

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H.-G. Gabius

Angefertigt unter der Leitung von
Priv.-Doz. Dr. Dr. R. G. Erben

Endokrine Regulation durch den Vitamin-D-Rezeptor

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

von Ute Zeitz
aus Berlin

München 2003

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla

1. Referent: Priv.-Doz. Dr.Dr. R.G. Erben
2. Referent: Univ.Prof. Dr. W. Schmahl
1. Korreferent: Univ. Prof. E. Wolf
2. Korreferent: Univ. Prof. Dr. J. Braun
3. Korreferent: Priv.-Doz. Dr. M. EL-Matbouli

Tag der Promotion: 18. Juli 2003

Inhaltsübersicht

	Seite
1	Literaturübersicht 1
1.1	Einführung 1
1.2	Vitamin D: Struktur, Metabolismus, Transport 1
1.3	Regulation der 1,25(OH) ₂ D ₃ -Biosynthese 4
1.4	Genomische Wirkungen des Vitamin-D-Hormons 4
1.5	Nicht-genomische Effekte des Vitamin D-Hormons 6
1.6	Physiologische Funktionen des Vitamin D-Hormons 7
1.6.1	Kalzämische Effekte von 1,25(OH) ₂ D ₃ 8
1.6.1.1	Funktionen des Vitamin-D-Hormons im Darm 8
1.6.1.2	Funktionen von 1,25(OH) ₂ D ₃ in der Niere 9
1.6.1.3	Vitamin D-Effekte am Knochen 10
1.6.1.4	Rachitis und Osteomalazie 11
1.6.1.5	Vitamin-D-resistente Rachitis 11
1.6.2	Nicht-kalzämische Vitamin-D-Wirkungen 13
1.7	Verschiedene Tiermodelle und ihre Bedeutung für die Vitamin-D-Forschung 14
2	Kapitel 1: Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D 16
3	Kapitel 2: Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor 31
4	Allgemeine Diskussion 46
4.1	Vergleich unseres Tiermodells mit anderen VDR-Knockout-Modellen 46
4.2	Einfluss diätetischer Maßnahmen auf die Phänotypausprägung 47
4.3	Gewebsresistenz von VDR ^{ΔΔ} -Mäusen gegenüber Vitamin-D-Metaboliten 49
4.4	VDR-vermittelte Effekte auf die Insulinsekretion 51
4.5	Ausblick 52
5	Zusammenfassung 53
	Summary 54
6	Literaturverzeichnis 55
7	Danksagung 65
8	Lebenslauf 66

1 Literaturübersicht

1.1 Einführung

Im ersten Viertel des 20. Jahrhunderts kam es durch die Entdeckung der Vitamine als für die normale Körperentwicklung essentielle Nahrungsbestandteile zu einer Revolution in der Therapie vieler Krankheiten, die man nun erst als Mangelerkrankung erkannte. Auch die damals vor allem in den Industrieländern häufige Rachitis erwies sich nun als heilbar durch die Verabreichung von Lebertran (Mellanby, 1918). Die eigentliche antirachitische Substanz darin wurde 1921 erstmalig als Vitamin D bezeichnet (McCullum et al., 1921) und den anderen bereits bekannten Vitaminen in seiner Bedeutung gleichgestellt. Bereits zur selben Zeit fand man jedoch heraus, dass eine Behandlung der Patienten mit UV-Bestrahlungen denselben therapeutischen Effekt hat wie die Gabe von Vitamin D (Huldschinsky, 1919) bzw. dass die UV-Bestrahlung des Patienten oder des zu verabreichenden Nahrungsmittels vergleichbare Auswirkungen bezüglich der Heilung der Rachitis hat (Hess & Weinstock, 1924; Steenbock & Black, 1924) - eine Erkenntnis, die nicht nur zur fast völligen Ausrottung der Rachitis zumindest in den Industrieländern geführt hat, sondern auch zu den ersten Anhaltspunkten für die Sonderstellung des Vitamin D unter den Vitaminen: Offensichtlich handelt es sich bei Vitamin D nicht um ein essentielles Vitamin, sondern um eine Substanz, die entweder mit der Nahrung aufgenommen oder im Körper selbst synthetisiert werden kann – allerdings nur unter dem Einfluss von UV-Strahlen.

1.2 Vitamin D : Struktur, Metabolismus, Transport

Die Bezeichnung Vitamin D oder Calciferol umfasst eine Gruppe von Substanzen, die ihrer chemischen Struktur nach Steroide sind. Dies ebenso wie einige ihrer Eigenschaften (z.B. die Fähigkeit des Körpers zur Eigensynthese bzw. die endokrine Kontrolle derselben, rezeptorvermittelte Effekte) führte dazu, dass die biologisch aktiven Metaboliten der Calciferole heute als Hormone angesehen werden (Vitamin-D-Hormon oder $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$).

Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe ist das Cholecalciferol (Vitamin D_3). Selbst nicht biologisch aktiv, kann es entweder mit der Nahrung aufgenommen und im Dünndarm resorbiert werden oder es wird in der Epidermis synthetisiert (Holick et al., 1980; Milde, 1991; Bikle & Pillai, 1993). Ausgangsstoff für die körpereigene Synthese ist das 7-Dehydrocholesterol (7-DHC), das in Hepatozyten aus Cholesterin durch das Enzym Cholesterin-7-Hydroxylase entsteht. Im Blutstrom gelangt 7-DHC, wegen seiner hydrophoben Eigenschaften vorwiegend an Transportproteine gebunden, zu den Keratinozyten der Haut. 7-DHC oder

Provitamin D stellt das Hauptreservoir für die Vitamin D-Eigensynthese des Körpers dar. Es handelt sich um ein chromophores Molekül, welches unter dem Einfluss von Photoenergie Isomere bildet (Windaus et al., 1936; Esvelt et al., 1978). 7-DHC findet sich in allen Schichten der Haut, vor allem aber im Stratum basale und Stratum spinosum der Epidermis (Holick et al., 1980). Hier findet auch der größte Teil der Vitamin-D-Synthese statt. Unter dem Einfluss von UV-Strahlen bestimmter Wellenlänge (UVB, 290-315 nm) (MacLaughlin et al., 1982) kommt es zu einer Ringöffnung am Sterangerüst des Moleküls (am B-Ring zwischen C9 und C10). Aus 7-DHC entsteht durch diese photochemische Isomerisierung das rotationsinstabile Prävitamin D (Windaus et al., 1936; Esvelt et al., 1978), das seinerseits langsam in einem temperaturabhängigen Schritt zum stabilen Vitamin D isomerisiert, wobei es zu einer Verschiebung der Doppelbindung kommt. Bei diesem letzten Schritt handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion (Velluz & Amiard, 1949), die abläuft, solange das Produkt Vitamin D aus der Zelle ausgeschleust wird. Über den genauen Übertrittsmechanismus in den Extrazellulärraum ist derzeit noch wenig bekannt, Vitamin-D-Bindungsproteine scheinen jedoch hierfür eine Rolle zu spielen (Haddad et al., 1993). Aufgrund dieses schnellen Abtransportes kann während der gesamten Dauer der UV-Exposition laufend Vitamin D nachgebildet werden - ein Faktor, der vor allem unter Bedingungen limitierter Sonneneinstrahlung (Jahreszeit, Tageszeit, Sonnenschutzmaßnahmen, geographische Lage, Pigmentierung der Haut u.a.) eine große Rolle spielen kann (Webb et al., 1988; Matsuoko et al., 1992; Lu et al., 1992).

Wie bereits erwähnt, besitzt das Vitamin D selbst noch keine biologische Aktivität. Gebunden an Transportproteine gelangt es zur Leber, wo der erste Schritt der Aktivierung stattfindet. Vitamin D ist zwar in der Lage, im Plasma auch an Albumin und Lipoproteine zu binden, die größte Bedeutung haben aber spezifische Vitamin-D-Bindungsproteine. Dabei handelt es sich um eine Gruppe mehrerer sehr ähnlicher Polypeptide (α -Globuline, ca. 58 kDa), die in der Leber synthetisiert werden (Haddad, 1987 und 1992; Cooke & Haddad, 1989; Braun et al., 1992). Diese Proteine liegen in hohem Überschuss frei im Plasma vor und „fangen“ aufgrund ihrer hohen Bindungsaffinität freies Vitamin D und dessen Metaboliten fast vollständig ein. Ihre Funktion als Kurzzeitspeicher für Vitamin D (Langzeitspeicher ist das Fettgewebe im Säuger bzw. die Leber bei manchen Fischen) wird diskutiert. Ihre Hauptfunktion liegt aber darin, die hydrophoben Vitamin-D-Metaboliten plasmagängig und damit an den Zielorten verfügbar zu machen.

In den Hepatozyten findet die erste Metabolisierungs-Stufe des Vitamin D auf dem Weg zur biologischen Aktivierung statt. Es handelt sich dabei um eine Hydroxylierung in der Posi-

tion 25, das beteiligte Enzym ist eine Cytochrom P450-abhängige, mitochondriale Hydroxylase (Andersson et al., 1989; Okuda et al., 1995). Für die Beteiligung anderer Enzyme, auch mikrosomaler, gibt es eine Reihe von Hinweisen, sie konnte bisher aber noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die Regulation dieser Hydroxylierung zu 25-Hydroxycholecalciferol ($25(\text{OH})\text{D}_3$) erfolgt nur über einen Produkthemmungsmechanismus, ist also nicht sehr strikt.

Der zentrale Vitamin-D-Regulationsmechanismus, der eine Überschussproduktion von biologisch aktivem Vitamin D verhindert, greift primär in der Niere, wo $25(\text{OH})\text{D}_3$ durch eine 1α -Hydroxylierung zum $1\alpha,25$ Dihydroxycholecalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) biologisch aktiviert wird. Der Steuerungsfaktor ist die Syntheserate der für diese Hydroxylierung notwendigen 1α -Hydroxylase, die ihrerseits einer Regulation durch Parathormon (PTH), Serum-Phosphat und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ selbst unterliegt (Gray et al., 1972; Henry, 1979). Dieses Enzym ist eine ebenfalls mitochondriale, Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase. Der Vorgang ist streng an die Niere gebunden (Fraser & Kodicek, 1970), weshalb Erkrankungen, die mit einem Funktionsverlust oder Gewebsuntergang der Niere - vor allem im Bereich des proximalen Tubulus (Holick et al., 1972) - einhergehen, häufig mit Störungen des Vitamin-D-Haushaltes und allen daraus resultierenden Folgen verbunden sind.

Liegt das Vitamin-D-Hormon $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Überschuss vor, entsteht in der Niere aus $25(\text{OH})\text{D}_3$ vermehrt der Metabolit $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durch eine Cytochrom P450-abhängige 24-Hydroxylase (Jones et al., 1987). Diese Metabolisierung von $25(\text{OH})\text{D}_3$ zu $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gilt als wichtigste Deaktivierung von $25(\text{OH})\text{D}_3$, da $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gegenüber $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine ca. 10 000mal geringere biologische Aktivität besitzt. Eine eigenständige Funktion von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird diskutiert (Norman et al., 2002). Dieser Metabolit unterliegt selbst aber keiner strengen Regulation, was gegen eine zentrale Bedeutung zumindest im Bereich der Kalziumhomöostase-Regulation spricht (Jones et al., 1987).

Die 24-Hydroxylierung stellt wahrscheinlich auch die erste und wichtigste Stufe der Inaktivierung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in den Zielzellen dar (Lohnes & Jones, 1992). Dabei entsteht der Metabolit $1,24,25$ -Trihydroxycholecalciferol, der eine ca. 5mal geringere biologische Aktivität gegenüber $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ besitzt. Der Katabolismus von Vitamin D ist nicht an ein bestimmtes Organsystem gebunden, wahrscheinlich sind alle Vitamin-D-Zielgewebe dazu in der Lage. Das Endprodukt des Vitamin-D-Stoffwechsels ist die Calcitronsäure, die in der Leber in die Gallenflüssigkeit sezerniert wird (Jones, 1999).

1.3 Regulation der 1,25(OH)₂D₃-Biosynthese

Angesichts der zentralen Bedeutung von 1,25(OH)₂D₃ für die Regulation des extrazellulären Kalziumspiegels unterliegt seine Biosynthese einer strengen Regulation. Soweit heute bekannt ist, stellt PTH die wichtigste Einflussgröße für die Stimulation der 1,25(OH)₂D₃-Biosynthese dar. Das Absinken des Kalziumspiegels im Blut löst eine gesteigerte PTH-Sekretion aus (Brown et al., 1993), die über einen noch nicht näher bekannten Mechanismus wahrscheinlich die Synthese der renalen 1 α -Hydroxylase stimuliert und die Synthese der 24-Hydroxylase hemmt, wodurch es zu einer vermehrten Bildung von 1,25(OH)₂D₃ kommt. Die kalzämischen Effekte von 1,25(OH)₂D₃ in Darm und Niere (siehe unten) führen über eine Erhöhung des Plasmakalziumspiegels wiederum zu einer Reduktion der PTH-Sekretion im Sinne einer negativen Rückkopplungsschleife.

Vermutlich gibt es noch weitere Einflussfaktoren in diesem Regulationssystem. So scheint z.B. 1,25(OH)₂D₃ selbst in der Lage zu sein, die Synthese der 24-Hydroxylase zu stimulieren (Zierold et al., 1994; Ohya et al., 1994). Auch der Plasmaphosphat Spiegel übt eine Wirkung auf die 1,25(OH)₂D₃-Synthese aus. Hypophosphatämie scheint ebenso wie PTH die 1 α -Hydroxylase zu stimulieren und die 24-Hydroxylase zu hemmen (Baxter & DeLuca, 1976; Wu et al., 1996). Der molekulare Mechanismus dieser Effekte ist allerdings noch nicht aufgeklärt.

1.4. Genomische Wirkungen des Vitamin-D-Hormons

1,25(OH)₂D₃ wirkt, wie andere Steroidhormone auch, über die Interaktion mit einem intrazellulären Rezeptor, der eine hohe Bindungsaffinität gegenüber 1,25(OH)₂D₃ besitzt (Brumbaugh & Haussler, 1975). Diese Rezeptoren entsprechen in ihrer Funktion ligandenaktivierbaren, regulatorischen Transkriptionsfaktoren.

Wie Sequenzanalysen gezeigt haben, gehört der Vitamin D-Rezeptor (VDR) innerhalb der Steroidrezeptor-Superfamilie zur Subfamilie (Klasse II) der Schilddrüsenhormonrezeptoren, ebenso wie die Retinsäure-Rezeptoren (RAR) und Retinoid-X-Rezeptoren (RXR) (Baker et al. 1988; Burmester et al., 1988). Das für den Vitamin-D-Rezeptor codierende Gen befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 12(q), bei Ratte und Maus auf Chromosom 7 (Szpirer et al., 1991). Das Gen ist ca. 45 kb lang und umfasst 9 codierende Exons. Zu den typischen Eigenschaften der Schilddrüsenhormon-Rezeptorgruppe gehört auch die Fähigkeit, Heterodimere mit verwandten Rezeptoren zu bilden.

Die Strukturelemente, die allen Nuklearrezeptoren dieser Subfamilie eigen sind, umfassen zwei funktionelle Rezeptordomänen. N-terminal (bei VDR codiert durch die ersten zwei codierenden Exons) bilden zwei „Zinkfinger“ die DNA-Bindungsdomäne (DBD). Diese Region ist innerhalb der Rezeptorfamilie hochkonserviert und ermöglicht nach der Aktivierung des Rezeptors dessen Bindung an so genannte VDREs (Vitamin D responsive elements) in der Promotorregion von Zielgenen. Der C-terminale Bereich des Moleküls umfasst die Hormonbindungsdomäne (bei VDR codiert von Exon 8 und 9) und ist bei den verschiedenen Rezeptoren sehr variabel, entsprechend den unterschiedlichen Liganden.

Die Zinkfinger als Schlüsselemente der DNA-Bindungsregion (hVDR: Aminosäuren 1-113) bestehen aus 8 tetraedrisch angeordneten Cysteinen, die um zentrale Zinkionen α -Helices bilden („loops“). Mit Hilfe von Mutationsanalysen konnten verschiedenen Subdomänen in der DNA-Bindungsregion von Steroidrezeptoren bestimmte Funktionen (z.B. Erkennung responsiver DNA-Elemente, Dimerbildung) zugeordnet werden. Bei VDR scheint vor allem der Bereich unmittelbar C-terminal des ersten Zinkfingers (T-Box) essentiell für die sequenzspezifische DNA-Bindung als Voraussetzung der Transkriptionsaktivierung zu sein (Hsieh et al., 1995). Erhärtet werden diese Vermutungen durch Strukturanalysen verschiedener Nuklearrezeptoren, die Analogieschlüsse auf den VDR zulassen (Luisi et al., 1991; Katahira et al., 1992). Andere Strukturmerkmale der VDR-DNA-Bindungsdomäne weisen darauf hin, dass die Heterodimerisation mit einem RAF (receptor auxiliary factor) Voraussetzung für die DNA-Bindung ist. Die C-terminale Region des Gens codiert einen Rezeptorbereich, der außer der Ligandenbindung noch einige andere Funktionen umfasst wie z.B. Heterodimerisation oder Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren (MacDonald et al., 1995) und Coaktivatoren (vom Baur et al., 1996), die für den Mechanismus der VDR-vermittelten Transkriptionsaktivierung wichtig sind.

Die höchste Ligandenbindungsaffinität besteht gegenüber $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Metaboliten, die nur in der 1α - oder der 25-Position hydroxyliert sind, binden ca. 100- bis 1000mal schwächer (Wecksler et al., 1978). Die Ligandenbindungsregion des VDR umfasst wahrscheinlich ca. 200 – 300 Aminosäuren (AS) C-terminal der AS 114 (hVDR). Hier sind vermutlich auch mehrere für die Heterodimerisation wichtige Bereiche lokalisiert. Soweit heute bekannt ist, bildet VDR nur mit RXR Heterodimere. Die Form der Heterodimerisation wirft allerdings noch viele Fragen auf. Trotz der strukturellen Verwandtschaft beider Rezeptoren scheint es sich nicht um eine achsensymmetrische Heterodimerbildung zu handeln. Die Struktur der bisher bekannten VDREs (2 unvollständige, 6 Basen lange repetitive Sequenzen, getrennt durch

3 Nucleotide) (Umesono & Evans, 1989) impliziert eher eine asymmetrische Bindung beider Partner („Kopf an Schwanz“), wie sie auch bei anderen Klasse II-Steroidrezeptoren vorkommt (Liao et al., 1990; Levin et al., 1992; Schrader et al., 1995; Jin & Pike, 1996).

Der C-terminale Endbereich des Rezeptormoleküls (AS 403 - 427 des hVDR) umfasst die Transaktivierungsdomäne (Nakajima et al., 1994). Entscheidend für die Aktivierung des Rezeptors, die letztlich zur Transkriptionsregulation des Zielgens führt, ist das Zusammenwirken verschiedener Faktoren. Durch die Bindung des Liganden kommt es - wahrscheinlich durch eine Konformationsänderung - zur Heterodimerisation (Peleg et al., 1995). Der primär vorwiegend zytosolische VDR-Ligand-Komplex akkumuliert nach der Ligandenbindung innerhalb weniger Minuten im Kern (Barsony et al., 1990). Begleitet wird die DNA-Bindung (Liao et al., 1990; Sone et al., 1991) wahrscheinlich von verschiedenen kovalenten Modifikationen des Ligand-Rezeptorkomplexes, wie z.B. Phosphorylierungen (Hsieh et al., 1993; Jurutka et al., 1993). Für die Bildung des Präinitiationskomplexes (PIC) der Transkription scheint vor allem der Transkriptionsfaktor TF IIB von entscheidender Bedeutung zu sein (Choy & Green, 1993; MacDonald et al., 1995), der mit dem Rezeptorkomplex interagiert. Einen regulativen Einfluss auf die Transkriptionsrate haben vermutlich verschiedene zusätzliche Transkriptionsfaktoren, Coaktivatoren und Corepressoren, die mit dem Rezeptorkomplex bzw. PIC interagieren (Onate et al., 1995; Chen & Evans, 1995).

1.5 Nicht-genomische Effekte des Vitamin-D-Hormons

Neben diesem „genomischen“ Wirkprinzip ist $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auch in der Lage, in verschiedenen Geweben Effekte zu erzielen, die in Sekunden bis Minuten eintreten und somit nicht auf einem veränderten Proteinsynthesemuster der Zelle beruhen können. Die Existenz solcher „nicht-genomischer“ Effekte ist schon seit längerem bekannt. Über die zugrunde liegenden Mechanismen weiß man jedoch noch immer wenig, ebenso wie über eine mögliche Beteiligung des klassischen VDR daran. Wahrscheinlich gibt es verschiedene Varianten nicht-genomischer Effekte, je nach Zelltyp bzw. Gewebe. Nachgewiesen wurden solche schnellen Effekte inzwischen in der Niere, in der Nebenschilddrüse, im Muskel, in Chondrozyten, in Fibroblasten, in Hepatozyten und in Keratinozyten sowie in Zellen des hämatopoetischen Systems und in Insulinomzellen (Desai et al., 1986; Schwartz et al., 1988; Boudreau et al., 1990; Selles & Boland, 1991; Segrev & Rhoten, 1994). Meist bestehen die Effekte in Veränderungen des intrazellulären Kalziumspiegels, des pH-Wertes sowie der Proteinkinase-C-Aktivität (Duval et al., 1983). Solche Effekte, also die Induktion transmembranärer Signaltransduktionswege konnten inzwischen auch für andere Steroidhormone nachgewiesen werden (Duval

et al., 1983). Am besten untersucht sind die Soforteffekte von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an Osteoblasten und Enterozyten. In Osteoblasten scheint $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ über eine Aktivierung der Phospholipase C und damit des Inositoltriphosphat/Diacylglycerol-Weges einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentrationen zu induzieren (Lieberherr et al., 1994). Zumindest in bestimmten In-vitro-Systemen (ROS 24/1 osteoblast-like cells der Ratte) scheint das Vorhandensein einer VDR-unabhängigen Signaltransduktion nachgewiesen. Diese Zellen exprimieren VDR nicht, trotzdem bewirkt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auch hier einen intrazellulären Kalzium-Anstieg (Baran et al., 1994).

Auch in Enterozyten existiert ein solcher Soforteffekt, der bereits 1984 beschrieben wurde und unter dem Namen „transcaltachia“ bekannt ist (Nemere et al., 1984; Nemere & Norman, 1986, 1987, 1990). Dabei kommt es in vivo innerhalb weniger Minuten (2 - 14) zu einer verstärkten Kalzium-Absorption aus dem Darmlumen durch ladungsgesteuerte Kalzium-Kanäle, begleitet von einer Steigerung der Proteinkinase-C und -A- Aktivität (de Boland & Norman, 1990). Darüber hinaus wird innerhalb von 4 - 8 Minuten auch die Phosphor-Absorption erhöht, gekoppelt an den gesteigerten Kalziueinstrom.

Die Bedeutung des klassischen, nukleären VDR oder von möglicherweise vorhandenen Membran-Rezeptoren für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ beim Zustandekommen nicht-genomischer Effekte wird kontrovers diskutiert (Nemere et al., 1998; Norman, 1998; Norman et al., 2002; Erben et al., 2002; Boyan et al., 2002).

1.6 Physiologische Funktionen des Vitamin-D-Hormons

Die offensichtlichste und damit auch am längsten und besten bekannte Funktion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist seine zentrale Rolle bei der Regulation der Kalziumhomöostase und des Knochenstoffwechsels. Funktionen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, die unmittelbar den Kalziumstoffwechsel betreffen, werden auch als „kalzämische Effekte“ bezeichnet. Ihr Ziel ist primär die Gewährleistung eines in engen Grenzen stabil gehaltenen Plasma-Kalzium-Spiegels (bei Säugtieren ca. 2,5 mmol/l, 45% davon ionisiert), aber auch, im Zusammenspiel mit PTH, die Bereitstellung von Kalzium für die Knochenmineralisation. Miteinbezogen in dieses komplexe Regulationssystem sind vor allem der Dünndarm als Ort der enteralen Kalzium- und Phosphorabsorption, die Nieren als Ort der renalen Kalzium- und Phosphorexkretion bzw. Reabsorption sowie der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Biosynthese und die Nebenschilddrüse als Bildungsort des neben $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wichtigsten regulatorischen Hormons PTH. Besonders zu nennen ist das Knochengewebe, das durch ein unter physiologischen Bedingungen ständig vorhandenes Ne-

beneinander von Knochenabbau und -neusynthese zum einen zwar einen gut mobilisierbaren Kalziumspeicher des Körpers darstellt, zum anderen aber längerfristig besonders auf die Verfügbarkeit von Kalzium und Phosphor zur Erhaltung stabiler, mechanisch belastbarer Knochensubstanz angewiesen ist.

Aus der Tatsache, dass VDR fast ubiquitär im Körper exprimiert wird, kann man schließen, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wahrscheinlich noch eine Vielzahl weiterer Funktionen in unterschiedlichen Geweben besitzt. Über ihre physiologische Bedeutung weiß man bislang allerdings noch wenig.

1.6.1 Kalzämische Effekte von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Die wichtigsten Organe für die kalzämischen Wirkungen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sind Darm, Niere und Knochen.

1.6.1.1 Funktionen des Vitamin-D-Hormons im Darm

Nach dem heutigen Kenntnisstand existieren zwei voneinander unabhängige Kalziumtransportmechanismen in Enterozyten. Erstens ein sättigbarer, transzellulärer Mechanismus, der bei Konzentrationen bis 10 mM vor allem im proximalen Teil des Dünndarms (Duodenum) von Bedeutung ist. Zweitens ein nicht sättigbarer, passiver, interzellulärer Mechanismus, der bei Konzentrationen ab 10 mM bis 50 mM im gesamten Dünndarm vonstatten geht (Johnson & Kumar, 1994; Wasserman & Fullmer, 1995). Im ersten Fall werden Kalziumionen lumenseitig am Bürstensaum entlang des elektrochemischen Gradienten resorbiert, transzellulär transportiert und an der basolateralen Zellmembran gegen den Konzentrationsgradienten mittels eines energieverbrauchenden Prozesses in die extrazelluläre Flüssigkeit der Lamina Propria abgegeben. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ beeinflusst wahrscheinlich alle Teilaspekte dieses transzellulären Kalzium-Absorptions-Systems im Sinne einer gesteigerten Kalziumaufnahme. Bei Vitamin-D-Mangel tritt Kalzium zwar in die Zellen über, bleibt aber im Mikrovillibereich, wo es an Calmodulin bindet. Man nimmt an, dass es dort zur Komplexbildung mit Myosin I (ATPase) und Actin kommt (Bikle et al., 1989; Chandra & Fullmer, 1990; Kaune et al., 1994). Dieser Komplex schließt die Kalziumkanäle möglicherweise irreversibel. Bei ausreichender Vitamin-D-Versorgung wird das aufgenommene Kalzium schnell intrazellulär weitergeleitet, was wahrscheinlich das Offenbleiben der Kalziumkanäle sicherstellt. Für den intrazellulären Transport ist bei Säugetieren das Kalziumbindungsprotein Calbindin D9K verantwortlich, dessen Synthese durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induziert wird (Feher et al., 1992). Bei Kalziummangel im Organismus kommt es über eine erhöhte Parathormon-Sekretion zu einer ge-

steigerten $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Biosynthese, die ihrerseits zu verbesserter enteraler Kalziumaufnahme führt. Die Resorption von Phosphat erfolgt im gesamten Jejunum und Ileum. Sie kann zwar durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimuliert werden, ist aber primär von der Phosphatkonzentration im Darmlumen abhängig (Lemann, 1993).

Außer den beschriebenen Mechanismen existieren wahrscheinlich noch weitere, möglicherweise nicht Vitamin-D-abhängige Wege der Kalziumresorption, unter anderem der bereits erwähnte „Soforteffekt“ (transcaltachia), dessen genauer Mechanismus noch der Klärung bedarf (Nemere et al., 1990).

1.6.1.2 Funktionen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Niere

Die Niere ist in zweifacher Hinsicht ein Schlüsselorgan der Kalziumhomöostase. Zum einen ist sie Syntheseort von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, zum anderen wichtigstes Regulativ der Kalzium- und Phosphatexkretion bzw. -reabsorption. Bis zu 98% des in den Primärharn abgegebenen Kalziums werden reabsorbiert, allerdings scheinen die zugrunde liegenden Mechanismen und die beteiligten Faktoren nicht auf der gesamten Tubuluslänge einheitlich zu sein. Nach dem heutigen Kenntnisstand findet im proximalen Tubulus vorwiegend passiver, parazellulärer Transport statt (ca. 65% des filtrierte Kalzium-Loads), in der Henleschen Schleife aktiver und passiver Transport (ca. 20% des filtrierte Kalzium-Loads). Im distalen Tubulus, der Schlüsselstelle der Regulation, bzw. im Sammelrohr werden über ein aktives Transportsystem noch bis zu 10% des filtrierte Kalzium-Loads reabsorbiert (Yamamoto et al., 1984; Friedman & Gesek 1995). Die wichtigsten endokrinen Faktoren in der Regulation der renalen Kalziumreabsorption sind vermutlich PTH sowie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Friedman & Gesek, 1995).

Viele Details der selektiven Kalzium- und Phosphat-Reabsorption sind heute noch nicht bekannt, die Grundprinzipien ergeben sich aber aus beobachtbaren Wechselwirkungen zwischen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und PTH: PTH ermöglicht wahrscheinlich den aktiven Übertritt von Kalzium apikal durch die Membran, wobei dieser Prozess eventuell durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ über eine Induktion der Synthese von PTH-Rezeptormolekülen gesteuert wird (Friedman & Gesek, 1993). Für den Übertritt aus den Tubuluszellen basolateral in die Blutbahn werden verschiedene Transportsysteme vermutet, eine Plasmamembran-Kalziumpumpe (PMCA) scheint jedoch von zentraler Bedeutung zu sein (Friedman & Gesek, 1995).

Die beiden wichtigsten intrazellulären Kalziumbindungsproteine in der Niere, Calbindin D28K und Calbindin D9K unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Struktur, sondern wahrscheinlich auch in ihrer Funktion. Während Calbindin D28K primär den apikalen Trans-

port durch Kalziumkanäle - vielleicht auch als Carrier die transzelluläre Weiterleitung - zu stimulieren scheint, beschleunigt Calbindin D9K wahrscheinlich vor allem die basolaterale Ausschleusung über die ATP-abhängige Plasmamembran-Kalziumpumpe. Da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ über eine Transkriptionsaktivierung die Syntheserate beider Proteine positiv beeinflusst, spielt es vermutlich auch hier eine entscheidende Rolle für die renale Kalziumrückresorption (Bouh-tiay et al., 1994; Koster et al., 1995; Liu et al., 1996).

Neben diesen Effekten besitzt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wahrscheinlich weitere Funktionen in der Niere. So wird z.B. eine Hemmung des Phosphattransports im proximalen Tubulus diskutiert (Bonjour et al., 1977). Die Tatsache, dass VDR im gesamten Tubulusbereich, vom Glomerulum bis zum Sammelrohr exprimiert wird (Liu et al., 1996), legt die Vermutung nahe, dass noch weitere, unentdeckte Vitamin-D-Effekte existieren.

1.6.1.3 Vitamin D-Effekte am Knochen

Auch im adulten Organismus besteht im Knochengewebe ein ständiges Fließgleichgewicht von Resorption und Neusynthese (bone remodeling). Wie bereits erwähnt, stellt die mineralische Knochensubstanz auch einen wichtigen Speicher für die Erhaltung der Kalzium- und Phosphathomöostase dar. Der Haupteinflussfaktor für die Regulation des Knochenturnovers ist PTH. Die Rolle von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird derzeit noch kontrovers diskutiert.

VDR wird sowohl in Osteoblasten als auch in Osteoklasten-Vorläuferzellen exprimiert. Viele osteoblastäre Matrixproteine wie Osteocalcin, Osteopontin, Bone Sialoprotein und Kollagen Typ I werden durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reguliert (Boyan et al., 1992; Lian & Stein, 1993), so dass vieles für einen unmittelbaren knochenanabolen Effekt von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ spricht. Es gibt auch Anhaltspunkte für eine Beteiligung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an resorptiven Prozessen, wie z.B. bei der Osteoklastenreifung. Gesichert ist, dass die hochdosierte, pharmakologische Gabe von Vitamin-D-Metaboliten eine direkte Stimulation der Knochenresorption induziert (Holtrop et al., 1981; Erben et al., 1997). Ob dieser Effekt allerdings von physiologischer Bedeutung ist, ist unklar.

In den letzten Jahren sind eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt worden, die es sehr wahrscheinlich gemacht haben, dass die knochenprotektive Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in vivo primär in seinen kalzämischen Effekten in Darm und Niere, also in der Steigerung des Plasmakalziumspiegels zu suchen ist. Untermauert wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass im Tiermodell bei Mäusen mit inaktiviertem VDR allein durch die Fütterung mit einer Kalzium-, Phosphat- und Laktose-angereicherten Diät eine Normalisierung nicht nur des

Plasmakalziumspiegels, sondern auch der Knochenmineralisierung erreicht werden kann (Li et al., 1998). Ähnliche Ergebnisse wurden bereits früher bei Vitamin-D-defizienten Ratten erzielt, deren Kalziumhomöostase durch Infusion mit Kalzium oder durch diätetische Maßnahmen normalisiert wurde (Underwood & DeLuca, 1984; Kollenkirchen et al., 1991a; Kollenkirchen et al., 1991b). Diese Daten sprechen dafür, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ keine physiologisch relevante, direkte Funktion am Knochen besitzt.

1.6.1.4 Rachitis und Osteomalazie

Als Rachitis und Osteomalazie werden Vitamin-D-Mangelsyndrome bei wachsenden bzw. adulten Individuen bezeichnet. Sie entstehen entweder durch eine mangelnde Aufnahme bzw. Eigensynthese von Vitamin D, durch Störungen im Vitamin-D-Metabolismus, oder durch Funktionsstörungen im Bereich des Rezeptors oder der Transaktivierung.

Fehlt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (oder seine Wirkung), führt dies letztlich immer zu einer Hypokalzämie, weil die enterale Aufnahme und die renale Rückresorption von Kalzium eingeschränkt sind. Dies löst wiederum eine verstärkte PTH-Sekretion aus. Es kommt zu gravierenden Störungen des Knochenstoffwechsels, zum einen durch den Kalziummangel (bzw. das Missverhältnis von Kalzium und Phosphat im Plasma) und die daraus resultierende verringerte Mineralisierung der Knochenmatrix, zum anderen durch die fehlregulierte Matrixsynthese und die PTH-induzierte erhöhte Knochenabbaurate. Die Folge ist eine mechanische Instabilität des Knochens, die vor allem am wachsenden Skelett zu schweren klinischen Symptomen wie Wachstumsretardierung, Deformationen vor allem der langen Röhrenknochen und überschießender Matrixproduktion an den Epiphysenfugen führt, begleitet von Knochenschmerzen, Hypokalzämie und -phosphatämie sowie sekundärem (reaktiven) Hyperparathyreoidismus. Im adulten Organismus findet sich vor allem eine erhöhte Frakturanfälligkeit und eine röntgenologisch nachweisbare Verringerung der Knochenmineraldichte (Garabedian & Ben-Mekhbi, 1999).

1.6.1.5 Vitamin-D-resistente Rachitis

Schon aus der Anfangszeit der gezielten Rachitisbekämpfung mit Vitamin D sind einzelne, seltene Fälle von Therapieresistenz bekannt. Der zugrunde liegende Mechanismus konnte jedoch erst nach der Aufklärung des Metabolismus bzw. der Wirkungsmechanismen von Vitamin D definiert werden (Baker et al., 1988; Pike, 1992). Inzwischen unterscheidet man zwei verschiedene Typen der so genannten Vitamin-D-abhängigen Rachitis. In beiden Fällen handelt es sich um einen seltenen, autosomal rezessiv vererbten Gendefekt.

Typ I (VDDR I) bezeichnet einen Funktionsdefekt der renalen 1α -Hydroxylase (Labuda et al., 1992; Fu et al., 1997). Betroffen ist also nur die letzte Stufe der Vitamin-D-Aktivierung, was zur Folge hat, dass durch eine lebenslange Therapie mit physiologischen Dosen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,25 – 1 $\mu\text{g}/\text{Tag}$) völlige Symptombefreiung gewährleistet ist. Deshalb wird diese Form auch als „Pseudo-Vitamin D-abhängige Rachitis“ bezeichnet (Malloy & Feldman, 1999).

Beim Typ II der Vitamin-D-abhängigen Rachitis (VDDR II) hingegen liegen Mutationen im VDR-Gen vor. Dabei kennt man inzwischen mehrere verschiedene Mutationsvarianten, die sich je nach ihrer Lokalisation auf dem Gen hinsichtlich ihrer Folgen für die Liganden- und DNA-Bindungsaffinität des VDR unterscheiden. Es kommt aber immer zu einer mehr oder minder vollständigen Gewebsresistenz gegenüber $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Brooks et al., 1978). Eine Therapie mit Vitamin-D-Metaboliten ist daher nur sehr eingeschränkt möglich. Gute Erfolge wurden mit einer hochdosierten, oralen Supplementierung von Kalzium erreicht (Balsan et al., 1986). In ca. der Hälfte der Fälle tritt als zusätzliches Symptom eine totale Alopezie auf, die im Gegensatz zur ebenfalls vorhandenen Hypokalzämie, Hypophosphatämie und dem sekundären Hyperparathyreoidismus therapeutisch nicht beeinflusst werden kann (Demay, 1999; Malloy & Feldman, 1999).

Nach dem heutigen Stand der Forschung handelt es sich bei den verschiedenen Varianten fast immer um Punktmutationen, die im Zusammenhang mit den jeweiligen Phänotypvarianten Aufschluss geben über die VDR-Genbereiche, die für die Rezeptorfunktion essentiell sind. Mutationen in der DNA-Bindungsregion führen häufig zu einem Verlust der DNA-Bindungsfähigkeit und damit zum Totalverlust der Rezeptorfunktion, ebenso wie Mutationen, die einen vorzeitigen Abbruch der Transkription und damit die Entstehung eines trunkeierten Rezeptors zur Folge haben (Hughes et al., 1988; Sone et al., 1989, 1990; Yagi et al., 1993; Malloy et al., 1994; Malloy & Feldman 1999). Bei Mutationen in anderen Bereichen des Gens, vor allem der Hormon-Bindungsregion, entsteht kein einheitlicher Phänotyp. Die Auswirkungen reichen von kompletter Gewebsresistenz bei Verlust der Ligandenbindungsfähigkeit über verschiedene Abstufungen verringerter Bindungsaffinität bis hin zu völlig normaler Rezeptorfunktion (Ritchie et al., 1989; Malloy et al., 1990, 1997; Kristjansson et al. 1993; Wiese et al., 1993), je nachdem, welche Auswirkungen die Mutation auf die Proteinstruktur hat.

Die zum Teil auftretende Alopezie wird meist in Verbindung mit Mutationen in der DNA-Bindungsregion gesehen, jedoch nicht in allen Fällen. Über ihre Entstehung gibt es derzeit keine gesicherten Erkenntnisse (Malloy & Feldman, 1999).

1.6.2 Nicht-kalzämische Vitamin-D-Wirkungen

In den späten 70er Jahren entdeckte man erstmalig Rezeptoren für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in den Zellkernen in Gonaden, Thymus, Hypophyse, Pankreas, Magen, Zähnen, Plazenta, Herzmuskel und Haut (Stumpf et al., 1979, 1983 und 1984; Kim et al., 1983), in Zellen des Immunsystems wie Monozyten, B- und T-Lymphozyten, und Makrophagen (Bhalla et al., 1983; Tsoukas et al., 1984; Provvedine et al., 1986), sowie in verschiedenen Tumorzelllinien.

Die Beobachtung, dass viele Krebszellen in vivo ebenso wie in vitro VDR exprimieren, hat im Zusammenhang mit der bekannten antiproliferativen Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zur Einbeziehung von Vitamin D bzw. Vitamin-D-Analoga in die Entwicklung neuer Ansätze in der Krebstherapie geführt. Inzwischen haben sich Vitamin-D-Analoga als effektive Proliferationshemmer in verschiedenen In-vitro-Systemen (Colston et al., 1981; Halline et al., 1994) bewährt, auch im Tiermodell gibt es erste Erfolge (van Leeuwen et al., 1999).

In der Haut konnten Rezeptoren für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bisher in Epidermiszellen (Stratum basale, spinosum und granulosum) sowie in der Wurzelscheide des Haarfollikels (Stumpf et al., 1979) und in Hautfibroblasten nachgewiesen werden (Stumpf et al., 1984; Smith et al., 1986). Die Wirkung besteht auch hier primär in einer Hemmung der Proliferation bzw. Stimulation der Zelldifferenzierung (Smith et al., 1986; Bikle et al., 1993), wobei es sich wahrscheinlich um einen genomischen Effekt handelt (fehlt bei VDDR II-Patienten). Vitamin D und verschiedene Analoga werden bereits erfolgreich bei der Behandlung hyperproliferativer Hautkrankheiten wie z.B. der Psoriasis eingesetzt (Reichrath & Holick, 1999). In den Gonaden und im Muskelgewebe lassen sich ebenfalls antiproliferative Effekte von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ beobachten. Für letztere Wirkungen scheinen Soforteffekte an Kalziumkanälen eine Rolle zu spielen, die in vitro an Sertolizellen (Akerstrom & Walters, 1992) und an Cardiomyozyten (Walters et al., 1987) nachgewiesen wurden. Eine mögliche Bedeutung des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ für die Kontrolle der Inotropie der Ventrikelmuskulatur wird diskutiert (Weishaar & Simpson, 1989). Die Aussagen bezüglich der Effekte an VDR-exprimierenden Zellen des Immunsystems sind sehr widersprüchlich. Es existieren viele In-vitro-Einzelbeobachtungen, die tendenziell auf eine antiproliferative Wirkung hindeuten, sich jedoch nicht zu einem einheitlichen Bild zusammenfügen lassen. VDDR II-Patienten zeigen im Regelfall keine erhöhte Infektanfälligkeit

(Malloy & Feldman, 1999). Dagegen leiden Vitamin-D-Mangelpatienten vermehrt unter Infektionen, vor allem der Atemwege und des Verdauungstraktes (Garabedian & Ben-Mekhbi, 1999). Wahrscheinlich verschleiern die vielfältigen Wechselwirkungen der Einzelkomponenten des Immunsystems in vivo die Effekte von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mehr oder weniger stark, so dass Aussagen über spezifische Effekte nur sehr schwer zu machen sind.

Schon in den 70er Jahren konnte im endokrinen Pankreas des Huhnes nicht nur VDR, sondern auch ein Vitamin-D-abhängiges Kalziumbindungsprotein nachgewiesen werden. Ferner war aus klinischen Studien bekannt, dass es Wechselwirkungen zwischen Kalziumhomöostase und der Funktion des endokrinen Pankreas gibt (Norman et al., 1980). Seit dieser Zeit wurden eine ganze Reihe von tierexperimentellen und In-vitro-Untersuchungen unternommen, um die genaue Rolle von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei der Regulation der Insulin-Synthese und/oder -Sekretion aufzuklären. Eine Schwierigkeit bei diesen Untersuchungen war stets, molekulare Effekte von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ von den Effekten einer veränderten Kalziumhomöostase zu separieren.

1.7 Verschiedene Tiermodelle und ihre Bedeutung für die Vitamin-D-Forschung

Bis in die zweite Hälfte der 90er Jahre konzentrierte sich die Forschung im Wesentlichen auf zwei Möglichkeiten, Vitamin-D-Effekte in vivo zu beschreiben: induzierte Vitamin-D-Mangelsituationen oder VDDR II-Humanstudien. Da es sich um einen seltenen Gendefekt (seit 1978 ca. 40 Familien dokumentiert) mit uneinheitlichem Genotyp und Phänotyp handelt, ist die Zahl vergleichbarer Probanden klein. Darüber hinaus gehören sie unterschiedlichen Rassen und Kulturkreisen an, so dass weder der genetische Hintergrund noch die Lebensbedingungen einheitlich sind.

Die grundlegenden Einblicke in die Mechanismen der Vitamin-D-Wirkung in vivo stammen vor allem aus tierexperimentellen Studien mit Vitamin-D-defizienten Ratten (z.B. Underwood & DeLuca, 1984; Cade & Norman, 1986, 1987; Kollenkirchen et al., 1991a; Kollenkirchen et al., 1991b). Diese Tiermodelle erlauben zwar einen Einblick in die komplexen Wechselbeziehungen des Vitamin-D-Stoffwechsels, über die molekularen Grundlagen der beteiligten Prozesse sagen sie aber oft nur wenig aus. Weitere Probleme dieser Studien waren in der Regel, dass sich aufgrund der äußerst effektiven kutanen Synthese von Vitamin D bei Ratten oder Restgehalten von Vitamin D in der Mangel-Diät die zirkulierenden $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegel nicht unter ein bestimmtes Rest-Niveau drücken ließen, und dass trotz diätetischer

Korrekturmaßnahmen noch subtile Veränderungen der Kalziumhomöostase bestehen blieben (Walters et al., 1992).

Seit vielen Jahren ist ein durch Zufall entstandenes Schweinemodell bekannt, das eine genetisch bedingte Funktionsstörung der renalen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Metabolisierung aufweist und damit der VDDR I des Menschen ähnelt (Kaune & Harmeyer, 1987). Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit und des nach wie vor ungeklärten molekularen Defektes in diesen Tieren (Axen et al., 1998), ist dieses Modell jedoch bisher nur für einige wenige Bereiche der Vitamin-D-Forschung eingesetzt worden.

Es lag deshalb nahe, mit Hilfe von embryonaler Stammzell-Technologie Mausmodelle des VDDR II zu generieren. Im Jahr 1997 wurde zum ersten Mal eine Maus mit gezielt inaktiviertem VDR vorgestellt. Dabei wurde der erste Zinkfinger des VDR mutiert. Diese VDR-Knockout-Mutante unterscheidet sich jedoch in einigen grundlegenden Merkmalen vom Phänotyp der VDDR II des Menschen. Homozygote Mutanten zeigen Rachitis und Alopezie, zusätzlich jedoch Infertilität infolge Uterushypoplasie sowie eine stark erniedrigte Lebenserwartung (Yoshizawa et al., 1997). Nur wenig später wurde eine zweite VDR-deletierte Maus generiert (Li et al., 1997). In diesem Fall wurde eine gezielte Mutation in dem Sequenzbereich, der den zweiten Zinkfinger der DNA-Bindungsregion umfasst, durchgeführt, was zu Leserasterverschiebung und damit zum vorzeitigen Abbruch der Transkription führt. Diese Maus entspricht in ihrem Phänotyp weitgehend dem VDDR II-Krankheitsbild des Menschen, ist durch Rachitis und Alopezie bei normaler Lebenserwartung charakterisiert und zeigt auch keine Störungen der Fertilität.

Unabhängig von den beiden oben genannten Mausmodellen war es auch Ziel unserer Arbeitsgruppe, ein Mausmodell mit inaktiviertem VDR zu erzeugen. Ähnlich der von Yoshizawa et al. (1997) erzeugten Mutante war es unsere Strategie, durch homologe Rekombination das für den ersten Zinkfinger codierende Exon 2 des VDR zu deletieren. Im Unterschied zu den beiden oben beschriebenen Modellen inserierten wir anstelle des Exons 2 jedoch eine bakterielle β -Galaktosidase (*LacZ*) als Reporter gen. Das Reporter gen steht somit unter Transkriptions-Kontrolle des endogenen VDR-Promotors und erlaubt so, das VDR-Expressionsmuster in der Maus während der Ontogenese und postnatal gewebespezifisch darzustellen. Es war unser Ziel, mit Hilfe dieser Mausmutante wichtige Fragen zur Rolle des Vitamin-D-Hormons für die endokrine Kontrolle der Sexualhormon-Sekretion und der Insulinsekretion zu untersuchen. Zusätzlich sollte dieses Modell dazu benutzt werden, die Funktion des klassischen, nukleären VDR in der Vermittlung von nicht-genomischen Effekten zu studieren.

2 Kapitel 1

Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D

**Reinhold G. Erben, Desi W. Soegiarto, Karin Weber, Ute Zeitz, Michèle Lieberherr,
Robert Gniadecki, Gabriele Möller, Jerzy Adamski, and Rudi Balling**

Institute of Animal Physiology, Ludwig Maximilians University, Veterinärstrasse 13, 80539
Munich, Germany (R.G.E., K.W., U.Z.)

Institute of Mammalian Genetics, GSF National Research Center for Environment and Health,
Ingolstädter Landstrasse 1, 85764 Neuherberg, Germany (D.W.S., R.B.)

CNRS UPR 1524 Bat 230, LNSA, INRA, 78 350 Jouy-en-Josas, France (M.L.)

Department of Dermatology D92, Bispebjerg Hospital, Bispebjerg Bakke 23, 2400 Copenha-
gen NV, Denmark (R.G.)

Institute of Experimental Genetics, GSF National Research Center for Environment and
Health, Ingolstädter Landstrasse 1, 85764 Neuherberg, Germany (G.M., J.A.)

Deletion of Deoxyribonucleic Acid Binding Domain of the Vitamin D Receptor Abrogates Genomic and Nongenomic Functions of Vitamin D

REINHOLD G. ERBEN, DESI W. SOEGIARTO*, KARIN WEBER, UTE ZEITZ, MICHÈLE LIEBERHERR, ROBERT GNIADDECKI, GABRIELE MÖLLER, JERZY ADAMSKI, AND RUDI BALLING†

Institute of Animal Physiology, Ludwig Maximilians University (R.G.E., K.W., U.Z.), 80539 Munich, Germany; Institute of Mammalian Genetics, GSF National Research Center for Environment and Health (D.W.S., R.B.), 85764 Neuherberg, Germany; National Center for Scientific Research, UPR 1524, National Institute of Agricultural Research (M.L.), 78 350 Jouy-en-Josas, France; Department of Dermatology D92, Bispebjerg Hospital (R.G.), 2400 Copenhagen NV, Denmark; and Institute of Experimental Genetics, GSF National Research Center for Environment and Health (G.M., J.A.), 85764 Neuherberg, Germany

The vitamin D hormone 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25-(OH)₂D₃], the biologically active form of vitamin D, is essential for an intact mineral metabolism. Using gene targeting, we sought to generate vitamin D receptor (VDR) null mutant mice carrying the reporter gene *lacZ* driven by the endogenous VDR promoter. Here we show that our gene-targeted mutant mice express a VDR with an intact hormone binding domain, but lacking the first zinc finger necessary for DNA binding. Expression of the *lacZ* reporter gene was widely distributed during embryogenesis and postnatally. Strong *lacZ* expression was found in bones, cartilage, intestine, kidney, skin, brain, heart, and parathyroid glands. Homozygous mice are a phenocopy of mice totally lacking the VDR protein and showed growth retardation, rickets, secondary hyperparathyroidism, and alopecia. Feeding of a diet

high in calcium, phosphorus, and lactose normalized blood calcium and serum PTH levels, but revealed a profound renal calcium leak in normocalcemic homozygous mutants. When mice were treated with pharmacological doses of vitamin D metabolites, responses in skin, bone, intestine, parathyroid glands, and kidney were absent in homozygous mice, indicating that the mutant receptor is nonfunctioning and that vitamin D signaling pathways other than those mediated through the classical nuclear receptor are of minor physiological importance. Furthermore, rapid, nongenomic responses to 1,25-(OH)₂D₃ in osteoblasts were abrogated in homozygous mice, supporting the conclusion that the classical VDR mediates the nongenomic actions of 1,25-(OH)₂D₃. (*Molecular Endocrinology* 16: 1524–1537, 2002)

THE VITAMIN D hormone 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25-(OH)₂D₃], the biologically active form of vitamin D, is essential for the active intestinal uptake of calcium and for an intact mineral metabolism (1). 1,25-(OH)₂D₃ acts through a nuclear receptor, the vitamin D receptor (VDR), which is a member of the nuclear receptor superfamily (2). The VDR regulates gene transcription by binding to vitamin D-responsive elements (VDRE) in the promoter region of target genes. Functional inactivation of the VDR by a genetic defect in the VDR gene results in hereditary vitamin D-dependent rickets type II in humans, an autosomal recessive disease characterized by severe rickets and alopecia (3). Recently, three mouse models of this disorder have been generated by targeted ablation of the VDR (4–6).

The role of 1,25-(OH)₂D₃ in active tubular reabsorption of calcium in the kidney is still controversial. Both *in vivo* and *in vitro* studies have demonstrated that 1,25-(OH)₂D₃ is able to stimulate transcellular calcium transport in the distal nephron (reviewed in Refs. 7 and 8). Transcellular calcium transport in distal tubule cells is a multiple-step process and involves calcium entry at the apical membrane, intracellular calcium diffusion, and active extrusion at the basolateral membrane (reviewed in Ref. 7). The stimulatory action of 1,25-(OH)₂D₃ on distal renal tubular calcium reabsorption may involve induction of the intracellular calcium-binding proteins calbindin D_{9k} (9) and calbindin D_{28k} (10). In the kidney of VDR-ablated mice, the mRNA levels of calbindin D_{9k} were found to be strongly down-regulated (4, 6, 11), while those of calbindin D_{28k} were only moderately decreased (11) or unchanged (6). Moreover, the recently cloned and characterized apical epithelial calcium channels (ECaC1 and -2; calcium transport protein1, CaT1, is a synonym for ECaC2) may also play an important role in the 1,25-(OH)₂D₃-induced increase in renal transcellular calcium transport (12–15). In this context, it has been shown that

Abbreviations: Δ/Δ, Homozygous; 1,25-(OH)₂D₃, 1,25-dihydroxyvitamin D₃; 24,25-(OH)₂D₃, 24,25-dihydroxyvitamin D₃; ECaC, epithelial calcium channel; ES, embryonic stem; GST, glutathione-S-transferase; KH1060, 20-epi-22-oxa-24a,26a,27a-trihomo-1,25-(OH)₂D₃; VDR, vitamin D receptor; VDRE, vitamin D-responsive element; wt/Δ, heterozygous; wt/wt, wild-type.

VDRE are localized in the promoter region of the human (16) and murine (17) ECaC1 genes, that ECaC1 mRNA and protein levels are decreased in the kidney of vitamin D-deficient rats (18), and that systemic treatment with high dose 1,25-(OH)₂D₃ increases the renal mRNA levels of ECaC1 and -2 in mice (6). However, data on the physiological importance of these effects *in vivo* are not available at present.

Besides the role of 1,25-(OH)₂D₃ in the regulation of gene transcription, a number of cellular and tissue responses to vitamin D metabolites have been described that occur within seconds to minutes (19, 20). These rapid, nongenomic actions of 1,25-(OH)₂D₃ are believed to be mediated by a putative membrane receptor (20, 21) and include activation of the phospholipase C pathway (22), activation of the adenylate cyclase pathway (23), opening of L-type, voltage-gated Ca²⁺ channels in the plasma membrane (23–25), or Ca²⁺ mobilization from the endoplasmic reticulum (26) in different cell types. However, the physiological significance of nongenomic actions of 1,25-(OH)₂D₃ is unclear.

To investigate further the functions of 1,25-(OH)₂D₃ in skeletal and extraskeletal tissues we sought to generate VDR null mutant mice by targeted disruption of the first zinc finger of the VDR. To monitor expression of VDR, a *lacZ* reporter gene cassette driven by the endogenous VDR promoter was introduced into the targeting vector. Here we show that our gene-targeted mutant mice expressed a VDR with an intact hormone binding domain, but lacking the first zinc finger necessary for DNA binding. These mutant mice show rickets, secondary hyperparathyroidism, growth retardation, and alopecia and are a phenocopy of mice totally lacking the VDR protein (4–6). After correction of calcium homeostasis by dietary means, homozygous mutants revealed a profound molecular defect in renal calcium reabsorption. Furthermore, genomic and nongenomic responses to vitamin D metabolites were absent in homozygous mutant mice, suggesting that the classical, nuclear VDR is the receptor mediating both genomic and nongenomic actions of 1,25-(OH)₂D₃.

RESULTS

Expression of a Mutant VDR in Gene-Targeted Mice

To generate VDR null mutant mice, we replaced the second exon and part of the second intron of the genomic VDR sequence with the bacterial *lacZ* reporter gene cassette and a neomycin phosphotransferase (*neo*) cassette by embryonic stem cell technology (Fig. 1, A and B). Heterozygous animals showed no defects, and homozygous animals were generated at the expected Mendelian frequency. To our surprise, Northern analysis showed that homozygous gene-targeted mice expressed a VDR transcript of similar length as the wild type in duodenum and kidney (Fig. 1C). Subsequent RT-PCR analysis of RNA from duo-

denum and kidneys using primers located in exons 1, 2, 3, and 7 revealed the presence of exons 1, 3, and 7, but not of exon 2, in the VDR mRNA in gene-targeted mice (Fig. 1D). When 5' and 3' primers in exons 1 and 7, respectively, were used, the RT-PCR product from homozygous mice was shorter compared with that in wild-type animals (Fig. 1D). The PCR products from homozygous gene-targeted mice were sequenced and found to be authentic VDR with a deletion of 148 bp corresponding to exon 2 (data not shown). The finding that a RT-PCR product could be amplified using primers in exons 1 and 7 indicated that the *lacZ* and *neo* cassettes located between exons 1 and 3 of the targeted VDR genomic sequence were obviously spliced out during mRNA processing. The fact that most of intron 2 of the VDR gene was left intact in the targeting construct may facilitate such splice mechanisms. It is not known whether the intron 2 contains regulatory sequences. To rule out tissue-specific splicing of the VDR transcripts in the mutant animals, we performed RT-PCR analysis on RNA from kidney, duodenum, testis, ovary, skin, and primary osteoblast cultures. Using primers located in exons 1, 3, and 7 of the VDR, the same RT-PCR products were present in all tissues examined (Fig. 1E). Thus, we found no evidence for tissue-specific splice mechanisms. The tissue distribution of the mutant VDR mRNA in homozygous mice paralleled that in wild-type mice (Fig. 1E).

Because of the presence of a second ATG codon at the beginning of exon 3 of the murine VDR, in-frame translation of the mutant VDR mRNA starting with methionine 52 would be conceivable. Therefore, we next asked whether the VDR mRNA in the gene-targeted mice would give rise to a mutant VDR protein lacking the first zinc finger. Western analysis using a polyclonal anti-VDR antibody reacting with the C-terminal region confirmed the presence of a VDR protein in the mutant mice (Fig. 1F). The expected difference in molecular mass of about 4 kDa was too small to result in visible changes in protein motility in SDS-PAGE. Immunohistochemistry with a monoclonal anti-VDR antibody directed against an epitope in the region just C-terminal of the second zinc finger (amino acids 89–105) revealed expression of the mutant receptor in duodenal epithelial cells of homozygous mice (Fig. 1G). Similar to the wild-type mice, the mutant VDR protein was mainly localized in the nuclei of the mucosa cells. To examine whether the mutant VDR protein would bind 1,25-(OH)₂D₃ with normal affinity, we performed competitive binding experiments with nuclear extracts from duodenum of wild-type and homozygous mutant mice as well as with human recombinant VDR. The mutant receptor bound radiolabeled 1,25-(OH)₂D₃ with similar affinity ($K_d = 0.80$ nM) compared with wild-type ($K_d = 0.36$ nM) or human recombinant VDR ($K_d = 0.62$ nM). To investigate whether the mutant VDR could still bind DNA, we performed gel mobility shift experiments with wild-type mouse VDR and the N-terminal truncated form of murine VDR (lacking the first 51 amino acids) present in our mutant mice. Both proteins were cloned from mouse duodenal cDNA and overexpressed

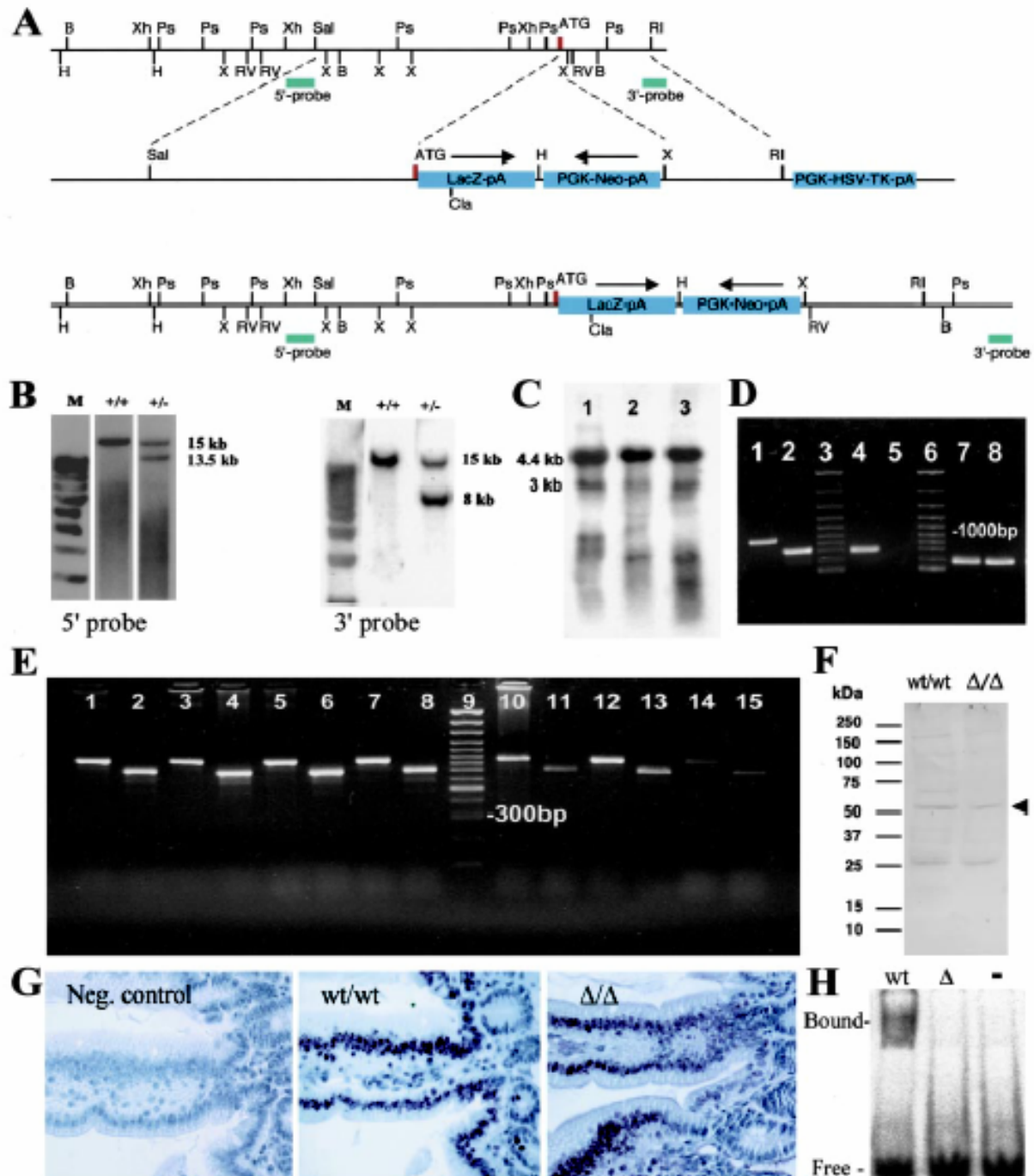


Fig. 1. Targeting Strategy and Expression of Mutant VDR in Gene-Targeted Mice

A, Targeting of the VDR gene. Top, Wild-type VDR locus. The ATG codon of exon 2 is shown in red. Middle, Structure of targeting vector. Bottom, Mutant allele. Probes used for Southern blot analysis are indicated in green. Arrows indicate the direction of translation. B, BamHI; Cla, ClaI; H, HindIII; Ps, PstI; Rl, EcoRI; RV, EcoRV; Sal, SalI; X, XbaI; Xh, XhoI. B, Southern blot analysis of DNA from wild-type and heterozygous, gene-targeted ES cells digested with HindIII and ClaI for analysis of the 5' region (left) and with HindIII for analysis of the 3' region (right). Fragments: wild-type 15 kb, and mutant 13.5 kb (5' probe) and 8 kb (3' probe). C, Northern analysis of total RNA (10 μ g/lane) isolated from duodenum of wild-type (lane 1), heterozygous (lane 2), and homozygous (lane 3) mice, hybridized with a 0.7-kb VDR-specific probe. D, RT-PCR analysis of RNA isolated from kidney of wild-type (lanes 1, 4, and 7) and homozygous (lanes 2, 5, and 8) mice. Primers were located in exons 1 and 7 (lanes 1 and 2), exons 2 and 7 (lanes 4 and 5), and exons 3 and 7 (lanes 7 and 8) of the VDR gene. E, RT-PCR analysis of RNA isolated from kidney (lanes 1 and 2), duodenum (lanes 3 and 4), testis (lanes 5 and 6), ovary (lanes 7 and 8), skin (lanes 10 and 11), primary cultures of osteoblasts (lanes 12 and 13), and larynx including thyroid and parathyroid glands (lanes 14 and 15) from wild-type (lanes 1, 3, 5, 7, 10, 12, and 14) and homozygous (lanes 2, 4, 6, 8, 11, 13, and 15) mice, using primers located in exons 1 and 7 of the VDR

in a bacterial system as glutathione-S-transferase (GST) fusion proteins. As shown in Fig. 1H, the mutant VDR did not bind mouse osteopontin VDRE.

These data showed that our gene-targeted mice expressed a VDR protein with a deletion of the first zinc finger, and thus an inability to bind DNA, but with normal ligand binding affinity. Because the usual terminology $VDR^{-/-}$ for homozygous null mutant mice would be misleading for our mice, we use the term $VDR^{wt/\Delta}$ for heterozygous and $VDR^{\Delta/\Delta}$ for homozygous gene-targeted mice in the following text. After initial confirmation with Southern blot analysis, genotyping of the mice for all experiments was performed using PCR.

Expression of the lacZ Reporter Gene

To investigate the expression of VDR during development, we studied the expression of the lacZ reporter gene in mouse embryos. The earliest lacZ expression was found in E10.5 embryos (data not shown). In E11.5 embryos, lacZ staining was present in the neural tube, telencephalon, mesencephalon, rhombencephalon, spinal nerves, eyes, heart, urogenital tract, pancreas, liver, and intestine (Fig. 2A). Beginning from stage E12.5 and later, strong lacZ expression was found in bones, cartilage, and intervertebral discs (Fig. 2, B and C). Postnatally, prominent lacZ expression was detected in tissues known to abundantly express VDR, such as duodenum, kidney, and parathyroid glands, confirming the specificity of the reporter gene (Fig. 2D and data not shown). There was a clear gene dosage effect, i.e. homozygous mutants with two alleles of the reporter gene showed higher β -galactosidase activity than heterozygous mutants with only one gene-targeted allele (Fig. 2D).

Despite the abundant expression of lacZ during ontogenesis, newborn $VDR^{wt/\Delta}$ and $VDR^{\Delta/\Delta}$ pups were normal and indistinguishable from wild-type pups. In accordance with our findings, VDR null mutant mice totally lacking the VDR protein are normal at birth (4, 5). Therefore, the absence of a functional VDR during development can be compensated by other as yet unknown factors with redundant functions.

The Phenotype of $VDR^{\Delta/\Delta}$ Mice Is a Phenocopy of VDR Null Mutants

Heterozygous and homozygous VDR mutant mice were normal until weaning. At 3 wk of age, the body weight of $VDR^{\Delta/\Delta}$ mice was still comparable to that of wild-type animals (Fig. 3A). Thereafter, male and fe-

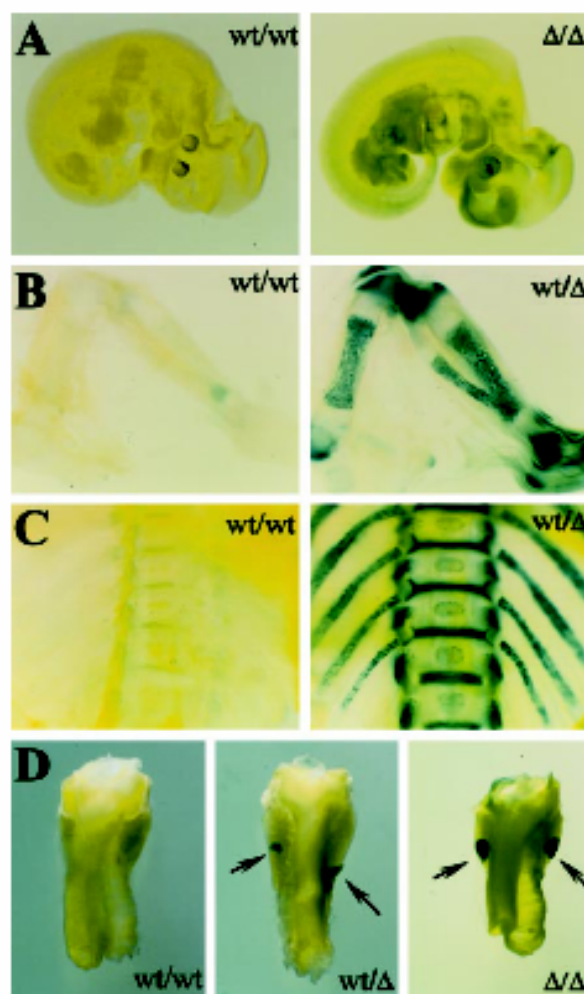


Fig. 2. Expression of the lacZ Reporter Gene Driven by the Endogenous VDR Promoter

lacZ expression is visualized by X-Gal staining. A, Wild-type (wt/wt) and homozygous (Δ/Δ) E11.5 embryos. B and C, Intense lacZ expression in bones and articular cartilage of the hindlimb (B), as well as in ribs, intervertebral discs, and vertebral bodies (C) in heterozygous (wt/Δ) E17.5 embryos. D, Dorsal view of the larynx from adult wild-type, heterozygous, and homozygous mice showing prominent lacZ staining in the parathyroid glands (arrows) of the mutant mice. The surrounding thyroid tissue, esophagus, and trachea were left unstained.

male $VDR^{\Delta/\Delta}$ mice showed reduced body weight throughout life. The life span of $VDR^{\Delta/\Delta}$ mice was greater than 1 yr in most animals. Heterozygous mice

gene. F, Protein extracts (10 μ g/lane) of duodenal mucosa from wild-type (wt/wt) and homozygous (Δ/Δ) mice assayed for VDR by Western blot analysis. VDR protein (arrowhead) was detected using a polyclonal antibody directed against the C-terminal part of the VDR. Left margin, Molecular sizes (kilodaltons). G, Immunohistochemical analysis of VDR protein in sections of duodenum from wild-type and homozygous mice, using the monoclonal antibody 9A7 or an irrelevant isotype-specific monoclonal antibody as a control. H, Gel mobility retardation assay of DNA binding activity of wild-type (wt) and mutant (Δ) murine VDR (lacking the first zinc finger) purified from a bacterial expression system. End-labeled mouse osteopontin vitamin D response elements were incubated with 100 ng wild-type and mutant VDR protein or no protein (–) on a nondenaturing acrylamide gel. Bound and free oligonucleotides are indicated.

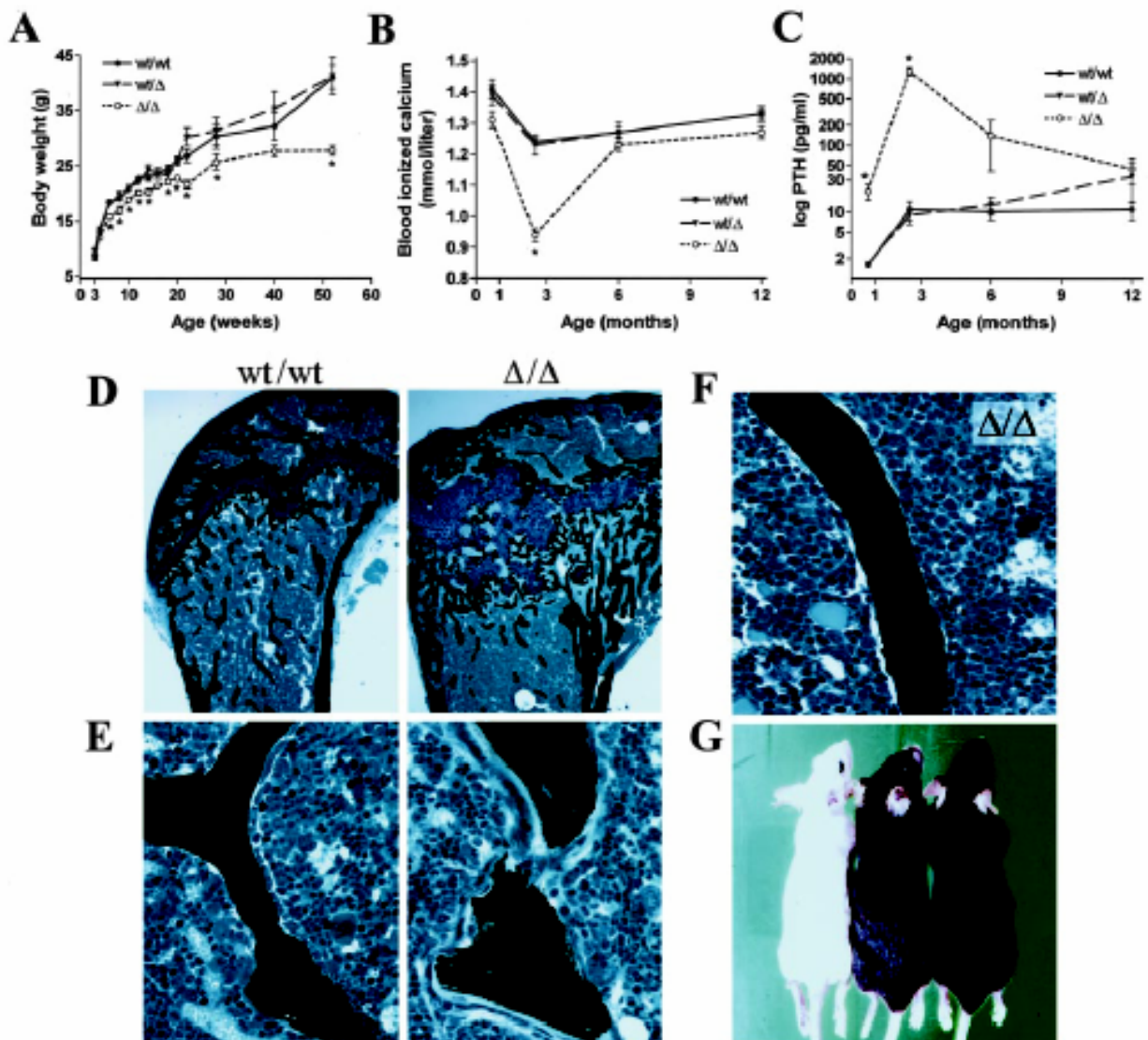


Fig. 3. Phenotype of Mice Expressing the Mutant VDR

A, Body weights of female wild-type (wt/wt), heterozygous (wt/Δ), and homozygous (Δ/Δ) mice. B, Blood ionized calcium. C, Serum intact PTH. D and E, Sections of distal femurs from 10-wk-old wild-type and homozygous mice, showing bone changes typical of rickets in the mutant animals (D): thickened and irregular growth plate, altered shape of epiphysis, thin and deeply eroded cortical bone. E, Increased bone turnover with thick osteoid seams and impaired bone mineralization indicating the presence of secondary hyperparathyroidism in 10-wk-old homozygous mouse. F, Normal bone turnover and absence of secondary hyperparathyroidism in a section of distal femur from 6-month-old homozygous mouse. G, Total alopecia in 9-month-old female homozygous mouse (left). Age-matched heterozygous (middle), and wild-type (right) mice are normal. Each data point in A-C is the mean \pm SEM of 3-19 animals. *, $P < 0.05$ compared with wild-type at the same time point, by ANOVA, followed by Dunnett's test.

did not have an overt phenotype, indicating that the mutant VDR does not act as a dominant negative receptor. Blood ionized calcium (Fig. 3B) was slightly decreased, and serum intact PTH levels (Fig. 3C) were already increased in 3-wk-old VDR Δ/Δ animals relative to those in wild-type controls. During the rapid growth phase in young mice, severe secondary hyperparathyroidism developed in all homozygous animals with profound hypocalcemia (Fig. 3B), and PTH serum levels greater than 1000 pg/ml were found in all animals (Fig. 3C). Serum 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ levels were very high in

homozygous mutants (mean \pm SD, 54 \pm 17, 55 \pm 23, and 898 \pm 593 pg/ml in 10-wk-old wild-type, heterozygous, and VDR Δ/Δ mice, respectively; $P < 0.001$, wt/wt vs. VDR Δ/Δ). In agreement with these findings, bones from 10-wk-old VDR Δ/Δ mice showed histological signs of rickets (Fig. 3D) and severe secondary hyperparathyroidism (Fig. 3E). Surprisingly, PTH serum levels declined with age in VDR Δ/Δ animals (Fig. 3C), and skeletally mature VDR Δ/Δ mice did not exhibit overt secondary hyperparathyroidism at the bone level in most cases (Fig. 3F). Interestingly, PTH serum levels

tended to rise with age in heterozygous animals (Fig. 3C), but not in wild-type controls, suggesting that the absence of one functioning allele of the VDR throughout life may favor the development of hyperparathyroidism in aged mice. Starting at about 6–8 wk of age, homozygous animals began to develop progressive alopecia. By about 4 months of age, most animals had completely or almost completely lost their hair (Fig. 3G). Sex did not influence the development of alopecia in $VDR^{\Delta/\Delta}$ mice.

Male and female, heterozygous and homozygous mice were fertile, and the organ weights of the testicles, seminal vesicles, and uterus were unchanged when normalized to body weight in 6-month-old animals (Fig. 4A). In good agreement with these findings, serum levels of testosterone and estradiol were normal in $VDR^{\Delta/\Delta}$ mice (Fig. 4B). Histological analysis of ovaries and testicles from $VDR^{\Delta/\Delta}$ mice revealed active ovaries with follicles at all stages of maturation and corpora lutea in females (Fig. 4C), and normal architecture of seminiferous tubules with active spermatogenesis in males (Fig. 4D).

Taken together, the phenotype of our $VDR^{\Delta/\Delta}$ mice is a close phenocopy of mutant mice with a total ablation of the VDR protein (4–6), indicating that the absence of the DNA binding domain abolishes the major physiological functions of the VDR. The reason

why the VDR null mutant mice created by Yoshizawa and co-workers (4, 27) show infertility, uterine hypoplasia, and impaired folliculogenesis in females and impaired spermatogenesis in males is unclear, but may be related to a different genetic background. Nevertheless, our findings of morphologically normal gonads together with unchanged blood levels of sex steroids and normal weight of typical target organs for male and female sex hormones strongly support the conclusion that genomic signaling through the VDR is not essential for reproductive functions. This idea is corroborated by the fact that the VDR knockout mice generated by Li et al. (5) are fertile, and that gonadal insufficiencies are absent in human vitamin D-dependent rickets type II (3). Moreover, the VDR knockout mice generated by Yoshizawa and co-workers show normal fertility when maintained on a high calcium diet (28).

Rescue Diet Normalizes Calcium Homeostasis, But Reveals Renal Calcium Leak in $VDR^{\Delta/\Delta}$ Mice

It has been shown that a diet enriched with calcium, phosphorus, and lactose (so-called rescue diet) is able to correct calcium homeostasis in VDR knockout mice (29). To explore the possible molecular effects of disruption of the VDR signaling pathway on renal calcium

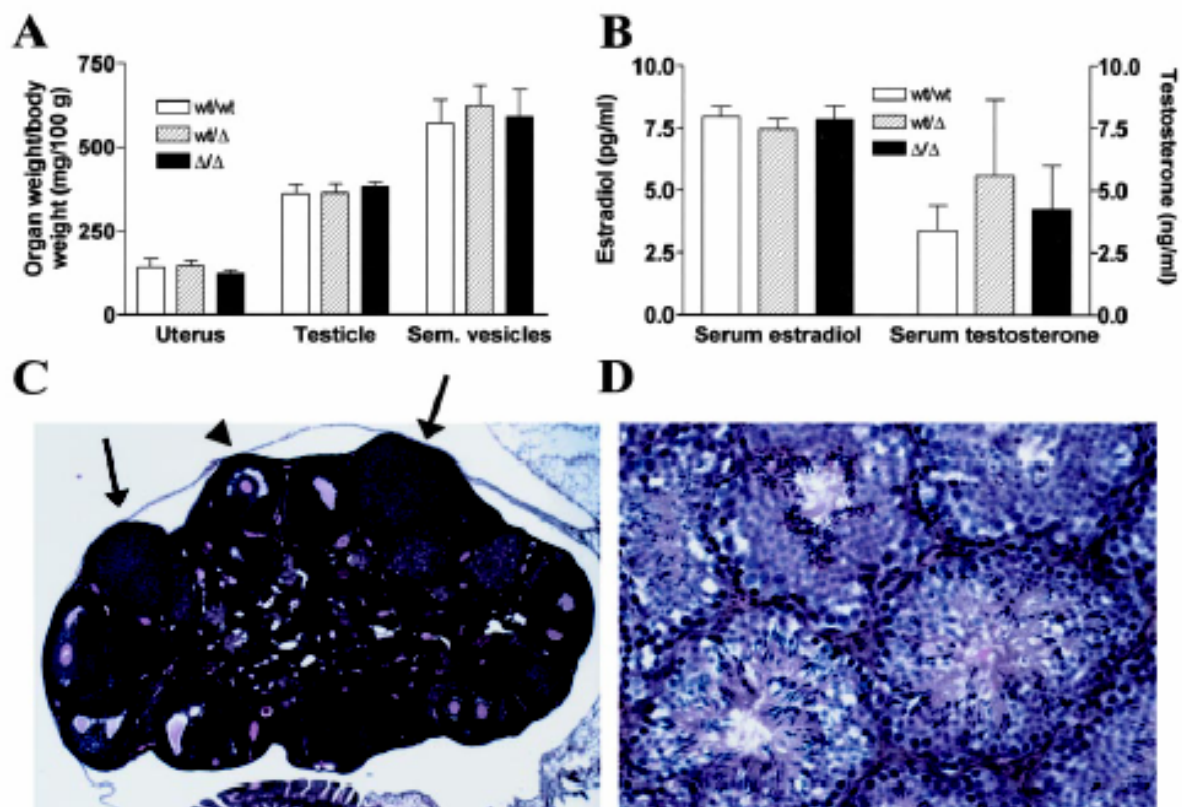


Fig. 4. Sex Organs and Circulating Sex Hormones in 6-Month-Old Male and Female VDR Mutant Mice

A, Organ weights of uterus, testicles, and seminal vesicles in male and female mice. B, Serum estradiol in female mice and serum testosterone in male mice. C, Section from ovary of female homozygous mutant mouse (arrowhead, tertiary follicle; arrows, corpora lutea). D, Section from testis of male homozygous mouse. Each data point in A and B is the mean \pm SEM of four to nine animals.

absorption we examined urinary excretion of calcium in 10-wk-old mice on either a normal diet or the rescue diet. In agreement with the study reported by Li *et al.* (29), we found that the rescue diet totally normalized blood ionized calcium (Fig. 5A), total serum calcium (data not shown), and serum PTH (Fig. 5B) in our $VDR^{\Delta/\Delta}$ mice. Interestingly, however, the urinary calcium/creatinine ratio was about 5-fold higher in normocalcemic $VDR^{\Delta/\Delta}$ mice on the rescue diet compared with wild-type animals on either the normal or the rescue diet (Fig. 5C). As shown in Fig. 5D, the 24-h urinary excretion of calcium in $VDR^{\Delta/\Delta}$ mice on the rescue diet was about 4-fold higher relative to that in wild-type controls on the same diet, but did not differ between wild-type and $VDR^{\Delta/\Delta}$ mice on the normal diet. Very similar results were obtained when calcium

clearance was calculated (data not shown). In contrast, urinary phosphate excretion was not different between wild-type and homozygous mice on either the normal or the rescue diet (data not shown). These findings clearly indicate that renal tubular calcium reabsorption was impaired in normocalcemic mice with a nonfunctioning VDR.

To examine changes in the expression of intracellular calcium-binding proteins we quantified the renal mRNA levels of calbindin D_{9k} and D_{28k} by Northern analysis. Similar to the findings reported by Li *et al.* (11), we found a profound down-regulation of calbindin D_{9k} and a small decrease in calbindin D_{28k} mRNA levels in the kidneys of $VDR^{\Delta/\Delta}$ mice receiving the normal diet (Fig. 5, E and F). The rescue diet normalized calbindin D_{28k} mRNA levels, but had no influence on calbindin D_{9k} in $VDR^{\Delta/\Delta}$ mice.

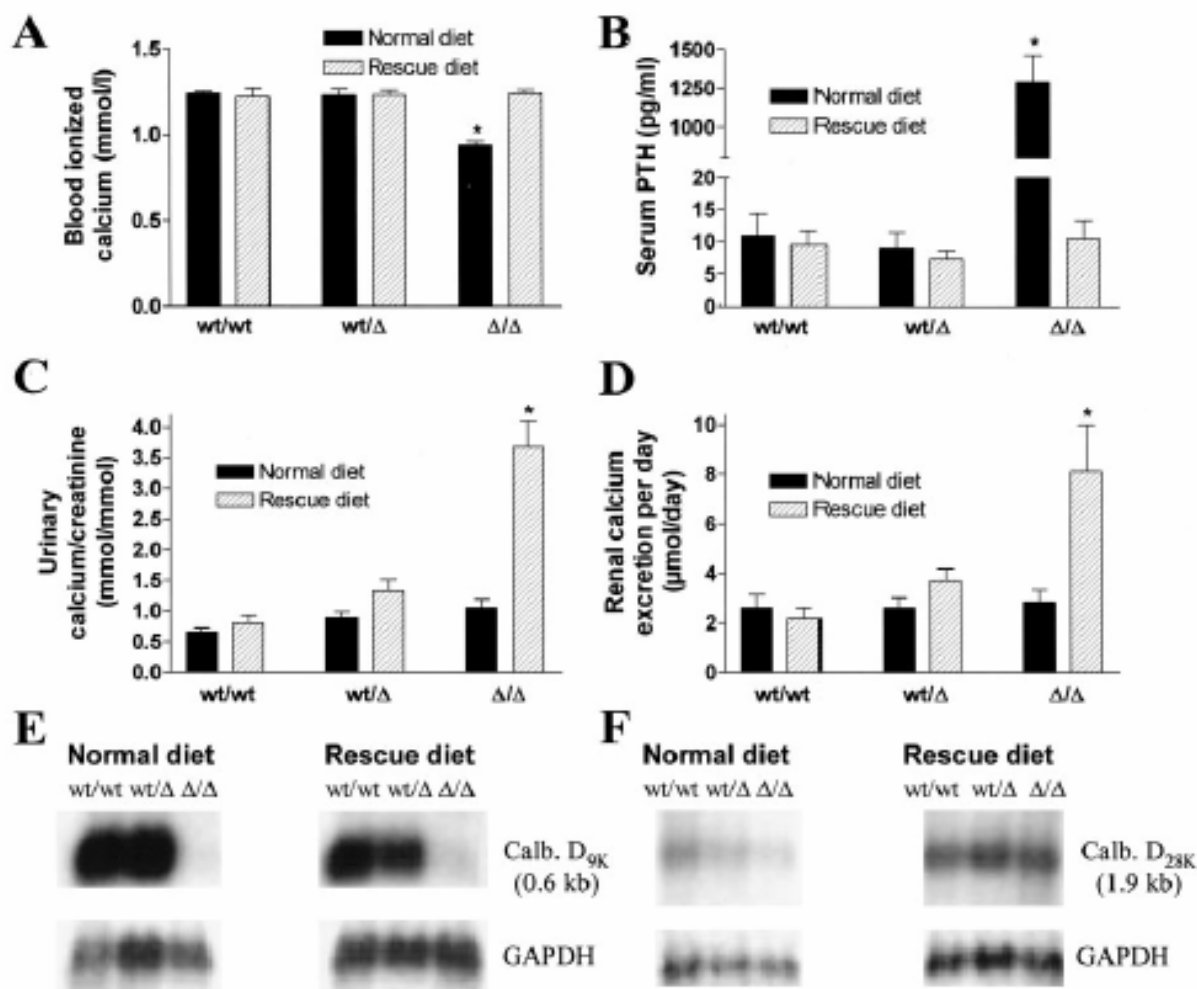


Fig. 5. Renal Calcium Leak in Normocalcemic VDR Mutant Mice

A-D, Calcium homeostasis and urinary calcium excretion in 10-wk-old, wild-type (wt/wt), heterozygous (wt/ Δ), and homozygous (Δ/Δ) mice fed the normal or the rescue diet (enriched with calcium, phosphorus, and lactose). The rescue diet was fed starting from d 16 of age. A, Blood ionized calcium. B, Serum intact PTH. C, Urinary calcium/creatinine excretion. D, Twenty-four-hour renal calcium excretion. E and F, Northern analysis of total RNA (10 μ g/lane) isolated from kidney of wild-type, heterozygous, and homozygous 10-wk-old mice fed the normal or the rescue diet. Blots were hybridized with a 0.4-kb calbindin D_{9k} -specific probe (E) or with a 0.7-kb calbindin D_{28k} -specific probe (F), using a 0.9-kb glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)-specific probe as a control. Each data point in A-D is the mean \pm SEM of 3-13 animals. *, $P < 0.05$ compared with wild-type fed the same diet, by ANOVA, followed by Dunnett's test.

Genomic and Nongenomic Responses to Vitamin D Hormones Are Abrogated in VDR^{ΔΔ} Mice

To test whether our mutant mice expressing a VDR with an intact hormone binding domain, but lacking the first zinc finger, would still respond to pharmacological doses of vitamin D analogs, we treated wild-type, heterozygous, and homozygous mice with different vitamin D metabolites. Short-term administration of high doses of active vitamin D metabolites is known to stimulate intestinal calcium absorption and bone resorption and to suppress PTH secretion by the parathyroid glands (30). These effects develop within hours or days and are known to be mainly mediated through altered gene transcription (31). In contrast, it has been shown that vitamin D metabolites stimulate intestinal calcium absorption in perfused chick and rat duodenal loops within minutes (19, 32), and this nongenomic mechanism is thought to be mediated by a putative vitamin D membrane receptor (21). Another distinct membrane receptor for the vitamin D analog 24,25-dihydroxyvitamin D₃ [24,25-(OH)₂D₃] has been functionally described in osteosarcoma cells (33) and chondrocyte matrix vesicles (34). We reasoned that these putative membrane receptors should still be present in our mutant mice if they represent novel gene products different from the classical VDR.

To test the *in vivo* response of our mutant mice to pharmacological doses of vitamin D metabolites, mice were adapted to metabolic cages and treated for 3 d with 1 μg/kg 1,25-(OH)₂D₃ or 5000 μg/kg 24,25-(OH)₂D₃. Monitoring 24-h urinary calcium excretion is a sensitive way to follow changes in bone resorption and intestinal calcium absorption under these experimental conditions (30). We found that 1,25-(OH)₂D₃ induced profound hypercalcemia and hypercalciuria in wild-type and heterozygous mice (Fig. 6, A and B). The 5000-fold higher dose of 24,25-(OH)₂D₃ induced an almost identical calcemic and calciuric response compared with 1 μg/kg 1,25-(OH)₂D₃ (Fig. 6C and data not shown). However, homozygous animals did not show any increase in blood or urinary calcium in these experiments (Fig. 6, A–C). Similarly, 1,25-(OH)₂D₃ suppressed serum PTH to undetectable levels in wild-type and heterozygous mice, but not in homozygous animals (Fig. 6D). After a 3-d treatment with high dose 1,25-(OH)₂D₃, cancellous bone in wild-type and heterozygous mice showed an accumulation of eroded bone surface indicative of increased osteoclastic bone resorption (Fig. 6E), and highly active tartrate-resistant acid phosphatase-positive osteoclasts (Fig. 6F). Again, these changes were absent in bones from VDR^{ΔΔ} mice (Fig. 6, E and F). Thus, high doses of different vitamin D metabolites did not stimulate intestinal calcium absorption or bone resorption, did not suppress PTH serum levels, and did not alter renal calcium handling in homozygous mutant mice with nonfunctioning nuclear VDR.

Another well characterized action of vitamin D metabolites is the hyperproliferation induced in keratinocytes after topical administration on the murine

skin (35). Therefore, we examined the effects of 1,25-(OH)₂D₃ and the vitamin D analog 20-epi-22-oxa-24a,26a,27a-trihomo-1,25-(OH)₂D₃ (KH1060) on epidermal thickness in our mice. The latter analog has previously been shown to be 100-fold more potent than 1,25-(OH)₂D₃ in the induction of epidermal hyperplasia after a single topical application in mice (35). Epithelial thickness did not differ in untreated skin of wild-type and homozygous mutant mice (Fig. 6G). Within 3 d, 1,25-(OH)₂D₃ and KH1060 (Fig. 6H) induced a profound increase in epidermal thickness in wild-type mice, but the response to both vitamin D analogs was absent in homozygous mice [wt/wt vs. VDR^{ΔΔ}, mean ± SD, 58.6 ± 17.4 vs. 17.7 ± 7.2 μm (*P* < 0.05) for 1,25-(OH)₂D₃; 89.8 ± 11.0 vs. 17.7 ± 2.3 μm (*P* < 0.05) for KH1060].

Taken together, these data clearly indicated that skin and the organs involved in calcium homeostasis, *i.e.* intestine, bone, parathyroid glands, and kidney, of homozygous mice expressing the mutant VDR did not respond to high doses of different vitamin D metabolites *in vivo*. To test whether rapid, nongenomic actions of vitamin D at the cellular level would still be present in our mutant mice, we examined the increase in intracellular calcium concentrations elicited by 1,25-(OH)₂D₃ in primary, confluent cultures of fura-2-loaded osteoblasts. This system shows an abrupt increase in intracellular calcium concentrations within seconds after the addition of 1,25-(OH)₂D₃ in a consistent and reproducible fashion (reviewed in Refs. 20 and 36). Interestingly, the rapid response to 1,25-(OH)₂D₃ was totally absent in osteoblasts from VDR^{ΔΔ} mice (Fig. 6I). Also, there appeared to be a gene dosage effect, because osteoblasts from heterozygous animals exhibited a dose-response curve that was shifted to the right by about 1 order of magnitude of 1,25-(OH)₂D₃ concentrations and a slightly decreased maximal response (Fig. 6I). In contrast, the increase in intracellular calcium in response to 10 nM bovine PTH-(1–84) was identical in osteoblasts of all three genotypes (data not shown).

DISCUSSION

Our study demonstrates that a deletion of the first zinc finger of the VDR protein creates a phenocopy of VDR null mutant mice totally lacking the VDR (4, 5). The results from immunocytochemistry and Western analysis showed that the mutant VDR is expressed in normal quantities and with normal, nuclear localization in enterocytes, demonstrating that the mutation does not interfere with regulation of VDR gene transcription and transport of the receptor into the nucleus. Therefore, the entire DNA binding domain of the murine VDR is not necessary for nuclear localization. It has been reported that the basic amino acid region between Arg⁴⁹ and Lys⁵⁵ (RRSMKPK) is a nuclear localization signal in the human VDR (37). This conserved sequence (38) is partially retained in our mutant VDR (MKPK).

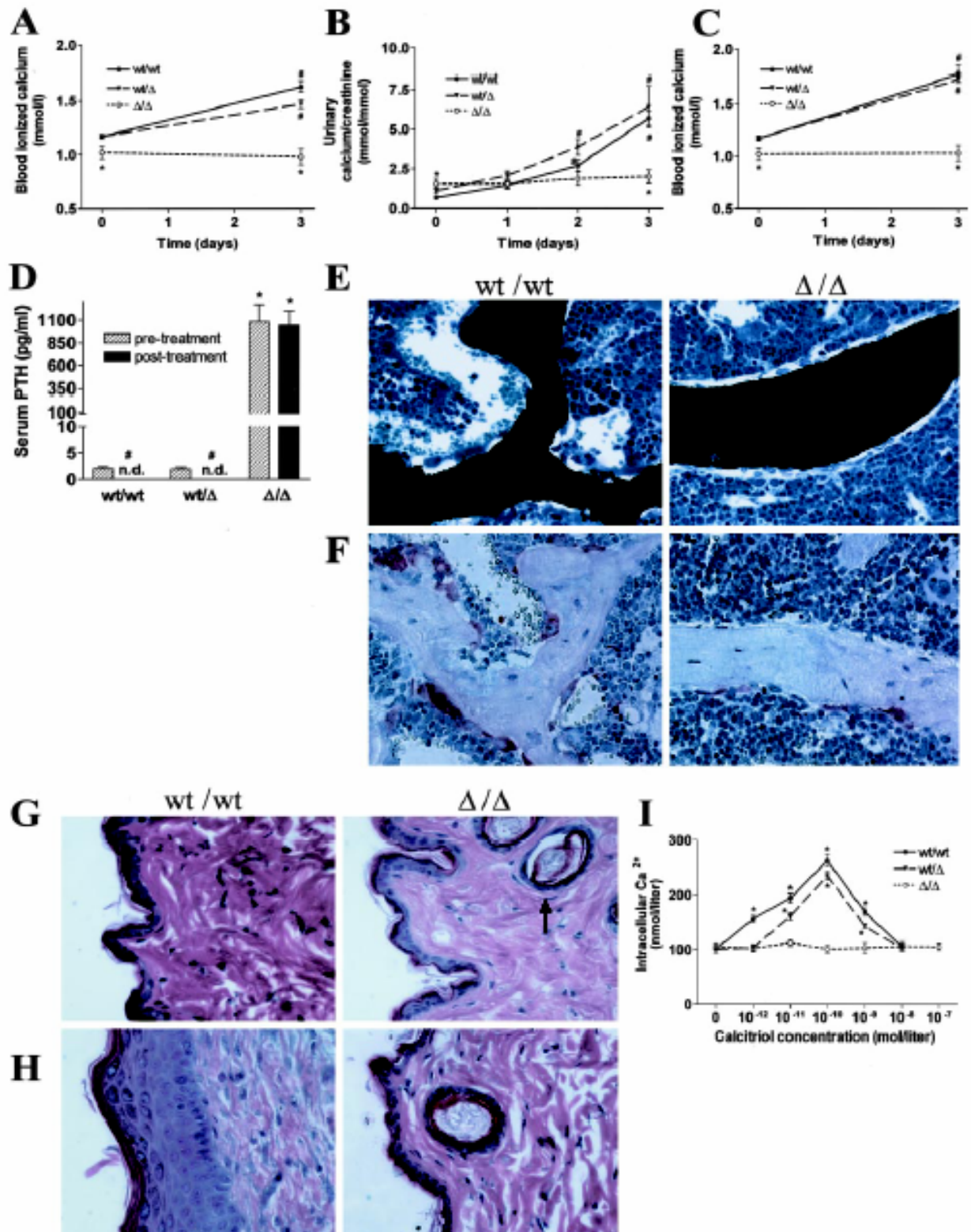


Fig. 6. Lack of Genomic and Nongenomic Effects of 1,25-(OH)₂D₃ in Homozygous VDR Mutant Mice

A-F, Three- to 4-month-old wild-type (wt/wt), heterozygous (wt/Δ), and homozygous (Δ/Δ) mice were treated for 3 d with 1 μg/kg 1,25-(OH)₂D₃ or 5000 μg/kg 24,25-(OH)₂D₃. 1,25-(OH)₂D₃ treatment profoundly increased blood ionized calcium (A) and urinary calcium/creatinine excretion (B) in wild-type and heterozygous, but not in homozygous mice. C, The 5000-fold higher dose of 24,25-(OH)₂D₃ induced almost identical changes. D, Serum intact PTH was not suppressed after a 3-d treatment with high dose 1,25-(OH)₂D₃ in VDR^{Δ/Δ} mice. n.d., Not detectable. Sections of the secondary spongiosa in the distal femurs of wild-type and

In addition to the typical phenotype of the homozygous mice, treatment of VDR^{Δ/Δ} mice with pharmacological doses of vitamin D metabolites confirmed that the mutant receptor is functionally inactive *in vivo*. In accordance with these findings, several known point mutations in the DNA binding domain of the human VDR result in hereditary vitamin D-dependent rickets type II (38). Both zinc finger motifs are essential for selective VDR binding to vitamin D response elements, which usually consist of direct hexanucleotide repeats with a three-nucleotide spacing (39, 40). As expected, our mutant VDR lacking the first zinc finger cannot bind to a mouse osteopontin VDRE. In analogy to our results, a naturally occurring mutation in the androgen receptor causing an in-frame deletion of the second zinc finger also results in a functionally inactive protein with nuclear localization (41). Despite normal androgen binding affinity of the mutant receptor, the patients suffer from complete androgen insensitivity. Therefore, the loss of one of the zinc finger motifs of the DNA binding domain of the VDR and of the androgen receptor results in end-organ resistance to the actions of the steroid hormones, but does not interfere with nuclear localization of the receptors.

In accordance with previous reports (6, 11), our study has demonstrated that feeding of the rescue diet enriched with calcium, phosphorus, and lactose to VDR^{Δ/Δ} mice fully corrected blood calcium levels and serum PTH. However, renal tubular calcium reabsorption was distinctly impaired in normocalcemic VDR^{Δ/Δ} mice. Despite similar ionized, and thus dialyzable, calcium levels in the blood, the daily amount of calcium excreted via the urine was about 4-fold higher in VDR^{Δ/Δ} compared with wild-type mice on the rescue diet. Therefore, our findings confirm earlier reports that renal tubular calcium reabsorption is impaired in vitamin D deficiency (42) and clearly establish that 1,25-(OH)₂D₃ indeed has an important physiological role in calcium reabsorption in the kidney *in vivo*.

In VDR mutants given the normal diet, this renal calcium leak is obviously masked by reduced ionized blood calcium, and therefore reduced filtered calcium load, together with very high levels of circulating PTH stimulating renal tubular calcium reabsorption. Despite the fact that urinary loss of calcium was much more pronounced in VDR^{Δ/Δ} mice fed the rescue diet relative to those receiving the normal diet, the mRNA levels of renal calbindin D_{9k} remained at a very low

level, and those of calbindin D_{28k} were normalized by the rescue diet in VDR^{Δ/Δ} mice. Therefore, the changes in mRNA levels of calbindins do not readily explain the molecular defect in renal tubular calcium reabsorption in normocalcemic mice with a nonfunctioning VDR. Although the newly characterized ECaC have been implicated to play an important role in 1,25-(OH)₂D₃-stimulated renal tubular calcium reabsorption (12, 13, 43), a recent study conducted in our laboratory using quantitative RT-PCR has shown that despite the presence of a putative VDRE in the promoter region of this gene, the mRNA level of the kidney-specific ECaC1 was down-regulated in the kidneys of homozygous VDR mutant mice given the normal diet, but returned to normal in VDR^{Δ/Δ} animals fed the rescue diet (17). The mRNA level of the ubiquitously expressed ECaC2 remained unchanged in the kidneys of our VDR^{Δ/Δ} mice fed either the normal or the rescue diet (17). Recently, it has been reported by Van Cromphaut *et al.* (6) that renal mRNA levels of ECaC1 and -2 were unchanged in VDR-ablated mice, and that changes in dietary calcium did not influence ECaC expression in VDR null mutants. Taken together, our data and the results provided by the latter study demonstrate that changes in the expression of the apical epithelial calcium channels ECaC1 and -2, at least at the mRNA level, do not appear to be causally linked to the defect in renal calcium reabsorption in normocalcemic mice with nonfunctioning VDR. Based on our present data, the profound down-regulation of the intracellular calcium carrier protein calbindin D_{9k} in VDR^{Δ/Δ} mice may provide a possible explanation for the defective renal calcium reabsorption in normocalcemic VDR^{Δ/Δ} mice. In VDR^{Δ/Δ} mice fed the normal diet, this defect may be counteracted by secondary hyperparathyroidism increasing renal epithelial calcium transport by a mechanism partially independent of calbindin D_{9k}. However, although urinary calcium excretion in VDR^{Δ/Δ} mice given the normal diet did not differ from that in wild-type mice, it appeared to be inappropriately high in light of the approximately 20% lower blood ionized calcium and the more than 100-fold higher PTH serum levels relative to those in wild-type animals. Clearly, further studies are necessary to elucidate the molecular mechanism of this physiologically important renal calcium leak induced by the absence of VDR signaling.

heterozygous (data not shown) 1,25-(OH)₂D₃-treated mice revealed deeply eroded bone spicules (E) covered with very large, intensely tartrate-resistant acid phosphatase-positive osteoclasts (F). However, bone turnover remained unchanged (E), and osteoclasts were of normal size and number (F) in 1,25-(OH)₂D₃-treated homozygous mice. G, Sections of untreated skin of 3-month-old wild-type and homozygous mice. Epidermal cysts (arrow) were typically present in homozygous mutants. H, Sections of skin from wild-type and homozygous mice treated topically for 3 d with the vitamin D analog KH1060, showing pronounced increase in epidermal thickness in wild-type, but lack of response in mutant, animals. I, Lack of increase in intracellular calcium 10 sec after the addition of 1,25-(OH)₂D₃ in primary cultures of fura-2-loaded, confluent osteoblasts of homozygous mice. Each data point in A–D is the mean ± SEM of four to six animals. Each data point in I is the mean ± SEM of six coverslips for each genotype and concentration. *, P < 0.05, compared with wild-type by ANOVA, followed by Dunnett's test; #, P < 0.05 vs. baseline by paired t test.

Treatment of our VDR^{Δ/Δ} mice with pharmacological doses of vitamin D analogs did not elicit any change in calcium homeostasis or keratinocyte proliferation, suggesting that the physiological significance of vitamin D signaling pathways, other than those mediated through the classical, nuclear VDR, is minor, at least in skin and tissues involved in the regulation of calcium homeostasis. Furthermore, deletion of the first zinc finger of the VDR not only abrogated the effects of vitamin D analogs *in vivo*, but also abolished the rapid nongenomic actions of 1,25-(OH)₂D₃ in osteoblasts. In the osteoblast model of nongenomic effects, the increase in intracellular calcium concentrations in response to 1,25-(OH)₂D₃ occurs within seconds and involves opening of L-type channels in the plasma membrane (33) as well as activation of phospholipase C-β1 linked to G_{αq/11} and subsequent inositol triphosphate-mediated Ca²⁺ mobilization from the endoplasmic reticulum (26, 44). Our findings support the conclusion that the classical VDR mediates these rapid actions of 1,25-(OH)₂D₃ in osteoblasts. Of course, we cannot totally rule out that the lack of nongenomic responses to vitamin D metabolites was caused by a down-regulation of the putative vitamin D membrane receptor in the absence of a functioning classical VDR. However, the total absence of the 1,25-(OH)₂D₃-induced, rapid effects in osteoblasts of VDR^{Δ/Δ} mice makes this scenario unlikely. Treatment of osteoblasts from VDR^{Δ/Δ} mice with PTH-(1-84) induced an identical rise in intracellular calcium compared with that in osteoblasts from wild-type animals, indicating that osteoblasts from VDR^{Δ/Δ} mutants had the capacity to show a rapid increase in intracellular calcium in response to other hormonal stimuli.

In agreement with our results, it has been shown that antibodies to the classical estrogen receptor α modulate rapid PRL release from pituitary tumor cells (45). Furthermore, the rapid, nonnuclear effects of estrogen on endothelial nitric oxide synthesis were reported to be mediated through the binding of classical estrogen receptor α in a ligand-dependent manner to the p85 α regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase (46). In addition, a recent study has indicated that the progesterone receptor directly interacts with SH3 domains of cytoplasmic signaling molecules in a hormone-dependent fashion to elicit rapid nongenomic activation of c-Src tyrosine kinases and MAPK (47). Thus, there is accumulating evidence that the nongenomic effects of steroid hormones are mediated through the classical receptors or subpopulations thereof. This idea is supported by the fact that cloning and characterization of any novel *bona fide* membrane steroid receptors have never been accomplished.

Our results favor a model in which the classical VDR interacts with as yet unknown proteins to elicit rapid, nongenomic effects in osteoblasts. Contrary to this idea, it has been shown that the ligand specificity for membrane effects of vitamin D analogs in osteoblasts are distinct from those for gene trans-activation-mediated effects (20, 36). However, it may be possible

that specific protein cofactors alter the ligand specificity of the classical VDR in this nongenomic signaling pathway. At present, we do not know whether the absence of the first zinc finger, the lack of the phosphorylation site at Ser²¹, or conformational changes in the mutant VDR interfere with binding of the mutant receptor to VDR-interacting proteins or intracellular trafficking of the protein. More extensive experimentation is required to define the cytoplasmic or membrane proteins possibly interacting with the classical VDR to mediate the nongenomic effects of vitamin D metabolites.

MATERIALS AND METHODS

Gene Targeting Strategy

Using probes for the coding sequences of the first (exon 2) and second (exon 3) zinc fingers of the mouse VDR, we isolated four clones containing VDR DNA from a 129/svJ mouse genomic λ -DASHII phage library (a gift from J. Rossant, Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, Canada). The four overlapping clones covered 30 kb of VDR genomic DNA. We constructed a targeting vector containing 8.7 kb of homology to the region of the VDR locus, a *lacZ* cassette as a reporter gene, a *neo* phosphotransferase (*neo*) cassette for positive selection, and a thymidine kinase cassette for negative selection. The *lacZ* and *neo* cassettes replaced exon 2 and part of intron 2. The *lacZ* cassette was introduced into the vector directly downstream of the start codon of exon 2, so that *lacZ* gene transcription used the endogenous start codon and was driven by the endogenous VDR promoter. The *neo* cassette was introduced into intron 2 in the opposite translation direction. Most of intron 2 remained intact. The *Sal*I-linearized vector was electroporated into R1 and E14 mouse embryonic stem (ES) cells, and the ES clones were selected in the presence of the neomycin analog G418 and gancyclovir as previously described (48). DNA prepared from resistant clones was digested with *Hind*III and *Cla*I for analysis of the 5' region and with *Hind*III for analysis of the 3' region and was screened by Southern blot using 0.8-kb *Sal*I-*Xho*I and 1.3-kb *Sma*I-*Eco*RI fragments as 5' and 3' probes, respectively. Eight correctly targeted clones from R1 ES cells and one positive clone from E14 ES cells were introduced into CD1 morulae by aggregation and implanted into pseudopregnant CD1 females. Chimeric male mice were obtained from four ES clones and were mated with C57BL/6 females. Subsequently, heterozygous F₁ mice were backcrossed to the C57BL/6 genetic background for four or five generations. Homozygous mutant mice were produced by intercrossing heterozygous animals. All experiments were performed on wild-type, heterozygous, and homozygous offspring of heterozygous matings.

Animal Maintenance

All mice were kept at 24°C with a 12-h light, 12-h dark cycle and were allowed free access to diet and tap water. The normal diet (Altromin, Lage, Germany) contained 0.9% calcium, 0.7% phosphorous, 0% lactose, and 600 IU vitamin D/kg. The rescue diet (Altromin), containing 2% calcium, 1.25% phosphorous, 20% lactose, and 600 IU vitamin D/kg, was fed starting from 16 d of age. To examine alterations in renal excretion of minerals, 10-wk-old wild-type, heterozygous, and homozygous mice fed either the normal or the rescue diet ($n = 12-13$ each) were kept in metabolic cages for a 15-h period overnight for urine collection. During that period the mice had free access to tap water, but were deprived of

food. For measurement of ionized blood calcium, 100 μ l blood were drawn from the retroorbital sinus into heparinized capillaries under ether anesthesia. Immediately thereafter, blood was drawn from the abdominal vena cava under anesthesia with ketamine/xylazine for serum collection. All animal procedures were approved by the local ethical committee and the government authorities.

Immunohistochemistry, lacZ Staining, and Histology

Immunohistochemical detection of VDR expression in duodenum was performed on methacarn-fixed, paraffin-embedded tissues. Sections were deparaffinized, microwaved for 10 min in 10 mM citrate-buffer, pH 6.0, and, after blocking with 20% rabbit serum, incubated overnight at 4 C with a monoclonal rat anti-VDR antibody (clone 9A7, Affinity BioReagents, Inc., Golden, CO) diluted 1:200. Bound antibody was detected with biotinylated rabbit antirat IgG and peroxidase-conjugated avidin-biotin complex (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA), using Vector VIP as enzyme substrate. To visualize lacZ reporter gene expression, X-gal staining of mouse embryos at pH 8.0 and subsequent clearing with benzyl benzoate/benzyl alcohol were carried out as previously described (49). Bone specimens were processed as previously described (50).

Northern and Western Blot Analyses, and Competitive Ligand Binding

Total RNA was extracted from duodenum and kidney using the RNeasy Midi Kit (QIAGEN, Valencia, CA), and was separated on formaldehyde-containing agarose gels. Nuclear extracts from duodenal mucosa were prepared as previously described (51) and were assessed by Western blot analysis (52) using a polyclonal antibody directed against the C-terminal part of the human VDR (H-81, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) at 1 μ g/ml for 16 h at 4 C. The peroxidase-labeled secondary antibody was used at a dilution of 1:1000. For competition studies, nuclear extracts were isolated from the duodenal mucosa of 10-wk-old wild-type and homozygous mice (51). Subsequently, competitive binding experiments with the duodenal nuclear extracts and recombinant human VDR (Oxford Biomedical Research, Oxford, MI) were performed according to the protocol described by Koszewski et al. (53) using 3 H-labeled 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) at a fixed concentration of 0.12 nM and concentrations of cold 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ ranging from 0.001–1000 nM. Binding curves were analyzed using PRISM 3.02 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

RT-PCR

For tissue distribution studies of the wild-type and mutant VDR with RT-PCR, sex-matched littermates were killed, and kidney, duodenum, skin, ovary, testis, and larynx including thyroid and parathyroid glands were isolated. Primary cultures of osteoblasts from calvariae of newborn mice were prepared as previously described (54). Total RNA was extracted from tissues using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN) and with TRIzol (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) from cultured cells. Two micrograms of total RNA were reverse transcribed using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany). PCR involved annealing at 58 C for VDR exon analysis or at 59 C for genotyping for 30 cycles. The following primers were used: VDR exon 1 forward, 5'-CAGAGTTCTTTGGTTGGACAG-3'; VDR exon 2 forward, 5'-CCACGGGCTTCCACTTCAA-3'; VDR exon 3 forward, 5'-CAAGGACAACCGGOGACACTG-3'; VDR exon 7 reverse, 5'-GACTTAAGCAGGACAATCTGGTG-3'; VDR wild-type and mutant allele (genotyping) forward, 5'-

GCCTGCTCTTCTTACAGGGATG-3'; VDR wild-type reverse, 5'-GGACTCACCTGAAGAAACCCTTGC-3'; and VDR mutant allele reverse, 5'-GGCTCAGGAAGATGCACTCC-3'.

Construction of Bacterial Expression Vectors and Protein Purification of Wild-Type and Mutant VDR

DNA fragments coding for the full-length VDR (422 amino acids) and the N-terminal-truncated form of murine VDR (lacking the first 51 amino acids, VDR Δ) were amplified from mouse duodenal cDNA by PCR using primers introducing BamHI and KpnI restriction sites (underlined). For VDR, the forward primer 5'-TTTGGATCCATGGAGGCAATG-CAGCCAGC-3' and the reverse primer 5'-TTTGGTACCT-CAGGAGATCTCATTGCCAAACACCTC-3' were used. For VDR Δ , we used the forward primer 5'-TTTGGATCCAT-GAAGCGCAAGGCCCTGTTC-3' and the same reverse primer as shown above. The PCR products were directionally cloned into modified pGex 2T vector (52) for the bacterial expression of GST fusion proteins. The recombinant plasmids were transformed into *Escherichia coli* BL21 DE3 codon plus RIL (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands). After harvesting, the bacteria were lysed by four freeze-thaw cycles in the presence of lysozyme. GST fusion proteins in the supernatant of the lysate were bound to GT-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) and eluted by Tris-HCl/glutathione after several washing steps as previously described (52). The eluates were directly used for the gel mobility shift assays.

Gel Mobility Shift Assay

Ten picomoles of double-stranded mouse osteopontin response element (5'-ACAAGGTTTCACGAGGTTTCACGTCT-3') were end-labeled with 20 pmol [γ - 32 P]ATP by T4 kinase (MBI Fermentas). Ten femtomoles of labeled osteopontin response element were incubated with 100 ng VDR proteins or without protein in binding buffer [20 mM Tris HCl (pH 7.9), 50 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, 0.05% Nonidet P-40, and 10% glycerol] with 50 μ g/ml poly(dideoxycytidine) for 30 min on ice. Samples were then resolved by electrophoresis on a 7% nondenaturing acrylamide gel in 0.5 \times Tris-boric acid-EDTA buffer at 26 V/cm at 4 C. The gels were dried, exposed 1 h to a phosphor screen, and scanned using a phosphor imager XLA-3000 (Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokyo, Japan).

Biological Chemistry

Blood ionized calcium was measured with an AVL 9140 electrolyte analyzer (Roche, Mannheim, Germany). Serum and urinary calcium levels were measured with flame photometry. Phosphorus and creatinine concentrations were determined using a Hitachi 766 autoanalyzer (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). PTH concentrations were assessed using a two-sided ELISA specific for intact mouse and rat PTH (Immutopics, San Clemente, CA). Total serum testosterone (Beckman Coulter, Inc., Krefeld, Germany), and estradiol (Diagnostica Systems Laboratories, Inc., Sinsheim, Germany) were determined by RIA after serum extraction with diethyl ether. Serum concentrations of 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ were measured using a radioreceptor assay (Immundiagnostik, Bensheim, Germany).

Systemic and Topical Treatment of Skin with Vitamin D Metabolites

For systemic treatment with vitamin D metabolites, 3- to 4-month-old mice (n = 6/genotype and treatment) were adapted to metabolic cages and were so treated with vehicle (5% ethanol in 0.15 M NaCl), 1 μ g/kg 1,25-(OH) $_2$ D $_3$, or 5000

$\mu\text{g}/\text{kg}$ 24,25-(OH) $_2\text{D}_3$ (Solway Pharmaceuticals, Inc., Weesp, The Netherlands) for 3 consecutive days. Blood was drawn at baseline and at the end of the experiment, i.e. 24 h after the last treatment. The femurs were harvested for histological analysis at the end of the trial. Urine was collected in 24-h samples during the experiment. For topical treatment with vitamin D metabolites, the back skin of 3-month-old mice ($n = 4/\text{genotype}$ and treatment) was shaved and was topically treated with placebo, 1,25-(OH) $_2\text{D}_3$ at 100 pmol/cm 2 , or the vitamin D analog KH1060 at 10 pmol/cm 2 once a day for 3 consecutive days (35). After 72 h, skin was harvested, and epidermal thickness was measured in quintuplicate in inter-follicular areas on hematoxylin- and eosin-stained microscopic sections as previously described (55).

Rapid, Nongenomic Effects of 1,25-(OH) $_2\text{D}_3$ in Osteoblasts

Osteoblasts were isolated from parietal bones of newborn mice by sequential enzymatic digestion (54) and were seeded and grown on coverslips for 4 d in phenol red-free α MEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum. Subsequently, cells were incubated for 72 h in phenol red-free medium containing 1% heat-inactivated fetal calf serum and transferred to serum-free medium 24 h before use. After washing, cells were loaded with 1 μM fura-2/AM for 30 min in Hank's HEPES buffer at pH 7.4, and the increases in intracellular calcium concentration in response to different concentrations of 1,25-(OH) $_2\text{D}_3$ were measured with a spectrofluorometer, as previously described (44), 10 sec after the addition of the drug. Each measurement on fura-2-loaded cells was followed by a parallel experiment under the same conditions with non-fura-2-loaded cells.

Acknowledgments

C. Bergow, K. Begsteiger, S. Lutz, and M. Kohlross are acknowledged for excellent technical assistance. We thank H. K. Thomsen for assistance with skin histology, H.-J. Grön for his help with the 1,25-(OH) $_2\text{D}_3$ measurements, and B. Lanske for critical reading of the manuscript and her help with the preparation of the figures. 1,25-(OH) $_2\text{D}_3$ and KH1060 for skin treatment were gifts from L. Binderup (Leo Pharmaceuticals Products, Ballerup, Denmark).

Received November 15, 2001. Accepted March 18, 2002.

Address all correspondence and requests for reprints to: Reinhold G. Erben, M.D., D.V.M., Institute of Animal Physiology, University of Munich, Veterinärstrasse 13, D-80539 Munich, Germany. E-mail: r.erben@lrz.uni-muenchen.de.

This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft, Er 223/5-1 (to R.G.E.) and Ba 869/7-1 (to R.B.). Parts of this work were presented at the 23rd Annual Meeting of the American Society for Bone Mineral Research, Phoenix, AZ, October 2001.

* Present address: MBT Munich Biotechnology GmbH, Fraunhoferstrasse 10, 82152 Martinsried, Germany.

† Present address: GBF Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig, Germany.

REFERENCES

- Bringhurst FR, Demay MB, Kronenberg HM 1998 Hormones and disorders of mineral metabolism. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, eds. Williams textbook of endocrinology. Philadelphia: Saunders; 1155-1209
- Evans RM 1988 The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895
- Malloy PJ, Pike JW, Feldman D 1999 The vitamin D receptor and the syndrome of hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets. *Endocr Rev* 20:156-188
- Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, Takeda S, Sekine K, Yoshihara Y, Kawakami T, Arioka K, Sato H, Uchiyama Y, Masushige S, Fukamizu A, Matsumoto T, Kato S 1997 Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet* 16:391-396
- Li YC, Piro AE, Arling M, Delling G, Baroni R, Bronson R, Demay MB 1997 Targeted ablation of the vitamin D receptor: An animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9831-9835
- Van Cromphaut SJ, Dewerchin M, Hoenderop JG, Stockmans I, Van Herck E, Kato S, Bindels RJ, Collen D, Carmeliet P, Bouillon R, Carmeliet G 2001 Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13324-13329
- Friedman PA, Geesek FA 1995 Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms, and regulation. *Physiol Rev* 75:429-471
- Raval-Pandya M, Porta AR, Christakos S 1999 Mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$ on intestinal calcium absorption and renal calcium transport. In: Holick MF, ed. Vitamin D: physiology, molecular biology, and clinical applications. Totowa: Humana Press; 163-173
- Bouhriaux I, Lajeunesse D, Christakos S, Brunette MG 1994 Two vitamin D $_3$ -dependent calcium binding proteins increase calcium reabsorption by different mechanisms. II. Effect of CaBP 9K. *Kidney Int* 45:469-474
- Bouhriaux I, Lajeunesse D, Christakos S, Brunette MG 1994 Two vitamin D $_3$ -dependent calcium binding proteins increase calcium reabsorption by different mechanisms. I. Effect of CaBP 28K. *Kidney Int* 45:461-468
- Li YC, Piro AE, Demay MB 1998 Analysis of vitamin D-dependent calcium-binding protein messenger ribonucleic acid expression in mice lacking the vitamin D receptor. *Endocrinology* 139:847-851
- Hoenderop JGJ, Van der Kemp AWCM, Hartog A, Van de Graaf SFJ, Van Os CH, Willems PHGM, Bindels RJM 1999 Molecular identification of the apical Ca $^{2+}$ channel in 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$ -responsive epithelia. *J Biol Chem* 274:8375-8378
- Hoenderop JG, Willems PH, Bindels RJ 2000 Toward a comprehensive molecular model of active calcium reabsorption. *Am J Physiol* 278:F352-F360
- Peng JB, Chen XZ, Berger UV, Vassilev PM, Brown EM, Hediger MA 1994 A rat kidney-specific calcium transporter in the distal nephron. *J Biol Chem* 269:28186-28194
- Peng JB, Brown EM, Hediger MA 2001 Structural conservation of the genes encoding cat1, cat2, and related cation channels. *Genomics* 76:99-109
- Muller D, Hoenderop JG, Merks GF, Van Os CH, Bindels RJ 2000 Gene structure and chromosomal mapping of human epithelial calcium channel. *Biochem Biophys Res Commun* 275:47-52
- Weber K, Erben RG, Rump A, Adamski J 2001 Gene structure and regulation of the murine epithelial calcium channels ECaC1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun* 289:1287-1294
- 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 2001 Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. *J Am Soc Nephrol* 12:1342-1349
- Nemere I, Yoshimoto Y, Norman AW 1984 Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: en-

- hancement within fourteen minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* 115:1476–1483
20. Revelli A, Massobrio M, Tesarik J 1998 Nongenomic effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Trends Endocrinol Metab* 9:419–427
 21. Norman AW 1998 Receptors for 1 α ,25(OH)₂D₃: past, present, and future. *J Bone Miner Res* 13:1360–1369
 22. Civitelli R, Kim YS, Gunsten SL, Fujimori A, Huskey M, Avioli LV, Hruska KA 1990 Nongenomic activation of the calcium message system by vitamin D metabolites in osteoblast-like cells. *Endocrinology* 127:2253–2262
 23. Massheimer V, Boland R, de Boland AR 1994 Rapid 1,25(OH)₂-vitamin D₃ stimulation of calcium uptake by rat intestinal cells involves a dihydropyridine-sensitive cAMP-dependent pathway. *Cell Signal* 6:299–304
 24. Caffrey JM, Farach-Carson MC 1989 Vitamin D₃ metabolites modulate dihydropyridine-sensitive calcium currents in clonal rat osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 264:20265–20274
 25. de Boland AR, Nemere I, Norman AW 1990 Ca²⁺-channel agonist BAY K8644 mimics 1,25(OH)₂-vitamin D₃ rapid enhancement of Ca²⁺ transport in chick perfused duodenum. *Biochem Biophys Res Commun* 166:217–222
 26. Le Mellay V, Grosse B, Lieberherr M 1997 Phospholipase C β and membrane action of calcitriol and estradiol. *J Biol Chem* 272:11902–11907
 27. Kinuta K, Tanaka H, Moriwake T, Aya K, Kato S, Seino Y 2000 Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology* 141:1317–1324
 28. Johnson LE, DeLuca HF 2001 Vitamin D receptor null mutant mice fed high levels of calcium are fertile. *J Nutr* 131:1787–1791
 29. Li YC, Amling M, Pirro AE, Priemel M, Meuse J, Baron R, Dellng G, Demay MB 1998 Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice. *Endocrinology* 139:4391–4396
 30. Erben RG, Scutt AM, Miao DS, Kollenkirchen U, Haberey M 1997 Short-term treatment of rats with high dose 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates bone formation and increases the number of osteoblast precursor cells in bone marrow. *Endocrinology* 138:4629–4635
 31. Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF 1998 Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* 78:1193–1231
 32. Nemere I, Norman AW 1987 The rapid, hormonally stimulated transport of calcium (transcaltachia). *J Bone Miner Res* 2:167–169
 33. Takeuchi K, Guggino SE 1996 24R,25-(OH)₂ vitamin D₃ inhibits 1 α ,25-(OH)₂ vitamin D₃ and testosterone potentiation of calcium channels in osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 271:33335–33343
 34. Sylvia VL, Schwartz Z, Ellis EB, Helm SH, Gomez R, Dean DD, Boyan BD 1996 Nongenomic regulation of protein kinase C isoforms by the vitamin D metabolites 1 α ,25-(OH)₂D₃ and 24R,25-(OH)₂D₃. *J Cell Physiol* 167:380–393
 35. Gniadecki R, Serup J 1995 Stimulation of epidermal proliferation in mice with 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and receptor-active 20-epi analogues of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochem Pharmacol* 49:621–624
 36. Nemere I, Farach-Carson MC 1998 Membrane receptors for steroid hormones: a case for specific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens. *Biochem Biophys Res Commun* 248:443–449
 37. Hsieh JC, Shimizu Y, Minoshima S, Shimizu N, Haussler CA, Jurutka PW, Haussler MR 1998 Novel nuclear localization signal between the two DNA-binding zinc fingers in the human vitamin D receptor. *J Cell Biochem* 70:94–109
 38. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW 1998 The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 13:325–349
 39. Freedman LP, Towers TL 1991 DNA binding properties of the vitamin D₃ receptor zinc finger region. *Mol Endocrinol* 5:1815–1826
 40. Towers TL, Luisi BF, Asianov A, Freedman LP 1993 DNA target selectivity by the vitamin D₃ receptor: mechanism of dimer binding to an asymmetric repeat element. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6310–6314
 41. Quigley CA, Evans BA, Simental JA, Marschke KB, Sar M, Lubahn DB, Davies P, Hughes IA, Wilson EM, French FS 1992 Complete androgen insensitivity due to deletion of exon C of the androgen receptor gene highlights the functional importance of the second zinc finger of the androgen receptor *in vivo*. *Mol Endocrinol* 6:1103–1112
 42. Yamamoto M, Kawanobe Y, Takahashi H, Shimazawa E, Kimura S, Ogata E 1984 Vitamin D deficiency and renal calcium transport in the rat. *J Clin Invest* 74:507–513
 43. Hoenderop JG, Muller D, Suzuki M, Van Os CH, Bindels RJ 2000 Epithelial calcium channel: gate-keeper of active calcium reabsorption. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9:335–340
 44. Le Mellay V, Lasmoles F, Lieberherr M 1999 G $\alpha_{q/11}$ and G $\beta\gamma$ proteins and membrane signaling of calcitriol and estradiol. *J Cell Biochem* 75:139–146
 45. Norfleet AM, Clarke CH, Gametchu B, Watson CS 2000 Antibodies to the estrogen receptor- α modulate rapid prolactin release from rat pituitary tumor cells through plasma membrane estrogen receptors. *FASEB J* 14:157–165
 46. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK 2000 Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407:538–541
 47. Boonyaratanakornkit V, Scott MP, Ribon V, Sherman L, Anderson SM, Maller JL, Miller WT, Edwards DP 2001 Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol Cell* 8:269–280
 48. Wurst W, Joyner AL 1993 Production of targeted embryonic stem cell clones. In: Joyner AL, ed. *Gene targeting: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press; 33–61
 49. Gossler A, Zachgo J 1993 Gene and enhancer trap screens in ES cell chimeras. In: Joyner CJ, ed. *Gene targeting: a practical approach*. New York: Oxford University Press; 181–227
 50. Erben RG 1997 Embedding of bone samples in methylmethacrylate: An improved method suitable for bone histomorphometry, histochemistry, and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 45:307–313
 51. Goff JP, Reinhardt TA, Beckman MJ, Horst RL 1990 Contrasting effects of exogenous 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25-(OH)₂D] vs. endogenous 1,25-(OH)₂D, induced by dietary calcium restriction, on vitamin D receptors. *Endocrinology* 126:1031–1035
 52. Leenders F, Tesdorpf JG, Markus M, Engel T, Seedorf U, Adamski J 1996 Porcine 80-kDa protein reveals intrinsic 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, fatty acyl-CoA-hydrolase/dehydrogenase, and sterol transfer activities. *J Biol Chem* 271:5438–5442
 53. Koszewski NJ, Reinhardt TA, Horst RL 1996 Vitamin D receptor interactions with the murine osteopontin response element. *J Steroid Biochem Mol Biol* 59:377–388
 54. Wong G, Cohn DV 1974 Separation of parathyroid hormone and calcitonin-sensitive cells from non-responsive bone cells. *Nature* 252:713–715
 55. Gniadecki R, Gniadecka M, Serup J 1994 Inhibition of glucocorticoid-induced epidermal and dermal atrophy with KH 1060: a potent 20-epi analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Br J Pharmacol* 113:439–444

3 Kapitel 2

Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor

Ute Zeitz, Karin Weber, Desi W. Soegiarto, Eckhard Wolf, Rudi Balling, and

Reinhold G. Erben

Institute of Animal Physiology, Ludwig Maximilians University, Veterinaerstrasse 13, 80539
Munich, Germany (U.Z., K.W., R.G.E.)

Institute of Mammalian Genetics, GSF National Research Center for Environment and Health,
Ingolstaedter Landstrasse 1, 85758 Neuherberg, Germany (D.W.S., R.B.)

Institute of Molecular Animal Breeding, Ludwig Maximilians University, Feodor-Lynen-
Strasse 25, 81377 Munich, Germany (E.W.)

The FASEB Journal express article 10.1096/fj.02-0424fje. Published online January 22, 2003.

Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor

Ute Zeitz,* Karin Weber,* Desi W. Soegiarto,[†] Eckhard Wolf,[‡] Rudi Balling,[†] and Reinhold G. Erben*

*Institute of Animal Physiology, Ludwig Maximilians University, 80539 Munich; [†]Institute of Mammalian Genetics, GSF National Research Center for Environment and Health, 85758 Neuherberg; and [‡]Institute of Molecular Animal Breeding, Ludwig Maximilians University, 81377 Munich, Germany

Corresponding author: Reinhold G. Erben, M.D., D.V.M., Institute of Animal Physiology University of Munich, Veterinärstrasse 13, D-80539 Munich, Germany. E-mail: R.Erben@lrz.uni-muenchen.de.

ABSTRACT

It was the aim of this study to further explore the functional role of vitamin D in the endocrine pancreas. By gene targeting, we have recently generated mice in which a *lacZ* reporter gene is driven by the endogenous vitamin D receptor (VDR) promoter. These mice express a functionally inactive mutant VDR. Pancreatic islets but not exocrine pancreas cells showed strong *lacZ* reporter gene expression in mutant mice. To rule out possible influences of hypocalcemia on pancreatic endocrine function, a rescue diet enriched with calcium, phosphorus, and lactose was fed to wild-type (WT) and VDR mutant mice. The rescue diet normalized body weight and mineral homeostasis in VDR mutants. In glucose tolerance tests, baseline blood glucose levels were unchanged in fasting VDR mutants. However, blood glucose was elevated after oral or subcutaneous glucose loading, and maximum serum insulin levels were reduced by ~60% in VDR mutants vs. WT mice on either diet. In addition, insulin mRNA levels were decreased in VDR mutant mice on both diets, whereas pancreatic β cell mass, islet architecture, and islet neogenesis were normal. These findings clearly establish a molecular role of the VDR in pancreatic insulin synthesis and secretion in vivo.

Key words: diabetes • VDR • calcium homeostasis • glucose tolerance • islet neogenesis

The vitamin D hormone $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 [$1,25(OH)_2D_3$], the biologically active form of vitamin D, is essential for an intact mineral metabolism (1). $1,25(OH)_2D_3$ acts through the vitamin D receptor (VDR), which is a member of the nuclear receptor superfamily (2). The VDR regulates gene transcription by binding to vitamin D responsive elements in the promoter region of target genes. Functional inactivation of the VDR by gene targeting in mice or by genetic defects in the VDR gene in humans results in rickets [vitamin D-dependent rickets type II (VDDRII)] and alopecia (3).

VDR expression is not limited to organs involved in calcium homeostasis such as bone, kidney, duodenum, and parathyroid gland but has also been demonstrated in various other tissues (reviewed in ref 4). Therefore, $1,25(OH)_2D_3$ may have important physiological functions beyond

calcium homeostasis. For example, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regulates keratinocyte differentiation in the skin, has immunomodulatory functions, and may also be involved in pancreatic insulin secretion (reviewed in refs 4, 5). Early *ex vivo* studies by Norman and et al. (6) have shown that insulin but not glucagon release after stimulation with glucose and arginine is reduced in the isolated perfused pancreas from vitamin D-deficient rats. Later on, the same group showed that glucose tolerance and insulin secretion are impaired in vitamin D-deficient rats *in vivo* (7) and that insulin secretion was improved within 3 h after a single administration of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ to vitamin D-deficient rats (8). In more recent studies, it was reported that *de novo* insulin synthesis is reduced in isolated islets from vitamin D-deficient rats and that insulin biosynthetic capacity can be restored *in vitro* by addition of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (9). However, other investigators found unaltered oral glucose tolerance in vitamin D-deficient rats (10) or reported that the decreased insulin secretion in vitamin D-deficient rats could be corrected by calcium supplementation (11). Further, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ failed to stimulate insulin secretion *in vitro* in islets from vitamin D-replete rats and in insulinoma β cells (12). Therefore, the role of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and the VDR in pancreatic insulin secretion remains unclear.

Additional evidence linking the VDR to the endocrine functions of the pancreas came from epidemiological studies showing that VDR restriction site polymorphisms are associated with the genetic susceptibility to type 1 diabetes in different populations (13–15) and that vitamin D supplementation in early childhood is associated with a reduced risk for type 1 diabetes (16, 17). It is not clear, however, whether the linkage of VDR with type 1 diabetes susceptibility may be due to the immunomodulatory effects of the vitamin D hormone.

Using embryonic stem cell technology, we have recently generated mice in which a *lacZ* reporter gene cassette is driven by the endogenous VDR promoter (18). These gene-targeted mice express a mutant VDR with an intact hormone binding domain but lacking the first zinc finger necessary for DNA binding. The mutant receptor is functionally inactive, and homozygous mice do not show any responses to pharmacological doses of vitamin D metabolites (18). To further explore the functional role of vitamin D in the endocrine pancreas, we investigated glucose tolerance and insulin secretion in these mice. Here we show that a nonfunctioning VDR is associated with impaired glucose tolerance and reduced maximum insulin secretory capacity, independent of changes in calcium homeostasis.

MATERIALS AND METHODS

Animal maintenance

All animal procedures were approved by the local ethical committee and the government authorities. Wild-type (WT) and VDR mutant mice (18) were kept at 24°C with a 12L:12D cycle and were allowed free access to a normal mouse chow or a rescue diet and tap water. The normal diet (Altromin 1314, Altromin, Lage, Germany) contained 0.9% calcium, 0.7% phosphorus, 0% lactose, and 600 IU vitamin D/kg. The rescue diet (Altromin), containing 2% calcium, 1.25% phosphorus, 20% lactose, and 600 IU vitamin D/kg, was fed starting from 16 days of age. All experiments were performed on 10- to 12-wk-old male WT and homozygous offspring of heterozygous x heterozygous matings. The heterozygous mice used for the matings had been backcrossed to C57BL/6 genetic background for five to six generations.

LacZ staining

To visualize *lacZ* reporter gene expression, pre-embedding X-gal staining of the pancreas from WT and homozygous VDR mutant mice was performed as described (19). Briefly, the pancreas was prefixed with 2% paraformaldehyde (PFA)/0.2% glutaraldehyde at pH 8.0 for 1 h and was stained overnight in X-gal staining solution at pH 8.0. After postfixation in 4% PFA, the specimens were embedded in paraffin, sectioned at 5 μ m thickness, and counterstained with nuclear fast red.

Rescue diet and calcium homeostasis

To examine the effects of the rescue diet on calcium homeostasis, groups of WT and homozygous VDR mutant mice ($n=6-7$ each) on either the normal or the rescue diet were killed in the morning between 9 AM and noon. For the measurement of ionized blood calcium, 100 μ l blood were collected from the retroorbital venous plexus into heparinized capillaries while the animals were under anesthesia with ketamine/xylazine (67/7 mg/kg ip). Immediately thereafter, the mice were exsanguinated from the abdominal vena cava for serum collection.

Oral and subcutaneous glucose tolerance and insulin secretion

To examine alterations in oral glucose tolerance and insulin secretion, WT and homozygous VDR mutant mice on either the normal or the rescue diet ($n=9-16$ each) were kept individually on hunger grids in their normal cage environment for a 15 h period overnight. During that period, the mice had free access to tap water but were deprived of food. On the next morning, glucose (1.5 mg/g body wt) was administered at time 0 by gavage or by subcutaneous injection. For subcutaneous administration, glucose was dissolved in physiological saline. Blood glucose levels at 0, 10, 20, 30, 60, 90, and 120 min were determined in ~ 10 μ l of whole blood from the tip of the tail using a standard test system (Precision QID, Abbott, Wiesbaden, Germany). With the use of the same experimental protocol, serum samples for measurement of insulin levels were obtained from the retroorbital venous plexus at baseline and 10 min after the oral glucose challenge while the animals were under ether anesthesia. In preliminary experiments, we found that insulin serum levels are maximal 10 min after glucose administration using this regimen (data not shown). Because stress is an important confounding variable in these experiments, glucose tolerances and insulin measurements were performed on animals that experienced any of the procedures for the first time.

Northern blot analysis

For Northern blot analyses, normally fed mice were killed in the morning by an ether overdose. Total RNA was extracted from the whole pancreas using the RNeasy Midi Kit (Qiagen) and was separated on formaldehyde-containing agarose gels.

Pancreas islet histomorphometry and immunohistochemistry

For these measurements, nonfasting WT controls and homozygous VDR mutant mice on the normal diet were killed in the morning by an ether overdose, and the pancreas was immediately removed, fixed in 4% PFA overnight, and routinely processed for paraffin embedding. The

paraffin-infiltrated pancreas of each animal was cut in ~2 mm thick slices perpendicular to the long axis of the organ using a razor blade. All slices from each animal were placed into one embedding cassette with the cut surface facing downwards. Subsequently, the paraffin blocks were sectioned at 5 μm thickness. With the use of this approach, each section contained tissue from all pancreas regions.

For immunohistochemical detection of insulin-expressing cells, sections were deparaffinized, incubated for 15 min in 3% hydrogen peroxide in PBS to block endogenous peroxidase activity, and, after being blocked with 20% rabbit serum, incubated for 2 h at room temperature with guinea pig anti-porcine insulin antiserum diluted 1:2,000 (DAKO, Hamburg, Germany). Bound antibody was detected with peroxidase-conjugated rabbit anti-guinea pig IgG (DAKO), using Vector VIP (Vector, Burlingame, CA) as enzyme substrate. After being blocked with 20% goat serum, detection of glucagon, somatostatin, and pancreatic polypeptide (PP) was performed by incubating deparaffinized sections for 2 h at room temperature with rabbit anti-human glucagon (1:500), rabbit anti-human somatostatin (1:300), and rabbit anti-human PP (1:700). Bound antibody was detected with biotinylated goat anti-rabbit IgG and alkaline phosphatase-conjugated avidin biotin complex (Vector), using Vector Red as enzyme substrate. Levamisole (Vector) was added to the incubation medium at the concentration recommended by the supplier. Finally, the sections were counterstained with Mayer's hematoxylin.

Histomorphometric measurements were made with a semiautomatic image analysis system (VIDEOPLAN, C. Zeiss, Oberkochen, Germany) and a microscope with a drawing attachment on sections immunostained with an anti-insulin antibody. Islet area was measured in 70-120 islets in each animal at x400. The number of islets and the area of pancreatic tissue were quantified in three nonserial sections in each animal at x25. Islet number was expressed as per millimeter squared of pancreas tissue. Single β cells or small clusters of insulin positive cells with a total area of $<1000 \mu\text{m}^2$ were quantified separately as an index of islet neogenesis (20).

Biological chemistry

Blood ionized calcium was measured with an AVL 9140 electrolyte analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Total serum calcium was measured with flame photometry. Alkaline phosphatase activity and phosphorus concentrations were determined using a Hitachi 766 autoanalyzer (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Parathyroid hormone (PTH) concentrations were assessed using a two-sided enzyme-linked immunosorbent assay specific for intact mouse and rat PTH (Immutopics, San Clemente, CA). Insulin was measured by a rat-specific enzyme-linked immunosorbent assay using mouse insulin standards (ChrysalChem, Chicago, IL).

Statistical analyses

Statistics were computed using SPSS for Windows 10.0 (SPSS, Chicago, IL). After tests were conducted for equality of variances by Levene's test, statistical comparisons between WT and homozygous VDR mutants on each diet were made using a two-sided *t* test for variables with equal variances or using the Mann-Whitney U test for variables with significantly different variances. *P* values <0.05 were considered significant. The data are presented as means \pm SE.

RESULTS

Strong reporter gene expression in pancreatic islets

In agreement with earlier findings of VDR expression in insulin-producing β cells (21), our VDR mutant mice showed strong *lacZ* reporter gene expression in pancreatic islets ([Fig. 1](#)). The surrounding exocrine pancreas cells did not exhibit *lacZ* expression.

Rescue diet normalizes calcium homeostasis and body weight in VDR mutants

It is well known that calcium is an important factor in the regulation of insulin secretion in pancreatic β cells (22). Therefore, the hypocalcemia present in VDR mutant mice ([Table 1](#)) could be a major confounding factor in the current investigation. In contrast to the VDR knockout mice generated by Li and et al. (23), our VDR mutants do not show hypophosphatemia on the normal diet. The reason for this discrepancy is not known but may be due to different amounts of available phosphorus in the standard mouse chows used. It has been shown that a so-called “rescue diet” enriched with calcium, phosphorus, and lactose is able to correct calcium homeostasis in VDR knockout mice (24). In agreement with these results, values for body weight, total serum calcium, ionized calcium, serum phosphate, alkaline phosphatase, and serum PTH in our homozygous VDR mutants on the rescue diet were indistinguishable from those in WT mice on either the normal or the rescue diet ([Table 1](#)). Thus, the rescue diet was able to fully normalize alterations in body weight and mineral homeostasis in VDR mutants.

Glucose tolerance and insulin secretory capacity are impaired in VDR mutants

After these initial experiments, we performed oral glucose tolerance tests in homozygous VDR mutants and WT control mice on the normal and the rescue diet. After an overnight fasting period, blood glucose was unchanged in VDR mutant mice ([Fig. 2, A and B](#)). Baseline insulin levels were comparable in WT and VDR mutant mice on the normal diet, but mutant mice on the rescue diet showed lower serum insulin levels ([Fig. 2C](#)). When the mice were challenged with a single oral glucose administration, blood glucose reached significantly higher values in VDR mutants compared with WT controls, regardless of the diet ([Fig. 2, A and B](#)). When we measured maximum insulin serum levels 10 min after oral glucose administration, we found a 65 and 63% reduction in insulin levels relative to WT controls in VDR mutant mice on the normal and the rescue diet, respectively ([Fig. 2C](#)). These findings clearly indicate that oral glucose tolerance and insulin secretion are impaired in normocalcemic and normophosphatemic mice with a nonfunctioning VDR. To rule out that these changes were caused by endocrine signals originating from the gut in response to oral glucose loading, we performed subcutaneous glucose tolerance tests in WT and VDR mutant mice on the rescue diet ([Fig. 2D](#)). The results showed that not only oral but also subcutaneous glucose tolerance was impaired in normocalcemic VDR mutant mice.

Pancreas from VDR mutants shows reduced insulin mRNA content

To examine changes in the expression of insulin at the mRNA level, we performed Northern analyses of total RNA isolated from the whole pancreas of nonfasting mice. Relative to WT

controls, VDR mutant mice showed a distinct reduction in insulin mRNA levels ([Fig. 2E](#)). The rescue diet failed to restore insulin mRNA levels in VDR mutants.

VDR mutant mice have pancreas islets of normal size and number

It is evident that all of the observed changes in VDR mutant mice could be explained by a reduced pancreatic β cell mass. Therefore, we analyzed the number and size of pancreas islets by histomorphometry as well as the cell distribution within the islets by immunohistochemistry. Because the impairment in endocrine pancreas function was very similar in mutants on the normal and the rescue diet, we performed these measurements only in mice on the normal diet. It is shown in [Fig. 3A](#) and [B](#) that the size and number of islets were unchanged in the pancreas of VDR mutants relative to WT mice. During recent years, it has become increasingly clear that β cell mass is dynamic and that β cells in the pancreas are subject to a life-long renewal process, at least in rodents (25). Therefore, we measured the number of small clusters of β cells as an index of islet neogenesis (20). However, mutant mice had normal numbers of small β cell clusters ([Fig. 3B](#)), indicating normal islet neogenesis in the absence of VDR signaling. Similarly, the distribution of cells producing insulin, glucagon, somatostatin, and PP within the islets of Langerhans was indistinguishable between WT and mutant mice ([Fig. 3C](#)). These results indicate that the impaired glucose tolerance and insulin secretion in VDR mutant mice cannot be explained by alterations in pancreatic β cell mass or microanatomical changes within pancreas islets.

DISCUSSION

This study has demonstrated that disruption of the VDR signaling pathway is associated with a pronounced impairment in oral glucose tolerance and insulin secretory capacity, together with a reduction in pancreatic insulin mRNA levels in normally fed mice. These changes were independent of alterations in body weight or mineral homeostasis. Thus, the data provided by the current experiments clearly establish a molecular role of the VDR in the endocrine function of the pancreas *in vivo*. Although our results are remarkably similar to those reported by Cade and Norman (7) in vitamin D-deficient rats, those earlier studies could not completely rule out altered mineral homeostasis or the involvement of other, unknown pathways as potential causes for the impaired insulin secretion in vitamin D deficiency.

In contrast to our study, Hochberg and et al. (26) found glucose curves within the normal range when they performed oral glucose tolerance tests in a small number of patients with VDDRII. Further, peak insulin response after oral glucose loading was normal in two normocalcemic but subnormal in three hypocalcemic VDDRII patients. Thus Hochberg's study in humans with a nonfunctioning VDR did not provide a clear answer to the question of the influence of VDR deficiency on insulin secretion. Moreover, these authors did not use control subjects without the defect and, therefore, may have missed more subtle differences in oral glucose tolerance and insulin secretion in these patients. Nevertheless, it remains to be shown that the VDR has a functional role in the endocrine pancreas in humans.

It is well known that oral glucose induces the release of gastrointestinal hormones that stimulate pancreatic insulin secretion such as glucose-dependent insulinotropic polypeptide or glucagon-like peptide 1, resulting in augmented insulin secretion in response to oral glucose loading

compared with systemic glucose administration (27). Therefore, it would be conceivable that the effect of vitamin D on insulin secretion involves this enteroinsular axis. However, our finding of a similar impairment in both oral and subcutaneous glucose tolerance in VDR mutants suggests that alterations in the enteroinsular axis are not involved in the diminished insulin secretory response in mice with a nonfunctioning VDR. This idea is corroborated further by earlier reports of reduced insulin secretion in the isolated perfused pancreas from vitamin D-deficient rats (6) and also by the finding that the insulin biosynthetic capacity can be restored in isolated islets from vitamin D-deficient rats in vitro by addition of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (9).

VDR mutant mice demonstrated normal pancreatic β cell mass, normal architecture of pancreas islets, and a normal number of small clusters of insulin-producing cells. These findings suggest that fetal and postnatal islet development as well as the intensity of islet neogenesis during postnatal life is unchanged in VDR mutant mice. Therefore, our study shows that the reduced insulin secretory capacity in VDR mutants is not based on a developmental or structural defect but is rather caused by functional alterations within insulin-producing cells. Because mice with a nonfunctioning VDR had normal fasting blood glucose and insulin levels, the defect in pancreatic insulin secretion is latent and is seen only when the mice are challenged with glucose.

At present, it is unclear whether $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regulates only the biosynthesis of insulin or whether $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ can also influence the mechanisms of insulin secretion. In our study, the observed ~60% reduction in maximum insulin secretion in response to an oral glucose challenge was associated with a distinct decrease in pancreatic insulin mRNA content in nonfasting VDR mutant mice. Thus the impaired insulin secretion in VDR mutants may be caused by a reduction in the amount of insulin stored in β cells. This notion is indirectly corroborated by the finding that $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ does not enhance insulin secretion from islets of vitamin D-replete rats or of rat insulinoma cells (12). The stimulatory effect of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on islet cell insulin synthesis (9) may, by direct or indirect pathways, involve increased transcriptional activity of the insulin gene or increased insulin mRNA stability. So far, no vitamin D response elements were reported in the human or mouse insulin gene promoters.

In conclusion, the present data have demonstrated a molecular role of the VDR in pancreatic endocrine function and may provide a functional basis for the association between diabetes and VDR in epidemiological studies. Although our study has shown that the VDR is not involved in islet morphogenesis and postnatal regulation of β cell mass in the mouse, disturbances in the vitamin D signaling pathway may compromise the ability of the β cell to functionally respond to situations of an increased insulin demand such as in type 2 diabetes or in the prediabetic phase of type 1 diabetes. Clearly, more extensive experimentation is required to define the molecular pathways by which $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regulates pancreatic insulin synthesis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Deutsche Forschungsgemeinschaft to R. G. Erben (Er 223/5–1) and R. Balling (Ba 869/7–1). We are indebted to Norman Rieger, Claudia Bergow, Siglinde Lutz, and Margit Kohlross for excellent technical assistance. Present address for D.W. Soegiarto: MBT Munich Biotechnology GmbH, Fraunhoferstrasse 10, 82152 Martinsried, Germany. Present address for R. Balling: GBF Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Mascheroder Weg 1, 38124 Braunschweig, Germany.

REFERENCES

1. Bringhurst, F. R., Demay, M. B., and Kronenberg, H. M. (1998) Hormones and disorders of mineral metabolism. In *Williams Textbook of Endocrinology* (Wilson, J. D., Foster, D. W., Kronenberg, H. M., and Larsen, P. R., eds) pp. 1155-1209, W.B. Saunders, Philadelphia, PA
2. Evans, R. M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**, 889–895
3. Kato, S. (2000) The function of vitamin D receptor in vitamin D action. *J. Biochem. (Tokyo)* **127**, 717–722
4. Haussler, M. R., Whitfield, G. K., Haussler, C. A., Hsieh, J. C., Thompson, P. D., Selznick, S. H., Dominguez, C. E., and Jurutka, P. W. (1998) The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J. Bone Miner. Res.* **13**, 325–349
5. Jones, G., Strugnell, S. A., and DeLuca, H. F. (1998) Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol. Rev.* **78**, 1193–1231
6. Norman, A. W., Frankel, J. B., Heldt, A. M., and Grodsky, G. M. (1980) Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science* **209**, 823–825
7. Cade, C., and Norman, A. W. (1986) Vitamin D₃ improves impaired glucose tolerance and insulin secretion in the vitamin D-deficient rat in vivo. *Endocrinology* **119**, 84–90
8. Cade, C., and Norman, A. W. (1987) Rapid normalization/stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ of insulin secretion and glucose tolerance in the vitamin D-deficient rat. *Endocrinology* **120**, 1490–1497
9. Bourlon, P. M., Billaudel, B., and Faure-Dussert, A. (1999) 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.* **160**, 87–95
10. Ayesha, I., and Raghuramulu, N. (2000) Oral glucose tolerance is unaltered in vitamin D-deficient rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **46**, 115–118
11. Ayesha, I., Bala, T. S., Reddy, C. V., and Raghuramulu, N. (2001) Vitamin D deficiency reduces insulin secretion and turnover in rats. *Diabetes Nutr. Metab.* **14**, 78–84
12. Lee, S., Clark, S. A., Gill, R. K., and Christakos, S. (1994) 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and pancreatic β -cell function: vitamin D receptors, gene expression, and insulin secretion. *Endocrinology* **134**, 1602–1610
13. McDermott, M. F., Ramachandran, A., Ogunkolade, B. W., Aganna, E., Curtis, D., Boucher, B. J., Snehalatha, C., and Hitman, G. A. (1997) Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indian Asians. *Diabetologia* **40**, 971–975

14. Chang, T. J., Lei, H. H., Yeh, J. I., Chiu, K. C., Lee, K. C., Chen, M. C., Tai, T. Y., and Chuang, L. M. (2000) Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **52**, 575–580
15. Pani, M. A., Knapp, M., Donner, H., Braun, J., Baur, M. P., Usadel, K. H., and Badenhop, K. (2000) Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes* **49**, 504–507
16. The EURODIAB Substudy 2 Study Group. (1999) Vitamin D supplement in early childhood and risk for Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* **42**, 51–54
17. Hypponen, E., Laara, E., Reunanen, A., Jarvelin, M. R., and Virtanen, S. M. (2001) Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* **358**, 1500–1503
18. Erben, R. G., Soegiarto, D. W., Weber, K., Zeitz, U., Lieberherr, M., Gniadecki, R., Möller, G., Adamski, J., and Balling, R. (2002) Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D. *Mol. Endocrinol.* **16**, 1524–1537
19. Gossler, A., and Zachgo, J. (1993) Gene and enhancer trap screens in ES cell chimeras. In *Gene Targeting: A Practical Approach* (Joyner, C. J., ed) pp. 181–227, NY Oxford University Press, New York
20. Xu, G., Stoffers, D. A., Habener, J. F., and Bonner-Weir, S. (1999) Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* **48**, 2270–2276
21. Johnson, J. A., Grande, J. P., Roche, P. C., and Kumar, R. (1994) Immunohistochemical localization of the 1,25(OH)₂D₃ receptor and calbindin D_{28k} in human and rat pancreas. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **267**, E356–E360
22. Unger, R. H., and Foster, D. W. (1998) Diabetes mellitus. In *Williams Textbook of Endocrinology* (Wilson, J. D., Foster, D. W., Kronenberg, H. M., and Larsen, P. R., eds) pp. 973–1059, W.B. Saunders, Philadelphia, PA
23. Li, Y. C., Pirro, A. E., Amling, M., Delling, G., Baroni, R., Bronson, R., and Demay, M. B. (1997) Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9831–9835
24. Li, Y. C., Amling, M., Pirro, A. E., Priemel, M., Meuse, J., Baron, R., Delling, G., and Demay, M. B. (1998) Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice. *Endocrinology* **139**, 4391–4396
25. Bonner-Weir, S. (2000) Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology* **141**, 1926–1929

26. Hochberg, Z., Borochowitz, Z., Benderli, A., Vardi, P., Oren, S., Spirer, Z., Heyman, I., and Weisman, Y. (1985) Does 1,25-dihydroxyvitamin D participate in the regulation of hormone release from endocrine glands? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **60**, 57–61
27. Creutzfeldt, W., and Nauck, M. (1992) Gut hormones and diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Rev.* **8**, 149–177

Received August 8, 2002; accepted November 25, 2002.

Table 1**Rescue diet rich in calcium, phosphorus, and lactose normalizes calcium homeostasis in 10-wk-old homozygous VDR mutant mice**

Variable	Normal Diet		Rescue Diet	
	Wild type	VDR mutants	Wild type	VDR mutants
Body weight (g)	25.9 ± 0.9	22.3 ± 1.3*	26.9 ± 1.1	26.0 ± 0.8
Ionized blood calcium (mmol/l)	1.24 ± 0.01	0.94 ± 0.02*	1.22 ± 0.05	1.24 ± 0.02
Total serum calcium (mmol/l)	2.19 ± 0.05	1.69 ± 0.05*	2.42 ± 0.14	2.33 ± 0.02
Serum phosphorus (mmol/l)	2.74 ± 0.22	2.65 ± 0.24	2.88 ± 0.22	2.70 ± 0.16
Alkaline phosphatase (U/l)	94 ± 7	354 ± 28*	81 ± 20	76 ± 9
Serum parathyroid hormone (pg/ml)	10.9 ± 3.5	1290 ± 171*	9.5 ± 2.3	10.5 ± 3.0

All values are means ± SE of 3-7 animals in each group. * $P < 0.05$ vs. wild-type on same diet by t test or U test.

Fig. 1

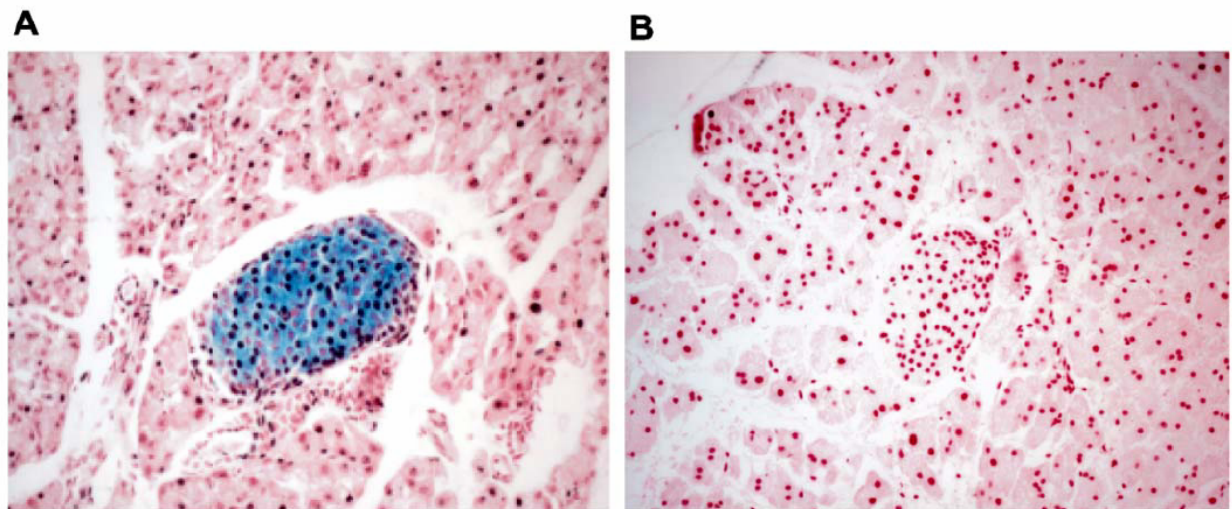


Figure 1. Strong *lacZ* reporter gene expression in pancreas islets of VDR mutants. Paraffin sections of pancreas from 10-wk-old wild-type and homozygous VDR mutant mice after *lacZ* staining. **A)** Islet cells of the pancreas show intense *lacZ* expression in the homozygous VDR mutant mouse. Exocrine pancreas cells are negative. **B)** Staining is completely absent in the wild-type mouse. The *lacZ* expression is visualized by X-Gal staining, and paraffin sections are 5 μ m thick.

Fig. 2

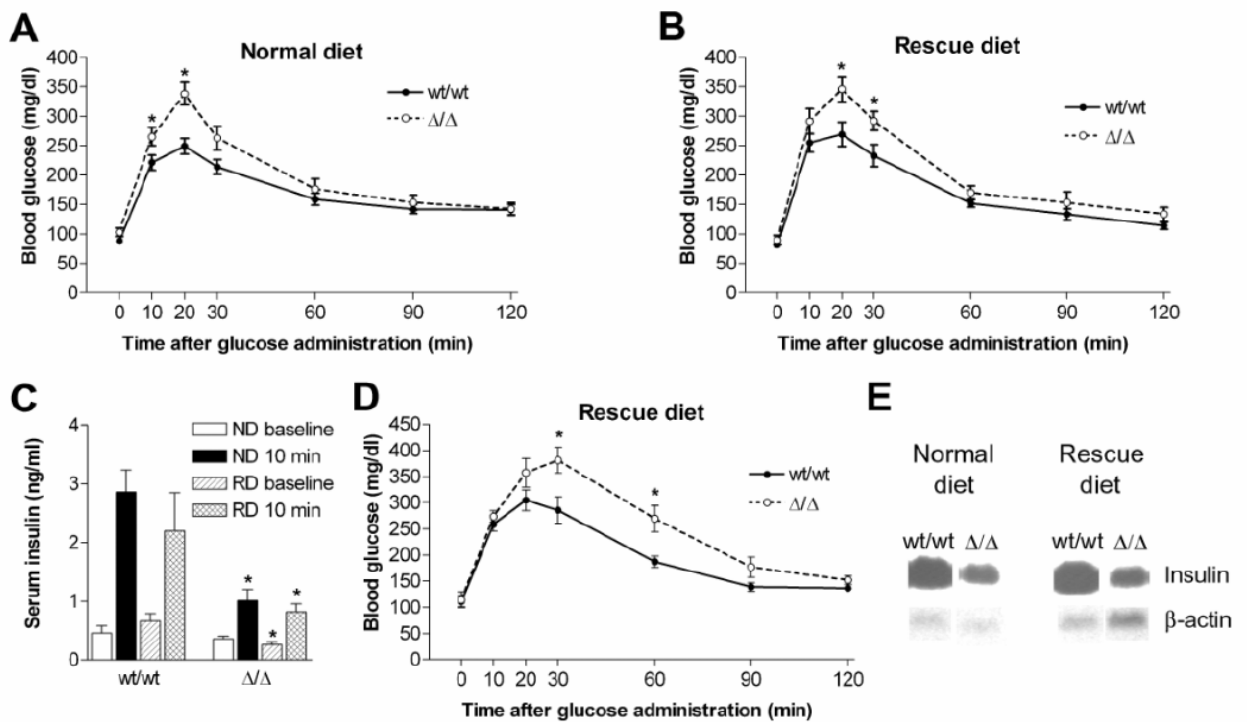


Figure 2. Mice with a nonfunctioning VDR have impaired oral glucose tolerance and reduced maximum insulin secretory capacity. **A-B**) Oral glucose tolerance ($n=9-11$ each) in 10-wk-old male wild-type (wt/wt) and homozygous VDR mutant mice (Δ/Δ) fed a standard diet (**A**) or a rescue diet (**B**). Glucose (1.5 mg/kg body wt.) was administered at time 0 by gavage after an overnight fast. **C**) Serum insulin levels at baseline and 10 min after an oral glucose challenge (1.5 mg/kg body wt.) in wild-type and VDR mutant mice on the normal (ND) and the rescue (RD) diet ($n=7-16$ each). **D**) Subcutaneous glucose tolerance (1.5 mg/kg body wt.) in wild-type and VDR mutant mice on the rescue diet ($n=6$ each). **E**) Representative Northern analysis of total RNA (10 μ g/lane) isolated from the whole pancreas of nonfasting, 10-wk-old male wild-type and homozygous VDR mutant mice on the normal or the rescue diet. Blots were hybridized with a 0.4 kb probe specific for both mouse insulin genes, using a 0.9 kb β -actin-specific probe as loading control. Data are means \pm SE. * $P < 0.05$ vs. wild-type by t test or U test.

Fig. 3

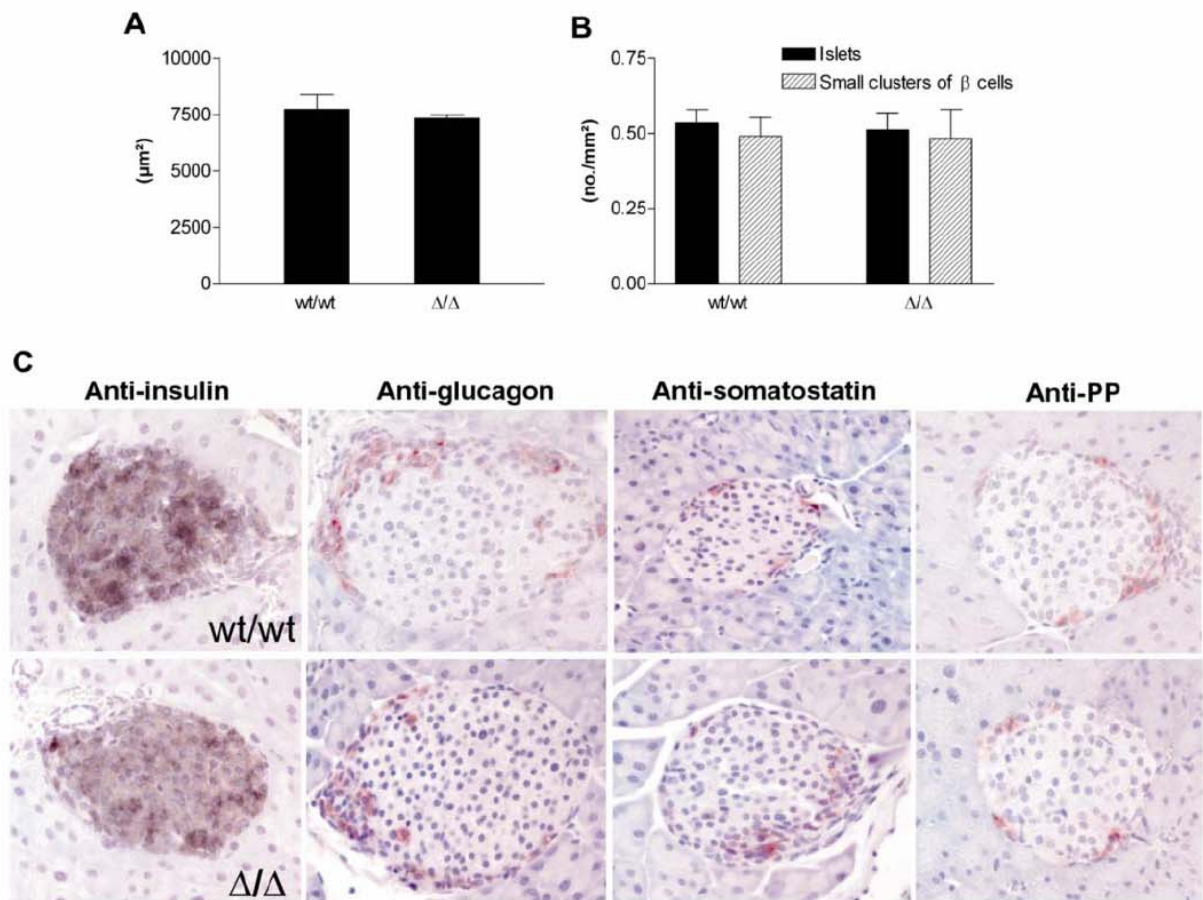


Figure 3. VDR mutant mice have normal β -cell mass and normal morphology of pancreas islets. A-B) Histomorphometry of pancreas islets. Mean area of islets (A) and number (B) of islets or small clusters of insulin positive cells measured histomorphometrically on sections immunolabeled for insulin in 10-wk-old male wild-type (wt/wt) and VDR mutant (Δ/Δ) mice on the normal diet ($n=4$ each). Data are means \pm SE. C) Immunohistochemical analysis of the pancreas from 10-wk-old wild-type (top panels) and VDR mutant mice (bottom panels) using antibodies against insulin, glucagon, somatostatin, and pancreatic polypeptide (PP) revealed normal cellular architecture of pancreas islets in VDR mutants.

4 Allgemeine Diskussion

4.1 Vergleich unseres Tiermodells mit anderen VDR-Knockout-Modellen

Die in unseren Studien verwendete Maus wurde durch den gezielten Austausch von Exon II des VDR gegen einen Targeting-Vektor erstellt. Dadurch wurde der erste Zinkfinger der DNA-Bindungsregion des VDR deletiert, was zu einem Verlust der DNA-Bindungsfähigkeit führt, die als Voraussetzung für die Transaktivierung gilt (MacDonald, 1999). Obwohl der Rezeptor normal exprimiert wird und eine normale Liganden-Bindungsaffinität und Translokation aufweist, zeigen die Mäuse, die in Bezug auf die Mutation homozygot sind, einen ausgeprägten Phänotyp, der ab dem Alter von 3 Wochen erkennbar wird. Vor allem in der Wachstumsphase bleiben die Tiere in Größe und Gewicht zurück, sie zeigen Hypokalzämie, sekundären Hyperparathyreoidismus, hohe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Plasmaspiegel sowie ausgeprägte Rachitis. Das augenfälligste Merkmal der Tiere ist die totale Alopezie, die sich ab der 4. Lebenswoche zu entwickeln beginnt. Heterozygote Tiere sind phänotypisch normal, da es sich um ein rezessives Merkmal handelt. Der Phänotyp zeigt keine Geschlechts-Spezifität, er beeinflusst auch nicht die Fertilität oder Lebenserwartung der Tiere. Darüber hinaus haben unsere Daten erstmals eindeutig gezeigt, dass männliche und weibliche VDR-Mutanten normale Serum-Konzentrationen von Testosteron und Estradiol aufweisen. Der VDR – obwohl er in den Gonaden exprimiert wird – spielt somit keine essentielle Rolle für die Sekretion von Sexualsteroiden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Phänotyp unserer Mausmutante weitgehend identisch ist mit der von Li et al. (1997) erstellten VDR-Mutante, deren VDR trunkiert und somit funktionell vollständig inaktiv ist. Er entspricht in seiner Ausprägung auch den dokumentierten Fällen von VDDR II des Menschen, bei denen die vorliegende Mutation einen vollständigen Verlust der Rezeptorfunktion induziert. Es ist somit nahe liegend, dass bei der von uns generierten Maus der VDR komplett inaktiviert ist, also die Deletion des ersten Zinkfingers der DNA-Bindungsregion zur funktionellen Inaktivierung führt. Dies wurde auch durch die in Kapitel 1 beschriebenen Experimente untermauert, in denen unsere VDR-Mutanten in einer Reihe von Geweben keinerlei physiologische Reaktionen auf die Gabe von hochdosierten Vitamin-D-Metaboliten zeigten. Es ist nach wie vor unklar, warum die von Yoshizawa et al. (1997) erzeugte VDR-Knockout-Maus sich im Phänotyp von unserer Mutante und auch von der in Boston erzeugten Mutante (Li et al., 1997) unterscheidet. Möglicherweise

liegt hier ein modulierender Einfluss des genetischen Hintergrunds oder der Haltungsbedingungen vor.

Als typisches Merkmal für VDR-Mutationen mit völligem Funktionsverlust gilt auch die totale Alopezie. Die von Li et al. (1997) generierte Maus wurde hinsichtlich der Ursache der Alopezie genauer untersucht (Sakai et al., 2001). Dabei stellte sich heraus, dass bei VDR-Nullmutanten eine Störung der Anagen-Phase der Haarbildung vorliegt und die VDR-exprimierenden Keratinozyten der Haarwurzelscheiden hierfür eine entscheidende Rolle spielen. Da die Überlegung bestand, dass die Alopezie auch Folge einer toxischen Wirkung der hohen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Plasmaspiegel sein könnte, wurde ein Teil der Tiere Vitamin D-frei gehalten. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die Haarbildung. Es handelt sich bei der Alopezie somit um einen Effekt, der durch die fehlende Funktion des VDR selbst ausgelöst wird, unabhängig vom Vorhandensein des Liganden. In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass eine Überexpression von humanem VDR in Keratinozyten von VDR-Knockout-Mäusen die Entwicklung der Alopezie vollständig verhindert (Chen et al., 2001).

4.2 Einfluss diätetischer Maßnahmen auf die Phänotypausprägung

Ähnlich wie in der Therapie von VDDR II-Patienten kann auch bei VDR-Knockout-Mäusen durch erhöhte diätetische Zufuhr von Kalzium und Phosphat in Kombination mit einem hohen Laktose-Anteil der Diät („Rescue diet“) eine Normalisierung des Plasmakalzium-Spiegels erreicht werden, wodurch die Entwicklung des sekundären Hyperparathyreoidismus verhindert wird und ein weitgehend ausgeglichener Kalzium- und Knochenstoffwechsel erzielt werden kann (Li et al.; 1998; Zeitz et al., 2003). Die Tatsache, dass Mäuse mit inaktiviertem VDR auf der Rescue diet normale PTH-Spiegel und eine normale Größe der Nebenschilddrüsen (Li et al., 1998) aufweisen, steht im Widerspruch zu der häufig vertretenen Meinung, dass der VDR eine essentielle Funktion für die Kontrolle der Zellproliferation und der PTH-Sekretion in der Nebenschilddrüse innehat. Die Möglichkeit, durch diätetische Maßnahmen alle Veränderungen der Kalziumhomöostase bei VDR-Mutanten ausgleichen zu können, stellt somit eine sehr elegante Methode dar, um unmittelbar VDR-abhängige Effekte von Wirkungen zu unterscheiden, die indirekt über Störungen des Mineralstoffwechsels entstehen.

Ein weiteres gutes Beispiel für das Potenzial dieser Methode ist, dass – wie in Kapitel 1 beschrieben - erst durch die Fütterung der Rescue diet eindeutig gezeigt werden konnte, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine wichtige Rolle in der renalen Kalzium-Reabsorption spielt. Die im Urin von homozygoten VDR-Mutanten bei normaler Fütterung gemessenen Kalziumwerte unter-

scheiden sich nicht signifikant von denen ihrer Wildtyp-Wurfgeschwister. Dadurch entsteht der Eindruck, es gäbe bei der renalen Kalziumausscheidung keinen VDR-abhängigen Effekt. Dabei ist jedoch nicht berücksichtigt, dass aufgrund der Hypokalzämie bei VDR-Mutanten auch die Menge von filtriertem Kalzium im Primärharn reduziert ist. Zusätzlich wird die Kalziumrückresorption durch den erhöhten PTH-Spiegel stark stimuliert.

Die VDR-Mutanten, die ab dem 16. Lebenstag die Rescue diet verabreicht bekommen, haben normale Kalzium- und PTH-Spiegel im Blut. Durch die Normalisierung der Kalziumhomöostase tritt eine deutlich erhöhte renale Kalziumausscheidung zutage, was auf eine Störung der renalen Kalziumrückresorption zurückzuführen ist. Dabei handelt es sich um eine Funktionsstörung, die auch in Vitamin-D-Mangelsituationen nachgewiesen werden konnte (Yamamoto et al., 1984). Unsere Experimente haben somit eindeutig gezeigt, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine wichtige molekulare Funktion in der renal-tubulären Kalzium-Reabsorption besitzt.

Da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wahrscheinlich an mehreren Stellen in die Kalzium-Rückresorptionsmechanismen der Niere eingreift, gibt es eine Reihe von Erklärungs-Ansätzen für die reduzierte renal-tubuläre Kalzium-Reabsorption bei VDR-Mutanten. Nach dem Ergebnis unserer Untersuchungen und in Übereinstimmung mit den Arbeiten von Li et al. (2001) liegt bei den $\text{VDR}^{\Delta/\Delta}$ -Tieren eine Verringerung der Calbindin D9K-Expression vor. Diesem intrazellulären Transportprotein wird vor allem eine Rolle bei der Stimulation der basolateralen Kalzium-Ausschleusung aus den Tubuluszellen zugeschrieben (Bouhassira et al., 1994). Die Transkriptionsrate des anderen renalen Kalziumbindungsproteins Calbindin D28K ist bei hypokalzämischen $\text{VDR}^{\Delta/\Delta}$ -Tieren zwar erniedrigt, bei normokalzämischen Tieren aber normal – was den Schluss zulässt, dass dieses Protein entgegen verbreiteter Auffassung eher Kalzium- als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -abhängig ist. Gleiches gilt auch für den nierenspezifischen epithelialen Kalziumkanal ECaC1 (Weber et al., 2001). Zusammenfassend kann man sagen, dass die Niere in ihrer zentralen Bedeutung für die Kalziumhomöostase von sekundären Vitamin D-Mangeleffekten (Hypokalzämie, sekundärer Hyperparathyreoidismus) ebenso stark beeinflusst ist wie das Knochengewebe, so dass Aussagen über Effekte, die VDR-abhängig sind, erst nach dem Einstellen normaler Plasmakalzium-Spiegel gemacht werden können. Ursache für die renale Kalzium-Rückresorptionsstörung der $\text{VDR}^{\Delta/\Delta}$ -Mäuse ist möglicherweise die verringerte Transkriptionsrate von Calbindin D9K. Gegen diese Hypothese spricht jedoch, dass die Expression von Calbindin D9K bei $\text{VDR}^{\Delta/\Delta}$ -Mäusen unabhängig von der Diät (Normaldiät oder Rescue diet) erniedrigt ist. Es ist demnach noch völlig unklar, welcher Faktor für

den Defekt der renal-tubulären Kalziumreabsorption in Abwesenheit eines funktionellen VDR verantwortlich ist.

4.3 Gewebsresistenz von $VDR^{\Delta/\Delta}$ -Mäusen gegenüber Vitamin-D-Metaboliten

Da die Phänotypausprägung der $VDR^{\Delta/\Delta}$ -Maus einen vollständig inaktiven VDR impliziert, war es von besonderem Interesse zu klären, ob tatsächlich eine totale Gewebsresistenz gegenüber $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ besteht. Gleichzeitig sollte festgestellt werden, ob $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als wichtiger Vitamin-D-Metabolit mit vermuteter eigenständiger Funktion in Vitamin-D-Zielgeweben (Norman et al., 2002) in den $VDR^{\Delta/\Delta}$ -Mäusen einen messbaren Effekt induziert.

Zu diesem Zweck wurden die Mäuse mit hohen Dosen der oben genannten Vitamin-D-Analoga behandelt. Die bekannten Effekte einer Kurzzeitbehandlung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bestehen in einer gesteigerten enteralen Kalziumresorption, in einer erhöhten Knochenresorption sowie in einer Hemmung der PTH-Ausschüttung (Erben et al., 1997). Dabei handelt es sich wahrscheinlich vorwiegend um genomische Effekte. Die physiologische Bedeutung von nicht-genomischen Wirkungen für die kalzämischen Effekte von Vitamin-D-Metaboliten ist unklar. Insbesondere für die enterale Kalziumresorption wird ein VDR-unabhängiger Mechanismus diskutiert, in den möglicherweise ein alternativer membranständiger Vitamin-D-Rezeptor involviert ist (Norman, 1998). Ein solcher eigenständiger Rezeptormechanismus sollte von der Inaktivierung des klassischen, nukleären VDR unberührt bleiben. Bei den Wildtyp-Tieren kam es ebenso wie bei den heterozygoten Tieren zu den erwarteten Ergebnissen in Form von Hyperkalzämie, Hyperkalziurie und PTH-Depression, die $VDR^{\Delta/\Delta}$ -Mäuse zeigten jedoch keinerlei Veränderungen. Analoge Ergebnisse zeigten sich auch in Versuchen mit Applikation von hohen Dosen von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Dies zeigt, dass sich die Gewebsresistenz der $VDR^{\Delta/\Delta}$ -Mäuse auch auf $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erstreckt. Zusätzlich zu diesen Experimenten wurden – wie in Kapitel 1 beschrieben – auch Versuche durchgeführt, in denen die Reaktion von $VDR^{\Delta/\Delta}$ -Tieren auf die topische, kutane Anwendung von Vitamin-D-Analoga untersucht wurde. Dazu wurde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und zusätzlich das in diesen Test-Systemen ca. 100fach potentere, synthetische Vitamin-D-Analogon KH1060 verwendet. Bei $VDR^{\Delta/\Delta}$ -Mäusen war jedoch keine gesteigerte Proliferation von Keratinozyten in Antwort auf diese Therapie festzustellen.

Alle diese Versuch zeigten somit hinsichtlich der Gewebsresistenz von $VDR^{\Delta/\Delta}$ -Mäusen ein überraschend klares Ergebnis: Es besteht bei diesen Mäusen - zumindest in den untersuchten Organsystemen Haut, Darm, Knochen, Nebenschilddrüsen und Nieren - keinerlei Reaktionsfähigkeit mehr gegenüber $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder anderen Vitamin-D-Analoga.

Neben diesen In-vivo-Experimenten testeten wir das Vorhandensein schneller, nicht-genomischer Effekte in vitro an kultivierten Osteoblasten von VDR^{Δ/Δ}-Tieren. Auch hier war ein eindeutiges Ergebnis zu verzeichnen: Zellen von Wildtyp-Tieren zeigten unter dem Einfluss von 1,25(OH)₂D₃ innerhalb von Sekunden einen intrazellulären Kalziumanstieg, bei VDR^{Δ/Δ}-Zellen konnte keine Änderung festgestellt werden.

Diese Ergebnisse demonstrieren nicht nur, dass allem Anschein nach durch Vitamin-D-Analoga keinerlei genomische Effekte in den untersuchten Geweben von VDR^{Δ/Δ}-Tieren ausgelöst werden können, der mutierte VDR also vollständig inaktiv ist, sondern dass darüber hinaus auch keine nicht-genomischen Soforteffekte mehr nachweisbar sind.

Diese Beobachtungen sind von besonderem Interesse im Hinblick auf die Diskussion, die seit ca. 20 Jahren um die Existenz von Membranrezeptoren für 1,25(OH)₂D₃ und 24,25(OH)₂D₃ geführt wird. Diese Membranrezeptoren sollen eine Funktion bei der Vermittlung von Soforteffekten haben, wahrscheinlich durch Interaktionen mit Kalziumkanälen, die über einen Anstieg des Kalziumspiegels intrazelluläre Signaltransduktionswege stimulieren. Sie werden auch als MARRS (membrane associated rapid response steroid binding proteins) bezeichnet (Farach-Carson & Nemere, 2003). Ob diese hypothetischen Membranrezeptoren in vivo aber eine eigenständige Funktion haben, ist derzeit noch unklar. Dem 1,25(OH)₂D₃-Membranrezeptor wird z.B. die Regulation der Proteinkinase C in den Matrixvesikeln von Chondrozyten zugeschrieben (Schwartz et al., 2002) ebenso wie Effekte in Osteoblasten, wo auch ein spezifischer Rezeptor für 24,25(OH)₂D₃ vermutet wird (Boyan et al., 2002). Für den letzteren Metaboliten wird außerdem eine eigenständige Funktion bei der Frakturheilung postuliert (Norman et al., 2002). Es gibt aber auch Anhaltspunkte dafür, dass die Wirkmechanismen von Nuklearrezeptor und putativem Membranrezeptor zumindest in einigen Bereichen gekoppelt sind. So wird z.B. vermutet, dass die Aktivierung des Membranrezeptors über eine Signalkaskade, die die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase einschließt, die Transaktivierung des VDR im Zellkern moduliert (Norman et al., 2002).

Die Ergebnisse aus den in Kapitel 1 dargelegten Experimenten legen den Schluss nahe, dass der nukleäre VDR sowohl bei der genomischen als auch bei der nicht-genomischen Signaltransduktion eine zentrale Rolle spielt, wahrscheinlich auch in Bezug auf 24,25(OH)₂D₃ als Liganden. Unsere Daten sprechen somit eindeutig gegen die Existenz eines eigenständigen Membranrezeptors für Vitamin-D-Metaboliten. Dies wird auch dadurch unterstrichen, dass trotz 20jähriger, intensiver Suche der zweifelsfreie Nachweis eines Membranrezeptors für 1,25(OH)₂D₃ oder irgendein anderes Steroidhormon bisher nicht gelungen ist. Obwohl prinzi-

piell die Möglichkeit besteht, dass an sich vorhandene Membranrezeptoren in ihrer Funktion von VDR abhängig und daher in VDR^{Δ/Δ}-Mäusen inaktiv sind, ist diese Hypothese doch als sehr unwahrscheinlich einzuschätzen, nachdem ein völliges und nicht nur ein partielles Fehlen der nicht-genomischen Effekte bei den VDR-Mutanten vorliegt. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass in Analogie zu anderen Steroidhormonen der klassische VDR selbst die nicht-genomischen Effekte vermittelt. Derzeit ist über die Bedeutung der Strukturelemente von VDR für die verschiedenen intrazellulären Protein-Interaktionen und die möglichen Reaktionspartner noch zu wenig bekannt, um genauere Aussagen über den Signaltransduktionsweg nicht-genomischer Effekte von 1,25(OH)₂D₃ machen zu können. Weitere Studien sind notwendig, um den Zusammenhang zwischen VDR und der Vermittlung nicht-genomischer Effekte zu entschlüsseln.

4.4 VDR-vermittelte Effekte auf die Insulinsekretion

Das endokrine Pankreas gehört nicht zu den klassischen Vitamin-D-Zielgeweben, in denen 1,25(OH)₂D₃ eine als physiologisch essentiell anerkannte Rolle spielt. Eine Korrelation zwischen Vitamin-D-Mangel und einer gestörten Insulinsekretion ist zwar schon lange vermutet worden (Norman et al., 1980; Kadowaki & Norman, 1985; Cade & Norman, 1986, 1987), die vorhandenen experimentellen und klinischen Daten sind jedoch widersprüchlich (Hochberg et al., 1985; Lee et al., 1994; Bourlon et al., 1999; Ayesha et al., 2001). Insbesondere die Rolle von indirekten, über eine veränderte Kalzium- und Phosphor-Homöostase vermittelten Effekten von 1,25(OH)₂D₃ auf die Funktionen des endokrinen Pankreas war stets unklar. Wir haben das von uns generierte Mausmodell mit mutiertem VDR dazu benutzt, um diese Fragen zu bearbeiten.

Unsere in Kapitel 2 beschriebenen Versuche haben erstmals klar gezeigt, dass bei VDR-Mutanten eine reduzierte Synthese von Insulin in β -Zellen des Pankreas vorliegt. Ebenso ist die maximale Insulinsekretion in Antwort auf eine orale Glukosebelastung bei VDR-Mutanten um mehr als 60% reduziert. Beide Veränderungen sind unabhängig von Veränderungen der Kalziumhomöostase oder des Körpergewichtes.

VDR^{Δ/Δ}-Mäuse haben eine normale Pankreasentwicklung, sie zeigen weder morphologischen Besonderheiten der Pankreasstruktur noch unter Standard-Haltungsbedingungen abweichende Blutglukose- oder Insulinwerte. Nach den Ergebnissen unserer Studie liegt die Bedeutung von Vitamin D für die Insulinfreisetzung in einer „Verstärkerfunktion“ in Situationen hoher Anforderung. Die Inaktivierung des VDR stellt unter normalen Lebensbedingungen al-

so einen latenten Defekt dar. Ob der Einfluss von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sich nur auf die Biosynthese oder auch auf die Sekretion von Insulin erstreckt, ist derzeit noch nicht klar. In der von uns durchgeführten Studie wurden in den β -Zellen von $\text{VDR}^{\Delta/\Delta}$ -Mäusen zwar eine Erniedrigung der Insulin-mRNA festgestellt, eine direkte Rolle von VDR in der Steuerung der Transkription des Insulingens ist aber noch nicht nachgewiesen. Da Veränderungen in der intrazellulären Kalziumkonzentration von entscheidender Bedeutung für die Insulinsekretion sind, könnte der Effekt von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auch im Bereich der Modulation des intrazellulären Kalziumtransportes liegen, möglicherweise unter Einbeziehung des Kalziumbindungsproteins Calbindin D28K (Reddy et al., 1997; Sooy et al., 1999). Weitere Studien sind erforderlich, um die molekulare Rolle von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei der Insulinbiosynthese und -sekretion im Pankreas zu klären. Dies könnte zu wichtigen neuen Impulsen für Prophylaxe und Therapie des Diabetes mellitus bei Mensch und Tier führen.

4.5 Ausblick

Wie die funktionale Analyse des von uns generierten Mausmodells gezeigt hat, spielt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und seine VDR-abhängigen Effekte in vielen Geweben eine wichtige Rolle. Die Diskrepanz zwischen dem nahezu ubiquitären Vorkommen von VDR im Körper und dem scheinbaren Fehlen von Symptomen beim funktionellen Ausfall des VDR in den meisten der „nicht-klassischen“ Organe wie z.B. Pankreas, Gonaden, Hypophyse, Thymus, und Immunsystem legt die Vermutung nahe, dass VDR in diesen Geweben Funktionen erfüllt, die denen von uns im endokrinen Pankreas nachgewiesenen Funktionen ähneln: Nicht essentiell für die Organfunktion, aber mit weitreichenden modulativen Aufgaben, eingebunden in das Kommunikationsnetzwerk der Zelle mit dem Ziel, diese gegenüber unterschiedlichen Anforderungen flexibler zu machen.

In den letzten Jahren stellt sich im Bereich medizinischer Forschung immer mehr die Frage, inwieweit latente Gendefekte einen Prädispositionsfaktor für Krankheiten wie z.B. Diabetes mellitus oder Osteoporose darstellen. Tiermodelle wie das von uns vorgestellte können hier vielleicht einen Einblick geben, wie latent eingeschränkte Organfunktionen letztlich zum Auftreten solcher multifaktorieller Erkrankungen beitragen. Entscheidende Voraussetzung dafür ist jedoch eine genaue Kenntnis der molekularen Funktionen des Genproduktes, in unserem Fall also des VDR, in den entsprechenden Geweben. Um dieses Ziel zu erreichen, sind weitere, umfangreiche Studien erforderlich.

5 Zusammenfassung

Das Vitamin-D-Hormon 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃], die biologisch aktive Form von Vitamin D, ist essentiell für einen intakten Mineralhaushalt. Unter Benutzung von Gene Targeting war es unsere Absicht, ein Mausmodell mit deletiertem Vitamin-D-Rezeptor (VDR) zu erzeugen, bei dem unter Kontrolle des endogenen VDR-Promotors ein *LacZ*-Reporter gen exprimiert wird. Hier zeigen wir, dass unsere Mausmutanten einen mutierten VDR mit intakter Hormon-Bindungsdomäne aber ohne den für die DNA-Bindung notwendigen ersten Zinkfinger exprimieren. Die Expression des Reportergens war weit verbreitet während der Embryogenese und postnatal. Deutliche *LacZ*-Expression zeigte sich in Knochen, Knorpel, Darm, Niere, Haut, Gehirn, Herz und Nebenschilddrüsen. Homozygote Mutanten sind eine Phänokopie von Mäusen mit fehlendem VDR und zeigen Wachstumsretardierung, Rachitis, sekundären Hyperparathyreoidismus und Alopezie. Eine mit Kalzium (Ca), Phosphor und Laktose angereicherte Diät normalisierte die Blut-Ca- und Parathormon-Werte, offenbarte aber ein renales Ca-Verlust-Syndrom bei normokalzämischen VDR-Mutanten. Bei der Behandlung mit pharmakologischen Dosen von Vitamin-D-Metaboliten zeigten homozygote Mäuse keinerlei Reaktivität mehr in Haut, Knochen, Darm, Nebenschilddrüsen und Niere. Dies zeigt, dass der mutierte VDR funktionell inaktiv ist und dass keine physiologisch bedeutsamen Vitamin-D-Signaltransduktionswege neben dem klassischen VDR existieren. Auch fehlten schnelle, nicht-genomische Wirkungen von 1,25(OH)₂D₃ in Osteoblasten von VDR-Mutanten, was die These unterstützt, dass der klassische VDR die nicht-genomischen Wirkungen von 1,25(OH)₂D₃ vermittelt (publiziert in *Mol Endocrinol* 16:1524-1537, 2002).

Unter Benutzung des von uns generierten Maus-Modells sollte die Rolle von Vitamin D für das endokrine Pankreas weiter untersucht werden. Pankreasinseln, nicht jedoch das exokrine Pankreas, zeigten eine deutliche *LacZ*-Reporter gen-Expression in VDR-Mutanten. Durch die Verabreichung der „Rescue Diet“ an Wildtyp- und homozygote Tiere in diesem Versuch sollten mögliche Einflüsse von unterschiedlichem Blut-Ca-Spiegel oder Körpergewicht auf die Insulinsekretion ausgeschaltet werden. In oralen und subkutanen Glukosetoleranztests zeigte sich, dass bei gleichen Basal-Blutglukosewerten die VDR-Mutanten auf beiden Diäten gegenüber den Wildtyp-Tieren erhöhte Blutglukosespiegel und um ca. 60% reduzierte maximale Insulinspiegel aufwiesen. Zusätzlich war der Insulin-mRNA-Gehalt im Pankreas von VDR-Mutanten auf beiden Diäten verringert, jedoch fand sich eine normale pankreatische β -Zellmasse, Inselarchitektur und Insel-Neogenese. Diese Daten zeigen klar, dass der VDR eine molekulare Rolle für die pankreatische Insulinsynthese und -sekretion in vivo besitzt (publiziert in *FASEB J* 10.1096/fj.02-0424fje, January 22, 2003).

Summary

Endocrine regulation through the vitamin D receptor

The vitamin D hormone 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃], the biologically active form of vitamin D, is essential for an intact mineral metabolism. Using gene targeting, we sought to generate vitamin D receptor (VDR) null mutant mice carrying the reporter gene *lacZ* driven by the endogenous VDR promoter. Here we show that our gene-targeted mutant mice express a VDR with an intact hormone binding domain but lacking the first zinc finger necessary for DNA binding. Expression of the *lacZ* reporter gene was widely distributed during embryogenesis and postnatally. Strong *lacZ* expression was found in bones, cartilage, intestine, kidney, skin, brain, heart, and parathyroid glands. Homozygous mice are a phenocopy of mice totally lacking the VDR protein, and showed growth retardation, rickets, secondary hyperparathyroidism, and alopecia. Feeding of a diet high in calcium, phosphorus, and lactose normalized blood calcium and serum parathyroid hormone levels but revealed a profound renal calcium leak in normocalcemic homozygous mutants. When mice were treated with pharmacological doses of vitamin D metabolites, responses in skin, bone, intestine, parathyroid glands, and kidney were absent in homozygous mice, indicating that the mutant receptor is non-functioning and that vitamin D signaling pathways other than those mediated through the classical nuclear receptor are of minor physiological importance. Furthermore, rapid, non-genomic responses to 1,25(OH)₂D₃ in osteoblasts were abrogated in homozygous mice, supporting the conclusion that the classical VDR mediates the nongenomic actions of 1,25(OH)₂D₃ (published in *Mol Endocrinol* 16:1524-1537, 2002).

Using this gene-targeted mouse model, it was the aim of further studies to explore the functional role of vitamin D for the endocrine pancreas. Pancreatic islets but not exocrine pancreas cells showed strong *lacZ* reporter gene expression in mutant mice. To rule out possible influences of hypocalcemia on pancreatic endocrine function, a rescue diet enriched with calcium, phosphorus, and lactose was fed to wild-type (WT) and VDR mutant mice. The rescue diet normalized body weight and mineral homeostasis in VDR mutants. In glucose tolerance tests, baseline blood glucose levels were unchanged in fasting VDR mutants. However, blood glucose was elevated after oral or subcutaneous glucose loading, and maximum serum insulin levels were reduced by about 60% in VDR mutants vs. WT mice on either diet. In addition, insulin mRNA levels were decreased in VDR mutant mice on both diets, while pancreatic β cell mass, islet architecture, and islet neogenesis were normal. These findings clearly establish a molecular role of the VDR for pancreatic insulin synthesis and secretion *in vivo* (published in *FASEB J* 10.1096/fj.02-0424fje, January 22, 2003)

6 Literaturverzeichnis

- Akerstrom, V.L., Walters, M. Physiological effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in TM4-sertoli cell line. *Am J Physiol* 1992; 262:E884-E890.
- Andersson, S., Davis, D.L., Dahlback, H., Jornvall, H., Russell, D.W. Cloning, structure and expression of the mitochondrial cytochrome P450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J Biol Chem* 1989; 264:8222-8229.
- Ayesha, I., Bala, T.S., Reddy, C.V., and Raghuramulu, N. Vitamin D deficiency reduces insulin secretion and turnover in rats. *Diabetes Nutr Metab* 2001; 14:78-84.
- Axen, E., Harmeyer, J., Wikvall, K. Renal and hepatic 1 α -hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃ in piglets suffering from pseudo vitamin D-deficiency rickets, type I. *Biochem Biophys Acta* 1998; 1407:234-42.
- Baker, A.L., McDonnell, D.P., Hughes, M., Crisp, T.M., Mangelsdorf, D.J., Haussler, M.R., Pike, J.W., Shine, J., O'Malley, B.W. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:3294-3298.
- Balsan, S., Garabedian, M., Larchet, M. et al. Long-term nocturnal calcium infusions can cure rickets and promote normal mineralization in hereditary resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Clin Invest* 1986; 77:1661-1667.
- Baran, D., Merriman, H., Ray, R., Sorensen, A., Quail, J. Characteristics of an osteoblast membrane protein that recognizes 1 α ,25-(OH)₂D₃. *J Bone Miner Res* 1994; 10:S292.
- Barsony, J., Pike, J.W., DeLuca, H.F., Marx, S.J. Immunocytology with microwave fixed fibroblasts show 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent rapid and estrogen-dependent slow reorganization of vitamin D receptors. *J Cell Biol* 1990; 111:2385-2395.
- vom Baur, E., Zechel, C., Heery, D., Heine, M.J.S., Garneir, J.M., Vivat, V., LeDouarin, B., Gronemeyer, H., Chambon, P., Losson, R. Differential ligand dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors nSUG1 and TIF1. *EMBO J* 1996; 15:110-124.
- Baxter, L.A., DeLuca, H.F. Stimulation of 25-hydroxyvitamin D₃-1-hydroxylase by phosphate depletion. *J Biol Chem* 1976; 251:3158-3161.
- Bhalla, A.K., Clemens, T., Amento, E., Holick, M.F., Krane, S.M. Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57:1308-1310.
- Bikle, D.D., Munson, S., Christakos, S.C., Kumar, R., Buckendahl, P. Calmodulin binding to the intestinal brush-border membrane: comparison to other calcium binding proteins. *Biochem Biophys Acta* 1989; 1010:122-127.
- Bikle, D.D. and Pillai, S. Vitamin D, calcium and epidermal differentiation. *Endocrine Rev* 1993; 14:3-19.
- Bikle, D.D., Gee, E., Pillai, S. Regulation of keratinocyte growth, differentiation, and vitamin D metabolism by analogs of 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Invest Dermatol* 1993; 101:713-718.
- deBoland, A.R., Norman, A.W. Influx of extracellular calcium mediates 1,25-dihydroxyvitamin D₃ dependent transcaltachia (the rapid stimulation of duodenal Ca²⁺ transport). *Endocrinology* 1990; 127:2475-2480.

- Bonjour, J.P., Preston, C., Fleisch, H. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on renal handling of P_i in thyroparathyroidectomized rats. *J Clin Invest* 1977; 60:1419-1428.
- Boudreau, A., Atmani, F., Grosse, B., Lieberherr, M. Rapid effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and extracellular Ca²⁺ on phospholipid metabolism in dispersed porcine parathyroid cells. *Endocrinology* 1990; 127:2738-2743.
- Bouhtiy, I., Lajeunesse, D., Christakos, S., Brunette, M.G. Two vitamin D-dependent calcium binding proteins increase calcium reabsorption by different mechanisms. II: Effect of CaBP28k. *Kidney Int* 1994; 45:461-468. II: Effect of CaBP9k. *Kidney Int* 1994; 45:469-474.
- Bourlon, P.M., Billaudel, B., and Faure-Dussert, A. Influence of vitamin D₃ deficiency and 1,25 dihydroxyvitamin D₃ on the de novo insulin biosynthesis in the islets of the rat endocrine pancreas. *J Endocrinol* 1999; 160:87-95.
- Boyan, B.D., Schwartz, Z., Swain, L.D. In vitro studies on the regulation of endochondral ossification by vitamin D. *Crit Rev Oral Biol Med* 1992; 3:15-30.
- Boyan, B.D., Bonewald, L.F., Sylvia, V.L., Nemere, I., Larsson, D., Norman, A.W., Rosser, J., Dean, D.D., Schwartz, Z. Evidence for distinct membrane receptors for 1 α ,25-(OH)(2)D(3) and 24R,25-(OH)(2)D(3) in osteoblasts. *Steroids* 2002; 67:235-246.
- Braun, A., Bichlmaier, R., Cleve, H. Molecular analysis of the gene for the human vitamin D-binding protein (Gc): allelic differences of the common genetic Gc types. *Hum Genet* 1992; 89:401-406.
- Brooks, M.H., Bell, N.H., Love, L. et al. Vitamin D-dependent rickets type II: resistance of target organs to 1,25-dihydroxyvitamin D. *N Engl J Med* 1978; 298:996-999.
- Brown, E.M., Gamba, G., Riccardi, D., Lombardi, M., Butters, R., Kifor, O., Sun, A., Hediger, M.A., Lutton, J., Hebert, S.C. Cloning and characterisation of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 1993; 366:575-580.
- Brumbaugh, P.F., Haussler, M.R. Nuclear and cytoplasmic binding components for vitamin D metabolites. *Life Sci* 1975; 16:353-362.
- Burmester, J.K., Wiese, R.J., Maeda, N., DeLuca, H.F. Structure and regulation of the rat 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:9499-9502.
- Cade, C., Norman, A.W. Vitamin D₃ Improves Impaired Glucose Tolerance and Insulin Secretion in the Vitamin D-Deficient Rat *in vivo*. *Endocrinology* 1986; 119:84-90.
- Cade, C., Norman, A.W. Rapid Normalization /Stimulation by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ of Insulin Secretion and Glucose Tolerance in the Vitamin D-Deficient Rat. *Endocrinology* 1987; 120:1490-1497.
- Chandra, S., Fullmer, C.S., Smith, C.A., Wasserman, R.H., Morrison, G.H. Ion microscopic imaging of calcium transport in the intestinal tissue of vitamin D-deficient and vitamin D replete chicks: a ⁴⁴Ca stable isotope study. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:5715-5719.
- Chen, C.H., Sakai, Y., and Demay, M. Targeting Expression of the Human Vitamin D Receptor to the Keratinocytes of Vitamin D Receptor Null Mice Prevents Alopecia. *Endocrinology* 2001; 142:5386-5389.
- Chen, J.D., Evans, R.M. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 1995; 377:454-457.
- Choy, B., Green, M.R. Eukaryotic activators function during multiple steps of preinitiation complex assembly. *Nature* 1993; 366:531-536.

- Colston, K., Colston, M.J., Feldman, D. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and malignant melanoma: the presence of receptors and inhibition of cell growth in culture. *Endocrinology* 1981; 108:1083-1086.
- Cooke, N.E., Haddad, J.G. Vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Endocr Rev* 1989; 10:294-307.
- Demay, M. Inherited Defects of Vitamin D Metabolism. In: *Vitamin D – Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications*. Holick, M.F. ed. Humana Press Totowa, N J 1999; pp 307-316.
- Desai, S.S., Appel, M.C., Baran, D.T. Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on cytosolic calcium in two human cell lines (HL-60 and U-937). *J Bone Miner Res* 1986; 1:497-501.
- Duval, D., Durant, S., Homo-DeLarch, F. Nongenomic effects of steroids: interactions of steroid molecules with membrane structures and functions. *Biochem Biophys Acta* 1983; 737:409-442.
- Erben, R.G., Scutt, A.M., Miao, D.S., Kollenkirchen, U., Haberey, M. Short term treatment of rats with high dose 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates bone formation and increases the number of osteoblast precursor cells in bone marrow. *Endocrinology* 1997; 138:4629-4635.
- Erben, R.G., Soegiarto, D., Weber, K., Zeitz, U., Lieberherr, M., Gniadecki, R., Möller, G., Adamski, J. and Balling, R. Deletion of Deoxyribonucleic Acid Binding Domain of the Vitamin D Receptor Abrogates Genomic and Nongenomic Functions of Vitamin D. *Mol Endocrinol* 2002; 16:1524-1537.
- Esvelt, R.P., Schnoes, H.K., De Luca, H.F. Vitamin D₃ from rat skins irradiated in vitro with ultraviolet light. *Arch Biochem Biophys* 1978; 188:282-286.
- Farach-Carson, M.C., Nemere, I. Membrane receptors for vitamin D steroid hormones: potential new drug targets. *Curr Drug Targets* 2003; 4:67-76.
- Feher, J.J., Fullmer, C.S., Wasserman, R.H. The role of facilitated diffusion of calcium by calbindin in intestinal calcium absorption. *Am J Physiol* 1992; 262:517-526.
- Fraser, D.R., Kodicek, E. Unique biosynthesis by kidney of a biologically active vitamin D metabolite. *Nature* 1970; 228:764-766.
- Friedman, P.A., Gesek, F.A. Vitamin D₃ accelerates PTH-dependent calcium transport in distal convoluted tubule cells. *Am J Physiol* 1993; 265:F300-F308.
- Friedman, P.A., Gesek, F.A. Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms and regulation. *Physiol Rev* 1995; 75:429-471.
- Fu, G.K., Lin, D., Zhang, M.Y.H. et al. Cloning of human 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase and mutations causing vitamin D-dependent rickets type I. *Mol Endocrinol* 1997; 11:1961-1970.
- Garabedian, M., Ben-Mekhbi, H. Rickets and Vitamin D Deficiency. In: *Vitamin D Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications*. Holick, M.F. ed. Humana Press Totowa, N J 1999; pp 273-286.
- Gray, R.W., Omdahl, J.L., Ghazarian, J.G., De Luca, H.F. 25-Hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase: subcellular location and properties. *J Biol Chem* 1972; 247:7528-7532.
- Haddad, J.G. Traffic, binding and cellular access of vitamin D sterols. In: *Bone and Mineral Research*, vol. 5. Peck WA, ed. New York: Elsevier, 1987; pp 281-308.

- Haddad, J.G. Clinical aspects of measurements of plasma vitamin D sterols and the vitamin D binding protein. In: Disorders of Bone and Mineral Metabolism. Coe, F.L., Favus, M.J. eds. New York Raven 1992; pp 195-216.
- Haddad, J.G., Matsuoko, L.Y., Hollis, B.W., Hu, Y.Z., Wortsman, J. Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. *J Clin Invest* 1993; 91:2552-2555.
- Halline, A.G., Davidson, N.O., Skarosi, S.F., Sitrin, M.D., Tietze, C., Alpers, D.H., Brasitus, T.H. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on proliferation and differentiation of Caco-2 cells. *Endocrinology* 1994; 134:1710-1717.
- Henry, H.L. Regulation of the hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃ in vivo and in primary cultures of chick kidney cells. *J Biol Chem* 1979; 254:2722-2729.
- Hess, A.F., Weinstock, M. Antirachitic properties imparted to inert fluids and green vegetables by ultraviolet irradiation. *J Biol Chem* 1924; 62:301-313.
- Hochberg, Z., Borochowitz, Z., Benderli, A., Vardi, P., Oren, S., Spirer, Z., Heyman, I., Weisman, Y. Does 1 α ,25-dihydroxyvitamin D participate in the regulation of hormone release from endocrine glands? *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60:57-61.
- Holick, M.F., Schnoes, H.K., DeLuca, H.F., Gray, R.W., Boyle, E.T., Suda, T. Isolation and identification of 24,25-dihydroxycholecalciferol, a metabolite of vitamin D₃ made in kidney. *Biochemistry* 1972; 11:4251-4255.
- Holick, M.F., MacLaughlin, J.A., Clark, M.B., Holick, S.A., Potts, J.T., Anderson, R.R., Blank, I.H., Parrish, J.A. and Elias, P. Photosynthesis of previtamin D₃ in human skin and the physiologic consequences. *1980 Science* 210:203-205.
- Holtrop, M.E., Cox, K.A., Clark, M.B., Holick, M.F., Anast, C.S. 1,25-dihydroxycholecalciferol stimulates osteoclasts in rat bones in the absence of parathyroid hormone, *Endocrinology* 1981; 108:2293-301.
- Hsieh, J.C., Jurutka, P.W., Nakajima, S., Galligan, M.A., Haussler, C.A., Shimizu, Y., Shimizu, N., Whitfield, G.K., Haussler, M.R. Phosphorylation of the human vitamin D receptor by protein kinase C: biochemical and functional evaluation of the serine 51 recognition site. *J Biol Chem* 1993; 268:118-126.
- Hsieh, J.C., Jurutka, P.W., Selznick, S.H., Reeder, M.C., Haussler, C.A., Whitfield, G.K., Haussler, M.R. The T-Box near the zinc fingers of the human vitamin D receptor is required for heterodimeric DNA binding and transactivation. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 215:1-7.
- Hughes, M.R., Malloy, P.J., Kieback, D.G., Kesterson, R.A., Pike, J.W., Feldman, D., O'Malley, B.W. Point mutations in the human vitamin D receptor gene are associated with hypocalcemic rickets. *Science* 1988; 242:1702-1705.
- Huldshinsky, K. Heilung von Rachitis durch künstliche Höhensonne. *Dtsch Med Wochenschr* 1919; 45:712-713.
- Jin, C.H., Pike, J.W. Human vitamin D receptor-dependent transactivation in *Saccharomyces cerevisiae* requires retinoid X receptor. *Mol Endocrinol* 1996; 10:196-205.
- Johnson, J.A., Kumar, R. Renal and intestinal calcium transport: roles of vitamin D and vitamin D dependent calcium binding proteins. *Sem Nephrol* 1994; 14:119-128.
- Jones, G., Vriezen, D., Lohnes, D., Palda, V., Edwards, N.S. Side chain hydroxylation of vitamin D₃ and its physiological implications. *Steroids* 1987; 49:29-55.

- Jones, G. Metabolism and Catabolism of Vitamin D, Its Metabolites, and Clinically Relevant Analogs. In: Vitamin D Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications. Holick, M.F. ed. Humana Press Totowa, N J 1999; pp 57-84.
- Jurutka, P.W., Hsieh, J.C., Haussler, M.R. Phosphorylation of the human 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ receptor by cAMP dependent protein kinase *in vitro* and in transfected COS-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191:1089-1096.
- Kadowaki, S., Norman, A.W. Demonstration that the Vitamin D Metabolite 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ and Not 24R,25(OH)₂-Vitamin D₃ is Essential for Normal Insulin Secretion in the Perfused Rat Pancreas. *Diabetes* 1985; 34:315-320.
- Katahira, M., Knegt, R.M., Boelens, R., Eib, D., Schilthuis, J.G., van der Saag, P.T., Kaptein, R. Homo- and heteronuclear NMR studies of the human retinoic acid receptor beta DNA binding domain: sequential assignments and identification of secondary structural elements. *Biochemistry* 1992; 31:6474-6480.
- Kaune, R., Harmeyer, J. Vitamin D₃ metabolism in a pig strain with pseudo vitamin D-deficiency rickets, type I. *Acta Endocrinol (Copenh.)* 1987; 115:345-52.
- Kaune, R., Munson, S., Bikle, D.D. Regulation of Calmodulin binding to the ATP extractable 110kDa protein (myosin I) from chicken duodenal brush-border by 1,25(OH)₂D₃. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1190:329-336.
- Kim, Y.S., Stumpf, W.E., Clark, S.A., Sar, M., DeLuca, H.F. Target cells for 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ in developing rat incisor teeth. *J Dent Res* 1983; 62:58,59.
- Kollenkirchen, U., Fox, J., Walters, M.R. Normocalcemia without hyperparathyroidism in vitamin D deficient rats. *J Bone Miner Res* 1991a; 6:273-278.
- Kollenkirchen, U., Walters, M.R., Fox, J. Plasma Ca influences vitamin D metabolite levels as rats develop vitamin D deficiency. *Am J Physiol* 1991b; 260:E447-E452.
- Koster, H.P.G., Hartog, A., VanOs, C.N., Bindels, R.J.M. Calbindin D28k facilitates cytosolic calcium diffusion without interfering with calcium signaling. *Cell Calcium* 1995; 18:187-196.
- Kristjansson, K., Rut, A.R., Hewison, M., O'Riordan, J.L.H. and Hughes, M.R. Two mutations in the hormone binding domain of the vitamin D receptor cause tissue resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Clin Invest* 1993; 92:12-16.
- Labuda, M., Fujiwara, T.M., Ross, M.V. et al. Two hereditary defects related to vitamin D metabolism map to the same region of human chromosome 12q13-14. *J Bone Miner Res* 1992; 7:1447-1453.
- Lee, S., Clark, S.A., Gill, R.K., and Christakos, S. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and pancreatic β-cell function: vitamin D receptors, gene expression, and insulin secretion. *Endocrinology* 1994; 134:1602-1610.
- van Leeuwen, J.P.T.M., Vink-van Wijngaarden, T. and Pols, H.A.P. Vitamin D and Breast Cancer. In: Vitamin D Physiology, Molecular Biology and Clinical Applications. Holick, M.F. ed. Humana Press Totowa, N J 1999; pp 411-429.
- Lemann, J. Intestinal absorption of calcium, magnesium and phosphorus. In: Primer on Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, 2nd ed. Favus MJ, ed. New York, Raven Press 1993; pp 46-50.
- Levin, A.A., Sturzenbecker, J., Kazmer, S., Bosakowski, T., Huselton, C., Allenby, G., Speck, J., Kratzeisen, C.L., Rosenberger, M., Lovey, A., Grippo, J.F. 9-Cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXRα *Nature* 1992; 355:359-361.

- Li, Y.C., Pirro, A.E., Amling, M., Delling, G., Baron, R., Bronson, R. and Demay, M.B. Targeted ablation of the vitamin D receptor: An animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:9831-9835.
- Li, Y.C., Amling, M., Pirro, A.E., Priemel, M., Meuse, J., Baron, R., Delling, G., and Demay, M. Normalization of Mineral Ion Homeostasis by Dietary Means Prevents Hyperparathyroidism, Rickets, and Osteomalacia, But Not Alopecia in Vitamin D Receptor-Ablated Mice. *Endocrinology* 1998; 139:4391-4396.
- Li, Y.C., Bolt, M.J., Cao, L.P., Sitrin, M.D. Effects of vitamin D receptor inactivation on the expression of calbindin and calcium metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 281:E558-564.
- Lian, J.B., Stein, G.S. Vitamin D regulation of osteoblast growth and differentiation. In: *Nutrition and Gene Expression*. Berdanier, C.D., Hargrove, J.L., eds. Boca Raton, FL; CRC Press, 1993; pp 391-429.
- Liao, J., Ozono, K., Sone, T., McDonnell, D.P., Pike, J.W. Vitamin D receptor interaction with specific DNA requires a nuclear protein and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:9751-9755.
- Lieberherr, M., Grosse, B., Tassin, M-T., Kachkache, M., Bourdeau, A. Transmembrane signal pathways induced by calcitriol, estradiol, testosterone, and progesterone in osteoblasts. In: *Proceedings of the Ninth Workshop on Vitamin D*, Orlando, FL, May 28-June 2, 1994, pp 315-323.
- Liu, L., Khastgir, A., McCauley, J., Dunn, S.T., Morrissey, J.H., Christakos, S., Hughes, M.R., Bourdeau, J.E. RT-PCR microlocalization of mRNAs for calbindin-D28k and vitamin D receptor in murine nephron. *Am J Physiol* 1996; 270:F677-F681.
- Lohnes, D., Jones, G. Further metabolism of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in target cells. *J Nutr Sci Vitam Special Issue*. 1992; 75-78.
- Lu, Y., Chen, T.C., Holick, M.F. Influence of season and time of day on the synthesis of vitamin D₃. In: *Biological Effects of Light*. Holick, M.F., Kligman, A.M. eds. Berlin Walter de Gruyter, 1992; pp 57-61.
- Luisi, B.F., Xu, W.X., Otwinowski, Z., Freedman, L.P., Yamamoto, K.R., Sigler, P.B. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 1991; 352:497-505.
- MacDonald, P.N., Sherman, D.R., Dowd, D.R., Jefcoat, S.C., DeLisle, R.K. The vitamin D Receptor interacts with general transcription factor IIB. *J Biol Chem* 1995; 270:4748-4752.
- MacDonald, P.N. Molecular Biology of the vitamin D receptor. In: *Vitamin D, Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications*. Holick, M.F. ed. Humana Press Totowa, N J 1999; pp 109-128.
- MacLaughlin, J.A., Anderson, R.R., Holick, M.F. Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D₃ and its photoisomers in human skin. *Science* 1982; 216:1001-1003.
- Malloy, P.J., Hochberg, Z., Tiosano, D., Pike, W.J., Hughes, M.R., and Feldman, D. The molecular basis of hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D₃ resistant rickets in seven related families. *J Clin Invest* 1990; 86:2071-2079.

- Malloy, P.J., Weisman, Y. and Feldman, D. Hereditary $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D-resistant rickets resulting from a mutation in the vitamin D receptor deoxyribonucleic acid-binding domain. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78:313-316.
- Malloy, P.J., Eccleshall, T.R., Gross, C., Van Maldergem, L., Bouillon, R. and Feldman, D. Hereditary vitamin D resistant rickets caused by a novel mutation in the vitamin D receptor that result in decreased affinity for hormone and cellular hyporesponsiveness. *J Clin Invest* 1997; 99:297-304.
- Malloy, P.J., Feldman, D. Molecular Defects in the Vitamin D Receptor Associated with Hereditary $1,25$ -Dihydroxyvitamin D-Resistant Rickets. In: *Vitamin D, Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications*. Holick, M.F. ed. Humana Press Totowa, N J 1999; pp 317-336.
- Matsuoko, L.Y., Wortsman, J., Dannenberg, M.J., Hollis, B., Lu, Z., Holick, M.F. Clothing prevents ultraviolet-B radiation-dependent photosynthesis of vitamin D₃. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:1099-1103.
- McCollum, E.F., Simmonds, N., Kinney, M., Shipley, P.G. and Park, E.A. Studies on experimental rickets. XVII. The effects of diets deficient in calcium and in fat soluble A in modifying the histological structure of the bones. *Am J Epidemiol* 1921; 141:280-296.
- Mellanby, T. The part played by an „accessory factor“ in the production of experimental rickets. *J Physiol* 1918; 52:11-14.
- Milde, P. Vitamin D und die Haut: neue Aspekte und die Perspektiven. 1991 *Hautarzt* 42:671-676.
- Nakajima, S., Hsieh, J-C., MacDonald, P.N., Galligan, M.A., Haussler, C.A., Whitfield, G.K., Haussler, M.R. The C-terminal region of the vitamin D receptor is essential to form a complex with a receptor auxiliary factor required for high affinity binding to the vitamin D-responsive element. *Mol Endocrinol* 1994; 8:159-172.
- Nemere, I., Yoshimoto, Y., Norman, A.W. Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within fourteen minutes of exposure to $1,25$ -dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* 1984; 115:1476-1483.
- Nemere, I., Norman, A.W. Parathyroid hormone stimulates calcium transport in perfused duodena from normal chicks: comparison with the rapid (transcaltachic) effect of $1,25$ -dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* 1986; 119:1406-1408.
- Nemere, I., Norman, A.W. The rapid, hormonally stimulated transport of calcium (transcaltachia). *J Bone Miner Res* 1987; 2:167-169.
- Nemere, I., Norman, A.W. Transcaltachia, vesicular calcium transport and microtubule associated calbindin-D28k: emerging views of $1,25$ -dihydroxyvitamin D₃ mediated intestinal calcium absorption. *Miner Elektrolyte Metab* 1990; 16:109-114.
- Nemere, I., Schwartz, Z., Pedrozo, H., Sylvia, V.L., Dean, D.D. and Boyan, B.D. Identification of a Membrane Receptor for $1,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ Which Mediates Rapid Activation of Protein Kinase C. *J Bone Min Res* 1998; 13:1353-1359.
- Norman, A.W., Frankel, B.J., Heldt, A.M., Grodsky, G. Vitamin D Deficiency Inhibits Pancreatic Secretion of Insulin. *Science* 1980; 209:823-825.
- Norman, A.W. Receptors for $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$: Past, Present, and Future. *J Bone Min Res*. 1998; 13:1360-1369.

- Norman, A.W., Okamura, W.H., Bishop, J.E., Henry, H.L. Update on biological actions of $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 (rapid effects) and $24\text{R},25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 . *Mol Cell Endocrinol* 2002; 197:1-13.
- Ohyama, Y., Ozono, K., Uchida, M., Shinki, T., Klato, S., Suda, T., Yamamoto, O., Noshiro, M., Kato, Y. Identification of a vitamin D-responsive element in the 5'-flanking region of the rat 25-hydroxyvitamin D_3 24-hydroxylase gene. *J Biol Chem* 1994; 269:545-550.
- Okuda, K.I., Usui, E., Ohyama, Y. Recent progress in enzymology and molecular biology of enzymes involved in vitamin D metabolism. *J Lipid Res* 1995; 36:1641-1652.
- Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M-J., O'Malley, B.W. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 1995; 270:1354-1357.
- Peleg, S., Sastry, M., Collins, E.D., Bishop, J.E., Norman, A.W. Distinct conformational changes induced by the 20-epi analogues of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 are associated with enhanced activation of the vitamin D receptor. *J Biol Chem* 1995; 279:10551-10558.
- Pike, J.W. Molecular mechanisms of cellular response to vitamin D_3 hormone. In: Disorders of Bone and Mineral Metabolism. Coe, F.L., Favus, M.J. eds. New York: Raven, 1992; pp 163-169.
- Provvedine, D.M., Tsoukas, C.D., Deftos, L.J., Manolagas, S.C. $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 -binding makromolekules in human B lymphocytes: effects on immunoglobulin production. *J Immunol* 1986; 136:2734-2739.
- Reddy, D., Pollock, A.S., Clark, S.A., Sooy, K., Vasavada, R.C., Stewart, A.F., Honeyman, T. and Christakos, S. Transfection and overexpression of the calcium binding protein calbindin $\text{D}28\text{k}$ results in a stimulatory effect on insulin synthesis in a rat β cell line (RIN 1046-38). *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:1961-1966.
- Reichrath, J., Holick, M.F. Clinical Utility of 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 and Its Analogs for the Treatment of Psoriasis and Other Skin Diseases. In: Vitamin D Physiology, Molecular Biology and Clinical Applications. Holick, M.F. ed. Humana Press Totowa, N J 1999; pp 357-373.
- Ritchie, H.H., Hughes, M.R., Thompson, E.T., Malloy, P.J., Hochberg, Z., Feldman, D., Pike, J.W. and O'Malley, B.W. An ochre mutation in the vitamin D receptor gene causes hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D_3 -resistant rickets in three families. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:9783-9787.
- Sakai, Y., Kishimoto, J., Demay, M. Metabolic and cellular analysis of alopecia in vitamin D receptor knockout mice. *J Clin Invest* 2001; 107:961-966.
- Schrader, M., Nayeri, S., Kahlen, J.P., Muller, K.M., Carlberg, C. Natural vitamin D_3 response elements formed by inverted palindromes: polarity-directed ligand sensitivity of vitamin D_3 receptor-retinoid X receptor heterodimer-mediated transactivation. *Mol Cell Biol* 1995; 15:1154-1161.
- Schwartz, Z., Schlader, D.L., Swain, L.D., Boyan, B.D. Direct effects of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 and 24,25-dihydroxyvitamin D_3 on growth zone and resting zone chondrocyte membrane alkaline phosphatase and phospholipase A2 specific activities. *Endocrinology* 1988; 123:2878-2884.
- Schwartz, Z., Sylvia, V.L., Larsson, D., Nemere, I., Casasola, D., Dean, D.D., Boyan, B.D. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regulates chondrocyte matrix vesicle protein kinase C (PKC) directly via G-protein-dependent mechanisms and indirectly via incorporation of PKC during matrix vesicle biogenesis. *J Biol Chem* 2002; 277:11828-11837.

- Segrev, I.N., Rhoten, W.B. Video imaging of intracellular calcium in insulinoma cells: effects of 1,25-(OH)₂D₃. In: Proceeding of the Ninth Workshop on Vitamin D, Orlando, FL, May 28-June 2, 1994, pp 355-356.
- Selles, J., Boland, R. Evidence on the participation of the 3', 5' -cyclic AMP pathway in the nongenomic action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in cardiac muscle. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 82:229-235.
- Smith, E.L., Walworth, N.D., Holick, M.F. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the morphologic and biochemical differentiation of cultured human epidermal keratinocytes grown in serum-free conditions. *J Invest Dermatol.*1986; 86:709-714.
- Sone, T., Scott, R.A., Hughes, M.R., Malloy, P.J., Feldman, D., O'Malley, B.W. and Pike, J.W. Mutant vitamin D receptors which confer hereditary resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in humans are transcriptionally inactive in vitro. *J Biol Chem* 1989; 264:20230-20234.
- Sone, T., Marx, S.J., Liberman, U.A. and Pike, J.W. A unique point mutation in the human vitamin D receptor chromosomal gene confers hereditary resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Mol Endocrinol* 1990; 4:623-631.
- Sone, T., Kerner, S., Pike, J.W. Vitamin D receptor interaction with specific DNA: association as a 1,25-dihydroxyvitamin D₃-modulated heterodimer. *J Biol Chem* 1991; 266:23296-23305.
- Sooy, K., Schermerhorn, T., Noda, M., Surana, M., Rhoten, W.B., Meyer, M., Fleischer, N., Sharp, G.W.G. and Christakos, S. CalbindinD28k Controls (Ca²⁺)_i and Insulin Release – Evidence obtained from CalbindinD28k knockout mice and β-cell lines. *J Biol Chem* 1999; 274:34343-34349.
- Steenbock, H., Black, A. The induction of growth-promoting and calcifying properties in a rat by exposure to ultraviolet light. *J Biol Chem* 1924; 61:408-422.
- Stumpf, W.E., Sar, M., Reid, F.A. et al. Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary and parathyroid. *Science* 1979; 206:1188-1190.
- Stumpf, W.E., Sar, M., Narbaitz, R., Huang, S., DeLuca, H.F. Autoradiographic localization of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in rat placenta and yolk sac. *Horm Res* 1983; 18:215-220.
- Stumpf, W.E., Clark, S.A., Sar, M., DeLuca, H.F. Topographical and developmental studies on target sites of 1,25(OH)₂-vitamin D₃ in skin. *Cell Tissue Res* 1984; 238:489-496.
- Szpirer, J., Szpirer, C., Riviere, M., Levan, G., Marynen, P., Cassiman, J-J., Wiese, R., DeLuca, H.F. The Sp 1 transcription factor gene (SP1) and the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor gene (VDR) are colocalized on human chromosome arm 12q and rat chromosome 7. *Genomics* 1991; 11:168-173.
- Tsoukas, C.D., Provvedine, D.M., Manolagas, S.C. 1,25-dihydroxyvitamin D₃, a novel immuno-regulatory hormone. *Science* 1984; 221:1438-1440.
- Umesono, K., Evans, R.M. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 1989; 57:1139-1146.
- Underwood, J.L., DeLuca, H.F. Vitamin D is not directly necessary for bone growth and mineralization. *Am J Physiol* 1984; 246:E493-498.
- Velluz, L., Amiard, G. Chimie organique – le precalciferol. *Compt Rend* 1949; 228:692-694.

- Walters, M.R., Ilenchuk, T.T., Claycomb, W.C. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ stimulates ⁴⁵Ca²⁺ uptake by cultured adult rat ventricular cardiac muscle cells. *J Biol Chem* 1987; 262:2536-2541.
- Walters, M.R., Kollenkirchen, U., Fox, J. What is vitamin D deficiency? *Proc Soc Exp Biol Med* 1992; 199:385-393.
- Wasserman, R.H., Fullmer, C.S. Vitamin D and intestinal calcium transport: facts, speculations and hypothesis. *J Nutr* 1995; 125:S1971-1979.
- Webb, A.R., Kline, L., Holick, M.F. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D₃; exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D synthesis in human skin. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67:373-378.
- Weber, K., Erben, R.G., Rump, A., Adamski, J. Gene structure and regulation of the murine epithelial calcium channels ECaC1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289:1287-1294.
- Wecksler, W.R., Okamura, W.H., Norman, A.W. Studies on the mode of action of vitamin D: XIV. Quantitative assessment of the structural requirements for the interaction of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ with its chick intestinal mucosa receptor system. *J Steroid Biochem* 1978; 9:929-937.
- Weishaar, R.E., Simpson, R.U. The involvement of the endocrine system in regulating cardiovascular function: emphasis on vitamin D₃. *Endocr Rev* 1989; 10:1-15.
- Wiese, R.J., Goto, H., Prahl, J.M., Marx, S.J., Thomas, M., Al-Aqeel, A. and DeLuca, H.F. Vitamin D-dependency rickets type II: truncated vitamin D receptor in three kindreds. *Mol Cell Endocrinol* 1993; 90:197-201.
- Windaus, A., Schenck, F.; Weder, Fv. Über das Antirachitisch Wirksame Bestrahlungsprodukt aus 7-Dehydro-Cholesterin. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem* 1936; 241:100-103.
- Wu, S.X., Finch, J., Zhong, M., Slatoposky, E., Grieff, M., Brown, A.J. Expression of the renal 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase gene-regulation by dietary phosphate. *Am J Phys* 1996; 40:F203-F208.
- Yagi, H., Ozono, K., Miyake, H., Nagashima, K., Kuroume, T. and Pike, J.W. A new point mutation in the deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor in a kindred with hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76:509-512.
- 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; 74:507-513.
- Yoshizawa, T., Handa, Y., Uematsu, Y., Takeda, S., Sekine, K., Yoshihara, Y., Kawakami, T., Arioka, K., Sato, H., Uchiyama, Y., Masushige, S., Fukamizu, A., Matsumoto, T. and Kato, S. Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nature Genetics* 1997; 16:391-396.
- Zeit U., Weber, K., Soegiarto, D., Wolf, E., Balling, R., and Erben, R.G. Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *FASEB J* 2003; 10.1096/fj.02-0424fje.
- Zierold, C., Darwish, H.M., DeLuca, H.F. Identification of a vitamin D-response element in the rat calcidiol (25-hydroxyvitamin D₃) 24-hydroxylase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:900-902.

7 Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mir während der letzten Jahre mit Rat und Tat zur Seite standen und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Insbesondere möchte ich danken:

Im Institut für experimentelle Genetik (IEG) der GSF Neuherberg:

Dr. J. Adamski für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im Genome Analysis Center und die großzügige Unterstützung meiner Arbeit.

Dr. Gabi Möller, Dr. Karl Joseph Gerber, Gabi Zieglmeier, Marion Schieweg und allen Doktoranden der AG Adamski sowie Dr. Geert Michel für ihre Hilfsbereitschaft.

Mein herzlicher Dank gilt auch der Tierhaltung der GSF Neuherberg, vor allem Therese Wandrowetz und ihren Kolleginnen, die mir die Praxis der Mäusehaltung nahegebracht haben.

Bei der LMU München:

Ich bedanke mich bei Dr. Karin Weber sowie dem gesamten Doktorandenteam der AG Erben für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche. Insbesondere gilt mein herzlicher Dank Karin Begsteiger, Siglinde Lutz und Claudia Bergow, ohne deren Hilfe bei der Probenaufarbeitung und -auswertung ich wahrscheinlich nochmal 2 Jahre gebraucht hätte!

Last but not least:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Reinhold G. Erben für die Überlassung des Themas, die hervorragende fachliche Betreuung sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen.

8 Lebenslauf

Ute Zeitz

Geburtsdatum: 14.03.1962

Geburtsort: Berlin-Charlottenburg

Eltern: Hanns Zeitz, Rechtsanwalt, Iris Zeitz, Hausfrau

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

1968 – 1972: Besuch der Grundschule in Eichenau

1972 – 1982: Besuch des Elsa-Brandström-Gymnasiums in München-Pasing
Abitur im Mai 1982

WS 82/83 - SS 84: Studium Agrarwissenschaft (FH Weihenstephan)
Exmatrikulation März 1984

WS 84/85 - SS 87: Studium Jura (LMU München) Exmatrikulation September 1987

1987 – 1992: verschiedene Tätigkeiten

WS 92/93 – WS 98/99: Studium Tiermedizin (LMU München)
abgeschlossen im Oktober 1998

November 1998: Approbation

Februar 1999: Beginn der Doktorarbeit