



Aus der Klinik für  
Nephrologie und Rheumatologie

Direktor: Prof. Dr. med. Grabensee

**Untersuchung der Bedeutung der  
Calcium Rezeptor Expression im Verlauf  
des sekundären  
Hyperparathyreoidismus**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

**Alexandra Stalder**

Düsseldorf 2001

Aus der Klinik für  
Nephrologie und Rheumatologie

Direktor: Prof. Dr. med. Grabensee

# **Untersuchung der Bedeutung der Calcium Rezeptor Expression im Verlauf des sekundären Hyperparathyreoidismus**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

**Alexandra Stalder**

Düsseldorf 2001

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Prof. Dr. Häussinger  
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Grabensee

Korreferent: Prof. Dr. med. Goretzki

---

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Die Nebenschilddrüsen</b>	<b>3</b>
1.1.1 Entwicklung und Histologie	3
1.1.2 Die Funktion der Nebenschilddrüsen	4
<b>1.2. Regulation der Synthese und Sekretion von Parathormon</b>	<b>6</b>
1.2.1 Das Parathormon	6
1.2.2 Einfluß des Serum-Calciums auf die Synthese und Sekretion von PTH	6
1.2.2.1 Die Calcium-PTH-Beziehung	6
1.2.3 Der parathyreoidale Calcium Rezeptor (CaR)	8
1.2.3.1 CaR-Gen und strukturelle Organisation des CaR	9
1.2.3.2 Mechanismus der Signaltransduktion	10
1.2.3.3 Expression des CaR	11
1.2.3.4 Regulation der CaR-Aktivität und -Genexpression	11
1.2.4 Wirkung von $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> auf die Nebenschilddrüsen	12
1.2.5 Wirkung von Phosphat auf die Nebenschilddrüsen	13
<b>1.3. Erkrankungen der Nebenschilddrüsen</b>	<b>14</b>
1.3.1 Primärer Hyperparathyreoidismus	14
1.3.2 Sekundärer Hyperparathyreoidismus	15
1.3.2.1 Pathogenese des sekundären Hyperparathyreoidismus	15
1.3.2.2 Proliferation der Nebenschilddrüsen	16
1.3.2.2.1 Einfluß von Calcium auf die Proliferation	17
1.3.2.2.2 Einfluß von Calcitriol auf die Proliferation	17
1.3.2.2.3 Nebenschilddrüsenhyperplasie	18
1.3.2.2.4 Veränderung der Calcium-Sensitivität	20
<b>1.4. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>21</b>
<b>2. MATERIAL</b>	<b>22</b>
2.1 Gewebe	22
2.2 Reagentien und Chemikalien	24
2.3 Standardlösungen	25
2.4 Oligonukleotidsonden	26
2.5 Software	27
2.6 Arbeitsplatzsituation	27
<b>3. METHODE</b>	<b>28</b>
3.1 Prinzip der <i>in situ</i> Hybridisierung	28
3.2. Erstellung und Fixierung der Gewebsschnitte	29
3.3. Markierung der Oligonukleotidsonden	30

---

<b>3.4 Protokoll der <i>in situ</i> Hybridisierung</b>	<b>31</b>
<b>3.5 Kontrollen</b>	<b>33</b>
<b>3.6 Auswertung</b>	<b>33</b>
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Ergebnisse der ISH der CaR mRNA</b>	<b>35</b>
4.1.1 Expression der CaR mRNA im Normalgewebe	35
4.1.2 Expression der CaR mRNA in pHPT-Geweben	41
4.1.3 Expression der CaR mRNA in sHPT-Geweben	43
<b>4.2 Ergebnisse der ISH der PTH mRNA</b>	<b>46</b>
4.2.1 Expression der PTH mRNA im Normalgewebe	49
4.2.2 Expression der PTH mRNA in pHPT-Geweben	50
4.2.3 Expression der PTH mRNA in sHPT-Geweben	51
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>52</b>
<b>5.1 Veränderung der CaR-Expression bei sHPT</b>	<b>52</b>
<b>5.2 Untersuchung der CaR-Expression mittels ISH</b>	<b>54</b>
<b>5.3 Veränderung der gewebssinternen Expressionsmuster</b>	<b>56</b>
<b>5.4 Expression des CaR im Normalgewebe</b>	<b>57</b>
<b>5.5 Expression des CaR in pHPT-Geweben</b>	<b>58</b>
<b>5.6 Expression des CaR in sHPT-Geweben</b>	<b>61</b>
<b>5.7 Ausblick</b>	<b>66</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>69</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>72</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>75</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>90</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>91</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>92</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>94</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>96</b>

# 1 EINLEITUNG

Der 1993 von Brown et al. erstmals beschriebene Calcium Rezeptor (CaR), der zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehört, besitzt eine Schlüsselstellung in der Regulation des Calciumhaushaltes, der bei der Entwicklung des renalen sekundären Hyperparathyreoidismus (sHPT) empfindlich gestört wird. Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz kommt es zu einem Calcitriol-Mangel durch die abnehmende Fähigkeit der Nieren zur Synthese des Calcitriols ( $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin  $D_3$ ). Zur Kompensation der resultierenden Hypocalcämie manifestiert sich eine pathologische Überfunktion der Nebenschilddrüsen (Parathyreoideae) mit einer erhöhten Sekretion von Parathormon (PTH). Die molekularen Ursachen dieses pathophysiologischen Phänomens sind bis jetzt noch nicht vollständig bekannt. In den folgenden Abschnitten werden die Zusammenhänge und Aspekte der Pathogenese des sHPT, die im Rahmen dieser Arbeit von Bedeutung sind, näher erläutert.

## 1.1 Die Nebenschilddrüsen

### 1.1.1 Entwicklung und Histologie

Die Nebenschilddrüsen, auch Epithelkörperchen oder Parathyreoideae genannt, entwickeln sich aus der dritten und vierten Schlundtasche. Im Regelfall befinden sich die paarig angelegten Nebenschilddrüsen beiderseits am oberen und unteren Schilddrüsenpol. Allerdings kommt es durch das Längenwachstum des Halses zu einer ausgeprägten Wanderung. Aberrierende Nebenschilddrüsen finden sich im gesamten Halsbereich bis ins obere Mediastinum und in Thymus-Nähe. Auch die Anzahl der normalerweise vier Drüsen kann bis zu 20 variieren. Sie sind endokrine Drüsen, die das PTH synthetisieren und sezernieren.

Der vorherrschende Zelltyp sind die Hauptzellen, die einem sekretorischen Zyklus unterliegen, d.h. sie wechseln zwischen aktivem und inaktivem Stadium [Roth & Raisz, 1996; Fitzpatrick, 1993; Sun et al., 1993]. Ein weiterer Zelltyp sind die mitochondrienreichen oxyphilen Zellen, außerdem existieren Intermediate zwischen beiden Zelltypen (transitionelle oxyphile Zellen) [Übersicht in(Parfitt,1994)]. In gesundem Nebenschilddrüsengewebe sind diese Zellen von Fettgewebe umgeben. Bei

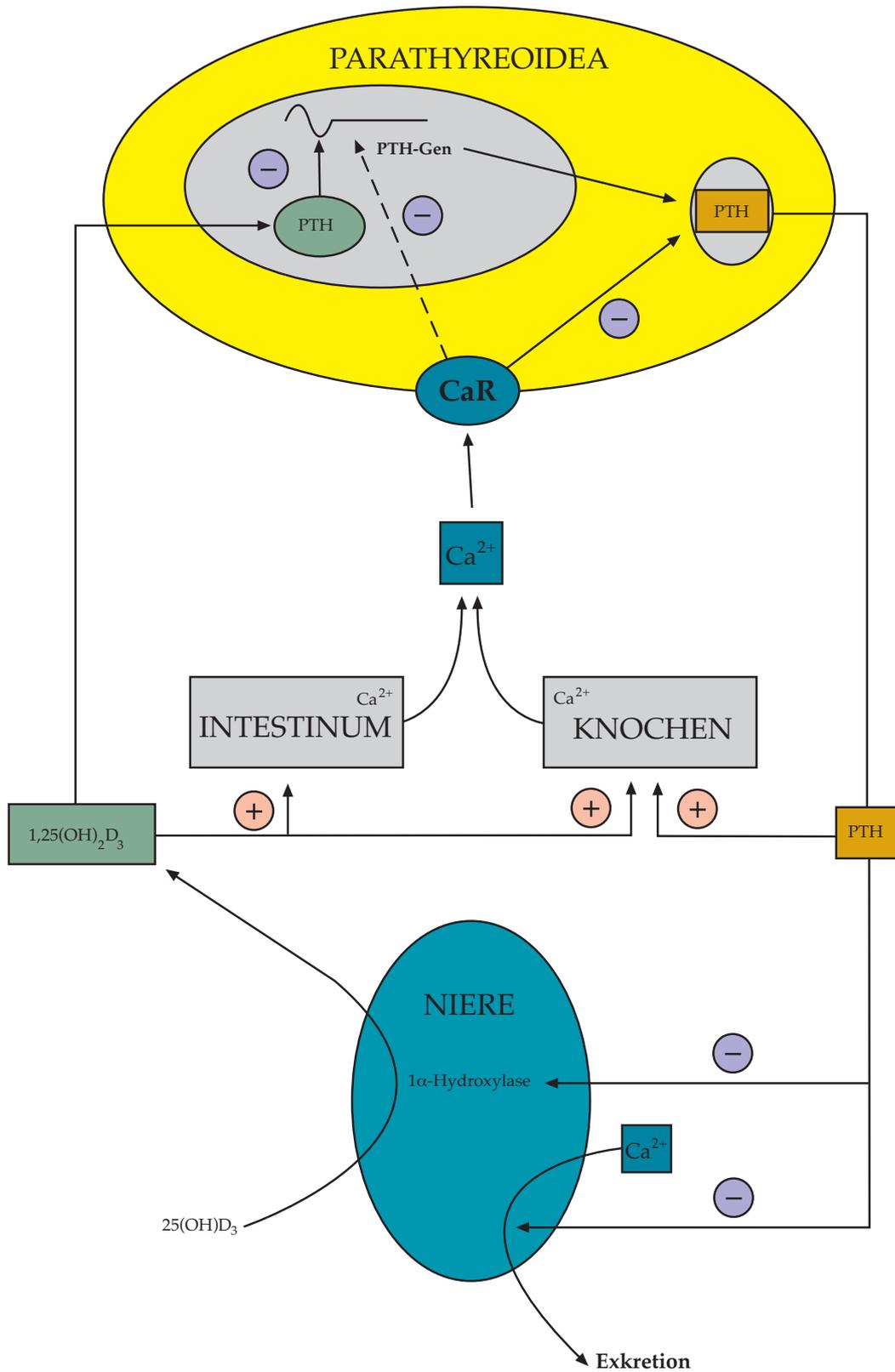
Erkrankungen der Nebenschilddrüsen wie primärem und sekundärem Hyperparathyreoidismus nimmt die Menge des Fettgewebes zugunsten der proliferierenden Nebenschilddrüsenzellen ab.

### 1.1.2 Die Funktion der Nebenschilddrüsen

Das in den Nebenschilddrüsen produzierte PTH ist an der Regulation des Calciumspiegels im Blutplasma beteiligt. Die Konzentration an extrazellulärem Calcium wird individuell nahezu konstant im Bereich von 1,1 bis 1,3 mM gehalten, was einer mehr als 10.000-fach höheren Konzentration im Vergleich zum intrazellulären Calcium in den meisten Zellen entspricht [Brown, 1991; Kurokawa, 1994]. Abbildung 1.1 zeigt eine vereinfachte schematische Darstellung der Funktionsbeziehung zwischen PTH, Calcium und Calcitriol.

Ein erniedrigter extrazellulärer Calcium-Spiegel bewirkt eine Steigerung der PTH-Sekretion. Dieses stimuliert die Calcium-Freisetzung aus dem Knochen und eine Verminderung der Calcium-Exkretion der Niere. Hierdurch erhöht sich das Serum-Calcium, welches seinerseits - vermittelt über den parathyreoidalen Calcium Rezeptor (CaR; s. 1.2.3) - im ersten negativen Rückkopplungsmechanismus die Sekretion (Kurzzeit-Effekt) und die Synthese (Langzeit-Effekt) des PTH supprimiert. Ein weiterer Effekt des PTHs ist die Aktivierung der renalen 1 $\alpha$ -Hydroxylase, welche die Umwandlung von 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in 1 $\alpha$ ,25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (Calcitriol) katalysiert. Letzteres bewirkt eine Erhöhung des extrazellulären Calciums über eine vermehrte intestinale Calcium-Absorption und die Freisetzung von Calcium aus den Knochen (synergistische Wirkung mit PTH). Der zweite negative Rückkopplungsmechanismus besteht in der durch Calcitriol vermittelten Suppression der Transkription des PTH-Gens.

Um die Darstellung zu vereinfachen, wird der Einfluß von Phosphat auf die Calcium-Homöostase in Kapitel 1.2.5 getrennt diskutiert. Ein weiterer Faktor bei der Calcium-Homöostase ist das in den C-Zellen der Thyreoidea gebildete Hormon Calcitonin, ein PTH-Antagonist (Calcium-Konservierung). Es ist keine Erkrankung bekannt, die auf einem Calcitonin-Mangel beruht. Folglich scheint die Regulation auch bei Fehlen dieses Hormons ungestört abzulaufen. Daher wurde auf die Einbindung von Calcitonin in den Regelkreis verzichtet.



**Abb. 1.1: Regulation des Calcium-Haushaltes.** Vereinfachte schematische Darstellung der funktionellen Beziehungen zwischen Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), PTH und Calcitriol [ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ] ohne Berücksichtigung weiterer regulatorischer Faktoren wie Phosphat oder Calcitonin (Erläuterungen s. Text). VDR = Vitamin  $\text{D}_3$  Rezeptor; CaR = Calcium Rezeptor

## 1.2. Regulation der Synthese und Sekretion von Parathormon

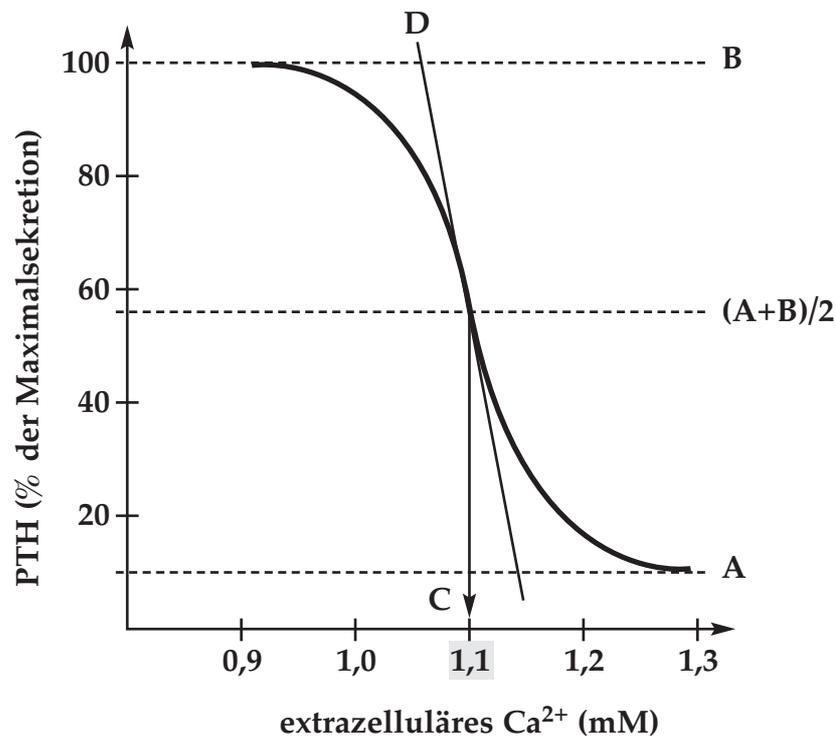
### 1.2.1 Das Parathormon

Das in den Nebenschilddrüsen produzierte Parathormon [Übersicht in Silver & Naveh-Manly, 1994; Silver & Kronenberg, 1996] ist ein Peptidhormon bestehend aus 84 Aminosäuren und besitzt eine Masse von 9,6 kDa. Es wird aus einem größeren Vorläufer (PreproPTH) synthetisiert. Zwischen den verschiedenen Spezies besteht ein hoher Homologie-Grad der Aminosäure-Sequenz von PTH, vor allem in der N-terminalen Region. Das humane PTH-Gen [Vasicek et al., 1983] besitzt drei Exons und ist auf Chromosom 11p15 lokalisiert [Zabel et al., 1985].

### 1.2.2 Einfluß des Serum-Calciums auf die Synthese und Sekretion von PTH

#### 1.2.2.1 Die Calcium-PTH-Beziehung

Seit langem ist bekannt, daß der Plasmacalciumspiegel einer der Hauptregulatoren der PTH-Sekretion ist: Ein Absinken der Konzentration der freien Calcium-Ionen stimuliert die PTH-Sekretion, wohingegen eine Erhöhung sie hemmt. Hierbei genügen geringe Veränderungen der Serumkonzentration an ionisiertem Calcium [Übersicht in (Goodman, 1996)], um Änderungen der PTH-Sekretion zu bewirken. Diese Beziehung läßt sich durch eine inverse sigmoidale Kurve beschreiben (Abb. 1.2). Vier Parameter kennzeichnen die Kurve (Brown et al., 1983): Ad eins die Plateau-Ebene im minimalen PTH-Sekretionsbereich (PTH<sub>min</sub>), die sich auch durch eine weitere Steigerung der Calciumkonzentration nicht mehr supprimieren läßt [Mayer et al., 1976]; die zweite Plateau-Ebene im Sekretionsmaximum des PTH (PTH<sub>max</sub>), die auch durch eine noch größere Hypocalcämie nicht mehr zu steigern ist. Der Calcium *setpoint* der PTH-Sekretion ist definiert als die Calciumkonzentration, bei der die PTH-Sekretion halbmaximal supprimiert ist  $[(PTH_{max} + PTH_{min})/2]$ . Bei normalen Nebenschilddrüsen Geweben liegt dieser im Durchschnitt bei 1,1 mM. Als Maß für die Sensitivität der PTH-Sekretion dient der *slope*, die Steilheit der Kurve im *setpoint* ( $\Delta PTH / \Delta Ca^{2+}$ ). Die basale PTH-Sekretion liegt in normalen Geweben bei 25% der maximalen Sekretion.



**Abb. 1.2: Calcium-PTH-Beziehung.** Vier-Parameter-Modell der inversen sigmoidalen Beziehung zwischen extrazellulärer Calciumkonzentration und PTH-Freisetzung. Die vier Parameter sind: A = minimale PTH-Sekretion, B = maximale PTH-Sekretion, C = *setpoint* (Calciumkonzentration, die zu einer halbmaximalen Suppression der PTH-Sekretion führt), D = *slope* (Steilheit der Kurve im *setpoint*).

Aus der Abbildung ist ersichtlich, daß eine Aussage über die PTH-Regulation bei Bestimmung des PTH bei einer basalen Calciumkonzentration nicht möglich ist. Nur eine mehrfache PTH-Messung unter kontrollierter, induzierter Hypo- und Hypercalcämie gibt Aufschluß über das vorliegende Sekretionsverhalten.

Bei der Wirkung von Calcium auf die PTH-Sekretion lassen sich ein Kurzzeit- und ein Langzeit-Effekt unterscheiden [Übersicht in (Felsenfeld & Llach, 1993)]. Die direkte Wirkung eines akut absinkenden Serum-Calciums auf das Nebenschilddrüsengewebe wird einem unmittelbaren Effekt auf präformierte PTH-Sekretionsgranula zugeschrieben. Innerhalb von 3 Minuten kann dies zu einer verstärkten PTH-Sekretion führen. Eine länger bestehende Hypocalcämie führt zu Veränderungen der intrazellulären PTH-Degradation, der Reutilisation von degradiertem Hormon sowie der Mobilisierung von sekundären Hormondepots. Eine langandauernde Hypocalcämie bewirkt eine Hyperplasie der Nebenschilddrüsen.

Auch die Expression des PTH-Gens wird durch Calcium verändert [Übersicht in (Silver & Naveh-Many, 1994; Silver & Kronenberg, 1996)]. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen ergaben jedoch verschiedene Ergebnisse: Bei Ratten steigert eine experimentelle Hypocalcämie die Expression des PTH-Gens [Naveh-Many et al., 1989; Naveh-Many & Silver, 1990a]. Allerdings bewirkt eine experimentelle Hypercalcämie keine Suppression der Expression. Yamamoto et al. (1989) beobachteten jedoch einen leichten Abfall der PTH-Expression. *In vitro* Untersuchungen ergaben gegenteilige Ergebnisse: eine Verminderung der PTH-Expression wird durch eine Hypercalcämie ausgelöst, eine Hypocalcämie hat dagegen keinen Einfluß auf die Expression [Russel et al., 1983]. Andere Autoren konnten einen Einfluß in beide Richtungen nachweisen [Brookman et al., 1986]. Um die *in vitro* Ergebnisse zu beurteilen, muß man beachten, daß sich diese erst nach längerer Inkubationszeit zeigen, während gleichzeitig der Gehalt des Calcium Rezeptors, der die Calciumeffekte vermittelt (1.2.3), stark abnimmt [Mithal et al., 1995].

### **1.2.3 Der parathyreoidale Calcium Rezeptor (CaR)**

Schon lange wurde postuliert, daß die Zellen über einen Mechanismus zur Messung feinsten Schwankungen des Serum-Calciumspiegels verfügen müssen. 1993 wurden von zwei Arbeitsgruppen zwei verschiedene Rezeptoren geklont. Der von der schwedischen Arbeitsgruppe um Lundgren (1994) beschriebene Rezeptor gehört zur Familie der LDL-Rezeptoren.

Aus bovinen Parathyreoideazellen klonte die Arbeitsgruppe um E. M. Brown in *X. laevis* Oocyten einen extracellulären Rezeptor, der mit hoher Spezifität den Serum-calciumspiegel mißt [Brown EM et al., 1993]. Dieser Calcium Rezeptor ist seit dem in Nieren von Ratten [Riccardi et al., 1995], Menschen [Aida et al., 1995] und Kaninchen [Butters et al., 1997], in humanen Nebenschilddrüsen [Garrett et al., 1995a; Hammeralnd et al., 1995], C-Zellen von Ratten [Garrett et al., 1995b] und ebenfalls im Gehirngewebe von Ratten [Ruat et al., 1995] beschrieben worden. Sie alle sind dem bovinen parathyroidalen CaR sehr ähnlich; ca. 90% der Aminosäuren sind identisch. Es handelt sich also um Spezies- und Gewebehomologe desselben Rezeptors.

### 1.2.3.1 CaR-Gen und Struktur des CaR

Auf Chromosom 3p13.3-21 [Janicic et al., 1995] ist das etwa 45 kb umfassende Gen des humanen CaR [Garrett et al., 1995a] lokalisiert. Die kodierende Region des CaR-Gens ist 3234 bp lang und besteht aus 6 Exons. Die Exons 1 bis 5 und der 5'-Bereich von Exon 6 codieren den extracellulären Anteil, der Rest von Exon 6 codiert den transmembranären und intrazellulären Anteil.

Die abgeleitete Struktur des CaR mit einer lipophilen Transmembrandomäne aus sieben  $\alpha$ -Helices charakterisiert ihn als G-Protein-gekoppelten Rezeptor [Chattopadhyay, 1996; Brown EM, 1998].

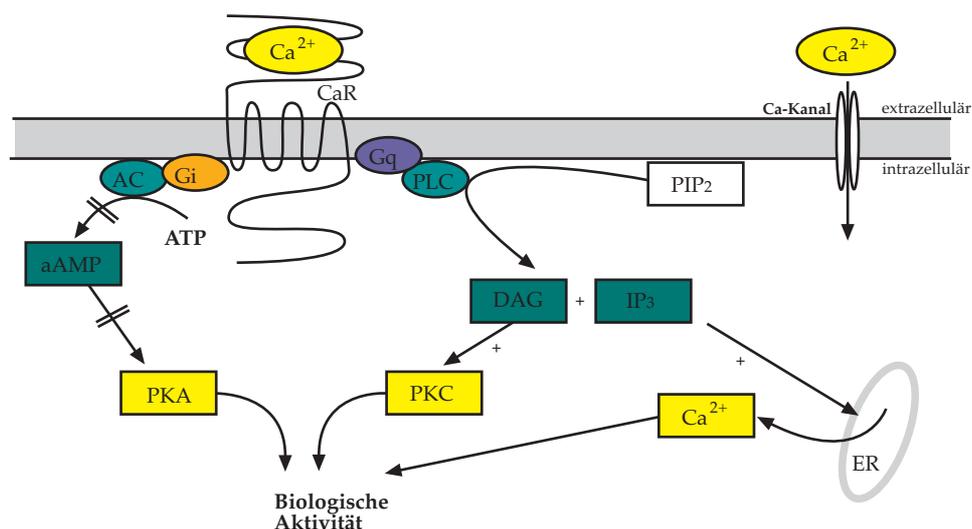
Die 613 Aminosäuren lange extrazelluläre N-terminale Domäne enthält 11 mögliche Glykosylierungsstellen und bindet  $\text{Ca}^{2+}$  [Brown E et al., 1993.; Hammerland et al., 1995]. Weitere CaR-Agonisten sind divalente Kationen, wie  $\text{Mg}^{2+}$ , trivalente, wie  $\text{La}^{3+}$  und  $\text{Gd}^{3+}$ , und Polykationen, wie Neomycin. Bisher konnten keine genauen Bindungsstellen identifiziert werden. Übereinstimmend mit der geringen Affinität des Rezeptors zu extrazellulärem Calcium enthält die extrazelluläre Domäne keine hochaffinen Calcium-Bindungsmotive, die für eine hohe Calcium-Sensitivität hinderlich wären. Ein *cluster* aus negativ geladenen Aminosäureresten (AS 216-252 und 557-611) ist vermutlich für die Bindung verantwortlich, ähnlich wie bei den niedrigaffinen Calcium-bindenden Proteinen Calreticulin oder Calsequestrin [Brown et al., 1993]. Die 250 Aminosäuren lange Transmembrandomäne, bestehend aus sieben Transmembran-Helices, vermittelt vermutlich die Rezeptor-Effektor-Koppelung. Die drei extrazellulär liegenden Schleifen dieser Domäne, von denen die zweite eine weitere kurze saure Region aus vier oder fünf aufeinander folgenden Glutamat- bzw. Aspartat-Resten (ELEDE) enthält, sind möglicherweise an der Agonist-Bindung und/oder der Interaktion zwischen extrazellulärer und transmembraner Domäne beteiligt.

Der intrazelluläre Anteil besteht aus 3 Schleifen der Transmembrandomäne und der carboxy-terminalen Domäne. Die C-terminale Domäne enthält fünf mögliche Proteinkinase C- und zwei mögliche Proteinkinase A-Phosphorylierungsstellen, die vermutlich an der Kopplung des Rezeptors zu seinen G-Proteinen beteiligt sind [Chattopadhyay et al., 1996; Bockaert 1991].

### 1.2.3.2 Mechanismus der Signaltransduktion

Die von extrazellulärem Calcium ausgehende Signaltransduktion ist nicht vollständig bekannt, die nachgewiesenen Teilschritte lassen jedoch folgenden Ablauf vermuten [Übersichten in (Brown EM et al. 1994; Herbert & Brown, 1995; Chattopadhyay et al., 1996)]. Durch Bindung des Liganden (s.o.) werden über G-Protein-Kopplung zwei wichtige *second messenger*-Systeme beeinflusst. Erstens kommt es durch Aktivierung der Phospholipase C zur Bildung von Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) aus Phosphatidylinositolbisphosphat ( $PIP_2$ ).  $IP_3$  vermittelt die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern. Gleichzeitig mit dem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration werden transmembranäre Kanäle geöffnet, die zum Einstrom von extrazellulärem Calcium führen. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Zweitens wird - vermutlich über ein inhibitorisches G-Protein ( $G_i$ ) - die Bildung von cAMP und damit die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) gehemmt. Diese Veränderungen führen letztendlich zu einer Hemmung der PTH-Sekretion und Genexpression (Abb. 1.3).

Es ist im Vergleich zu anderen endokrinen Zellen sehr ungewöhnlich, daß ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration zu einer Hemmung der Hormon-Sekretion führt. Die genauen Mechanismen der Calcium-abhängigen PTH-Sekretion sind bisher noch unklar.



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung der (potentiellen) Signaltransduktion von extrazellulärem Calcium über den CaR.** AC = Adenylatcyclase, cAMP = cyclisches AMP; CaR = Calcium Rezeptor; DAG = Diacylglycerol; ER = Endoplasmatisches Reticulum;  $G_i$  = inhibitorisches G-Protein; Gq = G-Protein;  $IP_3$  = Inositoltriphosphat;  $PIP_2$  = Phosphatidylinositolbisphosphat; PKA bzw. PKC = Proteinkinase A bzw. C; PLC = Phospholipase C.

### 1.2.3.3 Expression des CaR

Der CaR wird nicht nur in Nebenschilddrüsen- und C-Zellen exprimiert, die über Hormonsekretion an der Regulation des Calciumspiegels beteiligt sind, sondern auch in den hormonellen Zielzellen in Knochen, Intestinum und Nieren [Aida et al., 1995; Brown, EM 1999 ]. Dies führt zu einem erweiterten Rückkopplungssystem der Calcium-Homöostase, das kurze *feedback loops* mit Calcium selbst als Regulator enthält.

Außerdem gibt es Hinweise auf eine Expression des CaR in weiteren Geweben wie in verschiedenen Bereichen des ZNS, der Lunge [Übersicht in (Pearce & Thakker, 1997; Ott, 1998)], in Keratinozyten [Bikle et al., 1996] und in der Plazenta [Bradbury et al., 1998].

### 1.2.3.4 Regulation der CaR-Aktivität und -Genexpression

Die Regulationsmechanismen, die die Aktivität des CaR steuern, sind kaum bekannt. Eine mögliche negative Rückkopplung besteht in der von Aktivatoren der PKC vermittelten Hemmung des durch hohe Calciumkonzentrationen ausgelösten Anstiegs des IP<sub>3</sub> und des intrazellulärem Calciums [Kifor et al., 1990; Brown, 1991; Racke & Nemeth, 1993]. Möglicherweise ist dies ein Ergebnis der PKC-vermittelten Phosphorylierung des Rezeptors [Bai et al., 1998]. Der Anstieg an Inositolphosphat und intrazellulärem Calcium wird durch Aktivatoren der cAMP-abhängigen PKA nicht nachweisbar beeinflusst [Brown et al., 1984].

In Nebenschilddrüsen und Niere konnte keine Regulation der CaR-Expression durch extrazelluläres Calcium gezeigt werden [Zhong et al., 1994; Rogers & Fox, 1995; Rogers et al., 1995; Brown et al., 1996]. Ein bis zu vierfacher Anstieg der CaR mRNA wird in der Maus-Hirnanhangdrüsen-Zelllinie AtT20 durch eine Steigerung der extrazellulären Calciumkonzentration ausgelöst [Emanuel et al., 1996].

Widersprüchliche Ergebnisse ergaben sich in verschiedenen Studien zur Regulation der CaR-Genexpression durch Calcitriol. Zhong et al. (1994) und Brown et al. (1996) wiesen bei Ratten, die sie mit Calcitriol behandelten, einen leichten Anstieg der CaR mRNA nach, den Rogers et al. (1995) nicht bestätigen konnten.

### 1.2.4 Wirkung von 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> auf die Nebenschilddrüsen

Das Prohormon Vitamin D<sub>3</sub> entstammt entweder der Nahrung oder wird von der Haut unter Einfluß von UV-Strahlung aus 7-Dehydrocholesterin gebildet. Die biologisch aktive Form 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (Calcitriol) entsteht bei Hydroxylierung in Leber und Niere. Im Blut liegen Calcitriol und seine Metaboliten gebunden an das Vitamin D<sub>3</sub> Bindungsprotein (DBP) vor. Die normale Plasmakonzentration von Calcitriol liegt zwischen 30-60 pg/ml, was etwa 0,1 nM entspricht [Reichel & Norman, 1989]. Calcitriol besitzt eine lipophile Struktur, die nach Lösung vom Bindungsprotein eine leichte Diffusion durch die Zellmembranen ermöglicht. Im Zellkern bindet Calcitriol mit hoher Affinität an seinen nukleären Rezeptor, den Transkriptionsfaktor Vitamin D<sub>3</sub> Rezeptor (VDR), und übt darüber einen direkten Einfluß auf die Genregulation spezifischer Gene aus. Die klassische Funktion von Calcitriol ist die Regulation des Serum-Calciums über die Zielgewebe Intestinum, Knochen, Niere und Nebenschilddrüsen [Reichel & Norman, 1989].

Die Nebenschilddrüsen werden auf zwei Wegen von Calcitriol beeinflusst: Einerseits wirkt es indirekt hemmend auf die Nebenschilddrüsen über die Steigerung der Calciumkonzentration im Serum. Andererseits besteht ein direkter inhibitorischer Mechanismus in der *down* Regulation der PTH-Genexpression. Nachgewiesen wurde die Verminderung der Expression sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [Silver & Naveh-Many, 1994; 1997; Silver & Kronenberg, 1996].

Eine indirekte Verstärkung der Wirkung von Calcitriol beruht vermutlich auf der positiven Regulation seines eigenen Rezeptors [Naveh-Many et al., 1990b; Denda et al., 1996]. Möglicherweise bewirkt vor allem die ansteigende Calciumkonzentration in Nebenschilddrüsen die *up* Regulation der VDR-mRNA [Russel et al., 1993; Brown et al., 1995; Denda et al., 1996].

Über den Einfluß von Calcitriol auf den Calcium-*setpoint* und die Calcium-Sensitivität der Nebenschilddrüsen liegen widersprüchliche Ergebnisse vor [Übersicht in (Goodman et al., 1996)]. Dunlay et al. (1989) konnten einen *downward shift* der gesamten PTH-Calcium-Kurve ohne Einfluß auf den *setpoint* nachweisen. Delmez et al. (1989) wie auch Malberti et al. (1993a) beobachteten eine Erniedrigung eines pathologisch erhöhten *setpoints* nach Gabe von Calcitriol. Andere Autoren konnten diese Normalisierung des *setpoints* nicht bestätigen [Ali et al., 1993; Ramirez et al., 1994].

Auch die Ergebnisse zu einer Calcitriol-abhängigen Regulation der Expression des CaR sind stark umstritten. (s. 1.2.3.4)

### **1.2.5 Wirkung von Phosphat auf die Nebenschilddrüsen**

Phosphat hat einen direkten Effekt auf die Nebenschilddrüsen: Eine steigende Phosphatkonzentration steigert die Genexpression des PTH [Kilav et al., 1995; Yi et al., 1995; Almaden et al., 1996] und bewirkt eine Proliferation des Gewebes [Naveh-Manly et al., 1995; Hernandez et al., 1996b; Canalejo et al., 1998]. Der genaue Mechanismus dieser Prozesse ist bisher nicht bekannt. Desweiteren übt Phosphat über die Hemmung der Aktivität der renalen  $1\alpha$ -Hydroxylase und der hiermit verminderten Calcitriol-Synthese einen indirekten Einfluß auf die Nebenschilddrüsen aus [Tanaka & DeLuca, 1973; Baxter & DeLuca, 1976].

## 1.3 Erkrankungen der Nebenschilddrüsen

### 1.3.1 Primärer Hyperparathyreoidismus (pHPT)

Bei dieser Nebenschilddrüsenenerkrankung kommt es zu einer autonomen Produktion von Parathormon, die zu einer Hypercalcämie führt [Übersicht in (Hellman et al., 2000)]. Es gibt sporadisch auftretenden und familiären pHPT, der z. T. mit multipler endokriner Neoplasie Typ 1 (MEN 1) assoziiert ist. In 85% der sporadischen Fälle von pHPT ist ein solitäres Adenom für die Überproduktion des PTH verantwortlich. Diese Erkrankung tritt häufig bei postmenopausalen Frauen auf. Die familiäre Form beginnt früher und wird häufiger durch eine multiglanduläre Beteiligung gekennzeichnet.

In den betroffenen Geweben ist die Regulation der PTH-Sekretion gestört. Es kommt zu einer Rechtsverschiebung des Calcium-*setpoints*, als Ausdruck einer verminderten Sensitivität gegenüber Calcium [Larsson et al., 1984]. Die Schwere der Rechtsverschiebung bestimmt zum großen Teil den Serum-Calciumspiegel des individuellen Patienten [Wallfelt et al. 1988a,b]. Eine mögliche Ursache für diese verminderte Calcium-Sensitivität wäre eine verminderte Expression des CaR. Inzwischen wurde in mehreren Studien gezeigt, daß es bei pHPT zu einer Verminderung der Expression des CaR auf mRNA- und auf Proteinebene kommt [Farnebo et al., 1997; Garner et al., 1997; Corbetta et al., 2000].

Verschiedene genetische Veränderungen sind bei pHPT beobachtet worden. Neben dem MEN 1 Gen, dessen Inaktivierung für die MEN 1 assoziierten familiären Fälle von pHPT als erwiesen gilt, wurden auch bei nicht MEN 1 assoziiertem familiären pHPT veränderte Suppressorgene gefunden. Veränderungen wie Allelverluste und inaktivierende Punktmutationen des MEN 1 Gens lassen sich auch bei sporadischem pHPT nachweisen [Hellman et al., 2000].

### 1.3.2 Sekundärer Hyperparathyreoidismus

#### 1.3.2.1 Pathogenese des sekundären Hyperparathyreoidismus

Bei einer Erkrankung der Nieren kommt es zu einer Störung der Achse zwischen Nebenschilddrüsen und Nieren (vergl. Abb. 1.1). Die Folge ist eine Fehlfunktion der Nebenschilddrüsen, der sekundäre oder renale Hyperparathyreoidismus [Übersichten in (Drüeke, 1995; Slatopolsky & Delmez, 1995; Slatopolsky, 1998)]. Abbildung 1.4 stellt die Pathogenese des sHPT dar. Die frühe Niereninsuffizienz ist durch eine Phosphatretention gekennzeichnet. Dies führt zu einer erhöhten Phosphatkonzentration in den renalen Tubulus-Zellen, die wiederum die Aktivität der  $1\alpha$ -Hydroxylase und damit die Produktion des Calcitriols hemmt. Im Gegensatz zu früheren Behauptungen bleibt während dieser Phase der frühen Niereninsuffizienz ein meßbarer Anstieg der Serum-Phosphatkonzentration aus. Die Hypocalcämie wird also zunächst allein durch den Calcitriol-Mangel verursacht. Das Fortschreiten der chronischen Niereninsuffizienz hat eine Abnahme des funktionsfähigen Nierengewebes zur Folge, wodurch die Produktion des Calcitriols weiter sinkt. Der Calcitriol-Mangel führt zu einer verminderten Suppression der PTH-Genexpression und einer Hypocalcämie, die ebenfalls durch die gestörte Calcium-Reabsorption bedingt sein kann. Diese niedrige Calciumkonzentration im Blut stimuliert die PTH-Sekretion, wodurch die Serumkonzentration des PTHs stark steigt (bis auf das 20fache). Desweiteren kommt es zu einer Zunahme der Gewebsmasse der Nebenschilddrüsen.

Der Knochenstoffwechsel und die Mineralhomöostase werden durch den sekundären Hyperparathyreoidismus stark verändert. Deshalb gehört zur Therapie bei fortgeschrittenen Stadien nicht nur die alleinige Wiederherstellung der Nierenfunktion mittels Dialyse und Nierentransplantation sowie die diätetische Gabe von Phosphatbindern und Calcium, sondern auch die forcierte Supplementation des Calcitriols [Übersicht in (Akizawa et al., 1993; Fukagawa et al., 1997; Slatopolski & Brown, 1997)]. Durch einen frühen Beginn der Calcitriol-Therapie kann die Zunahme des Nebenschilddrüsen Gewebes vermindert und der sekundäre Hyperparathyreoidismus kontrolliert werden. Eine Begrenzung des therapeutischen Einsatzes von Calcitriol ergibt sich durch die Nebenwirkungen, verursacht durch den hypercalcämischen Effekt. Wünschenswert ist deshalb die Entwicklung nicht-calcämischer Calcitriol-Analoga.

Es gibt verschiedene Modelle, die zur Untersuchung des sHPT dienen. *In vitro* Versuche wurden an primären bovinen und humanen Zellkulturen aus Nebenschilddrüsengewebe durchgeführt. Problematisch ist hierbei die kurze Zeitspanne, über die die Kulturen stabilisiert werden können. Als *in vivo* Modelle dienen meist Ratten, bei denen entweder durch eine 5/6 Nephrektomie oder durch eine diätetisch verursachte Hypocalcämie bzw. einen Calcitriol-Mangel ein Hyperparathyreoidismus hervorgerufen wird. *Ex vivo* Untersuchungen werden, oft kombiniert mit der Erhebung klinischer Parameter, wie z. B. der Calcium-PTH-Kurve, an Nebenschilddrüsengewebe von sHPT-Patienten nach Parathyreoidektomien durchgeführt.

### 1.3.2.2 Proliferation der Nebenschilddrüsen

Ein wichtiger Aspekt der Überfunktion der Nebenschilddrüsen bei chronischer Niereninsuffizienz ist die Zunahme der Gewebsmasse [Übersicht in (Parfitt, 1994)]. Das Volumen der Nebenschilddrüsen steigt stetig mit dem Andauern der Niereninsuffizienz an [Mendes, 1983], wobei die zunehmende Zellmasse an sich vermutlich an der exzessiven PTH-Synthese und -Sekretion beteiligt ist [Brown et al., 1982; Ramirez et al., 1993; Messa et al., 1994].

Die genaue Regulation und der Mechanismus der Nebenschilddrüsen-Proliferation sind bis jetzt nicht bekannt. In verschiedenen Rattenmodellen ließ sich zeigen, daß die Zunahme der Proliferation der Nebenschilddrüsen parallel zum Anstieg der mRNA des PTH erfolgt und umgekehrt [Naveh-Many et al., 1995]. Deshalb wird diskutiert, ob beide Prozesse durch die gleichen Mechanismen reguliert werden. Mögliche Stimulationsfaktoren der Proliferation sind Veränderungen im Stoffwechsel wie Calcitriol-Mangel, Hyperphosphatämie und/oder Hypocalcämie oder pathologische Veränderungen wie z.B. Mutationen von Vermittlern der Signaltransduktion oder Faktoren des Zellzyklus oder Fehlen eines Tumorsuppressorgens. In den meisten Geweben herrscht ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose (programmierter Zelltod). Trotzdem konnte die Apoptose in sHPT-Geweben nicht nachgewiesen werden [Naveh-Many et al., 1995].

### 1.3.2.2.1 Einfluß von Calcium auf die Proliferation

Wichtig für die Prävention einer Nebenschilddrüsen-Proliferation ist die Bewahrung einer normalen Serum-Calciumkonzentration. Neben der Entwicklung eines sHPT mit deutlich erhöhter PTH-mRNA wirkt eine Hypocalcämie bei Ratten stimulierend auf die Proliferation der Nebenschilddrüsenzellen [Naveh-Many et al., 1995]. Homozygote CaR *knock out* Mäuse entwickeln eine starke Nebenschilddrüsen-Hyperplasie [Ho et al., 1995].

### 1.3.2.2.2 Einfluß von Calcitriol auf die Proliferation

Generell wird angenommen, daß Calcitriol einen inhibitorischen Einfluß auf die Zellproliferation hat. Der genaue Effekt auf die Proliferation der Nebenschilddrüsen ist noch nicht bekannt. Ein möglicher Hemmechanismus ist die Inhibition der Expression des Replikation-assoziierten Onkogens c-myc [Kremer et al., 1989].

VDR *knock out* Mäuse entwickeln neben dem Anstieg der PTH-mRNA eine starke Nebenschilddrüsen-Hyperplasie [Li et al., 1997]. In Untersuchungen, bei denen ein Hyperparathyreoidismus hervorgerufen wurde, hatte Calcitriol keinen hemmenden Einfluß auf die Proliferation [Naveh-Many et al., 1995]. Bei experimentell induzierter Urämie ließ sich bei frühzeitiger Gabe von Calcitriol eine antiproliferative Wirkung beobachten [Szabo et al., 1989]. Vermutlich spielt der Zeitpunkt der Calcitriol-Gabe eine wichtige Rolle für ihre Effektivität. *In vitro* Untersuchungen zeigten eine Hemmung der Proliferation durch pharmakologische Calcitriol-Dosen [Nygren et al., 1988]. Hohe Calcitriol-Dosen haben sogar einen regressiven Effekt auf die Nebenschilddrüsen-Hyperplasie im Tierexperiment [Reichel et al., 1993] und bei chronischen Hämodialyse Patienten [Fukagawa et al., 1990].

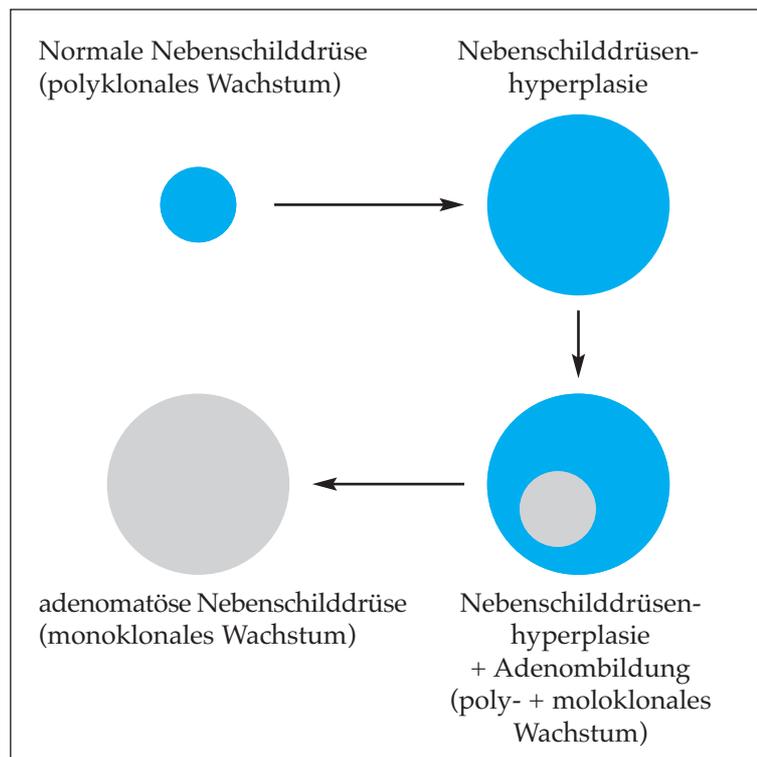
Ein steigender Anteil der Dialysepatienten mit langjähriger Niereninsuffizienz zeigt - bei normalisierten Calcium- und Calcitriol-Konzentrationen - einen nicht mehr supprimierbaren Hyperparathyreoidismus mit extraossären (Gefäß-, perarikulären, und Haut-) Verkalkungen, Knochenschmerzen und /oder Frakturen. Bei diesen Patienten wird eine subtotale oder totale Parathyreoidektomie (PTX) durchgeführt [Indikationen zur PTX in (Fukagawa et al., 1995)]. Die Entstehungsmechanismen dieser „Resistenz“ sind bisher nicht bekannt. Intrinsische Abnormalitäten der Nebenschilddrüsen und

der Anstieg der Nebenschilddrüsenmasse per se kommen als mögliche Ursachen in Frage [Brown et al., 1982; Ramirez et al., 1993; Messa et al., 1994; Indriason & Quarles, 1995].

### **1.3.2.2.3 Nebenschilddrüsenhyperplasie**

Die vermehrte Gewebsmasse erhöht die Zahl der Zellen, die auf Hypocalcämie und Calcitriol-Mangel reagieren, und die basale (nicht supprimierbare) PTH-Sekretion (PTHmin). Dies ist ausreichend, um die steigende PTH-Sekretion bei beginnender Proliferation zu erklären.

In den proliferierenden Geweben kommt es zu einem Wechsel vom zuerst diffusum zu nodösem Wachstum [Übersicht in (Drüeke, 1995)]. In einer Studie von Arnold et al. (1995) ließ sich monoklonales Wachstum in über 60% der untersuchten Drüsen nachweisen. Dabei bestand allerdings keine Korrelation zwischen histologischem Befund und dem Klonalitätsstatus. Andere Autoren bestätigten diese Ergebnisse [Tominaga et al., 1996; Chudek et al., 1998]. Tominaga et al. (1996) zeigten die Differenzierung von diffus hyperplastischen Drüsen als polyklonal und nodulären als monoklonal. Kennzeichnend für die nodösen Bereiche ist eine aggressive proliferative Aktivität; auch die Regulation der PTH-Sekretion durch Calcium ist in ihnen stärker gestört als in diffusen Bereichen [Tominaga et al., 1992; 1995; Yamaguchi et al., 1997]. Diese tumorartigen Areale wachsen vermutlich autonom mit zunehmend autonomisierender PTH-Synthese und -Sekretion. Dieses Stadium besteht auch nach einer Nierentransplantation, die den Calcium-Stoffwechsel normalisiert, weiter ein unzweifelhafter Hinweis für eine Autonomie der Nebenschilddrüsenfunktion [Übersicht in (Felsenfeld & Llach, 1993)]. Es gibt eine Hypothese, wie diese Veränderung entsteht: In einer diffus hyperplastischen polyklonalen Drüse entsteht durch eine somatische Mutation, z.B. eines das Zellwachstum kontrollierenden Gens, in zumindest einer Nebenschilddrüsenzelle ein selektiver Wachstumsvorteil. Dieser wird an die Tochterzellen weitergegeben, so daß sich eine monoklonale Drüse entwickelt. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens somatischer Mutationen, wie z.B. Rearrangements, Punktmutationen und Deletionen, erhöht sich aufgrund einer verminderten Fähigkeit zur DNA-Reparatur und des Proliferationsdrucks in urämischem Nebenschilddrüsenewebe [Malachi et al., 1993].



(nach Drüeke, 1995)

**Abb. 1.4. Pathogenese der Adenomentstehung bei sekundärem Hyperparathyroidismus.** Die diffuse Hyperplasie entwickelt sich zu einer Hyperplasie mit nodulären Formationen, die Zellen mit monoklonalem Wachstum enthält. Diese monoklonalen Zellen können sich über die gesamte betroffene Nebenschilddrüse ausbreiten.

#### 1.3.2.2.4 Veränderung der Calcium-Sensitivität

Eine Verschiebung des Calcium *setpoints* zu höheren Konzentrationen (Rechtsshift) bzw. eine geringere Steilheit im *setpoint* läßt sich teilweise bei Hyperparathyreoidismus beobachten [Brown et al., 1982 u. 1983; Wallfelt et al., 1988; Delmez et al., 1989; Ali et al., 1993; Felsenfeld & Llach, 1993; Malberti et al., 1993b]. Dies spricht für eine verringerte Calcium-Sensitivität der Nebenschilddrüsen.

Ursachen für diese veränderte Calcium-Sensitivität könnten in funktionellen Veränderungen des CaR oder der sich anschließenden Signalkaskade liegen. Eine Abnahme des CaR-Gehaltes würde ebenfalls eine Verminderung der Calcium-Sensitivität der Nebenschilddrüsen bewirken. *In vitro* zeigt sich in kultivierten Nebenschilddrüsenzellen eine abnehmende Sensitivität gegenüber extrazellulärem Calcium bei gleichzeitiger Verringerung der CaR-Expression [Brown et al., 1995; Mithal et al., 1995]. Auch bei sHPT ist eine Reduktion des CaR beschrieben [Kifor et al., 1996; Gogusev et al., 1997].

Außerdem ergibt sich aus der in 1.3.2.2.1 beschriebenen Beziehung zwischen Calcium und Proliferation die Möglichkeit, daß eine somatische Veränderung des CaR-Gens bei sHPT tumorig wirken könnte. Mehrere Mutationen des humanen parathyreoidalen CaR-Gens bei erblichen Erkrankungen sind bekannt, die mit einem abnormalen Calcium *setpoint* einhergehen. Eine verminderte Calcium-Sensitivität durch inaktivierende Mutationen des CaR liegt bei der familiären hypocaliurischen Hypercalcämie (FHH) und deren homozygoter Form, dem neonatalen schwergradigen Hyperparathyreoidismus (NSHPT), vor [Pollak et al., 1993; Pearce et al., 1995; Heath et al., 1996]. Eine aktivierende Mutation mit Verminderung des Calcium *setpoints* ist dagegen bei der autosomal dominanten Hypocalcämie vorhanden [Pollak et al., 1994].

## 1.4 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Anzahl der Patienten mit sekundärem Hyperparathyreoidismus (sHPT), die in der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie der Heinrich-Heine-Universität behandelt werden, ist sehr groß. Wenn die Standard-Therapie nicht mehr zu einer Suppression des sHPT führt, werden die Patienten zur subtotalen oder totalen Parathyreoidektomie (PTX) in die chirurgische Klinik A überwiesen.

Die genauen pathophysiologischen Mechanismen, die zur Entstehung des therapierefraktären sekundären Hyperparathyreoidismus führen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Auch die Rolle des 1993 von Brown et al. erstmals beschriebenen Calcium Rezeptors (CaR) ist größtenteils noch unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit soll anhand der durch PTX zur Verfügung stehenden Patienten-Gewebe die Expression des CaR auf mRNA-Ebene bei sHPT mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung und ihrer semiquantitativen Auswertung untersucht werden. Die Methode der *in situ* Hybridisierung wurde gewählt, weil sie eine gleichzeitige Beurteilung von Expression und Gewebsmorphologie ermöglicht.

Die Arbeitshypothese besteht in der Annahme, daß der sHPT mit einer verminderten mRNA-Expression des CaR verbunden sein könnte.

Eine weitere offene Frage ist, ob die bei zunehmender Monoklonalität sich entwickelnde Autonomie eventuell zu einer weiteren Abnahme der Expression führt. Daher soll untersucht werden, ob sich die verminderte Expression der CaR mRNA mit dem histologischen Befund der sHPT-Gewebe (diffus hyperplastisch oder nodulär) korrelieren läßt.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Gewebe

Untersucht wurden ein normales Nebenschilddrüsengewebe, das von Herrn Prof. Drüeke (Paris) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde, und Nebenschilddrüsengewebe von fünf Patienten mit pHPT (4 weibliche, 1 männliches) und acht Patienten mit sHPT (6 weibliche, 2 männliche), die von 1995 bis 1997 in der Chirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf operiert wurden.

Der sHPT resultierte in allen Fällen aus einer chronischen Niereninsuffizienz. Zwei Patienten mit sHPT waren nierentransplantiert, zwei Patienten wurden durch CAPD, weitere vier mit Hämodialyse behandelt. Durch einen funktionellen Test wurden die Nebenschilddrüsen vor der operativen Entfernung charakterisiert (s. Tab. 2.1 und 2.2) und die Ergebnisse zur Indikationsstellung der Parathyreoidektomie mit hinzugezogen. Die histologische Einstufung erfolgte in hyperplastisch (diffus) oder nodulär. Unmittelbar postoperativ wurden die Gewebe in bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagertem Isopentan schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt (Kühlschrank, Bio Freezer, Forma Scientific).

**Tabelle 2.1: Klinische Charakterisierung der sHPT-Gewebe:**

sHPT Nr.	Nieren-Ersatz-Therapie	setpoint Ca (mmol/l) mmol Ca	slope PTH pmol/0,01 (pmol/l)	PTH Maximum (pmol/l)	PTH Minimum
1	CAPD	1,22	2,61	192	14,1
2	NTX				
3	HD	1,45	0	249	101,0
4	NTX	nur Suppression			32,0
5	HD	1,14	6,8	263,25	117,0
6	CAPD	1,14	52,5	263,25	42,5
7	HD	1,17	2,2	61,9	22,2
8	HD	1,13	18,8	245,5	57,5

CAPD = Kontinuierliche ambulante Peritonealdialyse, HD = Hämodialyse, NTX = Nierentransplantation; *setpoint* = Calcium-Konzentration, die zu einer halbmaximalen Suppression der PTH-Sekretion führt; *slope* = Steilheit der Kurve im *setpoint* (s. Abb. 1.2; Kap. 1.2.2.1)  
Normwerte: Calcium *setpoint*: 1,1 mM; PTH: 1,1 - 5,8 pmol/l

Tab. 2.2: Klinische Daten von 8 parathyreoidektomierten Patienten mit sHPT für die ISH des CaR

lfd. NR.	Geschl.	zugrundeliegende Nierenerkrankung	Alter bei erster Dialyse	Alter bei PTX	Dialyse-Monate bei PTX	Nieren-Ersatz-Therapie bei PTX	Monate seit NTX	frühere PTX	Histologie Drüse 1	Histologie Drüse 2
sHPT 1	m	RPGN	54	54	4	CAPD	-	-	nodulär	-
sHPT 2	w	chron.rez.Pynephr.	21	29	95	NTX	81	-	diffus	diffus
sHPT 3	w	unbekannt	70	71	5	HD	-	-	diffus	-
sHPT 4	w	ADPKD	46	55		NTX	-	-	nodulär	diffus
sHPT 5	w	SLE	26	40	168	HD	-	-	diffus	-
sHPT 6	m	IgA-GN.	54	55	10	CAPD	-	2	nodulär	-
sHPT 7	w	unbekannt	39	49	115	HD	-	-	diffus	-
sHPT 8	w	SLE	37	40	15	NTX, HD	24	-	nodulär	-

ADPKD = autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung, IgA-GN = IgA-Glomerulonephritis, RPGN = rapid progressive Glomerulonephritis, SLE = systemischer Lupus Erythematoses, sHPT = sekundärer Hyperparathyroidismus, HD = Hämodialyse, CAPD = kontinuierliche ambulante Peritonealdialyse, PTX = Parathyreoidektomie, NTX = Nierentransplantation, chron.rez.Pynephr. = chronisch rezidivierende Pyelonephritis

## 2.2 Reagentien und Chemikalien

Anti-DIG-AP, Fab-Fragmente (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim )  
Aquatex (Merck, Darmstadt)  
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat - BCIP (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)  
Dextransulfat (Sigma, Deisenhofen)  
DIG Control Teststrips (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)  
DIG Oligonucleotide Tailing Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)  
DIG Quantification Teststrips (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)  
EDTA - Ethylenediaminetetraacetid Acid (Sigma, Deisenhofen)  
Ethanol 100 % (Merck, Darmstadt)  
Ficoll (Sigma, Deisenhofen)  
Formamid deionisiert (Sigma, Deisenhofen)  
HeringspermaDNA (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)  
Levamisol (Sigma, Deisenhofen)  
Lithiumchlorid 8M Lösung (Sigma, Deisenhofen)  
Magnesiumchlorid (6H<sub>2</sub>O) (Sigma, Deisenhofen)  
Maleinsäure (Sigma, Deisenhofen)  
Natriumchlorid (Sigma, Deisenhofen)  
Natriumdihydrogenphosphat (Sigma, Deisenhofen)  
Natriumhydrogenphosphat (Sigma, Deisenhofen)  
Natriumzitat (Sigma, Deisenhofen)  
Nitrobluetetrazoliumchlorid - NBT (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)  
Normales Schafserum (Sigma, Deisenhofen)  
Paraformaldehyd (Sigma, Deisenhofen)  
Pepsin (Sigma, Deisenhofen)  
Poly (A) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)  
Poly (dA) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)  
Polyvinylpyrrolidon (Sigma, Deisenhofen)  
Rinderserumalbumin / Bovine Albumin Fraction 5 (Sigma, Deisenhofen)  
Salzsäure 37% (Merck, Darmstadt)  
SDS 20% (Sigma, Deisenhofen)  
Tris HCL - Trizma Hydrochloride (Sigma, Deisenhofen)  
Triton X 100 (Sigma, Deisenhofen)  
Yeast tRNA (Sigma, Deisenhofen)

## 2.3 Standardlösungen

### Phosphatpuffer 0,2 M, pH 7,4:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	22,9 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,6 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l
Lösung vor Gebrauch autoklavieren	

### PBS (Phosphate buffered saline):

Phosphatepuffer 0,1 M	
NaCl	9 g/l

### 4 % Paraformaldehydlösung (PFA):

4 g PFA pro 100 ml PBS  
langsam auf 60° C erhitzen,  
einige Tropfen 10 N NaOH zugeben,  
vor Gebrauch filtern,  
innerhalb von 8 Stunden verbrauchen

### Prähybridisierungslösung

Gesamtvolumen:	1000 µl
Formamide deionisiert 100%	500 µl
20 X SSC	200 µl
Dextransulfat 50% (w/v)	200 µl
50 X Denhardt	20 µl
Heringssperma DNA (10 mg/ml)	10 µl
Yeast tRNA (20mg/ml)	10 µl
SDS 20%	10 µl
Poly (A) (100 µg/ml)	10 µl
Poly (dA) (5 µg/ml)	20 µl
bidestilliertes Wasser	20 µl

### Hybridisierungslösung:

Prähybridisierungslösung	100 µl
plus 150 ng Oligonukleotidsonde	

### Färbelösung:

NBT (100mg/ml)	45 µl
BCIP (50 mg/ml)	35 µl
Levamisol	24 mg
Lösung 2	ad 10 ml

5 bis 30 min vor Gebrauch herstellen, filtrieren,  
vor Lichteinfall schützen.

### 20X SSC, pH 7:

Natriumzitat (0,3 M)	88,2 g
Natriumchlorid (3 M)	175,5 g
bidestilliertes Wasser	ad 1 l
Lösung vor Gebrauch autoklavieren	

### Denhardt's 50X:

1% Polyvinylpyrrolidon	
1% BSA Fraktion 5	
1% Ficoll	

### Dextransulfat-Stammlösung 50% (w/v)

Dextransulfat	50 g
bidestilliertes Wasser	ad 100 ml

### Lösung 1, pH 7,5:

Tris HCl (100 mM)	15,76 g
NaCl (150 mM)	8,76 g
bidestilliertes Wasser	1 l

### Lösung 2, pH 9,5:

Tris HCl (100 mM)	15,76 g
NaCl (100 mM)	5,84 g
MgCl <sub>2</sub> (6H <sub>2</sub> O) (50 mM)	10,16 g
bidestilliertes Wasser	1 l

### Lösung 3, pH 8:

Tris HCl (10 mM)	1,58 g
EDTA (1 mM)	0,372 g
bidestilliertes Wasser	1 l

## 2.4 Oligonukleotidsonden

Die synthetische Herstellung von Oligonukleotidsonden bietet die Möglichkeit, sehr spezifische Markermoleküle für eine schon veröffentlichte DNA-Sequenz zu erhalten. So lassen sich die Oligonukleotidsonden bei gewünschtem mRNA-Nachweis spezifisch für die kodierende Sequenz und damit nur spezifisch für die darzustellende RNA erstellen. Die Spezifität der Sonde kann durch einen Vergleich mit dem Bestand bekannter Genbanken bestätigt werden. Ein weiterer Vorteil der synthetischen Herstellung ist die Tatsache, daß das Markermolekül in gereinigter Form und ausreichender Menge vorliegt.

Die Stabilität der Hybride wird nicht so sehr von ihrer Länge, als vielmehr von dem Gehalt an G-C beeinflusst. Vergleichende Studien zeigten, daß schon sehr kurze Oligonukleotide mit 15 bis 20 Basen stabile Hybride ausbilden. Je mehr G-C-Paarungen sich ausbilden können, desto mehr Wasserstoffbrückenbindungen sind vorhanden, die die beiden komplementären Nukleotidstränge verbinden, und desto stabiler sind die gebildeten Hybride. Der optimale G-C-Gehalt liegt bei 55 bis 65% (Fournier, Histologie moléculaire, Kp. 3, S.21 / 22).

Folgende Oligonukleotidsonden wurden in dieser Studie verwendet:

### **PTH sense 30-mer Oligonukleotid**

**PTH S:** 5'-CGA TGG AGA GAG TAG AAT GGC TGC GTA AGA-3',  
korrespondierend zu den Basen 358 (5') - 387 (3')

### **PTH antisense 30-mer Oligonukleotide**

**PTH AS:** 5'-TCT TAC GCA GCC ATT CTA CTC TTC CCA TCG-3',  
korrespondierend zu den Basen 387 (5') - 358(3')

**PTH AS 1:** 5'- CAT TGT CTT CCT TTT TTC GGG GCC -3',  
korrespondierend zu den Basen 480 (5') - 457 (3')

Diese Oligonukleotide sind bezogen auf cDNA PTHhum. 1156 bp Access.Nr. 6BJ00301. Sie wurden über die Datenbank GenEmbl auf die Spezifität für die kodierende Sequenz des PTHs überprüft. In allen drei Fällen wurde diese und die angegebene Lokalisation bestätigt und eine Übereinstimmung mit anderen Gensequenzen ausgeschlossen.

**CaR antisense 22-mer Oligonukleotide:****CAR 1:** 5'-TTGCGGAACTTGATGAAGACGA-3',

korrespondierend zu den Basen 2412 (5') - 2433(3')

**CAR 2:** 5'-ATGCTGAAGGTGATGAACTTGG-3',

korrespondierend zu den Basen 2928 (5') - 2949 (3')

Die Sequenz dieser Oligonukleotide wurde aus Gogusev et al. (1997) übernommen.

Die *antisense* Oligonukleotide wurden als Gemisch verwendet, nachdem sich in den Voruntersuchungen gezeigt hatte, daß jedes für sich ein spezifisches Signal erzeugte. Durch die Mischung ließ sich die Sensitivität erhöhen.

**2.5 Software**

Standard-Microsoft-Software: Excel 7.0, Powerpoint 7.0, WinWord 6.0 und 7.0 bzw. Word 97

**2.6 Arbeitsplatzsituation**

Die Arbeiten wurden 1996 in der INSERM-Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Drüeke am Hôpital Necker (Paris) im Rahmen eines einjährigen Forschungsaufenthaltes begonnen. Bei Wiederaufnahme meines Studiums an der HHU Düsseldorf (SS 1997) wurde parallel ein Laborplatz in der Klinik für Nephrologie eingerichtet. Nachdem dieser im November 1997 mit den notwendigen Geräten und Materialien ausgestattet war, wurden die Untersuchungen dort weitergeführt.

## 3 METHODE

### 3.1 Prinzip der *in situ* Hybridisierung (s. Abb. 3.1)

Die *in situ* Hybridisierung ist eine Methode, die die Möglichkeit eröffnet, sowohl DNA- wie RNA-Sequenzen mit Hilfe von Nukleinsäuresonden in Geweben und Zellen sichtbar zu machen. Bedeutung hat diese Technik auch für die Untersuchung räumlicher und zeitlicher Expressionsmuster erlangt.

Das Prinzip der *in situ* Hybridisierung beruht auf der Reassoziationskinetik von Nukleinsäuredoppelsträngen. Zwischen der Sonde und der nachzuweisenden Sequenz sollen sich hierbei möglichst stabile Hybride ausbilden.

Der Erfolg einer *in situ* Hybridisierung hängt nicht zuletzt von der Konservierung des Ausgangsmaterials ab, bei der Zielsequenzen und Gewebemorphologie erhalten bleiben sollen. Gleichzeitig muß das konservierte Gewebe für die Sonde und die Nachweisreagentien permeabel sein. Wenn RNA-Sequenzen nachgewiesen werden sollen, muß gleichzeitig eine Aktivierung von im Gewebe vorhandenen RNasen vermieden werden. Deshalb sollten die Gewebe nach Entnahme so schnell wie möglich schockgefroren und bis zur Fixierung nicht aufgetaut werden. Eine Kontamination der Gewebe/Objektträger durch RNasen, die sich an den Händen befinden, ist durch die Benutzung von sauberen Handschuhen zu vermeiden.

Die Fixierung kann durch zwei verschiedene Gruppen von Fixiermitteln erfolgen. Während die eine Gruppe die Präparate quervernetzt (z. B. Glutaraldehyd, Formaldehyd, Paraformaldehyd), fällt die andere Protein aus (z. B. Ethanol oder Methanol im Verhältnis 3:1 mit Essigsäure gemischt). Quervernetzende Mittel erhalten zwar die Struktur des Gewebes und die in ihnen enthaltenen Nukleinsäuren, vermindern jedoch die Permeabilität, so daß Sonde und Nachweisreagentien schlecht eindringen können. In diesen Fällen kann es erforderlich sein, die Permeabilität des Gewebes vor der *in situ* Hybridisierung durch zusätzliche Schritte, z.B. eine Inkubation mit proteinabbauenden Enzymen (z. B. Pronase E, Proteinase K, Pepsin/HCl) zu erhöhen. Präzipitierende Fixiermittel verringern die Gewebedurchlässigkeit kaum, können aber die Morphologie beeinträchtigen und zum Verlust der Nukleinsäuren führen. Schnittpräparate, vor allem für den Nachweis von mRNA und von Virussequenzen, werden gewöhnlich mit Glutaraldehyd und/oder Formaldehyd bzw. Paraformaldehyd fixiert. Für jeden Gewebetyp muß Art und Dauer der Fixierung

sorgfältig ausgetestet werden. Die 30minütige Fixierung in 4%iger Paraformaldehydlösung erwies sich für Nebenschilddrüsengewebe als die günstigste. Vor allem nach einer Quervernetzung der Proteine mit Paraformaldehyd ist eine Permeabilisierung erforderlich. Hierbei muß die optimale Konzentration, die das Gewebe gut permeabilisiert, ohne die Gewebsmorphologie zu beeinträchtigen, gefunden werden. Für die Permeabilisierung des Nebenschilddrüsengewebes erwies sich als einziges Enzym das Pepsin als geeignet. Bei allen anderen wurde die Gewebestruktur zu stark beeinträchtigt oder sogar zerstört. Die Konzentration des Pepsins wurde in einem Bereich zwischen 20 und 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  getestet. Eine Konzentration von 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  reichte aus, um bei erhaltener Morphologie eine gute Durchlässigkeit zu gewährleisten.

Der Nachweis der Hybride erfolgt nicht-radioaktiv mittels Digoxigenin-markierter Oligonukleotidsonden. Digoxigenin ist ein pflanzliches Steroid aus *Digitalis purpurea* und *Digitalis lanata*. In Form der modifizierten Nukleotide Digoxigenin-11-UTP beziehungsweise Digoxigenin-11-dUTP wird es als Marker für die nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung verwendet. Digoxigenin ist ein Hapten, gegen das spezifische Antikörper-Fab-Fragmente erhältlich sind. Diese Antikörper sind mit Enzymen (z. B. AP) gekoppelt, die mit Hilfe von zugegebenen Reagentien einen Farbniederschlag im Gewebe bewirken, durch den die Hybride sichtbar werden.

Die im weiteren angegebene Versuchsdurchführung basiert auf dem von Gogusev et al. (1997) entwickelten Versuchsprotokoll. Die vorgenommenen Änderungen sind in Zusammenarbeit mit dieser Arbeitsgruppe in Paris erarbeitet worden.

### **3.2 Erstellung und Fixierung der Gewebsschnitte**

Am Microtom (Slee Technik Mainz, Kry 220, MPE) wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  Schnitte von 10  $\mu\text{m}$  Dicke gefertigt und auf SuperFrost\*/Plus Objektträger (Menzel-Gläser) aufgezogen. Gefrierschnitte ermöglichen eine hohe Nachweissensitivität, jedoch ist die Handhabung der Schnitte schwieriger als die von Paraffinschnitten. So wurden sie bis zum Beginn der Fixierung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert, um eine Aktivierung der im Gewebe vorhandenen RNase zu verhindern.

Die Fixierung erfolgte 30 Minuten in 4%iger Paraformaldehydlösung. Nach drei 5minütigen Waschungen in PBS-Lösung wurden die Schnitte in einer Ethanolreihe - 70, 80, 100%, jeweils 2 Minuten - entwässert und an der Luft getrocknet. Um zu vermeiden, daß die Schnitte wieder Wasser aufnehmen konnten, wurden die Objektträger in Aufbewahrungsbehälter, die durch eine Parafilmabdichtung luftdicht abschlossen, verpackt und bei -20° C gelagert.

### 3.3 Markierung der Oligonukleotidsonden

Oligonukleotidsonden werden üblicherweise durch die als Endmarkierung (englisch: *Tailing*) bezeichnete Methode markiert. Hierbei wird an ihr 3'-Ende eine Kette aus 20 bis 100 Digoxigenin-11-dUTP geheftet. Dies geschieht mit Hilfe der Terminalen Transferase.

In dieser Studie wurde der Tailing Kit von Roche Molecular Biochemicals, Mannheim verwendet. Der Reaktionsansatz wurde laut Herstellerangaben für 100 pmol einer Oligonukleotidsonde angesetzt. Die Tailing-Reaktion fand 45 Minuten bei 37° C im Thermoblock (Eppendorf, Köln) statt. Durch Zugabe von 1 µl einer Mischung aus 2 µl Glykogen und 200 µl 0,2 M EDTA (pH 8) wurde sie beendet. 2,5 µl 4 M Lithiumchlorid und 75 µl 100%iges Ethanol, das auf -20° C gekühlt war, bewirkten die Ausfällung der Oligonukleotidsonde bei -20° C während mindestens 2 Stunden. Anschließend erfolgte eine 1stündige Zentrifugation mit 12.000 g (x g) bei 4° C (Sigma Zentrifuge 2-15, Sigma, Osterode). Der Überstand wurde abpipetiert und das Pellet in der Vakuumzentrifuge (Bachhofer, Reutlingen) lyophilisiert. Durch Zugabe von 100 µl sterilen bidestillierten Wassers entsteht eine Lösung mit einer Konzentration von 1 pmol/µl.

Überprüft wurde der Erfolg der Markierung mit Hilfe von dafür entwickelten Teststreifen und Kontrollstreifen, Boehringer Mannheim. Das Protokoll des Herstellers wurde ohne Änderungen übernommen.

### 3.4 Protokoll der *in situ* Hybridisierung

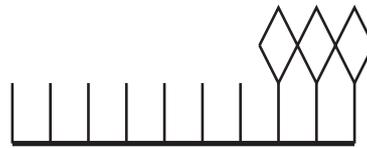
Als erstes wurden die Gewebsschnitte 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Drei 5minütige Waschungen mit PBS-Lösung folgten. Vor Beginn der Hybridisierung wurden die Gewebe durch eine Inkubation in 0,01 N HCl mit 20 µg/ml Pepsin bei 37° C permeabilisiert. Nach drei weiteren 5minütigen Waschschritten in PBS-Lösung und zehn Minuten Inkubation in 2 X SSC erfolgte die Prähybridisierung während drei Stunden bei Raumtemperatur mit 100 µl Prähybridisierungslösung pro Gewebsschnitt. Diese Reaktion fand wie alle, außer den Waschungen in einer von der Firma Welabo, Düsseldorf, gefertigten Hybridisierungskammer aus Plexiglas statt. Für die Hybridisierungslösung wurden die Prähybridisierungslösung und das markierte Oligonukleotid so gemischt, daß eine Endkonzentration der Oligonukleotidsonde von 150 ng/100 µl Hybridisierungslösung entstand. Auf jeden Gewebsschnitt wurden 100 µl Lösung gegeben. Nach 16 Stunden Hybridisierung bei 37° C im Hybridisierungssofen (Biometra OV1) folgten mehrere Waschschriffe: 2 mal 30 Minuten mit 2 X SSC, 2 mal 30 Minuten mit 1 X SSC, jeweils bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (GFL 3005), 15 Minuten in 0,5 X SSC bei 37° C im Hybridisierungssofen, 15 Minuten in 0,25 X SSC bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Die immunhistochemische Visualisierung der Hybride begann mit einer 5minütigen Inkubation in Lösung 1. Es folgte eine 30 Minuten dauernde Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen des Antikörpers durch Lösung 1, die zusätzlich 2% normales Schafserum und 0,1% Triton X 100 enthielt. Auf jeden Objektträger wurden 200 µl gegeben. Die Zugabe des Antidigoxigenin-AP-Fab-Fragmentes erfolgte in einer Verdünnung von 1:1000 in Lösung 1, unter Zusatz von 1% normalem Schafserum und 0,1% Triton. Nachdem 100 µl dieser Lösung auf jeden Gewebsschnitt gegeben wurden, wurden sie bei 4° C über Nacht inkubiert. Auf drei 5minütige Waschungen in Lösung 1 folgten zwei weitere 5minütige Waschungen in Lösung 2, jeweils unter Nutzung des Schüttlers. Nun folgte die Zugabe der Färbelösung, 300 µl pro Objektträger. Die Farbreaktion dauerte 2 bis 24 Stunden. Sie mußte ohne Lichtexposition stattfinden. Nach 4 bis 6 Stunden war in der Regel ein eindeutiges Signal im Mikroskop erkennbar, so daß die Färbung durch zwei 15minütige Waschungen in Lösung 3 und 2, plus eine weitere gleicher Dauer in bidestilliertem Wasser beendet wurde. Auch diese Waschschriffe fanden auf dem Schüttler statt. Nachdem die Gewebsschnitte an der Luft getrocknet waren, wurden die Deckgläser mit Aquatex aufgeklebt und es entstanden Dauerpräparate, die bis zur Auswertung bei Zimmertemperatur, vor ständigem Lichteinfall geschützt, gelagert wurden.

Legende zu Abb. 3.1: Schematische Darstellung der *in situ*-Hybridisierung

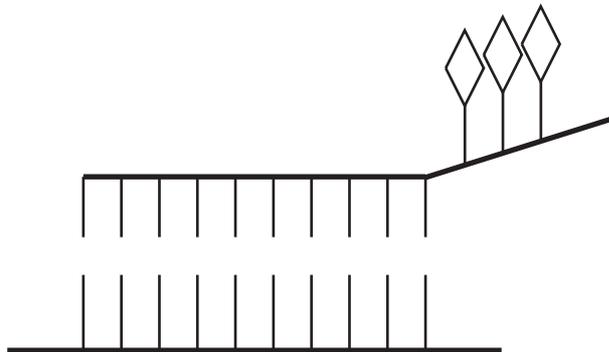
nachzuweisende mRNA



DIG-markierte  
Oligonukleotidsonde



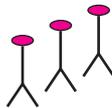
Hybrid aus Oligonukle-  
otidsonde und mRNA



Alkalische Phosphatase (AP)



Fab-Ak,  
gekoppelt mit AP



weitere Erläuterungen siehe Kap. 3.1 und 3.4

# ISH

- Schema -

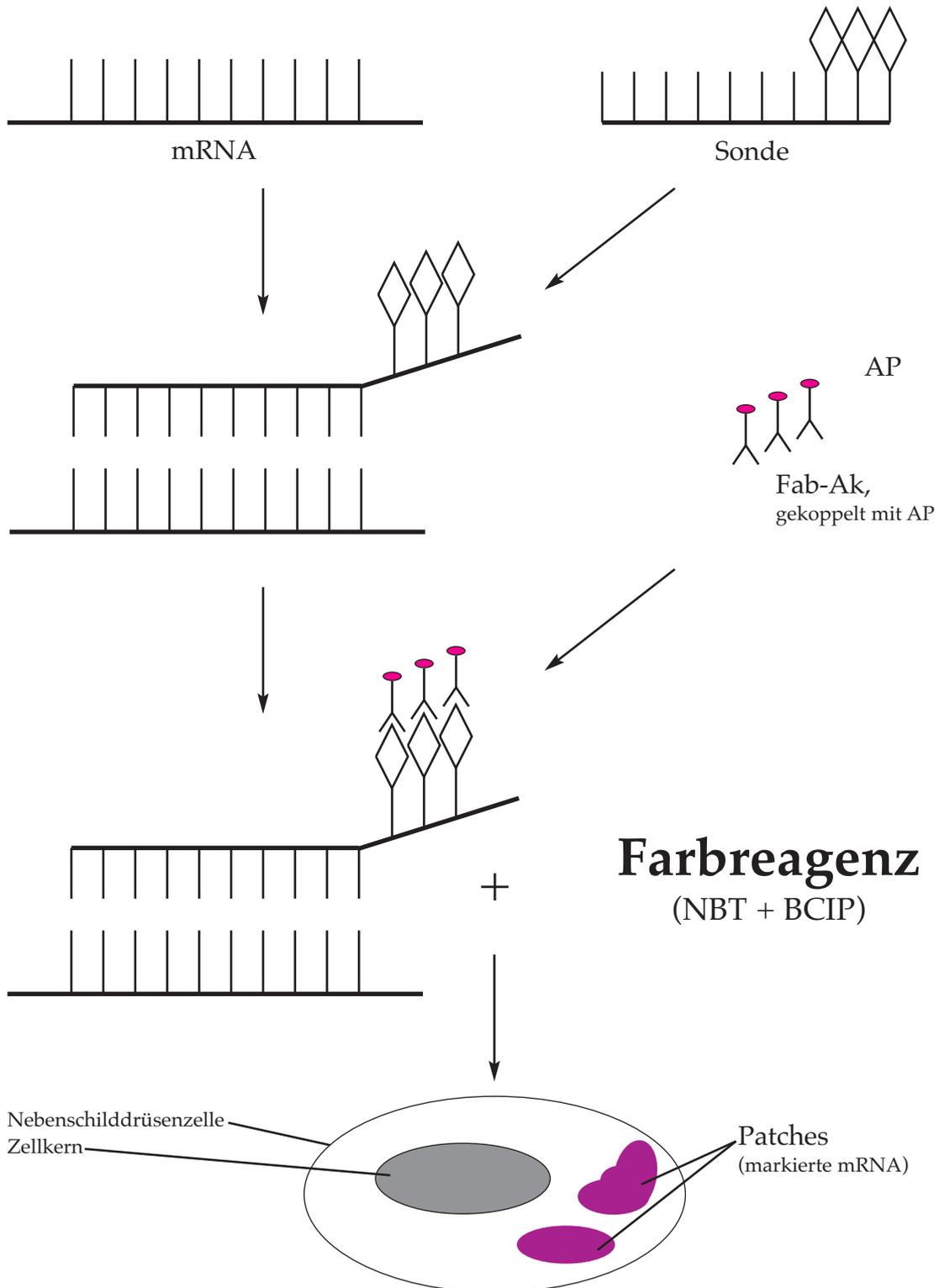


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der *in situ*-Hybridisierung

### 3.5 Kontrollen

Als interne Kontrolle bei der Durchführung der ISH eignet sich ein *sense* Oligonukleotid, das in seiner Basensequenz einem Ausschnitt der *sense* mRNA-Sequenz entspricht. Deshalb kann keine Hybridbildung erfolgen, so daß in diesem Fall nicht mit einem spezifischen Signal zu rechnen ist. Nach der Farbreaktion tritt nur ein geringes unspezifisches Hintergrundsignal auf. Es beruht z.B. auf unspezifischen Präzipitationen und auf wenigen in den Zellen verbliebenen Oligonukleotiden, an die der Antikörper binden konnte.

Wenn die Waschschrte nicht ausreichen, um ungebundene Oligonukleotide nach der Hybridisierung zu entfernen, kommt es zu einer stark ausgeprägten Farbreaktion. Diese ist in dem mit einem *sense* Oligonukleotid markierten Gewebsschnitt klar zu erkennen.

Eine weitere Kontrolle ist die Negativprobe, bei der die Hybridisierungslösung ohne Oligonukleotidsonde zugegeben wird. Auch hier kommt es nach Beendigung des Versuches maximal zu einem leichten Hintergrundsignal.

In dieser Arbeit wurde in jeder Hybridisierungsserie ein PTH *sense* Oligonukleotid und eine Negativprobe, der kein Oligonukleotid beigefügt wurde, als Kontrollen mitgeführt.

Die Hybridisierung mit PTH *antisense* Oligonukleotid diente neben der Analyse der PTH-Expression dem Nachweis, daß es sich bei den bearbeiteten Gewebsschnitten um Nebenschilddrüsengewebe handelt.

### 3.6 Auswertung

Bei der ISH kommt es durch die verschiedenen Reaktionsschritte, z.B. die Antikörperbindung und die anschließende enzymatische Farbreaktion, zu einer vielfachen Verstärkung des Signals. Diese ist nur ungefähr quantifizierbar. Ein Rückschluß auf die tatsächliche Menge der markierten mRNA-Moleküle ist nicht möglich, somit entfällt die Möglichkeit einer quantitativen Auswertung.

Die Auswertung der ISH erfolgte semiquantitativ durch Auszählung markierter und nicht markierter Zellen als Maß für die Expression der nachgewiesenen mRNA. Die Einarbeitung in die Analyse der ISH erfolgte durch Frau Duchambon in der

Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Drüeke (Paris). Das Konzept der semiquantitativen Auswertung war ebenfalls Ergebnis dieser Zusammenarbeit.

Bei Beginn der Auswertung (1. Zählung der CaR mRNA) wurden die Ergebnisse der Zählung stichprobenartig von Frau Duchambon auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft.

Für die Auszählung wurde die 640er Vergrößerung gewählt. Bei dieser starken Vergrößerungsstufe sind die Zellen leicht von einander abzugrenzen. Durch Benutzung der Mikrometerschraube ist klar zu erkennen, ob es sich um ein spezifisches Signal im Zytoplasma der Zelle handelt oder um ein unspezifisches Präzipitat. Pro markiertem Gewebsschnitt wurden in 10 unterschiedlichen, durch Blindeinstellung zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern jeweils 100 Zellen, markierte und nicht markierte, ausgezählt. Weil in jedem Fall die gleiche Anzahl von 10 x 100 Zellen bewertet wurde, konnte die Größe des Gewebsschnittes keinen Einfluß auf die Ergebnisse nehmen. Um Doppelzählungen der Zellen zu vermeiden, erfolgte die Zählung im zentralen Bereich des Gesichtsfeldes mäanderförmig.

Da diese Auswertung sehr arbeits- und zeitintensiv war, gelang es aus arbeitsorganisatorischen Gründen nicht, die Zählung von einem zweiten Beobachter wiederholen zu lassen. Dies hätte für den zweiten Beobachter eine gründliche Einarbeitung in die Analytik der mikroskopischen Schnitte vorausgesetzt. Denn nicht immer sind unspezifische Präzipitationen einfach vom spezifischen Signal in den Zellen zu unterscheiden. Diese Unterscheidung gelingt nur nach eingehender Übung und durch intensiven Einsatz der Mikrometerschraube, mit der beurteilt werden kann, ob sich das Präzipitat in der Zelle befindet oder über/unter dem Niveau der Zelle. Weil in der zur Verfügung stehenden Zeitspanne kein zweiter Beobachter zur Verfügung stand, erfolgte mit einer zeitlichen Verzögerung von mindestens 14 Tagen eine weitere Zählung, bei der erst nach Beendigung des Zählvorganges festgestellt wurde, um welches Präparat es sich handelte.

Der Prozentsatz der positiv markierten Zellen diente als Maß für die Expression der CaR bzw. PTH mRNA. Diese Auswertung wurde für die Hybridisierung der CaR mRNA und der PTH mRNA durchgeführt.

Eine computergestützte Auswertung des Signals stand bei dieser Arbeit nicht zur Verfügung.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Ergebnisse der ISH der CaR mRNA

Die Tabelle 4.2 stellt die Rohdaten sämtlicher Zählungen beider Auswertungsreihen der ISH für die CaR mRNA dar. Eine Zusammenfassung bietet Tabelle 4.1:

**Tab. 4.1: Gesamtergebnisse der ISH CaR mRNA - % markierte Zellen**

	gesamtes Gewebe	noduläre Hyperplasie	diffuse Hyperplasie
pHPT 1	49,2	-	-
pHPT 2	41,4	-	-
pHPT 3	45,6	-	-
pHPT 4	40,5	-	-
pHPT 5	47,9	-	-
sHPT 1	47,2	40,8	50,0
sHPT 2	46,1	-	-
sHPT 3	44,2	-	-
sHPT 4	47,3	50	48,9
sHPT 5	45,3	-	-
sHPT 6	36,6	31,7	41,6
sHPT 7	43,7	-	-
sHPT 8	49,1	39,6	49,9
Normalgewebe	49,3	-	-

#### 4.1.1 Expression der CaR mRNA im Normalgewebe

Im Normalgewebe waren 49,3% der Zellen für die CaR mRNA positiv markiert (s. Tab. 4.2). Im mikroskopischen Bild eines ISH-Präparates ergab sich eine felder- oder gruppenförmige Anfärbung der Zellen. Dies war in allen Geweben beim Nachweis der mRNA des CaR ausgeprägter als bei der des PTHs. Hier erschien die Signaldichte homogener.

Diese war im Normalgewebe besonders stark ausgeprägt, wodurch die Anzahl der positiven Zellen von Gesichtsfeld zu Gesichtsfeld stark schwankt (s. Tab. 4.2). Dies lässt sich gleichfalls den Differenztabellen (Tab. 4.3 u. 4.4) entnehmen.

**Tabelle 4.2: Auswertung der ISH CaR mRNA - Rohdatentabelle - Ergebnisse sämtlicher Zählungen beider Auswertungsreihen**

**1. Zählung der CaR mRNA**

% markierte Zellen	pHPT		pHPT		pHPT		sHPT		sHPT		sHPT		sHPT		sHPT		sHPT		Normal-gewebe		
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	4	4	5	6	6	7	8	8	8			
						gesamt	nodös	diffus	gesamt	nodös	diffus										
43	43	39	43	39	39	54	35	47	49	44	65	42	31	42	45	49	44	49	45	44	47
44	44	42	37	50	50	46	36	52	55	41	35	40	26	29	37	50	33	50	33	49	53
39	55	50	31	56	56	44	42	43	48	57	51	44	25	33	41	55	44	55	53	47	52
39	48	44	32	59	59	40	38	48	40	49	44	41	41	26	46	51	45	46	43	51	59
64	33	56	48	37	37	49	43	49	52	46	46	49	39	31	42	51	35	42	37	59	51
42	31	48	36	39	39	39	38	44	48	51	50	48	37	43	43	54	38	43	34	52	48
57	40	54	46	56	56	43	43	49	39	38	47	50	41	25	42	52	47	42	29	45	54
52	33	47	41	43	43	58	57	55	41	48	39	56	35	32	39	39	29	39	46	56	52
51	41	39	40	40	54	53	51	54	54	50	56	33	51	27	38	38	46	38	31	54	43
55	41	46	52	62	62	50	31	56	47	54	58	46	41	28	43	56	42	43	47	43	54
Mittelwert 1	48,6	40,9	46,5	40,6	49,5	47,6	41,4	49,7	46,7	47,8	49,1	44,9	36,7	31,6	41,6	49,5	39,9	41,6	39,8	50	51,3
Standardabweichung 1	8,04	6,98	5,48	6,48	8,78	5,95	7,36	4,05	6,33	5,47	8,41	6,06	7,43	5,97	2,76	5,89	5,87	2,76	7,64	10,00	4,20





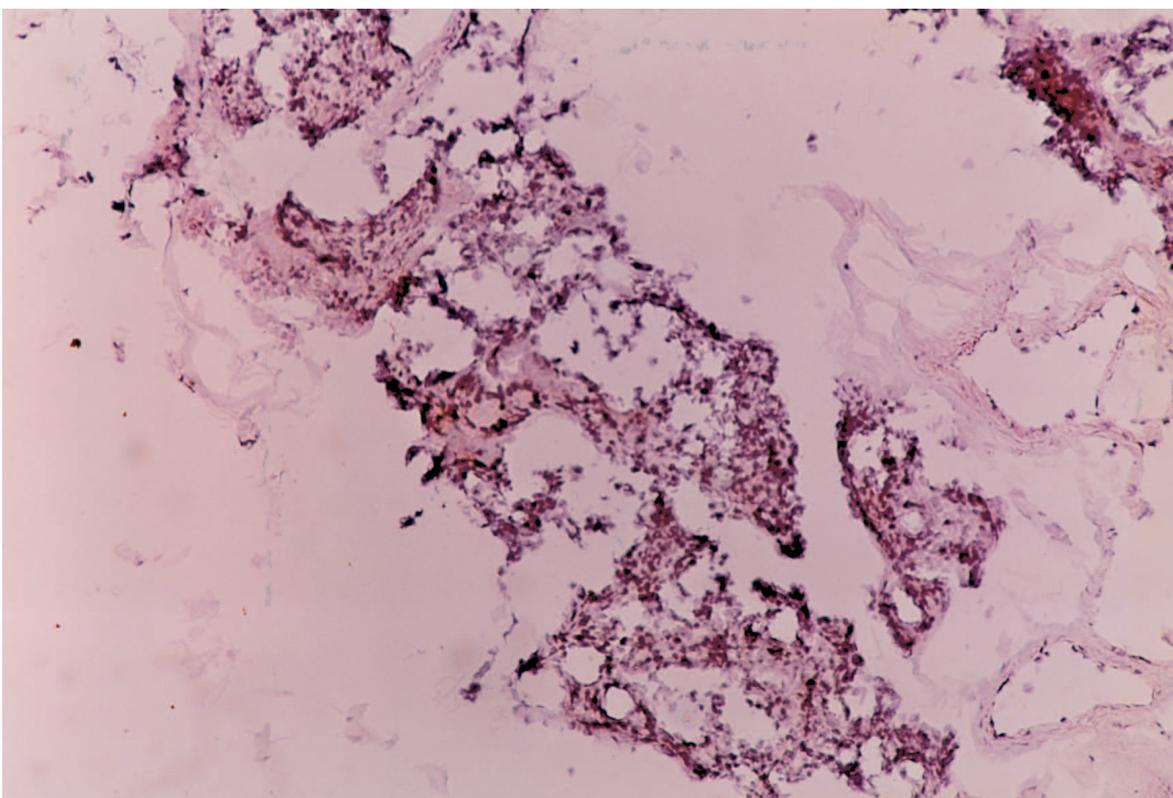
**Tab. 4.4: Differenzen im Ergebnis der beiden Auszählungen in prozentualer Darstellung (Ergebnis der 1. Zählung 100%)**

**Differenzen im Ergebnis der beiden Auszählungen der mRNA CaR**

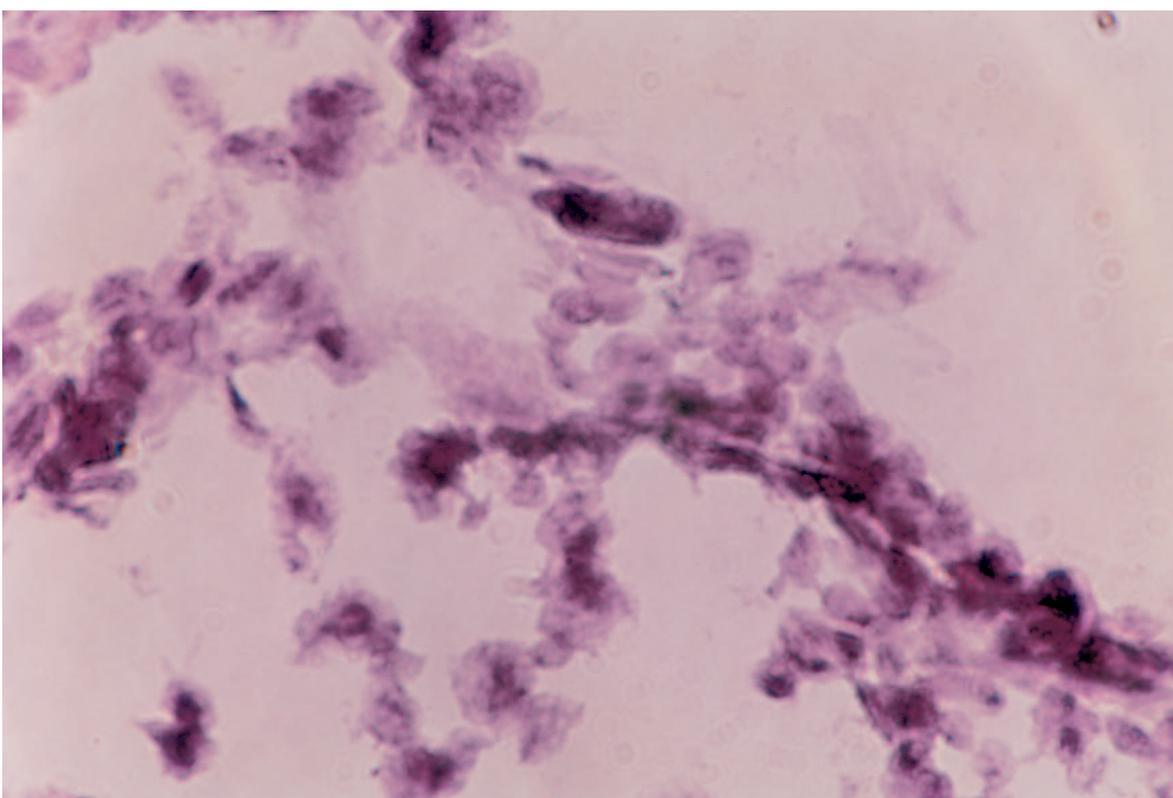
% markierte Zellen	pHPT		pHPT		sHPT		sHPT		sHPT		sHPT		sHPT		sHPT		sHPT			
	1	2	3	4	5	1	1	1	1	2	3	4	4	4	5	6	6	7	8	
						gesamt	nodös	diffus				gesamt	nodös	diffus				gesamt	nodös	
2,3	2,3	20,5	30,2	5,1	24,1	2,9	8,5	13,9	11,6	4,1	50,0	21,5	2,4	12,9	14,3	53,1	20,0	0,0	42,2	
25,0	20,5	31,0	18,9	6,0	4,3	11,1	26,9	25,7	37,5	5,5	43,9	14,3	35,0	96,2	34,5	36,6	13,5	8,0	60,6	
64,1	3,6	14,0	29,0	3,6	29,5	7,1	41,9	73,2	16,7	18,8	19,3	15,7	9,1	72,0	18,2	13,6	14,6	34,5	5,7	
10,3	12,5	4,5	3,1	39,0	2,5	7,9	8,3	4,5	15,6	60,0	18,4	47,7	70,7	7,3	19,2	28,9	6,5	0,0	30,2	
29,7	30,3	10,7	18,8	54,1	2,0	9,3	18,4	32,5	7,5	13,5	32,6	6,5	20,4	2,6	19,4	37,1	45,2	7,8	24,3	
23,8	25,8	20,8	16,7	15,4	17,9	15,8	27,3	3,7	3,8	6,3	15,7	26,0	43,8	35,1	2,3	36,8	25,6	3,7	8,8	
29,8	10,0	24,1	15,2	5,4	20,9	2,3	2,0	30,8	21,1	7,7	42,1	8,5	28,0	12,2	44,0	2,1	31,0	7,7	44,8	
9,6	30,3	12,8	7,3	16,3	5,2	35,1	3,6	43,8	0,0	2,9	10,4	17,9	12,5	37,1	25,0	27,6	5,1	2,6	6,5	
3,9	2,4	0,0	10,0	29,6	30,2	11,8	13,0	10,5	7,1	18,5	24,0	5,4	33,3	45,1	7,4	2,2	18,4	15,8	19,4	
1,8	7,3	0,0	36,5	32,3	2,0	22,6	17,9	36,7	1,9	23,4	7,4	5,2	19,6	19,5	14,3	16,7	34,9	5,4	0,0	
Mittelwert:	20,0	14,5	13,8	18,6	20,7	13,9	12,6	16,8	27,5	12,3	16,0	26,4	16,9	27,5	34,0	19,9	25,5	21,5	8,5	24,3
Median:	17,0	11,3	13,4	17,7	15,8	11,6	10,2	15,4	28,2	9,6	10,6	21,6	15,0	24,2	27,3	18,7	28,2	19,2	6,5	21,8
Mittelwert des Medians:	16,8																			

**Differenzen im Ergebnis der beiden Auszählungen der mRNA PTH**

% markierte Zellen	pHPT		pHPT		pHPT		sHPT		sHPT		sHPT		sHPT		sHPT		sHPT		sHPT		Normalgewebe	
	1	2	3	4	5	1	1	1	1	2	3	4	5	6	6	7	8	8	8	8	8	
						gesamt	nodös	diffus				gesamt	nodös	diffus				gesamt	nodös	diffus	diffus	gewebe
21,7	0,0	3,8	18,3	1,8	20,0	14,7	6,9	3,9	4,5	20,3	8,6	4,7	3,2	6,8	4,8	1,4	4,4	8,5	4,3	8,5	4,3	4,3
10,8	18,3	3,3	20,8	9,4	10,9	2,7	3,4	10,3	10,5	13,8	11,9	27,7	15,9	7,9	1,4	1,5	40,7	24,7	5,1	24,7	5,1	24,7
23,9	3,6	1,8	3,0	37,0	4,9	11,4	10,0	15,7	15,7	15,9	13,0	12,0	9,3	22,2	12,7	19,2	4,0	4,3	26,6	4,3	26,6	26,6
1,5	14,9	15,1	4,2	6,3	22,6	11,7	23,7	6,5	1,4	10,7	3,3	9,5	25,0	1,5	8,8	5,8	31,7	4,7	8,8	4,7	8,8	8,8
13,2	9,7	19,7	5,9	17,5	2,9	5,4	16,4	15,0	17,0	30,8	9,7	9,2	11,5	6,3	6,2	2,9	16,4	0,0	5,8	0,0	5,8	5,8
6,9	6,9	8,5	28,1	5,3	3,0	2,9	3,2	5,8	11,1	11,8	7,5	12,5	33,8	12,1	17,4	13,8	17,3	6,3	11,1	6,3	11,1	11,1
10,4	7,8	9,2	1,6	11,5	3,3	12,5	6,8	1,2	5,6	21,5	1,8	22,4	26,4	5,0	26,3	1,3	2,7	9,1	1,7	9,1	1,7	1,7
0,0	14,0	8,3	6,2	0,0	26,3	11,3	36,0	2,4	15,6	1,6	12,1	3,1	0,0	26,3	23,1	6,5	8,6	4,0	20,5	4,0	20,5	20,5
1,4	5,7	3,1	4,3	0,0	21,9	21,1	10,6	11,6	2,9	2,9	18,2	4,2	18,8	19,0	15,6	9,5	-	2,8	9,6	2,8	9,6	9,6
16,1	10,5	7,4	12,5	11,7	18,3	42,6	4,1	2,6	7,2	1,6	6,4	12,1	0,0	21,3	12,5	1,4	-	1,4	7,8	1,4	7,8	7,8
Mittelwert:	10,6	9,1	8,0	10,5	10,0	13,4	13,6	12,1	7,5	9,2	13,1	9,2	14,4	12,8	12,9	6,3	12,6	6,3	12,6	6,3	10,1	10,1
Median:	10,6	8,7	7,9	6,0	7,8	14,6	11,6	8,5	6,1	8,9	12,8	9,1	10,8	13,7	12,6	4,4	12,5	4,4	4,5	4,5	4,5	4,5
Mittelwert des Medians:	9,5																					



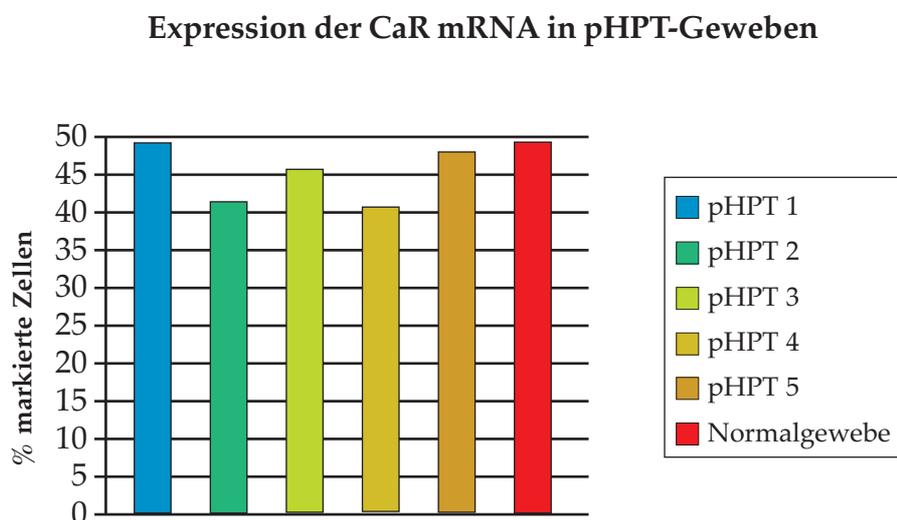
**Abb. 4.1: ISH CaR mRNA - Normalgewebe - Übersicht (100fache Vergrößerung).** Dieses Foto zeigt die Struktur des gesunden parathyreoidalen Gewebes: Gruppen von Hauptzellen sind umgeben von Fett- und Bindegewebe, das nicht durch die Oligonukleotidsonde markiert wurde.



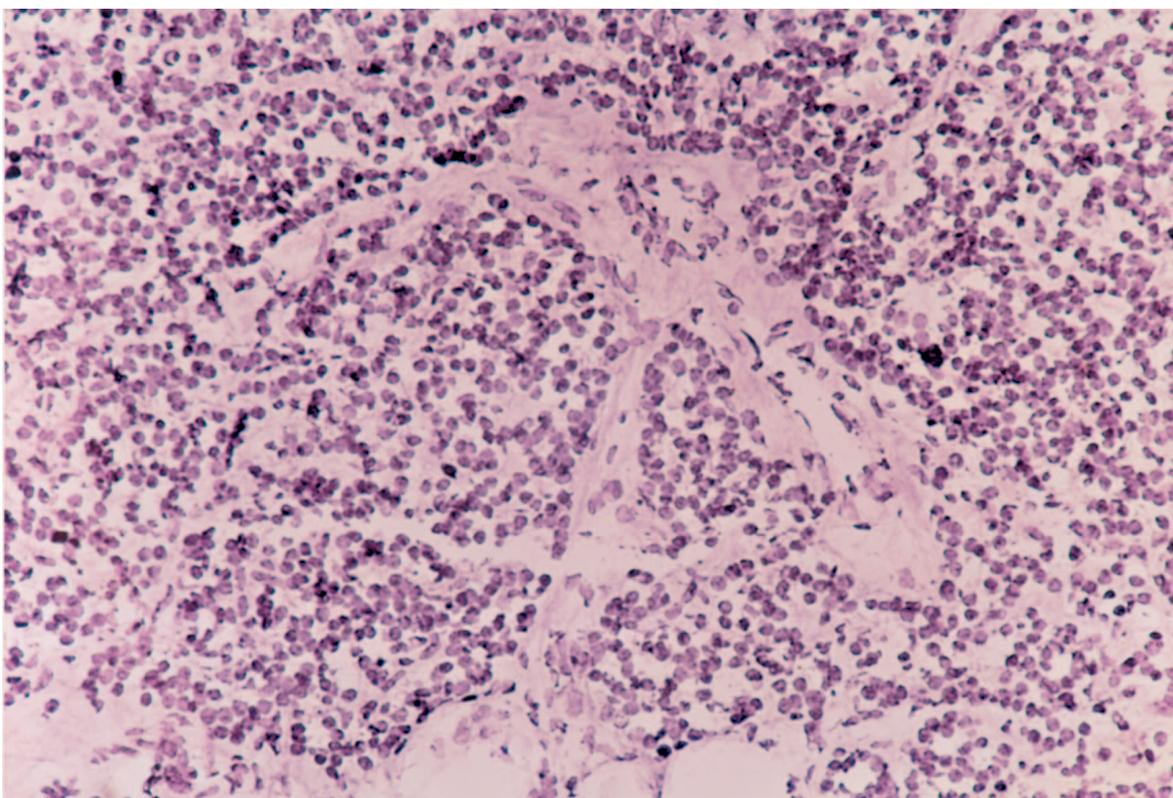
**Abb. 4.2: ISH CaR mRNA - Normalgewebe - Detailaufnahme (640fache Vergrößerung).** In dieser Vergrößerungsaufnahme läßt sich gut erkennen, daß die Hauptzellen gruppenförmig angefärbt sind.

### 4.1.2 Expression der CaR mRNA in pHPT-Geweben

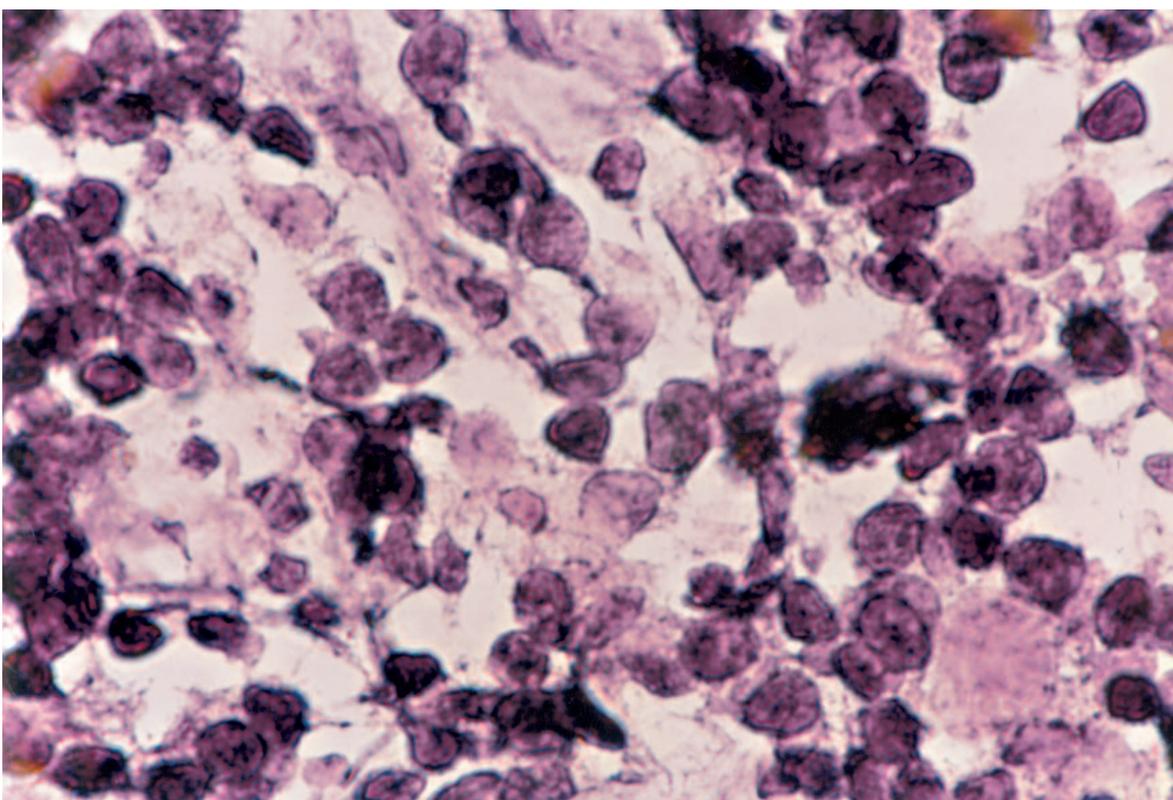
Die Ergebnisse der ISH der CaR mRNA in den pHPT-Geweben wiesen eine Streuung von 48,7% bis 40,2% positiv markierten Zellen auf. Damit lagen zwei der pHPT-Gewebe (Nr. 1 u. 5) im Bereich des Normalgewebes, eines im mittleren Bereich (Nr. 3), während die Gewebe Nr. 2 u. 4 etwa 10% darunter lagen.



**Abb. 4.3. Ergebnisse ISH der CaR mRNA in pHPT-Geweben im Vergleich zum Normalgewebe.** Aus dem Diagramm ist ersichtlich, daß die CaR-Expression in den pHPT-Geweben variabel ist, mit einer Tendenz zur Verminderung, (weitere Erläuterungen s. o., Standardabweichungen s. Tab. 4.2).



**Abb. 4.4: IHS CaR mRNA - pHTP - Übersicht (100fache Vergrößerung)** Dieses Foto zeigt den spezifischen CaR mRNA-Nachweis in den parathyroidalen Hauptzellen. Das in der Bildmitte vorhandene Bindegewebe ist negativ.

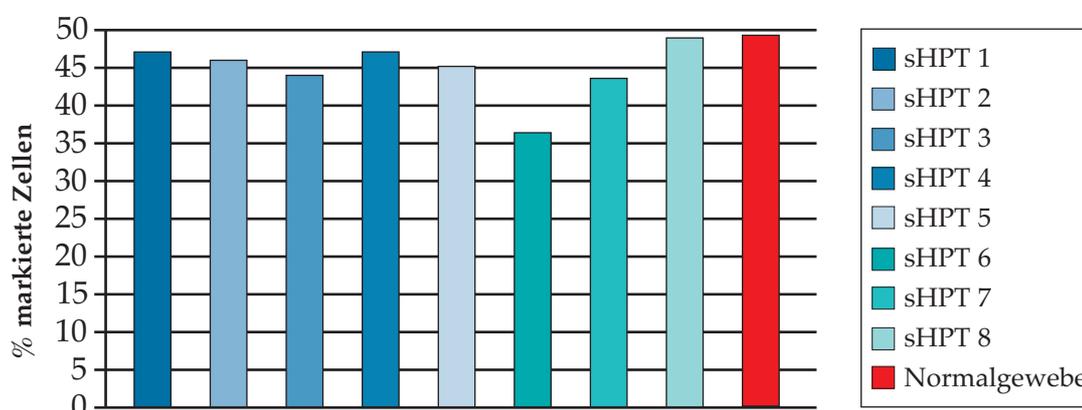


**Abb. 4.5: ISH CaR mRNA - pHTP - Detailaufnahme (640fache Vergrößerung)** Auf diesem Foto ist die gruppenförmige Anfärbung der Hauptzellen gut erkennbar. Eindeutig positive Zellen befinden sich in der rechten oberen Ecke und in der Bildmitte.

### 4.1.3 Expression der CaR mRNA in sHPT-Geweben

Die Ergebnisse der ISH für die CaR mRNA der sHPT-Gewebe schwankten von 36,6% bis 49,1% positiv markierte Zellen (s. Tab. 4.1 u. Abb. 4.2). Damit lag die CaR mRNA-Expression in allen sHPT-Geweben, außer im Gewebe Nr. 8, unterhalb der Expression der CaR mRNA im Normalgewebe. Am ausgeprägtesten war die Reduktion im Gewebe Nr. 6.

Expression der CaR mRNA in sHPT-Geweben



**Abb. 4.6: Gesamtergebnisse der ISH CaR mRNA der sHPT-Gewebe im Vergleich zum Normalgewebe.** Die sHPT-Gewebe zeigen eine variable Expression der CaR mRNA, wobei bis auf das Gewebe Nr. 8 alle Gewebe eine reduzierte Expression aufweisen. Diese Reduktion ist im Gewebe Nr. 6 am stärksten ausgeprägt (Standardabweichungen s. Tab. 4.2).

Die ISH ermöglicht es, die Morphologie der Gewebe und die markierte mRNA gleichzeitig zu beurteilen. Bei den sHPT-Geweben war es in vier Fällen möglich, nodöse Formationen von Regionen mit diffuser Hyperplasie zu unterscheiden (Abb. 4.9). Bei der getrennten Auszählung dieser Zonen konnte in drei dieser vier Gewebe (sHPT 1, 6 u. 8) ein Unterschied von 10% festgestellt werden. In den nodösen Arealen waren 10% weniger Zellen positiv für die mRNA des CaR als in Regionen mit diffuser Hyperplasie (s. Tab. 4.1 u. Tab. 4.2).

Expression der CaR mRNA in nodösen und diffus hyperplastischen Arealen von sHPT-Geweben

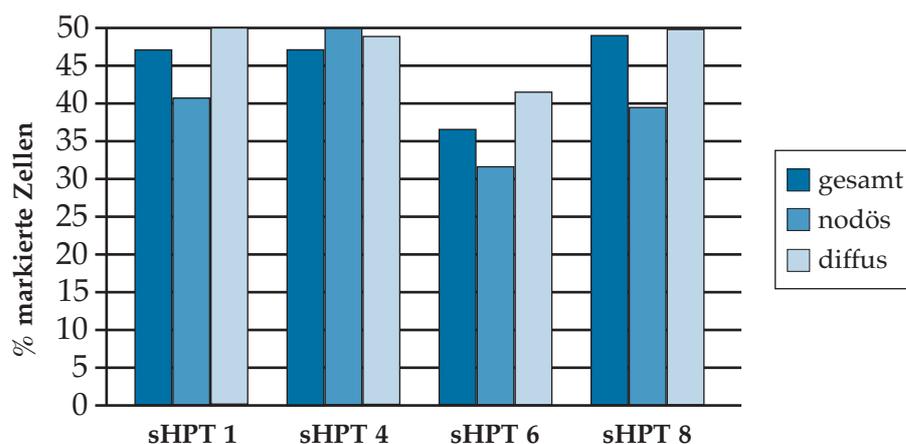


Abb. 4.7: Ergebnisse der ISH CaR mRNA der sHPT-Gewebe mit nodösen und diffus hyperplastischen Arealen. Die Expression der CaR mRNA ist in drei der vier Fälle in den nodösen Arealen um 10% vermindert. (Standardabweichungen s. Tab. 4.2)

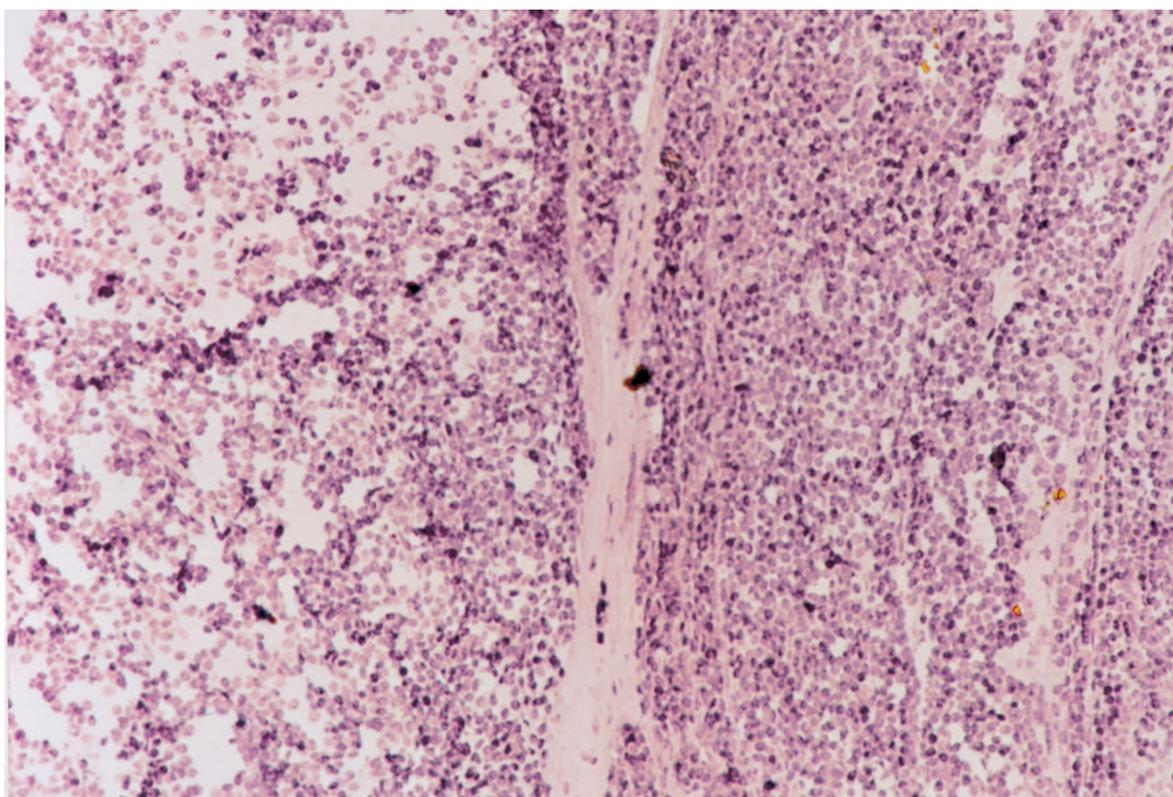
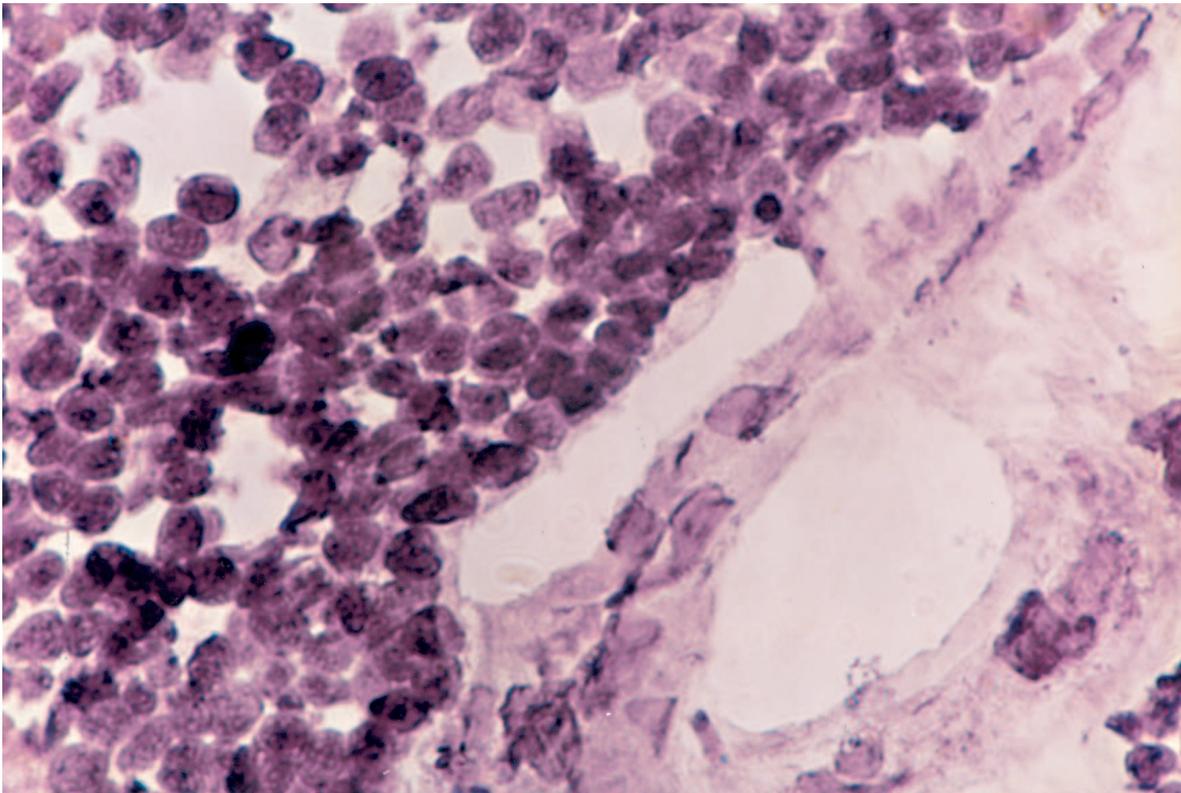


Abb. 4.8: ISH CaR mRNA - sHPT - Übersicht (100fache Vergrößerung): Dieses Foto illustriert sehr gut, daß man das Signal und die Gewebemorphologie gleichzeitig beurteilen kann. Die linke Bildhälfte zeigt eine Zone mit diffuser Hyperplasie der Hauptzellen. Rechts ist ein noduläres Areal zu erkennen.

Im mikroskopischen Bild eines ISH-Präparates ergibt sich eine felder-/gruppenförmige Anfärbung der Zellen. Dies war beim Nachweis der mRNA des CaR ausgeprägter als bei der des PTHs. Hier erschien die Signaldichte homogener. Dies läßt sich an den Differenztabellen (Tab. 4.3 u. 4.4), die die Schwankungsbreite zwischen der ersten und der zweiten Zählung darstellen, ablesen. Der Median der prozentualen Schwankung - gemittelt über alle Zählungen - liegt für die mRNA des CaR bei 16,3 und bei der des PTH bei 9,6.



**Abb. 4.9: ISH CaR mRNA - sHPT - Detailaufnahme (640fache Vergrößerung)** - In diesem Foto ist zu erkennen, daß im Bindegewebe und in dem Gefäß kein Signal vorhanden ist. Hier liegt eine interne Negativkontrolle vor, die zeigt, daß durch die ISH ein spezifisches Signal, in diesem Fall für die CaR mRNA, erzeugt wird.

## 4.2 Ergebnisse der ISH der PTH mRNA

Die Tabelle 4.6 stellt die Rohdaten aller Zählungen beider Auswertungsreihen der ISH für die mRNA des PTH dar. Eine Zusammenfassung bietet Tabelle 4.5:

**Tab. 4.5: Gesamtergebnisse der ISH PTH mRNA**

	gesamtes Gewebe	noduläre Hyperplasie	diffuse Hyperplasie
pHPT 1	65,5	-	-
pHPT 2	63,0	-	-
pHPT 3	57,5	-	-
pHPT 4	64,9	-	-
pHPT 5	54,6	-	-
sHPT 1	63,8	66,0	63,2
sHPT 2	74,9	-	-
sHPT 3	65,1	-	-
sHPT 4	58,8	-	-
sHPT 5	55,4	-	-
sHPT 6	66,5	64,3	60,8
sHPT 7	63,3	-	-
sHPT 8	68,6	69,1	67,7
Normalgewebe	58,8	-	-

**Tabelle 4.6: Auswertung der ISH PTH mRNA - Rohdatentabelle - Ergebnisse sämtlicher Zählungen beider Auswertungsreihen**

**1. Zählung der mRNA des PTH**

% markierte Zellen	pHPT		pHPT		pHPT		sHPT		sHPT		sHPT		sHPT		sHPT		sHPT		sHPT		Normalgewebe		
	1	2	3	4	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
						gesamt	nodös	diffus				gesamt	nodös	diffus			gesamt	nodös	diffus				
60	64	52	60	56	60	60	68	72	76	66	59	64	62	59	63	71	68	71	70				
74	60	61	72	53	64	64	73	59	78	76	65	83	63	63	69	66	59	73	59				
67	56	56	67	46	61	61	70	70	89	70	69	75	75	54	63	73	75	70	64				
66	74	53	71	64	62	62	77	76	77	72	56	63	56	67	68	69	82	64	57				
68	62	66	68	63	68	68	74	67	80	53	52	65	78	63	65	68	73	75	52				
58	72	59	57	57	57	66	68	62	69	63	51	80	80	66	69	65	81	63	72				
77	64	65	64	52	60	60	56	59	85	71	65	76	53	60	76	79	74	77	58				
63	57	60	65	51	57	57	62	50	82	64	63	65	65	57	65	62	70	75	44				
72	70	64	69	59	73	73	57	66	69	70	69	72	64	58	64	74	75	71	73				
62	57	54	72	60	60	60	54	73	78	69	63	58	63	61	56	72	71	69	64				
Mittelwert 1	66,7	63,6	59	66,5	56,1	63,1	65,9	65,4	78,3	67,4	61,2	70,1	65,9	60,8	65,8	69,9	72,8	70,8	61				
Standardabweichung 1	5,88	6,17	4,84	4,80	5,37	4,50	7,74	7,54	5,97	6,04	10,00	7,83	8,54	3,84	4,96	4,70	6,23	4,35	8,73				

## 2. Zählung der PTH mRNA

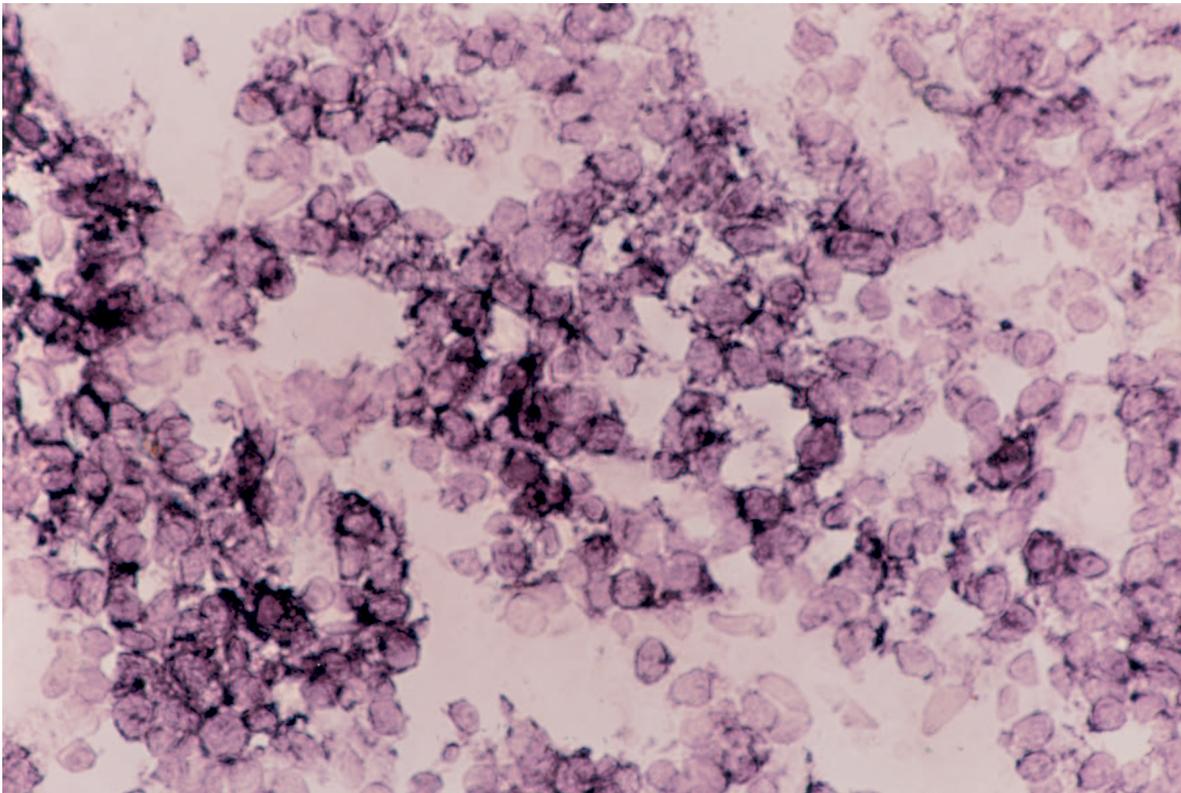
% markierte Zellen	pHPT 1	pHPT 2	pHPT 3	pHPT 4	pHPT 5	sHPT 1	sHPT 2	sHPT 3	sHPT 4	sHPT 5	sHPT 6	sHPT 7	sHPT 8	sHPT 8	Normal- gewebe			
																gesamt	nodös	diffus
73	64	54	54	71	55	72	78	67	73	63	47	53	67	66	72	71	65	67
66	71	63	57	58	58	71	71	61	70	68	56	66	60	68	67	83	55	56
51	58	57	69	63	63	58	62	63	75	59	58	61	66	71	59	72	73	47
67	63	61	68	60	76	68	68	58	82	71	62	59	69	74	65	56	61	62
77	68	53	64	52	70	70	70	56	68	62	68	56	71	69	66	61	75	55
54	67	54	73	54	54	64	66	64	73	56	57	62	70	57	74	67	67	64
69	59	59	65	65	58	62	63	63	86	67	51	58	59	56	78	76	84	59
63	65	65	69	69	51	72	69	68	80	74	62	51	63	72	66	64	72	35
71	74	62	72	72	59	57	69	73	77	72	67	45	75	74	81	69	69	66
72	63	58	63	63	53	71	77	70	76	64	64	50	65	63	73	77	68	69
Mittelwert 2	66,3	65,2	58,6	67,1	56,3	67,3	69,3	64,3	76	65,6	59,2	56,1	66,5	64,4	70,1	69,6	68,9	58
Standardabweichung 2	7,86	4,73	3,93	4,64	3,69	6,21	4,94	5,02	5,22	5,54	6,40	6,04	4,74	6,26	6,33	7,62	7,53	9,91

## Zusammenfassung der Zählungen 1 & 2

% markierte Zellen	pHPT 1	pHPT 2	pHPT 3	pHPT 4	pHPT 5	sHPT 1	sHPT 2	sHPT 3	sHPT 4	sHPT 5	sHPT 6	sHPT 7	sHPT 8	sHPT 8	Normal- gewebe				
																gesamt	nodös	diffus	gesamt
Mittelwert 3	65,5	63	57,5	64,9	54,6	63,8	66	63,2	74,9	65,1	58,8	55,4	66,5	64,3	63,3	68,6	69,1	67,7	58,8
Standardabweichung 3	6,95	5,55	4,41	4,73	4,61	5,82	6,71	6,43	5,72	5,86	6,35	5,63	6,72	7,49	6,51	5,58	7,14	6,22	9,48

#### 4.2.1 Expression der PTH mRNA im Normalgewebe

Im Normalgewebe waren 58,8% der Zellen für die PTH mRNA positiv markiert (s. Tab. 4.6). Die gruppenförmige Anfärbung der Zellen war hier besonders stark ausgeprägt, wodurch die Anzahl der positiven Zellen von Gesichtsfeld zu Gesichtsfeld stark schwankte (s. Tab. 4.6). Dies lässt sich gleichfalls den Differenztabellen (Tab. 4.3 u. 4.4) entnehmen und führt zu einer hohen Standardabweichung (s. Tab. 4.6).



**Abb. 4.10: ISH PTH mRNA - Normalgewebe - Übersicht (400fache Vergrößerung)** - Dieses Foto zeigt die felderförmige Anfärbung der parathyreoidalen Hauptzellen. Diese Art der Markierung ist im Normalgewebe stark ausgeprägt.

#### 4.2.2 Expression der PTH mRNA in pHPT-Geweben

Die Ergebnisse der ISH der PTH mRNA der pHPT-Gewebe sind heterogen und liegen zwischen 54,6% und 65,5% positiv markierte Zellen. Im Vergleich zum Ergebnis des Normalgewebes - 58,8% positiv markierte Zellen- waren in drei Geweben (pHPT 1, 2 u. 4) mehr Zellen positiv markiert. Das Gewebe pHPT 3 wies ebenso viele und das Gewebe pHPT 5 weniger markierte Zellen als das Normalgewebe auf (s. Tab. 4.6 und Abb. 4.11).

Expression der PTH mRNA in pHPT-Geweben

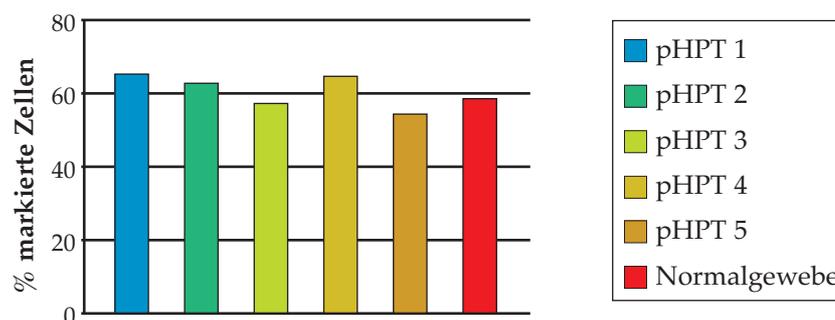


Abb. 4.11: Ergebnisse der ISH PTH mRNA der pHPT-Gewebe im Vergleich zum Normalgewebe. In drei der pHPT-Gewebe (Nr. 1, 2 u. 4) lag die PTH-Expression höher als im Normalgewebe. Gewebe Nr. 3 exprimierte die PTH mRNA ebenso stark wie das Normalgewebe, u. im Gewebe Nr. 5 lag eine reduzierte Expression vor (Standardabweichung s. Tab. 4.6).

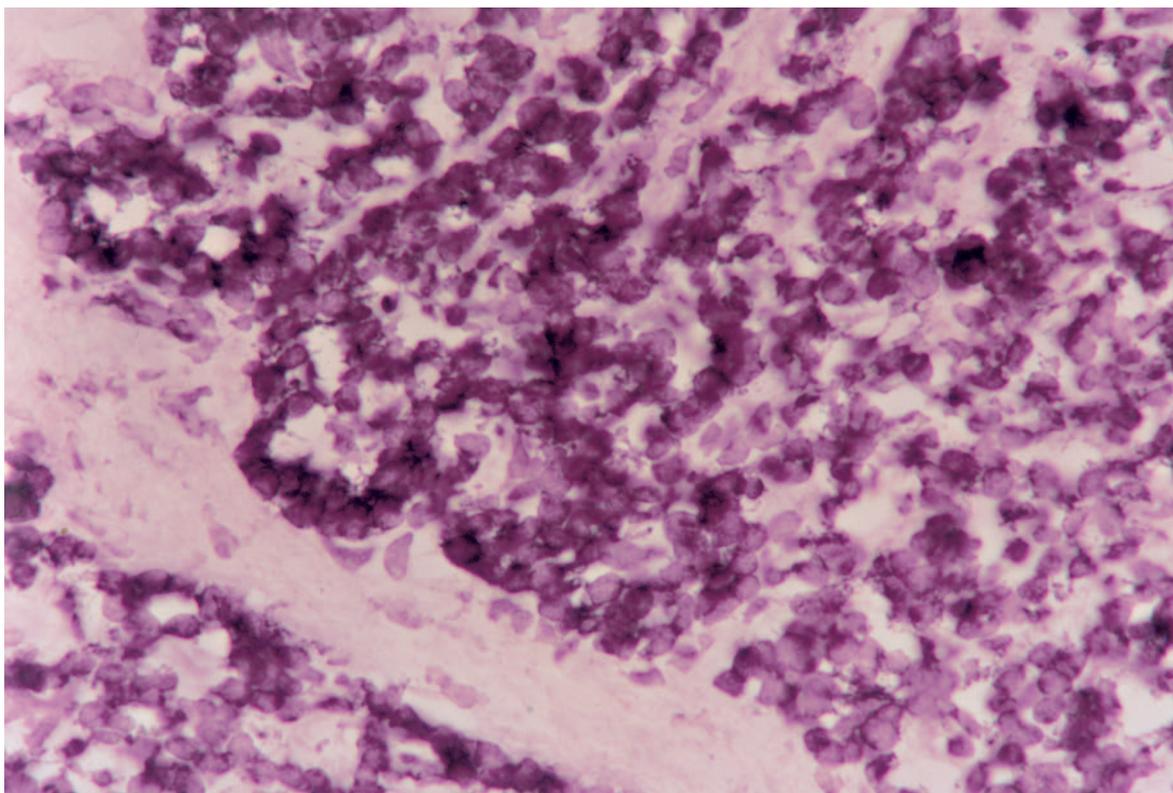
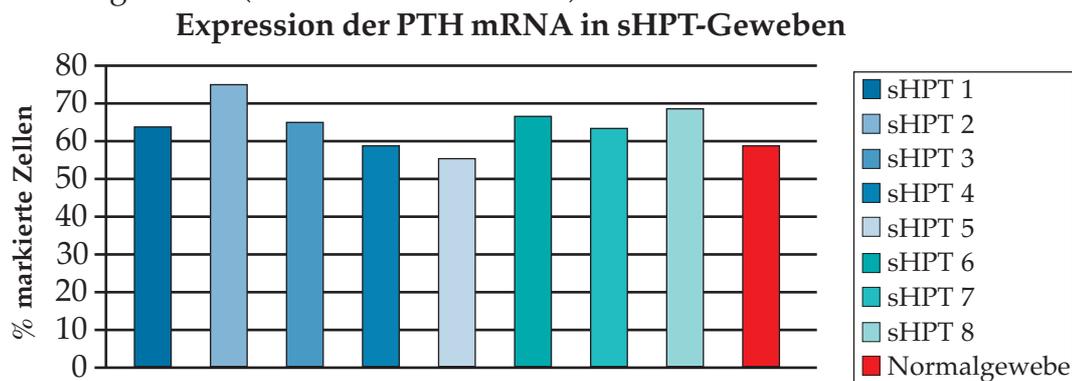


Abb. 4.12: ISH PTH mRNA - pHPT – Übersicht (400fache Vergrößerung). Im Streifen aus Bindegewebe (oben rechts) ist kein ISH-Signal zu erkennen. Die parathyreoidalen Hauptzellen sind deutlich angefärbt.

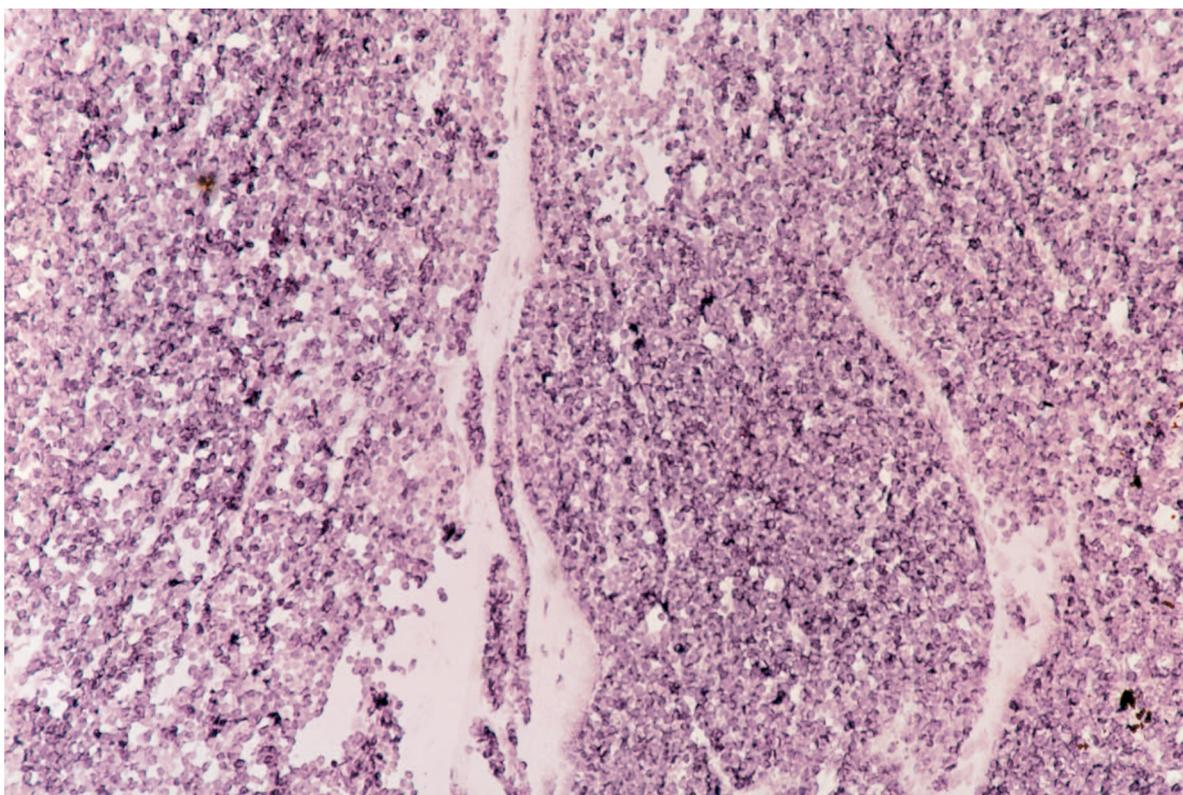
### 4.2.3 Expression der PTH mRNA in sHPT-Geweben

Die Ergebnisse der ISH der PTH mRNA in den sHPT-Gewebe waren heterogen und schwankten zwischen 55,4% und 74,9% positiv markierte Zellen. Verglichen mit dem Normalgewebe, das 58,8% positiv markierte Zellen aufwies, lagen sechs der acht sHPT-Gewebe über dem Normalgewebe. Zwei der sHPT-Gewebe lagen im Bereich des Normalgewebes (s. Tab. 4.6 u. Abb. 4.13).



**Abb. 4.13: Gesamtergebnisse der ISH der PTH mRNA in sHPT-Geweben im Vergleich zum Normalgewebe.** Die Expression der PTH mRNA lag in sechs der sHPT-Gewebe geringfügig über der Expression im Normalgewebe (Standardabweichung s. Tab. 4.6).

Bei der Auszählung der ISH für die mRNA des PTH ergab sich kein Unterschied zwischen Regionen mit nodulärer und diffuser Hyperplasie (s. Tab. 4.6).



**Abb. 4.14: ISH PTH mRNA - sHPT - Übersichtsaufnahme (100fache Vergrößerung)** - Auf der linken Bildseite befindet sich eine Zone mit diffuser Hyperplasie. Auf der rechten Bildseite ist eine noduläre Formation zu erkennen.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Veränderung der CaR-Expression bei sHPT

Der 1993 von Brown et al. erstmals beschriebene CaR, der zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehört, besitzt eine Schlüsselstellung in der Regulation des Calciumhaushaltes.

Seine große extrazelluläre Domäne umfaßt etwa 700 Aminosäuren. In ihr liegen die potentiellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen. Der CaR besteht aus sieben die Membran durchspannenden Segmenten und einer zytosolischen Carboxyl-terminalen Domäne aus ca. 200 Aminosäuren. Er reagiert auf sehr schwache Schwankungen der extrazellulären Calciumkonzentration, die in der Extrazellulärflüssigkeit um 1 mM liegt. Der CaR stimuliert über G-Proteine die Phospholipase C (PLC). Hieraus resultiert ein ansteigender  $\text{IP}_3$ -Spiegel, der  $\text{Ca}^{2+}$  aus unterschiedlichen intrazellulären Speichern mobilisiert. Die zweite durch den CaR aktivierte Signalkaskade hemmt die Bildung von intrazellulärem zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). In den Nebenschilddrüsen vermindert sich bei Aktivierung des CaR die PTH-Sekretion. Die Antwort auf veränderte Calciumspiegel im Blut erfolgt Sekunden später durch ein verändertes Sekretionsmuster [Brown et al., 1991; 1999].

Diese physiologische Antwort auf Calcium wird bei Entwicklung des sHPT gestört. Zuerst ist es die Einschränkung der Nierenfunktion, die die Calcium-Homöostase stört. Später kann sich eine Autonomie der Nebenschilddrüsen, oft kombiniert mit einer Zunahme der Gewebsmasse, entwickeln.

Zumindest bei einem Teil der Patienten läßt sich in Funktionsuntersuchungen eine veränderte Calcium-Sensitivität und/oder ein veränderter *setpoint* feststellen.

Pathophysiologisch kommen neben somatischen Mutationen oder einer reinen Funktionsstörung des Rezeptors, z.B. durch veränderte Glykolisierung und damit eingeschränkter  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung, auch eine gestörte Expression des CaR als Erklärung

in Frage. Ziel dieser Arbeit war es, die Expression des CaR auf mRNA-Ebene zu untersuchen und festzustellen, ob es bei sHPT-Patienten zu einer Verminderung der Expression des CaR kommt. Hierüber lagen zu Beginn dieser Arbeit keine Erkenntnisse vor.

In der Zeit, in der die in dieser Arbeit dargestellten Daten ermittelt wurden, ergaben sich erste Hinweise auf eine verminderte Expression des CaR [Kifor et al., 1996; Gogusev et al., 1997].

## 5.2 Untersuchung der CaR-Expression mittels ISH

Die *in situ* Hybridisierung ist eine sensitive und aussagekräftige Methode zum mRNA-Nachweis. Im Gegensatz zur *reverse transcriptase*-PCR (RT-PCR) bietet sie die Möglichkeit, die Gewebsmorphologie und die mRNA-Expression gleichzeitig zu beurteilen.

Die radioaktive ISH ermöglicht eine direkte Messung der Radioaktivität des Gewebsschnittes, was die Auswertung vereinfacht. Hierbei wird das Signal jedoch nur in bezug zur Gesamtfläche des Gewebsschnittes gesetzt. Deshalb sind die beurteilten Ausschnitte so zu wählen, daß der Anteil unspezifischen Bindegewebes möglichst gering bleibt. Die in dieser Arbeit gewählte Methode der nicht-radioaktiven, digoxigenin-markierten ISH und der Auswertung mit Hilfe des Mikroskops ermöglicht es, die markierte mRNA in den parathyreoidalen Zellen zu beurteilen, ohne daß unspezifische Präzipitate oder Gefäße bzw. Fett- und Bindegewebe das Ergebnis verfälschen. Die Auswertung der radioaktiven wie der nicht-radioaktiven *in situ* Hybridisierung ist semiquantitativ, weil es in beiden Fällen nicht möglich ist, von der Signalstärke auf die tatsächlich vorhandene mRNA-Menge zu schließen. Die Mehrzahl der Studien, die die CaR-Expression untersuchten, lieferten semiquantitative Ergebnisse [Kifor et al., 1996; Farnebo et al., 1997; 1998; Garner et al., 1997; Gogusev et al., 1997; Kaneko et al., 1999; Corbetta et al., 2000]. Als einzige entwickelten Garner et al. (1997) ein quantitatives RT-PCR-Essay zur Messung der CaR mRNA.

Bei einer Methode wie der ISH ist eine 100%tige Markierungsrate nicht zu erwarten, weil es aus technischen Gründen bei einigen Zellen zu einem RNA-Verlust kommt. So gibt es in jedem Gewebsschnitt angeschnittene Zellen, aus denen die RNA leicht ausgewaschen werden kann oder die von Beginn an keine der beiden nachzuweisenden RNA-Arten enthalten. Desweiteren schwankt der Gehalt von mRNA in Abhängigkeit vom Funktionszyklus der Zellen. Bei der ISH ist der freie Anteil der mRNA, an den sich die Oligonukleotidsonde anlagern kann, entscheidend. Wenn also viel mRNA zur Translation an Ribosomen gebunden vorliegt, können viele Bindungsstellen für die Sonde blockiert sein. Im Extremfall kann dann eine Zelle als negativ erscheinen.

Die in dieser Arbeit gewählte Auswertung von zwei unabhängigen Auswertungsreihen, die die Bewertung von 10 x 100 Zellen umfassen, ist sehr umfangreich und ermöglicht eine umfassende Auswertung der Gewebsschnitte unabhängig von ihrer Größe. In der Regel liegt die Größe der sHPT und der pHPT-Gewebe um ein Vielfaches über der des normalen Nebenschilddrüsengewebes.

### 5.3 Veränderung der gewebssinternen Expressionsmuster

Durch die große Anzahl der analysierten Gesichtsfelder ermöglicht diese Arbeit auch einen Einblick in die gewebsspezifische Expression des CaR, die sich als ebenso heterogen erweist wie die ebenfalls in anderen Studien beschriebene Variabilität der Expression in den untersuchten Geweben.

Interessant ist, daß die Schwankung der gewebssinternen CaR-Expression im Normalgewebe recht hoch ist. Hier findet sich ein Minimum von 35% und ein Maximum von 62% positiv markierte Zellen (s. Tab. 4.1). Diese Schwankung ist bei der Analyse der PTH-Expression im Normalgewebe noch höher: Hier liegt das Minimum bei 35% und das Maximum bei 70% markierten Zellen. Im Mikroskop zeigt sich diese Heterogenität in einer felder- bzw. gruppenförmigen Anfärbung der Zellen, die schon in der Übersichtsvergrößerung erkennbar ist. Diese gewebssinternen Schwankungen der CaR- und der PTH-Expression zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen der Expression im Normalgewebe und der im sHPT- bzw. pHPT-Gewebe: Die PTH-Expression im Normalgewebe ist heterogener als in den anderen beiden Gewebgruppen, was sich u. a. an der mit 9,48 höchsten Standardabweichung widerspiegelt (s. Tab.4.6). Wie Tabelle 4.4 zeigt, ist die Schwankung der PTH-Expression mit einem Mittelwert des Medians von 9,5 verglichen zu einem Mittelwert von 16,5 für die Expression des CaR gemittelt über alle Gewebe insgesamt geringer. Bedeutsam ist festzustellen, daß die Mehrzahl der sHPT und pHPT-Gewebe eine höhere PTH-Expression aufweisen als das Normalgewebe. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der für den sHPT und den pHPT bekannten Funktionsstörungen der Nebenschilddrüsen. Es könnte ein Hinweis auf eine abnehmende Zahl von Zellen, die sich in der Ruhephase befinden, sein.

Die Expression des CaR zeigt sowohl in den sHPT- wie in den pHPT-Geweben eine erhebliche gewebssinterne Schwankung (Tab. 4.3 u. 4.4). Fraglich bleibt, ob hieraus ein zumindest in einigen Zellgruppen erhöhter CaR mRNA *turnover* abzuleiten ist.

## 5.4 Expression des CaR im Normalgewebe

Die Expression der CaR mRNA im Normalgewebe ist verglichen mit allen anderen untersuchten Geweben am höchsten.

Die Studien zur CaR-Expression, die auf das schwer erhältliche Normalgewebe zurückgreifen konnten, zeigen, daß die CaR-Expression auch in Normalgeweben sehr variabel ist [Gogusev et al. 1996, Garner et al., 1997; Corbetta et al., 2000].

Farnebo et al. (1997) zeigten in einem direkten Vergleich von pHPT-Geweben und den zugehörigen Normalgewebsbiopsien, daß es durch die Hypercalcämie nicht zur *down* Regulation der CaR mRNA kommt, verglichen mit dem Normalgewebe normocalzämischer Patienten.

Die von Garner et al. (1997) entwickelte quantitative Messung der CaR mRNA mittels eines RT-PCR-Assays bestätigt die Untersuchungsergebnisse der semiquantitativen ISH-Studien. Bei den zwei histologisch normalen Geweben, die mit der quantitativen RT-PCR untersucht wurden, lagen die gemessenen CaR mRNA-Mengen innerhalb der Streuung der Adenome (pHPT-Gewebe). Die Untersuchung boviner Normalgewebe zeigte eine variable CaR-Expression, die im Bereich der humanen Normalgewebe lag.

## 5.5 Expression des CaR in pHPT-Geweben

Die in dieser Arbeit untersuchten pHPT-Gewebe wiesen eine unterschiedlich starke CaR mRNA-Expression auf: zwei der fünf Gewebe exprimierten fast ebenso stark wie das Normalgewebe, während eines eine geringe und zwei andere eine deutlichere Reduktion zeigten. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien überein.

So wiesen die von Farnebo et al. (1997) mittels radioaktiver ISH untersuchten Adenome eine Streuung der CaR mRNA von 98% bis 41%, bezogen auf die zugehörigen Biopsien normaler Nebenschilddrüsen auf. Auch in der Studie von Corbetta et al. (2000) exprimierten einige der untersuchten pHPT-Gewebe, die CaR mRNA genauso stark wie die untersuchten Normalgewebe. Hierbei handelt es sich jeweils um semiquantitative Ergebnisse. Die einzige Studie, die quantitative Ergebnisse erhob [Garner et al., 1997], wies sehr variable Mengen an CaR mRNA in den untersuchten Adenomen nach. Die normalen Gewebe, die mit der gleichen Methode untersucht wurden, lagen bezüglich der gemessenen CaR mRNA-Menge innerhalb der Streuung der untersuchten Adenome. In der Diskussion wird die interessante Frage aufgeworfen, ob die unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Studien, die die *in situ* Hybridisierung einsetzten, durch die Benutzung unterschiedlicher Oligonukleotidsonden begründet werden kann. Die von Gogusev et al. (1997) und in dieser Arbeit benutzten Oligonukleotide binden an den Teil der mRNA, der für die transmembranäre und die zytoplasmatische Domäne codiert, während die von Garner et al. (1997) benutzten Oligonukleotide spezifisch sind für den Bereich der mRNA, der das aminoternale Ende des CaR codiert. Garner et al. (1997) stellten zur Diskussion, ob durch die unterschiedlichen Oligonucleotide mRNAs für verschiedene Moleküle nachgewiesen werden. Hieraus ergibt sich die Frage, ob weitere Calcium messende Rezeptoren existieren.

Die Studien der letzten Jahre lieferten keinen Hinweis für die Existenz anderer als der beiden bekannten Calciumrezeptoren [Brown et al., 1993; Lundgren et al., 1994], die sich im Hinblick auf ihre molekulare Struktur und ihre Expression deutlich unterscheiden:

Die von Farnebo et al. (1998) durchgeführte Studie zur Expression des CAS, des putativen *calcium-sensing* Proteins, eines zur Familie der LDL-Rezeptoren gehörigen einfach transmembranären, großen Glykoproteins, zeigt eine stärker verminderte mRNA für CAS als für den CaR, wobei keine Korrelation zwischen der Expression des CAS und der des CaRs feststellbar war. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß die Expression des CaRs generell weniger anfällig für Veränderungen ist als die des CAS. Es gibt Hinweise, daß die Expression des CAS abhängig ist vom Differenzierungsgrad der Zellen: Untersuchungen der CAS-Expression in verschiedenen Zellkulturen (Maus F9 embryonale Carcinomzellen, Ratten IRPTC-Zellen des proximalen Nierentubulus und die humane Chorioncarcinom JEG-3-Zelllinie), zeigten, daß die Expression des CAS mit der Entdifferenzierung der Zellen zurückgeht [Czekay et al., 1998; Liu et al., 1998]. Für den CaR ist der Verlust des Rezeptors in boviner Nebenschilddrüsenkultur ebenfalls beschrieben [Mithal et al. 1995].

Für beide mRNA-Level, die des CaRs ebenso wie die des CAS, konnte keine Korrelation mit dem Serum-Calcium, dem PTH-Spiegel im Blut oder dem Gewicht des Adenoms festgestellt werden. [Farnebo et al., 1998; Corbetta et al., 2000]

Die Expression des CaR wurde auch auf der Proteinebene untersucht: Mit CaR-spezifischen Antikörpern untersuchten Kaneko et al. (1999) die CaR-Protein-Expression in pHPT-Geweben (Adenomen). Dies wurde mit einer präoperativen Analyse der Ca-PTH-Beziehung (Nebenschilddrüsen-Funktion) gekoppelt. Die Ergebnisse der CaR-Protein-Expression fielen unter den adenomatösen Geweben sehr variabel aus. Eine Korrelation zum *setpoint* ließ sich nicht herstellen. Allerdings zeigte sich: Je höher die basale bzw. minimale PTH-Sekretion ausfiel, desto geringer war der CaR-Protein-Nachweis. Patienten mit einem stark erhöhten Maximum der PTH-Sekretion wiesen eine besonders geringe CaR-Expression auf. Die CaR-Expression war jedoch bei Patienten mit normaler maximaler PTH-Sekretion vermindert. Eindeutige Zusammenhänge zwischen veränderten Funktionsparametern und der CaR-Expression auf Proteinebene konnten nicht hergestellt werden.

Die Studie von Corbetta et al. (2000) liefert keine neuen Erkenntnisse bezüglich der Expression des CaRs auf mRNA- oder Proteinebene. Zellkulturen von Adenomen, die eine unterschiedliche Sensitivität auf die Calciumkonzentration im Umgebungsmedium ( $[Ca^{2+}]_0$ ) zeigten - von durch normale  $[Ca^{2+}]_0$  supprimierbar bis resistent gegenüber Calcium - wiesen identische CaR-Protein-Spiegel auf. Die CaR mRNA war in den kultivierten Nebenschilddrüsenzellen vermindert. Wiederum ließ sich keine Korrelation zwischen in vivo erhobenen Ergebnissen, z.B. präoperativen PTH-Spiegeln, und in vitro Ergebnissen herstellen. So korrelieren die Reduktion der CaR mRNA und des CaR Proteins nicht mit der Sensitivität für  $Ca^{2+}$ .

Diese Studie geht jedoch über die Analyse der Expression hinaus und bezieht die Untersuchung der Signalkette, die vom CaR ausgelöst wird, mit ein. So konnte erstmalig gezeigt werden, daß die Signalkette, die vom CaR in pHPT-Gewebe ausgelöst wird, qualitativ identisch ist mit der in Normalgewebe. Denn in beiden Fällen waren die selben G-Proteine,  $Gq\alpha$  und  $G11\alpha$ , nachweisbar und es kam zu einer Verminderung der cAMP-Spiegel (s. 1.2.3.2). In der Mehrzahl der untersuchten pHPT-Gewebe war die Expression der G-Proteine vermindert. Diese reduzierte Expression der G-Proteine ließ sich allerdings nicht mit einer verminderten  $Ca^{2+}$ -Sensitivität korrelieren. Es handelt sich hier jedoch um einen möglichen zweiten Weg, der zur Beeinträchtigung des  $Ca^{2+}$ -Sensing führt. In jedem Fall ist die reduzierte CaR-Expression nicht allein für die veränderte  $[Ca^{2+}]_0$ -Sensitivität verantwortlich.

## 5.6 Expression des CaR in sHPT-Geweben

Die in dieser Arbeit untersuchten sHPT-Gewebe wiesen eine unterschiedlich starke Reduktion der CaR mRNA auf (36,6% bis 49,1% markierte Zellen; s. Tab. 4.1). In vier dieser Gewebe ließen sich nodöse von diffus hyperplastischen Arealen unterscheiden. Drei dieser vier Fälle wiesen in den nodösen Formationen eine um 10% geringere CaR-Expression auf als in den diffus hyperplastischen Arealen.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von Gogusev et al. (1997), die ebenfalls eine reduzierte Expression in sHPT-Geweben nachwiesen. Auch hier war die Reduktion in nodösen Arealen stärker als in hyperplastischen Arealen. Sie war bei der manuellen lichtmikroskopischen Analyse der Gewebsschnitte festzustellen, nicht jedoch mit der computergestützten Bildanalyse. Hier ging dieser feine Unterschied verloren.

Diese Studie legt wie die von Kifor et al. (1996) einen Schwerpunkt auf die Expression des CaR-Proteins, nachgewiesen mit Hilfe der Immunhistochemie. In beiden Studien fällt die Reduktion des Proteins deutlich aus.

Kifor et al. (1996) beschreibt jedoch auch eine gewebssintere Variabilität der Proteinexpression. So gibt es in den hyperplastischen Nebenschilddrüsen *cluster* mit einem immunhistochemischen Signal, das quantitativ dem der Normalgewebe entspricht. Auch die Studie von Akizawa et al. (1999) bestätigt die *down* Regulation des CaR in Nebenschilddrüsen von Patienten mit sHPT. Bei der Untersuchung der mRNA-Expression des CaR mittels quantitativer RT-PCR und Northern Blotting fanden sich reduzierte mRNA-Spiegel. Diese Reduktion war in Arealen mit nodulärer Hyperplasie stärker ausgeprägt. Es zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen CaR mRNA und dem Gewicht der untersuchten Nebenschilddrüse sowie der Ca<sup>2+</sup>-Sensitivität. Die Analyse der Proteinexpression ergab eine inverse Korrelation der CaR-Expression mit der Expression von Proliferationsmarkern. Der gleichzeitige Nachweis von CaR und VDR zeigte eine übereinstimmendes Expressionsmuster dieser beiden Rezeptoren.

Im Gegensatz zu den bisher aufgeführten Studien konnten Rogers et al. (1995) in urämischen Ratten keine Reduktion der mRNA des CaR nachweisen. Weder ließ sich eine Korrelation zwischen unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegeln und der CaR mRNA-Expression in Nebenschilddrüsen und Niere zeigen, noch hatte die unterschiedlich starke Calcitriol-Substitution in Vitamin D-Mangel-Ratten einen Einfluß auf die CaR mRNA-Spiegel. Demnach scheinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und Calcitriol nicht direkt an der Regulation der CaR-Expression beteiligt zu sein, bzw. ihr Einfluß war mit Hilfe dieses Modells nicht nachweisbar.

Brown et al. (1996) fanden ebenfalls keine Korrelation zwischen CaR mRNA-Expression, Serum  $\text{Ca}^{2+}$ - und PTH-Spiegel. Hyperparathyreoidismus und chronische Hypocalcämie hatten keinen Einfluß auf die Expression des CaR. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die CaR-Expression umso niedriger war, je größer das Calcitriol-Defizit wurde. Eine Substitution von Calcitriol bewirkte eine vermehrte CaR-Expression. Dieser Unterschied zu Rogers et al. (1995) kann durch die unterschiedliche Verabreichung des Calcitriol oder durch methodische Unterschiede in der RNA-Bestimmung bzw. Normalisierung der CaR mRNA erklärt werden.

Eine unveränderte Expression der CaR mRNA bei Ratten mit Niereninsuffizienz oder unter Calcium-armer Diät fand sich ebenfalls in der Studie von Rogers & Fox (1995). Auch eine phosphatreiche Ernährung beeinflusste die Expression des CaR-Gens in Nebenschilddrüsen weder in normalen Ratten noch in Ratten mit Niereninsuffizienz. Bekanntermaßen induziert eine phosphatreiche Diät sowohl bei nierengesunden wie bei niereninsuffizienten Ratten einen Hyperparathyreoidismus. Die Expression der CaR mRNA bleibt jedoch unverändert [Hernandez et al., 1996]. Damit ergibt sich für die Thematik der CaR-Expression wie auch für andere Themen, beispielsweise der Veränderung des *setpoint* in sHPT-Patienten, die Situation, daß verschiedene Arbeitsgruppen zu unterschiedlichen, teilweise widersprüchlichen Ergebnissen kommen. Da es sich beim sHPT um ein komplexes Krankheitsbild handelt, das in jedem Patienten eine Eigendynamik besitzt, wird es womöglich keine generellen Antworten geben. Insgesamt ist von einer multifaktoriellen Pathogenese auszugehen, bei der verschiedene Veränderungen, somatische Mutationen oder eine veränderte CaR-Expression bzw. Störungen seiner Funktion, letztlich zu den gleichen pathologischen Veränderungen führen.

Gestützt wird diese These auch durch die Ergebnisse der Studie von Autry et al. (1997). Sie zeigte, daß der mRNA-Gehalt für den CaR bei Ratten im Alter zwischen 6 Wochen (jung) und 24 Monaten (alt) im Nebenschilddrüsengewebe zunimmt. Gleichermäßen nimmt die Menge des CaR-Proteins zu. Parallel zur Zunahme der Expression des CaR steigt auch die PTH-Sekretion. Die altersbedingte vermehrte PTH-Sekretion konnte nicht durch eine Veränderung der CaR-Expression erklärt werden. Hier müssen andere Veränderungen vorliegen. Denkbar wäre eine gestörte  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung an den Rezeptor oder eine gestörte Signaltransduktion entweder an der Zellmembran oder vom CaR zu nachgeschalteten Effektoren, also dem cAMP-System oder dem Phospholipase C-pathway.

Um festzustellen, ob auf diesen Ebenen Veränderungen vorliegen, wären u. a. Funktionsanalysen des CaR *in vitro* geeignet. Die Kultivierung von Nebenschilddrüsenzellen ist jedoch sehr schwierig, und es gelang lange nicht, die Funktionalität der Zellen in Kultur zu erhalten: Der Verlust der Calcium-Sensitivität in primären Zellkulturen boviner Nebenschilddrüsenzellen ist gekoppelt an den Verlust der CaR-Expression. Nach 24 Stunden war eine Calcium-vermittelte Suppression der PTH-Sekretion noch nachweisbar, zeitgleich fiel die CaR mRNA um 75% ab. Schon in den ersten 4 Stunden der Kultivierung fielen die CaR mRNA-Spiegel stark ab. Nach sechs Tagen in Kultur ließ sich die PTH-Sekretion nicht mehr durch Calcium supprimieren. Die Verminderung der CaR mRNA-Expression ließ sich weder vom Kulturmedium, noch vom Calcium oder Calcitriol-Gehalt beeinflussen. [Brown AJ et al. 1995b].

Das gleiche Problem beschrieben auch Mithal et al. (1995) mit ihrer kultivierten bovinen Nebenschilddrüsenzellen. Sie konnten zeigen, daß eine 50%ige Reduktion der Anzahl der Rezeptoren ausreichend ist, um die Sensitivität für die Veränderung der extrazelluläre Calciumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ) signifikant zu vermindern. Dies ergibt eine inverse Korrelation der PTH-Suppression durch  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  zur Anzahl der CaR.

Roussanne et al. (1998) gelang die Entwicklung einer *long term*-Zellkultur humaner Nebenschilddrüsenzellen, die bis zu 5 Monate lang eine funktionelle Aktivität aufweisen. Diese Zellkulturen sind durch Zell-cluster gekennzeichnet und bestehen aus unterschiedlichen Zelltypen, die sowohl epithelialen wie endothelialen Ursprungs

sind. Die in den *clustern* erhaltene Interaktion der Zellen scheint für die Erhaltung der Funktionalität ebenso entscheidend zu sein wie die gemischte Zusammensetzung der *cluster*. Über einen Zeitraum von bis zu 5 Monaten bleibt die Sensitivität gegenüber Schwankung des extrazellulären  $[Ca^{2+}]$ , meßbar an der veränderten PTH-Sekretion, erhalten. Der CaR ist über diesen Zeitraum sowohl auf Proteinebene nachweisbar, als auch auf mRNA-Ebene. Durch einen inhibitorischen Antikörper ließ sich die PTH-Sekretion blockieren. Hiermit steht erstmals ein *in vitro* Modell zur Verfügung, an dem es möglich ist, über einen längeren Zeitraum an humanen Nebenschilddrüsenzellen in Kultur zu forschen.

Vielleicht gelingt es hiermit, durch weitere Funktionsanalysen des CaR seine exakte Funktionsweise, die nachgeschaltete Signalkette bis zur PTH-Sekretion und eventuelle Fehlfunktionen auf einer oder mehreren Ebenen nachzuweisen.

Neuere Studien zeigten, daß der CaR über Disulfidbrücken verbundene Dimere bildet [Ward, Brown & Harris, 1998; Bai, Tivedi & Brown, 1998b].

Die intermolekulare Interaktion zwischen den im Dimer verbundenen CaR-Monomeren ist wichtig für die normale Rezeptorfunktion. In ihrer Studie wiesen Bai et al. (1999) nach, daß die Kotransfektion spezifischer Paare mutierter CaRs zur Rekonstituierung der Calcium-Sensitivität führt. Die durch die Mutation hervorgerufene Fehlfunktion des jeweiligen CaRs wurde in dieser neuen Kombination offensichtlich aufgehoben, da die Zellen auf extrazelluläres Calcium reagierten. Gleichzeitig zeigte die Studie die Bildung von Heterodimeren an der Zelloberfläche, die wahrscheinlich die molekulare Basis für die wiedererlangte Calcium-abhängige Funktionsfähigkeit der Zellen sind.

Diese Ergebnisse bieten einen weiteren Ansatzpunkt für eine möglicherweise in sHPT-Geweben gestörte  $Ca^{2+}$ -Sensitivität. Eine gestörte Interaktion der CaR-Monomere könnte zu einer veränderten  $Ca^{2+}$ -Sensitivität führen, obwohl sich das Protein nachweisen läßt.

Einen therapeutischen Ansatz, der sich aus der Entdeckung des CaR für Patienten mit sHPT und pHPT ergibt, bietet die Entwicklung von Calcimimetika.

Hierbei handelt es sich um Substanzen, die den CaR selektiv aktivieren, also den Effekt von Calcium nachahmen [Nemeth et al., 1998; Nemeth & Bennet 1999; Coburn et al., 1999]. Sie „verstärken“ die Sensitivität des CaR für Calcium und vermindern die PTH-Sekretion [Hammerland et al., 1998]. Zwei „calcimimetische“ Substanzen, NPS R-467 or NPS R-568, entwickelt von Wissenschaftlern bei NPS Pharmazeutika, sind bekannt [Nemeth et al., 1998; Nemeth & Bennet 1999].

NPS R-568 wurde bislang am intensivsten getestet. Im Tierversuch hemmte NPS R-568 die Proliferation der Nebenschilddrüsen in niereninsuffizienten Ratten [Wada, Furuya & Sakiyama 1997], senkte dosisabhängig die PTH- und Calcium-Spiegel im Blut und verbesserte die Osteitis fibrosa in urämischen Ratten [Wada M et al., 1998].

Die Effektivität einer oder auch zweier an einem Tag verabreichten Dosen von NPS R-568 zur Reduktion der PTH-Spiegel bei Patienten mit sHPT bzw. pHPT konnten sowohl Antonsen, Sherrard & Andress (1998) als auch Silverberg et al. (1997) nachweisen. Die Calcium-Spiegel im Blut verminderten sich erst bei höheren Dosen und traten erst nach einem PTH-Abfall auf.

All diese Kurzzeituntersuchungen weisen darauf hin, daß das Calcimimetikum NPS R-568 effektiv die PTH-Spiegel in Patienten mit mildem pHPT und unterschiedlich stark ausgeprägten sHPT senkt. Dieser Effekt war unabhängig von den vor Beginn der Behandlung gemessenen PTH-Spiegeln [Antonsen, Sherrard & Andress 1998; Silverberg et al. 1997]. Die deutliche und konsistent auftretende Reduktion des PTH nach calcimimetischer Behandlung bei Patienten mit breit gestreuten PTH-Spiegeln deutet darauf hin, daß die in einigen Nebenschilddrüsen beobachtete verminderte CaR-Expression möglicherweise weniger bedeutsam ist, als zuerst angenommen.

Eine Einzelfallstudie zur Langzeitbehandlung eines Patienten mit einem inoperablen Nebenschilddrüsenkarzinom mit NPS R-568 über mehr als 20 Monate bewirkte eine Verbesserung der Symptome ohne den Nachweis von schweren Nebenwirkungen. Herz, Niere, Leber und Pankreas zeigten keine Funktionseinschränkungen und das Blutbild sowie alle anderen gemessenen Parameter blieben während der Behandlung stabil [Collins et al., 1998]. Obwohl es sich hier um eine Einzelfallstudie handelt, zeigt sie, daß NPS R-568 offensichtlich problemlos über einen längeren Zeitraum verabreicht werden kann. Nun müssen kontrollierte Langzeitstudien zeigen, ob NPS R-568 wirklich eine risiko- und nebenwirkungsarme Behandlung ermöglicht.

## 5.7 Ausblick

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß der in dieser Arbeit erbrachte Nachweis einer erniedrigten Expression des CaR in einer Subpopulation von sHPT-Geweben, speziell in solchen mit nodulären Anteilen, mit den Ergebnissen anderer Autoren übereinstimmt. Mit verschiedenen Methoden, wie RT-PCR, *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie, bzw. Western blot wurden unterschiedlich stark ausgeprägte, aber nachweisbare Reduktionen der CaR-Expression auf mRNA- wie auf Proteinebene gefunden [Kifor et al., 1996; Farnebo et al., 1997; 1998; Garner et al., 1997; Gogusev et al., 1997; Kaneko et al., 1999; Corbetta et al., 2000]. Dies gilt gleichermaßen für pHPT wie für sHPT-Gewebe.

Bei der veränderten CaR-Expression in beiden Krankheitsbildern handelt es sich wohl um sekundäre Phänomene, da die Mutationsanalysen des CaR keine Mutationen bei Patienten mit primärem oder sekundärem Hyperparathyreoidismus nachweisen konnten [Degenhardt et al., 1998; Hosokawa et al., 1995].

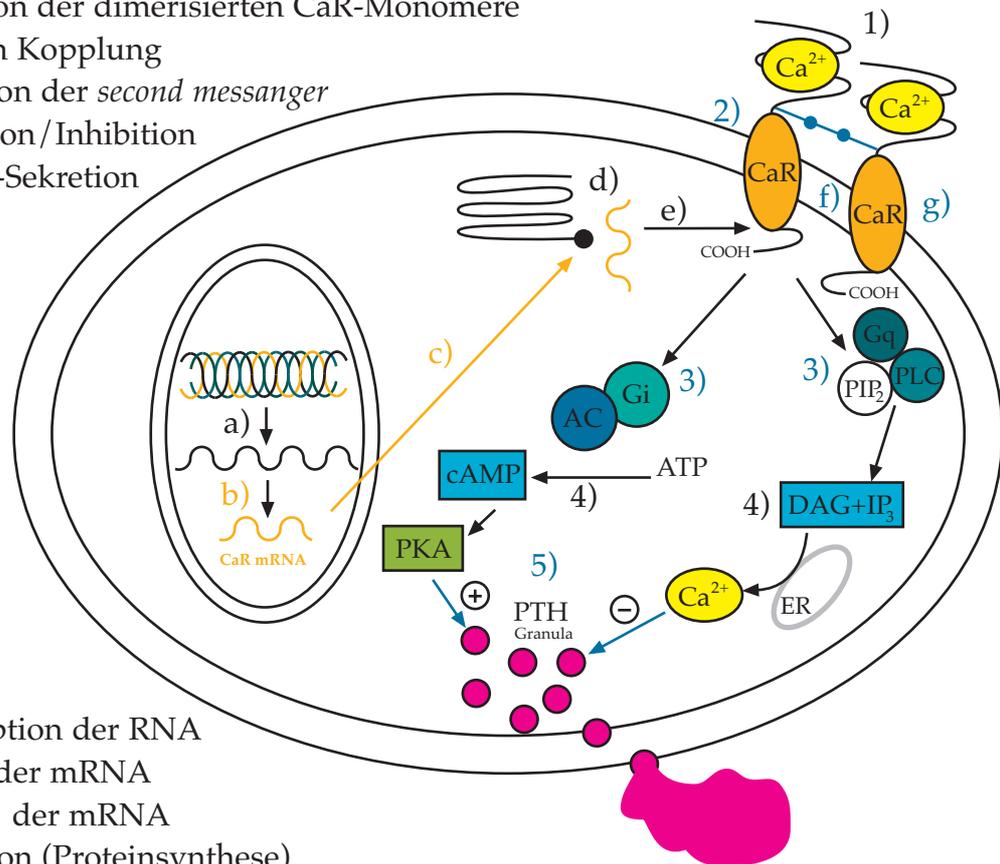
Außerdem ergaben sich in letzter Zeit Hinweise auf eine gestörte Signalkette [Corbetta et al., 2000]. In pHPT-Geweben wurden erniedrigte Spiegel der G-Proteine, G11a und Gqa, die das Signal vom CaR weiterleiten, nachgewiesen.

In den letzten zwei Jahren konnte gezeigt werden, daß der CaR über Disulfidbrücken verbundene Dimere bildet, deren intermolekulare Interaktion wichtig für seine normale Funktion ist [Ward, Brown & Harris 1998; Bai, Tivedi & Brown 1998b; Bai et al., 1999]. Eine gestörte Interaktion der Dimere könnte ebenfalls zu einer Funktionsstörung des CaR und damit zu einer verminderten Calcium-Sensitivität führen.

Denkbar wäre es, daß urämische Gifte bei einem Teil der sHPT-Patienten durch eine Störung der Dimer-Bildung oder -Interaktion eine Funktionsstörung des CaR hervorrufen. Für den VDR wurde gezeigt, daß Substanzen im urämischem Serum seine Bindung an die Zielgene vermindern [Patel et al., 1995; Toell et al., 1999].

In jedem Fall ist hier von einem multifaktoriellen Geschehen auszugehen. Abbildung 5.1 stellt zusammenfassend die verschiedenen Ebenen, auf denen es zu pathologischen Veränderungen kommen kann, dar.

- 1) Calcium Sensing
- 2) Interaktion der dimerisierten CaR-Monomere
- 3) G-Protein Kopplung
- 4) Produktion der *second messenger*
- 5) Stimulation/Inhibition der PTH-Sekretion



- a) Transkription der RNA
- b) Reifung der mRNA
- c) Stabilität der mRNA
- d) Translation (Proteinsynthese)
- e) Modifikation und Einbau des Proteins in die Membran
- f) Dimerisation der CaR (Bildung von Disulfidbrücken)
- g) *Turnover* des Rezeptors

**Abb. 5.1 Pathophysiologie des CaR:** Die Expression des CaR in Nebenschilddrüsenhauptzellen kann an vielen Punkten reguliert werden. Die *steady state* Konzentration der CaR mRNA kann beeinflusst werden durch die Transkription der DNA (a), das *Processing* zur reifen mRNA (b) oder durch die Stabilität der mRNA im Zytoplasma (c). Von der mRNA ausgehend muß das Protein synthetisiert werden (d). Dieses wird durch Glykolisierung modifiziert und in die Membran eingebaut (e), wo durch Disulfidbrückenbildung CaR-Dimere ausgebildet werden (f). Die Verweildauer an der Zelloberfläche wird durch den *Turnover* der Rezeptoren bestimmt (g) und hat ebenfalls Einfluß auf den Expressionsstatus. Die Anwesenheit des CaR an der Zelloberfläche ist notwendig, um Veränderungen der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu messen (1). Über eine Interaktion zwischen den CaR, als Dimer, der vermuteten funktionellen Einheit (2), und die an den Rezeptor gekoppelten G-Proteine (3) wird das Signal an die intrazellulären Signalkaskaden weitergegeben. Ein inhibitorisches G-Protein (Gi) hemmt die Aktivität der Adenylatcyclase (AC) und vermindert so die Konzentration des intrazellulären cAMP (4). Die Phospholipase C (PLC) wird aktiviert, so daß es zur vermehrten Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-Triphosphat ( $\text{IP}_3$ ) (4) kommt. Diese beiden *second messenger*-Systeme führen bei ansteigenden  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  zur Inhibition, sonst zur Stimulation der PTH-Sekretion (5). Die hellrot gekennzeichneten Bereiche b u. c wurden in dieser Arbeit untersucht, zu den blau gekennzeichneten Bereichen liegen nur wenige bis keine Daten vor. Sie müßten in weiteren Studien genauer untersucht werden.

Obwohl alle Studien der letzten Zeit feststellten, daß die Expression in sHPT-Geweben vermindert ist und die Reduktion in Zonen nodulären Wachstums größer ist als in Arealen mit diffuser Hyperplasie, genügt die alleinige Analyse seiner Expression nicht, um die Physiologie des CaR und vor allem seine pathophysiologische Rolle bei der Entwicklung des sHPT zu verstehen. Die durchgeführten Analysen der CaR Expression auf mRNA-Ebene, wie in dieser Arbeit, waren wichtig und notwendig, um die Veränderungen festzustellen und deren pathophysiologische Bedeutung einschätzen zu können. Heute ist klar, daß der schwere autonome sHPT pathophysiologisch nicht allein durch die verminderte CaR-Expression zu erklären ist. Dies ist ein Baustein in einem Krankheitsgeschehen, daß aller Wahrscheinlichkeit nach multifaktoriell bedingt ist.

Auf der Proteinebene ist nun zu klären, ob die Dimerisation des CaR von der Urämie beeinflusst wird. Möglicherweise ist auch hier ein Unterschied zwischen diffus hyperplastischen und nodulären Arealen festzustellen. Wie Bai et al. (1999) zeigen konnten, sind die Dimere für die Funktion des Rezeptors entscheidend. Eine gestörte Dimerisation könnte das morphologische Korrelat für die bei einem Teil der sHPT-Patienten feststellbare verminderte Calcium-Sensitivität darstellen.

Desweiteren ist es auch von Interesse zu überprüfen, ob die von Corbetta et al. (2000) in pHPT-Geweben gefundene Verminderung der G-Proteine auch in sHPT-Geweben vorliegt. Eine starke Verminderung der G-Proteine könnte unter Umständen zum Abbruch der Signalkaskade führen.

Auch die genauen molekularen Abläufe, die zur PTH-Sekretion führen, sind noch nicht bekannt, ebenso ob die autonome PTH-Sekretion bei schwerem sHPT durch Veränderungen dieser Prozesse mit bedingt sein kann.

Unabhängig von der Klärung all dieser offenen Fragen bietet sich in den Calciummimetika, die noch im Stadium der Entwicklung sind, eine mögliche neue Behandlungsstrategie für den sHPT und ebenso für den pHPT.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Der Calcium Rezeptor (CaR) spielt eine wichtige pathophysiologische Rolle bei der Entwicklung des sekundären Hyperparathyreoidismus (sHPT). Dieser G-Protein gekoppelte transmembranäre Rezeptor besitzt extrazelluläre Domänen, an die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden können. Er vermittelt über zwei unterschiedliche Signalkaskaden bereits geringe Schwankungen der extrazellulären Calciumkonzentration an die parathyreoidalen Hauptzellen und löst so ein verändertes PTH-Sekretionsmuster aus [Brown et al., 1991, 1999].

Dieser physiologische Regelkreis wird durch eine Niereninsuffizienz nachhaltig gestört: Zum Ausgleich, der bei chronischer Niereninsuffizienz durch die abnehmende renale Bildung von Calcitriol hervorgerufenen Hypocalcämie, entwickelt sich eine Überfunktion der Nebenschilddrüsen. Bei langer Krankheitsdauer ist der sHPT auch durch eine Normalisierung des Calciumhaushalts, z. B. nach Nierentransplantation, nicht mehr reversibel. Die genauen molekularen Mechanismen, die zum sHPT führen, sind bis jetzt nicht im Detail bekannt. Seit der Erstbeschreibung des CaR durch Brown et al. [1993] gilt dieser Rezeptor jedoch als Schlüssel zum weiteren Verständnis des sHPT.

Die vorliegende Arbeit untersuchte die CaR-Expression auf mRNA-Ebene in normalen Nebenschilddrüsenengewebe, in Gewebe mit primären (pHPT - als Kontrollgruppen) und sekundärem Hyperparathyreoidismus (sHPT). Unsere Arbeitshypothese war, daß die andauernde Stimulation bei bestehendem sHPT zu einer *down* Regulation der mRNA Expression des Rezeptors führen könnte. Für die Proteinebene war eine Verminderung des CaR in sHPT-Gewebe gezeigt worden. Zu Beginn dieser Arbeit lagen über das Expressionsverhalten der CaR mRNA kaum Daten vor [Gogusev et. al., 1997]. Bei sHPT kommt es nicht nur zu einer erhöhten PTH-Sekretion, sondern auch zu einer Zunahme des Nebenschilddrüsenengewebes, einer Hyperplasie, bei langer Krankheitsdauer sogar zu monoklonalem nodösem Wachstum mit der Entwicklung von Adenomen. Diese gelten als das morphologische Äquivalent für den autonomen, nicht mehr zu regulierenden sHPT [Drüeke, 1995]. Ein weitere Hypothese dieser Arbeit war, daß in diesen nodösen Arealen die Expression der CaR mRNA stärker *down* reguliert sein könnte, als in hyperplastischem Nebenschilddrüsenengewebe. Um diese Hypothese zu überprüfen, mußte die Gewebemorphologie und die CaR mRNA Expression gleichzeitig beurteilt werden können. Daher wurde

die *in situ* Hybridisierung (ISH) als Nachweismethode gewählt: Markierte Oligonukleotidsonden binden an die nachzuweisende mRNA direkt im Gewebe. Dieses Hybrid wird durch eine Farbreaktion in den Zellen nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ. In zwei voneinander unabhängigen Zählungen wurden pro Gewebe 10 Gesichtsfelder mit jeweils 100 Zellen ausgezählt.

Folgende Ergebnisse zur Expression der CaR mRNA wurden in dieser Arbeit erhoben:

- Die Ergebnisse der ISH der CaR mRNA in den pHPT-Geweben wiesen eine Streuung von 48,7% bis 40,2% positiv markierte Zellen auf. Damit lagen zwei der pHPT-Gewebe mit ihrer CaR mRNA Expression im Bereich des Normalgewebes, die drei anderen zeigten eine bis zu 10% verminderte Expression auf. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den aktuellen Studien der letzten Zeit, beispielsweise mit den Ergebnissen von Corbetta et al. (2000) oder Farnebo et al. (1997) so zeigt sich auch in diesen Arbeiten bei oft höherer Fallzahl, daß die Expression von Gewebe zu Gewebe stark schwankt. Eine generelle Tendenz zur verminderten Expression der CaR mRNA ließ sich nicht nachweisen, weil eine ähnliche Schwankungsbreite in den untersuchten Normalgeweben ebenfalls nachweisbar war.
- Die Ergebnisse der ISH für die CaR mRNA der sHPT-Gewebe schwanken von 36,6% bis 49,1% positiv markierte Zellen. Damit liegt die CaR mRNA-Expression in den meisten sHPT-Geweben unterhalb der Expression der CaR mRNA im Normalgewebe. Drei der sHPT-Gewebe exprimieren die CaR-mRNA ebenso stark wie das Normalgewebe. Die Genexpression des CaR ist demnach nicht grundlegend durch die Entstehung des sHPT verändert.
- Im Vergleich der gewebsinternen Expressionsmuster ist die felderförmige Anfärbung der Hauptzellen im Normalgewebe stärker ausgeprägt als bei pHPT- und sHPT-Geweben. Diese beiden Gruppen zeigen eine homogenere Expression der CaR-mRNA. Dies könnte auf eine abnehmende Zahl von Zellen, die sich in der Ruhephase befinden, hindeuten.

- Vier der sHPT-Gewebe wiesen nodöse und diffus hyperplastische Areale auf. Die Expression der CaR mRNA war in drei dieser vier Fälle in den nodösen Areale um 10% vermindert. Dieser Trend zu einer verminderten Expression der CaR mRNA in nodulären Arealen stützt die Hypothese einer Reduktion der Ca<sup>2+</sup> gesteuerten Kontrolle der PTH-Synthese und -Sekretion sowie der Entwicklung eines nicht supprimierbaren renalen Hyperparathyroidismus als Ausdruck einer besonders schweren Störung in den monoklonal wachsenden Zellen der nodulären Areale.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich ausschließlich mit der Erforschung der mRNA-Expression des CaR bei sHPT und steht in Übereinstimmung mit der Untersuchung von Akizawa et al. [1999] zur CaR-Expression bei sHPT, die ebenfalls eine Verminderung der CaR mRNA in nodulären Arealen beschreibt. Die verminderte CaR mRNA-Expression in nodulären Arealen, die als morphologisches Korrelat für den nicht supprimierbaren sHPT gelten, ist ein Hinweis für eine Beteiligung der mRNA-Ebene in diesem fortgeschrittenen Krankheitsstadium.

Für den pHPT ist die Expression des CaR auf mRNA-Ebene gut untersucht, wobei die Ergebnisse hier ernüchtern [Farnebo et al., 1997; Garner et al., 1997; Corbetta et al., 2000]. Denn auch hier ist - trotz monoklonalem Zellwachstums - die mRNA-Expression nicht generell an der Pathogenese des pHPT beteiligt.

Vielleicht bieten funktionelle Ansätze, z. B. Untersuchungen der Interaktion der CaR-Dimere oder nähere Untersuchungen der Signalkaskade, weitergehende Einblicke in die Pathogenese des sHPT.

Das komplexe und wahrscheinlich multifaktorielle Krankheitsbild des sHPT, von dem in dieser Arbeit nur ein wichtiger Baustein untersucht werden konnte, sollte durch weitere Studien auf molekularer und klinischer Ebene erforscht werden.

---

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
ADPKD	Autosomal dominante polyzystische Nierendegeneration
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine</i> (Rinder-)Serumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	ionisiertes Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAPD	kontinuierliche ambulante Peritonealdialyse
CaR	Calcium Rezeptor
cDNA	<i>complementary</i> DNA; zur mRNA komplementäre DNA
d	Tag(e)
d(A,C,G,T)TP	Desoxy (adenosin, cytidin, guanosin, thymidin) triphosphat
DAG	Diacylglycerol
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FHH	familiäre hypocalciurische Hypercalcämie
g	Gramm
g (x g)	Erdbeschleunigung (9,81 m x s <sup>-2</sup> )
Gi	inhibitorisches G-Protein
Gq	G-Protein
h	Stunde(n)
HD	Hämodialyse
H <sub>2</sub> O	Aqua bidest.
HPT	Hyperparathyreoidismus
IgA-GN	IgA Glomerulonephritis
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat

ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LDL	<i>low density</i> Lipoprotein
M	molar (Mol/l)
MEN 1, MEN 2	multiple endokrine Neoplasie Typ 1 bzw. 2
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger</i> RNA
NBT	Nirtoblautetrazoliumchlorid
NSHPT	neonataler schwergradiger Hyperparathyreoidismus
NTX	Nierentransplantation
P	Phosphat
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
pHPT	primärer Hyperparathyreoidismus
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKA, PKC	Proteinkinase A, Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PTH	Parathormon
PTX	Parathyreoidektomie
RNA	Ribonukleinsäure
RPGN	<i>rapid progressive</i> Glomerulonephritis
RT-PCR	<i>reverse transcriptase</i> -PCR
s	Sekunde(n)
SDS	<i>sodium</i> (Natrium) <i>dodecyl sulfate</i>
sHPT	sekundärer Hyperparathyreoidismus
SLE	systemischer Lupus Erythematoses
SSC	<i>salt sodiumcitrate</i>
Tab.	Tabelle
TAE; TE	Tris-Acetat-EDTA; Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan

tRNA	<i>transfer</i> RNA
U	<i>unit(s)</i> (internationale Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v; w/v	<i>volume/volume; weight/volume</i>
VDR	Vitamin D <sub>3</sub> (Calcitriol) Rezeptor
Vol	Volumenteile

**LITERATURVERZEICHNIS**

**Aida K, Koishi S, Tawata M, Onaya T (1995)** Molecular cloning of a putative Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor cDNA from human kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214:524-29

**Akizawa T, Ogata H, Koiwa F, Kingugasa E, Idenura T (1999)** The role of calcium-sensing receptor abnormality in the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant* 14 [Suppl 1]: 66-67

**Ali AA, Varghese Z, Moorhead JF, Baillod RA, Sweny P (1993)** Calcium setpoint progressively worsens in hemodialysis patient despite conventional oral 1-ahydroxycholecalciferol supplementation. *Clin Nephrol* 39:205-209

**Alamaden Y, Hernandez A, Ballesteros E, Garcia-Navarro S, Torres A, Rodriguez M (1996)** Direct effect of phosphorus on PTH secretion from whole rat parathyroid glands *in vitro*. *J Bone Miner Res* 11:970-976

**Antonsen JE, Sherrard DJ, Andress DL (1998)** A calcimimetic agent acutely suppresses parathyroid hormone levels in patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 53:510-511

**Arnold A, Brown MF, Urena P, Gaz RD, Sarfati E, Drüke TB (1995)** Monoclonality of parathyroid tumors in chronic renal failure and in primary parathyroid hyperplasia. *J Clin Invest* 95:2047-2053

**Autry CP, Kifor O, Brown EM, Fuller FH, Rogers KV, Halloran BP (1997)** Ca<sup>2+</sup> receptor mRNA and protein increase in the rat parathyroid gland with advancing age *J Endocrin* 153:437-444

**Bai M, Tivedi S, Lane CR, Yang YH, Quinn SJ, Brown EM (1998a)**, Protein kinase C phosphorylation of threonine at position 888 in Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor (CaR) inhibits coupling to Ca<sup>2+</sup> store release. *J Biol Chem* 273:21267-21275

**Bai M, Tivedi S & Brown EM (1998b)** Dimerization of the Extracellular Calcium-sensing receptor (CaR) on the cell Surface of CaR-transfected HEK293 Cells. *J Biol Chem* 273:23605-23610

**Bai M, Tivedi S, Kifor O, Quinn SJ, Brown EM (1999)** Intermolekular interactions between dimeric calcium-sensing receptor monomers are important for its normal function. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2834-2839

**Baxter LA, DeLuca HF (1976)** Stimulation of 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -hydroxylase by phosphate depletion. *J Bio Chem* 251:3158-3161

**Bikle DD, Ratnam A, Mauro T, Harris J, Pillai S. (1996)** Changes in calcium responsiveness and handling during keratinocyte differentiation - potential role of the calcium receptor. *J Clin Invest* 97:1085-1093

**Bockaert J. (1991)** G protein-coupled receptors: structure, function, and interactions *Curr. Opin. Neurobiol.* 1:32-42

**Brookman JJ, Farrow SM, Nicholson L et al. (1986)** Regulation by calcium of parathyroid hormone mRNA in cultured parathyroid tissue. *J Bone Miner Res* 1:529-537

**Bradbury RA, Sunn KL, Crossley M, Bai M, Brown EM, Delbridge L, Congrave AD. (1998)** Expression of the parathyroid Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor in cytotrophoblasts from human term placenta. *J Endocrinol* 156:425-430

**Brown AJ, Zhong M, Finch J, Ritter C, Satopolsky EF (1995a)** The roles of calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in the regulation of vitamin D receptor expression by rat parathyroid glands. *Endocrinology* 136:1419-1425

**Brown AJ, Zhong M, Ritter C, Brown EM, Satopolsky EF (1995b)** Loss of Calcium responsiveness in cultured bovine parathyroid cells is associated with decreased calcium receptor expression. *Biochem Biophys Res Comm* 3:861-867

**Brown AJ, Zhong M, Finch J, Ritter C, McCracken R, Morrissey J, Slatopolsky EF (1996)** Rat calcium-sensing receptor is regulated by vitamin D but not by calcium. *Am J Physiol, Renal Fluid Electrolyte Physiol* 270:F454-F460

**Brown, EM, Wilson RE, Eastmen RC, Pallotta J, Marynick S (1982)** Abnormal regulation of parathyroid hormone release by calcium in secondary hyperparathyroidism due to chronic renal failure. *J Clin Endocrinol Metab* 54:172-179

**Brown, EM (1983)** Four parameter model of the sigmoidal relationship between parathyroid hormone release and extracellular calcium concentration in normal and abnormal parathyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 56:577-581

**Brown, EM, Redgrave J, Thatcher JT (1984)** Effect of the phorbo ester TPA on PTH secretion. Evidence for a role for protein kinase C in the control of PTH release. *FFBS Lett* 175:72-75

**Brown, EM (1991)** Extracellular  $Ca^{2+}$ -sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of  $Ca^{2+}$  and other ions as extracellular first messengers. *Physiol Rev* 71:371-411

**Brown, EM., Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Herbert SC (1993)** Cloning and characterization of an extracellular  $Ca^{2+}$ -sensing receptor from bovine parathyroid. *Letters to Nature*, 366:575-580

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

**Brown, EM, Pollak M, Steven C.H. (1998)** The extracellular calcium-sensing receptor: Its role in health and disease. *Annu Rev Med* 49:15-29

**Brown, EM (1999)** Physiology and pathophysiology of the extracellular calcium-sensing receptor. *Am J Med* 106:238-253

**Butters RR, Chattopahyay N, Nielsen P, Smith CP, Mithal A, Kifor O, Bai M, Goldsmith P, Hurwitz S, Krapcho K, Busby J, Brown EM (1997)** Cloning and characterization of a calcium-sensing receptor from the hypercalcemic New Zealand white rabbit reveals unaltered responsiveness to extracellular calcium. *J Bone Mineral Res.* 12:568-79

**Canalejo A, Hernandez A, Almaden Y, Concepcion MT, Felsenfeld A, Torres A, Rodriguez M (1998)** The effect of a high phosphorus diet on the parathyroid cell cycle. *Nephrol Dial Transplant* 13(Suppl 3):19-22

**Chattopadhyay N., Mithal A, Brown E. (1996)** The calcium receptor: a new handle on the diagnosis and treatment of parathyroid disorders. *Endocrine Rev.* 17: 289-307

**Chou H, Inaba M, Nishizawa Y, Murano M, Ishimura E, Nishitani H, Kim M (1996)** Case of a parathyroidectomized patient observed longitudinally by ultrasonography. Relationship between the growth rates and 1,25-dihydroxyvitamin  $D_3$  receptor contents in the parathyroid glands. *Nephron* 73:695-700

**Chudek J, Ritz E, Kovacs G (1998)** Genetic abnormalities in parathyroid nodules of uremic patients. *Clin Cancer Res* 4:211-214

**Coburn JW, Elangovan L, Goodman WG, Frazao JM (1999)** Calcium-sensing receptor and calcimimetic agents. *Kidney Int* 56, Suppl. 73:S52-S58

**Collins MT, Skarulis MC, Bilezikian JP, Silverberg SJ, Spiegel AM, Marks SJ (1998)** Treatment of hypercalcaemia secondary to parathyroid carcinoma with a novel calcimimetic agent. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1083-1088

**Corbetta S, Mantavani G, Lania A, Borgato S, Vicentini L, Beretta E, Fagila G, Di Blasio AM, Spada A (2000)** Calcium-sensing receptor expression and signalling in human parathyroid adenomas and primary hyperplasia. *Clin Endocrinology* 52:339-348

**Czekay R-P, Orlando R, Woodward L, Adamson E, Farquhar M (1995)** The expression of megalin (gp330) and LRP diverges during F9 cell differentiation. *J Cell Sci* 108:1433-41

**Degenhardt S, Toell A, Weidemann W, Dotzenrath C, Spindler KD, Grabensee B (1998)** Point mutations of the human parathyroid calcium receptor gene are not responsible for non-suppressible renal hyperparathyroidism. *Kidney Int* 53(3):556-61

**Delmez JA, Tindira C, Grooms P, Dusso A, Windus DW, Slatopolsky E (1989)** Parathyroid hormone suppression by intravenous 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. A role for increased sensitivity to calcium. *J Clin Invest* 83:1349-1355

**Demay MB, Kierman MS, DeLuca HF, Kronenberg HM (1992)** Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor and mediate transcriptional repression in response to 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8097-8101

**Denda M, Finch J, Brown AJ, Nishii Y, Kubodera N, Slatopolsky E (1996)** 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 22-oxalcalcitriol prevent the decrease in vitamin D receptor content in the parathyroid glands of uremic rats. *Kidney Int* 50:34-39

**Drüeke TB (1995)** The pathogenesis of parathyroid gland hyperplasia in chronic renal failure. *Kidney Int* 48:259-272

**Drüeke TB (1999)** Medical management of Secondary Hyperparathyroidism in Uremia. *Am J Med Sci* 317(6):383-9

**Dunlay R, Rodriguez M, Felsenfeld AJ, Liach F (1989)** Direkt inhibitory effect of calcitriol on parathyroid function (sigmoidal curve) in dialysis. *Kidney Int* 36:1093-1098

**Emanuel RL, Adler GK, Kifor O, Quinn SJ, Fuller F, Krapcho K, Brown EM (1996)** Calcium-sensing receptor expression and regulation by extracellular calcium in the ArT-20 pituitary cell line. *Mol Endocrinol* 10:555-565

**Farnebo F, Höög A, Sandelin K, Larsson C, Farnebo L-O (1998)** Decreased expression of calcium-sensing receptor messenger ribonucleic acids in parathyroid adenomas. *Surgery* 124(6):1094-9

**Farnebo F, Enberg U, Grimelius L, Backdahl M, Schalling M, Larsson C, et al. (1997)** Tumor specific decreased expression of the calcium-sensing receptor (CaR) mRNA in sporadic primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3481-6

**Felsenfeld AJ, Llach F (1993)** Parathyroid gland function in chronic renal failure (editorial). *Kidney Int* 43:771-789

**Fitzpatrick LA (1993)** Heterogeneous secretory response of parathyroid cells *Recent Prog Horm Res* 48:471-475

**Fletcher S, Brownjohn AM, Dunwell C, Harnden P (1997)** Immunocytochemical detection of a reduction in 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor expression in uraemic parathyroid tissue. *Nephrol Dial Transplant* 12(1):93-96

**Fournier J.-G. (1994)** *Histologie moléculaire*, Kp. 3, S.21/22. *Technique & Documentation - Lavoisier, Paris, ISBN: 2-85206-925-3*

**Fukagawa M, Okazaki R, Takano K, Kaname S, Ogata E, Kitaoka , Harada S, Sekine N, Matsumoto T, Kurokawa K (1990)** Regression of parathyroid hyperplasia by calcitriol-pulse therapy in patients on long-term dialysis (letter). *N Engl J Med* 323:421-422

**Fukagawa M, Okazaki R, Takano K, Kaname S, Ogata E, Kitaoka , Harada S, Sekine N, Matsumoto T, Kurokawa K (1997)** Renal failure and hyperparathyroidism. In:Feldman, D, Glorieux, FH, Pike JW (eds.) *Vitamin D*. Academic Press, pp.1436-1443

**Fukuda N, Tanaka H, Tominaga Y, Fukagawa M, Kurokawa K, Seino Y (1993)** Decreased 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor density is associated with a more severe form of parathyroid hyperplasia in chronic uremic patients. *J Clin Invest* 92:1436-1443

**Garner SC, Hinson TK, McCarty K, Leight M, Leight Jr. GS, Quarles LD (1997)** Quantitative analysis of the calcium-sensing receptor messenger RNA in parathyroid adenomas. *Surgery* 122:1166-75

**Garett J, Capuano I, Hammerland LG, Hung BC, Brown EM, Herbert SC, Fuller F. (1995a)** Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs. *J. Biol. Chem.* 270:12919-25

**Garrett JE, Tamir H, Kifor O, Simin RT, Rogers KV, Mithal A, Gagel RF. (1995b).** Calcitonin-secreting cells of the thyroid express an extracellular calcium receptor gene. *Endocrinology* 136:5202-11

**Gogusev J, Chopard C, Duchambon P, Sarfati E, Drüeke TB (1994)** Abnormal TGF- $\alpha$  expression in parathyroid gland tissue from patients with secondary hyperparathyroidism. *J Am Soc Nephrol* 5:879 (Abstract)

**Gogusev J, Duchambon P, Giovanni M, Correz MC, Zhang P, Inagaki C, Sarfati E, Drüeke TB (1995)** Expression of vitamin D (vdr) and calcium sensing receptor in normal and pathologic human parathyroid tissue. *Nephrol Dial Transplant* 10:931 (Abstract)

**Gogusev J, Duchambon P, Hory B, Giovanni M, Goureau Y, Inagaki C, Sarfati E, Drüeke TB (1997)** Depressed expression of calcium receptor in parathyroid gland tissue of patients with hyperparathyroidism. *Kidney Int* 51:328-336

**Goodman WG, Belin TR, Salusky IB (1996)** In vivo assessments of calcium-regulated parathyroid hormone release in secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 50:1834-1844

**Habecker BA, Nathanson MN (1992)** Regulation of muscarinic acetylcholine receptor mRNA expression by activation of homologous and heterologous receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5035-5038

**Hammerland LG, Krapcho KJ, Alasti N, Garrett JE, Capuano IV, Hung BCP, Fuller FH. (1995)** Cation binding determinants of the calcium receptor revealed by functional analysis of chimeric receptors and a deletion mutant. *J. Bone Mineral Res.* 10: S156

**Hammerland LG, Garret JE, Hung BCP, Levinthall C, Nemeth EF (1998)** Allosteric activation of the Ca<sup>2+</sup> receptor expressed in *Xenopus laevis* oocytes by NPS 467 or NPS 568. *Mol Pharmacol* 53:1083-1088

**Hawa NS, O'Riordan JL, Farrow SM (1994)** Binding of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors to the 5'-flanking region of the bovine parathyroid hormone gene. *J Endocrinol* 142:53-60

**Heath H, Odelberg S, Jackson CE, Teh BT, Hayward N, Larsson C, Buist NR, Krapcho KJ, Hung BC, Capuano IV, Garret JE, Leppert MF (1996)** Clustered inactivating mutations and a benign polymorphism of the calcium receptor gene in familial benign hypocalciuric hypercalcemia suggest receptor functional domains (see comments). *J Clin Endocrinol Metab* 81:1312-1317

**Hellman P, Carling T, Rask L., Akerström G (2000)** Pathophysiology of primary hyperparathyroidism. *Histol Histopathol.* 15: 619-627

**Hernandez A, Torres A, Concepcion MT, Salido E (1996)** Parathyroid gland calcium receptor gene expression is not regulated by increased dietary phosphorus in normal and renal failure rats. *Nephrol Dial Transplant* 11(Suppl 3):11-14

**Ho C, Conner DA, Pollak MR, Ladd DJ, Kifor O, Warren HB, Brown EM, Seidman CE (1995)** A mouse model of human familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism (see comments). *Nat. Genet.* 11:389-394

**Hosokawa Y, PollakMR, Brown EM, Arnold A (1995)** Mutational analysis of the extracellular Ca<sup>(2+)</sup>-sensing receptor gene in human parathyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3107-3110

**Indriason OS, Quarles LD (1995)** Non-suppressible parathyroid hormone (PTH) secretion is related to parathyroids gland size in uremic hyperparathyroidism (HPT). *J Am Soc Nephrol* 6:964

**Janicic N, Soliman E, Pausova Z, Seldin MF, Riviere M, Szpirer C, Hendy GN. (1995)** Mapping of the calcium-sensing receptor gene (CASR) to human Chromosome 3q13,3-21 by fluorescence in situ hybridization, and location to rat chromosome 11 and mouse chromosome 16. *Mammalian Genome* 6:798-801

**Jones G, Calverly MJ (1993)** A dialogue on analogues. *Trends Endocrinol Metab* 4:297-303

- Kaneko C, Mizunashi K, Tanaka M, Uzuki M, Kikuchi M, Sawai T, Goto MM (1999)** Relationship between  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent change of serum PTH and extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor expression in parathyroid adenoma. *Calcif Tissue Int* 64:271-272
- Kifor O, Congo D, Brown EM (1990)** Phorbol esters modulate the high  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated accumulation of inositol phosphates in bovine parathyroid cells. *J Bone Miner Res* 5:1003-1011
- Kifor O, Moore F, Wang P, et al (1996)** Reduced immunostaining for the extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor in primary and uremic secondary hyperparathyroidism. *J Clin Endocr Metab* 81: 1598-1606
- Kilav R, Silver J, Naveh-Many T (1995)** Parathyroid hormone gene expression in hypophosphatemic rats. *J Clin Invest* 96:327-333
- Kobayashi M, Oguchi H, Higuchi M, Hora K, Kiyosawa K, Kobayashi S, Yamamori S (1995)** Regulation of vitamin D receptor (VDR) and its mRNA in the parathyroid of chronic dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 6(3):964 (Abstr.)
- Koike T, Fukuda N, Fukagawa M, Ohta K, Kurokawa K (1997)** Correlation of enhanced cell proliferation with decrease density of vitamin D receptor in parathyroid hyperplasia in chronic dialysis patients. *Nephrology* 3:279-284
- Korkor AB (1987)** Reduced binding of [ $^3\text{H}$ ]1,25-dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$  in the parathyroid glands of patients with renal failure. *N Engl J Med* 316:1573-1577
- Koyama H, Nishizawa Y, Inaba M, Hino M, Prah J, DeLuca HF, Morii H (1994)** Impaired homologous upregulation of vitamin D receptor in rats with chronic renal failure. *Am J Physiol* 266:F706-F712
- Kremer R, Bolivar I, Goltzman D, Hendy GN (1989)** Influence of calcium and 1,25-dihydroxycholecalciferol on proliferation and proto-oncogene expression in primary cultures of bovine parathyroid cells. *Endocrinology* 125:935-941
- Larsson R., Wallfelt C., Abrahamsson H., Gylie E., Ljunghll S., Rastad J., Rorsman P., Wide L., Akerström G. (1984)** Defective regulation of the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  activity in parathyroid cells from patients with hyperparathyroidism. *Bioscience Rep.* 4, 909-915

**Li YC, Pirro AE, Amling M, Delling G, Baron R, Bronson R, Demay M (1997)** Targeted ablation of the vitamin D receptor: An animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc Natl Acad Sci* 94:9831-9835

**Liu SM, Koszewski N, Lupez M, Malluche HH, Olivera A, Russel J (1996)** Characterization of a response element in the 5'-flanking region of the avian (chicken) PTH-gene that mediates negative regulation of gene transcription by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and binds the vitamin D<sub>3</sub> receptor. *Mol Endocrinol* 10:206-215

**Liu W, Yu w, Carling T, Juhlin C, Rastad J, Ridefelt P et al. (1998)** Regulation of gp330/megalin expression by vitamins A and D. *Eur J Clin Invest* 28:100-7

**Lundgren S, Hjalms G, Hellman P, Ek B, Juhlin C, Rastad j, Klareskog L, Akerstrom G, Rask L (1994)** A protein involved in calcium sensing of the human parathyroid and placental cytotrophoblast cells belongs to the LDL-receptor protein superfamily. *Exp Cell Res* 212:344-350

**Malberti F, Surian M, Cosci P (1993a)** Improvement of secondary hyperparathyroidism and reduction of the setpoint of calcium after intravenous calcitriol. *Kidney Int* 43(Suppl.41):S125-S130

**Malberti F, Corradi B, Pagliari B, Romanini D, Gazo A, Sidoti A, Baretta A, Bellazzi R, Imbasciati E (1993b)** The sigmoidal parathyroid hormone-ionized calcium curve and the setpoint of calcium in hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 13(Suppl 2):S476-S479

**Mayer GP, Habener JF, Potts Jr.JT (1976)** Parathyroid hormone secretion in vivo: demonstration of a calcium-independent, nonsuppressible component of secretion. *J Clin Invest* 57:678-683

**Mendes V (1983)** Secondary hyperparathyroidism in chronic haemodialysis patients: a clinicopathological study. *Proc EDTA* 20:731-738

**Merke J, Hugel U, Zlotkowski A, Szabo A, Bommer J, Mall G, Ritz E (1987)** Diminished parathyroid 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>receptors in experimental uremia. *Kidney Int* 32:350-353

**Messa P, Vallone C, Mioni G, Geatti O, Turrin D, Passoni N, Cruciatti A (1994)** Direct in vivo assessment of parathyroid hormone-calcium relationship curve in renal patients. *Kidney Int* 46:1713-1720

**Mithal A, Kifor O, Kifor I, Vassilev P, Butters R, Krapcho K, Simin R, Hebert SC, Brown EM (1995)** The reduced responsiveness of cultured bovine parathyroid cells to extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is associated with marked reduction in the expression of extracellular  $\text{Ca}^{(2+)}$ -sensing receptor messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology* 136:3087-3092

**Nagaba Y, Heishi M, Tazawa H, Tsukamoto Y, Kobayashi Y (1998)** Vitamin D receptor gene polymorphisms affect secondary hyperparathyroidism in hemodialyzed patients. *Am J Kidney Dis* 32:464-469

**Naveh-Many T, Silver J (1990a)** Regulation of parathyroid hormone gene expression by hypocalcemia, hypercalcemia and vitamin D in the rat. *J Clin Invest* 86:1313-1319

**Naveh-Many T, Marx R, Keshet E, Pike JW, Silver J (1990b)** Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$  receptor gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$  in the parathyroid in vivo. *J Clin Invest* 86:1968-1975

**Naveh-Many T, Rahamimov R, Livni N, Silver J (1995)** Parathyroid cell proliferation in normal and chronic renal failure rats. The effects of calcium, phosphate and vitamin D. *J Clin Invest* 96:1786-1793

**Nemeth E (1990)** Regulation of cytosolic calcium by extracellular divalent cations in C-cells and parathyroid cells. *Cell Calcium* 11: 323-42

**Nemeth EF, Steffey ME, Hammerland LG, Hung BC, VanWagenen BC, Delmar EG, Banandrin MF (1998)** Calcimimetics with potent and selective activity on the parathyroid calcium receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4040-4045

**Nemeth EF, Bennet SA (1999)** Tricking the parathyroid gland with novel calcimimetic agents. *Nephrol Dial Transplant* 13:1923-1925

**Nygren P, Larson R, Johansson H, Ljunghall S, Rastad J, Akerstrom G (1988)**  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inhibits hormone secretion and proliferation but not functional dedifferentiation of cultured bovine parathyroid cells. *Calcif Tissue Int* 43:213-218

**Ott SM (1998)** Calcimimetics - New drugs with the potential to control hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1080-1082

**Parfitt AM (1994)** Parathyroid growth: Normal and abnormal. In Bilezikian JP (ed) *The parathyroids: Basic and clinical concepts*. Raven Press, New York, pp.373-406

**Patel SR, Ke H-Q, Vanholder R, Koenig RJ, Hsu CH (1995)** Inhibition of calcitriol receptor binding to vitamin D response elements by uremic toxins. *J Clin Invest* 96:50-59

**Patel SR, Koenig RJ, Hsu CH (1996)** Effect of Schiff base formation on the function of the calcitriol receptor. *Kidney Int* 50:1539-1545

**Pearce SHS, Trump D, Wooding C, Besser GM, Chew SL, Grant DB, Heath DA, Paterson CR, Whyte MP, Thakker RV (1995)** Calcium-sensing receptor mutations in familial benign hypercalcemia and neonatal hyperparathyroidism. *J Clin Invest* 96:2683-2692

**Pearce SHS, Thakker RV (1997)** The calcium-sensing receptor: insights into extracellular calcium homeostasis in health and disease. *J Endocrinol* 154:371-378

**Pollak MR, Brown EM, Chou YH, Hebert SC, Marx SJ, Steinmann B, Levi T, Seidman CE, Seidman JG (1993)** Mutations in the human  $\text{Ca}^{(2+)}$ -sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism (see comments). *Cell* 75:1297-1303

**Pollak MR, Brown EM, Eestep HL, Mc Laine PN, Kifor O, Park J, Hebert SC, Seidman CE, Seidman JG (1994)** Autosomal dominant hypocalcaemia caused by a  $\text{Ca}^{(2+)}$ -sensing receptor gene mutation. *Nat Genet* 8:303-307

**Pols HAP, Birkenhäger JC, van Leeuwen JPTM (1994)** Vitamin D analogues: from molecule to clinical application. *Clin Endocrinol* 40:285-291

**Racke FK, Nemeth EF (1993)** Cytosolic calcium homeostasis in bovine parathyroid cells and its modulation by protein kinase C. *J Physiol Lond* 468:141-162

**Ramirez JA, Goodman WG, Gornbein J, Menezes C, Moulton L, Segre GV, Salusky IB (1993)** Direct in vivo comparison of calcium-regulated parathyroid hormone secretion in normal volunteers and patients with secondary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 76:1489-1494

**Ramirez JA, Goodman WG, Belin TR, Gales B, Segre GV, Salusky IB (1994)** Calcitriol therapy and calcium-regulated PTH secretion in patients with secondary hyperparathyroidism. *Am J Physiol* 267:E961-E967

**Reichel H, Norman AW (1989)** Systemic effects of vitamin D. *Ann Rev Med* 40:71-78

**Reichel H, Szabo A, Uhl J, Pesian S, Schmutz A, Schmidt Gayk H, Ritz E (1993)** Intermittent versus continuous administration of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in experimental renal hyperparathyroidism. *Kindney Int* 44:1259-1265

**Riccardi D, Park J, Lee WS, Gamba G, Brown EM, Herbert SC (1995)** Cloning and functional expression of a rat kidney extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:131-35

**Rogers KV, Dunn CK, Conklin RL, Hadfield S, Petty BA, Brown EM, Hebert SC, Nemeth EF, Fox J (1995)** Calcium receptor messenger ribonucleic acid levels in the parathyroid gland and kidney of vitamin D-deficient rats are not regulated by plasma calcium or 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Endocrinology* 136:499-504

**Rogers KV, Fox J (1995)** Parathyroid gland calcium receptor mRNA levels are unaffected by chronic renal insufficiency or low dietary calcium in rats. *Endocrine* 3:769-774

**Roussanne M-C, Gogusev J, Hory B, Duchambon P, Souberbielle JC, Nabarra B, Pierrat D, Sarfati E, Drüke TB, Bourdeau A. (1998)** Persistence of Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor expression in functionally active, long-term human parathyroid cell cultures *J Bone Miner Res* 13:354-362

**Roth SI, Raisz LG (1996)** The course and reversibility of the calcium effect on the ultrastructure of the rat parathyroid gland in organ culture. *Lab Invest* 15: 1187-1211

**Ruat M., Molliver M, Snowman A, Snyder SH. (1995)** Calcium-sensing receptor: molecular cloning in rat and localization to nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3161-65

**Russell J, Lettieri D, Sherwood LM (1983)** Direct regulation by calcium of cytoplasmic messenger ribonucleic acid coding for pre-proparathyroid hormone in isolated bovine parathyroid cells. *J Clin Invest* 72:1851-1855

**Russell J, Bar A, Sherwood LM, Hurwitz S (1993)** Interaction between calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in the regulation of preproparathyroid hormone and vitamin D receptor messenger ribonucleic acid in avian parathyroids. *Endocrinology* 132:2639-2644

**Shvil Y, Naveh-Many T, Barach P, Silver J (1990)** Regulation of parathyroid cell gene expression in experimental uremia. *J Am Soc Nephrol* 1:99-104

**Silver J, Naveh-Many T (1994)** Regulation of parathyroid hormone synthesis and secretion. *Semin Nephrol* 14:175-194

**Silver J, Kronenberg HM (1996)** Parathyroid hormone - molecular biology and regulation. In Biezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds) *Principles of bone biology*. Academic Press, pp325-337

**Silver J, Naveh-Many T (1997)** Vitamin D and the parathyroid glands. In: Feldman D, Glorieux FH, Pike JW (eds.) *Vitamin D*. Academic Press, pp 353-367

**Silverberg SJ, Bone H, Marriot T, Loccer FG, Thys-Jacobs S, Dziem G, Kaatz S, Sanguinetti EL, Bilezikian JP (1997)** Short-term inhibition of parathyroid hormone secretion by calcium receptor agonist in primary hyperparathyroidism. *N Engl J Med* 337:1506-1510

**Slatopolsky E, Delmez JA (1995)** Pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Miner Electrolyte Metab* 21:91-96

**Slatopolsky E (1998)** The role of calcium, phosphorus and vitamin D metabolism in the development of secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant* 13(Suppl. 3):3-8

**Sun F, Ritchie CK, Hassager C, Maercklein P, Fitzpatrick LA (1993)** Heterogeneous response to calcium by individual parathyroid cells. *J Clin Invest* 91:595-601

**Szabo A, Merke J, Beier E, Mall G, Ritz E (1989)** 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> inhibits parathyroid cell proliferation in experimental uremia. *Kidney Int* 35:1049-1056

**Szabo A, Ritz E, Schmidt-Gayk H, Reichel H (1996)** Abnormal expression and regulation of vitamin D receptor expression in experimental uraemia: effects of parathyroidectomy and administration of PTH. *Nephrol Dial Transplant* 13:340-349

**Tanaka Y, DeLuca HF (1973)** The control of 25-dihydroxyvitamin D metabolism by inorganic phosphorus. *Arch Biochem Biophys* 159:566-570

**Toell A, Degenhardt S, Grabensee B, Carlberg C (1999)** Inhibitory effect of uremic solutions on protein-DNA-complex formation of the vitamin D receptor and other members of the nuclear receptor superfamily. *J Cell Biochem* 74(3):386-94

**Tominaga Y, Tanaka Y, Sato K, Numano M, Uchida K, Falkmer U, Grimelius L, Johansson H, Takagi H (1992)** Recurrent renal hyperparathyroidism and DNA analysis of autografted parathyroid tissue. *World J Surg* 16:595-602

**Tominaga Y, Sato K, Tanaka Y, Numano M, Uchida K, Takagi H (1995)** Histopathology and pathophysiology of secondary hyperparathyroidism due to chronic renal failure. *Clin Nephrology* 44 (Suppl 1):S42-S47

**Tominaga Y, Kohara S, Namii Y, Nagasaka T, Haba T, Uchida K, Numano M, Tanaka Y, Takagi H (1996)** Clonal analysis of nodular parathyroid hyperplasia in renal hyperparathyroidism. *World J Surg* 20:744-752

**Vasicek TJ, McDevitt BE, Freeman MW, Fennick BJ, Hendy GN, Potts JT Jr, Rich A, Kronenberg HM (1983)** Nucleotide sequence of the human parathyroid hormone gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2127-2131

**Wada M, Furuya Y, Sakiyama J-I (1997)** The calcimimetic compound NPS R-568 suppresses parathyroid cell proliferation in rats with renal insufficiency. *J Clin Invest* 100:2977-2983

**Wada M, Ishii H, Furuya Y, Fox J, Nemeth EF, Nagano N (1998)** NPS R-568 halts or reverses osteitis fibrosa in uremic rats. *Kidney Int* 53:448-453

**Wallfelt C, Gylfe E, Larsson R, Ljunghall S, Rastad J, Akerstrom G (1988)** Relationship between external and cytoplasmic calcium concentrations, parathyroid hormone release and weight of parathyroid glands in human hyperparathyroidism. *J Endocrinol* 116:457-464

**Walters MR (1992)** Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocrine Rev* 13:719-764

**Ward DT, Brown EM & Harris HW (1998)** Disulfide bonds in the extracellular calcium-polyvalent cation-sensing receptor correlate with dimer formation and its response to divalent cations in vitro. *J Biol Chem* 273:14476-14483

**Yamaguchi S, Yachiku S, Morikawa M (1997)** Analysis of the proliferative activity of the parathyroid glands using proliferating cell nuclear antigen in patients with hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2681-2688

**Yamamoto M, Igarashi M, Muramatsu M, Fukagawa T, Motokura T, Ogata E (1989)** Hypocalcemia increases and hypercalcemia decreases the steady-state level of parathyroid hormone messenger RNA in the rat. *J Clin Invest* 883:1053-1056

**Yang J, Tashjian AH (1993)** Regulation of endogenous thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor messenger RNA by TRH in GH4CI cells. *Mol Endocrinol* 7:753-758

**Yi H, Fukagawa M, Yamamoto H, Kumagai M, Watanabe T, Kurokawa K (1995)** Prevention of enhanced parathyroid hormone secretion, synthesis and hyperplasia by mild dietary phosphorus restriction in early chronic renal failure rats: Possible direct role of phosphorus. *Nephron* 70:242-248

**Zabel BU, Kronenberg HM, Bell GI, Shows TB (1985)** Chromosome mapping of genes on the short arm of human chromosome 11: Parathyroid hormone gene is at 11p15 together with the genes for insulin, c-Harvey-ras and beta-hemoglobin. *Cytogenet Cell Genet* 39:200-205

**Zhong M, Finch J, McCracken R, Morrissey J, Slatopolsky E (1994)** The calcium receptor of rat parathyroid gland is regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> but not by dietary hyperparathyroidism. *J Am Soc Nephrol* 5:892 (Abstr)

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1	Regulation des Calcium-Haushaltes	S. 5
Abb. 1.2	Calcium-PTH-Beziehung	S. 7
Abb. 1.3	Schematische Darstellung der Signaltransduktion von extrazellulärem Calcium über den CaR	S. 10
Abb. 1.4	Pathogenese der Adenomentstehung bei sekundärem Hyperparathyroidismus	S. 19
Abb. 3.1	Schematische Darstellung der <i>in situ</i> Hybridisierung	S. 32
Abb. 4.1	ISH CaR mRNA – Normalgewebe – Übersicht	S. 40
Abb. 4.2	ISH CaR mRNA – Normalgewebe – Detailaufnahme	S. 40
Abb. 4.3	Ergebnisse ISH der CaR mRNA in pHPT-Geweben im Vergleich zum Normalgewebe	S. 41
Abb. 4.4	ISH CaR mRNA – pHPT – Übersicht	S. 42
Abb. 4.5	ISH CaR mRNA – pHPT – Detailaufnahme	S. 42
Abb. 4.6	Gesamtergebnisse der ISH CaR mRNA in sHPT-Gewebe im Vergleich zum Normalgewebe	S. 43
Abb. 4.7	Ergebnisse der ISH der CaR mRNA in sHPT-Geweben mit nodösen und diffus hyperpalstischen Arealen	S. 44
Abb. 4.8	ISH CaR mRNA – sHPT – Übersicht	S. 44
Abb. 4.9	ISH CaR mRNA – sHPT – Detailaufnahme	S. 45
Abb. 4.10	ISH PTH mRNA – Normalgewebe – Übersicht	S. 49
Abb. 4.11	Ergebnisse der ISH PTH mRNA in pHPT-Gewebe im Vergleich zum Normalgewebe	S. 50
Abb. 4.12	ISH PTH mRNA – pHPT – Übersicht	S. 50
Abb. 4.13	Gesamtergebnisse der ISH der PTH mRNA in sHPT-Gewebe im Vergleich zum Normalgewebe	S. 51
Abb. 4.14	ISH PTH mRNA – sHPT – Übersicht	S. 51
Abb. 5.1	Pathophysiologie des CaR (Übersichtsschema)	S. 67

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tab. 2.1	Klinische Charakterisierung der sHPT-Gewebe	S. 22
Tab. 2.2	Klinische Daten von 8 parathyreoidektomierten Patienten mit sHPT	S. 23
Tab. 4.1	Gesamtergebnisse der ISH CaR mRNA	S. 35
Tab. 4.2	Auswertung der ISH CaR mRNA (Rohdatentabelle)	S. 36
Tab. 4.3	Differenzen im Ergebnis der beiden Auszählungen (absolute Werte)	S. 38
Tab. 4.4	Differenzen im Ergebnis der beiden Auszählungen in prozentualer Darstellung	S. 39
Tab. 4.5	Gesamtergebnisse der ISH PTH mRNA	S. 46
Tab. 4.6	Auswertung der ISH PTH mRNA (Rohdatentabelle)	S. 47

## DANKSAGUNG

Mein Dank gilt

...Herrn Prof. Dr. med. B. Grabensee für die Vergabe des interessanten Themas, die Ermöglichung des einjährigen Forschungsaufenthaltes in Paris, sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit und die Erstellung des Gutachtens.

...Herrn Prof. Dr. med. Goretzki für die Erstellung des Zweitgutachtens.

...Herrn Prof. Dr. med. T. B. Drüeke und seinen Mitarbeitern für die fruchtbare Zusammenarbeit während meines einjährigen Forschungsaufenthaltes in Paris und die anregenden Diskussionen in der Ausarbeitungsphase.

...Herrn Dr. med. S. Degenhardt für die Betreuung der Arbeit und die konstruktiven Diskussionen.

...Frau P. Duchambon für die gute Einarbeitung in die Methodik der in situ Hybridisierung, die vielfältigen technischen Kniffe und die moralische Unterstützung.

...Frau Dr. rer. nat. A. Toell für die gute Zusammenarbeit, ihre Anregungen und ihre Diskussionsbereitschaft.

... Fr. PD Dr. med. C. Dozenrath von der Chirurgischen Klinik A für die Hilfe bei der Organisation der Nebenschilddrüsengewebe.

...den „Jungs“ der molekularbiologischen AG der Klinik für Neurologie (AG Neurochemie, Prof. Dr. W. Müller) für die großzügige Aufnahme in die „FrfrZ“ des gemeinsam genutzten Labors in der MNR-Klinik und für die Mitnutzung von Geräten.

...Herrn PD Dr. med. U. Germing und den Mitarbeitern des Hämatologischen Labors für die Mitbenutzung der Mikroskope zur Auswertung der Gewebsschnitte.

... meinen Eltern für die Betreuung des nicht-wissenschaftlichen Anteils und ihre Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit.

... und letztlich meinen Freunden, insbesondere meinem Freund Klaus für viel Geduld und moralische Unterstützung.

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Düsseldorf, den 30.07.01

## LEBENS LAUF

**Name** Alexandra Stalder

**Geburtsdatum** 06.10.1972

**Geburtsort** Düsseldorf

### Berufspraxis

seit 2/2002 Assistenzärztin, Klinik für Nephrologie und Rheumatologie,  
Universitätsklinikum, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

2000-2002 Ärztin im Praktikum, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

### Studium

15.05.2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

1999 / 2000 PJ an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

März 1999 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

August 1995 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

August 1994 Ärztliche Vorprüfung

1992 - 2000 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

### Praktika/Famulaturen

Juli 1998 Famulatur in der Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Evangelisches Krankenhaus Düsseldorf

Aug 1998 Hospitation bei einer strukturierten Diabetes Beratung, konventionelle Insulintherapie, und Übersetzung in die französische Sprache, Evangelisches Krankenhaus, Düsseldorf

April 1998 zweiwöchiges Praktikum in einer Allgemeinarztpraxis in Langenfeld

Februar 1998 einwöchiges Praktikum in der Gynäkologischen Abteilung des St. Franziskus Krankenhauses, Bielefeld

Febr./März 1995 Famulatur in der chirurgischen Abteilung der Kliniken der Landeshauptstadt Düsseldorf, Krankenhaus Gerresheim

Jun./Juli 1992 Krankenpflegepraktikum an den Kliniken der Landeshauptstadt Düsseldorf, Krankenhaus Gerresheim

**Auslandsaufenthalte**

- Aug.-Nov. 1999 2. PJ-Tertial in der chirurgischen Abteilung, Livingstone Hospital, Port Elizabeth, Südafrika
- Nov./Dez. 1996 Famulatur in der Nephrologischen Abteilung des Hôpital Necker Enfants malades in Paris/Frankreich
- 1996/97: einjähriges Forschungspraktikum INSERM Unité 90, Prevention et traitement de l'insuffisance renale, Hôpital Necker, Paris/Frankreich

**Schullaufbahn**

- 1979-1983 Besuch der Städtisch Katholischen Grundschule, Mettmann
- 1983-1992 Besuch des Konrad-Heresbach-Gymnasiums, Mettmann
- Juni 1992 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

**Sprachkenntnisse**

- Englisch fließend in Wort und Schrift
- Französisch fließend in Wort und Schrift

Düsseldorf, den 26.05.2002

## Untersuchung der Bedeutung der Calcium Rezeptor Expression im Verlauf des sekundären Hyperparathyreoidismus

**Einleitung:** Der Calcium Rezeptor (CaR) spielt eine in der Pathophysiologie des sekundären, renalen Hyperparathyreoidismus eine Schlüsselrolle. Die genauen molekularen Mechanismen und die Regulation des CaRs sind noch nicht vollständig erforscht. Einige Studien zeigten eine verminderte Expression des CaR, v. a. auf Proteinebene. Diese Arbeit sollte die Hypothese überprüfen, daß eine reduzierte Expression auch auf der mRNA-Ebene nachzuweisen sein könnte. Zusätzlich wurde untersucht, ob es in nodulären Arealen mit monoklonalem Zellwachstum verglichen mit der diffusen Hyperplasie mit polyklonalem Zellwachstum in sHPT-Geweben zu einer verminderten CaR mRNA Expression kommt.

**Methodik:** Verglichen wurde die Expression der CaR mRNA in Geweben mit primärem (pHPT; n = 5), mit sekundärem Hyperparathyreoidismus (n = 8) und normalem Nebenschilddrüsengewebe, mittels *in situ* Hybridisierung. Die mRNA des CaR und des Parathormons (PTH) wurde durch spezifische, Digoxigenin (DIG-11-dUTP) markierte Oligonukleotide nachgewiesen. Die Visualisierung des Signals erfolgte mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt mit anti-DIG-Antikörpern. Es folgte eine semiquantitative Analyse durch Ermittlung der Relation zwischen markierten und nicht markierten Zellen in jedem Gewebe unter Ausschluß von Binde- und Fettgewebe.

**Ergebnisse:** Die CaR mRNA wird in allen drei Gruppen pHPT-, sHPT- und normalem Nebenschilddrüsengewebe exprimiert. Sowohl in den pHPT- wie in den sHPT-Geweben ist eine Tendenz zur Verminderung der Expression zu erkennen, wobei in beiden Gruppen die Streubreite bis in den Expressionsbereich des Normalgewebes reicht. Eine Reduktion der CaR mRNA Expression ließ sich in nodulären Arealen feststellen. Diese Verminderung ließ sich in 3 der 4 sHPT-Gewebe, in denen noduläre Areale von Zonen mit diffuser Hyperplasie zu unterscheiden waren, nachweisen.

**Diskussion:** Die verminderte CaR mRNA Expression in nodulären Arealen, die als morphologisches Korrelat für den nicht supprimierbaren sHPT gelten, ist ein Hinweis für eine Beteiligung der mRNA-Ebene in diesem fortgeschrittenen Krankheitsstadium. Generell handelt es sich beim pHPT wie beim sHPT vermutlich um Krankheitsbilder mit multifaktorieller Pathogenese. Denn auch andere Studien, die meisten zum pHPT, konnten - auch bei teilweise höheren Fallzahlen - keine generelle Verminderung der CaR mRNA, also eine Pathogenese auf mRNA-Ebene feststellen [Corbetta et al., 2000 ; Farnebo et al., 1997]. Für ein weiterführendes Verständnis der Pathogenese des sHPT sind weitere Studien auf molekularer wie klinischer Ebene notwendig.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'frsu'.