

Aus dem Institut für Tierphysiologie
der tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Tierphysiologie
Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil H.-J. Gabius

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Dr. R. Erben

Die molekulare Charakterisierung des Gendefektes bei PVDR I-Schweinen

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

von
Zuzanna Teresa Harabasz
aus
Posen

München 2007

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E.P. Märtlbauer
Referent: Prof. Dr. Erben
Korreferent: Prof. Dr. Wolf

Tag der Promotion: 9. Februar 2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	4
2.1	Vitamin D	4
2.1.1	Synthese von Vitamin D.....	4
2.1.2	Aktivierung und Regulation von Vitamin D.....	5
2.1.2.1	Aktivierung des Vitamin D durch Makrophagen	7
2.1.3	Wirkung des Vitamin D ₃	9
2.2	Störungen des Vitamin D-Haushalts	16
2.2.1	Rachitis und Osteomalazie	16
2.2.2	Die Pseudo-Vitamin-D-Mangel-Rachitis Typ I-Erkrankung beim Menschen	17
2.2.3	Die Pseudovitamin-D-Mangel-Rachitis Typ I beim Schwein	18
2.2.3.1	Klinische Symptomatik der PVDR I beim Schwein.....	18
2.2.3.2	Aufbau und Funktion des 1 α -Hydroxylase-Enzyms	20
2.3	Tiermodelle der Vitamin D-Forschung	22
2.3.1	Nager-Modelle der Vitamin-D-Forschung	22
2.3.2	Das Schwein als Modell der Vitamin-D-Forschung.....	24
3	Material und Methoden	25
3.1	Tiermaterial	25
3.2	Analyse des Gendefektes	26
3.2.1	Gewinnung von genomischer DNA	26
3.2.2	Genomische PCR und Sequenzierung	27
3.2.2.1	Prinzip der PCR	27
3.2.2.2	Genomische PCR und Sequenzierung	27
3.2.2.3	Sequenzierung.....	29
3.3	Genotypisierung.....	30
3.3.1	Genotypisierung mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus	30
3.3.2	Genotypisierung mit Amplifikation-Refraktär-Mutations-System	31
3.3.2.1	Prinzip des Amplifikations-Refraktär-Mutations-System.....	31
3.3.2.2	Prinzip der Real-time PCR	32

3.3.2.3	Erstellung des ARMS-qPCR-Assays.....	33
3.4	Analysen auf RNA-Ebene	38
3.4.1	Bestimmung der Gen-Expression in verschiedenen Geweben.....	38
3.4.1.1	RNA-Isolierung und RT-PCR	38
3.4.1.2	Prinzip der quantitativen PCR.....	38
3.4.1.3	Quantitative Bestimmung der Genexpression.....	39
3.4.1.4	Durchführung der Real-Time PCR.....	40
3.4.2	Bestimmung der Gen-Expression in Blut-Makrophagen	41
3.4.2.1	Isolation und Kultivierung von Blutmakrophagen	41
3.4.2.2	Phagozytose der kultivierten Zellen	43
3.4.2.3	Stimulierung von Makrophagen	43
3.4.2.4	Stimulierung von porcinen Makrophagen mit Interferon γ	44
3.4.2.5	Extraktion der RNA aus kultivierten Makrophagen.....	44
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Analyse der genomischen Sequenz	45
4.2	Charakterisierung der Mutation.....	48
4.3	Expressionsprofil und cDNA–Struktur.....	49
4.4	Genotypisierung mittels ARMS-qPCR	51
4.5	Expressionsniveau in der Niere	52
4.6	Expressionsniveau in der Niere im Vergleich zur Haut.....	53
4.7	Nachweis der Phagozytose von Makrophagen.....	55
4.8	Expression in stimulierten Makrophagen	56
5	Diskussion	57
5.1	Analyse auf genomischer Ebene	57
5.2	Analyse der Expression	59
5.3	Expression in Makrophagen	61
6	Zusammenfassung	63
7	Summary	65
8	Literaturverzeichnis.....	67
9	Danksagung.....	84

Abkürzungsverzeichnis

1,25(OH) ₂ D ₃	1,25-Dihydroxycholecalciferol D ₃
1α-(OH)D ₃	1α-Hydroxycholecalciferol D ₃
25-(OH)D ₃	25-Hydroxycholecalciferol D ₃
ARMS	Amplifikations-Refraktär-Mutations-System
Bp	Basenpaare
CYP	Cytochrom P 450
DNA	Desoxy-Ribonuklein-Säure
dNTP	desoxy-Nukleotid-Tri-Phosphat
IE	Internationale Einheiten
IFN γ	Interferon γ
LPS	Lipopolysaccharid
PCR	Polymerase chain reaction
PIC	Präinitiationskomplex
PTH	Parathormon
PVDR I	Pseudo-Vitamin-D-Mangel-Rachitis Typ I
TNF α	Tumornekrosefaktor α
U	Units
VDR	Vitamin-D-Rezeptor

1 Einleitung

Seit Jahrzehnten ist bekannt, dass Vitamin D₃ eine essentielle Rolle im Calciumstoffwechsel und damit bei der Erhaltung des intakten Knochenmetabolismus spielt.

Für die Aktivierung von Vitamin D₃ zu seiner biologisch aktiven Form 1,25-Dihydroxycholecalciferol (1,25(OH)₂D₃) sind zwei Hydroxylierungsschritte notwendig, die zum einen aus der 25-Hydroxylierung in der Leber und zum anderen aus der 1 α -Hydroxylierung, die in der Niere stattfindet, bestehen. Fehlt diese Aktivierung, kommt es wie bei echtem Vitamin-D-Mangel zu den Symptomen von Rachitis. Diese Erscheinung wurde als Pseudo-Vitamin D-Defizienz-Rachitis Typ I bezeichnet (PVDR I). Beim Menschen ist die PVDR I eine autosomal rezessiv vererbte Krankheit. Sie wird durch einen spezifischen Mangel an dem Enzym 25-Hydroxyvitamin-1 α -Hydroxylase, das den zweiten Hydroxylierungsschritt in der Niere katalysiert, verursacht (FRASER et al., 1973). Verschiedenartige Mutationen in der codierenden Region und in den Splice-Sites sind in mehreren Familien beschrieben worden (KITANAKA et al., 1998; PORCU et al., 2002a; WANG et al., 1998; WANG et al., 2002; YOSHIDA et al., 1998). In der Forschung existiert ein Knock-out-Mausmodell (PANDA et al., 2001), bei dem Exon 6 bis 9 durch eine Neomycin-Resistenz-Kassette ersetzt wurde, wodurch die PVDR I-Erkrankung bei diesen Tieren ausgelöst wird. Ein entsprechender Defekt, der auf natürliche Weise auftrat, wurde bei den so genannten Hannover-Schweinen gefunden (PLONAIT, 1965). Klonierungen der 1 α -Hydroxylase-cDNA von diesen Tieren zeigten zwei verschiedene Deletionen in der Niere, die beide Exon 6 beinhalteten (CHAVEZ et al., 2003). Bei Menschen, Schweinen und Mäusen mit PVDR I-Erkrankung ist die enzymatische Aktivität der mutierten 1 α -Hydroxylase erniedrigt und die Bioaktivierung von 25-Hydroxyvitamin D₃ zu 1,25(OH)₂D₃ vermindert. Die Symptome äußern sich in niedrigen 1,25(OH)₂D₃-Spiegeln, hochgradiger Hypocalcämie, rachitischen Veränderungen des Skeletts und erhöhten Parathormon (PTH)-Spiegeln. Die systemische Verabreichung von 1,25(OH)₂D₃ oder 1 α -(OH)D₃ ist eine wirkungsvolle Substitutionstherapie bei der humanen PVDR I, die es ermöglicht, Calcium und PTH-Spiegel zu normalisieren. Bei den Hannover Schweinen werden

pharmakologische Dosen von Vitamin D₃ verabreicht, um physiologische Calcium-Spiegel und normales Knochenwachstum zu erreichen.

Die Expression der 1 α -Hydroxylase ist besonders markant in der Niere, jedoch werden auch extrarenale Gewebe beschrieben, die lokal in verschiedenen Zelltypen die Aktivierung von Vitamin D₃ durchführen (ZEHNDER et al., 2001). In der Niere wird die Expression durch PTH, Phosphat, Calcium und 1,25(OH)₂D₃ kontrolliert (DELUCA und SCHNOES, 1983), wobei in anderen Geweben die Expression von diesen Faktoren unabhängig zu erfolgen scheint. Zusammen mit der weit verbreiteten Expression des Vitamin-D-Rezeptors erscheint die 1 α -Hydroxylase wichtig bei der Übermittlung der Wirkung von Vitamin D₃ nicht nur in Geweben der Kalziumhomöostase, sondern auch der Haut (BIKLE et al., 2004; SCHUESSLER et al., 2001) und in Zellen des Immunsystems, wo Makrophagen erhebliche Mengen von 1,25(OH)₂D₃ produzieren, wenn sie aktiviert werden (DUSSO et al., 1991; REICHEL et al., 1987b). Bei Menschen mit PVDR I haben Makrophagen die Fähigkeit verloren, nach Stimulation 1,25(OH)₂D₃ zu synthetisieren (SMITH et al., 1999).

Für eine bessere Charakterisierung des Hannover-Schweine-Modells und die Etablierung einer Genotypisierungsmethode auf PCR-Basis ist die Aufklärung des zugrunde liegenden genetischen Defektes bei den PVDR I-Schweinen essentiell. Alle bisher vorliegenden Daten sprechen für einen monogenetischen Erbgang aufgrund von Mutationen im 1 α -Hydroxylase(CYP27B1)-Gen. Es fehlt jedoch eine genaue Charakterisierung der Mutation auf genomischer Ebene. Ob die beiden bisher dokumentierten, unterschiedlichen Deletionen auf mRNA-Ebene auf der Basis einer genomischen Mutation, die zu unterschiedlichen Splice-Varianten führen kann, beruht, oder auf zwei unterschiedlichen Deletionen basiert, ist derzeit ebenfalls noch unklar und soll im Rahmen dieser Dissertation untersucht werden.

Zum einen soll zur genomischen Analyse auf DNA-Ebene versucht werden, mit Hilfe Intron-überspannender Primer mit genomischer DNA der Tiere die Mutation zu lokalisieren. In diesem Zusammenhang soll auch eine genaue Beschreibung der Organisation in Bezug auf die Exon- und Intron-Grenzen der porcinen 1 α -Hydroxylase erfolgen, da diese bisher noch nicht bekannt sind.

Die genomische Information über den Gendefekt soll zum Aufbau einer Genotypisierung auf PCR-Basis genutzt werden, um eine zielgerichtete Zucht zu ermöglichen. Um dieses Tiermodell für weitere Studien nutzen zu können, ist es wichtig die homozygoten, heterozygoten und Wildtyp-Genotypen bei der Zucht differenzieren können. Die in der F₂-Generation auftretenden unterschiedlichen Genotypen innerhalb eines Wurfes sollen unterschieden werden können, ohne auf die Ausbildung eines Phänotyps und das Auftreten von klinischen Symptomen der PVDR I-Erkrankung warten zu müssen. Ebenfalls sollen die heterozygoten Tiere, die keinen Phänotyp ausbilden, von ihren Wildtyp-Geschwister-Tieren unterschieden werden.

Ein zweites Ziel dieser Dissertation ist die Untersuchung der Regulation der renalen 1 α -Hydroxylase bei den PVDR I-Schweinen. Dazu soll mit Real-Time PCR eine quantitative Bestimmung der Expression der 1 α -Hydroxylase-mRNA erfolgen. Um die Regulation zu untersuchen, soll die Expression in unterschiedlichen Geweben betrachtet werden. Mit RT-PCR soll vorher gezeigt werden, ob unterschiedliche Splice-Varianten in den unterschiedlichen Geweben vorkommen, in denen 1 α -Hydroxylase exprimiert wird. Diese Splice-Varianten könnten wiederum unterschiedlich reguliert werden. Gleichzeitig dient diese Analyse auch der Überprüfung der bereits publizierten Daten.

Darüber hinaus soll die Promotor-Region des 1 α -Hydroxylase-Gens analysiert werden, um sie mit den Promotoren der humanen und murinen 1 α -Hydroxylase zu vergleichen. Verschiedene Studien zeigen die Bedeutung von regulatorischen Elementen mithilfe von Luciferase-Assays, bei denen Promotor-Deletions-Konstrukte benutzt wurden, um die Effekte von PTH, 1,25(OH)₂D₃ und NF κ B zu beschreiben (BRENZA et al., 1998; EBERT et al., 2004; KONG et al., 1999; OMDAHL et al., 2001). In murinen Makrophagen-Zelllinien wurde eine C/EBP β -Bindungsstelle gefunden, die die Aktivierung der 1 α -Hydroxylase durch IFN γ ermöglicht (ESTEBAN et al., 2004). Möglicherweise sind diese Transkriptionselemente verantwortlich für die Unterschiede zwischen renalen und nichtrenalen Geweben. Diese Untersuchungen dienen der besseren Charakterisierung des Tiermodells in Bezug auf Erkrankungen, die beim Menschen von Bedeutung sind.

2 Literaturübersicht

2.1 Vitamin D

2.1.1 Synthese von Vitamin D

Vitamin D entsteht zum einen unter der Einwirkung von UV-Strahlung in der Haut und zum anderen kann es direkt über die Nahrung aufgenommen werden und ist somit kein Vitamin im eigentlichen Sinne. Der Großteil wird jedoch in der Haut synthetisiert, wo es aus Provitamin D gebildet wird, welches das Hauptreservoir des Körpers für die Vitamin-D-Eigensynthese darstellt (ERBEN,2005).

In der Haut befindet sich 7-Dehydrocholesterol (7-DHC) in allen Schichten, vor allem aber im Stratum basale und im Stratum spinosum der Epidermis (HOLICK et al., 1980). Unter Einfluß von Photoenergie bildet Provitamin D, bei dem es sich um ein chromophores (Definition: griech. Farbträger) Molekül handelt, Isomere aus (ESVELT et al., 1978; WINDHAUS et al., 1936). Durch die Einwirkung von UV-Strahlen bei einer Wellenlänge von 290 bis 315 nm (UVB) kommt es zur Öffnung eines Ringes am Sterangerüst zwischen C₉ und C₁₀ (MACLAUGHLIN et al., 1982). Durch photochemische Isomerisierung wird aus 7-DHC das rotationsinstabile Prävitamin D gebildet (ESVELT et al., 1978; WINDHAUS et al., 1936). Dieses isomerisiert zu stabilem Vitamin D in einem Schritt, der von der Temperatur abhängig ist, wobei eine Doppelbindungsverschiebung stattfindet und das Secosteroid Vitamin D₃ entsteht. Diese letzte Reaktion kann nur ablaufen, wenn Vitamin D₃ als Produkt aus der Zelle ausgeschleust wird, da sonst diese Gleichgewichtsreaktion nicht ablaufen kann (VELLUZ und AMIARD,1949). Zurzeit ist noch wenig über den Übertrittsmechanismus in den Extrazellulärraum bekannt, aber es gibt Hinweise, dass Vitamin D-Bindungsproteine dabei eine Rolle spielen (HADDAD et al., 1993). Mit Hilfe dieses zügigen Transports aus der Zelle kann permanent Vitamin D₃ unter UV-Exposition nachproduziert werden. Dies ist besonders bei eingeschränkter Sonnenexposition, z.B. abhängig von der Jahreszeit, der Tageszeit, der Hautpigmentierung, Sonnenschutz und geographischer Lage, von großer Relevanz (LU Y et al., 1992; LU et al., 1992; MATSUOKA et al., 1992; WEBB et al., 1988).

In dieser Form besitzt Vitamin D₃ noch keine biologische Aktivität. Außerhalb der Zelle bindet es vorwiegend an Vitamin-D-Transportproteine und in geringem Maße auch an Albumin und Lipoproteine. Die größte Bedeutung haben aber die spezifischen Vitamin-D-Bindungsproteine. Sie bestehen aus einer Fraktion sehr ähnlicher Polypeptide, die in der Leber synthetisiert werden (BRAUN et al., 1992; COOKE und HADDAD,1989; HADDAD et al., 1992; HADDAD et al., 1987). Sie kommen in hohem Überschuss frei im Plasma vor und binden, aufgrund ihrer hohen Bindungsaffinität, das frei vorkommende Vitamin D und seine Metaboliten fast vollständig und machen so das hydrophobe Vitamin plasmagängig und damit für die Zielorgane verfügbar. Auch eine Funktion als Kurzzeitspeicher wird diskutiert.

2.1.2 Aktivierung und Regulation von Vitamin D₃

Gebunden an diese spezifischen Transportproteine gelangt Vitamin D₃ in die Leber. In den Hepatozyten findet der erste Aktivierungsschritt in Form von Hydroxylierung in der Position 25 statt. Katalysiert wird dieser Metabolisierungsschritt von einer Cytochrom P450-abhängigen, mitochondrialen Hydroxylase (CYP27) (ANDERSSON et al., 1989). Es bestehen Hinweise, dass auch andere Enzyme an dieser Reaktion beteiligt sind, die bisher jedoch nicht eindeutig nachgewiesen wurden. Der Schritt zum 25-Hydroxycholecalciferol wird in keinem besonders engen Rahmen reguliert, denn dies geschieht nur über einen Produkthemmungsmechanismus.

Die weitere Umwandlung von 25-Hydroxycholecalciferol findet in der Niere statt. Dort wird es mit Hilfe der renalen 1 α -Hydroxylase zu 1,25-Dihydroxycholecalciferol in seine biologisch aktive Form umgewandelt. Bei diesem Enzym handelt es sich ebenfalls um eine Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase. Der Regulationsmechanismus, der eine Überproduktion von biologisch aktivem Vitamin D verhindert, läuft ebenfalls vorwiegend in der Niere ab. Einflussfaktoren, zu denen Parathormon (PTH), Plasmaphosphat Spiegel und 1,25(OH)₂D₃ selbst zählen, spielen dabei eine zentrale Rolle (GRAY et al., 1972; HENRY,1979). Aufgrund der wichtigen Stellung, die 1,25(OH)₂D₃ für den extrazellulären Calciumhaushalt zukommt, wird seine Synthese in sehr engen Grenzen reguliert. PTH aktiviert dabei die renale 1 α -Hydroxylierung und durch Phosphat wird die 1 α -Hydroxylase gehemmt. Sinkt der

Calciumspiegel im Blut ab, kommt es zu einer vermehrten Sekretion von Parathormon (BROWN et al., 1993). Über einen Mechanismus, der noch nicht genau analysiert wurde, wird bewirkt, dass die Produktion der 1α -Hydroxylase gesteigert wird und die Synthese der 24-Hydroxylase gehemmt wird, wodurch es zu einer vermehrten Bildung von $1,25(\text{OH})\text{D}_3$ kommt. Die Effekte von $1,25(\text{OH})\text{D}_3$ in Darm und Niere bewirken eine Anhebung des Plasmacalciumspiegels, was eine Verringerung der PTH-Sekretion im Sinne einer negativen Rückkopplungsschleife nach sich zieht. Ebenso wirkt der Plasmaspiegel von Phosphat regulierend auf die $1,25(\text{OH})\text{D}_3$ ein. So stimuliert auch eine Hypophosphatämie die 1α -Hydroxylase und hemmt die 24-Hydroxylase (BAXTER und DELUCA, 1976; WU et al., 1996). Über den molekularen Ablauf dieser Vorgänge ist jedoch noch wenig bekannt.

Da dieser Vorgang der Hydroxylierung mit seinem Regulationsmechanismus fast ausschließlich in der Niere stattfindet, entstehen bei Individuen mit Nierenerkrankungen, die mit einem Funktionsverlust des Gewebes besonders im Bereich der proximalen Tubuli einhergehen, zusätzlich Störungen des Vitamin-D-Haushalts und es zeigen sich die daraus folgenden Symptome (HOLICK et al., 1972).

Es wird angenommen, dass es noch andere Faktoren gibt, die regulierend in dieses System eingreifen, z.B. soll $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ selbst die Synthese der 24-Hydroxylase stimulieren können (OHYAMA et al., 1994; ZIEROLD et al., 1994).

Kommt es zu einem Überschuss von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, wird die Umwandlung von $25(\text{OH})\text{D}_3$ in der Niere zu dem Metaboliten $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gesteigert. Die Metabolisierung erfolgt mit Hilfe der 24-Hydroxylase, die ebenfalls zu den Monoxygenasen der Cytochrom P450-Familie gehört (JONES et al., 1987). Mit diesem Schritt wird $25(\text{OH})\text{D}_3$ deaktiviert, da die biologische Aktivität von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ um ein ca. 10 000-faches niedriger ist als die von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Ob dem Metaboliten eine eigene Funktion zugeschrieben wird, wird diskutiert (NORMAN et al., 2002). Seine Regulation unterliegt keinen strengen Grenzen, was nicht auf eine Aufgabe im Bereich der Calciumhomöostase hindeutet (JONES et al., 1987).

In den Zielzellen ist die 24-Hydroxylierung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ der wichtigste und erste Schritt zur Inaktivierung von aktivem Vitamin D_3 . Es entsteht $1,24,25$ -Trihydroxycholecalciferol, dessen Affinität zum Vitamin-D-Rezeptor, also auch seine biologische Aktivität, um ein fünffaches niedriger ist als die von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Der

Abbau von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ findet in allen Zielgeweben von Vitamin D_3 statt und ist somit nicht an ein spezielles Organsystem gebunden. Als Endprodukt des Stoffwechsels von Vitamin D_3 wird Calcitronsäure gebildet, welche über die Leber mit der Galle sezerniert wird (JONES, 1999).

2.1.2.1 Aktivierung des Vitamin D_3 durch Makrophagen

Makrophagen

Makrophagen gehören zum mononukleären Leukozyten-System. Sie differenzieren sich aus den Monozyten, die ein Teil dieses Systems darstellen. Diese stammen von hämatopoetischen myeloischen Vorläuferzellen des Knochenmarks ab. Bei der Migration vom Kapillarsystem ins Gewebe reifen Monozyten zu Makrophagen heran, wo sie spezifischen Signalen ausgesetzt sind, die ihre funktionelle und phänotypische Heterogenität bestimmen. *In vitro* kann Monozytenreifung durch die Zugabe von Serumfaktoren induziert werden, die dann durch die Expression von spezifischen reifungsassoziierten Antigenen angezeigt wird (BASTA et al., 1999).

Produktion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durch Makrophagen

Unter physiologischen Bedingungen ist die Niere verantwortlich für die Produktion eines Großteils, wenn nicht für das gesamte zirkulierende $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Wie bereits besprochen unterliegt es dort einer strengen Regulierung, die den Plasmacalciumspiegel in engen Grenzen hält.

Darüber hinaus sind ebenfalls aktivierte Makrophagen in der Lage, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu synthetisieren und zu sezernieren, da auch sie die 1α -Hydroxylase exprimieren. Klonierung und Sequenzierung der mRNA der 1α -Hydroxylase der Makrophagen haben eine Übereinstimmung der Sequenz mit der 1α -Hydroxylase in der Niere und auch der Haut gezeigt, was nahe legt, dass in diesen Systemen das selbe Gen exprimiert wird (SMITH et al., 1999).

Im Gegensatz zu der strengen Regulation der renalen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese verursacht eine exzessive $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Produktion durch aktivierte Makrophagen

schwere Hypercalcämien in Verbindung mit verschiedenen granulomatösen Erkrankungen und chronischen Entzündungen (GATES et al., 1986; GKONOS et al., 1984; MEYRIER et al., 1985). Bei solchen Patienten ist die Aktivität der 1α -Hydroxylase, dem hemmendem Feedback-Mechanismus gegenüber, unempfindlich, der normalerweise durch hohe Plasmacalciumspiegel und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ausgelöst wird. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen *in vivo* haben Studien *in vitro* gezeigt, dass im Gegensatz zur Niere die Aktivität der 1α -Hydroxylase, der Makrophagen durch erhöhtes extrazelluläres Calcium sogar gesteigert wird und durch supraphysiologische Konzentrationen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ unbeeinflusst bleibt (ADAMS et al., 1990; REICHEL et al., 1987a). Diese unterschiedlichen Reaktionen von Niere und Makrophagen auf Hypercalcämie deuten darauf hin, dass die Produktion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in den Makrophagen nicht darauf ausgerichtet ist, die Calciumhomöostase aufrechtzuerhalten. Eine potentielle immunmodulatorische Rolle durch lokale $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Produktion von Makrophagen wird deswegen vermutet, weil eine markante Stimulierung der 1α -Hydroxylase-Aktivität durch Entzündungsstimuli wie Lipopolysaccharid (LPS), Interferon γ ($\text{IFN}\gamma$) und Tumornekrosefaktor α ($\text{TNF}\alpha$) induziert werden kann (PRYKE et al., 1990). Die Demonstration einer direkten Korrelation von pleuralen $\text{IFN-}\gamma$ -Spiegeln und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ legen nahe, dass dieses Zytokin in die gesteigerte Produktion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ involviert ist. Tatsächlich kann bei einer Exposition von normalen Makrophagen, Alveolarmakrophagen der Lunge und Monozyten der humanen Monozytenzelllinien THP-1 mit $\text{IFN } \gamma$, die Produktion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ markant gesteigert werden. Des Weiteren antagonisiert $\text{IFN } \gamma$ die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei der Induktion der 24 -Hydroxylase-Genexpression. Eine reduzierte 24 -Hydroxylase-Aktivität kann bei einer exzessiven $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese erhöhte Blutplasmaspiegel von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erklären. Jedoch steigert $\text{IFN } \gamma$ die Höhe der Expression der 1α -Hydroxylase-mRNA in der Zelllinie THP-1, sowohl im Monozyten- als auch in den Makrophagen-Phänotypen, in frisch isolierten murinen Makrophagen und in murinen Makrophagen der Zelllinie P388D1 (ESTEBAN et al., 2004).

Die Effekte von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf das Immunsystem sind verschieden. Sie führen unter anderem zu einer Toleranzgenerierung und Anergie. In der Gegenwart von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reifen dendritische Zellen in Richtung tolergener Zellen mit einer niedrigeren Expression von Major Histocompatibility Complex (MHC) Klasse II-

Molekülen und Adhäsionsmolekülen, die für eine vollständige T-Zell-Stimulierung notwendig sind. Zusätzlich werden Zytokine, die entscheidend für das Rekrutieren und die Aktivierung von T-Zellen sind, durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ unterdrückt. Das Hauptzytokin, Interleukin 12 (IL-12), das für die Stimulierung der Entwicklung von T-Helfer Zellen Typ 1 (Th1) durch das Immunsystem verantwortlich ist, wird in der Gegenwart von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ über Einwirkung auf den NF κ B-Signalweg fast vollständig unterdrückt. Verschiedene T-Zell-Zytokine sind ebenso ein Ziel von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Sinne einer Inhibition von Th1-Zytokinen, wie z.B. Interleukin 2 (IL-2) und Interferon γ (IFN γ), und Stimulierung von Th2-Zytokinen wie IL-4. Die Effekte von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen scheinen dabei am stärksten zu sein, wobei die Anti-T-Zell-Effekte wohl relativ schwach sind. Es existieren jedoch verschiedene humane epidemiologische Studien, die belegen, dass die zusätzliche Aufnahme von Vitamin D₃, Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus Typ I, vorbeugen kann und die Ausbildung einer normalen Immunität fördert (MATHIEU und BADENHOOP,2005).

2.1.3 Wirkung des Vitamin D₃

Das aktive Vitamin D₃ hat, in Form von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, eine genomische Wirkung. Wie andere Steroidhormone auch interagiert es mit einem speziellen intrazellulären Rezeptor. Dieser Vitamin-D-Rezeptor (VDR) hat eine sehr hohe Bindungsaffinität gegenüber $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (BRUMBAUGH und HAUSSLER,1975). Er funktioniert als ein durch Liganden aktivierbarer regulatorischer Transkriptionsfaktor.

Der Vitamin-D-Rezeptor enthält u. a. zwei funktionelle Rezeptordomänen. Einerseits bilden zwei „Zinkfinger“ die DNA-Bindungsdomäne (DBD), die nach Aktivierung des Rezeptors dessen Bindung an sogenannte „Vitamin D responsive elements“ (VDREs) in der Promotorregion der Zielgene ermöglicht. Den zweiten wichtigen funktionellen Bereich bildet die Hormonbindungs-Domäne.

Die Bindungsaffinität des Rezeptors ist gegenüber $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ am höchsten. Vitamin D, welches entweder nur an Position 1 α oder 25 hydroxyliert ist, bindet nur ungefähr 100 bis 1000mal schwächer an den VDR (WECKSLER et al., 1978). Im Anschluss an die Bindung des Liganden kommt es zur Konformationsänderung

(PELEG et al., 1995) und zur Heterodimerisation. Der Ligand-VDR-Komplex akkumuliert im Kern innerhalb weniger Minuten (BARSONY et al., 1990), und nach Bindung der DNA wird über die Bildung des Präinitiationskomplexes (PIC) die Transkription initiiert. Regulativen Einfluss auf die Transkriptionsrate haben wahrscheinlich zusätzliche Transkriptionsfaktoren, wie z.B. TFIIB (CHOY und GREEN, 1993; MACDONALD et al., 1995), und außerdem andere Coaktivatoren und Coexpressoren, die mit dem Rezeptorkomplex bzw. mit dem PIC interagieren (CHEN und EVANS, 1995; ONATE et al., 1995).

Neben der genomischen Wirkung am VDR und der daraus resultierenden Änderung der Proteinsynthese gibt es auch die so genannten nicht genomischen Effekte, von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Diese zeigen ihre Wirkung innerhalb von Sekunden bis Minuten. Es ist wahrscheinlich, dass verschiedene Formen der nicht genomischen Effekte je nach Gewebe und Zelltyp, existieren. Nachweislich treten sie in Niere, Nebenschilddrüse, Muskel, in Chondrozyten, Fibroblasten, Hepatozyten und Keratinozyten sowie im hämatopoetischen System und in β -Zellen des Pankreas auf (BOURDEAU et al., 1990; DESAI et al., 1986; NORMAN et al., 2002; SCHWARTZ et al., 1988; SEGREVIN et al., 1994; SEGREV et al., 1994; SELLES und BOLAND, 1991). Oft bewirken diese Effekte eine Änderung des Calciumspiegels in der Zelle, eine pH-Wert-Verschiebung sowie eine Veränderung der Proteinase-C-Aktivität (DUVAL et al., 1983). Diese Vorgänge werden auch als transmembranäre Signaltransduktionswege bezeichnet und sind am besten an Osteoblasten und Enterozyten untersucht.

In Osteoblasten kommt es zu einem Anstieg des intrazellulären Calciums über die Aktivierung der Phospholipase C und des Inositoltriphosphatweges (LIEBERHERR et al., 1993). Bei den Enterozyten werden die Soforteffekte von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als „Transcaltachia“ bezeichnet und sind schon seit vielen Jahren bekannt (NEMERE et al., 1984). Dabei kommt es zu einer gesteigerten Absorption von Calcium und Phosphor aus dem Darmlumen *in vivo* indem ladungsgesteuerte Calciumkanäle aktiviert werden und die Aktivität der Proteinase A und C erhöht wird (DE BOLAND und NORMAN, 1990). Zusätzlich kommt es ebenfalls zu einer gesteigerten Phosphorabsorption innerhalb von 4-8 Minuten. Die Bedeutung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Membran-Rezeptoren wird in diesem Zusammenhang diskutiert (BOYAN et al., 2002; ERBEN et al., 2002; NORMAN et al., 2002).

Wirkmechanismus von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Unter den verschiedenen Aufgaben des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist die wichtigste und hervorstechendste Funktion die Regulation der Calciumhomöostase und des Knochenstoffwechsels. Ziel der Effekte, die es verursacht, ist die Aufrechterhaltung eines in engen Grenzen regulierten Plasma-Calcium-Spiegels, der sich bei Säugern im Bereich zwischen 2,3 und 2,7 mmol/L (45% davon in ionisierter Form) befindet. Zusätzlich ist es zusammen mit PTH relevant für die Bereitstellung von Calcium für die Knochenmineralisation. Seine Wirkung entfaltet es dabei im Dünndarm vorwiegend im Duodenum, bei der enteralen Calcium- und Phosphor-Absorption, und in der Niere bei der Calcium- und Phosphor-Exkretion sowie Reabsorption. Die Nebenschilddrüse ist dabei als Bildungsort des, neben dem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, wichtigsten regulatorischen Hormons, Parathormon (PTH) relevant.

Eine gesonderte Stellung hat dabei das Knochengewebe, da es unter physiologischen Bedingungen einem ständigem Abbau und Aufbau von Knochengewebe unterliegt. Weiters stellt es einerseits einen spontan gut mobilisierbaren Calciumspeicher dar und benötigt andererseits über längere Zeit die Verfügbarkeit von Calcium und Phosphor um mechanisch belastbare Knochensubstanz zu erhalten und auszubauen.

Funktion des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Darm

Der Calcium-Transportmechanismus im Darm funktioniert auf zwei unterschiedliche Weisen, die voneinander unabhängig sind. Zum einen läuft die Calciumabsorption über einen sättigbaren, transzellulären Mechanismus ab und zum anderen über einen nicht sättigbaren, passiven parazellulären Mechanismus. Im ersten Fall werden Calcium-Ionen lumenseitig entlang des elektrochemischen Gradienten resorbiert, transzellulär transportiert und an der basolateralen Zellmembran gegen den Konzentrationsgradienten, teilweise mittels eines energieverbrauchenden Prozesses,

in die extrazelluläre Flüssigkeit der *Lamina propria* abgegeben. Wahrscheinlich beeinflusst $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ alle Teilschritte dieses transzellulären Vorgangs, wobei es die Calcium-Aufnahme steigert.

Kommt es zu einem Vitamin D-Mangel, tritt zwar Calcium in die Zellen über, bleibt dann aber im Mikrovillibereich und bindet an Calmodulin. Dort bildet es schließlich Komplexe mit Myosin I und Actin, was die Calciumkanäle möglicherweise irreversibel inaktiviert (BIKLE et al., 1989; CHANDRA et al., 1990; KAUNE et al., 1994).

Bei ausreichender Versorgung mit Vitamin D_3 kann das aufgenommene Calcium schnell intrazellulär weitertransportiert werden und die Kanäle bleiben geöffnet. Diesen intrazellulären Transport übernimmt bei den Säugetieren das Protein Calbindin D_9K , welches über die Induktion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ synthetisiert wird (FEHER et al., 1992). Bei Calciummangel im Organismus steigt der Parathormonspiegel im Blut und somit kommt zu einer gesteigerten $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese, die wiederum eine verbesserte Calciumabsorption aus dem Darm bewirkt.

Funktion des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Niere

Die Niere spielt bei der Erhaltung der Calciumhomöostase eine entscheidende Rolle, da dort zum einen das aktive Hormon $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ synthetisiert wird und zum anderen die Exkretion und Reabsorption von Calcium stattfindet. Bis zu 98% des im Primärharn sezernierten Calcium können reabsorbiert werden. Dabei scheinen die Mechanismen und Einflussfaktoren in den unterschiedlichen Anteilen des Tubulussystems verschieden zu sein. Im proximalen Tubulus läuft der Transport vom Calcium vorwiegend passiv und parazellulär ab, wobei 65% des filtrierte „Calcium-Loads“ resorbiert werden. In der Henle-Schleife findet sowohl ein passiver als auch einen aktiver Transport statt, über den insgesamt weitere 20% filtrierte werden. Im distalen Tubulus und im Sammelrohr befinden sich die entscheidenden Stellen der Regulation, denn dort werden über einen aktiven Transport bis zu 10% der filtrierte „Calcium-Loads“ resorbiert (FRIEDMAN und GESEK, 1995; YAMAMOTO et al.,

1984). Die endokrinen Regulatoren, denen dabei eine wichtige Rolle zukommt, sind PTH und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (FRIEDMAN und GESEK, 1995).

Die Prinzipien der gerichteten Calcium-Absorption beruhen auf den Wechselwirkungen, die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und PTH aufeinander ausüben. So bewirkt PTH wahrscheinlich den Übergang von Calcium durch die apikale Membran, wobei dieser Vorgang durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ über eine Induktion der Synthetisierung von PTH-Rezeptoren gesteuert werden könnte (FRIEDMAN und GESEK, 1993). Bei dem basolateralen Übergang von Calcium in die Blutbahn wird vermutet, dass mehrere Transportmechanismen zuständig sind, doch scheint eine Plasmamembran-Calciumpumpe die zentrale Rolle zu spielen (FRIEDMAN und GESEK, 1995).

Intrazellulär wird das Calcium in der Niere an Calcium-Bindungsproteine gebunden. Dabei gibt es unterschiedliche Bindungsproteine, z.B. Calbindin D28K und Calbindin D9K, die nicht nur eine unterschiedliche Struktur aufweisen, sondern auch in ihrer Funktion voneinander abweichen. So scheint es, als ob Calbindin D28K primär den apikalen Transport durch Calciumkanäle anregt und eventuell auch eine transzelluläre „Carrierfunktion“ aufweist während Calbindin D9K wohl die basolaterale Calcium-Ausschleusung aus der Zelle über eine ATP-getriebene Plasmamembranpumpe stimuliert. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aktiviert die Transkription und steigert somit die Synthese dieser beiden Proteine und hat somit eventuell auch an dieser Stelle einen Einfluss in der renalen Rückresorption von Calcium (BOUHTIAUY et al., 1994; KOSTER et al., 1995; LIU et al., 1996).

Wahrscheinlich weist $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auch noch weitere Funktionen in der Niere auf. Es wird diskutiert, ob es nicht auch einen hemmenden Einfluss auf den Phosphat-Transport im proximalen Tubulus hat (BONJOUR et al., 1977). Des Weiteren deutet die Tatsache, dass VDR im gesamten Tubulusbereich vom Glomerulum bis zum Sammelrohr exprimiert wird, darauf hin, dass es noch weitere unbekannte Effekte von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gibt (LIU et al., 1996).

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

Nicht nur im heranwachsenden, sondern auch im adulten Organismus unterliegt der Knochen ständigen Umbauvorgängen von osteoklastärem Abbau und der Neusynthese von Knochenmaterial. Diese Vorgänge bezeichnet man als Modeling und Remodeling. Beim Modeling handelt es sich um eine Formveränderung des Knochens in Form von Formation oder Resorption. Es bewirkt im kortikalen Knochen eine Formveränderung und im trabekulären Knochen eine Neuordnung von Strukturelementen im Sinne eines dynamischen Adaptationsvorgangs an biomechanische Krafteinwirkung.

Das Remodeling dagegen läuft zyklisch ab und beginnt zunächst immer mit dem Abbau von Knochenmasse, die danach an derselben Stelle wieder aufgebaut wird. Dieser Erneuerungsmechanismus sichert die Stabilität des Knochenmaterials über die Zeit hinweg. PTH spielt dabei eine entscheidende Rolle, indem es regulatorisch auf den Remodeling-Zyklus einwirkt (ERBEN,2005).

Welche Rolle $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei der Regulation des Knochen turnover spielt ist noch nicht bis ins Detail geklärt. So wird der Vitamin-D-Rezeptor in Zellen des Knochens, den Osteoblasten und den Osteoklasten, exprimiert. Verschiedene Matrixproteine der Osteoblasten wie Osteocalcin, Osteopontin, Bone Sialoprotein und Kollagen Typ I stehen unter dem Einfluss von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (BOYAN et al., 1992; LIAN und STEIN,1993). Das legt einen anabolen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel nahe. Zum anderen gibt es Hinweise, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ beim Knochenabbau eine Rolle spielt, da es unter anderem die Osteoklastenreifung beeinflusst. Es gibt Erkenntnisse, dass eine Verabreichung von hohen, pharmakologischen Dosen Vitamin-D-Metaboliten die Knochenresorption stimuliert (ERBEN et al., 1997; HOLTROP et al., 1981). Ob dem jedoch eine physiologische Bedeutung zukommt ist jedoch ungeklärt.

Man geht davon aus, dass die schützende Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf den Knochen eher über die Effekte, die es bei der Regulation von Calcium in Darm und Niere bewirkt, entsteht, nämlich indem es den Plasmacalciumspiegel steigert. In Studien mit Mäusen, bei denen der VDR inaktiviert wurde, und bei denen allein durch Fütterung einer Calcium, Phosphat und Lactose-reichen Diät der Calciumspiegel normalisiert wurde, wurde gezeigt, dass auch die Knochenmineraldichte auf ein

normales Niveau gebracht werden konnte (LI et al., 1998). Es existieren auch Studien mit D-defizienten Ratten, die dafür sprechen, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ keine relevante direkte Wirkung am Knochen zugeordnet werden kann, sondern dass es indirekt über die Regulation des Calcium wirkt (KOLLENKIRCHEN et al., 1991a; KOLLENKIRCHEN et al., 1991b; UNDERWOOD und DELUCA, 1984).

Nicht-calcämische Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Neben diesen calcämischen Wirkungen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf den Darm, den Knochen und die Nieren geht man schon seit langem davon aus, dass auch in anderen Organen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine Funktion zugeordnet werden kann. In den Zellkernen der Zellen, die Gonaden, Thymus, Pankreas, Magen, Hypophyse, Zähne, Plazenta, Herzmuskel und Haut bilden, sind Rezeptoren für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nachgewiesen worden (KIM et al., 1983; STUMPF et al., 1979; STUMPF et al., 1983; STUMPF et al., 1984). Ebenso spielt in Zellen des Immunsystems, wie bereits erwähnt, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine wichtige Rolle. Zusätzlich zu der Fähigkeit von Makrophagen, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu synthetisieren, befinden sich in Monozyten und Makrophagen sowie in B- und T-Lymphozyten Vitamin-D-Rezeptoren (BHALLA et al., 1983; PROVVEDINI et al., 1986; TSOUKAS et al., 1984).

Auch in verschiedenen Tumorzelllinien konnte die Expression von Vitamin-D-Rezeptoren nachgewiesen werden. Aufgrund dessen und der antiproliferativen Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf verschiedene Krebszellen, wurden Erprobungen von Vitamin D_3 in entsprechenden *in vitro*-Systemen und ersten Tiermodellen durchgeführt in denen Vitamin D als erfolgreicher Proliferationshemmer eingesetzt werden konnte (COLSTON et al., 1981; HALLINE et al., 1994; VINK-VAN WIJNGAARDEN et al., 1994).

In der Haut wurden $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Rezeptoren in verschiedenen Zellen der Epidermis, in der Wurzelscheide der Haarfollikel (STUMPF et al., 1984) und in Hautfibroblasten (SMITH et al., 1986; SMITH et al., 1999; STUMPF et al., 1984) gefunden. Die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Haut äußert sich in einer Hemmung der Proliferation

bzw. Stimulierung der Zelldifferenzierung (BIKLE und PILLAI,1993; SMITH et al., 1986). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ scheint dabei für eine normale Differenzierung der Epidermis essentiell zu sein, indem es den epidermalen Calciumspiegel reguliert, der u. a. entscheidend für die Entstehung und Erhaltung der Barrierefunktion der Haut ist (BIKLE et al., 2004).

Ebenfalls antiproliferative Wirkungen werden in den Gonaden und Muskelzellen beobachtet, was für in *in vitro*-Untersuchungen an Sertolizellen und Cardiomyozyten gezeigt wurde (AKERSTROM und WALTERS,1992; WALTERS et al., 1987). Dabei scheinen Soforteffekte an Calciumkanälen eine Rolle zu spielen. Im Pankreas konnten schon früh VDRs und Vitamin-D-abhängige Calciumbindungsproteine nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde ein Einfluss der Calciumhomöostase auf die Funktion des endokrinen Pankreas gezeigt (NORMAN et al., 1980). Seitdem wurden verschiedene Studien *in vivo* und *in vitro* durchgeführt, die gezeigt haben, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ einen Einfluss auf die Insulin-Synthese und Sekretion hat (BOURLON et al., 1999; HYPONEN et al., 2001; NORMAN et al., 1980; THE EURODIAB SUBSTUDY 2 STUDY GROUP,1999; ZEITZ et al., 2003).

2.2 Störungen des Vitamin D-Haushalts

2.2.1 Rachitis und Osteomalazie

Bei einer mangelnden Aufnahme und einer unzureichende Eigensynthese von Vitamin D_3 kommt es zu einem Mangelsyndrom, das beim wachsenden Individuum als Rachitis und beim adulten als Osteomalazie bezeichnet wird. Ebenfalls tritt ein solches Mangelsyndrom bei Störungen des Vitamin-D-Metabolismus oder bei Funktionsstörungen des Rezeptors auf.

Ist $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder seine Wirkung nicht vorhanden, entsteht eine Hypocalcämie, da die Calciumresorption aus dem Darm und die renale Rückresorption gestört sind. Dies hat zur Folge, dass Parathormon verstärkt sezerniert wird. Es kommt zu einer erhöhten Osteoklastenaktivität und Knochen wird vermehrt abgebaut. Der

Knochenstoffwechsel ist hochgradig gestört, bedingt durch die verringerte Mineralisierung der Knochenmatrix, die fehlregulierte Matrixsynthese und eine PTH-induzierte Knochenabbaurate. Der Knochen wird mechanisch instabil, was sich besonders beim wachsenden Skelett in schweren klinischen Symptomen äußert. Es kommt zu Wachstumsretardierung, überschießender Produktion von Matrix an den Epiphysenfugen und zu Deformation, besonders an den langen Röhrenknochen aber auch an den Knochen des Stammes, wie z.B. den Brust- und Lendenwirbeln. Die Krankheit wird begleitet von hochgradigen Knochenschmerzen, Hypocalcämie und Hypophosphatämie sowie dem reaktiven sekundären Hyperparathyreoidismus. Im adulten Skelett tritt vor allem eine erhöhte Frakturanfälligkeit und röntgenologisch nachweisbare Verringerung der Knochenmineraldichte auf (GARABEDIAN und BEN MEKHBI, 1989).

2.2.2 Die Pseudo-Vitamin-D-Mangel-Rachitis Typ I-Erkrankung beim Menschen

Die Pseudo-Vitamin-D-Mangel-Rachitis Typ I ist eine Krankheit, bei der dieselben Symptome auftreten wie bei echter Rachitis, der aber kein Vitamin-D-Mangel zugrunde liegt und die auch nicht mit physiologischen Dosen von Vitamin D therapierbar ist. Zum ersten Mal wurde sie von Fraser und Salter, 1958 (FRASER und SALTER, 1958), und von Jesserer, 1961, als mutmaßlich eigenständige Krankheit beim Menschen beschrieben (JESSERER, 1961). 1961 bezeichnete Prader sie als eindeutig selbständige Erkrankung (PRADER et al., 1961).

Es handelt sich dabei um eine äußerst seltene Erbkrankheit, die autosomal rezessiv vererbt wird. Die vorwiegenden Symptome sind Hypocalcämie und Rachitis, die, wie bereits erwähnt, nicht durch die Gabe von physiologischen Dosen Vitamin D behandelbar sind. Es kommt zu einem sekundärer Hyperparathyreoidismus, und es können Zahnschmelzhyplasien beobachtet werden. Im Blut sind erniedrigte Calcium-, erniedrigte Phosphor-Werte und eine Erhöhung von PTH und der Alkalischen Phosphatase festzustellen. Die Funktionsfähigkeit der Niere und die Absorptionsfähigkeit des Darmes sind bei dieser Erkrankung uneingeschränkt. Radiologisch zeigen sich die klassischen infantilen rachitischen Veränderungen des Skelettsystems. Die Serumspiegel von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sind sehr niedrig bis nicht

detektierbar. Durch die Gabe von 1 bis 1,75 µg 1α-Cholecalciferol oder 1µg 1,25-Cholecalciferol D₃ (1,25(OH)₂D₃) können die Symptome vollständig beseitigt werden. Mit normalen Dosen von Vitamin D gelingt das nicht, allerdings kann mit einer Dosis von 1,25 bis 2,5 mg Vitamin D pro Tag eine völlige Symptombefreiung erreicht werden (SMITH et al., 1999).

2.2.3 Die Pseudovitamin-D-Mangel-Rachitis Typ I beim Schwein

Im Jahre 1963, nur zwei Jahre nachdem die PVDR I beim Menschen beschrieben wurde, wurde beim Saugferkel eine Vitamin-D-resistente Rachitis, die sich weitervererbte, charakterisiert (PLONAIT,1963). Einige Jahre später, nachdem der Charakter dieser Erkrankung beim Schwein näher beschrieben war, wurde man darauf aufmerksam, dass eine Ähnlichkeit mit der humanen Pseudo-Vitamin-D-Mangel-Rachitis Typ I (PVDR I) bestand (HARMEYER und PLONAIT,1967). Die dahingehend geäußerten Vermutungen wurden in den folgenden Jahren erhärtet. Seit vielen Jahren steht nun fest, dass diese Krankheit beim Schwein in Ätiologie, Pathogenese und nahezu allen klinischen Symptomen und biochemischen Merkmalen der des Menschen entspricht. *In vitro*-Versuche an Nierenhomogenaten haben gezeigt, dass diese Schweinemutante in Analogie zur menschlichen PVDR I keine renale 1α-Hydroxylase-Aktivität aufweist (WINKLER et al., 1986).

2.2.3.1 Klinische Symptomatik der PVDR I beim Schwein

Die PVDR I-Erkrankung beim Schwein ähnelt weitestgehend der Erkrankung beim Menschen. Die ersten biochemischen Veränderungen bei den Schweinen zeigen sich meist ein bis vier Wochen nach der Geburt. Klinische Symptome treten im Alter zwischen 2 ½ und 12 Wochen auf. Meist erkranken die Ferkel im engeren Altersabschnitt zwischen 3 ½ und 5 Wochen (HARMEYER,1982; PLONAIT,1969). Bereits drei bis zehn Tage vor Auftreten der ersten klinischen Symptome sind eine Hypocalcämie, eine Hypophosphatämie und eine Zunahme der Aktivität der alkalischen Phosphatase im Plasma nachweisbar (HARMEYER,1991). Aufmerksam

wurde man auf die Krankheit, als 1960/61 in einem landwirtschaftlichen Betrieb in der Nähe von Hannover Tiere mit solchen Leiden immer wieder auftraten und als Kümmerer in die Klinik für kleine Klautiere der Tierärztlichen Hochschule Hannover eingeliefert wurden. Die Tiere zeigten die Symptome einer Rachitiserkrankung. Therapieversuche mit der Verabreichung von physiologischen Dosen Vitamin D erzielten keine Verbesserung der Symptomatik. Jedoch konnten die Tiere mit pharmakologisch hohen Dosen von Vitamin D therapiert werden (PLONAIT,1963; PLONAIT,1965). Da man vermutete, dass eine Erbkrankheit vorlag, wurden von diesen therapierten Tieren Nachkommen gezogen, von denen ebenfalls ein Teil erkrankte. Der Erbgang ist autosomal rezessiv (MEYER und PLONAIT,1968). In Hannover wurde das Krankheitsmerkmal durch künstliche Besamung von homozygoten Landrasseebern auf Minipigs übertragen. Bei den schnell wachsenden Landrassetieren erkrankten die Homozygoten viel schneller als die langsamer wachsenden homozygoten Minipigferkel. Innerhalb eines Wurfes variierte das Auftreten der ersten Symptome um mehrere Wochen und mehr noch zwischen verschiedenen Würfen (LACHENMAIER-CURRLE und HARMeyer,1988).

Allgemein lässt sich bei diesem Krankheitsbild festhalten, dass die betroffenen Ferkel als erste äußere Symptome längere Liegezeiten und zunehmend passives Verhalten zeigen. Sie bleiben im Wachstum zurück und entwickeln ein rauhes und stumpfes Haarkleid und eine blässere, weiße Hautfarbe, im Vergleich zu gesunden Ferkeln. Bereits zwei bis fünf Tage nach Einsetzen der ersten äußeren Symptome treten Gelenkschmerzen, Schreckhaftigkeit und Verkrümmungen der Gliedmaßen und Gelenke auf. Die Deformationen des Skeletts nehmen schnell zu und zu den Verkrümmungen der Extremitäten bildet sich im Bereich der Brust- und oberen Lendenwirbelsäule eine Kyphose, oft mit gleichzeitiger Skoliose und Lordose im unteren Lendenwirbelbereich, aus. Auch Einsenkungen des Nasenrückens und rachitischer Rosenkranz werden beschrieben. Besonders bei den Landrasseferkeln kommt es dazu, dass die deformierten und fehl entwickelten Gliedmaßen dem Körpergewicht nicht mehr gewachsen sind, und sich die Tiere nur noch auf den Carpal- und Tarsalgelenken bewegen können. Bei diesen Tieren ist die Futteraufnahme deutlich reduziert. Es können Abbrüche des Femur- oder des Humerus-Kopfes z.B. durch Insulte gesunder Wurfgeschwister auftreten. Deformationen des Beckens führen zu erschwertem Kotabsatz und in der Folge

häufig zu Rectumvorfällen. Bedingt durch die unphysiologische enge Krümmung der Rippen, kommt es zur Einengung des Brustkorbes und zu Atembeschwerden, welche vermehrt Infektionen der Atemwege nach sich ziehen. Die Tiere zeigen im Allgemeinen eine erhöhte Infektneigung, was auf eine generelle Immunschwäche hindeutet (STRODER,1973). Ohne Behandlung sterben die Landrasseschweine im Alter zwischen drei und fünf Monaten, wobei die Minipig-Tiere ein bis zwei Monate länger leben (HARMEYER,1991).

2.2.3.2 Aufbau und Funktion des 1 α -Hydroxylase-Enzyms

Die 25-Hydroxyvitamin 1 α -Hydroxylase ist das Enzym, welches bei der PVDR I-Erkrankung, durch verschiedene Mutationen bedingt, inaktiviert ist.

Diese Hydroxylase gehört zu den Cytochrom P450-Enzymen (CYP). Die Cytochrome bilden eine eigene Gruppe der anaeroben Dehydrogenasen. Sie sind eisenhaltige Hämproteine, die unter anderem auch in den Elektronentransport der Atmungskette eingeschaltet sind. In ihrer Funktion als Monooxygenasen oder mischfunktionelle Hydroxylasen zeichnen sie sich dadurch aus, dass ein Sauerstoffatom von molekularem Sauerstoff, unter Bildung von einer Hydroxylgruppe, in das Substrat eingebaut wird, ein zweites Atom dient dabei der Wasserbildung. Das in den Hämproteinen enthaltene Hämgerüst bindet im Cytochrom P 450 zum einen Cystein zum anderen H₂O, das durch die Aktivierung von O₂, während der katalytischen Hydroxylierung von Kohlenwasserstoffen, verdrängt wird (LÖFFLER,1998).

Bei der 1 α -Hydroxylase ist diese mitochondriale funktionelle P 450-Domäne mit einer Membrananhaftung assoziiert. Darüber hinaus ist sie aufgebaut aus einer inneren Häm-bindenden Tasche, einer Ferredoxin-Bindungsstelle für den Elektronentransfer, einem Kanal für den Substratzugang und funktionellen Gruppen des aktiven Zentrums, die den Elektronen-Transfer während des Sauerstoff-Aktivierungszyklus erleichtern. Das Enzym nimmt eine annähernd dreieckige Konformation an, in der eine Seite die Domänen umfasst, die mit der N-terminalen Membranverankerung und den Substratkanälen assoziiert sind, die von einer β -Faltblatt-Domäne vorgegeben sind (β 1- und β 2-Domäne). Nahezu parallel zur β 1- und β 2-Domäne befindet sich die I-Helix, die sich über das gesamte Enzym spannt und mit dem zentralen Eisen des

Häms im aktiven Zentrum interagiert. Dieses Atom ist umgeben von der Häm-bindenden Tasche, die hoch konservierte Anteile enthält, die sich gemeinsam mit der Häm-Propionat-Gruppe anordnen (OMDAHL et al., 2001).

Nach Anlagerung des Substrats R-CH₃ an das Cytochrom P450 erfolgt die Reduktion des dreiwertigen zum zweiwertigen Eisen mit anschließender Anlagerung von Sauerstoff. Dieser wird reduziert, wonach die Hydroxylierung des Substrats mit anschließender Dissoziation von hydroxyliertem Substrat und Wasser erfolgt (LÖFFLER, 1998). Um diese stereospezifische Hydroxylierung durchzuführen, muss das Substrat abhängig vom Durchmesser, der verschiedenen Oberflächen und der internen Bindungsstelle im Substratbindungskanal binden können. In dieser Hinsicht herrscht eine gewisse Ähnlichkeit zum Enzym P450c27. Die renale mitochondriale 1 α -Hydroxylase zeigt eine Übereinstimmung in ca. 42% der Sequenz zu Cytochrom P450c25/27 (CYP27), was auch im Einklang mit seiner zwar niedrigen und nicht-physiologischen, aber doch nachgewiesenen 1-Hydroxylase-Aktivität steht (PIKULEVA et al., 1997). Aufgrund dessen wird es auch als CYP27B1 bezeichnet (OMDAHL et al., 2001).

Vom mitochondrialen Cytochrom P450c27 ist bekannt, dass es den Abbau von Cholesterol zu Gallensäuren katalysiert, indem es an C₂₇ hydroxiliert. Ebenso ist 25-Hydroxylase-Aktivität bei Cholecalciferol beschrieben. Darüber hinaus gibt es Untersuchungen mit Überexpression von recombinantem humaner CYP27 in E.coli, die zeigen, dass dieses Enzym auch die Fähigkeit besitzt 25-(OH)D₃ an Stelle C₁ zu hydroxylieren.

Auch hochaufgereinigtes humanes P450c27 hat diese Fähigkeit. Die Aktivität gegenüber der 27-Hydroxylierung ist um den Faktor 40 niedriger und es wird angenommen, dass sie unter physiologischen Bedingungen zu niedrig ist, um von Bedeutung im Stoffwechsel von 25-Hydroxyvitamin D₃ zu sein (PIKULEVA et al., 1997). Studien an aufgereinigten Lebermitochondrien von Schwein und Kaninchen und recombinantes humanes CYP27 zeigen ebenfalls, dass CYP27 in der Lage ist 1 α -Hydroxylierung von 25-Hydroxyvitamin D₃ zu katalysieren (AXEN et al., 1994).

Bei Mutationen im 1 α -Hydroxylase-Gen, die eine Inaktivierung des Enzyms und somit eine PVDR I-Erkrankung bewirken, sind die verschiedensten Bereiche des Enzyms betroffen. Bei den PVDR I-Schweinen wurden 2 mutierte Varianten der

mRNA festgestellt. Bei der einen fehlt das komplette Exon 6 und bei der anderen zusätzlich Exon 7 und ein Teil von Exon 8. Die Sequenz von Exon 6 kodiert unter anderem einen konservierten Argininrest in der I-Helix, die bei der Oxidation des Häm-Eisens während des Ablaufs des katalytischen Zyklus von P450C1 notwendig ist. Außerdem kodiert Exon 6 Anteile der J-Helix und die Oberfläche der K-Helix-Domäne, die das Ferredoxin-Elektron-Transfer-Molekül bindet, welches Elektronen für die Reduktion des molekularen Sauerstoffs bereitstellen, die während des katalytischen Zyklus notwendig sind. Beide Deletionen führen stromabwärts zu einer Verschiebung des Leserahmens, der zur Generierung eines verfrühten Stop-Codons führt und somit ein verkürztes Enzym codiert, das kein aktives Zentrum mehr besitzt und folglich keine Enzymaktivität mehr aufweisen kann (CHAVEZ et al., 2003).

2.3 Tiermodelle der Vitamin D-Forschung

2.3.1 Nager-Modelle der Vitamin-D-Forschung

Die Erforschung der Wirkung von Vitamin D und ihr Mechanismus wurden zum größten Teil an Tiermodellen durchgeführt. Zwar existiert, wie bereits erwähnt, eine gewisse Anzahl an humanen genetisch bedingten Erkrankungen des Vitamin-D-Haushalts, doch sind diese selten und zeigen unterschiedlich ausgeprägte Genotypen und Phänotypen. Aufgrund der Seltenheit und auch der unterschiedlichen genetischen Hintergründe und Lebensbedingungen sind Studien zur Vitamin-D-Forschung in Zusammenarbeit mit solchen Patienten sehr schwierig.

Die eigentliche Aufgabe und der Mechanismus der Wirkung von Vitamin D wurden auf der Grundlage von tierexperimentellen Studien z.B. mit Vitamin-D-defizienten Ratten aufgeklärt. Es konnten Einblicke in die Wechselbeziehungen des Vitamin-D-Metabolismus genommen werden. Jedoch konnten die molekularen Hintergründe auf diese Weise nicht geklärt werden, da diese Modelle dafür nicht uneingeschränkt geeignet waren. Schwierigkeiten ergaben sich dadurch, dass aufgrund der aktiven kutanen Vitamin-D-Synthese der Tiere oder Restmengen von Vitamin D in den Mangel diäten keine völlige Vitamin-D-Defizienz erzeugt werden konnte (WALTERS

et al., 1992).

Mit der Entwicklung der modernen embryonalen Stammzelltechnologie wurde es möglich, verschiedene Tiermodelle gezielt zu generieren und so konkrete Fragestellungen zu verfolgen. So steht ein Mausmodell zur Verfügung bei dem die 1α -Hydroxylase inaktiviert wurde. Durch gezielte Entfernung der Hormonbindungs- und der Häm-Bindungs-Domäne des 1α -Hydroxylase-Gens wurde ein Tier generiert, das das identische Krankheitsbild der menschlichen PVDR I zeigt (PANDA et al., 2001). An diesen Tieren wurde z.B. nachgewiesen, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei der Differenzierung der Haut und Regulierung ihrer Barrierefunktion eine zentrale Rolle spielt (BIKLE et al., 2004).

Darüber hinaus wurden verschiedene Mausmodelle mit einem inaktivierten Vitamin-D-Rezeptor erzeugt, die an der PVDR Typ II erkrankten. Bei diesen Tieren wurde zum einen eine gezielte Mutation des Exon 2 des VDR, das einen der Zinkfinger des Rezeptors codiert, eingeführt (LI et al., 1997; YOSHIZAWA et al., 1997). Bei einem anderen Modell wurde zusätzlich zu dieser Mutation noch ein LacZ-Reporter gen (β -Galktosidase) eingefügt, um VDR-Expressionsanalysen durchführen zu können (ERBEN et al., 2002). Zusätzlich wurde die Aussagekraft von Studien an solchen Modellen verbessert, indem es gelungen ist den gestörten Calciumhaushalt und das Körpergewicht bei diesen Tieren mithilfe einer so genannten „rescue-diet“ völlig zu normalisieren. Durch die Zugabe von Laktose und einen erhöhten Gehalt an Calcium und Phosphor kann die Resorption von Calcium und Phosphor aus dem Darm in der Weise verbessert werden, dass sich physiologische Serumspiegel einstellen (BIKLE et al., 2004; ERBEN et al., 2002; LI et al., 1998; VAN CROMPHAUT et al., 2001).

Mit einem solchen Modell konnten Fragen zur Rolle des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei der endokrinen Sekretion von Sexualhormonen und der Insulinsekretion untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass es bei diesen VDR-Knockout-Tieren eine molekulare Funktion des Vitamin-D-Hormons im endokrinen Pankreas gibt. Die maximale Insulinsekretion ist bei diesen Tieren um 60% verringert und die orale und subkutane Glukosetoleranz ist gegenüber den Wildtyp-Tieren eingeschränkt (ZEITZ et al., 2003). Diese Veränderungen sind unabhängig von Veränderungen der Calciumhomöostase oder des Körpergewichtes.

2.3.2 Das Schwein als Modell der Vitamin-D-Forschung

Am Institut für Physiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover existierte eine Schweinemutante, die wie oben bereits beschriebenen, durch Rachitis, Hypocalcämie und sekundären Hyperparathyreoidismus charakterisiert ist und damit der menschlichen Pseudo-Vitamin D-Mangel-Rachitis Typ I (PVDR I) sehr ähnlich ist (PLONAIT, 1969). Die bisher vorliegenden Daten zur molekularen Pathogenese der Erkrankung haben nahe gelegt, dass auf RNA-Ebene unterschiedliche Deletionen im C-terminalen Abschnitt des 1α -Hydroxylase-Gens vorliegen, die auf fehlerhaften Splice-Mechanismen beruhen könnten (CHAVEZ et al., 2000; CHAVEZ et al., 2003). Der zugrunde liegende genomische Defekt wurde bisher noch nicht aufgeklärt. In Analogie zum VDR-Knockout-Mausmodell zeigen auch die Vitamin-D-defizienten Schweine eine deutlich reduzierte Insulinsekretion nach oraler Glukosebelastung (HARMEYER et al., 1985). Im Gegensatz zu den VDR-Knockout-Mäusen ließ sich die Glukose-induzierte Insulinsekretion durch Calciuminfusionen fast normalisieren (HARMEYER et al., 1985). Die Daten sind jedoch widersprüchlich, denn nach therapeutischer Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kam es bei homozygoten Ferkeln trotz weiter bestehender Hypocalcämie zu einem starken Anstieg der Glukose-induzierten Insulinsekretion auf übernormale Werte. Die Autoren schlossen daraus, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ möglicherweise den Calciumhaushalt der Insulin-sezernierenden β -Zellen direkt stimuliert. Der Effekt des Vitamin-D-Hormon-Systems auf die Insulinsekretion könnte in einer Modulation der intrazellulären Calcium-Signaltransduktions-Mechanismen liegen. Mithilfe dieses PVDR I-Schweinmodells wäre man in der Lage die Zusammenhänge zwischen Vitamin-D-Hormon-System, intrazellulären Calcium-Signaltransduktions-mechanismen sowie Insulinsynthese und -sekretion zu untersuchen. Verdauung, Physiologie, Endokrinologie sowie Lipid-, Glukose-, und Protein-Stoffwechsel bei Schweinen ähneln weitgehend der Situation beim Menschen. Ein weiterer Vorteil gegenüber VDR-Knockout-Mäusen ist die erhaltene Rezeptivität von PVDR I-Schweinen gegenüber Vitamin-D-Metaboliten, was für *In-vivo*- und *In-vitro*-Untersuchungen ausgenutzt werden kann.

3 Material und Methoden

3.1 Tiermaterial

Homozygote PVDR I-Tiere, bei denen die phänotypische Expression festgestellt wurde, wurden uns von Prof. J. Harmeyer, Institut für Tierphysiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover, freundlicherweise überlassen. Die homozygoten Tiere erhielten in regelmäßigen Abständen unter Berücksichtigung des Vitamin-D-Dosierungs-Plans, eine intramuskuläre Injektion von Vitamin D₃ (Vitamin D₃-Konzentrat, Ceva, Düsseldorf) um einer rachitischen Erkrankung vorzubeugen.

Für einen Teil der Experimente war die Blutabnahme bei den PVDR I-Tieren und Kontroll-Tieren notwendig. Da die Tiere zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Tests an der Veterinärmedizinischen Universität in Wien aufgestellt waren, wurde in Übereinstimmung mit dem österreichischen Tierschutzgesetz für die Erlaubnis zur Blutabnahme ein Tierversuchsantrag gestellt, der durch die zuständige Ethik- und Tierschutzkommission bewilligt wurde (Aktenzeichen BMBWK-68.205/0035-BrGt/2006).

Vitamin-D-Dosierungs-Plan

Behandlung der PVDR I-Schweine (homozygot für PVDR I) mit Vitamin D₃ als intramuskuläre Applikation von Vitamin-D₃-Lösung 1 000 000 IE pro ml.

1. Erste Behandlung ab der 4. Lebenswoche	150 000 IE
2. 2. Mal, Alter 2 Monate	200 000 IE
3. 3. Mal, Alter 3 Monate	250 000 IE
4. 4. Mal, Alter 4,5 Monate	300 000 IE
5. 5. Mal, Alter ca. 6 Monate	500 000 IE
6. 6. Mal, Alter 7,5 Monate	600 000 IE
7. 7. Mal, Alter 9 Monate	800 000 IE
8. 8. Mal, Alter 10-11 Monate	800 000 bis 1 Mio. IE
9. danach alle 6-8 Wochen	800 000 bis 1 Mio. IE

Tragende und laktierende Sauen, sowie viel deckende Eber werden alle 5 Wochen mit ca. 800 000 IE behandelt. Der Plan muss je nach Wachstum, Gewicht und Rasse (Landrasse oder Minipig) angepasst werden.

3.2 Analyse des Gendefektes

3.2.1 Gewinnung von genomischer DNA

Um genomische DNA von den Tieren zu isolieren, wurde von PVDR I-Schweinen und Wildtyp-Kontrolltieren Vollblut genommen. Alternativ wurden Hautstanzen entnommen, die während des Setzens einer speziellen Ohrmarke (TypiFix Eartag[®], Agrobiogen, Thalmannsdorf) gewonnen werden konnten. Das Vollblut wurde unter Fixierung des Tieres mit der Oberkieferschlinge, durch Punktion der *Vena jugularis externa* gewonnen und in einem mit K-EDTA (1,2 bis 2 mg EDTA/ml Blut) präparierten Blutröhrchen aufgefangen.

Zur Gewinnung der DNA wurde das Blut zunächst hämolysiert. Dazu wurden 500 µl Blut in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und 500 µl Lysis Buffer (0,32 M Saccharose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 1% v/v Triton X-100) hinzugefügt und gemischt. Danach wurde die Probe bei 16 000 x g eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Vorgang sooft (2-4mal) wiederholt bis kein Hämoglobin mehr sichtbar war.

Der Überstand wurde verworfen und 500 µl Schwanzlysis-Puffer (10% SDS 5ml; 1M Tris (pH 7,5) 0,5 ml; 0,5M EDTA 5ml; 5M NaCl 1,5 ml; Aqua bidestillata 38 ml) und 200 µg Proteinase K (Boehringer, Mannheim) zugefügt.

Die Blutproben wurden für 12 Stunden bei 55°C in einem Schüttel-Thermoblock (Eppendorf, ThermoMixer comfort) bei 300 rpm inkubiert. Anschließend wurde zu jedem Eppendorf-Reaktionsgefäß 500 µl Phenol/Chloroform-Gemisch (1:1 v/v; Roti[®] Phenol/C, Rotha, Karlsruhe) pipettiert, kräftig gemischt und für 5 Minuten bei 15 700 x g zentrifugiert. Der klare Überstand, in dem die DNA enthalten war, wurde abpipettiert und in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammen mit 2 µl 0,5 M EDTA (pH 8), 200 µl 4M NH₄Ac und 800 µl Isopropanol überführt, gemischt und nochmals bei 15700 x g 5 Minuten zentrifugiert um die DNA zu fällen. Schließlich

wurde der Überstand vorsichtig dekantiert, sodass nur das Pellet am Boden des Eppendorf-Reaktionsgefäßes zurückblieb. Anschließend wurden 100 µl Tris/EDTA-Puffer (pH 7,4) dazugegeben und die DNA 10 Minuten bei 65°C mit offenem Deckel gelöst. Zur besseren Resuspendierung wurde die DNA über Nacht bei -20°C eingefroren. Anschließend wurde die DNA als Template für die PCR eingesetzt. Die Aufbewahrung erfolgte ebenfalls bei -20°C.

Die DNA aus Ohrmarken-Hautstanzen wurde mit Hilfe des für TypiFix Eartags vorgesehenen DNA-Isolationskit (Nexttec GmbH, Leverkusen) nach dem standardisierten Protokoll extrahiert und ebenfalls bei -20°C aufbewahrt.

3.2.2 Genomische PCR und Sequenzierung

3.2.2.1 Prinzip der PCR

Um DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) amplifizieren zu können, werden Oligonukleotid-Primer benötigt. Primer sind kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle (20-30 bp), die zu einer definierten Sequenz der DNA-Matrize komplementär sind. Eine DNA-Polymerase verlängert unter den geeigneten Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynukleotid-Triphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der einzelsträngigen, denaturierten DNA-Matrize. So werden neue DNA-Stränge synthetisiert, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist. Um die Synthese zu wiederholen, wird die doppelsträngige DNA erneut durch Hitze aufgeschmolzen. Mehrfache Zyklen führen zu einer exponentiellen Anreicherung des Produktes.

3.2.2.2 Genomische PCR und Sequenzierung

Die Primer für die PCR der genomischen DNA wurden kreiert, um zum einen die Promotorregion, zum anderen die komplette genomische Sequenz von Exon 1 bis Exon 9 des *Sus scrofa* 1 α -Hydroxylase-Gens zu amplifizieren. Die Synthese erfolgte durch die Firma AG Biodv, Neuherberg.

Da zu Beginn der Studie nur die cDNA, also die codierende Sequenz, in der Genbank verfügbar war, jedoch nicht die gesamte genomische Sequenz, waren die Exon- und Intron-Grenzen des Gens unbekannt. Als Exons bezeichnet man die codierenden Anteile der DNA, während Introns die nichtcodierenden Bereiche darstellen, die die benachbarten Exons voneinander trennen. Introns werden wie die Exons transkribiert, aber dann aus der prä-mRNA herausgespleißt, bevor diese zur Translation aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert wird. In der reifen mRNA verbleiben nur die Exons, sowie der 5'-Cap- und der Poly A-Abschnitt.

Die Exon und Intron-Grenzen der mitochondrialen 1 α -Hydroxylase mussten zunächst mittels eines Sequenzvergleichs der kodierenden Sequenz (Gen Bank Accession Nr. NM213995) mit der genomischen Sequenz von Mensch und Maus, mit Hilfe einer BLAST-Suche, kalkuliert werden.

Für die Promotorregion wurde ein Primer erstellt, der im 3'-Bereich des Methyltransferase-like-Gens (Mettl1-Gen) lokalisiert ist, welches sich im humanen und murinen Genom ca. 2 kB stromaufwärts des 1 α -Hydroxylase-Gens befindet. Die humane und murine Sequenz wurde verglichen und in einem hoch konservierten Bereich wurde ein Vorwärtsprimer für den 1 α -Hydroxylase-Promotor ausgewählt. Weitere Primerpaare wurden verwendet um 5 Fragmente des 1 α -Hydroxylase-Gens zu amplifizieren (Tabelle 1). Die dazugehörigen Sequenzen und Schmelztemperaturen sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 1. Primer für die Sequenzierung der 1 α -Hydroxylase

Fragment-Nr.	Amplifiziertes Produkt	Primer
1	Promotor bis Exon 1	Mettl1_F; 1ahy_ex1_R
2	Exon 1 bis Exon 2	1ahy_ex1_F; 1ahy_ex2_R
3	Exon 2 bis Exon 5	1ahy_ex2_F; 1ahy_ex5_R
4	Exon 4 bis Exon 9	1ahy_ex4_F; 1ahy_ex9_R
5	Exon 8 bis zum Ende von Exon 9	1ahy_ex8_F; 1ahy_ex9.2_R

Tabelle 2. PCR- und Sequenzierungs-Primer

Primer Name	Typ	Sequenz	T _m (°C)
Mettl1_F	Vorwärts	5'-TCCTCCAGGCAGTGACC-3'	62
1ahy_ex1_R	Rückwärts	5'-ATGGTCTGGCTGAGGGAAC-3'	62
1ahy_ex1_F	Vorwärts	5'-TCGCTTCCAGAGTGTTCCATC-3'	63
1ahy_ex2_R	Rückwärts	5'-GGGTCCCTCCTGTCTAGCA-3'	66
1ahy_ex2_F	Vorwärts	5'-TCTTGCGGACTGCTCACC-3'	62
1ahy_ex4_F	Vorwärts	5'-GGCTGCCTGGAACCCGAAGTG-3'	63
1ahy_ex5_F	Vorwärts	5'-GCACGTGGAGCGGCGAGAGG-3'	71
1ahy_ex5_R	Rückwärts	5'-GCCTCTCGCCGCTCCAC-3'	67
1ahy_ex8_F	Vorwärts	5'-GCGCAGCTGCATGGGGAGAC-3'	69
1ahy_ex8_R	Rückwärts	5'-AGCGAGCTGGACGAAAAGAAT-3'	61
1ahy_ex9_R	Rückwärts	5'-TGATTGGGGCAGAACCT-3'	58
1ahy_ex9.2_R	Rückwärts	5'-GAAGGGCTAAACAGGCAAATGGAC-3'	65

T_M: Schmelztemperaturen der Primer

3.2.2.3 Sequenzierung

Die erhaltenenen PCR-Fragmente wurden sequenziert (Seqlab, Göttingen) und mit Hilfe der Lasergene- MegAlign®-Software verglichen. Für die Durchführung der Promotoranalyse wurde die TESS-Software verwendet (TESS: Transcription Element Search Software im WWW, Jonathan Schug und G. Christian Overton, Technical Report CBIL-TR-1997-1001-v0.0. Computational Biology and Informatics Laboratory, School of Medicine, University of Pennsylvania, 1997; URL: <http://www.cbil.upenn.edu/tess>).

3.3 Genotypisierung

3.3.1 Genotypisierung mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus

Für die Genotypisierung wurde ein Primerpaar verwendet, das in Exon 4 und in Exon 8 (1ahy_ex4_F und 1ahy_ex8_R) lokalisiert war. Sowohl die genomische DNA der Wildtyp-Tiere, aber auch die der Mutanten zeigten PCR-Produkte von ca. 1450 bp. Diese PCR-Produkte wurden unter Zuhilfenahme derselben Primer jeweils von beiden Enden her sequenziert.

Nach Anlagerung und Vergleichen der Sequenzen zeigte sich eine Punktmutation von G zu A in Position 780 in der Mutante der genomischen DNA .

In der Folge sollte diese Information in weiteren Tieren bestätigt werden und für die Genotypisierung genutzt werden, um homozygote, heterozygote und Wildtyp-Tiere unterscheiden zu können. Dazu eignet sich die Anwendung eines Restriktion-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP). Dabei handelt es sich um ein Verfahren bei dem Variationen in der homologen DNA zu einem unterschiedlichen Restriktionsfragmentmuster führen. Dafür werden Restriktionsendonukleasen verwendet, die innerhalb einer spezifischen Erkennungssequenz die DNA schneiden. Diese besteht meist aus einer palindromischen Sequenz von vier, sechs oder acht Basenpaaren.

Eine Analyse mit Lasergene MapDraw Software legte dar, dass eine einmalig in der Wildtyp-DNA vorkommende *Bpu10I* Restriktionsschnittstelle, mit der Erkennungssequenz 5'...CC↓TNAGC...3', durch diese Punktmutation verloren ging. Für einen Verdau mit diesem Enzym wurden die PCR-Produkte 3 Stunden in einem 20 µl-Ansatz (17 µl DNA [PCR-Produkt], 1 µl *Bpu10I* [Fermentas, St. Leon-Rot] und 2 µl des dazu gehörigen Puffer) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Fragmente in einem 1%igen Agarose-Gel, dem 0,5 µg Ethidium-Bromid pro ml Gel hinzugefügt wurden, bei 80 bis 90 Volt aufgetrennt und unter UV-Licht betrachtet.

3.3.2 Genotypisierung mit Amplifikation-Refraktär-Mutations-System

Mit dem Restriktionsenzym *Bpu10I* ist es uns gelungen, eine Genotypisierungsmethode zu etablieren, die zu reproduzierbaren Daten führte. Jedoch war sie relativ material- und zeit-aufwändig. Da wir eine schnelle und sichere Methode benötigten, um die PVDRI-Tiere bei der Zucht nach ihrem homozygoten, heterozygoten und Wildtyp- Genotypen zu selektieren und möglichst auch kostengünstig genotypisieren wollten, suchten wir nach einem weiteren Weg die Punktmutation, die man auch als Single Nucleotide Polymorphism (SNP) betrachten kann, mit einem anderen Verfahren nachzuweisen. Eine von mehreren molekulargenetischen Methoden einen SNP nachzuweisen, ist der Einsatz eines Verfahrens namens Amplifikations-Refraktär-Mutations-System (ARMS-PCR). Dies sollte in Form einer SNP-spezifischen Real-Time PCR durchgeführt werden.

3.3.2.1 Prinzip des Amplifikations-Refraktär-Mutations-System

Das Prinzip der ARMS-PCR basiert auf einer beabsichtigten Paarung bzw. Fehlpaarung des letzten Nukleotids des 3'-Endes eines PCR-Primers unter stringenten PCR-Bedingungen. Es werden 2 PCR-Primer so gestaltet, dass sie sich nur im letzten Nukleotid unterscheiden und die durch diese Base spezifisch für das Allel 1 oder für das Allel 2 eines bestimmten genomischen Bereichs sind. Um festzustellen, welches der beiden Allele in einer unbekanntem DNA vorhanden ist, werden zwei verschiedene PCR-Ansätze mit jeweils einem der beiden allelspezifischen Primer und einem neutralen Primer durchgeführt. Entscheidend für das Gelingen sind stringente Bedingungen für diese PCR.

Nur wenn das letzte Nukleotid am 3'-Ende des PCR-Primers komplementär zur Ziel-DNA ist, erfolgt die Bindung des allelspezifischen Primers an die DNA. Ist dies nicht der Fall, erfolgt, unter den stringenten Bedingungen, eine sehr seltene Bindung des Primers und somit eine verzögerte Amplifikation.

3.3.2.2 Prinzip der Real-time PCR

Das Prinzip eines Real-time basierten Assays beruht auf der Hydrolyse einer Fluoreszenz-markierten Sonde (TaqMan-Prinzip) oder der Verwendung von dsDNA-bindenden Farbstoffen (SYT9, SYBR Green, SYBR Gold etc.). SYBR Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der ähnlich wie Ethidiumbromid an DNA bindet. Besonders wenn diese als doppelsträngige DNA vorliegt, verstärkt sich die Fluoreszenz-Emission. So wird im Laufe der PCR, wenn mehr doppelsträngige DNA produziert wird, die Fluoreszenz immer stärker.

Bei dem TaqMan-Prinzip befindet sich neben den beiden Primern zusätzlich eine Fluoreszenz-markierte Sonde, die an eine Gensequenz zwischen den beiden Primern bindet, in der Reaktion. Die Sonde ist am 5' und am 3'-Ende mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Wenn die beiden Fluoreszenzfarbstoffe durch die Bindung an die Sonde nahe zusammen sind, findet nach Anregung durch einen Argon-Laser ein sogenannter Energietransfer statt, d.h. die Energie des Reporterfarbstoffes (R) wird auf den Quencherfarbstoff (Q) übertragen. Dieser emittiert die aufgenommene Energie in Form von Licht einer größeren Wellenlänge oder wie in unserem Fall in Form von Wärme. Aufgrund der Endonuklease-Aktivität der TaqDNA-Polymerase wird die Sonde im Verlauf der PCR abverdaut. Das Resultat ist, dass die beiden Fluoreszenzfarbstoffe sich nicht mehr in räumlicher Nähe befinden und somit kein Energietransfer stattfinden kann. Es können nun also beide Fluoreszenzfarbstoffe eine ausreichende Menge an Fluoreszenz emittieren.

Das Emissionsspektrum wird in jedem PCR-Zyklus gemessen. Während in den frühen PCR-Zyklen nur ein schwaches Hintergrundsignal gemessen wird, ist bei den späteren Zyklen, aufgrund einer positiven Reaktion, das Signal der Reporter-Fluoreszenz wesentlich stärker.

Während die Fluoreszenzintensität von Reporter und Quencher bzw. von SYBR Green bei einer negativen Probe konstant bleibt, steigt die Reporterfluoreszenz bzw. SYBR Green-Fluoreszenz bei einer positiven Probe deutlich an.

Um den Einfluss von Pipettierfehlern zu minimieren, wird der Quotient aus Reportersignal und dem Quencher gebildet. Von diesem normalisierten

Reportersignal (R_n) wird der R_n -Wert am Beginn der PCR subtrahiert. Man erhält den ΔR_n -Wert, der die Reporterfluoreszenzänderung unabhängig von der eingesetzten Sondenkonzentration widerspiegelt. Diese normalisierte Änderung der Reporterfluoreszenz ist proportional zur amplifizierten DNA-Menge und wird im `Amplification Plot` dargestellt.

Während in der frühen PCR-Zyklen die Emission unter der Detektionsgrenze liegt, ist die Zunahme der Reporterfluoreszenz (bzw. ihr Verlauf) in den späteren Zyklen messbar. Innerhalb dieser Verlaufskurve wird schließlich ein geeigneter Parameter gewählt, der die Quantifizierung der Ausgangsmenge erlaubt. Dazu wird der Schwellenwert festgelegt, der sich aus den Reportersignalen am Anfang der PCR errechnet und die Basisfluoreszenz widerspiegelt. Aus diesen Werten werden Mittelwert und Standardabweichung errechnet, und der Schwellenwert wird normalerweise bei der zehnfachen Standardabweichung vom Mittelwert gesetzt. Somit ist sichergestellt, dass bei einer negativen Probe die PCR-Kurve diesen Schwellenwert nicht schneidet, und damit als `falsch-positiv` gewertet wird. Danach wird ermittelt, wann die PCR-Verlaufskurve bei einer positiven Probe diesen Schwellenwert schneidet. Dieser Wert wird als C_T -Wert bezeichnet.

3.3.2.3 Erstellung des ARMS-qPCR-Assays

Mit der freundlichen Unterstützung von Dr. Ralf Steinborn vom Institut für Genetik der Veterinärmedizinischen Universität Wien konnte ein Assay erarbeitet werden, mit dem es uns möglich war, die Punktmutation unserer PVDRI-Tiere nachzuweisen. Dieser Assay wurde mit Hilfe des Primer-Express®-Programms (Version 1.5, Applied Biosystems, Wien, Österreich) entwickelt, bei dem spezifische Primer für die sogenannte SNP-PCR ausgewählt wurden. Dazu wurde zunächst die genomische Sequenz des porcinen 1α -Hydroxylase-Gens, das Ergebnis der von uns sequenzierten DNA, im Bereich von Exon 6, Intron 6, an dessen Anfang die Punktmutation lokalisiert ist, und Exon 7 in 5`-3`-Richtung in das Programm eingegeben. Die Vorwärts-Primer sollten so spezifisch sein, dass sie die Punktmutation erkennen konnten. Deshalb wurden sie so gewählt, dass die letzte Base am 3`-Ende des Primers der Base entsprach, die von der Mutation betroffen

war. Das 3'-Ende wurde für diese Lokalisation gewählt, da sich dort der Ort der höchsten Spezifität eines Primers befindet. So wurden zwei verschiedene Primer kreiert, einer für das Wildtyp-Gen, mit dem Nukleotid G am 3'-Ende und einer für die Punktmutation, mit dem Nukleotid A am 3'-Ende.

Um die Spezifität dieser Vorwärts-Primer weiter zu erhöhen, wurde zusätzlich eine Fehlbasenpaarung in diese Primer an der zweiten Base vom 3'-Ende integriert. Da sich in der genomischen Sequenz ein G an dieser Stelle befindet, wurde ebenfalls ein Nukleotid, das unter Ausbildung von 3 Wasserstoffbrücken paart, also ein C an dieser Stelle platziert. So kommt es in der PCR zu einer Anpaarung von zwei Cytosinen, die keine Bindung miteinander eingehen können. Der Primer bindet somit mit der ersten, der dritten und den nachfolgenden Basen, nicht aber an der zweiten Base des 3'-Endes an die DNA, was die spezifische Bindung des Primers weiter begünstigt.

Nach Design der Vorwärts-Primer im Primer Express Programm® berechnet das Programm ca. 200 verschiedene Vorschläge für eine Sonde und einen Rückwärts-Primer. Für die Auswahl der Primer mußten folgende Kriterien berücksichtigt werden:

- keine 'runs' von mehr als 3 Basen (insbesondere Gs)
- mehr A/Ts als G/Cs auf den letzten 5 Basen am 3'Ende
- Amplicon-Länge sollte nicht mehr als 350 bp betragen
- keine Primer-Dimer Bildung

Um ein Optimum an Spezifität zu erreichen, wurde die Annealing-Temperatur (T_m) um 5 bzw. 6°C auf 60°C erhöht. Die T_m lag für den Vorwärts- bei 54°C und für den Rückwärts-Primer bei 55°C. Um eine Extension von unspezifisch angelagerten Primern zu verhindern, wurde eine HotStart-Polymerase, verwendet, die bei Umgebungstemperatur inaktiv ist und erst nach einer mehrminütigen Inkubation bei 95°C aktiviert wird. Bei den eingesetzten HotStart-Polymerasen handelte es sich zum einen um die HotFirePol (SolisBiodyne, Tartu, Estland), bei der die Erstellung des HotStart durch chemische Modifikation erfolgt und zum anderen die SmartTaq (Medigen, Nowosibirsk, Russland), bei der eine Antikörper-vermittelte HotStart-Modifikation durchgeführt wurde.

Die eingesetzten Vorwärts-Primer hatten folgende Sequenzen in 5`-3`-Richtung:

- CYP27B1-G: TGGTCAAGGAAGTGCTAACG für den Wildtyp
- CYP27B1-A: TGGTCAAGGAAGTGCTAACA für die Mutante
- genomische Wt-Sequenz zum Vergleich:
TGGTCAAGGAAGTGCTAAGG
- Rückwärts-Primer:
- CYP27B1-R: CCAACTTCTCATGTCCCTCA
- Die Größe des Amplikons: 171 Bp

Die passende Sonde wurde nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- Das 5`-Ende der Sonde sollte möglichst nahe am 3`-Ende des Primers liegen
- die Länge sollte zwischen 20 bis 30 Bp liegen
- der GC-Gehalt sollte zwischen 40 und 60% liegen
- die T_m sollte 8-10°C höher sein als die der Primer
- kein G am Ende der Sonde um den dadurch auftretenden Quenching-Effekt zu vermeiden
- keine `runs` von mehr als 3 Basen
- keine Komplementarität zwischen Primern und Sonde

Unter Berücksichtigung der oben genannten Regeln wurde eine 24 Bp lange TaqMan-Sonde mit einer T_m von 68°C und einem GC-Gehalt 51% auf dem reversen DNA-Strang gewählt. Die Sonde trug als Reporter-Fluorophor FAM und als Quencher den Black Hole Quencher® (BHQ1) und hatte folgende Sequenz:

- CYP27B1-FAM-Sonde:
FAM-TTCTTGGCCCGGCGTAGAGTACCA-BHQ1

Die Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Primer (Invitrogen, Lofer, Österreich)
- $MgCl_2$ (Solis Biodyne, Tartu, Estland)
- 10 x Buffer B (Solis Biodyne, Tartu, Estland)
- dNTP-Mix (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- HotFirePol-Polymerase (Solis Biodyne Tartu, Estland)
- Smart Taq-Polymerase (Medigen, Nowosibirsk, Russland)
- Sonde (Metabion, Martinsried, Deutschland)

Durchführung des SNP-Assays

Um Pipettierfehler zu minimieren wurde für den jeweiligen Primer ein Mastermix (n+2) angefertigt, zu dem der Aliquot der jeweiligen DNA-Probe zugegeben wurde. Der Reaktionsansatz für die SNP-PCR war wie Tabelle 3.3.2.3. folgt aufgebaut:

Tabelle 3.3.2.3. SNP-Assay 2613

Anzahl der Proben	μL pro Mastermix	μL pro Reaktion	Stock-Lösung	Endkonzentration
10	98,00	9,80	Wasser	
	28,00	2,80	0.1 M $MgCl_2$	3.5 mM
	20,00	2,00	10 x buffer B (Solis Biodyne)	1x
	20,00	2,00	dNTP mix (2 mM je)	200 μM
	5,00	0,50	CYP27B1-A/G-f(10 μm)	250 nM
	5,00	0,50	CYP27B1-r(10 μm)	250 nM
	2,00	0,20	CYP27B1-Fam-Sonde	100 nM
	2,00	0,20	HotFirePol (5 μM , Solis Biodyne) oder SmartTaq (5 μM , Medigen)	1U/20 μL Ansatz
		<u>2,00</u>	Ziel-DANN	
	180,00	20,00		
x 2 für je Primer A und G				
1 Proben	hom		Leonardo131	
2	wt		Rodrigo 682	
3	het		OM-Nr. 685	
4	708		OM-Nr.	
5	709		OM-Nr.	
6	710		OM-Nr.	
7	711		OM-Nr.	
8	ntc		No Template Control	

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

- 12 Minuten Aktivierung der HotStart-Polymerase
oder 5 Minuten Aktivierung der SmartTaq-Polymerase
- 30 Sekunden Denaturierung bei 95°C
- 1 Minute Annealing bei 60°C
- Anzahl der Zyklen: 40 bis 45

Es wurde ein Two-Step Programm durchgeführt, bei dem auf den bei einer üblichen PCR notwendigen Elongationsschritt bei 72°C aufgrund des kurzen Amplikons von 171 Bp verzichtet werden kann. Die Aufheizphase des jeweils nachfolgenden Zyklus ist ausreichend für eine vollständige Elongation.

Die DNA eines jeden Tieres wurde sowohl für das A-Allel als auch für das G-Allel getestet. Für Wildtyp-Tiere Genotypen, wurde nur ein Amplicon für das G-Allel erwartet, bei dem homozygoten PVDR I-Tieren entsprechend nur für das A-Allel. War das Tier heterozygot für die Mutation, so sollten beide PCR-Ansätze positiv sein und nahezu idente C_T -Werte zeigen.

Die Ansätze wurden in klare 0,5 ml-PCR-Reaktionsgefäße (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich) pipettiert und die PCR wurde auf dem Gerät Mx 3000p (Stratagene) mit der Software Mx pro durchgeführt.

3.4 Analysen auf RNA-Ebene

3.4.1 Bestimmung der Gen-Expression in verschiedenen Geweben

3.4.1.1 RNA-Isolierung und RT-PCR

Zur Gewinnung von RNA wurden drei adulte Wildtyp- und drei adulte homozygote PVDR I-Schweine euthanasiert und die Nieren der Tiere unverzüglich entnommen. Zusätzlich wurden von Lymphknoten, Nebennieren, Knochen, Colon und der Cervix uteri von allen Tieren Proben entnommen. Hautproben wurden während des Setzens der Ohrmarken gewonnen. Alle Gewebe wurden nach Entnahme sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die RNA wurde mit Hilfe des Qiagen RNeasy Midi oder Mini Kit extrahiert und mit DNase I (Qiagen, Hilden) auf der Qiagen-Säule behandelt, um genomische DNA vollständig zu entfernen. 2 µg der Gesamt-RNA wurden mit dem TaqMan Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Deutschland) in einem Volumen von 20 µl revers transkribiert. Davon wurden 2 µl für die erste Runde der PCR mit der HotStarTaq Master Mix (Qiagen, Hilden) verwendet. Als Primer dienten 1ahy_ex4_F und 1ahy_ex9_R. Nach 15-minütiger Denaturierung bei 94°C folgten 35 Zyklen mit 94°C für 1 Minute, 58°C für 1 Minute und Elongation bei 72°C für 5 Min. Für die nicht-renalen Gewebe wurde ein Teil dieser PCR-Produkte für eine zweite Runde der PCR, auch als „nested PCR“ bezeichnet, bei denselben Zyklus-Parametern mit einer Annealing-Temperatur von 61°C verwendet. Hier dienten als Primer 1ahy_ex5_F und 1ahy_ex8_R. Die PCR-Produkte wurden in einem Ethidiumbromid-haltigen 2%igen Agarosegel bei 80 bis 90 Volt aufgetrennt und unter UV-Licht analysiert (0,5 µg Ethidium-Bromid/ ml Gel).

3.4.1.2 Prinzip der quantitativen PCR

Für unsere Fragestellung ist eine Quantifizierung der spezifischen Nukleinsäuren notwendig. Die Quantifizierung der Ausgangsmenge mittels der semiquantitativen PCR ist aber nur möglich, solange sich die PCR-Reaktion in der exponentiellen Phase befindet. Mit Hilfe der Real-time PCR kann diese exponentielle Phase für jede

PCR-Reaktion individuell ermittelt werden, was eine relative Quantifizierung ermöglicht. Das Prinzip der quantitativen PCR bzw. der Real-time PCR wurde in Kapitel 3.3.2.2 bereits erläutert.

3.4.1.3 Quantitative Bestimmung der Genexpression

Für die vorliegende Studie haben wir uns für die Bestimmung der relativen Genexpression entschieden, um eine Aussage über Änderung der Expression einer bestimmten Zellpopulation, in unserem Fall Niere und Haut treffen zu können. Dazu wird ein Real-time PCR Assay, der ein endogenes Kontrollgen detektiert, verwendet. Zur Bestimmung der jeweils eingesetzten cDNA-Menge wird als Kontrollgen ein interner Standard verwendet, der keine Regulation aufweist. Dadurch kann die Menge der eingesetzten Gesamt-cDNA bestimmt werden. In einem zweiten Real-time PCR Assay wird dann die cDNA-Menge des zu untersuchenden Gens bestimmt. Zur Auswertung wird die delta-delta- C_T -Methode herangezogen. Bei dieser Methode wird davon ausgegangen, dass der Abstand zwischen den beiden C_T -Werten (delta- C_T) aus der cDNA-Mengen-Bestimmung und der Genexpressionsbestimmung unabhängig von der im Assay eingesetzten cDNA-Menge ist. Dieser delta- C_T -Wert sollte im Idealfall nur von der relativen Genexpression abhängig sein. Je größer der Unterschied der C_T -Werte (= delta- C_T), desto geringer ist die relative Genexpression des zu untersuchenden Gens. Nun wird der delta- C_T -Wert der Ausgangsprobe gleich eins gesetzt und alle anderen Genexpressionswerte darauf bezogen. Dazu wird der delta C_T -Wert der Ausgangsprobe von jedem anderen Wert abgezogen (delta-delta- C_T -Wert). Unter der Voraussetzung, dass die Reaktionseffizienzen beider Real-time PCR-Assays annähernd gleich sind ($< \pm 10\%$), können mit diesem delta-delta- C_T -Wert die relative Genexpression (bezogen auf den Ausgangswert) mit folgender Formel berechnen werden:

$$\text{Relative Genexpression} = 2^{-\text{delta-delta } C_T}$$

Eine andere Möglichkeit zur Darstellung der relativen Genexpression ist die Form der Ratio. Dazu wird die Ratio (r) mit folgender Formel berechnet:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{Ct target (control-treated)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{Ct ref (control-treated)}}}$$

Um die Effizienz einer solchen PCR bestimmen zu können wird eine Standardkurve aus einzeln definierten Verdünnungen erstellt. Die C_T -Werte der Verdünnungen werden gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen und man erhält eine Standardkurve mit hohem Korrelationskoeffizient.

3.4.1.4 Durchführung der Real-Time PCR

Für die quantitative PCR wurden 2 µg der Gesamt RNA von Niere und Haut mit dem TaqMan Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) in einem Volumen von 20 µl revers transkribiert. Der Ansatz für die PCR bestand aus 1,5 µl cDNA pro Reaktion, einer einfacher Konzentration SYBR Green-Master-Mix (Abgene, Hamburg) mit SYBR Green als Fluoreszenzfarbstoff sowie den Primern für die interne Kontrolle bzw. die 1α-Hydroxylase in einem Gesamtvolumen von 20 µl pro Reaktion. Als interne Kontrolle diente die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, wofür die Primer GAPDH_F und GAPDH_R verwendet wurden. Die 1α-Hydroxylase wurde mit Hilfe der Primer 1ahy_ex4_F und 1ahy_5 im Bereich von Exon 4 bis Exon 5 der cDNA amplifiziert. Es wurde eine 2-step-PCR auf einem ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System-Gerät (Applied Biosystems) durchgeführt. Das PCR-Programm war aufgebaut aus einer initialen Denaturierung von 15 Min bei 95°C, um die HotStart-Polymerase zu aktivieren, und nachfolgenden 40 Zyklen bestehend aus 95°C für 15 Sekunden und 60°C für 1 Minute. Für beide Gene wurde eine Standardkurve erstellt, um die Effizienz der quantitativen PCR zu bestimmen und jeder Ansatz wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Spezifität des Amplikons wurde mit der Durchführung einer No Template Control und DNase I

behandelter RNA ohne reverse Transkription festgestellt. Nach der PCR wurden Schmelzkurven erstellt um sicherzustellen, dass nur ein spezifisches PCR Produkt und keine Primer-Dimere ein Fluoreszenzsignal durch SYBR Green verursachen. Die Ergebnisse sind in Prozent der Kontrollwerte als Mittelwert mit \pm SEM angegeben. Die Ratios und die Statistik wurden mit Hilfe der Relative Expression Software Tool (Rest[®], Pfaffl et al., 2002) erstellt. Die Primersequenzen und Schmelztemperaturen T_m sind in Tabelle 3.4.1.4 angegeben.

Tabelle 3.4.1.4. Primer für die quantitative PCR

Primer Name	Typ	Sequenz	T_m (°C)	E%
GAPDH_F	vorwärts	5'-CCTTCATTGACCTCAACTACATGGT-3'	63	94
GAPDH_R	rückwärts	5'-CTCCATGGTCGTGAAGACACC-3'	65	
Beta2MG_F	vorwärts	5'-TCTACCTTCTGGTCCACACTGAG-3'	65	98
Beta2MG_R	rückwärts	5'-TCATCCAACCCAGATGCA-3'	58	
CyclophA_F	vorwärts	5'-GCGTCTCCTTCGAGCTGTT-3'	70	n.a.
CyclophA_R	rückwärts	5'-CCATTATGGCGTGTGAAGTC-3'	68	
1ahy_F	vorwärts	5'-CGCGGTGGGATCGGTGTTT-3'	65	96
1ahy_R	rückwärts	5'-CGCCCCAGATCCCAAGTCCT-3'	66	

T_m : Primer Schmelztemperatur; E: Amplifikationseffizienz der Primerpaare in der qPCR; n.a. nicht anwendbar.

3.4.2 Bestimmung der Gen-Expression in Blut-Makrophagen

3.4.2.1 Isolation und Kultivierung von Blutmakrophagen

Für die Kultivierung von Makrophagen wurden PVDR I- und Kontroll-Wildtyp-Tieren jeweils 80 ml Blut abgenommen. Die Tiere wurden mit der Oberkieferschlinge fixiert und das Blut wurde über Punktion der Vena jugularis externa mit einer Kanüle (TSK Supra 1.20 x 100 mm, Ehrhardt GmbH, Geislingen) entnommen. Das Blut wurde in 20 ml-Spritzen (BD Discardit, Becton Dickinson GmbH, Deutschland) aufgefangen, in die zuvor steril 2ml einer vorgefertigten Antikoagulans-Lösung vorgelegt wurden. Diese Lösung bestand aus:

- Phosphat gepufferte Salz-Lösung (PBS, bestehend aus 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,24 g KH₂PO₄ ad 1000 ml aqua destillata)

- 400 Units Na-Heparin/ ml zur Gerinnungshemmung (Ebewe Pharma, Österreich)
- 1 µg Gentamycin / ml als Antibiose (G 1397, Sigma-Aldrich, Wien, Österreich)
- 2,5 µg Amphotericin B-Lösung als Antimykotikum (A 2942, Sigma-Aldrich, Wien, Österreich).

Das gewonnene Blut wurde unter sterilen Bedingungen in einer Air Flow Lamina (Holten LaminAir, HB2472) 1:1 mit zimmerwarmen PBS verdünnt. Um die Lymphozyten/Monozyten-Fraktion aus dem Blut zu isolieren, wurden 15 ml Biocoll Separating Solution, Density 1.077 g/ml (Biochrom AG, Berlin) in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen (TPP, Wien, Österreich) vorgelegt. Ohne Durchmischung mit der Biocoll-Phase wurde das Gefäß vorsichtig mit dem Blut-PBS-Gemisch auf 50 ml aufgefüllt. Danach wurde 30 Minuten mit geringer Beschleunigung und ohne Bremse bei 900 x g bei Zimmertemperatur zentrifugiert. Mit einer 5 ml-Pipette wurde die entstandene Lymphozyten-Monozyten-reiche Interphase abgenommen und in ein auf Eis gekühltes 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Das Gefäß wurde mit 4°C kaltem PBS aufgefüllt und 8 Minuten bei 350 x g bei 4°C mit maximaler Beschleunigung und Bremse zentrifugiert. Danach wurden der Überstand abgenommen, die Zellen resuspendiert und der Vorgang noch weitere zweimal wiederholt, um die Zellen zu waschen und von eventuellen Biocoll-Rückständen zu befreien. Die Zellen wurden in einer geeigneten Menge Medium (DMEM) resuspendiert und die Zellzahl mittels der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wurde eine Konzentration von 1×10^7 Zellen pro ml Medium eingestellt und die Zellen in DMEM (DMEM high glucose 4,5g/l with L-Glutamine) (PAA, Linz, Österreich), mit 10 % porcinem Serum, 1-fachem Penicillin/Streptomycin (PAA, Linz, Österreich) aufgenommen. Je 2×10^7 Zellen wurden in 2 ml auf 8,8 cm² große Zellkulturschalen (Nunc über VWR, Wien, Österreich) ausgesäht. Da Monozyten die Eigenschaft haben, sich an eine Oberfläche anzuhafte und Lymphozyten diese Fähigkeit zur Adhärenz nicht haben, kann man diesen Effekt nutzen um Monozyten und Lymphozyten voneinander zu trennen. Man erhält eine bis zu 90% reine Monozytenkultur. Daher wurden die Zellen zum Adhärenzieren für 48 Stunden im Brutschrank (Cytoperm, Heraeus) bei 93% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die nicht adhärenzieren Zellen entfernt, indem die Kulturschale ca. fünfmal mit 37°C warmem Medium (DMEM) gewaschen wurde. Der Großteil der nicht adhärenzieren

Lymphozyten wurde auf diese Weise entfernt und es verblieb eine relativ reine Blut-Monozyten-Kultur. Die Monozyten differenzieren sich im Verlauf der Kultur in Makrophagen (MCCULLOUGH et al., 1997).

3.4.2.2 Phagozytose der kultivierten Zellen

Zum Nachweis, dass es sich um Monozyten und Makrophagen handelt, die in Kultur gebracht wurden, wurde ihre Phagozytose-Aktivität nachgewiesen. Dazu wurden adhärente Zellen in einer Zellkulturschale (Nunc, über VWR, Wien, Österreich) in Nährmedium (DMEM, 30% porcines Serum, 1% Penicillin/Streptomycin) kultiviert. Diese Zellen wurden 90 Minuten mit ca. 200 µl 1 µm-großer FITC-markierter Latex-Beads (Latex Beads Carboxylate-modified fluorescent yellow-green, L4655, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet und fotografiert.

3.4.2.3 Stimulierung von Makrophagen

Um die Regulation der Expression der 1 α -Hydroxylase von Makrophagen in Kultur zu untersuchen, sollen die Makrophagen stimuliert werden. In humanen und murinen Makrophagen wird im stimulierten Zustand die Expression der 1 α -Hydroxylase hochreguliert (DUSSO et al., 1991; ESTEBAN et al., 2004; REICHEL et al., 1987b; SMITH et al., 1999). Beim Schwein wurden dazu bisher wenige Studien durchgeführt. Es bestehen jedoch viele Parallelen in der Entwicklung von humanen und porcinen Monozyten und Makrophagen *in vitro* (HAVERSON et al., 1994; MCCULLOUGH et al., 1997). Über die Inkubierung mit IFN γ ist bekannt, dass es sowohl die mRNA-Expression als auch die funktionelle Enzymaktivität der 1 α -Hydroxylase in humanen und murinen Makrophagen stimuliert (MONKAWA et al., 2000; SMITH et al., 1999). Bei humanen Makrophagen in Kultur ist es möglich, die stärkste Stimulierung der 1 α -Hydroxylase zu erreichen, indem die Makrophagen über

einen Zeitraum von 24 Stunden mit Interferon γ behandelt werden (KOEFFLER et al., 1985; REICHEL et al., 1987b).

3.4.2.4 Stimulierung von porcinen Makrophagen mit Interferon γ

Augrund dieses Hintergrundes sollte überprüft werden, ob Makrophagen von Schweinen überhaupt auf eine Stimulierung mit Interferon γ mit einer vermehrten Expression der 1 α -Hydroxylase reagieren. Die Höhe der Expression sollte zu verschiedenen Zeitpunkten festgestellt werden. Dazu wurden Makrophagen eines nicht an PVDR I erkrankten Tieres in Kultur gebracht. Nach 48 Stunden Adhärenz wurden die Zellen gewaschen, und mit frischem Nährmedium überschichtet. Zur einen Hälfte der kultivierten Zellen wurde zum Medium porcines rekombinantes Interferon γ (Serotec, Düsseldorf) in einer Konzentration von 5×10^{-9} M (SMITH et al., 1999) für 24 Stunden zugegeben. Als Kontrolle diente die andere Hälfte der unbehandelten Zellen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden alle Zellen in unbehandeltem Nährmedium weiterkultiviert. Die Expression sollte an Tag 1, Tag 4 und Tag 7 nach Interferon γ -Behandlung analysiert werden.

3.4.2.5 Extraktion der RNA aus kultivierten Makrophagen

Zu den oben genannten Zeitpunkten wurde die RNA aus jeweiligen Makrophagen extrahiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Um die RNA aus den Zellen zu gewinnen, wurden mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit die Zell-Lysis und die RNA-Extraktion (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Im Anschluss daran wurde ein Verdau mit DNase I durchgeführt, um eine etwaige DNA-Kontamination zu entfernen. Die quantitative PCR wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Als interne Kontrolle diente jedoch Cyclophilin A, da GAPDH in diesem Fall als interne Kontrolle ungeeignet war. Die Primersequenzen und deren Schmelztemperaturen sind in Tabelle 3.4.1.4 angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der genomischen Sequenz

Die vollständige genomische Sequenz des porcinen 1 α -Hydroxylase-Gens mitsamt dem Promotor konnte durch Sequenzieren analysiert werden. Die Promotorregion wurde mit einem 5'-Primer amplifiziert, der spezifisch im letzten Exon des Mettl1-Gens bindet. Die Sequenzanalyse zeigt, dass Mettl1 ca. 1 kB stromaufwärts des 1 α -Hydroxylase-Gens lokalisiert ist, vergleichbar mit der Anordnung im humanen und murinen Genom. Der im Anschluss daran durchgeführte Vergleich mit der humanen Promotorsequenz zeigte, dass es vier Segmente mit hoher Homologie von 77 bis 88% gibt. Diese befanden sich im Bereich von -962 bis -870, von -697 bis -469, von -385 bis -350 und von -193 bis +100 Bp. Die In-Silicoanalyse des Promotors ergab, dass sich eine TATA-Box 64 Bp stromaufwärts des Startcodons befindet. Eine CCAAT-Box mit derselben Lokalisation, wie in der humanen Sequenz konnte gefunden werden. Des Weiteren enthält der Promotor wahrscheinliche Konsensus-Sequenzen für die Transkriptionsfaktoren AP-1 und Sp-1, sowie zwei NF κ B (-338 bis -346, + strand; -13 bis -3, - strand) und zwei CEBP/ β Bindungsstellen (-688 bis -679, + strand; -109 bis -103, - strand) (Abb.4.1.1). Es konnten keine „vitamin D response elements“ (VDREs) oder „cAMP response elements“ (CREs) gefunden werden. Der Vergleich mit dem murinen Promotor ergab keine signifikanten Übereinstimmungen. Die Sequenzierung von Exon 1 bis 9 ergab relativ kleine Introns mit einer Größe von 82 bis 297 Bp vergleichbar mit der Anordnung der Introns und Exons der menschlichen und murinen 1 α -Hydroxylase. Die DNA-Sequenz wurde in der Gen Bank veröffentlicht (Accession No. DQ295065) und in Abbildung 4.1.2 dargestellt.

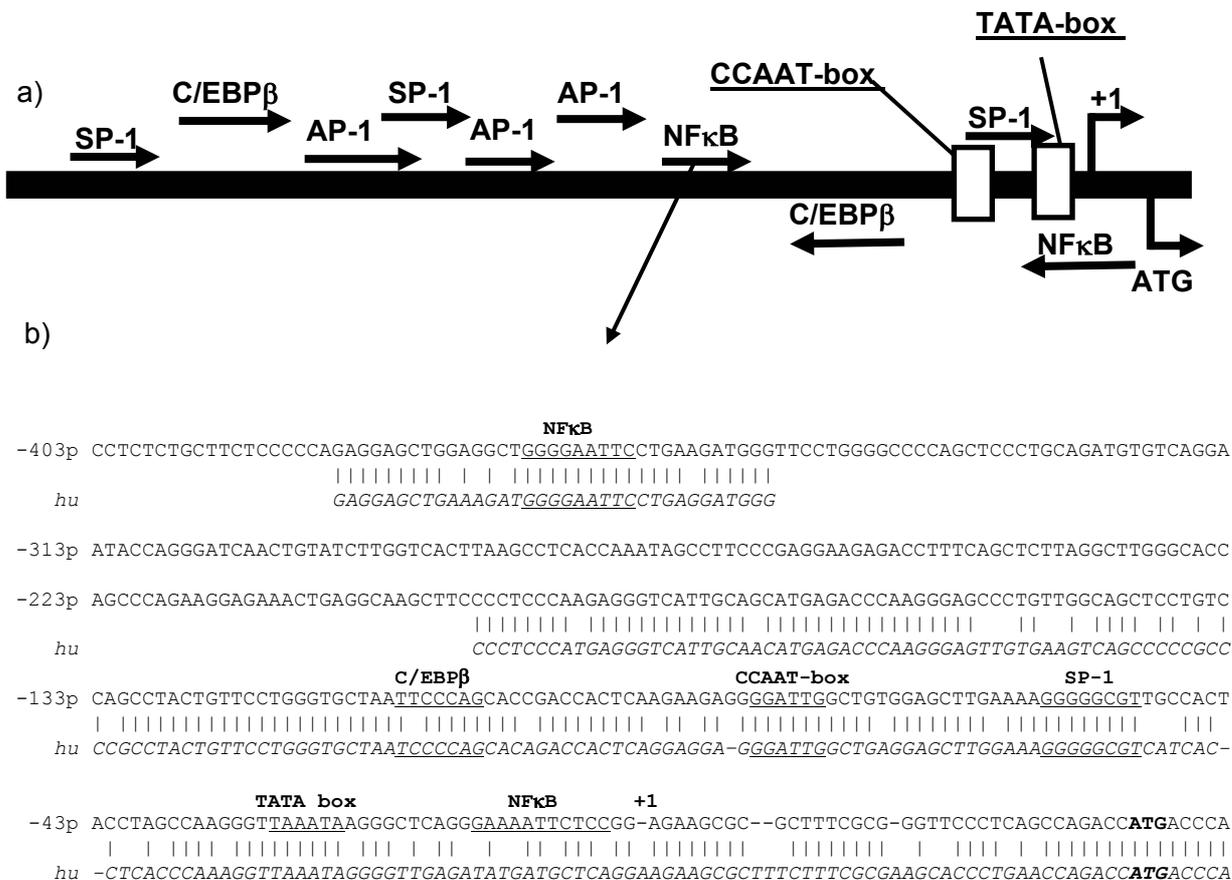


Abb.4.1.1. a) schematische Darstellung des porcinen Promotors
 b) Vergleich der porcinen und der humanen (hu) Sequenz des 1α-Hydroxylase-Promotors

ID porcine 1a-OHse standard; DNA; UNC; 5062 BP.
 SQ Sequence 5062 BP;

ccggtgctct	ctttattggt	gctgtctctg	gagagaccct	gggagggtg	tgatggtgga	60
gaccctctcc	ttttccttgt	taacattcac	tttgattgca	gaacctgaga	gctgactggc	120
tgacacagag	cctgcttggg	ggtaggggta	gggtaagggt	gtgaggagca	gaaagctgaa	180
cctgggagga	ttctgaagct	aaaagtggaa	aggggtgctg	gactagaaag	ccccggcaaa	240
gggatgag	cggctggaga	ttcagagcac	tgcctagcc	cttcctcat	acgggagccc	300
agacaaatct	ctgaacttgt	ctaatttgca	aaaaagtct	ttcattgctg	ttactcaagc	360
cccaaattcc	catgactgga	ggacagggt	tgtaaacc	aaaaaccaac	ctgcctctcc	420
gcaaggaata	aagacgaagg	ctcctggagc	cattttaact	cattaacca	tctgccttct	480
gtccagtgtc	agctacaggg	gaagggggag	atgtggtagt	gcaggaaaac	tctgctcaca	540
tgagacaat	gtgcagccca	gggagtcaag	aatctgagga	cgcctacagc	tctgcctctc	600
tgcttctccc	ccagaggagc	tgaggctgg	ggaattcctg	aagatgggtt	cctggggccc	660
cagctccctg	cagatgtgtc	aggaatacca	gggatcaact	gtatcttgg	cacttaagcc	720
tcacaaata	gccttcccga	ggaagagacc	tttcagctct	taggcttggg	caccagccca	780
gaaggagaaa	ctgaggaag	cttcccctcc	caagagggtc	attgcagcat	gagacccaag	840
ggagccctgt	tggcagctcc	tgtccagcct	actgttccctg	ggtgctaatt	cccagaccg	900
accactcaag	aagaggggat	tggctgtgga	gcttgaag	ggggcgttgc	cactacctag	960
ccaaggtta	aataagggt	cagggaaaat	tctccgg	AGA AGCGCGCTTT	CGCGGGTTCC	1020

CTCAGCCAGA	CCATGACCCA	AACCCCTCAAG	CTCGCTTCCA	GAGTGTTCCA	TCGCGTCTGC	1080
CGTGCTCCTG	AGCTGGGTTC	CAGAGGCTCC	GACTCAGCGC	CTCGGGGATT	GGCCGACCTC	1140
CCAGGCCCTT	CCACGCCTGG	TTCCCTTGCC	GAACTTTTCT	GCAAGGGGGG	TCTGTACCGG	1200
CTGCACGAGC	TACAGgtaga	aggggacccc	gttcctggga	ctgaatgctg	gggaacctgg	1260
ctgtcacaaa	attctacttg	caggacgtgg	gagagagggc	cagtgagaat	ggatgcccac	1320
gaattatgga	aaagacaagt	tgggactggg	ggcgggtggc	cactgggagc	ggagtccatc	1380
cccacacca	gcagagcagt	gcgttcaaaa	aacgccttct	ccctatgcag	aagcctggag	1440
gccgggtagg	ttcaggacaa	gtgtgcggga	ggcggagtac	tttccccgcg	caggagccta	1500
gtcgccccct	atacatttga	gggggggggt	cctcctgaga	tggaaagtct	atgtgaggaa	1560
catttagaga	tttctccgcc	tcagctcggc	ccaggtgacc	aaagagagat	cccgaacgtc	1620
agctttgagc	aaagctcctc	cgttttgccc	atcacactca	aactttctag	gggataggaa	1680
gtggggaaaa	agagaaggag	gggtttacag	catcaaagcc	atacgtgggt	tgggagcaga	1740
agcttcccc	tttcaaagct	cagtagccaa	gtcccttggc	attggcacgg	tcctagctgg	1800
gagtccccag	cccagagtctc	cagtgtccgc	tgetctgggt	ctcccagGTG	CAGGGTGCCG	1860
CGCGCTTTGG	CCAGTGTGG	TTGGCCAGTT	TCGGGAAGGT	GCGCACGGTG	TACGTGGCGG	1920
CCCCTACGCT	CGTCGAGCAG	CTGCTACGAC	AGGAGGGACC	CTTGCCCGAG	CGCTGCAGCT	1980
TCTCACCTTG	GACGGAGCAC	CGTCGCCGAC	GCCAGCGGTC	TTGCCGACTG	CTCACCGCgt	2040
gagtgcctttg	gccccaaaagc	cccgactgcc	ttcctttctt	gtgggggggtc	tggagacagt	2100
ctgggggtgt	ggagggaggt	cggtcgtttc	ttctggcaaa	tcgggggttcc	caccccagtc	2160
tgatttcgtc	caatctcggg	tagagtcggg	cttccgcccg	cccggccgct	tccccctgcg	2220
ttcacctctt	atcttttgag	gctagaaact	tgagaaactg	cagaaggggc	taaggtacca	2280
ggatctagtc	gtaagattct	gtgactcagc	ttacctagga	accaggccc	ctccggggca	2340
ggaaatgagt	aacgaggagg	ggggttgaa	agtgggcaca	agcaggggca	gatttctgta	2400
acaccaagg	agcagacgca	gtccctctcc	gggccacccc	agccaaacac	gtccttctc	2460
cacagcaaac	tgcccggtcg	ggccacctct	gcataccact	gtctgcacctg	gtccacctct	2520
tctcctcgcc	cttgcaagGGA	AGGTGAAGAA	TGGCAGAGGC	TCCGCAGTCT	CCTGGCCCCG	2580
TTGCTCCTCC	GGCCTCAAGC	GGCAGCCC GC	TATGCCGGGA	CCCTGCATGA	CGTGGTCCAG	2640
GACCTTGTGC	GGCGACTGCG	GAGCCAGCGG	GGACTGGGCG	CTGGGCCCTCC	CGCCCTGGTT	2700
CGGGACGTGG	CAGGAGAGTT	TTATAAGTTT	GGACTAGAAG	gtgagtcccc	aggcagggac	2760
cagcaaaagga	ggcaccgggc	cagggctctc	tgggtgcectg	acagegcccc	ctccgggcca	2820
gGCATTGCGG	CGGTGCTGTT	GGGTTCCTGC	CTGGGCTGCC	TGGAACCCGA	AGTGCCGCCA	2880
GACACAGAGA	CCTTCATCCG	CGCGGTGGGA	TCGGTGTTTG	TGTCCACGCT	CCTGACCATG	2940
GCGATGCCCA	GCTGGCTGCA	CCGCCTCGTG	CCGGGACCCT	GGGCCCGCCT	CTGCCGCGAC	3000
TGGGACCAGA	TGTTTGCATT	TGgtaaggga	cagaaatgaa	gtacgcgtgg	gggaacataa	3060
agctgttcag	gagtagtgag	gcatccctgt	aacttgtccc	catagCCCAG	GAGCACGTGG	3120
AGCGGCGAGA	GGCCGAGGCT	GCCATGAAGA	GCCAGGGAAA	GCCTGAGGAG	GA CT TGGGAT	3180
CTGGGGCGCA	CCTGACCTAC	TTCTCTTCC	GGGAAGAGCT	GCCAGCCCCG	TCCATCTTGG	3240
GGAATGTGAC	AGAGTTGCTA	CTGGCTGGAG	TGGACACGgt	gaggttcccc	ttccatgtca	3300
ggagccccac	ttccgcagct	taatctcccc	actctcaggg	ggcattttcc	tgctgcagaa	3360
gatccactat	ggtccctagg	tcagcttggt	ttagcactcc	ctggattcca	gcctacttca	3420
tattctgcct	cctatgctgg	gtccccactc	tcacacctcc	gatgettcca	gGTGTCCAAC	3480
ACACTCTCCT	GGCTCTCTA	TGA ACTCTCT	CGGCACCCTG	AAGTCCAGAT	GGCACTCCAT	3540
TCTGAGATCA	AAACTGCTTT	GGGCCCCAGC	TCCAGTGCCC	ACCCATCAGC	CACTGTTCTA	3600
TCCACGCTGC	CCCTGCTTAA	GGCAGTGGTC	AAGGAAGTGC	TAAGgtgagg	gggcaggaga	3660
ggaggagcta	gagaaaaatgc	tagggaaggg	gtggaaaagc	agataatgga	agggagtagg	3720
gagaaagagc	agaggaaaaat	ggtactctac	gccgggccaa	gaataggttt	ggaaggtagg	3780
ggacatgaga	agttggctac	agccccagc	ctcaccttgt	tgtctccttt	tcatgctctg	3840
ctgtccagAC	TGTACCCTGT	GGTACCCTGA	AACTCCCCTG	TGCCAGACAA	AGACATTTGT	3900
GTGGGTGACT	ACATTATCCC	CAAAAAAtgtg	agtagagcct	atgggcccc	tttgctaagc	3960
catccctcac	catcttggga	ctggttctct	tctcaaatac	tccccataag	cccttcaaac	4020
cctctccttg	gcctgaatgt	ctctctaggt	tgtaatgggg	cagtggagaa	atctttccaa	4080
aagtagcccc	agaaaatttc	cccaccacaa	ccaaccagtg	tctgcctttg	tcccagtgca	4140
tagatcccat	tccccacttc	cctcctggca	ttcctgggac	caaactgaca	agtttgtggt	4200
tttccctcac	cagACACTGG	TCACTCTGTG	TCACTATGCC	ACTTCAAGGG	ACCCTGCCCA	4260
GTTCCAGAG	CCAAATCTTT	TTCGTCCAGC	TCGCTGGCTG	GGGGAATGTC	CAGCCCCCA	4320
CCCATTGCA	TCTCTCCCCT	TTGGCTTTGG	CAAGCGCAGC	TGCATGGGGA	GACGCCTGGC	4380
AGAGCTTGAG	CTGCAAATGG	CTTTGGCCCCA	Ggtgagtgat	caagatcttc	taccttcccc	4440
ataccttaga	gatctaaagc	catgagctct	tttctgaca	ggcatagaaa	aatatataag	4500
atthgggagt	ctttatcctc	aaatataatca	atcccacat	aggcctgggtg	gatgagtgag	4560
agtatttgga	ctttgtacct	actgtcaata	accaagatgt	cccctaccag	tcgcaggtgc	4620
cattccaaca	ttgactatcc	taacagtagt	aatgtccact	accaatcaag	cccaccattg	4680

```

tagatccctc ccatagtaat agcttttttc ctccccttcc agATCTTGAT CCACTTTGAG 4740
GTGCAGCCTG AGCCAGGTTC TGCCCCAATC AGACCCATGA CCCGGACTGT TCTGGTACCT 4800
GAGAGAAGCA TCAATCTACA GTTTGTGGAC AGATAGTCCT GTGGAAGGAG GCTGTCATCA 4860
TCACCATTC TCTCATCATA GGGGTTTATT AGGCATAAGA CCAAGGGATG TATATTCCCT 4920
GAGGCTCAGC TCTCTGTCCA AACGGGTTGG AATGACCATA GCAAAGTACT TGAGGCAGCC 4980
CTGACCAAGG AGTGAAGTAT GCACTTGGCC TGACCCAGCA GGCCCTGAGA AAACCATGGT 5040
CCATTGCCT GTTAGCCCT TC 5062

```

Abb.2. Sequenz der porcinen mitochondrialen Wildtyp-1 α -Hydroxylase
Exons 1 bis 9 in Großbuchstaben und blau markiert, Introns in Kleinbuchstaben.

4.2 Charakterisierung der Mutation

Sowohl die genomische DNA der Wildtypiere wie auch die der Mutanten zeigten nach Amplifikation PCR-Produkte von ca. 1450 Bp in der PCR, bei der Primer verwendet wurden, die in Exon 4 und in Exon 8 (1ahy_ex4_F und 1ahy_ex8_R) binden (Abb 4.2.1). Auf genomischer Ebene konnte keine Deletion von Exon 6 bzw. von Exon 6, 7 und einem Teil von Exon 8 nachgewiesen werden. Allerdings ergab die Sequenzanalyse der PVDR I-Schweine, dass sich eine G zu A Mutation an Position 2613 im 1 α -Hydroxylase-Gen in der invarianten Sequenz der Splice-Donor-Site von Intron 6 befand (IVS6+1G>A). Diese Punktmutation führt zur Elimination der Restriktionsschnittstelle von *Bpu10I*. Beim Verdau des Wildtyp-PCR-Produktes mit *Bpu10I* entstanden zwei Fragmente (780 und ein 660 Bp), während das PCR-Produkt des homozygoten PVDR I-Tieres ungeschnitten blieb und eine einzige Bande mit 1450 Bp im Agarosegel zeigte (Abb. 4.2.2). Beim heterozygoten Genotyp konnten alle drei Banden nachgewiesen werden (Abb. 4.2.3).

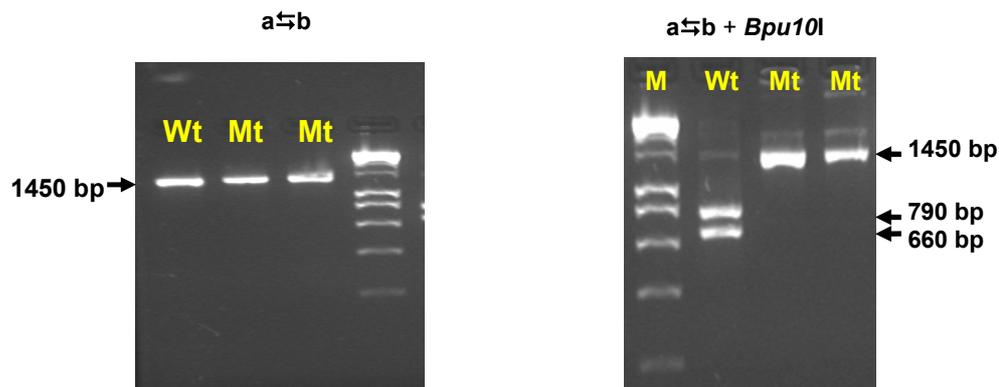


Abb. 4.2.1. PCR-Produkt von einem Wildtyp-Tier und zwei PVDR I-Tieren

Alle drei Tiere zeigen ein gleichgroßes PCR-Produkt bei 1450 Bp

Wt, Wildtyp; Mt, PVDR I-Tier

Primer **a**: 1ahy_ex4_F und **b**: 1ahy_ex8_R

Abb.4.2.2. *Bpu10I*-Restriktionsverdau

Bpu10I schneidet das PCR-Produkt der Wildtypen (Wt) in zwei Fragmente, bei homozygoten mutanten Tieren (Mt) bleibt das PCR-Produkt unverdaut.

Primer **a**: 1ahy_ex4_F und **b**: 1ahy_ex8_R

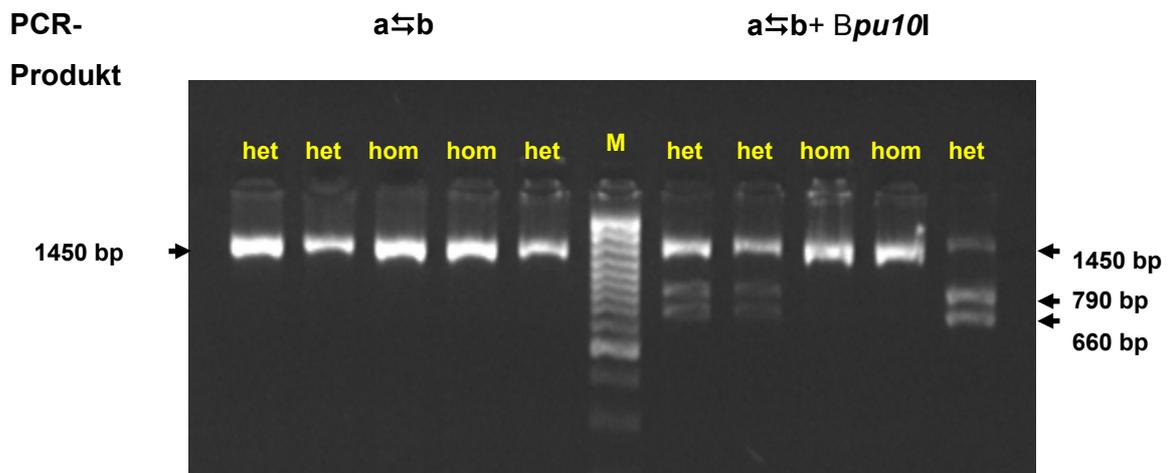


Abb.4.2.3. Die 5 rechten Banden zeigen die PCR-Produkte vor dem Restriktionsverdau, die 5 linken Banden nach dem Verdau (3 heterozygote und 2 homozygote Tiere). Primer **a**: 1ahy_ex4_F und Primer **b**: 1ahy_ex8_R

4.3 Expressionsprofil und cDNA-Struktur

Die Expression der 1 α -Hydroxylase wurde in verschiedenen Geweben mit Hilfe von RT-PCR gezeigt. Von der cDNA aus der Niere der Wildtypen wurde das erwartete Produkt von 840 Bp und aus der Mutante ein kleineres Fragment von 670 Bp

amplifiziert (Abb 4.3.1). In nicht renalen Geweben wird das Enzym nur schwach exprimiert, weshalb es nur mit Hilfe einer nested PCR nachgewiesen werden konnte. In der Haut, im Kolon, in der Nebenniere, in der Cervix des Uterus, in Lymphknoten und im Knochen konnte ein Amplikon von 500 Bp bei den Wildtyp-Tieren und 330 bp bei den PVDR I-Tieren nachgewiesen werden. Durch Sequenzierung der cDNA von Mutantetieren zeigte sich, dass bedingt durch Exon-Skipping das Exon 6 vollständig deletiert war. Dies resultiert außerdem in einer Verschiebung des Leserasters der Nukleotidsequenz und einem Stop-Codon in Exon 7, was zu einem verfrühten Abbruch der Translation führt (Abb. 4.3.2).

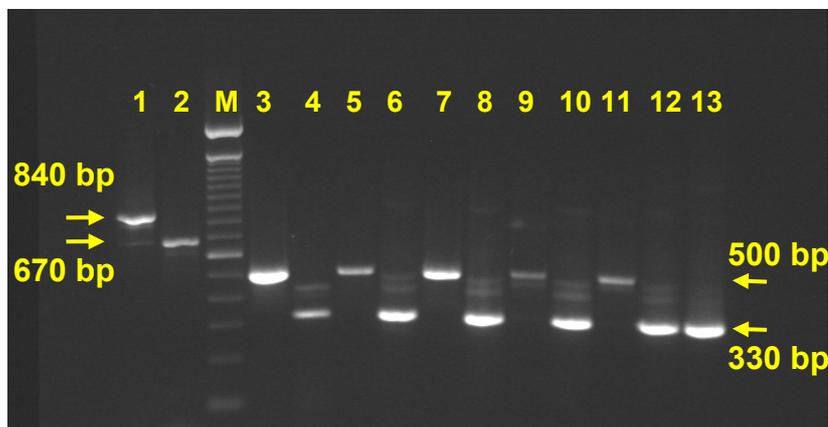


Abb 4.3.1. cDNA-Struktur in verschiedenen Geweben

1	Niere, Wildtyp-Tier	7	Haut, Wildtyp-Tier
2	Niere, homozygotes Tier	8	Haut, homozygotes Tier
M	100bp-Marker	9	Lymphknoten, Wildtyp-Tier
3	Cervix, Wildtyp-Tier	10	Lymphknoten, homozygotes Tier
4	Cervix, homozygotes Tier	11	Nebenniere, Wildtyp-Tier
5	Colon, Wildtyp-Tier	12	Nebenniere, homozygotes Tier
6	Colon, homozygotes Tier	13	Knochen, homozygotes Tier

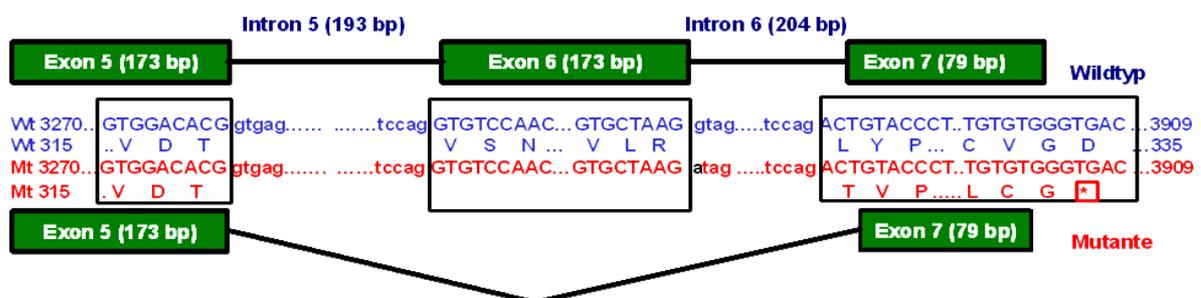


Abb. 4.3.2: Schematische Darstellung Exonskippings bei den PVDR I-Tieren

Die DNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz unterhalb, in blau der Wildtypen und rot der Mutanten. Im Bereich von Exon 7 kommt es zu einem Frameshift und zu einem verfrühten Stop-Codon [*].

4.4 Genotypisierung mittels ARMS-qPCR

Mit Hilfe der ARMS-qPCR ist es uns gelungen eine schnelle und kostengünstige Methode zur Genotypisierung der Hannover-Schweine zu etablieren. Die Ergebnisse des Gold-Standards für die Genotypisierung der PVDR I-Tiere, dem *Bpu10I*-RFLP, konnten mittels der ARMS-qPCR reproduziert werden. Unseren Erwartungen entsprechend, zeigten die drei verschiedenen Genotypen das jeweils charakteristische Bild. Der für die Punktmutation homozygote Genotyp (2613 A/A) zeigte einen positiven C_T -Wert mit dem A-Allel-spezifischen Assay. Der Wildtyp zeigte das entsprechende Signal mit dem G-Allel-spezifischen Assay. Bei dem heterozygoten Tier zeigten sich in beiden Ansätzen C_T -Werte, die sich kaum unterschieden ($\Delta C_T < 1$).

Bei dem Einsatz von ARMS-qPCR kommt es nicht nur zu spezifischen, sondern auch zu „falsch-positiven“ Signalen (C_T -Werte). Diese werden aber als solche erkannt, da sie im Vergleich zu den spezifischen Signalen ca. 8 bis 12 Zyklen später auftreten. Die spezifische Bindung unserer ARMS-Primer war so hoch, dass die „falsch-positiven“ Signalen nach 11 und mehr Zyklen auftraten. Der Schwellenwert wurde bei allen qPCRs einheitlich auf 150 Fluoreszenzeinheiten festgelegt.

Für die ARMS-qPCR wurden zwei kostengünstige HotStart-Polymerasen getestet. Dabei handelte es sich zum einen um die HotFirePol-Polymerase. Der HotStart erfolgt in diesem Fall durch chemische Modifikation. Bei dem zweiten Enzym handelt es sich um die SmartTaq-Polymerase, die mit Hilfe eines Antikörpers modifiziert wurde. Dieser Unterschied in der Modifikation zieht unterschiedliche Anforderungen an das Design der ARMS-Primer nach sich. Bei ARMS-Primern, die an der vorletzten Position mit beiden SNP-Allelen fehlpaaren, kann die Wahl der Polymerase zu unterschiedlich frühen C_T -Werten führen (Dr. Ralf Steinborn, persönliche Mitteilung). Diese Annahme sollte hier für ein neues Schnell-Verfahren für die DNA-Isolation geprüft werden. Der Unterschied in den C_T -Werten sollte in einem vergleichenden Ansatz ermittelt werden. Dazu wurden zwei identische qPCRs durchgeführt, die sich nur im Einsatz der Polymerase und der jeweils spezifischen HotStart-Zeit unterschieden. Es zeigte sich, dass bei Verwendung der SmartTaq-Polymerase die C_T -Werte im Mittel um 6,4 Zyklen niedriger waren als bei der Verwendung der HotFirePol-Polymerase (Bereich 3,8 bis 8,7 Zyklen; Details in Tabelle 4.3.1). Die zur

Überprüfung eingesetzten DNA-Proben von bekannten Genotypen lieferten eindeutige Ergebnisse und bestätigten die Möglichkeit der Genotypisierung über die ARMS-qPCR (Tab. 4.4.1).

Tabelle 4.4.1. Bestimmung der C_T -Werte und der daraus folgenden Genotypen mittels ARMS-qPCR bei identischen Schwellenwerten.

Probe	SmartTaq C_T -Wert		HotFirePol C_T -Wert		Genotyp
	Assay2613-A	Assay2613-G	Assay2613-A	Assay2613-G	
Standard A/A	29,7	43,3	34,2	>40	2613 A/A
Standard G/G	>45	25,2	>40	29,0	2613 G/G
712	26,5	26,4	35,1	34,1	2613 A/G
713	38,0	26,0	>40	32,2	2613 G/G
714	26,7	26,8	34,0	32,1	2613 A/G
715	25,6	26,2	34,3	33,3	2613 A/G
716	>45	26,1	>40	31,8	2613 G/G
717	43,7	26,4	>40	32,3	2613 G/G
718	27,0	26,4	33,2	33,0	2613 A/G
719	25,9	36,9	32,9	>40	2613 A/A
NTC	>45	>45	>40	>40	n.a.

C_T -Wert-Bestimmung bei gleichen Schwellenwerten.

Standard A/A, homozygoter mutanter Genotyp.

Standard G/G, Wildtyp-Genotyp.

NTC, Negativ-Kontrolle.

n.a., nicht anwendbar.

4.5 Expressionsniveau in der Niere

Um die Methode der quantitativen PCR für unser Modell zu testen, wurden zunächst ein homozygotes Tier und ein Kontroll-Tier geopfert, um aus Gewebeproben der Nieren dieser beiden Tiere RNA zu extrahieren. Nach Reverser Transkription wurde die erhaltene cDNA als Matritze eingesetzt. Als interner Standard diente GAPDH. Die qPCR wurde für jedes Tier in Triplikaten durchgeführt. Ansätze, die RNA enthielten, die nicht revers transkribiert wurde, und Kontrollen, die kein Template enthielten, zeigten keine Fluoreszenz über das Hintergrundrauschen hinaus. Die Schmelzkurven der PCR-Produkte zeigten einzelne Peaks, was eine spezifische

Amplifikation von GAPDH und 1 α -Hydroxylase ohne Primerdimerbildung und Kontamination mit genomischer DNA anzeigt. C_T -Werte sind in Tabelle 4.4.1 angegeben. Die Ratio Wildtyp gegenüber Mutante ergab einen Wert von $r=8,8$.

Tabelle 4.4.1. Expression in der Niere bei einem Tier

	GAPDH C_T -Werte	1 α -Hydroxylase C_T -Werte
Wildtyp Tier	20,31	23,23
	20,26	23,11
	20,28	23,12
Mittelwert	20,28	23,15
StdAbw.	0,03	0,07
Homozygotes Tier	19,29	25,97
	19,51	25,98
	19,68	26,04
	19,69	25,81
Mittelwert	19,54	25,95
StdAbw.	0,19	0,10
Effizienz	1,95	1,82
ΔC_T	-0,73971483	2,79
RATIO Wt VS. Mt		8,88

Darstellung der C_T -Werte der qPCR der internen Kontrolle (GAPDH) und der 1 α -Hydroxylase mit Angabe der Mittelwerte, Standardabweichung, Effizienzen, delta- C_T und Ratio in der Niere (n = 1 pro Genotyp).

4.6 Expressionsniveau in der Niere im Vergleich zur Haut

Um das relative Ausmaß der Expression der 1 α -Hydroxylase in der Niere im Vergleich zur Haut zu bestimmen, wurde auch hier eine quantitative PCR durchgeführt. Als interner Standard diente wieder GAPDH. Die Expression der Niere und der Haut sollten untersucht werden, um die unterschiedlichen Arten der Regulation zu betrachten. In der Niere (je n = 3) waren die GAPDH-Expressionswerte der Wildtypiere vergleichbar mit denen der Mutantetiere, wobei die der 1 α -Hydroxylase bei den PVDR I-Tieren, um ca. 60 %, signifikant niedriger waren (Abb. 4.6.1). In der Haut (n = 4) waren keine signifikanten Unterschiede messbar (Abb.4.6.2). Ansätze, die RNA enthielten, die nicht revers transkribiert wurde, und Kontrollen, die kein Template enthielten, zeigten auch hier keine Fluoreszenz über das Hintergrundrauschen hinaus. Die Schmelzkurven auch dieser

PCR-Produkte zeigten einzelne Peaks, was eine spezifische Amplifikation der GAPDH und der 1 α -Hydroxylase ohne Primerdimerbildung und ohne Kontamination mit genomischer DNA anzeigt.

Tabelle 4.6.1. Expression in der Niere

	GAPDH C _T -Werte	1 α -Hydroxylase C _T -Werte		GAPDH	1 α -Hydroxylase
			Signifikanz		runter
Wildtyp-1	17,48	19,77	Gen	Ref.	1
Wildtyp-2	17,82	21,06	PCR Effizienzen	1,94	1,96
Wildtyp-3	17,56	20,91	Kontroll MW	17,63	20,57
Mittelwert	17,63	20,58	Probe MW	17,72	22,01
StdAbw.	0,17	0,70	Expressions Ratio		0,41
			p-Wert		0,049
Homozygot-1	17,72	21,34	Expression Ratios-nn	0,94	0,38
Homozygot -2	17,88	22,85	p-Wert-nn	0,54	0,001
Homozygot -3	17,56	21,85			
Mittelwert	17,72	22,01			
StdAbw.	0,16	0,77			

StdAbw., Standardabweichung

MW, Mittelwert

GAPDH, interner Standard

Tabelle 4.6.2. Expression in der Haut

	GAPDH C _T -Werte	1 α -Hydroxylase C _T -Werte		GAPDH	1 α -Hydroxylase
			Signifikanz		
Wildtyp-1	18,89	31,23	Gen	Ref.	1
Wildtyp-2	18,61	31,39	PCR Effizienzen	2	2
Wildtyp-3	18,42	31,32	Kontroll MW	19,21	31,52
Wildtyp-4	20,92	32,17	Probe MW	19,01	31,65
Mittelwert	19,21	31,53	Expressions Ratio		0,80
StdAbw.	1,16	0,43	p-Wert		0,57
			Expression Ratios-nn	1,14	0,91
Homozygot-1	18,98	30,90	p-Wert-nn	0,97	0,82
Homozygot -2	19,07	31,54			
Homozygot -3	18,94	33,05			
Homozygot -4	19,05	31,10			
Mittelwert	19,02	31,65			
StdAbw.	0,06	0,97			

StdAbw., Standardabweichung

MW, Mittelwert

GAPDH, interner Standard

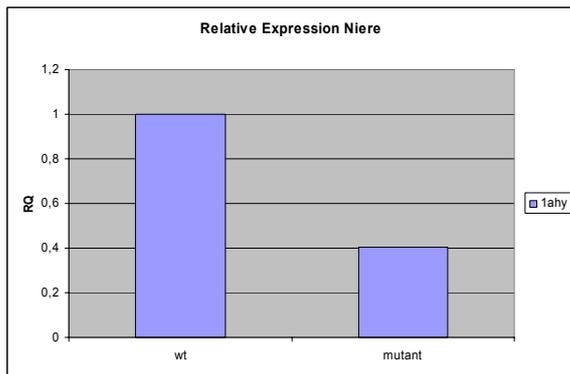


Abb. 4.6.1. Relative Expression in der Niere

Relative Expression (RQ) bei Wildtyp- und bei homozygoten Tieren (n=3 pro Genotyp). Die Expression der 1 α -Hydroxylase ist in den homozygoten Tieren, um ca. 60%, signifikant reduziert.

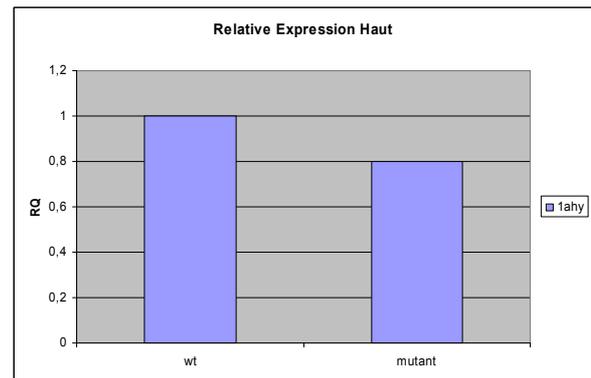


Abb. 4.6.2. Relative Expression in der Haut

Relative Expression (RQ) bei Wildtyp- und bei homozygoten Tieren (n=4 pro Genotyp). Die Expression der 1 α -Hydroxylase ist in den homozygoten Tieren, nur geringgradig und nicht signifikant erniedrigt.

4.7 Nachweis der Phagozytose von Makrophagen

Bei Betrachtung der Zellen im Fluoreszenzmikroskop zeigte sich, dass die Zellen die fluoreszierenden Beads phagozytiert haben. Zwei bis zehn Beads pro Zelle waren zu erkennen. Bei den Zellen, die in Kultur gebracht wurden handelt es sich um Monozyten und Makrophagen (Abb 4.7.1.)

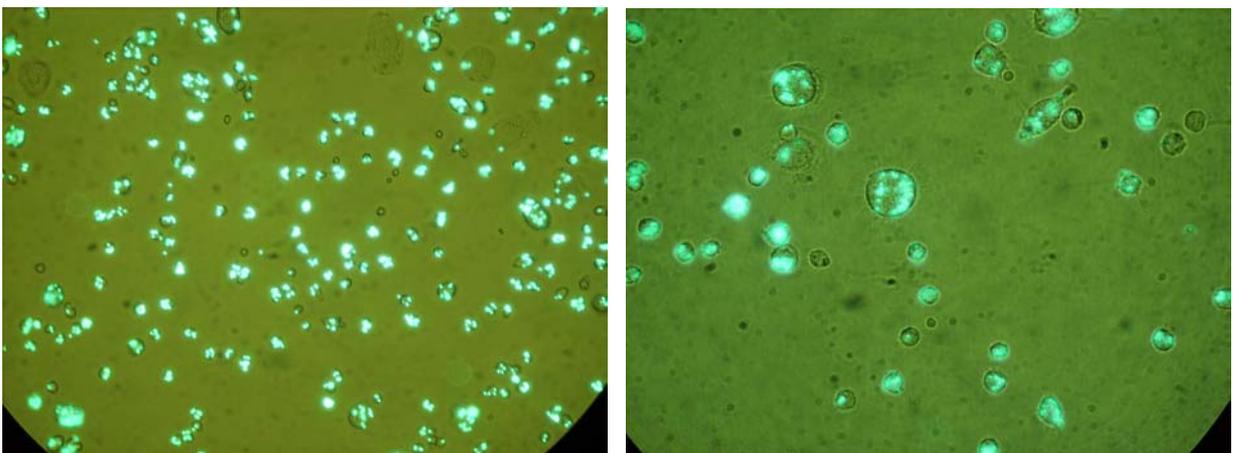


Abb 4.7.1. Makrophagen nach Phagozytose Vergrößerung 1x 200 (links) und 1x 400 (rechts)

4.8 Expression in stimulierten Makrophagen

Zur Untersuchung der Effekte der *in vitro* Stimulierung von Makrophagen auf die Expression der 1 α -Hydroxylase, kultivierten wir periphere Blut-Monozyten von einem nicht an PVDR I erkrankten Schwein. Wir konnten in den IFN γ behandelten porcinen Makrophagen einen Anstieg der 1 α -Hydroxylase-Expression sieben Tage nach der Behandlung mit Interferon γ , im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle, feststellen. Die Relative Expression (RE) betrug an diesem Tag 3,3. An Tag 4 konnte eine minimale Hochregulation der 1 α -Hydroxylase festgestellt werden (RE 1,5), wobei an Tag 1 die Expression durch die Interferon γ -Behandlung runterreguliert zu sein schien (RE 0,23). Die C_T -Werte sind in Tabelle 4.8.1 dargestellt.

Aufgrund von Coregulationen war GAPDH als interne Kontrolle zur Normalisierung ungeeignet. Deshalb entschieden wir uns für Cyclophilin A, welches durch die IFN γ -Behandlung weniger beeinflusst wurde. Die qPCR wurde in Duplikaten durchgeführt. Ansätze, die RNA enthielten, die nicht revers transkribiert wurde, und Kontrollen, die kein Template enthielten, zeigten auch hier keine Fluoreszenz über das Hintergrundrauschen hinaus. Die Schmelzkurven auch dieser PCR-Produkte zeigten einzelne Peaks, was eine spezifische Amplifikation des Cyclophilin A und der 1 α -Hydroxylase ohne Primer-Dimerbildung und ohne Kontamination mit genomischer DNA anzeigt.

Tabelle 4.8.1. Bestimmung der C_T -Werte in kultivierten Makrophagen

Tag nach IFN γ - Stimulierung	Probe	Cyclophilin A C_T -Wert	1 α -Hydroxylase C_T -Wert	Δ - C_T	RE
Tag 1	Kontrolle	16,9	25,0	8,1	0,23
	IFN γ	19,9	30,1	10,2	
Tag 4	Kontrolle	18,5	27,5	9,0	1,5
	IFN γ	16,8	25,2	8,4	
Tag 7	Kontrolle	16,7	25,1	8,4	3,3
	IFN γ	17,6	24,3	6,7	

Cyclophilin A, interner Standard
 Δ - C_T , delta C_T -Wert
 RE, Relative Expression

5 Diskussion

In dieser Dissertation wurde der Gendefekt der PVDR I-Schweine auf molekularer Ebene charakterisiert. Die Ursache für die erblich bedingte Pseudo-Vitamin-D-Mangel-Rachitis Typ I der Schweine wurde auf DNA-Ebene beschrieben. Die genomische Struktur des 1α -Hydroxylase-Gens mitsamt dem Promotor wurde analysiert. Auf RNA-Ebene wurden Expressionsanalysen in verschiedenen Geweben durchgeführt. Als Schlüsselenzym des Vitamin-D-Metabolismus ist die 1α -Hydroxylase nicht nur von besonderer Bedeutung für die Erhaltung der Calcium-Homöostase, sondern spielt auch eine wichtige Rolle in anderen Geweben, wie unter anderem der Haut und dem Immunsystem.

5.1 Analyse auf genomischer Ebene

Es wurde gezeigt, dass eine hohe Homologie zwischen dem menschlichen und dem porcinen 1α -Hydroxylase-Gen besteht. Wie beim Menschen und der Maus endet die 5'-Region des 1α -Hydroxylase-Gens am angrenzenden Mettl1-Gen. Beim Schwein wurde Mettl-1 auf dem Chromosom 5p11-p15 lokalisiert (www.thearkdb.org), was beim Menschen im Vergleich Chromosom 12 entspricht (www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/compare/compare.htm). Im murinen Organismus entspricht die Lokalisation Chromosom 10, wo die 1α -Hydroxylase und das Mettl1-Gen kartiert wurden.

Auf mRNA-Ebene wurde der Defekt der PVDR I-Schweine, wie zuvor bereits erwähnt, von CHAVEZ et al. 2003 beschrieben. Diese Arbeitsgruppe berichtet von zwei Deletionen in der porcinen 1α -Hydroxylase-cDNA. Zum einen wurde eine Deletion von Exon 6 und zum anderen eine noch größere Deletion, die Exon 6, 7 und einen Teil von Exon 8 betrifft, dargestellt. In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass eine genomische Mutation in der Splice-Site von Exon 6 die Deletion von Exon 6 auf mRNA-Ebene zur Folge hat, wobei die anderen Deletionen in der mRNA von uns nicht bestätigt werden konnten. Die Punktmutation führt zum so genannten Exon-Skipping. Der Splice-Apparat nutzt aufgrund der veränderten Splice-Donor-Site eine alternative, legitime Splice-Site. So kommt es bei Mutationen

der Splice-Donor-Site zum Skipping von stromaufwärts gelegenen Exons und bei Mutationen in Splice-Acceptor-Sites zum Verlust von Exons stromabwärts (STRACHAN et al., 2006). Die hier mutierte Splice-Donor-Site bewirkt also den Verlust von Exon 6. In allen von uns untersuchten PVDR I-Tieren konnte die Mutation entweder mit RFLP oder über ARMS bestätigt werden. Mit diesen Methoden haben wir die Möglichkeit geschaffen, homozygote, heterozygote und Wildtyp-Tier mittels PCR zu genotypisieren. Das ARMS bietet gegenüber dem RFLP den Vorteil, dass es möglich ist, die Tiere bei der Zucht zeitsparend innerhalb eines Tages zu genotypisieren, da ausschließlich die DNA-Extraktion und die Real-Time PCR durchgeführt werden müssen und der mehrere Stunden dauernde Restriktions-Verdau und die Auftrennung im Agarose-Gel wegfällt. Zudem kann auf den Umgang mit toxischen Substanzen, wie Ethidium-Bromid, zur Sichtbarmachung der DNA verzichtet werden. Darüber hinaus bietet die ARMS-Methode eine zusätzliche Kontrolle, da ein um 10 oder mehr Zyklen verspätetes „falsch-positives“ Signal bestätigt, dass Pipettierfehler ausgeschlossen werden können.

Da die homozygoten Tiere den typischen Phänotyp der PVDR I-Erkrankung zeigen, muss man davon ausgehen, dass der Verlust von Exon 6 den Funktionsverlust des 1α -Hydroxylase-Enzyms bewirkt. Eine sehr ähnliche Punktmutation in der Splice-Donor-Site von Intron 6 (IVS6+G>T) wurde in einem Allel bei einem menschlichen PVDR I-Patienten gefunden. Zusätzlich hat dieser Patient noch eine weiter verbreitete Mutation im zweiten Allel. Dabei handelt es sich um eine 7 Nukleotide lange Insertion in Exon 8 (PORCU et al., 2002b). Ob es in den beschriebenen Patienten zu einer Deletion des Exon 6 kommt, ist jedoch nicht bekannt. Bei den PVDR I-Tieren führt die Deletion von Exon 6 zu einem Verlust der konservierten Ferredoxin-bindenden Domäne. Zusätzlich kommt es zu einem Frameshift, der die Aminosäuresequenz ändert und die Entstehung eines verfrühten Stop-Codons in Exon 7 zur Folge hat. Dies würde zu einem verkürzten Protein führen, bei dem eine hoch konservierte Aminosäuresequenz mitsamt eines für die Funktionalität des Enzyms beim Menschen essentiellen Threonin-Restes (Thr409) fehlt. Der entsprechende Serin408-Rest bei der Maus und der Thr409-Rest in der humanen Sequenz sind als verantwortlich für die Substratbindung beschrieben worden (YAMAMOTO et al., 2005). Aus diesem Grund ist es sehr unwahrscheinlich, dass Transkripte mit dieser mutierten Sequenz ein funktionelles Protein hervorbringen.

5.2 Analyse der Expression

Die Expression der 1α -Hydroxylase in extrarenalen Geweben weckte wachsendes Interesse, seitdem wichtige Effekte von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Differenzierung von epithelialen und Immun-Zellen, sowie auf Zytokine beschrieben wurden. In unserer Studie konnten wir die Expression der 1α -Hydroxylase in Zellen der uterinen Cervix bestätigen, welche auch schon in humanem cervikalen Gewebe und in Gebärmutterhalskrebs nachgewiesen wurde (FRIEDRICH et al., 2002). Wie bei der Maus beschrieben (ANDERSON et al., 2005; ZEHNDER et al., 2001), wurde die Expression in der Haut, Kolon, Lymphknoten, Nebenniere und den Knochen ebenfalls beim Schwein festgestellt. Es konnten keine Splice-Varianten festgestellt werden, weshalb wir annehmen, dass in allen Geweben die gleiche mRNA exprimiert wird. In allen Geweben, die wir analysiert haben, zeigt das PVDR I-Tier dieselbe Exon 6-Deletion wie in der Niere. Daher ist zu erwarten, dass kein Gewebe der PVDR I-Schweine in der Lage ist, enzymatische Aktivität der mitochondrialen 1α -Hydroxylase zu zeigen.

Obwohl nur eine einzige Variante der 1α -Hydroxylase in den verschiedenen Geweben exprimiert wird, variiert ihre Regulation doch beträchtlich. In der Niere wird die Expression durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ runterreguliert, wobei in den Keratinozyten, Makrophagen und im Knochen eine Regulation auf diese Weise nicht stattfindet (ANDERSON et al., 2005; OVERBERGH et al., 2000; SCHUESSLER et al., 2001; XIE et al., 2002). In unseren PVDR I-Schweinen war die Expression der 1α -Hydroxylase um ca. 60% niedriger als in den Wildtyp-Tieren. Dies kann durch die Vitamin D_3 -Supplementierung bedingt sein, die notwendig ist, um ein normales Knochenwachstum der Tiere zu gewährleisten. Obwohl die PVDR I-Schweine nicht in der Lage sind, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mithilfe der 1α -Hydroxylase zu produzieren, könnten hohe Dosen von Vitamin D_3 die 1α -Hydroxylase-Expression in der Niere erniedrigen. Der Vitamin D-Rezeptor bindet $25(\text{OH})\text{D}_3$ mit einer ungefähr 100- bis 1000-fach niedrigeren Affinität, als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Jedoch könnten pharmakologische Dosen von Vitamin D_3 einen Einfluss auf VDR-regulierte Gene haben. Darüber hinaus besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass andere Monoxygenasen die 1α -Hydroxylierung an $25(\text{OH})\text{D}_3$ durchführen, wenn Substrat in enormem Überschuss angeboten wird. Dies ist der Fall bei der Behandlung der PVDR I-Tiere mit

pharmakologischen Dosen von Vitamin D₃. Dabei wird Vitamin D₃ im Vergleich zur einmaligen Behandlung einer nicht erblich bedingten Rachitis, in regelmäßigen Abständen um das ca. 30-fache höher dosiert. Für die Hydroxylase CYP27, die normalerweise Hydroxylierungen an anderen Positionen von Steroiden (C₂₅ und C₂₇) katalysiert, ist beschrieben, dass sie *in vitro* in der Lage ist, die 1 α -Hydroxylierung von Vitamin D₃ in Gegenwart von unphysiologischen hohen Dosen 25(OH)D₃ zu katalysieren.

Die 1 α -Hydroxylase-Expression in der Haut, von der angenommen wird, dass sie nicht durch systemisches Vitamin D₃ oder 1,25(OH)₂D₃-Spiegel beeinflusst wird, unterschied sich bei den PVDR I- und den Wildtyp-Tieren nicht.

Die Regulation der 1 α -Hydroxylase durch PTH und 1,25(OH)₂D₃ erscheint komplex, und verschiedene Studien beschreiben die Bedeutung von regulatorischen Promotor-Elementen. Im humanen und murinen Promotor der 1 α -Hydroxylase wurden „cAMP-responsive elements“ (CREs) gefunden, die beim Schwein jedoch nicht auftreten.

AP-1, SP-1 und NF κ B „responsive elements“ wurden jedoch beim Schwein wie auch bei Mensch und Maus gefunden. All diese Transkriptionsfaktoren können durch cAMP induziert werden (MONNIER und LOEFFLER, 1998; PARRY und MACKMAN, 1997), was darauf hinweist, dass cAMP-regulierte Signalwege auch beim Schwein von Bedeutung sind. NF κ B wurde auch ein suppressiver Effekt auf den humanen 1 α -Hydroxylase-Promotor zugeschrieben, was zudem die Verbindung schafft mit niedrigen 1,25(OH)₂D₃-Spiegeln bei entzündlichen Erkrankungen mit hohen TNF α -Konzentrationen, von denen bekannt ist, dass sie über NF κ B gesteuert werden (EBERT et al., 2004). Die humane und die porcine Sequenz zeigen hohe Homologie im Bereich der proximalen Promotorregion, sodass gemeinsame regulatorische Elemente angenommen werden können. Die Überprüfung in einer funktionellen Analyse steht allerdings aus. Wie bei anderen Spezies auch, wurde kein „Vitamin D responsive element“ entdeckt. Die supprimierende Wirkung von 1,25(OH)₂D₃ ist somit keine direkte Wirkung auf Transkriptionsebene.

5.3 Expression in Makrophagen

Seitdem die extrarenale Aktivierung von Vitamin D₃ als Ursache für Hypercalcämie bei Sarkoidose und ähnlichen Erkrankungen erkannt wurde, wurde die Synthese von 1,25(OH)₂D₃ durch Alveolar- und Blut-Makrophagen, sowie die Expression der 1 α -Hydroxylase in diesen Zellen genauer betrachtet. Verschieden Studien zeigen, dass die Aktivierung von Makrophagen durch Immunstimuli eine Hochregulierung der 1 α -Hydroxylase-Expression (MONKAWA et al., 2000; OVERBERGH et al., 2000) und der Enzym-Aktivität bewirkt (SMITH et al., 1999). Eine besonders starke Aktivierung kann bei menschlichen und murinen Makrophagen durch Interferon γ verursacht werden. Die höchste Induktion kann mit einer Behandlungsdauer von 24 Stunden erreicht werden (ESTEBAN et al., 2004). Daher untersuchten wir, ob die Induktion der 1 α -Hydroxylase in porcinen Blut-Makrophagen durch die Stimulation mit Interferon γ erreicht werden kann. Am siebten Tag nach der Behandlung der Makrophagen mit Interferon γ konnte eine Erhöhung der Expression detektiert werden. Ob allerdings Unterschiede zwischen der Expression in Wildtyp- und PVDR I-Schweinen bestehen, bleibt noch zu untersuchen. Weitere Experimente in dieser Hinsicht sind notwendig, um zu ermitteln in welchem Ausmaß IFN γ in der Lage ist die 1 α -Hydroxylase von porcinen Makrophagen der PVDR I-Schweine zu stimulieren, und ob die Exon-6-Mutation der PVDR I-Schweine diese Aktivierung in Bezug auf die Expression beeinflusst. Verfrühte Stop-Codons in der mRNA können auch die Transkript-Stabilität beeinträchtigen und zu einem schnelleren mRNA-Zerfall führen, aber ob dies bei den PVDR I-Tieren der Fall ist, ist noch nicht untersucht worden. Die langsame Kinetik der IFN γ -vermittelten Expression in murinen Makrophagen entspricht seiner Transaktivierung über C/EBP β (ESTEBAN et al., 2004). Im porcinen Promotor fanden wir zwei C/EBP β -Bindungsstellen, jedoch kein „Interferon stimulated responsive element“ (ISRE) oder „gamma Interferon activated site“ (GAS), sodass eine gleichartig regulierter Prozess beim Schwein wahrscheinlich erscheint. Wie bei der humanen PVDR I-Erkrankung (SMITH et al., 1999) ist bei den PVDR I-Schweinen die 1 α -Hydroxylase-Aktivität in den Makrophagen höchst wahrscheinlich nicht vorhanden, jedoch müssen die entsprechenden Experimente, die die 1,25(OH)₂D₃-Synthese messen, noch durchgeführt werden.

In dieser Studie haben wir gezeigt, dass der genomische Defekt der 1α -Hydroxylase bei den PVDR I-Schweinen vergleichbar ist mit der Ursache der PVDR I-Erkrankung beim Menschen. Die genomische Organisation dieses Gens und seine Expression in renalen und nicht-renalen Geweben wurden dargestellt. Da viele Gewebe von diesem Defekt betroffen sind, kann das PVDR I-Schwein als ein hervorragendes Modell für die Analyse von systemischen und lokal regulierten Mechanismen in der Aktivierung und Unterdrückung der 1α -Hydroxylase dienen. Dies kann zu einem besseren Verständnis in Bezug auf die verschiedenen Kontrollsysteme in verschiedenen Zell-Typen und dem Einfluss der 1α -Hydroxylase auf das Immun-System und anderer nicht-renaler Gewebe führen.

6 Zusammenfassung

Die molekulare Charakterisierung des Gendefektes bei PVDR I-Schweinen

In dieser Studie wurde der genetische Defekt der 25-Hydroxyvitamin D₃ 1 α -Hydroxylase (CYP27B1) der PVDR I-Schweine beschrieben. Diese Tiere stellen ein gutes Modell für die Pseudo-Vitamin-D-Mangel-Rachitis Typ I (PVDR I) dar. Die 1 α -Hydroxylase ist ein Enzym, das 25(OH)D₃ zu seiner hormonellen Form aktiviert. Wie bei der echten Vitamin-D-Defizienz resultiert die Unfähigkeit Vitamin D₃ zu aktivieren in Symptomen der Rachitis. Diese Tiere zeigen niedrige 1,25(OH)₂D₃-Blutspiegel, hochgradige Hypocalcämie, rachitische Veränderung des Skeletts und erhöhte Parathormon-Blutwerte. Diese Störung trat als spontane Mutation in den 60iger Jahren bei einer Zuchtlinie in Hannover auf. Wir konnten eine Splice-Site-Mutation in der Splice-Donor-Site von Intron 6 (IVS6+1G>A) ausfindig machen. In der cDNA von renalen und nicht-renalen Geweben wurde eine Deletion von Exon 6 gefunden, die in einem Frameshift und in einem verfrühten Stop-Codon resultiert. Zudem analysierten wir die Promotor-Region und die genomische Organisation des porcinen 1 α -Hydroxylase-Gens bei dem eine hohe Homologie zum humanen 1 α -Hydroxylase-Gen festgestellt wurde. Darüber hinaus wurde die Expression in der Niere und verschiedenen nicht-renalen Geweben, wie der uterinen Cervix, Haut, Lymphknoten, Nebenniere und dem Colon, ermittelt. Da alle Gewebe dieselbe defekte 1 α -Hydroxylase exprimieren, gehen wir davon aus, dass das Enzym in den PVDR I-Schweinen enzymatisch inaktiv ist. Die Information über die Punktmutation wurde für die Entwicklung einer neuen, PCR-basierten Genotypisierungsmethode genutzt. Durch die Mutation wurde eine einmalig vorkommende Restriktionsschnittstelle für *Bpu10I* ausgelöscht, was die Genotypisierung mittels Restriktions-Längen-Fragment-Polymorphismus (RFLP) erlaubte. Zusätzlich etablierten wir eine Amplifikations-Refraktär-Mutations-System-PCR (ARMS), um die Genotypisierung von homozygoten, heterozygoten und Wildtyp-Genotypen zu vereinfachen. Die Expressionsspiegel der 1 α -Hydroxylase wurden in einigen Geweben mittels quantitativer PCR in Wildtyp- und homozygoten Tieren bestimmt. In der Niere war die Expression gegenüber den Wildtyp-Tieren signifikant reduziert, wobei in der Haut keine Unterschiede gefunden wurden. Die Aktivierung von Blut-Makrophagen, mit

Hilfe von Interferon γ , bewirkte einen Anstieg der 1α -Hydroxylase-Expression. Die regulatorischen Unterschiede in renalen und nichtrenalen Geweben wurden diskutiert. Diese Ergebnisse erlauben es das PVDR I-Schwein als Tiermodell für die Pseudo-Vitamin-D-Mangel-Rachitis Typ I nutzen zu können, um Studien der Regulation des Vitamin-D-Metabolismus und des Calciumstoffwechsels beim Schwein durchführen zu können.

7 Summary

The molecular characterization of the genetic defect in the PDDR-pig

In this study, we determined the 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase (CYP27B1) defect in the Hannover pig, which is a model for pseudo-vitamin D-dependent rickets type 1 (PDDR). The 1 α -hydroxylase is an enzyme that activates 25(OH)-D₃ to its hormonal form. Similar to genuine vitamin D-deficiency, incapability to activate vitamin D results in clinical symptoms of rickets. These animals show low levels of 1,25(OH)₂-D₃, severe hypocalcemia, rachitic skeletal changes and increased parathyroid hormone (PTH) levels. This disorder was found as a spontaneous mutation in the Hannover pig strain in the 1960s.

During our investigation, we detected a splice site mutation at the splice donor site of intron 6 (IVS6+1G>A). As a consequence, deletion of exon 6 was found in cDNA of both renal and extrarenal tissues, resulting in a frame shift and a premature termination codon. We also analyzed the promoter region and genomic organization of the porcine gene for 1 α -hydroxylase, and found it to be highly homologous to the human 1 α -hydroxylase gene. Furthermore, its expression was detected in the kidney and several nonrenal tissues such as uterine cervix, skin, bone, lymph node, adrenal gland and colon. Since all tissues examined exhibited the same defect, no enzymatic activity is thought to occur in the Hannover pig. The knowledge of this point mutation was utilized for development of a PCR-based genotyping protocol. The mutation ablated a unique restriction site for *Bpu10I*, which allowed genotyping by restriction fragment length polymorphism (RFLP). In addition, we established an amplification refractory mutation system (ARMS)-PCR for genotyping of homozygous, heterozygous and wildtype pigs. The expression levels of 1 α -hydroxylase were determined in wildtype and mutant animals in several tissues by quantitative PCR. In the kidney, expression was significantly reduced in mutant compared to wildtype pigs, but no difference was found in the skin. Activation of blood-derived macrophages by IFN γ resulted in a increase of 1 α -hydroxylase expression. The regulatory differences in renal and extrarenal tissues are discussed.

These results will allow us to take full advantage of the Hannover pig as an animal

model for PDDR and to advanced studies about the regulation of vitamin D synthesis and calcium metabolism in the pig.

8 Literaturverzeichnis

- ADAMS, J. S., M.A. GACAD, M.M. DIZ and J.L. NADLER, 1990
A role for endogenous arachidonate metabolites in the regulated expression of the 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylation reaction in cultured alveolar macrophages from patients with sarcoidosis.
J. Clin. Endocrinol. Metab **70**, 595-600
- AKERSTROM, V. L. and M.R. WALTERS, 1992
Physiological effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in TM4 Sertoli cell line.
Am. J. Physiol **262**, E884-E890
- ANDERSON, P. H., P.D. O'LOUGHLIN, B.K. MAY and H.A. MORRIS, 2005
Modulation of CYP27B1 and CYP24 mRNA expression in bone is independent of circulating 1,25(OH)2D3 levels.
Bone **36**, 654-662
- ANDERSSON, S., D.L. DAVIS, H. DAHLBACK, H. JORNVALL and D.W. RUSSELL, 1989
Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme.
J. Biol. Chem. **264**, 8222-8229
- AXEN, E., H. POSTLIND, H. SJOBERG and K. WIKVALL, 1994
Liver Mitochondrial Cytochrome-P450 Cyp27 and Recombinant-Expressed Human Cyp27 Catalyze 1-Alpha-Hydroxylation of 25-Hydroxyvitamin D-3.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**, 10014-10018
- BARSONY, J., J.W. PIKE, H.F. DELUCA and S.J. MARX, 1990
Immunocytology with microwave-fixed fibroblasts shows 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-dependent rapid and estrogen-dependent slow reorganization of vitamin D receptors.
J. Cell Biol. **111**, 2385-2395
- BASTA, S., S.M. KNOETIG, M. SPAGNUOLO-WEAVER, G. ALLAN and K.C. MCCULLOUGH, 1999
Modulation of monocytic cell activity and virus susceptibility during differentiation into macrophages.
J. Immunol. **162**, 3961-3969

-
- BAXTER, L. A. and H.F. DELUCA, 1976
Stimulation of 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase by phosphate depletion.
J. Biol. Chem. **251**, 3158-3161
- BHALLA, A. K., E.P. AMENTO, T.L. CLEMENS, M.F. HOLICK and S.M. KRANE, 1983
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 **57**, 1308-1310
- BIKLE, D., S. MUNSON, S. CHRISTAKOS, R. KUMAR and P. BUCKENDAHL, 1989
Calmodulin binding to the intestinal brush-border membrane: comparison to other calcium-binding proteins.
Biochim. Biophys. Acta **1010**, 122-127
- BIKLE, D. D., S. CHANG, D. CRUMRINE, H. ELALIEH, M.Q. MAN, O. DARDENNE, Z. XIE, R.S. ARNAUD, K. FEINGOLD and P.M. ELIAS, 2004
Mice lacking 25OHD 1 α -hydroxylase demonstrate decreased epidermal differentiation and barrier function.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **89-90**, 347-353
- BIKLE, D. D. and S. PILLAI, 1993
Vitamin D, calcium, and epidermal differentiation.
Endocr. Rev. **14**, 3-19
- BONJOUR, J. P., C. PRESTON and H. FLEISCH, 1977
Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the renal handling of Pi in thyroparathyroidectomized rats.
J. Clin. Invest **60**, 1419-1428
- BOUHTIAUY, I., D. LAJEUNESSE, S. CHRISTAKOS and M.G. BRUNETTE, 1994
Two vitamin D3-dependent calcium binding proteins increase calcium reabsorption by different mechanisms. II. Effect of CaBP 9K.
Kidney Int. **45**, 469-474
- BOURDEAU, A., F. ATMANI, B. GROSSE and M. LIEBERHERR, 1990
Rapid effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and extracellular Ca²⁺ on phospholipid metabolism in dispersed porcine parathyroid cells.
Endocrinology **127**, 2738-2743
- BOURLON, P. M., B. BILLAUDEL and A. FAURE-DUSSERT, 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

-
- BOYAN, B. D., L.F. BONEWALD, V.L. SYLVIA, I. NEMERE, D. LARSSON, A.W. NORMAN, J. ROSSER, D.D. DEAN and Z. SCHWARTZ, 2002
Evidence for distinct membrane receptors for 1 alpha,25-(OH)(2)D(3) and 24R,25-(OH)(2)D(3) in osteoblasts.
Steroids **67**, 235-246
- BOYAN, B. D., Z. SCHWARTZ and L.D. SWAIN, 1992
In vitro studies on the regulation of endochondral ossification by vitamin D.
Crit Rev. Oral Biol. Med. **3**, 15-30
- BRAUN, A., R. BICHLMAIER and H. CLEVE, 1992
Molecular analysis of the gene for the human vitamin-D-binding protein (group-specific component): allelic differences of the common genetic GC types.
Hum. Genet. **89**, 401-406
- BRENZA, H. L., C. KIMMEL-JEHAN, F. JEHAN, T. SHINKI, S. WAKINO, H. ANAZAWA, T. SUDA and H.F. DELUCA, 1998
Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase gene promoter.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **95**, 1387-1391
- BROWN, E. M., G. GAMBA, D. RICCARDI, M. LOMBARDI, R. BUTTERS, O. KIFOR, A. SUN, M.A. HEDIGER, J. LYTTON and S.C. HEBERT, 1993
Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid.
Nature **366**, 575-580
- BRUMBAUGH, P. F. and M.R. HAUSSLER, 1975
Specific binding of 1alpha,25-dihydroxycholecalciferol to nuclear components of chick intestine.
J. Biol. Chem. **250**, 1588-1594
- CHANDRA, S., C.S. FULLMER, C.A. SMITH, R.H. WASSERMAN and G.H. MORRISON, 1990
Ion microscopic imaging of calcium transport in the intestinal tissue of vitamin D-deficient and vitamin D-replete chickens: a 44Ca stable isotope study.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **87**, 5715-5719
- CHAVEZ, L.S., J. HARMEYER, S. CHOE and J.L. OMDAHL, 2000
Molecular basis of pseudo vitamin D-deficiency rickets (PDDR) in the Hannover pig model.
In: *Vitamin D Endocrine System. Structural, Biological, Genetic and Clinical Aspects* (Ed.: B.R.T.M. Norman AW), Proceedings of the Eleventh Workshop on Vitamin D, Nashville Tennessee, USA. University of California, Riverside, CA, pp. 175-178

-
- CHAVEZ, L. S., R. SERDA, S. CHOE, L. DAVIDI, J. HARMAYER and J.L. OMDAHL, 2003
Molecular basis for pseudo vitamin D-deficiency rickets in the Hannover pig.
J. Nutr. Biochem. **14**, 378-385
- CHEN, J. D. and R.M. EVANS, 1995
A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors.
Nature **377**, 454-457
- CHOY, B. and M.R. GREEN, 1993
Eukaryotic activators function during multiple steps of preinitiation complex assembly.
Nature **366**, 531-536
- COLSTON, K., M.J. COLSTON and D. FELDMAN, 1981
1,25-dihydroxyvitamin D₃ and malignant melanoma: the presence of receptors and inhibition of cell growth in culture.
Endocrinology **108**, 1083-1086
- COOKE, N. E. and J.G. HADDAD, 1989
Vitamin D binding protein (Gc-globulin).
Endocr. Rev. **10**, 294-307
- DE BOLAND, A. R. and A.W. NORMAN, 1990
Influx of extracellular calcium mediates 1,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent transcaltachia (the rapid stimulation of duodenal Ca²⁺ transport).
Endocrinology **127**, 2475-2480
- DELUCA, H. F. and H.K. SCHNOES, 1983
Vitamin D: recent advances.
Annu. Rev. Biochem. **52**, 411-439
- DESAI, S. S., M.C. APPEL and D.T. BARAN, 1986
Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on cytosolic calcium in two human cell lines (HL-60 and U-937).
J. Bone Miner. Res. **1**, 497-501
- DUSSO, A. S., J. FINCH, A. BROWN, C. RITTER, J. DELMEZ, G. SCHREINER and E. SLATOPOLSKY, 1991
Extrarenal production of calcitriol in normal and uremic humans.
J. Clin. Endocrinol. Metab **72**, 157-164
- DUVAL, D., S. DURANT and F. HOMO-DELARCHE, 1983
Non-genomic effects of steroids. Interactions of steroid molecules with membrane structures and functions.
Biochim. Biophys. Acta **737**, 409-442

-
- EBERT, R., M. JOVANOVIC, M. ULMER, D. SCHNEIDER, J. MEISSNER-WEIGL, J. ADAMSKI and F. JAKOB, 2004
Down-regulation by nuclear factor kappaB of human 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase promoter.
Mol. Endocrinol. **18**, 2440-2450
- ERBEN, R.G., 2005
Knochen und Calciumhomöostase.
In: Physiologie der Haustiere (Ed.: von Engelhardt W, Breves G), Enke, Stuttgart, pp. 580-587
- ERBEN, R. G., A.M. SCUTT, D. MIAO, U. KOLLENKIRCHEN and M. HABEREY, 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
- ERBEN, R. G., D.W. SOEGIARTO, K. WEBER, U. ZEITZ, M. LIEBERHERR, R. GNIADDECKI, G. MOLLER, J. ADAMSKI and R. BALLING, 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
- ESTEBAN, L., M. VIDAL and A. DUSSO, 2004
1alpha-Hydroxylase transactivation by gamma-interferon in murine macrophages requires enhanced C/EBPbeta expression and activation.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. **89-90**, 131-137
- ESVELT, R. P., H.K. SCHNOES and H.F. DELUCA, 1978
Vitamin D3 from rat skins irradiated in vitro with ultraviolet light.
Arch. Biochem. Biophys. **188**, 282-286
- FEHER, J. J., C.S. FULLMER and R.H. WASSERMAN, 1992
Role of facilitated diffusion of calcium by calbindin in intestinal calcium absorption.
Am. J. Physiol **262**, C517-C526
- FRASER, D., S.W. KOOH, H.P. KIND, M.F. HOLICK, Y. TANAKA and H.F. DELUCA, 1973
Pathogenesis of hereditary vitamin-D-dependent rickets. An inborn error of vitamin D metabolism involving defective conversion of 25-hydroxyvitamin D to 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D.
N. Engl. J. Med. **289**, 817-822
- FRASER, D. and R.B. SALTER, 1958
The diagnosis and management of various types of rickets.

-
- Pediatr. Clin. North Amer. **5**, 417-441
- FRIEDMAN, P. A. and F.A. GESEK, 1993
Vitamin D3 accelerates PTH-dependent calcium transport in distal convoluted tubule cells.
Am. J. Physiol **265**, F300-F308
- FRIEDMAN, P. A. and F.A. GESEK, 1995
Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms, and regulation.
Physiol Rev. **75**, 429-471
- FRIEDRICH, M., R. AXT-FLIEDNER, C. VILLENA-HEINSEN, W. TILGEN, W. SCHMIDT and J. REICHRATH, 2002
Analysis of vitamin D-receptor (VDR) and retinoid X-receptor alpha in breast cancer.
Histochem. J. **34**, 35-40
- GARABEDIAN, M. and H. BEN MEKHBI, 1989
[Deficiency rickets: the current situation in France and Algeria].
Pediatrie. **44**, 259-264
- GATES, S., J. SHARY, R.T. TURNER, S. WALLACH and N.H. BELL, 1986
Abnormal calcium metabolism caused by increased circulating 1,25-dihydroxyvitamin D in a patient with rheumatoid arthritis.
J. Bone Miner. Res. **1**, 221-226
- GKONOS, P. J., R. LONDON and E.D. HENDLER, 1984
Hypercalcemia and elevated 1,25-dihydroxyvitamin D levels in a patient with end-stage renal disease and active tuberculosis.
N. Engl. J. Med. **311**, 1683-1685
- GRAY, R. W., J.L. OMDAHL, J.G. GHAZARIAN and H.F. DELUCA, 1972
25-Hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase. Subcellular location and properties.
J. Biol. Chem. **247**, 7528-7532
- HADDAD, J. G., Y.Z. HU, M.A. KOWALSKI, C. LARAMORE, K. RAY, P. ROBZYK and N.E. COOKE, 1992
Identification of the sterol- and actin-binding domains of plasma vitamin D binding protein (Gc-globulin).
Biochemistry **31**, 7174-7181
- HADDAD, J. G., L.Y. MATSUOKA, B.W. HOLLIS, Y.Z. HU and J. WORTSMAN, 1993
Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis.
J. Clin. Invest **91**, 2552-2555
- HADDAD, P., P.A. COULOMBE and M. GASCON-BARRE, 1987

-
- Influence of the vitamin D hormonal status on the hepatic response to bromobenzene.
J. Pharmacol. Exp. Ther. **242**, 354-363
- HALLINE, A. G., N.O. DAVIDSON, S.F. SKAROSI, M.D. SITRIN, C. TIETZE, D.H. ALPERS and T.A. BRASITUS, 1994
Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on proliferation and differentiation of Caco-2 cells.
Endocrinology **134**, 1710-1717
- HARMEYER, J., 1982
Inherited disturbance of vitamin D metabolism in pigs, 2nd World Cong. Genetics **II**, 64-75
- HARMEYER, J., 1991
Die Bedeutung von Tiermodellen bei der Erforschung menschlicher Krankheiten; drei Beispiele von Erkrankungen des Skeletts.
In: Qualitätskriterien der Versuchstierforschung: Ergebnisse aus dem Sonderforschungsbereich "Versuchstierforschung" der Medizinischen und Tierärztlichen Hochschule Hannover/ Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ed.: Gärtner K), VCH, Weinheim, pp. 307-374
- HARMEYER, J., S. KNORZ, A. DWENGER and I. WINKLER, 1985
The effect of vitamin D on B-cell activity on the endocrine pancreas.
Zentralbl. Veterinarmed. A **32**, 606-615
- HARMEYER, J. and H. PLONAIT, 1967
[Generalized hyperaminoaciduria with hereditary rickets in pigs].
Helv. Paediatr. Acta **22**, 216-229
- HAVERSON, K., M. BAILEY, V.R. HIGGINS, P.W. BLAND and C.R. STOKES, 1994
Characterization of monoclonal antibodies specific for monocytes, macrophages and granulocytes from porcine peripheral blood and mucosal tissues.
J. Immunol. Methods **170**, 233-245
- HENRY, H. L., 1979
Regulation of the hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D3 in vivo and in primary cultures of chick kidney cells.
J. Biol. Chem. **254**, 2722-2729
- HOLICK, M. F., J.A. MACLAUGHLIN, M.B. CLARK, S.A. HOLICK, J.T. POTTS, JR., R.R. ANDERSON, I.H. BLANK, J.A. PARRISH and P. ELIAS, 1980
Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences.
Science **210**, 203-205

-
- HOLICK, M. F., H.K. SCHNOES, H.F. DELUCA, R.W. GRAY, I.T. BOYLE and T. SUDA, 1972
Isolation and identification of 24,25-dihydroxycholecalciferol, a metabolite of vitamin D made in the kidney.
Biochemistry **11**, 4251-4255
- HOLTROP, M. E., K.A. COX, M.B. CLARK, M.F. HOLICK and C.S. ANAST, 1981
1,25-dihydroxycholecalciferol stimulates osteoclasts in rat bones in the absence of parathyroid hormone.
Endocrinology **108**, 2293-2301
- HYPONEN, E., E. LAARA, A. REUNANEN, M.R. JARVELIN and S.M. VIRTANEN, 2001
Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study.
Lancet **358**, 1500-1503
- JESSERER, H., 1961
Zur Pathologie des Calciumstoffwechsels.
Z. Ernährungswiss. Suppl. **1**, 81-89
- JONES, G., 1999
Metabolism and Catabolism of Vitamin D, Its Metabolites, and Clinically Relevant Analogs.
In: *Vitamin D Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications* (Ed.: M.F. Holick), Humana Press, Totowa, N J, pp. 57-84
- JONES, G., D. VRIEZEN, D. LOHNES, V. PALDA and N.S. EDWARDS, 1987
Side-chain hydroxylation of vitamin D₃ and its physiological implications.
Steroids **49**, 29-53
- KAUNE, R., S. MUNSON and D.D. BIKLE, 1994
Regulation of calmodulin binding to the ATP extractable 110 kDa protein (myosin I) from chicken duodenal brush border by 1,25-(OH)₂D₃.
Biochim. Biophys. Acta **1190**, 329-336
- KIM, Y. S., W.E. STUMPF, S.A. CLARK, M. SAR and H.F. DELUCA, 1983
Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in developing rat incisor teeth.
J. Dent. Res. **62**, 58-59
- KITANAKA, S., K. TAKEYAMA, A. MURAYAMA, T. SATO, K. OKUMURA, M. NOGAMI, Y. HASEGAWA, H. NIIMI, J. YANAGISAWA, T. TANAKA and S. KATO, 1998
Inactivating mutations in the 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene in patients with pseudovitamin D-deficiency rickets.
N. Engl. J. Med. **338**, 653-661
- KOEFLER, H. P., H. REICHEL, J.E. BISHOP and A.W. NORMAN, 1985

-
- gamma-Interferon stimulates production of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by normal human macrophages.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **127**, 596-603
- KOLLENKIRCHEN, U., J. FOX and M.R. WALTERS, 1991a
Normocalcemia without hyperparathyroidism in vitamin D-deficient rats.
J. Bone Miner. Res. **6**, 273-278
- KOLLENKIRCHEN, U., M.R. WALTERS and J. FOX, 1991b
Plasma Ca influences vitamin D metabolite levels as rats develop vitamin D deficiency.
Am. J. Physiol **260**, E447-E452
- KONG, X. F., X.H. ZHU, Y.L. PEI, D.M. JACKSON and M.F. HOLICK, 1999
Molecular cloning, characterization, and promoter analysis of the human 25-hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **96**, 6988-6993
- KOSTER, H. P., A. HARTOG, C.H. VAN OS and R.J. BINDELS, 1995
Calbindin-D28K facilitates cytosolic calcium diffusion without interfering with calcium signaling.
Cell Calcium **18**, 187-196
- LACHENMAIER-CURRLE, U. and J. HARMEYER, 1988
Intestinal absorption of calcium in newborn piglets. Role of vitamin D.
Biol. Neonate **53**, 327-335
- LI, Y. C., M. AMLING, A.E. PIRRO, M. PRIEMEL, J. MEUSE, R. BARON, G. DELLING and M.B. DEMAY, 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
- LI, Y. C., A.E. PIRRO, M. AMLING, G. DELLING, R. BARON, R. BRONSON and M.B. DEMAY, 1997
Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **94**, 9831-9835
- LIAN, J. B. and G.S. STEIN, 1993
The developmental stages of osteoblast growth and differentiation exhibit selective responses of genes to growth factors (TGF beta 1) and hormones (vitamin D and glucocorticoids).
J. Oral Implantol. **19**, 95-105
- LIEBERHERR, M., B. GROSSE, M. KACHKACHE and S. BALSAN, 1993

Cell signaling and estrogens in female rat osteoblasts: a possible involvement of unconventional nonnuclear receptors.
J. Bone Miner. Res. **8**, 1365-1376

LIU, L., A. KHASTGIR, J.M. MCCAULEY, S.T. DUNN, J.H. MORRISSEY, S. CHRISTAKOS, M.R. HUGHES and J.E. BOURDEAU, 1996
RT-PCR microlocalization of mRNAs for calbindin D28k and vitamin D receptor in the murine nephron.
Am. J. Physiol **270**, F677-F681

LÖFFLER, G., 1998
Elektronentransport und oxidative Phosphorylierung.
In: Biochemie und Pathobiochemie (Ed.: G. Löffler, P. Petrides), Springer, Berlin, pp. 496-518

LU Y, CHEN TC and M.F. HOLICK, 1992
Influence of season and time of day on the synthesis of vitamin D₃.
In: Biological Effects of Light (Ed.: M.F. Holick, Kligman AM), Walter de Gruyter, Berlin, pp. 57-61

LU, Y., T.C. CHEN and M.F. HOLICK, 1992
Influence of season and time of day on the synthesis of vitamin D₃.
In: Biological Effects of Light (Ed.: M.F. Holick, Kligman AM), Walter de Gruyter, Berlin, pp. 57-61

MACDONALD, P. N., D.R. SHERMAN, D.R. DOWD, S.C. JEFcoat, JR. and R.K. DELISLE, 1995
The vitamin D receptor interacts with general transcription factor IIB.
J. Biol. Chem. **270**, 4748-4752

MACLAUGHLIN, J. A., R.R. ANDERSON and M.F. HOLICK, 1982
Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D₃ and its photoisomers in human skin.
Science **216**, 1001-1003

MATHIEU, C. and K. BADENHOOP, 2005
Vitamin D and type 1 diabetes mellitus: state of the art.
Trends Endocrinol. Metab **16**, 261-266

MATSUOKA, L. Y., J. WORTSMAN, M.J. DANNENBERG, B.W. HOLLIS, Z. LU and M.F. HOLICK, 1992
Clothing prevents ultraviolet-B radiation-dependent photosynthesis of vitamin D₃.
J. Clin. Endocrinol. Metab **75**, 1099-1103

MCCULLOUGH, K. C., R. SCHAFFNER, V. NATALE, Y.B. KIM and A. SUMMERFIELD, 1997

-
- Phenotype of porcine monocytic cells: modulation of surface molecule expression upon monocyte differentiation into macrophages.
Vet. Immunol. Immunopathol. **58**, 265-275
- MEYER, H. and H. PLONAIT, 1968
[An inherited disorder of calcium metabolism in the pig (hereditary rickets)].
Zentralbl. Veterinarmed. A **15**, 481-483
- MEYRIER, A., D. VALEYRE, R. BOUILLON, F. PAILLARD, J.P. BATTESTI and R. GEORGES, 1985
Resorptive versus absorptive hypercalciuria in sarcoidosis: correlations with 25-hydroxy vitamin D3 and 1,25-dihydroxy vitamin D3 and parameters of disease activity.
Q. J. Med. **54**, 269-281
- MONKAWA, T., T. YOSHIDA, M. HAYASHI and T. SARUTA, 2000
Identification of 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene expression in macrophages.
Kidney Int. **58**, 559-568
- MONNIER, D. and J.P. LOEFFLER, 1998
Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates proenkephalin gene transcription through AP1- and CREB-dependent mechanisms.
DNA Cell Biol. **17**, 151-159
- NEMERE, I., Y. YOSHIMOTO and A.W. NORMAN, 1984
Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within fourteen minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D3.
Endocrinology **115**, 1476-1483
- NORMAN, A. W., B.J. FRANKEL, A.M. HELDT and G.M. GRODSKY, 1980
Vitamin-D Deficiency Inhibits Pancreatic-Secretion of Insulin.
Science **209**, 823-825
- NORMAN, A. W., W.H. OKAMURA, J.E. BISHOP and H.L. HENRY, 2002
Update on biological actions of 1alpha,25(OH)2-vitamin D3 (rapid effects) and 24R,25(OH)2-vitamin D3.
Mol. Cell Endocrinol. **197**, 1-13
- OHYAMA, Y., K. OZONO, M. UCHIDA, T. SHINKI, S. KATO, T. SUDA, O. YAMAMOTO, M. NOSHIRO and Y. KATO, 1994
Identification of a vitamin D-responsive element in the 5'-flanking region of the rat 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase gene.
J. Biol. Chem. **269**, 10545-10550
- OMDAHL, J. L., E.A. BOBROVNIKOVA, S. CHOE, P.P. DWIVEDI and B.K. MAY, 2001

-
- Overview of regulatory cytochrome P450 enzymes of the vitamin D pathway.
Steroids **66**, 381-389
- ONATE, S. A., S.Y. TSAI, M.J. TSAI and B.W. O'MALLEY, 1995
Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone
receptor superfamily.
Science **270**, 1354-1357
- OVERBERGH, L., B. DECALLONNE, D. VALCKX, A. VERSTUYF, J. DEPOVERE, J.
LAUREYS, O. RUTGEERTS, R. SAINT-ARNAUD, R. BOUILLON and C.
MATHIEU, 2000
Identification and immune regulation of 25-hydroxyvitamin D-1-alpha-
hydroxylase in murine macrophages.
Clin. Exp. Immunol. **120**, 139-146
- PANDA, D. K., D. MIAO, M.L. TREMBLAY, J. SIROIS, R. FAROOKHI, G.N. HENDY
and D. GOLTZMAN, 2001
Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1alpha -hydroxylase enzyme:
evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **98**, 7498-7503
- PARRY, G. C. and N. MACKMAN, 1997
Role of cyclic AMP response element-binding protein in cyclic AMP inhibition
of NF-kappaB-mediated transcription.
J. Immunol. **159**, 5450-5456
- PELEG, S., M. SASTRY, E.D. COLLINS, J.E. BISHOP and A.W. NORMAN, 1995
Distinct conformational changes induced by 20-epi analogues of 1 alpha,25-
dihydroxyvitamin D3 are associated with enhanced activation of the vitamin D
receptor.
J. Biol. Chem. **270**, 10551-10558
- PIKULEVA, I. A., I. BJORKHEM and M.R. WATERMAN, 1997
Expression, purification, and enzymatic properties of recombinant human
cytochrome P450c27 (CYP27).
Arch. Biochem. Biophys. **343**, 123-130
- PLONAIT, H., 1963
Eine nicht ernährungsbedingte Rachitis beim Schwein.
XVII. Welt-Tierärzte-Kongreß Hannover 1333-1334
- PLONAIT, H., 1965
[Hereditary rickets in sucking pigs].
Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. **72**, 255-256
- PLONAIT, H., 1969
Erbliche Rachitis der Saugferkel: Pathogenese und Therapie.

Zentralbl. Veterinarmed. A **16**, 271-316

PORCU, L., A. MELONI, L. CASULA, I. ASUNIS, M.G. MARINI, A. CAO and P. MOI, 2002b

A novel splicing defect (IVS6+1G>T) in a patient with pseudovitamin D deficiency rickets.

J. Endocrinol. Invest **25**, 557-560

PORCU, L., A. MELONI, L. CASULA, I. ASUNIS, M.G. MARINI, A. CAO and P. MOI, 2002a

A novel splicing defect (IVS6+1G>T) in a patient with pseudovitamin D deficiency rickets.

J. Endocrinol. Invest **25**, 557-560

PRADER, A., R. ILLIG and E. HEIERLI, 1961

Eine besondere Form der primären Vitamin-D-resistenten Rachitis mit Hypocalcämie und autosomal-dominantem Erbgang: die hereditäre Pseudo-Mangel-Rachitis.

Helv. Paediatr. Acta **16**, 452-468

PROVEDINI, D. M., C.D. TSOUKAS, L.J. DEFTOS and S.C. MANOLAGAS, 1986

1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D₃-binding macromolecules in human B lymphocytes: effects on immunoglobulin production.

J. Immunol. **136**, 2734-2740

PRYKE, A. M., C. DUGGAN, C.P. WHITE, S. POSEN and R.S. MASON, 1990

Tumor necrosis factor-alpha induces vitamin D-1-hydroxylase activity in normal human alveolar macrophages.

J. Cell Physiol **142**, 652-656

REICHEL, H., H.P. KOEFFLER, R. BARBERS and A.W. NORMAN, 1987a

Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ production by cultured alveolar macrophages from normal human donors and from patients with pulmonary sarcoidosis.

J. Clin. Endocrinol. Metab **65**, 1201-1209

REICHEL, H., H.P. KOEFFLER and A.W. NORMAN, 1987b

Synthesis in vitro of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and 24,25-dihydroxyvitamin D₃ by interferon-gamma-stimulated normal human bone marrow and alveolar macrophages.

J. Biol. Chem. **262**, 10931-10937

SCHUESSLER, M., N. ASTECKER, G. HERZIG, G. VORISEK and I. SCHUSTER, 2001

Skin is an autonomous organ in synthesis, two-step activation and degradation of vitamin D(3): CYP27 in epidermis completes the set of essential vitamin D(3)-hydroxylases.

Steroids **66**, 399-408

SCHWARTZ, Z., D.L. SCHLADER, L.D. SWAIN and B.D. BOYAN, 1988
Direct effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and 24,25-dihydroxyvitamin D₃ on growth zone and resting zone chondrocyte membrane alkaline phosphatase and phospholipase-A₂ specific activities.
Endocrinology **123**, 2878-2884

SEGREV IN, RHOTEN WB, 1994
Video imaging of intracellular calcium in insulinoma cells: effects of 1,25-(OH)₂D₃.
In: Proceedings of the Ninth Workshop on Vitamin D, (Ed.: May 28-June 2), Orlando,Fl, pp. 355-356

SEGREV, I.N., W.B. RHOTEN, 1994
Video imaging of intracellular calcium in insulinoma cells: effects of 1,25-(OH)₂D₃.
In: Proceedings of the Ninth Workshop on Vitamin D, Orlando,Fl, pp. 355-356

SELLES, J. and R. BOLAND, 1991
Evidence on the participation of the 3',5'-cyclic AMP pathway in the non-genomic action of 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ in cardiac muscle.
Mol. Cell Endocrinol. **82**, 229-235

SMITH, E. L., N.C. WALWORTH and M.F. HOLICK, 1986
Effect of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ on the morphologic and biochemical differentiation of cultured human epidermal keratinocytes grown in serum-free conditions.
J. Invest Dermatol. **86**, 709-714

SMITH, S. J., A.K. RUCKA, J.L. BERRY, M. DAVIES, S. MYLCHREEST, C.R. PATERSON, D.A. HEATH, M. TASSABEHJI, A.P. READ, A.P. MEE and E.B. MAWER, 1999
Novel mutations in the 1alpha-hydroxylase (P450c1) gene in three families with pseudovitamin D-deficiency rickets resulting in loss of functional enzyme activity in blood-derived macrophages.
J. Bone Miner. Res. **14**, 730-739

STRACHAN, T., A.P. READ, 2006
Pathogenic mutations.
In: Human Molecular Genetics 2 (Ed.: NCBI), Garland Science, pp. 1-7

STRODER, J., 1973
[Infection resistance in rickets].
Monatsschr. Kinderheilkd. **121**, 354-359

STUMPF, W. E., S.A. CLARK, M. SAR and H.F. DELUCA, 1984

-
- Topographical and developmental studies on target sites of 1,25 (OH)₂ vitamin D₃ in skin.
Cell Tissue Res. **238**, 489-496
- STUMPF, W. E., M. SAR, R. NARBAITZ, S. HUANG and H.F. DELUCA, 1983
Autoradiographic localization of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in rat placenta and yolk sac.
Horm. Res. **18**, 215-220
- STUMPF, W. E., M. SAR, F.A. REID, Y. TANAKA and H.F. DELUCA, 1979
Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid.
Science **206**, 1188-1190
- 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
- TSOUKAS, C. D., D.M. PROVVEDINI and S.C. MANOLAGAS, 1984
1,25-dihydroxyvitamin D₃: a novel immunoregulatory hormone.
Science **224**, 1438-1440
- UNDERWOOD, J. L. and H.F. DELUCA, 1984
Vitamin D is not directly necessary for bone growth and mineralization.
Am. J. Physiol **246**, E493-E498
- VAN CROMPHAUT, S. J., M. DEWERCHIN, J.G. HOENDEROP, I. STOCKMANS, E. VAN HERCK, S. KATO, R.J. BINDELS, D. COLLEN, P. CARMELIET, R. BOUILLON and G. CARMELIET, 2001
Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **98**, 13324-13329
- VELLUZ, L. and G. AMIARD, 1949
Chimie organique - le precalciferol.
Compt Rend **228**, 692-694
- VINK-VAN WIJNGAARDEN, T., H.A. POLS, C.J. BUURMAN, G.J. VAN DEN BEMD, L.C. DORSSERS, J.C. BIRKENHAGER and J.P. VAN LEEUWEN, 1994
Inhibition of breast cancer cell growth by combined treatment with vitamin D₃ analogues and tamoxifen.
Cancer Res. **54**, 5711-5717
- WALTERS, M. R., T.T. ILENCHUK and W.C. CLAYCOMB, 1987
1,25-Dihydroxyvitamin D₃ stimulates 45Ca²⁺ uptake by cultured adult rat ventricular cardiac muscle cells.

-
- J. Biol. Chem. **262**, 2536-2541
- WALTERS, M. R., U. KOLLENKIRCHEN and J. FOX, 1992
What is vitamin D deficiency?
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **199**, 385-393
- WANG, J. T., C.J. LIN, S.M. BURRIDGE, G.K. FU, M. LABUDA, A.A. PORTALE and W.L. MILLER, 1998
Genetics of vitamin D 1alpha-hydroxylase deficiency in 17 families.
Am. J. Hum. Genet. **63**, 1694-1702
- WANG, X., M.Y. ZHANG, W.L. MILLER and A.A. PORTALE, 2002
Novel gene mutations in patients with 1alpha-hydroxylase deficiency that confer partial enzyme activity in vitro.
J. Clin. Endocrinol. Metab **87**, 2424-2430
- WEBB, A. R., L. KLINE and M.F. HOLICK, 1988
Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D3: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D3 synthesis in human skin.
J. Clin. Endocrinol. Metab **67**, 373-378
- WECKSLER, W. R., W.H. OKAMURA and A.W. NORMAN, 1978
Studies on the mode of action of vitamin D--XIV. Quantitative assessment of the structural requirements for the interaction of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 with its chick intestinal mucosa receptor system.
J. Steroid Biochem. **9**, 929-937
- WINDHAUS, A., SCHENCK F and WEDER FV, 1936
Über das Antirachitisch Wirksame Bestrahlungsprodukt aus 7-Dehydro-Cholesterin.
Hoppe-Seylers Z Physiol Chem **241**, 100-103
- WINKLER, I., F. SCHREINER and J. HARMEYER, 1986
Absence of renal 25-hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase activity in a pig strain with vitamin D-dependent rickets.
Calcif. Tissue Int. **38**, 87-94
- WU, S., J. FINCH, M. ZHONG, E. SLATOPOLSKY, M. GRIEFF and A.J. BROWN, 1996
Expression of the renal 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase gene: regulation by dietary phosphate.
Am. J. Physiol **271**, F203-F208
- XIE, Z., S.J. MUNSON, N. HUANG, A.A. PORTALE, W.L. MILLER and D.D. BIKLE, 2002
The mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) autoregulation in keratinocytes.

-
- J. Biol. Chem. **277**, 36987-36990
- YAMAMOTO, K., E. UCHIDA, N. URUSHINO, T. SAKAKI, N. KAGAWA, N. SAWADA, M. KAMAKURA, S. KATO, K. INOUE and S. YAMADA, 2005
Identification of the amino acid residue of CYP27B1 responsible for binding of 25-hydroxyvitamin D3 whose mutation causes vitamin D-dependent rickets type 1.
J. Biol. Chem. **280**, 30511-30516
- YAMAMOTO, M., Y. KAWANOBE, H. TAKAHASHI, E. SHIMAZAWA, S. KIMURA and E. OGATA, 1984
Vitamin D deficiency and renal calcium transport in the rat.
J. Clin. Invest **74**, 507-513
- YOSHIDA, T., T. MONKAWA, H.S. TENENHOUSE, P. GOODYER, T. SHINKI, T. SUDA, S. WAKINO, M. HAYASHI and T. SARUTA, 1998
Two novel 1 α -hydroxylase mutations in French-Canadians with vitamin D dependency rickets type I1.
Kidney Int. **54**, 1437-1443
- YOSHIZAWA, T., Y. HANDA, Y. UEMATSU, S. TAKEDA, K. SEKINE, Y. YOSHIHARA, T. KAWAKAMI, K. ARIOKA, H. SATO, Y. UCHIYAMA, S. MASUSHIGE, A. FUKAMIZU, T. MATSUMOTO and S. KATO, 1997
Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning.
Nat. Genet. **16**, 391-396
- ZEHNDER, D., R. BLAND, M.C. WILLIAMS, R.W. MCNINCH, A.J. HOWIE, P.M. STEWART and M. HEWISON, 2001
Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 α -hydroxylase.
J. Clin. Endocrinol. Metab **86**, 888-894
- ZEITZ, U., K. WEBER, D.W. SOEGIARTO, E. WOLF, R. BALLING and R.G. ERBEN, 2003
Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor.
FASEB J. **17**, 509-511
- ZIEROLD, C., H.M. DARWISH and H.F. DELUCA, 1994
Identification of a vitamin D-response element in the rat calcidiol (25-hydroxyvitamin D3) 24-hydroxylase gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **91**, 900-902

9 Danksagung

Für die Überlassung des Themas und für die Betreuung dieser Dissertation gilt mein besonderer Dank Herrn Univ.- Prof. Dr. Dr. Reinhold Erben und Frau Dr. Karin Weber.

Bei meinem Kollegen und Mitdoktoranden Bernhard Ludwig möchte ich mich herzlich für die gute Zusammenarbeit, die sehr nette Atmosphäre und die viele großzügige Hilfe, bei der Betreuung der Tiere und der Arbeit mit den Schweinen bedanken.

Den Mitgliedern des Graduierten-Kolleg 1029 danke ich für die Überlassung des Stipendiums, die damit verbundene finanzielle Unterstützung und ihre freundliche Kollegialität.

Bei Herrn Ao.Univ.Prof. Dr.rer.nat. Ralf Steinborn möchte ich mich für die Hilfe bei der Etablierung der ARMS-qPCR und die freundliche Beratung bedanken.

Für die freundliche Unterstützung bei der Kultivierung der Schweine-Makrophagen möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernd Kaspers und seinen Mitarbeitern bedanken.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Erben, sowohl in München als auch in Wien, besonders aber Claudia Bergow und Sieglinde Hirmer, möchte ich für die nette Atmosphäre und die freundliche Unterstützung danken. Besonders möchte ich mich auch bei Dr. Leopold Fröhlich für die großzügige Hilfe im Labor, beim Kongress in Prag und bei meiner Dissertation bedanken.

Bei meinen Mitdoktorandinnen und Freundinnen möchte ich mich an dieser Stelle für die wirklich gute Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfe bedanken. Tine Hesse, Kathrin Odörfer und Katharina Mildner haben mit ihrer netten Art und einem stets offenen Ohr sehr dazu beigetragen, dass ich mich bei meiner Arbeit wohl gefühlt habe.

Herrn Univ.Prof. Dr.rer.nat. Armin Saalmüller und seinen Mitarbeitern in der klinischen Immunologie der VU Wien danke ich für die Unterstützung in der Zellkultur.

Für die Versorgung und Pflege der Tiere in den Stallungen des Instituts für Tierschutz, Haltung und Verhalten der LMU in München danke ich Herrn Prof. Dr. Erhard und seinen Mitarbeitern.

Beim Lehr- und Forschungs-Gut der VU Wien und seinen Mitarbeitern möchte ich mich für die Versorgung und Pflege der Tiere bedanken, nachdem die Schweine nach Wien übersiedelt waren und dort aufgestellt wurden.

Für die Hilfe bei der medizinischen Versorgung der Schweine möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Heinritzi von der Klinik für Schweine der LMU München und seinen Mitarbeitern bedanken.

Den Mitarbeitern der Klinik für Gynäkologie und Andrologie danke ich für die Hilfe bei der Zucht der PVDR I-Schweine, die eine echte Herausforderung war.

