

**Die Rolle von CalbindinD28k für die Kalzium-  
Homöostase und Glukosetoleranz bei der Maus**

**Von Eva Wüstmann  
aus Erlangen**

**München 2006**

Aus dem Institut für  
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung  
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Geschäftsführender Vorstand:  
Univ.-Prof. Dr. H.-J. Gabius

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

## **Die Rolle von CalbindinD28k für die Kalzium-Homöostase und Glukosetoleranz bei der Maus**

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

Von  
Eva Wüstmann  
aus Erlangen

München 2006

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Priv.-Doz. Dr. Dr. R. G. Erben

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. R. Schulz

Tag der Promotion: 10. Februar 2006

**In Liebe meinen Eltern und Schwestern**

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>		I-III
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
<b>2.</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	3
<b>2.1.</b>	<b>Vitamin D<sub>3</sub></b> .....	3
2.1.1.	Struktur, Synthese und Metabolismus .....	3
2.1.2.	Regulation des Vitamin D-Metabolismus .....	6
2.1.3.	Der Vitamin D-Rezeptor .....	7
2.1.4.	Physiologische Wirkungen des Vitamin D <sub>3</sub> .....	9
2.1.4.1.	Schnelle und nicht genomische Effekte des Vitamin D <sub>3</sub> .....	9
2.1.4.2.	Genomische Wirkungen des Vitamin D <sub>3</sub> .....	10
2.1.4.2.1.	Klassische Zielorgane des Vitamin D <sub>3</sub> .....	11
2.1.4.2.1.1.	Wirkung auf den Darm .....	11
2.1.4.2.1.2.	Wirkung auf die Niere .....	13
2.1.4.2.1.3.	Wirkung auf den Knochen.....	15
2.1.4.2.2.	Nicht-klassische Zielorgane des Vitamin D <sub>3</sub> .....	16
2.1.4.2.2.1.	Hämatopoetisches System .....	16
2.1.4.2.2.2.	Immunsystem .....	16
2.1.4.2.2.3.	Haut.....	17
2.1.4.2.2.4.	Pankreas .....	17
2.1.5.	Vitamin D-abhängige Erkrankungen.....	19
2.1.5.1.	Rachitis und Osteomalazie.....	19
2.1.5.2.	Die hereditäre Vitamin D-abhängige Rachitis.....	20
<b>2.2.</b>	<b>Vitamin D-abhängige Kalzium-bindende Proteine</b> .....	22
2.2.1.	Vorkommen, chemische und molekulare Aspekte .....	22
2.2.2.	Funktionelle Überlegungen .....	24
2.2.2.1.	Calbindin in der Niere .....	25
2.2.2.2.	Calbindin im Knochen .....	27
2.2.2.3.	Calbindin im Nervensystem.....	28
2.2.2.4.	Calbindin im Uterus .....	29
2.2.2.5.	Calbindin im Pankreas .....	30
2.2.2.6.	Calbindin im Darm .....	32

2.2.2.7.	Veränderungen des Calbindin bei verschiedenen Krankheitsbildern .....	34
2.2.3.1.	Intestinales CalbindinD9k .....	34
2.2.3.2.	Neuronales CalbindinD28k .....	35
2.2.3.2.1.	Epilepsie .....	35
2.2.3.2.2.	Morbus Alzheimer .....	35
<b>2.3.</b>	<b>Ziel und Fragestellung der Arbeit</b> .....	<b>36</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1.</b>	<b>Tiermodelle</b> .....	<b>37</b>
3.1.1.	Die VDR-Knockout-Mäuse .....	37
3.1.2.	Die CalbindinD28k-Knockout-Mäuse .....	37
3.1.3.	Die Doppel-Knockout-Mäuse .....	38
<b>3.2.</b>	<b>Genotypisierung der Versuchstiere</b> .....	<b>38</b>
3.2.1.	Genotypisierung der VDR-Mutanten .....	38
3.2.1.1.	Isolierung genomischer DNA .....	38
3.2.1.2.	PCR (= polymerase chain reaction) .....	39
3.2.2.	Genotypisierung der CalbindinD28k-Knockout-Mäuse .....	40
3.2.3.	Genotypisierung der Doppel-Knockout-Mäuse .....	42
<b>3.3.</b>	<b>Tierhaltung</b> .....	<b>42</b>
<b>3.4.</b>	<b>Zuchtstrategie</b> .....	<b>43</b>
<b>3.5.</b>	<b>Tierversuche</b> .....	<b>45</b>
3.5.1.	Streptozotocin-induzierter Diabetes mellitus bei VDR- und CalD28k-Mutanten .....	45
3.5.2.	Subkutane Glukosetoleranz bei VDR/CalD28k-Doppelmutanten .....	46
3.5.3.	Untersuchung der CalbindinD28k-Mutanten .....	47
<b>3.6.</b>	<b>Analyse biochemischer Parameter</b> .....	<b>48</b>
3.6.1.	Urinanalyse .....	48
3.6.2.	Serumanalyse .....	49
<b>3.7.</b>	<b>Histologie und Histomorphometrie</b> .....	<b>49</b>
3.7.1.	Herstellung der Knochenschnitte für die Histologie .....	49
3.7.1.1.	Präparation, Fixierung und Entwässerung der Knochen .....	49
3.7.1.2.	Infiltration und Einbettung .....	50
3.7.1.3.	Herstellung der histologischen Knochenschnitte .....	51
3.7.1.4.	Färbung der Schnitte für die Histologie .....	52

## Inhaltsverzeichnis

3.7.1.5.	Histomorphometrische Messgen.....	53
3.7.1.6.	Statische Parameter .....	53
3.7.1.7.	Dynamische Parameter .....	54
<b>3.8.</b>	<b>Knochenmineraldichtemessung</b> .....	<b>54</b>
<b>3.9.</b>	<b>Statistik</b> .....	<b>56</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>57</b>
<b>4.1.</b>	<b>CalbindinD28k-Mauslinie</b> .....	<b>57</b>
4.1.1.	Phänotypische Veränderungen.....	57
4.1.2.	Biochemische Parameter in Serum und Urin .....	57
4.1.3.	Histologische Knochenuntersuchung.....	60
4.1.4.	Knochenmineraldichtemessung .....	62
4.1.4.1.	Femurschaft.....	62
4.1.4.2.	Femur-Metaphyse.....	63
<b>4.2.</b>	<b>VDR/CalbindinD28k-Doppel-Mutanten</b> .....	<b>65</b>
4.2.1.	Phänotypische Veränderungen.....	65
4.2.2.	Biochemische Parameter in Serum und Urin .....	66
4.2.3.	Histologische Knochenuntersuchung.....	72
4.2.4.	Knochenmineraldichtemessung .....	74
4.2.4.1.	Femurschaft.....	74
4.2.4.2.	Femur-Metaphyse.....	79
4.2.5.	Subkutaner Glukosetoleranztest.....	84
4.2.6.	Streptozotocin-induzierter Diabetes mellitus bei VDR- und CalD28k-Mutanten.....	87
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>90</b>
<b>5.1.</b>	<b>Interaktion von CalbindinD28k und VDR in der Regulation der Kalzium-Homöostase</b> .....	<b>90</b>
<b>5.2.</b>	<b>Glukosetoleranz bei CalbindinD28k-/VDR-Doppel-Mutanten</b> .....	<b>96</b>
<b>5.3.</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>100</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>101</b>
<b>7.</b>	<b>Summary</b> .....	<b>103</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>105</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>125</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>126</b>

## Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
aqua dest	Aqua destillata ( destilliertes Wasser )
APES	3-Aminopropyltriethoxy-Silan
AUC	Area under the curve
Ba	Barium
BMD	bone mineral density ( Knochenmineraldichte)
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca	Kalzium
CalD9k	CalbindinD9k
Cal28k	CalbindinD28k
Cd	Cadmium
Co	Kobalt
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Crea	Creatinin
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DNA	Desoxyribonukleidsäure
dl	Deziliter
dNTPs	Desoxynukleotid-Triphosphate
7-DHC	7- Dehydrocholesterol
25(OH)D <sub>3</sub>	25-hydroxycoleciferol
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et altera (und weitere Personen)
G	Guanin
g	Gramm
HCl	Salzsäure
Hyp	Hypophosphatämie



## Abkürzungen

i.p.	intraperitoneal (innerhalb des Bauchfells, im Bauchraum)
IU	international unit (internationale Einheit)
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
KDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
M	molar
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
mM/mmol	millimolar
MMA	Methylmethacrylat
Mn	Mangan
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
N	normal
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natronlauge
neo	Neomycinphosphotransferase
nm	Nanometer
PCR	Polymerase-chain-reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDDR	Pseudo-Vitamin D-Deficiency-Rickets
PFA	Paraformaldehyd
pH	pondus Hydrogenii
p.i.	post injectionem (nach dem Zeitpunkt der Injektion)
PKC	Proteinkinase C
pmol	pikomol

## Abkürzungen

PTH	Parathormon
RAR	Retinsäure-Rezeptoren
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sr	Strontium
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat/EDTA
TE	Tris/EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRCa	Tubuläre Reabsorption von Kalzium
TRP	Tubuläre Reabsorption von Phosphat
U	Einheit der enzymatischen Aktivität
UrCa	Kalzium im Urin gemessen
UrCrea	Creatinin im Urin gemessen
UrNa	Natrium im Urin gemessen
V	Volt
VDR	Vitamin D – Rezeptor
VDREs	Vitamin D – responsive elements
Wt	Wildtyp
XLH	X-linked hypophosphatemic rickets
Zn	Zink
-/-	homozygot
+/-	heterozygot

## **1. Einleitung**

Seit langem ist bekannt, dass Vitamin D eine wesentliche Rolle im Kalzium- und Phosphathaushalt und damit für die Integrität der Knochen spielt. Zusammen mit Parathormon (PTH) hält Vitamin D den Plasma-Kalziumspiegel konstant (Säugetiere: ca. 2,5 mmol/l) und stellt Kalzium bereit für die Knochenmineralisation. Sein aktiver Metabolit, das 1,25-Dihydroxyvitamin<sub>D</sub><sub>3</sub>, hat in erster Linie den Darm, die Nieren und die Knochen als Zielorgane. Im Dünndarm findet die enterale Kalzium- und Phosphatabsorption statt, die Knochen speichern Kalzium für dessen Bereitstellung und die Nieren sind Ort der 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Biosynthese und der renalen Kalzium- und Phosphat-Reabsorption.

1969 vollzogen HAUSSLER und NORMAN einen wichtigen Schritt in der Vitamin D-Forschung. Sie lieferten zum ersten Mal den Beweis, dass dieses Vitamin nur über die Bindung an einen spezifischen Rezeptor, dem sogenannten Vitamin-D-Rezeptor, seine physiologische Wirkung im Darm entfalten kann. Später entdeckte man diesen Rezeptor auch in anderen Zielgeweben wie in den Knochen (KREAM et al., 1977), in der Nebenschilddrüse (BRUMBAUGH et al., 1975), in der Niere (CHANDLER et al., 1979), und in nicht-typischen Zielgeweben wie zum Beispiel Pankreas, reproduktive Organe, Haut etc.

Seit Jahren wird an den vielen verschiedenen Funktionen des Vitamin D geforscht. Interessanterweise belegen bisherige Studien, dass es Einfluss auf die pankreatische Insulinsekretion nimmt, und zwar unabhängig von Veränderungen der Kalzium-Homöostase und des Körpergewichts. Bei Mäusen mit inaktiviertem VDR zeigt sich eine verminderte Insulinsekretionskapazität (ZEITZ et al., 2003). Die Aufklärung der molekularen Rolle des VDR in der pankreatischen Insulinsekretion und der genauen Wirkungsweise des Vitamin D bei diesem Prozess, zu der unsere Studie beitragen soll, könnte zu wichtigen neuen Impulsen für die Prophylaxe und Therapie des Diabetes mellitus führen. Aufgrund bisheriger Ergebnisse scheint es möglich, dass die Assoziation zwischen VDR und der Inzidenz von Typ-I-Diabetes in humanen Populationen durch einen latenten Defekt in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas verursacht wird. Die Überprüfung dieser Frage ist deshalb von großer Wichtigkeit für die Diabetes-Grundlagenforschung.

Das Kalzium-bindende, Vitamin D-abhängige CalbindinD28k wurde zum ersten Mal 1966 von WASSERMANN und TAYLOR im Darm des Vogels entdeckt. Seitdem ist es in vielen Geweben identifiziert worden, meist in solchen, in denen auch der VDR zu finden ist. Auch dessen Vitamin D-Abhängigkeit ist bekannt. Die genaue molekulare Rolle dieses Proteins ist bisher noch nicht aufgeklärt. Vermutet wird, aufgrund seiner Kapazität Kalzium zu binden, eine Beteiligung an der Kalzium-Homöostase. Bekannt ist die Existenz der Calbindine unter anderem in der Niere (RHOTEN et al., 1985) und deren Abhängigkeit von Vitamin D. Inwieweit es jedoch am Kalzium-Transport beziehungsweise an der renal-tubulären Kalzium-Rückresorption beteiligt ist, muss noch geklärt werden und ist gleichzeitig Fragestellung unserer Studie. Von der Existenz des CalbindinD28k in den Osteoblasten berichtet BALMAIN et al., 1986, doch auch hier ist die Funktion nicht klar. In unserer Studie untersuchen wir junge und ältere CalbindinD28k-Knock-out-Mäuse, um Aufschluss über die Rolle dieses Proteins in der Kalzium-Homöostase zu bekommen.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist dessen Funktion im Kohlenhydratstoffwechsel. Über die Existenz des Calbindins in den insulinsezernierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas berichtete schon MORRISEY et al. (1975) und KADOWAKI et al. (1984). Seitdem gab es einige Studien über dessen Funktion in den  $\beta$ -Zellen. SOOY et al. (1999) zeigten eine erhöhte Insulinsekretion in  $\beta$ -Zellen von CalbindinD28k-Knock-out-Mäusen, REDDY et al. (1997) stellten zwei Jahre zuvor das Gegenteil fest. Die vorliegende Studie sollte klären, ob und inwieweit dieses Protein eine Rolle für die Glukose-induzierte Insulinsekretion in vivo spielt und ob es in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen eine wechselseitige, molekulare Interaktion zwischen dem VDR und dem CalbindinD28k gibt. Wie auch schon ZHENG et al. (2004) generierten wir ein VDR/CalbindinD28k-Doppel-Knockout-Mausmodell, um diesen Fragen nachzugehen und untersuchten bei diesen Tieren im Alter von 3 Monaten Urin, Serum und die Knochen mit Hilfe histomorphometrischer und knochendensiometrischer Methoden. Um eventuelle Unterschiede bezüglich des Alters herauszustellen, unterzogen wir 9 Monate alte CalbindinD28k-Knockout-Mäuse derselben Untersuchung. Um Aufschluss über eine Beteiligung am Kohlenhydrat-Stoffwechsel zu bekommen, führten wir Glukosetoleranztests an VDR/CalbindinD28k-Doppel-Knockouts durch und betrachteten die Empfindlichkeit der VDR- und CalbindinD28k-Mutanten, an Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus zu erkranken.

## **2. Literaturübersicht**

### **2.1. Vitamin D**

Vitamin D ist notwendig für eine normale Entwicklung und spätere Instandhaltung der Knochen und spielt eine wesentliche Rolle im Kalzium- und Phosphathaushalt. 1919 machte Sir Edward Mellanby die Entdeckung, dass Rachitis auf einen Ernährungsmangel zurückzuführen ist und isolierte eine fettlösliche, antirachitische Substanz aus Fischleberöl und anderen Lebensmitteln und identifizierte diese als Vitamin D<sub>2</sub> (MELLANBY et al., 1919). Eine Heilung von Kindern, die unter Rachitis litten, erfolgte nach Exposition dieser Patienten unter UV-Licht (HULDSCHINSKY, 1919). Damit war ein grosser Schritt in der Behandlung der weit verbreiteten Rachitis getan und man erkannte, dass sowohl die UV-Bestrahlung der Patienten, als auch die Gabe von Vitamin D beziehungsweise Vitamin D-haltigen Lebensmitteln, vergleichbare Wirkung in Bezug auf die Heilung von Rachitis hat (HESS und WEINSTOCK, 1924).

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass dieses Vitamin entweder – durch UV-Licht induziert – vom Körper selbst hergestellt wird, oder mit der Nahrung aufgenommen werden muss, um seine Aktivität entfalten zu können.

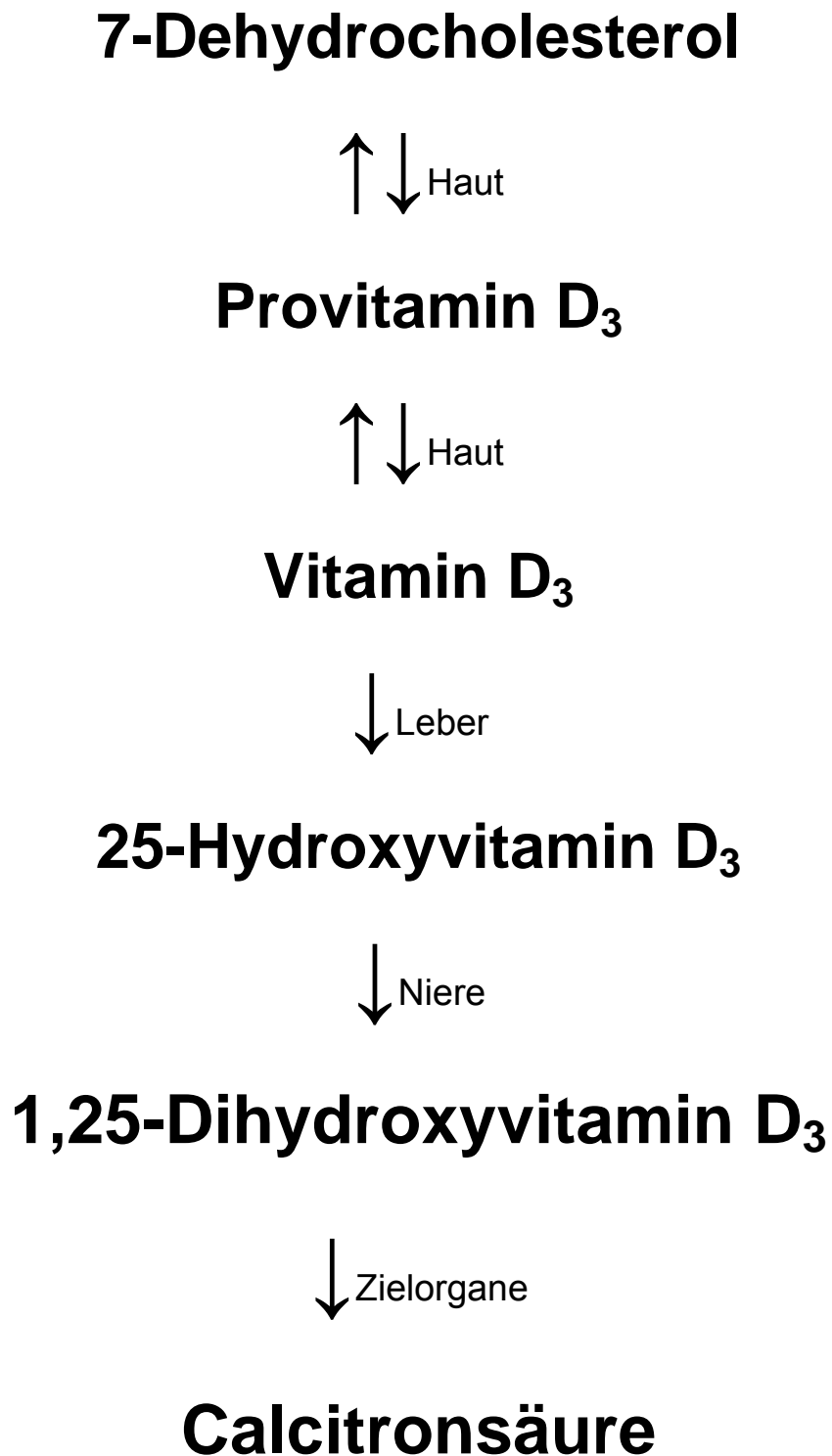
#### **2.1.1. Struktur, Synthese und Metabolismus**

Vitamin D<sub>3</sub>, auch Cholecalciferol genannt, kann also mit der Nahrung aufgenommen werden oder durch die Wirkung des Sonnenlichts auf den Organismus von diesem selbst synthetisiert werden. Nur wenige Lebensmittel, etwa wie Leber, Fischöle und Eigelb weisen bedeutende Gehalte an Vitamin D<sub>2</sub> und D<sub>3</sub> auf, jedoch gibt es heutzutage eine Reihe von Nahrungsmitteln, die mit Vitamin D angereichert sind, um den körperlichen Bedarf daran zu decken.

In den Hepatozyten beginnt der erste Schritt der biologischen Aktivierung des Vitamin D, und somit die körpereigene Synthese, indem aus Cholesterol durch das Enzym Cholesteroldehydrogenase das 7- Dehydrocholesterol (7-DHC), auch Provitamin D genannt, entsteht. An Transportproteine gebunden gelangt das lipophile Mo-

lekül über die Blutbahn in die Haut, genauer gesagt zu den Keratinozyten. Durch UV-Licht bestimmter Wellenlänge (UVB, 290 – 315 nm) (MacLAUGHLIN et al., 1982) wird in allen Schichten der Haut, vor allem aber im Stratum basale und Stratum spinosum der Epidermis, eine photolytische Umwandlung von 7-DHC zu Provitamin D<sub>3</sub> induziert. Anschließend erfolgt eine temperaturabhängige Isomerisation zu Vitamin D<sub>3</sub> (HOLICK, 1981). Zur metabolischen Aktivierung dieses Vitamins wird es an spezifische Vitamin-D-Bindungsproteine gebunden über den Blutstrom in die Leber transportiert. Dort ist der erste Schritt die Hydroxylierung des Carbon 25 in den Hepatozyten, wobei auch von anderen Geweben berichtet wird, in denen dieser Reaktionsschritt stattfindet soll, wie zum Beispiel Haut, Darm und Niere. Bei dem hier beteiligten Enzym handelt es sich um eine Cytochrom P450-abhängige, mitochondriale Hydroxylase (ANDERSSON et al., 1989) Die Beteiligung weiterer Enzyme konnte bis heute nicht nachgewiesen werden. Das entstandene Produkt ist das 25-Hydroxycholecalciferol (25(OH)D<sub>3</sub>). Dessen Spiegel im Blut steigt proportional zur Vitamin D-Aufnahme an, und wird deshalb im Allgemeinen als Indikator für die Vitamin D-Versorgung des Organismus verwendet (HOLICK, 1981). Der zweite und damit auch wesentliche Schritt in der Vitamin-D-Bioaktivierung ist die Hydroxylierung von 25-Hydroxycholecalciferol zu 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. Dieser Reaktionsschritt findet neben Makrophagen, Plazenta und anderen Geweben, hauptsächlich in der Niere statt und wird durch das Enzym 1- $\alpha$ -Hydroxylase, eine ebenfalls mitochondriale, Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase vermittelt (FRASER und KODICEK, 1970). Bei Erkrankungen, die mit einem Gewebsuntergang oder Funktionsverlust der Niere einhergehen, zeigen die Patienten daher häufig Störungen des Vitamin D-Haushaltes und die damit verbundenen, bekannten Folgen (HOLICK et al. 1972).

Herrscht in der Niere ein Überschuss an der biologisch aktiven Form des Vitamin D, baut die 24-Hydroxylase das 25-DihydroxyvitaminD<sub>3</sub> zu 24,25- DihydroxyvitaminD<sub>3</sub> ab (JONES et al., 1987). Dieser deaktivierte Metabolit besitzt eine 10 000mal geringere biologische Aktivität als seine aktive Form. Das Endprodukt des Vitamin-D-Stoffwechsels stellt die Calcitronsäure dar, welche in der Leber in die Gallenflüssigkeit sezerniert wird (Abb.1).



**Abb.1:** Vitamin D-Metabolismus

Beteiligte Schritte an der Produktion des Vitamin D<sub>3</sub> in der Haut, seine Aktivierung zum 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> und der Katabolismus zum wasserlöslichen Metaboliten Calcitriol

### **2.1.2. Regulation des Vitamin D-Metabolismus**

Die strenge Kontrolle des Serumspiegels von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wird durch die Kalzium- und Phosphatbedürfnisse des Tieres bestimmt und durch die Wirkung der klassischen Mineralhaushalt-regulierenden Zielorgane, wie Niere, Darm, Knochen und Nebenschilddrüse ausgeführt. Die Hauptregulatoren der  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Gehalte im Organismus sind das Parathormon (PTH), Kalzium, Phosphat und  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  selbst. Hypokalzämie lässt den  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegel im Serum ansteigen, indem die  $1\alpha$ -Hydroxylase in der Niere stimuliert wird, wohingegen Hyperkalzämie die Aktivität dieses Enzyms hemmt und die der 24-Hydroxylase ansteigen lässt, wodurch die metabolisch aktive Form des Vitamin D inaktiviert wird.

Bei Ratten zeigt sich nach erfolgter Parathyreoidektomie ebenso eine Induktion der renalen  $1\alpha$ -Hydroxylase infolge einer Hypokalzämie (GARABEDIAN et al., 1972). Eine Applikation von PTH an diese Tiere oder auch an Tiere mit intakter Nebenschilddrüse resultiert in einem Anstieg der  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Produktion.

Desweiteren zeigen Patienten, die unter einem Hypoparathyreoidismus leiden, niedrige Calcitriol-Werte und eine damit verbundenen Hypokalzämie (HAUSSLER et al., 1976). Auf der anderen Seite hemmt PTH die 24-Hydroxylase-Aktivität in der Niere und verlangsamt so den Prozess der  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Inaktivierung (HENRY, 1981).

Eine weitere wichtige Rolle in der Regulation des Vitamin D-Metabolismus spielt das Kalzium. Ratten wurden parathyreoidektomiert und mit PTH versorgt, um eine Hyperphosphatämie zu verhindern, die den Calcitriol-Spiegel sinken lässt. Bei diesen Versuchstieren sinken die Vitamin  $\text{D}_3$ -Spiegel, nachdem das Serum-Kalzium durch eine Kalziumchlorid-Infusion erhöht wurde, und steigen, nachdem das Serum-Kalzium durch eine EGTA-Infusion (ein Kalzium-Chelator) gesenkt wurde.

Der Phosphat-Haushalt der Tiere und natürlich auch der des Menschen nimmt ebenso grossen Einfluss auf die Regulation des Vitamin D-Metabolismus. Bei einer Reduzierung des Phosphats in der Nahrung steigt der  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegel im Serum und der der  $1\alpha$ -Hydroxylase in der Niere (TANAKA und DeLUCA, 1973).

Die Art und Weise, wie die Produktion des Vitamin  $\text{D}_3$  durch Phosphat beeinflusst wird, ist bisher unklar, aber es scheint unabhängig vom PTH-Spiegel (HUGHES et al., 1975) und von Veränderungen des Serum-Kalziums zu sein (BUSHINSKY et al., 1989). Des weiteren zeigen Ratten mit Phosphat-Mangel, die unter einem



Streptozotocin-induzierten Diabetes mellitus leiden, eine verringerte Stimulation der  $1\alpha$ -Hydroxylase-Aktivität, diese kann jedoch durch Insulin-Applikation wieder hergestellt werden (MATSUMOTO et al., 1986).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass auch Insulin in den Vitamin D-Haushalt eingreift. Jedoch herrscht auch in diesem Bereich noch große Unklarheit und weitere Studien müssen durchgeführt werden.

Um einer Vitamin D-Intoxikation vorzubeugen, bedient sich der Organismus dem System der Feedback-Regulation. Bei Vitamin D-Mangel-Tieren ist die Aktivität der  $1\alpha$ -Hydroxylase hoch und die der 24-Hydroxylase sehr gering. Bei hohen Vitamin D-Gaben dreht sich diese Reaktion um und verhindert so eine Intoxikation des Körpers mit Vitamin D.

Die Hauptregulatoren des Vitamin D-Metabolismus scheinen also Kalzium und Phosphat zu sein. Ist eine adäquate Aufnahme und Versorgung dieser Mineralstoffe gewährleistet, bleibt der Spiegel des zirkulierenden Calcitriols konstant erhalten.

### **2.1.3. Der Vitamin-D-Rezeptor**

Seine biologische Aktivität kann das Vitamin  $D_3$  nur über die Interaktion mit einem intrazellulären Rezeptor, dem sogenannten Vitamin-D-Rezeptor (VDR), entfalten, welcher eine hohe Bindungsaffinität gegenüber diesem Hormon besitzt (BRUMBAUGH und HAUSSLER, 1975).

HAUSSLER und NORMAN lieferten 1969 den ersten Beweis über die Existenz eines löslichen, circa 50-60 kDa grossen Proteins in den Nuklei intestinaler Mukosa, das den aktiven Metaboliten des Vitamin D spezifisch und mit hoher Affinität bindet. HOLICK et al. identifizierten diesen Metabolit 1972 als  $1,25(OH)_2D_3$ .

Die Tatsache, dass der Rezeptor zuerst im wichtigsten Zielorgan für Vitamin D entdeckt wurde, nämlich der intestinalen Mukosa, und wenig später auch in anderen Geweben die in die Regulation des Mineralhaushaltes eingreifen, etwa wie in den Knochen (KREAM et al., 1977), der Nebenschilddrüse (BRUMBAUGH et al., 1975) und der Niere (CHANDLER et al., 1979), unterstützte die Vermutung der Beteiligung des VDR an der Vitamin-D-Wirkung. In diesen Geweben zeigt sich die höchste Konzentration des VDR, jedoch konnte dessen Existenz auch in anderen Zielgeweben und Zelltypen des  $1,25(OH)_2D_3$  nachgewiesen werden, wie zum Beispiel

Beispiel in endokrinen Organen (Pankreas, Ovarien, Hoden), reproduktiven Geweben (Brust, Placenta, Uterus) und der Haut, der Ort, wo die Photobiosynthese des Vitamin D stattfindet.

Nach erfolgreicher Sequenzanalyse zeigte sich, dass dieser Rezeptor innerhalb der Steroidrezeptor-Superfamilie zur Subfamilie (Klasse II) der Schilddrüsenhormonrezeptoren gehört. Zu dieser Gruppe sind auch die Retinoid-X-Rezeptoren (RXR) und die Retinsäure-Rezeptoren (RAR) zu zählen (BAKER et al., 1988).

Betrachtet man die Struktur dieser Schilddrüsenhormon-Rezeptorgruppe zeigen sich bei allen zwei funktionelle Rezeptordomänen. C-terminal befindet sich die Hormonbindungsdomäne (beim VDR codiert von Exon 8 und 9) und N-terminal (beim VDR codiert durch die ersten beiden codierenden Exons) bilden zwei „Zinkfinger“ die DNA-Bindungsdomäne (DBD). Dieser letztere Bereich ermöglicht, nach der Aktivierung des Rezeptors, dessen Bindung an sogenannte VDREs (Vitamin D responsive elements) in der Promotorregion von Zielorganen. Die Hormonbindungsdomäne ist bei den verschiedenen Rezeptoren sehr variabel, entsprechend den unterschiedlichen Liganden. Beim VDR besteht die höchste Ligandenbindungsaktivität gegenüber  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Metaboliten. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei Metaboliten, die nur in der  $1\alpha$ - oder 25-Position hydroxyliert sind, eine 100 – 1000mal schwächere Bindungsaktivität (WECKSLER et al., 1978).

Das für den VDR codierende Gen befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 12(q) , bei Ratte und Maus auf Chromosom 7 (SZPIRER et al., 1991). Das Gen hat eine Länge von 45 kb und besteht aus 9 codierenden Exons.

Eine typische Eigenschaft dieser Rezeptoren ist die Fähigkeit, Heterodimere mit anderen Rezeptoren zu bilden. Entscheidend für die Aktivierung des Rezeptors, welche letztlich zur Transkriptionsregulation des Zielgens führt, ist das Zusammenwirken verschiedener Faktoren. Durch die Bindung des Liganden kommt es, vermutlich durch eine Konformationsänderung, zur Heterodimerisation (PELEG et al., 1995). Innerhalb weniger Minuten nach der Ligandenbindung kommt es zu einer Akkumulierung des VDR-Ligand-Komplexes im Kern (BARSONY et al., 1990).

Bei Mutationen, in denen der menschliche VDR die Fähigkeit verlor, mit dem RXR ein Heterodimer zu bilden, konnte keine Transkriptionsaktivierung der Zielgene festgestellt werden. Dieses Resultat lässt vermuten, dass Heterodimerisierung ein essentieller Vorgang für die Transkriptionsaktivierung der Zielgene durch den VDR ist.

Autoradiographische Techniken ermöglichten die Lokalisierung des VDR in einzelnen Zielzellen, wie im Darm, in der Niere, in der Nebenschilddrüse, in Neuronen des Gehirns und des Rückenmarks, in endokrinen Zellen des Magens, in pankreatischen  $\beta$ -Zellen, in retikulären Knochenmarkszellen, Chondroblasten und Osteoblasten (STUMPF et al., 1979).

Die genaue Funktion des VDR ist in vielen Zielzellen bis heute unklar und bedarf noch einer Reihe von Studien.

#### **2.1.4. Physiologische Wirkungen des Vitamin D<sub>3</sub>**

##### **2.1.4.1. Schnelle und nicht-genomische Effekte des Vitamin D<sub>3</sub>**

Neben den Effekten des Vitamin D<sub>3</sub> auf Transkriptionsebene gibt es auch schnelle Wirkungen, die unabhängig von Transkription und Proteinsynthese sein müssen, weil sie innerhalb weniger Sekunden bis Minuten eintreten, also auch nicht auf einem veränderten Proteinsynthesemuster der Zelle beruhen können. Es wird vermutet, dass diese sogenannten nicht-genomischen Effekte über membranständige Vitamin-D-Rezeptoren vermittelt werden – im Gegensatz zum nukleären VDR. Zu den nicht-genomischen, schnellen Wirkungen des Vitamin D zählen unter anderem der Phosphoinositid-Metabolismus (BOURDEAU et al., 1990), der Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels (LIEBERHERR, 1987), die Stimulation des intestinalen Kalziumtransports (NEMERE et al., 1984), die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) (SYLVIA et al., 1996) und der Phosphat-Fluss (KARSENTY et al., 1985). Lokalisiert wurden solche Wirkungen in verschiedenen Zielgeweben, wie im Muskel, in der Niere, in Fibroblasten, Hepatocyten, Chondrocyten, Keratinocyten, sowie in Insulinomzellen und Zellen des Hämatopoetischen Systems (BOURDEAU et al., 1990; SCHWARTZ et al., 1988; DESAI et al., 1986; SELLES und BOLAND, 1991) Im Darm des Huhnes stimuliert 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> den Fluss von Kalzium vom Lumen zur basolateralen Oberfläche innerhalb weniger Minuten. Begleitet wird diese Reaktion von einer erhöhten Phosphat-Absorption. Auch in den Osteoblasten führt 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> über eine Aktivierung der Phospholipase C und somit des Inositoltriphosphat/Diacylglycerol - Weges innerhalb weniger Minuten zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums (LIEBERHERR et al., 1994).

2002 zeigten ERBEN et al., dass Organe, die in die Kalzium-Homöostase involviert sind, etwa wie Knochen, Darm, Niere und Nebenschilddrüse, bei VDR-Knockout-Mäusen nicht auf hohe Dosen verschiedener Vitamin D-Metaboliten in vivo reagierten. Um schnelle, nicht-genomische Effekte bei diesen VDR-Knockout-Mäusen auf zellulärer Ebene zu testen, wurde der Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration in Osteoblasten nach Stimulation durch  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  überprüft. Die normalerweise schnelle Reaktion auf  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  blieb jedoch bei Osteoblasten dieser Nullmutanten völlig aus. Dies legt nahe, dass auch die schnellen, nicht-genomischen Effekte von Vitamin D-Metaboliten durch den nukleären VDR vermittelt werden.

Die Rolle dieser schnell eintretenden Effekte ist bis heute jedoch in vielen Geweben noch nicht aufgeklärt und verbleibt in den meisten Zellen unklar.

#### **2.1.4.2. Genomische Wirkungen des Vitamin D<sub>3</sub>**

Die zentrale und wesentliche Rolle des  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in der Regulation der Kalzium-Homöostase und des Knochen-Stoffwechsels sind seit langem bekannt. Das Ziel besteht darin, den Plasma-Kalzium-Spiegel konstant und stabil zu halten (Säugetiere: 2,5 mmol/l, 45% davon ionisiert) und Kalzium für die Knochenmineralisation bereitzuhalten, unter Einbeziehung des PTH.

Beteiligt an diesen Regelmechanismen sind zum einen der Dünndarm, als Ort der enteralen Kalzium- und Phosphatabsorption, die Nieren als Ort der  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Biosynthese und der renalen Kalzium- und Phosphatabsorption bzw. -reabsorption, die Knochen als wichtiger Kalziumspeicher und zu guter letzt die Nebenschilddrüse als Bildungsort des PTH.

Der nukleäre VDR wurde in allen klassischen Vitamin D-Zielorganen wie Darm, Niere, Knochen und Nebenschilddrüse gefunden. Des weiteren ließ er sich aber auch in Organen lokalisieren, die nicht an der Kalzium-Homöostase beteiligt sind, wie Haut, Muskel, Pankreas, Lunge, Herz, reproduktive Organe, hämatopoetisches System, Nerven- und Immunsystem (BERGER et al., 1988; CLEMENS et al., 1988).

### 2.1.4.2.1. Klassische Zielorgane des Vitamin D<sub>3</sub>

#### 2.1.4.2.1.1. Wirkung auf den Darm

Die wesentliche Rolle des 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> im Mineralhaushalt ist, die Kalzium-Absorption im Darm zu erleichtern, und somit für einen konstanten Kalzium-Spiegel im Blut zu sorgen.

1,25-Vitamin D<sub>3</sub> fördert und erleichtert den Eintritt von Kalzium durch die Plasmamembran in den Enterocyt, den Transport des Kalziums durch das Zytoplasma, und den Transfer dessen durch die basolaterale Membran in die Zirkulation des Organismus.

Es ist das einzig bekannte Hormon, das den intestinalen Kalzium-Transport *direkt* stimuliert. Andere Vitamin D-Metaboliten stimulieren diesen Transport zwar ebenso, aber erst bei einer höheren Konzentration, verbunden mit deren geringeren Affinität zum VDR. Es existieren zwei getrennte Mechanismen im Dünndarm zur Absorption von Kalzium – zum einen der passive, parazelluläre Transport und der aktive, transzelluläre Transport. Der Letztere findet vorwiegend im Duodenum und oberen Jejunum statt, wohingegen sich der parazelluläre Transport über die gesamte Länge des Darms erstreckt (BRONNER et al., 1986).

Die aktive transzelluläre Kalzium-Absorption lässt sich in drei Schritte untergliedern:

- 1) der Transfer des luminalen Kalziums in den Enterozyt
- 2) der intrazelluläre Transport von Kalzium vom Eintrittsort in die Zelle zur basolateralen Membran (während dieses Prozesses ist Kalzium an CalbindinD9k/D28k gebunden)
- 3) die aktive Ausschleusung aus der Zelle in die Zirkulation auf zwei Wegen
  - a) mit Hilfe der Plasma Membran Ca<sup>2+</sup>ATPase (PMCA 16)
  - b) mit Hilfe des Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauschers (NCX1)(HOENDEROP et al., 2000)

NCX1 beschränkt sich auf die Niere, wohingegen PMCA16 in Darm und Niere agiert. Studien zeigten, dass die Expression der intestinalen Plasmamembran-Ca<sup>2+</sup>ATPase durch 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> stimuliert wird (WASSERMANN et al., 1992; CAI et al., 1993). Beim Transport des Kalziums in die Zelle spielen die hochselektiven Kal-

ziumkanäle ECaC1 (TRPV5) und ECaC2 (TRPV6) eine wichtige Rolle. Das murine ECaC2 wird in einigen Zielgeweben des  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , vorallem im Bürstensaum der intestinalen, absorptiven Zellen (ZHUANG et al., 2002), inklusive der Haut und den Osteoblasten exprimiert, wohingegen sich die Expression des ECaC1 sich auf die Niere und den Darm beschränkt (WEBER et al., 2001). Ein Beweis der Regulation des ECaC1 durch Vitamin D lieferte eine Studie, bei der Ratten auf eine Vitamin D-Mangel-Diät gesetzt wurden. Neben dem Serum- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Spiegel, sank der mRNA- und Proteinspiegel des ECaC1 signifikant (HOENDEROP et al., 2001). Eine Versorgung dieser Tiere mit  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  mittels intraperitonealer Injektion resultierte in einer deutlichen Hochregulation der Expression des ECaC1. Caco-2-Zellen, die als humanes intestinales Zell-Modell verwendet werden, zeigen nach einer Verabreichung von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  einen Anstieg der ECaC2-Expression binnen 24h, das auch mit einem Anstieg der CalbindinD9k-Expression verbunden war (WOOD et al., 2001). DARDENNE et al., generierten 2001 ein Mausmodell mit inaktivem  $1\alpha$ -Hydroxylase-Gen. In den Knockout-Mäusen zeigte sich wie erwartet eine Verringerung der renalen ECaC1 und der intestinalen ECaC2-Expression, sowie ein Abfall des CalbindinD9k, im Vergleich zu den Wildtypen. WEBER et al. (2001) zeigten anhand von VDR-Mutanten, dass die murine ECaC-Expression durch den Kalzium-Spiegel reguliert wird und nicht durch die genomischen Effekte des Vitamin  $\text{D}_3$ . Bei Nullmutanten auf Normaldiät zeigte sich ein deutlicher Abfall der ECaC1 und 2-Expression, setzte man diese Nullmutanten jedoch auf eine spezielle Kalziumreiche Diät (sog. Rescue diet) lässt sich keinerlei Veränderung in der Expression im Vergleich zu den Wildtypen feststellen. ECaC2 von Mensch und Maus lassen sich stets in Verbindung mit CalbindinD9k und /oder -D28k lokalisieren, was die Vermutung nahe legt, dass der apikale ECaC und intrazelluläre Ca-bindende Proteine Teile der Kaskade sind, die den Kalziumeintritt und die intrazelluläre Kalzium-Konzentration in vielen Geweben reguliert. Die Analyse der Promotor-Regionen der humanen und murinen ECaC1- und ECaC2-Gene offenbarte Vitamin D responsive elements, was eine Erklärung für den Vitamin D-vermittelten Anstieg der ECaC-Expression darstellen könnte (WEBER et al., 2001; HOENDEROP et al., 2001).

Das  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  interagiert mit dem VDR und induziert die Expression und Synthese des Kalzium-bindenden Proteins CalbindinD9k/D28k. Diese Vitamin-D-abhängigen Proteine sind für den zweiten Schritt, also den intrazellulären Transport des Kalziums zuständig und sollen als zytosolischer Puffer agieren und so eine In-

toxikation der Zelle mit Kalzium verhindern. Bei VDR-Knockout-Mäusen zeigt sich neben der verminderten intestinalen Kalzium-Absorption eine signifikante Reduktion des CalbindinD9k auf mRNA- als auch auf Proteinebene (LI et al., 1997).

Bei einem bestehenden Mangel an Vitamin D tritt Kalzium zwar in die Zellen über, verbleibt aber im Mikrovillibereich, wo es an Calmodulin bindet. Bei ausreichender Versorgung mit Vitamin D wird das aufgenommene Kalzium schnell intrazellulär weitergeleitet. Besteht ein Kalzium-Mangel, führt das im Organismus zu einer erhöhten PTH-Sekretion und somit zu einer gesteigerten  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Biosynthese, die in einer verbesserten enteralen Kalzium-Aufnahme resultiert.

Bis heute ist zwar bekannt, dass das Vitamin  $\text{D}_3$  die Aufnahme von Kalzium in den Enterocyt, dessen Transport durch die Zelle und schließlich die Ausschleusung in die Zirkulation, erleichtert und so die Rate der Kalzium-Absorption ansteigen lässt, dennoch verbleiben viele Fragen in der genauen molekularen Regulation, zum Beispiel in Bezug auf die Funktion des Calbindins. Weitere Studien in diesem Bereich könnten neue Einblicke in den genauen molekularen Prozess der Vitamin-D-abhängigen, intestinalen Kalzium-Absorption geben.

#### **2.1.4.2.1.2. Wirkung auf die Niere**

Die Niere ist eines der wichtigsten regulativen Organe in der Kalziumhomöostase. Sie regelt zum einen die Kalzium- und Phosphatexkretion bzw. -reabsorption und stellt den Synthesort von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  dar. Ein weiterer wichtiger Effekt des Vitamin  $\text{D}_3$  in der Niere ist die Unterdrückung der  $1\alpha$ -Hydroxylase-Aktivität und die Stimulation der 24-Hydroxylase-Aktivität, wobei beide Reaktionen VDR-vermittelt sind und  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  somit die Fähigkeit besitzt, seine Produktion selbst zu regulieren.

Das in den Primärharn filtrierte Kalzium wird zu 98% reabsorbiert. Der Vorgang der Reabsorption ähnelt dem im Darm. Auch hier finden sich die drei Schritte der Absorption wieder: der Kalzium-Eintritt durch die apikale Membran, die Diffusion durch das Zytosol unter Einbeziehung des Kalzium-bindenden Proteins Calbindin, und die aktive Ausschleusung des Kalziums an der basolateralen Membran in die Zirkulation. Bisher konnte kein signifikanter Effekt des  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf den Kalzium-Transport im proximalen Tubulus, in dem vorwiegend ein passiver, parazellulärer Transport stattfindet (ca. 65% des filtrierten Kalziums), festgestellt werden (BOUH-

TIAUY et al., 1993). Desweiteren konnte keine durch Vitamin D<sub>3</sub> induzierte Expression des Kalzium-bindenden Proteins CalbindinD28k verzeichnet werden. Auf der anderen Seite erleichtert 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> aber an diesem Ort der Niere die Phosphat-Absorption (EGEL et al., 1985).

In den distalen Tubuli der Niere hingegen lässt 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> die Kalzium-Absorption ansteigen – eine Applikation von Vitamin D<sub>3</sub> führt zu einer erhöhten transzellulären Kalzium-Absorption, zu einem Anstieg des CalbindinD28k-Gehaltes, welches die zytoplasmatische Kalzium-Diffusion in den tubulären Zellen erleichtert (RAVAL-PANDYA et al., 1998; SOOY et al., 2000) und zu einer Induktion der Expression des Kalzium-Kanals ECaC1 im distalen Tubulus und im Sammelrohr (HOENDEROP et al., 1999; PENG et al., 2000). Auch die Expression des CalbindinD9k wird dadurch induziert, welches vermutlich vor allem die basolaterale Ausschleusung über die ATP-abhängige Plasmamembran-Kalzium-Pumpe beschleunigt.

In den distalen Tubuli sowie im Sammelrohr wird über ein aktives, transzelluläres Transportsystem bis zu 10% des filtrierte Kalziums reabsorbiert (YAMAMOTO et al., 1984; FRIEDMAN und GESEK, 1995).

In vorangegangenen Studien führte die Verabreichung von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> zu einem signifikanten Anstieg der Expression der PTH-Rezeptoren in den distalen Tubuli (TAN und LAU, 1993). Vermutlich ermöglicht PTH den aktiven Übertritt von Kalzium apikal durch die Membran, wodurch 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> also auch indirekt über PTH die Kalzium-Absorption fördert.

Zusätzlich zeigt sich, dass bei Versuchstieren mit bestehendem Vitamin D-Mangel die Absorption von Kalzium auch durch einen verminderten stimulatorischen Effekt des PTH auf die Kalzium-Absorption verringert ist (BOUHTIAUY et al., 1993; YAMAMOTO et al., 1984)

Die bislang bekannten Effekte dieses Vitamins auf die Niere und somit auf den Kalzium-Haushalt des Organismus werden über den VDR vermittelt. Es zeigt sich eine Expression dieses Rezeptors im gesamten Tubulusbereichs, vom Glomerulum bis zum Sammelrohr (LIU et al., 1996). Aufgrund dieser ubiquitären Expression liegt die Vermutung nahe, dass noch weitere interessante Effekte des Vitamin D<sub>3</sub> existieren, die aber bis heute noch nicht aufgeklärt sind.



### **2.1.4.2.1.3. Wirkung auf den Knochen**

Vitamin D ist essentiell für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der mineralisierten Knochen, die ihrerseits einen wichtigen Kalzium- und Phosphatspeicher für die Erhaltung des Mineralhaushaltes darstellen. Es besteht ein ständiges Fließgleichgewicht von Resorption und Neusynthese, das sogenannte „bone remodeling“. Ein Mangel an Vitamin D, eine Störung in den Reaktionsschritten der metabolischen Aktivierung des  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder in der Interaktion mit dem VDR führen im Wachstum zu Rachitis und im adulten Organismus zu Osteomalazie.

Bis heute ist allerdings unklar, ob Vitamin  $\text{D}_3$  einen essentiellen, direkten Effekt auf die Knochen hat. Der VDR wird sowohl in den Osteoblasten (NARBAITZ et al., 1983), als auch in den Vorläuferzellen der Osteoklasten (ROODMAN, 1996) exprimiert, weshalb eine direkte Funktion des Calcitriols in den Knochen denkbar wäre. Diese Überlegung wird durch die Tatsache gestützt, dass Vitamin  $\text{D}_3$  an der Osteoblastenreifung und an der Produktion der Osteoblasten von Kollagen Typ I, der alkalischen Phosphatase, Osteocalcin und Osteopontin *in vitro* beteiligt ist (REICHEL et al., 1989). Auf der anderen Seite aber widerlegen einige Studien diese Überlegung eindeutig. Ratten, die unter Vitamin-D-Mangel leiden und deren veränderte Kalzium- und Phosphathomöostase durch adäquate Kalzium- und Phosphat-Infusionen korrigiert wurde, zeigen eine normale Knochenmineralisation (WEINSTEIN et al., 1984).

Einen weiteren Beweis dafür, dass Vitamin D-Metaboliten keine direkte, essentielle Funktion im Knochen haben, erbrachten Studien mit VDR-Knockout-Mäusen. Bei diesen Tieren wurde der VDR durch gene targeting funktionell inaktiviert, was in einer Hypokalzämie, schweren Rachitis, sekundärem Hyperparathyreoidismus und Alopezie resultierte, vergleichbar mit der hereditären, Vitamin-D-abhängigen Rachitis Typ II, einer autosomal rezessiven, vererbaren Krankheit des Menschen, die durch einen Gendefekt im VDR-Gen verursacht wird (MALLOY et al., 1999).

Interessanterweise konnten Veränderungen in der Kalziumhomöostase, im Serum-PTH und in den Knochen durch eine spezielle Diät, die sogenannte „Rescue Diet“ korrigiert werden (LI et al., 1998). Diese Diät ist mit Kalzium und Phosphat angereichert und weist einen hohen Anteil an Lactose auf, welche die intestinale Kalzium- und Phosphat-Aufnahme verbessert (KOLLENKIRCHEN et al., 1991).

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die knochenprotektive Wirkung von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  *in vivo* primär in seinen kalzämischen Effekten in Darm und Niere und dadurch in der Erhöhung des Kalzium-Spiegels im Plasma zu suchen ist.

#### **2.1.4.2.2. Nicht-klassische Zielgewebe des Vitamin D<sub>3</sub>**

##### **2.1.4.2.2.1. Hämatopoetisches System**

Bei Vitamin-D-Mangel-Tieren lassen sich einige Veränderungen im hämatopoetischen System feststellen, wie zum Beispiel Anämie, verringerte Knochenmarkszell-dichte und verminderte Erythrocytenbildung. Nach Verabreichung von Calcitriol zeigt sich schnell eine Verbesserung der hämatopoetischen Bedingungen, reguliert durch Reaktionsabläufe, die bis heute noch nicht aufgeklärt sind (YETGIN und OZ-SOYLU, 1982).

Desweiteren hemmt  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die klonale Proliferation bei einer Reihe menschlicher Leukämie-Zelllinien und fördert die Differenzierung normaler und leukämischer Myeloid-Vorläuferzellen zur fertigen Reifung. Aufgrund dieser Wirkungen wird Vitamin D<sub>3</sub> erfolgreich in der Behandlung von Leukämie und anderen myeloproliferativen Krankheiten eingesetzt (TRUMP et al., 2004).

##### **2.1.4.2.2.2. Immunsystem**

Da sich der VDR auch in den Zellen des Immunsystems lokalisieren lässt, scheint dem Calcitriol auch auf diesem Gebiet eine wesentliche Rolle zuzukommen.

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  interagiert mit reifen Monozyten und Makrophagen, indem es deren immunologische Funktionen unterstützt und die Abwehr gegen bakterielle Infektionen und das Tumorzell-Wachstum verbessert. Zusätzlich fördert und unterstützt das Vitamin das Überleben und die Funktion von Makrophagen bei Entzündungen im Organismus und dem damit verbundenen Temperaturanstieg des Gewebes, indem es die Synthese von Hitzeschock-Proteinen induziert. Neben diesem stimulatorischen Effekte des Hormons auf Monozyten und Makrophagen, agiert es in den Lymphozyten als Immunsuppressor (LEMIRE, 1997), indem es die Proliferationsrate und die Aktivität der T- und B-Zellen herabsetzt und die Verfügbarkeit von T-Suppressorzellen induziert und somit zu einer begrenzten Lymphozyten-Aktivität führt. Diese immunsuppressiven Wirkungen des Calcitriols werden heutzutage er-

folgreich in der Therapie einiger Autoimmunkrankheiten, wie zum Beispiel beim systemischen Lupus erythematosus (ABE et al., 1990), bei rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose, juvenilen Diabetes Typ I (CASTEELS et al., 1998) und bei Transplantatabstoßung eingesetzt.

#### **2.1.4.2.2.3. Haut**

In der Haut lässt sich der VDR in den Epidermiszellen (Stratum basale, spinosum und granulosum), in der Wurzelscheide des Haarfollikels (STUMPF et al., 1979) und in den Fibroblasten (STUMPF et al., 1984) lokalisieren. Vitamin D wurde schon in den 30er Jahren bei einer Reihe von Hautkrankheiten, wie zum Beispiel Psoriasis, als Therapeutikum eingesetzt.

Seine antiproliferativen und differenzierungsfördernden Effekte auf Keratinozyten, Fibroblasten und Melanozyten, sowie seine immunsuppressiven Eigenschaften auf antigen-präsentierende Zellen der Haut werden auch heute zur Therapie von hyperproliferativen Hautkrankheiten, wie Psoriasis, eingesetzt. Die Tatsache, dass sich in den Haarfollikeln eine hohe Expression des VDR zeigt, und dass Patienten mit erblicher, Vitamin-D-resistenter Rachitis unter Alopezie und Hautzysten leiden, spricht für eine essentielle Rolle des VDR in der physiologischen Entwicklung von Haut und Haaren.

#### **2.1.4.2.2.4. Pankreas**

Lange bekannt ist die Tatsache, dass der VDR in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas lokalisiert ist, und damit Vitamin D<sub>3</sub> wahrscheinlich einen wesentlichen Einfluss auf die Physiologie der Insulin-Sekretion der  $\beta$ -Zellen nimmt (NORMAN, 1980).

Es wird vermutet, dass 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, VDR-vermittelt, die CalbindinD28k-Expression induziert und durch dieses Protein den intrazellulären Kalzium-Fluss in den  $\beta$ -Zellen reguliert, was einen Einfluss auf die Insulin-Sekretion nimmt (CHRISTAKOS et al., 1979). Desweiteren belegen einige Studien, dass die Insulin-Sekretion bei Tieren mit Vitamin D-Mangel vermindert ist und durch die Verabreichung dieses Vitamins korrigiert werden kann (CHERTOW et al., 1983).

Interessanterweise zeigten ZEITZ (2003) anhand von genetisch veränderten Mäusen mit inaktivem VDR, eine um 60% reduzierte Insulin-Sekretion im Gegensatz zu Tieren mit intaktem VDR. Um den Einfluss der bestehenden Hypokalzämie dieser

Mäuse auf das endokrine Pankreas auszuschließen, bekamen die Versuchstiere die sogenannte „Rescue Diet“, eine mit Kalzium, Phosphat und Laktose angereicherte Spezialdiät (s.o.). Die isolierten Pankreatici der VDR-Mutanten zeigten verminderte Gehalte an Insulin-mRNA, auf der anderen Seite wiesen die Pankreasinseln normale Größe und Anzahl auf.

Im Gegensatz dazu wiesen VDR-Knockout-Mäuse mit einem anderen genetischen Background jedoch normale  $\beta$ -Zellfunktion auf (MATHIEU et al., 2001).

Beim Diabetes mellitus Typ I handelt sich bekanntlich um eine Autoimmunerkrankung des Organismus und das eigene Immunsystem spielt hierbei eine wesentliche Rolle in der Zerstörung der  $\beta$ -Zellen. Der immunsuppressive Effekt des Vitamin D auf das Abwehrsystem des Körpers ist bekannt und zeigt daher auch Auswirkung auf das Krankheitsbild des Diabetes. Eine chronische Applikation pharmakologischer Dosen des  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  reduziert die Inzidenz sowohl der Insulinitis, als auch des Diabetes bei NOD-Mäusen, einem genetischen Mausmodell für den menschlichen Diabetes Typ I (MATHIEU et al., 1992). Desweiteren verringert diese Hormon-Applikation das Risiko des Auftretens einer diabetischen Hyperglykämie bei Mäusen, bei denen ein Diabetes durch niedrige Dosen von Streptozotocin induziert wurde (INABA et al., 1992).

Epidemiologische Studien belegen, dass eine Vitamin-D-Versorgung jeglicher Art in frühen Jahren das Risiko senken, an Diabetes mellitus Typ I zu erkranken (HYP-PONEN et al, 2001). Anhand dieser Studien lässt sich klar erkennen, dass Vitamin D essentiell für eine normale  $\beta$ -Zellfunktion und einer damit verbundenen Insulinsekretion ist und im späteren Leben einen gewissen Schutz gegenüber Diabetes mellitus Typ I darstellt. Die genaue molekulare Wirkungsweise und das Zusammenspiel von CalbindinD28k und dem VDR in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas bedürfen zur Aufklärung jedoch noch weiterer Studien.

## **2.1.5. Vitamin D-abhängige Erkrankungen**

### **2.1.5.1. Rachitis und Osteomalazie**

Besteht beim juvenilen beziehungsweise adulten Organismus ein Mangel an Vitamin D spricht man von Rachitis beziehungsweise Osteomalazie. Verursacht wird dieses Krankheitsbild entweder durch eine verminderte Aufnahme dieses Vitamins, durch eine unzureichende photochemische Umwandlung von Vitamin D in Vitamin D<sub>3</sub> durch mangelnde UV-Bestrahlung, durch eine Störung in den Stoffwechselschritten bis zum aktiven Metaboliten oder im Bereich des Rezeptors beziehungsweise dessen Transaktivierung.

Das Krankheitsbild ist durch eine Hypokalzämie charakterisiert, bedingt durch die verminderte Kalzium-Resorption aus dem Darm und eine reduzierte renale Kalzium- und Phosphat-Rückresorption. Die Folge ist eine verstärkte PTH-Sekretion und der daraus resultierende sekundäre Hyperparathyreoidismus. Es kommt dadurch zu einer verstärkten Kalzium-Mobilisation aus den Knochen und einer gesteigerten renalen Phosphat-Ausscheidung. Es zeigen sich gravierende Störungen im Knochen-Stoffwechsel, verursacht durch den Kalzium-Mangel, das Missverhältnis von Kalzium und Phosphat im Plasma und einer damit verbundenen verminderten Mineralisierung des Knochens, fehlregulierte Matrixsynthese und die durch PTH induzierte erhöhte Knochenabbaurate.

Als klinische Symptome zeigen sich Wachstumsretardierung, Deformationen an den langen Röhrenknochen mit damit verbundener überschießender Matrixproduktion an den Epiphysenfugen und eine Anlagerung von nicht verkalktem Osteoid an den Knorpel-Knochen-Grenzen (zum Beispiel an den Rippen, auch bekannt als sogenannter „Rachitischer Rosenkranz“). Begleitet sind diese Veränderungen von erheblichen Knochenschmerzen, einer Hypokalzämie und -phosphatämie und einem sekundären Hyperparathyreoidismus.

Beim Erwachsenen handelt es sich bei diesem Krankheitsbild, der so genannten Osteomalazie, ebenfalls um eine Stoffwechselstörung, die sich symptomatisch durch generalisierte Knochenschmerzen, Muskelschwäche, Hypokalzämie und Pseudofrakturen äußert. Ein Mangel an Vitamin D, eine unzureichende Metabolisie-

rung des Vitamin D<sub>3</sub>, oder eine Störung im Phosphatstoffwechsel sind beim Adulten für dieses Krankheitsbild verantwortlich. Beim Vitamin D-Mangel handelt es sich beim erwachsenen Menschen oft weniger um eine verminderte Zufuhr, als vielmehr um eine verringerte Vitamin D-Resorption aus dem Darm aufgrund chronischer Darmerkrankungen (z.B. das Malabsorptionssyndrom) oder nach Darmresektionen (z.B. aufgrund eines malignen Tumors)

Die Folge ist eine Skelettveränderung, die durch unzureichende Mineralisation und Verkalkung der Grundsubstanz hervorgerufen wird, mit einhergehendem Verlust der Knochenfestigkeit und daraus resultierenden Knochendeformierungen. Morphologisch finden sich breite nicht-verkalkte Osteoidsäume auf Spongiosabälkchen mit Mikrofrakturen und einer gestörten Knochenheilung (Kallusbildung mit Ablagerung von sogenanntem Fibro-oder Chondro-Osteoid). Radiologisch sind diese Veränderungen als „Loosersche Umbauzonen“ bekannt.

Im adulten Organismus spielt die erhöhte Frakturanfälligkeit, zusammen mit einer röntgenologisch nachweisbaren Verringerung der Knochenmineraldichte, eine wesentliche Rolle für die Diagnose (GARABEDIAN und BEN-MEKHBI, 1999).

Therapeutisch kann diesem Krankheitsbild mit einer oralen Vitamin D<sub>3</sub>-Applikation begegnet werden, beim Malabsorptionssyndrom auf intramuskulärem Wege.

#### **2.1.5.2. Die hereditäre Vitamin D-abhängige Rachitis**

Hierbei sind bis heute zwei autosomal rezessiv vererbte Krankheiten bekannt, deren Ursache auf eine Störung der Metabolisierung zurückzuführen ist. Es handelt sich hierbei um die sogenannte „Vitamin D-dependent-Rickets I + II“ (VDDR Typ I+II).

Bei beiden Formen zeigt sich das typische klinische Krankheitsbild der Rachitis mit all seinen Veränderungen im Mineralhaushalt und in den Knochen (RASMUSSEN und ANAST, 1978).

Beim Typ I, auch bekannt als „Pseudovitamin D-Deficiency-Rickets“ (PDDR) (MALLOY und FELDMAN, 1999), handelt es sich um einen Funktionsdefekt der renalen 1 $\alpha$ -Hydroxylase (FU et al., 1997) und somit eine Störung im Metabolisierungsschritt von 25(OH)D<sub>3</sub> zu 1 $\alpha$ 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Diese autosomal rezessive Krankheit ist durch

eine extrem niedrige Serumkonzentration von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  charakterisiert, wobei der  $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Spiegel physiologisch normal ist. Durch eine lebenslange Therapie mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (ca. 0,25 – 1  $\mu\text{g}/\text{Tag}$ ) kann eine völlige Symptombefreiung erreicht werden.

Die Erkrankung des VDDR II ist auf eine Mutation im VDR zurückzuführen. Unterschiedliche Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne führen zu einer verminderten Bindungsaffinität des VDR zu den Sequenzen der VDREs (HUGHES et al., 1988). Bei Punktmutationen im Bereich der Liganden-Bindungsdomäne kommt es zu einer Beeinträchtigung der Bindung des VDR mit dem Liganden  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . In jedem Fall resultiert diese Veränderung in einer Geweberesistenz gegenüber Vitamin  $\text{D}_3$  (BROOKS et al., 1978). Da es sehr verschiedene Varianten der Mutationen an diesem Gen gibt, reichen die Auswirkungen von kompletter Geweberesistenz bis zu völlig normaler Rezeptorfunktion (RITCHIE et al., 1989; MALLOY et al., 1990).

Als Therapie erreicht man gute Erfolge mit einer hochdosierten, oralen Supplementierung von Kalzium (BALSAN et al., 1986). Bei betroffenen Patienten tritt zu 50% zusätzlich das Symptom der totalen Alopezie auf, die im Gegensatz zur Hypokalzämie, Hypophosphatämie und dem sekundären Hyperparathyreoidismus nicht therapeutisch beeinflusst werden kann (MALLOY und FELDMAN, 1999).

## **2.2. Vitamin D-abhängige Kalzium-bindende Proteine**

### **2.2.1. Vorkommen, chemische und molekulare Aspekte**

Einer der wichtigsten und frühesten Schritte im Bereich der Vitamin D-Forschung wurde 1966 von Wassermann und Taylor getätigt, als sie zum ersten Mal im Darm des Vogels ein Vitamin D-abhängiges Kalzium-bindendes Protein entdeckten. Bald darauf identifizierte man dieses Protein, genannt Calbindin, auch im Darm der Ratte (KALLFELZ et al., 1967). Im Laufe der Zeit wurde es bei einer Reihe von Spezies und Geweben lokalisiert, wie zum Beispiel in Niere und Knochen von Säugern, aber auch in Geweben, die nicht in den Kalzium-Haushalt eingreifen, wie zum Beispiel Pankreas, Plazenta, Uterus, Gehirn, Lunge, Innenohr und Retina.

Die Calbindine gehören zu einer Familie von intrazellulären Proteinen, die eine hohe Affinität besitzen, Kalzium zu binden, wozu auch Calmodulin, Parvalbumin, Troponin C und das S100 Protein zu zählen sind (RESIBOIS et al., 1990).

Biochemisch lassen sich die Calbindine in zwei Klassen einteilen: Das CalbindinD9k mit einem Molekulargewicht von 9 kDa, das vorwiegend im Darm von Säugern zu finden ist und zwei Kalzium-bindende Domänen besitzt (FULLMER und WASSERMANN, 1981) und das größere CalbindinD28k, mit einem Molekulargewicht von 28 kDa, das in hoher Konzentration im Vogeldarm, desweiteren aber auch in Darm, Niere, Gehirn, Uterus und Pankreas von Säugern und Vögeln vorliegt (FULLMER und WASSERMANN, 1987). Da beide die gesamte Evolution über erhalten geblieben sind, muß man ihnen eine weitläufige, funktionelle Bedeutung zuschreiben.

All diesen Kalzium-bindenden, intrazellulären Proteinen ist die gleiche Struktur gemein, gebildet durch eine oktahedrale Helix-Loop-Helix Konformation der Polypeptidkette. Hieraus entsteht die dafür typische Struktur einer sogenannten EF-Hand. Die Schleife enthält Seitenketten mit Sauerstoff-Atomen, die das Kalzium binden.

Die vollständige Aminosäure-Sequenz des CalbindinD28k aus dem Hühnerdarm wurde 1985 von WILSON aufgeklärt. Die Sequenzanalyse zeigte, dass es sich um eine einzelne Polypeptidkette handelt, bestehend aus 261 Aminosäuren. Das Cal-



bindinD28k der Säuger zeigt untereinander eine Sequenzhomologie von 98% und im Vergleich zum Huhn von 79% (HUNZIKER und SCHRICKEL, 1988).

Zwischen CalbindinD28k und CalbindinD9k besteht jedoch keinerlei Hinweis auf Sequenzhomologie. CalbindinD9k ist ebenfalls eine einzelne Polypeptidkette bestehend aus 78 Aminosäuren. Es gibt vier Haupt-Helices mit Kalzium-bindenden Schleifen zwischen Helices I und II und zwischen Helices III und IV, also zwei EF-Hände. Im Gegensatz dazu besitzt das CalbindinD28k sechs Kalzium-bindende Domänen (EF-Hands), wobei nur vier der sechs EF-Hände die für die hohe Kalzium-bindungsaffinität nötige Anzahl und Position der sauerstoffhaltigen Aminosäuren enthalten (HUNZIKER und SCHRICKEL, 1988). Die zwei anderen Domänen scheinen im Laufe der Evolution ihre Kalzium-Bindungsaktivität verloren zu haben, die Tatsache jedoch, dass CalbindinD28k die ganze Evolution über erhalten geblieben ist - sogar zwischen Vögeln und Säugern - spricht dafür, dass es eine wesentliche und bedeutende Rolle im Organismus der Lebewesen spielen muss, die leider bis heute unklar ist.

Auch wenn sich zwischen den beiden Calbindinen keine Sequenzhomologie der Aminosäuren zeigt, haben sie dennoch einige Gemeinsamkeiten. Beide sind in den meisten Geweben Vitamin D-abhängig (außer im Gehirn), zeigen Hitzestabilität und ihr isoelektrischer Punkt befindet sich im sauren Bereich ( $\text{pH} \approx 4.7$ ). Desweiteren zeigen sie Affinität zu einigen anderen Kationen außer Kalzium:  $\text{Ca} > \text{Cd} > \text{Sr} > \text{Mn} > \text{Zn} > \text{Ba} > \text{Co} > \text{Mg}$  (FULLMER und WASSERMANN, 1977). Festzuhalten ist, dass Antikörper gegen CalbindinD9k und gegen CalbindinD28k weder Kreuzreaktionen mit anderen Kalzium-bindenden Proteinen, noch untereinander zeigen (CHRISTAKOS et al., 1989).

Da sich CalbindinD28k auch im distalen Konvolut der Niere von Amphibien und Reptilien nachweisen lässt, scheint es ein phylogenetisch altes Protein zu sein, dass vermutlich schon lange eine wesentliche Rolle in der Regulation der intrazellulären Kalzium-Homöostase spielt. Interessanterweise lässt sich dieses Protein im Gehirn von Fischen identifizieren, nicht aber in deren Darm oder Niere (PARMENTIER et al., 1987). Es liegt daher die Vermutung nahe, dass Calbindin ursprünglich als neuronales Protein agierte und seine Präsenz in anderen Geweben eine Erscheinung in der Entwicklung höherer Spezies ist.

Im Darm und Niere wird die Expression des Calbindin-Gens durch das  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , die metabolisch aktive Form des Vitamin D, reguliert, wohingegen

sich im Gehirn von Ratte und Vogel eine Vitamin D-Unabhängigkeit zeigt (SONNENBERG, 1984). So zeigen Tiere mit Vitamin D-Mangel nach Verabreichung von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  einen deutlichen Anstieg der CalbindinD28k-mRNA in Darm (DUPRET et al., 1987) und Niere (VARGHESE et al. 1989). Bei weiteren Untersuchungen der Regulation der Calbindin-Gen-Expression zeigte sich Folgendes: Ratten mit einer speziellen Vitamin D- und Kalziumarmen Diät wurden sieben Tage lang mit  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelt und anschließend die Veränderungen der mRNA-Spiegel in Niere und Darm von Calbindin und der Vitamin D-Rezeptoren (VDR) gemessen. Im Darm zeigten sich ein deutlicher Anstieg der CalbindinD9k-mRNA und eine unveränderte VDR-mRNA. In der Niere erhöhte sich der Gehalt an CalbindinD28k-mRNA und die VDR-mRNA veränderte sich auch hier nicht. Bei Tieren auf einer Vitamin D-reichen Diät zeigte sich nach dieser Behandlung eine Induktion der Calbindin - Genexpression und der VDR-mRNA. Diese Ergebnisse lassen die Präsenz eines Inhibitors bei Vitamin D- und Kalzium-Mangel-Tieren für die Induktion der Rezeptor-Gen-Expression vermuten. Es besteht auch eine deutliche Differenz zwischen CalbindinD9k und CalbindinD28k in Hinblick auf den zeitlichen Ablauf der Gen-Expression. Nach einmaliger Gabe von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  an Vitamin-D-Mangel-Mäuse erreichte die Induktion der renalen CalbindinD28k-mRNA nach 12h ihren Peak, im Gegensatz dazu, die des CalbindinD9k erst nach 24h p.i. Im Darm hingegen zeigt sich diese verzögerte Antwort des CalbindinD9k auf das Hormon nicht (LI und CHRISTAKOS, 1991). Dies ist eventuell auch auf die vermutlich unterschiedlichen Funktionen dieser beiden Proteine in unterschiedlichen Geweben zurückzuführen.

### **2.2.2. Funktionelle Überlegungen**

Viele Studien wurden bisher durchgeführt, um die genaue Aufgabe der Calbindine zu erforschen – es kann nur vermutet werden, was ihre letztendliche Funktion im Kalzium-Haushalt, wie zum Beispiel die Beteiligung am Kalzium-Transport, ist. Die genaue molekulare Wirkungsweise verbleibt bis heute im Unklaren.

### **2.2.2.1. Calbindin in der Niere**

Hauptaufgabe des Vitamin D ist die Erhaltung der Kalzium-Homöostase durch Steigerung der renalen Rückresorption. Inwiefern CalbindinD9 und 28k darin involviert sind, ist bislang unklar. Aufgrund einiger Studien lassen sich über deren Funktion nur Vermutungen anstellen.

Eine relativ hohe Konzentration an CalD28k und CalD9k lassen sich bei Säugern in den distalen Tubuli und den Sammelrohren nachweisen. Immunocytochemische Studien belegen, dass sich beide Calbindine bei einer Anfärbung meist in der gleichen Zelle befinden (RHOTEN et al., 1985). Auch von der Existenz des VDR in der Niere wurde früh berichtet (HAUSSLER et al., 1988). Seit langem bekannt ist, dass die Expression des Calbindins durch die aktive Form des Vitamin D induziert wird. Die Schlüsselrolle für die hormonelle Regulation des Kalziums stellt der transzelluläre Kalzium-Transport in den distalen Tubuli dar, was mit der intestinalen Kalzium-Absorption zu vergleichen ist. Kalzium betritt die Zelle durch die apikale Plasmamembran, diffundiert durchs Zytosol und wird aktiv durch die gegenüberliegende basolaterale Membran ausgeschleust (FRIEDMAN, 1999).

Dieser Mechanismus und inwieweit Vitamin D und Calbindin hier eingreifen bleibt bis heute ungeklärt.

Vitamin D-Mangel verringert die Kalzium-Absorption und führt zu einem Anstieg des stimulatorischen Effekts des Parathormons auf die Kalzium-Absorption (YAMAMOTO et al., 1984). Da Calbindin in den Zellen der tubulären Kalzium-Rückresorption lokalisiert ist, scheint es bei diesem Vorgang eine wesentliche Rolle zu spielen. Es befindet sich im Zytoplasma und im Kern der Zelle, steht also nicht in Verbindung mit den Membranen, was die Vermutung zulässt, dass es nicht am Kalzium-Transport *durch die Plasmamembran* beteiligt ist, sondern eher, wie auch am Darm, am Transport *durch die Zelle* (CHRISTAKOS et al., 1989).

Eine weitere funktionelle Überlegung ist die Aufgabe des Calbindins als intrazellulärer Kalzium-Puffer in den distalen Tubuli. Eine Komplexbildung des Kalziums mit dem Calbindin könnte als intrazellulärer Puffer agieren und so für ein Kalzium-Gleichgewicht in der Zelle sorgen und eventuelle metabolische Entgleisungen mit anschließendem apoptotischen Zelltod verhindern (CHRISTAKOS et al., 1989). Um die Rolle des Calbindin in der Niere genauer definieren zu können, wurden CalbindinD28k-Null-Mutanten (Knockouts) generiert und untersucht. Es zeigte sich bei

diesen CalbindinD28k-Knockout-Mäusen, die über einen Zeitraum von vier Wochen eine Kalzium-reiche Diät bekamen, ein 2-3mal höherer Kalzium-Gehalt im Urin im Vergleich zu den Wildtypen. Keinerlei Veränderungen wurden im Serum-Kalzium, PTH, Magnesium oder Phosphor in Urin und Serum festgestellt (SOOY et al., 2000). Im Hinblick auf die mRNA- und Proteinspiegel des CalbindinD9k in der Niere zeigen die CalbindinD28k-Null-Mutanten unter einer Kalzium-armen Diät einen deutlichen Anstieg - aber auch die Wildtypen weisen diesen Anstieg auf, weshalb es sich nicht um einen kompensatorischen Anstieg des CalbindinD9k aufgrund des fehlenden CalbindinD28k handelt. Im Gegensatz dazu bleibt der Gehalt des CalbindinD28k unter Veränderungen des Kalzium-Gehaltes des Futters stets unverändert. Hieraus kann man den Schluss ziehen, dass diesen beiden Proteinen wohl unterschiedliche Funktionen in der Niere zuzuschreiben sind (SOOY et al., 2000). Dass der Kalzium-Spiegel im Serum bei Kalzium-reicher Diät unbeeinflusst bleibt, spricht für einen Anstieg der intestinalen Calcium-Absorption oder für einen hohen `Bone Turnover` der Knockouts. Diese in vivo-Daten legen nahe, dass CalbindinD28k eine wesentliche Rolle in der renalen Kalzium-Absorption spielt (SOOY et al., 2000).

Das genaue Zusammenspiel von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Calbindin in der Niere verbleibt dennoch unklar. Bei VDR-Knockout-Mäusen lässt sich eine Hypocalcämie, verbunden mit einer 90%igen Reduktion der CalbindinD9k-Expression in der Niere feststellen - die Expression des CalbindinD28k ist relativ normal (LI et al., 2001). Um ein vollständiges Fehlen des Calbindins zu gewährleisten wurden VDR/CalbindinD28k-Doppel-Knockouts generiert und untersucht. Sowohl bei den VDR-Knockouts als auch bei den Doppel-Knockouts war die Kalzium-Exkretion im Urin 2 – 3mal höher als bei den Wildtypen, das den Verdacht eines Defekts der renalen Kalzium-Absorption bei VDR- und Doppel-Knockouts bestätigt (ZHENG et al., 2004).

Zusammenfassend kann man sagen, dass CalbindinD28k/9k in Verbindung mit  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  eine kritische Rolle in der renalen Kalzium-Rückresorption und dem transzellulären Kalzium-Transport in der Niere spielen – die genaue molekulare Wirkungsweise ist jedoch bis heute noch nicht klar definiert und es bedarf noch weiterer Studien in diesem Bereich.

### **2.2.2.2. Calbindin im Knochen**

Die Präsenz von Calbindin im Knochen von Ratte und Huhn, nachgewiesen mittels immunreaktiver Techniken, ist seit längerem bekannt. Es wird von einem Gehalt an Calbindin von 4 – 460 ng/mg Protein berichtet (CHRISTAKOS und NORMAN, 1978)

Mittels immunocytochemischer Methoden konnte CalbindinD28k/D9k im Knochen lokalisiert werden, und zwar bei der Ratte und beim Huhn in den Chondrozyten des Knorpels der Wachstumsfuge (BALMAIN et al., 1986), in den Ameloblasten von Nagerzähnen (TAYLOR et al., 1984) und in Osteoblasten-Kulturen von Ratten (MOUE et al., 1988).

Es wurde eine Vitamin D-Abhängigkeit des Calbindins in den Osteoblasten des Hühnerknochens vermutet (CHRISTAKOS und NORMAN, 1978), diese konnte jedoch weder in den Chondrocyten, noch in den Ameloblasten nachgewiesen werden (BALMAIN et al., 1986). Das Calbindin wurde im Zytoplasma reifender Chondrocyten der Ratte identifiziert, um genauer zu sein, am lateralen Rand der longitudinalen Septen, also dort wo die Knochenmineralisation beginnt und die Matrix-Vesikel lokalisiert sind. Aufgrund bisheriger Studien wird vermutet, dass Calbindin eine wesentliche Rolle in der Bewegung des intrazellulären Kalziums in den Chondrocyten spielt und in den Transport von Kalzium zum extrazellulären Ort der Kalzifikation in der Wachstumsfuge verwickelt ist.

Interessanterweise sind die Knochen von CalbindinD28k-Knockout-Mäusen phänotypisch normal und weisen eine normale histologische Knochenstruktur auf, zeigen aber dennoch eine moderate Reduktion der totalen und corticalen Knochenmineraldichte (BMD) (ZHENG et al., 2004). Bei der Untersuchung von VDR/CalbindinD28k-Doppel-Knockout-Mäusen stellte man eine noch niedrigere BMD und eine höhere Akkumulation von Osteoid als Folge des höheren Kalzium-Verlusts über die Niere fest (ZHENG et al., 2004).

In den Nagerzähnen zeigt sich CalbindinD28k/D9k im Bereich des inneren Zahnepithels während der Zahnschmelzbildung. Eine mögliche Funktion für das Kalzium-bindende Protein in den Ameloblasten könnte eine Beteiligung am Prozess des Kalzium-Transports in den Zahnschmelz sein, also auch an der Zahnentwicklung.

Die Präsenz des Calbindins in Zellen des Knochens und Zahngewebes weisen auf eine wesentliche Funktion dieses Proteins hin, vermutlich im Bereich des Kalzium-

Transports beziehungsweise der Erhaltung der Kalzium-Homöostase, doch um diesen Mechanismus genauer zu verstehen, müssen auch hier noch weitere Studien durchgeführt werden.

### **2.2.2.3. Calbindin im Nervensystem**

CalbindinD28k zeigt eine hohe Verbreitung über das gesamte zentrale Nervensystem. Es ist präsent in den meisten, aber nicht in allen großen neuronalen Zellgruppen und Fasersträngen. Calbindin macht 0,1 – 1,5% des gesamten löslichen Proteins im Gehirn aus (FELDMANN et al., 1983), die höchste Konzentration findet sich im Kleinhirn, insbesondere in den Purkinje-Zellen.

Im Gegensatz zum Calbindin in Darm und Niere, zeigt es im Gehirn keinerlei Vitamin D-Abhängigkeit (SONNENBERG et al., 1984), interessanterweise zeigt jedoch Calbindin im peripheren Nervensystem eine Reaktion auf Vitamin D – im Nervus intestinalis des Vogels zeigt sich nach Vitamin D-Applikation ein deutlicher Konzentrationsanstieg des Kalzium-bindenden Proteins (LEE et al., 1987).

Die Funktion des Calbindin im peripheren Nervensystem ist bislang unklar, vermutet wird eine Beteiligung an der Regulation der Muskelkontraktion und des Blutflusses durch Bindung von Kalzium-Ionen.

Zum einen befindet sich Calbindin in Strukturen des Limbischen Systems wie olfaktorische Cortex, Amygdala, Hippocampus, Septum und Hypothalamus – wobei bemerkt sei, dass einige dieser Systeme Steroide, wie zum Beispiel das  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , binden, der Zusammenhang mit Calbindin aber unklar ist – zum anderen ist es aber auch ein Bestandteil von Strukturen ausserhalb des Limbischen Systems, des zentralen visuellen Systems und der Basalganglien (PASTEELS et al., 1986).

Auch wenn es keine eindeutige Verbindung des Calbindins zu verschiedenen Transmittern des Gehirns gibt, spricht die Präsenz dieses Proteins in zahlreichen Neuronen dafür, dass Calbindin eine wesentliche Rolle in der Regulation des intrazellulären Kalziums und somit in der physiologischen Antwort der Neurone spielt. Des weiteren liegt die Vermutung nahe, dass das Calbindin im Gehirn als Puffersystem fungiert, das die Neuronen vor exzessiven Veränderungen der Kalziumkonzentration in der Zelle und den dadurch induzierten Zelltod schützt. Auf der anderen Seite könnte ein Vorkommen dieses Proteins an den Nervenenden ein Hinweis auf eine Beteiligung an synaptischen Reaktionsabläufen sein. In vorangegan-

genen Studien konnte Calbindin auch in den Horizontalzellen der Retina (RABIE et al., 1983) und in cochlearen und vestibulären Haarzellen des Innenohrs lokalisiert werden (RABIE et al., 1983). Immunocytochemische Verfahren zeigen Calbindin in der Retina von Säugern, Vögeln und Reptilien – insbesondere in der Photorezeptoren-Schicht der menschlichen Retina, in den Zapfen – nicht aber in den Stäbchen (VERSTAPPEN et al., 1986). Hieraus lässt sich die Erkenntnis ziehen, dass die Zapfen, im Gegensatz zu den Stäbchen, einem hohen Kalzium-Fluss unterliegen. Vermutlich steuert es im visuellen und vestibulären System Kalzium-vermittelte Prozesse und ist auf diesem Wege an der Signalübertragung der Hör-, Seh-, und Gleichgewichtsfunktion beteiligt. So könnte Calbindin eine wichtige Funktion in der Hörübertragung und der Kalzium-Homöostase der Haarzellen haben.

Um die genauen Reaktionsabläufe im zentralen Nervensystem im Hinblick auf das Calbindin zu verstehen, müssen wohl noch einige Studien folgen.

#### **2.2.2.4. Calbindin im Uterus**

CalbindinD28k befindet sich im Uterus von Legehennen – es wird von Konzentrationen von 3 µg/mg Protein berichtet - das CalbindinD9k hingegen ist im Uterus der Ratte zu finden (FULLMER et al., 1976).

Bisher konnte bei keiner Spezies eine Vitamin D-Abhängigkeit des Calbindins im Uterus festgestellt werden, es zeigt sich aber ein deutlicher Konzentrationsanstieg nach Applikation von 17β-Estradiol (MATHIEU et al., 1988).

Dennoch wird von der Präsenz des Vitamin-D-Rezeptors im Uterus berichtet, dessen Quantität durch 17β-Estradiol reguliert wird (WALTERS et al., 1981). Von großem Interesse wäre hierbei die genaue Lokalisation des Vitamin-D-Rezeptors im Uterus zu ermitteln und mit der des Calbindins zu vergleichen, ob etwaige Gemeinsamkeiten vorliegen.

Das Calbindin der Schalendrüse der Legehenne ließ sich nur in den tubulären Drüsenzellen und nicht im Oberflächenepithel identifizieren (LIPPIELLO et al., 1975), was dafür spricht, dass es in dem Abschnitt des Ovidukts vorkommt, in dem die Eierschalenbildung stattfindet. Desweiteren ist bekannt, dass die Drüsenzellen an die Kalzium-Sekretion während der Eierschalenbildung beteiligt sind und deshalb Calbindin hier wohl beim Kalzium-Transport eine Rolle zu spielen scheint.

Im Uterus der Ratte zeigen immunocytochemische Studien, dass beide, sowohl Endometrium, als auch Myometrium, das CalbindinD9k enthalten. Im Endometrium nicht - trächtiger Ratten findet es sich im Zytoplasma der Stromazellen, und nicht in den Epithel- oder Drüsenzellen wieder. Im Gegensatz dazu zeigen trächtige Ratten auch ein Vorkommen des Proteins in Epithelzellen, was für eine Beteiligung des Calbindins am Transport von Kalzium zum fetalen Organismus spricht. Im Myometrium scheint es, durch seine eventuelle Verwicklung in den Kalzium-Haushalt der Zellen, eine wesentliche Rolle bei der Regulation von Muskelkontraktionen zu spielen (BRUNS et al., 1988).

Doch auch hier besteht aufgrund mangelnden Wissens und fehlender Studien über die genauen Reaktionsabläufe und die Rolle des Calbindin im Uterus noch grosser Forschungsbedarf.

#### **2.2.2.5. Calbindin im Pankreas**

Schon lange gibt es immunologische (MORRISEY et al., 1975) und biochemische (KADOWAKI et al., 1984) Beweise für die Präsenz des CalbindinD28k im Pankreas von Vögeln und Säugern. Es wird von Konzentrationen von 3 und 400 ng/mg Protein berichtet. Roth et al. entdeckten 1982 Calbindin in den Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen, nicht aber im exokrinen Teil des Pankreas.

Des weiteren wurde 1979 zum ersten Mal von einem Rezeptor im Pankreas, mit hoher Affinität für die hormonell aktive Form des Vitamin D, dem 1,25(OH)dihydroxyvitaminD<sub>3</sub>, berichtet, womit das Pankreas als eines der ersten nicht-klassischen Zielgewebe des Vitamin D aufgedeckt wurde (CHRISTAKOS und NORMAN, 1979). Autoradiographische und immunhistochemische Analysen zeigen, dass sich der VDR ebenfalls in den  $\beta$ -Zellen befindet (ROTH, 1982).

Seither gibt es eine Reihe von Studien, um die genaue Wirkungsweise, beziehungsweise das eventuelle Zusammenspiel des Rezeptors für Vitamin D und des Calbindins aufzuklären. Neben der Vitamin D-Abhängigkeit des Kalzium-bindenden Proteins ist die genaue molekulare Rolle des VDR im Pankreas bis heute noch nicht klar. Bekannt ist eine verminderte Insulin-Sekretion bei Vitamin-D-defizienten Ratten und die gleichzeitige Verbesserung der Glukose-induzierten Insulin-Sekretion nach einer Behandlung mit 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (KADOWAKI et al., 1984). Auch ZEITZ et al. untersuchte 2003 die funktionelle Rolle des Vitamin D im Pankreas und



stellte eine 60%ige Reduktion des Serum-Insulin-Spiegels bei VDR-Knockout-Mäusen im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen fest.

Die Verwicklung von CalbindinD28k in dieses Geschehen ist bis heute unklar, die Kalzium-Abhängigkeit der Insulin-Sekretion ist jedoch bestens geläufig. Vermutet wird daher, dass Vitamin D einen speziellen Effekt auf den Kalzium-Haushalt der Pankreaszellen ausübt (CHERTOW et al., 1986).  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  könnte die intrazellulären Kalziumspeicher regulieren, vielleicht durch Mechanismen, die CalbindinD28k mit einbeziehen. Ein Anstieg des verfügbaren intrazellulären Kalziums könnte so die Insulin-Sekretion erleichtern.

1999 untersuchte SOOY die Rolle des CalbindinD28k bei einem durch Kalium stimulierten Anstieg der freien Kalzium-Konzentration im Zytosol und der Insulin-Ausschüttung bei CalbindinD28k-Knockout-Mäusen. Nach Isolierung einzelner Pankreasinseln der Null-Mutanten und anschließender Stimulation dieser mit 45 mM Kaliumchlorid-Lösung, war der Kalzium-Peak in den Inseln der Knockouts 3,5mal höher als der der Wildtyp-Mäuse. Zusätzlich zeigte sich nach Stimulation bei den Null-Mutanten ein deutlicher Anstieg der Insulin-Ausschüttung im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Dieselben Ergebnisse zeigten sich bei der Durchführung dieses Versuchs an  $\beta$ -Zelllinien mit unterschiedlichem Gehalt an CalbindinD28k. Diese Ergebnisse verstärken den Verdacht der Beteiligung des Calbindin an der Insulinsekretion und lassen vermuten, dass CalbindinD28k die Menge der Insulin-Ausschüttung durch Regulation des Kalziums in der Zelle kontrollieren kann (SOOY et al., 1999).

Eine weitere Studie zur Aufklärung der molekularen Rolle des Calbindin in den Pankreasinseln wurde von REDDY et al. 1997 durchgeführt, die jedoch zu anderen Ergebnissen als bisher bekannt führte. Das CalbindinD28k der Ratte wurde in einer pankreatischen  $\beta$ -Zelllinie überexprimiert und die Veränderungen an Insulin-mRNA untersucht. In den Zellen mit hohem Gehalt an Calbindin zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Expression der Insulin-mRNA (20mal höher als bei Zellen mit Vektortransfektion). Mit der Calbindin-Überexpression war auch ein Anstieg des Insulin-Gehalts und eine vermehrte Sekretion verbunden.

Es ist bekannt, dass Kalzium eine wichtige Rolle in den  $\beta$ -Zellen in Bezug auf die Stimulus-induzierte Sekretion von Insulin spielt und durch Glukose und andere Sekretagoga reguliert wird. Glukose führt zu einem Schließen der durch ATP regulierten Kalium-Kanäle, was eine Membran-Depolarisation verursacht und dadurch

die Kalzium-Kanäle geöffnet werden. Die Folge ist ein intrazellulärer Konzentrationsanstieg des freien Kalziums (BERGGREN et al., 1993). Das Kalzium-bindende Protein scheint in diesem Bereich ein wichtiger Mediator zu sein. Da das Calbindin nicht nur im Zytosol, sondern auch im Nukleus lokalisiert ist (TAYLOR et al. 1988), ist es möglich, dass es eventuell mittels Kalzium-vermittelter Regulation in den Transkriptionskomplex eingreift, also wie ein 'Kern-Regulator' agiert. Sicher ist bis heute nur die Tatsache, dass sowohl Calbindin als auch Vitamin D die Insulin-Sekretion beeinflussen, indem sie den Kalzium-Haushalt regulieren. Über genauere molekulare Wirkungsweisen kann bisher nur spekuliert werden.

BOURLON berichtete 1996 von einer Präsenz des Calbindin sowohl in  $\beta$ -Zellen als auch in  $\alpha$ -Zellen des Pankreas und vermutet daher, dass dieses Vitamin-D-abhängige Protein auch eine Rolle bei der Glukagon-Sekretion spielt.

#### **2.2.2.6. Calbindin im Darm**

Im Darm des Vogels wurde Calbindin 1966 von WASSERMAN und TAYLOR entdeckt und seine Vitamin D-Abhängigkeit festgestellt. Es wird vermutet, dass  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in den Prozess der intestinalen Absorption in drei Phasen eingreift.

- 1) in den Kalzium-Transfer in die Zelle
- 2) in den Kalzium-Transfer durch die Zelle und
- 3) in die Ausschleusung des Kalziums aus der intestinalen Zelle  
(WASSERMAN und FULLMER, 1983).

Die zweite Phase steht in Wechselbeziehung mit der Synthese von Calbindin. Da es im Zytosol der Zylinderepithelzellen lokalisiert ist und nicht in den Membranen, scheint es eine wesentliche Rolle beim Transport des Kalziums *durch* die Zelle zu spielen und die Diffusion zu erleichtern. Zusätzlich könnte das intestinale Calbindin auch als intrazellulärer Puffer agieren und einem toxischen Kalzium-Spiegel in der Zelle vorbeugen, der aufgrund von Akkumulation des Kalziums während des Vitamin D-abhängigen Kalzium-Transports durch die Zelle entsteht.

TAYLOR et al. beobachteten 1988 hohe Konzentrationen an CalbindinD28k im Kern der Darmzellen kurz nach einer Applikation von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  mit darauffolgender sinkender Konzentration. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Calbin-

din, neben seiner Beteiligung am Kalzium-Transport, eventuell auch als Kern-Regulator in Bezug auf die Transkription agiert.

Nach Zugabe von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zu einer Kultur von Hühner-Enterocyten zeigt sich ein deutlicher Anstieg des CalbindinD28k-mRNA-Spiegels, induziert durch die ansteigende Transkriptionsrate des korrespondierenden Gens (FERRARI et al., 1992). In adulten VDR-Knockout-Mäusen ist die intestinale CalbindinD9k-Expression um 90% reduziert, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, verglichen mit den Wildtyp-Mäusen (LI et al., 2001).

2004 untersuchten BOLT et al. den Effekt einer Kalzium-reichen Diät auf die Expression von CalbindinD9k und CalbindinD28k im Darm in An- und Abwesenheit des funktionellen Vitamin D-Rezeptors. Eine Behandlung mit dieser Diät unterdrückte die intestinale CalbindinD9k-Expression bei den Wildtypen signifikant, sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene. Bei den VDR-Knockouts zeigte sich nur ein sehr geringer Effekt auf die Expression dieses Gens. Die CalbindinD28k-Expression im Darm blieb bei Wildtypen und Null-Mutanten unter der Kalzium-reichen Diät weitgehend unbeeinflusst. Diese Ergebnisse lassen den Verdacht zu, dass Kalzium die CalbindinD9k-Expression durch Veränderung des zirkulierenden  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  reguliert und dass der VDR für die durch die Kalzium-reiche Diät induzierte Unterdrückung der CalbindinD9k-Expression von Notwendigkeit ist. Ratten, deren Bedarf an Vitamin D reichlich gedeckt ist eine Vitamin D- und Kalzium-arme Diät und behandelt diese mit der metabolisch aktiven Form des Vitamin D über sieben Tage, zeigt sich eine Induktion, sowohl der Calbindin-Gen-Expression als auch der VDR-mRNA. Aufgrund dieser Ergebnisse wird die Existenz eines Inhibitors der  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -vermittelten Hochregulation der Rezeptor-Gen-Expression bei Tieren mit Vitamin D- und Kalzium-Mangel vermutet (HUANG et al., 1989).

Bis heute ist also auch im Darm das genaue Zusammenwirken des CalbindinD28k/D9k mit der aktiven Form des Vitamin D nicht ganz aufgeklärt. Über die genaue molekulare Rolle des Calbindin lassen sich nur Vermutungen aufstellen, wie eine Beteiligung an der Regulation der Kalzium-Homöostase, eine durch Bindung des Kalziums erleichterte Kalzium-Diffusion durch die Enterozyten, oder das Agieren als eine Art Kern-Regulator, oder das Auftreten als Kalzium-Puffer, um eventuellen Zell-Intoxikationen vorzubeugen.

Um in diesem Bereich ein besseres Wissen zu erlangen, müssen noch eine Reihe von Studien vollzogen werden.

### **2.2.3. Veränderungen des Calbindin bei verschiedenen Krankheitsbildern**

#### **2.2.3.1. Intestinales CalbindinD9k**

Die sogenannte *Hyp*-Maus ist das murine Gegenstück zu XLH, der X-chromosomal dominant vererbten Hypophosphatämie des Menschen (EICHER et al., 1976). Die *Hyp*-Maus weist Hypophosphatämie, Verzweigung, eine reduzierte Reabsorption von filtriertem Phosphat in der Niere und somit eine vermehrte Exkretion von Phosphat im Urin auf. Bei der juvenilen *Hyp*-Maus, während des Absetzalters, ist die Konzentration des intestinalen CalbindinD9k im Gegensatz zur normalen Maus um 35-65% vermindert und fällt im Laufe der Wachstumsphase noch weiter ab (mit ca. 6 Wochen nur 15-45% im Vergleich zur normalen Maus). 4-5 Wochen alte *Hyp*-Mäuse haben nur 75% der  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  – Plasmaspiegel der normalen Mäuse (MEYER et al., 1983). Es ist unwahrscheinlich, dass dieser 25%ige Abfall den dramatischen Abfall des intestinalen Calbindins verursacht. Beim Menschen ist die X-chromosomale Hypophosphatämie (XLH) die meist verbreitetste Form der Vitamin D-resistenten Rachitis und ist mit einer verminderten renalen tubulären Phosphatrückresorption und Osteomalazie verbunden (RASMUSSEN et al., 1978). Sowohl bei Kindern, als auch bei juvenilen Mäusen mit XLH wird von reduzierter intestinaler Kalzium- und Phosphatabsorption berichtet, ebenso von einer unzureichenden Skelettmineralisation (WILLIAMS et al., 1972). Es wird vermutet, dass der Abfall der CalbindinD9k-Konzentration eine Rolle in der Malabsorption des Kalziums und den Knochenveränderungen der juvenilen *Hyp*-Maus spielt.

## **2.2.3.2. Neuronales CalbindinD28k**

### **2.2.3.2.1. Epilepsie**

GODDARD et al. initiierten 1969 bei Ratten durch täglich Elektrostimulationen einer bestimmten Gehirnregion ein tonisch-klonisches Anfallmodell von Epilepsie. Während eines Epilepsieanfalls zeigt sich ein progressiver Abfall des Calbindins in den Granulazellen des Hippocampus (MILLER et BAIMBRIDGE, 1983), welche sehr empfänglich für solche Anfälle sind. Es wird vermutet, dass der Abfall des Calbindins einen ausgleichenden Mechanismus widerspiegelt. Durch weniger Calbindin in der neuronalen Zelle ist die intrazelluläre Kalzium-Puffer-Kapazität herabgesetzt, was zu einer rapiden Inaktivierung der Kalzium-Kanäle, mit einem leichten Abfall des Neurotransmitter-Outputs führen könnte. Demnach wird vermutet, dass der beobachtete Abfall des Calbindins im Gehirn zu einer Veränderung der Regulation des intrazellulären Kalziumhaushaltes führt und an der Epileptogenese beteiligt ist.

### **2.2.3.2.2. Morbus Alzheimer**

Bei der postmortem Untersuchung von Gehirnen von Patienten, die unter Alzheimer litten, zeigt sich, dass alle neokortikalen Gehirnbereiche eine signifikante Verringerung der CalbindinD28k-Konzentration zeigen. Diese Beobachtung ist nicht spezifisch für Alzheimer, sondern zeigt sich auch bei Patienten mit Demenz eines anderen histopathologischen Typs und dort auch in der temporalen und parietalen Kortex (McLACHLAN et al., 1987). Es wird vermutet, dass der Calbindin-Abfall zu Kalzium-vermittelten irreversiblen zytotoxischen Ereignissen in den letzten Stadien des pathologischen Prozesses führt.

### **2.3. Ziel und Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

Bisherige Studien haben gezeigt, dass bei VDR-Mutanten eine reduzierte Insulinsekretion in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas vorliegt (ZEITZ et al., 2003) und dass eventuell eine molekulare Interaktion zwischen dem kalzium-bindenden Protein CalbindinD28k und dem VDR besteht. Die hier vorliegende Studie soll klären, ob CalbindinD28k per se einen Einfluss auf den Kalzium-Haushalt hat oder im Rahmen der VDR-Effekte Einfluss auf die pankreatische Insulinsekretion nimmt, beziehungsweise ob generell eine wechselseitige Interaktion zwischen VDR und CalbindinD28k besteht. Um diese Frage zu beantworten, wurden Urin, Serum und die Knochen (Histologie und Knochenmineraldichtemessung mittels pQCT) von 3 und 9 Monate alten CalbindinD28k-Mutanten untersucht. Des Weiteren wurden subkutane Glukosetoleranzen nach Glucosebelastung bei VDR/CalbindinD28k-Doppelmutanten durchgeführt und Serum, Urin und die Knochen (Histologie, Knochenmineraldichtemessung mittels pQCT) dieser Tiere untersucht. Zusätzlich sollte die Frage geklärt werden, ob VDR- beziehungsweise CalbindinD28k-Mutanten eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Streptozotocin-induziertem Diabetes aufweisen. Aufgrund bisheriger Ergebnisse scheint es möglich, dass die Assoziation zwischen VDR und der Inzidenz von Typ-I-Diabetes in humanen Populationen durch einen latenten Defekt in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas verursacht wird. Die Überprüfung dieser Frage wäre von großer Wichtigkeit für die Diabetes-Grundlagenforschung.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Tiermodelle**

#### **3.1.1. Die VDR-Knockout-Mäuse**

Diese Mauslinie stammt aus der Zucht des Instituts für Säugetiergenetik der GSF in Neuherberg. Es handelt sich hierbei um ein durch Gene Targeting erzeugtes Mausmodell, das einen mutierten Vitamin-D-Rezeptor mit intakter Hormonbindungsdomäne, jedoch ohne den für die DNA-Bindung notwendigen ersten Zinkfinger exprimiert (ERBEN et al., 2002).

Das erstkodierende Exon 2 des VDR-Gens, welches die erste Zinkfingerregion der DNA-Bindungsdomäne kodiert, wurde durch eine *Lac-Z*-Reporter-Kassette und eine Neomycin-phosphotransferase(*neo*)Kassette mittels embryonaler Stammzell-Technologie ersetzt. Die Expression des VDR-Gens ist schwer detektierbar, daher ermöglichte der Einbau der bakteriellen *Lac-Z*-Kassette eine sichere Methode, um die Expression dieses Gens zu analysieren, da dieses Reporter-gen unter Kontrolle des endogenen VDR-Promotors exprimiert wird. Als positiver Selektionsmarker wurde das *Neo*-Gen für die Resistenz gegenüber dem Antibiotikum *Neomycin* verwendet, als negativer Selektionsmarker eine Thymidinkinase-Kassette.

#### **3.1.2. Die CalbindinD28k-Knockout-Mäuse**

Diese Mauslinie stammt aus der Zucht des Max-Planck-Instituts Martinsried. Das Mausmodell wurde erstellt, indem ein 1,3 kb *Cl*I-*Eco*47III-Fragment des Calbindin-Gens, welches den Promotor und das erste codierende Exon enthält, durch ein 1,6 kb Fragment ersetzt wurde, welches das *Neomycin*-resistente Gen (*neo*) enthält. Demzufolge wurde das CalbindinD28k-Gen inaktiviert, indem der Promotor und das erste codierende Exon durch eine *Neomycin*-resistente Kassette ersetzt wurden (AIRAKSINEN et al., 1997). Die homozygoten Tiere sind somit nicht in der Lage, das Kalzium-bindende Protein CalbindinD28k zu exprimieren. Alle Mäuse dieser Zucht sind inzwischen auf C57BL/6-Hintergrund rückgezüchtet worden.

### **3.1.3. Die Doppel-Knockout-Mäuse**

Diese Maus-Linie wurde durch Verpaarung von heterozygoten Tieren der VDR- und CalD28k-Zuchtlinie produziert (siehe unten).

## **3.2. Genotypisierung der Versuchstiere**

### **3.2.1. Genotypisierung der VDR-Mutanten**

#### **3.2.1.1. Isolierung genomischer DNA**

Zur Gewinnung genomischer DNA wurde ein Gewebstück der Tiere benötigt. Hierzu wurde den Tieren im Alter von drei Wochen, kurz nach dem Absetzen, etwa ein halber Zentimeter des Schwanzes abgeschnitten. Die Schwanzstücke wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufbewahrt. Um das Gewebe zu verdauen, wurde diesem 600 µl Lysis-Puffer (1 M Tris pH 7.5, 0.5 M EDTA, 5 M NaCl, 10% SDS) und 30 µl Proteinase K (20 mg/ml a.d.), zugeführt und dieses Gemisch für etwa zwölf Stunden bei 55°C in einem Schüttel-Thermoblock (Fa. Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Um die DNA zu extrahieren, wurden zu jeder verdauten Schwanzprobe 500 µl Phenol-Chloroform-Gemisch pipettiert und diese kräftig gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde für zehn Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammen mit 200 µl 4 M Ammonium-Acetat und 800 µl Isopropanol überführt und nochmals für zehn Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Beim vorsichtigen Abkippen des Überstand blieb das Pellet am Boden des Gefäßes zurück. Für etwa fünf Minuten beließ man die extrahierte DNA mit offenem Deckel bei 65°C in einem Wasserbad, um restliche Isopropanol-Reste verdampfen zu lassen. Um das Pellet besser zu lösen, wurden zu jeder Probe 200 µl Tris-EDTA pH 7.5 gegeben und die Gefäße anschließend im Wasserbad bei 65°C für eine Stunde belassen und danach bei 4°C aufbewahrt.



### **3.2.1.2. PCR (=polymerase chain reaction)**

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion ist eine Amplifizierung eines DNA-Abschnitts zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Bei diesen Primern handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle mit etwa 20-35 bp. Eine DNA-Polymerase, die sogenannte Taq-Polymerase (von *Thermus aquaticus*) heftet unter richtigen Reaktionsbedingungen Desoxynukleotid-Triphosphate (dNTPs) an die 3'-OH-Primer-Enden und synthetisiert komplementäre DNA-Sequenzen. Um diese Synthese mehrfach zu wiederholen, wird das entstandene Syntheseprodukt durch Hitze denaturiert und es erfolgt eine weitere Hybridisierung von Oligonukleotid-Primern, mit anschließender DNA-Strangsynthese. Mehrfache Zyklen erzielen eine exponentielle Anreicherung des DNA-Syntheseprodukts im Reaktionsansatz.

Als VDR-Primer wurden folgende verwendet:

LacZ-Reverse-Primer:            5'-GGCCTCAGGAAGATCGCACTCC  
3'-VDR-Reverse-Primer:        5'-GGA CT CACCTGAAGAAACCCTTGC  
VDR-Forward-Primer:            5'-GCCTGCTCTTACAGGGATG

Das Syntheseprodukt, das entstand, besaß eine Länge von 170 bp, wenn es sich um eine Wildtyp-Maus handelte und eine Länge von 250 bp bei den homozygoten Tieren. Heterozygote Tiere wiesen beide Banden auf.

Für die PCR wurden pro 25 µl-Ansatz folgende Komponenten gemischt:

4µl	genomische DNA der Maus
0,5µl	LacZ-Reverse-Primer (25 pmol/µl)
0,5µl	3'-VDR-Reverse-Primer (25 pmol/µl)
0,5µl	VDR-Forward-Primer (25 pmol/µl)
12,5µl	HotStar Taq Master Mix (enthält HotStarTaq DNA Polymerase, PCR Puffer mit 3 mM MgCl <sub>2</sub> , und 400 µM dNTP; Quiagen GmbH, Hilden)
ad 25µl aqua dest.	

Die einzelnen Ansätze wurden in geeignete Reaktionsgefäße pipettiert, fest verschlossen und in einen Thermocycler (Fa. Eppendorf, Hamburg) überführt.

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

1. Initiale Denaturierung: 10 Minuten 94°C
2. Denaturierung: 60 Sekunden 94°C
- Annealing: 60 Sekunden 57°C
- Polymerisation: 60 Sekunden 72°C
- Anzahl der Zyklen: 35x
3. Finale Polymerisation: 10 Minuten 72°C

Nach Beendigung der Reaktion wurden die Reaktionsgefäße auf 4°C abgekühlt und bei dieser Temperatur bis zur Entnahme gelagert.

Die PCR-Produkte wurden in einem 2%igen, ethidiumbromidhaltigen Agarosegel (0,5 µg Ethidiumbromid pro ml Gel) mit TBE-Puffer (4,5 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA) bei 90 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die entstandenen Banden konnten unter UV-Licht charakterisiert und identifiziert werden.

### **3.2.2. Genotypisierung der CalbindinD28K-Knockout-Mäuse**

Die genomische DNA wurde zuerst wie in 3.2.1. schon beschrieben extrahiert und bei 4°C aufbewahrt.

Als CalbindinD28k-Primer wurden folgende verwendet:

CalD28k-exon2-Reverse-Primer: 5'-AAGCACAGTCGAAGGGAAGAGCA

Pa1(Reverse-Primer,Vektor-Promotor.PKG-Gen):

5'-TGACTAGGGGAGGAGTAGAAG

Cs3 (Forward-Primer, Promotor-Region): 5'-GCAAGTAACTAATGGCATCG

CalD28k-exon1-Forward-Primer: 5'-ATGGCAGAATCCCACCTGCAGTC

Für die PCR wurden pro 50µl-Ansatz folgende Komponenten gemischt:

2µl	genomische DNA der Maus
1µl	CalbindinD28k-exon2-reverse-Primer (25 pmol/µl)
1µl	Pa1_Primer (25 pmol/µl)
1µl	Cs3_Primer (25 pmol/µl)
1µl	CalbindinD28k-Forward1-Primer (25 pmol/µl)
5µl	10x PCR-Puffer (0,05 M KCl, 0.01 M Tris pH 8.3)
3µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
2µl	2.5 mM dNTPs
0,25µl	Taq-Polymerase
ad 50µl aqua dest.	

Das Zusammenmischen der einzelnen Komponenten erfolgte die ganze Zeit über auf Eis.

Die einzelnen Ansätze wurden in geeignete Reaktionsgefäße pipettiert, fest verschlossen und in einen Thermocycler (Fa. Eppendorf, Hamburg) überführt.

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

1. Initiale Denaturierung: 3 Minuten 94°C
2. Denaturierung: 60 Sekunden 94°C  
Annealing: 60 Sekunden 55°C  
Polymerisation: 60 Sekunden 72°C  
Anzahl der Zyklen: 35x
3. Finale Polymerisation: 10 Minuten 72°C

Nach Beendigung der Reaktion wurden die Reaktionsgefäße auf 4°C abgekühlt und bei dieser Temperatur bis zur Entnahme gelagert.

Die Syntheseprodukte stellten sich wie folgt dar: die Wildtypbande entsprach einer Größe von 250 bp und die der Homozygoten von 150bp. Heterozygote Tiere wiesen beide Banden auf.

Die PCR-Produkte wurden in einem 2%igen, ethidiumbromidhaltigen Agarosegel (0,5 µg Ethidiumbromid pro ml Gel) mit TBE-Puffer (4,5 mM Tris-Borat, 1 mM

EDTA) bei 90 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die entstandenen Banden konnten unter UV-Licht charakterisiert und identifiziert werden.

### **3.2.3. Genotypisierung der Doppel-Knockout-Mäuse**

Da sich die Bande der Homozygoten von VDR und CalbindinD28k nach elektrophoretischer Auftrennung aufgrund gleicher Größe von 250 bp auf gleicher Höhe befinden, müssen für die Genotypisierung der Doppel-Knockout-Mäuse zwei getrennte PCRs durchgeführt werden.

Vorgehensweise siehe 3.2. und 3.3.

## **3.3. Tierhaltung**

Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen Typ II der Firma Altromin in einem vollklimatisierten Raum, ohne Fenster, bei einer Raumtemperatur von 24-26°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55-57 % gehalten. Eine automatische Zeitschaltuhr regelte die Tag- und Nachtphase, die jeweils 12 Stunden betrug. Die Zuchtmäuse wurden paarweise gehalten, während die übrigen Versuchstiere, nach Geschlecht getrennt, mit maximaler Belegung von 5 Tieren untergebracht waren.

Den Mäusen der VDR-, sowie der Doppel-Knockout-Zuchtlinie stand pelletiertes Alleinfutter (1314, Laborherstellung, Fa. Altromin, Lage) mit 2,0% Calcium, 1,25% Phosphor und 20% Lactose, die sogenannte `Rescue Diet`, sowie Leitungswasser ad libitum zur Verfügung.

Die Mäuse der CalbindinD28k-Zuchtlinie wurden mit pelletiertem Alleinfutter (1314, Aufzuchtfutter, Fa. Altromin, Lage) mit 0,9% Calcium, 0,7% Phosphor und 600 IU Vitamin D/kg, sowie Leitungswasser ad libitum versorgt.

Die Tiere wurden wöchentlich in saubere Käfige mit frischer Einstreu gesetzt. Drei Wochen nach der Geburt wurden die Jungen von ihren Eltern abgesetzt, nach Geschlecht getrennt und durch Ohrlochung markiert.

### 3.4. Zuchtstrategie

Die Zuchtpaare der VDR-, als auch der CalbindinD28k-Zuchtlinie bestanden ausschließlich aus heterozygoten Männchen und Weibchen: Durch diese Anpaarungen erhielt man Wurfgeschwister mit allen Genotypen, also homozygote, heterozygote und Wildtyp-Tiere.

<b>Weibchen</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>Männchen</b>		
<b>+</b>	<b>+/+</b>	<b>+/-</b>
<b>-</b>	<b>+/-</b>	<b>-/-</b>

Für die Doppel-Knockout-Linie wurden Zuchtpaare verwendet, die sowohl auf das Merkmal VDR, als auch auf das Merkmal CalbindinD28K heterozygot waren. Die Nachkommen dieser Anpaarungen stellten sich mit folgenden Genotypen dar:

<b>VDR</b>	<b>CAL</b>
<b>+/-</b>	<b>+/-</b>
<b>+/-</b>	<b>wt</b>
<b>+/-</b>	<b>-/-</b>
<b>wt</b>	<b>+/-</b>
<b>wt</b>	<b>wt</b>
<b>wt</b>	<b>-/-</b>
<b>-/-</b>	<b>+/-</b>
<b>-/-</b>	<b>wt</b>
<b>-/-</b>	<b>-/-</b>

Ausschließlich Nachkommen mit den rot markierten Genotypen wurden für den Versuch benötigt.

### **3.5. Tierversuche**

Die Versuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt und unter dem Aktenzeichen 209.1/211-2531-40/03 durchgeführt. Alle Tierversuche fanden am Institut für Physiologische Chemie und Tierernährung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München statt.

#### **3.5.1. Streptozotocin-induzierter Diabetes mellitus bei VDR- und CalD28k-Mutanten**

Bei diesem Versuch wird die Suszeptibilität von VDR- und CalD28k-Mutanten gegenüber Streptozotocin-induziertem Diabetes geprüft.

Für dieses Experiment wurden insgesamt je 25 männliche, oder weibliche Wildtyp- und homozygote Mäuse der VDR- als auch der CalbindinD28k-Zuchtlinien im Alter von 10-12 Wochen verwendet. Die Mäuse wurden über 5 Tage täglich mit 40 mg/kg Streptozotocin (Merck Biosciences, Schwalbach) behandelt. Die Substanz wurde in Zitronensäure-Zitrat-Puffer 0,01 M, pH 4,2 gelöst und mit einer Dosierung von 4mg/ml bei den VDR-Mäusen bzw. 5 mg/ml bei den Calbindin-Mäusen intraperitoneal injiziert. Die Gruppen umfassten je nach Verfügbarkeit der Tiere ca. 8-20 Tiere. An den Tagen 0, 4, 7, 10, 21, und 42 wurde die Blutglukose im Vollblut gemessen (One Touch Ultra, Lifescan, Neckargemünd). Die Blutentnahme erfolgte durch einen kleinen Stich in die Schwanzvene. Die kumulative Inzidenz von Hyperglykämie (> 200 mg/dl Glukose) wurde zwischen den verschiedenen Genotypen verglichen. Am Tag 42 wurden die Tiere durch Entbluten aus der Vena cava abdominalis unter Ketamin/Xylazin-Injektionsanästhesie (70 mg/kg Ketamin Hostaket, Fa. Hoechst, Wiesbaden und 7 mg/kg Xylazin Rompun 2%ig, Fa. Bayer, Leverkusen, i.p.) getötet. Das Pankreas wurde zur histologischen Untersuchung entnommen und in 4%igem Paraformaldehyd bei 4°C auf einem Magnetrührer fixiert (weiteres Vorgehen siehe unten).

### **3.5.2. Subkutane Glukosetoleranzen bei VDR-/CalD28k-Doppel-Mutanten**

Mit diesem Experiment soll geklärt werden, ob es in  $\beta$ -Zellen eine Interaktion auf molekularer Ebene zwischen VDR und CalbindinD28K gibt, und inwieweit CalbindinD28K eine Rolle für die Glukose-induzierte Insulinsekretion in vivo spielt.

Für dieses Vorhaben wurden ca. 10-12 Wochen alte, männliche oder weibliche VDR/CalD28k-Doppelmutanten verwendet. Es wurden ca. 10 Tiere pro folgender 4 Genotypen auf Rescue Diet (2,0% Calcium, 1,25% Phosphor, 20% Lactose) untersucht:

VDR (wt)	/	Cal (wt)
VDR (wt)	/	Cal (homo)
VDR (homo)	/	Cal (wt)
VDR (homo)	/	Cal (homo)

Die Tiere wurden im Alter von 10-11 Wochen vor Versuchsbeginn in ihrer normalen Umgebung für ca. 12 Stunden auf Hungergitter mit freiem Zugang zum Wasser gehalten. Danach wurde zum Zeitpunkt 0 die Blutglukose im Vollblut gemessen, anschließend wurde 1,5 mg/g Körpergewicht D(+) Glukosemonohydrat als 2molare Lösung in physiologischer Kochsalzlösung subkutan injiziert. Zu den Zeitpunkten 10, 20, 30, 60, 90, und 120 Minuten wurde erneut die Blutglukose im Vollblut durch eine kleine Inzision in die Schwanzvene gemessen (One Touch Ultra, Lifescan, Neckargemünd). Im Alter von 12 Wochen erhielten die Tiere vor dem jeweiligen Versuchsende 3 und 1 Tage vor ihrer Tötung eine Flourochrom-Doppelmarkierung von 20 mg/kg Calcein gelöst in 2%iger NaHCO<sub>3</sub> (Fa.Sigma, Deisenhofen) zur Kenntlichmachung der sich in Mineralisation befindenden Knochenoberfläche. Aufgrund seiner geringen Toxizität, seiner besonders stark fluoreszierenden Eigenschaften und der geringen Tendenz auszubleichen, gilt dieser Knochenmarker, der subkutan injiziert wird, als erstes Mittel der Wahl (ERBEN, 2003).

Die Versuchstiere wurden für 15 Stunden, einzeln, am Abend vor Versuchsende in Stoffwechsellkäfige gesetzt, mit freiem Zugang zum Wasser, jedoch vollständigem Futterentzug. Zur Bestimmung der Urinmenge, sowie der Veränderungen in der renalen Exkretion von Mineralien, wurde der Urin der Tiere aufgefangen.



Anschließend wurden die Tieren unter einer Ketamin/Xylazin-Injektionsnarkose (70 mg/kg Ketamin Hostaket®, Fa. Hoechst, Wiesbaden, und 7 mg/kg Xylazin Rompun® 2%ig, Fa. Bayer, Leverkusen, intraperitoneal) durch Entbluten aus der Vena cava abdominalis schmerzlos getötet.

Desweiteren wurden der linke und rechte Femur, der erste Lendenwirbel und die restliche Lendenwirbelsäule entnommen. Der linke Femur und die Lendenwirbelsäule wurden vom Weichgewebe gesäubert, in 70%igen Ethanol eingelegt und bis zur späteren Knochenmineraldichtemessung mittels pQCT (siehe unten) bei Zimmertemperatur gelagert.

Der rechte Femur und der erste Lendenwirbel, die für die Histologie bestimmt waren, wurden ebenfalls entfleischt, in kleine Histokörbchen verbracht und in 4%igem Paraformaldehyd (pH 7,4) bei 4°C auf einem Magnetrührer fixiert (weiteres Vorgehen siehe unten).

Nach Aliquotierung der gewonnenen Serumproben wurden diese bei –35°C gelagert.

### **3.5.3. Untersuchung der CalbindinD28k-Mutanten**

Bei diesem Experiment sollten die biochemischen Parameter des Knochenstoffwechsels der CalbindinD28k-Mutanten, deren Serum- und Urinparameter, sowie deren Knochengewebe histologisch untersucht werden.

Dazu wurden 18 männliche oder weibliche Mäuse (6 Wildtypen, 6 Heterozygote und 6 Homozygote) im Alter von ca. 9 Monaten verwendet.

Sie wurden in ihrer normalen Käfigumgebung gehalten. Handelsübliches, pelletiertes Alleinfuttermittel (1314, Fa. Altromin, Lage) mit 0,9% Calcium, 0,7% Phosphor und 600 IU Vitamin D/kg, sowie Leitungswasser stand ihnen ad libitum zur Verfügung.

Zur Kenntlichmachung der sich in Mineralisation befindenden Knochenoberfläche bekamen die Tiere an den Tagen 3 und 1 vor Versuchsende eine Fluorochrom-Doppelmarkierung von 20 mg/kg Calcein gelöst in NaHCO<sub>3</sub> (Fa. Sigma, Deisenhofen) subkutan. Sie wurden über Nacht, einzeln und nüchtern, mit freiem Zugang zu

Leitungswasser, in Stoffwechselfäßen gehalten, um später die Urinmenge, sowie dessen Zusammensetzung zu untersuchen.

Am nächsten Morgen bekamen sie intraperitoneal eine Ketamin/Xylazin-Injektionsnarkose (70 mg/kg Ketamin Hostaket®, Fa. Hoechst, Wiesbaden, und 7 mg/kg Xylazin Rompun®, Fa. Bayer, Leverkusen). Den Tieren wurde eine Blutprobe entnommen, danach wurden sie durch Entbluten aus der Vena cava abdominalis schmerzlos getötet.

Desweiteren wurden der linke Femur und der erste Lendenwirbel zur späteren histologischen Untersuchung entnommen und in 4%igen Paraformaldehyd bei 4°C auf einem Magnetrührer fixiert (weiteres Vorgehen siehe unten).

Der rechte Femur, sowie die restliche Lendenwirbelsäule wurden bis zur Mineraldichtebestimmung mittels pQCT in 70%igem Ethanol aufbewahrt.

Das gewonnene Serum wurde aliquotiert und bis zur weiteren Diagnostik bei -35°C gelagert.

### **3.6. Analyse biochemischer Parameter**

#### **3.6.1. Urinanalyse**

Nach Bestimmung der Urinmenge wurden von jeder Probe 125µl Urin zusammen mit 125µl 2 N HCl in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Hieraus wurde mit einem EFOX 5053 Flammenphotometer (Fa. Eppendorf, Hamburg) der Kalium-, Calcium- und Natriumspiegel bestimmt.

Aus der obigen Verdünnung (1:1) wurden 30 µl in ein weiteres Reaktionsgefäß mit 300 µl destilliertem Wasser pipettiert (1:22) und mit einem Hitachi 766 Automatic Analyzer (Fa. Boehringer, Mannheim) die Creatinin- und Phosphatkonzentration im Urin gemessen.

Mit folgender Formel wurde die renal-tubuläre Reabsorption von Phosphat (TRP) und Calcium (TRCa) berechnet:

$$\%TRP = [1 - (\text{UrP} \cdot \text{SeCrea}) / (\text{SeP} \cdot \text{UrCrea})] \cdot 100$$

$$\%TRCa = [1 - (\text{UrCa} \cdot \text{SeCrea}) / (\text{SeCa} \cdot \text{UrCrea})] \cdot 100$$

(Se: Serum, Ca: Calcium, P: Phosphat, Crea: Creatinin, Ur: im Urin gemessen)

### **3.6.2. Serumanalyse**

Die Blutproben, die den Versuchstieren bei den Versuchsenden entnommen wurden, wurden eine Stunde bei 30°C im Wärmeschrank gelagert und anschließend 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert, aliquotiert und bis zur Diagnostik bei –35°C gelagert.

Folgende Parameter wurden im Serum bestimmt: Natrium (Na), Kalium (K), Calcium (Ca), Aspartat-Amino-Transferase (AST), Alkalische Phosphatase (ALP), Gesamt-Bilirubin, Creatinkinase (CK), Albumin (ALB), Harnstoff (HAST), Creatinin (CREA), Phosphat (Ph). Der Spiegel von Natrium, Kalium und Calcium wurde durch Flammenphotometrie bestimmt (Modell EFOX 5053, Fa. Eppendorf, Hamburg). Aspartat-Amino-Transferase, Alkalische Phosphatase, Bilirubin, Harnstoff, Creatinin, Creatinkinase, Albumin und Phosphat wurde mit einem Hitachi 766 Automatic Analyzer (Fa. Boehringer, Mannheim) gemessen.

## **3.7. Histologie und Histomorphometrie**

### **3.7.1. Herstellung der Knochenschnitte für die Histologie**

#### **3.7.1.1. Präparation, Fixierung und Entwässerung der Knochen**

Die Knochen, die den Versuchstieren in Versuch 2 und 3 entnommen wurden, wurden sorgfältig von anhaftendem Weichteilgewebe gesäubert. Der distale Anteil der Femora wurde mit einer elektrischen Knochensäge vom proximalen Teil getrennt und zusammen mit dem ersten Lendenwirbel in Histokörbchen gelegt, welche mit Bleistift beschrifteten Papierschildchen versehen waren. Zur Fixierung wurden diese für 24 Stunden bei 4°C in 4%ige Paraformaldehyd-Lösung gegeben.

Um diese Lösung herzustellen wurden 8 g PFA-Pulver mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt und bis zur vollständigen Lösung bei ca. 80°C auf der Heizplatte eines Magnetrührers belassen. Um die Lösung zu klären, wurde 2 M NaOH tropfenweise zugegeben. Nach Kühlung wurde die Lösung mit 0.1 M Phosphatpuffer (2.722 g Kaliumhydrogenphosphat und 14.24 g di-Natriumhydrogenphosphat auf



Für die Einbettung wurden Rollrandgläser mit etwa 3 ml vorgekühltem Polymerisationsgemisch (frisch angesetzte MMA-III- Lösung wurde mit 600 µl N, N-Dimethyl-p-Toluidin pro 100 ml versetzt) gefüllt, für etwa 30 Sekunden mit CO<sub>2</sub> begast, um Luftsauerstoff zu entfernen, anschließend schnell verschlossen und bei 4°C bis zur vollständigen Polymerisation belassen.

Die entwässerten und mit MMA infiltrierte Knochen wurden auf diesen Böden platziert und die Rollrandgläser mit MMA-Polymerisationslösung (frische MMA-Lösung III mit Zusatz von 400µl des Polymerisationsbeschleunigers N,N-Dimethyl-para-Toluidin pro 100 ml) gefüllt und sofort verschlossen. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis ausgeführt. Schließlich wurden die Gläschen zur Polymerisation bei ca. -23°C für drei Tage in eine Klimakammer (Fa. Binder, Tuttlingen) verbracht. Anschließend wurden die eingebetteten Knochen im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

### **3.7.1.3. Herstellung der histologischen Knochenschnitte**

Nach vollständiger Polymerisation wurden die Gläschen mit einem Gummihammer durch leichtes Klopfen zerstört und entfernt. Mit Hilfe von Säge und Feile wurden die MMA-Blöcke in die zum Schneiden nötige Form gebracht („Trimmen“). Anschließend wurden aus der Sagittalebene der Femora, sowie aus der Medianebene der Lendenwirbel mit einem HM-360-Mikrotom (Fa. Microm, Walldorf) 3 µm dicke Knochenschnitte hergestellt. Während des Schneidens wurden das Hartmetallmesser (Mikrom) und die MMA-Blöcke mit Schneidflüssigkeit (0,1%iges TWEEN 20) feucht gehalten. Die Schnitte wurden direkt vom Mikrotommesser mit Hilfe einer Stachelschweinborste auf einen mit 3-Amino-Propyltriethoxysilan (APES, Fa. Sigma, Deisenhofen) vorbehandelten Objektträger gezogen, mit 70%igem Ethanol befeuchtet, und mit einem feinem Pinsel gestreckt. Der von Falten befreite Knochenschnitt wurde mit einer Kunststoff-Folie (Kisol-Folie, Fa. Kettenbach, Eschenburg) bedeckt und mit einem Gummiroller glatt gerollt. Die Objektträger wurden zum Trocknen in einer Presse gestapelt und im Wärmeschrank für 2 Tage bei 42°C aufbewahrt.

### **3.7.1.4. Färbung der Schnitte für die Histologie**

Zunächst wurden unter einem Mikroskop die qualitativ besten Schnitte in Bezug auf die richtige Schnittebene und das Vorhandensein von Artefakten ausgewählt.

Vor der Färbeprozedur wurde aus allen Schnitten das vorhandene Einbettmedium durch Entplasten (ERBEN, 1997) wie folgt entfernt:

2-Methoxyethylacetat	3 x 20 Minuten
70%iger Ethanol	5 Minuten
40%iger Ethanol	5 Minuten
Aqua dest.	5 Minuten

Mit der nachfolgenden *von-Kossa/Mc Neal Färbung* (SCHENK et al., 1984) zeigt sich eine intensive Schwarzfärbung der kalzifizierten Knochen mit Silbernitrat. Es wurden die folgenden Färbeschritte durchlaufen:

#### Von Kossa:

5%iges Silbernitrat	10 Minuten
Abspülen in aqua dest	3 x
Natriumcarbonat/Formaldehyd (150 ml 6.7%ige Natriumcarbonatlösung + 50 ml 38%ige Formaldehydlösung)	2 Minuten
Abspülen mit Leitungswasser	1 x
Farmer's Reducer (200 ml 10%ige Natriumthiosulfatlösung + 10 ml 10%ige Formaldehydlösung)	30 Sekunden
fließendes Leitungswasser	20 Minuten
Abspülen mit aqua dest.	1 x

#### McNeal:

5%ige Tetrachromlösung	60 Minuten
Abspülen mit aqua dest.	1 x
Abspülen mit Isopropanol (100%)	2 x
Xylol	5 Minuten

Die fertig gefärbten Schnitte verblieben in frischem Xylol bis sie mit DePex (Fa. Boehringer, Ingelheim) eingedeckt wurden.

An den Tagen 3 und 1 vor Versuchsende wurde den Tiere Calcein subkutan injiziert, um die aktiv in Mineralisation befindlichen Knochenoberflächen mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen. Zur Messung wurden die Knochenschnitte ohne Entplasten mit Fluoromount (Fa. Serva, Heidelberg) eingedeckt und bis zur Auswertung lichtgeschützt aufbewahrt.

### **3.7.2. Histomorphometrische Messungen**

Um die Knochenmorphologie auszuwerten, wurden ausschließlich zweidimensionale Parameter verwendet. Der Benennung aller Messergebnisse liegt die vom Histomorphometry Nomenclature Committee der American Society for Bone Mineral Research vorgeschlagenen Terminologie zugrunde (PARFITT et al. 1987).

#### **3.7.2.1. Statische Parameter**

Zur Auswertung der *Von Kossa* gefärbten Knochenschnitte der Femora wurde das vollautomatische Bildanalyseverfahren VIDAS (Fa. Zeiss, Oberkochen) in Verbindung mit einem Stereomikroskop SV 11 (Fa. Zeiss, Oberkochen) und eine digitale Kamera verwendet.

Vorerst musste der Messbereich des eingescannten Knochens bestimmt werden. Hierzu wurde die Spongiosa-Fläche durch einen 0,5 mm breiten Rand zur Epiphysenfuge und zur Kortikalis hin abgegrenzt, endokortikaler Knochen sollte nach Möglichkeit in die Messung nicht mit einbezogen werden. Durch das Bildanalyseverfahren wurde die Zahl (Number of Trabeculae, N. Tb), die Summe der Flächen (Total bone area, Tt.B.Ar) und die Summe der Umfänge (Total bone perimeter, Tt.B.Pm) der innerhalb der Messfläche (Tissue area, T.Ar) gelegenen Knochen trabekel bestimmt.

Daraus ließen sich folgende Parameter ableiten:

Bone Area = $Tt.B.Ar/T.Ar \times 100$	[%]
Bone Perimeter = $Tt.B.Pm/T.Ar$	[mm/mm <sup>2</sup> ]
Trabecular Width = $Tt.B.Ar/Tt.B.Pm \times 2000$	[ $\mu$ m]
Trabecular Number = $N.Tb/T.Ar$	[/mm <sup>2</sup> ]
Trabecular Area = $Tt.B.Ar/N.Tb$	[mm <sup>2</sup> ]
Trabecular Separation = $1/N.Tb - Tb.Wi$	[ $\mu$ m]

### **3.7.2.2. Dynamische Parameter**

Die mit Fluoromount eingedeckten Knochenschnitte wurden für die Fluoreszenz-Mikroskopie verwendet. Für die Auswertung benötigte man das halbautomatische Meßsystem VIDEOPLAN (Fa. Zeiss, Oberkochen) und ein Axioskop-Mikroskop mit Zeichentubus (Fa. Zeiss, Oberkochen). Mittels einer Quecksilber-Höchstdrucklampe vom Typ HBO 50 (Fa. Zeiss, Oberkochen) wird blaues Licht emittiert, welches die in die Knochen eingelagerten Calcein-Moleküle zu einer grünen, intensiven Fluoreszenz anregt (ERBEN, 2003).

### **3.8. Knochenmineraldichtemessung**

Die Messung der Knochenmineraldichte (bone mineral density, BMD) wurde mit der peripheren quantitativen Computertomographie (pQCT) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine nichtinvasive, röntgendiagnostische Methode, mit der Veränderungen der Knochenmineraldichte und der geometrischen Veränderungen dreidimensional dargestellt und analysiert werden können.

Zur Messung wurde ein XCT Research M+ pQCT Gerät (Fa. Stratec Medizintechnik, Pforzheim) verwendet. Die hierfür nötigen Femora wurden an den jeweiligen Versuchsenden, kurz nach dem Entbluten, entnommen, von Weichteilresten befreit und bei Zimmertemperatur in 70% Ethanol gelagert. Zur Vorbereitung wurden die Knochen in einem mit 70% Ethanol gefüllten Plastik-Reagenzgefäß mit einer kleinen Feder fixiert und positioniert. Zunächst wurden vier Schnittebenen festgelegt. Die Erste befand sich in der Mitte der Diaphyse des Femurs, die übrigen drei Mess-



ebenen lagen 1,5, 2 und 2,5 mm proximal der Gelenkfläche des Kniegelenks am distalen Femur. Die Voxelsize betrug 0.070 mm und als unterer Schwellenwert für die Berechnung der kortikalen Knochenmineraldichte wurde 600 mg/cm<sup>3</sup> gewählt.

Folgende Parameter der pQCT-Analyse wurden bestimmt:

Am Femurschaft:

Gesamtknochenmineraldichte in mg/cm<sup>3</sup> (Total density)

Kortikale Mineraldichte in mg/cm<sup>3</sup> (Cortical density)

Gesamtquerschnittsfläche in mm<sup>2</sup> (Total area)

Kortikale Dicke in mm (Cortical thickness)

Periostaler Umfang in mm (Periostal perimeter)

Endostaler Umfang in mm (Endostal perimeter)

An der Metaphyse:

Gesamtknochenmineraldichte in mg/cm<sup>3</sup> (Total density)

Kortikale und Subkortikale Mineraldichte in mg/cm<sup>3</sup> (Cortical and subcortical density)

Gesamtmineraldichte der Spongiosa in mg/cm<sup>3</sup> (Trabecular density)

Gesamtquerschnittsfläche in mm<sup>2</sup> (Total area)

Querschnittsfläche der Kortikalis und Subkortikalis in mm<sup>2</sup> (Cortical and subcortical area)

Querschnittsfläche der Spongiosa in mm<sup>2</sup> (Trabecular area)

### **3.9. Statistik**

Die statistischen Analysen wurden mittels SPSS für Windows 11.5 (SPSS, Chicago, USA) durchgeführt. Die Daten aus dem Doppel-Knockout-Experiment wurden mit der mehrfachen, faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) analysiert, um den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Resultate zu überprüfen. Zeigte sich ein signifikanter Unterschied beispielsweise in Bezug auf das Geschlecht, wurde die einfache Varianzanalyse (ANOVA) für jedes Geschlecht getrennt durchgeführt. Falls sich zwischen den Genotypen signifikante Unterschiede feststellen ließen, wurde als Post-hoc-Test der DUNNETT-T-Test durchgeführt, der die Gruppe *Wildtyp* als Kontrollgruppe verwendet und alle Gruppen mit dieser Gruppe vergleicht.

Für das Experiment mit den 9 Monate alten CalbindinD28k-Knockouts wurde eine einfache ANOVA und der DUNNETT-T-Test als Post-hoc-Test durchgeführt, wobei auch hier die Wildtyp-Gruppe als Kontrollgruppe diente.

Werte mit  $p < 0.05$  wurden für die Analysen als statistisch signifikant angesehen. Die Daten in den Tabellen sind als Mittelwerte und Standardabweichung, die Daten in den Abbildungen als Mittelwerte und Standardfehler angegeben.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. CalbindinD28k-Mauslinie**

Um die Langzeit-Wirkung einer fehlenden CalbindinD28k-Expression auf den Knochen- und Mineralstoffwechsel zu untersuchen, analysierten wir Wildtyp-, heterozygote und homozygote CalbindinD28k-Knockout-Mäuse im Alter von 9 Monaten.

#### **4.1.1. Phänotypische Veränderungen**

Die CalbindinD28k-Knockout-Mäuse wiesen im Vergleich zu den Heterozygoten beziehungsweise zu den Wildtypen keinerlei signifikante Differenz in Bezug auf das Gewicht auf (Tab. 1). Alle Mäuse zeigten normale Fruchtbarkeit, Lebenserwartung, und makroskopische Knochenmorphologie, unabhängig von den Genotypen.

#### **4.1.2. Biochemische Parameter in Serum und Urin**

Der Natriumgehalt im Serum war bei den Knock-out-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen signifikant erniedrigt (Tab. 1 und Abb. 2B). Das Kalium im Serum der Knockout-Mäuse war im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen leicht erniedrigt, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Tab. 1 und Abb. 2A). Die übrigen gemessenen Parameter im Serum wiesen keinerlei signifikante Besonderheiten auf.

Bei den im Urin gemessenen Parametern zeigte sich lediglich eine Signifikanz beim Kalium/Kreatinin-Verhältnis. Dieses war im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen bzw. heterozygoten Mäusen erniedrigt (Tab. 2 und Abb. 2C).

**Tab.1: Alter, Körpergewicht und biochemische Parameter in Vollblut und Serum**

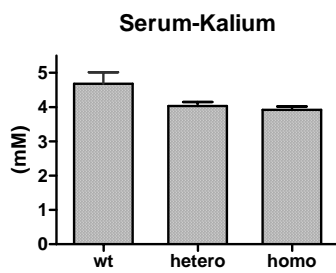
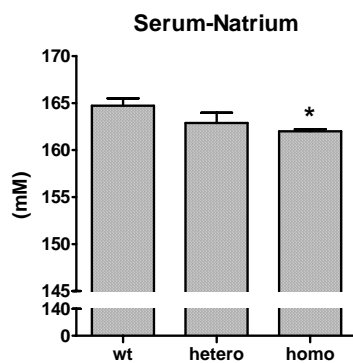
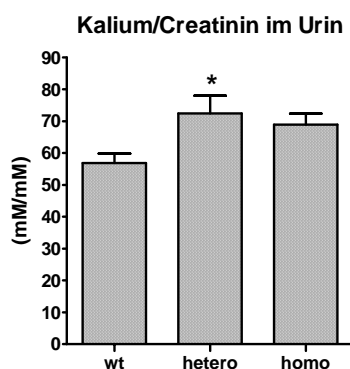
Genotyp	KG	Alter	Na <sup>+</sup> Vollblut	K <sup>+</sup> Vollblut	Ionis.Ca <sup>2+</sup>
	[g]	[d]	[mM]	[mM]	[mM]
Wildtyp	33,3 ± 6,6	285 ± 19	153 ± 1	4,55 ± 1	1,29 ± 0,05
Heterozygot	34,4 ± 4,6	288 ± 17	154 ± 2	4,10 ± 0,00	1,34 ± 0,01
Homozygot	32,5 ± 5,3	288 ± 19	152 ± 0	4,75 ± 0,49	1,34 ± 0,05
ANOVA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Genotyp	K Serum	Na Serum	Ca Serum	AST	AP
	[mM]	[mM]	[mM]	[U/l]	[U/l]
Wildtyp	4,68 ± 0,75	164 ± 2	2,31 ± 0,12	100 ± 27	96,1 ± 25,2
Heterozygot	4,03 ± 0,26	162 ± 2	2,27 ± 0,02	127 ± 43	77,8 ± 18,5
Homozygot	3,92 ± 0,33	161 ± 1*	2,24 ± 0,05	82,8 ± 5,93	128 ± 113
ANOVA	n.s.	p<0,05	n.s.	n.s.	n.s.

Genotyp	Gesamt-Bilirubin	CK	Albumin	Harnstoff	Creatinin
	[μM]	[U/l]	[G/l]	[mM]	[μM]
Wildtyp	1,20 ± 0,57	325 ± 269	34,7 ± 3,4	11,5 ± 3,1	14,6 ± 2,1
Heterozygot	1,86 ± 1,19	658 ± 721	32,8 ± 2,5	13,3 ± 2,5	13,6 ± 1,1
Homozygot	1,14 ± 0,57	207 ± 141	33 ± 2	10,9 ± 2,6	14 ± 1
ANOVA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Genotyp	Phosphat
	[mM]
Wildtyp	3,45 ± 0,75
Heterozygot	2,79 ± 0,65
Homozygot	2,78 ± 0,29
ANOVA	n.s.

Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung (n= 6-11 pro Gruppe) angegeben, einfache ANOVA gefolgt von Dunnett-T-Test, \* p<0.05 vs. Wildtyp-Kontrolle

**A****B****C****Abb.2A-C:**

Biochemische Parameter im Serum und Urin von ca. 9 Monate alten CalbindinD28k-Mutanten auf Normal-Diät. **(A)** Der Kalium-Gehalt im Serum ist bei den homozygoten Mäusen im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen verringert, erreicht jedoch keine statistische Signifikanz. **(B)** Der Natrium-Gehalt im Serum zeigt bei den homozygoten Mäusen ebenfalls einen Abfall im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen. Der Dunnett-T-Test zeigt, dass ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Genotypen besteht. **(C)** Das Kalium/Kreatinin-Verhältnis im Urin ist bei den heterozygoten Tieren am Höchsten und zeigt auch bei den homozygoten Tieren höhere Werte als bei Wildtyp-Mäusen. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben (n=6-11 pro Gruppe). Einfache ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test, \*p<0.05 vs. Wildtyp-Kontrolle

**Tab.2: Biochemische Parameter im Urin**

Genotyp	UrCrea	UrNa/Crea	UrCa	UrCa/Crea	UrK/Crea
	[mM]	[mM/mM]	[mM]	[mM/mM]	[mM/mM]
<b>Wildtyp</b>	112 ± 39	39,5 ± 15,8	1,62 ± 0,76	1,37 ± 0,60	56,9 ± 9,7
<b>Heterozygot</b>	93,3 ± 17,7	51,7 ± 6,8	1,82 ± 1,22	1,93 ± 1,58	72,5 ± 13,6
<b>Homozygot</b>	97,2 ± 10,5	44,7 ± 9,3	1,00 ± 0,50	0,93 ± 0,41	68,9 ± 8,4
<b>ANOVA</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Genotyp	UrP/Crea	%TRP	%TRCa	%TRCa <sup>2+</sup>	P/die
	[mM/mM]	[%]	[%]	[%]	[μmol/24h]
<b>Wildtyp</b>	14,2 ± 3,7	93,6 ± 3	99,2 ± 0,3	98,7 ± 0,5	2,22 ± 1,67
<b>Heterozygot</b>	13,4 ± 4,6	92,5 ± 2,3	99,2 ± 0,4	98,5 ± 0,9	2,40 ± 1,30
<b>Homozygot</b>	12,2 ± 1,5	93,8 ± 1,6	99,5 ± 0,2	99,3 ± 1,0	1,57 ± 0,96
<b>ANOVA</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Genotyp	DPD/24h	DPD/Crea
	[pmol/24h]	[mmol/mmol]
<b>Wildtyp</b>	5,23 ± 2,98	19,4 ± 8,6
<b>Heterozygot</b>	7,27 ± 3,00	20,3 ± 9,8
<b>Homozygot</b>	6,77 ± 6,16	19,2 ± 11,8
<b>ANOVA</b>	n.s.	n.s.

Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung (n= 6-11 pro Gruppe) angegeben. Einfache ANOVA gefolgt von Dunnett-T-Test.

#### **4.1.3. Histologische Knochenuntersuchung**

Die Knochenmineralisation, die mittels Calcein-Doppelmarkierung dargestellt wurde, konnte nur bei den Femora der männlichen CalbindinD28k-Mäusen ausgewertet werden, da die weiblichen Mäuse zu wenig trabekulären Knochen aufwiesen und eine Auswertung somit unmöglich machten. Bei den männlichen Tieren zeichneten sich keine signifikanten Veränderungen ab (Tab. 3). Die Knochenformationsrate war jedoch bei homozygoten gegenüber Wildtyp-Tieren um etwa 62 % erniedrigt, was jedoch aufgrund der geringen n-Zahlen keine statistische Signifikanz erreichte.

**Tab.3: Dynamische histomorphometrische Parameter der männlichen CalbindinD28k-Mutanten**

<b>Genotyp</b>	<b>MPm/B.Pm</b>	<b>MAR</b>	<b>BFR/B.Pm</b>
♂	[%]	[ $\mu\text{m}/\text{d}$ ]	[ $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}/\text{d}$ ]
<b>Wildtyp</b>	17,8 $\pm$ 10,6	2,63 $\pm$ 0,37	0,50 $\pm$ 0,31
<b>Heterozygot</b>	8,80 $\pm$ 5,00	2,79 $\pm$ 0,31	0,25 $\pm$ 0,16
<b>Homozygot</b>	8,07 $\pm$ 2,12	2,35 $\pm$ 0,04	0,19 $\pm$ 0,05
<b>ANOVA</b>	n.s.	n.s.	n.s.

MPm: Mineralizing Perimeter, MAR: Mineral Apposition Rate, BFR: Bone Formation Rate. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=2-4 pro Gruppe, nur männlich) angegeben. Einfache ANOVA gefolgt von Dunnett-T-Test.

Auch bei der Auswertung der statischen histomorphometrischen Messungen wurden keine statistischen Signifikanzen erreicht. Es zeigte sich somit kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen in Bezug auf die strukturellen Knochenparameter. Im Hinblick auf das Geschlecht zeigen die weiblichen Mäuse bei den Parametern *Bone Area*, *Bone Perimeter*, *Trabecular Width* und *Trabecular Number* niedrigere Werte als die Männchen, bei den Parametern *Trabecular Area* und *Trabecular Separation* höhere Werte als die Männchen (Tab. 4). Die trabekuläre Knochenfläche war bei den weiblichen Mäusen mit ca. 1% extrem niedrig.

**Tab.4: Statische histomorphometrische Parameter bei männlichen und weiblichen CalbindinD28k-Mäusen**

	Genotyp	Bone Area	Bone Perimeter	Trabecular Width	Trabecular Number	Trabecular Area	Trab. Separation
		[B.Ar/T.Ar] [%]	[B.Pm/T.Ar] [mm/mm <sup>2</sup> ]	[Tb.Wi] [μm]	[N.Tb/T.Ar] [1/mm <sup>2</sup> ]	[B.Ar/N.Tb] [mm <sup>2</sup> ]	[Tb.Sp] [μm]
Männlich	Wildtyp	6,25 ± 1,38	4,75 ± 0,60	26,2 ± 4,0	10,2 ± 3,8	178 ± 108	313 ± 43
	Heterozygot	5,44 ± 2,36	4,26 ± 1,32	25 ± 3	9,86 ± 0,56	200 ± 60	371 ± 99
	Homozygot	5,37 ± 2,98	4,12 ± 2,47	26,5 ± 1,4	7,26 ± 1,27	152 ± 60	442 ± 276
Weiblich	Wildtyp	1,03 ± 1,01	0,76 ± 0,31	23,7 ± 16,9	3,57 ± 0,02	657 ± 640	2224 ± 917
	Heterozygot	1,30 ± 1,80	1,43 ± 1,94	14,5 ± 5,3	4,54 ± 5,75	937 ± 850	13850±18816
	Homozygot	1,00 ± 0,70	1,23 ± 0,74	15,8 ± 1,6	4,70 ± 1,67	539 ± 144	1606 ± 840
	ANOVA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung (n=2-4 pro Gruppe, nach Geschlecht getrennt) angegeben. Einfache ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test.

#### **4.1.4. Knochenmineraldichtemessung**

##### **4.1.4.1. Femurschaft**

Die mit Hilfe des pOCT gemessenen Daten zeigten keine Auffälligkeiten und wurden für Männchen und Weibchen getrennt ausgewertet.



**Tab.5: Knochenmineraldichtemessung des Femurschafts bei Calbindin-D28k-Mutanten**

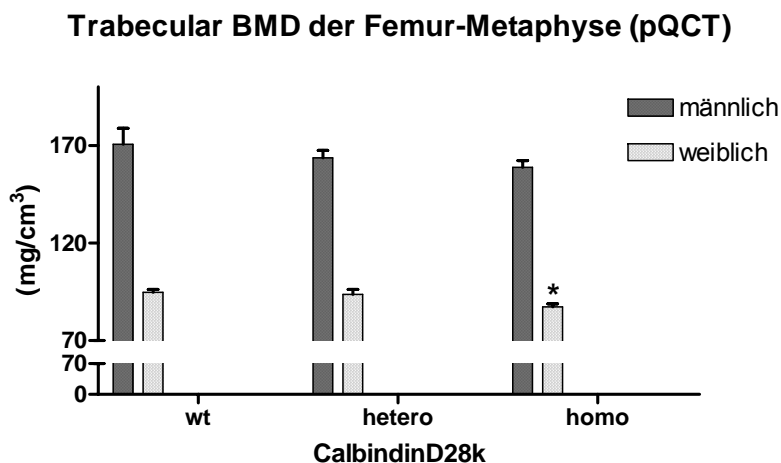
Parameter	weiblich			männlich			ANOVA
	Wildtyp	Hetero	Homo	Wildtyp	Hetero	Homo	
<b>Total Density</b> [mg/cm <sup>3</sup> ]	686 ± 34	656 ± 12	675 ± 20	577 ± 33	559 ± 36	572 ± 25	n.s.
<b>Total Area</b> [mm <sup>2</sup> ]	2,13 ± 0,15	2,22 ± 0,06	2,09 ± 0,20	2,71 ± 0,07	2,73 ± 0,09	2,56 ± 0,06	n.s.
<b>Cortical Density</b> [mg/cm <sup>3</sup> ]	1235 ± 17	1206 ± 15	1215 ± 16	1180 ± 26	1172 ± 14	1182 ± 38	n.s.
<b>Cortical Area</b> [mm <sup>2</sup> ]	1,03 ± 0,04	1,06 ± 0,03	1,02 ± 0,07	1,14 ± 0,07	1,10 ± 0,05	1,04 ± 0,04	n.s.
<b>Cortical Thickness</b> [mm]	0,23 ± 0,00	0,23 ± 0,00	0,23 ± 0,00	0,22 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,01	n.s.
<b>Periosteal Perimeter</b> [mm]	5,17 ± 0,19	5,28 ± 0,07	5,12 ± 0,24	5,84 ± 0,08	5,85 ± 0,08	5,67 ± 0,06	n.s.
<b>Endocortical Perimeter</b> [mm]	3,70 ± 0,21	3,81 ± 0,06	3,67 ± 0,22	4,45 ± 0,12	4,52 ± 0,18	4,37 ± 0,03	n.s.

Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=2-6), einfache ANOVA, anschließender Dunnett-T-Test.

#### **4.1.4.2.Femur-Metaphyse**

Die Knochenmineraldichtemessung an der Femur-Metaphyse zeigte eine signifikante Verringerung der *Trabecular Bone Mineral Density (TrBMD)* bei weiblichen CalbindinD28k-Knockout-Mäuse (Tab. 6). Allerdings ist die Differenz minimal und die trabekuläre Knochenmineraldichte der homozygoten, weiblichen Tiere nur um etwa 8% geringer als die der Wildtypen (Abb. 3) Auch bei den Männchen zeichnet sich dieser Trend ab, erreicht jedoch hier keine statistische Signifikanz.

Passend zu den histologischen Auswertungen zeigte sich ein Unterschied in der trabekulären Knochenmineraldichte von Männchen und Weibchen, die bei den Weibchen wesentlich geringer ist (Tab. 6,7 und Abb. 3).



**Abb.3:** *Trabecular Bone Mineral Density.* Bei den weiblichen Tieren zeigt sich eine deutliche Verringerung der *trBMD*. Bei allen Tieren ist die *trBMD* bei den Homozygoten reduziert. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben (n=2-6 pro Gruppe) einfache ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test. \*p<0.05 vs. Wildtyp-Kontrolle.

**Tab.6: Knochenmineraldichtemessung der Femur-Metaphyse bei weiblichen CalbindinD28k-Mutanten**

Parameter	Einheit	Wildtyp	Heterozygot	Homozygot	ANOVA
Total BMD	[mg/cm <sup>3</sup> ]	398 $\pm$ 17	375 $\pm$ 4	382 $\pm$ 37	n.s.
Cortical/Subcortical BMD	[mg/cm <sup>3</sup> ]	827 $\pm$ 14	804 $\pm$ 8	812 $\pm$ 39	n.s.
Trabecular BMD	[mg/cm <sup>3</sup> ]	94,8 $\pm$ 3,2	93,7 $\pm$ 3,5	87,3 $\pm$ 3,1*	p<0,05
Total Area	[mm <sup>2</sup> ]	3,50 $\pm$ 0,22	3,86 $\pm$ 0,13	3,57 $\pm$ 0,33	n.s.
Cortical/Subcortical Area	[mm <sup>2</sup> ]	1,43 $\pm$ 0,08	1,52 $\pm$ 0,07	1,43 $\pm$ 0,15	n.s.
Trabecular Area	[mm <sup>2</sup> ]	2,07 $\pm$ 0,17	2,34 $\pm$ 0,06	2,14 $\pm$ 0,22	n.s.

Die Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben (n= 2-5 pro Gruppe), einfache ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test. \*p<0.05 vs. Wildtyp-Kontrolle

**Tab.7: Knochenmineraldichtemessung der Femur-Metaphyse bei männlichen CalbindinD28k-Mutanten**

Parameter	Einheit	Wildtyp	Hetero	Homo	ANOVA
Total BMD	[mg/cm <sup>3</sup> ]	397 ± 38	394 ± 8	384 ± 14	n.s.
Cortical/Subcortical BMD	[mg/cm <sup>3</sup> ]	750 ± 21	752 ± 7	742 ± 12	n.s.
Trabecular BMD	[mg/cm <sup>3</sup> ]	170 ± 20	163 ± 8	158 ± 5	n.s.
Total Area	[mm <sup>2</sup> ]	4,38 ± 0,14	4,33 ± 0,13	4,18 ± 0,03	n.s.
Cortical/Subcortical Area	[mm <sup>2</sup> ]	1,72 ± 0,20	1,71 ± 0,07	1,62 ± 0,02	n.s.
Trabecular Area	[mm <sup>2</sup> ]	2,66 ± 0,16	2,62 ± 0,10	2,56 ± 0,05	n.s.

Die Werte wurden als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n= 2-6 pro Gruppe), einfache ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test. \*p<0.05 vs. Wildtyp-Kontrolle

#### **4.2. CalbindinD28k/VDR-Doppelmutanten**

Um die Interaktion zwischen dem Kalzium-bindenden Protein CalbindinD28k und dem VDR näher betrachten zu können, wurden Doppel-Mutanten erzeugt.

Bei der statistischen Auswertung des Versuchs wurde folgendermaßen vorgegangen: Zuerst wurde eine mehrfache, faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, um eventuelle Effekte der Faktoren *Geschlecht*, *VDR*, *CAL*, oder eventuelle wechselseitige Interaktionen untereinander zu analysieren. Zeigte sich hierbei keine Signifikanz, wurden alle Daten zusammen statistisch analysiert. Erhielten wir jedoch bei der mehrfachen, faktoriellen Varianzanalyse einen signifikanten Einfluss des Faktors *Geschlecht* wurde die einfache Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Dunnett-T-Test für jedes Geschlecht getrennt durchgeführt.

##### **4.2.1. Phänotypische Veränderungen**

Bei den homozygoten VDR-Mutanten zeigten sich, unabhängig vom CalbindinD28k-Genotyp, die gleichen phänotypischen Veränderungen wie bei VDR-Knockout-Mäusen. Ab der 4. Lebenswoche zeigte sich eine ausgeprägte Alopezie. Die übrigen Veränderungen der VDR-Mutanten, wie Hypokalzämie, sekundärer Hyperparathyreoidismus und Rachitis blieben aus, weil die Tiere ab der Geburt mit einer kalziumreichen Rescue Diet versorgt wurden. Auf diese Weise konnten

eventuelle Veränderungen festgestellt werden, die unabhängig von der Kalzium-Homöostase der Tiere sind. Die Doppel-Knockout-Mäuse zeigten neben der Alopezie ein Zurückbleiben in Größe und Gewicht. Die Lebenserwartung konnte nur bis zum 3. Lebensmonat beurteilt werden, weil zu diesem Zeitpunkt alle Tiere getötet wurden.

#### **4.2.2. Biochemische Parameter in Serum und Urin**

Um abzuklären, ob die Faktoren *VDR*, *CalbindinD28k* oder das *Geschlecht* einen Einfluss auf die Ergebnisse haben, beziehungsweise ob sich eine Interaktion zwischen diesen drei Faktoren feststellen lässt, wurde eine faktorielle, mehrfache Varianzanalyse durchgeführt (Tab. 8).

Die faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) ergab einen signifikanten Effekt von *VDR* auf die Parameter NaSerum, AST, CK, UrK/Crea, UrCa/Crea, UrP/crea und UrCrea. Das *Geschlecht* hatte signifikante Auswirkungen auf das Körpergewicht und das Verhältnis UrK/Crea. Zusätzlich lässt sich keine eindeutige Interaktion zwischen *VDR* und *CalbindinD28k* feststellen.

**Tab.8: Faktorielle Varianzanalyse der Parameter in Urin und Serum von Doppel-Knockout Mäusen**

Variable	VDR	CAL	SEX	VDR*CAL	VDR*SEX	CAL*SEX	VDR*CAL*SEX
KG	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
K Serum	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Na Serum	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Ca Serum	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.
AST	p<0.05	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.
AP	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
T-Bili	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CK	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
ALB	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HAST	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CREA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.
Phos	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
UrNa/Crea	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
UrK/Crea	p<0.05	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.
UrCa/Crea	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
UrCrea	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
UrP/Crea	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.
%TRCa	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Mehrfache Varianzanalyse (ANOVA), n.s.: nicht signifikant, \* gegenseitige Interaktion

Die Messung von klinisch-chemischen Serumparametern zeigte bei der anschließenden einfachen Varianzanalyse signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen in Bezug auf die Parameter *Natrium*, *Aspartataminotransferase (AST)*, *PTH (Parathormon)* und *Creatinkinase (CK)*. Der *Natrium*spiegel der Doppel-Knockout-Mäuse und der VDR(homo)/CalD28k(wt)-Mäuse war im Vergleich zu den anderen zwei Gruppen erniedrigt. Bei der Gruppe VDR(homo)/CalD28k(wt) zeigten sich außerdem signifikant reduzierte *AST- und CK*-Spiegel (Tab. 9 und Abb. 4A-C). Serum-PTH war bei den Doppel-Knockouts und VDR-Knockouts signifikant erhöht. Dieser Wert war bei den VDR-Knockouts ca. 3mal, und bei den Doppel-Knockouts ca. 15mal so hoch wie bei den Wildtyp-Mäusen.

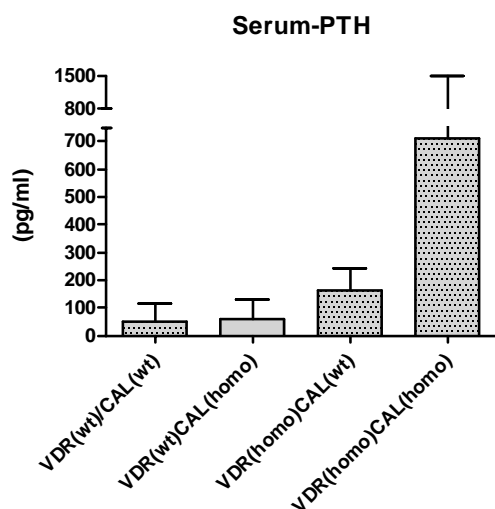
Im Urin wurden ebenfalls Unterschiede bei den Doppel-Knockout-Mäusen und VDR(homo)/CalD28k(wt)-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen festgestellt. Das *Ca/Crea*-Verhältnis war bei ihnen höher als bei den Wildtyp-Mäusen. Auch das *P/Crea*-Verhältnis war erhöht, erreichte aber im anschließenden Dunnett-T-Test keine statistische Signifikanz. Der *Kreatinin*-Gehalt im Urin, sowie die renal-tubuläre Reabsorption von Kalzium war bei diesen beiden Gruppen niedriger als bei den Wildtyp-Mäusen (Tab. 10 und Abb. 4D-F).

**Tab. 9: Alter, Gewicht und Biochemische Parameter im Serum der VDR/CalD28k-Doppelmutanten**

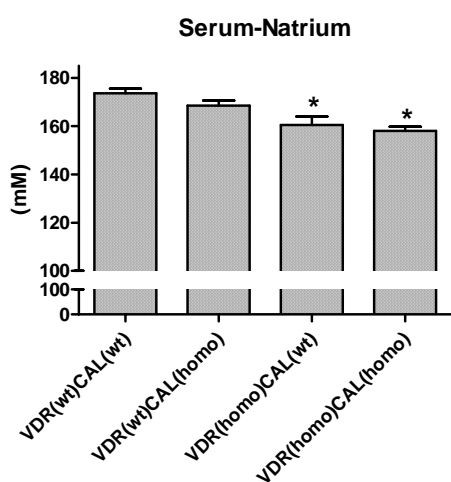
Parameter		VDR(wt) CalD28k(wt)	VDR(wt) CalD28k(homo)	VDR(homo) CalD28k(wt)	VDR(homo) CalD28k(homo)	ANOVA
KG	[g]	20,5 ± 4,9	20,3 ± 3,0	20,4 ± 5,4	16,5 ± 1,7	n.s.
Alter	[d]	87,4 ± 4,2	87,1 ± 6,8	89 ± 6	88,3 ± 6,7	n.s.
K Serum	[mM]	5,36 ± 1,67	5,07 ± 1,13	5,08 ± 0,60	5,32 ± 1,69	n.s.
Na Serum	[mM]	173 ± 7	168 ± 8	160 ± 9*	158 ± 5*	p<0,05
Ca Serum	[mM]	2,41 ± 0,10	2,32 ± 0,12	2,34 ± 0,10	2,30 ± 0,17	n.s.
AST	[U/l]	90,4 ± 25,5	97,4 ± 37,5	177 ± 110*	107 ± 90	p<0,05
AP	[U/l]	109 ± 30	109 ± 23	120 ± 52	132 ± 38	n.s.
T-Bili	[µM]	2,15 ± 0,90	2,21 ± 0,58	2,76 ± 1,28	2,52 ± 1,53	n.s.
CK	[U/l]	396 ± 295	328 ± 183	1099 ± 1145*	581 ± 584	p<0,05
ALB	[g/l]	36,3 ± 2,7	34,7 ± 2,5	37,2 ± 4,5	35,4 ± 3,7	n.s.
HAST	[mM]	14,8 ± 3,8	12,8 ± 1,7	13,8 ± 2,7	14,2 ± 2,3	n.s.
CREA	[µM]	15,3 ± 3,3	13,9 ± 3,0	13,8 ± 4,1	12,8 ± 2,6	n.s.
Phos	[mM]	3,26 ± 0,56	3,18 ± 0,75	3,52 ± 0,54	3,64 ± 0,94	n.s.
PTH	[pg/ml]	48 ± 66	61 ± 67	161 ± 81	711 ± 780*	p<0,05

Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=8-13 pro Gruppe), einfache ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test.\*p<0.05 vs. Wildtyp-Kontrolle

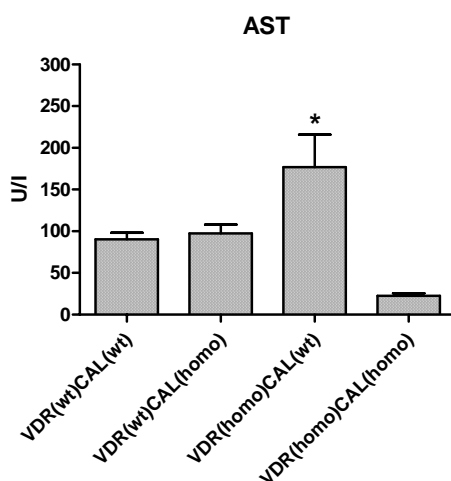
A



B



C

**Abb.4A-D:**

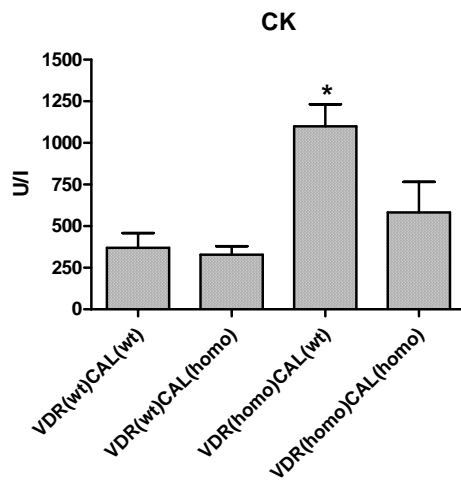
Biochemische Parameter im Serum von ca. 12 Wochen alten VDR/CalD28k-Doppel-Mutanten

**(A)** Die PTH-Werte bei den Doppel-Knockouts lagen in etwa 15mal so hoch wie bei den Wildtyp-Mäusen, bei den VDR-Knockouts in etwa 3mal so hoch

**(B)** Der Natrium Gehalt im Serum der VDR/CalD28k-Doppel-Knockouts und der VDR-(homo)CAL(wt)-Gruppe ist im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen erniedrigt. **(C)** Die Enzymaktivität der *Aspartataminotransferase* (AST) ist bei den VDR(homo)CAL(wt)-Tieren am höchsten und bei den Wildtyp-Mäusen am geringsten. **(D)**

Ähnlich verhält sich die *Creatinkinase* (CK). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben (n=8-13 pro Gruppe), einfache Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Dunnett-T-Test. \*p<0.05 vs. Wildtyp-Kontrolle.

## D



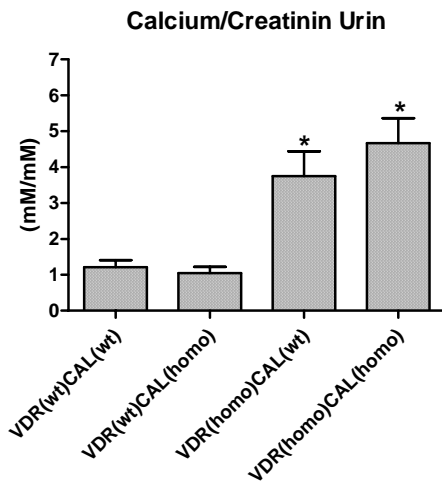
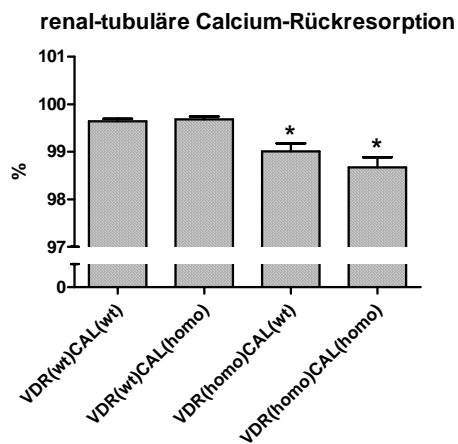
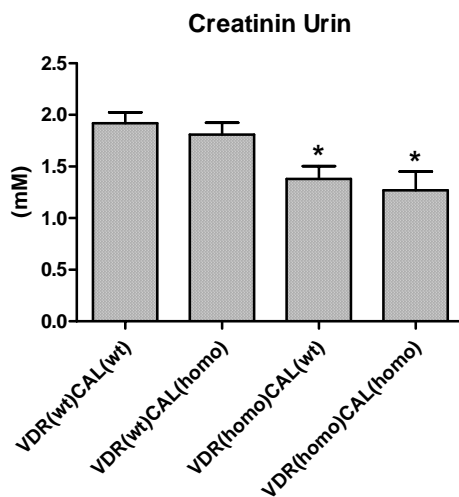
**Tab.10: Biochemische Parameter im Urin der VDR/CalD28k-Doppelmutanten**

Parameter	VDR(wt) CalD28k(wt)	VDR(wt) CalD28k(homo)	VDR(homo) CalD28k(wt)	VDR(homo) CalD28k(homo)	ANOVA
UrNa/Crea [mM/mM]	60,2 ± 17,5	62 ± 18	49,2 ± 26,0	55,2 ± 24,8	n.s.
UrK/Crea [mM/mM]	64,1 ± 15,4	61,3 ± 13,1	76,9 ± 26,8	78,7 ± 23,5	n.s.
UrCa/Crea [mM/mM]	1,21 ± 0,68	1,05 ± 0,67	3,75 ± 1,95*	4,67 ± 2,20*	p<0,05
UrCrea [mM]	1,92 ± 0,36	1,81 ± 0,44	1,38 ± 0,35*	1,27 ± 0,57*	p<0,05
UrP/Crea [mM/mM]	1,79 ± 0,88	1,66 ± 0,74	2,51 ± 1,24	2,70 ± 0,80	n.s.
%TRCa [%]	99,6 ± 0,2	99,7 ± 0,2	99,0 ± 0,4*	98,7 ± 0,7*	p<0,05

Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=8-13 pro Gruppe), einfache ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test.

\*p<0.05 vs. Wildtyp-Kontrolle



**E****F****G****Abb4 E-G:**

**(E)** Das Kalzium/Kreatinin-Verhältnis ist bei der VDR(homo)CAL(homo)- beziehungsweise VDR(homo)-CAL(wt)-Gruppe deutlich gegenüber den Wildtyp-Tieren erhöht. **(F)** Die renal-tubuläre Rückresorption von Kalzium ist bei den VDR-(homo)CAL(homo)-Tieren am Geringsten. **(G)** Beim Kreatiningehalt im Urin zeigt sich bei den Doppel-Knockout-Mäusen beziehungsweise den VDR-(homo)CAL(wt)-Tieren eine deutliche Erhöhung gegenüber den Wildtyp-Kontrollen. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben (n=8-13 pro Gruppe). Einfache ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test, \*p<0.05 vs. Wildtyp-Kontrolle

### 4.2.3. Histologische Knochenuntersuchung

Um auch hier die Einflüsse der Variablen *VDR*, *CAL* und *Geschlecht* auf die Knochenmineralisation zu überprüfen, wurde eine faktorielle, mehrfache Varianzanalyse durchgeführt. Die Variable *VDR* hatte signifikante Auswirkungen auf den Parameter MPM (Mineralizing Perimeter) (Tab. 11). Der MPM der *VDR*-Knockouts war tendenziell verringert, was jedoch beim anschließenden Dunnett-T-Test keine statistische Signifikanz erreichte (Tab. 12).

**Tab.11: Faktorielle Varianzanalyse der dynamischen histomorphometrischen Parameter der *VDR*/*CalD28k*-Doppel-Knockout-Mäuse**

Variable	VDR	CAL	SEX	VDR*CAL	VDR*SEX	CAL*SEX	VDR*CAL*SEX
MPM	p<0.05.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
MAR	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
BFR	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Mehrfache Varianzanalyse (ANOVA), n.s.:nicht-signifikant; \*gegenseitige Interaktion

**Tab.12: Dynamische histomorphometrische Parameter der *VDR*/*CalD28k*-Doppel-Knockout-Mäuse**

Genotyp	MPm/B.Pm	MAR	BFR/B.Pm
	[%]	[ $\mu\text{m}/\text{d}$ ]	[ $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}/\text{d}$ ]
VDR(wt)/ <i>CalD28k</i> (wt)	17,8 ± 12,0	2,92 ± 0,80	0,58 ± 0,46
VDR(wt)/ <i>CalD28k</i> (homo)	25,4 ± 9,4	3,04 ± 0,55	0,80 ± 0,44
VDR(homo)/ <i>CalD28k</i> (wt)	13,2 ± 7,5	3,04 ± 0,55	0,43 ± 0,29
VDR(homo)/ <i>CalD28k</i> (homo)	9,62 ± 9,90	3,27 ± 0,80	0,34 ± 0,39
ANOVA	n.s.	n.s.	n.s.

Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=8-13 pro Gruppe), einfache ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test.

Interessanterweise wurde bei der faktoriellen mehrfachen Varianzanalyse festgestellt, dass der Faktor *VDR*, die Interaktion zwischen *VDR* und dem *Geschlecht*, sowie die zwischen *CAL* und dem *Geschlecht* einen signifikanten Einfluss auf den Parameter *Trabecular Area* nimmt (Tab. 13). Des weiteren hat der Faktor *VDR*,

sowie dessen Interaktion mit der Variable *Geschlecht* auch Auswirkungen auf die *Trabecular Width* und *Trabecular Thickness* (Tab. 13). Das Geschlecht nimmt in jedem Fall keinen Einfluss auf die von uns gemessenen Daten.

Bei der anschließenden einfachen ANOVA der statischen Parametern der histomorphometrischen Messungen zeigte sich eine tendenziell geringere *Trabecular Width und Thickness* bei der VDR(homo)CAL(wt)-Gruppe und den Doppel-Knockouts, es wurde mit diesem Ergebniss jedoch keine statistische Signifikanz erreicht (Tab. 14) In Hinblick auf die *Trabecular Area* konnte bei den Doppel-Knockouts ein höherer Wert als bei den Wildtyp-Mäusen festgestellt werden, jedoch auch hier ohne statistische Signifikanz.

**Tab.13: Faktorielle Varianzanalyse der statischen histomorphometrischen Parameter der VDR/CalD28k-Doppel-Knockout-Mäuse**

Variable	VDR	CAL	SEX	VDR*CAL	VDR*SEX	CAL*SEX	VDR*CAL*SEX
<b>Bone Area</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Bone Perimeter</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Trabecular Width</b>	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.
<b>Trabecular Number</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Trabecular Area</b>	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	p<0.05	p<0.05	n.s.
<b>Trabecular Thickness</b>	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.
<b>Trab. Separation</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Mehrfache Varianzanalyse, n.s.= nicht signifikant, \*gegenseitige Interaktion

**Tab.14: Statische histomorphometrische Parameter der VDR/CalD28k-Knockout-Mäuse**

Parameter		VDR(wt) CalD28k(wt)	VDR(wt) CalD28k(homo)	VDR(homo) CalD28k(wt)	VDR(homo) CalD28k(homo)	ANOVA
<b>Bone Area</b>	[B.Ar/T.Ar] [%]	9,87 ± 4,61	10,7 ± 2,4	10,4 ± 3,1	8,62 ± 5,80	n.s.
<b>Bone Perimeter</b>	[B.Pm/T.Ar] [mm/mm <sup>2</sup> ]	8,07 ± 2,51	8,53 ± 1,20	9,05 ± 2,33	7,72 ± 3,84	n.s.
<b>Trabecular Width</b>	[Tb.Wi] [µm]	23,6 ± 3,7	25,1 ± 4,1	23 ± 5	20,94 ± 5,36	n.s.
<b>Trabecular Number</b>	[N.Tb/T.Ar] [1/mm <sup>2</sup> ]	17,9 ± 3,1	17,9 ± 3,7	19,4 ± 5,2	18,61 ± 4,20	n.s.
<b>Trabecular Area</b>	[B.Ar/N.Tb] [mm <sup>2</sup> ]	214 ± 88	173 ± 46	213 ± 116	297 ± 182	n.s.
<b>Trabecular Thickness</b>	[Tb.Th] [µm]	18,5 ± 2,9	19,7 ± 3,2	18 ± 4	16,4 ± 4,2	n.s.
<b>Trab. Separation</b>	[µm] [mm <sup>2</sup> ]	193 ± 70	167 ± 25	164 ± 41	229 ± 110	n.s.

Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=7-8 pro Gruppe), einfache ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test.

#### **4.2.4. Knochenmineraldichtemessung**

##### **4.2.4.1. Femurschaft**

Um den Einfluss der Faktoren *VDR*, *CAL*, *Geschlecht* oder der wechselseitigen Interaktion derer untereinander auf die einzelnen Knochenparameter des Femurschafts zu überprüfen, wurde zunächst eine faktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das Geschlecht einen signifikanten Einfluss auf alle Parameter, außer auf die *Total* und *Cortical BMD* (Abb. 5E-G) nimmt. Aus diesem Grund wurden weibliche und männliche Tiere für die weitere statistische Auswertung getrennt analysiert. Der Faktor *VDR* beeinflusste die *Cortical Thickness*, *Area* und *BMD*, sowie die *Total BMD* in signifikanter Weise (Tab. 15). Ein signifikanter Einfluss des Faktors *CAL* konnte nur für die *Cortical Area* nachgewiesen werden.

Bei der getrenntgeschlechtlichen Auswertung wurde bei den weiblichen Tieren bei der einfachen Varianzanalyse (ANOVA) bei keinem der Knochenparameter statistische Signifikanz erreicht (Tab. 16).

Bei den Männchen zeigt sich dagegen ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die *Total BMD*, welche bei den VDR(homo)CAL(wt)-Tieren (um ca. 9%)

und noch deutlicher bei den VDR(homo)CAL(homo)-Tieren (um ca. 25%) im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen verringert ist (Tab. 17 und Abb. 5A). Die *Cortical BMD* (um ca. 14%), *Area* (um ca. 44%) und *Thickness* (um ca. 30%) weisen ebenfalls bei den Doppel-Knockout-Mäusen einen signifikant geringeren Wert auf als bei den Wildtyp-Kontrollen (Tab.17 und Abb. 5B,C,D).

**Tab.15: Faktorielle Varianzanalyse der Knochenmineraldichtemessung des Femurschafts bei VDR/CalD28k-Knockout-Mäusen**

Variable	VDR	CAL	SEX	VDR*CAL	VDR*SEX	CAL*SEX	VDR*CAL*SEX
<b>Total BMD</b>	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Total Area</b>	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.
<b>Cortical BMD</b>	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Cortical Area</b>	p<0.05	p<0.05	p<0.05	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.
<b>Cortical Thickness</b>	p<0.05	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.
<b>Periosteal Perimeter</b>	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Endocortical Perimeter</b>	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

n.s.= nicht signifikant, \*gegenseitige Interaktion

**Tab.16: Knochenmineraldichtemessung des Femurschafts bei weiblichen VDR/CalD28k-Doppel-Knockout-Mäusen**

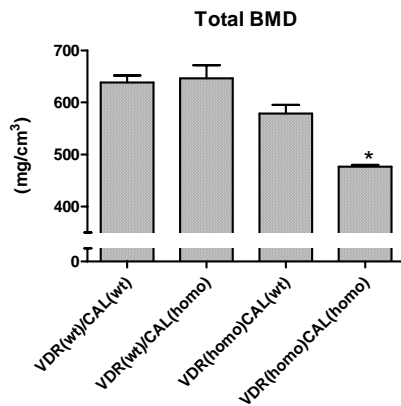
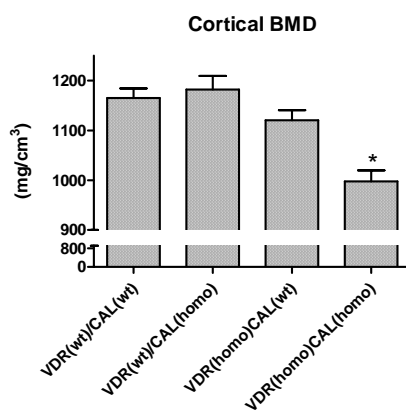
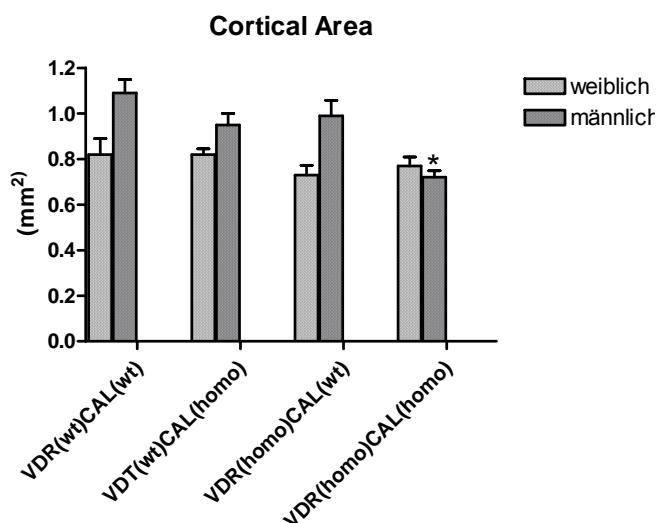
Parameter	Einheit	VDR(wt) CalD28k(wt)	VDR(wt) CalD28k(homo)	VDR(homo) CalD28k(wt)	VDR(homo) CalD28k(homo)	ANO- VA
<b>Total BMD</b>	[mg/cm <sup>3</sup> ]	587 ± 52	601 ± 19	530 ± 36	536 ± 71	n.s.
<b>Total Area</b>	[mm <sup>2</sup> ]	1.83 ± 0.32	1.79 ± 0.12	1.75 ± 0.06	1.84 ± 0.26	n.s.
<b>Cortical BMD</b>	[mg/cm <sup>3</sup> ]	1104 ± 72	1120 ± 19	1033 ± 65	1062 ± 65	n.s.
<b>Cortical Area</b>	[mm <sup>2</sup> ]	0.82 ± 0.17	0.82 ± 0.07	0.73 ± 0.06	0.77 ± 0.11	n.s.
<b>Cortical Thickness</b>	[mm]	0.19 ± 0.03	0.20 ± 0.11	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.02	n.s.
<b>Periostel Perimeter</b>	[mm]	4.77 ± 0.44	4.74 ± 0.16	4.70 ± 0.08	4.80 ± 0.33	n.s.
<b>Endocortical Perimeter</b>	[mm]	3.55 ± 0.31	3.50 ± 0.10	3.58 ± 0.00	3.67 ± 0.33	n.s.

Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=2-8), einfache ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test

**Tab.17: Knochenmineraldichtemessung des Femurschafts bei männlichen VDR/CalD28k-Doppel-Knockout-Mäusen**

Parameter	Einheit	VDR(wt) CalD28k(wt)	VDR(wt) CalD28k(homo)	VDR(homo) CalD28k(wt)	VDR(homo) CalD28k(homo)	ANOVA
<b>Total BMD</b>	mg/cm <sup>3</sup>	638 ± 30	646 ± 35	579 ± 37*	477 ± 5*	p<0.05
<b>Total Area</b>	mm <sup>2</sup>	2.28 ± 0.25	2.01 ± 0.08	2.26 ± 0.29	1.84 ± 0.16	n.s.
<b>Cortical BMD</b>	mg/cm <sup>3</sup>	1165 ± 43	1182 ± 39	1121 ± 45	998 ± 31*	p<0.05
<b>Cortical Area</b>	mm <sup>2</sup>	1.09 ± 0.13	0.95 ± 0.07	0.99 ± 0.15	0.72 ± 0.04*	p<0.05
<b>Cortical Thickness</b>	mm	0.24 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.17 ± 0.00*	p<0.05
<b>Periostel Perimeter</b>	mm	5.34 ± 0.30	5.02 ± 0.11	5.32 ± 0.33	4.80 ± 0.21	n.s.
<b>Endocortical Perimeter</b>	mm	3.86 ± 0.20	3.65 ± 0.03	3.99 ± 0.24	3.74 ± 0.21	n.s.

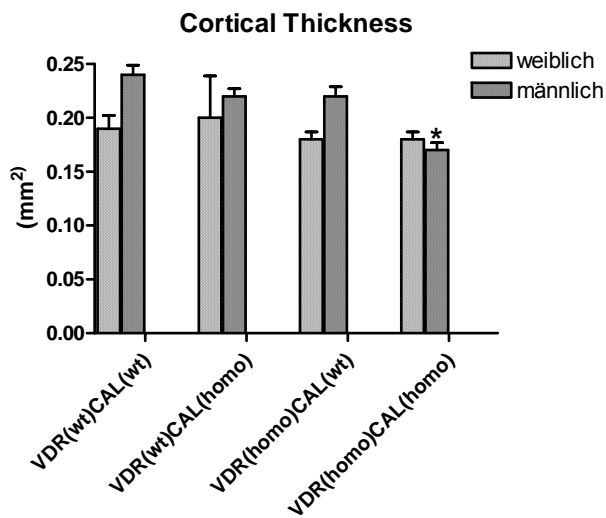
Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=2-5), einfache ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test, \*p<0.05 vs. Wildtyp

**A****B****C****Abb.5A-D**

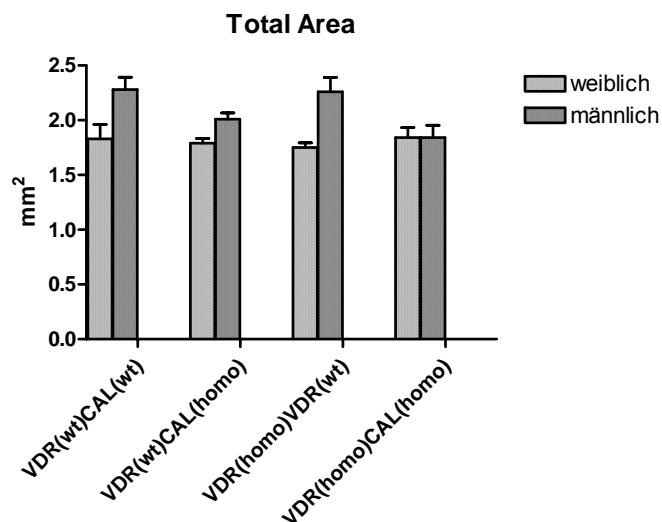
Knochenmineraldichtemessung des Femurschafts von ca. 3 Monate alten männlichen (A,B) und bei (C-E) auch weiblichen VDR/CalD28k-Doppel-Mutanten auf Rescue Diet. **(A)** Die totale Knochenmineraldichte (Total BMD) war bei den VDR-Knockouts um ca. 9%, bei den Doppel-Knockouts um etwa 25% verringert im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. **(B)** Die kortikale Knochenmineraldichte (Cortical BMD) zeigt bei den Doppel-Knockouts einen signifikant geringeren Wert (um ca. 14%) als bei den Wildtyp-Kontrollen. Bei den VDR-Knockouts konnten wir eine Verringerung um 4% feststellen. **(C)** Auch die Cortical Area war bei den männlichen Doppel-Knockouts um ca. 44% reduziert.

Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben (n=2-5 pro Gruppe) einfache ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test. \*p<0.05 vs. Wildtyp

D



E

**Abb.5D,E**

**(D)** Die Cortical Thickness zeigt bei den Doppel-Knockout-Männchen eine signifikante Reduktion im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (um 29%). **(E)** In Bezug auf die Total area besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen, aber zwischen den Geschlechtern.

Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben (n=2-5 pro Gruppe). Einfache ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test. \*p<0.05 vs. Wildtyp



#### **4.2.4.2.Femur-Metaphyse**

Die Analyse der Daten mittels faktorieller Varianzanalyse (Tab. 18) ergab einen signifikanten Einfluss des Faktors *VDR* auf die Parameter *Total BMD*, *Cortical/Subcortical BMD*, *Trabecular BMD*, *Cortical BMD*, *Trabecular Area*, *Cortical Area*, und *Trabecular Thickness*. Der Faktor *CAL* alleine, als auch in wechselseitiger Interaktion mit dem Geschlecht übt einen Effekt auf die *Total BMD*, *Trabecular BMD*, *Cortical/Subcortical Area*, sowie auf die *Cortical Area* und *Thickness* aus (Tab. 18). In der faktoriellen Varianzanalyse zeigte sich ebenso ein signifikanter Effekt des Geschlechts auf die Parameter *Trabecular BMD*, *Total Area*, *Cortical/Subcortical Area*, *Trabecular Area*, *Endocortical Perimeter* und *Periosteal Perimeter*. Aus diesem Grund wurde die einfache Varianzanalyse für Männchen und Weibchen getrennt durchgeführt. Es zeigte sich bei den weiblichen *VDR(homo)CAL(homo)*-Tieren eine um etwa 16%, bei den männlichen *VDR(homo)CAL(homo)*-Tieren eine um etwa 36% geringere *totale Knochenmineraldichte* im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Tab. 19, 20 und Abb. 6A). Bei den Männchen erreichten alle drei Gruppen in Bezug auf die *Trabekuläre Knochenmineraldichte* statistische Signifikanz im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen. Bei den Doppel-Knockout-Mäusen war sie um etwa 41%, bei den *VDR(homo)CAL(wt)*-Tieren um etwa 16% und bei den *VDR(wt)CAL(homo)*-Mäusen um etwa 25% erniedrigt (Tab. 20 und Abb. 6B).

**Tab.18: Faktorielle Varianzanalyse der Knochenmineraldichtemessung der Femurmetaphyse bei VDR/CalD28k-Knockout-Mäusen**

Variable	VDR	CAL	SEX	VDR*CAL	VDR*SEX	CAL*SEX	VDR*CAL*SEX
<b>Total BMD</b> [mg/cm <sup>3</sup> ]	p<0.05	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.
<b>Cortical/Subcortical BMD</b> [mg/cm <sup>3</sup> ]	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0.05
<b>Trabecular BMD</b> [mg/cm <sup>3</sup> ]	p<0.05	p<0.05	p<0.05	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.
<b>Total Area</b> [mm <sup>2</sup> ]	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Cortical/Subcortical Area</b> [mm]	n.s.	p<0.05	p<0.05	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.
<b>Trabecular Area</b> [mm]	p<0.05	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Endocortic. Perimeter</b> [mm]	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Cortical Area</b> [mm <sup>2</sup> ]	p<0.05	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.
<b>Cortical Thickness</b> [mm]	p<0.05	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.
<b>Periostal Perimeter</b> [mm]	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Cortical BMD</b> [mg/cm <sup>3</sup> ]	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

n.s.= nicht signifikant, \*gegenseitige Interaktion

**Tab.19: Knochenmineraldichtemessung der Femurmetaphyse bei weiblichen VDR/CalD28k-Doppel-Knockout-Mäusen**

Parameter	VDR(wt) CalD28k(wt)	VDR(wt) CalD28k(homo)	VDR(homo) CalD28k(wt)	VDR(homo) CalD28k(homo)	ANOVA
<b>Total BMD</b> [mg/cm <sup>3</sup> ]	464 ± 35	435 ± 12	413 ± 42	400 ± 55*	p<0.05
<b>Cortical/Subcortical BMD</b> [mg/cm <sup>3</sup> ]	804 ± 43	778 ± 37	724 ± 57	746 ± 50	n.s.
<b>Trabecular BMD</b> [mg/cm <sup>3</sup> ]	177 ± 21	162 ± 31	155 ± 4	156 ± 40	n.s.
<b>Total Area</b> [mm <sup>2</sup> ]	3.22 ± 0.56	3.23 ± 0.35	3.05 ± 0.08	3.34 ± 0.54	n.s.
<b>Cortical/Subcortical Area</b> [mm]	1.46 ± 0.27	1.43 ± 0.13	1.37 ± 0.06	1.37 ± 0.26	n.s.
<b>Trabecular Area</b> [mm]	1.76 ± 0.31	1.80 ± 0.23	1.68 ± 0.14	1.98 ± 0.34	n.s.
<b>Endocortic. Perimeter</b> [mm]	5.20 ± 0.45	5.28 ± 0.36	5.26 ± 0.26	5.49 ± 0.48	n.s.
<b>Cortical Area</b> [mm <sup>2</sup> ]	1.04 ± 0.21	0.99 ± 0.08	0.82 ± 0.15	0.91 ± 0.19	n.s.
<b>Cortical Thickness</b> [mm]	0.18 ± 0.03	0.17 ± 0.01	0.15 ± 0.03	0.15 ± 0.03	n.s.
<b>Periostal Perimeter</b> [mm]	6.33 ± 0.57	6.35 ± 0.35	6.18 ± 0.08	6.45 ± 0.51	n.s.
<b>Cortical BMD</b> [mg/cm <sup>3</sup> ]	938 ± 46	908 ± 32	887 ± 46	879 ± 47	n.s..

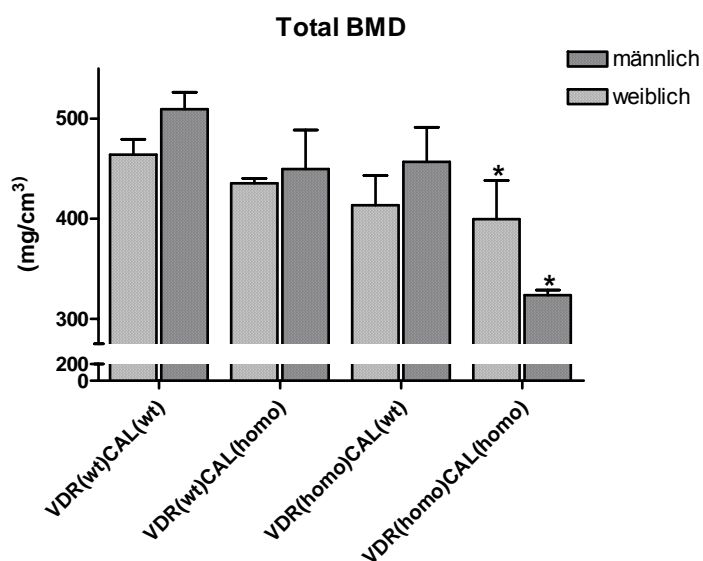
Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=2-8), einfache ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test, \*p<0.05 vs. Wildtyp-Kontrolle

**Tab.20: Knochenmineraldichtemessung der Femurmetaphyse bei männlichen VDR/CalD28k-Doppel-Knockout-Mäusen**

Parameter	VDR(wt) CalD28k(wt)	VDR(wt) CalD28k(homo)	VDR(homo) CalD28k(wt)	VDR(homo) CalD28k(homo)	ANOVA
<b>Total BMD</b> [mg/cm <sup>3</sup> ]	509 ± 38	450 ± 55	457 ± 77	324 ± 7*	p<0.05
<b>Cortical/Subcortical BMD</b> [mm <sup>2</sup> ]	763 ± 34	773 ± 42	745 ± 62	658 ± 14	n.s.
<b>Trabecular BMD</b> [mg/cm <sup>3</sup> ]	254 ± 30	190 ± 9*	214 ± 17*	150 ± 1*	p<0.05
<b>Total Area</b> [mm <sup>2</sup> ]	3.97 ± 0.51	3.62 ± 0.27	4.40 ± 0.48	3.64 ± 0.05	n.s.
<b>Cortical/Subcortical Area</b> [mm]	2.06 ± 0.41	1.63 ± 0.33	1.96 ± 0.47	1.20 ± 0.03	n.s.
<b>Trabecular Area</b> [mm]	1.91 ± 0.21	2.00 ± 0.06	2.43 ± 0.43	2.44 ± 0.01	n.s.
<b>Endocortic. Perimeter</b> [mm]	5.74 ± 0.35	5.61 ± 0.03	6.23 ± 0.46	6.09 ± 0.02	n.s.
<b>Cortical Area</b> [mm <sup>2</sup> ]	1.34 ± 0.28	1.11 ± 0.25	1.27 ± 0.40	0.66 ± 0.03	n.s.
<b>Cortical Thickness</b> [mm]	0.21 ± 0.03	0.18 ± 0.04	0.19 ± 0.06	0.11 ± 0.00	n.s.
<b>Periostal Perimeter</b> [mm]	7.05 ± 0.46	6.73 ± 0.25	7.41 ± 0.42	6.75 ± 0.04	n.s.
<b>Cortical BMD</b> [mg/cm <sup>3</sup> ]	904 ± 28	909 ± 45	886 ± 60	813 ± 15	n.s.

Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=2-5), einfache ANOVA mit anschließendem Dunnett-T-Test, \*p<0.05 vs. Wildtyp-Kontrolle

A



B

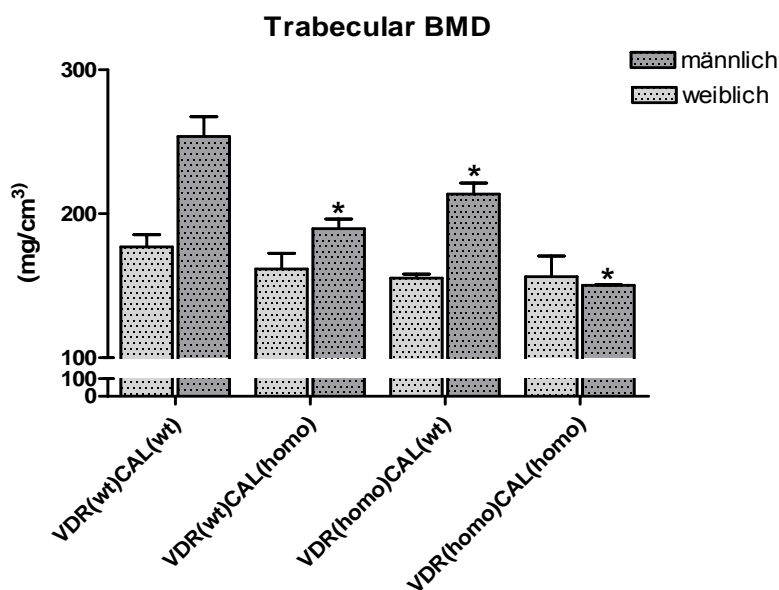


Abb.6A,B

**(A)** Bei den Doppel-Knockouts war die Totale BMD (Knochenmineraldichte) im Gegensatz zu den Wildtypen bei den Männchen um 36% und bei den Weibchen um 16% verringert. Bei allen Gruppen zeigten die Weibchen eine geringere Totale Knochenmineraldichte, außer bei den Doppel-Knockouts, dort verhielt es sich genau umgekehrt. **(B)** Die trabekuläre Knochenmineraldichte war bei den Männchen bei allen Gruppen im Vergleich zu den Wildtypen reduziert. Am deutlichsten bei den Doppel-Knockouts (um ca. 41%). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben (n=2-5). Einfache ANOVA, \*p<0.05 vs.Wildtyp

#### **4.2.5. Subkutane Glukosetoleranztests**

Die mehrfache Varianzanalyse lässt erkennen, dass das *Geschlecht* einen deutlichen Einfluss auf die Glukosetoleranz der Tiere nimmt. Dies ist in Tabelle 21 deutlich zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 90 und 120 Minuten zu erkennen. Auch das Körpergewicht der Versuchstiere und die Area under the curve (AUC) werden vom Faktor *Geschlecht* beeinflusst. Wie aus Tabelle 22 und 23 zu erkennen ist, war die Area under the curve (AUC) bei männlichen Mäusen deutlich höher als bei weiblichen. Der Faktor *CAL* alleine zeigte einen signifikanten Einfluss auf den Glukosespiegel zum Zeitpunkt 90 Minuten, sowie auf die Area under the curve. Der Faktor *VDR* war ohne signifikanten Einfluss auf Körpergewicht oder Glukosetoleranz.

Die Analyse der Daten mit einfacher Varianzanalyse nach Auftrennung in die Geschlechter zeigte, dass zu keinem der gemessenen Zeitpunkte der Glukosetoleranzen, weder bei den Männchen, noch bei den Weibchen statistische Signifikanz erreicht wurde. Bei den männlichen Mäusen konnten nur tendenziell höhere Glukosewerte, vor allem zu den Zeitpunkten 30, 60, 90 und 120 Minuten festgestellt werden (Tab. 22 und 23)

**Tab.21: Mehrfache, faktorielle Varianzanalyse der subkutanen Glukosetoleranzen der VDR/CalD28k-Knockout-Mäuse**

Zeit	VDR	CAL	SEX	VDR*CAL	VDR*SEX	CAL*SEX	VDR*CAL*SEX
<b>KG</b>	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.
<b>0 Min</b>	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>10 Min</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>20 Min</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>30 Min</b>	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>60 Min</b>	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>90 Min</b>	n.s.	p<0.05	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>120 Min</b>	n.s.	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>AUC</b>	n.s.	p<0.05	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

n.s.: nicht-signifikant; p<0,05:signifikant; AUC:Area under the curve; Min: Minuten

**Tab.22: Subkutane Glukosetoleranzen der weiblichen VDR/CalD28k-Doppel-Knockout-Mäuse**

Zeit	Glukose	VDR(wt) CalD28k(wt)	VDR(wt) CalD28k(homo)	VDR(homo) CalD28k(wt)	VDR(homo) CalD28k(homo)	ANOVA
0 Min	[mg/dl]	65,7 ± 17,1	71,8 ± 15,9	72 ± 12	86,2 ± 7,7	n.s.
10 Min	[mg/dl]	229 ± 67	288 ± 87	246 ± 77	264 ± 53	n.s.
20Min	[mg/dl]	311 ± 51	363 ± 80	338 ± 94	349 ± 80	n.s.
30 Min	[mg/dl]	319 ± 41	316 ± 47	331 ± 88	312 ± 77	n.s.
60 Min	[mg/dl]	190 ± 22	206 ± 60	177 ± 84	203 ± 77	n.s.
90 Min	[mg/dl]	132 ± 23	126 ± 23	98 ± 21	143 ± 29	n.s.
120 Min	[mg/dl]	99 ± 19	92 ± 14	86 ± 22	111 ± 14	n.s.
AUC		23225 ± 2110	24498 ± 2998	22337 ± 5840	24834 ± 4654	n.s.

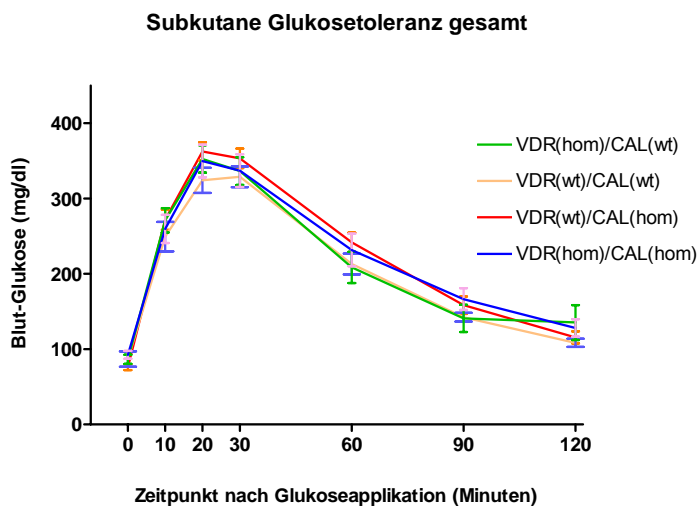
Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen angegeben (n=3-8 pro Gruppe); einfache ANOVA; Min.=Minuten, AUC=Area under the curve

**Tab.23: Subkutane Glukosetoleranzen der männlichen VDR/CalD28k-Doppel-Knockout-Mäuse**

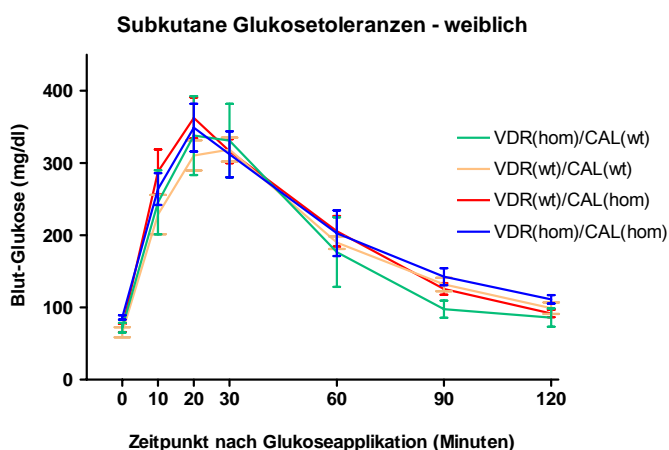
Zeit	Glukose	VDR(wt) CalD28k(wt)	VDR(wt) CalD28k(homo)	VDR(homo) CalD28k(wt)	VDR(homo) CalD28k(homo)	ANOVA
0 Min	[mg/dl]	109 ± 41	79 ± 19	95 ± 16	102 ± 25	n.s.
10 Min	[mg/dl]	270 ± 75	260 ± 31	286 ± 22	253 ± 82	n.s.
20Min	[mg/dl]	338 ± 71	363 ± 27	361 ± 24	351 ± 69	n.s.
30 Min	[mg/dl]	339 ± 60	380 ± 52	340 ± 38	375 ± 53	n.s.
60 Min	[mg/dl]	237 ± 61	268 ± 41	228 ± 47	275 ± 38	n.s.
90 Min	[mg/dl]	153 ± 15	182 ± 55	167 ± 53	202 ± 52	n.s.
120Min	[mg/dl]	118 ± 16	133 ± 38	165 ± 73	154 ± 52	n.s.
AUC		26852 ± 3956	29738 ± 3582	28057 ± 3937	30659 ± 2856	n.s.

Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen angegeben (n=4-11 pro Gruppe); Einfache ANOVA; Min.=Minuten, AUC=Area under the curve

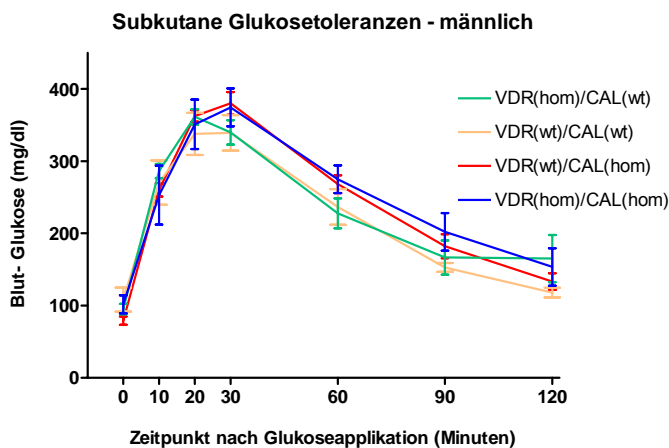
**A**



**B**



**C**



**Abb.5A-C**

Subkutane Glukosetoleranz (n=8-19) bei 10-11 Wochen alten weiblichen und männlichen Doppel-Knockout-Mäusen. **(A)** Alle Tiere, **(B)** weibliche Tiere, **(C)** männliche Tiere. Alle Tiere bekamen die sog. Rescue Diet. Glukose (1,5 mg/kg KG) wurde zum Zeitpunkt 0 subkutan verabreicht. Unabhängig vom VDR-Genotyp zeigten D28k-Knockout-Mäuse eine leicht verschlechterte Glukosetoleranz. Dieser Effekt war bei beiden Geschlechtern zu erkennen. Bei männlichen Mäusen war ein im Vergleich zu weiblichen Tieren mehr protrahierter Verlauf der Glukose-Kurven zu erkennen. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben, n= 3-11 pro Gruppe.



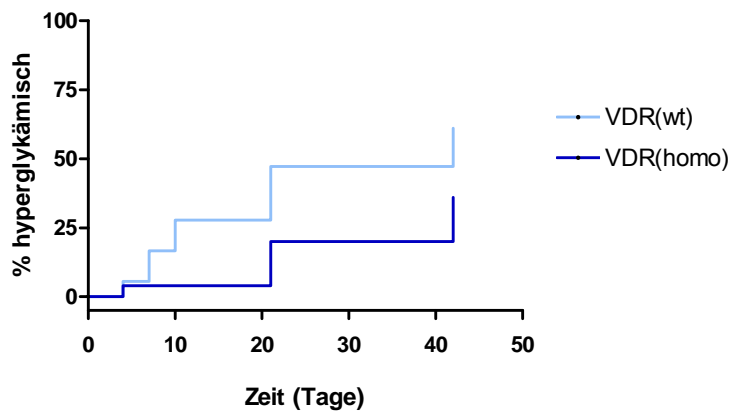
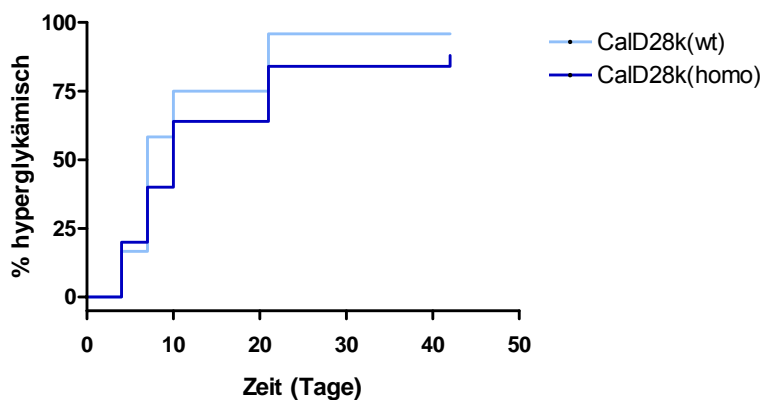
#### **4.2.6. Suszeptibilität von CalbindinD28k bzw. VDR-Mutanten gegenüber Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus**

**Tab.24: Glukosewerte im Vollblut nach Streptozotocin-Behandlung**

<b>Zeitpunkt</b>	<b>VDR(wt)</b>	<b>VDR(homo)</b>	<b>CalD28k(wt)</b>	<b>CalD28k(homo)</b>
	[mg/dl]	[mg/dl]	[mg/dl]	[mg/dl]
<b>Tag 0</b>	153 ± 20	146 ± 33	151 ± 22	148 ± 29
<b>Tag 4</b>	159 ± 43	147 ± 33	166 ± 42	157 ± 34
<b>Tag 7</b>	162 ± 44	138 ± 24	228 ± 87	198 ± 60
<b>Tag 10</b>	178 ± 52	145 ± 23	289 ± 106	256 ± 94
<b>Tag 21</b>	190 ± 59	168 ± 43	325 ± 116	308 ± 127
<b>Tag 42</b>	210 ± 86	178 ± 57	375 ± 151	358 ± 136

Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n=25-40 pro Gruppe)

VDR- und CalD28k-Mutanten wurden im Alter von 12 Wochen Streptozotocin (VDR: 4 mg/kg KG, CalD28k: 5 mg/kg KG) verabreicht mit der Absicht einen Diabetes mellitus zu induzieren. Wie im Material- und Methodenteil bereits beschrieben, ließ sich bei den CalbindinD28k-Mäusen mit 4 mg/kg Streptozotocin keine Hyperglykämie induzieren, weshalb wir bei diesen Tieren die Dosis auf 5 mg/kg erhöhten. Blutglukose wurde an den Tagen 0, 4, 7, 10, 21 und 42 gemessen. Bei Erreichen von Blutglukosewerten von über 200 mg/dl wurden die Tiere als diabetisch eingestuft. Bei den VDR(wt) waren zum Zeitpunkt Tag 4 5,6%, an Tag 7 16,7%, an Tag 10 27,8%, an Tag 21 47,2% und an Tag 42 61,1% hyperglykämisch. Bei den VDR(homo) zeigte sich eine Hyperglykämie an Tag 4 bei 4%, an Tag 21 bei 20% und an Tag 42 bei 36% der Versuchsgruppe (Tabelle 24, 25 und Abb.6A). Diese Unterschiede zwischen den Genotypen erreichten statistische Signifikanz ( $p < 0.05$ ) (Tab. 20,21 und Abb. 6A). Bei den CalbindinD28k-Mutanten zeigte sich Folgendes: Die Wildtypen waren an Tag 4 zu 16,7%, an Tag 7 zu 58,3%, an Tag 10 zu 75% und an den Tagen 21 und 42 zu 95,8% hyperglykämisch. Bei den CalbindinD28k-Knockout-Mäusen konnte ein Diabetes an Tag 4 bei 20%, an Tag 7 bei 40%, an Tag 10 zu 64%, an Tag 21 zu 84% und an Tag 42 zu 88% beobachtet werden. Diese Unterschiede erreichten keine statistische Signifikanz (Tab. 20, 21 und Abb. 6B)

**A****Diabetes-Inzidenz der VDR-Mäuse****B****Diabetes-Inzidenz der CalbindinD28k-Mäuse****Abb.6A,B:**

**(A)** Diabetes-Inzidenz der VDR(wt)- und VDR(homo)-Mäuse nach Behandlung mit Streptozotocin über 5 Tage (4 mg/kg KG) an den Tagen 0 bis 5. Glukose wurde an den Tagen 0, 4, 7, 10, 21, 42 nach Streptozotocinbehandlung gemessen (in mg/dl). Die Ergebnisse erreichen zwischen den beiden Genotypen statistische Signifikanz. **(B)** Diabetes-Inzidenz der CalD28k(wt)- und CalD28k(homo)-Mäuse nach Behandlung mit Streptozotocin über 5 Tage (5 mg/kg KG) an den Tagen 0 bis 5. Glukose wurde an den Tagen 0, 4, 7, 10, 21, 42 gemessen (in mg/dl).

**Tab.25: Diabetes Inzidenz bei VDR-und CalD28k-Mutanten nach Streptozotocin-Behandlung**

<b>Zeitpunkt</b>	<b>VDR(wt)</b>	<b>VDR(homo)</b>	<b>CalD28k(wt)</b>	<b>CalD28k(homo)</b>
<b>Tag 0</b>	0%	0%	0%	0%
<b>Tag 4</b>	6%	4%	17%	20%
<b>Tag 7</b>	17%	4%	58%	40%
<b>Tag 10</b>	28%	4%	75%	64%
<b>Tag 21</b>	47%	20%	96%	84%
<b>Tag 42</b>	61%	36%	96%	88%

## **5 Diskussion**

In der hier vorliegenden Studie wurde unter anderem der Frage nachgegangen, inwieweit das Kalzium-bindende Protein CalbindinD28k eine Rolle in der Kalzium-Homöostase spielt. Dazu untersuchten wir CalbindinD28k-Knockout-Mäuse im Alter von 3 und 9 Monaten. Als Untersuchungsparameter wurden Blut- und Urinuntersuchung, Knochenmineraldichtemessung mittels pQCT und die histologische Untersuchung der Knochen herangezogen. Die Frage, inwieweit CalbindinD28k in einer wechselseitigen Interaktion mit dem Vitamin D-Rezeptor steht, sollte durch die Untersuchung von VDR/CalbindinD28k-Doppel-Knockout-Mäusen geklärt werden.

Desweiteren war es von großem Interesse, die Rolle des CalbindinD28k und die des VDR in der Pathophysiologie des Diabetes mellitus weiter zu untersuchen. Dazu führten wir bei 3 Monate alten VDR/CalbindinD28k-Doppel-Knockout-Mäusen auf Rescue Diet subkutane Glukosetoleranz-Tests durch und überprüften bei 3 Monaten alten CalbindinD28k beziehungsweise VDR-Knockout-Mäusen die Diabetes-Inzidenz nach einer Streptozotocin-Behandlung.

### **5.1 Interaktion von CalbindinD28k und VDR in der Regulation der Kalzium-Homöostase**

Ein interessanter Teil unserer Studie ist die Betrachtung der Kalzium-Homöostase bei CalbindinD28k-Knockout-Mäusen und VDR/CalbindinD28k-Knockout-Mäusen.

Die CalbindinD28k-Mäuse wurden im Alter von 9 Monaten untersucht und bekamen Normaldiät. Zusätzlich konnten wir bei den Doppel-Knockout-Mäusen ein Tiermodell im Alter von 3 Monaten untersuchen, um eventuelle Unterschiede im Hinblick auf das Alter und den Kalzium-Haushalt herauszustellen. Diese Tiere erhielten lebenslang die sogenannte Rescue diet.

VDR-Knockout-Mäuse zeigen, wie von YOSHIZAWA et al. (1997), LI et al. (1997) und ERBEN et al. (2002) berichtet, geringeres Körpergewicht als die Wildtypen, ab einem Alter von 6 - 8 Wochen eine progressive Alopezie, einen sekundären Hyperparathyreoidismus und die damit verbundenen hohen PTH-Serumspiegel und Hypokalzämie, einen renalen Kalzium-Verlust, sowie rachitische Veränderungen an den Knochen. Mit Hilfe einer mit 2% Kalzium, 1,25% Phosphor und 20% Lactose

angereicherten Diät (sogenannte Rescue diet), konnte diese Veränderungen bei den Versuchstieren mit inaktiviertem Vitamin D-Rezeptor korrigiert werden (LI et al., 1998; ERBEN et al., 2002; ZEITZ et al., 2003). Das heißt, die Tiere wiesen physiologische Kalzium-, Phosphat- und PTH-Werte auf, sowie eine weitgehend normale Knochenstruktur. Die Alopezie, das erhöhte Kalzium/Kreatinin-Verhältnis, sowie der renale Kalzium-Verlust konnten im Gegensatz dazu nicht korrigiert werden (LI et al., 1998; ERBEN et al., 2002). Hier zeigt sich eine weitgehende Übereinstimmung mit unseren Resultaten: Die VDR(homo)/CalbindinD28k(wt), sowie die Doppel-Knockout Mäuse auf Rescue Diet zeigten Normokalzämie und Normophosphatämie und ebenfalls ein erhöhtes Kalzium/Kreatinin-Verhältnis im Urin und damit renalen Kalzium-Verlust. In der VDR(homo)/CalbindinD28k(wt)-Gruppe war dieses Verhältnis 3mal so hoch, bei den Doppel-Knockout-Mäusen 3,5 mal so hoch wie bei Wildtyp-Mäusen.

Zu der gleichen Erkenntnis über den renalen Kalzium-Verlust bei Vitamin D-Mangel kam auch YAMAMOTO et al. (1984). Bei dieser Studie zeigten Ratten, die auf eine Vitamin D-Mangel-Diät gesetzt wurden, ebenfalls eine verringerte renal-tubuläre Rückresorption von Kalzium. Anhand dieser übereinstimmenden Daten bestätigt sich die Vermutung, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> eine physiologisch wichtige Rolle in der Kalzium-Reabsorption in der Niere in vivo spielt.

Die einzige bisher veröffentlichte Studie, in der der Kalzium-Haushalt und die Knochen von VDR/CalbindinD28k-Doppel-Knockout-Mäusen untersucht wurden, ist die von ZHENG et al. (2004). Diese Autoren untersuchten die Tiere, im Gegensatz zu uns, sowohl auf einer kalziumreichen Diät als auch auf Normaldiät, kamen jedoch zu weitgehend ähnlichen Ergebnissen im Vergleich zu unseren und denen von ERBEN et al. (2002). Die VDR-Knockouts und Doppel-Knockouts zeigten auf Normaldiät die typischen Veränderungen, die die Inaktivierung des Vitamin D-Rezeptors mit sich bringt (YOSHIZAWA et al., 1997; LI et al., 1997; ERBEN et al., 2002) und die Verabreichung der sogenannten Rescue diet normalisierte die Werte im Blut und Urin, bis auf die Alopezie und den renalen Kalzium-Verlust. Auch in den vorliegenden Experimenten war die renal-tubuläre Rückresorption von Kalzium bei den VDR-Knockouts auf der Rescue diet verringert und bei den Doppel-Knockouts noch etwas mehr. Betrachtet man die von uns gemessenen PTH-Werte, zeigt sich bei den VDR-Knockouts ein 3mal so hoher, bei den Doppel-Knockouts ein 15mal so hoher Wert im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen. In den Studien von ERBEN et al.

(2002) und von ZEITZ et al. (2003) führte die Rescue Diet bei VDR-Knockouts zu einer völligen Normalisierung der PTH-Spiegel. Worauf diese leicht unterschiedlichen Daten beruhen, ist unklar. Sie könnten jedoch mit subtilen Veränderungen in der Zusammensetzung der Rescue diet erklärbar sein.

In sehr guter Übereinstimmung mit unseren Daten wiesen in der Studie von ZHENG et al. (2004) CalbindinD28-Knockout-Mäuse weitgehend physiologische PTH-Werte auf. Dies wird auch durch die Studie von AIRAKSINEN et al. (1997) untermauert. Betrachtet man die Doppel-Knockout Mäuse bei ZHENG et al. (2004), zeigen sie auf Normaldiät einen 68mal so hohen PTH-Wert, auf Rescue Diet einen ca. 15mal so hohen PTH-Wert im Serum im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Die erhöhte PTH-Sekretion ging mit einer Vergrößerung der Nebenschilddrüse einher (ZHENG et al., 2004). In unserer Studie fanden wir ebenfalls eine 15mal so hohe PTH-Serumkonzentration bei Doppel-Knockout-Tieren gegenüber den Wildtyp-Kontrollen. Die Erhöhung der PTH-Serumkonzentration bei den Doppel-Knockouts wird sehr wahrscheinlich durch einen gesteigerten renalen Kalzium-Verlust induziert. Interessant ist es in diesem Zusammenhang, dass trotz der stark gesteigerten PTH-Spiegel ein Defekt der renal-tubulären Kalziumreabsorption bei Doppel-Knockout-Mäusen in unserem Experiment feststellbar war. Bei VDR-Knockout-Mäusen auf der Normaldiät ist die stark gesteigerte PTH-Sekretion in der Lage, den VDR-induzierten renalen Kalziumreabsorptionsdefekt zu maskieren (ERBEN et al., 2002).

Dieses Tiermodell der VDR/CalbindinD28k-Doppel-Knockout-Maus hat einige interessante Einblicke in den Kalzium-Haushalt, oder vielmehr in das renale „Handling“ des Kalziums in Bezug auf die Calbindine ermöglicht. Das Handling von Kalzium in der Niere ist eine wichtige Determinante in der Kalzium-Homöostase. Im normalen Organismus wird ca. 95% des filtrierten Kalziums reabsorbiert und 5% mit dem Urin ausgeschieden. In den proximalen Tubuli und in der Henle-Schleife wird der größte Teil des filtrierten Kalziums durch parazelluläre Prozesse reabsorbiert. Im distalen Tubulus findet die aktive, ATP-abhängige, transzelluläre Reabsorption statt, die letztendlich den Teil des Kalziums bestimmt, der mit dem Urin ausgeschieden wird (BUSHINSKY et al., 1999). Bei VDR-Knockout-Mäusen werden, wie im Literaturteil schon erwähnt, in den distalen Tubuli der Niere nur etwa 10% des Kalzium-bindenden Proteins CalbindinD9k exprimiert. Generiert man ein Mausmodell wie die VDR/CalbindinD28k-Knockout-Maus, bekommt man Versuchstiere, die das Kalzi-

um-bindende CalbindinD28k gar nicht und das CalbindinD9k in der Niere nur zu 10% und im Duodenum nur zu 30% exprimieren. Ein kompensatorischer Anstieg des CalbindinD9k bei den CalbindinD28k beziehungsweise Doppel-Knockout-Mäusen konnte nicht beobachtet werden (ZHENG et al., 2004). Der renale Kalzium-Verlust, den wir und auch ZHENG et al. (2004) bei den VDR-Knockouts und noch deutlicher bei den Doppel-Knockouts feststellen konnten, gibt Aufschlüsse über die Rolle der Calbindine im renalen „Kalzium-Handling“. Der Verlust von CalbindinD28k per se scheint keinen wesentlichen Einfluss auf den Kalzium-Haushalt zu nehmen, da die Kalziumkonzentrationen in Serum und Urin wie auch die PTH-Serumspiegel bei CalbindinD28k-Knockouts im Alter von 3 und 9 Monaten normal waren.

Bei den VDR-Knockouts zeigt sich – wie oben bereits erwähnt - jedoch eine verminderte renal-tubuläre Kalzium-Rückresorption und damit ein renaler Kalziumverlust. Eine mögliche Erklärung ist, dass durch die stark verminderte Expression des CalbindinD9k bei den VDR-Knockouts ein Defekt in den distalen Tubuli der Niere und dadurch in der renalen Kalzium-Rückresorption entsteht, der auch nicht von CalbindinD28k kompensiert wird (ZHENG et al., 2004). Betrachtet man die Doppel-Knockout-Mäuse, verstärkt sich der renale Kalziumverlust noch mehr, was bedeuten könnte, dass die Kalzium-bindende und somit Kalzium-transportierende Eigenschaft beider Calbindine nun wegfällt und somit dieser noch stärkere Verlust verursacht wird. Also scheint CalbindinD28k das CalbindinD9k nicht kompensieren zu können, aber es scheint wohl doch in seiner Funktion als „Kalzium-Transporter“ dieses zu unterstützen. Obwohl somit der Calbindin D28k-Mangel per se keine wesentlichen negativen Folgen für die Kalzium-Homöostase auslöst, führt der Wegfall von Calbindin D28k im Falle einer stark reduzierten Calbindin D9k-Expression zu einer deutlichen Verschlechterung der renalen Kalziumreabsorption, die sich dann in stark gesteigerten PTH-Serumspiegeln im Sinne einer Gegenregulation niederschlägt.

Im Vergleich zu unserer Studie und der Studie von ZHENG et al. (2004) berichteten LEE et al. (2002) unterschiedliche Resultate. Diese Autoren untersuchten CalbindinD28k-Knockout-Mäuse und setzten diese auf eine Diät mit normalem Kalziumgehalt (1.0% Kalzium). Interessanterweise zeigten die CalbindinD28k-Knockouts bei der Untersuchung des Urins ein ca. 2 - 3mal so hohes Kalzium/Kreatinin-Verhältnis wie die Wildtyp-Kontrollen und damit eine deutlich höhere Kalzium-Exkretion. Zu dem ähnlichen Resultat kamen auch SOOY et al. (2000).

Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen unserer und der Studie von ZHENG et al. (2004) auf der einen Seite und den Ergebnissen von LEE et al. (2002) und SO-OY et al. (2000) auf der anderen Seite könnte eventuell an dem unterschiedlichen Alter der Versuchstiere liegen. Die von uns und von ZHENG et al. (2004) untersuchten Tiere waren 2 - 3 Monate alt (bei uns zusätzlich noch 9 Monate alt). Im Gegensatz dazu waren die von LEE verwendeten Tiere erst 4 Wochen alt. Ein weiterer Grund ist eventuell in einem unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Tiere zu suchen. Auch die genaue Zusammensetzung der verwendeten Diäten könnte hier eine Rolle spielen.

Eine direkte Interaktion zwischen dem VDR und CalbindinD28k scheint es also in Bezug auf die Kalzium-Homöostase nicht zu geben. Zu einer ähnlichen Interpretation der Daten kamen auch ZHENG et al. (2004). Im Vergleich zu CalbindinD9k scheint CalbindinD28k eine untergeordnete Rolle für die renal-tubuläre Kalzium-Rückresorption zu spielen. Ausgehend von unseren Resultaten erlangt CalbindinD28k nur im Falle einer stark reduzierten Expression von CalbindinD9k eine kritische Bedeutung für die renale Kalziumreabsorption. Aus diesem Grund könnte die wesentliche Funktion von CalbindinD28k in einem anderen Bereich liegen. Von großem Interesse wäre es deshalb, eine CalbindinD28k/CalbindinD9k-Doppel-Knockout-Maus zu generieren und zu untersuchen, falls diese überhaupt lebensfähig ist.

In Hinblick auf den Kalzium-Haushalt war es natürlich sehr interessant, den Knochenphänotyp zu analysieren. Unsere Studie ist die erste Studie, in der eine histomorphometrische Analyse von Knochen von CalbindinD28k-Knockout-Mäusen durchgeführt wurde. Um einen Altersvergleich und besseren Einblick in die Funktionen von CalbindinD28k zu bekommen, untersuchten wir hierbei die Knochen der 9 Monate alten CalbindinD28k-Knockouts auf Normal-Diät und die jüngeren, ca. 3 Monate alten Doppel-Knockouts auf Rescue diet. Diese kalziumreiche Diät sollte den rachitischen Knochenveränderungen der VDR-Knockouts begegnen (ERBEN et al., 2002; ZEITZ et al., 2003). Bei der histomorphometrischen Auswertung der Knochenparameter der älteren männlichen CalbindinD28k-Knockouts stellten wir keine statistisch signifikanten Veränderungen fest. Eine histomorphometrische Auswertung der Knochen der weiblichen Mäuse war ohnehin nicht möglich, da diese nicht genug trabekuläre Knochenmasse aufwiesen. Bei der Knochenmineraldichtemessung der Femurmetaphyse zeigte sich jedoch bei den 9 Monate alten homo-



zygoten Weibchen eine Reduktion der trabekulären Knochenmineraldichte im Vergleich zu den Wildtypen. Ein Vorteil der pQCT-Analyse gegenüber der histomorphometrischen Analyse ist, dass ein Mittelwert über mehrere Schnittebenen in der Metaphyse gebildet werden kann, wodurch praktisch alle Regionen mit trabekulärem Knochen in die Auswertung mit einbezogen werden. Bei der histologischen Auswertung beschränkt man sich in aller Regel auf die zentralen Anteile der Spongiosa, da ansonsten der Arbeitsaufwand pro Knochen extrem hoch würde.

Betrachtet man die Knochen der jüngeren Tiere, ergaben sich bei der histomorphometrischen Auswertung der Knochen keine signifikanten Veränderungen. Bei der Knochenmineraldichtemessung mittels pQCT zeigte die faktorielle Varianzanalyse jedoch, dass der Verlust von CalbindinD28k per se zu einer Reduktion der trabekulären Knochenmasse führt. Da sich bei der faktoriellen Varianzanalyse für das Geschlecht ein signifikanter Effekt abzeichnete, wurden die Knochen in unseren Experimenten nach Geschlecht getrennt ausgewertet. Auch die nach Geschlechtern getrennte Analyse mit einfacher Varianzanalyse ergab eine signifikant reduzierte trabekuläre Knochenmineraldichte in der distalen Femurmetaphyse bei männlichen CalbindinD28k-Knockout-Mäusen. Ein ähnlicher Trend war bei weiblichen Mäusen zu verzeichnen. Zusätzlich zu dem oben erwähnten Argument lässt sich die Diskrepanz zwischen den histomorphometrischen und knochendensitometrischen Ergebnissen sehr wahrscheinlich auch durch die Tatsache erklären, dass nur ein Teil der Knochen histomorphometrisch ausgewertet wurde. Zusammenfassend fanden wir also bei 3 und 9 Monate alten CalbindinD28k-Knockout-Mäusen eine Osteopenie des trabekulären Knochens. Die Ursache dieser Osteopenie ist unklar, denn signifikante Veränderungen in der renalen Kalziumexkretion, im PTH-Spiegel oder in der Knochenformationsrate waren in CalbindinD28k-Knockout-Mäusen nicht nachweisbar.

Am Femurschaft konnte in unseren Experimenten kein signifikanter Einfluss von CalbindinD28k bei 3 oder 9 Monaten alten Mäusen festgestellt werden. Im Gegensatz zu unseren Daten fanden ZHENG et al. (2004) bei 2 Monate alten CalbindinD28k-Knockout-Mäusen auf Normaldiät eine Reduktion der Knochenmineraldichte am Femurschaft. Diese Autoren führten jedoch keine Messungen in metaphysären Knochenregionen mit einem höheren Anteil von trabekulärem Knochen durch. Der Faktor VDR hatte in unserem Experiment einen deutlichen Einfluss auf die Knochenmineraldichte, insbesondere bei männlichen Tieren. Bei ihnen zeigte

sich bei den VDR-Knockouts eine reduzierte totale Knochenmineraldichte, ebenso bei den Doppel-Knockouts, bei denen der Unterschied noch gravierender war. Ebenso verhielten sich die *Cortical BMD*, *Cortical Area* und *Thickness*. Bei den Weibchen konnten in Abhängigkeit vom Faktor VDR keine signifikanten Veränderungen der Knochenmineraldichte am Femurschaft festgestellt werden.

An der Femurmetaphyse war die totale Knochenmineraldichte der weiblichen Doppel-Knockouts um ca. 16%, die der männlichen um ca. 36% gegenüber Wildtyp-Mäusen reduziert. Bei den männlichen Mäusen zeigte sich dieser Effekt auch bei der trabekulären Knochenmineraldichte, die um 41% niedriger war als Wildtyp-Mäusen. Hier erkennt man deutlich den Unterschied zwischen den Geschlechtern, der bei uns bei der Auswertung berücksichtigt wurde. Auch wenn diese Differenzierung nicht bei ZHENG et al. (2004) verwendet wurde, kann man doch deren Studie als Vergleich heranziehen. Diese Autoren untersuchten die Doppel-Knockouts zuerst auf Normaldiät und stellten fest, dass die totale Knochenmineraldichte des Femurschafts bei den VDR-Knockouts um etwa 23% und bei den Doppel-Knockouts um etwa 57% gegenüber Wildtyp-Kontrollen reduziert war. Das gleiche Verhalten zeigten auch die trabekuläre und kortikale Knochenmineraldichte. Wurden diese Versuchstiere auf Rescue Diet gesetzt, verbesserten sich die durch die Hypokalzämie verursachten Veränderungen im Organismus und die rachitischen Veränderungen der Knochen der VDR-Knockout-Mäuse wurden korrigiert. Leider führten diese Autoren keine Bestimmung der Knochenmineraldichte bei den Tieren auf der Rescue diet durch. Die Ursache für den Knochenverlust bei VDR-Knockout und Doppel-Knockout-Mäusen ist sehr wahrscheinlich in den erhöhten PTH-Serumspiegeln und dem damit assoziierten sekundären Hyperparathyreoidismus bei diesen Tieren zu suchen. Wie oben bereits erwähnt, führt die Kombination von reduzierter CalbindinD9k-Expression und Verlust von CalbindinD28k zu einer starken Erhöhung der PTH-Sekretion.

## **5.2 Glukosetoleranz bei CalbindinD28k- und VDR-Knockout-Mäusen**

Bei den von uns durchgeführten Glukosetoleranztests wurden die Mäuse im Alter von ca. 12 Wochen subkutan mit Glukose behandelt und zu den Zeitpunkten 0, 10, 20, 30, 60, 90, und 120 Minuten der Blutzucker gemessen. Ein sehr interessantes Ergebnis der faktoriellen Varianzanalyse war dabei, dass CalbindinD28k-Knockout-Mäuse eine signifikant höhere Area-under-the-curve (AUC) zeigten. Daneben war

auch ein deutlicher Effekt des Geschlechts festzustellen, das heißt männliche Mäuse wiesen eine höhere AUC auf als weibliche. Glukosetoleranztests an CalbindinD28k-Knockout-Mäusen sind bisher nicht publiziert worden.

SOOY et al. (1999) isolierten Pankreasinseln von CalbindinD28k-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen und untersuchten die Rolle von CalbindinD28k in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen. Es wurden bei dieser Studie jedoch keine Glukosetoleranztests wie in unserer Studie durchgeführt. Vielmehr wurde ex vivo die Insulinsekretion der Pankreasinseln bei CalbindinD28k-Knockouts und Wildtyp-Kontrollen überprüft, nachdem diese mit 4.8 mM KCl stimuliert wurden. Es zeigte sich bei den isolierten Pankreasinseln der Knockouts ein signifikanter Anstieg der Insulinausschüttung nach Stimulation mit KCl im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen.

Um unsere Ergebnisse mit denen von SOOY et al. (1999) besser vergleichen zu können, wäre es wichtig, die Insulinsekretionskapazität in unseren CalbindinD28k-Knockout-Mäusen nach oraler beziehungsweise subkutaner Stimulation mit Glukose zu messen. Diese Daten werden momentan in einer weiterführenden Studie erhoben. Da bei unseren Experimenten die Glukosetoleranz der CalbindinD28k-Knockouts im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren verringert war, wäre zu erwarten, dass bei diesen Tieren auch die Insulinsekretion etwas reduziert ist, was den Ergebnissen von SOOY et al. (1999) widersprechen würde. Um jedoch darüber letztendlich eine Aussage machen zu können, ist eine weiterführende Studie nötig.

Interessante Resultate erhielten auch REDDY et al. (1997) mit ihrer Studie über die Rolle des CalbindinD28k in pankreatischen  $\beta$ -Zellen. Hierzu benutzten sie eine Ratten- $\beta$ -Zelllinie und überexprimierten mittels Transfektion in diesen CalbindinD28k, so dass sie  $\beta$ -Zellen mit verschiedenen Gehalten an CalbindinD28k erhielten. Nach Stimulation mit Glukose zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Insulinsekretion. Das heißt, je mehr CalbindinD28k die  $\beta$ -Zellen enthielten, desto höher war deren Insulingehalt, beziehungsweise deren Insulinsekretion als Antwort auf den Stimulus Glukose. Diese Resultate stimmen insofern mit unseren überein, weil die verringerte Glukosetoleranz unserer CalbindinD28k-Knockout-Mäuse auch eine reduzierte Insulinsekretion erwarten lässt.

Um den Phänotyp der CalbindinD28k-Knockout-Mäuse im Hinblick auf die Insulinsekretion besser zu charakterisieren, sollte auch die Pankreasmorphologie und die Expression von Insulin auf RNA-Ebene genauer betrachtet werden. Die Methoden für diese Untersuchungen wurden von ZEITZ et al. (2003) beschrieben. Dabei wird

mittels histomorphometrischer Messungen die Anzahl und Größe der Pankreasinseln, und mittels immunhistochemischer Techniken die Zellverteilung in den Inseln überprüft.

Ein überraschendes Ergebnis erhielten wir in Bezug auf die Glukosetoleranz der Mäuse mit inaktiviertem VDR. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Glukosetoleranzen von VDR-Knockout-Mäusen mit Wildtyp-Mäusen. Dies steht in Widerspruch zu den Ergebnissen von ZEITZ et al. (2003). Dort wurden ebenfalls die Glukosetoleranz und zusätzlich noch die Insulinsekretionskapazität der VDR-Knockout-Mäuse auf Normaldiät und Rescue Diet getestet. Dabei zeigte sich eine deutlich verschlechterte Glukosetoleranz bei normokalzämischen und normophosphatämischen VDR-Knockout-Mäusen nach oraler und subkutaner Glukosebelastung und eine um ca. 60% reduzierte Insulinsekretion. CADE et al. zeigten 1986 an Ratten, die auf eine kalziumreiche Vitamin D-Mangel-Diät gesetzt wurden, dass diese Versuchstiere nach intravenöser Glukosegabe eine gegenüber normal Vitamin D-versorgten Ratten verschlechterte Glukosetoleranz aufwiesen. Auch die Insulinsekretion wurde gemessen und war bei den Vitamin D-Mangel-Tieren um 50% reduziert – übereinstimmend mit den Ergebnissen der Studie von ZEITZ (2003).

Es ist momentan unklar, worauf diese unterschiedlichen Ergebnisse beruhen. Als mögliche Erklärung kommt in Betracht, dass die reduzierte Insulinsekretion bei VDR-Mutanten in den Experimenten von ZEITZ et al. (2003) durch ein Gen in der Nähe des VDR-Lokus verursacht wurde, das durch die weitere Rückzüchtung der Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund inzwischen verloren wurde. Da für die Rückzüchtung auf einen anderen genetischen Hintergrund als den der ES-Zelllinie (Stamm 129/svJ) stets auf das Vorhandensein der mutierten VDR-Allels selektioniert wird, bleiben natürlich Gene in unmittelbarer Umgebung des VDR-Lokus aus dem ursprünglichen genetischen Hintergrund der Tiere erhalten. Bei weiterer Rückzüchtung engt sich dieser Bereich dann immer weiter ein, so dass es möglich sein kann, dass sich dadurch eine Veränderung des Phänotyps ergibt, wenn sich Gene in der Nähe der Selektionsmarkers (hier VDR) befinden, die den jeweiligen Phänotyp beeinflussen und dann im Laufe der Rückzüchtung durch Gene des neuen genetischen Hintergrunds ersetzt werden. Neben den Glukosetoleranzen führten wir auch Experimente zur Suszeptibilität von CalbindinD28k- und VDR-Knockout Mäusen gegenüber Steptozotocin-induziertem Diabetes mellitus durch. Nachdem wir die

VDR- und CalbindinD28k-Mutanten über fünf Tage mit Streptozotocin behandelt hatten, wurde an den Tagen 0, 4, 7, 10, 21 und 42 überprüft, ob sich Blutglukosewerte über 200 mg/dl zeigten, was als Schwelle für die Diagnose „Diabetes“ verwendet wurde. Bei einer Streptozotocin-Dosis von 4 mg/kg KG waren am Tag 42 bei den Wildtyp-Mäusen 61% der Mäuse an Diabetes erkrankt, bei den VDR-Mutanten nur 36%. Die VDR-Knockouts wiesen somit einen gewissen Schutz gegenüber dem Streptozotocin-induzierten Diabetes auf.

MATHIEU et al. (2001) zeigten in ihrer mit unserer vergleichbaren Studie Folgendes. VDR-Mutanten und Wildtypen wurden auf Normaldiät gesetzt und nahezu derselben Streptozotocin-Behandlung unterzogen wie unsere Tiere. Bei den Wildtyp-Kontrollen zeigte sich die zu erwartende Diabetes-Inzidenz, die Knockouts jedoch waren fast vollständig vor der Erkrankung geschützt. Setzte man alle Versuchstiere auf eine unserer Rescue diet vergleichbaren Diät, die mit Lactose und Kalzium angereichert ist, zeigte sich, dass auch die VDR-Knockout-Mäuse ihren Schutz verloren und die gleiche Inzidenz zeigten wie die Wildtyp-Mäuse, so dass am Tag 42 nahezu alle Tiere erkrankt waren. Bei unseren Daten zeigt sich zwar kein kompletter Schutz, aber im Gegensatz zu den Wildtyp-Kontrollen immer noch eine um etwa eine 25% geringere Inzidenz.

Mögliche Erklärungen für diese Diskrepanz liegen eventuell im unterschiedlichen genetischen Background der verwendeten Versuchstiere, oder etwa in mehr oder weniger geringen Abweichungen, was den Inhalt der verabreichten Diäten betrifft. Das Alter der in den Studien verwendeten Tiere war in etwa gleich und kann somit keine Rolle spielen. Einen Einfluss auf die unterschiedlichen Resultate könnte eventuell die verabreichte Streptozotocin-Dosis haben, die bei MATHIEU et al. (2001) 5 mg/kg betrug und bei uns 4 mg/kg. Bei den CalbindinD28k-Knockout-Mäusen erhielten wir bei der Dosis von 4 mg/kgKG Streptozotocin keine Resultate, da zu keinem Zeitpunkt eine Hyperglykämie ausgelöst wurde. Wir mussten daher die Dosis auf 5 mg/kg KG erhöhen. Nach dieser Behandlung zeigten die CalbindinD28k-Wildtypen schon nach 20 Tagen zu 95% eine Hyperglykämie und die CalbindinD28k-Knockouts zu 88%, also fast gleiche Inzidenzen. Somit hat CalbindinD28k wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit gegenüber Streptozotocin-induziertem Diabetes bei der Maus. Eine Erklärung für die notwendige Erhöhung der Dosis in den Versuchen mit CalbindinD28k-Knockout-Mäusen gegenüber VDR-Mutanten ist wahrscheinlich im leicht unterschiedlichen genetischen Hin-

tergrund unserer Versuchstiere zu suchen. Obwohl beide Linien über 5 – 6 Generationen auf den Stamm C57BL/6 rückgezüchtet wurden, stammen die Tiere für die Rückzüchtung der VDR-Mutanten aus der C57BL/6-Linie der GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg)) und die der CalbindinD28k-Mäuse aus der C57BL/6-Linie des Max-Planck-Instituts in Martinsried. Da diese Populationen seit Jahrzehnten am jeweiligen Ort voneinander getrennt ingezüchtet wurden, ist es sehr wohl möglich, dass sich der genetische Hintergrund beider Linien im Laufe der Zeit zum Beispiel durch Spontanmutationen verändert hat. Dafür sprechen auch subtile Unterschiede im Phänotyp beider C57BL/6-Linien.

### **5.3 Ausblick**

Die Resultate unserer Studie geben einen Einblick in die Rolle des CalbindinD28k in der Kalzium-Homöostase und im Kohlenhydratstoffwechsel. Obwohl die Effekte subtil sind, scheint dieses Kalzium-bindenden Proteins eine essentielle Rolle für die Homöostase des Knochens und für die Glukosetoleranz und Insulinsekretion zu spielen. Interessant wäre an dieser Stelle eine CalbindinD28k/CalbindinD9k-Doppel-Mutante zu generieren und zu untersuchen, um Näheres über die wechselseitige Interaktion dieser Proteine zu erfahren. Fraglich ist jedoch, ob dieses Modell überhaupt lebensfähig ist.

In Bezug auf den Kohlenhydrat-Stoffwechsel müssten die vorliegenden Arbeiten vervollständigt werden, indem die Insulinsekretionskapazität der Doppel-Knockouts und CalbindinD28k-Knockouts nach subkutaner und oraler Glukosebelastung überprüft wird. Es wäre auch wichtig, die Pankreasinselmorphologie der CalbindinD28k-Knockouts zu kontrollieren, um eventuelle Veränderungen in Größe und Anzahl der Inseln und im Insulingehalt der  $\beta$ -Zellen festzuhalten. Die Vervollständigung dieser Daten kann einen weiteren Schritt in der Diabetes-Forschung bedeuten, dennoch sind in diesem Bereich noch umfangreiche Studien nötig, um letztendlich die genaue molekulare Rolle des CalbindinD28k in  $\beta$ -Zellen aufzuklären.

## **6. Zusammenfassung**

CalbindinD28k ist ein Kalzium-bindendes Protein, dessen Rolle in der Kalzium-Homöostase und im Kohlenhydrat-Stoffwechsel bis heute unklar ist. Um dieser Frage nachzugehen und um eventuelle wechselseitige Interaktionen zwischen diesem Kalzium-bindenden Protein und dem Vitamin D-Rezeptor (VDR) zu testen, untersuchten wir CalbindinD28k-Knockout-Mäuse und VDR/CalbindinD28k-Doppel-Mutanten. Die CalbindinD28k-Knockout-Mäuse wurden auf Normaldiät gesetzt und im Alter von 9 Monaten untersucht. Die Doppel-Mutanten dagegen waren zum Zeitpunkt der Untersuchung erst 3 Monate alt und bekamen eine mit 2,0% Kalzium, 1,25% Phosphor und 20% Lactose angereicherte Diät (sog. Rescue Diet). Bei allen Tieren wurde Serum und Urin untersucht. Die Knochen wurden mittels histomorphometrischer und knochendensitometrischer Methoden analysiert.

Die VDR-Knockouts auf Rescue Diet zeigten Normokalzämie, ein erhöhtes Kalzium/Kreatinin-Verhältnis im Urin, einen erhöhten renalen Kalzium-Verlust und erhöhte Serum-PTH-Werte. Bei den Doppel-Knockouts verstärkten sich diese Effekte noch zusätzlich. Bei den jungen und alten CalbindinD28k-Knockout-Mäusen konnten keine signifikanten Veränderungen im Kalzium-Haushalt festgestellt werden. Somit scheint CalbindinD28k per se wohl keine wesentliche Funktion in der Kalzium-Homöostase zu haben. Eine direkte Interaktion zwischen dem VDR und CalbindinD28k konnten wir in Bezug auf die Kalzium-Homöostase nicht feststellen. Die Untersuchung der Femora von jüngeren und älteren CalbindinD28k-Knockouts zeigte eine deutliche Reduktion der trabekulären Knochenmineraldichte. Nach getrenntgeschlechtlicher Auswertung zeigte sich diese Osteopenie des trabekulären Knochens vor allem bei männlichen Tieren. Die Ursache hierfür ist unklar, da wir bei diesen Tieren keine signifikanten Veränderungen in der renalen Kalzium-Exkretion, in den Serum-PTH-Werten und der Knochenformationsrate feststellen konnten.

In Bezug auf die Glukosetoleranztests zeigten die CalbindinD28k-Knockouts eine signifikant höhere Area under the curve (AUC) als die Wildtyp-Mäuse. Desweiteren konnten wir einen deutlichen Effekt des Geschlechts feststellen, das heisst männliche Tiere wiesen eine höhere AUC auf als weibliche. Bei den VDR-Knockouts zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. In Bezug auf den durch Streptozotocin induzierten Diabetes mellitus

zeigten CalbindinD28k-Knockout keine veränderte Empfindlichkeit, während VDR-Knockouts eine geringere Empfindlichkeit als Wildtyp-Kontrollen aufwiesen.

Weitere Studien werden notwendig sein, um die molekulare Funktion des CalbindinD28k in der Kalzium-Homöostase und im Kohlenhydratstoffwechsel herauszufinden.



## **7. Summary**

### **Role of calbindinD28k for calcium homeostasis and glucose tolerance in mice**

The role of the calcium-binding protein calbindinD28k in calcium homeostasis and carbohydrate metabolism is not clearly defined. To further examine these questions, and to test a possible interaction between this calcium-binding protein and the vitamin D receptor (VDR), we investigated calbindinD28k knockout mice and VDR/calbindinD28k double knockout mice. The calbindinD28k knockout mice were fed the normal diet, and were investigated at the age of 9 months. The double knockouts were 3 months old at the time of investigation, and were fed the so-called rescue diet enriched with 2.0% calcium, 1.25% phosphate and 20% lactose. We examined clinical chemistry parameters in serum and urine. Bones were analyzed by histomorphometric and densitometric methods.

The VDR knockout mice fed the rescue diet showed normocalcemia, an increased urinary calcium/creatinine ratio, increased renal calcium wasting and higher PTH serum levels than wildtype controls. The double knockout mice revealed qualitatively similar, but more pronounced, changes. Neither the young nor the older calbindinD28k knockout mice showed any changes in calcium homeostasis. Thus, calbindinD28k does not seem to have an essential function in calcium metabolism. A direct interaction between calbindinD28k and the VDR was not found. Femurs of young and old calbindinD28k knockouts displayed a significant reduction in trabecular bone mineral density. After a gender-specific analysis of male and female bones it was evident that the osteopenia in calbindinD28k-ablated mice was more pronounced in male mice. The reason for this effect remains unclear, because changes in renal calcium excretion, PTH serum levels or bone formation rate were absent in calbindinD28k-deficient mice.

With respect to the glucose tolerance tests, the calbindinD28k knockouts had a significantly higher area under the curve (AUC) compared with wildtype controls. The factor sex significantly influenced the AUC values. Males showed higher AUC values than females. The glucose tolerance curves of VDR knockout mice did not show significant changes relative to wildtype controls. Furthermore, the suscepti-

bility to streptococin-induced diabetes mellitus was unchanged in calbindinD28k knockouts, but reduced in VDR knockout mice.

Further studies are necessary to explore the molecular function of calbindinD28k in calcium homeostasis and carbohydrate metabolism.

## **8. Literaturverzeichnis**

- Abe, J., Nakamura, Y., Takita, T., Nakano, H., Irie, H. and Nishii, Y (1990) Prevention of immunological disorders in MRL/l mice by a new synthetic analogue of vitamin D3: 22-oxa-1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 36(1): 21-31
- Andersson, S., Davis, D. L., Dahlback, H, Jornvall, H and Russell, D. W (1989) Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme." *J Biol Chem* 264(14): 8222-9
- Airaksinen, M. S., Eilers, J., Garaschuk, O., Thoenen, H., Konnerth, A. and Meyer, M. (1997) *Proc Natl Sci USA* 94: 1488-1493
- Baker, A. R., McDonnell, D. P., Hughes, M., Crisp, D., Mangelsdorf, J , Haussler, M. R. , Pike, J. W. , Shine, J. and O'Malley, B. W. (1988) Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(10): 3294-8
- Balmain, N., Tisserand-Jochem, E , Thomasset, M., Cuisinier-Gleizes, P. and Mathieu, H. (1986) Vitamin-D-dependent calcium-binding protein (CaBP-9K) in rat growth cartilage. *Histochemistry* 84(2): 161-8
- Balsan, S., Garabedian, M., Larchet, M., Gorski, A. M., Cournot, G., Tau, C., Bourdeau, A., Silve, C. and Ricour, C. (1986) Long-term nocturnal calcium infusions can cure rickets and promote normal mineralization in hereditary resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Clin Invest* 77(5): 1661-7

- Barsony, J., Pike, J. W., DeLuca, H. F. and Marx, S. J. (1990) Immunocytochemistry with microwave-fixed fibroblasts shows 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-dependent rapid and estrogen-dependent slow reorganization of vitamin D receptors. *J Cell Biol* 111(6 Pt 1): 2385-95
- Berger, U., Wilson, P., McClelland, R. A., Colston, K., Haussler, M. R., Pike, J. W. and Coombes, R. C. (1988) Immunocytochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in normal human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 67(3): 607-13
- Berggren, P. O., Arkhammar, P., Islam, M. S., Juntti-Berggren, L., Khan, A., Kindmark, H., Kohler, M., Larsson, K., Larsson, O., Nilsson, T. (1993) Regulation of cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> in insulin-secreting cells. *Adv Exp Med Biol* 334: 25-45
- Bolt, M. J., Liu, W., Qiao, G., Kong, J., Zheng, W., Krausz, T., Cs-Szabo, G., Sitrin, M. D. and Li, Y. C. (2004) Critical role of vitamin D in sulfate homeostasis: regulation of the sodium-sulfate cotransporter by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287(4): E744-9
- Bouhtiauy, I., Lajeunesse, D. and Brunette, M. G. (1993) Effect of vitamin D depletion on calcium transport by the luminal and basolateral membranes of the proximal and distal nephrons. *Endocrinology* 132(1): 115-20
- Bourdeau, A., Atmani, F., Grosse, B. and Lieberherr, M. (1990) Rapid effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and extracellular Ca<sup>2+</sup> on phospholipid metabolism in dispersed porcine parathyroid cells. *Endocrinology* 127(6): 2738-43
- Bourlon, P. M., Faure-Dussert, A., Billaudel, B., Sutter, B. C., Tramu, G. and Thomasset, M. (1996) Relationship between calbindin-D28K levels in the A and B cells of the rat endocrine pancreas and the secretion of insulin and glucagon: influence of vitamin D<sub>3</sub> deficiency and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Endocrinol* 148(2): 223-32

- Bronner, F., Pansu, D. and Stein, W. D. (1986) An analysis of intestinal calcium transport across the rat intestine. *Am J Physiol* 250(5 Pt 1): G561-9
- Brooks, M. H., Bell, N. H., Love, L., Stern, P. H., Orfei, E., Queener, S. F., Hamstra, A. J. and DeLuca, H. F. (1978) Vitamin-D-dependent rickets type II. Resistance of target organs to 1,25-dihydroxyvitamin D. *N Engl J Med* 298(18): 996-9
- Brown, A. J., Finch, J., Grieff, M., Ritter, C., Kubodera, N., Nishii, J. and Slatopolsky, E. (1993) The mechanism for the disparate actions of calcitriol and 22-oxacalcitriol in the intestine. *Endocrinology* 133(3): 1158-64
- Brumbaugh, P. F. and Haussler, M. R. (1975) Nuclear and cytoplasmic binding components for vitamin D metabolites. *Life Sci* 16(3): 353-62
- Bruns, M. E., Overpeck, J. G., Smith, G. C., Hirsch, G. N., Mills, S. E. and Bruns, D. E. (1988) Vitamin D-dependent calcium binding protein in rat uterus: differential effects of estrogen, tamoxifen, progesterone, and pregnancy on accumulation and cellular localization. *Endocrinology* 122(6): 2371-8
- Bushinsky, D. A., Nalbantian-Brandt, C. and Favus, M. J. (1989) Elevated  $\text{Ca}^{2+}$  does not inhibit the 1, 25(OH) $_2$ D $_3$  response to phosphorus restriction. *Am J Physiol* 256(2 Pt 2): F285-9
- Bushinsky, D. A. (1999) in *Primer on metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, Fourth edition (Favus, M.J., ed): 67-74, Lippincott Williams + Wilkins, Philadelphia
- Cai, Q., Chandler, J. S., Wasserman, R. H., Kumar, R. and Penniston, J. T (1993) Vitamin D and adaptation to dietary calcium and phosphate deficiencies increase intestinal plasma membrane calcium pump gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(4): 1345-9

- Casteels, K. M., Mathieu, C., Waer, M., Valckx, D., Overbergh, L., Laureys, J. M. and Bouillon, R. (1998) Prevention of type I diabetes in nonobese diabetic mice by late intervention with nonhypercalcemic analogs of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in combination with a short induction course of cyclosporin A. *Endocrinology* 139(1): 95-102
- Chandler, J. S., Pike, J. W. and Haussler, M. R. (1979) 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors in rat kidney cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* 90(3): 1057-63
- Chertow, B. S., Sivitz, W. I., Baranetsky, N. G., Clark, S. A., Waite, A. and Deluca, H. F. (1983) Cellular mechanisms of insulin release: the effects of vitamin D deficiency and repletion on rat insulin secretion. *Endocrinology* 113(4): 1511-8
- Chertow, B. S., Sivitz, W. I., Baranetsky, N. G., Cordle, M. B. and DeLuca, H. F. (1986) Islet insulin release and net calcium retention in vitro in vitamin D-deficient rats. *Diabetes* 35(7): 771-5
- Christakos, S., Dhawan, P., Liu, Y., Peng, X. and Porta, A. (2003) New insights into the mechanisms of vitamin D action. *J Cell Biochem* 88(4): 695-705
- Christakos, S., Gabrielides, C. and Rhoten, W. B. (1989) Vitamin D-dependent calcium binding proteins: chemistry, distribution, functional considerations, and molecular biology. *Endocr Rev* 10(1): 3-26
- Christakos, S. and Norman, A. W. (1978) Vitamin D<sub>3</sub>-induced calcium binding protein in bone tissue. *Science* 202(4363): 70-1
- Christakos, S. and Norman, A. W. (1979) Studies on the mode of action of calciferol. XVIII. Evidence for a specific high affinity binding protein for 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in chick kidney and pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 89(1): 56-63

- Clemens, T. L., Garrett, K. P., Zhou, X. Y., Pike, J. W., Haussler, M. R. and Dempster, D. W. (1988) Immunocytochemical localization of the 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor in target cells. *Endocrinology* 122(4): 1224-30
- Dardenne, O, Prud'homme, J, Arabian, A, Glorieux, FH and St-Arnaud, R. (2001) Targeted inactivation of the 25-hydroxyvitamin D(3)-1(alpha)-hydroxylase gene (CYP27B1) creates an animal model of pseudovitamin D-deficiency rickets. *Endokrinol* 142(7): 2734-35
- Desai, S. S., Appel, M. C. and Baran, D. T. (1986) Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on cytosolic calcium in two human cell lines (HL-60 and U-937) *J Bone Miner Res* 1(6): 497-501
- Dupret, J. M., Brun, P., Perret, C., Lomri, N., Thomasset, M. and Cuisinier-Gleizes, P. (1987) Transcriptional and post-transcriptional regulation of vitamin D-dependent calcium-binding protein gene expression in the rat duodenum by 1,25-dihydroxycholecalciferol. *J Biol Chem* 262(34): 16553-7
- Erben, R. G., (2003) Bone labelling techniques. In: *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. An, Y. H. , Martin, K. L. (eds) Humana Press Inc., Totowa, USA: 99-117
- Erben, R. G., Soegiarto Desi W., Weber, K., Zeitz, U., Lieberherr, M., Gniadecki, R., Möller, G. ,Adamski, J. and Balling, R. (2002) Deletion of Desoxyribonucleic Acid Binding Domain of the Vitamin D Receptor Abrogates Genomic and Nongenomic Functions of Vitamin D. *Mol Endocrinol* 16(7): 1524-1537
- Erben, R. G.(1997) Embedding of Bone Samples in Methylmethacrylate: An Improved Method Suitable for Bone Histomorphometry, Histochemistry, and Immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*
- Egel, J, Pfanstiel, J. and Puschett, J. B. (1985) Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on membrane transport and intermediary metabolism. *Miner Electrolyte Metab* 11(1): 62-8

- Eicher, E. M., Southard, J. L., Scriver, C. R. and Glorieux, F. H. (1976) Hypophosphatemia: mouse model for human familial hypophosphatemic (vitamin D-resistant) rickets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(12): 4667-71
- Feldman, S. C., Christakos, S. (1983) Vitamin D-dependent calcium binding protein in rat brain: biochemical and immunocytochemical characterization. *Endokrinol* 112: 290
- Ferrari, S., Molinari, S., Battini, R., Cossu, G. and Lamon-Fava, S. (1992) Induction of Calbindin-D28K by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in cultured chicken intestinal cells. *Exp Cell Res* 200(2): 528-31
- Fraser, D. R. and Kodicek, E. (1970) Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite. *Nature* 228(5273): 764-6
- Friedman, P. A. (1999) Calcium transport in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 8(5): 589-95
- Friedman, P. A. and Gesek, F. A. (1995) Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms, and regulation. *Physiol Rev* 75(3): 429-71
- Fu, G. K., Lin, D., Zhang, M. Y., Bikle, D. D., Shackleton, C. H., Miller, W. L. and Portale, A. A. (1997) Cloning of human 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase and mutations causing vitamin D-dependent rickets type 1. *Mol Endocrinol* 11(13): 1961-70
- Fullmer, C. S., Brindak, M. E., Bar, A. and Wasserman, R. H. (1976) The purification of calcium-binding protein from the uterus of the laying hen. *Proc Soc Exp Biol Med* 152(2): 237-41
- Fullmer, C. S. and Wasserman, R. H. (1981) The amino acid sequence of bovine intestinal calcium-binding protein. *J Biol Chem* 256(11): 5669-74



- Fullmer, C. S. and Wasserman, R. H. (1987) Chicken intestinal 28-kilodalton calbindin-D: complete amino acid sequence and structural considerations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(14): 4772-6
- Fullmer, C. S. and Wasserman, R. H. (1977) Bovine intestinal calcium binding protein: cation binding properties, chemistry and trypsin resistance. In: Wasserman R. H. et al.: *Calcium binding proteins and calcium function*. Elsevier/North Holland, New York, 303
- Garabedian, M. and Ben-Mekhbi, H. (1999) Rickets and Vitamin D Deficiency. In: *Vitamin D, Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications*. Holick, M. F. ed Humana Press Totowa, NJ: 273-286
- Garabedian, M., Holick, M. F., Deluca, H. F. and Boyle, I. T. (1972) Control of 25-hydroxycholecalciferol metabolism by parathyroid glands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69(7): 1673-6
- Goddard, G. V., McIntyre, D. C. and Leech, C. K. (1969) A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol* 25(3): 295-330
- Haussler, M. R., Baylink, D. J., Hughes, M. R., Brumbaugh, P. F., Wergedal, J. E., Shen, F. H., Nielsen, R. L., Counts, S. J., Bursac, K. M. and McCain, T. A. (1976) The assay of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: physiologic and pathologic modulation of circulating hormone levels. *Clin Endocrinol (Oxf)* 5 Suppl: 151S-165S
- Haussler, M. R., Mangelsdorf, D. J., Komm, B. S., Terpening, C. M., Yamaoka, K., Allegretto, E. A., Baker, A. R., Shine, J., D. P., McDonnell, Hughes, M. (1988) Molecular biology of the vitamin D hormone. *Recent Prog Horm Res* 44: 263-305
- Haussler, M. R. and Norman, A. W. (1969) Chromosomal receptor for a vitamin D metabolite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 62(1): 155-62

- Henry, H. L. (1981) Insulin permits parathyroid hormone stimulation of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> production in cultured kidney cells. *Endocrinology* 108(2): 733-5
- Hess, A. F., Weinstock, M. (1924) Antirachitic properties imparted to inert fluids and to green vegetables by ultraviolet irradiation. *J Biol Chem* 62: 301-313
- Hoenderop, J. G., Hartog, A., Stuver, M., Doucet, A., Willems, P. H. and Bindels, R. J. (2000) Localisation of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channel in rabbit kidney and intestine. *J Am Soc Nephrol* 11: 1171-1178
- Hoenderop, J. G., Muller, D., Suzuki, M., van Os C. H. and Bindels R. J. (2000) Epithelial calcium channels: gate-keeper of active calcium reabsorption. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9: 335-340
- Hoenderop, J. G., Muller M. , van der Kemp, A. W. , Hartog, A. , Suzuki, M. , Ishibashi, K. , Imai, M. , Sweep, F. , Willems, P. H. , van Os CH. and Bindels RJ (2001) Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. *J Am Soc Nephrol* 12: 1342-1349
- Hoenderop, J. G., van der Kemp AWCM., Hartog, A. , van de Graaf, S. F., van Os C. H., Willems, P. H. and Bindels, R. J. (1999) Molecular identification of the apical Ca<sup>2+</sup> channel in 1,25-dihydroxyvitamin D-responsive epithelia. *J Biol Chem* 274: 8375-8378
- Holick, M. F. (1981) The cutaneous photosynthesis of previtamin D<sub>3</sub>: a unique photoendocrine system." *J Invest Dermatol* 77(1): 51-8
- Holick, M. F., H. K. Schnoes, H. K., DeLuca, H. F., Gray, R. W., Boyle, I. T. and Suda, T. (1972) Isolation and identification of 24,25-dihydroxycholecalciferol, a metabolite of vitamin D made in the kidney. *Biochemistry* 11(23): 4251-5

- Huang, Y. C., Lee, S., Stolz, R., Gabrielides, C., Pansini-Porta, A., Bruns, M. E., Bruns, D. E., Miffin, T. E., Pike, J. W. and Christakos, S. (1989) Effect of hormones and development on the expression of the rat 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor gene Comparison with calbindin gene expression. *J Biol Chem* 264(29): 17454-61
- Hughes, M. R., Brumbaugh, P. F., Hussler, M. R., Wergedal, J. E. and Baylink, D. J. (1975) Regulation of serum 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> by calcium and phosphate in the rat. *Science* 190(4214): 578-80
- Hughes, M. R., P. J. Malloy, P. J., Kieback, D. G., Kesterson, R. A., Pike, J. W., Feldman, D. and O'Malley, B. W. (1988) Point mutations in the human vitamin D receptor gene associated with hypocalcemic rickets. *Science* 242(4886): 1702-5
- Huldschinsky, K. (1919) Heilung von Rachitis durch künstliche Höhensonne. *Dtsch med Wschr* 65: 712-713
- Hunziker, W. and Schrickel, S. (1988) Rat brain calbindin D28: six domain structure and extensive amino acid homology with chicken calbindin D28. *Mol Endocrinol* 2(5): 465-73
- Hypponen, E., Laara, E., Reunanen, A., Jarvelin, M. R. and Virtanen, S. M. (2001) Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 358(9292): 1500-3
- Inaba, M., Nishizawa, Y., Song, K., Tanishita, H., Okuno, S., Miki, T. and Morii, H. (1992) Partial protection of 1  $\alpha$ -hydroxyvitamin D<sub>3</sub> against the development of diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin injection in CD-1 mice. *Metabolism* 41(6): 631-5
- Jones, G., Vriezen, D., Lohnes, D., Palda, V. and Edwards, N. S. (1987) Side-chain hydroxylation of vitamin D<sub>3</sub> and its physiological implications. *Steroids* 49(1-3): 29-53

- Kadowaki, S. and Norman, A. W. (1984) Pancreatic vitamin D-dependent calcium binding protein: biochemical properties and response to vitamin D. *Arch Biochem Biophys* 233(1): 228-36
- Kallfelz, F. A., Taylor, A. N. and Wasserman, R. H. (1967) Vitamin D-induced calcium binding factor in rat intestinal mucosa. *Proc Soc Exp Biol Med* 125(1): 54-8
- Karsenty, G., Lacour, B., Ulmann, A., Pierandrei, E. and Drueke, T. (1985) Early effects of vitamin D metabolites on phosphate fluxes in isolated rat enterocytes. *Am J Physiol* 248(1 Pt 1): G40-5
- Kollenkirchen, U., Fox, J. and Walters, M. R. (1991) Normocalcemia without hyperparathyroidism in vitamin D-deficient rats. *J Bone Miner Res* 6(3): 273-8
- Kream, B. E., Jose, M., Yamada, S. and DeLuca, H. F. (1977) A specific high-affinity binding macromolecule for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in fetal bone. *Science* 197(4308): 1086-8
- Lee, C. T., Huynh, V. M, Lai, L. W. and Lien, Y. H. (2002) Cyclosporine A-induced hypercalciuria in Calbindin-D28k knockout and wild-type mice. *Kidney International* 62 (6): 2055-2063
- Lee, Y. S., Taylor, A. N., Reimers, T. J., Edelstein, S., Fullmer, C. S. and Wasserman, R. H. (1987) Calbindin-D in peripheral nerve cells is vitamin D and calcium dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(20): 7344-8
- Lemire, J. (1997) The role of vitamin D in immunosuppression : lessons from autoimmunity and transplantation. In: *Vitamin D* edited by D.Feldman et al. San Diego: Academic: 1167-1181

- Li, Y. C., Amling, M., Pirro, A. E., Priemel, M., Meuse, J., Baron, R., Delling, G. and Demay, M. B. (1998) Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice. *Endocrinology* 139(10): 4391-6
- Li, Y. C., Bolt, M. J., Cao, L. P. and Sitrin, M. D. (2001) Effects of vitamin D receptor inactivation on the expression of calbindins and calcium metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281(3): E558-64
- Li, H. and Christakos, S. (1991) Differential regulation by 1, 25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> of CalbindinD9k and CalbindinD28k gene expression in mouse kidney. *Endocrinology* 128: 2844-2852
- Li, Y. C., Pirro, A. E., Amling, M., Delling, G., Baron, R., Bronson, R. and Demay, M. B. (1997) Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(18): 9831-5
- Lieberherr, M, Grosse, B., Tassin, M-T. , Kachkache, M. , Bourdeau, A. (1994) Transmembrane signal pathways induced by calcitriol, estradiol, testosterone, and progesterone in osteoblasts. In: *Proceedings of the Ninth Workshop on Vitamin D*, Orlando, FL, 315-323
- Lieberherr, M. (1987) Effects of vitamin D<sub>3</sub> metabolites on cytosolic free calcium in confluent mouse osteoblasts. *J Biol Chem* 262(27): 13168-73
- Lippiello, L. and Wasserman, R. H. (1975) Fluorescent antibody localization of the vitamin D-dependent calcium-binding protein in the oviduct of the laying hen. *J Histochem Cytochem* 23(2): 111-6

- Liu, L., Khastgir, A., McCauley, J. M., Dunn, S. T., Morrissey, J. H., Christakos, S., Hughes, M. R. and Bourdeau, J. E. (1996) RT-PCR microlocalization of mRNAs for calbindin D28k and vitamin D receptor in the murine nephron. *Am J Physiol* 270(4 Pt 2): F677-81
- McLachlan, D. R. C., Wong, L., (1987) Calmodulin and CalbindinD28k. *Alzheimer Disease and associated Disorders*.1:175
- MacLaughlin, J. A., Anderson, R. R and Holick, M. F. (1982) Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D3 and its photoisomers in human skin. *Science* 216(4549): 1001-3
- Malloy, P. J. and Feldman, D. (1999) Molecular defects in the vitamin D receptor associated with hereditary 1, 25-Dihydroxyvitamin D-resistant rickets. In: *Vitamin D, Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications*. Holick, M. F. ed Humana Press Totowa, NJ: 317-336
- Malloy, P. J., Hochberg, Z., Tiosano, D., Pike, J. W., Hughes, M. R. and Feldman, D. (1990) The molecular basis of hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D3 resistant rickets in seven related families. *J Clin Invest* 86(6): 2071-9
- Malloy, P. J., Pike, J. W. and Feldman, D. (1999) The vitamin D receptor and the syndrome of hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets. *Endocr Rev* 20(2): 156-88
- Mathieu, C. L., Burnett, S. A., Mills, S. E., Bruns, D. E. and Bruns, M. E. (1988) Gestational appearance of 9kD calbindin in uterus, yolk sac and placenta: implication for maternal-fetal calcium transport. *J Bone Mineral Res* (3): S151 (Abstract 331)
- Mathieu, C., Laureys, J., Sobis, H., Vandeputte, M., Waer, M. and Bouillon, R. (1992) 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 prevents insulinitis in NOD mice. *Diabetes* 41(11): 1491-5

- Mathieu, C., Van Etten, E., Gysemans, C., Decallonne, B., Kato, S., Laureys, J., Depovere, J., Valckx, D., Verstuyf, A. and Bouillo, R. (2001) In vitro and in vivo analysis of the immune system of vitamin D receptor knockout mice. *J Bone Miner Res* 16(11): 2057-65
- Matsumoto, T., Kawanobe, Y., Ezawa, I., Shibuya, N., Hata, K. and Ogata, E. (1986) Role of insulin in the increase in serum 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations in response to phosphorus deprivation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Endocrinology* 118(4): 1440-4
- Mellanby, E. (1919) An experimental investigation on rickets. *Lancet* 1: 407-412
- Meyer, Jr. R. A., Meyer, M. H., Gray, A. W. and Korkor, R. B. (1983) Near normal plasma  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in juvenile x-linked hypophosphatemic mice : are duodenal receptors for  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  low? *Calcif Tissue Int* 35: 673
- Miller, J. J. and Baimbridge, K. G. (1983) Biochemical and immunohistochemical correlates of kindling-induced epilepsy: role of calcium binding protein. *Brain Res* 278(1-2): 322-6
- Morrissey, R. L. ,Bucci T. J. , Empson, R. N. and Lufkin, E. G. (1975) Calcium binding protein: its cellular localization in jejunum, kidney and pancreas. *Proc Soc Exp Biol Med* 149-156
- Moue, P. D., Holt, M. , Brehier, A. , Lomri, A. and Thomasset, M. (1988) Immunocytochemical demonstration of 9k and 28k vitamin D dependent calcium binding proteins in human and rat osteoblastic cells in culture. *J Bone Mineral Res* 3: 5152 (Abstract 336)
- Narbaitz, R., Stumpf, W. E., Sar, M., Huang, S. and DeLuca, H. F. (1983) Autoradiographic localization of target cells for 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in bones from fetal rats. *Calcif Tissue Int* 35(2): 177-82

- Nemere, I., Yoshimoto, Y. and Norman, A. W. (1984) "Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within fourteen minutes of exposure to 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>." *Endocrinology* 115(4): 1476-83
- Norman, A. W., Frankel, J. B., Heldt, A. M. and Grodsky, G. M. (1980) Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science* 209(4458): 823-5
- Norman, A. W., Okamura, W. H. Bishop, J. E. and Henry, H. L. (2002) Update on biological actions of 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> (rapid effects) and 24R,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub>. *Mol Cell Endocrinol* 197(1-2): 1-13
- Parfitt, A. M. , Drezner, M. K. , Glorieux, F. H. , Kanis, J. A. , Malluche, H. , Meunier, P. J. , Ott, S. M. And Recker, R. R. (1987) Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. *J Bone Miner Res* 2(6): 595-611
- Parmentier, M., M. Ghysens, F. Rypens, D. E. Lawson, J. L. Pasteels and R. Pochet (1987) Calbindin in vertebrate classes: immunohistochemical localization and Western blot analysis. *Gen Comp Endocrinol* 65(3): 399-407
- Pasteels, J. L., Pochet, R., Surardt, L., Hubeau, C., Chirnoaga, M., Parmentier, M. and Lawson, D. E. (1986) Ultrastructural localization of brain 'vitamin D-dependent' calcium binding proteins. *Brain Res* 384(2): 294-303
- Peleg, S., Sastry, M., Collins, E. D., Bishop, J. E. and Norman, A. W. (1995) Distinct conformational changes induced by 20-epi analogues of 1  $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> are associated with enhanced activation of the vitamin D receptor. *J Biol Chem* 270(18): 10551-8
- Peng, J. B., Chen, X. Z., Berger, U. V. ,Vassilev, P. M. , Brown, E. M. and Hedinger, M. A. (2000) A rat kidney specific calcium transporter in the distal nephron. *J Biol Chem* 275: 28186-28194



- Rabie, A., Thomasset, M. and Legrand, C (1983) Immunocytochemical detection of calcium-binding protein in the cochlear and vestibular hair cells of the rat. *Cell Tissue Res* 232(3): 691-6
- Rasmussen, H. and Anast, C. (1978) Familial hypophosphatemic (vitamin D resistant) rickets and vitamin D-dependent rickets. In: Stanbury, J. B., et al. : *The metabolic basis of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, 1537-1562
- Raval-Pandya, M. and Porta, A. R. (1998) Mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on intestinal calcium absorption and renal calcium transport. *Mol Biol Clin Appl*, humana Press Inc.: 163-173
- Reddy D., Pollock, A. S., Clark, S. A., Sooy, K., Vasavada, R. C., Stewart, A. F., Honeyman, T. and Christakos, S. (1997) Transfection and overexpression of the calcium binding protein calbindin-D28k results in a stimulatory effect on insulin synthesis in a rat beta cell line (RIN 1046-38) *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 4;94(5):1961-6
- Reichel, H., Koeffler, H. P. and Norman, A. W. (1989) The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N Engl J Med* 320(15): 980-91
- Resibois, A., Blachier, F., Rogers, J.H., Lawson, D. E. and Pochet, R. (1990) Comparison between rat brain calbindin- and calretinin-immuno-reactivities. *Adv Exp Med Biol* 269: 211-4
- Rhoten, W. B., Bruns, M. E. and Christakos, S. (1985) Presence and localization of two vitamin D-dependent calcium binding proteins in kidneys of higher vertebrates. *Endocrinology* 117(2): 674-83
- Ritchie, H. H., Hughes, M. R., Thompson, E. T., Malloy, P. J., Hochberg, Z., Feldman, D., Pike, J. W. and O'Malley, B. W. (1989) An ochre mutation in the vitamin D receptor gene causes hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-resistant rickets in three families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(24): 9783-7

- Roodman, G. D. (1996) Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* 17(4): 308-32
- Roth, J., Brown, D., Norman, A. W. and Orci, L. (1982) Localization of the vitamin D-dependent calcium-binding protein in mammalian kidney. *Am J Physiol* 243(3): F243-52
- Schenk, R. K., Olah, A. J. and Herrmann, W. (1984) Preparation of calcified tissues for the light microscopy. In: Dickson, G. R., ed. *Methods of Calcified Tissue Preparation*. Amsterdam, Elsevier: 1-56
- Schwartz, Z., Schlader, D. L., Swain, L. D. and Boyan, B. D. (1988) Direct effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 24,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on growth zone and resting zone chondrocyte membrane alkaline phosphatase and phospholipase-A<sub>2</sub> specific activities. *Endocrinology* 123(6): 2878-84
- Selles, J. and Boland, R. (1991) Evidence on the participation of the 3',5'-cyclic AMP pathway in the non-genomic action of 1,25-dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> in cardiac muscle. *Mol Cell Endocrinol* 82(2-3): 229-35
- Sonnenberg, J., Pansini, A. R. and Christakos, S. (1984) Vitamin D-dependent rat renal calcium-binding protein: development of a radioimmunoassay, tissue distribution, and immunologic identification. *Endocrinology* 115(2): 640-8
- Sooy, K., Kohut, J and Christakos, S. (2000) The role of calbindin and 1,25dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9(4): 341-7
- Sooy, K., Schermerhorn, T., Noda, M., Surana, M., Rhoten, W. B., Meyer, M., Fleischer, N., Sharp, G. W. and Christakos, S. (1999) Calbindin-D28k controls [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and insulin release. Evidence obtained from calbindinD28k-knockout mice and beta cell lines. *J Biol Chem* 274(48): 34343-9

- Stumpf, W. E., Clark, S. A., Sar, M. and DeLuca, H. F. (1984) Topographical and developmental studies on target sites of 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> in skin. *Cell Tissue Res* 238(3): 489-96
- Stumpf, W. E., Sar, M., Reid, F. A., Tanaka, Y. and DeLuca, H. F. (1979) Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. *Science* 206(4423): 1188-90
- Sylvia, V. L., Schwartz, Z., Ellis, E. B., Helm, S. H., Gomez, R., Dean, D. D. and Boyan, B. D. (1996) Nongenomic regulation of protein kinase C isoforms by the vitamin D metabolites 1 alpha,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 24R,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. *J Cell Physiol* 167(3): 380-93
- Szipirer, J., Szipirer, C., Riviere, M., Levan, G., Marynen, P., Cassiman, J. J., Wiese, R. and DeLuca, H. F. (1991) The Sp1 transcription factor gene (SP1) and the 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor gene (VDR) are colocalized on human chromosome arm 12q and rat chromosome 7. *Genomics* 11(1): 168-73
- Tan, S. and Lau, K. (1993) Patch-clamp evidence for calcium channels in apical membranes of rabbit kidney connecting tubules. *J Clin Invest* 92(6): 2731-6
- Tanaka, Y. and Deluca, H. F. (1973) The control of 25-hydroxyvitamin D metabolism by inorganic phosphorus. *Arch Biochem Biophys* 154(2): 566-74
- Taylor, A. N., Gleason, W. A., Jr. and Lankford, G. L. (1984) Rat intestinal vitamin D-dependent calcium-binding protein: immunocytochemical localization in incisor ameloblasts. *J Dent Res* 63(2): 94-7
- Taylor, A. N. and Inpanbutr, N. (1988) Vitamin D mediated intestinal calcium transport: ultrastructural distribution of calbindin-D28 K following calcitriol. *Prog Clin Biol Res* 252: 109-14

- Trump, D. L., Hershberger, P. A., Bernardi, R. J. , Ahmed, S. , Muindi, J. , Fakih, M. , Yu, W. D. , Johnson, C. S. (2004) Anti-tumor activity of calcitriol: pre-clinical and clinical studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90 (1-5): 519-526
- Van Cromphaut, S., Derwechin M., Hoenderop, J. G. , Stockmans, I. , Van Herck, E. , Kato, Bindels, R. J. , Collen, D. , Carmeliet, P. , Boullion, R. , Carmeliet, G. (2001) Active duodenal calcium absorption in Vitamin D receptor-Knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13324-13329
- Varghese, S., Deaven, L. L., Huang, Y. C., Gill, R. K., Iacopino, A. M. and Christakos, S. (1989) Transcriptional regulation and chromosomal assignment of the mammalian calbindin-D28k gene. *Mol Endocrinol* 3(3): 495-502
- Verstappen, A., M., Parmentier, M. Chirnoaga, D. E. Lawson, J. L. Pasteels and R. Pochet (1986). Vitamin D-dependent calcium binding protein immunoreactivity in human retina. *Ophthalmic Res* 18(4): 209-14
- Walters, M. R. (1981) An estrogen-stimulated 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor in rat uterus. *Biochem Biophys Res Commun* 103(2): 721-6
- Wasserman, R. H. and Taylor, A.N. (1966) Vitamin D<sub>3</sub> induced calcium binding protein in chick intestinal mucosa. *Science* 152: 791-793
- Wasserman, R. H. and Fullmer, C. S. (1983) Calcium transport proteins, calcium absorption, and vitamin D. *Annu Rev Physiol* 45: 375-90
- Wasserman, R. H., Smith, C. A., Brindak, M. E., de Talamoni, N., Fullmer, C. S., Penniston, J. T. and Kumar, R. (1992) Vitamin D and mineral deficiencies increase the plasma membrane calcium pump of chicken intestine. *Gastroenterology* 102: 886-894

- Weber, K., Erben R. G., Rump, A. and Adamski, J. (2001) Gene structure and regulation of the murine epithelial calcium channels EcaC1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 1287-1294
- Wecksler, W. R., W. H. Okamura, W. H. and Norman, A. W. (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 D<sub>3</sub> with its chick intestinal mucosa receptor system. *J Steroid Biochem* 9(10): 929-37
- Weinstein, R. S., Underwood, J. L., Hutson, M. S. and DeLuca, H. F. (1984) Bone histomorphometry in vitamin D-deficient rats infused with calcium and phosphorus. *Am J Physiol* 246(6 Pt 1): E499-505
- Williams, T. F., Winters, R. W. (1972) Familial (hereditary) vitamin D-resistant rickets with hypophosphatemia. *Metab B Inh Di*, NY: 1465
- Wilson, P. W., Harding, M. and Lawson, D. E. (1985) Putative amino acid sequence of chick calcium-binding protein deduced from a complementary DNA sequence. *Nucleic Acids Res* 13(24): 8867-81
- Wood, R. J., Tchack, L., Taparias, H. (2001) 1,25DihydroxVitamin D<sub>3</sub> increases the expression of the CAT1 epithelial calcium channel in the Caco-2 human intestinal cell line. *BMC Physiol* 1: 11
- Yamamoto, M., Kawanobe, Y., Takahashi, H., Shimazawa, E., Kimura, S. and Ogata, E. (1984) Vitamin D deficiency and renal calcium transport in the rat. *J Clin Invest* 74(2): 507-13
- Yetgin, S. and Ozsoylu, S. (1982) Myeloid metaplasia in vitamin D deficiency rickets. *Scand J Haematol* 28(2): 180-5

- Yoshizawa, T, Handa, Y., Uematsu, Y., Takeda, S., Sekine, K., Yoshihara, Y., Kawakami, T., Arioka, K., Sato, H., Uchiyama, Y., Masushige, S., Fukamizu, A., Matsumoto, T., Kato, S. (1997) Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet.* Aug;16(4):391-6
- 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(3): 509-11
- Zheng, W., Xie, Y., Li, G., Kong, J., Feng, Q. and Li, Y. C. (2004) Critical role of calbindin-D28k in calcium homeostasis revealed by mice lacking both vitamin D receptor and calbindin-D28k. *J Biol Chem* 279(50): 52406-13
- Zhuang, L., Peng, J.B., Tou, L., Takanaga, H., Adam, R. M., Hediger, M. A., Freeman, M. R. (2002) Calcium-selective ion channel, CAT1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Lab Invest* 82: 1755-1764

## **9. Danksagung**

Mein größter und innigster Dank gilt meiner Familie – meinen Eltern, die mich seit dem ich denken kann in jeder Hinsicht unterstützt haben, mir das Studium und die Promotion ermöglicht haben und immer hinter mir standen –meinen beiden Schwestern, Julia und Anne, die immer an meiner Seite sind und mir stets neue Kraft geben. Letztendlich sind sie mir alle vier das Wertvollste und Wichtigste auf der Welt und dafür möchte ich ihnen von ganzem Herzen danken.

Prof. Dr. Reinhold G. Erben danke ich für die Überlassung des Themas, die gute fachliche Betreuung, die hervorragende Zusammenarbeit und für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Einen großes Dankeschön richte ich an Karin Weber, Karin Begsteiger, Siglinde Hirmer und Ute Zeitz für ihre Geduld, mir verschiedene molekularbiologische Arbeitsmethoden zu zeigen, ihre Hilfsbereitschaft und gute Teamarbeit. Ebenfalls bedanke ich mich bei den anderen Doktorandinnen für die angenehme Atmosphäre in der Arbeitsgruppe, insbesondere bei Tine, für die vielen lustigen Stunden bei mir durch ihre liebenswerte Art in dieser Zeit besonders ans Herz gewachsen.

Besonders danken möchte ich Claudi, ohne deren Hilfe ich in den letzten zweieinhalb Jahren wohl desöfteren verloren gewesen wäre. Sie unterstützte mich in fast allen Labortätigkeiten, gab mir eine Bleibe in Wien (oder wohl besser ein ZUHause mit eigener Kaffeetasse!) und hatte stets ein offenes Ohr für meine Problemchen, woraus sich eine wunderbare Freundschaft entwickelt hat.

Einen sehr wichtigen Dank richte ich an Sam, meiner besten Freundin und Teil meiner Seele, die mich seit nun 11 Jahren durchs Leben begleitet, mich in jeder Situation auffängt und mich ohne Worte versteht.

Ein mir persönlich noch sehr wichtiger Dank geht an Onkel Gottfried, für seine herzliche, humorvolle Art, die mich oft genug zum Lachen brachte, sein stets offenes Ohr für meine Geschichten und Angelegenheiten und die dadurch entspannte Arbeitsatmosphäre. Sein Bestreben, ich solle in den Jahren der Doktorarbeit durch eine Lebensschule gehen, hat sich mit hiermit erfüllt. Danke dafür, Onkel Gottfried.

## 10.Lebenslauf

**Familienname:** Wüstmann  
**Vorname:** Eva  
**Anschrift:** Enhuberstrasse 5  
 80333 München  
**Geboren am/in:** 24.05.1976 in Erlangen  
**Familienstand:** ledig  
**Eltern:** Vater: Dr.med. Georg Ernst Wüstmann  
 Hals-Nasen-Ohrenarzt, Allergologe  
Mutter: Marianne Christine Antonie  
 Wüstmann geb.Sajitz-Hermstein  
 Studienrätin für Englisch und Französisch  
**Geschwister** Julia Wüstmann, geb. 08.05.1974  
 Internistin in der Klinik Dr. Agiroff in Berg  
 am Starnberg.  
Anne Wüstmann, geb. 04.11.1983, Modeschule  
**Religion:** römisch-katholisch  
**Schulische Ausbildung:** 1982 - 1986 Grundschule Hersbruck  
 1986 – 1995 Paul-Pfinzing-Gymnasium  
 Hersbruck  
 1995 Abschluß mit Abitur  
**Berufliche Ausbildung:** 1995 - 2002 Studium der Veterinärmedizin  
 an der Ludwig-Maximilians-  
 Universität München  
 - Von August 2002 bis Januar 2003 Hospitanz in der Tierärztlichen Klinik Duisburg-  
 Homberg  
 - Promotion: Vom 01.05.2003 bis 01.04.2005 wissenschaftliche Mitarbeiterin (BatII/2)  
 an dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der Tier-  
 ärztlichen Fakultät der Universität München mit gleichzeitiger Anfertigung der Disser-  
 tation unter der Leitung von Prof.Dr.Dr.Reinhold G.Erben.