

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

**Das FAM20A-Knockout-Mausmodell
zeigt keine renalen
Funktionseinschränkungen**

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

vorgelegt von

Lara Heinekamp

aus **Steinheim (Westfalen)**

Kiel (2022)

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

2. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Markus Damme, Biochemisches Institut

Tag der mündlichen Prüfung: 12.09.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 12.09.2023

gez. PD Dr. ret. nat. Heinrich Terlau

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	IV
Diagrammverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Vorwort.....	1
1.2 Kalziumhomöostase.....	1
1.2.1 Hormonelle Kalziumregulation	2
1.2.2 Intestinale Kalziumresorption.....	4
1.2.3 Renale Kalziumresorption	4
1.3 Physiologische Kalzifizierung	8
1.3.1 Knochenmineralisation	9
1.3.2 Zahnmineralisation	10
1.4 Pathologische Kalzifizierung.....	13
1.4.1 Amelogenesis Imperfecta	14
1.4.2 Nephrokalzinose	14
1.5 Enamel-Renal Syndrome	16
1.5.1 FAM20-Proteinfamilie	18
1.6 Fragestellung der Forschungsarbeit.....	19
2 Material und Methoden.....	21
2.1 Chemikalien	21
2.2 Lösungen.....	21
2.3 FAM20A-Knockout-Maus	22
2.3.1 Genotypisierung.....	23
2.4 Metabolischer Versuch	26
2.4.1 Diätfutter	26
2.4.2 Metabolischer Käfig	27
2.4.3 Herstellung des Kotüberstandes	30
2.4.4 Gefrierpunktosmometrie	31
2.4.5 Flammenfotometrie.....	31
2.4.6 Klinische Chemie.....	31
2.4.7 Analyse der metabolischen Daten	32
2.4.8 Berechnungen der metabolischen Daten	33
2.5 Statistik	34
2.6 Bildgebende Verfahren	34

2.6.1 μ -Computertomographie	34
2.6.2 Histologie	35
3 Ergebnisse.....	36
3.1 Populationsstatistik und Gewichtsunterschiede.....	36
3.2 Zahnpänotyp	38
3.3 Metabolischer Versuch	41
3.3.1 Nahrungsaufnahme und Exkretion	41
3.3.2 Plasmaparameter und Säure-Basen-Haushalt	45
3.3.3 Nierenfunktion und Wasserhaushalt.....	49
3.3.4 Elektrolytexkretion	53
3.3.5 Elektrolytbilanzierung	63
4 Diskussion	69
4.1 Methoden	69
4.1.1 Tiermodell Maus.....	69
4.1.2 Alizarin Rot Färbung	70
4.1.3 Metabolischer Käfig	71
4.2 Entstehung und Folgen von Amelogenesis Imperfecta	72
4.2.1 Beeinflussung der Nahrungsaufnahme	73
4.3 Nierenfunktion und Elektrolythaushalt.....	74
4.3.1 Blutparameter	75
4.3.2 Nieren-Morphologie	75
4.3.3 Physiologische Reaktionen auf das Diätfutter und renaler Elektrolytstoffwechsel.....	76
4.3.4 Erhöhte Kalzumbilanz der Knockout-Tiere	79
4.4 Hypothesen zur Rolle von FAM20A basierend auf dem <i>iMES</i> -Modell	80
4.5 Die Rolle von Magnesium bei der Mineralisation.....	83
5 Ausblick	84
6 Zusammenfassung	85
7 Anhang.....	87
7.1 Elektrolytkonzentrationen im Trinkwasser.....	87
7.2 Absolutwerte der morphometrischen Daten, metabolischer Versuch	88
7.3 Absolutwerte der Futteraufnahme und Exkretion, metabolischer Versuch.....	89
7.4 Absolutwerte der Plasmaanalyse, metabolischer Versuch	90
7.5 Absolutwerte des Säure-Basen-Haushaltes, metabolischer Versuch.....	91
7.6 Absolutwerte der renalen Elektrolytexkretion, metabolischer Versuch	92
7.7 Absolutwerte der fraktionellen Exkretion und Kreatinin-Clearance, metabolischer Versuch	93
7.8 Absolutwerte der enteralen Elektrolytexkretion, metabolischer Versuch	94
Literaturverzeichnis	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Kalziumhomöostase	3
Abbildung 2 Intestinale Kalziumresorption	4
Abbildung 3 Prozentuale Kalziumresorption entlang des Nephrons	5
Abbildung 4 Kalziumresorption im proximalen Tubulus	6
Abbildung 5 Kalziumresorption in der dicken aufsteigenden Henleschen Schleife	7
Abbildung 6 Kalziumresorption in distalen Abschnitten des Nephrons	8
Abbildung 7 Schema der Kalziumphosphat-Präzipitation	9
Abbildung 8 Schematischer Aufbau eines adulten Zahnes	10
Abbildung 9 Schmelzentwicklung des Menschen	11
Abbildung 10 Schmelzunterschiede zwischen menschlichen und murinen Zähnen	12
Abbildung 11 Schema eines adulten menschlichen und murinen Gebisses, Oberkieferhälften	12
Abbildung 12 Funktionen von FAM20A	18
Abbildung 13 Mutationsstatus der FAM20A-Zuchtlinie mit Primern	23
Abbildung 14 Originalbild der FAM20A-Genotypisierung	25
Abbildung 15 Metabolischer Käfig	30
Abbildung 16 Schneidezähne, FAM20A-Zuchtlinie	38
Abbildung 17 Zahnhistologie, FAM20A-Zuchtlinie	39
Abbildung 18 Computertomographische Aufnahmen Mausschädel, FAM20A-Zuchtlinie	40
Abbildung 19 Nierenhistologie, FAM20A-Zuchtlinie	51
Abbildung 20 Nephrokalzinose einer Claudin-10-Knockout-Maus	70
Abbildung 21 Hypothesen zur Funktion von FAM20A bei der Schmelzbildung	73
Abbildung 22 Kalziumhomöostase	80
Abbildung 23 Schema der Hyaluronsäure	81
Abbildung 24 <i>iMES</i> - Modell, Hypothesen zur Funktion von FAM20A	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Chemikalien	21
Tabelle 2 Lösungen.....	21
Tabelle 3 Schema der PCR-Replikation, FAM20A-Genotypisierung	25
Tabelle 4 Zusammensetzung des Tierfutters.....	27
Tabelle 5 Übersicht der Analytik, metabolischer Versuch	29
Tabelle 6 Computertomographisch untersuchte Mäuse	34
Tabelle 7 Zahnhistologisch untersuchte Mäuse	35
Tabelle 8 Elektrolytkonzentrationen im Trinkwasser, Wasserwerk Kiel (2017).....	87
Tabelle 9 Absolutwerte der morphometrischen Daten, metabolischer Versuch.....	88
Tabelle 10 Absolutwerte der Futteraufnahme und Exkretion, metabolischer Versuch	89
Tabelle 11 Absolutwerte der Plasmaanalyse, metabolischer Versuch.....	90
Tabelle 12 Absolutwerte des Säure-Basen-Haushaltes, metabolischer Versuch	91
Tabelle 13 Absolutwerte der renalen Elektrolytexkretion, metabolischer Versuch.....	92
Tabelle 14 Absolutwerte der fraktionellen Exkretion und Kreatinin-Clearance, metabolischer Versuch	93
Tabelle 15 Absolutwerte der enteralen Elektrolytexkretion, metabolischer Versuch.....	94

Diagrammverzeichnis

Diagramm 1 Beispielhafte Trinkmenge der Kontrollgruppe, metabolischer Versuch.....	32
Diagramm 2 Mendelsche Verteilung, FAM20A-Zuchtlinie	36
Diagramm 3 Gewicht im Alter von 3-4 Wochen, FAM20A-Zuchtlinie.....	37
Diagramm 4 Gewicht im Alter von >24 Wochen, FAM20-Zuchtlinie.....	37
Diagramm 5 Futtermenge.....	42
Diagramm 6 Trinkmenge	42
Diagramm 7 Kotmenge (Feuchtgewicht).....	43
Diagramm 8 Wassergehalt im Kot	44
Diagramm 9 Urinmenge	44
Diagramm 10 Relative Gewichtsänderung	45
Diagramm 11 Kationenkonzentrationen im Plasma, Kontrolldiät	46
Diagramm 12 Anionen- und Phosphatkonzentrationen im Plasma, Kontrolldiät.....	46
Diagramm 13 Harnstoff- und Kreatininkonzentrationen im Plasma, Kontrolldiät	47
Diagramm 14 pH-Wert und Kohlenstoffdioxidpartialdruck im Plasma, Kontrolldiät.....	47
Diagramm 15 Sauerstoffpartialdruck, Sättigung und Hämatokrit im Plasma, Kontrolldiät	48
Diagramm 16 Glukosekonzentration und Osmolalität im Plasma, Kontrolldiät	48
Diagramm 17 Renale Kreatininausscheidung	49
Diagramm 18 Kreatinin-Clearance	50
Diagramm 19 Osmolalität im Sammelurin	52
Diagramm 20 Freiwasser-Clearance	53
Diagramm 21 Kalziumausscheidung im Urin sowie fraktionelle Kalziumexkretion	54
Diagramm 22 Natriumausscheidung im Urin sowie fraktionelle Natriumexkretion	55
Diagramm 23 Kaliumausscheidung im Urin sowie fraktionelle Kaliumexkretion.....	56
Diagramm 24 Magnesiumausscheidung im Urin sowie fraktionelle Magnesiumexkretion	57
Diagramm 25 Chloridausscheidung im Urin sowie fraktionelle Chloridexkretion	58
Diagramm 26 Phosphatausscheidung im Urin sowie fraktionelle Phosphatexkretion	59
Diagramm 27 Harnstoffausscheidung im Urin sowie fraktionelle Harnstoffexkretion	60
Diagramm 28 Kalziumexkretion im Kot.....	61
Diagramm 29 Natriumexkretion im Kot	62
Diagramm 30 Kaliumexkretion im Kot	63
Diagramm 31 Kalzumbilanz	64
Diagramm 32 Natriumbilanz.....	64
Diagramm 33 Kalumbilanz	65
Diagramm 34 Magnesumbilanz	66
Diagramm 35 Chloridbilanz.....	66
Diagramm 36 Phosphatbilanz	67
Diagramm 37 Physiologische Reaktion auf das Diätfutter, metabolischer Versuch	77

Abkürzungsverzeichnis

♂	<i>Männchen</i>
♀	<i>Weibchen</i>
AI	<i>Amelogenesis imperfecta</i>
AIGFS	<i>Amelogenesis imperfecta and gingival fibromatosis syndrome</i>
AP	<i>Alkalische Phosphatase</i>
BE	<i>Basenüberschuss</i>
bp	<i>Basenpaare</i>
CaSR	<i>Kalzium-Rezeptor</i>
CS	<i>Chondroitinsulfat</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
EDTA	<i>Ethyldiamintetraessigsäure</i>
ERS	<i>Enamel-renal syndrome</i>
EZM	<i>Extrazellularmatrix</i>
<i>FAM20A</i>	<i>Humanes family with sequence similarity 20A-Gen</i>
<i>Fam20a</i>	<i>Murines family with sequence similarity 20a-Gen</i>
FAM20A	<i>Humanes und murines family with sequence similarity 20A-Protein</i>
FE	<i>Fraktionelle Exkretion</i>
FWC	<i>Freiwasser-Clearance</i>
GAG	<i>Glykosaminoglykan</i>
GalNAcT-I	<i>N-acetyl-Galactosamin-Transferase-I</i>
HAK	<i>Hydroxylapatitkristall</i>
H.E.	<i>Hämatoxylin-Eosin</i>
HET	<i>Heterozygot</i>
iMES	<i>Interphase between the membrane and bulk of extracellular solution</i>
IVC	<i>Isolated ventilated cage</i>
KG	<i>Körpergewicht</i>
KO	<i>Knockout (hier Fam20a)</i>
MOINCC	<i>Molecular Imaging North Competence Center</i>
NC	<i>Nephrokalzinose</i>
NL	<i>Nephrolithiasis</i>
PBS	<i>Phosphatgepufferte Salzlösung</i>
pCO ₂	<i>Kohlenstoffdioxidpartialdruck</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
PG	<i>Proteoglykan</i>
pO ₂	<i>Sauerstoffpartialdruck</i>
PPi	<i>Pyrophosphat</i>
PTH	<i>Parathormon</i>
RAAS	<i>Renin-Angiotensin-Aldosteron-System</i>

sBE	<i>Standard Basenüberschuss</i>
SEM	<i>Standardfehler</i>
VHH	<i>Victor-Hensen Haus</i>
WT	<i>Wildtyp</i>

1 Einleitung

1.1 Vorwort

1972 wurde in der Literatur erstmals das *McGibbon Syndrome* beschrieben, welches sich durch hypoplastischen Zahnschmelz (engl. enamel) sowie beidseitiger Nephrokalzinose (engl. nephrocalcinosis, NC) auszeichnet^[1]. Daher wird es auch Enamel-renal syndrome (ERS) genannt. Erst nach umfassenden genetischen Untersuchungen konnte im Jahr 2012 eine Mutation des sog. *FAM20A*-Gens als Ursache der Erkrankung identifiziert werden^[2,3]. Das dort kodierte Protein gehört zur „family with sequence similarity 20“ (FAM20). Die Mitglieder dieser Proteingruppe übernehmen Funktionen im sekretorischen Stoffwechselweg der Zellen, beeinflussen dadurch das extrazelluläre Milieu und führen zu Mineralisierungseffekten im Körper^[4].

Die genaue Funktionsweise von *FAM20A* ist dabei bisher noch nicht ausreichend geklärt, sodass weitere Untersuchungen zur Entstehung des ERS notwendig sind. Hierbei könnten Fehlfunktionen des renalen Kalziumstoffwechsels ursächlich für die Entstehung von interstitieller Nierenverkalkung sowie hypomineralisiertem Zahnschmelz sein. Ob solche fehlgesteuerten Mechanismen vorliegen, wird in der folgenden Arbeit thematisiert und erforscht. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der integrativen Nierenfunktion.

Bevor näher auf das ERS und dessen bisherigen Forschungsstand eingegangen wird, erfolgt zuvor eine kurze Skizzierung der wichtigsten Regulatoren des Kalziumhaushaltes sowie Mechanismen einer physiologischen und pathologischen Kalzifizierung.

1.2 Kalziumhomöostase

Kalzium ist ein essentielles Element für den menschlichen Organismus. In Hartgeweben wie Knochen und Zahn fungieren Kalziumkristalle strukturgebend. Extrazellulär beeinflusst es unter anderem die Erregbarkeit der Zelle und ist außerdem unerlässlich für eine intakte Blutgerinnungs-Kaskade. Auch als intrazellulärer Transmitter hat Kalzium zellspezifische Aufgaben und führt z.B. zu Muskelkontraktionen oder Hormonausschüttungen. Des Weiteren

kann durch Kalzium die Genexpression beeinflusst und so unter anderem Entzündungsreaktionen reguliert werden [5,6].

Über 99 % des Kalziums im menschlichen Körper kommt als Salz eingelagert in Knochen und Zähnen vor, meist in Verbindung mit Phosphat [7]. Nur ein geringer Anteil des skelettalen Kalziums befindet sich im freien Austausch mit anderen Kompartimenten [8]. Im Plasma wird die Gesamtkalziumkonzentration konstant bei ca. 2,5 mmol/l gehalten. Davon sind 38 % an Plasmaalbumin gebunden und weitere 12 % gehen Komplexe mit Anionen wie Phosphat, Zitrat oder Sulfat ein, sodass nur etwa die Hälfte der plasmatischen Kalziumionen frei vorliegt [7]. Intrazellulär ist Kalzium ebenfalls zum großen Teil an Proteine gebunden oder in Zellorganellen gespeichert, sodass zytosolisch nur 0,1 µmol/l an aktivem Kalzium vorhanden ist [6]. Die Einhaltung dieser Konzentrationen ist eine unabdingbare Voraussetzung für die physiologische Zellfunktion und das Überleben des Organismus. Zudem muss in sämtlichen Geweben eine ungewollte Präzipitation von Kalziumkristallen vermieden werden. Daher sind komplexe Regulationsmechanismen notwendig, welche durch enteralen und renalen epithelialen Transport unter hormoneller Kontrolle gesteuert werden (**Abbildung 1**) [7,9].

1.2.1 Hormonelle Kalziumregulation

Die wichtigsten Regulatoren der Kalziumhomöostase sind Parathormon (PTH), Kalzitriol (Vitamin D₃) und Kalzitonin [7].

Befindet sich der Körper im hypokalzämischen Zustand wird aus den Epithelkörperchen der Nebenschilddrüsen PTH in den Blutkreislauf sezerniert. Das Ziel ist eine möglichst schnelle Erhöhung der Kalziumkonzentration im Plasma, indem Kalzium und Phosphat aus dem Knochen mobilisiert werden. Um einen renalen Verlust des Kalziums zu verhindern, führt PTH zusätzlich zu einer erhöhten Kalziumresorption in der Niere. Gleichzeitig kommt es zu einer Phosphaturie, damit die Löslichkeitsgrenze für Kalziumphosphatkristalle im Plasma nicht überschritten wird [6]. Langfristig würde ein erhöhter PTH-Spiegel zum Abbau der Knochensubstanz führen. Um diesem entgegenzuwirken, nimmt PTH zusätzlich einen positiven Einfluss auf die Kalzitriol-Synthese, welches die enterale und renale Kalzium- sowie Phosphatresorption steigert, sodass Knochenmatrix aufgebaut werden kann [7].

Ist die Plasmakonzentration von Kalzium zu hoch, wird die PTH-Sekretion unterdrückt und aus den parafollikulären C-Zellen der Schilddrüse Kalzitonin in die Blutbahn ausgeschüttet.

Die Hauptwirkung des Kalzitonins besteht in der Hemmung der Osteoklasten, den knochenabbauenden Zellen. Die renale Wirkung ist teilweise synergistisch mit PTH. Insgesamt wird Kalzium in die Knochensubstanz eingebaut, sodass sich der Kalziumspiegel wieder normalisiert (**Abbildung 1**)^[5,7].

Kalzitonin spielt beim Menschen verglichen mit Nagetieren wohl nur eine untergeordnete Rolle und muss z. B. nach einer Schilddrüsenresektion nicht substituiert werden. Auch eine extrem hohe Kalzitoninkonzentration, wie sie beim medullären Schilddrüsenkarzinom vorkommt, hat keine relevanten Auswirkungen auf den Kalziumhaushalt^[10,11].

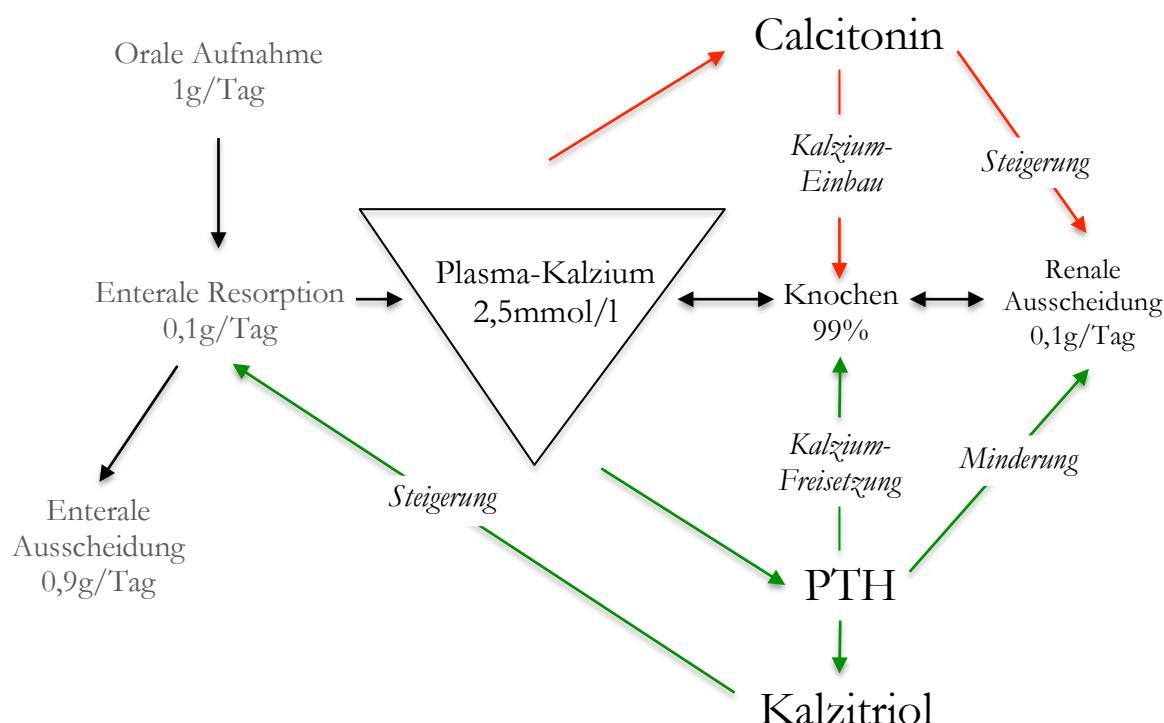


Abbildung 1 | Kalziumhomöostase

Bei ausgeglichenem Kalziumhaushalt wird enteral die gleiche Menge an Kalzium resorbiert wie renal ausgeschieden. Die Plasmakonzentration wird konstant bei 2,5mmol/l gehalten. Gleichzeitig sind geringe Mengen des skelettalen Kalziums im freien Austausch mit anderen Kompartimenten (**schwarze Pfeile**).

In der Nebenschilddrüse kann die Plasmakalziumkonzentration über einen Rezeptor gemessen werden. Im hypokalzämischen Zustand führt PTH zu einer Freisetzung von Kalzium aus dem Knochen sowie zu einer erhöhten renalen Kalziumrückresorption. Außerdem erhöht Kalzitriol PTH-abhängig die enteralen Resorptionen von Kalzium (**grüne Pfeile**). Im hyperkalzämischen Zustand wird PTH unterdrückt und Kalzitonin freigesetzt. Dies führt zu einem vermehrten Einbau bzw. verminderter Abbau von Kalzium im Knochen. Gleichzeitig wird die renale Ausscheidung gesteigert (**rote Pfeile**).

1.2.2 Intestinale Kalziumresorption

Täglich nehmen wir etwa 1g Kalzium mit der Nahrung auf. Davon werden im Bürstensaum des Dünndarms nur 10-20 % resorbiert, der restliche Anteil wird enteral ausgeschieden^[7]. Vorherrschender Mechanismus zur enteralen Kalziumaufnahme ist der parazelluläre Weg, getriggert durch einen Konzentrationsgradienten zwischen Lumen und Interstitium. Zusätzlich kann Kalzium transzellulär transportiert werden. Hier erlaubt ein luminaler Kalziumkanal den passiven Einstrom entlang des Konzentrationsgefälles. Über einen sekundär-aktiven Transport wird Kalzium im Austausch mit Natrium basolateral aus der Zelle geschleust (**Abbildung 2**)^[7,8].

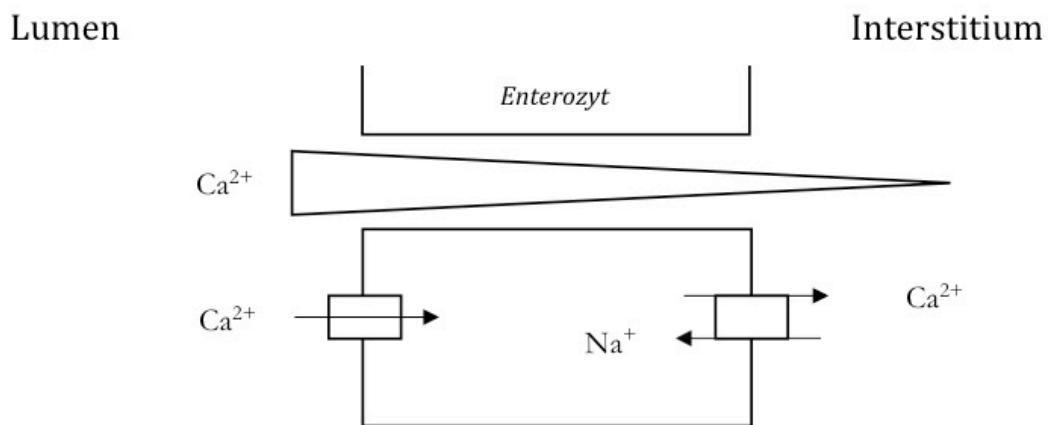


Abbildung 2 | Intestinale Kalziumresorption

Oben: Passive parazelluläre Aufnahme von Kalzium durch einen Konzentrationsgradienten zwischen Lumen und Interstitium. Unten: Transzelluläre Kalziumaufnahme mittels luminalem Kalziumkanal und basolateralem Natrium-Kalzium-Antiporter.

1.2.3 Renale Kalziumresorption

Im Laufe des Tages wird die im Plasma vorhandene Menge an Kalzium mehrfach durch die Niere filtriert und muss dementsprechend auch mehrfach, insgesamt ca. 10 g täglich, rückresorbiert werden. Hierbei spielt vor allem der parazelluläre Weg eine wichtige Rolle, da so die zytotoxischen Effekte einer zu hohen intrazellulären Kalziumkonzentration umgangen werden^[8,9]. Bei solch hohen Resorptionskapazitäten besteht die Gefahr einer Kalziumakkumulation auf der basolateralen Seite, welche die Ausfällung von Kalziumkristallen begünstigen würde. Daher stehen renale Mechanismen zur Verfügung, welche die resorbierten Kalziummengen abpuffern und somit eine Präzipitation

verhindern^[12]. In **Abbildung 3** ist ein Nephron mit seinen Hauptabschnitten und deren prozentualer Rückresorption dargestellt. Die wichtigsten zugrundeliegenden Mechanismen werden folgend kurz aufgeführt.

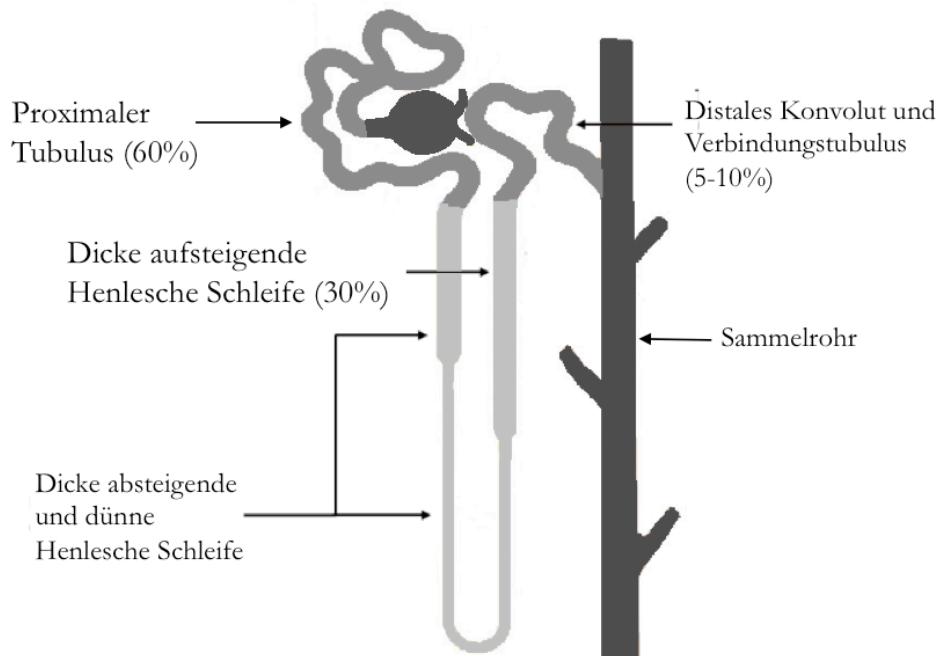


Abbildung 3 | Prozentuale Kalziumresorption entlang des Nephrons

Abhängig vom jeweiligen Tubulussegment werden unterschiedliche Mengen an Kalzium rückresorbiert.

1.2.3.1 Proximaler Tubulus

Über die Hälfte des glomerulär filtrierten Kalziums wird im proximalen Tubulus resorbiert. 80% davon gelangen passiv und hormonunabhängig über den parazellulären Weg auf die Kapillarseite. Dies ist aufgrund des dort bestehenden elektrischen und chemischen Gradienten zwischen Tubuluslumen und Interstitium durch Diffusion und *solvent drag* möglich (**Abbildung 4**). Beeinflusst wird dies vor allem durch die intratubulären Natrium- und Chlorid-Mengen sowie die gesamte Resorptionsleistung des proximalen Tubulus^[13].

Die restlichen 20 % werden aktiv über noch nicht sicher aufgeklärte Mechanismen im geraden Teil des proximalen Tubulus durch das Epithel geschleust^[9]. An beiden Wegen können PTH und Kalzitonin die Resorption steuern^[8].

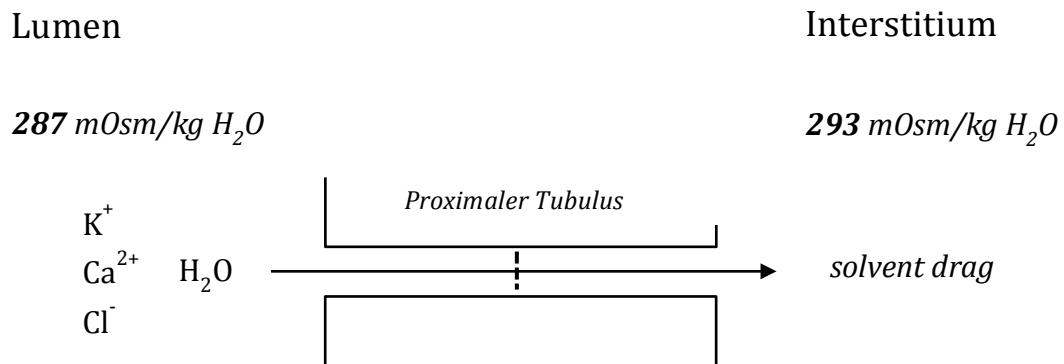


Abbildung 4 | Kalziumresorption im proximalen Tubulus

Der Einstrom von Wasser aus dem Tubuluslumen ins Interstitium entlang eines osmotischen Gradienten führt zum „Mitreißen“ (**solvent drag**) von unter anderem Kalzium-, Kalium- und Chloridionen. Der Transport findet durch hoch-selektive Schlussleisten statt.

1.2.3.2 Dicke aufsteigende Henlesche Schleife

Nach dem proximalen Tubulus findet erst wieder im dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife eine nennenswerte Kalziumresorption statt. Das Kalzium gelangt, ähnlich wie im proximalen Tubulus, parazellulär auf die Kapillarseite. Der transzelluläre Natrium-Chlorid-Transporter führt hier zur Ausbildung eines Lumen-positiven transepithelialen Potentials (bis zu +30mV), sodass die divalenten Kationen Kalzium und Magnesium über hochselektive Schlussleisten ins Interstitium getrieben werden (**Abbildung 5**).

Als Besonderheit in diesem Abschnitt des Nephrons kann Kalzium selbst regulierend auf die Resorption wirken: An der basolateralen Membran befindet sich ein Kalzium-Rezeptor (CaSR), welcher Einfluss auf die Permeabilität des Epithels nehmen kann und bei zu hohen Kalziumkonzentrationen die Resorption drosselt und umgekehrt. Im gleichen Zuge wird auch die Resorption von Natrium und Magnesium gedrosselt.

Des Weiteren wirkt PTH in den kortikalen Abschnitten stimulierend auf die Kalziumresorption, in den medullären Teilen hingegen dominiert die Wirkung von Kalzitriol [9,6].

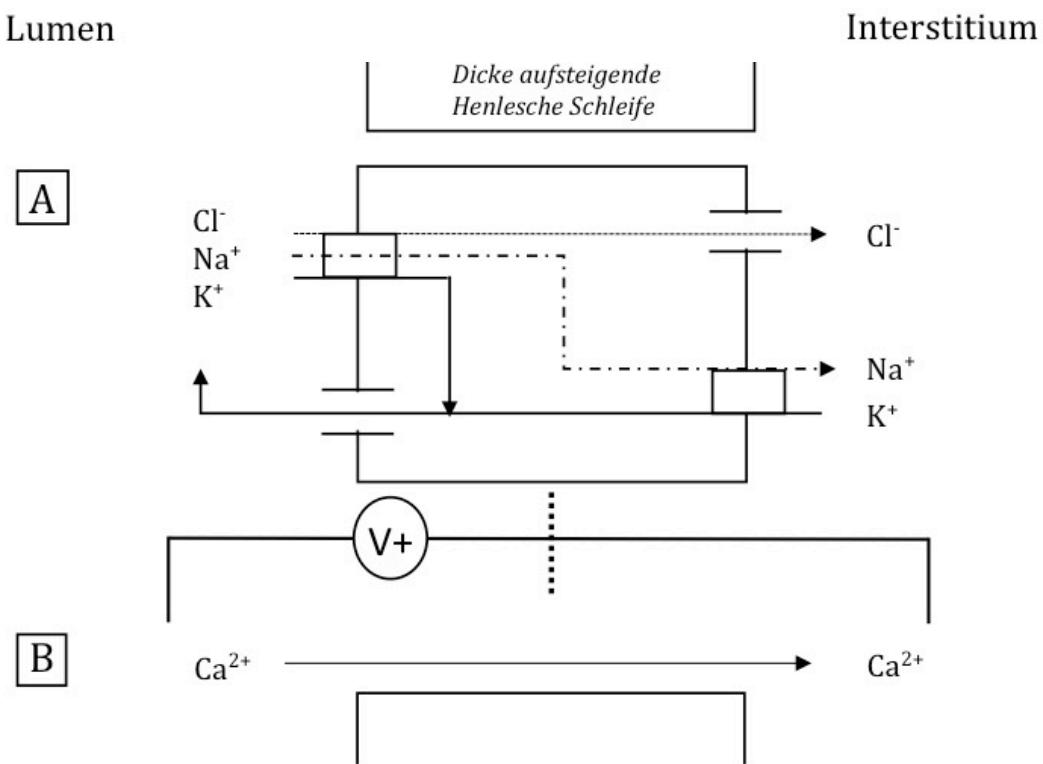


Abbildung 5 | Kalziumresorption in der dicken aufsteigenden Henleschen Schleife

A: Elektroneutrale Resorption von Natrium, Kalium und Chlorid durch den Na-K-2Cl-Cotransporter. Kalium gelangt durch einen apikalen Kanal wieder zurück ins Lumen und bedingt ein positives transepitheliales Potenzial ($V+$). B: Dies führt zu einer Resorption von Kalzium und weiteren positiv geladenen Ionen wie Magnesium und Natrium.

1.2.3.3 Distales Konvolut und Sammelrohr

Die Schlussleisten im distalen Nephronabschnitt sind undurchlässig für die meisten Substanzen, sodass die Resorption dort vor allem transzellulär abläuft. Dieser Prozess ist nur unter Aufwand von Energie möglich und findet ähnlich dem transzellulären Transport im Darm (**Abbildung 2**) über einen luminalen Kanal und einen primär- oder sekundär-aktiven Transporter auf der basolateralen Seite statt (**Abbildung 6**). Die Kalziumresorption verhält sich invers zur intraluminalen Natriumkonzentration^[14]. Auch wenn in den terminalen Nephronbereichen der geringste Anteil am gesamt resorbierten Kalzium aufgenommen wird, findet hier die stärkste Regulation durch Hormone statt: Es greifen vor allem Kalzitriol und PTH in die Resorption ein, Kalzitonin spielt nur eine untergeordnete Rolle^[9].

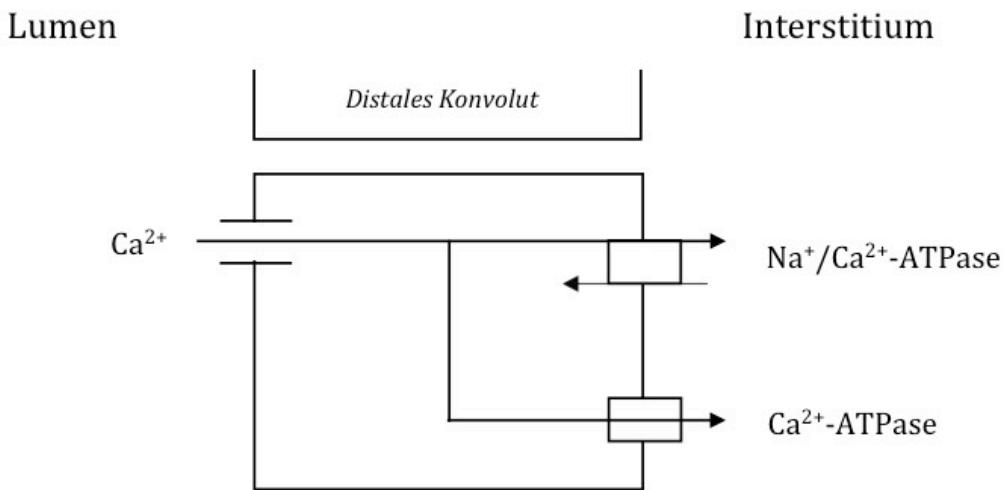


Abbildung 6 | Kalziumresorption in distalen Abschnitten des Nephrons

Ein basolateral lokalisierte Natrium-Kalzium-Austauscher sowie eine Kalzium-ATPase schleusen Kalzium gegen den Konzentrationsgradienten auf die Kapillarseite. Luminal gelangt Kalzium mit Hilfe eines Kanals in die Zelle.

1.3 Physiologische Kalzifizierung

Knochen- und Zahngewebe bestehen zu einem hohen Anteil aus schwer löslichen, alkalischen Salzen. Hierbei handelt es sich größtenteils um Kalziumphosphat- und Kalziumkarbonat-Verbindungen^[6]. Damit solche hocheffizienten und geordneten Kalzifizierungsprozesse ablaufen können, müssen die lokalen Gegebenheiten entsprechend angepasst werden. Ausschlaggebend für die Ausfällung von Salzverbindungen ist das Löslichkeitsprodukt der beteiligten Substrate. Dies ist abhängig von vielen Parametern und kann zum Teil stark variieren. Grundvoraussetzung ist jedoch eine ausreichend hohe lokale Konzentration an freien Ionen^[5]. Kalzium-Komplexbildner wie Zitrat oder Sulfat können folglich den Vorgang der Präzipitation verhindern. Weitere Inhibitoren der Präzipitation sind unter anderem Pyrophosphat oder Nephrocalcin. Auch der pH-Wert beeinflusst das Löslichkeitsprodukt: alkalisches Milieu senkt die Ausfällungsgrenze und eine Azidifizierung erschwert die Präzipitation. Des Weiteren provozieren Kristallisationskeime der extrazellulären Matrix eine Präzipitation, sodass die freien Ionenkonzentrationen lokal niedriger gehalten werden können^[7]. Häufig sind Zell-Matrix-Interaktionen ausschlaggebend für die optimalen Bedingungen zur Ausfällung von Kalziumphosphatkristallen an gewünschter Stelle (Abbildung 7)^[5].

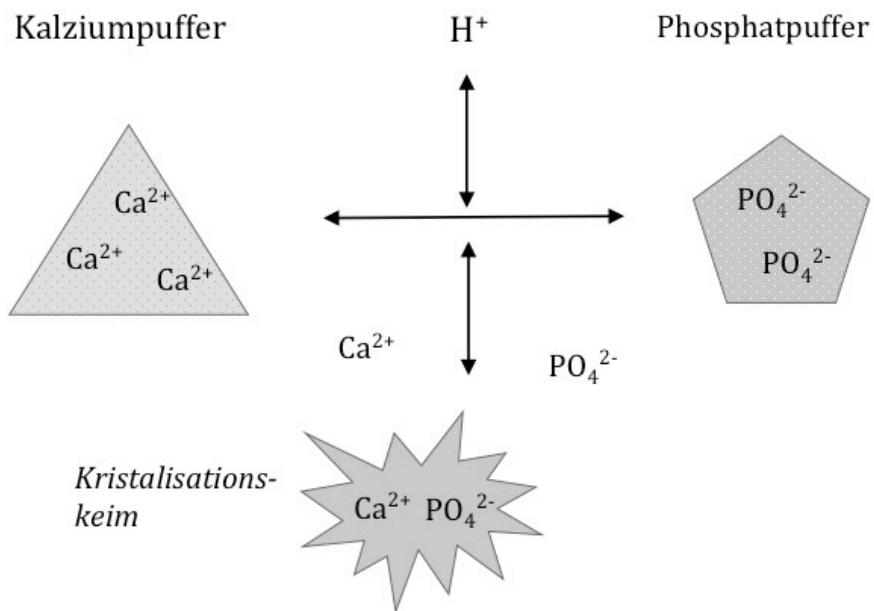


Abbildung 7 | Schema der Kalziumphosphat-Präzipitation

Sowohl Kalzium (Ca^{2+}) als auch Phosphat (PO_4^{2-}) können durch unterschiedliche Substanzen abgepuffert werden und sind somit nicht mehr frei verfügbar. Bei ausreichend hohen Konzentrationen beider Ionen kann es jedoch zur Ausfällung von Salzen kommen. Diese sind v.a. im alkalischen Milieu schwer löslich. Daher behindern Protonen (H^+) die Präzipitation. **Kristallisationskeime** erleichtern die Präzipitatbildung.

1.3.1 Knochenmineralisation

Wie anfangs beschrieben, ist der Knochen der wichtigste und gleichzeitig größte Speicher für Kalzium im Körper. Für die biomechanische Funktion des Knochengewebes ist vor allem die Matrix verantwortlich, deren Hauptbestandteile Kollagen Typ 1 und Hydroxylapatitkristalle (HAK, $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2]$) sind. Es handelt sich hierbei um kleine, hexagonale Kalziumphosphatpräzipitate.

Das notwendige Milieu zur Ausfällung von HAK wird durch die Osteoblasten, den knochenaufbauenden Zellen, reguliert. Als Gegenspieler fungieren die Osteoklasten, welche mithilfe von Säuren die Kalziumverbindungen auflösen und die organische Matrix enzymatisch abbauen. Somit sind einerseits Umbauprozesse des Knochens möglich, andererseits kann schnell Kalzium aus dem Knochen mobilisiert werden^[5].

1.3.2 Zahnmineralisation

1.3.2.1 Zahnaufbau

Für die Struktureigenschaften des Zahnes sind ebenfalls HAK verantwortlich. Die Entwicklung und der Aufbau sind aber im Gegensatz zum Knochen komplexer: Der Zahn besteht aus Krone, Hals und Wurzel. Diese werden wiederum durch unterschiedliche Gewebeanteile gebildet. Der größte Anteil besteht aus Dentin, welches im Bereich der Krone von Schmelz und im Bereich der Wurzel von Zement bedeckt wird. Im Kern des Zahnes befindet sich die Pulpa mit Gefäßen sowie Nervenendigungen (**Abbildung 8**)^[5].

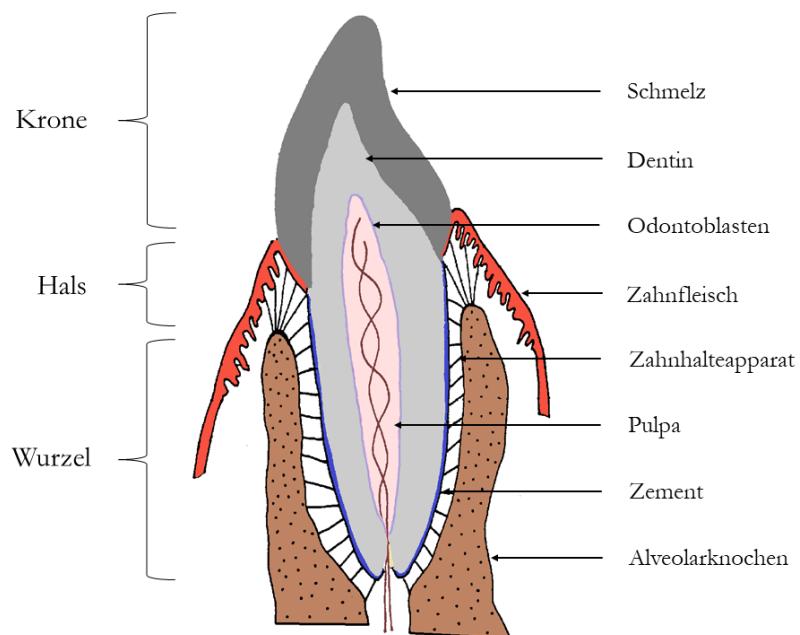


Abbildung 8 | Schematischer Aufbau eines adulten Zahnes

Neben **Krone**, **Hals** und **Wurzel** wird zwischen unterschiedlichen Hartgeweben, bestehend aus **Schmelz**, **Dentin** mit den **Odontoblasten**, **Zement** und **Alveolarknochen** sowie Weichtalgeweben wie **Zahnfleisch** und **Pulpa** mit Gefäß- und Nervenbündel, unterschieden.

1.3.2.2 Zahnentwicklung

Die physiologische Entwicklung des Zahnes setzt einen genau koordinierten Ablauf verschiedener Induktionsvorgänge voraus, bei dem ektodermale und mesenchymale Anteile miteinander kommunizieren. Im Folgenden werden die Prozesse vereinfacht dargestellt:

Zunächst produzieren die Odontoblasten am apikalsten Punkt der Zahnkrone organische Dentinmatrix, welche v. a. aus Kollagenfasern besteht. Dieses sogenannte Prädentin induziert die Differenzierung von Prä-Ameloblasten zu sekretorischen Ameloblasten, den Schmelzbildnern. Nachdem das Prädentin mineralisiert ist, beginnen die Ameloblasten ebenfalls mit der Sekretion von organischen Matrixanteilen sowie Kalzium- und Phosphat-Ionen. Proteine wie z.B. Amelogenin und Enamelin katalysieren und regulieren vermutlich die Bildung bzw. Ausrichtung der HAK. Zuletzt erlangen die Ameloblasten resorbierende Funktion und phagozytieren mit Hilfe von Proteasen die organische Matrix des Schmelzes, bevor sie apoptotisch zu Grunde gehen. Die so entstandenen Lücken werden durch weitere HAK aufgefüllt. Dadurch ist der Schmelz das härteste Gewebe im Körper und besteht zu 95% aus Mineralien. Diese Entwicklung dauert bei den bleibenden Zähnen des Menschen etwa 6 Jahre (**Abbildung 9**). Eine Störung innerhalb dieser genau abgestimmten Prozesse kann zu unterschiedlichsten Zahnfehlbildungen führen [5].

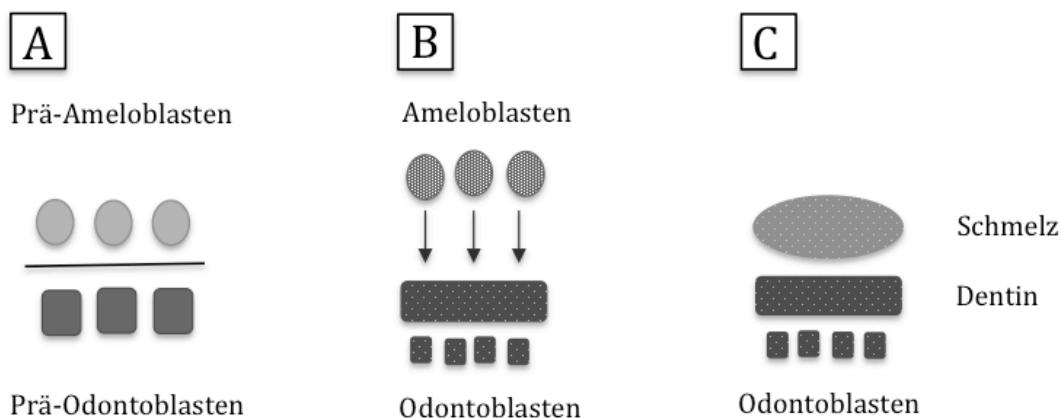


Abbildung 9 | Schmelzentwicklung des Menschen

A: **Prä-Ameloblasten** und **Prä-Odontoblasten** liegen sich gegenüber und sind nur durch die Membrana perforantia getrennt (**Linie**). **B:** Nachdem die Sekretion der Dentin-Matrix durch die Odontoblasten begonnen hat, differenzieren sich die Prä-Ameloblasten ebenfalls zu sekretierenden Zellen und synthetisieren die organische Schmelzmatrix (**Pfeile**). **C:** Im adulten Zahn liegen Schmelz und Dentin direkt nebeneinander. Die Ameloblasten gehen am Ende ihrer Reifung apoptotisch zu Grunde, sodass der Schmelz keine Möglichkeit zur Regenerierung hat.

1.3.2.3 Unterschiede des Mausgebisses

Die Koordination der Zahnentwicklung bei der Maus gleicht der des Menschen, läuft jedoch schneller ab, sodass die Entwicklung des Schmelzorgans am 23. Tag der Embryonalphase abgeschlossen ist [15]. Des Weiteren wachsen die Schneidezähne von Nagern lebenslang nach, da die Ameloblasten nach Reifung des Schmelzes keine Apoptose betreiben. Somit sind alle

Stadien der Schmelzentwicklung auch im adulten Altern zu beurteilen [16]. Interessanterweise haben Nagetiere nur auf der labialen Seite der Schneidezähne Schmelz [17]. Als weiteren Unterschied ist der differente Eisengehalt des Schmelzorgans hervorzuheben. Dieser ist bei den Nagern mit einem Anteil von etwa 0,03 % sehr viel höher als beim Menschen und bedingt die gelbe Pigmentierung der Schneidezähne. Der Eisengehalt verhält sich außerdem invers zum Kalziumgehalt und sorgt für eine erhöhte Säureresistenz der Zähne. Die Basisstruktur des menschlichen und murinen Schmelzes ist jedoch identisch (**Abbildung 10**) [18–20].

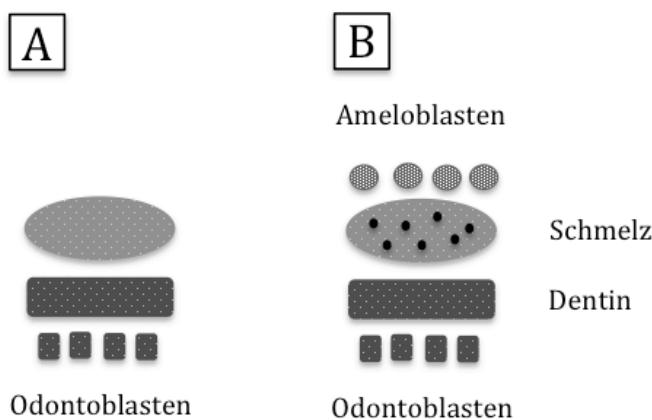


Abbildung 10 | Schmelzunterschiede zwischen menschlichen und murinen Zähnen

A: Menschlicher Schneidezahn mit Schmelzorgan, Dentin und Odontoblastenepithel. **B:** Der murine Schneidezahn besitzt zusätzlich ein Ameloblastenepithel und in den Schmelz sind vermehrt Eisenkomplexe eingelagert (**schwarze Punkte**).

Ergänzend besteht noch ein Unterschied im menschlichen und murinen Gebiss: Während ersteres aus jeweils drei Molaren, zwei Prämolaren, einem Eckzahn und zwei Schneidezähnen pro Unterkieferhälfte besteht, haben Mäuse nur drei Molaren und einen Schneidezahn sowie ein zahnloses Diastema (**Abbildung 11**) [20].

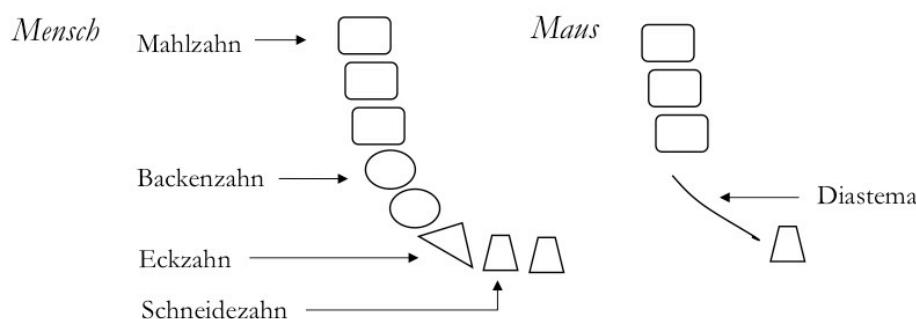


Abbildung 11 | Schema eines adulten menschlichen und murinen Gebisses, Oberkieferhälfte
Das Diastema ist ein zahnloser Bereich bei Mäusen.

1.4 Pathologische Kalzifizierung

Kalzium ist ein sehr reaktives Ion und neigt spontan zur Ausbildung von Mikrokristallen. Die physiologischen Kalzium- und Phosphatkonzentrationen im Plasma wären ausreichend hoch für diesen Prozess. Allerdings agieren verschiedene Stoffe, vor allem Proteine, als Inhibitoren dieser Reaktion. Dazu gehören z.B. Magnesium, Fetuin A und Osteoprotegerin. Es handelt sich bei den Kalzifizierungsprozessen im menschlichen Organismus also nicht um passiv ablaufende Vorgänge, sondern vielmehr um hoch kontrollierte Mechanismen in Abhängigkeit von Inhibitoren und Promotoren, welche wiederum unter der Kontrolle von unterschiedlichen Genen stehen. Pyrophosphat (PP_i), ein Inhibitor der Kalzifizierung, wird z.B. durch die Ektoneukleotid-Pyrophosphatase sowie das Progressive ankylosis protein homolog reguliert [9,21–25]. Des Weiteren nehmen elastische Fasern aufgrund ihres langsamen Umbaus sowie der Fähigkeit Kalzium zu binden, Einfluss auf die Homöostase der Extrazellulärmatrizen (EZM). Wichtig hierbei sind u.a. die Eigenschaften der in den elastischen Fasern vorhandenen Proteoglykane (PG) und Glykosaminoglykane (GAG) [26].

In diesem Zusammenhang spielen mesenchymale Zellen eine Schlüsselrolle, indem sie regulatorische Proteine synthetisieren sowie sezernieren und damit verantwortlich für das extrazelluläre Milieu sind. Gleichzeitig können aber auch ursprünglich lokal vorhandene Substanzen durch hämatogene Zirkulation systemisch wirken und somit einen Effekt auf die Kalzium- und Phosphat-Homöostase in anderen Geweben haben. Außerdem konnte für glatte Muskelzellen der Gefäße unter bestimmten Bedingungen eine Differenzierung zu Osteoblasten nachgewiesen werden. Dabei ändert sich das Expressionsmuster der Zellproteine und Kalkablagerungen werden gefördert [26,27].

Unter pathologischen Bedingungen ist es möglich, dass Kalziumkristalle in sämtlichen Weichteilgeweben ausfallen und spezifische Erkrankungen bedingen. Entzündungszellen sind z.B. in der Lage Mikrovesikel zu sezernieren, welche ähnlich wie im Knochen, Mineralisierungsprozesse antreiben. Diese Entzündungsvorgänge können beispielsweise zu Kalkeinlagerungen in der Schulter führen (Tendinosis calcarea). Andererseits kann es durch eine Entzündungsreaktion aber auch zum Knochenabbau kommen, wie bei einer Osteomyelitis. Somit hängen eine insuffiziente Mineralisation sowie übermäßige Kalkablagerung unweigerlich zusammen [28].

1.4.1 Amelogenesis Imperfecta

Ein Krankheitsbild, welches mit einer insuffizienten Mineralisation einhergeht, ist Amelogenesis imperfecta (AI). Es handelt sich hierbei um eine heterogene Gruppe von kongenitalen Erkrankungen mit Störungen der Schmelzbildung und pathologischen Formen des Gebisses. Die Klinik der Patienten ist höchst variabel: Es können entweder nur die Milchzähne betroffen sein und/oder auch das adulte Gebiss. Überdies sind in manchen Fällen auch Pathologien außerhalb des Schmelzorgans nachweisbar, wie z.B. Pulpasteine oder Zementdefekte. Häufig ist auch die Dentition abnorm. Die Vererbungsmodi verlaufen autosomal dominant, rezessiv oder x-chromosomal [29–31]. AI bedingt eine erschwerete Mundhygiene und einen sehr schlechten Zahnstatus. Dies führt bei den betroffenen Patienten oft zu einem verminderten Selbstwertgefühl und dem Verlust von Lebensqualität. Außerdem geht die Erkrankung mit einer erhöhten Morbidität einher [32].

Bereits identifizierte Proteindefekte welche AI verursachen sind unter anderem Mutationen im *AMELX*-, *ENAM*-, *MMP20*- und *KLK4*-Genlokus. Neben der rein oralen Manifestation kann AI auch Syndrom-assoziiert vorkommen, wie bei der Tricho-Dento-Ossären Dysplasie, dem Jalili-Syndrom oder dem Enamel-renal syndrome, welches Thema dieser Forschungsarbeit ist [30,31,33–36].

1.4.2 Nephrokalzinose

Während bei der AI eine Mindermineralisation des Gewebes vorliegt, kann es in den Nieren zu unphysiologischen Kalkablagerungen kommen. Diese liegen entweder intratubulär, also im Lumen vor und werden als Nephrolithiasis (NL) bezeichnet, oder in Form von diffusen ektopen Verkalkungen im Interstitium, auch Nephrokalzinose genannt (engl. nephrocalcinosis, NC). Die Pathogenese beider Krankheitsbilder ist häufig unabhängig voneinander und multifaktoriell bedingt. Eine typische Auffälligkeit beider Erkrankungen ist jedoch das gehäufte Vorkommen einer Hyperkalziurie [12,37].

Risikofaktoren für die Entstehung von NL und NC bei Erwachsenen sind vor allem erworbene metabolische Störungen wie eine erhöhte Insulinresistenz oder ein gestörter Fettstoffwechsel. Bei Kindern haben die Erkrankungen vor allem genetische Ursachen. Ein erhöhtes Risiko geht auch mit einem verminderten Urinvolumen oder Epithelschäden durch z.B. nephrotoxische Medikamente oder Durchblutungsstörungen einher [37]. Ungewollte

Kalkablagerungen in der Niere sind ernsthafte Diagnosen und erhöhen das Risiko an einer chronischen Niereninsuffizienz zu erkranken um bis zu 60%. Des Weiteren sind sie mit einem signifikanten Morbiditätsanstieg assoziiert [12]. Die Diagnose von NL und NC wird im klinischen Alltag standardmäßig radiologisch mittels Sonographie oder Computertomographie gestellt [38].

Intratubuläre Steine entstehen beispielsweise durch Übersättigung des Primärharns mit Kalzium, Phosphat oder Oxalat. Anfällig für Präzipitate sind vor allem die distalen Abschnitte des Nephrons, da dort die Ionenkonzentrationen im Tubulus am größten sind, sodass NL häufig innerhalb des Nierenkelch- oder Nierenbeckensystems vorkommt. Auch pH-Wert-Erhöhungen und Proteaseaktivität können eine Akkumulation begünstigen. Die Niere kann eine Übersättigung auf unterschiedliche Wege verhindern, indem z.B. die intraluminale Wassermenge erhöht und somit die Ionenkonzentration gesenkt wird. Im Falle des Kalziums geschieht dies durch Aktivierung des Kalzium-Rezeptors, welcher die Wirkung anti-diuretischer Hormone reduziert und somit das Urinvolumen erhöht. Des Weiteren hemmen unterschiedliche Moleküle im Urin wie Zitrat, Magnesium oder auch größere Proteine die Kristallbildung und kontrollieren deren Aggregation und Wachstum. Wird die Niere aber in ihrer Funktion eingeschränkt, wie z.B. bei einer Glomerulonephritis, können diese Kompensationsmechanismen nicht mehr in vollem Maße greifen und die Entstehung von NL begünstigen [12,35,39].

Die Pathogenese der interstitiellen Verkalkung ist noch nicht so fundiert erforscht. NC kommt häufig im Rahmen genetischer Erkrankungen vor, welche mit metabolischen Anomalitäten oder anatomischen Besonderheiten assoziiert sind. Hinsichtlich der genauen Mechanismen zur Bildung von Präzipitaten im Interstitium gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze. Einerseits wäre eine *de novo* Bildung von Kristallen durch chemisch getriebene oder zellulär regulierte Abläufe denkbar. Hierbei ist die Theorie von initialen Ablagerung sog. *Randall's Plaques* an der basolateralen Membran der dünnen Henleschen Schleife verbreitet, welche dann von dort aus wachsen und sich im Interstitium ausbreiten. Ebenso könnte eine Translokation von Kristallen aus dem Tubuluslumen ins Interstitium möglich sein, welche dann eine weitere Präzipitation triggert [12,35,39-41].

Eine wichtige Rolle bei der Entstehung von interstitiellen Verkalkungen sind Unregelmäßigkeiten innerhalb des epithelialen Zellverbandes, welche sowohl die

Zellfunktion als auch den parazellulären Weg beeinflussen. Dies führt zu einem Ungleichgewicht von protektiven und triggernden Faktoren^[39].

In der Regel sind ektope Kalzifizierungen des Interstitiums in der Medulla lokalisiert. Ursächlich hierfür ist die dort ablaufende Resorption von Kalzium in der dicken aufsteigenden Henleschen Schleife sowie die Regulation des Säure-Basen-Haushaltes im Sammelrohr, welcher ebenfalls Einfluss auf die Ausfällung von Präzipitaten nimmt. In kortikalen Abschnitten kommt NC selten vor und kann z.B. durch eine Gewebedestruktion im Rahmen einer Pyelonephritis oder chronischen Glomerulonephritis entstehen. Häufige Ursachen für NC sind der Hyperparathyreoidismus, die distale renal-tubuläre Azidose und die angeborene Markschwammniere^[39,40].

1.5 Enamel-Renal Syndrome

Ein in dieser Arbeit thematisierter, noch nicht lange bekannter und nur wenig erforschter Symptomkomplex ist die Assoziation von Amelogenesis imperfecta in Kombination mit Nephrokalzinose (engl. Enamel-renal syndrome, ERS). Der Zahnphänotyp betrifft die Milch- sowie bleibenden Zähne und kann zusätzlich zu Fehlbildungen von Zement, Dentin, Pulpa und Schmelz, einer gelblichen Verfärbung der Zähne sowie Zahnfleischhypertrophie führen. Anders als bei vielen Erkrankungen die mit NC assoziiert sind, liegen die Blutparameter alle im Normbereich und die Patienten weisen eher eine verminderte renale Kalziumausscheidung auf. In multiplen Fallbeschreibungen zum ERS wurde die Diagnose einer NC schon vor den ersten Symptomen einer beginnenden Niereninsuffizienz gestellt. Man kann somit davon ausgehen, dass ein ERS nur zum kleinen Teil bei Patienten mit Amelogenesis imperfecta diagnostiziert wird. Hypothesen zur Ursache der pathologischen Mineralisation in Niere und Zahn gehen von Störungen der interstitiellen Matrix hinsichtlich der Kalziumhomöostase aus^[2,3,36,42].

Beim ERS handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, welche durch einen homozygoten Funktionsverlust von FAM20A verursacht wird. Codiert wird das Protein im Genlokus 17q24. Das Protein besteht aus 11 Exons, welche bei Maus, Ratte und Mensch identisch sind und ist insgesamt 541 Aminosäuren lang^[2,36]. Immunoblotting identifizierte FAM20A als sekretiertes Glykoprotein. Die Sekretion des Proteins setzt dabei eine richtige Signalsequenz voraus, sodass FAM20A bei einer Mutation nicht mehr sekretiert werden kann^[4]. Des Weiteren konnte eine intrazelluläre Lokalisation zum Golgi-Apparat nachgewiesen

werden [42]. Das Expressionsmuster ist nach bisherigem Stand auf folgende Gewebe beschränkt: Lunge, Leber, Niere, Larynx, Hoden und Thymus sowie Ovar und Nebenschilddrüse [4,43]. Im Blut und Speichel ist es nur marginal nachzuweisen [44]. *In situ* Hybridisierung von *Fam20a*-mRNA und Immunolokalisation in murinen Schneidezähnen konnten das Protein in sekretierenden und reifen Ameloblasten sowie im Bindegewebe des Zahnfleisches, der Pulpa und Odontoblasten nachweisen. Ebenso in der Niere und dort v.a. in den renalen Tubuli und der Bowmannkapsel des Kortex, jedoch nicht in den glomerulären Kapillaren [3,4,36,45].

Bereits etablierte FAM20A-Knockout-Mausmodelle (KO) brachte die Erkenntnis, dass der Schmelzdefekt von KO mit einem Untergang des Ameloblastenepithels einhergeht. Stattdessen konnten dort wenig mineralisierte, multilobuläre Schmelzkörper-ähnliche Strukturen nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden ubiquitäre Verkalkungen in den muskulären Arterien, vor allem in der Niere, dargestellt. Außerdem besaßen die KO-Mäuse eine geringere Menge an Glykogen in den Hepatozyten, welches auf eine Malnutrition hinwies. Zusätzlich waren die KO-Mäuse kleiner und die Population wichen zugunsten von den Wildtyp-Tieren (WT) von der Mendelschen Segregationsregel ab. Das Verhalten sowie sämtliche Plasmaparameter und die Knochendichte waren unauffällig [43,46].

In unserer Forschungsgruppe konnten Untersuchungen an Fibroblastenkulturen von gingivalen Zellen betroffener Patienten eine erhöhte N-acetyl-Galactosamin-Transferase-I Aktivität (GalNAcT-I) nachweisen. Es handelt sich dabei um ein Schlüsselenzym der Chondroitinsulfat (CS) Synthese, welches Bestandteil bestimmter GAG ist und dadurch die Eigenschaften der EZM beeinflusst [26,45].

Das mit FAM20A verwandte Protein FAM20C führt zu einem ähnlichen Zahnpänotyp wie beim ERS, sodass Untersuchungen hinsichtlich einer Interaktion beider Proteine durchgeführt wurden. Diese brachten die Erkenntnis, dass FAM20A zum einen ein allosterischer Aktivator von FAM20C ist und dessen katalytische Funktion positiv beeinflusst [47]. Zum anderen konnte belegt werden, dass ein intaktes FAM20A-Protein unabdingbar für die Sekretion von FAM20C ist [48]. Welche weiteren Funktionen FAM20A zugeschrieben werden können, ist bisher noch nicht geklärt (**Abbildung 12**).

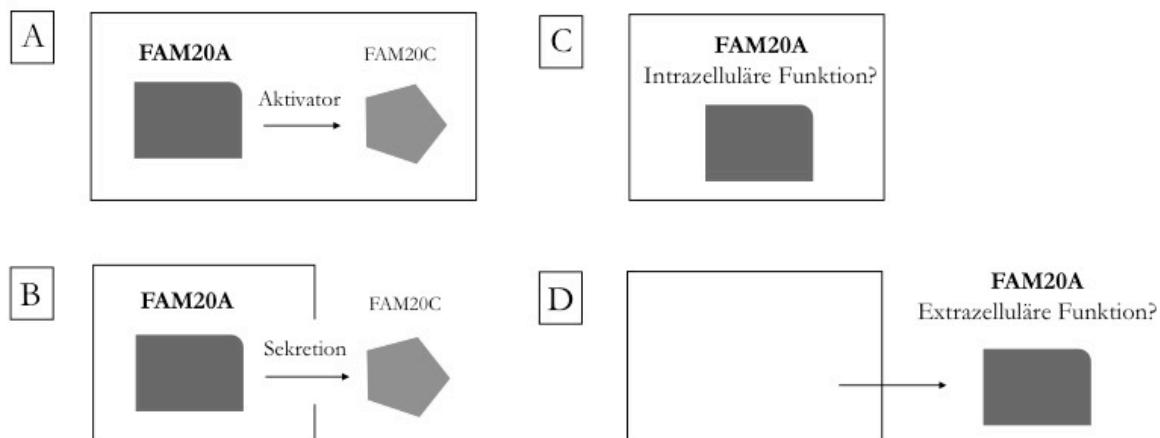


Abbildung 12 | Funktionen von FAM20A

A: FAM20A fungiert als Aktivator der katalytischen Funktion von FAM20C. **B:** FAM20A ist außerdem notwendig für die Sekretion von FAM20C. **C + D:** Besitzt FAM20A noch weitere intrazelluläre und/oder extrazelluläre Funktionen im Organismus?

1.5.1 FAM20-Proteinfamilie

Wie an den oben dargestellten Forschungsergebnissen erkennbar ist, interagieren einzelne Mitglieder der „family with sequence similarity 20“ Proteinfamilie miteinander. Daher ist ein Blick auf die Abstammung der FAM20-Familie und auch auf die Geschwisterproteine FAM20B und FAM20C interessant, dessen Funktionen im sekretorischen Stoffwechselweg der Zelle bereits partiell erforscht sind.

Alle drei FAM20-Proteine stammen von einem gemeinsamen Vorfahren-Gen ab. Die Gene enthalten nicht nur ähnlichen Exons sondern auch eine gleiche, am Carboxy-Terminus gelegene Domäne von etwa 350 Aminosäuren. Außerdem besitzen Mensch und Maus orthologe Gene für die Proteine [4].

FAM20B wird in vielen Geweben exprimiert, ist Teil des Golgi-Apparates und phosphoryliert Xylose-Reste von extrazellulären GAG. Es kontrolliert sowohl die Menge als auch die Länge der GAG und nimmt so vor allem Einfluss auf die Produktion und Entwicklung der Knorpelmatrix. Denn die biomechanische Funktion des Knorpels hängt unter anderem von der wasserbindenden Eigenschaft der GAG ab. Ein Funktionsverlust von FAM20B führt im Mausmodell zu postnatalen Ossifizierungs-Defekten, Störungen des Längenwachstums von Röhrenknochen sowie zu übermäßigem Wachstum des Gelenkknorpels. Beim Menschen

konnte bisher noch kein spezifisches Krankheitsbild nachgewiesen werden, welches mit einer *FAM20B*-Mutation einher geht [4,49,50].

FAM20C hat ein ähnliches Expressionsmuster wie *FAM20B* und auch die Funktion entspricht der einer Kinase. Außerdem konnte *FAM20C* als extrazelluläres Matrixprotein identifiziert werden, welches Kalzium bindet und somit für den Biomineralisationsprozess unentbehrlich ist [4,51,52]. Ein Funktionsverlust beider Allele führt zum sog. Raine-Syndrom, welches mit einer letalen osteosklerotischen Knochendysplasie und ektopen Kalzifizierungen einhergeht. Der Tod tritt häufig während der Neonatalperiode auf und zeigt eindeutig die Unentbehrlichkeit des Proteins für einen physiologischen und lebensnotwendigen Mineralisationsprozess beim Menschen. Im Mausmodell zeigten sich neben einer erhöhten Mortalität der Tiere auch physischer Minderwuchs sowie Verhaltensauffälligkeiten. Der Zahnpheotyp weist, ähnlich wie bei ERS-Patienten, Schmelzdefekte bis hin zu Schmelzverlust auf. Auch im Blut konnten Auffälligkeiten festgestellt werden: die Aktivität der alkalischen Phosphatase war erhöht und die Konzentrationen von Kalzium und Phosphat vermindert [43,45,49].

Erkennbar ist, dass auch der Funktionsverlust von *FAM20B* und *FAM20C* zu erheblichen Funktionsstörungen der EZM und pathologischen Kalzifizierungen führt, welche insgesamt mit einer frühzeitigen Letalität verbunden bzw. nicht mit dem Leben vereinbar sind. Welche Aufgabe *FAM20A* bei diesen Vorgängen zuteilwird, kann hoffentlich in naher Zukunft aufgedeckt werden.

1.6 Fragestellung der Forschungsarbeit

Das Wissen über die Funktion von *FAM20A* und insbesondere über seine Rolle bei Kalzifizierungsprozessen im menschlichen Körper ist bisher noch unvollständig. Daher möchte ich in dieser Forschungsarbeit funktionelle und morphologische Daten über den Einfluss von *FAM20A* auf den Kalziumhaushalt und die damit verbundenen Pathologien erheben. Das Hauptaugenmerkt liegt dabei auf der Nierenfunktion und der Entstehung von Nephrokalzinose. Da es sich bei den Mechanismen der Ionenhomöostase um ein komplexes Zusammenspiel vieler Parameter handelt, wurden Untersuchungen im Gesamtorganismus Maus unternommen.

Dafür wurde ein neues FAM20A-Knockout-Mausmodell unter folgenden Fragestellungen charakterisiert:

- Leiden die Mäuse an Schmelzdefekten?
- Zeigen sich histologische oder funktionelle Auffälligkeiten in der Niere, vor allem hinsichtlich der Kalziumhomöostase oder ektoper Mineralisierungen?
- Wie wirken sich Änderungen der Kalzium- und Natriumzufuhr auf die Nierenfunktion aus?
- Sind körperliche Beeinträchtigungen oder Verhaltensauffälligkeiten der Tiere zu beobachten?

Diese Erkenntnisse könnten von großer Bedeutung für das Verständnis von Erkrankungen im Bereich des Kalziumhaushaltes oder von Mineralisierungsdefekten sein, sodass möglicherweise Rückschlüsse auf Methoden zur Heilung oder symptomatischen Therapie gezogen werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Sämtliche im Kapitel 2 erwähnten Chemikalien stammen, wenn nicht anders bezeichnet, von Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) sowie Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland) und entsprechen dem höchsten Reinheitsgrad. Zusätzlich verwendete Chemikalien sind in **Tabelle 1** gesondert aufgelistet.

Tabelle 1 | Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Proteinase K (20mg/ml)	SERVA Electrophoresis
DNAse freies Wasser	Carl Roth
10x DreamTaq Puffer	Promega Corporation
Taq-Polymerase	Promega Corporation
Primer	Eurofins Genomic
Isofluran	Baxter Healthcare Corporation
Heparin-Natrium (25000 I.E./5ml)	Ratiopharm
Mowiol-DABCO	Carl Roth

2.2 Lösungen

Tabelle 2 | Lösungen

Lösungen	Inhalt
Lysispuffer	50mM Tris, pH 8 10mM EDTA, pH 8 100mM Natriumchlorid
4% PFA	Paraformaldehyd 4% Phosphat Buffer Solution (PBS)
Eichlösung Gonotec Calibration Standart	Natriumchlorid 850 mOsmol/kg H ₂ O
Lithiumstandard	500 mmol/l Lithium

2.3 FAM20A-Knockout-Maus

Die FAM20A-Knockout-Maus wurde vom Knockout Mouse Project Repository der University of California (*Davis*) hergestellt. Dabei wurde die Zielregion, das Exon 2 von *Fam20a*, homolog rekombiniert. Das Konstrukt enthielt einen LacZ-Reporter sowie eine Neomycin-Resistenz und war darüber hinaus mit lox-P- und FRT-Sequenzen zur Rekombination flankiert. Dies führt zum Verlust der Proteinfunktion, indem die Transkription nach dem LacZ-Reporter beendet wird. Das Konstrukt ermöglicht aber auch eine Veränderung des Mutationsstatus: Verpaarung mit einer Flipase-Maus führt zu einer konditionalen Wiederherstellung der Genaktivität durch Ausschneiden des LacZ-Reporters. Wird anschließend ein Cre-Stamm eingekreuzt, führt dies zu einem dauerhaften Funktionsverlust des Gens in den entsprechenden Geweben (**Abbildung 13**).

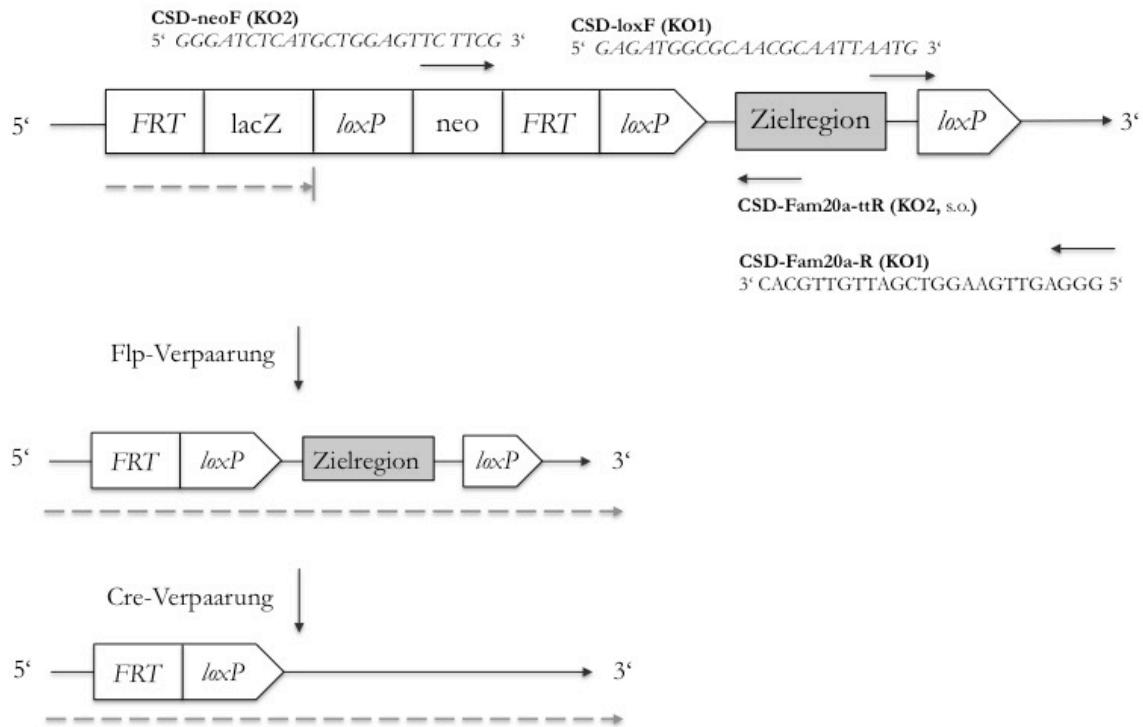
In dieser Arbeit wurde nur die ursprüngliche Mauslinie verwendet. Um die Zuchlinie aufrecht zu erhalten, wurden Heterozygoten-Verpaarungen angesetzt. Als genetischer Hintergrund dienten C57BL/6N Mäuse. Die Aufzucht der FAM20A-Linie fand unter Standardbedingungen in isoliert belüfteten Käfigen (Isolated Ventilated Cages, IVC) im Victor-Hensen Haus (VHH), dem Tierhaus der vorklinischen Institute der CAU Kiel, statt.

Im Folgenden werden die Genotypen mit KO für Knockout und WT für Wildtyp abgekürzt.

WT



KO

**Abbildung 13 | Mutationsstatus der FAM20A-Zuchlinie mit Primern**

WT mit **Zielregion** (*Fam20a*, Exon 2) und Primern (**CSD-Fam20a-F**, **CSD-Fam20a-ttR**). KO mit **Zielregion**, Primern (**KO1: CSD-loxF**, **CSD-Fam20a-R**; **KO2: CSD-neoF**, **CSD-Fam20a-ttR**) und **lacZ**-Reporter (**lacZ**), **Neomycin-Resistenz** (**neo**) sowie **loxP**-Schnittstelle für **Cre**-Mäuse (**Cre**) und **FRT**-Schnittstellen für **Flipase**-Mäuse (**Flp**). Hinter lacZ wird die Transkription abgebrochen. Paarung mit **Flipase**-Mäusen führt zur Wiederherstellung der Genfunktion. Erneute Paarung mit **Cre**-Mäusen führt zum endgültigem Verlust der Zielregion. **Gestrichelter Pfeil**: abgelesener Genabschnitt.

2.3.1 Genotypisierung

Die Genotypisierung der FAM20A-Zucht wurde mit DNA-Fragmenten aus der Schwanzspitze durchgeführt. Das Gewebe wurde zunächst bei 56°C über Nacht im Thermoschüttler mit Lysispuffer, 10%iger Natriumlaurylsulfat-Lösung und Proteinase K

inkubiert. Nach Zentrifugation erfolgte die Ausfällung der DNA-Fragmente in 70%iger Ethanol-Lösung und die Übertragung in DNase-freies Wasser. Anschließend wurden die Proben mittels PCR in drei unterschiedlichen Ansätzen repliziert:

1. **WT**-Ansatz mit Vorwärtsprimer *CSD-Fam20a-F* (5'-3' TTCCTACTTGCATGTCTCCT CCCC) und Rückwärtsprimer *CSD-Fam20a-ttR* (3'-5' TTAGGAGTTCAAATCTAGCCCCA GC). Es entstand ein DNA-Fragment von 571 bp.
2. **KO1**-Ansatz mit Vorwärtsprimer *CSD-loxF* (5'-3' GAGATGGCGAACGCAATTAAAT G) und Rückwärtsprimer *CSD-Fam20a-R* (3'-5' CACGTTGTTAGCTGGAAAGTTGAGGG). Es entstand ein DNA-Fragment von 377 bp.
3. **KO2**-Ansatz mit Vorwärtsprimer *CSD-neoF* (5'-3' GGGATCTCATGCTGGAGTTCTTC G) und Rückwärtsprimer *CSD-Fam20a-ttR* (s.o.). Es entstand ein DNA-Fragment von 568 bp.

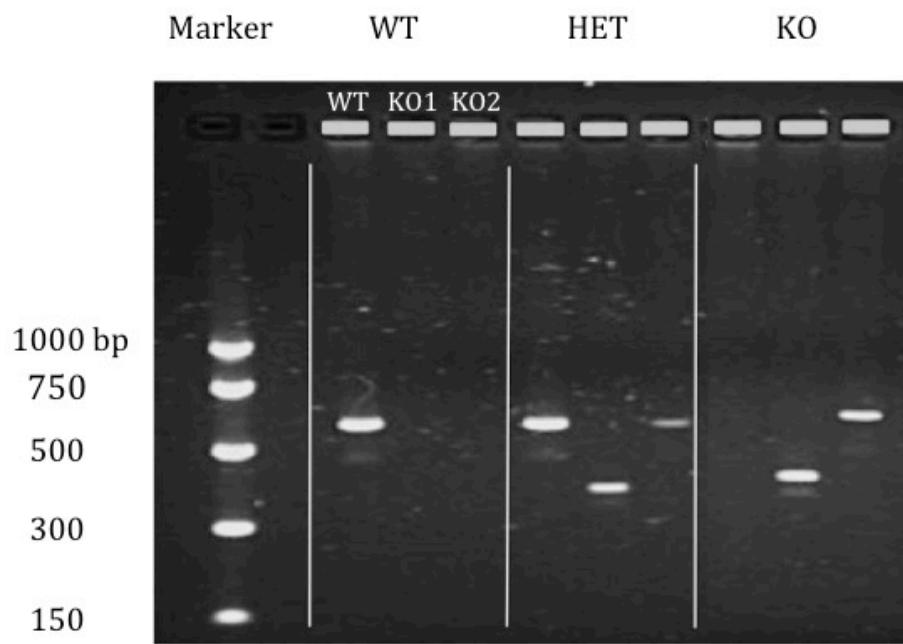
Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in 1,8%igem Agarose-Gel bei 120 Volt für 50 Minuten. Dargestellt wurden die Banden der jeweils drei PRC-Reaktionen unter UV-Licht:

1. **WT**: nur eine Bande mit 571 bp in der WT-PCR
2. **KO**: jeweils eine Bande mit 377 bp und 568 bp in der KO1- bzw. KO2-PCR
3. **HET**: alle drei Banden (WT, KO1 und KO2)

Die Verwendung beider KO PCR-Ansätze dienten zur Sicherstellung der Anwesenheit des vollständigen Konstrukts in der Zuchtlinie (**Abbildung 13 und 14, Tabelle 3**).

Tabelle 3 | Schema der PCR-Replikation, FAM20A-Genotypisierung

PCR Ansatz	Programm	
2,5 µl 10x DreamTaq Puffer	94 °C	5 Minuten
0,125 µl DreamTaq Polymerase [5 U/µL]	94 °C	15 Sekunden
2,5 µl dNTP [2 mM]	56 °C	30 Sekunden
0,325 µl DMSO	72 °C	40 Sekunden
1 µl Magnesiumchlorid [25 mM]	72 °C	5 Minuten
0,5 µl Primer forward [1,3 mM]	4 °C	∞
0,5 µl Primer reverse [1,3 mM]		
15,55 µl Aqua dest.		
2 µl Probe		

**Abbildung 14 | Originalbild der FAM20A-Genotypisierung**

Darstellung der PCR-Banden unter UV-Licht. Wildtyp: nur **WT**-Bande, Heterozygot: **WT**-, **KO1**- und **KO2**-Bande; Knockout: **KO1**- und **KO2**-Bande; **bp**: Basenpaare.

2.4 Metabolischer Versuch

Der metabolische Versuch diente dem Vergleich von WT- und FAM20A-KO-Tieren hinsichtlich der Kalziumhomöostase unter physiologischen Umständen sowie unter systematischer Veränderung der Elektrolytzufuhr. Hierfür erhielten die Versuchstiere neben dem normalen Standardfutter auch Spezialfutter mit unterschiedlichem Kalzium- und Natriumchloridgehalt. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf dem renalen Kalziumstoffwechsel. Die Aufnahme von Wasser und Nahrung sowie die Ausscheidung wurden mit Hilfe eines speziell angefertigten metabolischen Käfigs beurteilt (s.u.). Die Versuchsdurchführung geschah unter definierten Standardbedingungen (Temperatur $22,6 \pm 0,11$ °C; Luftfeuchtigkeit $56,8 \pm 1,13$ %; Tag-Nacht-Rhythmus 12 Stunden) über 72 Stunden in einem *ScanClime*-Haltungssystem (Scanbur, *Dänemark*). Insgesamt wurden 107 Mäuse in das Tierversuchsvorhaben aufgenommen, wobei Daten von 96 Tieren erhoben werden konnten. Ausschlusskriterien waren schlechtes Trink- und Fressverhalten sowie zu großer Gewichtsverlust, vorzeitiger Tod und nicht verifizierter Genotyp.

Das Tierversuchsvorhaben wurde durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein unter der Nummer V 242-7224.121-2 (74-7/16) genehmigt.

2.4.1 Diätfutter

Neben dem normalen Tierfutter erhielten die Mäuse wie bereits erwähnt auch spezielles Diätfutter. Dabei entsprach die Kontrolldiät dem Standardfutter im Tierhaus. Die Spezialdiäten hatten beide einen Natriumchlorid-Anteil von $\leq 0,04\%$. Der Kalziumgehalt hingegen lag bei 4,5% ($\downarrow \text{NaCl}/\uparrow \text{Ca}^{2+}$ -Diät) bzw. $\leq 0,04$ ($\downarrow \text{NaCl}/\downarrow \text{Ca}^{2+}$ -Diät; **Tabelle 4**).

Die Diäten wurde für insgesamt 10 Tage verabreicht: 1 Woche während der IVC Haltung in Pelletform und drei weitere Tage auf dem metabolischen Käfig in Mehlfom.

Hergestellt wurden die Diäten von der ssniff Spezialdiäten GmbH (*Soest, Deutschland*).

Tabelle 4 | Zusammensetzung des Tierfutters

		Kontrolldiät	↓NaCl/↑Ca ²⁺ -Diät	↓NaCl/↓Ca ²⁺ -Diät
Natrium	[%]	0,24	≤ 0,03	≤ 0,03
Kalzium	[%]	0,97	4,50	≤ 0,04
Chlorid	[%]	0,35	0,04	0,04
Kalium	[%]	0,97	0,97	0,97
Magnesium	[%]	0,21	0,22	0,22
Phosphat	[%]	0,7	0,65	0,65
Zucker	[%]	10,8	12,2	12,2
Stärke	[%]	46,8	21,2	28,9
Protein	[%]	20,8	21,1	21,1
Fett	[%]	4,2	5,2	5,2
Energie	[MJ/kg]	18	14	15,5
Vitamin A	[IU/IE]	15000	15000	15000
Vitamin D3	[IU/IE]	1500	1500	1500
Vitamin E	[mg]	150	150	150
Vitamin K3	[mg]	20	20	20
Vitamin C	[mg]	30	30	30
Kupfer	[mg]	14	14	14

2.4.2 Metabolischer Käfig

Der metabolische Käfig diente dazu, die tägliche Ein- und Ausfuhr der Versuchstiere zu bestimmen. Hergestellt wurde der Käfig in der institutseigenen Werkstatt. Er besteht aus einem Metallgitter, auf dem sich die Maus frei bewegen konnte. Zu den Seiten hatten die Tiere während des ganzen Versuchsvorhabens uneingeschränkten Zugang zu Futter und Trinkwasser. Die Exkremeante wurden unterhalb der Plattform gesammelt. Damit sich Kot und Urin nicht vermischteten, tropfte der Urin über einen kegelförmigen Trichter in ein Behältnis, während der Kot durch das Gitter auf den Boden fiel. Um den Lichteinfall zu dämmen und ein Verstecken zu ermöglichen, wurde auf an den Käfig partiell schwarzer Tonkarton angebracht (**Abbildung 15**).

Sowohl vor der Nahrungsumstellung auf das Diätfutter als auch vor Versuchsbeginn sowie zu Versuchsende wurde das Gewicht der Mäuse notiert. Danach erfolgte im Tierlabor unter Isofluran-Narkose (Isofluran Vapor 19.3 von Dräger) die Blutentnahme aus der Vena cava inferior mit einer Heparin-benetzten Kanüle. Ein Teil der Blutprobe wurde in Messkapillaren übertragen. Es schloss sich die sofortige Blutgasanalyse (BGA, Lithium-Heparin-Kunststoffkapillare von Sanguis Counting GmbH, Compact BGA Ecosys II von Eschweiler) sowie die Hämatokritbestimmung (Natrium-Heparin-Hämatokrit-Mikrokapillare von Brand GmbH & CoKG) an. Zur Plasmagewinnung wurde das Vollblut für 3 Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert (Eppendorf Mikrozentrifuge 5415 C). Durch einen Thoraxschnitt wurde der Tod herbeigeführt und anschließend die Körperlänge von der Nasenspitze bis zur Schwanzwurzel bestimmt. Es folgte die Begutachtung des Zahnpolotyps sowie die Entnahme von Leber und Nieren. Die Organe wurden gewogen und Gewebeproben jeweils in 4%igem Paraformaldehyd (PFA) und flüssigem Stickstoff fixiert. Alle Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

Die **Tabelle 5** zeigt eine Übersicht der durchgeführten Analysen sowie Parameterbestimmung aus Blut, Urin und Kot.

Tabelle 5 | Übersicht der Analytik, metabolischer Versuch

Probe	Analyseparameter	Analyseverfahren
Venöses Vollblut	Sauerstoffpartialdruck [mmHg], Kohlenstoffdioxidpartialdruck [mmHg], pH-Wert, aktuelles Bikarbonat [mmol/l], Standard Bikarbonat [mmol/l], Basenüberschuss [mmol/l], Standard Basenüberschuss [mmol/l], Sauerstoffsättigung [%] Hämatokrit [%]	Blutgasanalyse Zentrifugation 2 Minuten bei 13.000 x g
Plasma	Osmolalität [mosmol/kg] Natrium-, Kalium-, Kalzium-, Magnesium-, Chlorid-, Phosphat-, Harnstoffkonzentration [mmol/l], Kreatinininkonzentration [μ mol/l], Glukosekonzentration [mg/dl]	Gefrierpunktosmometrie Roche Analyseautomat, Zentrallabor des UKSH Kiel
Sammelurin	Osmolalität [mosmol/kg] Natrium-, Kalium-, Kalzium-, Magnesium-, Chlorid-, Phosphat-, Harnstoff-, Kreatinin-Konzentration [mmol/l] pH-Wert	Gefrierpunktosmometrie Roche Analyseautomat, Zentrallabor des UKSH Kiel Blutgasanalyse
Kot	Wassergehalt [%]	Wiegen Nass- und Trockengewicht
Kotsuspension (Überstand)	Osmolalität [osmol/kg] Natrium-, Kalium-, Kalziumkonzentration [mmol/l]	Gefrierpunktosmometrie Flammenfotometrie

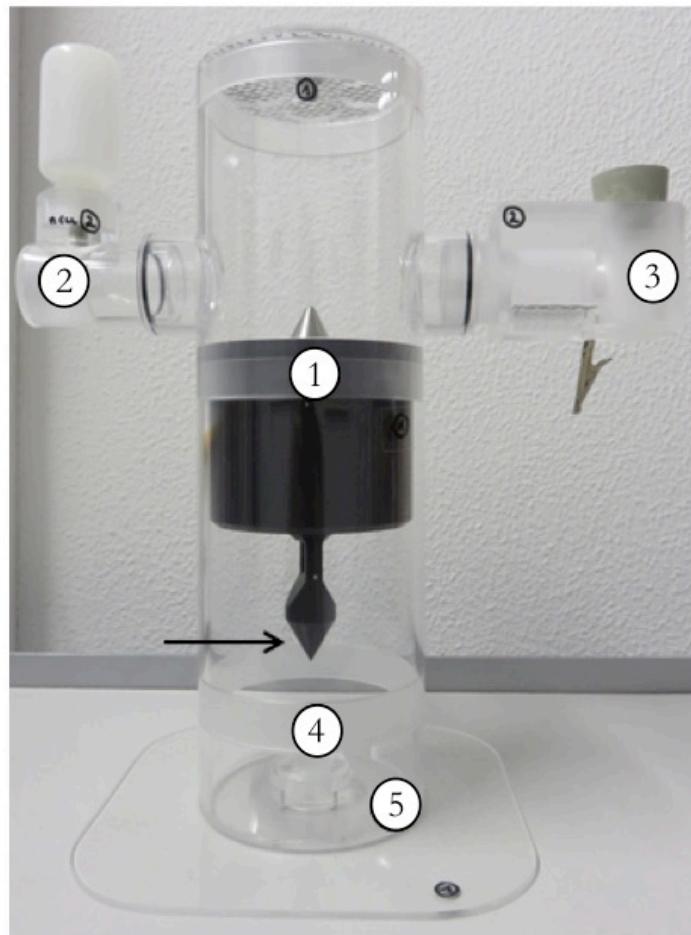


Abbildung 15 | Metabolischer Käfig

1: Bewegungsplattform mit Gitter, **2:** Trinkmöglichkeit, **3:** Futtervorrat, **4:** Auffangbehältnis für Urin, **5:** Käfigboden, **Pfeil:** Kegelförmiger Trichter zur getrennten Urinableitung vom Kot.

2.4.3 Herstellung des Kotüberstandes

Um die Elektrolytkonzentrationen im Kot bestimmten zu können, musste dieser zunächst in eine analysefähige Form überführt werden: Nach Bestimmung des Feuchtgewichts wurden die Kotproben bei 50 °C für 3 Tage getrocknet und anschließend das Trockengewicht ermittelt. Danach erfolgte die Zugabe der zehnfachen Menge Aqua dest. und die Herstellung einer homogenen Suspension durch Dispersion (IKA 25 T digital ULTRA-TURRAX). Der Überstand wurde mittels Zentrifugation bei 13.000 x g für 5 Minuten abgetrennt und dann zu Analysezwecken in ein Mikroreaktionsgefäß überführt.

2.4.4 Gefrierpunktosmometrie

Die Osmolalität [$\text{mosmol/kg H}_2\text{O}$] des Sammelurins, Kotüberstandes und Plasmas wurde mittels Gefrierpunktosmometrie bestimmt. Dabei ist der Gefrierpunkt ein Maß für die Gesamtzahl aller gelösten Teilchen: je mehr Teilchen in der Lösung vorhanden sind, desto niedriger ist der Gefrierpunkt^[53].

Vor der Messung wurde das Osmometer (Gonotec Osmomat 030 Gefrierpunktosmometer) an zwei Punkten geeicht: Zunächst mit einer Natriumchlorid-Probe von 850 mOsmol/kg H₂O und anschließend mit deionisiertem Wasser von 0 mOsmol/kg H₂O. Das verwendete Probenvolumen betrug jeweils 50 µl.

2.4.5 Flammenfotometrie

Die Natrium-, Kalium- und Kalziumkonzentrationen im Kotüberstand wurden mittels Flammenfotometrie bestimmt (Eppendorf EFOX 5053). Die Lösungsproben werden dabei über einen Zerstäuber in eine Acetylen-Luftflamme eingebracht. Die Valenzelektronen der Metallionen erreichen dadurch ein höheres Energieniveau. Beim Rückfall auf das Ausgangsniveau wird Energie in Form von Lichtemission frei. Jedes Metallion besitzt eine charakteristische Wellenlänge, welche durch die Farbe der Flamme detektierbar ist. Mit optischen Bandpassfiltern wird das emittierte Licht selektiert, sodass jedes Metallion getrennt bestimmt werden kann. Natriumionen werden bei 589 nm gemessen, Kaliumionen bei 767 nm und Kalziumionen bei 622 nm. Die Intensität der Lichtemission ist proportional zur Substanzmenge. Im Gegensatz zur wässrigen Lösung liegen alle Ionen auf Grund der Temperatur der Flamme in freier Form vor^[54].

Zur Kalibrierung wurde ein Lithium-Standard verwendet. Es wurde eine Doppelbestimmung mit einem Volumen von jeweils 100 µl durchgeführt und beide Werte gemittelt.

2.4.6 Klinische Chemie

Alle Plasma- und Urinproben wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (*Campus Kiel*) hinsichtlich der Elektrolyt-, Harnstoff- und Kreatinininkonzentrationen untersucht. Das Volumen der Plasmaproben betrug 180 µl. Die Urinproben wurden vorher im Verhältnis 1:5 mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 250 µl verdünnt.

2.4.7 Analyse der metabolischen Daten

Aufgrund von Anpassungsreaktionen der Mäuse während des metabolischen Versuchs wurden nur die Werte vom letzten Versuchstag berücksichtigt. Beispielhaft am Trinkverhalten ausgewählter Versuchstiere unter der Kontrolldiät ist erkennbar, dass einige Tiere anfänglich verhältnismäßig viel bzw. wenig zu sich genommen hatten. Am dritten Versuchstag hatten sich die Werte hingegen stabilisiert (**Diagramm 1**).

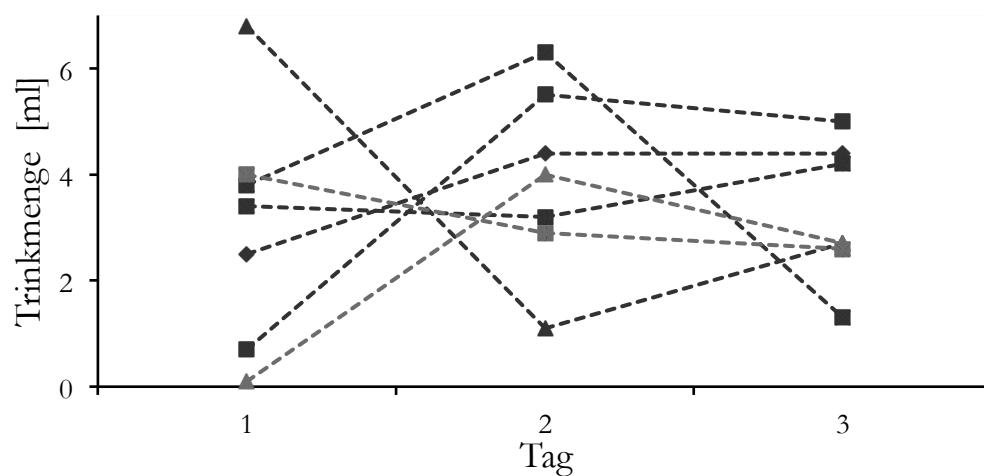


Diagramm 1 | Beispielhafte Trinkmenge der Kontrollgruppe, metabolischer Versuch

Dargestellt sind beispielhaft die Trinkmengen einzelner Weibchen über alle drei Tage; **dunkelgrau**: Wildtyp; **hellgrau**: Knockout.

2.4.8 Berechnungen der metabolischen Daten

Folgende Parameter wurden erhoben bzw. berechnet. Die vollständige Datentabelle ist dem Anhang zu entnehmen.

$$\text{Wassergehalt im Kot [\%]} = 1 - \frac{\text{Kottrockengewicht [g]}}{\text{Kotfeuchtgewicht [g]}} \quad (2.4.8.1)$$

$$\text{Freiwasser-Clearance [\mu l/24h/gKG]} = \quad (2.4.8.2)$$

$$\text{Harnzeitvolumen [\mu l/24h/gKG]} * \left(1 - \frac{\text{Urinosmolalität [mosmol/kg]}}{\text{Plasmaosmolalität [mosmol/kg]}} \right)$$

$$\text{Kreatinin-Clearance [\mu l/min/gKG]} = \quad (2.4.8.3)$$

$$\text{Harnzeitvolumen [\mu l/min/gKG]} * \frac{\text{Kreatinin Urin [mmol/l]}}{\text{Kreatinin Plasma [mmol/l]}}$$

$$\text{Fraktionelle Exkretion von X [\%]} = \quad (2.4.8.4)$$

$$\frac{\text{Urinkonzentration von X [mmol/l]} * \text{Kreatinin Plasma [mmol/l]}}{\text{Plasmakonzentration von X [mmol/l]} * \text{Kreatinin Urin [mmol/l]}} * 100$$

$$\text{Ionenaufnahme von X durch Trinken [\mu mol/24h/gKG]} = \quad (2.4.8.5)$$

$$\frac{\text{Massenkonzentration von X im Trinkwasser [mg/l]} * \text{Trinkmenge [\mu l/24h/gKG]}}{\text{Molare Masse von X [g/mol]} * 1000}$$

Referenzangaben zum Trinkwasser vom Kieler Wasserwerk (2017, Tabelle 8)

$$\text{Ionenaufnahme von X durch Fressen [\mu mol/24h/gKG]} = \quad (2.4.8.6)$$

$$\frac{\text{Anteil X im Futter [\%]} * \text{Futtermenge [mg/24h/gKG]} * 1000}{\text{Molare Masse von X [g/mol]}}$$

$$\text{Ionenexkretion von X [\mu mol/24h/gKG]} = \quad (2.4.8.7)$$

$$\frac{\text{Stoffmengenkonzentration von X im Urin(Kot) [m(\mu)mol/l]} * \text{Urin(Kot)menge [\mu l(ml)/24h/gKG]}}{1000}$$

2.5 Statistik

Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 2011 (Microsoft Corporation, *Redmont, WA, USA*) und dem Datenanalyseprogramm Stata. Sämtliche erhobenen Werte wurden in gleicher Art und Weise auf Signifikanz überprüft. Als Signifikanzniveau wurde ein $p < 0,05$ festgelegt. Der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ist als Fehlerindikator in die Diagramme eingefügt. Zum Vergleich von FAM20A-KO- und WT-Mäusen dienten der gepaarte, zweiseitige t-Test. Zum Vergleich der FAM20A-Population mit der zu erwartenden Mendelschen Verteilung wurde ein zweiseitiger Binomialtest durchgeführt.

2.6 Bildgebende Verfahren

Neben den metabolischen Daten wurden auch computertomographische und histologische Darstellungen von Mäusezähnen und –nieren durchgeführt.

2.6.1 μ -Computertomographie

In Kooperation mit dem Molecular Imaging North Competence Center (MOINCC, *Campus Kiel*) wurden computertomographische Schnittbilder von Schädeln der FAM20A-Zuchlinie angefertigt (**Tabelle 6**). Die Proben wurden nicht weiter aufbereitet, sondern direkt nach Abtrennung des Schädels schockgefroren und bei -80°C bis zur Untersuchung aufbewahrt.

Es handelt sich hierbei um Nativbilder mit folgenden Parametern: Scannertyp: SCANCO MedicalVivaCT 80; Voxelgröße: $15 \mu\text{m}$; elektrische Spannung: 70 kV ; Strahlungsenergie: 104mAs ; Scanzeit: 26,6 Minuten. Ausgewertet und dargestellt wurden die Aufnahmen mit dem Siemens Syngo 3D-Viewer.

Tabelle 6 | Computertomographisch untersuchte Mäuse

Genotyp	Anzahl	Alter [d]
Männlich WT	3	44-52
Männlich KO	4	44-52
Männlich HET	3	41

2.6.2 Histologie

In Kooperation mit dem Anatomischen Institut (*CAU Kiel*) wurden histologische Schnitte von Niere und Zahn angefertigt. Bevor die Zähne in Paraplast eingebettet werden konnten, mussten diese zunächst in 20%iger Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) bei pH 7,2 über fünf Wochen dekalzifiziert werden. Anschließend konnten alle Proben in 4%igem PFA über sieben Tage fixiert werden. Mittels aufsteigender Alkoholreihe wurden diese dann entwässert und in Paraplast eingebettet. Am Rotationsmikrotom wurden 7 µm dicke Schnitte hergestellt. Diese wurden auf Histobond Objektträgern fixiert und nach Goldner, Hämatoxylin-Eosin, Alcianblau und van Kossa gefärbt.

Die Nierenschnitte wurden zusätzlich mit Alizarin Rot gefärbt, welches mit Kalzium rotviolette Komplexe bildet. Hierfür wurden die Nierenschnitte zunächst mit 4%igem PFA für 10 Minuten behandelt und danach mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bei pH 4,2 für fünf Minuten gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger mit einer gefilterten Lösung 2 g Alizarin Red S und 100 ml Aqua dest. mit pH 4,2 für 15 Minuten bei 37 °C gefärbt. Danach erfolgte erneutes Waschen mit PBS bei pH 4,2 und Fixierung mittels Mowiol-DABCO.

Alle mikroskopischen Aufnahmen wurden am Fotomikroskop Zeiss Axiophot mit der Analysesoftware Axio Vision Release 4.8.2 SP2 hergestellt.

Nierenschnitte wurden von allen Mäusen des Tierversuchs hergestellt.

Tabelle 7 | Zahnhistologisch untersuchte Mäuse

Genotyp	Anzahl	Alter [d]
Männlich WT	2	154; 162
Weiblich WT	1	161
Männlich KO	3	161-203

3 Ergebnisse

3.1 Populationsstatistik und Gewichtsunterschiede

Nach Generierung der FAM20A-Zuchlinie wurden im Untersuchungszeitraum insgesamt 566 Tiere geboren. Nach der Mendelschen Segregationsregel tritt bei Verpaarung zweier gleichartig heterozygoter Genotypen die erste Filialgeneration im Verhältnis von 1:2:1 auf^[55].

Betrachtet man die Genotypen-Verteilung der FAM20A-Zucht, fällt diese deutlich zum Nachteil von KO (19 %) aus. Dementsprechend weisen WT (28 %) und Heterozygot (HET, 53 %) ein leicht erhöhtes Vorkommen auf. Die Abweichung von KO ist dabei deutlich signifikant (**Diagramm 2**).

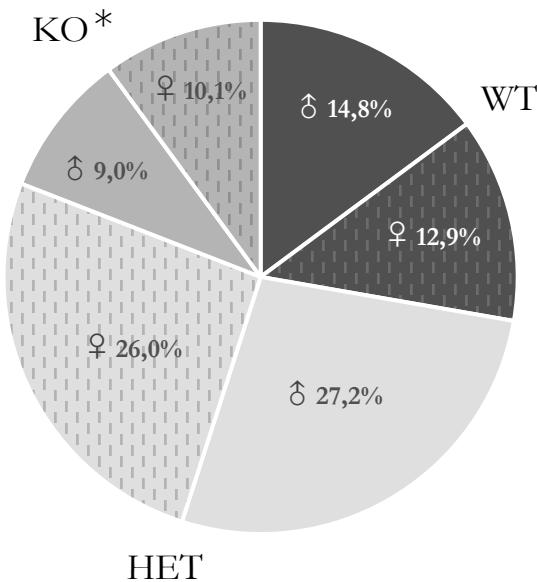


Diagramm 2 | Mendelsche Verteilung, FAM20A-Zuchlinie

Dargestellt ist die Genotypen-Verteilung getrennt nach Geschlecht; n=566 Tiere; **KO**=Knockout, **WT**=Wildtyp, **HET**=Heterozygot. Das Vorkommen von KO ist dabei geringer als erwartet.

Vergleicht man das Gewicht der KO-Tiere im Altersverlauf mit ihren entsprechenden WT-Geschwistern, so zeigte sich in allen Altersgruppen eine Gewichtsminderung. In **Diagramm 3** sind Tiere im Alter von 3-4 Wochen dargestellt. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Ernährung durch die Mutter. Bei diesen Tieren bestand vor dem Fortpflanzungsalter noch kein

Geschlechtsunterschied für das Gewicht, jedoch bereits ein erheblicher Genotyp-Unterschied: die KO-Tiere waren ca. 2-3 g leichter. Bei voll ausgewachsenen Tieren >24 Wochen bestand dieser Unterschied weiterhin und war auf ca. 7-8 g gestiegen (**Diagramm 4**). Zusätzlich zeigte sich dann auch für beide Genotypen der typische Geschlechtsunterschied mit leichteren Weibchen.

Hinsichtlich der Längen, gemessen von der Nasenspitze bis zur Schwanzwurzel, konnten keine Unterschiede identifiziert werden (siehe **Tabelle 9** im Anhang).

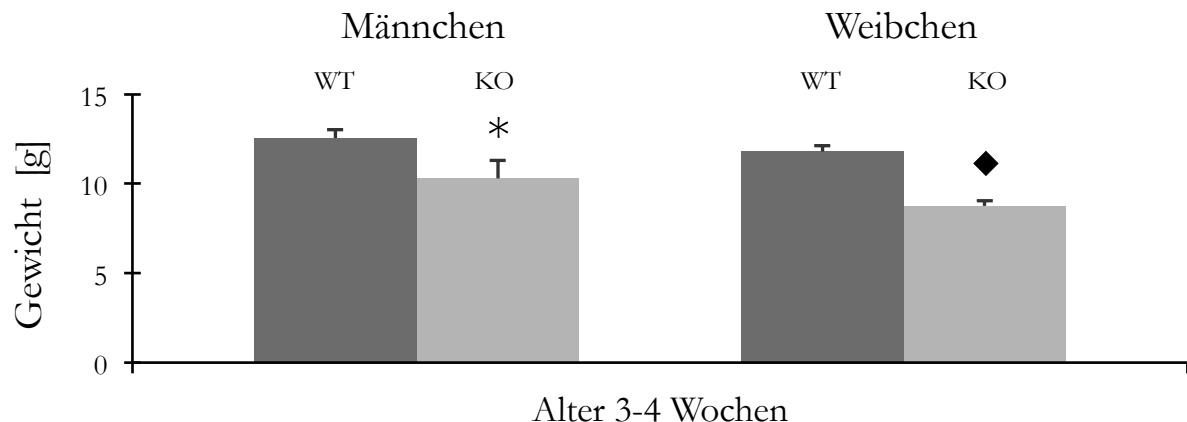


Diagramm 3 | Gewicht im Alter von 3-4 Wochen, FAM20A-Zuchtlinie

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp. n=85/32/68/35 von links nach rechts; *: p<0,05, WT-♂ vs. KO-♂; ♦: p<0,05, WT-♀ vs. KO-♀; **dunkelgrau: WT, hellgrau: KO**.

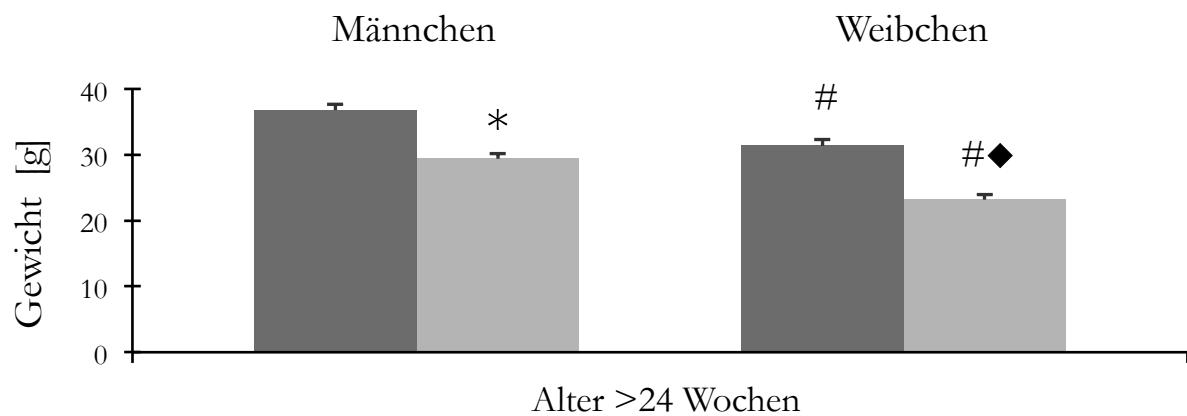


Diagramm 4 | Gewicht im Alter von >24 Wochen, FAM20-Zuchtlinie

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp. n=23/21/22/27 von links nach rechts; #: p<0,05, Geschlechtsunterschied innerhalb eines Genotyps; *: p<0,05, WT-♂ vs. KO-♂; ♦: p<0,05, WT-♀ vs. KO-♀; **dunkelgrau: WT, hellgrau: KO**.

3.2 Zahnpfänotyp

Schon beim Blick mit dem bloßen Auge ließ sich ein Unterschied hinsichtlich des Zahnpfänotyps zwischen WT und KO erkennen: anstatt der physiologischen labialseitigen Gelbfärbung der Schneidezähne waren die selbigen bei KO weißlich und insgesamt auch von geringerer Dicke (**Abbildung 16**). Hieran konnte der Genotyp eindeutig identifiziert werden.

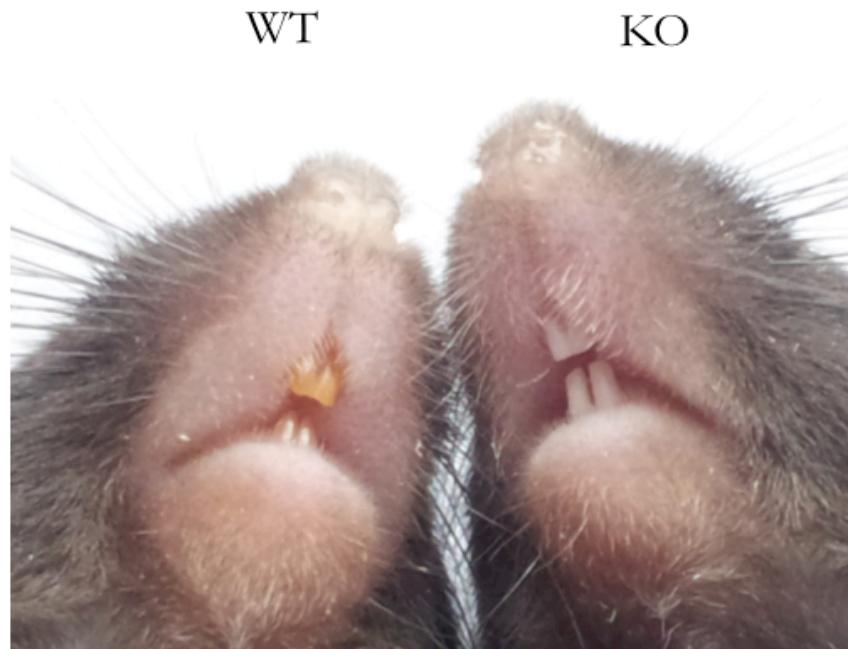


Abbildung 16 | Schneidezähne, FAM20A-Zuchtlinie

Wildtyp-Mäuse (**WT**) zeigen die typische Gelbfärbung der Schneidezähne. Die Schneidezähne von Knockout-Mäusen (**KO**) erscheinen hingegen weißlich und dünner.

Auch histologisch waren Unterschiede im Schmelzaufbau der Schneidezähne des Oberkiefers zwischen WT und KO erkennbar (**Abbildung 17**). Aufgrund einer vorherigen Dekalzifizierung beim Herstellen der Präparate, konnte die Schmelzstruktur selbst nicht beurteilt werden. Hingegen aber die Zellen, welche für die Schmelzproduktion verantwortlich sind: die Ameloblasten. Bei WT war ein einreihiges hochprismatisches Ameloblasten-Epithel mit darunterliegendem Bindegewebe zu sehen. KO besaß kein erkennbares Epithel. Stattdessen befanden sich dort globuläre, in Nestern angeordnete Strukturen, welche in viel Bindegewebe eingebettet waren. Des Weiteren hatte das herausgelöste Schmelzorgan bei KO eine geringere Breite. Pulpa und Dentin sowie Alveolarknochen unterschieden sich nicht.

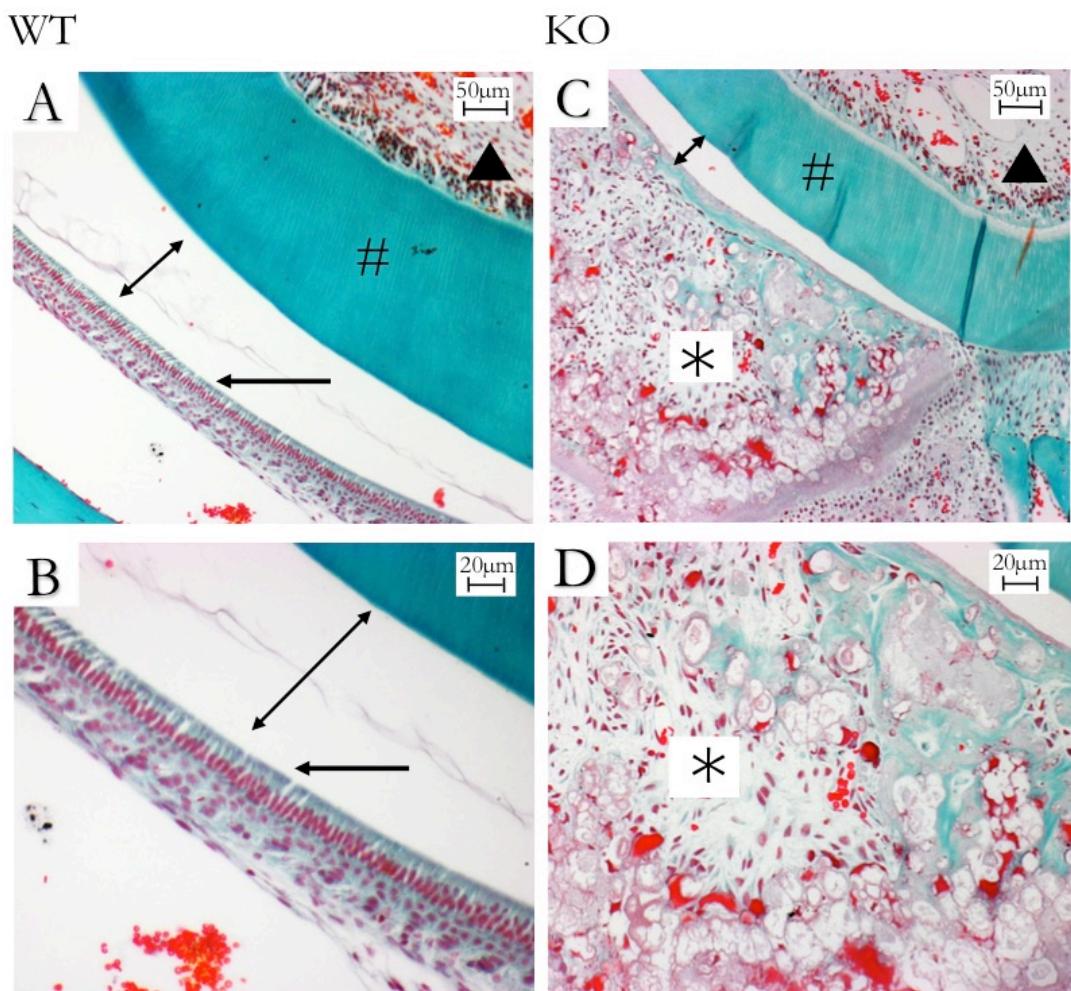


Abbildung 17 | Zahnhistologie, FAM20A-Zuchlinie

Dargestellt sind Schnittbilder der Schneidezähne des Oberkiefers, **A + B**: Wildtyp (WT); **C + D**: Knockout (KO). Der Schmelz (**Pfeil mit Doppelspitze**) ist durch die histologische Aufarbeitung herausgelöst. Bei **WT** ist ein einreihiges Ameloblastenepithel erkennbar (**Pfeil**). Bei **KO** sind stattdessen globuläre Strukturen mit viel Bindegewebe (*) erkennbar. #: Dentin; Dreieck: Pulpa; Goldner-Färbung.

In der computertomographischen Darstellung bestätigte sich der mikro- und makroskopische Zahnbefund: Bei WT imponierte der Zahnschmelz aufgrund einer höheren Röntgendiftichte als weiße, homogene und glatt begrenzte Struktur. Dies war sowohl an den Schneidezähnen als auch an den Backenzähnen erkennbar. Das Schmelzorgan bei KO war hingegen nicht abzugrenzen und die Zähne erschienen im Vergleich zu WT hypodens. Des Weiteren war die Oberflächenstruktur von KO uneben konfiguriert. Unterschiede in der Knochenbildung waren nicht erkennbar (**Abbildung 18**).

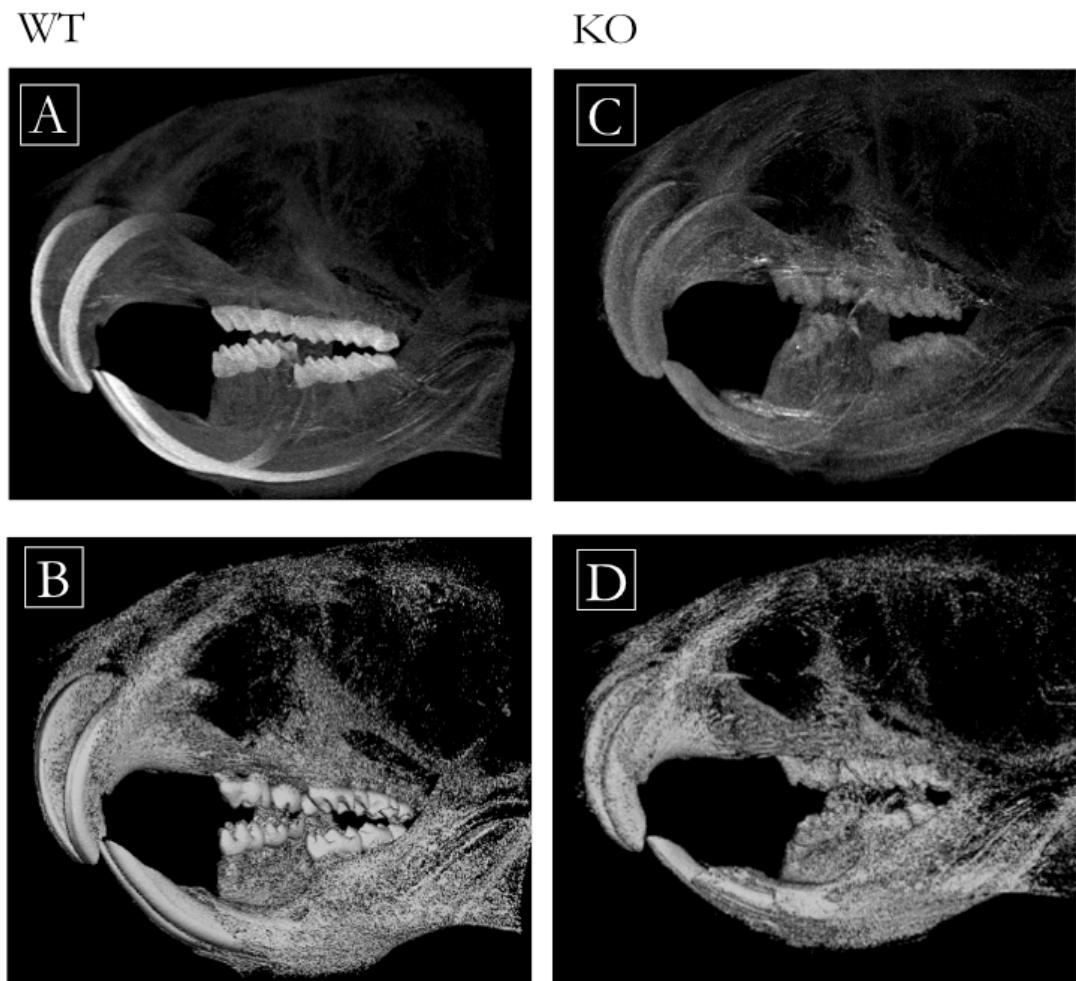


Abbildung 18 | Computertomographische Aufnahmen Mausschädel, FAM20A-Zuchtlinie

A + B: Wildtyp (WT); **C + D:** Knockout (KO); **B + D:** 3-dimensionale-Rekonstruktion der Oberflächenstruktur. Die Schmelzstruktur hebt sich bei WT weißlich und eben konfiguriert ab, bei KO fehlt sie nahezu gänzlich.

3.3 Metabolischer Versuch

Wie im Methodenteil bereits erläutert, erhielten die Versuchstiere neben dem normalen Tierfutter auch Diätnahrung. Die erste Diät zeichnete sich durch einen niedrigen Natriumgehalt von $\leq 0,04\%$ und einen hohen Kalziumgehalt von 4,5 % aus. Die zweite Diätnahrung beinhaltete jeweils einen Natrium- sowie Kalziumgehalt von $\leq 0,04\%$ (**Tabelle 4**). Das Spezialfutter wurde für insgesamt zehn Tage verabreicht: sieben Tage in der normalen Haltung und drei Tage auf dem metabolischen Käfig. Im Folgenden werden die Diäten mit Kontrolldiät, $\downarrow\text{NaCl}/\uparrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät und $\downarrow\text{NaCl}/\downarrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät bezeichnet.

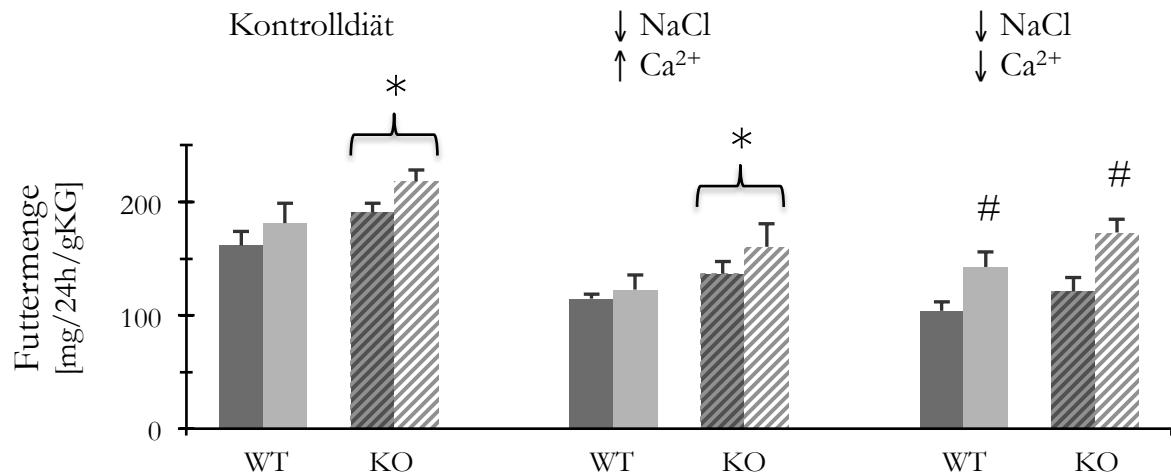
Die Versuchsergebnisse sind Werte des dritten Versuchstages und jeweils in Relation zum Körpergewicht der Mäuse gesetzt. Die Absolutwerte sind den **Tabellen 9-15** im Anhang zu entnehmen.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen WT und KO sowie Geschlechterunterschiede sind in den Diagrammen markiert. Auswirkungen der Diäten werden nur im Text erwähnt, da die unterschiedlichen Diätgruppen statistisch nicht miteinander verglichen wurden.

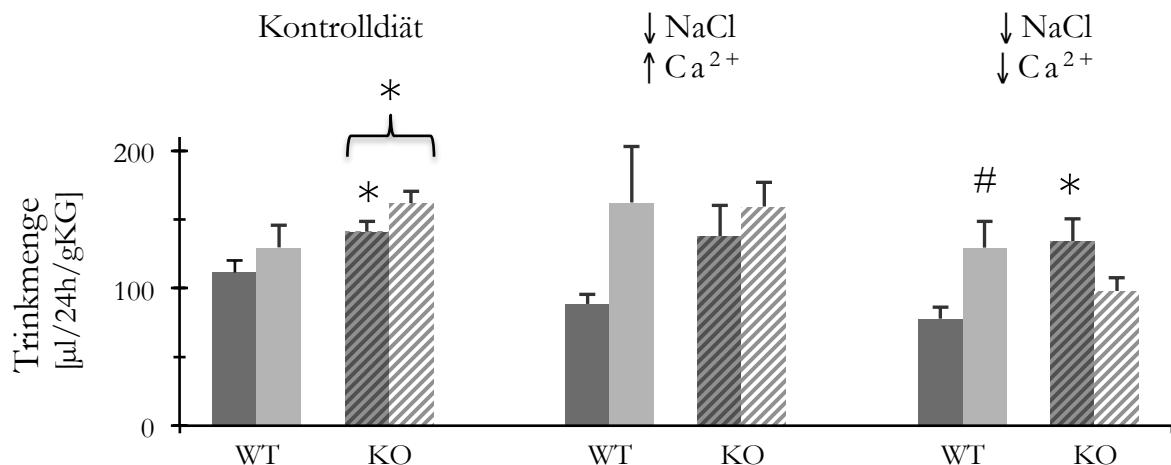
3.3.1 Nahrungsaufnahme und Exkretion

Im ersten Schritt wurde die Nahrungsaufnahme während des metabolischen Versuchs betrachtet. Hierbei fiel zunächst auf, dass die Futtermengen unter der Kontrolldiät höher waren als unter dem Spezialfutter. Während bei ersterer im Schnitt 188 mg/24h/gKG gefressen wurde, hatten die Mäuse unter der $\downarrow\text{NaCl}/\uparrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät nur etwa 133 mg/24h/gKG zu sich genommen und unter der $\downarrow\text{NaCl}/\downarrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät ähnlich viel mit 135 mg/24h/gKG. Zusätzlich fiel auf, dass KO in den ersten beiden Versuchsgruppen mehr als WT gefressen hatte. Interessanterweise führte die $\downarrow\text{NaCl}/\downarrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät bei beiden Genotypen zu einer erhöhten Futteraufnahme der Weibchen (**Diagramm 5**).

Die Trinkmenge während des metabolischen Versuchs ergab keinen einheitlichen Trend bei den Genotypen oder Geschlechtern. Insgesamt zeigte sich eine größere Streuung der Messwerte. Die Trinkmenge unter der Kontrolldiät war bei KO erhöht (insgesamt und Männchen im Vergleich). Unter der $\downarrow\text{NaCl}/\downarrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät war die Trinkmenge der WT-Männchen sowohl im Geschlechter- als auch Genotypenvergleich erniedrigt (**Diagramm 6**).

**Diagramm 5 | Futtermenge**

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=8; #: p<0,05, Geschlechtsunterschied innerhalb eines Genotyps; geschweifte Klammer mit *: p<0,05, WT vs. KO geschlechtsunabhängig; **dunkelgrau:** ♂, **hellgrau:** ♀.

**Diagramm 6 | Trinkmenge**

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=8; #: p<0,05: Geschlechtsunterschied innerhalb eines Genotyps; *: p<0,05, WT-♂ vs. KO-♂; geschweifte Klammer mit *: p<0,05, WT vs. KO geschlechtsunabhängig; **dunkelgrau:** ♂, **hellgrau:** ♀.

Bei der Interpretation dieser Befunde ist das geringere Ausgangsgewicht der KO-Tiere zu berücksichtigen.

Im nächsten Schritt wurde die fäkale Ausscheidung während des metabolischen Versuchs betrachtet. Hierbei fiel eine vielfach geringere Kotmenge (Feuchtgewicht) der Mäuse nach Verzehr des Spezialfutters auf, welche auf den ersten Blick nicht im Verhältnis zur Nahrungsaufnahme stand. Während die Tiere der Kontrollgruppe im Schnitt 92 mg/24h/gKG exkretierten, produzierten die Mäuse unter der $\downarrow\text{NaCl}/\uparrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät nur 36 mg/24h/gKG und unter der $\downarrow\text{NaCl}/\downarrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät sogar nur 13 mg/24h/gKG Kot (**Diagramm 7**). Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass der Wassergehalt im Kot unter der Kontroldiät bei fast 50 % lag, während die Wasseranteile unter den Spezialdiäten bei nur 32 % ($\downarrow\text{NaCl}/\uparrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät) bzw. 20 % ($\downarrow\text{NaCl}/\downarrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät) lagen (**Diagramm 8**).

Es konnte eine erhöhte Kotmenge im Genotypen-Vergleich bei $\downarrow\text{NaCl}/\uparrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät-Männchen und $\downarrow\text{NaCl}/\downarrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät-Weibchen beobachtet werden. Bei ersterer Diät war auch im geschlechtsunabhängigen Vergleich ein Unterschied festzustellen. Weiter war unter der Kontroll- und $\downarrow\text{NaCl}/\downarrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät eine erhöhte Ausscheidung der KO-Weibchen im Vergleich zu den Männchen zu detektieren (**Diagramm 7**).

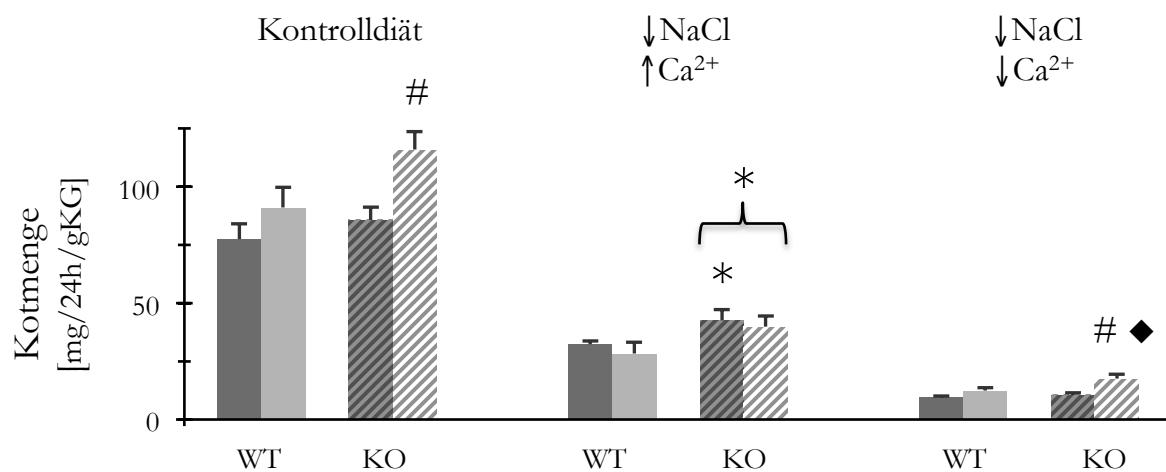


Diagramm 7 | Kotmenge (Feuchtgewicht)

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=8; #: p<0,05, Geschlechtsunterschied innerhalb eines Genotyps; *: p<0,05, WT-♂ vs. KO-♂; ♦: p<0,05, WT-♀ vs. KO-♀; geschweifte Klammer mit *: p<0,05, WT vs. KO geschlechtsunabhängig; **dunkelgrau**: ♂, **hellgrau**: ♀.

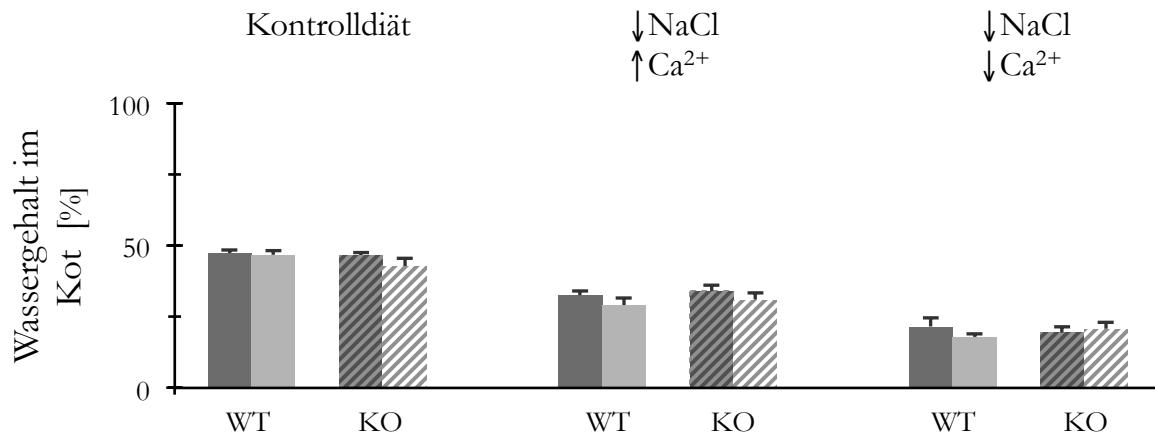


Diagramm 8 | Wassergehalt im Kot

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=8; **dunkelgrau:** ♂, **hellgrau:** ♀.

Die Urinproduktion spiegelte qualitativ die Trinkmenge der verschiedenen Gruppen wider (**Diagramm 6**). Unter der Kontroll- bzw. ↓NaCl/↑Ca²⁺-Diät produzierten die KO-Männchen mehr Urin als die WT-Männchen (**Diagramm 9**).

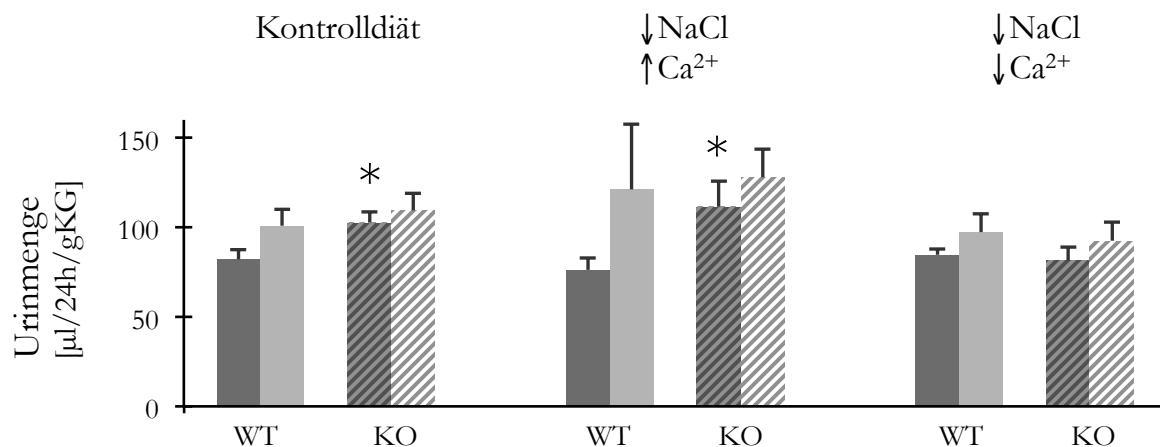


Diagramm 9 | Urinmenge

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=8; *: p<0,05, WT-♂ vs. KO-♂; **dunkelgrau:** ♂, **hellgrau:** ♀.

3.3.1.1 Gewichtsentwicklung

Innerhalb der drei Tage auf dem metabolischen Käfigen kam es unter der Kontrolldiät bei den WT-Tieren zu einer geringen Gewichtsabnahme, während die KO-Männchen das Gewicht hielten und die KO-Weibchen sogar leicht zunahmen. Zwischen den weiblichen Genotypen und auch beim geschlechtsunabhängigen Vergleich war die relative Gewichtsänderung signifikant unterschiedlich.

Unter der $\downarrow\text{NaCl}/\uparrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät nahmen mit Ausnahme der KO-Weibchen alle Tiere deutlich ab. Unter der $\downarrow\text{NaCl}/\downarrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät nahmen nur die Männchen ab, während die Weibchen ihr Gewicht hielten (WT) bzw. zunahmen (KO). Daraus ergab sich ein Geschlechtsunterschied zwischen den KO-Weibchen und -Männchen (**Diagramm 10**).

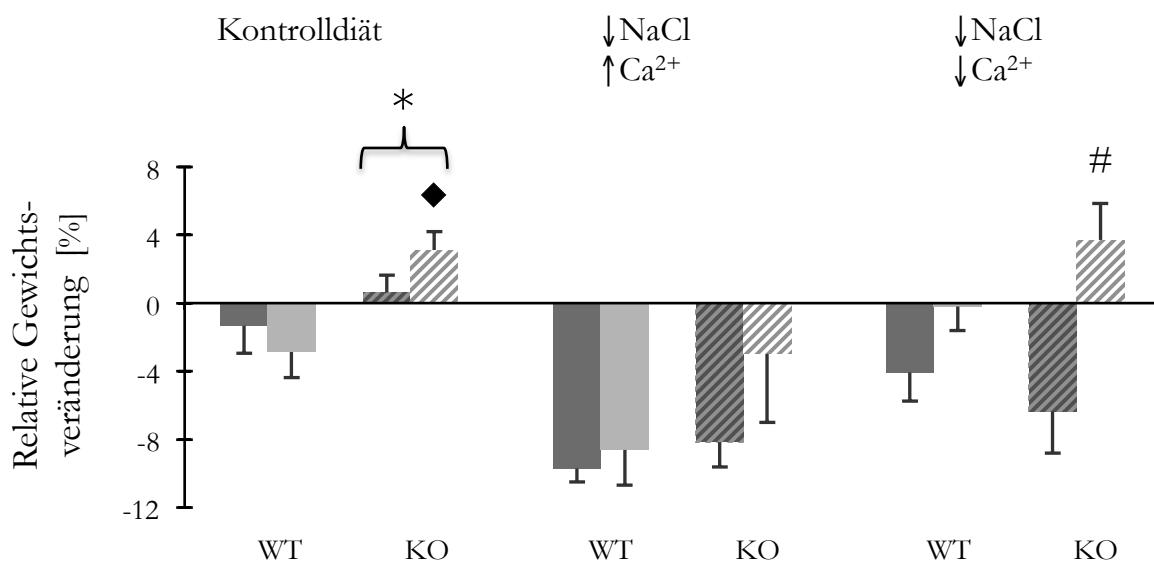


Diagramm 10 | Relative Gewichtsänderung

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=8; #: p<0,05, Geschlechtsunterschied innerhalb eines Genotyps; ♦: p<0,05, WT-♀ vs. KO-♀; geschweifte Klammer mit *: p<0,05, WT vs. KO geschlechtsunabhängig; dunkelgrau: ♂, hellgrau: ♀.

3.3.2 Plasmaparameter und Säure-Basen-Haushalt

Die Analyse des Elektrolyt-, Wasser- und Säure-Basen-Haushaltes im Blutplasma ergab keinerlei Unterschiede, weder zwischen den Männchen und Weibchen noch zwischen WT und KO oder zwischen den unterschiedlichen Diäten. Daher werden im Folgenden beispielhaft die Plasmawerte der Tiere unter der Kontrolldiät, nur getrennt nach Genotypen, dargestellt. Die gesamten Werte sind den **Tabellen 11** und **12** im Anhang zu entnehmen.

3.3.2.1 Kationenkonzentration

Die Natriumkonzentration im Plasma lag im oberen physiologischen Bereich. Die Kaliumkonzentration war mit ca. 4 mmol/l im Normbereich, ebenso die Plasmawerte der divalenten Kationen Kalzium und Magnesium (**Diagramm 11**). Dies war besonders für die Tiere unter den Spezialdiäten bemerkenswert, da sie direkt oder indirekt eine Störung der Homöostase des Natrium-, Kalium-, Kalzium- und Phosphat-Haushaltes erfuhrten.

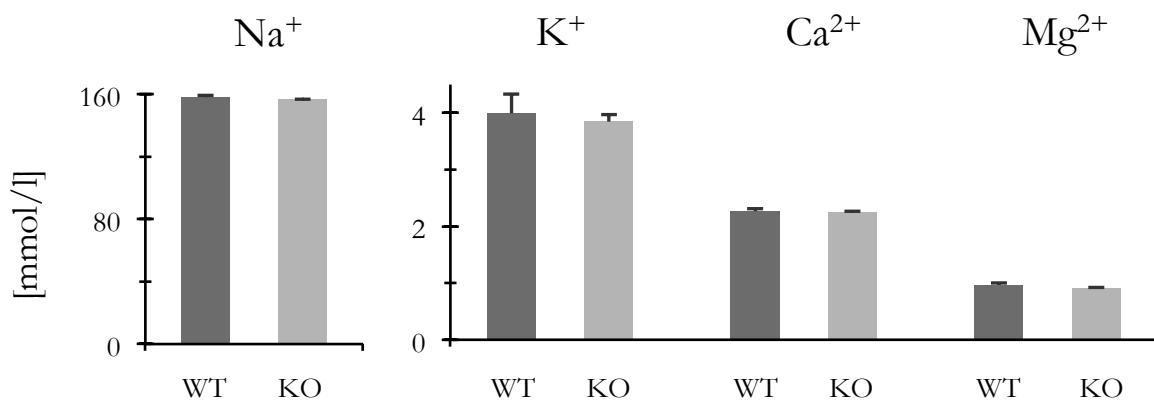


Diagramm 11 | Kationenkonzentrationen im Plasma, Kontrolldiät

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Genotyp; n: 13-15.

3.3.2.2 Anionen- und Phosphatkonzentration

Diagramm 12 zeigt die Plasmakonzentrationen der Anionen. Auch bei Chlorid und Bikarbonat gab es keine Unterschiede. Ebenso war die Phosphatkonzentration, eng assoziiert mit dem Kalziumhaushalt, zwischen den Genotypen gleich.

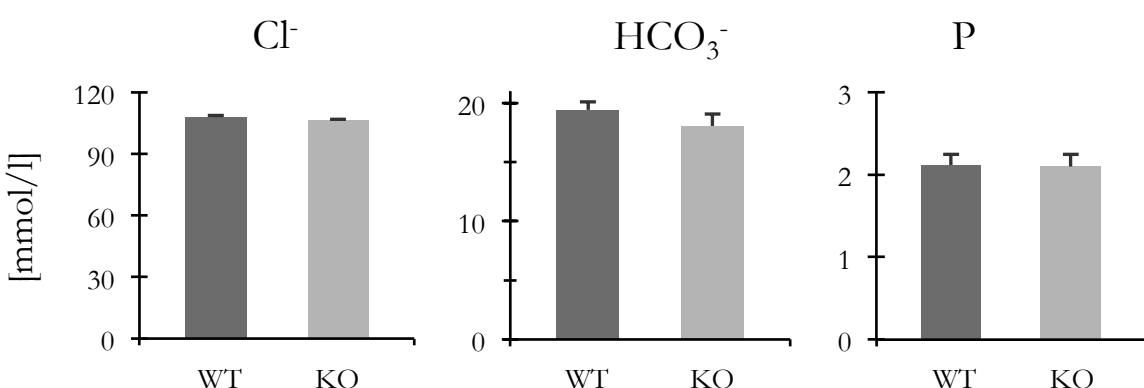


Diagramm 12 | Anionen- und Phosphatkonzentrationen im Plasma, Kontrolldiät

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Genotyp; n: 13-15.

3.3.2.3 Harnstoff- und Kreatininkonzentration

Die Nierenretentionsparameter Kreatinin und Harnstoff waren mit ca. 9 mmol/l bzw. 7 μ mol/l zwischen den Genotypen gleich und gaben keinen Hinweis auf eine mögliche Nierenfunktionseinschränkung (**Diagramm 13**).

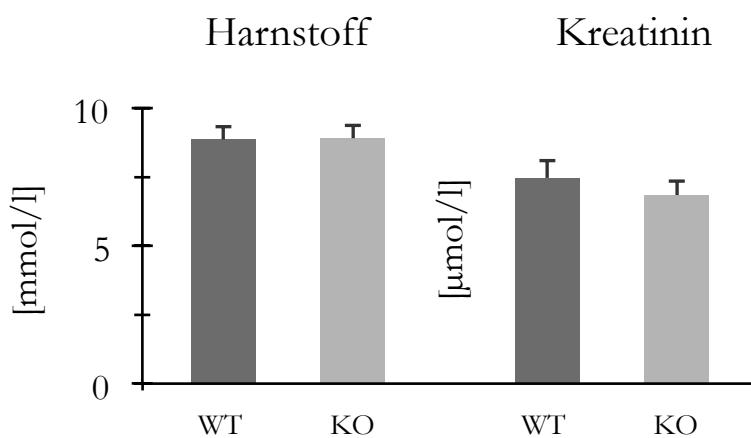


Diagramm 13 | Harnstoff- und Kreatininkonzentrationen im Plasma, Kontrolldiät

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Genotyp; n: 13-14.

3.3.2.4 pH-Wert und Kohlenstoffdioxid-Partialdruck

Der Säure-Basen-Haushalt, welcher maßgeblich durch die Atmung und den renalen Transport von Bikarbonat und Säuren gesteuert wird, zeigte keinen Genotypenunterschied. Der venöse pH-Wert lag mit 7,2 im azidotischen Bereich. Dies war durch den erhöhten venösen Kohlenstoffdioxidpartialdruck von ca. 50 mmHg bedingt, welcher durch eine Hypoventilation im Rahmen der tiefen Sedierung bei der Blutentnahme entstand (**Diagramm 14**).

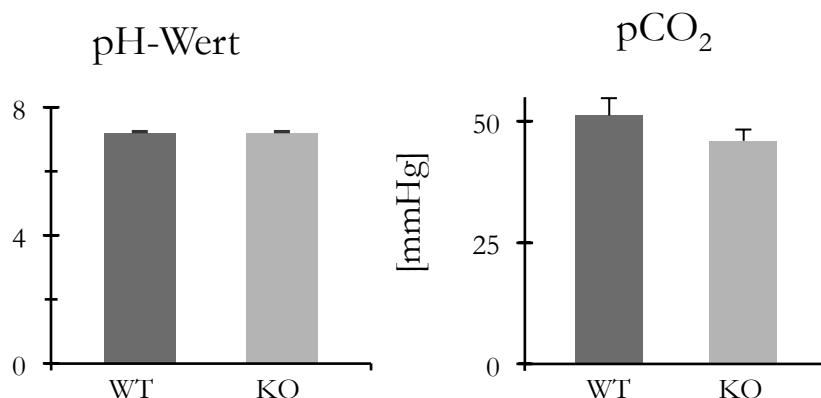


Diagramm 14 | pH-Wert und Kohlenstoffdioxidpartialdruck im Plasma, Kontrolldiät

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Genotyp; n: 14.

3.3.2.5 Sauerstoffpartialdruck, Sättigung und Hämatokrit

Hinsichtlich der Oxygenierung konnte bei vorliegender venöser BGA, soweit beurteilbar, keine Störungen detektiert werden. Der Sauerstoffpartialdruck lag bei ca. 62 mmHg, die Sauerstoff-Sättigung bei > 80% und der Hämatokrit bei ca. 43 % (**Diagramm 15**).

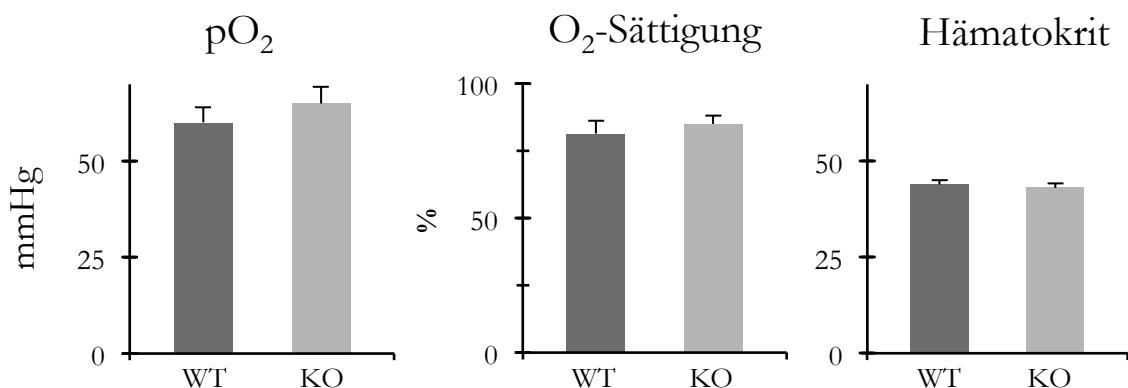


Diagramm 15 | Sauerstoffpartialdruck, Sättigung und Hämatokrit im Plasma, Kontrolldiät

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Genotyp; n: 14-15.

3.3.2.6 Glukose und Osmolalität

Zuletzt seien noch die Glukosekonzentration und die Osmolalität des Plasmas als metabolische Parameter erwähnt. Auch hier waren keinerlei Unterschiede zwischen den Genotypen zu erkennen (**Diagramm 16**). Der Blutzuckerwert lag bei ca. 280 g/dl und die Osmolalität bei 325 mosmol/kg. Dieser, auch für Mäuse etwas erhöhte Blutzuckerwert, erklärt zusammen mit der Natriumkonzentration die, im Vergleich zu Menschen höhere Plasmaosmolalität^[56].

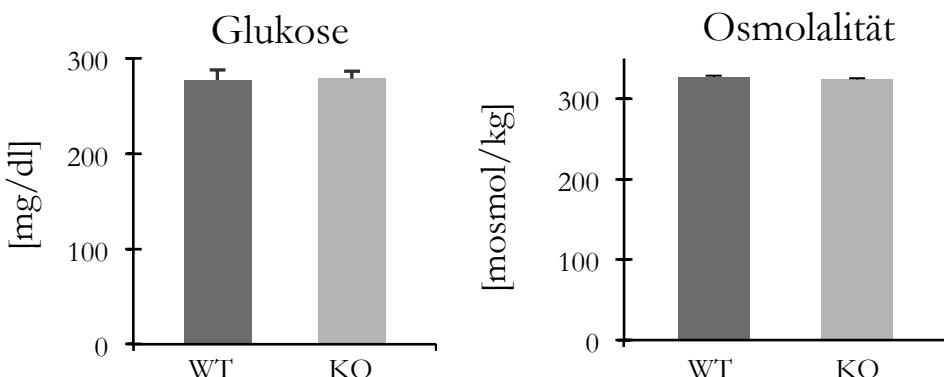


Diagramm 16 | Glukosekonzentration und Osmolalität im Plasma, Kontrolldiät

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Genotyp; n: 13-15.

3.3.3 Nierenfunktion und Wasserhaushalt

3.3.3.1 Kreatinin-Clearance und morphologische Nierenaspekte

Die Kreatinin-Clearance ist ein wichtiger Parameter im klinischen Alltag zur Überprüfung der Nierenfunktion. Kreatinin wird entlang des Tubulussystems frei filtriert und weder resorbiert noch sekretiert. Daher kann die Clearance dieser Substanz als indirektes Maß zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate herangezogen werden^[6].

Wie im Methodenteil erklärt, wurde die Kreatinin-Clearance mit Hilfe der Kreatinin-Konzentrationen im Plasma und Urin sowie dem Harnzeitvolumen berechnet. Hinsichtlich der Plasmakonzentration von Kreatinin konnten keine Unterschiede zwischen den Versuchstieren und -gruppen nachgewiesen werden (**Diagramm 13**). Die Kreatininexkretion im Urin zeigte ebenfalls keine Unterschiede (**Diagramm 17**) und auch die Unterschiede im Harnzeitvolumen (siehe Abschnitt 3.3.1) wirkten sich nicht signifikant auf die Durchschnittswerte der Kreatinin-Clearance aus. Lediglich die WT- und KO-Weibchen unter der Kontroldiät wiesen einen kleinen, statistisch signifikanten Unterschied auf (**Diagramm 18**).

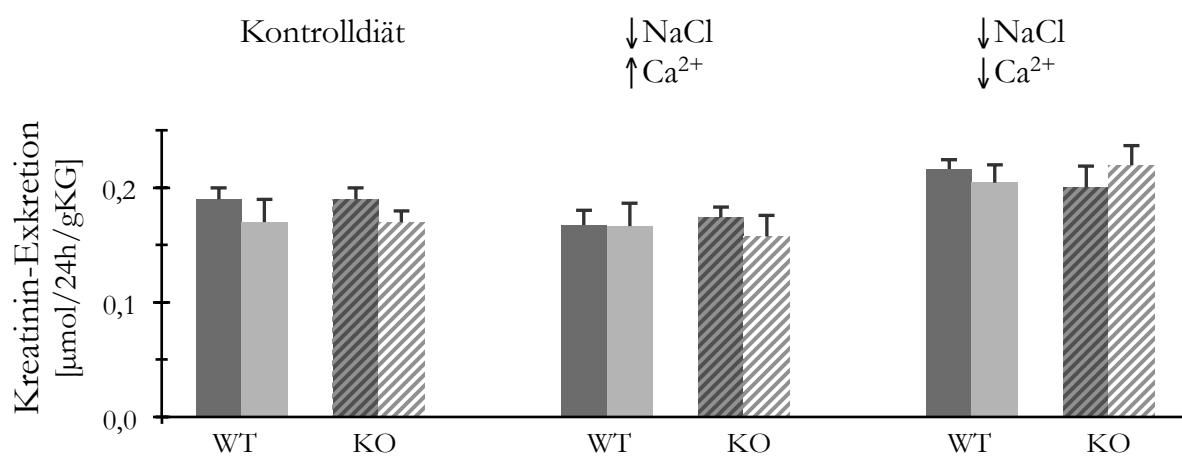


Diagramm 17 | Renale Kreatininausscheidung

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=6-8; dunkelgrau: ♂, hellgrau: ♀.

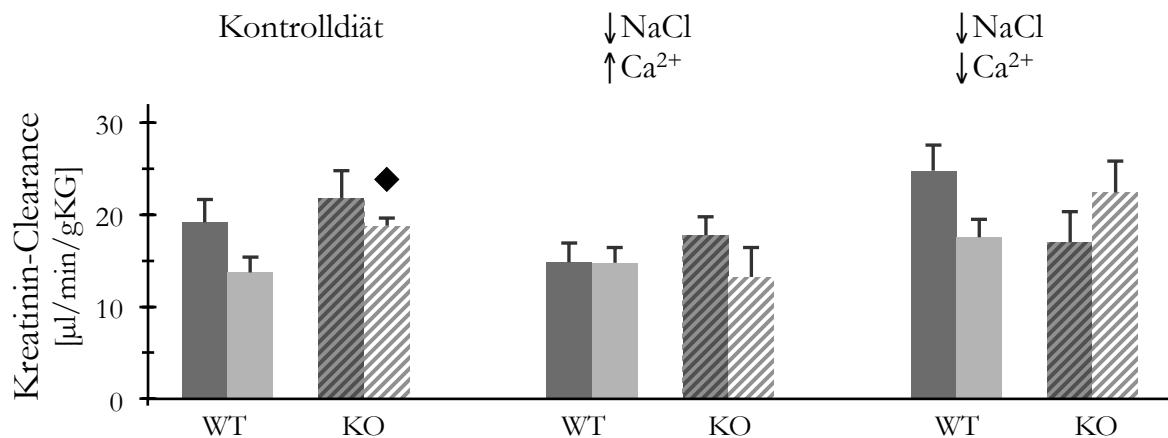


Diagramm 18 | Kreatinin-Clearance

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n: 5-8; ♦: p<0,05, WT-♀ vs. KO-♀; **dunkelgrau:** ♂, **hellgrau:** ♀

Zusätzlich zur Charakterisierung der Nierenfunktion wurden auch die Nierengewichte aller Versuchstiere in Relation zum Körpergewicht bestimmt. Hier zeigten sich keine Unterschiede (siehe **Tabelle 9** im Anhang). Ebenso waren die histologischen Untersuchungen der Niere unauffällig. Es konnten weder Kalzifizierungen nachgewiesen, noch morphologische Unterschiede zwischen WT und KO entdeckt werden (**Abbildung 19**).

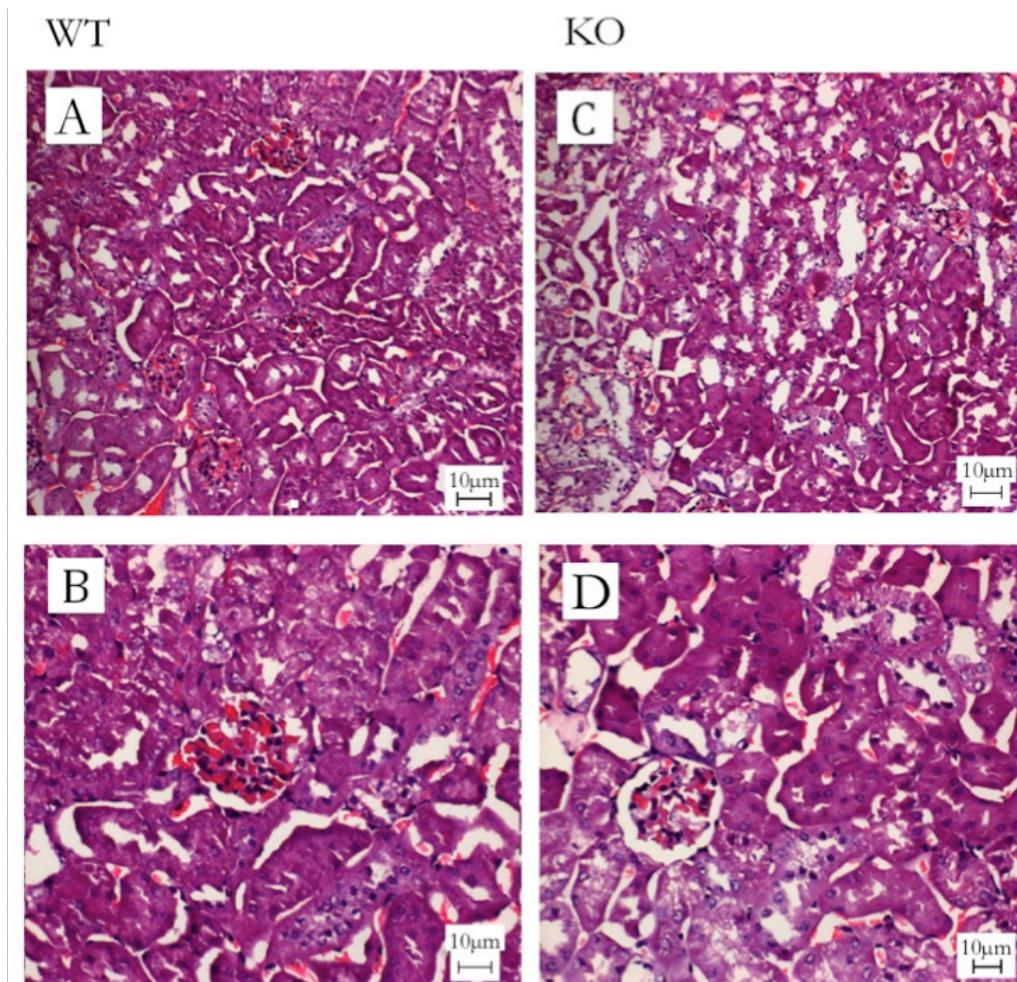


Abbildung 19 | Nierenhistologie, FAM20A-Zuchlinie

A + B: Wildtyp (**WT**); **C + D:** Knockout (**KO**). Es sind keine Unterschiede oder Pathologien hinsichtlich des Aufbaus oder anderer morphologischer Aspekte zwischen **WT** und **KO** erkennbar. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

3.3.3.2 Wasserhaushalt während des metabolischen Versuchs

Die Harnkonzentrierung und die Freiwasser-Clearance (FWC) sind wichtige Nierenfunktionsparameter zur Beurteilung des Wasserhaushalts und könnten Aufschluss über eine Störung durch den FAM20A-KO geben.

Die Osmolalität des Urins zeigte in allen Versuchsgruppen die für Nagetiere typische hohen Werte von >2000 mosmol/kg^[57]. Unter der $\downarrow\text{NaCl}/\uparrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät war die Osmolalität im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen tendenziell etwas niedriger. Die KO-Weibchen konzentrierten den Harn unter der $\downarrow\text{NaCl}/\downarrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät stärker als die WT-Weibchen. Darüber hinaus waren aber keine Unterschiede erkennbar (**Diagramm 19**).

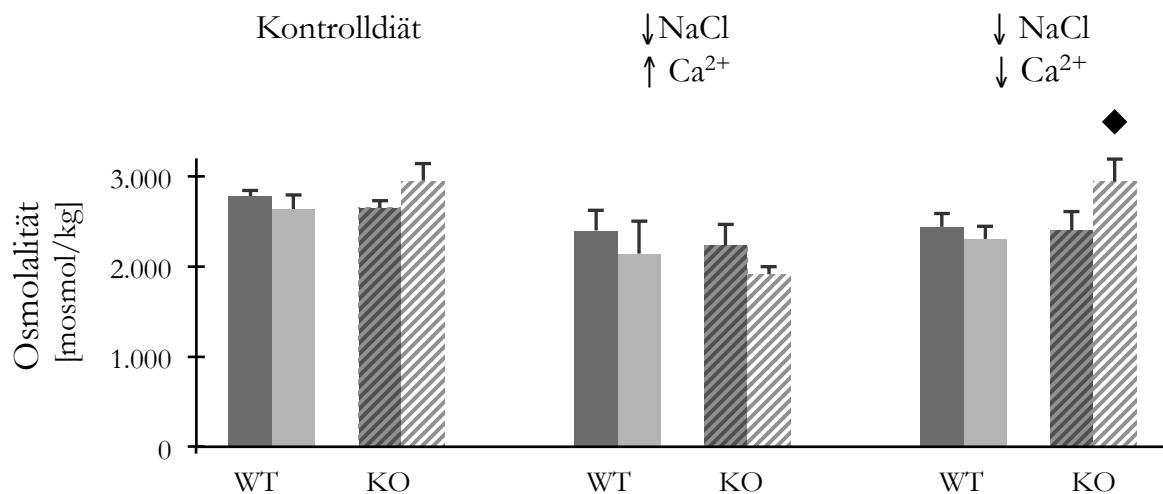


Diagramm 19 | Osmolalität im Sammelurin

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=6-8; ♦: p<0,05, WT-♀ vs. KO-♀; **dunkelgrau:** ♂, **hellgrau:** ♀.

Die Freiwasser-Clearance kann Aussagen über den Diuresezustand der Niere geben. Bei negativen Werten ist die Nierenfunktion antidiuretisch reguliert und versucht Wasser einzusparen^[6].

Letzteres war bei allen Versuchstieren der Fall. Tendenziell retinierten sowohl die Weibchen innerhalb eines Genotyps (Kontrolldiät) bzw. auch im Vergleich mit WT (↓NaCl/↓Ca²⁺-Diät) mehr Wasser, ebenso bei geschlechtsunabhängiger Betrachtung KO verglichen mit WT (Kontroll- und ↓NaCl/↑Ca²⁺-Diät). Im Falle der ↓NaCl/↑Ca²⁺-Diät war die Stichprobe der KO-Weibchen (n=3) zu klein für einen signifikanten Unterschied. Des Weiteren konnte ein Unterschied zwischen den WT- und KO-Männchen unter der ↓NaCl/↑Ca²⁺-Diät detektiert werden (**Diagramm 20**).

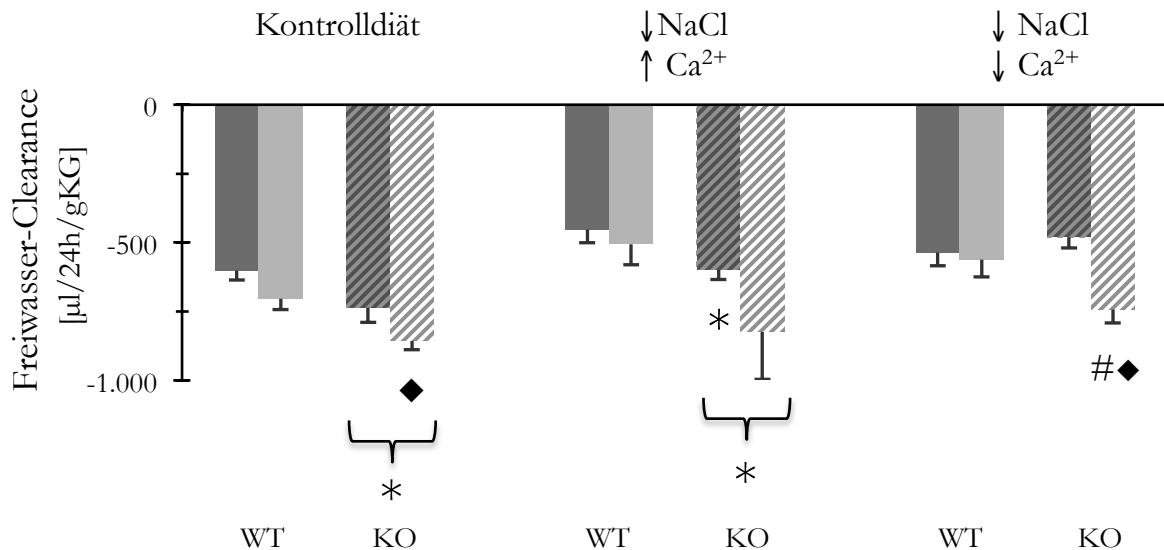


Diagramm 20 | Freiwasser-Clearance

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=3-8; #: p<0,05, Geschlechtsunterschied innerhalb eines Genotyps; *: p<0,05, WT-♂ vs. KO-♂; ◆: p<0,05, WT-♀ vs. KO-♀; geschweifte Klammer mit *: p<0,05, WT vs. KO geschlechtsunabhängig; **dunkelgrau**: ♂, **hellgrau**: ♀.

Zusammenfassend wiesen die Mäuse einen antidiuretischen Zustand während des metabolischen Versuchs auf. Interessanterweise ging die negativere FWC der KO-Tiere nicht mit einer verminderten Harnflussrate einher (Vergl. Abschnitt 3.3.1).

3.3.4 Elektrolytexkretion

Nachdem bisher nur Parameter betrachtet wurden, welche Aussagen über die allgemeine Nierenfunktion treffen, liegt der Fokus im Folgenden auf der renalen und enteralen Exkretion sowie Bilanzierung bestimmter Elektrolyte und des Harnstoffs.

Neben der Exkretion, wurde auch die fraktionelle Exkretion (FE) betrachtet. Hierbei handelt es sich um den Anteil einer filtrierten Substanz, welche tatsächlich mit dem Urin ausgeschieden wird. Wird eine Substanz vollständig rückresorbiert, ist die FE 0 %, wird sie nur filtriert, beträgt die FE 100 % [7].

3.3.4.1 Renale Kalziumausscheidung

Das Hauptaugenmerkt lag dabei auf der Kalziumausscheidung, begründet darin, dass das humane Krankheitsbild bei *FAM20A*-Mutationen mit einer Nierenverkalkung einhergeht.

Die Kalziumausscheidung spiegelte zunächst einmal die Diäten wider, mit einer deutlich höheren Kalziumexkretion unter der $\downarrow\text{NaCl}/\uparrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät. Dabei schieden die KO-Weibchen im Vergleich zu WT sowohl fraktionell als auch absolut deutlich mehr Kalzium aus. Dies führte zusätzlich dazu, dass KO auch bei der geschlechtsunabhängigen Betrachtung eine höhere Exkretion aufwies. Unter der Kontrolldiät wurde im WT ein Geschlechtsunterschied festgestellt, indem die Weibchen mehr ausschieden. Dies konnte auch unter der $\downarrow\text{NaCl}/\downarrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät beobachtet werden. Außerdem schieden die KO-Männchen unter Kontrolldiät mehr als die WT-Männchen aus (**Diagramm 21**).

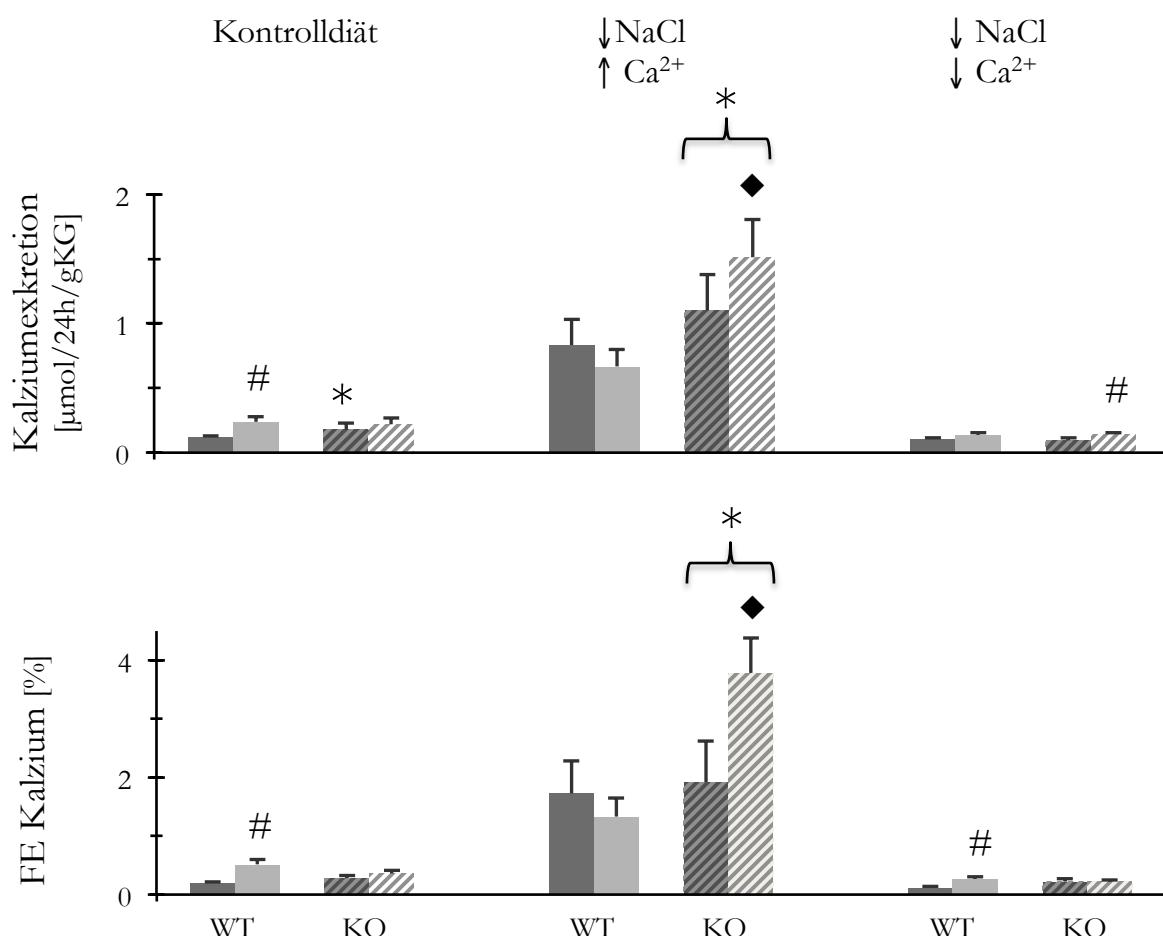


Diagramm 21 | Kalziumausscheidung im Urin sowie fraktionelle Kalziumexkretion

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=5-8; #: p<0,05, Geschlechtsunterschied innerhalb eines Genotyps; *: p<0,05, WT-♂ vs. KO-♂; ♦: p<0,05, WT-♀ vs. KO-♀; geschweifte Klammer mit *: p<0,05, WT vs. KO geschlechtsunabhängig; **dunkelgrau**: ♂, **hellgrau**: ♀; **FE**: fraktionelle Exkretion.

3.3.4.2 Renale Natriumausscheidung

Auch die Natriumausscheidung im Urin sowie die fraktionelle Natriumexkretion gaben die Elektrolytzusammensetzung des Futters wider, indem die Exkretion unter der Kontrolldiät um ein Vielfaches höher war als unter den natriumarmen Spezialdiäten. Es waren keine systematischen Unterschiede zwischen den Geschlechtern bzw. den Genotypen erkennbar (Diagramm 22).

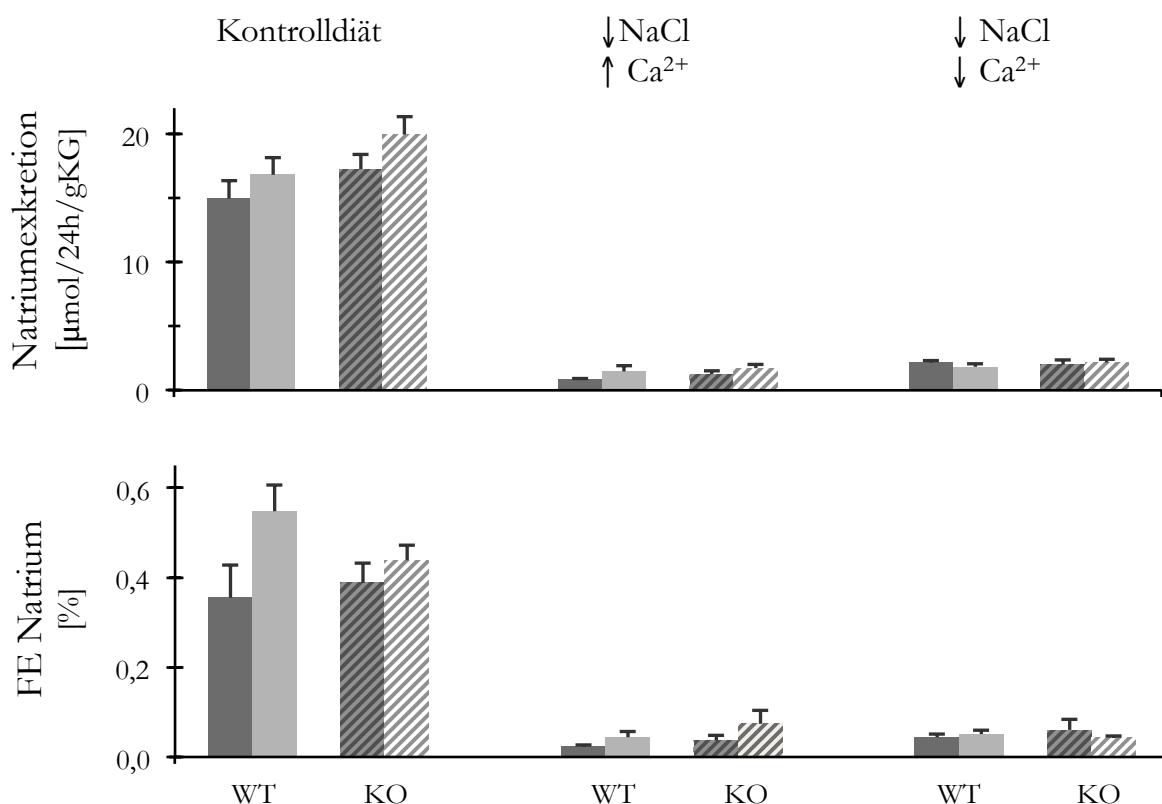


Diagramm 22 | Natriumausscheidung im Urin sowie fraktionelle Natriumexkretion

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=4-8; dunkelgrau: ♂, hellgrau: ♀; FE: fraktionelle Exkretion.

3.3.4.3 Renale Kaliumausscheidung

Bei Betrachtung der Kaliumexkretion im Urin fiel unter der Kontrolldiät eine erhöhte Ausscheidung von KO bei der geschlechtsunabhängigen Betrachtung auf, sowie für die KO-Männchen verglichen mit dem WT. Weiter ist ein Geschlechtsunterschied für die fraktionelle Ausscheidung bei WT erkennbar. Beides waren jedoch Einzelbefunde, die sich nicht in den korrespondierenden Ausscheidungswerten wiederholten. Auch in den Diätgruppen waren keine konsistenten systematischen Unterschiede zwischen den Genotypen oder Geschlechtern erkennbar. Es gab jeweils einen Geschlechtsunterschied bei KO, indem die Männchen weniger Kalium ausschieden. Interessanterweise waren die Kaliumausscheidungswerte unter den natriumarmen Spezialdiäten in allen Gruppen deutlich erniedrigt, welches auf eine geringe Beteiligung des Sammelrohrs bei der Natriumresorption unter diesen Diäten hinweist, da dort eine inverse Resorption von Natrium und Kalium vorliegt (**Diagramm 23**)^[7].

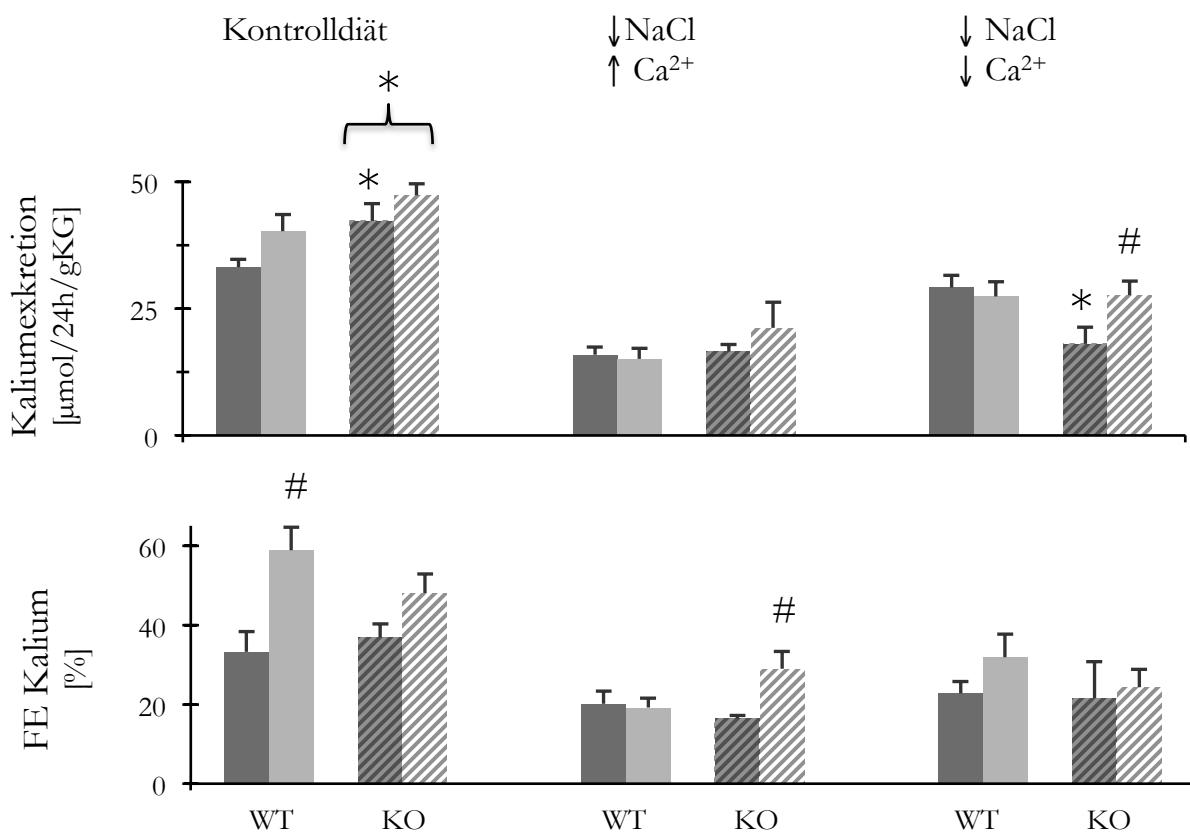


Diagramm 23 | Kaliumausscheidung im Urin sowie fraktionelle Kaliumexkretion

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=4-8; #: p<0,05, Geschlechtsunterschied innerhalb eines Genotyps; *: p<0,05, WT-♂ vs. KO-♂; geschweifte Klammer mit *: p<0,05, WT vs. KO geschlechtsunabhängig; **dunkelgrau:** ♂, **hellgrau:** ♀; FE: fraktionelle Exkretion.

3.3.4.4 Renale Magnesiumexkretion

Bei der Magnesiumausscheidung im Urin konnte unter der Kontrolldiät ein klarer Geschlechtsunterschied sowohl bei WT als auch bei KO festgestellt werden, indem die Weibchen mehr exkretierten (WT-Weibchen +134 % und KO-Weibchen +74 %). Dieser trat ebenfalls unter der $\downarrow\text{NaCl}/\downarrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät auf, unter der $\downarrow\text{NaCl}/\uparrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät war der Unterschied unterdrückt. Hier zeigte sich jedoch ein Unterschied zwischen den Genotypen bei der geschlechtsunabhängigen Betrachtung mit einer erhöhten Exkretion von KO, welcher auch bei der FE zu erkennen war. Ansonsten zeigte die fraktionelle Magnesiumausscheidung ein heterogenes Bild mit einer höheren FE der WT-Weibchen sowohl unter der Kontrolldiät als auch der $\downarrow\text{NaCl}/\downarrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät sowie einer erhöhten FE der KO-Weibchen unter der $\downarrow\text{NaCl}/\uparrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät (**Diagramm 24**).

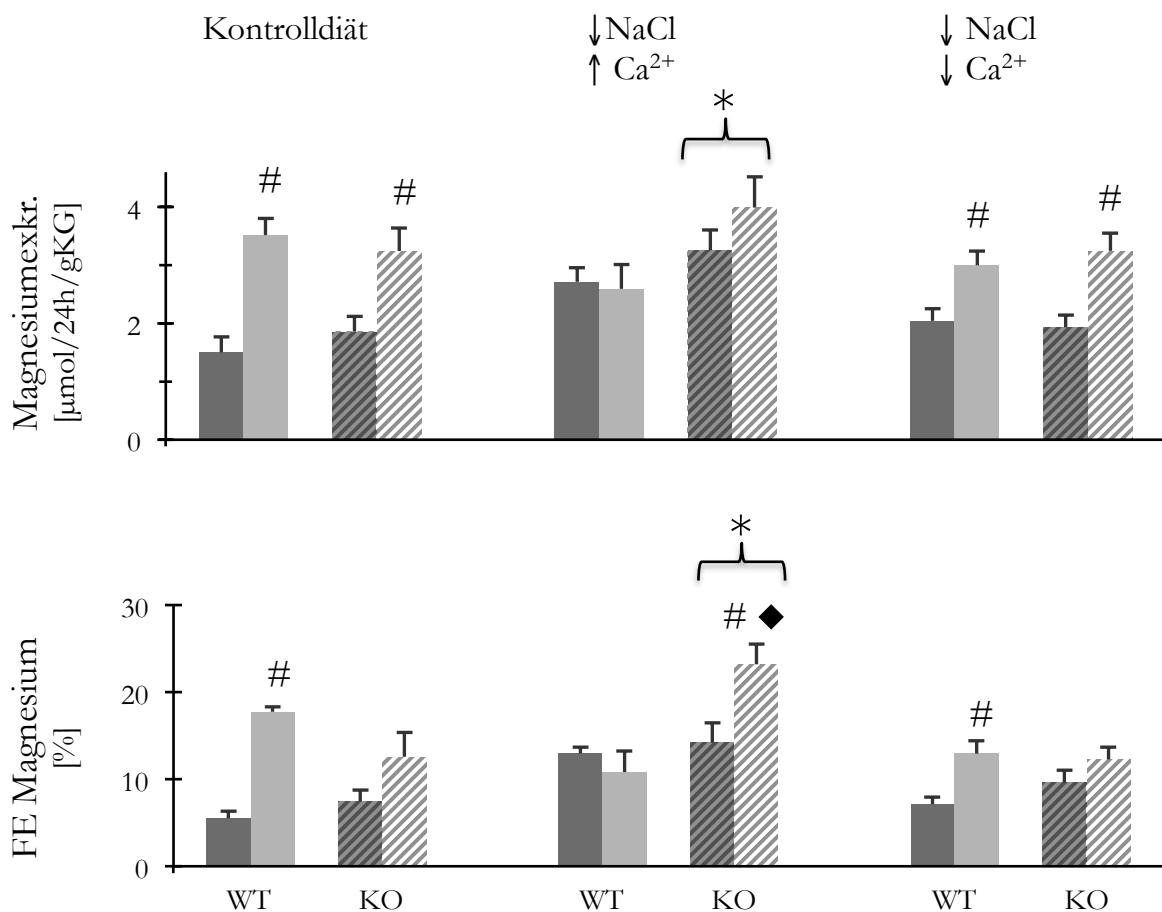


Diagramm 24 | Magnesiumausscheidung im Urin sowie fraktionelle Magnesiumexkretion

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=5-8; #: p<0,05, Geschlechtsunterschied innerhalb eines Genotyps; ♦: p<0,05, WT-♀ vs. KO-♀; geschweifte Klammer mit *: p<0,05, WT vs. KO geschlechtsunabhängig; **dunkelgrau**: ♂, **hellgrau**: ♀; **FE**: fraktionelle Exkretion.

3.3.4.5 Renale Chloridausscheidung

Die Werte der Chloridausscheidung im Urin sowie die fraktionelle Chloridexkretion spiegelten die Diätsituation mit einem Natriumchlorid-Anteil von 0,47 % in der Kontrolldiät und 0,04 % in den natriumchloridarmen Diäten wider und hatten ein nahezu identisches Muster wie die Natriumausscheidung. Unsystematische Unterschiede bei der renalen Exkretion konnten unter der Kontrolldiät zwischen den Genotypen geschlechtsunabhängig und unter der $\downarrow\text{NaCl}/\uparrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät für den Genotyp der Männchen festgestellt werden (Diagramm 25).

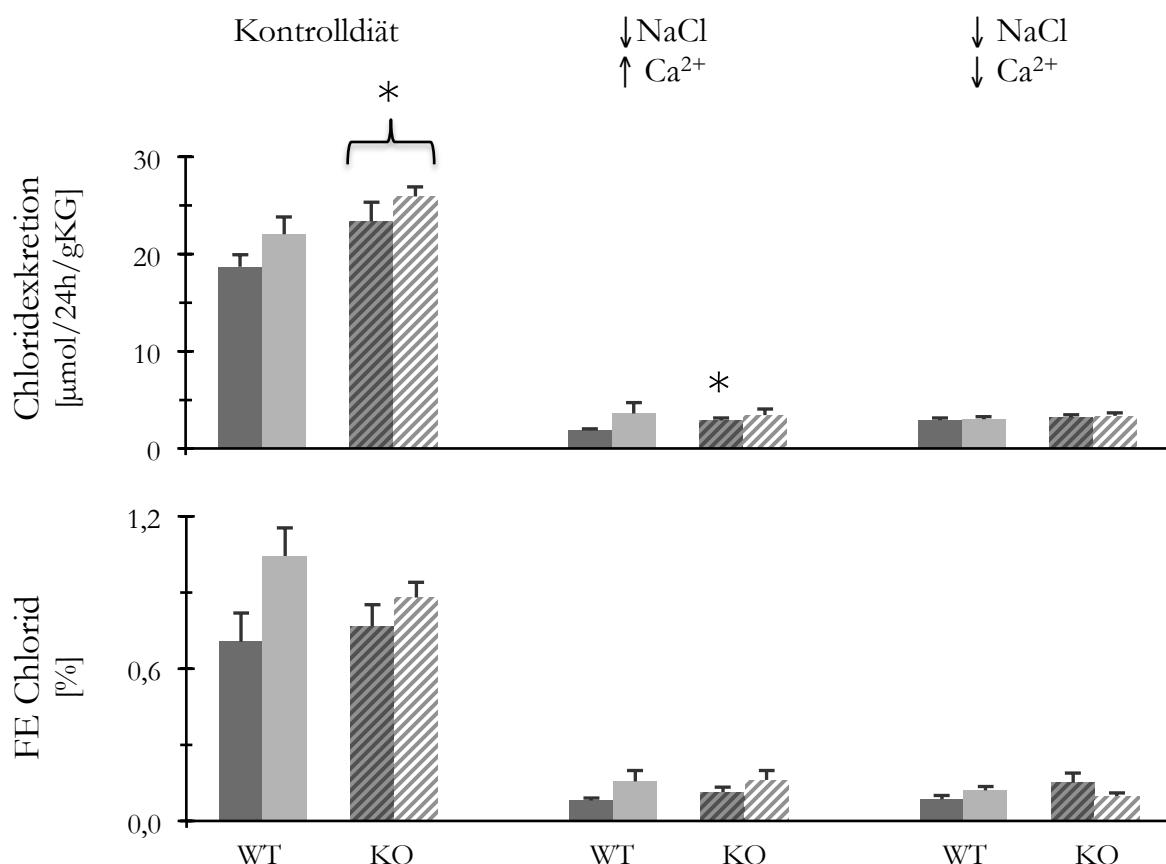


Diagramm 25 | Chloridausscheidung im Urin sowie fraktionelle Chloridexkretion

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=4-8; *: p<0,05, WT-♂ vs. KO-♂; geschweifte Klammer mit *: p<0,05, WT vs. KO geschlechtsunabhängig; **dunkelgrau:** ♂, **hellgrau:** ♀; **FE:** fraktionelle Exkretion.

3.3.4.6 Renale Phosphatexkretion

Besonders eindrucksvoll waren die Messwerte für die Phosphatexkretion im Urin und die fraktionelle Phosphatexkretion. Sie zeigten den physiologischen Zusammenhang des Kalzium-Phosphat-Haushaltes, bei der eine Störung der Kalzumbilanz mit einer gegenläufigen renalen Phosphatausscheidung beantwortet wird.

Die Exkretion war unter der $\downarrow\text{NaCl}/\downarrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät am höchsten und unter $\downarrow\text{NaCl}/\uparrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät minimal. Diese Anpassung gelang den WT- und KO-Tieren in gleicher Weise, wobei unter der Kontrolldiät und der $\downarrow\text{NaCl}/\downarrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät eine niedrigere Phosphatausscheidung bei den KO-Männchen festgestellt wurde. Die FE wies diese Unterschiede nicht auf. Des Weiteren wurde unter der Kontrolldiät sowohl bei der Phosphatexkretion als auch bei der FE der gleiche Geschlechtsunterschied wie bei der Kalziumausscheidung zu Gunsten der WT-Weibchen beobachtet. Dieser Unterschied war bei den KO-Tieren durch eine erhöhte Phosphatausscheidung bei den Männchen aufgehoben (**Diagramm 26**).

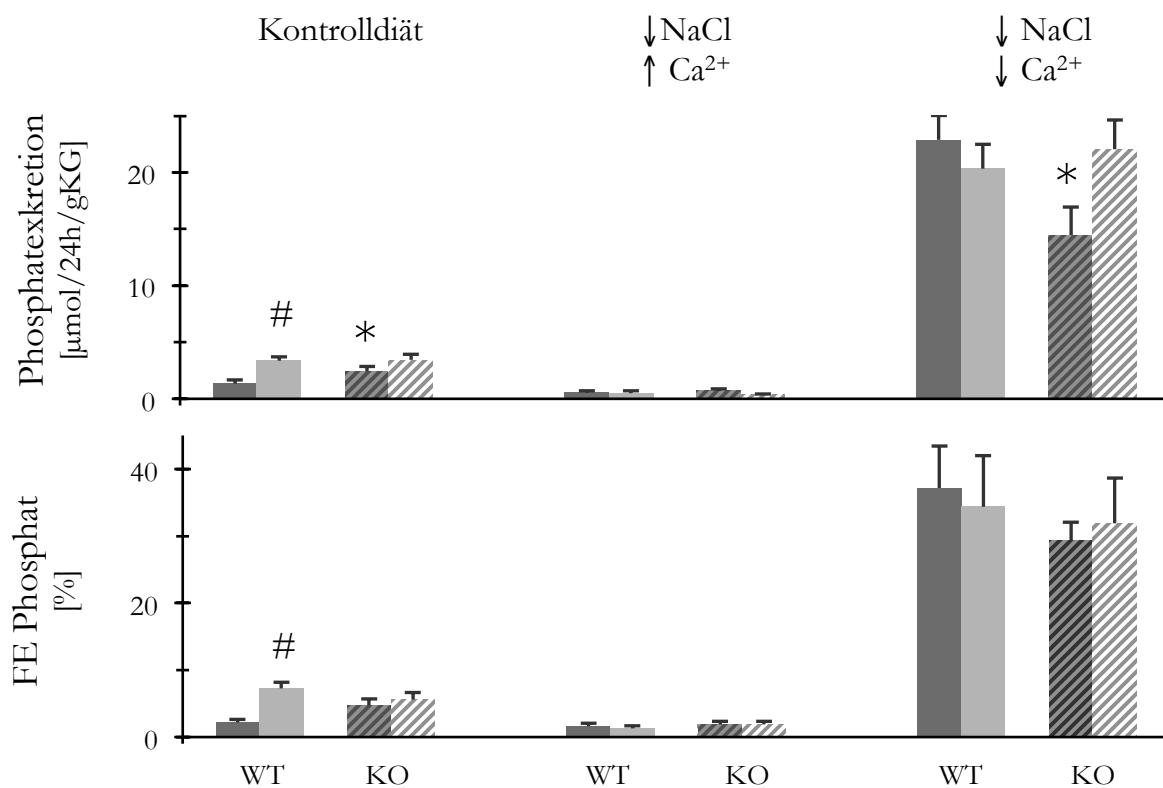


Diagramm 26 | Phosphatausscheidung im Urin sowie fraktionelle Phosphatexkretion

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=5-8; #: p<0,05, Geschlechtsunterschied innerhalb eines Genotyps; *: p<0,05, WT-♂ vs. KO-♂; **dunkelgrau:** ♂, **hellgrau:** ♀; **FE:** fraktionelle Exkretion.

3.3.4.7 Renale Harnstoffexkretion

Die Harnstoffausscheidung wird durch den Eiweißstoffwechsel, den Säure-Basen-Haushalt und die Harnkonzentrierung beeinflusst [7]. Die Untersuchung der Harnstoffexkretion im Urin und der fraktionellen Harnstoffexkretion ergaben unter der Kontrolldiät einen Geschlechtsunterschied beim WT. Die Harnstoffausscheidung war unter der Kontrolldiät und der $\downarrow\text{NaCl}/\uparrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät bei den KO-Männchen sowie insgesamt bei KO erhöht. Die fraktionelle Ausscheidung war unter $\downarrow\text{NaCl}/\uparrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät bei den KO-Weibchen erhöht, sowohl verglichen mit WT als auch innerhalb des Genotyps. Bei der fraktionellen Ausscheidung unter $\downarrow\text{NaCl}/\downarrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät gab es wiederum innerhalb von WT einen Geschlechtsunterschied (**Diagramm 27**).

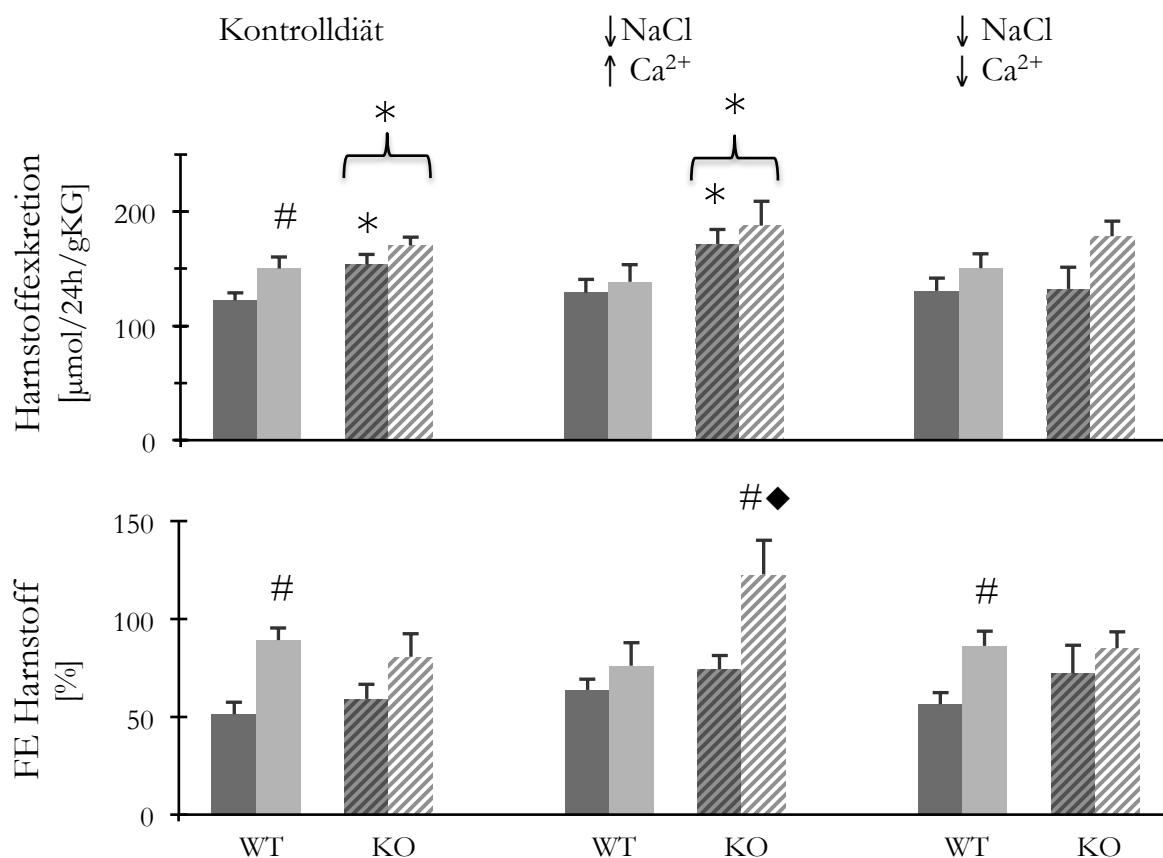


Diagramm 27 | Harnstoffausscheidung im Urin sowie fraktionelle Harnstoffexkretion

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=5-8; #: p<0,05, Geschlechtsunterschied innerhalb eines Genotyps; *: p<0,05, WT-♂ vs. KO-♂; ♦: p<0,05, WT-♀ vs. KO-♀; geschweifte Klammer mit *: p<0,05, WT vs. KO geschlechtsunabhängig; **dunkelgrau:** ♂, **hellgrau:** ♀; **FE:** fraktionelle Exkretion.

Resümierend lässt sich sagen, dass es hinsichtlich der renalen Elektrolyt- und Harnstoffexkretion sowie dessen fraktionellen Exkretion nur vereinzelte Hinweise auf einen Effekt des Genotyps gab. Deutlich ist dieser z.B. für die erhöhte Kalziumausscheidung unter der $\downarrow\text{NaCl}/\uparrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät für die KO-Weibchen gewesen. Außerdem zeigte sich ein Unterschied hinsichtlich der Magnesiumexkretion zwischen den Geschlechtern unabhängig vom Genotyp, indem die Weibchen mehr exkretierten. Darüber hinaus konnten die KO-Mäuse genauso gut auf die Elektrolytunterschiede in den Diäten reagieren wie die WT-Tiere.

3.3.4.8 Enterale Kalziumausscheidung

Auch der ausgeschiedene Kot wurde im metabolischen Versuch auf den Gehalt von Kalzium, Natrium und Kalium untersucht, damit eine genauere Bilanzierung dieser wichtigen Elektrolyte zu erreichen war.

Betrachtet man zunächst die Kalziumausscheidung im Kot, spiegelten sich auch hier die unterschiedlichen Diäten wider. Während unter der Kontrolldiät und der $\downarrow\text{NaCl}/\uparrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät annähernd gleich viel ausgeschieden wurde, betrug die Ausscheidungsmenge unter der niedrig-Kalziumdiät wie zu erwarten nur einen Bruchteil davon. Unterschiede zwischen den Genotypen waren nicht zu erkennen. Unter der $\downarrow\text{NaCl}/\downarrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät konnten die WT-Männchen Kalzium besser zurückhalten als WT-Weibchen (**Diagramm 28**).

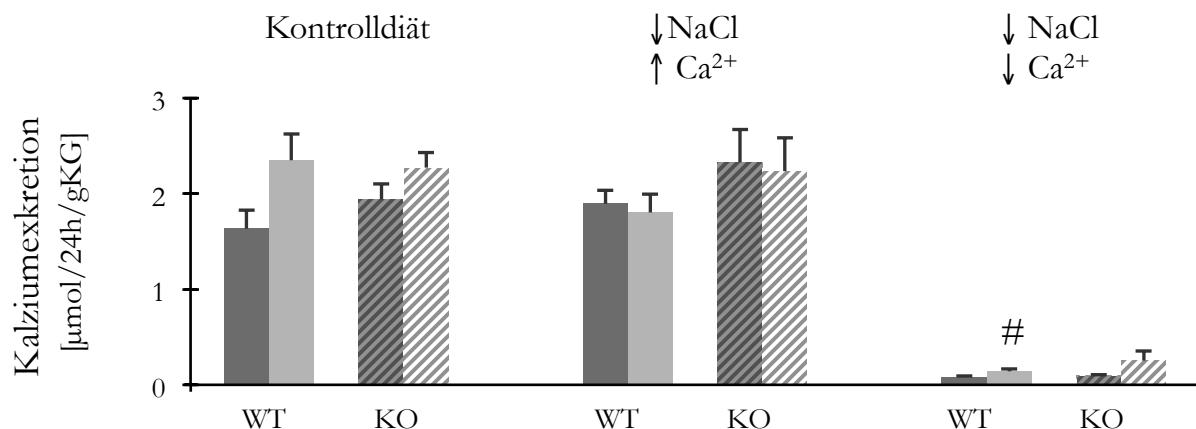


Diagramm 28 | Kalziumexkretion im Kot

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=6-8; #: p<0,05, Geschlechtsunterschied innerhalb eines Genotyps; **dunkelgrau:** ♂, **hellgrau:** ♀.

3.3.4.9 Enterale Natriumausscheidung

Auch hinsichtlich der Natriumexkretion fielen diätische Unterschiede auf, indem unter der Kontrolldiät ein Vielfaches mehr ausgeschieden wurde, als unter den natriumarmen Spezialdiäten. Die KO-Weibchen schieden unter der Kontrolldiät mehr Natrium aus als die KO-Männchen. Unter der $\downarrow\text{NaCl}/\uparrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät konnte eine erniedrigte Natriumausscheidung bei den WT-Weibchen sowohl im Vergleich zu den KO-Weibchen als auch innerhalb des Genotyps festgestellt werden. Bei der geschlechtsunabhängigen Betrachtung war unter den natriumarmen Spezialdiäten die Exkretion von KO jeweils erhöht (**Diagramm 29**, man beachte die unterschiedliche Skalierung).

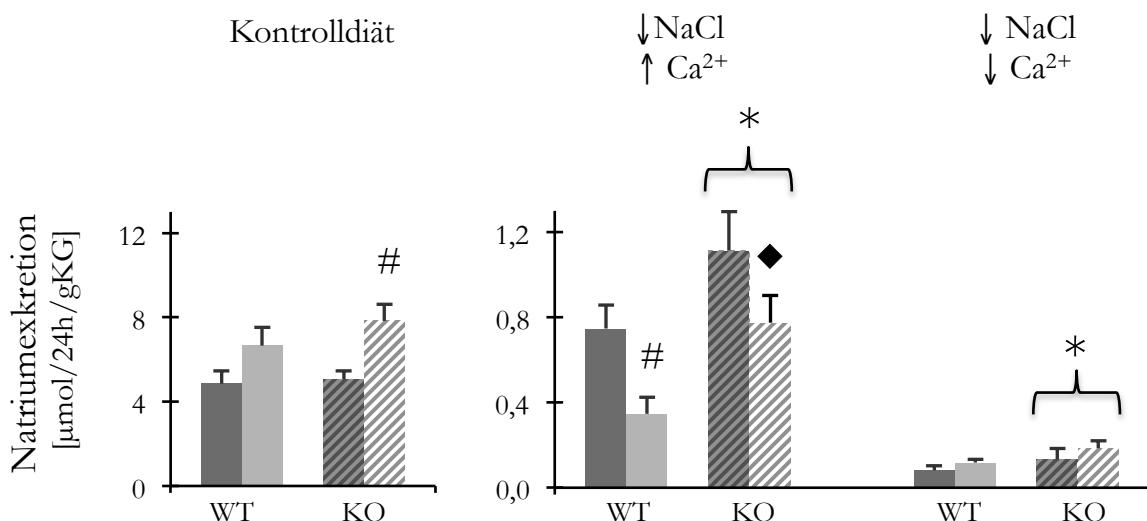


Diagramm 29 | Natriumexkretion im Kot

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=6-8; #: p<0,05, Geschlechtsunterschied innerhalb eines Genotyps; ◆: p<0,05, WT-♀ vs. KO-♀; geschweifte Klammer mit *: p<0,05, WT vs. KO geschlechtsunabhängig; **dunkelgrau**: ♂, **hellgrau**: ♀, man beachte die unterschiedliche Skalierung.

3.3.4.10 Enterale Kaliumausscheidung

Die Kaliumausscheidung im Kot war interessanterweise unter den beiden natriumarmen Diäten deutlich niedriger als unter der Kontrolldiät. Unter der $\downarrow\text{NaCl}/\uparrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät wurde ein erhöhter Wert bei den WT-Männchen im Vergleich zu den WT-Weibchen gefunden sowie eine erhöhte Exkretion von KO unter der $\downarrow\text{NaCl}/\downarrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät beim geschlechtsunabhängigen Vergleich (**Diagramm 30**).

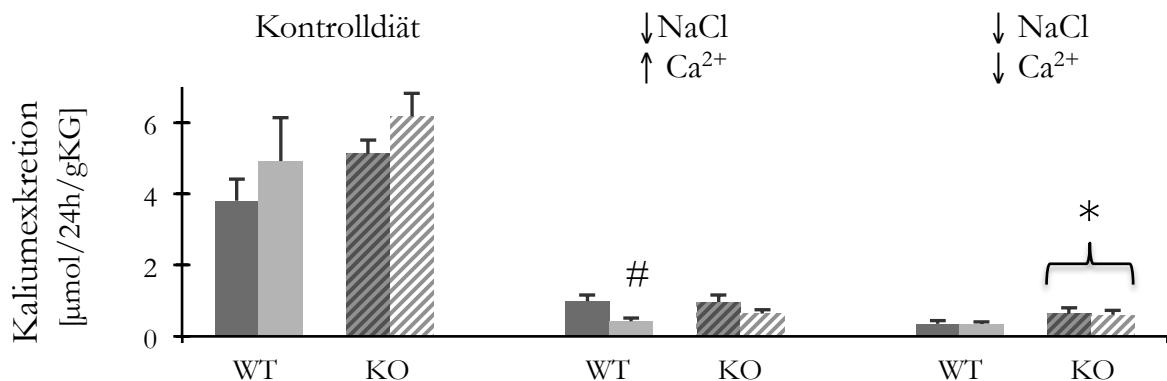


Diagramm 30 | Kaliumexkretion im Kot

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=6-8; #: p<0,05, Geschlechtsunterschied innerhalb eines Genotyps; geschweifte Klammer mit *: p<0,05, WT vs. KO geschlechtsunabhängig; **dunkelgrau**: ♂, **hellgrau**: ♀.

3.3.5 Elektrolytbilanzierung

Zur Integration der Daten aus dem metabolischen Versuch wurde eine Bilanzierung der Elektrolyte durchgeführt, welche überwiegend durch die Nahrungsaufnahme sowie Urin- und Stuhlausscheidung beeinflusst wurde. Die Salzaufnahme über das Trinkwasser war nur marginal (0-2,5 %). Für die Exkretion von Natrium, Kalium und Chlorid war maßgeblich der Urin verantwortlich (>85 %). Kalzium, Magnesium und Phosphat wurden hingegen vorwiegend über den Stuhl ausgeschieden. Im Folgenden ist bei der Bilanzierung für Magnesium, Chlorid und Phosphat aus methodischen Gründen die Stuhlausscheidung nicht eingeflossen, welches zu einer Überschätzung dieser Bilanzen führte.

3.3.5.1 Kalzumbilanz

Die Kalzumbilanz war in allen Gruppen positiv und es bildeten sich sehr gut die diätischen Unterschiede hinsichtlich der Kalziumzufuhr ab. Dabei fiel auf, dass die KO-Tiere unter der Kontroll- und $\downarrow \text{NaCl} / \uparrow \text{Ca}^{2+}$ -Diät bei der geschlechtsunabhängigen Betrachtung eine signifikant höhere Kalzumbilanz aufwiesen. Hervorzuheben ist dabei, dass die höhere Bilanz von KO nicht durch eine verminderte renale Kalziumexkretion zustande kam, denn diese war bei KO sogar höher als bei WT (Diagramm 21). Unter der $\downarrow \text{NaCl} / \downarrow \text{Ca}^{2+}$ -Diät konnte

lediglich eine etwas erhöhte Kalziumbilanz bei WT-Weibchen im Vergleich zu WT-Männchen beobachtet werden (**Diagramm 31**, man beachte die unterschiedliche Skalierung).

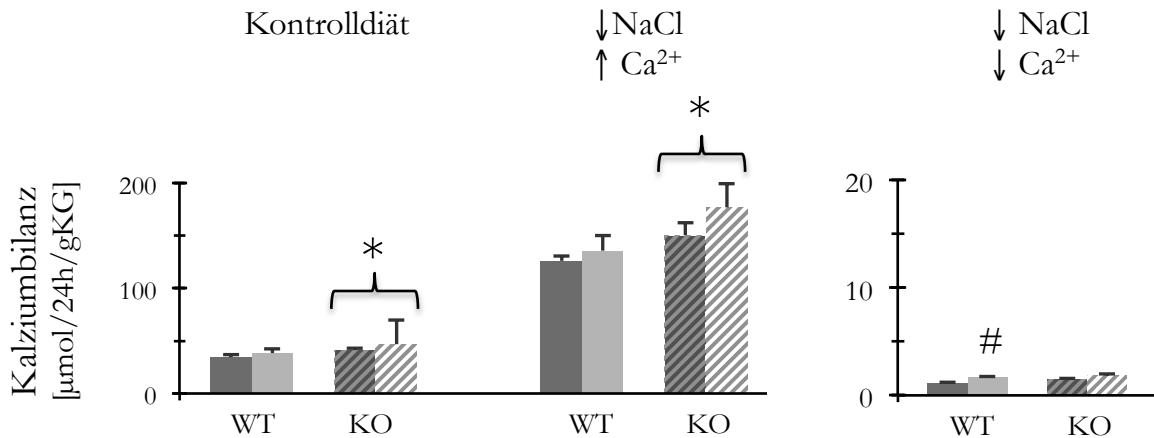


Diagramm 31 | Kalziumbilanz

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=6-8; #: p<0,05, Geschlechtsunterschied innerhalb eines Genotyps; geschweifte Klammer mit *: p<0,05, WT vs. KO geschlechtsunabhängig; **dunkelgrau**: ♂, **hellgrau**: ♀, man beachte die unterschiedliche Skalierung

3.3.5.2 Natriumbilanz

Während die Kalziumbilanz ausschließlich positiv war, ergab sich unter der Kontrolldiät eine negative Natriumbilanz. Unter den natriumarmen Diäten war die Bilanz variabel. Die Genotypen unterschieden sich nicht voneinander. Bei den WT-Tieren konnte unter der ↓NaCl/↓Ca²⁺-Diät eine etwas positivere Bilanz bei den Weibchen berechnet werden (**Diagramm 32**, man beachte die unterschiedliche Skalierung).

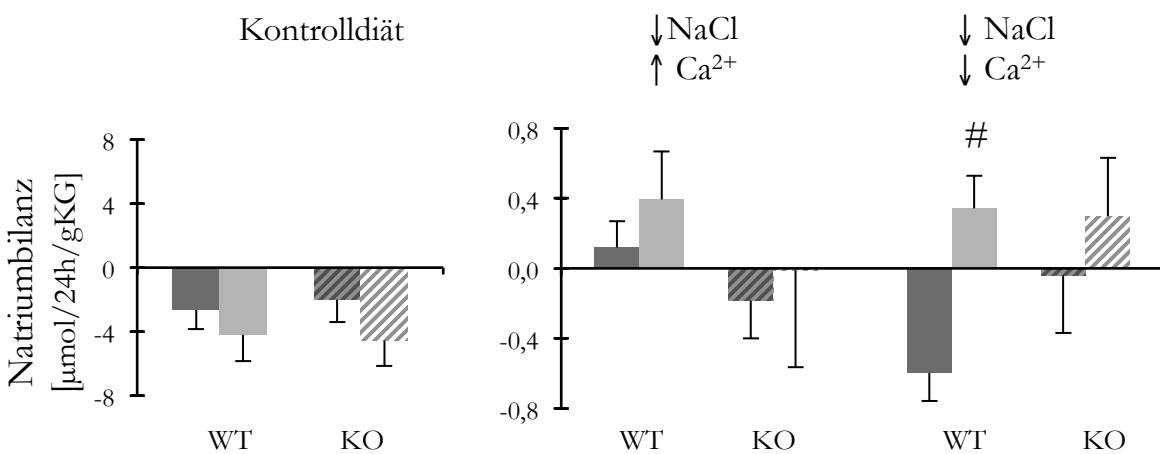


Diagramm 32 | Natriumbilanz

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=6-8; #: p<0,05, Geschlechtsunterschied innerhalb eines Genotyps; **dunkelgrau**: ♂, **hellgrau**: ♀.

3.3.5.3 Kalumbilanz

Die Kalumbilanz war unter der Kontrolldiät ausgeglichen. Unter den niedrig-Natriumdiäten war die Kalumbilanz hingegen positiv, mit Ausnahme der WT-Männchen unter der kalziumarmen Diät, welche eine ausgeglichene Bilanz hatten. Hieraus ergab sich sowohl ein Unterschied innerhalb WT als auch verglichen mit den KO-Männchen, sodass insgesamt ein Unterschied für den Genotyp bei der geschlechtsunabhängigen Betrachtung berechnet wurde. Darüber hinaus konnten keine Unterschiede für Geschlecht oder Genotyp gefunden werden (**Diagramm 33**).

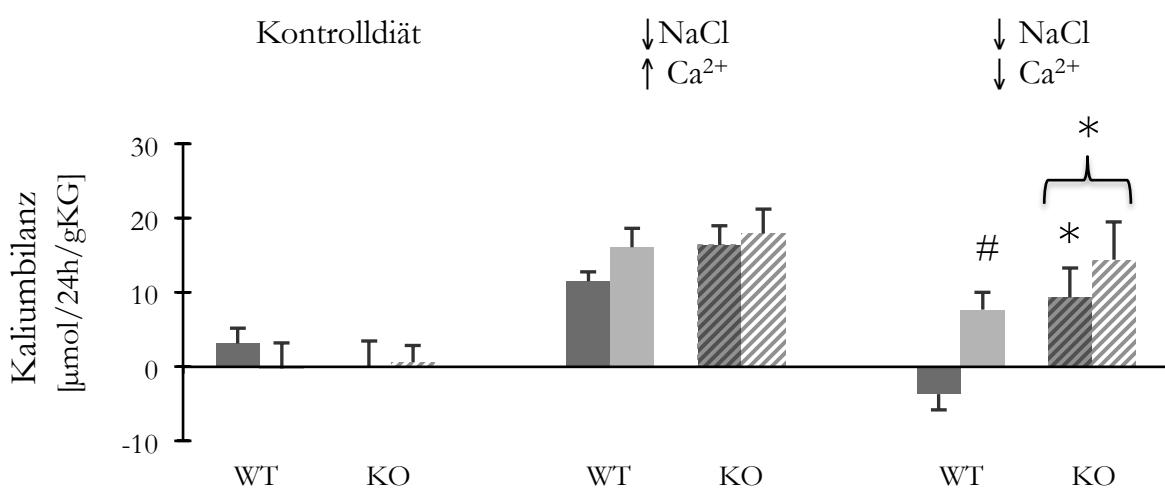
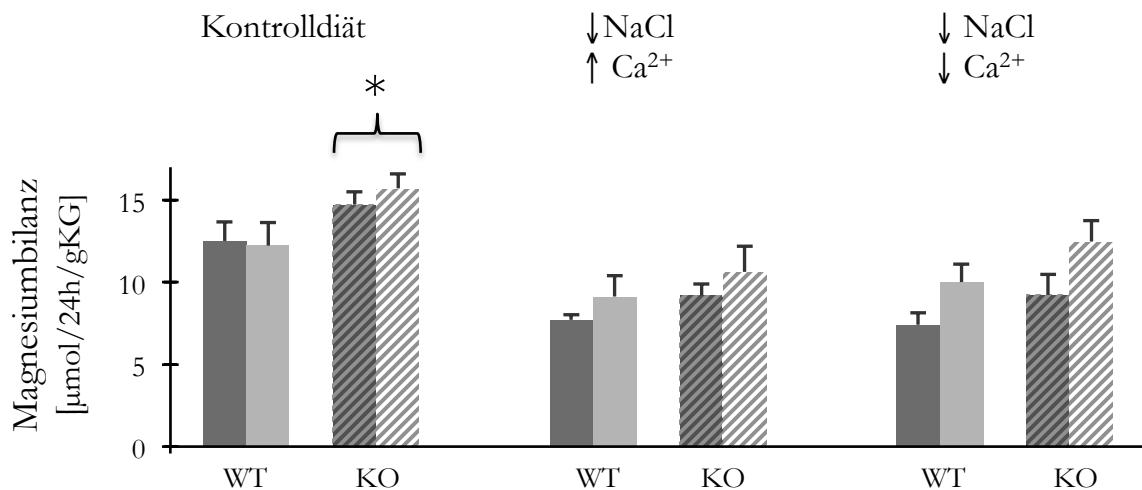


Diagramm 33 | Kalumbilanz

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=5-8; #: p<0,05: Geschlechtsunterschied innerhalb eines Genotyps; *: p<0,05: WT-♂ vs. KO-♂; geschweifte Klammer mit *: p<0,05, WT vs. KO geschlechtsunabhängig; **dunkelgrau**: ♂, **hellgrau**: ♀.

3.3.5.4 Magnesiumbilanz

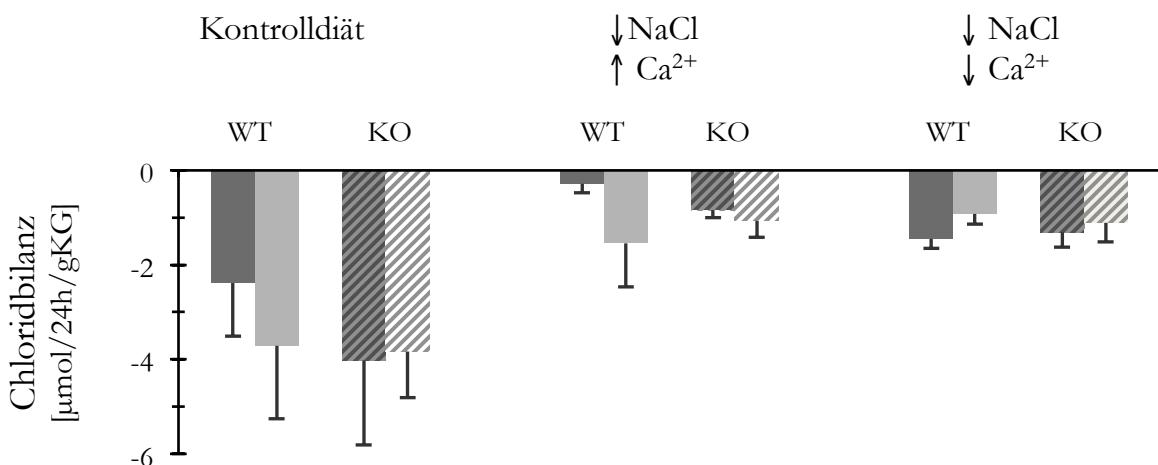
Die Magnesiumbilanz war durchgehend positiv und es konnte lediglich ein Unterschied unter der Kontrolldiät zwischen den Genotypen bei geschlechtergepoolter Betrachtung detektiert werden. Interessant ist hierbei der Vergleich mit der renalen Magnesiumexkretionen (**Diagramm 24**). Hier war die Ausscheidung bei den weiblichen Tieren jeweils deutlich höher, d.h. der fehlende Unterschied in der Bilanz kann möglicherweise durch einen Geschlechtsunterschiede in der enteralen Magnesiumausscheidung erklärt werden, welche aufgrund der fehlenden Stuhldaten in der Bilanz nicht berücksichtigt wurden (**Diagramm 34**).

**Diagramm 34 | Magnesiumbilanz**

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=7-8; geschweifte Klammer mit *: p<0,05, WT vs. KO geschlechtsunabhängig; **dunkelgrau**: ♂, **hellgrau**: ♀.

3.3.5.5 Chloridbilanz

Die Chloridbilanz fiel durchgehend negativ aus, mit Ausnahme der WT-Männchen unter der $\downarrow\text{NaCl}/\uparrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät, welche ausgeglichen war. Die größeren Beträge unter der Kontrolldiät sind auf dem Hintergrund der insgesamt höheren Chloridzufuhr im Vergleich zu den niedrig-Natriumdiäten zu sehen. Es konnten keine Unterschiede für das Geschlecht oder den Genotyp gefunden werden (**Diagramm 35**).

**Diagramm 35 | Chloridbilanz**

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=6-8; **dunkelgrau**: ♂, **hellgrau**: ♀.

3.3.5.6 Phosphatbilanz

Betrachtet man zuletzt die Phosphatbilanz, werden die Anpassungsmechanismen der Niere im Rahmen der Parathormonwirkung bei Kalziummangel erkennbar. Während die Bilanz unter den Diäten mit normalem bzw. hohem Kalziumanteil deutlich positiv ausfiel, wurde unter der $\downarrow \text{NaCl}/\downarrow \text{Ca}^{2+}$ -Diät mehr Phosphat ausgeschieden, sodass sich die Bilanzsumme verkleinerte und bei den WT-Männchen sogar ausgeglichen war. Hieraus ergab sich sowohl ein Unterschied innerhalb von WT als auch verglichen mit den KO-Männchen, sodass insgesamt ein Unterschied für den Genotyp bei der geschlechtsunabhängigen Betrachtung berechnet wurde. Unter der Kontrolldiät konnte außerdem ein Unterschied zwischen den Genotypen bei gepoolten Geschlechtern ermittelt werden. Auch hier wurde, wie oben erläutert, die Phosphatausscheidung mit dem Stuhl in der Bilanzierung nicht berücksichtigt (**Diagramm 36**).

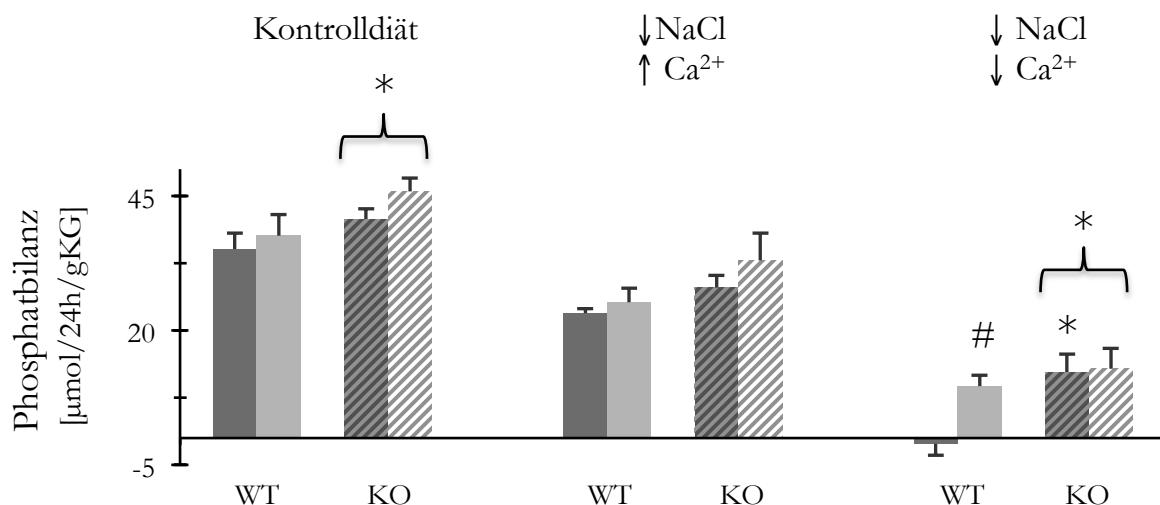


Diagramm 36 | Phosphatbilanz

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, getrennt nach Geschlecht und Genotyp; n=7-8; #: p<0,05: Geschlechtsunterschied innerhalb eines Genotyps; *: p<0,05: WT-♂ vs. KO-♂; geschweifte Klammer mit *: p<0,05, WT vs. KO geschlechtsunabhängig; dunkelgrau: ♂, hellgrau: ♀.

3.3.5.7 Fazit des metabolischen Versuchs

Wenn man nun die gesamten Ergebnisse des metabolischen Versuchs rekapituliert, lassen sich folgende Unterschiede hervorheben: die KO-Tiere zeigten eine erhöhte Nahrungsaufnahme und dementsprechend waren auch die Exkretionsmengen größer. Trotz der dadurch erhöhten Aufnahme von Salzen, zeigten die Bilanzen für Wasser, Natrium, Kalium und

Chlorid keine Unterschiede zum WT. Hingegen waren die Bilanzen von Kalzium-, Phosphat- und Magnesium (wenn auch nicht konsequent unter jeder Diät) bei KO positiver.

Die Analysen zeigten weiter einen deutlichen Geschlechterunterschied für die renale Magnesiumausscheidung, sowohl bei WT- als und bei KO, indem die Weibchen mehr exkretierten.

Welche Rückschlüsse hieraus gezogen werden können, wird im Folgenden diskutiert.

4 Diskussion

4.1 Methoden

4.1.1 Tiermodell Maus

Bisher ist das Verständnis zur Entstehung von frühen ektopen Präzipitationsprozessen, sowohl in der Niere als auch anderen Geweben, limitiert. Um hinsichtlich der Genese von Nephrokalzinosen neue Forschungsergebnisse gewinnen zu können, sind Untersuchungen an standardisierten Modellen notwendig. Zu diesem Zweck gibt es heutzutage unterschiedliche Tiermodelle. Hierzu zählt neben der Ratte und der Maus interessanterweise auch die Fliege *Drosophila melanogaster* ^[57].

Die Maus ist ein mittlerweile phänotypisch sehr gut charakterisierter Organismus, dessen gesamtes Genom analysiert und die Entwicklung hinsichtlich experimenteller Methoden weit entwickelt und standardisiert sind. Obwohl Nager selbst nicht anfällig für Nephrokalzinosen sind, werden sie als häufigstes Modell zur Untersuchung dessen verwendet ^[58].

Hierbei kann man unter anderem zwischen Studien unterscheiden, die mit einer experimentell erzeugten Nephrokalzinose nach endogenen Faktoren suchen, die protektiv gegen ektope Kalzifizierungen wirken (z.B. das Tamm-Horsfall-Protein ^[59,60]) oder Studien, welche Nephrokalzinose als Symptom eines fehlerhaften Transportmechanismus beschreiben (z.B. Claudin-10 in der Niere ^[61]). Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob FAM20A möglicherweise eine protektive Eigenschaft hinsichtlich ektoper Kalzifizierungen in der Niere besitzt.

Ein weiterer Aspekt, wieso das Modell Maus so gut in der Forschung etabliert ist, ist die phylogenetische Ähnlichkeit zum Menschen, erkennbar anhand vieler genetischer Homologien beider Organismen ^[62]. Auch das *FAM20A*-Gen ist bei Maus und Mensch nahezu identische, sodass von einer gleichen Funktion in beiden Organismen ausgegangen werden kann ^[4].

Bedenkt man den humanen Phänotyp beim ERS, ist hervorzuheben, dass sich die Maus als optimales Modell zur Erforschung von Schmelzdefekten erweist. Denn im Gegensatz zum

Menschen wachsen die Schneidezähne von Mäusen kontinuierlich nach, sodass auch bei der adulten Maus jedes Stadium der Zahnentwicklung begutachtet werden kann^[16].

Ein Nachteil der Maus im Vergleich zur Ratte ist die höhere Stressanfälligkeit, da physiologische Stressreaktionen die erhobenen Daten beeinflussen und können^[63].

4.1.2 Alizarin Rot Färbung

Die histologischen Bilder wurden mit der Hilfe des Anatomischen Instituts (*Campus Kiel*) hergestellt. Diese Verfahren werden dort routinemäßig angewandt und entsprechen somit höchstem Standard.

Die Alizarin Rot Färbung wurde hingegen in unserem Labor etabliert. Sie dient zum Nachweisen von Kalziumablagerungen^[64]. Zur Qualitätskontrolle wurde einer Positivprobe mit nachgewiesener NC bei Claudin-10-KO-Mäusen durchgeführt^[61]. Hierbei konnten eindeutig Kalziumpräzipitate nachgewiesen werden (**Abbildung 20**). Somit ist diese Methode geeignet, um Nephrokalzinosen nachzuweisen. Die Detektionsgrenze für dieses Färbeverfahren wurde jedoch nicht ermittelt. Damit bleibt unklar, ob kleinste Präzipitate eventuell unerkannt blieben.

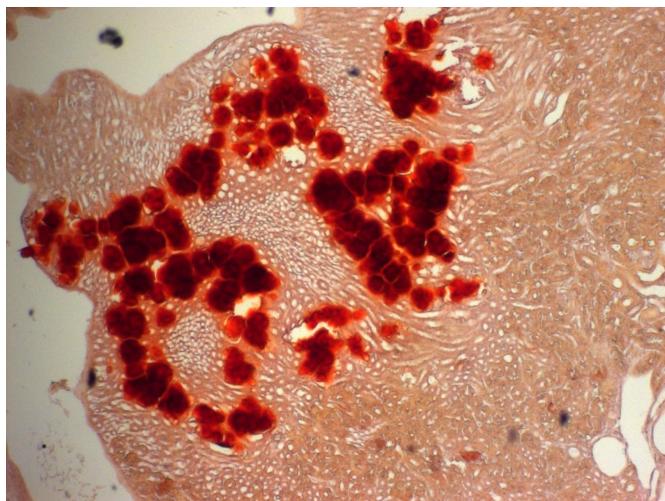


Abbildung 20 | Nephrokalzinose einer Claudin-10-Knockout-Maus

Erkennbar sind rote Kalziumpräzipitate in der Niere. Alizarin Rot Färbung.

4.1.3 Metabolischer Käfig

Mit Hilfe des selbstkonstruierten metabolischen Käfigs war es möglich, die tägliche Ein- und Ausfuhr der Versuchstiere auf einfache Weise zu dokumentieren und die Exkremeante zu asservieren. Jedoch kam es teilweise aufgrund der gitterartigen Plattform zu einer Vermischung der Exkremeante mit dem Futter. Daher erfolgte vor der Datenerhebung zusätzlich eine manuelle Trennung aller Komponenten, sodass die Verunreinigung auf ein Minimum reduziert wurde.

Eine weitere Ungenauigkeit während des metabolischen Versuchs waren Verdunstungsvorgänge des Urins. Aufgrund der hohen Luftfeuchtigkeit der Haltungsumgebung (relative Luftfeuchtigkeit von etwa 55%) ist aber davon auszugehen, dass es sich dabei um einen kleinen und systematischen Fehler in allen Versuchsgruppen handelt.

Weiterhin muss die ausgelöste Stressreaktion der Tiere durch die neue Umgebung berücksichtigt werden. Die äußereren Gegebenheiten wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Lautstärke und Belichtung wurden daher optimiert, während gleichzeitig die tägliche Nahrungsaufnahme und Fellpflege zur indirekten Beurteilung des Wohlbefindens begutachtet wurden [65]. Damit die erhobenen Daten nicht durch eine veränderte Stoffwechsellage verfälscht wurden, hatten die Tiere eine Eingewöhnungsphase von zwei Tagen. Anschließend wurden die Werte des dritten Tages bei wieder ausgeglichenem metabolischem Status ausgewertet [66,67]. Trotzdem muss aber weiterhin von einer besonderen Situation für die Tiere ausgegangen werden. Dies wird vor allem durch den bis zu dreifach erhöhten Stoffwechselumsatz unter der Kontrolldiät deutlich. Der Umsatz lag hier bei etwa 2,3 (WT) bzw. 2,7 (KO) $\text{kJ}/24\text{h}/\text{gKG}$. In der Literatur wird der normale Umsatz mit nur $0,97 - 1,7 \text{ kJ}/24\text{h}/\text{gKG}$ angegeben. Unter den Spezialdiäten wurde bei geringerer Energiedichte des Futters auch weniger gefressen, sodass der Umsatz rechnerisch im Normbereich lag, die Tiere aber deutlich an Gewicht verloren (**Diagramm 10**) [68]. Es ist dabei möglich, dass die geringere Futtermenge der Spezialdiäten mit einer anderen Konsistenz, Farbe sowie Geruch und mutmaßlich auch Geschmack zusammen hängen [69].

Außerdem ist bei der Auswertung der metabolischen Daten zu berücksichtigen, dass es bei der Gewinnung und Analyse bestimmter Parameter aus methodischen Gründen zu einem Informationsverlust gekommen ist und die Stichprobengröße daher zum Teil sehr klein ausgefallen ist.

4.2 Entstehung und Folgen von Amelogenesis Imperfecta

Wie im Ergebnisteil aufgeführt, konnte durch verschiedene Untersuchungsmethoden ein ausgeprägter Schmelzdefekt der KO-Tiere nachgewiesen werden (**Abbildung 16, 17 und 18**). Dies erklärt auch die makroskopisch sichtbare Weißfärbung der labialseitigen Schneidezähne, denn ein pathologisches Schmelzorgan führt zu einem verminderten Eisengehalt und einer veränderten Koloration sowie einer verminderten Resistenz und Härte des Zahnes^[19]. Weitere orale Defekte wie intrapulpale Kalzifizierungen, Gingivahyperplasie oder Pathologien am alveolären Knochen konnten in diesem Mausmodell jedoch nicht nachgewiesen werden.

Diese Untersuchungsergebnisse führen zu der Annahme, dass FAM20A ein essentiell notwendiges Protein für die physiologische Schmelzentwicklung ist und ein Verlust der Genfunktion zu einer Mindermineralisation der EZM sowie einem Verlust des Ameloblasten-Epithels führt. Unterstützt wird diese These durch den Nachweis von *FAM20A*-mRNA im odonten Gewebe sowie einer erhöhte Expression von FAM20A in sekretorischen Ameloblasten, welche für die Bildung des Schmelzorgans verantwortlich sind^[5,36,45].

Eine Hypothese zur Entstehung der pathologischen Zahnentwicklung wäre, dass FAM20A selbst als sekretiertes Glykoprotein Einfluss auf die EZM nimmt oder intrazellulär die Sekretion von Matrixproteinen reguliert und so für ein optimales Milieu zur Ausfällung von Hydroxylapatitkristallen (HAK) sorgt^[4]. Dieser Mechanismus zur Entstehung von AI ist auch schon von anderen organischen Matrixmolekülen, wie Enamelin oder Amelogenin bekannt^[29]. Jedoch lassen die neusten Forschungsergebnisse auch die Überlegung zu, dass es durch eine gestörte Interaktion von FAM20A und FAM20C zu der verminderten Mineralisation des Schmelzorgans kommt. Unterstützt wird diese Hypothese durch einen ähnlichen Zahnpänotyp beim Raine-Syndrom, welches durch den Funktionsverlust von FAM20C entsteht^[43]. Wie bereits in der Einleitung erläutert, ist FAM20A zum einen ein allosterischer Aktivator von FAM20C und beeinflusst so dessen katalytische Funktion positiv. Zum anderen konnte belegt werden, dass ein intaktes FAM20A Protein unabdingbar für die Sekretion von FAM20C ist. Ausgehend von diesem Wissensstand gäbe es zum einen die Möglichkeit, dass durch den Funktionsdefekt von FAM20A eine verminderte katalytische Aktivität von FAM20C die intrazelluläre Proteinphosphorylierung und -sekretion so beeinflusst, dass das dadurch veränderte extrazelluläre Milieu die Schmelzbildung hemmt. Belegt wird die These durch die nachweisliche Phosphorylierung von Schmelz-Matrixproteinen *in vitro* und im Zellverbund durch FAM20C^[47,70]. Bereits identifizierte Enzymdefekte, welche AI bedingen

sind u.a. der Verlust von Kallikrein 4 oder der Matrix-Metalloprotease 20^[29,31]. Andererseits wäre es auch möglich, dass eine verminderte Sekretion von FAM20C zu Schmelzdefekten führt oder sowohl der Verlust der Kinase-Aktivität als auch der Verlust der Funktion als extrazelluläres Matrixprotein eine Mindermineralisation bedingen (**Abbildung 21**)^[48].

Ob der Verlust der epithelartigen Anordnung der Ameloblasten ein primäres Phänomen ist konnte nicht festgestellt werden. FAM20A könnte einerseits Einfluss auf die Zellintegrität nehmen und zu einer gestörte Zell-Zell-Interaktion führen. Andererseits wäre es auch möglich, dass der Verlust des interzellulären Kontaktes durch eine pathologische EZM verursacht wird.

Letztendlich konnte in unserem Tiermodell der dem ERS entsprechende Schmelzdefekt bei den KO-Tieren nachgewiesen werden. Weitere Informationen über Vorgänge auf zellulärer Ebene zur Entstehung von AI konnten nicht gewonnen werden. Hierfür sind weitere Untersuchungen notwendig.

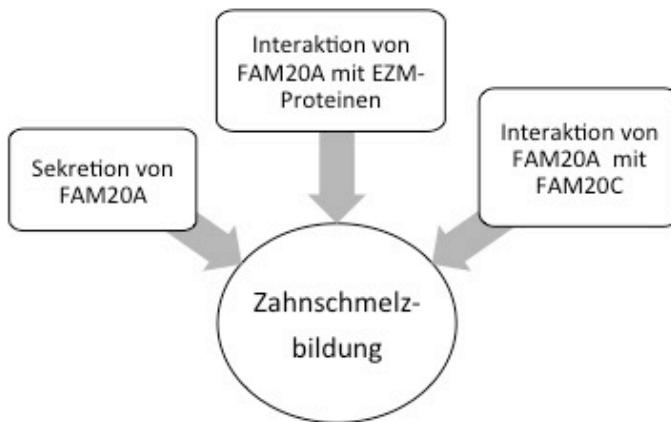


Abbildung 21 | Hypothesen zur Funktion von FAM20A bei der Schmelzbildung

Links: FAM20A nimmt selbst Einfluss als sekretiertes Glykoprotein auf die Extrazellulärmatrix, sodass sich ein normales Schmelzorgan entwickelt; *mittig:* FAM20A reguliert die Sekretion von anderen Matrixproteinen, sodass es zur Schmelzbildung kommt; *rechts:* FAM20A interagiert mit FAM20C, welches zur regelrechten Schmelzbildung führt.

4.2.1 Beeinflussung der Nahrungsaufnahme

Neben der o.g. Diskussion hinsichtlich der Funktion von FAM20A, sind auch die Auswirkungen einer pathologischen Zahmineralisation mit einhergehender Minderung von Resistenz und Härte zu berücksichtigen, welche die Nahrungsaufnahme beeinträchtigten^[18,19]. Auch wenn das Verhalten auf dem metabolischen Käfig zwischen WT und KO keine

offensichtlichen Unterschiede aufwies, ist erkennbar, dass die KO-Tiere im Vergleich zu WT mehr fraßen. Die größeren Futtermengen von KO könnten mit einer erleichterten Nahrungsaufnahme durch das Mehlfutter zusammenhängen, denn in der normalen Haltung wurde nur Pelletfutter verabreicht, welches durch die Nager selbst zerkleinert werden musste. Auch das geringere Gewicht der KO-Tiere spricht für eine verminderte Nahrungsaufnahme durch das Pelletfutter (**Diagramm 4 und 5**). Jedoch ist zu berücksichtigen, dass dieser Gewichtsunterschied schon im Säuglingsalter auftritt, während die Jungen noch durch die Muttermilch versorgt werden (**Diagramm 3**). Hier sollten keine Nachteile hinsichtlich der Nahrungsaufnahme vorhanden sein, sodass das Entwicklungsdefizit nicht nur auf den Schmelzdefekt zurückzuführen ist, sondern möglicherweise auch durch eine endogene Ursache entsteht. Hierfür spricht auch der geringere Anteil an KO-Nachkommen in der Gesamtpopulation (**Diagramm 2**). Denn zum Zeitpunkt der Genotypisierung in der 3. postpartalen Woche, waren bereits schwächere oder tote Geschwistertiere von der Mutter aussortiert worden^[71].

Das FAM20A-KO-Mausmodell von An et al. (2009) stimmt mit diesen Beobachtungen überein. Des Weiteren konnte in diesem Modell bei KO ein geminderter Glykogengehalt in den Hepatozyten als Ausdruck einer geringeren Nahrungsaufnahme nachgewiesen werden^[46].

4.3 Nierenfunktion und Elektrolythaushalt

Nachdem der Zahnpänotyp und Hypothesen zur Entstehung dessen diskutiert wurden, wird nun auf die zentrale Fragestellung der Forschungsarbeit eingegangen: Zeigten sich in der FAM20A-KO-Maus histologische sowie funktionelle Auffälligkeiten der Nieren oder bestanden Kompensationsschwierigkeiten hinsichtlich des Kalziumhaushaltes unter systematischer Änderung der Elektrolytzufuhr.

Durch den metabolischen Versuch konnten viele physiologische Regelmechanismen beobachtet werden. Der Fokus der Diskussion liegt jedoch auf den für die Fragestellung wichtigen Daten.

4.3.1 Blutparameter

Eine wichtige und auch im klinischen Alltag routinierte Methode zur Untersuchung der Nierenfunktion, ist die Bestimmung ausgewählter Plasmaparameter sowie die Durchführung einer BGA, da die Niere maßgeblich den Ionen- sowie Säure-Basen-Haushalt steuert. Es zeigte sich bei den erhobenen Daten, dass sämtliche Blutparameter wie Natrium, Kalium und Kalzium sowie Harnstoff und Kreatinin im Normbereich lagen. Dies weist auf eine intakte Nierenfunktion hin. Auch der Säure-Basen-Haushalt zeigte keine Auffälligkeiten oder Unterschiede zwischen KO und WT (siehe Abschnitt 3.3.2). Die systematisch azidotische Stoffwechsellage ist auf die venöse Blutprobe und einer Hypoventilation während der Blutentnahme zurückzuführen [72–74].

Diese Ergebnisse zusammengenommen sprechen gegen eine Nierenfunktionsstörung bei den KO-Tieren. Auch Patienten mit ERS zeigten trotz beidseitiger Nephrokalzinose häufig eine normale Nierenfunktion und die wichtigsten Plasmaparameter zur Regulation des Kalziumstoffwechsels (Kalzium-, Phosphat- und PTH-Konzentrationen sowie die Aktivität der Alkalischen Phosphatase) lagen im Normbereich [3, 61–63].

4.3.2 Nieren-Morphologie

Die Diagnose einer Nephrokalzinose wird standartmäßig via Sonographie oder zum sensitiveren Nachweis mittels CT-Untersuchung gestellt [40]. In dieser Arbeit wurde hingegen mit histologischen Gewebeschnitten gearbeitet, um auch kleinste Präzipitate, welche mit den o.g. Untersuchungsmethoden ggf. nicht darzustellen sind, nachzuweisen. An bereits etablierten FAM20A-KO-Mausmodellen wurden durch schnittbildliche Untersuchungen der Niere bisher variabel Strukturdefekte mit Zeichen einer Entzündung und Kalzifizierungen nachwiesen [43,46]. In den hier angefertigten histologischen Bildern der Niere gab es jedoch in keiner Färbung einen Anhalt für strukturelle Anomalitäten, Entzündungsreaktionen oder Kalkablagerungen bei den KO-Tieren (**Abbildung 19**). Somit konnte keine NC oder NL bei den KO-Tieren diagnostiziert werden.

4.3.3 Physiologische Reaktionen auf das Diätfutter und renaler Elektrolytstoffwechsel

Das Kernstück der Arbeit liegt im metabolischen Käfig und den Elektrolytbilanzierungen. Es wurde untersucht, welchen Einfluss die unterschiedlichen Diäten auf die Nierenfunktion und insbesondere auf die Ionenhomöostase haben. Es sollten physiologische Mechanismen zum Erhalt eines ausgeglichenen Elektrolytstatus aktiviert werden, um eventuell vorhandene renale Fehlregulierungen hinsichtlich der Kalziumhomöostase bei den FAM20A-KO-Mäusen aufzudecken. Wie schon im Ergebnissesteil angedeutet, lassen sich viele physiologische Anpassungsmechanismen an die unterschiedlichen Elektrolytbelastungen durch das Futter erkennen.

Beiden Spezialdiäten gemein ist der niedrige Natriumchloridanteil von <0,03 % bzw. 0,04 %. Die verminderte Kochsalzaufnahme führt zu Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), welches zu einer Natrium- sowie Wasserretention in der Niere führt (**Diagramm 22**). Dies geschieht zum Teil durch eine erhöhte Expression von apikalen Natrium-Transportern sowie der basolateralen Natrium-Kalium-ATPase in den Tubuluszellen^[67]. Wie bereits in der Einleitung im Abschnitt 1.2.3.1 erläutert, beeinflusst die Natrium- und Wasserresorption im proximalen Tubulus auch maßgeblich die Resorption von anderen Ionen, sodass auch Kalzium vermehrt auf die basolaterale Seite geschleust wird.

Die ↓NaCl/↑Ca²⁺-Diät beinhaltete die fünffache Menge an Kalzium, verglichen mit der Kontrolldiät. Hierdurch wird enteral mehr Kalzium resorbiert, welches eine vermehrte renale Ausscheidung nach sich zieht und somit eine Hyperkalzurie verursacht (**Diagramm 21**). Dies ist die häufigste Ursache für NC und NL^[39,40]. Gleichzeitig führen die geringen Natrium- und Chlorid-Mengen zu einem erhöhten elektrochemischen Gradienten in distalen Tubulusabschnitten und sorgen somit zusätzlich für eine geringere Kalziumresorption und höheren intratubulären Kalziumkonzentration^[40]. Dies führt physiologischerweise zu einer Aktivierung des Kalzium-Rezeptors in der Niere, wodurch nicht nur die Wirkung antidiuretischer Hormone reduziert und somit das Urinvolumen erhöht, sondern auch die Natrium- und Magnesium-Resorption gedrosselt wird, sodass die Fähigkeit der Harnkonzentrierung zum Teil verloren geht^[6,9]. Diese Mechanismen sind auch im metabolischen Versuch zu erkennen (**Diagramm 9, 22 und 24**). Letztendlich sollte diese Diät die Entstehung von intratubulären Kalziumpräzipitaten erleichtern. Denn auch wenn beim ERS interstitielle Verkalkungen der Niere nachgewiesen wurden, ist es möglich, dass diese

durch eine Translokation von intratubulären Präzipitaten auf die basolaterale Seite entstanden sind (**Diagramm 37**)^[39].

Die $\downarrow \text{NaCl}/\downarrow \text{Ca}^{2+}$ -Diät hatte hingegen sowohl sehr geringe Anteile an Natriumchlorid als auch an Kalzium. Dies führt zu einem Kalziummangelzustand des Organismus, sodass über hormonelle Feedbackschleifen PTH und Kalzitriol ausgeschüttet werden. Dies mobilisiert einerseits Kalzium aus dem Knochen und steigert andererseits die enterale und renale Kalziumresorption^[6,7]. Durch diesen experimentellen Ansatz sollte die Niere getriggert werden, ihre Resorptionsfähigkeiten hinsichtlich Natrium und Kalzium auszuschöpfen, sodass eine interstitielle Akkumulation herbeigeführt wird^[41]. Dabei sind vor allem die distalen Nephronabschnitte anfällig für eine Präzipitation, da die Elektrolyte bei solch geringen Mengen nicht mehr passiv sondern viel mehr aktiv unter Energieaufwand resorbiert werden (**Diagramm 37**)^[14,78].

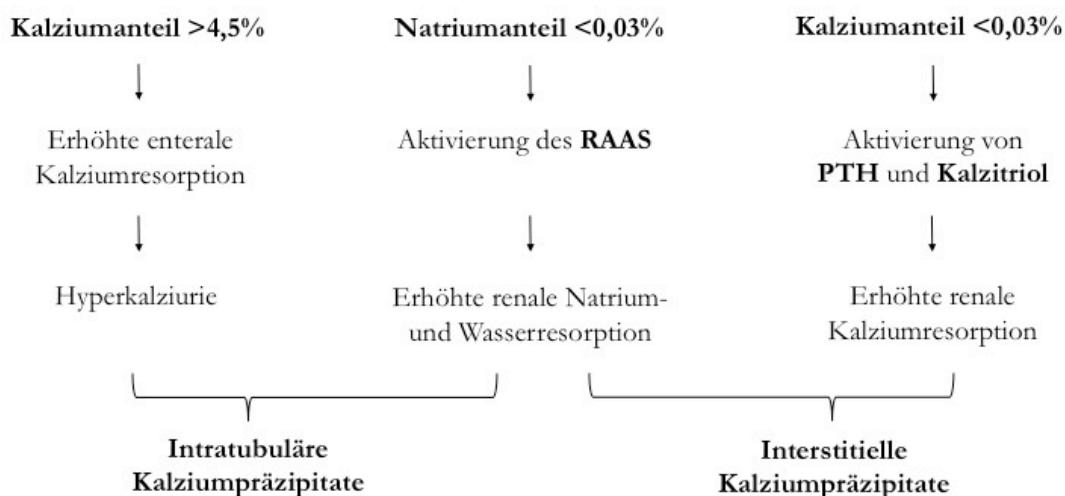


Diagramm 37 | Physiologische Reaktion auf das Diätfutter, metabolischer Versuch

Dieses Flussdiagramm stellt die physiologische Antwort auf die Spezialdiäten und deren potenzielle Wirkung dar. **RAAS:** Renin-Angiotensin-Aldosteron-System; **PTH:** Parathormon.

Betrachtet man nun die renalen Elektrolytexkretionen während des metabolischen Versuchs, sind letztendlich zwar teilweise Differenzen zwischen den Geschlechtern und Genotypen erkennbar, welche sich jedoch nicht als so eindeutig und wegweisend einordnen lassen, um die Vermutung eines Funktionsproblems der Niere bei den FAM20A-KO-Tiere zu belegen. Auch dass Patienten mit ERS nachweislich eher unter einer für NC oder NL untypischen Hypokalzurie leiden^[36], konnte im metabolischen Versuch unter keiner Diät beobachtet

werden. Das Gegenteil war eher der Fall, vor allem unter der Kontrolldiät (**Diagramm 21**). Dieses Ergebnis muss jedoch in Relation zur erhöhten Nahrungsaufnahme von KO gesetzt werden, welches auch eine größere Exkretionsmenge nach sich zieht.

In Zusammenschau aller erhobenen Befunden, kann insgesamt von keiner renalen Funktionseinschränkung bei den KO-Tieren gesprochen werden. Dies lässt schlussfolgern, dass FAM20A in diesem Tiermodell weder direkten Einfluss auf die Resorptionsfähigkeit des Nierenepithels noch auf die parazelluläre Durchlässigkeit hat, indem z.B. die Claudin-Zusammensetzung verändert wird^[8]. Es konnten auch keine ungewollten Präzipitate im Interstitium nachgewiesen werden, welche auf eine geänderte Pufferkapazität der EZM durch einen Verlust von FAM20A hinweist.

Eine Möglichkeit wäre natürlich, dass das Tiermodell an sich einen fehlerhaften Mutationsstatus aufweist und die FAM20A-Funktion in der Niere erhalten ist. Hiergegen spricht jedoch der eindeutige Zahnbefund mit hypoplastischem Schmerz wie beim ERS.

Es wäre auch denkbar, dass die Entstehung von NC beim ERS erst durch prädisponierende Faktoren wie Entzündungsreaktionen im Urogenitaltrakt oder nephrotoxische Medikamente ausgelöst wird. In den Fallberichten zum ERS gab es jedoch keine systematische Erwähnung solcher Prädispositionen. Außerdem konnten in anderen Tiermodellen auch ohne erkennbare Abfälligkeiten, interstitielle oder vaskuläre Mineralisationen nachgewiesen werden^[3,37,43].

Weiterhin ist bei der Entstehung von NC und NL zu berücksichtigen, dass zwischen Maus und Mensch deutliche Unterschiede in der Konzentrierungsfähigkeit der Niere, der Ernährung sowie der Lebenserwartung bestehen, sodass das hier gewählte Tiermodell eventuell über andere Schutzmechanismen gegen Verkalkung verfügt und somit eine Präzipitation erschwert ist. Außerdem ist das Alter der gewählten Mäuse zu diskutieren. Die Versuchsmäuse waren im Schnitt 23 Wochen alt und damit zwar bereits geschlechtsreif, aber möglicherweise noch zu jung, um eine Niereninsuffizienz oder interstitielle Verkalkungen auszubilden. Auch bei Menschen versagen vorherige Kompensationsmechanismen des Körpers häufig erst im Alter. Einerseits durch ein Älterwerden der Zellen, andererseits auch durch die Kumulation von toxischen Einflüssen^[37]. Daher wäre es als abschließende Überlegung möglich, ähnliche Versuche nochmals mit älteren Tieren durchzuführen.

Trotz all dieser unauffälligen Ergebnisse hinsichtlich des renalen Kalziumstoffwechsels während des metabolischen Versuchs, ist die signifikant erhöhte Kalziumbilanz der KO-Tiere

hervorzuheben, welche nicht maßgeblich durch eine verminderte renale Ausscheidung verursacht wird (**Diagramm 21 und 31**). Wie ist dies zu interpretieren?

4.3.4 Erhöhte Kalziumbilanz der Knockout-Tiere

Bei ausgeglichenem Elektrolythaushalt wird Kalzium enteral resorbiert und die für eine Aufrechterhaltung der Zellfunktion notwendigen Mengen bleiben im Organismus oder werden im Knochen gespeichert. Der Rest wird dann renal ausgeschieden oder bei Bedarf vermehrt über die Niere rückresorbiert. Von diesem Status gehen wir bei den WT-Tieren aus. Ist die Bilanz nun bei normaler Nierenfunktion und ähnlicher Kalziumaufnahme sowie Exkretion positiver, bedeutet dies, dass die Kalziumionen nicht mehr frei verfügbar sind, um renal ausgeschieden zu werden, sondern stattdessen gebunden im Organismus bleiben. Dies könnte ein Hinweis für das Vorhandensein von ektopen Kalzifizierungen bei FAM20A-KO erklären, auch wenn in diesem Tiermodell keine Präzipitate nachgewiesen werden konnten (**Abbildung 22**).

Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass in bereits etablierten Mausmodellen ubiquitäre Verkalkungen wie z.B. in der Lunge oder muskulären Arterien nachgewiesen werden konnten [43]. Somit könnten AI und NC zwar pathognomonisch für das ERS sein, aber weitere Kalzifizierungsdefekte sollte nicht ausgeschlossen werden. Daher sollte von einer relevanten FAM20A-Funktion in sämtlichen Geweben ausgehangen werden und nach weiteren systematischen Pathologien gesucht werden.

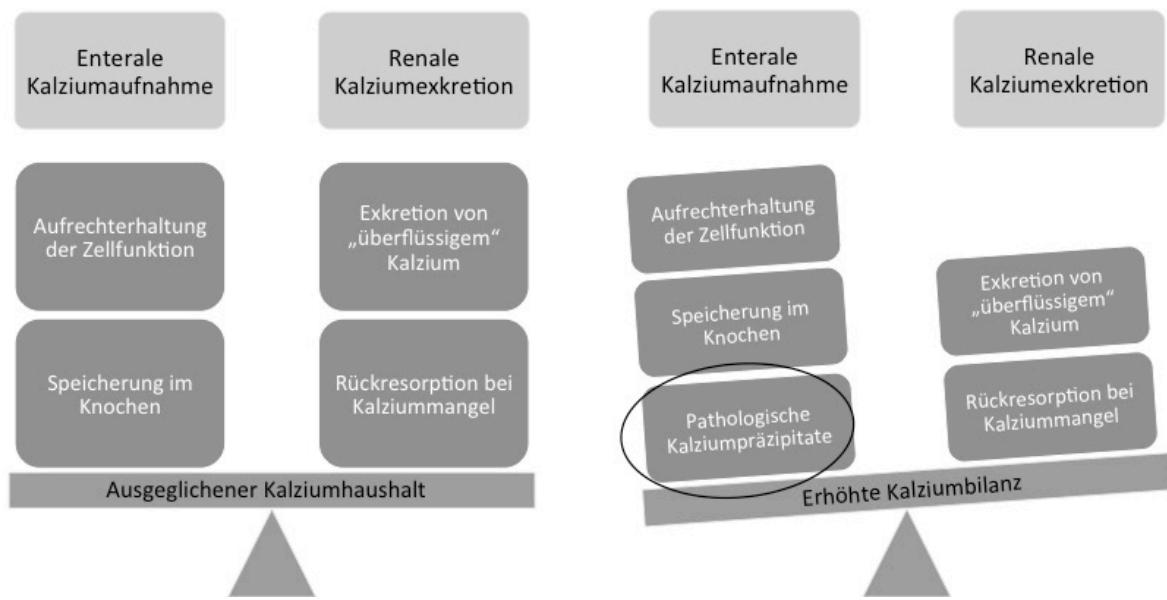


Abbildung 22 | Kalziumhomöostase

Besteht ein ausgeglichener Kalziumhaushalt, werden nur die für eine Aufrechterhaltung der Zellfunktion notwendigen Kalziummengen resorbiert oder im Knochen gespeichert. Der Rest wird renal ausgeschieden oder bei Bedarf vermehrt über die Niere rückresorbiert. Ist die Kalzumbilanz hingegen höher bei normaler Nierenfunktion, bedeutet dies, dass mehr Kalziummengen im Körper zurückbleiben und möglicherweise eine Kalzifizierung bedingen.

4.4 Hypothesen zur Rolle von FAM20A basierend auf dem *iMES*-Modell

Vor dem Hintergrundwissen, dass alle FAM20 Proteine von einem Ursprungsgen abstammen, liegt die Vermutung nahe, dass auch eine ähnliche Funktion oder Interaktion der Proteine vorliegt. Letzteres konnte bereits zwischen FAM20A und FAM20C nachgewiesen werden [47,48]. Sowohl FAM20B als auch FAM20C beeinflussen die Zusammensetzung und Funktion der EZM, indem sie unter anderem extrazelluläre GAG phosphorylieren [50]. FAM20A könnte ähnlich agieren.

Ein Hinweis hierfür ist die erhöhte Aktivität der N-acetyl-Galactosamin-Transferase-I in Fibroblastenkulturen des Zahnfleisches von betroffenen Patienten, welches in unserer Forschungsgruppe nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich hierbei um das Schlüsselenzym der Chondroitinsulfat-Synthese (CS), einem GAG, welches mitunter den größten Anteil an körpereigenen GAG bildet. In Form von Proteoglykanen (PG) sind GAG ein wichtiger Bestandteil der EZM und Glykokalix vieler Zellen (Abbildung 23). Sie besitzen nicht nur mechanische, sondern und zellbiologische Funktionen und interagieren in

vielfältiger Weise mit anderen Proteinen. Sie können z.B. die Zellproliferation und -differenzierung beeinflussen oder als Permeabilitätsbarriere fungieren. CS ist unter anderem mitverantwortlich für die biochemischen Eigenschaften des Knorpelgewebes, kommt aber auch in vielen Bindegeweben vor^[45,79].

Durch Steuerung der CS-Synthese könnte FAM20A die EZM dahingehend beeinflussen, dass hohe Kalziummengen im Bindegewebe der Niere abpuffern werden und somit eine ungewollte Präzipitation ausbleibt.

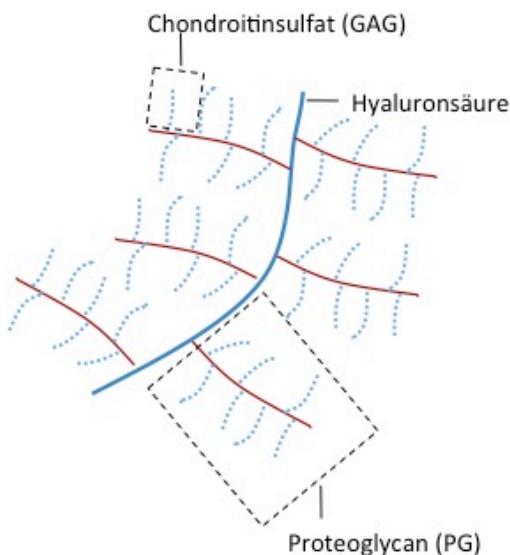


Abbildung 23 | Schema der Hyaluronsäure

Glykosaminoglykane (GAG) sind sulfatierte Polysaccharide und formieren sich über ein *Core-Protein* zu hochmolekularen Proteoglycanen (PG). Chondroitinsulfat repräsentiert dabei den größten Anteil der körpereigenen GAG. Im Knorpelgewebe bildet die Hyaluronsäure den Kern großer PG und bestimmt dadurch die biochemischen Eigenschaften des Gewebes.

Die Interaktion zwischen der Zelle und deren EZM ist dabei hochspezifisch angepasst und reguliert. Hierzu wurde ein Modell etabliert, welches als '*interphase between the membrane and bulk extracellular solution*' (*iMES*) bezeichnet wird. Dieses geht davon aus, dass es einen mikrozellulären Platz zwischen den Zellen und der EZM gibt, welcher eine Barriere für sich der Zellmembran nähernde Ionen und Proteine darstellt und das Epithel dadurch vor toxischen Umgebungen, wie z.B. dem sauren pH-Wert des Mageninhaltes, schützt. Das *iMES* ist jeder Zelle individuell angepasst und variiert daher stark in dessen Eigenschaften und Dicke. Es wird in zwei Schichten eingeteilt: dem '*unstirred layer*', welcher aus sekretierten Proteinen und vielen strukturellen Elementen wie Glykanen, den extrazellulären Regionen von Kanälen, Transportern oder Rezeptoren besteht, sowie dem '*nano interface*', welches der Zellmembran

direkt anliegt und aus untypisch verteilten Wassermolekülen besteht. Diese werden wiederum von einem Baum aus Polymerketten bedeckt. Die Interaktion erfolgt in Abhängigkeit von deren Phosphatgruppen^[80]. Ausgehend von diesem Modell wäre es möglich, dass FAM20A genau in dieser hoch-spezifisch angepassten Schicht als wichtiger Regulator für den Kalziumhaushalt agiert und auf der einen Seite Mineralisation hervorruft, gleichzeitig aber auch in anderem Gewebe eine Präzipitation verhindern kann. Ob dies durch das sekretierte Protein selbst geschieht oder ob FAM20A intrazellulär sekretierte Proteine verändert, ist noch unklar (**Abbildung 24**)^[80].

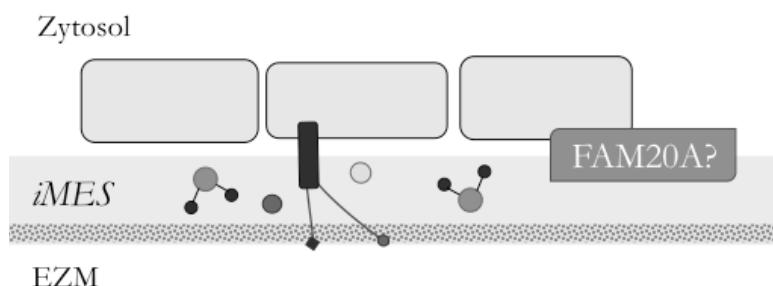


Abbildung 24 | iMES- Modell, Hypothesen zur Funktion von FAM20A

Die Zelle wird basalseitig von einem der EZM abgetrennten Bereich überdeckt: dem *iMES* (*interphase between the membrane and bulk extracellular solution*). Dieser besteht aus untypisch verteilten Wassermolekülen, welche von einem Baum aus Polymerketten bedeckt sind. Zusätzlich kommen dort noch freie Ionen, sekretierte Proteine und viele strukturelle Elemente wie Glykane sowie die extrazellulären Regionen von Kanälen, Transportern oder Rezeptoren, vor. Das *iMES* dient als Diffusionsbarriere und schützt das Epithel vor toxischen Einflüssen. Jedes *iMES* ist der Zelle individuell angepasst und variiert daher stark in der Eigenschaft und Dicke. Ein Gewebe-abhängiges Agieren von FAM20A in dieser Anordnung ist denkbar, sodass sowohl eine Hyper- als auch Hypomineralisation bei einem Funktionsverlust hervorgerufen wird.

Für eine Gewebe-abhängige Funktion von FAM20A könnte mitunter eine differente embryonale Abstammung verantwortlich sein: Während sich die Niere aus dem intermediären Mesoderm entwickelt, formiert sich der Zahn inklusive Schmelzorgan aus dem Ektoderm des 1. Kiemenbogens und Ektomesenychm der Neuralleiste^[5]. Des Weiteren unterscheiden sich Zahn und Niere auch in ihrer organischen und anorganischen Zusammensetzung. Der Schmelz besteht zu < 95% aus anorganischem Material, sodass kaum bindegewebige Anteile vorhanden sind. Dadurch verändert sich auch die Funktion des Interstitiums und die EZM-Proteine agieren möglicherweise anders^[5]. Als letzter Punkt sollte die bereits bekannt Interaktion von FAM20A mit FAM20C im odonten Gewebe berücksichtigt werden, welche zu einer Hypomineralisation führt. Möglichweise kommt dieses Zusammenspiel in der Niere nicht vor, wodurch es zu einer anderen Kalziumwirkung kommt.

Um hier weitere Erkenntnisse zur gewebeabhängigen Funktion von FAM20A zu erlangen, könnten Untersuchungen auf molekularer Ebene hinsichtlich Zell-Matrix-Interaktionen wegweisend sein.

4.5 Die Rolle von Magnesium bei der Mineralisation

Eine Beobachtung während des metabolischen Versuchs war der Geschlechtsunterschied hinsichtlich der Magnesiumexkretion im Urin: die Weibchen exkretieren signifikant mehr als die Männchen (**Diagramm 24**). Dieser ist vor allem unter der Kontrolldiät und der $\downarrow\text{NaCl}/\downarrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät erkennbar. Unter ersterer schieden die WT-Weibchen mit 134 % bzw. die KO-Weibchen mit 74 % signifikant mehr als der männliche Genotyp und unter der $\downarrow\text{NaCl}/\downarrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät mit 47 % bzw. 86 lit% ebenfalls eindeutig mehr aus. Unter der $\downarrow\text{NaCl}/\uparrow\text{Ca}^{2+}$ -Diät war dieser Unterschied etwas geringer. Diese Erkenntnisse wurden schon bei anderen Stoffwechselversuchen mit Mäusen in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen und scheinen bei Mäusen regelrecht vorzukommen. Wodurch dieses Phänomen ausgelöst wird, ist noch unklar. Die Magnesiumbilanz war für beide Geschlechter hingegen war gleich und insgesamt leicht positiv.

Für Magnesium ist eine protektive Eigenschaft bei der Entstehung von HAK im azellulären System *in vitro* sowie auch in lebenden Zellen nachgewiesen worden [81,82]. Diese Ergebnisse lassen die Überlegung zu, dass Mäuse-Weibchen aufgrund ihrer erhöhten renalen Magnesiumausscheidung vor NC und NL besser geschützt sind. Falls diese Theorie zutrifft, könnten daraus therapeutische Ansätze für den klinischen Gebrauch getroffen werden. Hierfür müssten aber weitere Forschungen betrieben werden.

5 Ausblick

Beim Vergleich des ERS mit dem FAM20A-KO-Modell lässt sich sagen, dass das hypoplastische Schmelzorgan der Mäuse mit dem Zahnpänotyp der Patienten vergleichbar ist. Hinsichtlich der Nierenfunktion konnten jedoch weder funktionelle Auffälligkeiten noch strukturelle Anomalien gefunden werden. Ebenso nicht bezüglich der Blutparameter und des Säure-Basen-Haushalts.

Die Rolle von FAM20A im Biomineralisationsprozess ist dabei umstritten. Eine interessante Frage ist, wieso es bei einem Gendefekt einerseits zu einer überschießenden und andererseits zu einer verminderten Kalzifizierung kommt. Hierbei ist zum einen die unterschiedliche embryonale Abstammung der Gewebe zu berücksichtigen, andererseits auch die unterschiedliche organische und anorganische Zusammensetzung, welche die Funktion des Interstitiums beeinflusst. Ausgehend von der Hypothese, dass FAM20A als extrazelluläres Protein des *iMES* eine tragende Rolle in der Kalziumpufferung hat, müssten im nächsten Schritt auf molekularer Ebene Untersuchungen angegangen werden. Hierbei sollte der Fokus auf der extrazellulären Matrixzusammensetzung und der Zell-Matrix-Interaktion liegen. Agiert FAM20A noch mit anderen Proteinen außer FAM20? Welche Funktion hat FAM20A selbst als sekretiertes Glykoprotein und wie variiert die Funktion abhängig von den Geweben? Diese Erkenntnisse wären ein großer Schritt im Verständnis der Pathophysiologie zur Entstehung von Kalkablagerungen und somit wichtig für alle sklerotischen Krankheitsbilder.

6 Zusammenfassung

Das Enamel-renal syndrome (ERS) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, welche durch den Funktionsverlust des FAM20A-Proteins entsteht. Es beschreibt das gleichzeitige Auftreten von hypoplastischem Zahnschmelz und interstitiellen Nierenverkalkungen. Die genaue Entstehungsweise der Mineralisierungsdefekte ist bisher jedoch noch nicht ausreichend geklärt.

In dieser Forschungsarbeit wurden funktionelle und morphologische Daten einer FAM20A-Knockout-Maus (KO) erhoben mit der Frage nach möglichen Auffälligkeiten im Kalziumhaushalt. Der Fokus lag dabei auf der integrativen Nierenfunktion.

Hierfür verbrachten die Versuchstiere 72 Stunden auf einem metabolischen Käfig. Die Elektrolythomöostase wurde zusätzlich durch zwei natriumarme Diäten mit hohem bzw. niedrigem Kalziumgehalt getestet. Danach erfolgte die Analyse von Urin, Kot und Blut hinsichtlich aller relevanten Parameter zur Beurteilung der Nierenfunktion und des Ionenhaushaltes. Überdies wurden histologische Bilder von Nieren und Zähnen angefertigt sowie computertomographische Untersuchungen des Gebisses durchgeführt.

Die Ergebnisse brachten zu Tage, dass die KO-Mäuse neben einem generalisiert mindermineralisiertem Schmelzorgan auch architektonische Pathologien im Ameloblastenepithel und der umliegenden Matrix aufwiesen. In den Nieren konnten hingegen keine morphologischen Auffälligkeiten dokumentiert werden. Auch die Nierenfunktion von KO war unbeeinträchtigt: Sämtliche Retentionsparameter sowie die Kreatinin-Clearance und der Säure-Basen-Haushalt waren unauffällig. Bei der Betrachtung des renalen Elektrolythandlings waren trotz gewisser Unterschiede keine wegweisenden Befunde erkennbar, welche auf ein renales Funktionsproblem hinwiesen. Die genaue Stoffwechselbilanzierung vor dem Hintergrund eines niedrigeren Körpergewichtes und einer höheren Nahrungsaufnahme der KO-Tiere ergab eine positivere Kalzium- und Magnesiumbilanz im Vergleich zum Wildtyp (WT). Die Bilanzen von Wasser und weiteren Salzen hingegen zeigten keine Unterschiede. Somit lässt sich schlussfolgern, dass FAM20A in diesem Mausmodell essenziell für die Zahnschmelzbildung ist, jedoch keinen wesentlichen Einfluss auf die Nierenfunktion und -morphologie hat. Wie lassen sich diese Ergebnisse nun einordnen?

Hypothesen zur Entstehung des ERS gehen von Störungen der interstitiellen Matrix hinsichtlich der Kalziumhomöostase aus. Diese sind anhand der o.g. Ergebnisse jedoch nicht

durch ein renales Funktionsproblem bedingt. Die deutlich erhöhte Kalzumbilanz der KO-Tiere könnte hingegen ein indirekter Hinweis für die Entstehung ektopen Kalzifizierungen sein, indem vermehrt Kalziumionen im Organismus verbleiben. Weiterhin ist zu diskutieren, wie ein Proteindefekt gleichzeitig eine Hyper- als auch Hypomineralisation bedingt. Hierbei sollte von einer Gewebe-abhängigen Funktion von FAM20A ausgegangen werden. Denn Niere und Zahn weisen zum einen eine differente embryonale Abstammung auf, zum anderen ist die unterschiedliche organische und anorganische Zusammensetzung zu berücksichtigen. Weitere Experimente zu dieser Hypothese könnten den nächsten Schritt im Verständnis der Pathophysiologie zur Entstehung von Kalkablagerungen oder Mineralisierungsdefekten bilden.

7 Anhang

7.1 Elektrolytkonzentrationen im Trinkwasser

Tabelle 8 | Elektrolytkonzentrationen im Trinkwasser, Wasserwerk Kiel (2017)

	[mg/l]
Natrium	60,5
Kalium	5,05
Kalzium	107
Magnesium	16,1
Chlorid	123
Phosphat	0,06

7.2 Absolutwerte der morphometrischen Daten, metabolischer Versuch

Tabelle 9 | Absolutwerte der morphometrischen Daten, metabolischer Versuch

Daten \pm SEM, (n=8, geschlechtsunabhängig n=16)

Parameter	Kontrolle				Diät 1				Diät 2			
	WT		KO		WT		KO		WT		KO	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Alter [Wochen]	19,50 $\pm 0,70$	18,38 $\pm 0,28$	19,25 $\pm 0,61$	18,89 $\pm 0,42$	23,43 $\pm 1,94$	25,57 $\pm 1,85$	23,88 $\pm 1,81$	24,38 $\pm 1,77$	24,95 $\pm 1,31$	26,89 $\pm 1,74$	24,36 $\pm 1,13$	25,98 $\pm 1,37$
BMI [kg/m^2]	2,97 $\pm 0,07$	2,67 $\pm 0,08$	2,93 $\pm 0,04$	2,49 $\pm 0,03$	2,76 $\pm 0,04$	2,41 $\pm 0,15$	2,57 $\pm 0,08$	2,26 $\pm 0,08$	2,98 $\pm 0,09$	2,60 $\pm 0,08$	2,48 $\pm 0,03$	2,38 $\pm 0,06$
Länge [cm]	9,78 $\pm 0,15$		9,36 $\pm 0,13$		9,99 $\pm 0,08$		9,39 $\pm 0,11$		10,1 $\pm 0,11$		9,50 $\pm 0,07$	
Lebergewicht [$mg/kg KG$]	46,4 $\pm 2,49$		49,9 $\pm 1,81$		45,7 $\pm 3,28$		50,0 $\pm 3,38$		38,6 $\pm 1,57$		42,5 $\pm 2,50$	
Nierengewicht [$mg/kg KG$]	12,1 $\pm 0,36$		12,2 $\pm 0,27$		11,7 $\pm 0,39$		12,3 $\pm 0,37$		12,2 $\pm 0,25$		13,3 $\pm 0,27$	

7.3 Absolutwerte der Futteraufnahme und Exkretion, metabolischer Versuch

Tabelle 10 | Absolutwerte der Futteraufnahme und Exkretion, metabolischer Versuch

Daten \pm SEM, (n=8)

Parameter	Kontrolle				Diät 1				Diät 2			
	WT		KO		WT		KO		WT		KO	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Trinkmenge [μ l/24h/gKG]	111 $\pm 8,84$	130 $\pm 16,2$	141 $\pm 7,44$	162 $\pm 8,77$	88,6 $\pm 6,92$	162 $\pm 40,9$	138 $\pm 22,1$	159 $\pm 17,6$	77,7 $\pm 8,31$	129 $\pm 19,0$	134 $\pm 16,2$	98,0 $\pm 9,88$
Harnfluss [μ l/24h/gKG]	82,1 $\pm 5,27$	101 $\pm 9,16$	103 $\pm 6,14$	109 $\pm 9,49$	76,2 $\pm 6,76$	121 $\pm 36,3$	111 $\pm 14,3$	128 $\pm 15,6$	84,6 $\pm 3,33$	97,3 $\pm 10,3$	81,4 $\pm 7,37$	92,5 $\pm 10,3$
Futtermenge [mg/24h/gKG]	161 $\pm 12,3$	181 $\pm 17,9$	191 $\pm 7,94$	218 $\pm 10,3$	114 $\pm 4,16$	123 $\pm 12,7$	137 $\pm 10,9$	160 $\pm 20,7$	104 $\pm 7,81$	143 $\pm 13,2$	121 $\pm 12,1$	173 $\pm 11,9$
Kotmenge [mg/24h/gKG]	77,5 $\pm 6,62$	91,1 $\pm 8,78$	85,7 $\pm 5,49$	116 $\pm 7,74$	32,3 $\pm 1,37$	28,4 $\pm 4,72$	42,6 $\pm 4,52$	39,9 $\pm 4,61$	9,45 $\pm 0,57$	12,4 $\pm 1,37$	10,6 $\pm 0,89$	17,6 $\pm 1,86$
Wassergehalt im Kot [%]	47,4 $\pm 1,18$	46,8 $\pm 1,41$	46,7 $\pm 0,77$	42,8 $\pm 2,72$	32,6 $\pm 1,40$	29,1 $\pm 2,50$	34,0 $\pm 2,11$	31,0 $\pm 2,34$	21,6 $\pm 2,98$	17,9 $\pm 1,18$	19,5 $\pm 2,03$	20,8 $\pm 2,17$
Gewichtsentwicklung [g]	-0,53 $\pm 0,53$	-0,76 $\pm 0,36$	0,15 $\pm 0,29$	0,60 $\pm 0,21$	-2,94 $\pm 0,19$	-2,24 $\pm 0,49$	-2,09 $\pm 0,38$	-0,91 $\pm 0,77$	-1,50 $\pm 0,68$	-0,10 $\pm 0,35$	-1,68 $\pm 0,64$	0,74 $\pm 0,42$

7.4 Absolutwerte der Plasmaanalyse, metabolischer Versuch

Tabelle 11 | Absolutwerte der Plasmaanalyse, metabolischer Versuch

Daten \pm SEM, (n=5-8)

Parameter	Kontrolle				Diät 1				Diät 2			
	WT		KO		WT		KO		WT		KO	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Kalzium [$mmol/l$]	2,31 $\pm 0,06$	2,21 $\pm 0,07$	2,28 $\pm 0,03$	2,18 $\pm 0,03$	2,20 $\pm 0,04$	2,27 $\pm 0,06$	2,24 $\pm 0,03$	2,28 $\pm 0,04$	2,21 $\pm 0,01$	2,20 $\pm 0,02$	2,15 $\pm 0,06$	2,15 $\pm 0,05$
Natrium [$mmol/l$]	156 $\pm 0,64$	160 $\pm 2,57$	156 $\pm 1,38$	159 $\pm 3,33$	163 $\pm 1,66$	161 $\pm 1,93$	159 $\pm 1,02$	160 $\pm 1,59$	157 $\pm 1,05$	157 $\pm 0,48$	156 $\pm 1,41$	158 $\pm 1,09$
Kalium [$mmol/l$]	3,72 $\pm 0,10$	3,60 $\pm 0,17$	3,97 $\pm 0,12$	3,65 $\pm 0,23$	3,99 $\pm 0,21$	4,03 $\pm 0,27$	3,97 $\pm 0,21$	3,61 $\pm 0,15$	3,87 $\pm 0,11$	3,59 $\pm 0,09$	4,06 $\pm 0,18$	3,95 $\pm 0,37$
Magnesium [$mmol/l$]	0,95 $\pm 0,03$	0,99 $\pm 0,06$	0,90 $\pm 0,03$	0,89 $\pm 0,02$	0,91 $\pm 0,02$	1,07 $\pm 0,03$	0,92 $\pm 0,04$	1,01 $\pm 0,03$	0,86 $\pm 0,03$	1,00 $\pm 0,03$	0,95 $\pm 0,04$	0,96 $\pm 0,04$
Chlorid [$mmol/l$]	107 $\pm 1,10$	109 $\pm 1,02$	105 $\pm 0,96$	108 $\pm 0,71$	109 $\pm 2,46$	107 $\pm 1,24$	108 $\pm 0,67$	106 $\pm 1,37$	110 $\pm 0,65$	106 $\pm 1,19$	108 $\pm 1,49$	107 $\pm 1,04$
Phosphat [$mmol/l$]	1,91 $\pm 0,14$	2,36 $\pm 0,18$	1,94 $\pm 0,17$	2,34 $\pm 0,25$	1,48 $\pm 0,33$	2,09 $\pm 0,30$	1,68 $\pm 0,16$	1,54 $\pm 0,28$	1,93 $\pm 0,08$	2,77 $\pm 0,24$	2,17 $\pm 0,19$	2,55 $\pm 0,21$
Harnstoff [$mmol/l$]	8,90 $\pm 0,60$	8,81 $\pm 0,80$	9,29 $\pm 0,27$	8,28 $\pm 1,17$	9,28 $\pm 0,87$	9,09 $\pm 0,58$	9,37 $\pm 1,14$	9,31 $\pm 0,82$	7,01 $\pm 0,37$	7,38 $\pm 0,36$	9,21 $\pm 0,68$	7,33 $\pm 0,17$
Kreatinin [$\mu mol/l$]	7,43 $\pm 0,92$	8,29 $\pm 0,61$	6,88 $\pm 0,79$	6,80 $\pm 0,49$	7,60 $\pm 0,75$	8,43 $\pm 1,13$	7,29 $\pm 0,75$	9,43 $\pm 1,04$	6,63 $\pm 0,78$	8,63 $\pm 0,84$	9,25 $\pm 1,60$	7,38 $\pm 0,63$
Glukose [mg/dl]	268 $\pm 12,6$	279 $\pm 19,3$	276 $\pm 12,6$	284 $\pm 6,03$	220 $\pm 17,2$	170 $\pm 21,0$	185 $\pm 25,0$	194 $\pm 21,5$	285 $\pm 12,6$	214 $\pm 20,3$	211 $\pm 25,8$	233 $\pm 19,6$
Hämatokrit [%]	44,1 $\pm 0,70$	43,7 $\pm 2,50$	44,7 $\pm 1,23$	41,4 $\pm 2,15$	42,8 $\pm 1,81$	44,8 $\pm 1,31$	47,2 $\pm 1,10$	44,5 $\pm 0,97$	44,0 $\pm 1,18$	45,5 $\pm 0,80$	46,0 $\pm 0,91$	44,3 $\pm 0,71$

Osmolalität [mosmol/kg]	328 ±2,18	325 ±3,44	324 ±1,32	324 ±2,57	323 ±2,94	321 ±4,94	319 ±2,24	323 ±4,63	324 ±1,72	325 ±2,39	324 ±3,89	324 ±2,22
-------------------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------

7.5 Absolutwerte des Säure-Basen-Haushaltes, metabolischer Versuch

Tabelle 12 | Absolutwerte des Säure-Basen-Haushaltes, metabolischer Versuch

Daten ± SEM, (n=6-8)

Parameter	Kontrolle				Diät 1				Diät 2			
	WT		KO		WT		KO		WT		KO	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Sauerstoffpartialdruck [mmHg]	60,0 ±6,62	60,1 ±3,51	69,7 ±6,70	60,2 ±5,75	53,8 ±8,10	59,3 ±2,54	58,2 ±4,81	52,1 ±1,69	53,4 ±2,23	56,2 ±1,53	62,0 ±5,30	50,1 ±3,20
Kohlenstoffdioxidpartialdruck [mmHg]	54,2 ±5,70	47,0 ±3,74	52,1 ±2,91	39,9 ±1,58	44,3 ±3,15	51,3 ±3,16	47,2 ±2,71	48,9 ±3,38	43,8 ±1,95	46,7 ±2,23	43,9 ±2,26	51,4 ±4,53
pH-Wert	7,20 ±0,04	7,23 ±0,03	7,22 ±0,02	7,20 ±0,05	7,31 ±0,02	7,25 ±0,02	7,30 ±0,02	7,25 ±0,02	7,30 ±0,01	7,22 ±0,03	7,22 ±0,04	7,20 ±0,03
Aktuelles Bikarbonat [mmol/l]	19,8 ±1,04	18,8 ±0,69	20,4 ±0,61	15,6 ±1,49	21,7 ±1,42	21,6 ±0,77	22,7 ±1,25	20,2 ±1,08	21,0 ±1,30	18,6 ±0,75	17,5 ±1,89	19,0 ±0,93
Standard Bikarbonat [mmol/l]	18,3 ±0,81	17,9 ±0,73	18,6 ±0,50	15,6 ±1,58	21,0 ±1,20	19,9 ±0,46	21,4 ±0,87	19,1 ±0,75	20,2 ±0,94	17,6 ±0,74	16,9 ±1,69	17,7 ±0,76
Basenüberschuss [mmol/l]	-10,2 ±1,92	-9,85 ±1,42	-8,93 ±1,08	-13,3 ±2,89	-4,75 ±1,78	-7,03 ±0,64	-4,29 ±1,28	-7,59 ±1,10	-5,81 ±1,33	-10,3 ±1,34	-11,5 ±2,92	-10,9 ±1,56
Standard Basenüberschuss [mmol/l]	-7,78 ±1,47	-8,02 ±1,05	-6,76 ±0,84	-11,5 ±2,32	-3,78 ±1,63	-5,11 ±0,65	-3,05 ±1,29	-6,07 ±1,11	-4,71 ±1,37	-8,44 ±1,08	-9,60 ±2,54	-8,53 ±1,24
Sauerstoffsättigung [%]	78,9 ±8,53	84,3 ±2,78	87,9 ±2,70	81,9 ±5,41	79,7 ±4,60	85,4 ±1,03	85,1 ±2,07	81,5 ±1,44	83,1 ±1,64	82,1 ±1,84	84,6 ±2,57	73,6 ±5,84

7.6 Absolutwerte der renalen Elektrolytexkretion, metabolischer Versuch

Tabelle 13 | Absolutwerte der renalen Elektrolytexkretion, metabolischer Versuch

Daten \pm SEM, (n=4-8)

Parameter	Kontrolle				Diät 1				Diät 2			
	WT		KO		WT		KO		WT		KO	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Kalzium [mmol/l]	1,48 $\pm 0,14$	2,30 $\pm 0,26$	1,75 $\pm 0,18$	2,09 $\pm 0,57$	11,1 $\pm 2,46$	9,89 $\pm 2,91$	9,44 $\pm 1,96$	11,9 $\pm 1,76$	1,22 $\pm 0,11$	1,41 $\pm 0,09$	1,14 $\pm 0,15$	1,73 $\pm 0,27$
Natrium [mmol/l]	180 $\pm 10,2$	171 $\pm 11,4$	168 $\pm 6,05$	186 $\pm 8,42$	10,7 $\pm 1,15$	10,9 $\pm 0,86$	11,0 $\pm 0,93$	13,7 $\pm 2,67$	25,9 $\pm 1,24$	18,6 $\pm 1,08$	23,0 $\pm 3,73$	20,5 $\pm 2,13$
Kalium [mmol/l]	409 $\pm 17,3$	407 $\pm 24,4$	409 $\pm 16,1$	444 $\pm 23,05$	218 $\pm 27,6$	186 $\pm 38,3$	172 $\pm 29,3$	158 $\pm 21,2$	341 $\pm 21,7$	286 $\pm 24,5$	217 $\pm 33,5$	309 $\pm 25,4$
Magnesium [mmol/l]	18,7 $\pm 3,37$	35,7 $\pm 2,40$	18,7 $\pm 2,89$	29,8 $\pm 3,01$	36,6 $\pm 2,87$	29,7 $\pm 7,22$	31,5 $\pm 3,50$	31,6 $\pm 2,34$	24,4 $\pm 2,74$	31,4 $\pm 1,23$	24,2 $\pm 2,12$	36,1 $\pm 1,82$
Chlorid [mmol/l]	229 $\pm 9,84$	223 $\pm 13,1$	226 $\pm 10,9$	244 $\pm 12,8$	26,0 $\pm 3,15$	27,4 $\pm 3,52$	27,7 $\pm 3,60$	25,0 $\pm 2,58$	34,4 $\pm 2,07$	30,6 $\pm 1,51$	38,0 $\pm 4,80$	31,7 $\pm 2,12$
Phosphat [mmol/l]	17,0 $\pm 3,86$	35,2 $\pm 4,63$	24,3 $\pm 3,97$	33,8 $\pm 6,46$	7,85 $\pm 2,98$	5,01 $\pm 2,21$	7,13 $\pm 2,50$	3,50 $\pm 0,76$	267 $\pm 18,2$	212 $\pm 18,1$	171 $\pm 17,9$	218 $\pm 13,1$
Harnstoff [mmol/l]	1513 $\pm 73,2$	1534 $\pm 97,2$	1501 $\pm 28,9$	1604 $\pm 87,9$	1759 ± 168	1648 ± 268	1673 ± 158	1489 $\pm 84,8$	1543 ± 127	1580 $\pm 92,5$	1662 ± 220	2042 ± 169
Kreatinin [mmol/l]	2,39 $\pm 0,27$	1,75 $\pm 0,17$	1,92 $\pm 0,10$	1,61 $\pm 0,17$	2,31 $\pm 0,24$	2,07 $\pm 0,42$	1,85 $\pm 0,35$	1,27 $\pm 0,11$	2,60 $\pm 0,19$	2,21 $\pm 0,24$	2,54 $\pm 0,27$	2,22 $\pm 0,16$
pH-Wert	7,33 $\pm 0,14$	6,86 $\pm 0,23$	7,23 $\pm 0,21$	6,82 $\pm 0,20$	7,14 $\pm 0,19$	7,23 $\pm 0,26$	6,92 $\pm 0,20$	6,93 $\pm 0,21$	5,60 $\pm 0,03$	5,65 $\pm 0,02$	5,63 $\pm 0,03$	5,64 $\pm 0,03$
Osmolalität [mosmol/kg]	2782 $\pm 60,4$	2634 ± 162	2651 $\pm 76,9$	2952 ± 188	2399 ± 224	2142 ± 362	2231 ± 237	1914 $\pm 83,9$	2400 ± 144	2306 ± 141	2403 ± 207	2943 ± 245

7.7 Absolutwerte der fraktionellen Exkretion und Kreatinin-Clearance, metabolischer Versuch

Tabelle 14 | Absolutwerte der fraktionellen Exkretion und Kreatinin-Clearance, metabolischer Versuch

Daten \pm SEM, (n=4-8)

Parameter	Kontrolle				Diät 1				Diät 2			
	WT		KO		WT		KO		WT		KO	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
FE Kalzium [%]	0,18 $\pm 0,02$	0,52 $\pm 0,09$	0,28 $\pm 0,05$	0,36 $\pm 0,05$	1,73 $\pm 0,56$	1,33 $\pm 0,33$	1,92 $\pm 0,71$	3,79 $\pm 0,59$	0,12 $\pm 0,01$	0,27 $\pm 0,04$	0,22 $\pm 0,05$	0,22 $\pm 0,03$
FE Natrium [%]	0,39 $\pm 0,07$	0,55 $\pm 0,06$	0,39 $\pm 0,04$	0,44 $\pm 0,03$	0,02 $\pm 0,00$	0,04 $\pm 0,01$	0,04 $\pm 0,01$	0,07 $\pm 0,03$	0,04 $\pm 0,01$	0,05 $\pm 0,01$	0,06 $\pm 0,02$	0,04 $\pm 0,00$
FE Kalium [%]	33,24 $\pm 5,17$	58,8 $\pm 5,77$	36,8 $\pm 3,53$	48,1 $\pm 4,86$	20,1 $\pm 3,27$	19,2 $\pm 2,40$	16,4 $\pm 0,71$	28,9 $\pm 4,39$	22,7 $\pm 2,97$	31,8 $\pm 5,91$	21,6 $\pm 9,11$	24,3 $\pm 2,90$
FE Magnesium [%]	5,50 $\pm 0,84$	17,7 $\pm 0,56$	7,45 $\pm 1,27$	12,5 $\pm 2,85$	13,0 $\pm 0,73$	10,8 $\pm 2,39$	14,2 $\pm 2,26$	23,2 $\pm 2,35$	7,12 $\pm 0,85$	12,9 $\pm 1,49$	9,63 $\pm 1,42$	12,3 $\pm 1,40$
FE Chlorid [%]	0,71 $\pm 0,11$	1,04 $\pm 0,11$	0,77 $\pm 0,08$	0,88 $\pm 0,06$	0,08 $\pm 0,01$	0,16 $\pm 0,04$	0,11 $\pm 0,02$	0,16 $\pm 0,04$	0,08 $\pm 0,02$	0,12 $\pm 0,02$	0,15 $\pm 0,04$	0,10 $\pm 0,01$
FE Phosphat [%]	2,30 $\pm 0,52$	7,26 $\pm 0,93$	4,71 $\pm 0,97$	5,60 $\pm 1,08$	1,62 $\pm 0,46$	1,25 $\pm 0,41$	1,87 $\pm 0,45$	1,89 $\pm 0,48$	37,2 $\pm 6,24$	34,4 $\pm 7,61$	29,3 $\pm 2,79$	31,9 $\pm 6,71$
FE Harnstoff [%]	51,38 $\pm 6,07$	89,1 $\pm 6,18$	59,2 $\pm 7,56$	80,6 $\pm 11,8$	63,8 $\pm 5,39$	76,1 $\pm 11,7$	74,3 $\pm 7,14$	123 $\pm 17,5$	56,4 $\pm 6,02$	86,2 $\pm 7,52$	72,1 $\pm 14,6$	85,1 $\pm 8,34$
Kreatinin-Clearance [$\mu\text{l}/\text{min}/\text{kgKG}$]	19,16 $\pm 2,50$	13,7 $\pm 1,69$	21,8 $\pm 2,93$	18,8 $\pm 0,86$	14,8 $\pm 2,09$	14,8 $\pm 1,68$	17,8 $\pm 2,04$	13,2 $\pm 3,18$	24,8 $\pm 2,81$	17,5 $\pm 1,96$	17 $\pm 3,36$	22,4 $\pm 3,45$

7.8 Absolutwerte der enteralen Elektrolytexkretion, metabolischer Versuch

Tabelle 15 | Absolutwerte der enteralen Elektrolytexkretion, metabolischer Versuch

Daten \pm SEM, (n=6-8)

Parameter	Kontrolle				Diät 1				Diät 2			
	WT		KO		WT		KO		WT		KO	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Kalzium [mmol/l]	39,3 $\pm 2,53$	49,0 $\pm 3,82$	42,9 $\pm 3,33$	35,6 $\pm 3,13$	89,2 $\pm 9,15$	104 $\pm 17,6$	82,4 $\pm 8,40$	82,3 $\pm 11,1$	11,2 $\pm 1,44$	16,2 $\pm 4,61$	9,62 $\pm 1,54$	16,5 $\pm 5,57$
Natrium [mmol/l]	116 $\pm 9,19$	135 $\pm 11,4$	111 $\pm 5,12$	118 $\pm 6,07$	33,9 $\pm 4,18$	21,9 $\pm 8,01$	40,1 $\pm 6,49$	31,4 $\pm 5,76$	11,5 $\pm 3,40$	12,1 $\pm 1,57$	13,3 $\pm 4,86$	13,0 $\pm 1,51$
Kalium [mmol/l]	93,7 $\pm 11,6$	94,8 $\pm 15,8$	113 $\pm 6,01$	93,6 $\pm 7,32$	46,1 $\pm 9,10$	19,6 $\pm 2,34$	34,6 $\pm 6,59$	24,4 $\pm 4,16$	49,9 $\pm 12,6$	35,6 $\pm 5,00$	66,3 $\pm 15,9$	40,8 $\pm 6,20$

Literaturverzeichnis

1. MacGibbon D. Generalized enamel hypoplasia and renal dysfunction. *Australian Dental Journal* 1972;61–93.
2. Jaureguiberry G, De la Dure-Molla M, Parry D, Quentrec M, Himmerkus N, Koike T, u. a. Nephrocalcinosis (enamel renal syndrome) caused by autosomal recessive FAM20A mutations. *Nephron Physiology* 2012;122(1–2):1–6.
3. Wang SK, Reid BM, Dugan SL, Roggenbuck JA, Read L, Aref P, u. a. FAM20A mutations associated with enamel renal syndrome. *Journal of Dental Research* 2014;93(1):42–8.
4. Nalbant D, Youn H, Nalbant SI, Sharma S, Cobos E, Beale EG, u. a. FAM20: An evolutionarily conserved family of secreted proteins expressed in hematopoietic cells. *BMC Genomics* 2005;6(11).
5. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie*. 5. Aufl. Thieme-Verlag; 2009.
6. Schmidt, RF, Lang, F, Heckmann, F. *Physiologie des Menschen*. 31. Aufl. Springer-Verlag; 2010.
7. Klinke R, Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S. *Physiologie*. 6. Aufl. Thieme-Verlag; 2009.
8. Blaine J, Chonchol M, Levi M. Renal control of calcium, phosphate and magnesium homeostasis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2015;10(7):1257–72.
9. Moor MB, Bonny O. Ways of calcium reabsorption in the kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2016;310(11):1337–50.
10. Wappler F, Tonner PH, Bürkle H, herausgeber. *Anästhesie und Begleiterkrankungen: Perioperatives Management des kranken Patienten*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2006
11. Brown EM. Role of the calcium-sensing receptor in extracellular calcium homeostasis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2013;27(3):333–43.
12. Vervaet BA, Verhulst A, D’Haese PC, De Broe ME. Nephrocalcinosis: new insights into mechanisms and consequences. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2009;24(7):2030–5.
13. Levy M, Koeppen B, Stanton B. *Principles of Physiology*. 4. Aufl. 2005.
14. Bonny O, Edwards A. Calcium reabsorption in the distal tubule: regulation by sodium, pH, and flow. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2013;304(5):585–600.
15. Ruch JV. Determinisms of odontogenesis. *Revis Biol Celular* 1987;14:1–99.

16. Krivanek J, Soldatov RA, Kastriti ME, Chontorotzea T, Herdina AN, Petersen J, u. a. Dental cell type atlas reveals stem and differentiated cell types in mouse and human teeth. *Nat Commun* 2020;11(1):4816.
17. Peyer B. Comparative Odontology. The University Chicago Press; 1968.
18. Møinichen, C B, Lyngstadaas, S P, Risnes, S. Morphological characteristics of mouse incisor enamel. *Journal of Anatomy* 1996;189:325–33.
19. Wen X, Paine ML. Iron deposition and ferritin heavy chain localization in rodent teeth. *BMC Research Notes* 2013;6(1):1.
20. Peterkova R, Hovorakova M, Peterka M, Lesot H. Three-dimensional analysis of the early development of the dentition. *Australian Dental Journal* 2014;59:55–80.
21. Meyer JL. Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1984;231(1):1–8.
22. Ho AM, Johnson MD, Kingsley DM. Role of the Mouse *ank* Gene in Control of Tissue Calcification and Arthritis. *Science* 2000;289(5477):265–70.
23. Murshed M, McKee MD. Molecular determinants of extracellular matrix mineralization in bone and blood vessels: *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2010;19(4):359–65.
24. Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, Sali A, Goding JW, u. a. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(14):9445–9.
25. Heiss A, DuChesne A, Denecke B, Grötzingen J, Yamamoto K, Renné T, u. a. Structural Basis of Calcification Inhibition by α 2-HS Glycoprotein/Fetuin-A. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278(15):13333–41.
26. Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biology* 2015;42:11–55.
27. Ronchetti I, Boraldi F, Annovi G, Cianciulli P, Quaglino D. Fibroblast involvement in soft connective tissue calcification. *Frontiers in Genetics* 2013;6(11).
28. Demer LL, Tintut Y. Inflammatory, metabolic and genetic mechanisms of vascular calcification. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2014;34(4):715–23.
29. Crawford PJ, Aldred M, Bloch-Zupan A. Amelogenesis imperfecta. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2007;2(1):17.
30. Hu JCC, Chun YHP, Al Hazzazzi T, Simmer JP. Enamel Formation and

- Amelogenesis Imperfecta. *Cells Tissues Organs* 2007;186(1):78–85.
31. Stephanopoulos G, Garefalaki ME, Lyroudia K. Genes and Related Proteins Involved in Amelogenesis Imperfecta. *J Dent Res* 2005;84(12):1117–26.
32. Coffield KD, Phillips C, Brady M, Roberts MW, Strauss RP, Wright JT. The psychosocial impact of developmental dental defects in people with hereditary amelogenesis imperfecta. *The Journal of the American Dental Association* 2005;136(5):620–30.
33. Hirji N, Bradley PD, Li S, Vincent A, Pennesi ME, Thomas AS, u. a. Jalili Syndrome: Cross-sectional and Longitudinal Features of Seven Patients With Cone-Rod Dystrophy and Amelogenesis Imperfecta. *American Journal of Ophthalmology* 2018;188:123–30.
34. Parry DA, Mighell AJ, El-Sayed W, Shore RC, Jalili IK, Dollfus H, u. a. Mutations in CNNM4 Cause Jalili Syndrome, Consisting of Autosomal-Recessive Cone-Rod Dystrophy and Amelogenesis Imperfecta. *The American Journal of Human Genetics* 2009;84(2):266–73.
35. Kirzioglu Z, Ulu KG, Sezer MT, Yuksel S. The relationship of amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis syndrome. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal* 2009;579–82.
36. O’Sullivan J, Bitu CC, Daly SB, Urquhart JE, Barron MJ, Bhaskar SS, u. a. Whole-exome sequencing identifies FAM20A mutations as a cause of amelogenesis Imperfecta and gingival hyperplasia syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 2011;88(5):616–20.
37. Habbig S, Beck BB, Hoppe B. Nephrocalcinosis and urolithiasis in children. *Kidney International* 2011;80(12):1278–91.
38. Evan AP, Unwin RJ, Williams, Jr. JC. Renal Stone Disease: A Commentary on the Nature and Significance of Randall’s Plaque. *Nephron Physiol* 2011;119(4):p49–53.
39. Shavit L, Jaeger P, Unwin RJ. What is nephrocalcinosis? *Kidney International* 2015;88(1):35–43.
40. Oliveira B, Kleta R, Bockenhauer D, Walsh SB. Genetic, pathophysiological and clinical aspects of nephrocalcinosis. *American Journal of Physiology (Renal Physiology)* 2016;311(6):1243–52.
41. Sethmann I, Wendt-Nordahl G, Knoll T, Enzmann F. Microstructures of Randall’s plaques and their interfaces with calcium oxalate monohydrate kidney stones reflect underlying mineral precipitation mechanisms. *Urolithiasis* 2017;45(3):235–48.
42. Wang SK, Aref P, Hu Y, Milkovich RN, Simmer JP, El-Khateeb M, u. a. FAM20A

- mutations can cause enamel renal syndrome (ERS). *PLoS Genetics* 2013;9(2).
43. Vogel P, Hansen GM, Read RW, Vance RB, Thiel M, Liu J, u. a. Amelogenesis imperfecta and other biomineralization defects in Fam20a and Fam20c null mice. *Veterinary Pathology* 2012;49(6):998–1017.
44. Gonzalez-Begne M, Lu B, Han X, Hagen FK, Hand AR, Melvin JE, u. a. Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multidimensional protein identification technology. *Journal of Proteome Research* 2009;8(3):1304–14.
45. Tagliabracci VS, Engel JL, Wen J, Wiley SE, Worby CA, Kinch LN, u. a. Secreted kinase phosphorylates extracellular proteins that regulate biomineralization. *Science* 2012;336(6085):1150–3.
46. An C, Ide YH, Nagano-Fujii M, Kitazawa S, Shoji I, Hotta H. A transgenic mouse line with a 58-kb fragment deletion in chromosome 11E1 that encompasses part of the FAM20A gene and Its upstream region shows growth disorder. *Kobe Journal of Medicine* 2010;55(4):82–92.
47. Cui J, Xiao J, Tagliabracci VS, Wen J, Rahdar M, Dixon JE. A secretory kinase complex regulates extracellular protein phosphorylation. *eLife Science Publication* 2015;4
48. Ohyama Y, Lin JH, Govitvattana N, Lin IP, Venkitapathi S, Alamoudi A, u. a. FAM20A binds to and regulates FAM20C localization. *Scientific Reports* 2016;6(1).
49. Ma P, Yan W, Tian Y, Wang J, Feng JQ, Qin C, u. a. Inactivation of FAM20B in joint cartilage leads to chondrosarcoma and postnatal ossification defects. *Scientific Reports* 2016;6(1).
50. Koike T, Izumikawa T, Tamura J, Kitagawa H. FAM20B is a kinase that phosphorylates xylose in the glycosaminoglycan–protein linkage region. *Biochemical Journal* 2009;421(2):157–62.
51. Hao J, Narayanan K, Muni T, Ramachandran A, George A. Dentin matrix protein 4, a novel secretory calcium-binding protein that modulates odontoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282(21):15357–65.
52. Palma-Lara I, Pérez-Ramírez M, García Alonso-Themann P, Espinosa-García AM, Godínez-Aguilar R, Bonilla-Delgado J, u. a. FAM20C Overview: Classic and Novel Targets, Pathogenic Variants and Raine Syndrome Phenotypes. *IJMS* 2021;22(15):8039.
53. Gressner A, Arndt T. Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 2. Aufl. Springer-Verlag; 2013.

54. Bruhn H, Fölsch U, Schäfer H. LaborMedizin: Indikationen, Methodik und Laborwerte. Pathophysiologie und Klinik. 1. Aufl. Schattauer-Verlag; 2008.
55. Buselmaier W, Tariverdian G. Humangenetik. 4. Aufl. Springer-Verlag; 2007.
56. Wolfensohn S, Lloyd M, herausgeber. Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd; 2003
57. Tzou DT, Taguchi K, Chi T, Stoller ML. Animal models of urinary stone disease. *International Journal of Surgery* 2016;36:596–606.
58. Dolan ME, Baldarelli RM, Bello SM, Ni L, McAndrews MS, Bult CJ, u. a. Orthology for comparative genomics in the mouse genome database. *Mamm Genome* 2015;26(7–8):305–13.
59. Chen SJ, Chiu KY, Chen HY, Lin WY, Chen YH, Chen WC. Animal Models for Studying Stone Disease. *Diagnostics* 2020;10(7):490.
60. Wu TH, Li KJ, Yu CL, Tsai CY. Tamm–Horsfall Protein is a Potent Immunomodulatory Molecule and a Disease Biomarker in the Urinary System. *Molecules* 2018;23(1):200.
61. Breiderhoff T, Himmerkus N, Stuiver M, Mutig K, Will C, Meij IC, u. a. Deletion of claudin-10 (Cldn10) in the thick ascending limb impairs paracellular sodium permeability and leads to hypermagnesemia and nephrocalcinosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012;109(35):14241–6.
62. Perlman RL. Mouse models of human disease: An evolutionary eerspective. *Evolution, Medicine and Public Health* 2016;2016(1):170–6.
63. Liebelt AG. Unique Features of Anatomy, Histology, and Ultrastructure, Kidney, Mouse. In: Jones TC, Mohr U, Hunt RD, herausgeber. Urinary System. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1986. Seite 24–44.
64. Puchtler H, Meloan SN, Terry MS. On the history and mechanism of alizarin red S stains for calcium. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1969;17(2):110–24.
65. Marx JO, Brice AK, Boston RC, Smith AL. Incidence rates of spontaneous disease in laboratory mice used at a large biomedical research institution. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 2013;52(6):782–91.
66. Stechman, M J, Ahmad, B N, Loh, N Y, Reed, Anita A C, Stewart, M, Wells, S, u. a. Establishing normal plasma and 24-hour urinary biochemistry ranges in C3H, BALB/c and C57BL/6J mice following acclimatization in metabolic cages. Sage Publications

- 2010;44(3):218–25.
67. Udwan K, Abed A, Roth I, Dizin E, Maillard M, Bettoni C, u. a. Dietary sodium induces a redistribution of the tubular metabolic workload: Effect of dietary Na^+ on renal tubular transport. *The Journal of Physiology* 2017;595(22):6905–22.
68. Heldmaier G, Neuweiler G. Energiehaushalt von Tieren. In: Vergleichende Tierphysiologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2004.
69. Peng Y, Gillis-Smith S, Jin H, Tränkner D, Ryba NJP, Zuker CS. Sweet and bitter taste in the brain of awake behaving animals. *Nature* 2015;527(7579):512–5.
70. Zhang H, Zhu Q, Cui J, Wang Y, Chen MJ, Guo X, u. a. Structure and evolution of the FAM20 kinases. *Nature Communications* 2018;9(1).
71. Weber EM, Hultgren J, Algers B, Olsson IAS. Do laboratory mouse females that lose their litters behave differently around parturition? *PLOS ONE* 2016;11(8).
72. Cunningham R, Esmaili A, Brown E, Biswas RS, Murtazina R, Donowitz M, u. a. Urine electrolyte, mineral, and protein excretion in NHERF-2 and NHERF-1 null mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2008;294(4):1001–7.
73. Zur B. Laborchemische Referenzbereiche für Wistratten und C57BL/6-Mäuse. 2005;
74. de Baaij JHF, Kompatscher A, Viering DHJM, Bos C, Bindels RJM, Hoenderop JGJ. P2X6 knockout mice exhibit normal electrolyte homeostasis. *PLOS ONE* 2016;11(6).
75. Martelli-Júnior H, Santos Neto PE, Aquino SN, Santos CC, Borges SP, Oliveira EA, u. a. Amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis syndrome: A case report and review of the literature. *Nephron Physiology* 2011;118(3):62–5.
76. Paula LM, Melo NS, Silva Guerra EN, Mestrinho DH, Acevedo AC. Case report of a rare syndrome associating amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis in a consanguineous family. *Archives of Oral Biology* 2005;50(2):237–42.
77. Dellow E, Harley K, Unwin R, Wrong O, Winter G, Parkins B. Amelogenesis imperfecta, nephrocalcinosis, and hypocalciuria syndrome in two siblings from a large family with consanguineous parents. *Nephrology Dialysis Transplantation* 1998;13(12):3193–6.
78. Vervaet BA, Verhulst A, D'Haese PC, De Broe ME. Nephrocalcinosis: New insights into mechanisms and consequences. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2009;24(7):2030–5.
79. Hänsel R, Sticher O, Steinegger E, herausgeber. *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. 8., überarb. und aktualisierte Aufl. Heidelberg: Springer; 2007.
80. Hibino H, Takai M, Noguchi H, Sawamura S, Takahashi Y, Sakai H, u. a. An

approach to the research on ion and water properties in the interphase between the plasma membrane and bulk extracellular solution. *J Physiol Sci* 2017;67(4):439–45.

81. Salimi MH, Heughebaert JC, Nancollas GH. Crystal growth of calcium phosphates in the presence of magnesium ions. *Langmuir* 1985;1(1):119–22.

82. Wang L, Nancollas GH. Calcium Orthophosphates: Crystallization and Dissolution. *Chem Rev* 2008;108(11):4628–69.

Danksagung

Ich möchte mich im Folgenden bei einigen Personen namentlich für ihre Unterstützung und Hilfe bedanken, ohne die ich meine Dissertation nicht durchführen können.

An erster Stelle gilt der Dank meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Markus Bleich und meiner Betreuerin, Frau Dr. Nina Himmerkus, die mich herzlich in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen haben, immer ein offenes Ohr für Probleme hatten und mir stetig mit wissenschaftlichem und methodischem Rat zu Seite standen. Des Weiteren spreche ich meinen Dank Thomas Stegmann aus, welcher mich bei jedem Versuch fachlich sowie motivierend begleitet und unterstützt hat und Lieske, die mir nicht nur im Labor, sondern auch während des ganzen Studiums eine besondere Freundin war und ist. Bedanken möchte ich mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe für den Rückhalt in stressigen Situationen und die unterhaltsamen Pausengespräche. Außerdem danke ich Dominik für die helfende Hand bei manchem Statistikproblem.

Des Weiteren spreche ich meinen Dank den Mitarbeitern des Tierhauses für ihre Betreuung der Tierzucht und Hilfe bei der Versuchsdurchführung aus. Ebenso Frau Prof. Susann Boretius und dem MOINCC für die computertomographischen Schädelaufnahmen, Dr. rer. nat. Tilman Breiderhoff (Charité Berlin) für die Gewebeproben der Claudin-4-KO-Mäuse und dem Zentrallabor des UKSH für die Analyse meiner Proben.

Zuletzt danke ich meiner Mutter für ihre liebevollen sowie aufbauenden Worte und Taten, meinem Vater für seine stetige Hilfsbereitschaft, meinen Brüdern für so manche Ablenkung in stressigen Zeiten und Christofer, der vor allem in der letzten Phase immer an meiner Seite stand und mich bis zum Schluss motiviert hat. Außerdem möchte ich mich bei allen Freunden und Familienmitgliedern bedanken die ich hier namentlich nicht erwähnt habe, mich aber stets unterstützt haben.