

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Angefertigt unter der Leitung von: Prof. Dr. Katrin Hartmann

Untersuchung über die Expression von Kalzium- Transportproteinen in kaninem Duodenum, Niere und Pankreas

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Claudia Claassen geb. Palm
aus Köln

München 2011

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Korreferent: Prof. Dr. Kaltner

Tag der Promotion: 30. Juli 2011

Meinen lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	2
1.	Kalzium-Homöostase.....	2
1.1.	Kalzium-Absorption	3
1.1.1.	Kalzium-Absorption im Darm.....	5
1.1.2.	Kalzium-Absorption in der Niere	5
1.2.	Kalzium-Transportproteine	6
1.2.1.	TRPV 5 und TRPV 6.....	6
1.2.2.	Calbindin-D28k	9
1.2.3.	PMCA 1	11
1.2.4.	NCX 1	13
1.2.5.	SERCA 3.....	15
1.3.	Regulation der Kalzium-Homöostase.....	17
2.	Kalzium-Handling im Pankreas.....	19
2.1.	Kalzium-Transportproteine im Pankreas	19
2.1.1.	TRPV 5 und TRPV 6.....	20
2.1.2.	Calbindin-D28k	21
2.1.3.	PMCA 1	21
2.1.4.	NCX 1	21
2.1.5.	SERCA 3.....	22
2.2.	Kalzium-Ausstrom aus den β -Zellen.....	22
2.3.	Regulation durch Vitamin D im Pankreas	23
3.	Rolle von Vitamin D bei Diabetes	24
III.	PUBLIKATION.....	26
	Expression and Immunolocalization of Calcium Transport Proteins in the Canine Duodenum, Kidney and Pancreas	
IV.	DISKUSSION	32
V.	ZUSAMMENFASSUNG	39
VI.	SUMMARY.....	41

VII.	LITERATURVERZEICHNIS	43
VIII.	DANKSAGUNG	77

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Kalzium-Transport durch eine Epithelzelle (schematisch).....</i>	<i>4</i>
--	----------

TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Expression des Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV) 5 in Darm und Niere von Säugetieren</i>	<i>8</i>
<i>Tabelle 2: Expression des Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV) 6 in Darm und Niere von Säugetieren</i>	<i>9</i>
<i>Tabelle 3: Expression von Calbindin-D28k in Darm und Niere von Säugetieren</i>	<i>11</i>
<i>Tabelle 4: Expression der Plasma Membrane Calcium ATPase (PMCA) 1 in Darm und Niere von Säugetieren</i>	<i>13</i>
<i>Tabelle 5: Expression des Natrium Calcium Exchanger (NCX) 1 in Darm und Niere von Säugetieren</i>	<i>15</i>
<i>Tabelle 6: Expression der Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase (SERCA) 3 in Darm und Niere von Säugetieren</i>	<i>16</i>
<i>Tabelle 7: Expression des Vitamin-D-Rezeptors (VDR) in Darm und Niere von Säugetieren</i>	<i>19</i>
<i>Tabelle 8: In der Literatur beschriebene Kalzium-Transportproteine im Pankreas bei Säugetieren.....</i>	<i>24</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α -Zelle	Alpha-Zelle
ATP	Adenosin-Triphosphat
β -Zelle	Beta-Zelle
Ca^{++}	Kalzium
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	intrazellulärer Kalzium-Spiegel
Calbindin-D28k	28000-Dalton-Calbindin
Calb-D28k	Calbindin-D28k
Calbindin-D9k	9000-Dalton-Calbindin
CaT	Calcium Transporter (Kalzium-Transporter)
DTK	distales Tubuluskonvolut
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
ECaC	Epithelial Calcium Channel (epithelialer Kalzium-Kanal)
ER	endoplasmatisches Retikulum
l	Liter
mmol	Millimol
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid (Messenger Ribonukleinsäure)
n. b.	genaue Lokalisation nicht beschrieben
nmol	Nanomol
NCX	Natrium Calcium Exchanger (Natrium-Kalzium-Austauscher)
PMCA	Plasma Membrane Calcium ATPase (Plasma-Membran-Kalzium-ATPase)
PTK	proximales Tubuluskonvolut
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RP 5	ribosomales Protein S 5
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction (Echtzeit Polymerasekettenreaktion)
SaR	Sammelrohr

SERCA	Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase (sarko-endoplasmatische-Retikulum-Kalzium-ATPase)
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TRPV	Transient Receptor Potential Vanilloid (Transientes Rezeptor Potential, Untergruppe Vanilloid)
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VDREs	Vitamin-D-responsive-Elemente
VS	Verbindungsstück
z. B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Eine fein regulierte Steuerung der Kalzium-Homöostase ist eine essentielle Voraussetzung für einen funktionierenden Organismus bei allen Säugetieren. Diese wird erreicht durch die permanente Kontrolle der Kalzium-Aufnahme und -Ausscheidung und die intrazelluläre Pufferung von Kalzium. Dieses Gleichgewicht wird maßgeblich durch Vitamin D reguliert, in dem das Vitamin die Gentranskription verschiedener Kalzium-Handling-Proteine steuert. Vermittelt werden Vitamin-D-Effekte über den nukleären Vitamin-D-Rezeptor (VDR), der als Transkriptionsfaktor agiert. Die epithelialen Kalzium-Kanäle Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV) 5 und TRPV 6 ermöglichen die Aufnahme von Kalzium in das Zellinnere. Dort wird es an das Kalzium-Transportprotein Calbindin gebunden. Ein Teil des zytosolischen Kalzium-Gehalts wird mithilfe der sarko-endoplasmatischen-Retikulum-Kalzium-ATPase (SERCA) in das endoplasmatische oder sarkoplasmatische Retikulum (ER oder SR) befördert und dort gespeichert. Der Rest der aufgenommenen Kalzium-Menge kann über die in der Plasmamembran lokalisierten Transporter Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) oder Plasma-Membran-Kalzium-ATPase (PMCA) wieder aus der Zelle heraus befördert werden.

Es ist bekannt, dass diese Proteine hauptsächlich in Dünndarm und Niere vorkommen, die beiden Organe, die eine Schlüsselrolle für die Aufrechterhaltung physiologischer Kalzium-Konzentrationen einnehmen. Verschiedene Studien belegen jedoch, dass auch die Insulinsekretion aus den Beta-Zellen (β -Zellen) des Pankreas sowohl durch Kalzium als auch durch Vitamin D reguliert wird (NORMAN et al., 1980; KAJIKAWA et al., 1999).

Studien über den Nachweis und die Lokalisation relevanter Kalzium-Handling-Proteine gibt es bisher hauptsächlich bei Nagetier-Modellen und beim Menschen. In der vorliegenden Studie wurden erstmals das Vorkommen und die Lokalisation wichtiger Kalzium-Handling-Proteine in Duodenum, Niere und endokrinem Pankreas beim Hund untersucht.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Kalzium-Homöostase

Kalzium ist von allen Mineralstoffen im Körper mengenmäßig am stärksten vertreten, in einem erwachsenen Menschen sind es etwa 1000 Gramm. Der Großteil des Gesamtkalzium-Gehalts ist in der Knochenmatrix und der Zahnschmelz in Form von Kalzium-Hydroxylapatit gebunden, nur ein kleiner Teil liegt in ionisierter Form vor. Dieser mengenmäßig kleine Teil des Kalzium-Gehalts spielt eine entscheidende Rolle für den Organismus, da die Aufrechterhaltung der Kalzium-Homöostase Voraussetzung für viele Körperfunktionen ist (RINGER, 1883; WEBER, 1959; FUKUGAWA & KUOKAWA, 2002). Im Vergleich zu allen anderen Ionen weist Kalzium die höchste Konzentrationsdifferenz zwischen Intra- und Extrazellularraum auf. Daher ist es als Signalmolekül besonders geeignet und an vielen Signalkaskaden beteiligt (BOOTMAN & BERRIDGE, 1995; RIZZOLI & BONJOUR, 1998; CARAFOLI, 2002).

Die klassische Funktion von Kalzium ist die eines Second-Messengers (CLAPHAM, 1995). Das bedeutet, dass von extrazellulär kommende Signale im Zellinneren durch Veränderung des zytosolischen Kalzium-Spiegels weitergeleitet werden. Dies kann auf zwei Wegen geschehen, durch Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speicherorganellen oder durch Kalzium-Einstrom aus dem Extrazellularraum. Die dafür benötigten membranständigen Kalzium-Kanäle sind ihrerseits durch Kalzium aktivierbar (BEZPROZVANNY & EHRLICH, 1995). Dies wird als Kalzium-induzierte Kalzium-Freisetzung bezeichnet (PUTNEY, 1986, 1990).

Die Geschwindigkeit, mit der der intrazelluläre Kalzium-Spiegel ($[Ca^{2+}]_i$) ansteigt, muss einerseits sehr variabel sein, um sich den jeweiligen Zelltypen und Bedürfnissen anzupassen, andererseits müssen länger andauernde Erhöhungen des $[Ca^{2+}]_i$ vermieden werden. Ein erhöhter Kalzium-Gehalt im Zytosol kann verschiedene zellschädigende Mechanismen in Gang setzen, insbesondere die Schädigung des Zytoskeletts durch Aktivierung von katabolen Enzymen, wie Phospholipasen, Proteasen und Endonukleasen. Die daraus resultierenden Defekte an der Zelle können bis zum Zelltod führen (SCHANNE et al., 1979;

ORRENIUS et al., 1992b; ORRENIUS et al., 1992a; TRUMP & BEREZESKY, 1995). Aufgrund dieser zytotoxischen Eigenschaften wird der $[Ca^{2+}]_i$ in sehr engen Grenzen zwischen 20 - 100 Nanomol/Liter (nmol/l) gehalten (CARAFOLI, 1988c; CARMELIET et al., 2003; HOUILLIER et al., 2003).

Um die unkontrollierte Diffusion von Kalzium in die Zelle zu verhindern, sind fast alle Zellen mit teils hochaffinen Kalzium-Transportern und -Bindungsproteinen ausgestattet (CARAFOLI, 1994a). Damit Kalzium als ubiquitäres Signalmolekül funktionieren kann, bedarf es einem angepassten Verteilungsmuster an Kalzium-Pumpen und -Transportproteinen für jedes Gewebe. Für viele Organe kennt man bereits Gewebs-spezifische Isoformen der Kalzium-Handling-Proteine (CARAFOLI, 1988b; FRIEDMAN & GESEK, 1995; GUERINI, 1998; HOENDEROP et al., 2000b).

Auch im Extrazellularraum hat Kalzium eine große Bedeutung als Signalmolekül, hier jedoch in Form eines First-Messengers (BROWN et al., 1993; BROWN et al., 1999). Das bedeutet, dass Kalzium im Extrazellularraum an Rezeptoren auf der Zellmembran bindet und dadurch Signalkaskaden innerhalb der Zelle aktivieren kann. Der extrazelluläre Kalzium-Gehalt muss, wie der intrazelluläre Gehalt, innerhalb sehr enger Grenzen gehalten werden [1,1 - 1,3 Millimol/Liter (mmol/l)], da beim Überschreiten des Löslichkeitsprodukts im Extrazellularraum Kalziumphosphat ausfällt, das zur Kalzifizierung von Gewebe mit nachfolgenden Schäden an den entsprechenden Organen führen kann (ANDERSON, 1981; SHANAHAN, 2005).

Die wichtigsten Organsysteme zur Aufrechterhaltung der Kalzium-Homöostase sind Darm, Niere und Knochen (HURWITZ, 1996; FUKUGAWA & KUROKAWA, 2002). Im Knochengewebe ist ionisiertes Kalzium fest in der Knochenmatrix gebunden, daher kann dieser Anteil am Gesamtkalzium nur sehr langsam verändert werden. Die hormongesteuerte Regulation in Niere und Darm ermöglicht dagegen eine kurzfristig Anpassung des nicht gebundenen Kalzium-Anteils (BINDELS, 1993; GAMA et al., 1997; VAN CROMPHAUT et al., 2001).

1.1. Kalzium-Absorption

Der Kalzium-Transport durch Epithelzellen ist ein dreistufiger Prozess, bestehend aus dem passiven Kalzium-Einstrom an der apikalen Membran, Diffusion durch das Zytosol und dem energieabhängigen Ausstrom an der basolateralen Membran.

Der proximale Dünndarm und die distalen Tubulusnephrene der Niere sind die Hauptorte, in denen die Kalzium-Aufnahme entgegen dem elektrochemischen Gradienten stattfindet (PENG et al., 2003b).

Der gegenüber dem Zellinneren erhöhte Kalzium-Gehalt im Extrazellularraum ermöglicht den Kalzium-Einstrom an der apikalen Zellmembran durch die epithelialen Kalzium-Kanäle TRPV 5 und TRPV 6 (PENG et al., 2003b). Zur Diffusion durch das Zytoplasma wird Kalzium an das Kalzium-Transportprotein Calbindin gebunden. Der Kalzium-Ausstrom an der basolateralen Membran ist ein energieverbrauchender Prozess, der durch die Kalzium-Pumpen PMCA und/oder den Natrium-Kalzium-Austauscher NCX geschieht. Ein Teil des $[Ca^{2+}]_i$ wird mithilfe der SERCA in das ER oder SR befördert, wo es gespeichert wird, bis es bei einer Aktivierung der Zelle wieder in das Zytoplasma freigesetzt wird (siehe Abbildung 1). Kontrolliert werden diese Transportproteine maßgeblich durch 1,25-(OH)₂D₃ (1,25-Dihydroxycholecalciferol), die aktivierte Form von Vitamin D (WASSERMAN & FULLMER, 1995; OKANO et al., 2004).

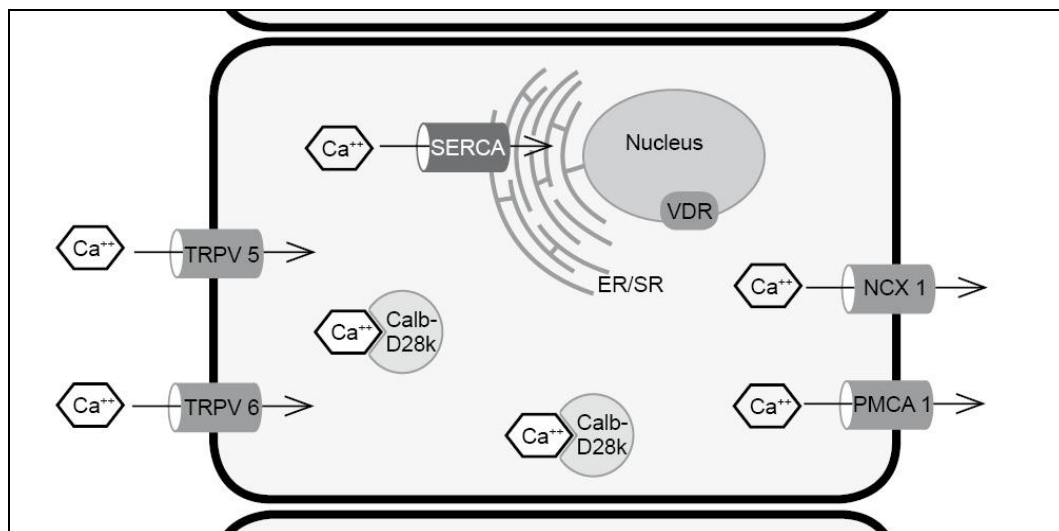


Abbildung 1: Kalzium-Transport durch eine Epithelzelle (schematisch)

Kalzium (Ca^{++}) wird an der luminalen Seite durch die Transporter Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV) 5 und 6 in die Zelle aufgenommen. Im Zytoplasma wird es an Calbindin-D28k (Calb-D28k) gebunden und dann entweder durch die sarko-endoplasmatische-Retikulum-Kalzium-ATPase (SERCA) in das endoplasmatische (ER) oder sarkoplasmatische Retikulum (SR) transportiert oder an der basolateralen Membran durch den Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) oder die Plasmamembran-Kalzium-ATPase (PMCA) aus der Zelle transportiert. Reguliert werden diese Vorgänge maßgeblich durch den Vitamin-D-Rezeptor (VDR).

1.1.1. Kalzium-Absorption im Darm

Die intestinale Kalzium-Aufnahme geschieht auf zwei Wegen, entweder passiv durch die Interzellularräume oder aktiv durch die Enterozyten. Bei der Aufnahme Kalzium-reicher Nahrung überwiegt der passive, parazelluläre Kalzium-Einstrom. Diese Kalzium-Aufnahme durch den Interzellularraum der Enterozyten benötigt keine Kalzium-Transportproteine. Bei begrenztem Kalzium-Angebot in der Nahrung überwiegt jedoch die transzelluläre Aufnahme durch die Enterozyten mithilfe von Kalzium-Pumpen (BRONNER et al., 1986; PANSU et al., 1993). Die Kalzium-Aufnahme über die Mikrovilli an der apikalen Plasmamembran der Enterozyten entspricht dem für alle Epithelzellen beschriebenen Vorgang. Dieser Transport ist, dem elektrochemischen Gradienten folgend, ein energieunabhängiger Prozess, da der Kalzium-Gehalt in den Enterozyten viel niedriger ist (10^{-7} bis 10^{-6} mol/l) als der im Darmlumen (10^{-3} mol/l). Zusätzlich ist das Zytoplasma im Vergleich zum Darmlumen stärker elektronegativer; dies begünstigt die Aufnahme der positiv geladenen Kalzium-Ionen (WASSERMAN & FULLMER, 1995). Die Ausschleusung von Kalzium an der basolateralen Membran erfolgt entgegen einem elektrochemischen Gradienten hauptsächlich durch energieverbrauchende Kalzium-Pumpen (WASSERMAN et al., 1992; PANSU et al., 1993).

1.1.2. Kalzium-Absorption in der Niere

Um den Gehalt an freiem Kalzium im Körper konstant zu halten, wird 98 % der im Glomerulum filtrierten Kalzium-Menge in den Nephronen der Niere rückresorbiert (FRIEDMAN & GESEK, 1995). Ebenso wie im Darm kann Kalzium auch in der Niere sowohl passiv parazellulär als auch aktiv transzellulär absorbiert werden (BINDELS, 1993). Der Großteil der Kalzium-Reabsorption findet im proximalen Tubuluskonvolut und im geraden Teil des proximalen Tubulus als passiver, parazellulärer Einstrom statt. Die aktive, transzelluläre Kalziumrückresorption durch die Epithelzellen findet überwiegend in den distalen Teilen des Nephrons statt, hauptsächlich im distalen Tubuluskonvolut, den Verbindungsstücken und teilweise im Anfangsstück der Sammelrohre (BINDELS, 1993; REILLY & ELLISON, 2000).

Die Mechanismen der transzellulären Kalzium-Aufnahme im Tubulussystem der Niere sind vergleichbar mit denen im Darm. Dem passiven Einstrom an der apikalen Membran folgt die an Calbindin gebundene Diffusion durch das

Zytoplasma mit nachfolgender aktiver Ausschleusung an der basolateralen Membran (VAN OS, 1987; LAMBERS et al., 2006).

1.2. Kalzium-Transportproteine

Um die Aufrechterhaltung der Kalzium-Homöostase zu gewährleisten, sind eine Reihe von Kalzium-Transportproteinen und -Kanälen nötig. Die Expression dieser Proteine ist in verschiedenen Geweben und teilweise bei verschiedenen Spezies unterschiedlich (CARAFOLI, 1994a).

1.2.1. TRPV 5 und TRPV 6

TRPV 5, auch genannt Epithelial Calcium Channel 1 (ECaC 1) oder Calcium Transporter 2 (CaT 2) und TRPV 6, auch genannt Epithelial Calcium Channel 2 (ECaC 2) oder Calcium Transporter 1 (CaT 1), sind zwei von sechs Mitgliedern der TRPV-Subfamilie (HOENDEROP et al., 1999; PENG et al., 1999), einer heterogenen Gruppe von Kalzium-permeablen Kationenkanälen (HARTENECK et al., 2000). TRPV 5 und 6, die eine zu 75 % gleiche Aminosäurestruktur besitzen (MONTELL, 2001), sind Kalzium-selektive Kanäle und regulieren entscheidend die Kalzium-Aufnahme an der apikalen Seite von Kalzium-transportierenden Epithelien (PENG et al., 2003b). Da sie den limitierenden Schritt in der aktiven Resorption von Kalzium darstellen, werden diese Proteine auch als „Gatekeeper“ des transepithelialen Kalzium-Transports bezeichnet (MULLER et al., 2000; HOENDEROP et al., 2002b).

Bei Vorliegen eines physiologischen Membranpotentials sind die Kanäle geöffnet und somit kann Kalzium durch die Kanäle in die Zelle strömen. Um einen intrazellulären Kalzium-Anstieg auf toxische Level zu vermeiden, werden die Kanäle durch einen Anstieg des zytoplasmatischen Kalzium-Gehalts inaktiviert (NILIUS et al., 2001; VENNEKENS et al., 2001). TRPV 6 zeigt eine schnelle (~ 50 Millisekunden) und eine langsame Phase der Inaktivierung (NIEMEYER et al., 2001). TRPV 5 kann nicht so schnell inaktiviert werden (PENG et al., 2003b). Die anschließende Erholungsphase dauert bei TRPV 5 ebenfalls etwa doppelt so lang wie bei TRPV 6 (HOENDEROP et al., 2001b). Da der Kalzium-Gehalt im Darmlumen in Abhängigkeit von der Nahrungszusammensetzung sehr stark variiert, werden im Darm überwiegend die Kalzium-Transporter TRPV 6 exprimiert, die über einen sehr schnellen Inaktivierungsmechanismus verfügen. Dadurch können die Enterozyten vor einem zu stark variierenden Kalzium-

Einstrom geschützt werden. Der Kalzium-Gehalt in der Niere ist dagegen abhängig vom Kalzium-Gehalt im Blut und ist daher nicht solchen starken Schwankungen ausgesetzt. Somit ist eine entsprechend schnelle Unterbrechung des Kalziumeinstroms in die Nierenzellen nicht nötig. Daher überwiegt in der Niere der Kalziumtransporter TRPV 5 (NILIUS et al., 2002; SONG et al., 2003; HOENDEROP et al., 2004).

Beim Menschen gibt es kaum Daten über das Vorkommen von TRPV 5. Der Transporter wurde in humanem Darmgewebe nicht nachgewiesen. In der Niere des Menschen wird TRPV 5 in geringem Maße im Bereich der Nierenrinde und dem äußeren Nierenmark gefunden (PENG et al., 2001, 2003a). In der Niere von Mäusen und Ratten wurde der Transporter dagegen als wichtigster Kalzium-Kanal identifiziert (PENG et al., 2000; NIJENHUIS et al., 2003; PENG et al., 2003b; OZ et al., 2007). Bei der Ratte ist das Vorkommen von TRPV 5 auch in Duodenum und Caecum nachgewiesen (VAN ABEL et al., 2003; BROULAND et al., 2005; SATO et al., 2006), im Colon wurde bisher nur seine mRNA gefunden (TEERAPORNPUNTAKIT et al., 2009). Bei Mäusen konnte TRPV 5 im Duodenum identifiziert werden (VAN CROMPHAUT et al., 2001; BOUILLON et al., 2003; VAN ABEL et al., 2003). Beim Kaninchen wurde TRPV 5 bisher in Duodenum, Jejunum (HOENDEROP et al., 1999) und der Niere gefunden (HOENDEROP et al., 2000a; PENG et al., 2003a) (siehe Tabelle 1).

Über das Vorkommen des Kalzium-Transporters TRPV 6 im menschlichen Darm gibt es unterschiedliche Angaben. In vielen Studien ist angegeben, dass der Transporter nur im Duodenum vorkommt (BARLEY et al., 2001; WALTERS et al., 2004; BALESARIA et al., 2009; KIM et al., 2009). Es gibt aber auch Berichte über die Expression von TRPV 6 im gesamten menschlichen Darm (PENG et al., 2000; ZHUANG et al., 2002) oder im Colon (HOWARD et al., 1993; IRNATEN et al., 2008). Die TRPV-6-Expression in humaner Niere ist noch weniger gut erforscht. Teilweise wurde der Transporter hier gar nicht gefunden (BARLEY et al., 2001), während er in anderen Studien als wichtigster Kalzium-Transporter in der Niere des Menschen beschrieben wird, mit einer zehnfach höhere Expression von TRPV 6 gegenüber TRPV 5 (PENG et al., 2001). An Ratten wurde TRPV 6 in allen Darmabschnitten nachgewiesen (PENG et al., 1999; VAN ABEL et al., 2003; SATO et al., 2006; TISSANDIE et al., 2008; FUKUSHIMA et al., 2009; TEERAPORNPUNTAKIT et al., 2009). In der Niere von Ratten konnte der

Transporter bisher jedoch nicht gefunden werden (PENG et al., 1999). Mäuse exprimieren diesen Transporter hauptsächlich im Duodenum (VAN CROMPHAUT et al., 2001; BOUILLON et al., 2003; VAN ABEL et al., 2003; HUYBERS et al., 2007) und im proximalen Colon (XUE & FLEET, 2009). In Nieren von Mäusen kommt TRPV 6 in den distalen Tubuluskonvoluten, den Verbindungsstücken und Sammelrohren des Tubulussystems vor (NIJENHUIS et al., 2003; LEE et al., 2004; OZ et al., 2007; KIM et al., 2009) (siehe Tabelle 2).

Studien, die die genaue Lokalisation von TRPV 5 und 6 im Darm untersuchten, fanden den Transporter ausschließlich an der apikalen Membran von Enterozyten und im Dünndarm nur in Enterozyten im Bereich der Darmzotten-Spitzen (HOENDEROP et al., 2000b; PENG et al., 2000; ZHUANG et al., 2002; VAN ABEL et al., 2003). Bei allen bisher untersuchten Tierarten wird TRPV 5 in der Niere an der apikalen Membran der Epithelzellen des distalen Tubuluskonvoluts, der Verbindungsstücke und teilweise im angrenzenden Sammelrohr exprimiert. Das sind die Zellen, in denen die aktive Kalzium-Resorption stattfindet und die auch andere Proteine für das Kalzium-Handling, wie Calbindin-D28k und NCX 1, exprimieren (HOENDEROP et al., 2000a; HOENDEROP et al., 2003b; PENG et al., 2003a). Das Verteilungsmuster von TRPV 6 in der Niere ist wenig erforscht, es gibt jedoch Hinweise, dass der Transporter zusammen mit TRPV 5 in den Nierenepithelzellen vorkommt (HOENDEROP et al., 2003a).

Tabelle 1: Expression des Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV) 5 in Darm und Niere von Säugetieren

DTK = distales Tubuluskonvolut, SaR = Sammelrohr, VS = Verbindungsstück, -- = Vorkommen nicht beschrieben

Spezies	Lokalisation im Darm	Intrazelluläre Lokalisation (Darm)	Lokalisation in der Niere	Intrazelluläre Lokalisation (Niere)
Mensch	--	Apikale Zellmembran der Darmepithelzellen	Nierenrinde, Nierenmark	Apikale Zellmembran der Tubulusepithelzellen
Ratte	Duodenum, Caecum, Colon		DTK, VS	
Maus	Duodenum		DTK, VS, SaR	
Kaninchen	Duodenum, Jejunum		DTK, VS	

Tabelle 2: Expression des Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV) 6 in Darm und Niere von Säugetieren

DTK = distales Tubuluskonvolut, SaR = Sammelrohr, VS = Verbindungsstück, -- = Vorkommen nicht beschrieben, * = Lokalisation nicht bestätigt

Spezies	Lokalisation im Darm	Intrazelluläre Lokalisation (Darm)	Lokalisation in der Niere	Intrazelluläre Lokalisation (Niere)
Mensch	Duodenum, Colon, (gesamter Magen-Darm-Trakt)	Apikale Zellmembran der Darmepithelzellen*	Distales Segment des DTK	Apikale Zellmembran der Tubulusepithelzellen*
Ratte	Gesamter Darm		--	
Maus	Duodenum, Colon		DTK, VS, SaR	

1.2.2. Calbindin-D28k

Beim Säuger unterscheidet man zwei verschiedene Vitamin-D-abhängige Kalzium-bindende Proteine, das 9000-Dalton-Calbindin (Calbindin-D9k) und das 28000-Dalton-Calbindin (Calbindin-D28k) (HOWARD et al., 1992). Diese hauptsächlich im Zytosol vorkommenden Proteine gehören zu einer Familie von hochaffinen Kalzium-bindenden Proteinen, der auch Calmodulin und Parvalbumin angehören (KUMAR et al., 1989; HEIZMANN & HUNZIKER, 1991).

Calbindin nimmt eine wichtige Stellung bei der Kalzium-Aufnahme über Epithelzellen ein. Nur mithilfe der Kalzium-bindenden Proteine kann der Kalzium-Transport durch Epithelzellen stattfinden und trotzdem der Gehalt an freiem Kalzium im Zytoplasma niedrig gehalten werden (BRONNER & STEIN, 1988). Nachdem Kalzium an der apikalen Zellmembran durch die Kalzium-Transporter TRPV 5 und 6 in die Zelle aufgenommen wurde, wird es umgehend an Calbindin gebunden und zur basolateralen Zellmembran transportiert, um hier aus der Zelle exportiert zu werden (siehe Abbildung 1). Da die Kalzium-Aufnahme an der apikalen Membran durch einen hohen Gehalt an freiem Kalzium an der apikalen Membran gehemmt wird, wird der transepitheliale Kalzium-Transport durch Calbindin erhöht, indem Calbindin das freie Kalzium direkt nach seiner Aufnahme bindet und von der apikalen Membran weg transportiert (FEHER et al., 1992; CHARD et al., 1993). Calbindin-D28k ist hochaffin für

Kalzium, zeigt aber eine langsame Bindungs-Kinetik. Dadurch kann Kalzium trotz der hochaffinen Bindung an Calbindin als Second-Messenger agieren, da bei einem schnellen Anstieg des Kalzium-Gehalts im Zytoplasma weitere Signalkaskaden aktiviert werden, bevor Kalzium an Calbindin gebunden und abgepuffert wird (LEATHERS et al., 1990; KOSTER et al., 1995; LI et al., 1995).

Calbindin-D28k wird bei Säugetieren besonders stark in der Niere exprimiert (ROTH et al., 1982a; RHOTEN et al., 1984), während im Darm Calbindin-D9k für die Bindung von Kalzium in den Epithelzellen verantwortlich ist (HEMMINGSEN et al., 2002; LEE et al., 2003; YAMAGISHI et al., 2006). Die Expression von Calbindin-D28k in der Niere ist Gegenstand vieler Forschungen bei Menschen (BORKE et al., 1988; KUMAR et al., 1994), Ratten (BINDELS et al., 1991; WANG et al., 2008), Mäusen (LOFFING et al., 2001; LEE et al., 2004) und Kaninchen (TAYLOR et al., 1982; VAN BAAL et al., 1996; VAN ABEL et al., 2005). Zusätzlich wurde das Protein in der Niere von Affen und Schweinen nachgewiesen (SCHREINER et al., 1983) (siehe Tabelle 3).

Aufgrund seiner Rolle als intrazellulärer Kalzium-Puffer wird Calbindin-D28k in den gleichen Nierenzellen exprimiert wie der Kalzium-Transporter TRPV 5, also in den Epithelzellen des distalen Tubuluskonvoluts, der Verbindungsstücke und der Anfangsstücke der Sammelrohre. Als mobiles Kalzium-Bindungsprotein kommt Calbindin im gesamten Zytoplasma dieser Zellen vor (TAYLOR et al., 1982; SCHREINER et al., 1983; BINDELS et al., 1991; VAN BAAL et al., 1996).

Tabelle 3: Expression von Calbindin-D28k in Darm und Niere von Säugetieren

DTK = distales Tubuluskonvolut, SaR = Sammelrohr, VS = Verbindungsstück,
 -- = Vorkommen nicht beschrieben

Spezies	Lokalisation im Darm	Intrazelluläre Lokalisation (Darm)	Lokalisation in der Niere	Intrazelluläre Lokalisation (Niere)
Mensch	--	--	DTK	Zytoplasma der Epithelzellen
Ratte			DTK	
Maus			DTK, VS	
Kaninchen			DTK, VS, SaR	
Affe, Schwein			DTK, VS, SaR	

1.2.3. PMCA 1

Die Kalzium-Pumpen der Plasmamembran, PMCA, sind in allen eukaryotischen Zellen für den Kalzium-Ausstrom aus dem Zytosol verantwortlich (CARAFOLI, 1988b). In vielen Zellen geschieht der Kalzium-Export sogar ausschließlich über diese hochaffinen Kalzium-Transporter. Lokalisiert an der basolateralen Membran, bewirken sie den Kalzium-Ausstrom nach extrazellulär entgegen einem starken Konzentrationsgradienten (DUNHAM & GLYNN, 1961; SCHATZMANN, 1966). Dieses Transportsystem hat eine sehr hohe Affinität für Kalzium und gewährleistet einen stetig gleichbleibend niedrigen $[Ca^{2+}]_i$ in Ruhe (CARAFOLI, 1991). Die Kapazität dieser Transporter ist jedoch gering. PMCA können auf verschiedene Arten aktiviert werden, der wichtigste Aktivator ist Calmodulin (SCHARFF & FODER, 1982; ENYEDI et al., 1987; FALCHETTO et al., 1991). Wenn Calmodulin an die Calmodulin-Bindungsstelle von PMCA gebunden hat, beginnt der Transporter zu arbeiten und verbraucht jeweils ein Adenosin-Triphosphat-(ATP-)Molekül für jedes Kalzium-Ion, das aus der Zelle herausgebracht wird (VILLALOBO et al., 1986; NIGGLI et al., 1987; CARAFOLI, 1991, 1992).

Beim Menschen kodieren vier Gene auf unterschiedlichen Chromosomen für die vier Isoformen PMCA 1 - 4 (CARAFOLI, 1994b). Durch alternatives Splicen an den Schnittstellen jeder Isoform entstehen weitere Splicevarianten (STREHLER

et al., 1989; STAUFFER et al., 1994). Die Expression der PMCA-Isoformen und -Splicevarianten wird Zell- und Gewebs-spezifisch reguliert. PMCA 1 und 4 kommen in fast allen Geweben vor, während die Isoformen 2 und 3 nur in bestimmten Geweben vorkommen, zum Beispiel (z. B.) in Muskelzellen oder der Niere (GREEB & SHULL, 1989; MAGOSCI et al., 1992; STAUFFER et al., 1994).

PMCA 1 scheint bei Menschen und Ratten die vorherrschende Isoform im Darm zu sein und wird besonders stark im Duodenum exprimiert. Beim Menschen kommt es darüber hinaus auch im Jejunum und Ileum vor (STOLL et al., 1987; HOWARD et al., 1993; WALTERS et al., 1999). In der Niere des Menschen ist es nicht nachgewiesen. Bei der Ratte ist die PMCA-1-Expression in Duodenum und Ileum in vielen Studien beschrieben (VAN CORVEN et al., 1985; ARMBRECHT et al., 1988; BORKE et al., 1990; WALTERS et al., 1999). Darüber hinaus wurde der Transporter in anderen Studien auch im Colon (TEERAPORNPUKAKIT et al., 2009) und den restlichen Darmabschnitten gefunden (GREEB & SHULL, 1989) sowie in den distalen Tubuluskonvoluten der Niere (VAN HEESWIJK et al., 1984; GREEB & SHULL, 1989; LYTTON et al., 1996). Bei der Maus kommt der Transporter im Duodenum, dem distalen Tubuluskonvolut und dem Verbindungsstück in der Niere vor (LOFFING et al., 2001; VAN CROMPHAUT et al., 2001; OZ et al., 2007). Beim Kaninchen kommt der Transporter ebenfalls im Duodenum, den distalen Tubuluskonvoluten und Sammelrohren sowie den Verbindungsstücken in der Niere vor (HOENDEROP et al., 1999; HOENDEROP et al., 2000b). Ein Vorkommen von PMCA 1 wurde auch im Duodenum beim Rind nachgewiesen (YAMAGISHI et al., 2006) (siehe Tabelle 4).

PMCA 1 kommt zusammen mit anderen Kalzium-Handling-Proteinen in den Kalzium-transportierenden Epithelzellen vor. Das sind im Darm die Enterozyten und in der Niere die Epithelzellen der jeweiligen Tubulusabschnitte. Lokalisiert ist der Transporter jeweils an der basolateralen Zellmembran (STOLL et al., 1987; MAGOSCI et al., 1992; LYTTON et al., 1996; VAN BAAL et al., 1996).

Tabelle 4: Expression der Plasma Membrane Calcium ATPase (PMCA) 1 in Darm und Niere von Säugetieren

DTK = distales Tubuluskonvolut, SaR = Sammelrohr, VS = Verbindungsstück, -- = Vorkommen nicht beschrieben

Spezies	Lokalisation im Darm	Intrazelluläre Lokalisation (Darm)	Lokalisation in der Niere	Intrazelluläre Lokalisation (Niere)
Mensch	Duodenum, Jejunum, Ileum	Basolaterale Zellmembran der Darmepithelzellen	--	Basolaterale Zellmembran der Tubulusepithelzellen
Ratte	Gesamter Darm		DTK	
Maus	Duodenum		DTK, VS	
Kaninchen	Duodenum		DTK, VS, SaR	
Rind	Duodenum		--	

1.2.4. NCX 1

Der Natrium-Kalzium-Austauscher NCX 1 ist ein Elektronentransporter an der basolateralen Zellmembran, der in den meisten eukaryotischen Zellen ein Kalzium-Ion im Austausch gegen drei Natriumionen aus der Zelle heraus transportiert. Der Transporter kann seine Transportrichtung unter bestimmten Umständen auch umdrehen und Kalzium in die Zelle hinein transportieren (WU et al., 2008). In welche Richtung der NCX-medierte Kalzium-Strom stattfindet, hängt maßgeblich von den Natrium- und Kalzium-Konzentrationen im Zytoplasma ab. Generell aktiviert ein hoher Natrium-Gehalt und ein niedriger Kalzium-Gehalt im Zytoplasma den Einstrom von Kalzium in die Zelle (DIPOLO, 1979; DIPOLO & BEAUGE, 1987; KIMURA et al., 1987), während der Kalzium-Ausstrom über NCX durch hohe Kalzium-Gehalte in der Zelle aktiviert und durch hohe Natrium-Gehalte in der Zelle gehemmt wird (BLAUSTEIN & SANTIAGO, 1977; BLAUSTEIN & LEDERER, 1999; UEHARA et al., 2004).

Der Kalzium-Transport durch NCX verbraucht im Gegensatz zum Kalzium-Transport durch PMCA keine Energie in Form von ATP (BLAUSTEIN & HODGKIN, 1969; BLAUSTEIN & SANTIAGO, 1977). Die genauen kinetischen Eigenschaften von PMCA 1 sind noch nicht endgültig geklärt, scheinen aber durch verschiedene Umgebungsfaktoren wie Kalzium- und Natrium-Gehalt des

Zytoplasmas, Vorhandensein von ATP und weiteren Faktoren beeinflusst zu werden. Die Kapazität des Transporters passt sich dem jeweils aktuellen $[Ca^{2+}]_i$ der Zelle an und nimmt mit steigendem $[Ca^{2+}]_i$ zu (BLAUSTEIN & SANTIAGO, 1977). NCX hat im Vergleich zu PMCA eine zehnfach niedrigere Affinität für Kalzium, jedoch eine 10- bis 50-fach höhere Durchflussrate als die ATP-abhängigen Kalzium-Pumpen (CARAFOLI, 1988a; BLAUSTEIN & LEDERER, 1999).

Beim Säugetier sind bisher drei NCX-Isoformen bekannt: NCX 1, 2 und 3, die durch drei verschiedene Gene kodiert werden. Zusätzlich werden viele Gewebespezifische Splicevarianten von NCX 1 und NCX 3 beschrieben, allein 32 Varianten für NCX 1 (SCHULZE et al., 1996). NCX 1 konnte bisher in sehr vielen Geweben nachgewiesen werden, wobei eine besonders starke Expression im Gewebe von Niere, Gehirn und Herz zu finden ist (CHEON & REEVES, 1988; KOFUJI et al., 1992; LEE et al., 1994b).

Beim Menschen wurde NCX in Duodenum und Colon gefunden (STOLL et al., 1987; SAKSENA et al., 2002). Bei Ratten wurde der Transporter in allen Darmabschnitten nachgewiesen (GHIJSEN et al., 1983; VAN CORVEN et al., 1985; LEE et al., 1994b; TEERAPORNPUNTAKIT et al., 2009). In der Niere wurde der Transporter in den distalen Tubuluskonvoluten und Verbindungsstücken von Ratten, Mäusen, Meerschweinchen und Rindern nachgewiesen (SCHONFELD et al., 1984; VAN HEESWIJK et al., 1984; TALOR & ARRUDA, 1986; VAN BAAL et al., 1996; WHITE et al., 1998; SCHMITT et al., 1999; OZ et al., 2007), beim Kaninchen zusätzlich in den Sammelrohren der Niere (HOENDEROP et al., 1999; HOENDEROP et al., 2000b; VAN ABEL et al., 2005) (siehe Tabelle 5).

Im Darm ist der Transporter zusammen mit PMCA 1 an der basolateralen Membran der Enterozyten lokalisiert (STOLL et al., 1987; SAKSENA et al., 2002). Die Lokalisation von NCX 1 in der Niere stimmt mit der von PMCA 1 überein. Beide Transporter sind an der basolateralen Membran der Nierenepithelzellen lokalisiert (GMAJ et al., 1979; SCHONFELD et al., 1984; TALOR & ARRUDA, 1986; BINDELS et al., 1992).

Tabelle 5: Expression des Natrium Calcium Exchanger (NCX) 1 in Darm und Niere von Säugetieren

DTK = distales Tubuluskonvolut, SaR = Sammelrohr, VS = Verbindungsstück, -- = Vorkommen nicht beschrieben

Spezies	Lokalisation im Darm	Intrazelluläre Lokalisation (Darm)	Lokalisation in der Niere	Intrazelluläre Lokalisation (Niere)
Mensch	Duodenum, Colon	Basolaterale Zellmembran der Darmepithelzellen	--	Basolaterale Zellmembran der Tubulusepithelzellen
Ratte	Gesamter Darm		DTK, VS	
Maus, Meerschwein, Rind	--		DTK, VS	
Kaninchen	--		DTK, VS, SaR	

1.2.5. SERCA 3

SERCA sind Kalzium-Pumpen, die den aktiven Transport von Kalzium durch die Membranen intrazellulärer Kalzium-Speicher, wie dem SR oder ER, gewährleisten. Sie tragen somit maßgeblich dazu bei, den $[Ca^{2+}]_i$ nach einer Aktivierung der Zelle wieder auf ein physiologisches Ruhe-Level zu reduzieren (BURK et al., 1989; MACLENNAN et al., 1992).

SERCA gehören in eine Klasse mit PMCA und NCX. Sie sind im ER und SR, analog zu PMCA, in der Membran verankert und weisen mit PMCA und NCX eine starke Strukturähnlichkeit auf. Da der Kalzium-Gehalt im ER oder SR, ähnlich dem im Extrazellularraum, deutlich höher ist als der im Zytoplasma, stellt der Transport von Kalzium in diese Speicherorganellen einen energieverbrauchenden Prozess dar. Pro verbrauchtem ATP-Molekül transportieren SERCA zwei Kalzium-Ionen (INESI et al., 1980). Nachdem Kalzium durch SERCA in das ER oder SR transportiert wurde, wird es an Kalzium-Bindungsproteine gebunden. Die Freisetzung aus diesen Speichern erfolgt über spezielle Kanäle in der Membran, die durch verschiedene Signalmoleküle aktiviert werden können. Der SERCA-medierte Kalzium-Transport ist also ein unidirektionaler Transport vom Zytosol in die intrazellulären Kalzium-Speicher (CAMACHO & LECHLEITER, 1993; PETERSEN et al., 1993; POZZAN et al., 1994; MELDOLESI & POZZAN, 1998; MORGAN &

JACOB, 1998; GREENE et al., 2000; YU & HINKLE, 2000).

Bisher wurden drei verschiedene SERCA-Isoformen beschrieben, SERCA 1 bis SERCA 3. SERCA 1 wird ausschließlich in roter Skelettmuskulatur exprimiert (BRANDL et al., 1986; BRANDL et al., 1987). SERCA 2 kommt in sehr vielen Gewebearten vor (GUNTESKI-HAMBLIN et al., 1988; LYTTON & MACLENNAN, 1988). Die Isoform SERCA 3 ist bisher wenig erforscht. Sie wird jedoch als nicht-Muskel-spezifische Isoform angesehen (BURK et al., 1989; WU & LYTTON, 1993). Eine starke SERCA-3-Expression wird in hämatopoetischen Zellen gefunden (BOBE et al., 1994; WUYTACK et al., 1994), der Transporter kommt jedoch auch in Endothel- und Epithelzellen verschiedener Organe vor (BURK et al., 1989). Für SERCA 3 werden außerdem verschiedene Splicevarianten beschrieben (BOBE et al., 1994; DODE et al., 1996; POCH et al., 1998; MARTIN et al., 2002).

Die Expression von SERCA 3 in Darm und Niere ist bisher wenig erforscht. Der Mensch zeigt eine starke Expression im Colon, eine weniger starke im Dünndarm und eine geringe Expression von SERCA 3 in der Niere (POCH et al., 1998; GELEBART et al., 2002; BROULAND et al., 2005). Bei Mäusen und Ratten kommt der Transporter ebenfalls in Darm und Niere vor (BURK et al., 1989; WU et al., 1995; OZOG et al., 1998; MARTIN et al., 2002) (siehe Tabelle 6).

In welchen Zelltypen SERCA 3 in Darm und Niere vorkommt, ist unklar. Die intrazelluläre Lokalisation scheint jedoch entsprechend der Funktion dieses Kalzium-Transporters auf die Membranen des ER oder SR beschränkt zu sein (POCH et al., 1998).

Tabelle 6: Expression der Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase (SERCA) 3 in Darm und Niere von Säugetieren

ER = endoplasmatisches Retikulum, n. b. = genaue Lokalisation nicht beschrieben

Spezies	Lokalisation im Darm	Intrazelluläre Lokalisation (Darm)	Lokalisation in der Niere	Intrazelluläre Lokalisation (Niere)
Mensch	Dünndarm, Colon	ER	n.b.	ER
Ratte	Gesamter Darm		n. b.	
Maus	n. b.		n. b.	

1.3. Regulation der Kalzium-Homöostase

Vitamin D₃ [1,25-(OH)₂D₃], die biologisch aktive Form von Vitamin D, hat verschiedene endokrine Wirkungen auf den gesamten Organismus. Seine Hauptaufgabe liegt jedoch in der Aufrechterhaltung der Kalzium-Homöostase. Wichtige Angriffspunkte für 1,25-(OH)₂D₃ stellen somit die Orte der Kalzium-Aufnahme und -Ausscheidung, Darm und Niere, dar (NICOLAYSEN & EEG-LARSEN, 1953; YAMAMOTO et al., 1984).

Im Dünndarm bewirkt 1,25-(OH)₂D₃ die aktive Aufnahme von Kalzium aus der Nahrung über Kalzium-Kanäle in den Epithelzellen der Darmmukosa (FREUND & BRONNER, 1975; BOUILLON et al., 2003) und von dort ins Blutgefäßsystem (DANISI et al., 1980). Den limitierenden Schritt der intestinalen Kalzium-Aufnahme stellt dabei die Kapazität der epithelialen Kalzium-Kanäle TRPV 6 dar, die an der luminalen Seite der Enterozyten für den ersten Schritt der Kalzium-Aufnahme sorgen (MULLER et al., 2000; HOENDEROP et al., 2002b; MEYER et al., 2006).

In der Niere fördert 1,25-(OH)₂D₃ die Reabsorption von Kalzium. Das distale Nephron hat die meisten Rezeptoren für 1,25-(OH)₂D₃ und vermittelt über den epithelialen Kalzium-Kanal TRPV 5 den Großteil der Kalzium-Aufnahme (FRIEDMAN & GESEK, 1993, 1995).

Um den Kalzium-Gehalt im Körper ständig in engen Grenzen zu halten, muss 1,25-(OH)₂D₃ an verschiedenen Stellen Einfluss auf den Kalzium-Stoffwechsel nehmen. Alle oben beschriebenen Kalzium-Transportproteine nehmen an der Aufrechterhaltung der Kalzium-Homöostase teil und können in ihrer Expression und Aktivität durch 1,25-(OH)₂D₃ reguliert werden (BRONNER & FREUND, 1975; FREUND & BRONNER, 1975; GILL & CHRISTAKOS, 1993; LI et al., 1998; WOOD et al., 2001; HOENDEROP et al., 2002a; OKANO et al., 2004; VAN DE GRAAF et al., 2004).

Die meisten Effekte von 1,25-(OH)₂D₃ werden durch den VDR vermittelt (HAUSSLER et al., 1988; PIKE, 1991; WALTERS, 1992). Dieser intrazelluläre Steroid-Rezeptor (EVANS, 1988) agiert als Liganden-induzierter Transkriptionsfaktor, indem er direkt an spezielle Bindungsstellen der Desoxyribonukleinsäure (DNA) bindet, sogenannte Vitamin-D-responsive-Elemente (VDREs) (ALROY et al., 1995; KATO, 2000). Nachdem 1,25-(OH)₂D₃

durch die Zellmembran diffundiert ist, bindet es an den VDR. Dadurch kommt es am Rezeptor zu einer Konformationsänderung und dieser bildet durch Zusammenlagerung mit dem Retinoid-X-Rezeptor ein Heterodimer. Die DNA-Bindungsdomäne dieses Heterodimers bindet nun an die DNA der Zielgene. Die Bindung des VDR an seine Zielgene kann zu einer vermehrten oder verminderten Gentranskription führen (PIKE, 1982, 1991; DUSSO et al., 2005).

Zu den Zielgenen von $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ in Darm und Niere gehören die oben beschriebenen Proteine des Kalzium-Handlings. Somit kann der VDR die Kalzium-Aufnahme über Darm und Niere fördern, indem er die Proteinbiosynthese der dafür benötigten Transportmechanismen induziert (HOENDEROP et al., 2001a; HOENDEROP et al., 2002a; SONG et al., 2003; VAN ABEL et al., 2003).

Die Expression des VDR ist nicht limitiert auf die in den Kalzium-Metabolismus involvierten Organe wie Knochen, Niere, Darm und Nebenschilddrüse. Eine Expression konnte in über 30 verschiedenen Geweben nachgewiesen werden (STUMPF et al., 1979; HAUSSLER et al., 1998). Beim Menschen ist das Vorkommen des VDR im Duodenum aus vielen Studien bekannt (WECKSLER et al., 1979b; LEE et al., 2003; WALTERS et al., 2007; TEERAPORNPUNTAKIT et al., 2009). In der menschlichen Niere kommt der Rezeptor im proximalen und distalen Tubuluskonvolut, den Sammelrohren und den Parietalzellen des Glomerulums vor (KUMAR et al., 1994). Bei Ratten kommt der VDR in den Epithelzellen des gesamten Darms (KREAM et al., 1977; STUMPF et al., 1979; WECKSLER et al., 1979a; CHAN et al., 1984) und im gesamten Tubulusapparat der Niere vor (STUMPF et al., 1980; KAWASHIMA & KUOKAWA, 1982; IIDA et al., 1993; LIU et al., 1994; LIU et al., 1996). Bei Mäusen ist das Duodenum der Darmabschnitt mit der größten VDR-Dichte (HIRST & FELDMAN, 1982; SEINO et al., 1982; SONG & FLEET, 2004), aber auch im Colon von Mäusen wurde der Rezeptor nachgewiesen (TEERAPORNPUNTAKIT et al., 2009). In Mäusenieren kommt der Rezeptor in allen Teilen der Nierentubuli vor, inklusive dem Glomerulum, dem dicken aufsteigendem Teil der Henleschen Schleife, dem proximalen und distalen Tubuluskonvolut, den Verbindungsstücken und dem proximalen Teil der Sammelrohre (LIU et al., 1996). Bei Schweinen konnte der VDR ebenfalls im Tubulussystem der Niere nachgewiesen werden (CHANDLER et al., 1984; LIU et

al., 1994). Bei Rindern und Ziegen wurde der VDR im Duodenum nachgewiesen (YAMAGISHI et al., 2006; SIDLER-LAUFF et al., 2010). Der Rezeptor wird besonders stark im Nucleus von Zellen exprimiert, kommt aber auch im Zytoplasma vor (STUMPF et al., 1979; WECKSLER et al., 1979b; PIKE, 1982; PIKE & HAUSSLER, 1983; NORMAN, 2006) (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Expression des Vitamin-D-Rezeptors (VDR) in Darm und Niere von Säugetieren

PTK = proximales Tubuluskonvolut, DTK = distales Tubuluskonvolut, SaR = Sammelrohr, VS = Verbindungsstück, -- = Vorkommen nicht beschrieben

Spezies	Lokalisation im Darm	Intrazelluläre Lokalisation (Darm)	Lokalisation in der Niere	Intrazelluläre Lokalisation (Niere)
Mensch	Duodenum	Nucleus, Zytoplasma	PTK, DTK, SaR, Glomerulum	Nucleus, Zytoplasma
Ratte	Gesamter Darm		Gesamtes Tubulussystem	
Maus	Duodenum, Colon	Nucleus, Zytoplasma	PTK, DTK, VS, SaR, Henlesche Schleife, Glomerulum	Nucleus, Zytoplasma
Schwein	--		DTK, VS, SaR	
Rind, Ziege	Duodenum		--	

2. Kalzium-Handling im Pankreas

Auch in nicht-epithelialen Zellen wie Muskelzellen, Neuronen oder sekretorischen Zellen spielt Kalzium als Signalmolekül für verschiedene Zellfunktionen eine Rolle. In den letzten Jahren wurde der Einfluss von Kalzium auf die Ausschüttung von Insulin aus den β -Zellen des Pankreas und auf die Entstehung von Diabetes mellitus in mehreren Studien untersucht (ROE et al., 1993; LEVY et al., 1994; LEVY et al., 1998; PARKASH et al., 2002).

2.1. Kalzium-Transportproteine im Pankreas

Die Glukose-Homöostase ist Voraussetzung für einen geregelten Energiehaushalt. Sie wird ermöglicht durch eine fein abgestimmte Insulinsekretion aus den β -Zellen des Pankreas. Unter physiologischen Bedingungen führt die postprandiale

Hyperglykämie zu einem Anstieg des ATP-Gehalts in der β -Zelle, der zu einem Schluss der ATP-abhängigen Kaliumkanäle führt. Daraufhin kommt es zur Depolarisation der Plasmamembran mit nachfolgendem Einstrom von extrazellulärem Kalzium und einem Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ (ROE et al., 1993). Der erhöhte Kalzium-Gehalt initiiert in den β -Zellen zwei wichtige Effekte. Zum einen bewirkt er die Freisetzung von Insulin, zum anderen werden verschiedene Mechanismen aktiv, um den erhöhten $[Ca^{2+}]_i$ wieder auf physiologische Level zu reduzieren (BERGGREN & LARSSON, 1994; KINDMARK et al., 1994; HENQUIN, 2000; LEMMENS et al., 2001).

Die Insulinsekretion wird durch Kalzium-medierte Exozytose der Insulinvesikel bewirkt (ASHCROFT & RORSMAN, 1989; EASOM, 1999). Das freigesetzte Insulin gelangt über die Blutzirkulation in die Peripherie. Dort bindet es an Insulinrezeptoren und bewirkt die Glukose-Aufnahme in die Zellen (CHEATHAM & KAHN, 1995). Unmittelbar nach dem Einstrom von Kalzium in die β -Zelle wird der Großteil des Kalziums wieder aus dem Zytoplasma entfernt. Dies wird über Beteiligung verschiedener Kalzium-Transportproteine und -Kanäle ermöglicht. Veränderungen im Kalzium-Handling der β -Zellen führen zu einer gestörten Insulinsekretion (OKAMOTO et al., 1992; CHEN et al., 2003).

2.1.1. TRPV 5 und TRPV 6

Die Expression und Funktion der Transporter TRPV 5 und TRPV 6 im Pankreas sind bisher kaum erforscht. Das Vorkommen von TRPV 5 ist in humanem Pankreas beschrieben, aber nicht seine genaue Lokalisation (MULLER et al., 2000; HOENDEROP et al., 2001b). Bei der Ratte konnte TRPV 5 ausschließlich im Zytoplasma von β -Zellen nachgewiesen werden (JANSSEN et al., 2002). TRPV 6 wurde bisher in humanem und murinem Pankreas gefunden, aber ebenfalls nicht genauer lokalisiert (PENG et al., 2000; BARLEY et al., 2001; ZHUANG et al., 2002; HIRNET et al., 2003; NIJENHUIS et al., 2003) (siehe Tabelle 8).

Die Funktion dieser beiden Kalzium-Transporter im Pankreas ist bisher nicht geklärt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass sie zum Anstieg des Kalzium-Gehalts in der Zelle bei Zellstimulation beitragen, indem Kalzium durch die Transporter aus dem Extrazellularraum oder aus sekretorischen Granula in das Zytoplasma transportiert wird, wodurch die Insulinsekretion aus den β -Zellen

induziert werden kann (JANSSEN et al., 2002; PENG et al., 2003b).

2.1.2. Calbindin-D28k

Calbindin-D28k wird in den Inselzellen des Pankreas exprimiert (siehe Tabelle 8). Bei Menschen und Ratten kommt der Transporter sowohl in Alpha-Zellen (α -Zellen) als auch in β -Zellen vor (JOHNSON et al., 1994; BOURLON et al., 1996; JANSSEN et al., 2002). Bei Mäusen wurde Calbindin-D28k im Pankreas bisher nur in β -Zellen nachgewiesen (SOOY et al., 1999; PARKASH et al., 2002).

Studien an Calbindin-D28k-knockout-Mäusen zeigen, dass Calbindin in den β -Zellen die Kalzium-abhängige Insulinsekretion beeinflusst, indem es den Kalziumgehalt im Zytoplasma reguliert (SOOY et al., 1999; PARKASH et al., 2002). Calbindin-D28k scheint aber nicht nur die Insulinsekretion zu beeinflussen, sondern induziert auch die Synthese von Insulin (REDDY et al., 1997).

2.1.3. PMCA 1

PMCA 1 kommt bei Menschen und Ratten in den Inselzellen des Pankreas vor. Bei der Ratte wurde der Transporter auch in den Azinuszellen gefunden (MUALLEM et al., 1988; VARADI et al., 1996b; KAMAGATE et al., 2000) (siehe Tabelle 8).

Die Kalzium-Pumpen der Plasmamembran spielen eine wichtige Rolle bei der Entfernung von Kalzium aus den β -Zellen des Pankreas. Sie können durch Glukose und durch Änderungen des Zellmembranpotentials aktiviert werden. Eine Überexpression dieses Transporters führt zu einem verminderten Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ bei Zellstimulation (PLASMAN & HERCHUELZ, 1992; KAMAGATE et al., 2002).

2.1.4. NCX 1

Das Vorkommen von NCX 1 im Pankreas wurde bisher hauptsächlich an Labortieren untersucht (siehe Tabelle 8). Der Transporter kommt bei Ratten, Mäusen, Meerschweinchen und Hamstern in den Inselzellen, einschließlich den β -Zellen, vor (PLASMAN et al., 1990; GARCIA-BARRADO et al., 1996; GALL et al., 1999; VAN EYLEN et al., 2001; HERCHUELZ et al., 2002). Bei der Ratte wurde er außerdem in den Azinuszellen beschrieben (BAYERDORFFER et al., 1985; MUALLEM et al., 1988).

Der Austausch von Natrium gegen Kalzium spielt in den β -Zellen eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung des intrazellulären Kalzium-Spiegels und somit für die Steuerung der Kalzium-regulierten Insulinsekretion (PLASMAN et al., 1990; YOSHIHASHI et al., 1996). In Studien an β -Zellen der Ratte konnte gezeigt werden, dass NCX 1 für bis zu 70 % des Kalzium-Ausstroms aus diesen Zellen verantwortlich ist und dass das Fehlen dieses Transporters über einen erhöhten intrazellulären Kalzium-Gehalt zu einer vermehrten Insulinausschüttung führen kann (VAN EYLEN et al., 1998; VAN EYLEN et al., 2001; XIMENES et al., 2003).

2.1.5. SERCA 3

Das ER und die hier lokalisierten Kalzium-ATPasen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle für die Regulation des $[Ca^{2+}]_i$ und die Insulinsekretion der β -Zellen (WOLF et al., 1988). Der Kalzium-Transporter SERCA 3 kommt in den β -Zellen von Menschen, Ratten und Mäusen vor, bei der Maus wurde er darüber hinaus in den Azinuszellen gefunden (BURK et al., 1989; ROE et al., 1994; WORLEY et al., 1994; VARADI et al., 1996b; MOGAMI et al., 1998; POCH et al., 1998; MARTIN et al., 2002) (siehe Tabelle 8).

SERCA 3 beeinflusst die Kalzium-Konzentration im Zytoplasma von aktivierten β -Zellen und den Kalzium-Gehalt im ER, indem es in Phasen von steigendem $[Ca^{2+}]_i$ Kalzium aus dem Zytoplasma heraus in das ER pumpt und diese Speicher damit für nachfolgende oszillatorische Kalzium-Ströme auffüllt (BEAUVOIS et al., 2006). Der Transporter hat eine niedrige Affinität für Kalzium und wird durch einen hohen $[Ca^{2+}]_i$ aktiviert (ARREDOUANI et al., 2002). Die Funktion dieser Transporter in den β -Zellen ist sehr komplex. Ohne die Aktivität von SERCA 3 kann es in β -Zellen zu einem erhöhten $[Ca^{2+}]_i$ und einer gesteigerter Insulinsekretion kommen (XU et al., 1999). Andererseits kann eine verminderte Genexpression von SERCA 3 in den β -Zellen von Ratten und Mäusen mit einem vermehrten Risiko für die Entstehung von Diabetes mellitus assoziiert sein. Bestimmte Mutationen im SERCA-3-Gen sind bei Menschen mit dem Auftreten von Typ II Diabetes mellitus assoziiert (ROE et al., 1994; VARADI et al., 1996a; VARADI et al., 1999).

2.2. Kalzium-Ausstrom aus den β -Zellen

Der Kalzium-Ausstrom aus den β -Zellen des Pankreas wird durch die beiden

basolateral lokalisierten Transporter NCX und PMCA bewirkt. Der Natrium-Kalzium-Austauscher hat eine niedrige Affinität aber eine hohe Kapazität für Kalzium, während die Kalzium-ATPase eine hohe Kalzium-Affinität bei geringer Kapazität zeigt. Die Regulation dieser beiden Kalzium-Pumpen wird u. a. über den Glukose-Gehalt der Zelle gesteuert. Bei steigendem Glukose-Gehalt in der Zelle wird die Transkription, Expression und Aktivität von PMCA gehemmt und die Aktivität von NCX gefördert (XIMENES et al., 2002). Während der Stimulation durch Glukose muss die β -Zelle mit einem enormen Kalzium-Einstrom zurecht kommen und schaltet um von einer wenig effizienten Kalzium-Pumpe (PMCA) zu einem System mit hoher Kapazität (NCX). Auf diesem Wege kann der Kalzium-Gehalt im Zytoplasma wieder auf physiologische Level reduziert werden, bevor es zu einer Zellschädigung durch den hohen Kalzium-Gehalt kommen kann (XIMENES et al., 2003; HERCHUELZ et al., 2007).

2.3. Regulation durch Vitamin D im Pankreas

Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit dem Einfluss von $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ auf die verschiedenen Funktionen des Pankreas. Da die meisten Effekte von $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ durch den VDR vermittelt werden, kann man daraus schließen, dass der VDR im Pankreas bei Säugetieren vorkommen muss (HAUSSLER et al., 1988; PIKE, 1991; WALTERS, 1992). Es gibt jedoch nur wenige Studien, die das Vorkommen des Rezeptors im Pankreas direkt untersucht haben. Bei Menschen, Ratten und Mäusen wurde der VDR in den β -Zellen des Pankreas nachgewiesen, bei Menschen und Ratten außerdem in den Azinuszellen (JOHNSON et al., 1994; LEE et al., 1994a; BOURLON et al., 1996; ZEITZ et al., 2003) (siehe Tabelle 8).

Der VDR spielt eine wichtige Rolle für die Funktion der β -Zellen, da er die Bindung und Wirkung von $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ auf die Zelle vermittelt, und $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ einen großen Einfluss auf die normale Insulinsekretion ausübt (NORMAN et al., 1980; CLARK et al., 1981; BOURLON et al., 1997). Die Bedeutung des VDR auf die Insulinsekretion konnte an Mäusen mit defektem VDR verdeutlicht werden, da diese Tiere eine gestörte Glukosetoleranz und eine verminderte maximale Insulin-Sekretionskapazität zeigen (ZEITZ et al., 2003). Bestimmte Mutationen im VDR-Gen können beim Menschen zu einer gestörten Insulinsekretion führen (HITMAN et al., 1998; OGUNKOLADE et al., 2002).

Tabelle 8: In der Literatur beschriebene Kalzium-Transportproteine im Pankreas bei Säugetieren

TRPV = Transient Receptor Potential Vanilloid, SERCA = Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase, NCX = Natrium Calcium Exchanger, PMCA = Plasma Membrane Calcium ATPase, VDR = Vitamin-D-Rezeptor, α -Zellen = Alpha-Zellen, β -Zellen = Beta-Zellen, n. b. = genaue Lokalisation nicht beschrieben

Protein	Tierart	Lokalisation im Pankreas
TRPV 5	Mensch Ratte	n. b. β -Zellen
TRPV 6	Mensch, Maus	n. b.
Calbindin-D28k	Mensch, Ratte Maus	α - und β -Zellen β -Zellen
PMCA 1	Mensch Ratte	α - und β -Zellen α - und β -Zellen, Azinuszellen
NCX 1	Ratte Maus Meerschwein, Hamster	Inselzellen, β -Zellen, Azinuszellen Inselzellen, β -Zellen Inselzellen, β -Zellen
SERCA 3	Mensch, Ratte Maus	β -Zellen β -Zellen, Azinuszellen
VDR	Mensch Ratte, Maus	Inselzellen, Azinuszellen β -Zellen

3. Rolle von Vitamin D bei Diabetes

1,25-(OH)₂D₃ und der VDR haben einen großen Einfluss auf den Glukose-Metabolismus und auf die für die Insulinsekretion nötige Erhöhung des Kalzium-Stroms in den β -Zellen. Vitamin-D-defiziente Ratten zeigen eine signifikant reduzierte Insulinsekretion, die durch die Gabe von 1,25-(OH)₂D₃ wieder normalisiert wird (CLARK et al., 1980; NORMAN et al., 1980; CHERTOW et al., 1983). In gesunden Ratten kann 1,25-(OH)₂D₃ ebenfalls zu einer erhöhten Insulinsekretion führen (ISHIDA et al., 1983). Auch bei Menschen mit Vitamin-D-Mangel führt die Gabe von 1,25-(OH)₂D₃ zu einer erhöhten Insulinsekretion und verbesserter Insulinsensitivität (GEDIK & AKALIN, 1986; RUDNICKI & MOLSTED-PEDERSEN, 1997).

Der Insulinmetabolismus in den β -Zellen wird auf mehreren Wegen durch 1,25-(OH)₂D₃ beeinflusst. Zum einen induziert 1,25-(OH)₂D₃ nachweislich die

Insulinbiosynthese (OZONO et al., 1990; BOURLON et al., 1999a). Andererseits bewirkt $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ eine Erhöhung des für die Insulinsekretion essentiellen Kalzium-Gehalts in den β -Zellen, indem vermehrt Kalzium von extrazellulär und aus intrazellulären Kalzium-Speichern in das Zytoplasma befördert wird (BILLAUDEL et al., 1993; BILLAUDEL et al., 1995).

Die Aktivität der verschiedenen Kalzium-Transportproteine in den β -Zellen ist Voraussetzung für die normale Insulinsekretion. Veränderungen oder Defekte dieser Proteine können zu Störungen im Insulinmetabolismus und zu einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Diabetes mellitus führen (LEVY et al., 1994; ROE et al., 1994; BOURLON et al., 1996; LEVY et al., 1998; BOURLON et al., 1999b; SOOY et al., 1999; ARREDOUANI et al., 2002; PARKASH et al., 2002).

III. PUBLIKATION

Expression and Immunolocalization of Calcium Transport Proteins in the Canine Duodenum, Kidney and Pancreas

Claudia Palm

Katrin Hartmann, Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet., habil., Dipl. ECVIM-CA

Karin Weber, Dr. med. vet.

Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Germany

Veröffentlicht in The Anatomical Record

Anat Rec (Hoboken). 2010 May; 293(5):770-4

Expression and Immunolocalization of Calcium Transport Proteins in the Canine Duodenum, Kidney, and Pancreas

CLAUDIA PALM, KATRIN HARTMANN, AND KARIN WEBER*

Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Muenchen, Germany

ABSTRACT

The aim of the study was to elucidate expression and localization of several calcium handling proteins and the regulating vitamin D receptor (VDR) in the dog using RT-PCR and immunohistochemistry. The results of RNA expression and antibody staining were compared to ensure specificity. We found several antibodies to be useful for further studies on calcium homeostasis. *Anat Rec*, 293:770–774, 2010. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

Keywords: dog; beta cells; calcium homeostasis; immunohistochemistry; kidney; duodenum

The regulation of intracellular calcium levels depends on uptake, intracellular buffering, and clearance of Ca^{2+} . Important calcium handling proteins in epithelial cells are the calcium-binding protein calbindin D-28k, the plasma membrane calcium ATPase (PMCA1), the sodium calcium exchanger (NCX1), and the epithelial Ca^{2+} channels TRPV5 and TRPV6. TRPV5 is predominantly expressed in the distal convoluted tubules (DCT) of the kidneys, whereas TRPV6 is expressed in the duodenum; they both mediate the calcium uptake at the apical surface of epithelial cells (Hoenderop et al., 2001). Calbindin is an intracellular protein that binds calcium ions and moves them from the apical to the basolateral membrane, where PMCA1 and NCX1 are located to extrude them into the extracellular space (Lambers et al., 2006; Schlatter, 2006). Also involved in calcium handling is the sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA), which moves free cytosolic Ca^{2+} back into the endoplasmic and sarcoplasmic reticulum. There is evidence for control of these transport systems by calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), the activated form of vitamin D (Okano et al., 2004). The widespread endocrine, autocrine, and paracrine responses to calcitriol are mediated via the vitamin D receptor (VDR). Recently, calcium transport proteins which were first detected in epithelial cells of the intestinal tract and the kidneys have been found to play a role in the insulin secretion mechanisms of pancreatic β -cells (Chen et al., 2003). Defects of calcium handling in pancreatic β -cells are known to contribute to insulin secretion deficits, which can lead to diabetes mellitus (Marie et al., 2001). Dogs are often affected by dia-

betes and are considered to represent a non-rodent model for latent autoimmune diabetes of the adult in man (Catchpole et al., 2005). This study addresses the presence of calcium handling proteins and their mRNA in canine kidney, duodenum, and pancreatic islets, because nothing is known about the relevance and distribution of these targets in the dog. Kidneys and duodenum were chosen as positive control tissues, since expression of the proteins examined in this study has been proven in these tissues in other species. None of the available antibodies had been previously tested on canine tissue; therefore RNA expression was assessed as a control for the immunohistochemical data to detect possible false positive or false negative staining.

Samples of canine pancreas (left lobe), kidneys (section containing renal cortex and medulla), and duodenum (close to the stomach) were obtained from four Beagle dogs from a control group of a toxicological research experiment (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH, Biberach, Germany), which was approved and conducted

Grant sponsor: DFG; Grant number: GRK1029.

*Correspondence to: Karin Weber, Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Veterinärstrasse 13, 80539 Muenchen, Germany. Fax: +49-89-21806240. E-mail: karin.weber@lmu.de

Received 4 September 2009; Accepted 2 December 2009

DOI 10.1002/ar.21104

Published online 23 February 2010 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

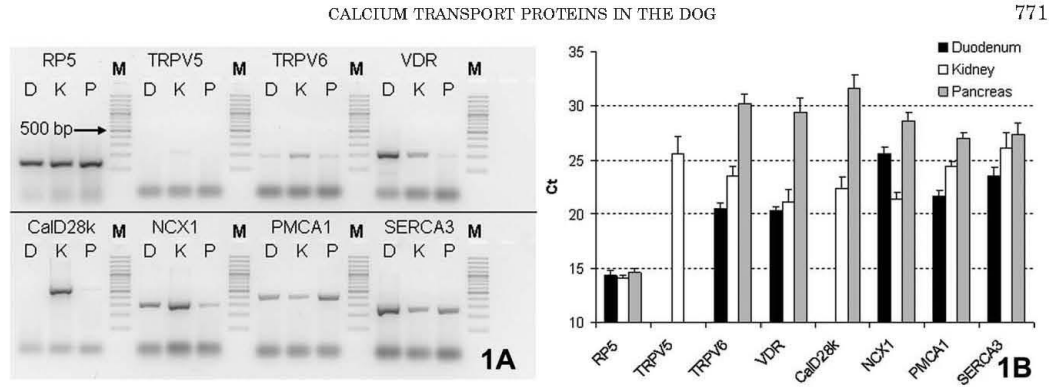


Fig. 1. Qualitative (**1A**) and quantitative (**1B**) mRNA expression of calcium handling proteins in canine duodenum (D), kidneys (K), and pancreas (P). Quantitative analysis was done on $n = 4$ independent samples. The loading control RP5 shows that comparable amounts of mRNA were used for all tissues. Ct = cycle threshold.

according to the German animal welfare law. All samples were taken immediately after euthanasia and kept in RNAlater solution (Qiagen, Hilden, Germany) for RNA extraction or fixed in 4% paraformaldehyde solution (PFA) and embedded in paraffin.

Total RNA was extracted from kidneys, duodenum, and pancreas from the four dogs using the RNeasy Midi Kit (Qiagen). Four microgram of total RNA were reverse transcribed using the QuantiTect reverse transcription kit (Qiagen). For the qualitative PCR, cDNA from one dog was amplified by PCR for all targets using the Hot-StarTaq Master Mix (Qiagen). For the quantitative PCR, all targets were amplified in parallel from a single reverse transcription reaction. The cDNA template was mixed with SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) and the appropriate primer pair. Samples were run in duplicates in a 96-well plate using a 7300HT Real Time PCR system (Applied Biosystems). No template controls (NTCs) were included, and a melting curve analysis was run to make sure that only a single PCR product was amplified and no primer dimer were present. Specificity of the primer pairs was assessed by sequencing the PCR products (Seqlab, Göttingen, Germany). Ribosomal protein S5 (RP5) was used as a reference gene and loading control. For all measurements, mean values, and standard deviations (SD) for the threshold cycle (Ct) were calculated using the four independent samples of each organ.

Immunohistochemistry was done on deparaffinized sections which were autoclaved in 0.01 M citrate buffer pH 6.0 for 20 min for antigen retrieval and incubated with the primary antibody overnight at 4°C. The primary antibodies used were targeted against calbindin D-28k (Mouse monoclonal to Calbindin-Neuronal Marker, clone 300, 1:100, abcam, Cambridge, UK), VDR (Rat monoclonal to VDR Ab-1, clone 9A7γ.E10.E4, 1:100, Dianova, Hamburg, Germany), SERCA3 (Mouse monoclonal to SERCA3 ATPase, 1:500, abcam), PMCA1-ATPase (Mouse polyclonal to Calcium Pump PMCA1 ATPase, 1:200, abcam), NCX1 (Mouse monoclonal to NCX1, clone 6H2, 1:200, abcam), TRPV 5 (Sheep polyclonal to TRPV 5, 1:1000, abcam), and TRPV 6 (Rabbit polyclonal to

TRPV 6, 1:1000, abcam) and against Insulin (Guinea pig anti Insulin, 1:100, DAKO, Hamburg, Germany).

The next day, sections were incubated with the appropriate biotinylated secondary antibody 1:200 (anti-mouse/anti-rat/anti-sheep/anti-rabbit IgG, Rockland, Gilbertsville, PA) or HRP-conjugated anti-guinea pig IgG (DAKO) for 30 min at room temperature. The sections were washed again and incubated with a peroxidase-conjugated streptavidin-biotin complex (Vectastain Elite ABC Standard Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Vector VIP (Vector Laboratories) was used as substrate, and nuclei were counterstained with methyl green. For the VDR, signal amplification was required using biotinyl tyramide (1:50) for 30 min at room temperature (Renaissance indirect tyramide reagent, Perkin Elmer, Waltham, MA). For the calbindin D-28k/insulin double staining Vector VIP was used as a substrate for the insulin antibody, and DAB (Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany) was used for the calbindin antibody. Images were made using a Zeiss Axioskop with a digital camera (Zeiss Axio Vision, Munich, Germany).

For each antibody, immunohistochemistry was performed in sections from duodenum, kidneys, and pancreas. As negative controls, sections from all tissues were stained using the same staining protocols with omission of the first antibodies.

RESULTS AND DISCUSSION

Since tissue samples can yield highly variable results for mRNA expression due to variability in tissue composition, mRNA loss during handling, or inadequate cDNA yield after reverse transcription, the expression of the ribosomal protein S5 (RP5) was used as a loading control. Qualitative PCR shows that RP5 is expressed abundantly in all three organs. Duodenum, kidney, and pancreas express TRPV6, VDR, NCX1, PMCA1, and SERCA3, while TRPV5 is only expressed in the kidney and calbindin D28k is not expressed in the duodenum (Fig. 1A). Quantitative PCR confirms the results of the qualitative PCR and shows the different expression levels of the targets and comparable amounts of the RP5

772

PALM ET AL.

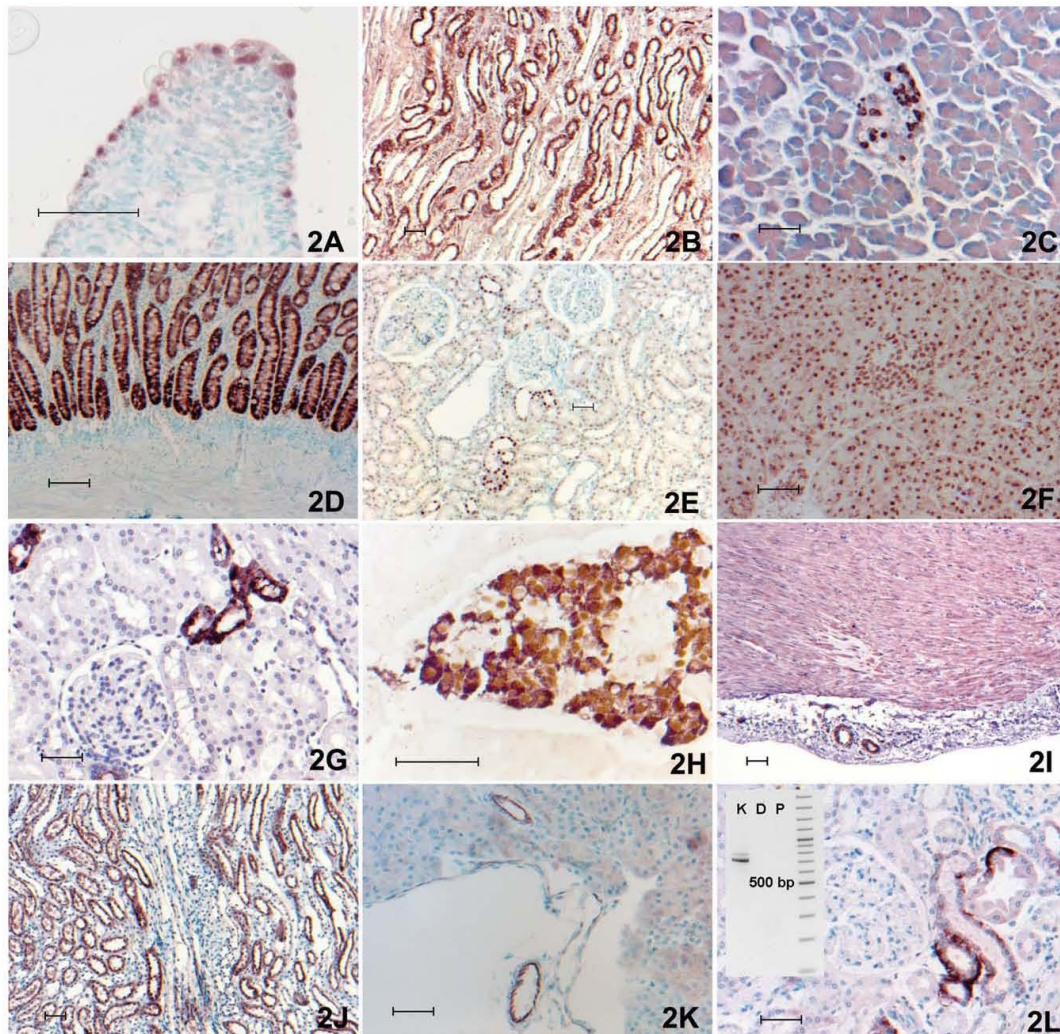


Fig. 2. Immunohistochemical staining of Ca^{2+} -regulating proteins in the canine duodenum, kidneys, and pancreas: TRPV6 staining in apical epithelial cells of the duodenum (2A), epithelial cells of the kidney collecting ducts (2B), and cells of the pancreatic islets (2C). Nuclear VDR staining in duodenal crypt cells (2D), in renal tubular cells (2E), and endocrine and exocrine pancreas (2F). CalD28k staining in the kidney cortex (2G) and in pancreatic β -cells (2H). The pancreatic islet

is double-stained with insulin (blue) and CalD28k (brown). SERCA3 staining in the muscular layer of the duodenum (2I), kidney collecting ducts (2J), and blood vessel endothelia of the pancreas (2K). NCX1 staining in distal convoluted tubules of the kidney (2L) and expression of NCX splice variants in the kidney [2L inset; kidneys (K), duodenum (D), pancreas (P)]. All scale bars 50 μm .

loading control. Low Ct values equal high expression (Fig. 1B).

The two highly homologous and very selective Ca^{2+} channels TRPV5 and TRPV6 provide an apical transport of Ca^{2+} ions into epithelial cells of the kidneys and the duodenum. Using polyclonal antibodies against TRPV5 and TRPV6 in the dog, the results were remarkably similar for both antibodies in duodenum, kidneys, and pancreas. In the duodenum, apical enterocytes showed

strong immunohistochemical staining for TRPV6 (Fig. 2A), which resembles findings in other species. Apical enterocytes have been found to express TRPV6 in human and mouse tissue (Peng et al., 1999). Since there is no mRNA expression of TRPV5 in the duodenum, the immunohistochemical staining of enterocytes using this antibody is most probably an artefact. In the canine kidneys, the TRPV6 transporter showed a widespread expression in the cytoplasm of epithelial cells from the

distal convoluted tubule to the collecting duct (Fig. 2B). For TRPV5 background staining was very high with some tubuli showing stronger immunoreactivity. Comparable results were found in murine kidneys with widespread expression of TRPV6 in the kidneys from the distal convoluted tubule to the collecting duct, whereas TRPV5 was only found in the distal convoluted tubule and connecting tubule (Nijenhuis et al., 2003).

In the murine pancreas, immunohistochemical TRPV6 staining has been demonstrated in the exocrine tissue, but not in pancreatic islets (Zhuang et al., 2002). In contrast, a strong cytoplasmic TRPV6 staining in the canine pancreatic islets, but only faint staining of exocrine tissue was found in this study (Fig. 2C). Colocalization of TRPV5 with insulin as seen in the rat could not be confirmed for the dog, where pancreatic tissue is devoid of TRPV5 mRNA expression. The results for both antibodies are ambiguous; TRPV5 antibody most certainly is not specific in canine tissue, but TRPV6 antibody might also bind to another closely related epitope and exhibit unspecific staining. It is therefore uncertain whether the TRPV6 antibody is useful for the detection of this protein in canine tissue.

High expression of the VDR (both mRNA and protein) can be found in duodenum and kidneys. The VDR is necessary in these organs to regulate systemic calcium levels, and several calcium-handling proteins are regulated via vitamin D. The distribution of VDR-positive cells in duodenal crypts (Fig. 2D) and kidney epithelial cells of the DCT (Fig. 2E) in the dog is similar to findings in many other species in which the same antibody has been used successfully (Clemens et al., 1988; Kumar et al., 1994). In the pancreas, signal amplification with biotinyl tyramide was necessary to show immunoreactivity for the VDR. The receptor was expressed in the nuclei of the exocrine and endocrine cells of the pancreas (Fig. 2F). Other species, like the zebrafish, express VDR in pancreatic acinar cells (Craig et al., 2008), but it has also been found in β -cells of rats and humans (Johnson et al., 1994; Bourlon et al., 1996). In β -cells, calcitriol appears to enhance insulin secretion by activating calcium influx (Billaudel et al., 1993), an effect mediated through the VDR.

Calbindin D-28k has been extensively studied in several species as a neuronal marker and as a calcium binding protein in the kidneys (Biner et al., 2002).

In the dog, the results of the immunohistochemical staining of calbindin D-28k are in agreement with the expression data. In the kidneys, specific staining could be seen in the DCT and cortical collecting ducts, whereas the glomerula remained unstained (Fig. 2G). This finding is comparable to the expression seen in other species (Hoenderop et al., 1999).

In the pancreas, calbindin D-28k could be detected in the cytoplasm and nuclei of the majority of cells in the pancreatic islets. A double staining with insulin showed that calbindin-positive cells are also insulin-positive, characterizing these cells as β -cells (Fig. 2H). These results match the findings in human and rat pancreas (Johnson et al., 1994). In the rat, calbindin D-28k has been shown to influence insulin secretion through the modulation of intracellular Ca^{2+} concentration (Parkash et al., 2002). Ca^{2+} handling in the canine β -cells may follow a similar pathway.

In the duodenum, no immunoreactivity against calbindin D-28k was detected in the dog. It is known from

other species that the closely related protein calbindin D-9k instead of calbindin D-28k is responsible for intestinal intracellular calcium binding, and that calbindin D-28k is not expressed in the duodenum (Opperman et al., 1990).

SERCA3 immunoreactivity in sections of the duodenum was found in smooth muscle cells of the intestinal walls and the blood vessels (Fig. 2I). Strong immunoreactivity was also found in the epithelial cells of collecting ducts in the kidneys (Fig. 2J). In the pancreas, only blood vessel endothelia were stained (Fig. 2K). SERCA3 has been described as the sarco(endo)plasmic Ca^{2+} -ATPase of non-muscle tissue because it has been detected in vascular endothelial cells, tracheal epithelial cells, pancreatic β -cells, and many other tissues. The closely related proteins SERCA1 and SERCA2 are predominantly found in skeletal and cardiac muscle cells (Wuytack et al., 1992). Several splice variants have been detected for SERCA3, which are expressed in different tissues and vary between humans and rodents (Martin et al., 2002). In our study, a strong expression in the smooth muscle cells of the duodenal tunica muscularis and the vessel walls was found. Together with the detection of specific mRNA in the duodenum this indicates that SERCA3 is expressed in smooth muscle cells, and therefore can not longer be labelled as the non-muscle SERCA. Its localization in kidney epithelial cells of the collecting ducts has not been reported before and might be important for intracellular Ca^{2+} handling in these cells. SERCA3 was not detected in pancreatic β -cells, although others consider it an important factor in Ca^{2+} -signalling and insulin stimulus-secretion coupling (Beauvois et al., 2006). The only prominent staining in the canine pancreas was found in blood vessel endothelia. Despite some unexpected results, it appears likely that the staining is specific for canine SERCA3. Detection of specific mRNA in all tissues tested supports this notion.

In canine tissue, expression of NCX1 mRNA was detected in kidneys, duodenum, and pancreas, while immunohistochemical staining was only found in the kidneys. Staining was found at the basolateral membrane of cells in the DCT, but not in glomeruli or proximal tubular segments (Fig. 2L). Other studies show that NCX1 is widely distributed in various tissues. It influences calcium uptake in the duodenal mucosa and is considered to control calcium reabsorption in the kidneys (Loffing et al., 2001; Dong et al., 2005). Some findings support an important role of NCX1 in Ca^{2+} -extrusion from pancreatic β -cell (Herchuelz et al., 2007). The lack of staining in duodenum and pancreas in the dog, despite expression of mRNA, might be due to expression of NCX1 splice variants in these tissues. Multiple species-specific and tissue-specific splice variants have been described (Quednau et al., 1997), which might change the epitope the antibody recognizes. We therefore used an additional primer pair for NCX1 splice variants [as described in (Van Eylen et al., 2001)] and detected two PCR products (about 700 bp and 770 bp long) in the kidney, but no PCR products in duodenum and pancreas (Fig. 2L, inset). The antibody appears to be useful for the NCX1 variant of canine kidney but seems to lack specificity for other forms of NCX1.

Immunohistochemistry using an antibody against PMCA1 did not show any reaction in the kidneys, duodenum, or pancreas. PMCA1 expression is known to be widespread but so far, protein content in several tissues

could only be identified by Western blot. The immunogen used to generate the PMCA1 antibody is 100% homologue in many species (human amino acid 1121–1220), but it seems that this antibody is not suitable for formalin or methacarn fixed paraffin-embedded tissue sections and can only be applied to analyze fresh tissue samples. Specific mRNA expression could be detected in the canine kidneys, duodenum, and pancreas, but the cellular localization remains unclear.

No staining was detected on all control slides using only secondary antibodies.

In conclusion, several Ca^{2+} -regulating proteins were identified in canine tissues and the cellular localization using commercially available antibodies for which cross-reactivity with canine proteins was assessed for the first time. Apart from the main tissues of systemic calcium regulation, the expression in the pancreas was also investigated, primarily to determine the localization of these proteins in β -cells, since Ca^{2+} -handling in these cells is crucial for insulin secretion. The mRNA and protein expression results show that the canine β -cell is equipped with calbindin D-28k for intracellular Ca^{2+} -buffering, and that the VDR can mediate hormonal regulation by calcitriol. For Ca^{2+} -entry at least some cells of the islets appear to express TRPV6, whereas TRPV5 is not expressed in the canine pancreas. For uptake into the endoplasmic reticulum, SERCA3 is most probably not an important factor in canine β -cells. It should be investigated whether other SERCA proteins can serve this function. For Ca^{2+} -extrusion, NCX1 and PMCA1 are expressed in canine pancreas and might be functional, but their cellular distribution could not be localized.

Detection of calbindin D-28k, VDR, TRPV6, SERCA3, and NCX1 in the canine kidneys and duodenum emphasizes the importance of these proteins for systemic calcium regulation. The antibodies used could prove useful in studying dysregulation of calcium homeostasis in the dog.

LITERATURE CITED

- Beauvois MC, Merezak C, Jonas JC, Ravier MA, Henquin JC, Gilon P. 2006. Glucose-induced mixed $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations in mouse beta-cells are controlled by the membrane potential and the SERCA3 Ca^{2+} -ATPase of the endoplasmic reticulum. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C1503–C1511.
- Billaudel BJ, Delbancut AP, Sutter BC, Faure AG. 1993. Stimulatory effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on calcium handling and insulin secretion by islets from vitamin D3-deficient rats. *Steroids* 58:335–341.
- Biner HL, Arpin-Bott MP, Loffing J, Wang X, Knepper M, Hebert SC, Kaissling B. 2002. Human cortical distal nephron: distribution of electrolyte and water transport pathways. *J Am Soc Nephrol* 13:836–847.
- Bourlon PM, Faure-Dussert A, Billaudel B, Sutter BC, Tramu G, Thomasset M. 1996. Relationship between calbindin-D28K levels in the A and B cells of the rat endocrine pancreas and the secretion of insulin and glucagon: influence of vitamin D3 deficiency and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Endocrinol* 148:223–232.
- Catchpole B, Ristic JM, Fleeman LM, Davison LJ. 2005. Canine diabetes mellitus: can old dogs teach us new tricks? *Diabetologia* 48:1948–1956.
- Chen L, Koh DS, Hille B. 2003. Dynamics of calcium clearance in mouse pancreatic beta-cells. *Diabetes* 52:1723–1731.
- Clemens TL, Garrett KP, Zhou XY, Pike JW, Haussler MR, Dempster DW. 1988. Immunocytochemical localization of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in target cells. *Endocrinology* 122:1224–1230.
- Craig TA, Sommer S, Sussman CR, Grande JP, Kumar R. 2008. Expression and regulation of the vitamin D receptor in the zebrafish, *Danio rerio*. *J Bone Miner Res* 23:1486–1496.
- Dong H, Sellers ZM, Smith A, Chow JY, Barrett KE. 2005. $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange regulates Ca^{2+} -dependent duodenal mucosal ion transport and HCO_3^{-} secretion in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:G457–G465.
- Herchuelz A, Kamagate A, Ximenes H, Van Eylen F. 2007. Role of Na/Ca exchange and the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in beta cell function and death. *Ann N Y Acad Sci* 1099:456–467.
- Hoenderop JG, van der Kemp AW, Hartog A, van de Graaf SF, van Os CH, Willems PH, Bindels RJ. 1999. Molecular identification of the apical Ca^{2+} channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D3-responsive epithelia. *J Biol Chem* 274:8375–8378.
- Hoenderop JG, Vennekens R, Muller D, Prenen J, Droogmans G, Bindels RJ, Nilius B. 2001. Function and expression of the epithelial Ca^{2+} channel family: comparison of mammalian ECAC1 and 2. *J Physiol* 537:747–761.
- Johnson JA, Grande JP, Roche PC, Kumar R. 1994. Immunohistochemical localization of the 1,25(OH)2D3 receptor and calbindin D28k in human and rat pancreas. *Am J Physiol* 267:E356–E360.
- Kumar R, Schaefer J, Grande JP, Roche PC. 1994. Immunolocalization of calcitriol receptor, 24-hydroxylase cytochrome P-450, and calbindin D28k in human kidney. *Am J Physiol* 266:F477–F485.
- Lambers TT, Bindels RJ, Hoenderop JG. 2006. Coordinated control of renal Ca^{2+} handling. *Kidney Int* 69:650–654.
- Loffing J, Loffing-Cueni D, Valderrabano V, Klausli L, Hebert SC, Rossier BC, Hoenderop JG, Bindels RJ, Kaissling B. 2001. Distribution of transcellular calcium and sodium transport pathways along mouse distal nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F1021–F1027.
- Marie JC, Bailbe D, Gylfe E, Portha B. 2001. Defective glucose-dependent cytosolic Ca^{2+} handling in islets of GK and nSTZ rat models of type 2 diabetes. *J Endocrinol* 169:169–176.
- Martin V, Bredoux R, Corvazier E, Van Gorp R, Kovacs T, Gelebart P, Enouf J. 2002. Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) 3 isoforms. Expression, regulation, and function of the membranes of the SERCA3 family. *J Biol Chem* 277:24442–24452.
- Nijenhuis T, Hoenderop JG, van der Kemp AW, Bindels RJ. 2003. Localization and regulation of the epithelial Ca^{2+} channel TRPV6 in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 14:2731–2740.
- Okano T, Tsugawa N, Morishita A, Kato S. 2004. Regulation of gene expression of epithelial calcium channels in intestine and kidney of mice by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89–90:335–338.
- Opperman LA, Pettifor JM, Ross FP. 1990. Immunohistochemical localization of calbindins (28K and 9K) in the tissues of the baboon *Papio ursinus* 228:425–430.
- Parkash J, Chaudhry MA, Amer AS, Christakos S, Rhoten WB. 2002. Intracellular calcium ion response to glucose in beta-cells of calbindin-D28k nullmutant mice and in betaHC13 cells overexpressing calbindin-D28k. *Endocrine* 18:221–229.
- Peng JB, Chen XZ, Berger UV, Vassilev PM, Tsukaguchi H, Brown EM, Hediger MA. 1999. Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J Biol Chem* 274:22739–22746.
- Quednau BD, Nicoll DA, Philipson KD. 1997. Tissue specificity and alternative splicing of the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat. *Am J Physiol* 272:C1250–C1261.
- Schlatter E. 2006. Who wins the competition: TRPV5 or calbindin-D28K? *J Am Soc Nephrol* 17:2954–2956.
- Van Eylen F, Bollen A, Herchuelz A. 2001. NCX1 Na/Ca exchanger splice variants in pancreatic islet cells. *J Endocrinol* 168:517–526.
- Wuytack F, Raeymaekers L, De Smedt H, Eggermont JA, Missiaen L, Van Den Bosch L, De Jaegere S, Verboomen H, Plessers L, Casteels R. 1992. Ca^{2+} -transport ATPases and their regulation in muscle and brain. *Ann N Y Acad Sci* 671:82–91.
- Zhuang L, Peng JB, Tou L, Takanaga H, Adam RM, Hediger MA, Freeman MR. 2002. Calcium-selective ion channel, CaT1 , is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Lab Invest* 82:1755–1764.

IV. DISKUSSION

Nur durch das Zusammenspiel verschiedener Kalzium-Handling-Proteine ist eine exakte und den jeweiligen Verhältnissen angepasste Steuerung der für den Organismus essentiellen Kalzium-Homöostase möglich. Die Kalzium-Aufnahme in den Körper erfolgt hauptsächlich im Dünndarm und wird über den VDR gesteuert. Bei reduzierter Kalzium-Aufnahme entwickeln sich beim Menschen Krankheitsbilder wie Osteomalazie oder Rachitis (PANDA et al., 2004). Die Kalzium-Ausscheidung erfolgt überwiegend über die Nieren, und eine eingeschränkte Nierenfunktion, z. B. bei chronischer Niereninsuffizienz, führt zu einem gestörten Kalzium-Metabolismus (ALCAZAR ARROYO, 2008).

Das Wissen über das Vorkommen und die Funktion wichtiger Proteine des Kalzium-Stoffwechsels und des sie regulierenden VDR ist bisher sehr lückenhaft und für Spezies wie den Hund liegen kaum Daten diesbezüglich vor. Um den genauen Pathomechanismus der verschiedenen, durch Kalzium und Vitamin D beeinflussten Krankheiten aufdecken zu können, werden Informationen über Verteilung und Funktion dieser Proteine benötigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher erstmals das Vorkommen und die Lokalisation wichtiger Kalzium-Handling-Proteine in Duodenum und Niere sowie im Pankreas beim Hund untersucht.

Störungen im Kalzium-Metabolismus beeinträchtigen auch die Funktion des endokrinen Pankreas und können an der Entstehung eines Diabetes mellitus beteiligt sein (LEVY et al., 1994; BOURLON et al., 1997; MARIE et al., 2001). Um alle Aspekte der Kalzium-induzierten Insulinsekretion verstehen zu können, sind Kenntnisse über die Lokalisation und Funktion der Kalzium-Handling-Proteine im Pankreas erforderlich.

Unter Anwendung quantitativer und qualitativer PCR wurden Gewebeproben aus Darm, Niere und Pankreas auf das Vorkommen entsprechender mRNA untersucht. In allen drei untersuchten Organen konnte die RNA für TRPV 6, VDR, NCX 1, PMCA 1 und SERCA 3 nachgewiesen werden. TRPV-5-RNA kommt beim Hund dagegen nur in der Niere vor und Calbindin-D28k-RNA in Niere und Pankreas, aber nicht im Duodenum.

Die PCR ist eine sensitive und einfache Methode des qualitativen und quantitativen Nachweises von mRNA, erfordert aber den Einsatz eines internen Standards, um die Untersuchungen verschiedener Proben miteinander vergleichen zu können. Als interner Standard wurde in dieser Studie das ribosomale Protein S 5 (RP 5) eingesetzt, da es beim Hund für diesen Einsatzbereich validiert ist (BRINKHOF et al., 2006). Somit konnten Unterschiede in Menge und Beschaffenheit des Probenmaterials ausgeglichen werden. Als Positivkontrolle wurde mit den gleichen Methoden der VDR im Duodenum von Mäusen nachgewiesen und Calbindin-D28k und NCX 1 in der Niere von Mäusen, da das Vorkommen dieser Transporter in diesen Geweben bekannt ist (STUMPF et al., 1979; LOFFING et al., 2001; DONG et al., 2005).

Ein Nachteil der PCR liegt darin, dass die nachgewiesene RNA nicht ohne Weiteres einem bestimmten Zelltyp zugeordnet werden kann und man keine Informationen über den tatsächlichen Zustand der Zelle auf Proteinebene oder über die Lokalisation des gesuchten Proteins innerhalb der Zelle erhält.

Daher wurden von den zu untersuchenden Geweben Paraffinschnitte angefertigt und für alle Proteine immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Diese ermöglichten die Identifizierung und Lokalisation der gesuchten Proteine im Gewebsverband. Da spezifische Antikörper für den Hund nur selten verfügbar sind, wurden Antikörper gegen andere Spezies (Kaninchen, Ratte, Maus, Schaf und Meerschwein) eingesetzt. Dabei wurde jeweils der Antikörper verwendet, der gegen das Epitop mit der größten Sequenzhomologie zum Hund gerichtet war. Keiner der hier eingesetzten Antikörper wurde bisher für den Hund validiert, so dass die Ergebnisse der Immunhistochemie mit den Ergebnissen der PCR und den Untersuchungen bei anderen Spezies verglichen wurden, um Artefakte oder Kreuzreaktionen zu erkennen.

Die beiden Kalzium-Transporter TRPV 5 und TRPV 6 vermitteln die Kalzium-Aufnahme an der apikalen Seite von Kalzium-transportierenden Epithelien (PENG et al., 2003b). Die immunhistochemischen Untersuchungen für die beiden Transporter zeigten in dieser Studie eine fast identische Verteilung in den untersuchten Geweben. Im Duodenum führten beide Antikörper zu einer starken Färbung der apikalen Enterozyten. Das Vorhandensein von TRPV 6 im Darm konnte durch die PCR bestätigt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit Studien an anderen Spezies überein, in denen der Transporter ebenfalls in Enterozyten

vorkommt (PENG et al., 1999; PENG et al., 2003b). Für TRPV 5 konnte hingegen keine mRNA im Duodenum detektiert werden, so dass die Ergebnisse der Immunhistochemie wahrscheinlich auf Kreuzreaktionen zu TRPV 6 beruhen. In der Niere konnten beide Transporter sowohl mittels Antikörper als auch durch die PCR nachgewiesen werden, wobei für TRPV 6 jeweils eine etwas stärkere Expression gefunden wurde als für TRPV 5. Beide Proteine zeigten in der Immunhistochemie ein vergleichbares Verteilungsmuster in den Epithelzellen verschiedener Tubulusabschnitte der Niere. Untersuchungen an anderen Spezies belegen ebenfalls das Vorkommen beider Transporter in der Niere, obwohl es Spezies-spezifische Unterschiede gibt, welcher der beiden Transporter mengenmäßig überwiegt. Im Pankreas zeigte sich in dieser Studie eine deutliche Färbung der Inselzellen beim Einsatz des TRPV-6-Antikörpers, aber kein positives Signal bei der Verwendung von Antikörpern gegen TRPV 5. Die PCR-Ergebnisse bestätigen dieses Expressionsmuster. Bei der Ratte dagegen kommt TRPV 5 kolokalisiert mit Insulin in den β -Zellen vor und das Vorhandensein beider Transporter im Pankreas ist von verschiedenen Spezies bekannt (MULLER et al., 2000; HOENDEROP et al., 2001b; JANSSEN et al., 2002; HIRNET et al., 2003).

Die Ergebnisse für TRPV 6 stimmen daher insgesamt mit den Untersuchungen an anderen Spezies gut überein. So konnte die hier gezeigte apikale Lokalisation in Darm-Epithelzellen auch bei Menschen (WALTERS et al., 2006) und Mäusen (ZHUANG et al., 2002) nachgewiesen werden. Das Verteilungsmuster von TRPV 6 in der Niere gleicht dem Verteilungsmuster bei der Maus (NIJENHUIS et al., 2003). In dieser Studie wurde sowohl die mRNA für TRPV 6 als auch das Protein im Pankreas nachgewiesen. Dieser Transporter kommt ebenfalls im Pankreas von anderen Spezies vor (MULLER et al., 2000; BARLEY et al., 2001; JANSSEN et al., 2002). Daher ist es gut möglich, dass das Protein auch beim Hund eine Rolle für die Insulinsekretion aus den β -Zellen spielt.

Aufgrund der großen Strukturähnlichkeit der beiden Transporter (MONTELL, 2001) und der nicht eindeutigen Ergebnisse für TRPV 5 in dieser Studie, scheint der Einsatz des hier verwendeten polyklonalen Antikörpers gegen TRPV 5 beim Hund aufgrund mangelnder Spezifität nicht sinnvoll zu sein. Es wäre erstrebenswert, die Untersuchungen mit spezifischeren Antikörpern gegen TRPV 5 und 6 zu wiederholen, diese sind jedoch bisher nicht erhältlich.

Das Kalzium-bindende Protein Calbindin-D28k dient in vielen Zellen als Kalzium-Puffer im Zytoplasma. Das Vorkommen von Calbindin-D28k in Nierenepithelzellen ist von verschiedenen Spezies seit langem bekannt (ROTH et al., 1982a; RHOTEN et al., 1984). Auch beim Hund konnte hier eine starke Expression des Proteins und seiner RNA nachgewiesen werden. Im kaninen Duodenum konnte das Protein dagegen weder mittels Immunhistochemie noch durch die PCR gefunden werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass auch der Hund, wie andere Spezies (OPPERMAN et al., 1990), im Darm stattdessen das Calbindin-D9k exprimiert. Die einzige bisher bekannte Ausnahme stellt der Vogel dar, bei dem Calbindin-D28k im Darm nachgewiesen werden konnte (HUNZIKER et al., 1983). Im Pankreas zeigte die Mehrheit der Inselzellen eine deutliche Färbung für Calbindin-D28k. Mittels Doppelfärbung mit Insulin konnten diese Zellen als β -Zellen identifiziert werden. Diese Ergebnisse gleichen den Verhältnissen bei anderen Spezies (ROTH et al., 1982b; POCHET et al., 1987), bei denen Calbindin über die Regulation des zytoplasmatischen Kalzium-Gehalts in den β -Zellen die Kalzium-abhängige Insulinsekretion beeinflusst (SOOY et al., 1999). Es ist anzunehmen, dass Calbindin-D28k auch beim Hund die Insulinsekretion beeinflussen kann.

Die in der Plasmamembran lokalisierten Kalzium-Pumpen PMCA sind als hochaffine Transportsysteme für den Transport von Kalzium aus der Zelle heraus verantwortlich. PMCA-1-mRNA konnte beim Hund in allen drei untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Die Verwendung des Antikörpers gegen PMCA 1 brachte jedoch kein positives Signal in der Immunhistochemie. Untersuchungen bei anderen Tierarten zeigen, dass der verwendete Antikörper gegen PMCA 1 Spezies-übergreifend einsetzbar ist. Außerdem ist er gegen ein Epitop gerichtet, das zu 100 % homolog zur Proteinsequenz des Hundes ist. Der Nachweis des Proteins wurde in anderen Studien jedoch mittels Western Blot durchgeführt (STAUFFER et al., 1995). Ein weiterer kommerziell erhältlicher Antikörper gegen PMCA 1 zeigt eine weniger starke Homologie zum kaninen Protein und erscheint daher als weniger geeignet für den Einsatz beim Hund. Beide Antikörper werden vom Hersteller für den Einsatz auf fixierten Paraffinschnitten angeboten. Es scheint trotzdem so, dass der hier verwendete Antikörper nur für unfixiertes Gewebe brauchbare Ergebnisse liefert und die gebräuchlichen Fixationsmethoden für Paraffinschnitte das Epitop so stark

verändern, dass es vom Antikörper nicht mehr erkannt wird. Da PMCA 1 bei verschiedenen Spezies als ubiquitär vorkommend angesehen wird (OKUNADE et al., 2004) und auch beim Hund in Darm, Niere und Pankreas die mRNA nachgewiesen werden konnte, ist anzunehmen, dass das Protein auch bei dieser Spezies weit verbreitet vorkommt und an der Aufrechterhaltung der Kalzium-Homöostase in Darm, Niere und Pankreas beteiligt ist.

Der Natrium-Kalzium-Austauscher NCX 1 kommt bei Mäusen und Ratten in vielen Zellen vor und vermittelt in den Epithelzellen von Darm und Niere die Kalzium-Aufnahme (LOFFING et al., 2001; DONG et al., 2005). Im Pankreas spielt der Transporter eine wichtige Rolle für den Kalzium-Ausstrom aus den β -Zellen (VAN EYLEN et al., 1998; XIMENES et al., 2003) und beeinflusst dadurch wahrscheinlich auch die Insulinsekretion. Beim Hund konnte die mRNA in allen drei untersuchten Geweben gefunden werden, während der Proteinnachweis nur in der Niere gelang. Von diesem Protein ist bekannt, dass es in sehr vielen Spezies- und Gewebes-spezifischen Splice-Varianten vorkommt (SCHULZE et al., 1996; QUEDNAU et al., 1997), so dass anzunehmen ist, dass auch der Hund in der Niere eine andere NCX-1-Isoform exprimiert als in Darm und Pankreas. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Ergebnisse einer zusätzlichen PCR, die in der vorliegenden Studie durchgeführt wurde. Dazu wurden Primer gegen weitere NCX-1-Splice-Varianten eingesetzt, die in einer anderen Studie beschrieben wurden (VAN EYLEN et al., 2001). Mit diesen Untersuchungen wurden ebenfalls zwei PCR-Produkte für NCX 1 in der kaninen Niere aber nicht in Darm und Pankreas nachgewiesen. Der Hersteller des Antikörpers stellt leider keine Informationen über die Proteinsequenz des entsprechenden Immunogens zur Verfügung, so dass ein Abgleich mit der Proteinsequenz des Hundes nicht möglich ist. Die in dieser Studie gezeigte Lokalisation von NCX 1 in den Nieren-Tubulus-Epithelzellen gleicht den Verhältnissen bei anderen Spezies (LYTTON et al., 1996). Der Hund scheint also ebenfalls Gewebes-spezifische Splice-Varianten dieses Transporters zu exprimieren, und der hier verwendete monoklonale Maus-Antikörper gegen NCX 1 ist beim Hund nur für die in der Niere vorkommende Isoform einsetzbar.

Die Kalzium-Pumpe SERCA 3 wird bei Mäusen und Ratten hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen sowie in Endothel- und Epithelzellen verschiedener Organe beschrieben. Beim Hund konnte das Protein unter Verwendung eines

monoklonalen Maus-Antikörpers, und mittels PCR auch seine mRNA, ebenfalls in allen drei untersuchten Organen identifiziert werden. In der Niere färbten sich die Epithelzellen der Sammelrohre stark an und im Pankreas die Endothelzellen der Blutgefäße. In kaninen β -Zellen scheint diese Isoform nicht vorzukommen, obwohl sie bei Mäusen die Kalzium-mediierte Insulinausschüttung beeinflusst (BEAUVOIS et al., 2006). Im Duodenum wurde das Protein in den glatten Muskelzellen der Darmwand und im Gefäßendothel gefunden. In bisherigen Studien wurde SERCA 3 oft als nicht-muskuläre Isoform bezeichnet, da sie im Gegensatz zu den Isoformen SERCA 1 und SERCA 2a nicht Muskel-spezifisch exprimiert wird. Beim Hund scheint SERCA 3 jedoch hauptsächlich eine Rolle als Kalzium-Transporter in den Zellen der glatten Muskulatur zu spielen, so dass die Bezeichnung als nicht-muskuläre Isoform bei dieser Spezies unzutreffend ist. Der hier verwendete Antikörper gegen SERCA 3 kann als geeignet für den Einsatz beim Hund angesehen werden, da die Ergebnisse der Immunhistochemie mit denen der PCR übereinstimmen. Unterschiede zu anderen Spezies liegen eher darin begründet, dass auch SERCA 3 in verschiedenen Isoformen vorkommt, deren Expression und Lokalisation zwischen verschiedenen Spezies variiert (WUYTACK et al., 1992; BOBE et al., 2004).

Der VDR wurde schon in den Nuclei von mehr als 30 verschiedenen Zelltypen nachgewiesen (STUMPF et al., 1979; HAUSSLER et al., 1998). Beim Hund wird der VDR und seine mRNA sehr stark in Duodenum und Niere exprimiert. Lokalisiert ist er in den Epithelzellen der Darmkrypten und den distalen Tubulus-Abschnitten der Niere. Der Einsatz des gleichen Antikörpers brachte bei anderen Spezies vergleichbare Ergebnisse (CLEMENS et al., 1988; KUMAR et al., 1994). Dies sind die Orte, in denen durch die VDR-gesteuerten Kalzium-Transportproteine die Kalzium-Reabsorption stattfindet, so dass davon auszugehen ist, dass auch beim Hund der VDR in dieser Weise Einfluss auf den Kalzium-Haushalt nimmt. Im kaninen Pankreas konnte das Protein in der Immunhistochemie nur nach Signal-Amplifikation mit Biotinyl-Tyramid identifiziert werden, und zwar gleichmäßig in den Zellkernen des endokrinen und exokrinen Pankreas. Die PCR zeigte ebenfalls das Vorhandensein von VDR-mRNA im Pankreas, wobei die Expression deutlich schwächer war als in Darm und Niere. Bei Mensch und Ratte wird der Rezeptor stark im exokrinen Pankreas exprimiert, jedoch kaum im endokrinen Pankreas (JOHNSON et al., 1994). Man

geht davon aus, dass der VDR in β -Zellen die Insulinsekretion verstärkt, indem er indirekt den für die Insulinsekretion nötigen Kalzium-Gehalt in der Zelle erhöht (BILLAUDEL et al., 1993). Möglicherweise hat der Rezeptor einen ähnlichen Einfluss auf die Kalzium-medierte Sekretion aus exokrinem Gewebe. Der hier verwendete VDR-Antikörper von der Ratte erwies sich auch für den Einsatz beim Hund als geeignet, wobei je nach Gewebsdichte des Rezeptors eine Signal-Amplifikation nötig ist, um ein eindeutiges Signal zu erhalten.

In den immunhistochemischen Untersuchungen dieser Studie wurde nur der VDR in den Zellkernen exprimiert, alle anderen Proteine kamen in verschiedenen Bereichen des Zytoplasmas vor. Dies entspricht den bekannten Funktionen dieser Proteine. Der VDR ist ein nucleärer Rezeptor, der die Proteinbiosynthese der wichtigen Kalzium-Handling-Proteine steuert. Die hier untersuchten Kalzium-Transporter und -Puffer sind für das Kalzium-Handling in der Zelle und für den Transport durch die Membran der Zellwand und des ER oder SR verantwortlich.

Mit der vorliegenden Studie konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die hier untersuchten Kalzium-Handling-Proteine größtenteils auch beim Hund in den wichtigen Organen des Kalzium-Stoffwechsels sowie in den β -Zellen des Pankreas vorkommen. Die verwendeten Antikörper gegen TRPV 6, Calbindin-D28k, SERCA 3, VDR und NCX 1 (in der Niere) sind für den immunhistochemischen Proteinnachweis beim Hund geeignet. Für die Proteine PMCA 1, NCX 1 (in anderen Geweben als der Niere) und TRPV 5 müssen andere, am besten Spezies-spezifische Antikörper gefunden werden, um diese beim Hund einsetzen zu können.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Kalzium ist im Organismus von Säugetieren an einer Vielzahl wichtiger Zellfunktionen als Signalmolekül beteiligt. Ein fein reguliertes Gleichgewicht des Kalzium-Gehalts zwischen Intra- und Extrazellularraum ist Voraussetzung für eine physiologische Körperfunktion. Um dieses Gleichgewicht stets aufrecht zu erhalten, sind eine Reihe von Kalzium-Transportproteinen notwendig, die über Vitamin D und dessen Rezeptor reguliert werden. Während es beim Menschen und insbesondere bei Mäusen und Ratten bereits zahlreiche Untersuchungen über die zellulären Mechanismen der Kalzium-Homöostase gibt, ist beim Hund über die beteiligten Proteine noch sehr wenig bekannt.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, das Vorkommen und die Verteilung verschiedener Kalzium-Handling-Proteine in wichtigen Organen des Kalzium-Stoffwechsels und im Pankreas des Hundes zu untersuchen. Dazu wurde die Expression der Kalzium-Pumpen TRPV 5 und 6, NCX 1, PMCA 1 und SERCA 3 sowie des Kalzium-Transporters Calbindin-D28k und des Rezeptors für Vitamin D in Gewebeproben aus kaninem Duodenum, Niere und Pankreas mittels PCR und Immunhistochemie untersucht.

Mittels PCR wurde die mRNA-Expression von TRPV 6, VDR, NCX 1, PMCA 1 und SERCA 3 in allen drei untersuchten Organen nachgewiesen. TRPV-5-mRNA konnte dagegen nur in der Niere und Calbindin-D28k-mRNA ausschließlich in Niere und Pankreas gefunden werden. Die Antikörper gegen TRPV 6, Calbindin-D28k, SERCA 3, VDR und NCX 1 stellten sich als geeignet für den immunhistochemischen Proteinnachweis beim Hund heraus.

TRPV 6 kommt beim Hund in den apikalen Enterozyten des Duodenums, in Nierenepithelzellen und den Inselzellen des Pankreas vor. Calbindin-D28k wurde in verschiedenen Tubulusabschnitten der Niere und in den β -Zellen des Pankreas gefunden, jedoch nicht im Duodenum. Obwohl die mRNA für NCX 1 in allen drei Organen gefunden wurde, zeigte nur die Niere eine spezifische immunhistochemische Färbung für dieses Protein, wahrscheinlich aufgrund von organspezifischen Splice-Varianten. Es wurde gezeigt, dass der VDR beim Hund in den Nuclei einzelner Nieren- und Darmepithelzellen stark exprimiert wird, vergleichbar mit dem Expressionsmuster bei Mensch und Maus. Darüber hinaus

konnte der Rezeptor in den Nuclei der Zellen des endokrinen und exokrinen Pankreas gefunden werden. Der hier verwendete Antikörper gegen TRPV 5 erwies sich aufgrund mangelnder Spezifität als ungeeignet für den Nachweis beim Hund. Der Antikörper gegen PMCA 1 zeigte kein Signal in der immunhistochemischen Untersuchung, da wahrscheinlich das Epitop durch Formalinfixierung und Paraffineinbettung zerstört wurde.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Expression und Verteilung der hier untersuchten Kalzium-Handling-Proteine beim Hund große Ähnlichkeiten mit anderen Spezies wie Maus, Ratte und Mensch aufweisen. Sowohl in Darm und Niere als auch im Pankreas kann die Expression dieser Proteine in verschiedenen funktionellen Zelltypen nachgewiesen werden. Das lässt vermuten, dass diese Proteine auch beim Hund maßgeblich an der Regulation der Kalzium-Aufnahme und -Sekretion in Darm und Niere sowie an der Insulinsekretion des Pankreas beteiligt sind. Während der Nachweis der mRNA-Expression für alle untersuchten Gene gelang, waren nicht alle Antikörper für den Einsatz im Hundegewebe geeignet.

VI. SUMMARY

In Mammals, calcium is needed for various cellular functions as a signal molecule. A tightly regulated balance between calcium content of the intra- and the extracellular space is needed to enable a physiological functioning of the entire organism. To sustain this balance, several calcium transport proteins are necessary, which are regulated by Vitamin D and its functional receptor. Numerous studies focus on the cellular mechanisms of calcium balance in human beings, mice, and rats, but little is known about the proteins involved in dogs.

Aim of the present study was to investigate the expression and distribution of several calcium handling proteins in the main organs involved in calcium metabolism and in the pancreas in dogs. For this purpose, the expression of the calcium pumps TRPV 5 and 6, NCX 1, PMCA 1, and SERCA 3 as well as the calcium transporter Calbindin-D28k and the receptor for Vitamin D was studied in tissue samples of canine duodenum, kidney, and pancreas by using PCR and immunohistochemistry.

RNA expression of TRPV 6, VDR, NCX 1, PMCA 1, and SERCA 3 was found in all three organs by using PCR. In contrast, mRNA of TRPV 5 was only found in the kidney and mRNA of Calbindin-D28k was exclusively detected in kidney and pancreas. Antibodies against TRPV 6, Calbindin-D28k, SERCA 3, VDR, and NCX 1 were shown to be useful for the immunohistochemical protein analysis in the dog.

TRPV 6 was found in the apical enterocytes of the duodenum, in epithelial cells of the kidney, and in islet cells of the pancreas. Calbindin-D28k was detected in several parts of the renal tubuli and in pancreatic β -cells, but not in the duodenum. Although mRNA of NCX 1 occurred in all three organs, only the kidney showed a specific immunohistochemical staining, most likely due to tissue specific splice-variants. A strong expression of VDR was found in the nuclei of several epithelial cells in kidney and duodenum, similar to the expression patterns found in human beings and mice. In addition, the receptor was detected in the nuclei of cells of the endocrine and exocrine pancreas. The antibody against TRPV 5 turned out inapplicable for the use in dogs because of its lack of specificity. The antibody against PMCA 1 showed no signal in the immunohistochemistry, probably due to

disintegration of the epitope through formalin fixation and paraffine embedding.

In summary, the expression and distribution of the studied calcium handling proteins in the dog show strong similarity to other species like mice, rats, and human beings. In duodenum and kidney, as well as in the pancreas, the expression of these proteins in several functional cell types was evident. This leads to the presumption that these proteins also play an important role for the uptake and secretion of calcium in duodenum and kidney and for the insulin release from the pancreas in dogs. While mRNA expression could be proven for all genes studied, not all antibodies were appropriate for the use in canine tissues.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Alcazar Arroyo R. [Electrolyte and acid-base balance disorders in advanced chronic kidney disease]. *Nefrologia* 2008; 28 Suppl 3: 87-93.

Alroy I, Towers TL, Freedman LP. Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 5789-99.

Anderson HC. Normal and abnormal mineralization in mammals. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1981; 27: 702-8.

Armbrecht HJ, Doubek WG, Porter SB. Calcium transport by basal lateral membrane vesicles from rat small intestine decreases with age. *Biochim Biophys Acta* 1988; 944: 367-73.

Arredouani A, Guiot Y, Jonas JC, Liu LH, Nenquin M, Pertusa JA, Rahier J, Rolland JF, Shull GE, Stevens M, Wuytack F, Henquin JC, Gilon P. SERCA3 ablation does not impair insulin secretion but suggests distinct roles of different sarcoendoplasmic reticulum Ca(2+) pumps for Ca(2+) homeostasis in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2002; 51: 3245-53.

Ashcroft FM, Rorsman P. Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog Biophys Mol Biol* 1989; 54: 87-143.

Balesaria S, Sangha S, Walters JR. Human duodenum responses to vitamin D metabolites of TRPV6 and other genes involved in calcium absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G1193-7.

Barley NF, Howard A, O'Callaghan D, Legon S, Walters JR. Epithelial calcium transporter expression in human duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G285-90.

Bayerdorffer E, Haase W, Schulz I. Na⁺/Ca²⁺ countertransport in plasma membrane of rat pancreatic acinar cells. *J Membr Biol* 1985; 87: 107-19.

Beauvois MC, Merezak C, Jonas JC, Ravier MA, Henquin JC, Gilon P. Glucose-induced mixed [Ca²⁺]_i oscillations in mouse beta-cells are controlled by the membrane potential and the SERCA3 Ca²⁺-ATPase of the endoplasmic reticulum. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C1503-11.

Berggren PO, Larsson O. Ca²⁺ and pancreatic B-cell function. *Biochem Soc Trans* 1994; 22: 12-8.

Bezprozvanny I, Ehrlich BE. The inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) receptor. *J Membr Biol* 1995; 145: 205-16.

Billaudel BJ, Delbancut AP, Sutter BC, Faure AG. Stimulatory effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on calcium handling and insulin secretion by islets from vitamin D₃-deficient rats. *Steroids* 1993; 58: 335-41.

Billaudel BJ, Bourlon PM, Sutter BC, Faure-Dussert AG. Regulatory effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on insulin release and calcium handling via the phospholipid pathway in islets from vitamin D-deficient rats. *J Endocrinol Invest* 1995; 18: 673-82.

Bindels RJ, Hartog A, Timmermans JA, van Os CH. Immunocytochemical localization of calbindin-D_{28k}, calbindin-D_{9k} and parvalbumin in rat kidney. *Contrib Nephrol* 1991; 91: 7-13.

Bindels RJ, Ramakers PL, Dempster JA, Hartog A, van Os CH. Role of Na⁺/Ca²⁺ exchange in transcellular Ca²⁺ transport across primary cultures of rabbit kidney collecting system. *Pflugers Arch* 1992; 420: 566-72.

Bindels RJ. Calcium handling by the mammalian kidney. *J Exp Biol* 1993; 184: 89-104.

Blaustein MP, Hodgkin AL. The effect of cyanide on the efflux of calcium from squid axons. *J Physiol* 1969; 200: 497-527.

Blaustein MP, Santiago EM. Effects of internal and external cations and of ATP on sodium-calcium and calcium-calcium exchange in squid axons. *Biophys J* 1977; 20: 79-111.

Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 1999; 79: 763-854.

Bobe R, Bredoux R, Wuytack F, Quarck R, Kovacs T, Papp B, Corvazier E, Magnier C, Enouf J. The rat platelet 97-kDa Ca²⁺-ATPase isoform is the sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 protein. *J Biol Chem* 1994; 269: 1417-24.

Bobe R, Bredoux R, Corvazier E, Andersen JP, Clausen JD, Dode L, Kovacs T, Enouf J. Identification, expression, function, and localization of a novel (sixth) isoform of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 gene. *J Biol Chem* 2004; 279: 24297-306.

Bootman MD, Berridge MJ. The elemental principles of calcium signaling. *Cell* 1995; 83: 675-8.

Borke JL, Minami J, Verma AK, Penniston JT, Kumar R. Co-localization of erythrocyte Ca⁺⁺-Mg⁺⁺ ATPase and vitamin D-dependent 28-kDa-calcium binding protein. *Kidney Int* 1988; 34: 262-7.

Borke JL, Caride A, Verma AK, Penniston JT, Kumar R. Cellular and segmental distribution of Ca²⁺(+)-pump epitopes in rat intestine. *Pflugers Arch* 1990; 417: 120-2.

Bouillon R, Van Cromphaut S, Carmeliet G. Intestinal calcium absorption: Molecular vitamin D mediated mechanisms. *J Cell Biochem* 2003; 88: 332-9.

Bourlon PM, Faure-Dussert A, Billaudel B, Sutter BC, Tramu G, Thomasset M. Relationship between calbindin-D28K levels in the A and B cells of the rat endocrine pancreas and the secretion of insulin and glucagon: influence of vitamin D3 deficiency and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Endocrinol* 1996; 148: 223-32.

Bourlon PM, Faure-Dussert A, Billaudel B. Modulatory role of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on pancreatic islet insulin release via the cyclic AMP pathway in the rat. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 751-8.

Bourlon PM, Billaudel B, Faure-Dussert A. Influence of vitamin D3 deficiency and 1,25 dihydroxyvitamin D3 on de novo insulin biosynthesis in the islets of the rat endocrine pancreas. *J Endocrinol* 1999a; 160: 87-95.

Bourlon PM, Faure-Dussert A, Billaudel B. The de novo synthesis of numerous proteins is decreased during vitamin D3 deficiency and is gradually restored by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 repletion in the islets of langerhans of rats. *J Endocrinol* 1999b; 162: 101-9.

Brandl CJ, Green NM, Korczak B, MacLennan DH. Two Ca²⁺ ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. *Cell* 1986; 44: 597-607.

Brandl CJ, deLeon S, Martin DR, MacLennan DH. Adult forms of the Ca²⁺ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J Biol Chem* 1987; 262: 3768-74.

Brinkhof B, Spee B, Rothuizen J, Penning LC. Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression. *Anal Biochem* 2006; 356: 36-43.

Bronner F, Freund T. Intestinal CaBP: a new quantitative index of vitamin D deficiency in the rat. *Am J Physiol* 1975; 229: 689-94.

Bronner F, Pansu D, Stein WD. An analysis of intestinal calcium transport across the rat intestine. *Am J Physiol* 1986; 250: G561-9.

Bronner F, Stein WD. CaBPr facilitates intracellular diffusion for Ca pumping in distal convoluted tubule. *Am J Physiol* 1988; 255: F558-62.

Brouland JP, Gelebart P, Kovacs T, Enouf J, Grossmann J, Papp B. The loss of sarco/endoplasmic reticulum calcium transport ATPase 3 expression is an early event during the multistep process of colon carcinogenesis. *Am J Pathol* 2005; 167: 233-42.

Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC. Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 1993; 366: 575-80.

Brown EM, Vassilev PM, Quinn S, Hebert SC. G-protein-coupled, extracellular Ca(2+)-sensing receptor: a versatile regulator of diverse cellular functions. *Vitam Horm* 1999; 55: 1-71.

Burk SE, Lytton J, MacLennan DH, Shull GE. cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca²⁺ pump. *J Biol Chem* 1989; 264: 18561-8.

Camacho P, Lechleiter JD. Increased frequency of calcium waves in *Xenopus laevis* oocytes that express a calcium-ATPase. *Science* 1993; 260: 226-9.

Carafoli E. Membrane transport of calcium: an overview. *Methods Enzymol* 1988a; 157: 3-11.

Carafoli E. The plasma membrane calcium transporting systems in the regulation of cell calcium. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1988b; 21: 147-55.

Carafoli E. Intracellular calcium regulation, with special attention to the role of the plasma membrane calcium pump. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988c; 12 Suppl 3: S77-84.

Carafoli E. The calcium pumping ATPase of the plasma membrane. *Annu Rev Physiol* 1991; 53: 531-47.

Carafoli E. The Ca²⁺ pump of the plasma membrane. *J Biol Chem* 1992; 267: 2115-8.

Carafoli E. The signaling function of calcium and its regulation. *J Hypertens Suppl* 1994a; 12: S47-56.

Carafoli E. Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *FASEB J* 1994b; 8: 993-1002.

Carafoli E. Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 1115-22.

Carmeliet G, Van Cromphaut S, Daci E, Maes C, Bouillon R. Disorders of calcium homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003; 17: 529-46.

Chan SD, Chiu DK, Atkins D. Oophorectomy leads to a selective decrease in 1,25-dihydroxycholecalciferol receptors in rat jejunal villous cells. *Clin Sci (Lond)* 1984; 66: 745-8.

Chandler JS, Chandler SK, Pike JW, Haussler MR. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase in a cultured monkey kidney cell line (LLC-MK2) apparently deficient in the high affinity receptor for the hormone. *J Biol Chem* 1984; 259: 2214-22.

Chard PS, Bleakman D, Christakos S, Fullmer CS, Miller RJ. Calcium buffering properties of calbindin D28k and parvalbumin in rat sensory neurones. *J Physiol*

1993; 472: 341-57.

Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 1995; 16: 117-42.

Chen L, Koh DS, Hille B. Dynamics of calcium clearance in mouse pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2003; 52: 1723-31.

Cheon J, Reeves JP. Site density of the sodium-calcium exchange carrier in reconstituted vesicles from bovine cardiac sarcolemma. *J Biol Chem* 1988; 263: 2309-15.

Chertow BS, Sivitz WI, Baranetsky NG, Clark SA, Waite A, DeLuca HF. Cellular mechanisms of insulin release: the effects of vitamin D deficiency and repletion on rat insulin secretion. *Endocrinology* 1983; 113: 1511-8.

Clapham DE. Calcium signaling. *Cell* 1995; 80: 259-68.

Clark SA, Stumpf WE, Sar M, DeLuca HF, Tanaka Y. Target cells for 1,25 dihydroxyvitamin D₃ in the pancreas. *Cell Tissue Res* 1980; 209: 515-20.

Clark SA, Stumpf WE, Sar M. Effect of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ on insulin secretion. *Diabetes* 1981; 30: 382-6.

Clemens TL, Garrett KP, Zhou XY, Pike JW, Haussler MR, Dempster DW. Immunocytochemical localization of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in target cells. *Endocrinology* 1988; 122: 1224-30.

Danisi G, Bonjour JP, Straub RW. Regulation of Na-dependent phosphate influx across the mucosal border of duodenum by 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Pflugers Arch* 1980; 388: 227-32.

DiPolo R. Calcium influx in internally dialyzed squid giant axons. *J Gen Physiol*

1979; 73: 91-113.

DiPolo R, Beauge L. Characterization of the reverse Na/Ca exchange in squid axons and its modulation by Cai and ATP. Cai-dependent Nai/Cao and Nai/Na_o exchange modes. *J Gen Physiol* 1987; 90: 505-25.

Dode L, Wuytack F, Kools PF, Baba-Aissa F, Raeymaekers L, Brike F, van de Ven WJ, Casteels R. cDNA cloning, expression and chromosomal localization of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase 3 gene. *Biochem J* 1996; 318 (Pt 2): 689-99.

Dong H, Sellers ZM, Smith A, Chow JY, Barrett KE. Na(+)/Ca(2+) exchange regulates Ca(2+)-dependent duodenal mucosal ion transport and HCO(3)(-) secretion in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G457-65.

Dunham ET, Glynn IM. Adenosinetriphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions. *J Physiol* 1961; 156: 274-93.

Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F8-28.

Easom RA. CaM kinase II: a protein kinase with extraordinary talents germane to insulin exocytosis. *Diabetes* 1999; 48: 675-84.

Enyedi A, Flura M, Sarkadi B, Gardos G, Carafoli E. The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently. *J Biol Chem* 1987; 262: 6425-30.

Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; 240: 889-95.

Falchetto R, Vorherr T, Brunner J, Carafoli E. The plasma membrane Ca²⁺ pump contains a site that interacts with its calmodulin-binding domain. *J Biol Chem*

1991; 266: 2930-6.

Feher JJ, Fullmer CS, Wasserman RH. Role of facilitated diffusion of calcium by calbindin in intestinal calcium absorption. *Am J Physiol* 1992; 262: C517-26.

Freund T, Bronner F. Stimulation in vitro by 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ of intestinal cell calcium uptake and calcium-binding protein. *Science* 1975; 190: 1300-2.

Friedman PA, Gesek FA. Vitamin D₃ accelerates PTH-dependent calcium transport in distal convoluted tubule cells. *Am J Physiol* 1993; 265: F300-8.

Friedman PA, Gesek FA. Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms, and regulation. *Physiol Rev* 1995; 75: 429-71.

Fukugawa M, Kurokawa K. Calcium homeostasis and imbalance. *Nephron* 2002; 92 Suppl 1: 41-5.

Fukushima A, Aizaki Y, Sakuma K. Short-chain fatty acids induce intestinal transient receptor potential vanilloid type 6 expression in rats and Caco-2 cells. *J Nutr* 2009; 139: 20-5.

Gall D, Gromada J, Susa I, Rorsman P, Herchuelz A, Bokvist K. Significance of Na/Ca exchange for Ca²⁺ buffering and electrical activity in mouse pancreatic beta-cells. *Biophys J* 1999; 76: 2018-28.

Gama L, Baxendale-Cox LM, Breitwieser GE. Ca²⁺-sensing receptors in intestinal epithelium. *Am J Physiol* 1997; 273: C1168-75.

Garcia-Barrado MJ, Gilon P, Sato Y, Nenquin M, Henquin JC. No evidence for a role of reverse Na(+)-Ca²⁺ exchange in insulin release from mouse pancreatic islets. *Am J Physiol* 1996; 271: E426-33.

Gedik O, Akalin S. Effects of vitamin D deficiency and repletion on insulin and glucagon secretion in man. *Diabetologia* 1986; 29: 142-5.

Gelebart P, Kovacs T, Brouland JP, van Gorp R, Grossmann J, Rivard N, Panis Y, Martin V, Bredoux R, Enouf J, Papp B. Expression of endomembrane calcium pumps in colon and gastric cancer cells. Induction of SERCA3 expression during differentiation. *J Biol Chem* 2002; 277: 26310-20.

Ghijssen WE, De Jong MD, Van Os CH. Kinetic properties of Na⁺/Ca²⁺ exchange in basolateral plasma membranes of rat small intestine. *Biochim Biophys Acta* 1983; 730: 85-94.

Gill RK, Christakos S. Identification of sequence elements in mouse calbindin-D28k gene that confer 1,25-dihydroxyvitamin D₃- and butyrate-inducible responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 2984-8.

Gmaj P, Murer H, Kinne R. Calcium ion transport across plasma membranes isolated from rat kidney cortex. *Biochem J* 1979; 178: 549-57.

Greeb J, Shull GE. Molecular cloning of a third isoform of the calmodulin-sensitive plasma membrane Ca²⁺-transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle. *J Biol Chem* 1989; 264: 18569-76.

Greene AL, Lalli MJ, Ji Y, Babu GJ, Grupp I, Sussman M, Periasamy M. Overexpression of SERCA2b in the heart leads to an increase in sarcoplasmic reticulum calcium transport function and increased cardiac contractility. *J Biol Chem* 2000; 275: 24722-7.

Guerini D. The Ca²⁺ pumps and the Na⁺/Ca²⁺ exchangers. *Biometals* 1998; 11: 319-30.

Gunteski-Hamblin AM, Greeb J, Shull GE. A novel Ca²⁺ pump expressed in brain, kidney, and stomach is encoded by an alternative transcript of the slow-

twitch muscle sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase gene. Identification of cDNAs encoding Ca²⁺ and other cation-transporting ATPases using an oligonucleotide probe derived from the ATP-binding site. *J Biol Chem* 1988; 263: 15032-40.

Harteneck C, Plant TD, Schultz G. From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci* 2000; 23: 159-66.

Haussler MR, Mangelsdorf DJ, Komm BS, Terpening CM, Yamaoka K, Allegretto EA, Baker AR, Shine J, McDonnell DP, Hughes M, et al. Molecular biology of the vitamin D hormone. *Recent Prog Horm Res* 1988; 44: 263-305.

Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 325-49.

Heizmann CW, Hunziker W. Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights. *Trends Biochem Sci* 1991; 16: 98-103.

Hemmingsen C, Staun M, Nielsen PK, Olgaard K. Separate effects of 1,25-dihydroxyvitamin D and calcium on renal calbindin-D28k and intestinal calbindin-D9k. *Pharmacol Toxicol* 2002; 91: 111-5.

Henquin JC. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 2000; 49: 1751-60.

Herchuelz A, Diaz-Horta O, Van Eylen F. Na/Ca exchange in function, growth, and demise of beta-cells. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 976: 315-24.

Herchuelz A, Kamagate A, Ximenes H, Van Eylen F. Role of Na/Ca exchange and the plasma membrane Ca²⁺-ATPase in beta cell function and death. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1099: 456-67.

Hirnet D, Olausson J, Fecher-Trost C, Bodding M, Nastainczyk W, Wissenbach

U, Flockerzi V, Freichel M. The TRPV6 gene, cDNA and protein. *Cell Calcium* 2003; 33: 509-18.

Hirst M, Feldman D. Glucocorticoid regulation of 1,25(OH)₂vitamin D₃ receptors: divergent effects on mouse and rat intestine. *Endocrinology* 1982; 111: 1400-2.

Hitman GA, Mannan N, McDermott MF, Aganna E, Ogunkolade BW, Hales CN, Boucher BJ. Vitamin D receptor gene polymorphisms influence insulin secretion in Bangladeshi Asians. *Diabetes* 1998; 47: 688-90.

Hoenderop JG, van der Kemp AW, Hartog A, van de Graaf SF, van Os CH, Willems PH, Bindels RJ. Molecular identification of the apical Ca²⁺ channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D₃-responsive epithelia. *J Biol Chem* 1999; 274: 8375-8.

Hoenderop JG, Willems PH, Bindels RJ. Toward a comprehensive molecular model of active calcium reabsorption. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000a; 278: F352-60.

Hoenderop JG, Hartog A, Stuiver M, Doucet A, Willems PH, Bindels RJ. Localization of the epithelial Ca(2+) channel in rabbit kidney and intestine. *J Am Soc Nephrol* 2000b; 11: 1171-8.

Hoenderop JG, Muller D, Van Der Kemp AW, Hartog A, Suzuki M, Ishibashi K, Imai M, Sweep F, Willems PH, Van Os CH, Bindels RJ. Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. *J Am Soc Nephrol* 2001a; 12: 1342-9.

Hoenderop JG, Vennekens R, Muller D, Prenen J, Droogmans G, Bindels RJ, Nilius B. Function and expression of the epithelial Ca(2+) channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2. *J Physiol* 2001b; 537: 747-61.

Hoenderop JG, Dardenne O, Van Abel M, Van Der Kemp AW, Van Os CH, St - Arnaud R, Bindels RJ. Modulation of renal Ca²⁺ transport protein genes by

dietary Ca²⁺ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in 25-hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase knockout mice. *FASEB J* 2002a; 16: 1398-406.

Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. ECaC: the gatekeeper of transepithelial Ca²⁺ transport. *Biochim Biophys Acta* 2002b; 1600: 6-11.

Hoenderop JG, Voets T, Hoefs S, Weidema F, Prenen J, Nilius B, Bindels RJ. Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J* 2003a; 22: 776-85.

Hoenderop JG, van Leeuwen JP, van der Eerden BC, Kersten FF, van der Kemp AW, Merillat AM, Waarsing JH, Rossier BC, Vallon V, Hummler E, Bindels RJ. Renal Ca²⁺ wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5. *J Clin Invest* 2003b; 112: 1906-14.

Hoenderop JG, van der Kemp AW, Urben CM, Strugnell SA, Bindels RJ. Effects of vitamin D compounds on renal and intestinal Ca²⁺ transport proteins in 25-hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase knockout mice. *Kidney Int* 2004; 66: 1082-9.

Houillier P, Nicolet-Barousse L, Maruani G, Paillard M. What keeps serum calcium levels stable? *Joint Bone Spine* 2003; 70: 407-13.

Howard A, Legon S, Spurr NK, Walters JR. Molecular cloning and chromosomal assignment of human calbindin-D_{9k}. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 185: 663-9.

Howard A, Legon S, Walters JR. Human and rat intestinal plasma membrane calcium pump isoforms. *Am J Physiol* 1993; 265: G917-25.

Hunziker W, Siebert PD, King MW, Stucki P, Dugaiczky A, Norman AW. Molecular cloning of a vitamin D-dependent calcium-binding protein mRNA sequence from chick intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 4228-32.

Hurwitz S. Homeostatic control of plasma calcium concentration. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1996; 31: 41-100.

Huybers S, Naber TH, Bindels RJ, Hoenderop JG. Prednisolone-induced Ca^{2+} malabsorption is caused by diminished expression of the epithelial Ca^{2+} channel TRPV6. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G92-7.

Iida K, Taniguchi S, Kurokawa K. Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor and 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase mRNA expression along rat nephron segments. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 194: 659-64.

Inesi G, Kurzmack M, Coan C, Lewis DE. Cooperative calcium binding and ATPase activation in sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Biol Chem* 1980; 255: 3025-31.

Irnatén M, Blanchard-Gutton N, Harvey BJ. Rapid effects of 17 β -estradiol on epithelial TRPV6 Ca^{2+} channel in human T84 colonic cells. *Cell Calcium* 2008; 44: 441-52.

Ishida H, Seino Y, Seino S, Tsuda K, Takemura J, Nishi S, Ishizuka S, Imura H. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on pancreatic B and D cell function. *Life Sci* 1983; 33: 1779-86.

Janssen SW, Hoenderop JG, Hermus AR, Sweep FC, Martens GJ, Bindels RJ. Expression of the novel epithelial Ca^{2+} channel ECaC1 in rat pancreatic islets. *J Histochem Cytochem* 2002; 50: 789-98.

Johnson JA, Grande JP, Roche PC, Kumar R. Immunohistochemical localization of the 1,25(OH)₂D₃ receptor and calbindin D28k in human and rat pancreas. *Am J Physiol* 1994; 267: E356-60.

Kajikawa M, Ishida H, Fujimoto S, Mukai E, Nishimura M, Fujita J, Tsuura Y, Okamoto Y, Norman AW, Seino Y. An insulinotropic effect of vitamin D analog

with increasing intracellular Ca^{2+} concentration in pancreatic beta-cells through nongenomic signal transduction. *Endocrinology* 1999; 140: 4706-12.

Kamagate A, Herchuelz A, Bollen A, Van Eylen F. Expression of multiple plasma membrane Ca^{2+} -ATPases in rat pancreatic islet cells. *Cell Calcium* 2000; 27: 231-46.

Kamagate A, Herchuelz A, Van Eylen F. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase overexpression reduces Ca^{2+} oscillations and increases insulin release induced by glucose in insulin-secreting BRIN-BD11 cells. *Diabetes* 2002; 51: 2773-88.

Kato S. Molecular mechanism of transcriptional control by nuclear vitamin receptors. *Br J Nutr* 2000; 84 Suppl 2: S229-33.

Kawashima H, Kurokawa K. Localization of receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D3 along the rat nephron. Direct evidence for presence of the receptors in both proximal and distal nephron. *J Biol Chem* 1982; 257: 13428-32.

Kim MH, Lee GS, Jung EM, Choi KC, Jeung EB. The negative effect of dexamethasone on calcium-processing gene expressions is associated with a glucocorticoid-induced calcium-absorbing disorder. *Life Sci* 2009; 85: 146-52.

Kimura J, Miyamae S, Noma A. Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea-pig. *J Physiol* 1987; 384: 199-222.

Kindmark H, Kohler M, Arkhammar P, Efendic S, Larsson O, Linder S, Nilsson T, Berggren PO. Oscillations in cytoplasmic free calcium concentration in human pancreatic islets from subjects with normal and impaired glucose tolerance. *Diabetologia* 1994; 37: 1121-31.

Kofuji P, Hadley RW, Kieval RS, Lederer WJ, Schulze DH. Expression of the Na-Ca exchanger in diverse tissues: a study using the cloned human cardiac Na-Ca exchanger. *Am J Physiol* 1992; 263: C1241-9.

Koster HP, Hartog A, Van Os CH, Bindels RJ. Calbindin-D28K facilitates cytosolic calcium diffusion without interfering with calcium signaling. *Cell Calcium* 1995; 18: 187-96.

Kream BE, Yamada S, Schnoes HK, DeLuca HF. Specific cytosol-binding protein for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in rat intestine. *J Biol Chem* 1977; 252: 4501-5.

Kumar R, Wieben E, Beecher SJ. The molecular cloning of the complementary deoxyribonucleic acid for bovine vitamin D-dependent calcium-binding protein: structure of the full-length protein and evidence for homologies with other calcium-binding proteins of the troponin-C superfamily of proteins. *Mol Endocrinol* 1989; 3: 427-32.

Kumar R, Schaefer J, Grande JP, Roche PC. Immunolocalization of calcitriol receptor, 24-hydroxylase cytochrome P-450, and calbindin D28k in human kidney. *Am J Physiol* 1994; 266: F477-85.

Lambers TT, Bindels RJ, Hoenderop JG. Coordinated control of renal Ca²⁺ handling. *Kidney Int* 2006; 69: 650-4.

Leathers VL, Linse S, Forsen S, Norman AW. Calbindin-D28K, a 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced calcium-binding protein, binds five or six Ca²⁺ ions with high affinity. *J Biol Chem* 1990; 265: 9838-41.

Lee CT, Shang S, Lai LW, Yong KC, Lien YH. Effect of thiazide on renal gene expression of apical calcium channels and calbindins. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287: F1164-70.

Lee GS, Choi KC, Park SM, An BS, Cho MC, Jeung EB. Expression of human Calbindin-D(9k) correlated with age, vitamin D receptor and blood calcium level in the gastrointestinal tissues. *Clin Biochem* 2003; 36: 255-61.

Lee S, Clark SA, Gill RK, Christakos S. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and

pancreatic beta-cell function: vitamin D receptors, gene expression, and insulin secretion. *Endocrinology* 1994a; 134: 1602-10.

Lee SL, Yu AS, Lytton J. Tissue-specific expression of Na(+)-Ca²⁺ exchanger isoforms. *J Biol Chem* 1994b; 269: 14849-52.

Lemmens R, Larsson O, Berggren PO, Islam MS. Ca²⁺-induced Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum amplifies the Ca²⁺ signal mediated by activation of voltage-gated L-type Ca²⁺ channels in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 9971-7.

Levy J, Gavin JR, 3rd, Sowers JR. Diabetes mellitus: a disease of abnormal cellular calcium metabolism? *Am J Med* 1994; 96: 260-73.

Levy J, Zhu Z, Dunbar JC. The effect of glucose and calcium on Ca²⁺-adenosine triphosphatase in pancreatic islets isolated from a normal and a non-insulin-dependent diabetes mellitus rat model. *Metabolism* 1998; 47: 185-9.

Li YC, Pirro AE, Demay MB. Analysis of vitamin D-dependent calcium-binding protein messenger ribonucleic acid expression in mice lacking the vitamin D receptor. *Endocrinology* 1998; 139: 847-51.

Li Z, Decavel C, Hatton GI. Calbindin-D28k: role in determining intrinsically generated firing patterns in rat supraoptic neurones. *J Physiol* 1995; 488 (Pt 3): 601-8.

Liu L, Ng M, Iacopino AM, Dunn ST, Hughes MR, Bourdeau JE. Vitamin D receptor gene expression in mammalian kidney. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5: 1251-8.

Liu L, Khastgir A, McCauley JM, Dunn ST, Morrissey JH, Christakos S, Hughes MR, Bourdeau JE. RT-PCR microlocalization of mRNAs for calbindin D28k and vitamin D receptor in the murine nephron. *Am J Physiol* 1996; 270: F677-81.

Loffing J, Loffing-Cueni D, Valderrabano V, Klausli L, Hebert SC, Rossier BC, Hoenderop JG, Bindels RJ, Kaissling B. Distribution of transcellular calcium and sodium transport pathways along mouse distal nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281: F1021-7.

Lytton J, MacLennan DH. Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca²⁺-ATPase gene. *J Biol Chem* 1988; 263: 15024-31.

Lytton J, Lee SL, Lee WS, van Baal J, Bindels RJ, Kilav R, Naveh-Many T, Silver J. The kidney sodium-calcium exchanger. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 779: 58-72.

MacLennan DH, Toyofuku T, Lytton J. Structure-function relationships in sarcoplasmic or endoplasmic reticulum type Ca²⁺ pumps. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 671: 1-10.

Magosci M, Yamaki M, Penniston JT, Dousa TP. Localization of mRNAs coding for isozymes of plasma membrane Ca(2+)-ATPase pump in rat kidney. *Am J Physiol* 1992; 263: F7-14.

Marie JC, Bailbe D, Gylfe E, Portha B. Defective glucose-dependent cytosolic Ca²⁺ handling in islets of GK and nSTZ rat models of type 2 diabetes. *J Endocrinol* 2001; 169: 169-76.

Martin V, Bredoux R, Corvazier E, Van Gorp R, Kovacs T, Gelebart P, Enouf J. Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 3 isoforms. Expression, regulation, and function of the membranes of the SERCA3 family. *J Biol Chem* 2002; 277: 24442-52.

Meldolesi J, Pozzan T. The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 10-4.

Meyer MB, Watanuki M, Kim S, Shevde NK, Pike JW. The human transient receptor potential vanilloid type 6 distal promoter contains multiple vitamin D receptor binding sites that mediate activation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in intestinal cells. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 1447-61.

Mogami H, Tepikin AV, Petersen OH. Termination of cytosolic Ca²⁺ signals: Ca²⁺ reuptake into intracellular stores is regulated by the free Ca²⁺ concentration in the store lumen. *EMBO J* 1998; 17: 435-42.

Montell C. Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2001; 2001: re1.

Morgan AJ, Jacob R. Differential modulation of the phases of a Ca²⁺ spike by the store Ca²⁺-ATPase in human umbilical vein endothelial cells. *J Physiol* 1998; 513 (Pt 1): 83-101.

Muallem S, Beeker T, Pandol SJ. Role of Na⁺/Ca²⁺ exchange and the plasma membrane Ca²⁺ pump in hormone-mediated Ca²⁺ efflux from pancreatic acini. *J Membr Biol* 1988; 102: 153-62.

Muller D, Hoenderop JG, Meij IC, van den Heuvel LP, Knoers NV, den Hollander AI, Eggert P, Garcia-Nieto V, Claverie-Martin F, Bindels RJ. Molecular cloning, tissue distribution, and chromosomal mapping of the human epithelial Ca²⁺ channel (ECAC1). *Genomics* 2000; 67: 48-53.

Nicolaysen R, Eeg-Larsen N. The biochemistry and physiology of vitamin D. *Vitam Horm* 1953; 11: 29-60.

Niemeyer BA, Bergs C, Wissenbach U, Flockerzi V, Trost C. Competitive regulation of Ca²⁺ entry by protein kinase C and calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 3600-5.

Niggli V, Zurini M, Carafoli E. Purification, reconstitution, and molecular

characterization of the Ca²⁺ pump of plasma membranes. *Methods Enzymol* 1987; 139: 791-808.

Nijenhuis T, Hoenderop JG, van der Kemp AW, Bindels RJ. Localization and regulation of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV6 in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2731-40.

Nilius B, Prenen J, Vennekens R, Hoenderop JG, Bindels RJ, Droogmans G. Modulation of the epithelial calcium channel, ECaC, by intracellular Ca²⁺. *Cell Calcium* 2001; 29: 417-28.

Nilius B, Prenen J, Hoenderop JG, Vennekens R, Hoefs S, Weidema AF, Droogmans G, Bindels RJ. Fast and slow inactivation kinetics of the Ca²⁺ channels ECaC1 and ECaC2 (TRPV5 and TRPV6). Role of the intracellular loop located between transmembrane segments 2 and 3. *J Biol Chem* 2002; 277: 30852-8.

Norman AW, Frankel JB, Heldt AM, Grodsky GM. Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science* 1980; 209: 823-5.

Norman AW. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 2006; 147: 5542-8.

Ogunkolade BW, Boucher BJ, Prahl JM, Bustin SA, Burrin JM, Noonan K, North BV, Mannan N, McDermott MF, DeLuca HF, Hitman GA. Vitamin D receptor (VDR) mRNA and VDR protein levels in relation to vitamin D status, insulin secretory capacity, and VDR genotype in Bangladeshi Asians. *Diabetes* 2002; 51: 2294-300.

Okamoto Y, Ishida H, Taminato T, Tsuji K, Kurose T, Tsuura Y, Kato S, Imura H, Seino Y. Role of cytosolic Ca²⁺ in impaired sensitivity to glucose of rat pancreatic islets exposed to high glucose in vitro. *Diabetes* 1992; 41: 1555-61.

Okano T, Tsugawa N, Morishita A, Kato S. Regulation of gene expression of epithelial calcium channels in intestine and kidney of mice by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89-90: 335-8.

Okunade GW, Miller ML, Pyne GJ, Sutliff RL, O'Connor KT, Neumann JC, Andringa A, Miller DA, Prasad V, Doetschman T, Paul RJ, Shull GE. Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *J Biol Chem* 2004; 279: 33742-50.

Opperman LA, Pettifor JM, Ross FP. Immunohistochemical localization of calbindins (28K and 9K) in the tissues of the baboon *Papio ursinus*. *Anat Rec* 1990; 228: 425-30.

Orrenius S, McCabe MJ, Jr., Nicotera P. Ca(2+)-dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. *Toxicol Lett* 1992a; 64-65 Spec No: 357-64.

Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GE, Dypbukt JM, Nicotera P. Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol* 1992b; 32 Suppl: S33-42.

Oz OK, Hajibeigi A, Howard K, Cummins CL, van Abel M, Bindels RJ, Word RA, Kuro-o M, Pak CY, Zerwekh JE. Aromatase deficiency causes altered expression of molecules critical for calcium reabsorption in the kidneys of female mice *. *J Bone Miner Res* 2007; 22: 1893-902.

Ozog A, Pouzet B, Bobe R, Lompre AM. Characterization of the 3' end of the mouse SERCA 3 gene and tissue distribution of mRNA spliced variants. *FEBS Lett* 1998; 427: 349-52.

Ozono K, Seino Y, Yano H, Yamaoka K. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ enhances the effect of refeeding on steady state preproinsulin messenger ribonucleic acid levels in rats. *Endocrinology* 1990; 126: 2041-5.

Panda DK, Miao D, Bolivar I, Li J, Huo R, Hendy GN, Goltzman D. Inactivation of the 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis. *J Biol Chem* 2004; 279: 16754-66.

Pansu D, Duflos C, Bellaton C, Bronner F. Solubility and intestinal transit time limit calcium absorption in rats. *J Nutr* 1993; 123: 1396-404.

Parkash J, Chaudhry MA, Amer AS, Christakos S, Rhoten WB. Intracellular calcium ion response to glucose in beta-cells of calbindin-D28k nullmutant mice and in betaHC13 cells overexpressing calbindin-D28k. *Endocrine* 2002; 18: 221-9.

Peng JB, Chen XZ, Berger UV, Vassilev PM, Tsukaguchi H, Brown EM, Hediger MA. Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J Biol Chem* 1999; 274: 22739-46.

Peng JB, Chen XZ, Berger UV, Weremowicz S, Morton CC, Vassilev PM, Brown EM, Hediger MA. Human calcium transport protein CaT1. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278: 326-32.

Peng JB, Brown EM, Hediger MA. Structural conservation of the genes encoding CaT1, CaT2, and related cation channels. *Genomics* 2001; 76: 99-109.

Peng JB, Brown EM, Hediger MA. Apical entry channels in calcium-transporting epithelia. *News Physiol Sci* 2003a; 18: 158-63.

Peng JB, Brown EM, Hediger MA. Epithelial Ca²⁺ entry channels: transcellular Ca²⁺ transport and beyond. *J Physiol* 2003b; 551: 729-40.

Petersen CC, Petersen OH, Berridge MJ. The role of endoplasmic reticulum calcium pumps during cytosolic calcium spiking in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 22262-4.

Pike JW. Interaction between 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors and intestinal nuclei. Binding to nuclear constituents in vitro. *J Biol Chem* 1982; 257: 6766-75.

Pike JW, Haussler MR. Association of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ with cultured 3T6 mouse fibroblasts. Cellular uptake and receptor-mediated migration to the nucleus. *J Biol Chem* 1983; 258: 8554-60.

Pike JW. Vitamin D₃ receptors: structure and function in transcription. *Annu Rev Nutr* 1991; 11: 189-216.

Plasman PO, Lebrun P, Herchuelz A. Characterization of the process of sodium-calcium exchange in pancreatic islet cells. *Am J Physiol* 1990; 259: E844-50.

Plasman PO, Herchuelz A. Regulation of Na⁺/Ca²⁺ exchange in the rat pancreatic B cell. *Biochem J* 1992; 285 (Pt 1): 123-7.

Poch E, Leach S, Snape S, Cacic T, MacLennan DH, Lytton J. Functional characterization of alternatively spliced human SERCA3 transcripts. *Am J Physiol* 1998; 275: C1449-58.

Pochet R, Pipeleers DG, Malaisse WJ. Calbindin D-27 kDa: preferential localization in non-B islet cells of the rat pancreas. *Biol Cell* 1987; 61: 155-61.

Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* 1994; 74: 595-636.

Putney JW, Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 1986; 7: 1-12.

Putney JW, Jr. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 1990; 11: 611-24.

Quednau BD, Nicoll DA, Philipson KD. Tissue specificity and alternative splicing

of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat. *Am J Physiol* 1997; 272: C1250-61.

Reddy D, Pollock AS, Clark SA, Sooy K, Vasavada RC, Stewart AF, Honeyman T, Christakos S. Transfection and overexpression of the calcium binding protein calbindin-D28k results in a stimulatory effect on insulin synthesis in a rat beta cell line (RIN 1046-38). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 1961-6.

Reilly RF, Ellison DH. Mammalian distal tubule: physiology, pathophysiology, and molecular anatomy. *Physiol Rev* 2000; 80: 277-313.

Rhoten WB, Lubit B, Christakos S. Avian and mammalian vitamin D-dependent calcium binding protein in reptilian nephron. *Gen Comp Endocrinol* 1984; 55: 96-103.

Ringer S. A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol* 1883; 4: 29-42 3.

Rizzoli R, Bonjour JP. [Calcitropic hormones and integrated regulation of calcemia and calcium balance]. *Rev Prat* 1998; 48: 1178-84.

Roe MW, Lancaster ME, Mertz RJ, Worley JF, 3rd, Dukes ID. Voltage-dependent intracellular calcium release from mouse islets stimulated by glucose. *J Biol Chem* 1993; 268: 9953-6.

Roe MW, Philipson LH, Frangakis CJ, Kuznetsov A, Mertz RJ, Lancaster ME, Spencer B, Worley JF, 3rd, Dukes ID. Defective glucose-dependent endoplasmic reticulum Ca²⁺ sequestration in diabetic mouse islets of Langerhans. *J Biol Chem* 1994; 269: 18279-82.

Roth J, Brown D, Norman AW, Orci L. Localization of the vitamin D-dependent calcium-binding protein in mammalian kidney. *Am J Physiol* 1982a; 243: F243-

52.

Roth J, Bonner-Weir S, Norman AW, Orci L. Immunocytochemistry of vitamin D-dependent calcium binding protein in chick pancreas: exclusive localization. *Endocrinology* 1982b; 110: 2216-8.

Rudnicki PM, Molsted-Pedersen L. Effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol on glucose metabolism in gestational diabetes mellitus. *Diabetologia* 1997; 40: 40-4.

Saksena S, Ammar MS, Tyagi S, Elsharydah A, Gill RK, Ramaswamy K, Dudeja PK. Mechanisms of calcium transport in human colonic basolateral membrane vesicles. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 2306-15.

Sato T, Yamamoto H, Sawada N, Nashiki K, Tsuji M, Nikawa T, Arai H, Morita K, Taketani Y, Takeda E. Immobilization decreases duodenal calcium absorption through a 1,25-dihydroxyvitamin D-dependent pathway. *J Bone Miner Metab* 2006; 24: 291-9.

Schanne FA, Kane AB, Young EE, Farber JL. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science* 1979; 206: 700-2.

Scharff O, Foder B. Rate constants for calmodulin binding to Ca²⁺-ATPase in erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta* 1982; 691: 133-43.

Schatzmann HJ. ATP-dependent Ca⁺⁺-extrusion from human red cells. *Experientia* 1966; 22: 364-5.

Schmitt R, Ellison DH, Farman N, Rossier BC, Reilly RF, Reeves WB, Oberbaumer I, Tapp R, Bachmann S. Developmental expression of sodium entry pathways in rat nephron. *Am J Physiol* 1999; 276: F367-81.

Schonfeld W, Menke KH, Schonfeld R, Repke KR. Evidence against parallel operation of sodium/calcium antiport and ATP-driven calcium transport in plasma

membrane vesicles from kidney tubule cells. *Biochim Biophys Acta* 1984; 770: 183-94.

Schreiner DS, Jande SS, Parkes CO, Lawson DE, Thomasset M. Immunocytochemical demonstration of two vitamin D-dependent calcium-binding proteins in mammalian kidney. *Acta Anat (Basel)* 1983; 117: 1-14.

Schulze DH, Kofuji P, Valdivia C, He S, Luo S, Ruknudin A, Wisel S, Kirby MS, duBell W, Lederer WJ. Alternative splicing of the Na(+)-Ca²⁺ exchanger gene, NCX1. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 779: 46-57.

Seino Y, Sierra RI, Ichikawa M, Avioli LV. I alpha, 25-Dihydroxyvitamin D₃ receptor in the X-linked hypophosphatemic mouse. *Endocrinology* 1982; 111: 329-31.

Shanahan CM. Mechanisms of vascular calcification in renal disease. *Clin Nephrol* 2005; 63: 146-57.

Sidler-Lauff K, Boos A, Kraenzlin M, Liesegang A. Influence of different calcium supplies and a single vitamin D injection on vitamin D receptor and calbindin D_{9k} immunoreactivities in the gastrointestinal tract of goat kids. *J Anim Sci* 2010; 88: 3598-610.

Song Y, Peng X, Porta A, Takanaga H, Peng JB, Hediger MA, Fleet JC, Christakos S. Calcium transporter 1 and epithelial calcium channel messenger ribonucleic acid are differentially regulated by 1,25 dihydroxyvitamin D₃ in the intestine and kidney of mice. *Endocrinology* 2003; 144: 3885-94.

Song Y, Fleet JC. 1,25 dihydroxycholecalciferol-mediated calcium absorption and gene expression are higher in female than in male mice. *J Nutr* 2004; 134: 1857-61.

Sooy K, Schermerhorn T, Noda M, Surana M, Rhoten WB, Meyer M, Fleischer

N, Sharp GW, Christakos S. Calbindin-D(28k) controls $[Ca^{2+}]_i$ and insulin release. Evidence obtained from calbindin-d(28k) knockout mice and beta cell lines. *J Biol Chem* 1999; 274: 34343-9.

Stauffer TP, Hilfiker H, Carafoli E, Strehler EE. Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes. *J Biol Chem* 1994; 269: 32022.

Stauffer TP, Guerini D, Carafoli E. Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca^{2+} pump. A study using specific antibodies. *J Biol Chem* 1995; 270: 12184-90.

Stoll R, Stern H, Ruppin H, Domschke W. Effect of two potent calmodulin antagonists on calcium transport of brush border and basolateral vesicles from human duodenum. *Aliment Pharmacol Ther* 1987; 1: 415-24.

Strehler EE, Strehler-Page MA, Vogel G, Carafoli E. mRNAs for plasma membrane calcium pump isoforms differing in their regulatory domain are generated by alternative splicing that involves two internal donor sites in a single exon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 6908-12.

Stumpf WE, Sar M, Reid FA, Tanaka Y, DeLuca HF. Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. *Science* 1979; 206: 1188-90.

Stumpf WE, Sar M, Narbaitz R, Reid FA, DeLuca HF, Tanaka Y. Cellular and subcellular localization of 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ in rat kidney: comparison with localization of parathyroid hormone and estradiol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77: 1149-53.

Talor Z, Arruda JA. Na-Ca exchange in renal tubular basolateral membranes. *Miner Electrolyte Metab* 1986; 12: 239-45.

Taylor AN, McIntosh JE, Bourdeau JE. Immunocytochemical localization of vitamin D-dependent calcium-binding protein in renal tubules of rabbit, rat, and chick. *Kidney Int* 1982; 21: 765-73.

Teerapornpuntakit J, Dorkkam N, Wongdee K, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Endurance swimming stimulates transepithelial calcium transport and alters the expression of genes related to calcium absorption in the intestine of rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: E775-86.

Tissandie E, Gueguen Y, Lobaccaro JM, Grandcolas L, Aigueperse J, Gourmelon P, Souidi M. Enriched uranium affects the expression of vitamin D receptor and retinoid X receptor in rat kidney. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 110: 263-8.

Trump BF, Berezesky IK. Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J* 1995; 9: 219-28.

Uehara A, Iwamoto T, Nakamura Y, Imanaga I. Forefront of Na⁺/Ca²⁺ exchanger studies: physiology and molecular biology of monovalent cation sensitivities in Na⁺/Ca²⁺ exchangers. *J Pharmacol Sci* 2004; 96: 19-22.

Van Abel M, Hoenderop JG, van der Kemp AW, van Leeuwen JP, Bindels RJ. Regulation of the epithelial Ca²⁺ channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G78-85.

Van Abel M, Hoenderop JG, van der Kemp AW, Friedlaender MM, van Leeuwen JP, Bindels RJ. Coordinated control of renal Ca²⁺ transport proteins by parathyroid hormone. *Kidney Int* 2005; 68: 1708-21.

Van Baal J, Yu A, Hartog A, Fransen JA, Willems PH, Lytton J, Bindels RJ. Localization and regulation by vitamin D of calcium transport proteins in rabbit cortical collecting system. *Am J Physiol* 1996; 271: F985-93.

Van Corven EJ, Roche C, van Os CH. Distribution of Ca²⁺-ATPase, ATP-dependent Ca²⁺-transport, calmodulin and vitamin D-dependent Ca²⁺-binding protein along the villus-crypt axis in rat duodenum. *Biochim Biophys Acta* 1985; 820: 274-82.

Van Cromphaut SJ, Dewerchin M, Hoenderop JG, Stockmans I, Van Herck E, Kato S, Bindels RJ, Collen D, Carmeliet P, Bouillon R, Carmeliet G. Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 13324-9.

Van de Graaf SF, Boullart I, Hoenderop JG, Bindels RJ. Regulation of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6 by 1alpha,25-dihydroxy Vitamin D3 and dietary Ca²⁺. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89-90: 303-8.

Van Eylen F, Lebeau C, Albuquerque-Silva J, Herchuelz A. Contribution of Na/Ca exchange to Ca²⁺ outflow and entry in the rat pancreatic beta-cell: studies with antisense oligonucleotides. *Diabetes* 1998; 47: 1873-80.

Van Eylen F, Bollen A, Herchuelz A. NCX1 Na/Ca exchanger splice variants in pancreatic islet cells. *J Endocrinol* 2001; 168: 517-26.

Van Heeswijk MP, Geertsen JA, van Os CH. Kinetic properties of the ATP-dependent Ca²⁺ pump and the Na⁺/Ca²⁺ exchange system in basolateral membranes from rat kidney cortex. *J Membr Biol* 1984; 79: 19-31.

Van Os CH. Transcellular calcium transport in intestinal and renal epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1987; 906: 195-222.

Varadi A, Molnar E, Ostenson CG, Ashcroft SJ. Isoforms of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase are differentially expressed in normal and diabetic islets of Langerhans. *Biochem J* 1996a; 319 (Pt 2): 521-7.

Varadi A, Molnar E, Ashcroft SJ. A unique combination of plasma membrane

Ca²⁺-ATPase isoforms is expressed in islets of Langerhans and pancreatic beta-cell lines. *Biochem J* 1996b; 314 (Pt 2): 663-9.

Varadi A, Lebel L, Hashim Y, Mehta Z, Ashcroft SJ, Turner R. Sequence variants of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca(2+)-transport ATPase 3 gene (SERCA3) in Caucasian type II diabetic patients (UK Prospective Diabetes Study 48). *Diabetologia* 1999; 42: 1240-3.

Vennekens R, Prenen J, Hoenderop JG, Bindels RJ, Droogmans G, Nilius B. Modulation of the epithelial Ca²⁺ channel ECaC by extracellular pH. *Pflugers Arch* 2001; 442: 237-42.

Villalobo A, Brown L, Roufogalis BD. Kinetic properties of the purified Ca²⁺-translocating ATPase from human erythrocyte plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 1986; 854: 9-20.

Walters JR, Howard A, Lowery LJ, Mawer EB, Legon S. Expression of genes involved in calcium absorption in human duodenum. *Eur J Clin Invest* 1999; 29: 214-9.

Walters JR, Barley NF, Khanji M, Rhodes-Kendler O. Duodenal expression of the epithelial calcium transporter gene TRPV6: is there evidence for Vitamin D-dependence in humans? *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89-90: 317-9.

Walters JR, Balesaria S, Chavele KM, Taylor V, Berry JL, Khair U, Barley NF, van Heel DA, Field J, Hayat JO, Bhattacharjee A, Jeffery R, Poulson R. Calcium channel TRPV6 expression in human duodenum: different relationships to the vitamin D system and aging in men and women. *J Bone Miner Res* 2006; 21: 1770-7.

Walters JR, Balesaria S, Khair U, Sangha S, Banks L, Berry JL. The effects of Vitamin D metabolites on expression of genes for calcium transporters in human duodenum. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103: 509-12.

Walters MR. Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev* 1992; 13: 719-64.

Wang S, Hu D, Xi Q, Su S, Bai J, Liu J, Ye Z. The expression and implication of TRPV5, Calbindin-D28k and NCX1 in idiopathic hypercalciuria. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2008; 28: 580-3.

Wasserman RH, Chandler JS, Meyer SA, Smith CA, Brindak ME, Fullmer CS, Penniston JT, Kumar R. Intestinal calcium transport and calcium extrusion processes at the basolateral membrane. *J Nutr* 1992; 122: 662-71.

Wasserman RH, Fullmer CS. Vitamin D and intestinal calcium transport: facts, speculations and hypotheses. *J Nutr* 1995; 125: 1971S-9S.

Weber A. On the role of calcium in the activity of adenosine 5'-triphosphate hydrolysis by actomyosin. *J Biol Chem* 1959; 234: 2764-9.

Wecksler WR, Ross FP, Norman AW. Characterization of the 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 receptor from rat intestinal cytosol. *J Biol Chem* 1979a; 254: 9488-91.

Wecksler WR, Mason RS, Norman AW. Specific cytosol receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human intestine. *J Clin Endocrinol Metab* 1979b; 48: 715-7.

White KE, Gesek FA, Reilly RF, Friedman PA. NCX1 Na/Ca exchanger inhibition by antisense oligonucleotides in mouse distal convoluted tubule cells. *Kidney Int* 1998; 54: 897-906.

Wolf BA, Colca JR, Turk J, Florholmen J, McDaniel ML. Regulation of Ca²⁺ homeostasis by islet endoplasmic reticulum and its role in insulin secretion. *Am J Physiol* 1988; 254: E121-36.

Wood RJ, Tchack L, Taparia S. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases the expression of the CaT1 epithelial calcium channel in the Caco-2 human intestinal cell line. *BMC Physiol* 2001; 1: 11.

Worley JF, 3rd, McIntyre MS, Spencer B, Mertz RJ, Roe MW, Dukas ID. Endoplasmic reticulum calcium store regulates membrane potential in mouse islet beta-cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 14359-62.

Wu KD, Lytton J. Molecular cloning and quantification of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoforms in rat muscles. *Am J Physiol* 1993; 264: C333-41.

Wu KD, Lee WS, Wey J, Bungard D, Lytton J. Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoform transcripts. *Am J Physiol* 1995; 269: C775-84.

Wu MP, Kao LS, Liao HT, Pan CY. Reverse mode Na⁺/Ca²⁺ exchangers trigger the release of Ca²⁺ from intracellular Ca²⁺ stores in cultured rat embryonic cortical neurons. *Brain Res* 2008; 1201: 41-51.

Wuytack F, Raeymaekers L, De Smedt H, Eggermont JA, Missiaen L, Van Den Bosch L, De Jaegere S, Verboomen H, Plessers L, Casteels R. Ca(2+)-transport ATPases and their regulation in muscle and brain. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 671: 82-91.

Wuytack F, Papp B, Verboomen H, Raeymaekers L, Dode L, Bobe R, Enouf J, Bokkala S, Authi KS, Casteels R. A sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase 3-type Ca²⁺ pump is expressed in platelets, in lymphoid cells, and in mast cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 1410-6.

Ximenes HM, Kamagate A, Van Eylen F, Herchuelz A. Effect of glucose on the expression level of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase and the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in pancreatic islet cells. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 976: 354-5.

Ximenes HM, Kamagate A, Van Eylen F, Carpinelli A, Herchuelz A. Opposite effects of glucose on plasma membrane Ca^{2+} -ATPase and Na/Ca exchanger transcription, expression, and activity in rat pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 22956-63.

Xu GG, Gao ZY, Borge PD, Jr., Wolf BA. Insulin receptor substrate 1-induced inhibition of endoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake in beta-cells. Autocrine regulation of intracellular Ca^{2+} homeostasis and insulin secretion. *J Biol Chem* 1999; 274: 18067-74.

Xue Y, Fleet JC. Intestinal vitamin D receptor is required for normal calcium and bone metabolism in mice. *Gastroenterology* 2009; 136: 1317-27, e1-2.

Yamagishi N, Miyazaki M, Naito Y. The expression of genes for transepithelial calcium-transporting proteins in the bovine duodenum. *Vet J* 2006; 171: 363-6.

Yamamoto M, Kawanobe Y, Takahashi H, Shimazawa E, Kimura S, Ogata E. Vitamin D deficiency and renal calcium transport in the rat. *J Clin Invest* 1984; 74: 507-13.

Yoshihashi K, Shibuya I, Kanno T. Contribution of $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in maintaining $[\text{Ca}^{2+}]_c$ at a stable state in rat pancreatic islets. *Jpn J Physiol* 1996; 46: 473-80.

Yu R, Hinkle PM. Rapid turnover of calcium in the endoplasmic reticulum during signaling. Studies with cameleon calcium indicators. *J Biol Chem* 2000; 275: 23648-53.

Zeitz U, Weber K, Soegiarto DW, Wolf E, Balling R, Erben RG. Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *FASEB J* 2003; 17: 509-11.

Zhuang L, Peng JB, Tou L, Takanaga H, Adam RM, Hediger MA, Freeman MR.

Calcium-selective ion channel, CaT1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Lab Invest* 2002; 82: 1755-64.

VIII. DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt

- Prof. Dr. Katrin Hartmann und Dr. Karin Weber für ihre engagierte Betreuung und Beratung,
- Sieglinde Hirmer und Karin Begsteiger für ihre tolle Hilfe im Labor,
- dem Graduiertenkolleg 1029 für die hilfreichen Diskussionen und Tipps und insbesondere Dr. Sonja Härtle für die Gewebeproben,
- den Kolleginnen und Kollegen aus der MTK, insbesondere Dr. Astrid Wehner,
- allen, die regelmäßig auf Chewy aufpassen, besonders Kathrin, Anne und Carina,
- meiner Schwester Marion, der ich zu jeder Tages- und Nachtzeit mein Herz ausschütten darf,
- meinen Vorgesetzten, Kolleginnen und Kollegen bei Selectavet für Ihre moralische Unterstützung und für viel Verständnis,
- meiner Familie und meinem Mann und allen anderen, die meine Launen ertragen haben, für ihre Geduld und Unterstützung.

Diese Arbeit wurde gefördert vom Graduiertenkolleg 1029 „Funktionale Genomforschung in der Tiermedizin“ der DFG.