht. Es wurden nur für die Zellreihen mpPTEC und mprMC Kalibrierungsversuche nach dem unten beschriebenen Schema durchgeführt, beispielhaft dargestellt in Abbildung 12.

Zunächst wurde Ionomycin in der Konzentration von 5 μM unter extrazellulär kalziumfreien Bedingungen appliziert. Dadurch kam es zu einem maximalen Kalziumausstrom aus dem Zytosol mit einer minimal möglichen Ratio 340/380 nm (R_{\min}). Nach Wiederherstellung der normalen extrazellulären Kalziumkonzentration wurde unter erneuter Ionomycingabe der maximale Wert der Ratio bei maximaler Permeabilität der Membran für Ca^{2+} gemessen (R_{\max}).

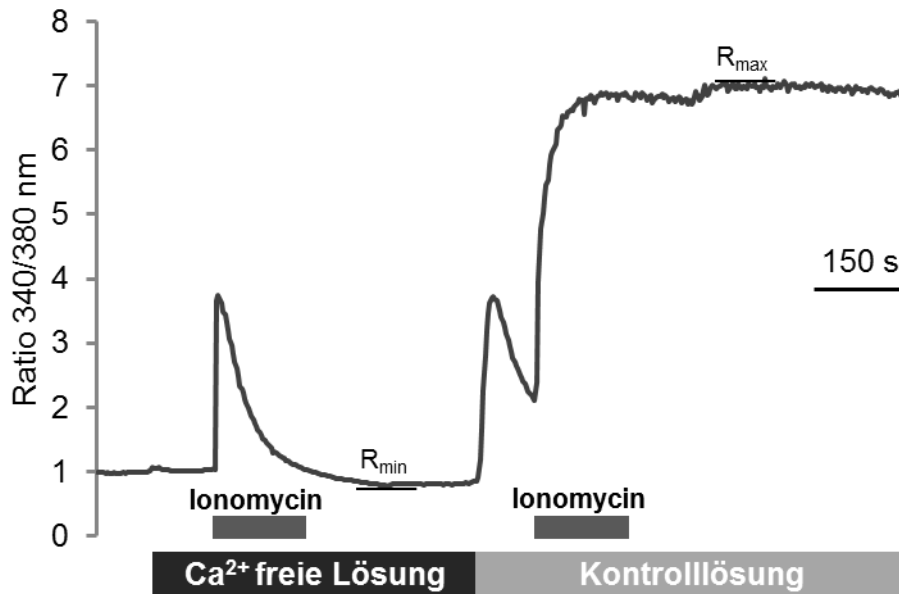


Abbildung 12: Beispiel Kalibrierung der Fura-2 Messung mit mpPTEC

Mithilfe der Formel nach Grynkiewicz et al. [64] wurde die intrazelluläre Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ berechnet.

Formel 1

$$[Ca^{2+}]_i = K_D * \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right) * \frac{S_{f2}}{S_{b2}}$$

$K_D = 224 \text{ nmol/l}$

R_{min} = Minimaler Wert der Ratio bei minimaler Kalziumkonzentration

R_{max} = Maximaler Wert der Ratio bei maximaler Kalziumkonzentration

S_{f2} = Maximaler Wert des Signals bei Anregung mit 380 nm

S_{b2} = Minimaler Wert des Signals bei Anregung mit 380 nm

R = beobachtete Ratio (340/380 nm)

In Abbildung 13 und in Abbildung 14 werden die dadurch ermittelten Kalibrierungskurven für mpPTEC und mprMC graphisch dargestellt. Diese zeigen die ungefähre intrazelluläre Kalziumkonzentration in Abhängigkeit der gemessenen Ratio bei den unterschiedlichen Zelltypen.

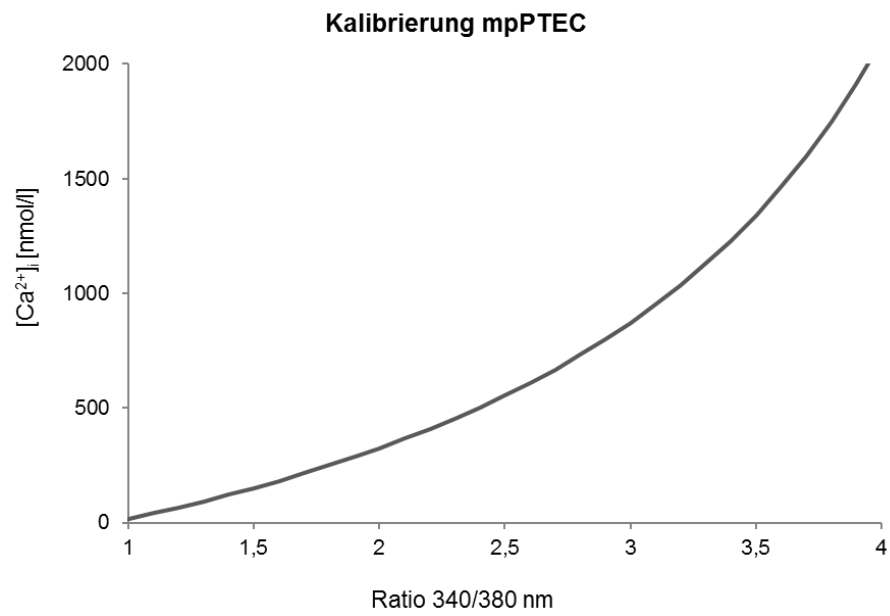


Abbildung 13: Kalibrierungskurve mpPTEC

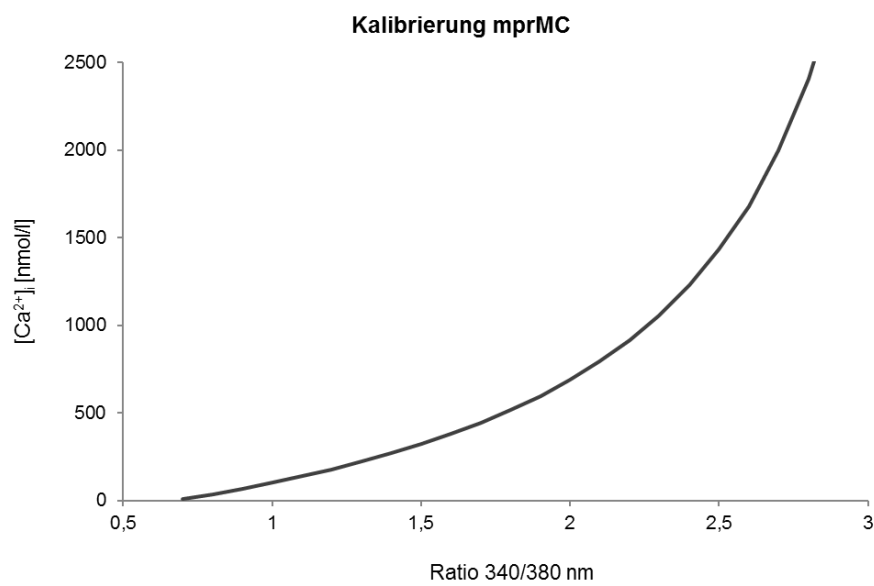


Abbildung 14: Kalibrierungskurve mprMC

2.5.7 Auswertung der Fura-2 Messungen

Die Auswertung der Fura-2 Experimente erfolgte mithilfe des Programms MetaFluor. Pro Experiment wurden 9-10 Einzelzellen als sogenannte regions of interest (ROI, interessierende Bereiche) definiert, wobei die Regionen innerhalb des Zytosols der jeweiligen Einzelzellen gewählt wurden. Bei jedem Experiment wurde zudem eine ROI in ein zellfreies Areal des Gesichtsfeldes gesetzt, um die Hintergrundfluoreszenz zu bestimmen und bei der Analyse als sogenannten *background* vom Fluoreszenzsignal subtrahieren zu können.

Um einen möglichst objektiven, einheitlichen Standard zu gewährleisten, wurden Kriterien festgelegt, die die Zellen erfüllen mussten um als ROI ausgewählt zu werden. Dazu zählten formale Voraussetzungen wie eine durchschnittliche, gut erkennbare Zellmorphologie (keine sehr ungewöhnlich geformten, sehr großen oder sehr kleinen Zellen abweichend von der Durchschnittsmorphologie) sowie eine gute Beladung mit Fura-2 (erkennbar an möglichst hoher Fluoreszenzintensität). Des Weiteren sollte der Ausgangswert der Ratio ungefähr dem Durchschnitt der Mehrheit der Zellen entsprechen, wobei kleinere, jedoch keine exzessiven Abweichungen zugelassen wurden. Zudem musste eine Reaktion auf Stimulation mit dem Agonisten vorhanden und möglichst synchron zu derjenigen des restlichen Zellverbandes sein.

Starke Abweichungen von diesen Kriterien wurden nicht toleriert und resultierten im Aussortieren der Ausreißer, sodass die gewählten Zellen als repräsentativ für das jeweilige Experiment angesehen werden können.

2.6 Immunfluoreszenz

Da die mprMC Kulturen, wie in 2.4.2 beschrieben, durch mehrmaliges Passagieren aus einem Gemisch unterschiedlichster Nierenzellen gewonnen wurden, wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz der Nachweis erbracht, dass es sich dabei tatsächlich um Mesenchymzellen und nicht etwa um Epithelzellen handelt. Dies wurde mithilfe des mesenchymalen Zellmarkers Vimentin gezeigt und epitheliale Eigenschaften mittels des Epithelzellmarkers Pan-Cytokeratin ausgeschlossen.

Hierfür wurden separate Immunfluoreszenzfärbungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kulturentwicklung angefertigt, um den Rückgang der

Epithelzellpopulation von Passage 0 (ursprüngliches Zellgemisch) über Passage 3 bis zu Passage 5 (Fura-2 Messungen) zu dokumentieren.

Mit den oben genannten Markern wurden ebenfalls Immunfluoreszenzfärbungen von mpPTEC Kulturen (siehe 2.4.1) durchgeführt, um den Grad der Entdifferenzierung zum Zeitpunkt der Fura-2 Messungen zu eruieren.

Die Deckgläschen mit den darauf befindlichen Zellen wurden zunächst für 10 min in 4% PFA fixiert und in PBS bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Dann wurden die Deckgläschen dreimal in PBS mit 0,3 % Triton X-100 (PBS-T) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für ca. 30 min mit einer Lösung aus 5 % BSA und 0,5 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern in der Verdünnung 1:250 in dieser Blockierlösung über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Als mesenchymaler Zytoskelettmarker wurde ein monoklonaler anti-Vimentin Primärantikörper aus dem Kaninchen (ab 92547, abcam, Cambridge, GB) und als epithelialer Zytoskelettmarker ein monoklonaler anti-pan-Cytokeratin Primärantikörper aus der Maus (ab 7753, abcam, Cambridge, GB) verwendet. Zusätzlich wurde bei den mpPTEC Kulturen auch ein anti-Claudin 2 Antikörper aus dem Kaninchen (lifetechnologies) als PT spezifischer Marker eingesetzt.

Nach Entfernung des Primärantikörpers und dreimaligem Waschen mit PBS-T erfolgte die Inkubation mit den Sekundärantikörpern in der Verdünnung 1:500 in PBS-T für 2 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Als Sekundärantikörper dienten Alexa Fluor 488 anti-Maus IgG (Invitrogen) für Pan-Cytokeratin, Alexa Fluor 633 anti-Kaninchen IgG (Thermo Scientific) für Vimentin, sowie Alexa Fluor 488 anti-Kaninchen (Invitrogen) für Claudin 2.

Nach mehrmaligen Waschschritten wurden die Zellen mit 0,1 % Dapi in Mowiol/Dabco auf einem Objektträger eingedeckt und über Nacht an einem lichtgeschützten Ort getrocknet. Die Auswertung der Präparate erfolgte an einem Axiovert 200M Mikroskop (Carl Zeiss, Jena, D).

2.7 Statistische Datenanalyse

Die statistische Auswertung der Daten wurde mithilfe des Programms Graphpad Prism 7.0 und Excel 2010 vorgenommen. Die Daten werden im Folgenden als arithmetischer Mittelwert der jeweiligen Stichprobe sowie dessen Standardfehler (engl. *sem* = *standard error of the mean*) dargestellt. Die Anzahl n wurde in Abhängigkeit des jeweiligen Zelltyps wie folgt definiert: für LLC-PK₁ Zellen gilt n =Anzahl aller Einzelexperimente, für mpPTEC gilt n =Mittelwert aller Replikate einer Maus und für mprMC gilt n =Anzahl aller Einzelexperimente.

Innerhalb eines Typs von Experimenten wurden stets WT und KO miteinander verglichen, die der gleichen Behandlung (Standard vs. Chondroitinase) unterzogen wurden. Ein zusätzlicher Vergleich innerhalb der WT oder KO-Gruppen erfolgte nicht.

Die Testung auf Normalverteilung wurde mittels Shapiro-Wilk-Test vorgenommen. Normalverteilte Daten wurden durch einfaktorielle ANOVA und danach durch den Tukey-Test auf statistische Signifikanz hin überprüft. Daten, die nicht normalverteilt waren, wurden mittels Kruskal-Wallis Test und anschließend Dunn's multiplem Vergleichstest als Post-hoc-Test auf ihre Signifikanz hin überprüft. Das Signifikanzniveau wurde stets auf $p < 0,05$ festgelegt.

Für den Vergleich der LLC-PK₁-Experimente und der kalziumfreien mprMC-Experimente wurde der zweiseitige ungepaarte T-Test herangezogen.

Zur Auswertung der Experimente wurden bei allen Zellmodellen und Versuchsreihen vergleichbare Kriterien herangezogen. Zunächst wurde die Basisratio als Durchschnittswert der Ratios vor Stimulation mit ATP als Vergleichskriterium gewählt. Daneben wurde auch das Maximum als Maximalwert der Ratio nach ATP-Stimulation ausgewertet. Zusätzlich wurde das Plateau als Durchschnittswert der Ratios nach Beendigung der Stimulation mit ATP für eine definierte Zeitspanne von 50 Sekunden gewählt. Das Plateau ist Ausdruck des Ca²⁺ induzierten Ca²⁺ Einstroms nach Aktivierung purinerger Rezeptoren. Zum Schluss wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) verglichen, die dem Integral des Graphen für die Dauer der ATP-Stimulation entspricht.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung der Primärzellkulturen

3.1.1 Wachstum und Morphologie der proximal tubulären Primärkultur mpPTEC

Um möglichst natives Gewebe zu gewinnen, wurden Primärkulturen aus proximalen Tubuluszellen von Fam20a WT- und KO-Mäusen angelegt. Hierfür wurden die PT-Segmente, wie in 2.4.1 beschrieben, enzymatisch angedaut, um die Desintegration der Basalmembran und das Auswachsen von Einzelzellen aus den Tubulusenden auf unbeschichteten Deckgläschen zu erleichtern.

Nach 5-7 Tagen hatten sich große, nahezu konfluente mpPTEC-Kolonien gebildet, in deren Zentrum die PT-Segmente noch rudimentär als erhabene Konvolute erkennbar waren (Abbildung 15).

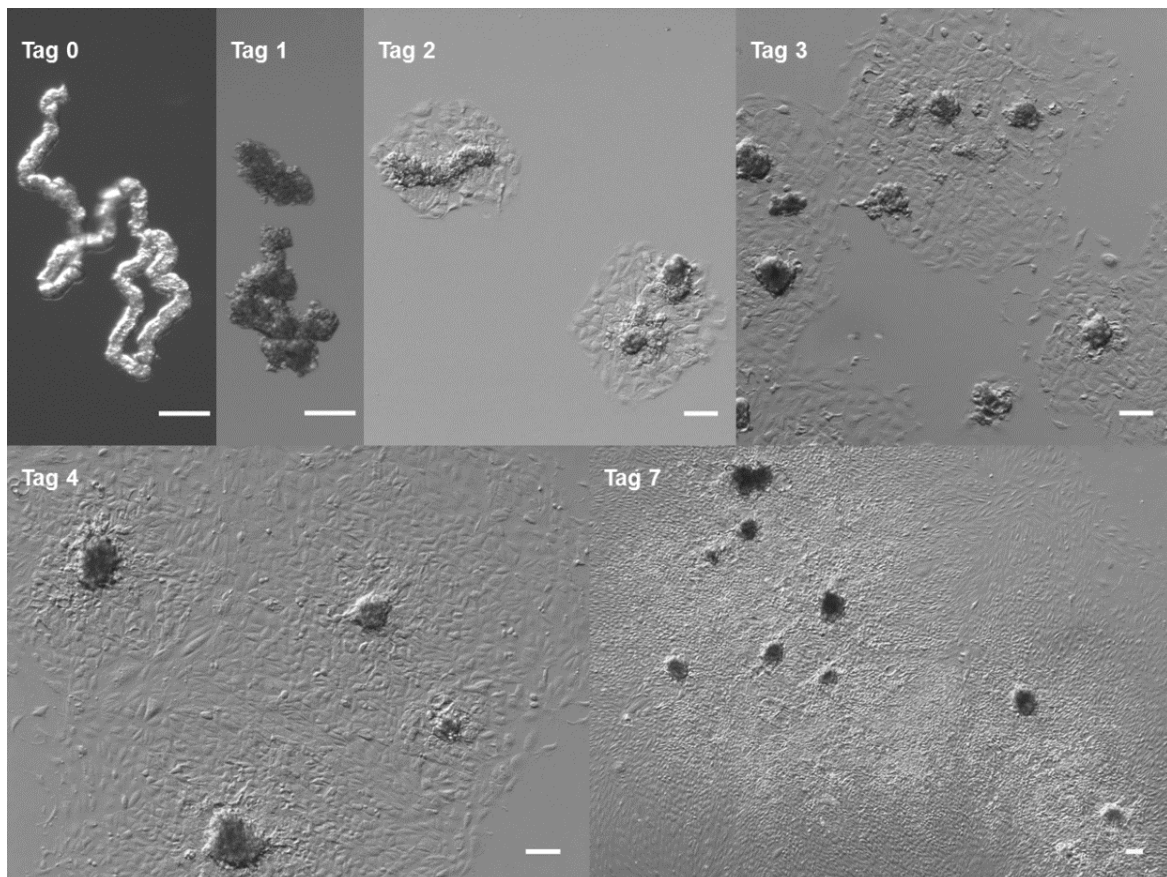


Abbildung 15: Auswachsen einer mpPTEC-Kultur: die angedauten PT-Segmente (Tag 0) wurden für 7 Tage kultiviert und fotografiert. Weiße Maßstabsbalken entsprechen jeweils 100 µm.

Die auswachsenden mpPTEC-Zellen sahen dabei morphologisch unterschiedlich aus, je nachdem wo sie sich innerhalb der Kolonie befanden. Zentral und noch in direkter Nachbarschaft zu den PT-Segmentresten waren die Zellen eher klein und der epitheliale Verbund dichter und höher. In der Peripherie wurden die Zellen zunehmend größer und flacher. Die funktionellen Unterschiede sollen in späteren Kapiteln näher beleuchtet werden, während der Fokus in diesem Kapitel auf der unterschiedlichen Morphologie liegt.

Die zentral um das PT-Fragment gelegenen mpPTEC, nachfolgend als SmpPTEC bezeichnet (engl.: *small murine primary proximal tubular epithelial cells*, kleine mpPTEC) wiesen ein verhältnismäßig kleines, kubisches Soma und ein dichtes Wachstumsmuster im Lichtmikroskop auf, welches einer Art Pflastersteinrelief ähnelte (Abbildung 16 oben links).

Die peripher gelegenen mpPTEC, nachfolgend als LmpPTEC bezeichnet (engl.: *large murine primary proximal tubular epithelial cells*, große mpPTEC) dagegen zeigten einen deutlich größeren und flacheren Zellkörper, sowie ein ausgedehnteres Flächenwachstum (Abbildung 16 unten rechts). Diese morphologischen Unterschiede konnten konsistent in allen angelegten mpPTEC Kulturen, sowohl bei WT- als auch in KO-Kulturen, beobachtet werden.

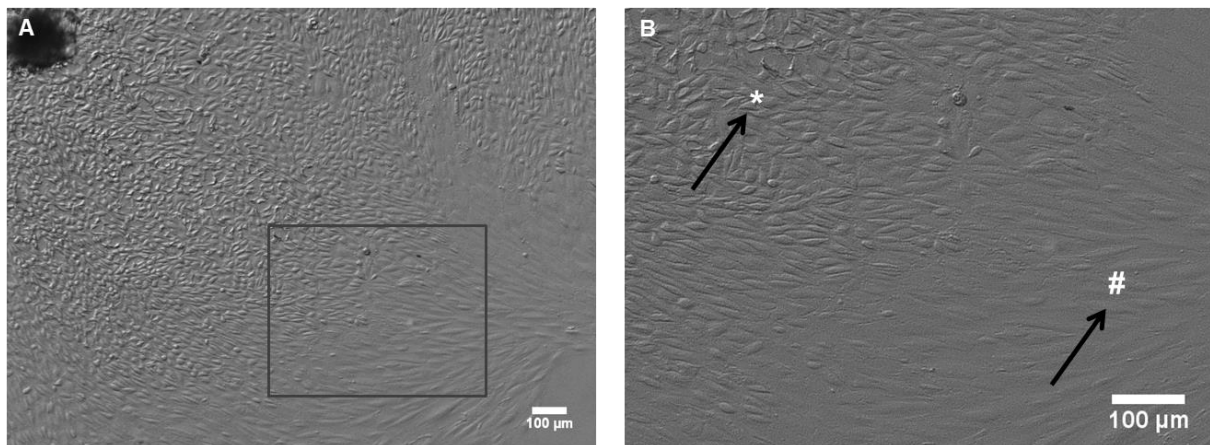


Abbildung 16: Differenzierung der mpPTEC in zentrale und periphere Zellen innerhalb einer Kolonie: (A) links oben ursprüngliches PT-Segment (schwarzes Konvolut), darum herum SmpPTEC: zentral gelegene, kleine kubische Zellen. Rechts unten in der Peripherie LmpPTEC: größere, flachere Zellen mit länglichem Soma. (B) Ausschnitt vergrößert. Pfeil (*) weist auf SmpPTEC, Pfeil (#) zeigt LmpPTEC.

3.1.2 Wachstum und Morphologie der renalen interstitiellen Zellkultur mprMC

Wie in 2.4.2 beschrieben, wurde das Gemisch aus unterschiedlichsten Nierenzellen kultiviert und mehrfach passagiert, um ausschließlich das Überleben von mesenchymalen Zellen, insbesondere Fibroblasten, zu gewährleisten [61]. Während dieses Prozesses, der je nach Kultur 1-3 Monate in Anspruch nahm, wurden regelmäßige Fotodokumentationen durchgeführt um die morphologischen Veränderungen in den Kulturen zu verfolgen (Abbildung 17 - Abbildung 20).

Dabei zeigte das ursprüngliche Zellgemisch (Passage 0) eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen der Niere mit unterschiedlicher Morphologie, beispielsweise kleine kubische Zellen neben größeren langgestreckten Zellen oder Zellinseln und strangartigen Zellformationen (Abbildung 17).

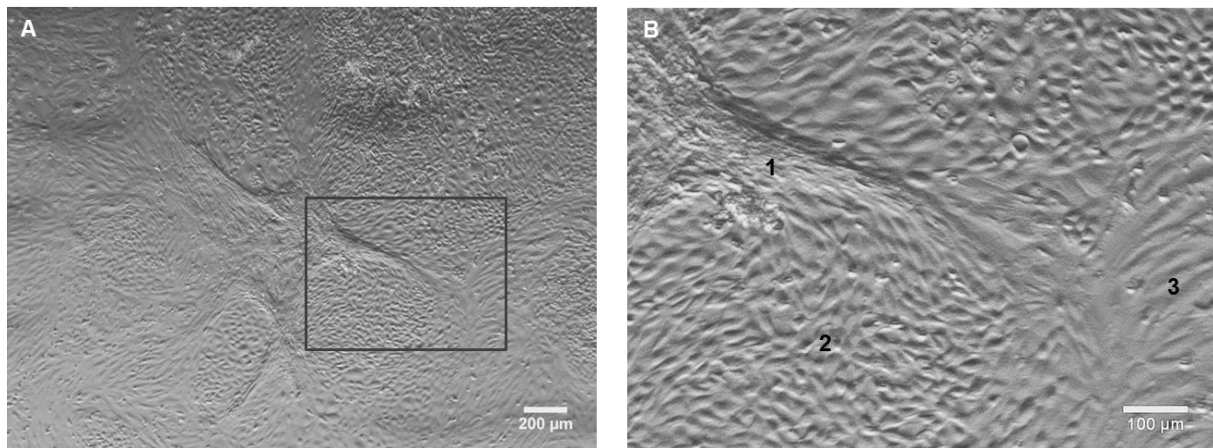


Abbildung 17: (A) mprMC Passage 0 nach 7 Tagen. (B) vergrößerter Ausschnitt. Die unterschiedliche Zellmorphologie der verschiedenen Zelltypen ist deutlich erkennbar. Strangartig übereinander wuchernde Zellen (1), befinden sich neben kopfsteinpflasterartigen kleineren Zellen (2). Daneben liegen flachere größere Zellen mit langgestrecktem Soma (3).

Von Passage 0 zu Passage 3 kam es zu einer deutlichen Reduktion der Teilungsrate, was durch eine stark verlangsamte Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen und kaum zu erreichende Konfluenz auch nach sehr langer Wachstumszeit von z.T. bis zu 3 Wochen auffiel. Passage 3 (Abbildung 18) zeigte bereits ein völlig verändertes Zellbild. Der vorherrschende Zelltyp bestand aus sehr großen, unförmigen sowie schmalen, langgestreckten, spindelförmigen Zellen, die ungeordnet neben- und übereinander wuchsen und keinerlei morphologische Eigenschaften eines organisierten Epithels mehr aufwiesen. Bereits zu diesem Zeitpunkt bestand die Kultur nach

morphologischen Kriterien nicht mehr aus einem nierenspezifischen Epithel, sondern aus mesenchymalen Stromazellen, wie zum Beispiel Fibroblasten.

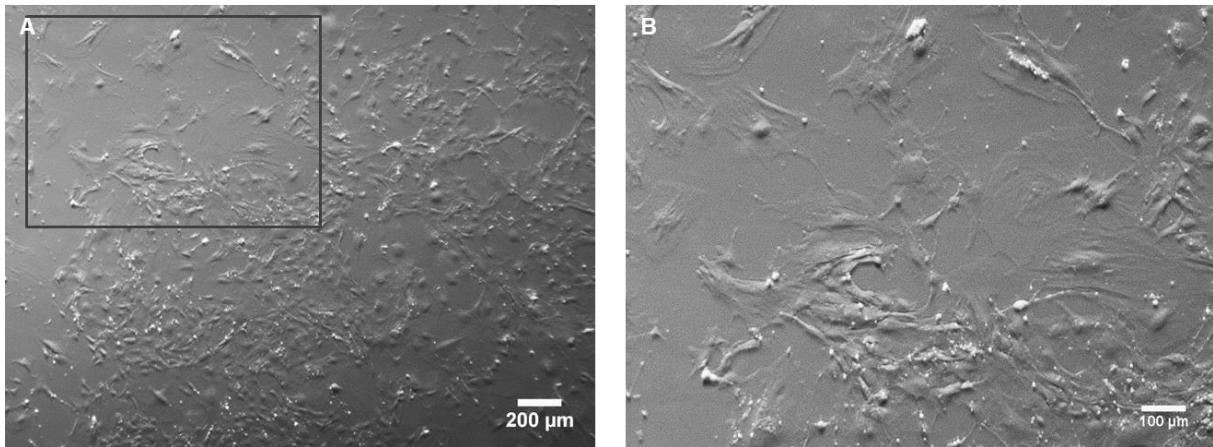


Abbildung 18: (A) mprMC Passage 3 nach 8 Tagen. (B) Ausschnitt vergrößert. Anhand geringerer Zelldichte ist die deutliche Reduktion der Proliferationsrate von Passage 0 bis Passage 3 erkennbar. Die ursprüngliche Aufteilung und Ordnung der Zellen von Passage 0 in verschiedene strukturelle Einheiten ist verschwunden. Der vorherrschende Zelltyp besteht aus großen flachen Zellen mit ausgedehntem Zellkörper und Zellkontakten zu benachbarten Zellen, wie es bei mesenchymalen Stromazellen zu erwarten ist.

Von Passage 3 zu Passage 5 erholte sich die Wachstumsrate der Kulturen wieder und die Zeit von der Aussaat nach dem Passagieren bis zum erneuten Passagieren bei Konfluenz der Kultur verkürzte sich wieder auf durchschnittlich 10 Tage. Passage 5, die zu Fura-2 Messungen der intrazellulären Kalziumaktivität verwendet wurde, wies vor allem spindelförmige, längliche Zellen mit schlankem Zellkörper auf, die einen nahezu konfluenten Zellrasen bildeten. Wie bei Stromazellen typisch zeigten die Kulturen ein fischgrätenartiges Wachstumsmuster.

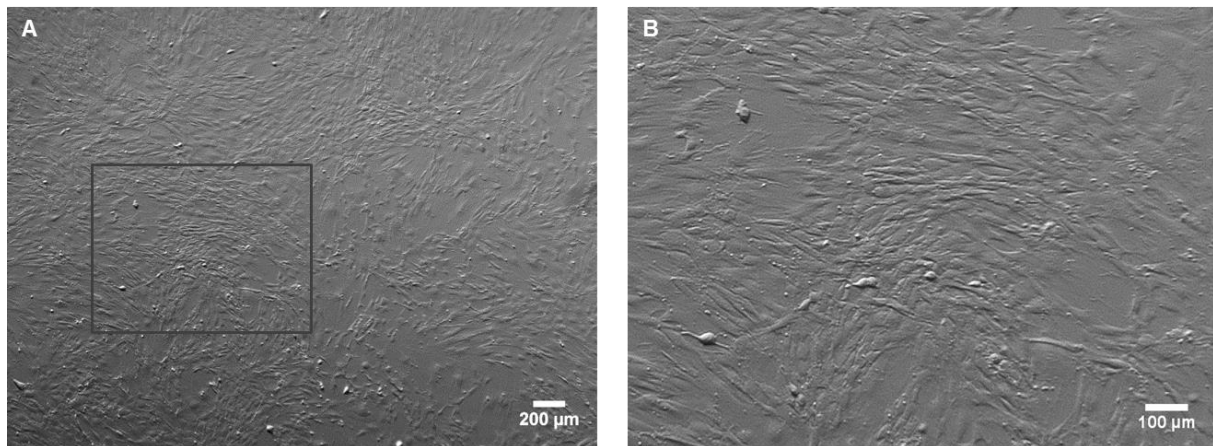


Abbildung 19: (A) mprMC Passage 5 nach 6 Tagen. (B) Vergrößerter Ausschnitt. Die Teilungsrate der Zellen hat nach anfänglicher Reduktion von Passage 0 bis zu Passage 3 wieder deutlich zugenommen. Der Großteil der Zellen weist ein langgestrecktes spindelförmiges Soma auf, das bei Fibroblasten typisch ist. Das Wachstumsmuster kann ansatzweise mit dem eines Fingerabdrucks verglichen werden (Zellstränge wachsen in verschiedenen Richtungen aufeinander zu).

Exemplarisch wird die weitere Entwicklung der mprMC Kultur in Passage 7 dargestellt (Abbildung 20). Hier ist deutlich erkennbar, dass kaum mehr morphologische Unterschiede zu den Zellen aus Passage 5 bestehen und daher von einer relativ stabilen Zellpopulation aus mesenchymalen Zellen ausgegangen werden kann.

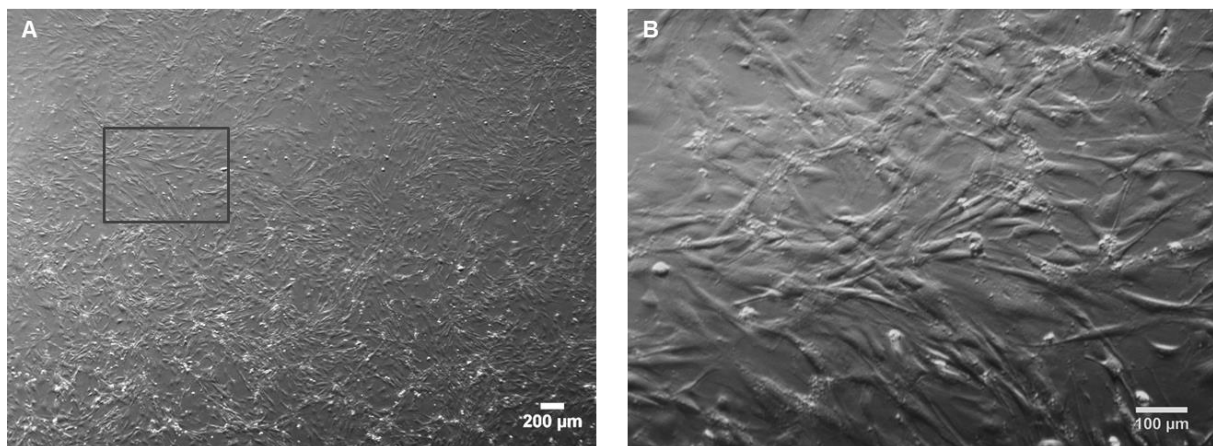


Abbildung 20: (A) mprMC Passage 7 nach 7 Tagen. (B) Vergrößerter Ausschnitt. Die Mehrheit der Zellen zeigt morphologisch charakteristische Eigenschaften von Fibroblasten, wie einen länglichen spindelförmigen Zellkörper, dünne anastomosierende Zytoplasmafortsätze, Zellverbindungen und fischgrätenartiges dreidimensionales Wachstumsmuster übereinander.

3.2 Differenzierung und Expression epithelialer und mesenchymaler Markerproteine

3.2.1 Immunhistochemische Untersuchung der mprMC Kulturen

Neben der oben beschriebenen Fotodokumentation wurden zudem, wie in 2.6 beschrieben, regelmäßig Immunfluoreszenz-Färbungen der mprMC Kulturen durchgeführt, um die Entwicklung der Kulturen sowie die Selektion einzelner Zellpopulationen zu dokumentieren.

Abbildung 21 zeigt die Immunfluoreszenzfärbung des ursprünglichen Nierenzellgemisches einer mprMC Kultur bei Passage 0 vor dem ersten Passagieren. Bereits hier wird die mengenmäßige Überlegenheit Vimentin-positiver mesenchymaler Zellen (rot) gegenüber Cytokeratin-positiven epithelialen Zellen (grün) deutlich. Bild A, B und D zeigen eine deutliche Trennung von Epithelzellmarker-exprimierenden Zellen und Mesenchymzellmarker-exprimierenden Zellen. Man sieht inselartig zusammengelagerte Epithelzellen, die umgeben sind von einer Vielzahl von Mesenchymzellen. Bild C (sowie eine Zelle in Bild B) zeigt zudem wenige Zellen, die sowohl epitheliale als auch mesenchymale Zellmarker gleichzeitig exprimieren.

Des Weiteren fallen morphologische Unterschiede zwischen den Cytokeratin-positiven und Vimentin-positiven Zellen auf. Erstere zeigen ein pflastersteinartiges, bündiges Wachstum, während letztere eher ungeordnet neben- und teilweise übereinander wachsen.

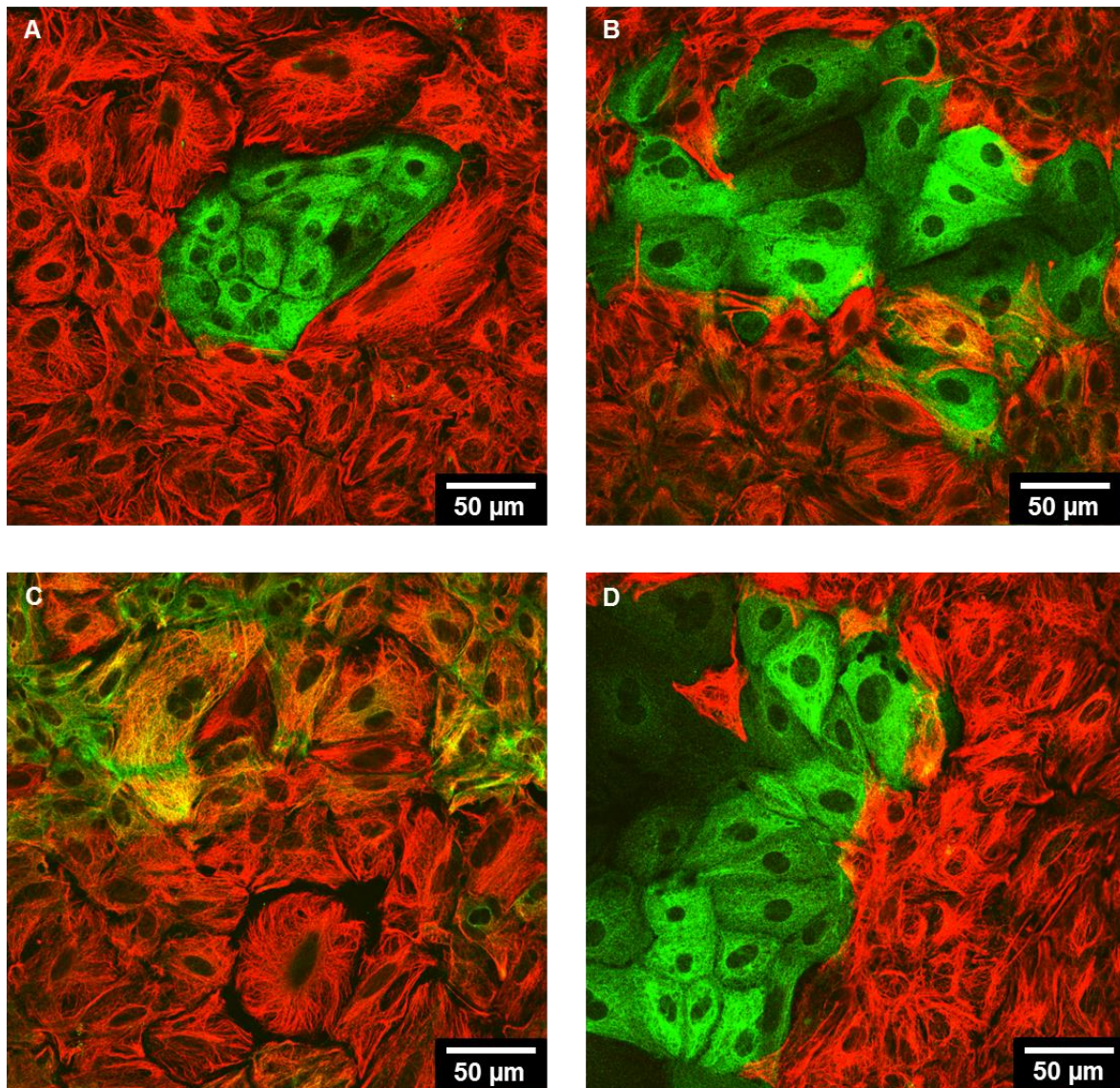


Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung mprMC Passage 0 (Vimentin rot, Pan-Cytokeratin grün). Bild A-D zeigt die deutlich ausgeprägtere Expression von Vimentin im Vergleich zu Cytokeratin. Die wenigen Cytokeratin-positiven Zellen finden sich inselartig zusammengelagert und umgeben von einer Vielzahl Vimentin-positiver Zellen.

Die mengenmäßige Überlegenheit Vimentin-positiver Mesenchymzellen wird besonders in der Übersichtsaufnahme derselben Kultur (Abbildung 22) deutlich. Vor allem im Zentrum und gelegentlich in der Peripherie finden sich einige Cytokeratin-positive Epithelzellinseln. Diese sind umgeben von einem Vielfachen an Vimentin-positiven Mesenchymzellen.

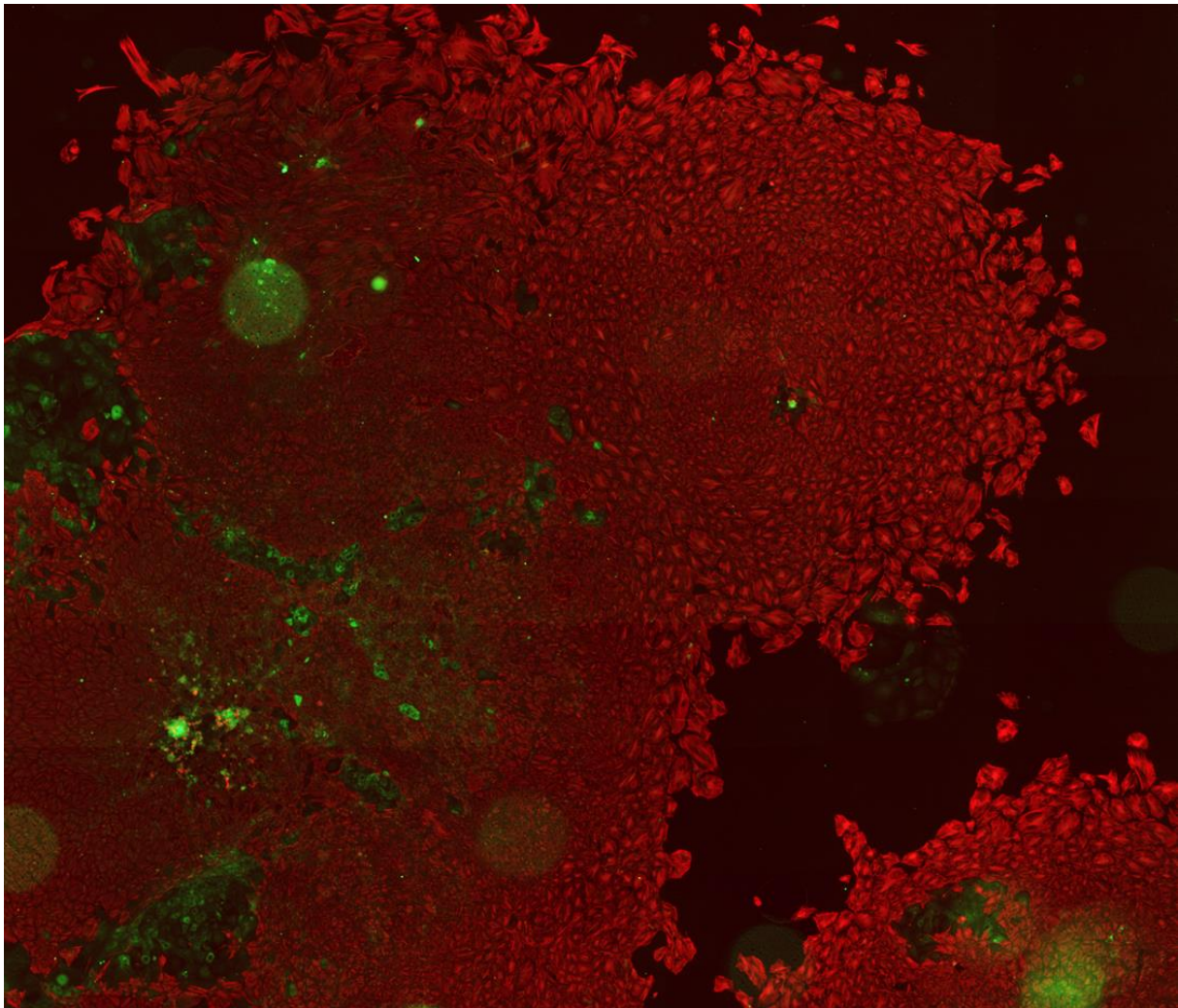


Abbildung 22: Übersichtsaufnahme Immunfluoreszenzfärbung mprMC Passage 0 (Vimentin rot, Pan-Cytokeratin grün). Zentral finden sich einige Cytokeratin-positive Epithelzellinseln, die umgeben sind von einer Überzahl an Vimentin-positiven Mesenchymzellen.

Bei den Immunfluoreszenzfärbungen von Passage 3 zeigte sich eine starke Reduktion der Epithelzellen, wie in Abbildung 23 dargestellt. Lediglich Bild A zeigt eine einzelne Cytokeratin-positive Epithelzelle. Alle anderen Zellen waren zu dem Zeitpunkt schon ausschließlich Vimentin-positiv.

Ebenfalls konnte, analog zu den oben beschriebenen lichtmikroskopischen Aufnahmen, eine Veränderung der Zellmorphologie beobachtet werden. Wie oben beschrieben bestand der vorherrschende Zelltyp aus großen unförmigen Zellen neben kleineren, polygonalen und spindelförmigen Zellen.

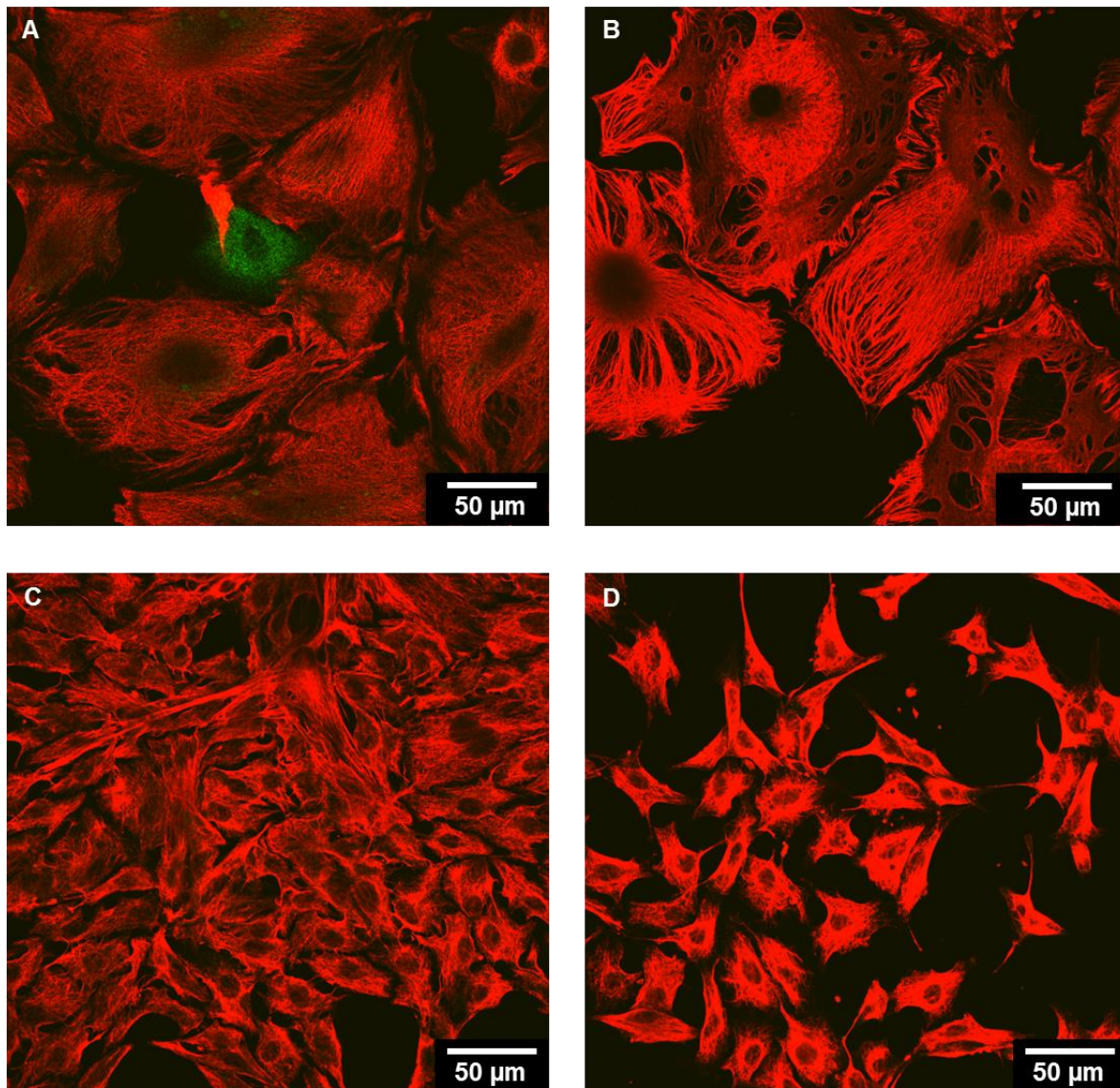


Abbildung 23: Immunfluoreszenzfärbung mprMC Passage 3 (Vimentin rot, Pan-Cytokeratin grün). Hier zeigt sich eine drastische Reduktion der Cytokeratin-positiven Epithelzellen. Lediglich eine einzige grüne Zelle ist in Bild A zu sehen.

In den Immunfluoreszenzaufnahmen von Passage 5 waren keine Epithelzellen mehr vorhanden, sondern ausschließlich Mesenchymzellen unterschiedlicher Morphologie (Abbildung 24). Vorherrschend waren langgestreckte, spindelförmige, sowie polygonale Zellen, die teils dicht und teils etwas vereinzelt wuchsen. Dazwischen fanden sich immer wieder große, unförmige Mesenchymzellen.

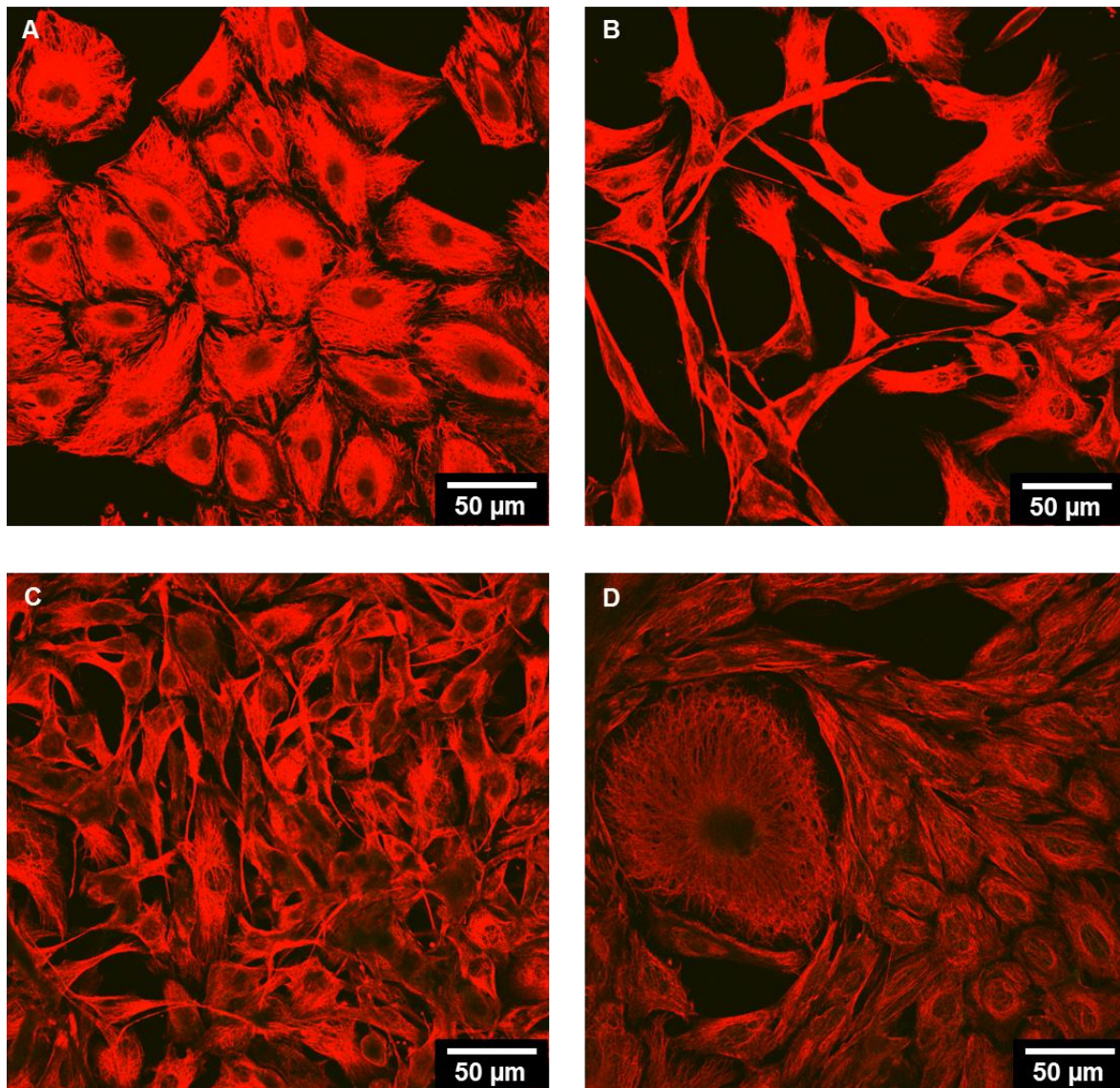


Abbildung 24: Immunfluoreszenzfärbung mprMC Passage 5 (Vimentin rot). Die Kultur besteht zu diesem Zeitpunkt ausschließlich noch aus Vimentin-positiven Mesenchymzellen unterschiedlicher Morphologie.

3.2.2 Differenzierung der mpPTEC

Ebenso wie bei den mprMC Kulturen wurden auch von den mpPTEC Kulturen Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt um die Entwicklung der Primärzellen aus dem ursprünglichen PT-Segment in Korrelation zu den exprimierten Zellmarkern zu zeigen.

Abbildung 25 zeigt eine mpPTEC Kultur nach 6 Tagen Wachstum auf einem Deckgläschen. Dieser Zeitpunkt wurde auch für die Fura-2 Messungen gewählt. Bild A zeigt im Zentrum das ursprüngliche PT-Segment, aus dem die Zellen auswachsen und die mpPTEC Kultur bilden. Dieses PT-Segment wies, wie erwartet, ausschließlich

Cytokeratin-positive Epithelzellen (grün) auf. Unerwartet war jedoch, dass die mpPTEC sofort nach Verlassen des ursprünglichen Zellverbandes begannen den mesenchymalen Marker Vimentin (rot) zu exprimieren. Diese kleinen, zentralen mpPTEC wurden, wie oben beschrieben, als SmpPTEC definiert.

Bild B und C zeigen SmpPTEC, wobei in Bild B die Expression von Cytokeratin überwiegt, während die Zellen in Bild C Cytokeratin und Vimentin zum Teil koexprimieren. In einem anderen Teil der Zellen überwiegt dagegen eine Sorte der beiden Intermediärfilamente.

Bild D zeigt den Übergang von SmpPTEC (unten links) zu LmpPTEC (oben rechts). Dabei ist deutlich erkennbar, dass Vimentin das vorherrschende Intermediärfilament bei LmpPTEC darstellt, wobei durchaus auch einzelne Zellen vorkommen, die eine starke Cytokeratin- und/oder Koexpression beider Marker aufweisen.

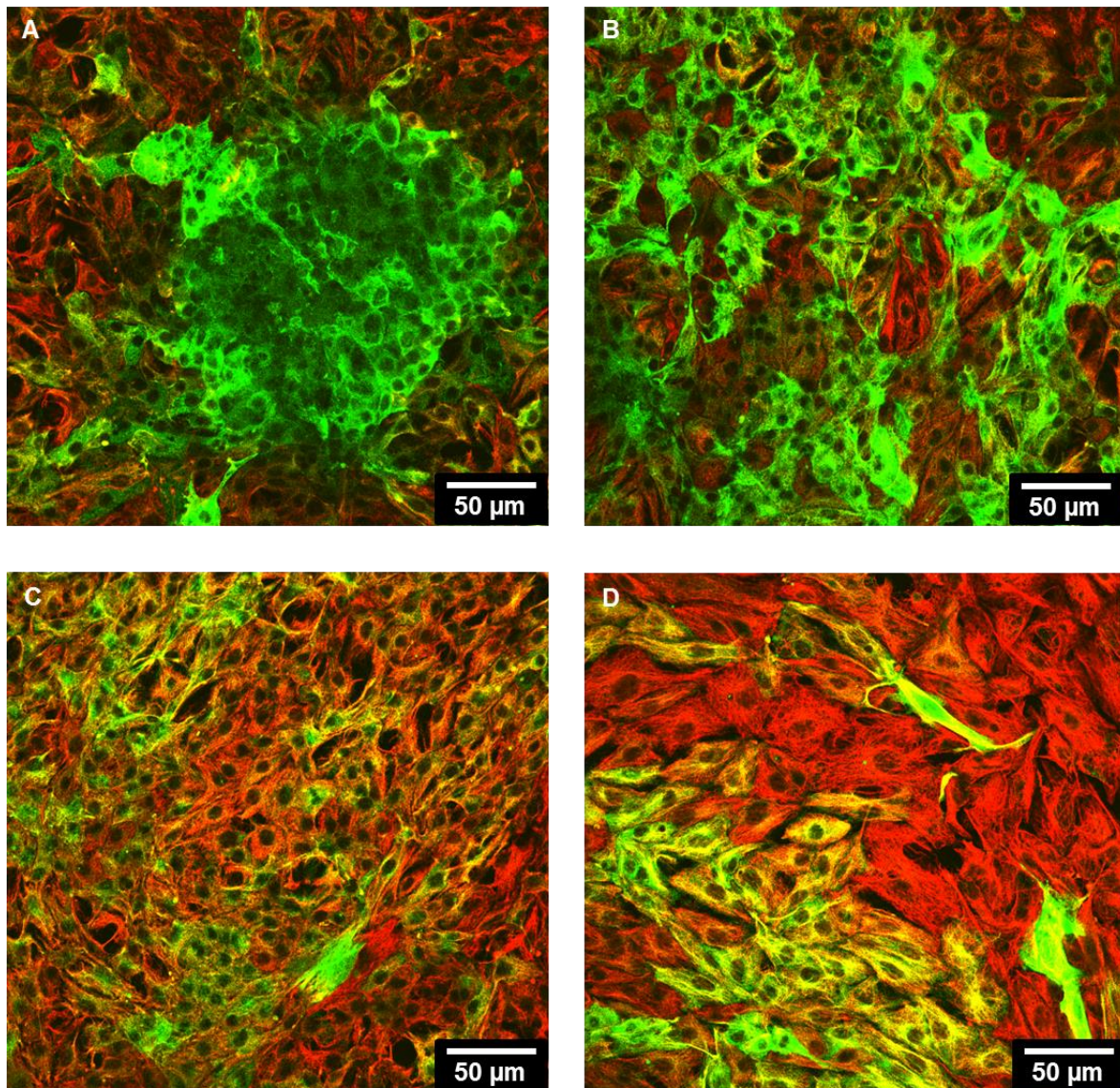


Abbildung 25: Immunfluoreszenzfärbung mpPTEC nach 6 Tagen Wachstum auf Deckgläschen. (Vimentin rot, Pan-Cytokeratin grün). (A) rudimentäres PT Segment (grün), sofort nach dem Auswachsen aus der ursprünglichen funktionellen Struktur beginnen die mpPTEC den mesenchymalen Marker Vimentin zu exprimieren. (B) SmpPTEC: kleine Zellen zentral gelegen, vorwiegende Expression von Cytokeratin. (C) SmpPTEC: kleine Zellen intermediär gelegen, Koexpression von Cytokeratin und Vimentin. (D) Übergang SmpPTEC zu LmpPTEC, Vimentin überwiegt als vorherrschendes Intermediärfilament.

Besonders deutlich wird die Separation der mpPTEC in SmpPTEC und LmpPTEC in der Übersichtsaufnahme (Abbildung 26). Hier stellen die zentral gelegenen intensiv grünen Bereiche die ursprünglichen PT-Segmente dar, die fast ausschließlich epitheliales Cytokeratin exprimieren. Darum herum wachsen SmpPTEC, die sowohl Cytokeratin als auch bereits einen beträchtlichen Anteil Vimentin exprimieren. In der Peripherie wachsen LmpPTEC, die vorwiegend Vimentin und nur noch zu einem geringen Teil Cytokeratin exprimieren.

Für Fura-2 Messungen wurde stets ein Bereich gewählt, der sowohl SmpPTEC, als auch LmpPTEC enthielt, um beide Unterarten der mpPTEC in einem Experiment funktionell darzustellen.

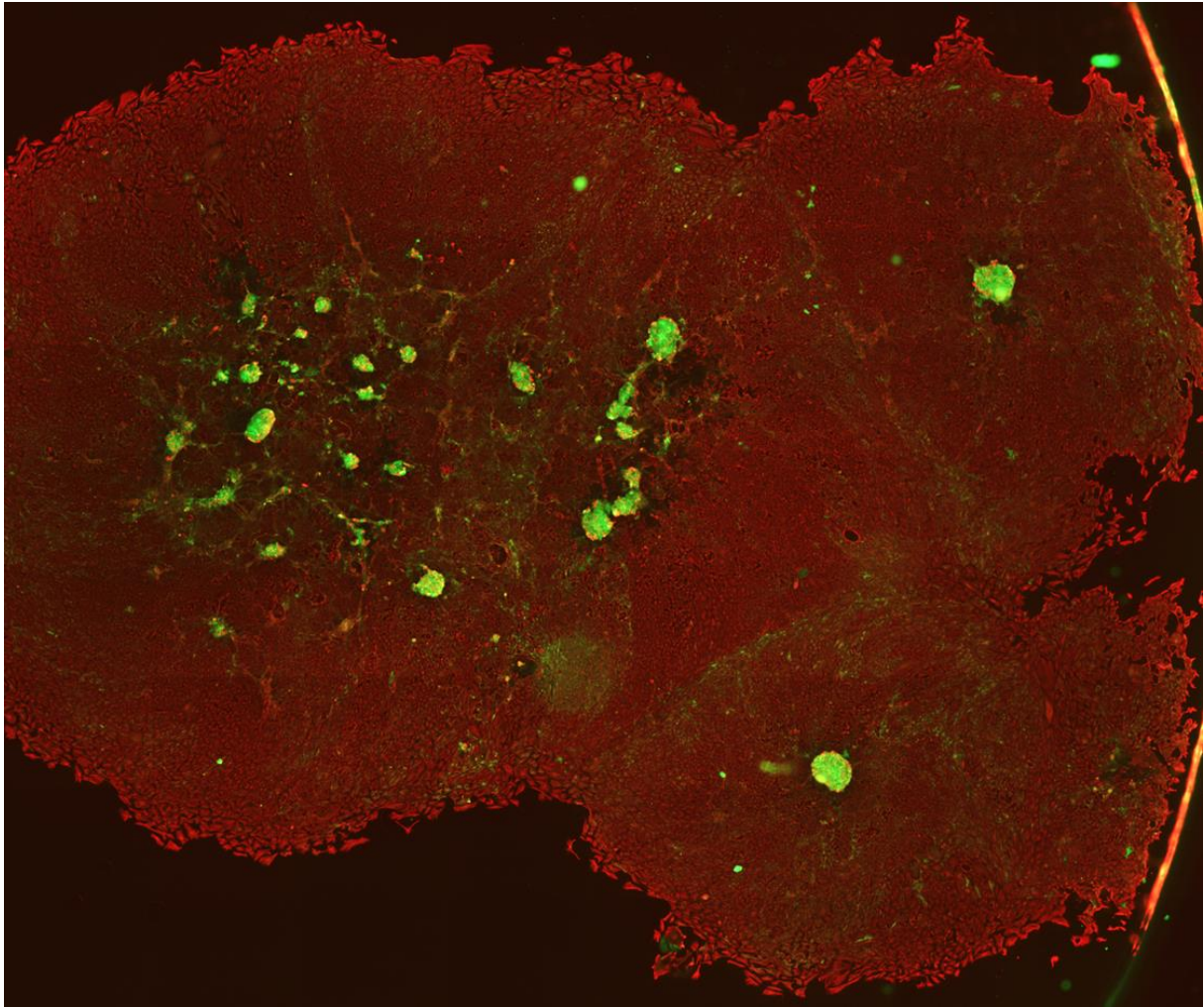


Abbildung 26: Übersichtsaufnahme Immunfluoreszenzfärbung mpPTEC nach 6 Tagen Wachstum auf Deckgläschen (Vimentin rot, Pan-Cytokeratin grün).

Abbildung 27 zeigt LmpPTEC in Bild A-D, die vorwiegend den mesenchymalen Marker Vimentin exprimieren. Einige Zellen zeigen jedoch auch eine Koexpression von mesenchyalem und epithelialem Marker. Manche LmpPTEC weisen ausschließlich Cytokeratin auf, insbesondere in Bild D (unten rechts) zu erkennen.

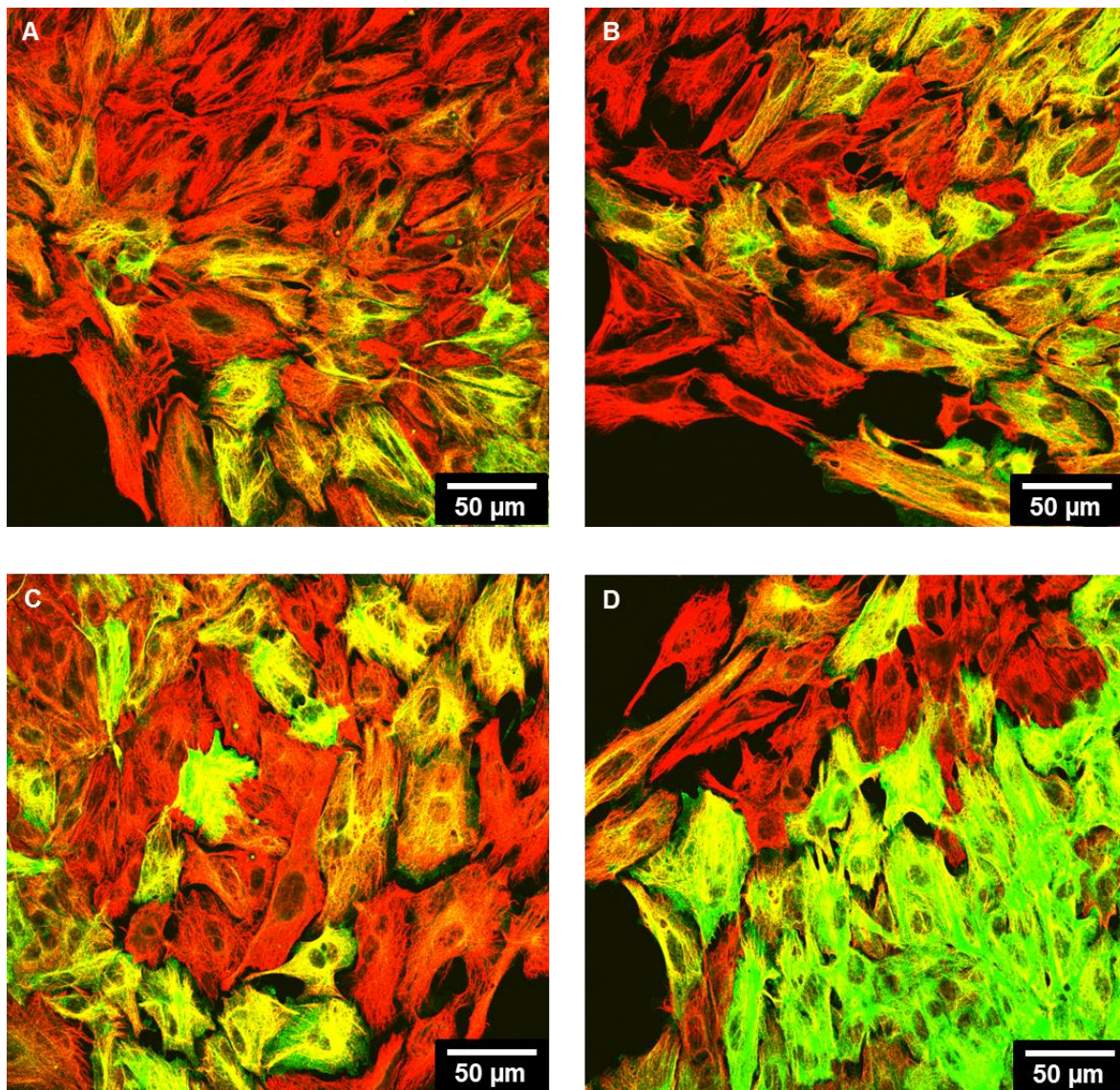


Abbildung 27: Immunfluoreszenzfärbung mpPTEC nach 6 Tagen Wachstum auf Deckgläschen. (Vimentin rot, Pan-Cytokeratin grün). (A-D) LmpPTEC: große, peripher gelegene mpPTEC. Der mesenchymale Marker Vimentin stellt das vorherrschende Intermediärfilament dar, wobei einige Zellen gleichzeitig, manche sogar fast ausschließlich, Cytokeratin exprimieren.

Um zu überprüfen, inwieweit SmpPTEC und LmpPTEC noch PT-spezifische Eigenschaften aufweisen, wurde zusätzlich eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem anti-Claudin 2-Antikörper durchgeführt (Abbildung 28). Claudin 2, ein für den funktionalen proximalen Tubulus spezifisches Tight junction Protein, färbt hierbei die Zellgrenzen der benachbarten mpPTEC an.

Abbildung 28 A zeigt SmpPTEC, deren Zellgrenzen deutlich durch Claudin 2 gefärbt sind. Bild B und C zeigen jeweils den Übergang von SmpPTEC zu LmpPTEC, wobei jeweils links unten SmpPTEC und rechts oben LmpPTEC zu finden sind. Dabei ist in

der Übergangszone deutlich der Abbruch der Färbung der Zellgrenzen erkennbar. SmpPTEC weisen eine durchgehende Expression von Claudin 2 auf, während diese in den LmpPTEC überhaupt nicht mehr zu finden ist. Bild D zeigt ausschließlich LmpPTEC, bei denen keinerlei Färbung der Zellgrenzen und somit keinerlei Claudin 2-Expression mehr nachweisbar ist und die somit eine wesentliche Eigenschaft eingebüßt haben, die PT-Zellen kennzeichnet.

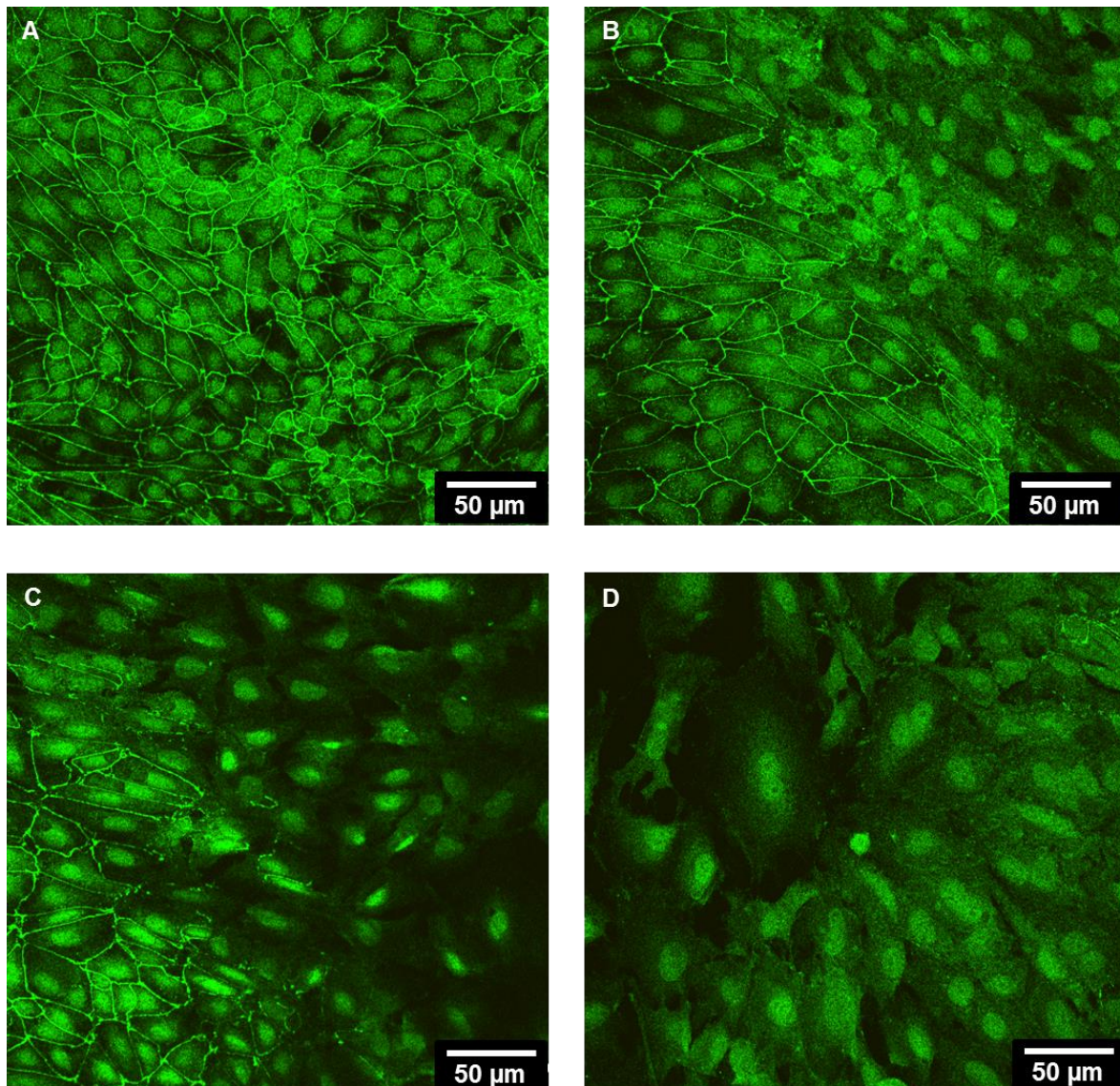


Abbildung 28: Immunfluoreszenzfärbung gegen Claudin 2, mpPTEC nach sechs Tagen Wachstum auf Deckgläschen. (A) Claudin 2, ein für den proximalen Tubulus spezifisches Tight junction Protein färbt hier deutlich die Zellgrenzen der SmpPTEC. (B + C) Übergang von SmpPTEC zu LmpPTEC. Auf der linken Seite zeigen SmpPTEC eine deutliche Färbung der Zellgrenzen durch Claudin 2, während die Übergangszone nur noch bruchstückhafte Reste von Claudin 2 aufweist. Auf der rechten Seite (LmpPTEC) findet sich dagegen überhaupt kein Claudin 2 mehr. (D) LmpPTEC zeigen keinerlei Claudin 2-Expression in den Tight junctions mehr.

Somit ergibt sich in Zusammenschau aller Befunde die Hypothese, dass es sich bei SmpPTEC um differenzierte proximale Tubuluszellen handelt, während LmpPTEC PT Zellen in dedifferenziertem Zustand sind.

3.3 Einfluss von Fam20a auf die intrazelluläre Kalziumaktivität

Es wurde untersucht, ob die Expression von Fam20a einen Einfluss auf den ATP-induzierten Ca^{2+} -Transienten hat. Dazu wurden Experimente mit den verschiedenen oben genannten Fam20a-defizienten Zellmodellen durchgeführt (siehe 2.5.4).

Um den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Haushalt der Zellen zu beschreiben wurde zum einen die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ als Basisratio bestimmt. Zum anderen wurde die zelluläre Antwort auf einen ATP Stimulus als exemplarische Rezeptorantwort untersucht. Die initiale Maximalantwort als Speicherentleerung wurde ebenso beurteilt, wie der länger anhaltende Ca^{2+} induzierte Ca^{2+} Einstrom, d.h. die Plateauphase. Die gesamte Rezeptorantwort wurde zusätzlich als Integral (Fläche unter der Kurve) dargestellt. Die Durchführung dieser Experimente auch unter extrazellulär kalziumfreien Bedingungen erlaubte zusätzlich eine genauere Aufschlüsselung des Signals in Ca^{2+} Einstrom von extrazellulär und Ca^{2+} Freisetzung aus intrazellulären Speichern.

3.3.1 Erste Versuche an einer etablierten Zellkulturlinie

Als Pilotversuche dienten Fura-2-Messungen an der etablierten PT-Zelllinie der LLC-PK₁ Zellen, welche wie in 2.3 beschrieben, mit einem KD-Konstrukt für Fam20a versehen wurden. Diese lieferten erste wertvolle Hinweise auf den Einfluss von Fam20a auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Die Applikation von 30 μM ATP in Kontrolllösung führte in LLC-PK₁ Zellen wie beschrieben zu einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Abbildung 29 zeigt die Graphen von Zelllinie 1 (WT) und 4 (KD) als arithmetischer Mittelwert der Graphen der jeweiligen Einzelexperimente. Während sich die Basisratio beider Zelllinien kaum unterschied, erreichte Zelllinie 4 (KD) nach ATP-Gabe eine signifikant höhere *peak response* (Maximum, $p=0,03$) als Zelllinie 1 (Kontrolle). Ebenfalls signifikant war der Unterschied bezüglich des gesamten Ca^{2+} Transienten beider Zelllinien (AUC, $p=0,04$). Beim

Plateau des Kalziumtransienten nach Beendigung der ATP-Stimulation fand sich hingegen kein signifikanter Unterschied.

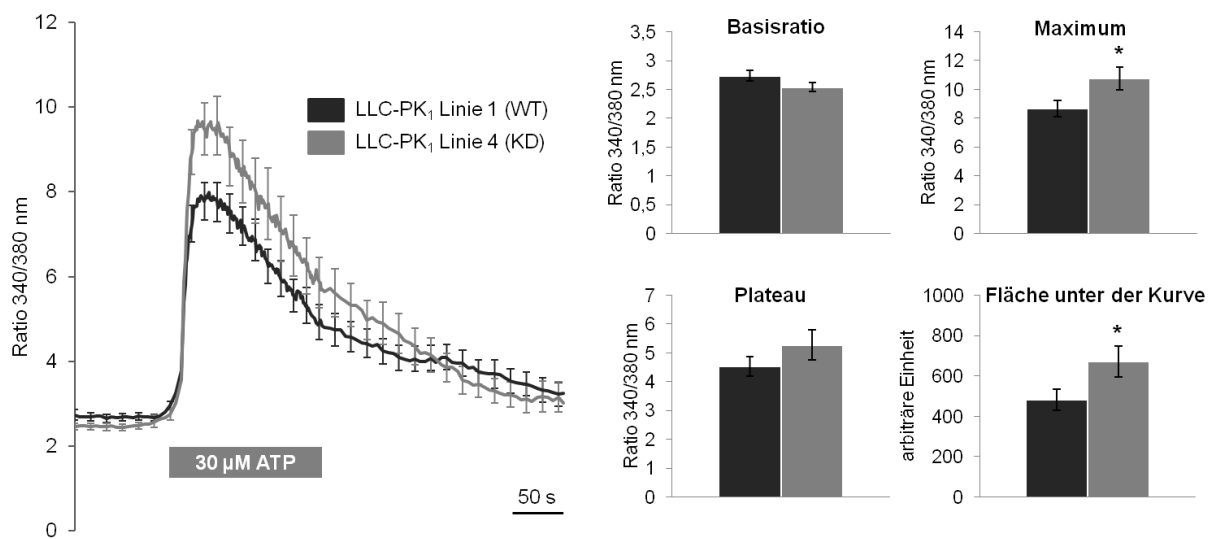


Abbildung 29: ATP-induzierter intrazellulärer Ca^{2+} -Transient in LLC-PK₁ Zellen. Bei ähnlicher Ausgangsratio erreichte Zelllinie 4 (Fam20a KD) ein signifikant höheres Maximum (peak response) als Zelllinie 1 (Fam20a WT) sowie eine signifikant größere Fläche unter der Kurve. Die Graphen entsprechen dem arithmetischen Mittelwert aus der Anzahl (n) der angegebenen Einzelerperimente. Linie 1 n=18, Linie 4 n=15

3.3.2 Fam20a Verlust in differenzierten SmpPTEC erhöht primär die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unabhängig von einer Chondroitinasebehandlung

Nach Etablierung der Primärzellkulturen konnten nun Fura-2 Messungen an Modellen mit vollständiger Fam20a-Defizienz vorgenommen werden, die aufgrund ihrer Präparation deutlich eher den nativen Strukturen in der Niere entsprachen.

Bei den Fura-2 Messungen mit mpPTEC wurde aufgrund der beobachteten morphologischen Unterschiede eine getrennte Auswertung der Experimente für SmpPTEC und LmpPTEC sowohl bei WT als auch bei KO Kulturen vorgenommen. Abbildung 30 und Abbildung 31 zeigen hierbei deutliche funktionelle Unterschiede der beiden Subpopulationen bezüglich ihrer Reaktion auf ATP-Stimulation. Zusätzlich wurde, wie in 2.5.3.3 beschrieben, eine Trennung innerhalb von WT und KO der SmpPTEC und LmpPTEC in eine Standard- und eine Chondroitinasegruppe vorgenommen.

Beim Vergleich von WT und KO der SmpPTEC (Abbildung 30) zeigte sich eine deutlich signifikant höhere Basisratio bei KO sowohl in der Standard- ($p=0,003$) als auch in der Chondroitinasegruppe ($p=0,001$). Dies entsprach bei SmpPTEC KO bei einer durchschnittlichen Basisratio von 1,99 einer $[Ca^{2+}]_i$ von 321 nmol/l. Bei WT betrug die durchschnittliche Basisratio 1,46, was einer $[Ca^{2+}]_i$ von 140 nmol/l entspricht. Damit zeigte sich die $[Ca^{2+}]_i$ bei KO mehr als doppelt so hoch im Vergleich zu WT.

Ebenso fanden sich beim Vergleich der maximal erreichten Ratio von KO Standard ($p=0,02$) mit WT Standard und KO Chondroitinase ($p=0,02$) mit WT Chondroitinase signifikant höhere Werte für Fam20a-KO. Beim Vergleich des Plateaus von KO und WT Standard und KO und WT Chondroitinase bleibt der signifikante Unterschied mit $p=0,002$ beziehungsweise $p=0,004$ weiterhin deutlich bestehen.

Legte man die Kurven von KO und WT jedoch gedanklich übereinander, verschwanden die Unterschiede beim Maximum und Plateau wieder. Daraus ergab sich auch, dass sich bei der summierten Rezeptorantwort, das heißt der AUC, kein Unterschied zwischen WT und KO zeigte. Dies wies darauf hin, dass tatsächlich primär die basale $[Ca^{2+}]_i$ in SmpPTEC KO durch Fam20a-Verlust verändert war.

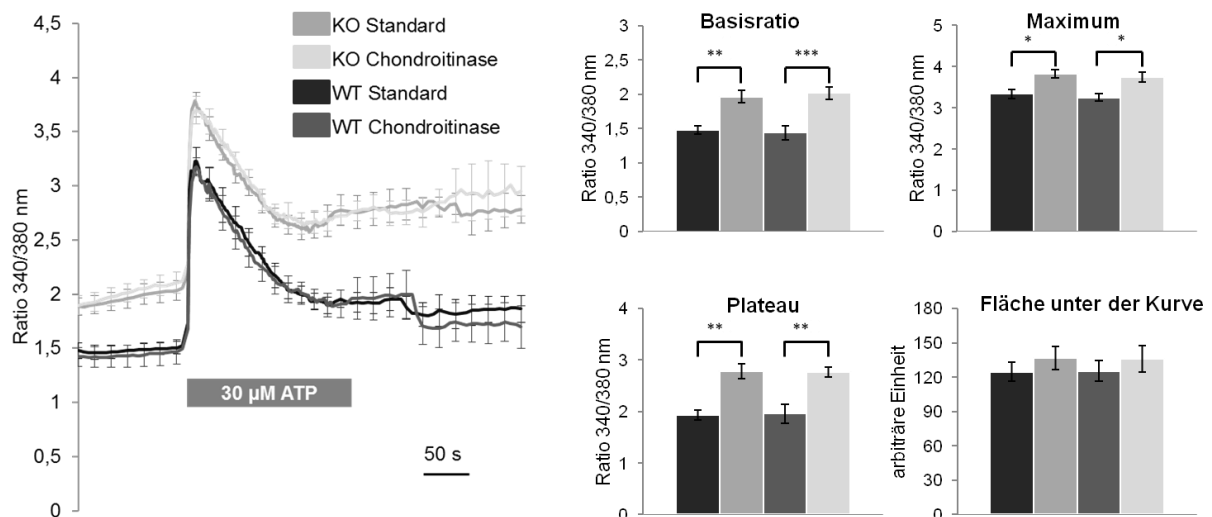


Abbildung 30: ATP Experiment SmpPTEC. KO Standard n=6, WT Standard n=6, KO Chondroitinase n=5, WT Chondroitinase n=6

3.3.3 Dedifferenzierte LmpPTEC werden von Fam20a-Defizienz nicht in ihrem Kalziumhaushalt beeinflusst

Bei LmpPTEC hingegen fand sich keinerlei Unterschied in den verglichenen Parametern zwischen WT und KO weder in der Standard- noch in der Chondroitinasegruppe (Abbildung 31).

Bei LmpPTEC WT betrug die durchschnittliche Basisratio 1,33 und bei KO 1,35, was einer $[Ca^{2+}]_i$ von 102 nmol/l bzw. 108 nmol/l entspricht.

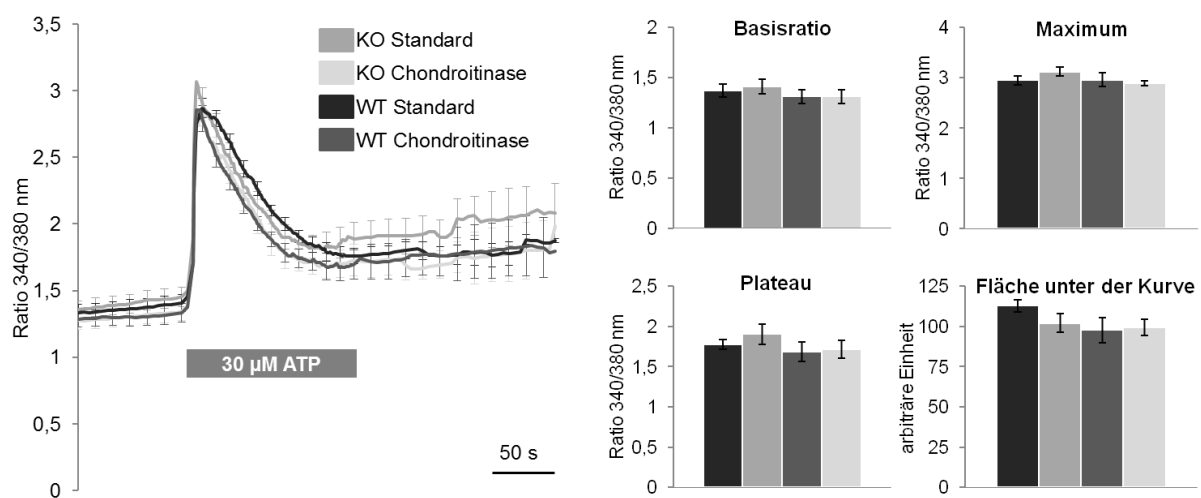


Abbildung 31: ATP Experiment LmpPTEC. KO Standard n=8, WT Standard n=6, KO Chondroitinase n=6, WT Chondroitinase n=6

3.3.4 Primäre renale Mesenchymzellen zeigen durch Fam20a-Verlust ein verstärktes Ca^{2+} -Signal, das durch Chondroitinasewirkung aufgehoben wird

Bei den mprMC Kulturen zeigten sich teils ähnliche und teils andersartige Unterschiede zwischen WT und KO als in SmpPTEC (Abbildung 32). Die Basisratio war nur zwischen KO und WT Standard signifikant unterschiedlich ($p=0,007$), jedoch nicht zwischen KO und WT Chondroitinase. Bei WT Standard betrug die durchschnittliche Basisratio 0,83 was einer ungefähren $[Ca^{2+}]_i$ von 47 nmol/l entspricht. Bei KO Standard hingegen 0,90, entsprechend betrug die $[Ca^{2+}]_i$ 69 nmol/l und war

damit fast 1,5-mal so groß. Bei WT Chondroitinase und KO Chondroitinase hingegen waren die Basisratios mit 0,81 und 0,82 fast identisch, entsprechend auch die $[Ca^{2+}]_i$ Werte mit 41 nmol/l und 44 nmol/l.

Ein deutlich signifikanter Unterschied fand sich beim Maximum zwischen KO und WT Standard ($p=0,0004$). Nach Behandlung mit Chondroitinase war dieser jedoch völlig verschwunden. Beim Plateau zeigte sich kein Unterschied zwischen WT und KO ($p=0,2$, sowohl für Standard als auch für Chondroitinase). Die AUC war bei KO Standard signifikant größer als bei WT Standard ($p=0,01$). Auch dieser Unterschied wurde durch die Chondroitinase-Behandlung so abgeschwächt, dass die Signifikanz verloren ging ($p=0,2$).

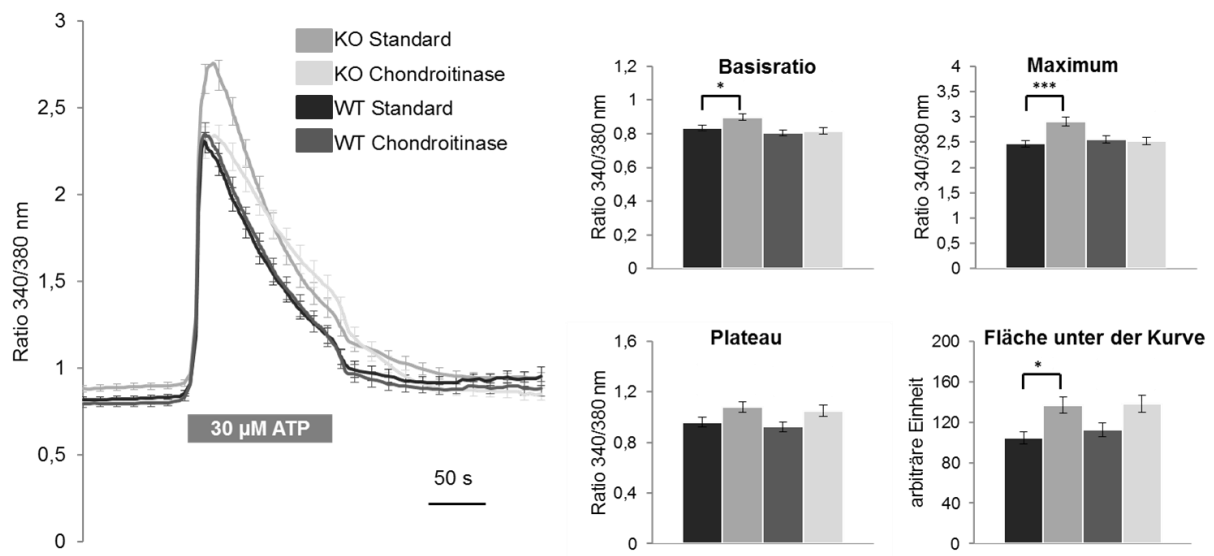


Abbildung 32: ATP Experiment mprMC. KO Standard n=41, WT Standard n=27, KO Chondroitinase n=20, WT Chondroitinase n=25

3.4 Einfluss des extrazellulären Ca^{2+} auf den ATP-induzierten Ca^{2+} -Transienten und Auswirkung des Fam20a Verlusts

Um den Anteil der intrazellulären Kalziumspeicher am ATP-induzierten Kalziumtransienten zu ermitteln, wurden Fura-2 Messungen mit mpPTEC und mprMC unter nahezu kalziumfreien Bedingungen durchgeführt.

Hierbei wurden Basisratio, Maximum und AUC wie oben beschrieben für den ersten Teil des Experiments (ATP-Stimulation in Ca^{2+} freier Lösung) ermittelt. Das Plateau ist in diesen Experimenten definiert als Zeitspanne von 60 s beginnend direkt nach erneutem Anstieg der Ratio nach Wiederherstellung normaler extrazellulärer Kalziumbedingungen.

3.4.1 Fam20a-abhängige Unterschiede sind unter kalziumfreien Bedingungen in SmpPTEC deutlich attenuiert

Abbildung 33 zeigt das Ergebnis des Versuchsansatzes für SmpPTEC in Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium. Dabei wurde deutlich, dass die sehr großen Unterschiede zwischen KO und WT aus dem ersten Versuch (Abbildung 30) deutlich abgemildert und damit nicht mehr statistisch signifikant waren.

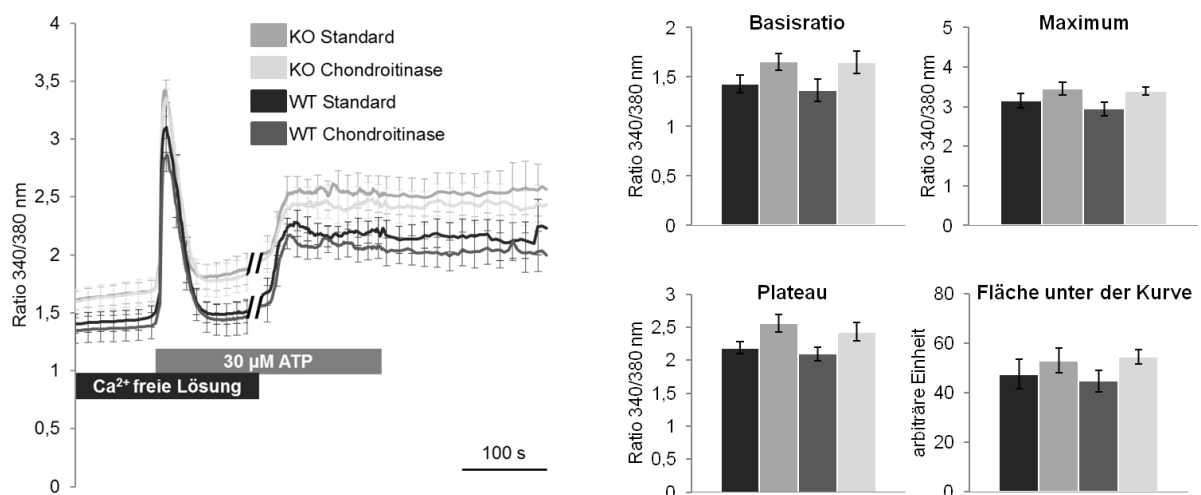


Abbildung 33: Experimente unter kalziumfreien Bedingungen: SmpPTEC. KO Standard n=7, WT Standard n=5, KO Chondroitinase n=7, WT Chondroitinase n=6

3.4.2 LmpPTEC zeigen keine Unterschiede unter extrazellulär kalziumfreien Bedingungen

Bei der Auswertung des Experiments für LmpPTEC ergab sich, wie auch schon im ersten Experiment, kein Unterschied zwischen KO und WT (Abbildung 34).

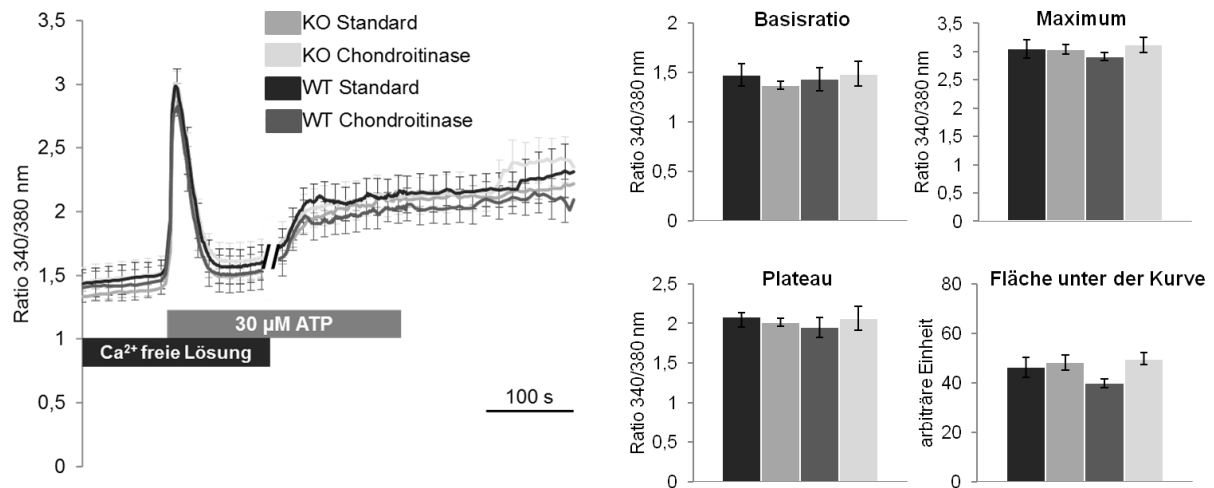


Abbildung 34: Experimente unter kalziumfreien Bedingungen: LmpPTEC. KO Standard n=8, WT Standard n=6, KO Chondroitinase n=8, WT Chondroitinase n=6

3.4.3 Fam20a defiziente mprMC haben einen vermehrten Kalziumeinstrom nach Kalziumdepletion

Der experimentelle Ansatz der ATP-Stimulation unter kalziumfreien Bedingungen wurde bei mprMC nur für KO und WT Standard in ausreichend großer Anzahl an Versuchen durchgeführt. Für KO und WT Chondroitinase war diese Anzahl zu gering um sie nach den gewählten Kriterien statistisch valide bewerten zu können.

Abbildung 35 stellt die Ergebnisse dieses Versuchsansatzes graphisch dar. Dabei zeigte sich, dass die anfänglichen Unterschiede zwischen KO und WT Standard aus dem ersten Versuchsansatz unter diesen neuen Bedingungen fast vollständig verschwunden waren. Lediglich das Plateau nach Wiederherstellung der normalen extrazellulären Kalziumkonzentration zeigte sich signifikant höher bei KO im Vergleich zu WT ($p=0,02$) und bestätigte somit die Ergebnisse aus dem ersten Versuchsansatz (Abbildung 32).

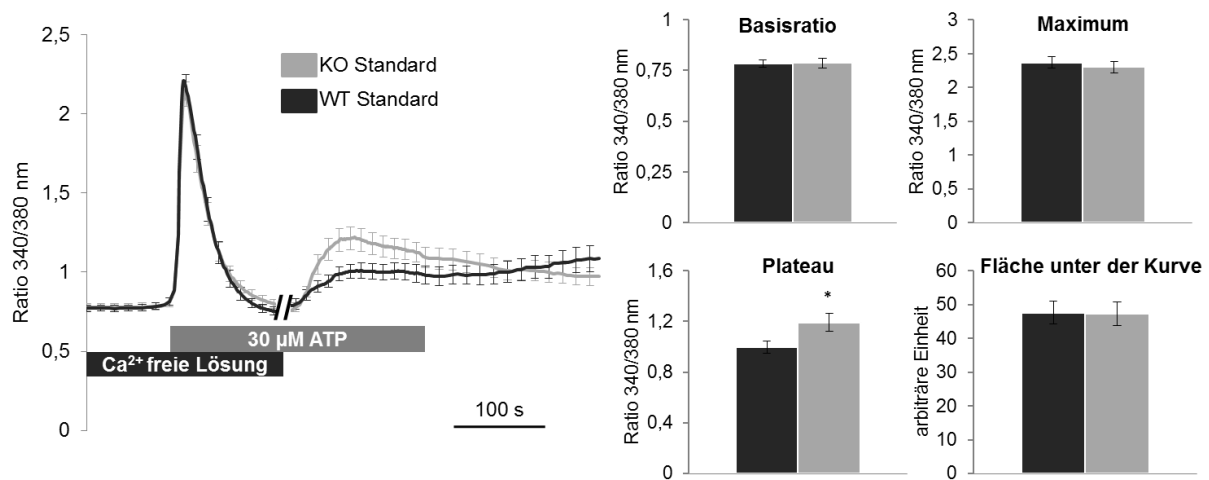


Abbildung 35: Verhalten der mprMC im Experiment unter kalziumfreien Bedingungen. KO Standard n=19, WT Standard n=22

Trotz zu geringer Anzahl zeigte die Auswertung der Experimente mit Chondroitinasebehandlung dennoch interessante Ergebnisse. Diese seien hier nur als Pilotstudie erwähnt und werden in Abbildung 36 dargestellt. Es zeigten sich Hinweise auf einen deutlichen Einfluss der Chondroitinase auf den Kalziumtransienten in Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium im Sinne einer deutlichen Verringerung des Maximums von KO im Vergleich zu WT. Nach Zugabe von extrazellulärem Ca²⁺ war das Plateau sowohl von WT als auch KO annähernd gleich, was wiederum die Ergebnisse aus 0 bestätigte. Um eine statistisch valide Aussage über die tatsächliche Chondroitinasewirkung unter diesen Bedingungen treffen zu können sind jedoch weitere Experimente nötig. Daher fehlt in diesem Ansatz auch die detaillierte statistische und graphische Auswertung der Einzelkriterien.

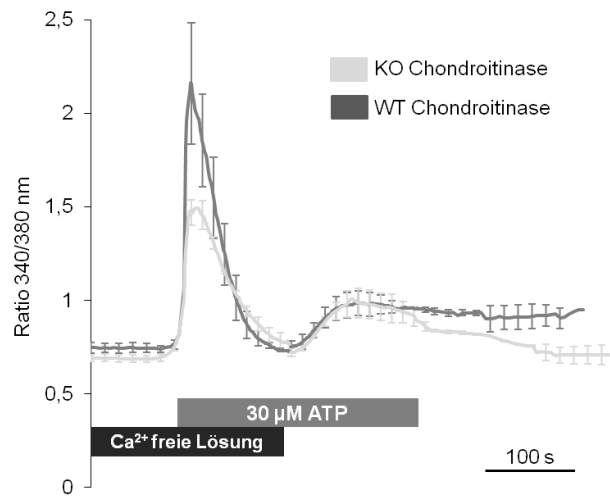


Abbildung 36: mprMC nach Chondroitinasebehandlung unter extrazellulär kalziumfreien Bedingungen. KO Chondroitinase n=6, WT Chondroitinase n=6. Aufgrund der geringen n-Zahl sei dieser Versuch nur als Pilotstudie erwähnt und es wurde keine detaillierte Auswertung der Einzelkriterien vorgenommen.

4. Diskussion

4.1 Methodik

4.1.1 Zellkulturen als Modellgewebe

4.1.1.1 LLC-PK₁

Als Pilotversuche wurden in dieser Arbeit Experimente mit veränderten Zellen der etablierten LLC-PK₁ Zellkultur durchgeführt. Dies ist eine 1976 von Hull et al. entwickelte und gut charakterisierte Zellkultur von renalen proximalen Tubuluszellen vom Schwein. Generell gilt jedoch, dass Erkenntnisse aus *in vitro* Versuchen mit Zellkulturen in der Regel nicht direkt eins zu eins *in vivo* übertragbar sind [65]. Beispielsweise exprimieren LLC-PK₁ Zellen kein Claudin 2 [65], welches *in vivo* eines der wichtigsten Claudine im PT darstellt [66].

Um die Funktion von Fam20a in Bezug auf die $[Ca^{2+}]_i$ näher zu ergründen, wurde eine Hälfte der LLC-PK₁ Zellen mit einem Knockdown-Konstrukt für Fam20a versehen. Beim Knockdown (KD) werden RNA-Interferenzen dazu verwendet spezifische Gene mittels siRNA (engl. *small interfering RNA*) stillzulegen, was als *Gene-silencing* bezeichnet wird [67]. Dieses Prinzip dient heute als wichtiges Instrument in der Grundlagenforschung [67].

Die hier verwendeten LLC-PK₁ Zellen wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Robert Kleta (Nephrology, University College London, GB) stabil mit einem siRNA-Konstrukt für Fam20a transfiziert. Die Kontrolle der KD-Effizienz erfolgte durch Expressionsanalyse mittels semiquantitativer RT-PCR und wurde ebenfalls in der Arbeitsgruppe unseres Kooperationspartners Prof. Dr. Kleta durchgeführt. Dabei zeigte sich eine um 70 % reduzierte Fam20a-Expression der KD-Zelllinie im Vergleich zur Kontrollzelllinie.

Der Knockdown stellt somit zwar kein optimales Modell dar, jedoch wurde die Reduktion der Fam20a Expression als ausreichend angesehen, um die Zellen für experimentelle Zwecke als Modell zu verwenden.

Aufgrund der genannten Nachteile wurde der experimentelle Ansatz mit LLC-PK₁ Zellen jedoch verlassen, sobald die Primärzellkulturen der Fam20a WT und KO Mäuse verfügbar waren.

4.1.1.2 Epitheliale Primärzellkultur mpPTEC

Nach Erhalt der Fam20a WT und KO Mäuse war das Ziel, die oben beschriebenen Versuche nun an einem nativen Gewebe durchzuführen ohne die genannten Einschränkungen einer permanenten Zellkultur. So wurden Primärkulturen aus nativen PT-Fragmenten der WT und KO Mäuse etabliert. Das Protokoll hierfür ähnelte in Grundzügen der von Romero et al. 1992 beschriebenen Methode zur Kultivierung primärer renaler PT-Zelllinien nach mechanisch-enzymatischer Dissektion der Tubuli [68]. Hier wurde jedoch keine Kultivierung auf Filtern durchgeführt, sondern auf unbeschichteten Deckgläschen, um die Mikroskopie zu ermöglichen. Entscheidender Unterschied bei der hier angewendeten Methode war jedoch, dass die daraus erwachsenen mpPTEC nicht passagiert und weiter kultiviert wurden, sondern nach Erreichen von Konfluenz nach wenigen Tagen bereits den verschiedenen experimentellen Ansätzen zugeführt wurden. Grund hierfür war die allseits gefürchtete Dedifferenzierung von Primärzellen in Kultur von Passage zu Passage und damit einhergehendem Verlust PT-spezifischer Eigenschaften [68].

Lichtmikroskopisch waren bereits nach wenigen Tagen Unterschiede in den Zellkulturen erkennbar, die morphologisch wie in 3.1.1 beschrieben, in SmpPTEC und LmpPTEC unterschieden wurden. Dies wurde als erster Hinweis auf bereits stattfindende Dedifferenzierung in den Kulturen angesehen.

Um den Grad der Dedifferenzierung der mpPTEC Kulturen immunhistochemisch nachzuvollziehen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit dem epithelialen Marker Cytokeratin, dem mesenchymalen Marker Vimentin sowie dem PT-spezifischen Marker Claudin 2 durchgeführt. Hatzinger et al. konnten zeigen, dass PT-Zellkulturen von Ratten Vimentin exprimieren, wenn es zu Zellproliferation, ausgelöst durch nephrotoxischen Stress kommt [69]. In differenzierten PT Zellen war dagegen kein Vimentin nachweisbar. Daraus leitete sich die Verwendung von Vimentin als Marker für Dedifferenzierung in primären PT Zellkulturen ab [70].

In der Immunfluoreszenz der SmpPTEC zeigte sich deutlich das Überwiegen von Cytokeratin sowie der Nachweis von Claudin 2, sodass SmpPTEC als differenzierte, funktionale PT Zellen angesehen wurden. Jedoch konnte auch bei SmpPTEC bereits ein geringer Anteil Vimentin-positiver Zellen nachgewiesen werden, was als Indikator für den rasch voranschreitenden Dedifferenzierungsprozess von Primärzellen in Kultur interpretiert wurde.

LmpPTEC exprimierten dagegen hauptsächlich Vimentin. Einige Zellen zeigten die gleichzeitige Expression von Cytokeratin und Vimentin. Allen LmpPTEC gemeinsam war das Fehlen von Claudin 2. Damit wurden LmpPTEC als dedifferenzierte PT Zellen im Proliferationsmodus angesehen, welche wesentliche Eigenschaften funktionaler transportierender PT Zellen eingebüßt hatten.

4.1.1.3 Mesenchymale Primärzellkultur mprMC

Um die beim ERS beschriebene interstitielle Nephrokalzinose und deren Entstehung näher zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Primärzellkultur aus renalen mesenchymalen Zellen etabliert, die die Zellen des renalen Interstitiums abbilden sollte, die mprMC Kultur. Dies wurde sowohl für Fam20a KO als auch WT durchgeführt. Grundgedanke dabei war, dass aus einer Mischung verschiedenster Nierenzellen, jedoch ohne Glomeruli oder Tubulusfragmente, nach mehrfachem Passagieren nur noch mesenchymale Zellen übrig bleiben. Überprüft wurde dies anhand von Immunfluoreszenzfärbungen mit dem mesenchymalen Marker Vimentin und dem epithelialen Marker Cytokeratin. Tatsächlich zeigte sich bei fast allen Kulturen bereits nach der dritten Passage ein deutliches Überwiegen bis ausschließliches Vorliegen vimentinpositiver Zellen.

2016 gelang es Ji, Bai et al. aus fetalem Nierengewebe vom Schaf mesenchymale Stammzellen nach einer ähnlichen Methode zu isolieren und für insgesamt 26 Passagen zu kultivieren [61]. Dabei wurde u.a. ebenfalls Vimentin als mesenchymaler Zellmarker verwendet.

Nachteil der hier angewandten Methode war jedoch, dass keine monoklonale Zelllinie untersucht wurde, sondern ein Gemisch verschiedener mesenchymaler Zellen unterschiedlicher Art und Morphologie. Dies schloss beispielsweise Fibroblasten, Myofibroblasten, mesenchymale Stammzellen, Mesangiumzellen und weitere mit ein.

Dennoch wurde die mprMC Kultur als repräsentativ für das renale Interstitium und damit als geeignetes Modellgewebe für die Untersuchung des Einflusses von Fam20a auf das intrazelluläre Kalziumsignaling angesehen.

4.1.2 Fura-2 Messungen

Zur Klärung der Frage, ob Fam20a Verlust einen Einfluss auf die $[Ca^{2+}]_i$ und die intrazelluläre Kalziumsignalübermittlung hat, wurden Fluoreszenzmessungen mit dem intrazellulären Farbstoff Fura-2 durchgeführt.

Bereits 1987 beschrieben Malgaroli, Milani et al. methodische Schwächen bei intrazellulären Kalziumfarbstoffen wie Fura-2, z.B. eine intrazellulär inhomogene Verteilung des Farbstoffs durch Anreicherung in perinuklear lokalisierten Lysosomen vorzugsweise in Fibroblasten. Ein weiterer methodischer Schwachpunkt besteht im raschen Export von Fura-2 aus der Zelle durch organische Anionentransporter, insbesondere in transportierenden Epithelien und dadurch bedingtem „Ausbleichen“ während des Experiments [71]. Beide Phänomene werden durch organische Anionentransporter vermittelt und können mittels Probenecid gehemmt werden [62].

In dieser Arbeit wurde ein entsprechendes Inkubationsprotokoll mit Probenecid verwendet. Dennoch zeigten sich vor allem in mpPTEC, und hier insbesondere bei SmpPTEC, deutliche Anzeichen eines Fura-Exports aus den Zellen im Laufe eines Experiments. Es kam zu einer deutlichen Reduktion der Emissionsintensität gegen Ende der Messungen durch zunehmenden Fura-2 Export in den EZR, da mit zunehmender Dauer des Experiments das Probenecid nach und nach ausgewaschen wurde. Dadurch war beispielsweise eine Kalibrierung unmittelbar im Anschluss an ein Experiment nicht möglich und es musste eine gesonderte Reihe an Kalibrierungsversuchen für alle verwendeten Zellarten durchgeführt werden. Inwieweit ein zusätzliches Ausbleichen des Farbstoffs durch Fotobleaching eine Rolle spielte, konnte im Einzelnen nicht quantifiziert werden.

4.2 Fam20a verändert die Kalziumhomöostase renaler Zellen

- Fam20a-Verlust führt bei mprMC zu einer verstärkten Kalziumantwort auf ATP-Stimulation
- Sowohl Chondroitinase als auch ein extrazellulär kalziumfreies Milieu können diesen Effekt aufheben
- Fam20a-Defizienz führt zu einer erhöhten basalen intrazellulären Kalziumkonzentration in SmpPTEC und mprMC

4.2.1 Verstärkter Kalziumtransient in renalen Mesenchymzellen und Einfluss von Chondroitinase

Nach Stimulation mit ATP zeigte sich in Fam20a-defizienten mprMC ein deutlich stärkerer Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, also ein deutlich größerer Kalziumtransient im Vergleich zu WT. Dagegen glichen sich in extrazellulär kalziumfreiem Milieu die Kalziumtransienten zwischen Fam20a WT und KO fast vollständig an.

Eine mögliche Erklärung für die deutlich höhere *peak response* von mprMC KO könnte eine Veränderung von Kationenkanälen, wie beispielsweise P2X-Rezeptoren sein, welche ligandengesteuert einen direkten Kalziumeinstrom aus dem EZR ermöglichen [72]. Um dies zu verifizieren sind jedoch weitere Studien zur Expression und spezifischen Inhibition von P2X-Rezeptoren in Fam20a-defizienten mprMC nötig.

Nach Entfernen des extrazellulären Kalziums steht für die ATP-stimulierte intrazelluläre Kalziumsignaltransduktion lediglich noch das in intrazellulären Speichern vorhandene Ca^{2+} zur Verfügung [38]. Unter diesen Bedingungen zeigten sich die Kalziumtransienten von WT und KO jedoch beinahe identisch. Dies deutet darauf hin, dass in der Tat das extrazelluläre Ca^{2+} hauptverantwortlich für den Unterschied im Kalziumtransienten von WT und KO sein muss. Eine verstärkte Expression von P2Y-Rezeptoren oder aber auch ein vermehrter Füllungszustand intrazellulärer Kalziumspeicher und dadurch verstärkte P2Y-Antwort, die so indirekt zu einer Erhöhung der basalen $[Ca^{2+}]_i$ führen würden, erscheinen daher eher unwahrscheinlich. Diese Hypothese wurde zudem dadurch bestätigt, dass sich der Kalziumtransient der

Fam20a KO mprMC nach Wiederherstellung einer normalen Ca^{2+} Konzentration im extrazellulären Milieu erneut deutlich größer als derjenige der WT mprMC zeigte.

Es konnte gezeigt werden, dass in humanen Fibroblastenkulturen von Patienten mit ERS bei Fam20a-Defizienz die Menge an extrazellulärem Chondroitinsulfat doppelt so groß war im Vergleich zu Kontrollfibroblasten, jedoch strukturell verändert mit veränderten Verzweigungsmustern (unveröffentlichte Daten, H. Kitagawa, Kobe Pharmaceutical University, Japan). Die hier untersuchte mprMC Kultur repräsentiert die Zellen des renalen Interstitiums, die wesentlich zur EZM-Produktion beitragen [4], sodass in der KO Kultur ebenfalls eine veränderte CS Menge und Zusammensetzung angenommen wurde. Die negativ geladenen GAGs wie CS üben eine extrazelluläre Pufferfunktion für divalente Kationen wie Ca^{2+} aus [13, 73]. Gleichzeitig konnte in Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe [74] jedoch gezeigt werden, dass in Überständen von Fam20a-defizienten LLC-PK1 Zellen trotz mehr, jedoch anders verzweigten CS die Ca^{2+} Aktivität in Zellkulturüberständen höher war, d.h. ein größeres Angebot an Kalziumionen in unmittelbarer Nähe der Zellen zur Verfügung stand.

Die Behandlung mit dem Enzym Chondroitinase ABC (*Proteus vulgaris*), welches Chondroitinsulfat spaltet [14], konnte den Effekt der Fam20a Defizienz vollständig aufheben. Wie lässt sich dies erklären? 2009 konnten Hrabetova, Masri et al. zeigen, dass die Kalziumdiffusion im Neocortex und Hippocampus durch Entfernung von CS aus dem EZR durch Chondroitinase ABC deutlich beschleunigt wurde. Dies legt nahe, dass CS bzw. CS-Proteoglykane die lokalen Diffusionseigenschaften divalenter Kationen im EZR beeinflussen und wahrscheinlich durch elektrostatische Interaktionen aufgrund ihres polyanionischen Charakters die lokale Kalziumdiffusion behindern [75]. Diese Erkenntnisse lassen sich auf die vorliegende Arbeit wie folgt übertragen: Aufgrund der Veränderung der CS im EZR um Fam20a-defiziente renale interstitielle Zellen und der damit verbundenen lokal erhöhten Ca^{2+} Konzentration kommt es nach ATP-Stimulation zu einem verstärkten Ca^{2+} Einstrom nach intrazellulär und damit zu einem erhöhten Kalziumtransienten. Nach Entfernung des Überschusses an extrazellulären CS durch Chondroitinase ist die räumliche und zeitliche Verfügbarkeit von Ca^{2+} im EZR sowohl für KO als auch für WT wieder annähernd identisch. Daher gleichen sich die Kalziumtransienten von KO und WT annähernd an. Durch Entzug extrazellulären Kalziums wird die Verfügbarkeit für eine intrazelluläre Signalkaskade auf die intrazellulären Kalziumspeicher begrenzt. Da die Transienten unter diesen

Bedingungen ebenfalls keinen Unterschied aufweisen, scheiden die Speicher als Erklärung für den Effekt aus.

Aufgrund zu geringer Datenmenge kann zum Chondroitinaseeffekt auf mprMC unter Ca^{2+} freien Bedingungen keine valide Aussage getroffen werden. Jedoch zeigten sich in den Pilotversuchen Hinweise auf einen deutlichen Einfluss von Chondroitinase auf die *peak response* von mprMC KO. Hierfür sind jedoch weitere Experimente nötig, um dies statistisch valide bewerten und im Gesamtzusammenhang diskutieren zu können.

4.2.2 Fam20a-Defizienz führt zu einer erhöhten basalen intrazellulären Kalziumkonzentration in proximal tubulären Epithelzellen und in renalen Mesenchymzellen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Fam20a-Verlust in der differenzierten PT-Kultur SmpPTEC eine primär erhöhte basale intrazelluläre Kalziumkonzentration besteht. In der mesenchymalen Primärkultur mprMC führte die Fam20a-Defizienz ebenfalls zu einer primären Erhöhung der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Wodurch lässt sich diese Veränderung erklären? Wie wirkt sich der Fam20a-Verlust auf den Kalziumhomöostase-Apparat der Zelle aus?

Ansatzpunkte sind einerseits Kalziumkanäle, andererseits Ca^{2+} -ATPasen (z.B. PMCA) und der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, die nach erfolgtem Ca^{2+} -Signal die ursprüngliche $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wiederherstellen und somit essentiell für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Kalziumhomöostase sind [76, 77]. In zerebellären Granularzellen konnte gezeigt werden, dass deren langfristiges Überleben in Kultur an eine Erhöhung der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch partielle Öffnung von L-Typ Kalziumkanälen gekoppelt war [24]. Damit einher gingen verschiedenste Änderungen der Expression der membranständigen Ca^{2+} -ATPasen, intrazellulären IP_3 -abhängigen Kalziumkanäle und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher [24].

2016 konnten Udem et al. [78] zeigen, dass es bei chronischer Hypoxie zu einer Erhöhung der basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in glatten Muskelzellen von Lungenarterien durch vermehrten Ca^{2+} Einstrom durch unspezifische Kationenkanäle und durch umgekehrte Wirkung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers kommt. Der verstärkte Ca^{2+} Einstrom war dabei bedingt durch eine vermehrte Expression von TRPC Proteinen (engl. *canonical*

transient receptor potential) [79], welche als Kationenkanäle (SOCCs) eine wichtige Rolle bei der Kalzium-Signaltransduktion durch SOCE spielen [80].

Über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ist bekannt, dass er in der gesunden Niere ein Ca^{2+} Ion aus der Zelle im Austausch gegen drei Na^+ Ionen transportiert. Unter pathologischen Bedingungen, z.B. bei Ischämie-Reperfusionen bei akuten Nierenversagen kommt es dagegen zu einer Umkehr des Transportvorgangs, sodass es zu einem Kalziumeinstrom und Natriumausstrom mit konsekutiver Kalziumüberladung des IZR kommt [81]. Daraus resultiert die Schädigung der renalen Tubulusepithelzellen.

Für die vorliegende Arbeit erscheint eine Veränderung der Ca^{2+} -ATPasen oder des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher eher fraglich, da im Zuge dessen auch Form und Eigenschaften des ATP-induzierten Ca^{2+} Transienten bei Fam20a Defizienz im Vergleich zu WT verändert sein müssten. Um dies zu bestätigen sind weitere Experimente nötig, beispielsweise mit spezifischen Inhibitoren des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers und der Ca^{2+} -ATPasen oder Expressionsanalysen.

Ursächlich für die höhere basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ könnte jedoch auch eine primär verminderte cytosolische Kalziumpufferkapazität bei Fam20a KO sein. Kalziumpuffer liegen im Ruhezustand vorwiegend, jedoch nicht ausschließlich in ihrer kalziumungebundenen Form vor [77]. Man unterscheidet mobile und immobile Kalziumpuffer [82]. Zu den mobilen Kalziumpuffern gehört die Klasse der EF-Hand Proteine mit einer hohen Kalziumbindungskapazität [31], zu der beispielsweise Calbindin, Calretinin, Parvalbumin, Regucalcin und viele mehr zählen. Insgesamt sind über 600 Vertreter der EF-Hand Proteinfamilie bekannt [24]. Dagegen ist über die Struktur und Eigenschaften immobiler Kalziumpuffer bislang wenig bekannt [77]. Immobile Kalziumpuffer besitzen eine relativ geringe Kalziumaffinität und -bindungskapazität und sind vermutlich Membranproteine bzw. Membran-assoziierte Proteine sowie negativ geladene Phospholipidgruppen des inneren Blattes der Zellmembran [77, 83].

Eine mögliche Erklärung für veränderte intrazelluläre Kalziumpufferkapazität könnte eine veränderte Expression von CBPs darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass in Motoneuronen eine verminderte intrazelluläre Kalziumpufferkapazität mit einer reduzierten Expression von CBPs wie Calbindin D28k oder Parvalbumin einhergeht [84]. 2015 konnten Delvendahl, Jablonski et al. zeigen, dass eine reduzierte endogene

Kalziumpufferkapazität eine schnellere synaptische Signalübertragung ermöglicht [83]. In dieser Studie an zerebellären Moosfasern konnte ebenfalls ein vermindertes Expressionslevel von Parvalbumin als CBP nachgewiesen werden.

Was an dieser Stelle jedoch nicht ganz mit den Ergebnissen dieser Arbeit in Einklang zu bringen ist, ist die These, dass mobile und immobile Kalziumpuffer eher die Form des Kalziumsignals in Bezug auf seine örtliche und zeitliche Ausdehnung im Cytosol zu beeinflussen scheinen, als die basale $[Ca^{2+}]_i$ [77]. Des Weiteren wurden die meisten Studien, welche das intrazelluläre Kalziumsignaling untersuchen, an erregbaren Zellen wie Neuronen oder Muskelzellen durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit handelt es sich mit PT und mesenchymalen Zellen jedoch um eine Untersuchung von nicht erregbaren Zellen.

Als allgemein akzeptiert gilt, dass die Kalziumresorption im PT über den parazellulären Weg passiv erfolgt oder über das transepitheliale Potenzial angetrieben wird [20, 85]. Jedoch gibt es mehr und mehr Hinweise auf eine zusätzliche aktive Resorption von Kalzium im proximalen Tubulus. Bereits 1980 konnten Rouse et al. im PST des PT einen aktiven Kalziumtransport nachweisen, der 20-30 % des gesamten Kalziumflusses über den PT ausmachen soll. Die genauen molekularen Mechanismen dahinter sind jedoch bislang weitgehend unbekannt. Zusätzlich wurden spannungsabhängige L-Typ-Kalziumkanäle und TRPC 1-Kanäle in der apikalen Membran von PT-Zellen nachgewiesen [86-88]. All dies weist auf einen zusätzlichen, aktiven Resorptionsmechanismus für Kalzium im PT hin.

Regucalcin, ein CBP, für das eine supprimierende Wirkung auf das intrazelluläre Kalziumsignaling in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen wurde, spielt eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Kalziumhomöostase in PT Zellen der Niere [76]. Es konnte gezeigt werden, dass Regucalcin ATP-abhängige Ca^{2+} Transporter in der basolateralen Membran von kortikalen proximalen Tubuluszellen der Ratte aktiviert und so einen wichtigen Beitrag zum transzellulären Kalziumtransport im PT und damit der Ca^{2+} Rückresorption aus dem Primärharn leistet [76, 89]. Von Patienten mit Fam20a Mutationen und ERS ist bekannt, dass die Konzentration von Kalzium im Urin vermindert ist, während die Konzentration von Ca^{2+} und Phosphat im Blut durchweg normal bleibt [43, 44].

Daraus ergibt sich die Hypothese, dass Fam20a möglicherweise einen Einfluss auf die Menge und Art intrazellulärer Kalziumpuffer wie CBPs und damit auf die intrazelluläre Kalziumpufferkapazität hat.

Um dies zu verifizieren sind weitere Experimente nötig, einerseits bezüglich direkter Messungen der intrazellulären Kalziumpufferkapazität in Fam20a defizienten Zellen, beispielsweise durch die von Neher und Augustine 1992 entwickelte Methode des Zufügens von Kalziumpuffer in Form von Fura-2, dessen kalziumbindende Eigenschaften bekannt sind, bei gleichzeitiger Patch clamp Messung der Zelle [82, 90]. Andererseits durch Untersuchung der Art der CBPs und der Quantifizierung der CBP-Expression in Fam20a defizienten Zellen.

Warum hatte der Fam20a Verlust keinen Effekt auf die basale $[Ca^{2+}]_i$ von LmpPTEC? LmpPTEC waren durch Verlust von Claudin 2 und Expression von Vimentin nachgewiesenermaßen nicht mehr im Funktionszustand einer differenzierten PT Zelle so wie SmpPTEC, sondern in dedifferenziertem Zustand (siehe 4.1.1.2). Dass sich die basale $[Ca^{2+}]_i$ von LmpPTEC bei Fam20a KO und WT nicht unterschied, legt die Vermutung nahe, dass die mit dem Fam20a-Verlust einhergehenden Veränderungen der intrazellulären Kalziumhomöostase, wie z.B. eine mutmaßlich veränderte Pufferkapazität oder veränderte Transportvorgänge, vom Funktionszustand der Zelle abhängig sind und nur in differenzierten, voll funktionsfähigen PT Zellen signifikant ausgeprägt sind [17].

Unter extrazellulär Ca^{2+} freien Bedingungen war der Unterschied in der basalen $[Ca^{2+}]_i$ zwischen SmpPTEC KO und WT deutlich attenuiert und damit nicht mehr statistisch signifikant. Dies könnte ein Hinweis auf den Einfluss des extrazellulären Ca^{2+} für die durch Fam20a-Defizienz bedingte Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ sein. Im Prinzip verhindert die Wegnahme von extrazellulärem Ca^{2+} das Nachströmen von Ca^{2+} aus dem EZR in den IZR bzw. erleichtert den Ca^{2+} Transport in den Extrazellularraum [24, 25] und könnte damit einen Mangel an Ca^{2+} Pufferkapazität teilweise ausgleichen, da einfach weniger Puffer benötigt wird. Ein anderer Grund hierfür könnte jedoch auch eine durch die Analysemethode bedingte geringe n-Zahl von n=5-7 Mäusen sein, da bei mpPTEC jeweils alle Einzelexperimente der Kulturen einer Maus zusammengefasst wurden. Daher sind weitere Experimente nötig um diesen Sachverhalt aufzuklären.

Die Behandlung mit Chondroitinase hatte generell keinen Effekt auf die basale $[Ca^{2+}]_i$ in mpPTEC weder bei WT noch bei KO. Die mpPTEC Primärkultur besteht aus Epithelzellen, welche unter physiologischen Bedingungen keine EZM produzieren. Unter pathologischen Bedingungen konnten Borges et al. 2005 jedoch erstmals die Synthese von Chondroitinsulfat-Proteoglykanen durch LLC-PK₁ Zellen im Rahmen von Kalziumoxalat-Kristallisation nachweisen [91]. Bereits 1997 zeigten Weinstein, Gafter et al. die Bindung von GAGs wie Heparansulfat und Chondroitinsulfat an die basolaterale Membran und die Basalmembran von PT Zellen [92]. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass die Veränderung der Zusammensetzung der EZM keinen Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumsignaltransduktion in mpPTEC hat.

Anders verhält sich dies jedoch bei den mesenchymalen Zellkulturen. In der mesenchymalen Primärkultur mprMC führte die Fam20a-Defizienz ebenfalls zu einer primären Erhöhung der basalen $[Ca^{2+}]_i$. Dies konnte jedoch durch den EZM-Verdau nach Chondroitinasebehandlung aufgehoben werden.

4.2.3 Überlegungen zur Rolle von Fam20a bei Kalzifizierungsprozessen im Rahmen des ERS

Es wurde gezeigt, dass Fam20a als Pseudokinase Fam20c aktiviert, wodurch normalerweise sezernierte Proteine phosphoryliert werden, z.B. Proteoglykane [93]. Fehlt Fam20a wird Fam20c vermindert bzw. nicht aktiviert, wodurch es zu einer verminderten Proteinphosphorylierung und Sekretion von EZM-Proteinen kommt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die CS-Menge bei Fam20a-defizienten Fibroblastenkulturen doppelt so hoch war wie bei Kontrollfibroblasten, jedoch mit unterschiedlicher Verzeigerungsrate der Disaccharid-Ketten (unveröffentlichte Daten, H. Kitagawa, Kobe Pharmaceutical University, Japan). Dies ließe sich durch verschiedene Hypothesen erklären: 1. Die Fam20c-Aktivität oder Expression könnte bei Fehlen von Fam20a (unkontrolliert) hochreguliert sein und führt zu fehlgebildetem CS. 2. Es handelt sich um ein artifizielles *in vitro* Phänomen, dessen Nachweis *in vivo* noch aussteht. 3. Fam20a könnte neben Fam20c noch weitere Enzyme regulieren, die an der EZM-Synthese beteiligt sind. Hierfür würde ein weiterer Befund bei Fam20a defizienten Fibroblastenkulturen sprechen, nämlich eine deutlich höhere Aktivität der

GalNac Transferase (unveröffentlichte Daten, Physiologisches Institut der CAU Kiel, AG Bleich). Fam20a könnte deren Aktivität beispielsweise durch negative Rückkopplung regulieren.

Die nachgewiesene erhöhte basale $[Ca^{2+}]_i$ in den proximal tubulären Zellen könnte andererseits ein Hinweis für eine gesteigerte Aktivität eines aktiven Kalziumresorptionsmechanismus bei Fam20a-Defizienz darstellen. Unter Einbezug der Ergebnisse der mesenchymalen Zellkultur könnte weiter spekuliert werden, dass durch eine höhere Menge an CS und damit verbundener höherer lokaler Kalziumkonzentration im EZR in Verbindung mit einer gesteigerten tubulären Resorption eine interstitielle Präzipitation von Ca^{2+} begünstigt wird. Dies könnte ein Erklärungsansatz für die interstitielle Nephrokalzinose beim ERS sein.

Der Nachweis für diese Hypothese steht jedoch bislang aus. Es sind weitere Experimente hierfür nötig, insbesondere an isolierten perfundierten Tubuli zur genaueren Untersuchung der stattfindenden Transportprozesse.

5. Zusammenfassung

Vielfältige Untersuchungen der letzten Jahre haben dazu beigetragen die Funktion von Fam20a mehr und mehr zu enthüllen. Bei Mutationen im Fam20a-Gen kommt es zum *Enamel-Renal-Syndrome* (ERS) [42]. Das sehr seltene ERS beschreibt einen Symptomkomplex aus Amelogenesis imperfecta und Nephrokalzinose.

In dieser Arbeit konnte erstmals der Einfluss von Fam20a auf die intrazelluläre Kalziumsignaltransduktion renaler Zellen nachgewiesen werden.

Als Modellgewebe dienten hierfür Fam20a KO- und WT-Primärzellkulturen sowohl des epithelialen als auch des mesenchymalen Anteils der Niere und eine etablierte Zelllinie des proximalen Tubulus mit supprimierter Fam20a-Expression. Als experimenteller Ansatz wurden intrazelluläre Kalziummessungen in den Modellgeweben durchgeführt.

In differenzierten renalen proximalen Tubuluszellen zeigte sich bei Fehlen von Fam20a eine primär erhöhte basale intrazelluläre Kalziumkonzentration. In renalen mesenchymalen Zellen beeinflusste die Fam20a-Defizienz zusätzlich die Höhe des entstehenden Kalziumtransienten nach Stimulation mit ATP. Aufgrund der Veränderung der Chondroitinsulfate im EZR um Fam20a-defiziente renale interstitielle Zellen und der damit verbundenen lokal erhöhten Ca^{2+} Konzentration kam es nach ATP-Stimulation zu einem verstärkten Ca^{2+} Einstrom nach intrazellulär und damit zu einem erhöhten Kalziumtransienten. Sowohl durch Entzug extrazellulären Kalziums, als auch nach enzymatischer Behandlung der Extrazellulärmatrix mit Chondroitinase ließ sich dieser Effekt in den mesenchymalen Zellen aufheben. In den proximalen Tubuluszellen hingegen hatte lediglich der Entzug extrazellulären Kalziums einen verminderten Effekt auf die basale Kalziumkonzentration. Das Enzym hatte darauf keinen Einfluss.

Zusammenfassend ergibt sich aus den vorliegenden Daten für die proximal tubulären Zellen die Schlussfolgerung, dass Fam20a-Verlust entweder zu einer verminderten intrazellulären Kalziumpufferkapazität oder zu einer gesteigerten aktiven Kalziumresorption unter Ruhebedingungen führen könnte. Dagegen ist in renalen mesenchymalen Zellen ein deutlicher Einfluss von Fam20a auf die Zusammensetzung und Eigenschaften der Extrazellulärmatrix wahrscheinlich. Zusammengenommen

schaffen diese Veränderungen ein Milieu im renalen Interstitium, welches eine Präzipitation von Kalzium und damit eine fortschreitende Nephrokalzinose mit progredientem Nierenversagen begünstigt.

Weiterführende Experimente sind jedoch nötig, um die damit verbundenen Hypothesen kritisch zu überprüfen und die molekularen Mechanismen dahinter aufzuklären.

6. Literaturverzeichnis

1. Klinker, R., Silbernagl, S., *Lehrbuch der Physiologie*. 2003, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
2. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenbuch Histologie*. 2009, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
3. Günzel, D. and A.S. Yu, *Claudins and the modulation of tight junction permeability*. *Physiol Rev*, 2013. 93(2): p. 525-69.
4. Lemley, K.V. and W. Kriz, *Anatomy of the renal interstitium*. *Kidney International*, 1991. 39(3): p. 370-381.
5. Kaissling, B. and M. Le Hir, *The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects*. *Histochem Cell Biol*, 2008. 130(2): p. 247-62.
6. Boor, P. and J. Floege, *The renal (myo-)fibroblast: a heterogeneous group of cells*. *Nephrol Dial Transplant*, 2012. 27(8): p. 3027-36.
7. Meran, S. and R. Steadman, *Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis*. *Int J Exp Pathol*, 2011. 92(3): p. 158-67.
8. Maxwell, P.H., et al., *Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice*. *Kidney International*, 1993. 44(5): p. 1149-1162.
9. Bachmann, S., M. Le Hir, and K.U. Eckardt, *Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin*. *J Histochem Cytochem*, 1993. 41(3): p. 335-41.
10. Lee, J.M., et al., *The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease*. *J Cell Biol*, 2006. 172(7): p. 973-81.
11. Grgic, I., J.S. Duffield, and B.D. Humphreys, *The origin of interstitial myofibroblasts in chronic kidney disease*. *Pediatr Nephrol*, 2012. 27(2): p. 183-93.
12. Loeffler, I. and G. Wolf, *Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Diabetic Nephropathy: Fact or Fiction?* *Cells*, 2015. 4(4): p. 631-52.
13. Labat-Robert, J., M. Bihari-Varga, and L. Robert, *Extracellular matrix*. 1990.
14. Zeng, Y., et al., *The structural stability of the endothelial glycocalyx after enzymatic removal of glycosaminoglycans*. *PLoS One*, 2012. 7(8): p. e43168.
15. Hay, E.D., *An overview of epithelio-mesenchymal transformation*. *Acta Anat (Basel)*, 1995. 154(1): p. 8-20.
16. Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. *Journal of Clinical Investigation*, 2003. 112(12): p. 1776-1784.

17. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. 119(6): p. 1420-8.
18. Liu, Y., *Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis*. Nat Rev Nephrol, 2011. 7(12): p. 684-96.
19. Kriz, W., B. Kaissling, and M. Le Hir, *Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy?* Journal of Clinical Investigation, 2011. 121(2): p. 468-474.
20. Bleich, M., Q. Shan, and N. Himmerkus, *Calcium regulation of tight junction permeability*. Ann N Y Acad Sci, 2012. 1258: p. 93-9.
21. Fahlke, C., Linke, W. A., Raßler, B., Wiesner, R. J., *Taschenatlas Physiologie*. 2008, München: Elsevier, Urban & Fischer.
22. Gambaro, G. and A. Trinchieri, *Recent advances in managing and understanding nephrolithiasis/nephrocalcinosis*. F1000Res, 2016. 5.
23. Reddish, F.N., et al., *Calcium Dynamics Mediated by the Endoplasmic/Sarcoplasmic Reticulum and Related Diseases*. Int J Mol Sci, 2017. 18(5).
24. Brini, M. and E. Carafoli, *Calcium pumps in health and disease*. Physiol Rev, 2009. 89(4): p. 1341-78.
25. Berridge, M.J., *Elementary and global aspects of calcium signalling*. J Physiol, 1997. 499 (Pt 2)(Pt 2): p. 291-306.
26. Mercer, J.C., et al., *Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1*. J Biol Chem, 2006. 281(34): p. 24979-90.
27. Lopez, J.J., et al., *Molecular modulators of store-operated calcium entry*. Biochim Biophys Acta, 2016. 1863(8): p. 2037-43.
28. Prakriya, M. and R.S. Lewis, *Store-Operated Calcium Channels*. Physiol Rev, 2015. 95(4): p. 1383-436.
29. Roos, J., et al., *STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function*. J Cell Biol, 2005. 169(3): p. 435-45.
30. Feske, S., et al., *A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function*. Nature, 2006. 441(7090): p. 179-85.
31. Niki, I., et al., *Ca²⁺ signaling and intracellular Ca²⁺ binding proteins*. J Biochem, 1996. 120(4): p. 685-98.
32. Heinrich, P.C., M. Müller, and L. Graeve, *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 2014, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag GmbH.
33. Leipziger, J., *Control of epithelial transport via luminal P2 receptors*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. 284(3): p. F419-32.
34. Ralevic, V. and G. Burnstock, *Receptors for purines and pyrimidines*. Pharmacol Rev, 1998. 50(3): p. 413-92.

35. Koshimizu, T.A., et al., *Characterization of calcium signaling by purinergic receptor-channels expressed in excitable cells*. Mol Pharmacol, 2000. 58(5): p. 936-45.
36. Kaczmarek-Hajek, K., et al., *Molecular and functional properties of P2X receptors--recent progress and persisting challenges*. Purinergic Signal, 2012. 8(3): p. 375-417.
37. Lu, D. and P.A. Insel, *Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 6. Purinergic signaling and response in fibroblasts and tissue fibrosis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2014. 306(9): p. C779-88.
38. Xia, S.L., et al., *Extracellular ATP-induced calcium signaling in mIMCD-3 cells requires both P2X and P2Y purinoceptors*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. 287(2): p. F204-14.
39. Nalbant, D., et al., *FAM20: an evolutionarily conserved family of secreted proteins expressed in hematopoietic cells*. BMC Genomics, 2005. 6: p. 11.
40. Wang, S.K., et al., *FAM20A mutations can cause enamel-renal syndrome (ERS)*. PLoS Genet, 2013. 9(2): p. e1003302.
41. O'Sullivan, J., et al., *Whole-Exome sequencing identifies FAM20A mutations as a cause of amelogenesis imperfecta and gingival hyperplasia syndrome*. Am J Hum Genet, 2011. 88(5): p. 616-20.
42. Jaureguiberry, G., et al., *Nephrocalcinosis (enamel renal syndrome) caused by autosomal recessive FAM20A mutations*. Nephron Physiol, 2012. 122(1-2): p. 1-6.
43. de la Dure-Molla, M., et al., *Pathognomonic oral profile of Enamel Renal Syndrome (ERS) caused by recessive FAM20A mutations*. Orphanet J Rare Dis, 2014. 9: p. 84.
44. Wang, S.K., et al., *FAM20A mutations associated with enamel renal syndrome*. J Dent Res, 2014. 93(1): p. 42-8.
45. Poulter, J.A., et al., *A distinctive oral phenotype points to FAM20A mutations not identified by Sanger sequencing*. Mol Genet Genomic Med, 2015. 3(6): p. 543-9.
46. Vogel, P., et al., *Amelogenesis imperfecta and other biomineralization defects in Fam20a and Fam20c null mice*. Vet Pathol, 2012. 49(6): p. 998-1017.
47. Li, L.L., et al., *Loss of epithelial FAM20A in mice causes amelogenesis imperfecta, tooth eruption delay and gingival overgrowth*. Int J Oral Sci, 2016. 8(2): p. 98-109.
48. Koike, T., et al., *FAM20B is a kinase that phosphorylates xylose in the glycosaminoglycan-protein linkage region*. Biochem J, 2009. 421(2): p. 157-62.
49. Cui, J., et al., *A secretory kinase complex regulates extracellular protein phosphorylation*. Elife, 2015. 4: p. e06120.
50. Tagliabracci, V.S., et al., *A Single Kinase Generates the Majority of the Secreted Phosphoproteome*. Cell, 2015. 161(7): p. 1619-32.
51. Tagliabracci, V.S., et al., *Secreted kinase phosphorylates extracellular proteins that regulate biomineralization*. Science, 2012. 336(6085): p. 1150-3.

52. Ishikawa, H.O., et al., *The Raine syndrome protein FAM20C is a Golgi kinase that phosphorylates bio-mineralization proteins*. PLoS One, 2012. 7(8): p. e42988.
53. Wang, X., et al., *Inactivation of a novel FGF23 regulator, FAM20C, leads to hypophosphatemic rickets in mice*. PLoS Genet, 2012. 8(5): p. e1002708.
54. Raine, J., et al., *Unknown syndrome: microcephaly, hypoplastic nose, exophthalmos, gum hyperplasia, cleft palate, low set ears, and osteosclerosis*. J Med Genet, 1989. 26(12): p. 786-8.
55. Simpson, M.A., et al., *Mutations in FAM20C are associated with lethal osteosclerotic bone dysplasia (Raine syndrome), highlighting a crucial molecule in bone development*. Am J Hum Genet, 2007. 81(5): p. 906-12.
56. Acevedo, A.C., et al., *Variability of systemic and oro-dental phenotype in two families with non-lethal Raine syndrome with FAM20C mutations*. BMC Med Genet, 2015. 16: p. 8.
57. Cui, J., et al., *Structure of Fam20A reveals a pseudokinase featuring a unique disulfide pattern and inverted ATP-binding*. Elife, 2017. 6.
58. Ohyama, Y., et al., *FAM20A binds to and regulates FAM20C localization*. Sci Rep, 2016. 6: p. 27784.
59. Wang, S.K., A.C. Samann, and J.P. Simmer, *Secreted protein kinases?* Trends Biochem Sci, 2013. 38(9): p. 424-5.
60. Tagliabracci, V.S., L.A. Pinna, and J.E. Dixon, *Secreted protein kinases*. Trends Biochem Sci, 2013. 38(3): p. 121-30.
61. Ji, M., et al., *Biological characterization of sheep kidney-derived mesenchymal stem cells*. Exp Ther Med, 2016. 12(6): p. 3963-3971.
62. Di Virgilio, F., T.H. Steinberg, and S.C. Silverstein, *Inhibition of Fura-2 sequestration and secretion with organic anion transport blockers*. Cell Calcium, 1990. 11(2-3): p. 57-62.
63. Maruyama, I., et al., *Loading of fura-2/AM with an aid of DFP on single smooth muscle cells prepared from guinea pig taenia coli*. J Pharmacol Methods, 1989. 21(1): p. 1-12.
64. Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien, *A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties*. J Biol Chem, 1985. 260(6): p. 3440-50.
65. Prozialeck, W.C. and J.R. Edwards, *Cell adhesion molecules in chemically-induced renal injury*. Pharmacology & therapeutics, 2007. 114(1): p. 74-93.
66. Reyes, J.L., et al., *The renal segmental distribution of claudins changes with development*. Kidney Int, 2002. 62(2): p. 476-87.
67. Kim, V.N., *RNA interference in functional genomics and medicine*. J Korean Med Sci, 2003. 18(3): p. 309-18.

68. Romero, M.F., et al., *Development and characterization of rabbit proximal tubular epithelial cell lines*. Kidney International, 1992. 42(5): p. 1130-1144.
69. Hatzinger, P.B., et al., *Alterations in intermediate filament proteins in rat kidney proximal tubule epithelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. 157(3): p. 1316-22.
70. McQueen, C.A., *Comprehensive Toxicology*. Vol. 7. 2010, Kidlington, Oxford: Elsevier Ltd.
71. Malgaroli, A., et al., *Fura-2 measurement of cytosolic free Ca²⁺ in monolayers and suspensions of various types of animal cells*. J Cell Biol, 1987. 105(5): p. 2145-55.
72. Liang, L., A. Zsembery, and E.M. Schwiebert, *RNA interference targeted to multiple P2X receptor subtypes attenuates zinc-induced calcium entry*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. 289(2): p. C388-96.
73. Maroto, M., et al., *Chondroitin sulfate, a major component of the perineuronal net, elicits inward currents, cell depolarization, and calcium transients by acting on AMPA and kainate receptors of hippocampal neurons*. J Neurochem, 2013. 125(2): p. 205-13.
74. Sandmann, C., *Der Einfluss von Fam20A auf die Calciumkonzentration, die Calciumaktivität und den scheinbaren Calciumaktivitätskoeffizienten im Zellkulturmedium von LLCPK-1-Zellen*. 2015, CAU Kiel.
75. Hrabetova, S., et al., *Calcium diffusion enhanced after cleavage of negatively charged components of brain extracellular matrix by chondroitinase ABC*. J Physiol, 2009. 587(Pt 16): p. 4029-49.
76. Yamaguchi, M., *The potential role of regucalcin in kidney cell regulation: Involvement in renal failure (Review)*. Int J Mol Med, 2015. 36(5): p. 1191-9.
77. Schwaller, B., *Cytosolic Ca²⁺ buffers*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. 2(11): p. a004051.
78. Udem, C., T. Luke, and L.A. Shimoda, *Contribution of elevated intracellular calcium to pulmonary arterial myocyte alkalinization during chronic hypoxia*. Pulm Circ, 2016. 6(1): p. 93-102.
79. Wang, J., et al., *Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca²⁺ in pulmonary arterial smooth muscle cells*. Circ Res, 2006. 98(12): p. 1528-37.
80. Qu, Y.Y., et al., *TRPC1 stimulates calciumsensing receptorinduced storeoperated Ca²⁺ entry and nitric oxide production in endothelial cells*. Mol Med Rep, 2017. 16(4): p. 4613-4619.
81. Yang, D. and D. Yang, *Role of intracellular Ca²⁺ and Na⁺/Ca²⁺ exchanger in the pathogenesis of contrast-induced acute kidney injury*. Biomed Res Int, 2013. 2013: p. 678456.

82. Zhou, Z. and E. Neher, *Mobile and immobile calcium buffers in bovine adrenal chromaffin cells*. The Journal of physiology, 1993. 469: p. 245-273.
83. Delvendahl, I., et al., *Reduced endogenous Ca²⁺ buffering speeds active zone Ca²⁺ signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. 112(23): p. E3075-84.
84. Lips, M.B. and B.U. Keller, *Endogenous calcium buffering in motoneurons of the nucleus hypoglossus from mouse*. J Physiol, 1998. 511 (Pt 1): p. 105-17.
85. Boros, S., R.J. Bindels, and J.G. Hoenderop, *Active Ca(2+) reabsorption in the connecting tubule*. Pflugers Arch, 2009. 458(1): p. 99-109.
86. Moor, M.B. and O. Bonny, *Ways of calcium reabsorption in the kidney*. Am J Physiol Renal Physiol, 2016. 310(11): p. F1337-50.
87. Lee, J.J., et al., *Effects of phospho- and calciotropic hormones on electrolyte transport in the proximal tubule*. F1000Res, 2017. 6: p. 1797.
88. Goel, M., et al., *Identification and localization of TRPC channels in the rat kidney*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. 290(5): p. F1241-52.
89. Kurota, H. and M. Yamaguchi, *Activatory effect of calcium-binding protein regucalcin on ATP-dependent calcium transport in the basolateral membranes of rat kidney cortex*. Mol Cell Biochem, 1997. 169(1-2): p. 149-56.
90. Neher, E. and G.J. Augustine, *Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells*. J Physiol, 1992. 450: p. 273-301.
91. Borges, F.T., et al., *Characterization of glycosaminoglycans in tubular epithelial cells: calcium oxalate and oxalate ions effects*. Kidney Int, 2005. 68(4): p. 1630-42.
92. Weinstein, T., et al., *Distribution of glycosaminoglycans in rat renal tubular epithelium*. J Am Soc Nephrol, 1997. 8(4): p. 586-95.
93. Tagliabracci, V.S., et al., *Dynamic regulation of FGF23 by Fam20C phosphorylation, GalNAc-T3 glycosylation, and furin proteolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. 111(15): p. 5520-5.

7. Anhang

Tierversuchsantrag

Die Tötung von Tieren zur Organentnahme wurde beim Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein angezeigt und unter der Nummer V 312-7224.121-2 genehmigt.

8. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei meinen Doktoreltern Herrn Prof. Dr. Markus Bleich und Frau Dr. Nina Himmerkus für das Überlassen des Themas und die ausdauernde geduldige und fachkundige Betreuung bedanken. Vielen Dank für das Vertrauen und die vielen guten Ratschläge, sowohl fachlich als auch persönlich, die mir geholfen haben, diese Arbeit zu vollenden.

Ebenso danke ich Frau Dr. Susanne Milatz für die hilfsbereite Unterstützung und zahlreichen anregenden Diskussionen.

Ich danke auch den übrigen beteiligten wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Mitarbeitern der AG Bleich und des physiologischen Instituts.

Privat gilt meine tiefste Dankbarkeit meinem Ehemann Florian sowie meinen Eltern, die mich all die Jahre unterstützt und ermutigt haben und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Auch meiner Schwester und dem Rest meiner Familie möchte ich in diesem Sinne ganz herzlich danken.

Veröffentlichungen

Kongressbeiträge

Debert, D., Klootwijk, E. D., Himmerkus, N., Kleta, R., Bleich, M. (2015): ATP induced intracellular calcium signaling in Fam20a deficient proximal tubular cells. Acta Physiologica 2015, Volume 213, P199

Debert, D., Himmerkus, N., Grüssel, S., Bleich, M. (2014): Measurements of intracellular calcium in proximal tubular cells. 19. Jahrestagung der Ostseephysiologen

Veröffentlichungen in Vorbereitung

Heinekamp, L., Winkler, D., et al., unremarkable renal calcium handling in FAM20A knockout mice.

Winkler, D., Heinekamp, L., et al., Fam20a involvement in intracellular calcium signaling.