

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung
der tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Geschäftsführender Vorstand:
Univ.-Prof. Dr. habil. H.-J. Gabius

Angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Dr. R. G. Erben

Untersuchungen zur diätetischen Normalisierung der
Calciumhomöostase
und zur *in vitro*-Insulinsekretion der Langerhans-Inseln bei
PVDR 1-Schweinen

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

von
Bernhard Ludwig
aus
Wildendürnbach

München 2008

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Erben

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Stangassinger

Tag der Promotion: 8. Februar 2008

I. Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| I. Inhaltsverzeichnis | I |
| II. Abbildungsverzeichnis | III |
| III. Tabellenverzeichnis | IV |
| IV. Abkürzungsverzeichnis | V |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 2 Literaturübersicht..... | 3 |
| 2.1 Vitamin-D-Hormonsystem | 3 |
| 2.1.1 Synthese und Aktivierung von Vitamin D | 3 |
| 2.1.2 Funktion und Wirkung | 5 |
| 2.1.3 Regulationsmechanismen | 8 |
| 2.2 Calcium | 9 |
| 2.2.1 Biologische Funktionen | 9 |
| 2.2.2 Systemische Regulation..... | 10 |
| 2.2.3 Zelluläre Regulation | 11 |
| 2.2.4 Die intestinale Calciumaufnahme | 11 |
| 2.2.4.1 Der transzelluläre Calciumtransport..... | 12 |
| 2.2.4.2 Der parazelluläre Calciumtransport..... | 15 |
| 2.3 Das Pankreas..... | 20 |
| 2.3.1 Anatomie und Histologie | 20 |
| 2.3.2 Entwicklung | 22 |
| 2.3.3 Insulin und Insulinsekretion | 23 |
| 2.3.4 Wirkungsweisen des Insulins | 24 |
| 2.4 Einfluss des Vitamin-D-Hormonsystem und der Calcium-Homöostase auf die endokrine Pankreasfunktion | 25 |
| 2.4.1 Wirkung des Vitamin-D-Hormonsystems über die Modulation des Immunsystems auf die endokrine Pankreasfunktion | 25 |
| 2.4.2 Wirkung des Vitamin-D-Hormonsystems und der Calcium-homöostase auf die Insulinsekretion | 27 |
| 2.5 Tiermodell Schwein | 29 |
| 2.5.1 PVDR 1–Erkrankung beim Menschen..... | 29 |
| 2.5.2 PVDR 1–Erkrankung beim Schwein..... | 29 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.5.3 | Tiermodell PVDR 1-Schwein..... | 30 |
| 3 | Material und Methode..... | 32 |
| 3.1 | Tiermaterial | 32 |
| 3.2 | Genotypisierung | 33 |
| 3.2.1 | DNA–Gewinnung | 33 |
| 3.2.2 | Amplification Refractory Mutation System PCR | 33 |
| 3.3 | Probennahme..... | 35 |
| 3.4 | Messung der Konzentration von ionisiertem Calcium im heparinisiertem Vollblut..... | 35 |
| 3.5 | Fütterungsversuche..... | 36 |
| 3.5.1 | Toleranzversuche..... | 37 |
| 3.5.2 | Wirkungstests mit adulten Schweinen..... | 42 |
| 3.5.3 | Calcium ²⁺ -Verlaufsversuch mit Saugferkeln und SGS-Test (Static glucose stimulation) | 47 |
| 3.5.4 | Wirkungstests mit Saugferkeln..... | 50 |
| 3.6 | Statistische Auswertung | 52 |
| 4 | Ergebnisse | 53 |
| 4.1 | Schweinezucht und Genotypisierung | 53 |
| 4.2 | Toleranzversuche..... | 53 |
| 4.2.1 | Kotkonsistenz..... | 54 |
| 4.2.2 | Körpergewichtsentwicklung..... | 54 |
| 4.3 | Wirkungstests mit adulten Schweinen..... | 55 |
| 4.4 | Verlaufstudie des ionisierten Calciumgehalts im Vollblut von Ferkeln..... | 57 |
| 4.5 | SGS-Test | 58 |
| 4.6 | Wirkungstests mit Ferkeln | 59 |
| 5 | Diskussion | 64 |
| 6 | Zusammenfassung | 70 |
| 7 | Summary | 72 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 73 |
| 9 | Danksagung | 91 |
| 10 | Lebenslauf | 93 |

II. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1. Der strukturelle Aufbau der epithelialen Ca^{2+} -Kanäle TRPV5 und TRPV6... | 13 |
| Abb. 2. Epithelialer Ca^{2+} -Transport..... | 15 |
| Abb. 3. Das Pankreas des Schweins..... | 20 |
| Abb. 4. Position der Filter-Einsätze in der Zellkulturplatte im Querschnitt. | 49 |
| Abb. 5. Schema für die Durchführung des SGS-Tests. | 49 |
| Abb. 6. Gewichtsentwicklung der Ferkel..... | 54 |
| Abb. 7. Konzentration des ionisierten Calciums im Vollblut. | 56 |
| Abb. 8. Entwicklung des ionisierten Calciumgehaltes im Vollblut von PVDR 1-Ferkeln..... | 57 |
| Abb. 9. Glucose-induzierte Insulinsekretion nach 10 Minuten. | 58 |
| Abb. 10. Verlauf des ionisierten Calciumgehaltes im Vollblut von Ferkeln bei Aufzucht mit unterschiedlich supplementierten MAT. | 59 |
| Abb. 11. Überlebensfunktion. | 60 |
| Abb. 12. Gruppenvergleich der Werte des ionisierten Calciums im Vollblut. | 62 |

III. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tab. 1. Vitamin-D-Behandlungsplan..... | 32 |
| Tab. 2. Die Reagenzien und Reaktionsgefäß für den Assay | 34 |
| Tab. 3. Der Reaktionsansatz für die SNP-PCR | 34 |
| Tab. 4. Die Testsubstanzen und die für die Versuche notwendigen Futterbestandteile | 36 |
| Tab. 5. Die Testsubstanzen und ihre Konzentrationen im Futter..... | 37 |
| Tab. 6. Lactose-Futtermischungen 1 – 3 und ihre Rohstoffe | 37 |
| Tab. 7. Lactose-Futtermischungen 1 – 3 und ihre Inhaltsstoffe | 38 |
| Tab. 8. Lactulose-Futtermischungen 1 – 3 und ihre Rohstoffe | 39 |
| Tab. 9. Lactulose-Futtermischungen 1 – 3 und ihre Inhaltsstoffe | 39 |
| Tab. 10. Xylitol-Futtermischungen 1 – 3 und ihre Rohstoffe | 40 |
| Tab. 11. Xylitol-Futtermischungen 1 – 3 und ihre Inhaltsstoffe | 40 |
| Tab. 12. Maltitol-Futtermischungen 1 – 3 und ihre Rohstoffe | 41 |
| Tab. 13. Maltitol-Futtermischungen 1 – 3 und ihre Inhaltsstoffe | 42 |
| Tab. 14. Die Testsubstanzen und ihre Konzentrationen in den Futtermitteln | 43 |
| Tab. 15. Lactose- und Xylitol-Futtermischungen und ihre Rohstoffe | 43 |
| Tab. 16. Lactose- und Xylitol-Futtermischungen und ihre Inhaltsstoffe | 44 |
| Tab. 17. Maltitol- und Lactulose-Futtermischungen und ihre Rohstoffe..... | 44 |
| Tab. 18. Maltitol- und Lactulose-Futtermischungen und ihre Inhaltsstoffe..... | 45 |
| Tab. 19. Die DFA III- und Mischratration-Futtermischungen und ihre Rohstoffe..... | 46 |
| Tab. 20. DFA III- und Mischratration-Futtermischungen und ihre Inhaltsstoffe | 46 |
| Tab. 21. Tierzahlen und Konzentrationen der Substanzen im MAT | 51 |
| Tab. 22. Rohstoffe der MAT | 51 |
| Tab. 24. Festlegung der maximalen Konzentrationen der Wirkstoffe im Wirkungstestfutter | 55 |

IV. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------|--|
| 1,25(OH) ₂ D | 1,25-Dihydroxycholecalciferol D ₃ |
| 1 α -(OH)D | 1 α -Hydroxycholecalciferol D ₃ |
| 25-(OH)D | 25-Hydroxycholecalciferol D ₃ |
| Akt | Serin-/Threonin-Kinase |
| ANOVA | Varianzanalyse |
| ARMS | Amplifikations-Refraktär-Mutations-System |
| ATP(ase) | Adenosintriphosphat(ase) |
| CCK | Cholezystokinin-Pankreozymin |
| cGMP | zyklisches Guanosinmonophosphat |
| c-myc | Proto-Onkogen-Protein |
| CYP | Cytochrom P 450 |
| DFA III | Difruktosedianhydrid |
| DNA | Desoxy-Ribonuklein-Säure |
| dNTP | desoxy-Nukleotid-Tri-Phosphat |
| ECaC | Epithelialer Calcium-Kanal |
| EGF-R | Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor |
| FAS | Fibroblast Associated |
| FGF 23 | Fibroblast Growth Factor 23 |
| GLUT | Glukosetransporter |
| GM-CSF | Granulozyten und Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor |
| HBSS | Hanks Balanced Salt Solution |
| I.E. | Internationale Einheit |
| i.m. | intramuskulär |
| IFN- γ | Interferon- γ |
| IGF | Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor |
| IL | Interleukin |
| IRS | Insulinrezeptorsubstrat |
| LDL | Lipoprotein geringer Dichte |
| MAP | Mitogen-aktiviertes Protein |
| MAT | Milchaustauscherfutter |
| ME | umsetzbare Energie |

| | |
|------------------|---|
| MEPE | extrazelluläres Matrix-Glycoprotein |
| MW | Mittelwert |
| NCX | Natrium/Calcium-Tauscher |
| NF-AT | Nukleärer Faktor aktiverter T-Zellen |
| NF-κB | Nukleärer Faktor κB |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PDK1 | 3-Phosphoinositid-abhängige Protein-Kinase-1 |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-(3,4)-Diphosphat |
| PIP ₃ | Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Triphosphat |
| PMCA | Plasmamembran-Calcium-ATPase |
| PP | Pankreas-Polypeptid |
| Protein rel B | Transkriptionsfaktor rel B |
| PTH | Parathormon |
| PTHRP | Parathormon-verwandtes Peptid |
| PVDR 1 | Pseudo-Vitamin-D-Mangel-Rachitis Typ I |
| RANKL | Rezeptor Aktivator des NF-κB Liganden |
| RPMI 1640 | Roosevelt Park Memorial Institute 1640 Medium |
| RXR | Retinoid-X-Rezeptor |
| SEM | Standardfehler des Mittelwertes |
| SGS | Statische Glukose Stimulation |
| Th1 | CD4 T-Helfer-Zellen Typ 1 |
| Th2 | CD4 T-Helfer-Zellen Typ 2 |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor-α |
| TRP | Transient Receptor Potential channel |
| U/min | Umdrehung pro Minute |
| uS | ursprüngliche Substanz |
| VDR | Vitamin-D-Rezeptor |
| VDRE | Vitamin-D-responsives Element |
| VIP | Vasoaktives, Intestinales Polypeptid |
| VUW | Veterinärmedizinische Universität Wien |

1 Einleitung

Eine Reihe von klinischen und tierexperimentellen Daten deutet darauf hin, dass eine Assoziation zwischen Vitamin D und Insulinsekretion bzw. Diabetes-Inzidenz besteht (NORMAN et al., 1980; BOURLON et al., 1999; HYPPONEN et al., 2001). Ziel dieses Projektes ist es nun, anhand eines Schweinemodells, das aufgrund eines genetischen Defekts in der Vitamin-D-Synthese beeinträchtigt ist, die Zusammenhänge zwischen Vitamin-Hormon-System und Insulinsynthese und –sekretion aufzuklären. Die weitere Erforschung der molekularen Rolle des Vitamin-D-Hormonsystems für die Insulinsekretion könnte zu wichtigen neuen Impulsen für Prophylaxe und Therapie des Diabetes mellitus führen.

Das Schwein ist für die Diabetesforschung von großem Interesse, da es ein sehr gutes Modell für die menschliche Physiologie und Pathophysiologie des Kohlenhydratstoffwechsels darstellt. Von speziellem Interesse dabei sind die vergleichbaren Organsysteme wie zum Beispiel der Gastrointestinaltrakt (HUGE et al., 1995, DIXON et al., 1999; MILLER und ULLREY, 1987; BENTOUIMOU et al., 1997; SWINDLE und SMITH, 1998), die Pankreasmorphologie und Pankreasentwicklung (JAY et al., 1999; MURAKAMI et al., 1997; STEFAN et al., 1983) sowie die Blutchemie (CHAPMAN und GOLDSTEIN, 1976; BRECHBÜHLER et al., 1984; ELLEGAARD et al., 1995; JOERGENSEN et al., 1998, LARSEN et al., 2001). Diese Eigenschaften machen das Schwein zu einem wichtigen Versuchstier für die Erforschung von abnormalen Stoffwechselvorgängen bei Diabetes mellitus (MILLER und ULLREY, 1987; BARTH et al., 1990).

Bisherige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an einem Mausmodell mit inaktiviertem Vitamin-D-Rezeptor (VDR) haben in diesem Zusammenhang klar gezeigt, dass es eine molekulare Funktion des Vitamin-D-Hormons im endokrinen Pankreas gibt (ERBEN et al., 2002). Die Inaktivierung des VDR geht mit einer ca. 60%igen Reduktion der maximalen Insulinsekretion und mit einer eingeschränkten oralen und subkutanen Glukosetoleranz gegenüber Wildtyp-Tieren einher. Diese Veränderungen sind unabhängig von Veränderungen der Calciumhomöostase oder des Körbergewichts. VDR-Mutanten haben aber normale Inselmorphologie, Inselzahl

und –größe sowie auch normale Insel-Neogenese im Pankreas (ZEITZ et al., 2003). Durch seinen Defekt in der $1\alpha,25\text{-}(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese ist das PVDR 1-Schwein ein besonders geeignetes Modell um, die Rolle des Vitamin-D-Hormonsystems für die pankreatische Insulinsekretion zu untersuchen. In Analogie zum VDR-Knockout-Mausmodell zeigen auch die Vitamin-D-defizienten Schweine eine deutlich reduzierte Insulinsekretion nach oraler Glukosebelastung (HARMEYER et al, 1985).

Ein weiterer Vorteil gegenüber VDR-Knockout-Mäusen ist die erhaltene Rezeptivität von PVDR 1-Schweinen gegenüber Vitamin-D-Metaboliten, was für *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen ausgenutzt werden kann.

Ein wesentlicher Teil dieser Dissertation bestand darin, Methoden zur diätetischen Normalisierung des Mineralstoffwechsels bei PVDR 1-Schweinen zu etablieren, da dies in Analogie zum VDR-Knockout-Mausmodell zu einer erheblichen Verbesserung der Aussagekraft dieses Tiermodells führen würde. Da die Einstellung des Calciumhaushaltes bei Mäusen mit defektem Vitamin D-System mit Hilfe der so genannten „rescue diet“ sehr gut funktioniert (LI et al., 1998), gingen wir davon aus, dass dieser Effekt auch beim Schwein mit einer der „rescue diet“ ähnlichen Diät erreicht werden kann. Im VDR-Knockoutmodell wird Lactose zur Verbesserung des parazellulären Calcium-Transports und damit zur Normalisierung des Calciumhaushaltes dem Futter zugesetzt. Auf diese Weise ist es möglich, die Calcium-Plasmawerte vollständig zu korrigieren. In weiteren Versuchen an Ratten wurden auch andere Substanzen entdeckt, die sich positiv auf den parazellulären Calciumtransport auswirken (KNUUTTILA et al., 1989; BROMMAGE et al, 1993; SUZUKI et al., 1998; HARA et al., 2000). Diese anderen Substanzen sollen nun beim Schwein getestet werden, da bekannt ist, dass sich mit Lactose beim Schwein kein vergleichbarer Effekt (SCHLUMBOHM und HARMEYER, 2004) wie beim Mausmodell (ZEITZ et al., 2003) erzielen lässt.

Eine Korrektur der Hypocalcämie bei PVDR 1-Schweinen ist wichtig für die geplanten *in vivo*-Versuche zur Insulinsekretion, da seit langem bekannt ist, dass eine Hypocalcämie per se die Insulinsekretion hemmt (MILNER und HALES, 1967).

2 Literaturübersicht

2.1 Vitamin-D-Hormonsystem

2.1.1 Synthese und Aktivierung von Vitamin D

Vitamin D kann einerseits direkt mit der Nahrung aufgenommen oder andererseits aus einer UV-Licht-abhängigen Reaktion in der Haut gewonnen werden. Die UV-Strahlung induziert in der Haut eine photolytische Konversion von 7-Dehydrocholesterol zu Provitamin D₃, welches durch thermische Isomerisation zu Vitamin D₃ umgewandelt wird (HOLICK et al., 1977; OKANO et al., 1977).

Der erste Schritt zur metabolischen Aktivierung von Vitamin D₃ ist die Hydroxylierung des Kohlenstoffs 25 des Vitamin D zum 25-Hydroxycholecalciferol (25(OH)D), die hauptsächlich in der Leber stattfindet. Mehrere Mitglieder der Cytochrom P450-Enzymsuperfamilie (CYP) sind in der Lage, diese Hydroxylierung des Vitamin D-Metaboliten an der Position 25 zu katalysieren. Die Cytochrom P-Familie ist groß und umfasst derzeit mindestens 74 Mitglieder. Es wird angenommen, dass in einer Säuger-Spezies zwischen 60 und 200 unterschiedliche Mitglieder exprimiert werden. Diese P450-Proteine sind in ihrer Aminosäure-Sequenz mindestens zu 40% homolog innerhalb einer Familie und zeigen gewöhnlich mehr als 55% Übereinstimmung innerhalb einer Subfamilie. Die Cystein-beinhaltende Region, die mit der Häm-bindenden Domäne des P450-Proteins verbunden ist, ist in allen eukaryotischen Spezies hochkonserviert (SHINKI et al., 1997).

Das mikrosomale Enzym CYP2R1 katalysiert die Hydroxylierung des Kohlenstoffs Nr. 25, sowohl von Vitamin D₂ (Ergocalciferol) als auch von Vitamin D₃ (CHENG et al., 2003). Bei Menschen, die an niedrigen 25(OH)D-Werten und an Rachitis litten, konnte eine Mutation im 2R1-Gen nachgewiesen werden (CHENG et al., 2004). Es sind fünf weitere CYP-Enzyme bekannt, die diese Reaktion katalysieren können. Sie unterscheiden sich in ihrem Spezies-abhängigen Vorkommen und in ihren katalytischen Möglichkeiten (OHYAMA und YAMASAKI, 2004). Im Schwein zum Beispiel spielt die mikrosomale 25-Hydroxylase CYP2D25 für die 25-Hydroxylierung eine Rolle (HOSSEINPOUR et al., 2003; POSTLIND und WIKVALL, 1988; AXEN et al., 1992). Dieser Teilschritt in der Aktivierung des Vitamin D ist nur schwach reguliert. Da der Gehalt an 25(OH)D im Plasma direkt proportional zur Menge an

aufgenommenem Vitamin D ist, wird dieser Wert gewöhnlich herangezogen um den Vitamin D Status zu überprüfen (HOLICK, 1981).

Der zweite Schritt in der Vitamin D-Bioaktivierung, ist die Bildung von 1- α ,25-Dihydroxycholecalciferol (1,25(OH)₂D). Diese Hydroxylierung findet hauptsächlich in der Niere statt (FRASER und KODICEK, 1970). Aber auch andere Organsysteme können unter gewissen Bedingungen, wie zum Beispiel während der Schwangerschaft, bei chronischem Nierenversagen, Tuberkulose oder Gelenkrheumatismus, die im Organismus zirkulierende Menge an 1,25(OH)₂D erhöhen. Ausserdem dient 1,25(OH)₂D auch als autokriner oder parakriner Faktor für zellspezifische Funktionen, wie zum Beispiel Zellproliferation und Zelldifferenzierung (DUSSO et al., 2005).

25(OH)D wird ebenfalls durch ein Mitglied der Cytochrom P450-Enzym-Familie hydroxyliert, dem CYP27B1. Es handelt sich dabei um ein Hämprotein mit einer Molekülmasse von rund 52 kDa, das an der Mitochondrienmembran verankert ist. Molekularer Sauerstoff wird von diesem Protein während der katalytischen Reaktion gespalten, wobei ein Atom der Hydroxylierung zugeführt und das andere zu Wasser reduziert wird. CYP27B1, ein zu der Klasse der Mischfunktions-Oxidasen gezähltes Enzym, metabolisiert keine adrenalen oder Geschlechtssteroide, da diese keine 25-Hydroxy-Secosteroid-Konfiguration aufweisen. Isolation und Charakterisierung dieser 1 α -Hydroxylase, wurde lange Zeit als fundamentaler Schritt in Richtung Verständnis der Zellexpression und der Funktion des 1,25(OH)₂D gesehen. Früher wurde angenommen, dass die 1 α -Hydroxylierung von 25(OH)D hauptsächlich durch das Enzym CYP27A1 katalysiert wird und CYP27B1 nur eine untergeordnete Rolle in dieser Synthese spielt (OMDAHL et al., 2003). Doch Knock-Out-Studien bewiesen das Gegenteil (DARDENNE et al., 2001; PANDA et al., 2001). Die Hydroxylierung des 1 α -Kohlenstoffs durch das Enzym CYP27B1 zum 1,25(OH)₂D ist der letzte Schritt zur biologisch aktiven Form des Vitamin D, welcher strenger Regulation unterliegt.

2.1.2 Funktion und Wirkung

Entfaltung der 1,25(OH)₂D-Wirkung über genomische Aktivierung

1- α ,25-Dihydroxycholecalciferol (1,25(OH)₂D) ist der aktivste Metabolit im Vitamin-D-Hormonsystem. Die meisten biologischen Funktionen werden über einen Rezeptor, der als liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor wirkt, ausgelöst. Dieser Vitamin D-Rezeptor (VDR), gehört zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren. Im Zellkern bindet 1,25(OH)₂D an den VDR, was zu einer Konformationsänderung des Rezeptors führt und so die Voraussetzung zu dessen Heterodimerisierung mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) schafft. Dieses Heterodimer ist nun in der Lage, an spezifische DNA-Sequenzen, genannt Vitamin D-responsive Elemente (VDRE), in der Promotor-Region verschiedener Zielgene zu binden und sich so an deren Regulation zu beteiligen. An diese aktive Form des VDR lagern sich zusätzlich Koaktivator-Proteine an, die unterschiedliche regulatorische Wirkungen besitzen (YAMADA et al., 2003). Zielgene, deren Expression auf diese Weise induziert wird, sind beispielsweise Osteocalcin, Osteopontin, der Rezeptor Aktivator des NF- κ B Liganden (RANKL) und Carboanhydrase II. All diese Proteine sind in die extrazellulären Knochenmatrixbildung und in Knochenumbildungs-Prozessen eingebunden. Auch die Gene für das Zell-Adhäsions-Molekül- β 3-Integrin, den Tumor Supressor p21, das Calbindin-9k, das IGF-Bindungsprotein-3 und die 24-Hydroxylase (CYP24) tragen ein VDRE in ihrer Promotor-Region und zeigen eine Vitamin D-abhängige Steigerung ihrer Expression. Bindet das Heterodimer an negative VDRE, kommt es zu einer verminderten Expression der Zielgene (DONG et al., 2003; LIU et al., 1996). Betroffen von dieser Art der Regulation sind die Gene von PTH, PTHrP und des Proteins rel B (Komponente des nukleären Faktor- κ B).

Der VDR als Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor kann auch als Inhibitor die Expression mancher Gene steuern, indem er die Aktionen der Transkriptions-Faktoren NF-AT und NF- κ B antagonisiert (ALROY et al., 1995; TAKEUCHI et al., 1998; HARANT et al., 1997). Diese Antagonisierung wirkt sich auf jene Gene aus, deren Produkte hyperproliferierende (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, c-myc, Keratin-16) oder inflammatorische (IL-2, IL-12, TNF- α , IFN- γ , GM-CSF, Granulozyten und Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor) Wirkung besitzen (NAGPAL et al., 2005).

Entfaltung der 1- α ,25-Vitamin-D-Wirkung über nicht-genomische Aktivierung

Vitamin D-Metabolite sind in der Lage, Effekte in kurzer Zeit auszulösen. Diese Funktionen scheinen über Zelloberflächenrezeptoren induziert zu werden. Die Zeitspanne ist zu kurz um eine Änderung des Genexpressionsstatus anzunehmen. Beispielsweise wurde im Hühner-Duodenum beobachtet, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ den vesikulären Calcium-Transport innerhalb von Minuten stimuliert (NEMERE et al., 1984). Für diese Art der $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -medierten, intestinalen Calcium-Aufnahme wurde der Begriff „Transcaltachia“ geprägt (NEMERE und NORMAN, 1990). Ob dieser Effekt jedoch eine physiologische Rolle spielt ist bis dato noch nicht geklärt. Auch werden schnell stimulierende Wirkungen auf die Cytosolkonzentration von Calcium, den cGMP Spiegel und die Aktivität von Kinassen (Proteinkinase C und MAP Kinase) dem $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ zugeschrieben (DUSSO et al., 2005).

In Chondrozyten wurde gezeigt, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ und 24,25-Dihydroxycholecalciferol auf nicht-genomische Weise den Membran-Fettstoffwechsel, die Prostaglandin-Synthese und die Proteasen-Aktivität beeinflussen. Das führt zu einer Modifikation der Knochenmatrix und der Kalzifizierung (BOYAN et al., 1994).

Wie und wann welche(r) Rezeptor(en) für diese Funktionen verantwortlich ist (sind), wird nach wie vor diskutiert. Einige Studien legen nahe, dass für manche nicht-genomischen Wirkungen des $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ der Vitamin D Rezeptor trotzdem notwendig ist. Andererseits, könnte die nicht-genomische Stimulierung von Proteinkinasen, einen großen Einfluss auf die VDR-Wirkung haben (DUSSO et al., 2005).

Die Funktion und Wirkung des Vitamin-Hormon-Systems an den Zielorganen

Verdauungstrakt

Die Stimulierung der Calcium- und Phosphorresorption gehört zu einer der Hauptaufgaben des Vitamin D (ERBEN, 2005). Die aktive Calciumresorption findet hauptsächlich im oberen Dünndarm (Duodenum und proximales Jejunum) statt. Mit Hilfe von VDR-Knockout-Modellen konnte die molekulare Wirkung des Vitamin D in den drei Schritten des transzellulären Calciumtransports (siehe Punkt 2.2.4.1.) gezeigt werden. Der erste Schritt beinhaltet den luminalen Calciumeinstrom, wobei $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ die Bildung von Calciumkanälen stimuliert (ECaC1 und ECaC2) (VAN ABEL et al., 2003). Der intrazelluläre Transport des Calciums ist der zweite Schritt,

der über die Erhöhung der Proteinkonzentrationen von Calbindin-D9k (Säugetiere) und Calbindin-D28k (Vögel) durch Vitamin D verbessert wird. Abschließend folgt die Ausschleusung des Calciums aus der Zelle, über Vitamin D-abhängig exprimierte Plasma-Membran-Calcium-ATPase (PMCA_{1b}) (Bouillon et al., 2003).

Knochen

Vitamin D hat eine essentielle Funktion in der Entwicklung und im Erhalt des Skeletts. Vitamin D-Mangel führt bei adulten Tieren zu Osteomalazie und bei juvenilen und im Wachstum befindlichen Tieren zu Rachitis. 1,25(OH)₂D induziert die Knochenentwicklung einerseits über die Bereitstellung von Calcium und Phosphat und andererseits durch die Stimulierung der Produktion von Knochenmatrix-Proteinen (BROWN et al., 1999).

Für die Untersuchung, in wie weit intakte VDR und/oder funktionsfähiges 1,25(OH)₂D für die Knochenbildung/Umbildung benötigt werden, oder ob schon physiologische Calcium-Serum-Gehalte völlig ausreichend sind, boten sich Knockout Tiermodelle an. Die Resultate von Studien mit VDR-Knockout- und 1 α -Hydroxylase-Knockout-Mäuse legen nahe, dass Calciumionen und die Komponenten des VDR/1,25(OH)₂D-Systems verschiedene Effekte auf die Mineral- und Knochenstoffwechsel ausüben, wobei diese Komponenten sowohl abhängig als auch unabhängig voneinander agieren (PANDA et al., 2004).

Niere

Ein wesentlicher Effekt von 1,25(OH)₂D in der Niere besteht darin, seine eigene Homöostase streng zu kontrollieren. Das geschieht zum einen durch die gleichzeitige Suppression von CYP27B1 und Stimulation von CYP24 und zum andern durch seine potentielle Fähigkeit die Megalin-Expression in den proximalen Nierentubuli zu erhöhen. Megalin, ein membran-gebundenes 550-kD, Ca²⁺-bindendes Glycoprotein gehört zur Familie der LDL (Lipoproteine niedriger Dichte) Rezeptoren und wurde als Calcium-messendes Molekül identifiziert (LIU et al., 1998). Die Arbeitsgruppe WILLNOW nimmt an, dass Megalin eine essentielle Rolle in der renalen Aufnahme von 25(OH)D und dessen Konversion zu 1,25(OH)₂D spielt (LEHESTE et al., 2003). Die Beteiligung des 1,25(OH)₂D in der renalen Steuerung des Calcium- und Phosphatstoffwechsels wird wegen der gleichzeitigen Wirkung auf den Parathormon-(PTH)-Wert im Serum und der intestinalen Ca/P-Absorption kontrovers diskutiert. 1,25(OH)₂D erhöht die renale Reabsorption von Calcium und die Calbindin-

Expression und beschleunigt den PTH-abhängigen Calcium-Transport in den distalen Nierentubuli, welche konstitutiv hohe Expressionsraten des VDR aufweisen. Dieser Transport ist der hauptbestimmende Faktor für die Exkretion von Calcium über den Urin. Der positive Effekt von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ auf die renale Phosphatabsorption dürfte keine direkte Wirkung des Vitamin-D-Hormons auf die Niere sein.

Nebenschilddrüse

Das Vitamin D endokrine-System ist ein starker Modulator für die Funktionen der Nebenschilddrüse. Während Vitamin D Mangel Hyperplasie der Nebenschilddrüse und gesteigerte PTH-Synthese hervorruft, bewirkt die Applikation von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ eine Inhibition des Zellwachstums der Nebenschilddrüse und eine Senkung der PTH-Produktion. Somit ist eine effektive Behandlung eines sekundären Hyperparathyroidismus, ausgelöst durch eine chronische Nierenerkrankung, mittels $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -Substitution möglich (DUSSO et al., 2004). Zusätzlich zur direkten Regulation des PTH-Gens über den $1,25(\text{OH})_2\text{D}/\text{VDR}$ -Komplex, steuert $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ den Gehalt an VDR in der Nebenschilddrüse und das Ansprechverhalten der Drüse auf Calcium. Die durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ induzierte Erhöhung der Anzahl an VDR wird einerseits über höhere mRNA-Spiegel und möglicherweise sekundär durch gesteigerte Serum-Calciumkonzentration vermittelt (BROWN et al., 1995). Auch der Schutz vor proteosomaler VDR-Degradation über Ligand-abhängige Protektion wird genannt (DUSSO et al., 2005).

2.1.3 Regulationsmechanismen

Die renale Aktivität der 1α -Hydroxylase (CYP27B1) ist streng kontrolliert, um in Einklang mit der starken Wirkung seines Produkts ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) die Calcium-Homöostase zu regulieren. In diesem Kontrollprozess spielen das Parathormon, der Calcium- und Phosphatgehalt im Serum und der aktive Vitamin D-Metabolit selbst eine große Rolle. PTH steigert die Aktivität der 1α -Hydroxylase CYP27B1, indem es einen positiv regulativen Effekt auf die Transkription dieses Enzyms ausübt. Die Stimulation der 1α -Hydroxylase durch Hypocalcämie kann durch Entfernung der Schilddrüse stark reduziert, jedoch nicht völlig eliminiert werden (GARABEDIAN et al., 1972). Das Enzym CYP27B1 wird entweder direkt über den Serum-Calciumgehalt, oder indirekt über den veränderten PTH-Spiegel reguliert (OMDAHL et al., 1972). Der direkte Einfluss der Calciumkonzentration sowohl auf die Aktivität

der CYP27B1, als auch auf deren Expression wurde in einer humanen proximalen Nierentubuli-Zelllinie nachgewiesen (BLAND et al., 1998).

Auch die unzureichende Aufnahme von Phosphor kann CYP27B1 aktivieren und zwar unabhängig von PTH- und Calciumgehalten im Serum. Der Mangel an einem direkten Effekt von Phosphat in Zellkulturen auf die CYP27B1-Aktivität lässt auf einen anderen Mechanismus schließen. Es wird vermutet, dass unter anderem Phosphatine, der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23 (FGF 23) und das extrazelluläre Matrix-Glykoprotein (MEPE) eine Rolle spielen.

Die hohe Effizienz von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, die Serumkonzentration von Calcium und Phosphat zu steigern, erfordert regulatorische Gegenspieler. Diese negative Rückkopplung wird von einem weiteren Cytochrom-P450-Enzym, der 1,25-Dihydroxyvitamin-D-24-Hydroxylase (CYP24), bewerkstellt. Über eine Serie von Oxidations-Prozessen an den Kohlenstoffen 23 und 24 des $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, kommt es zur Abspaltung von Seitenketten und in der Folge zur Inaktivierung des aktiven Metaboliten. In allen Zielzellen wird das $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ auf diese Weise verstoffwechselt. Die CYP24 und CYP27B1 werden gegenläufig reguliert. Die Aktivität und Expression von CYP24 wird durch hohe Phosphatkonzentrationen gesteigert und unter PTH-Einfluss reduziert (DUSSO et al., 2005; TANAKA et al., 1973).

2.2 Calcium

2.2.1 Biologische Funktionen

Der menschliche Organismus enthält 1,2 kg Calcium (29 Mol), wovon 98% in fester Form als Hydroxylapatit, vorliegen. Die Gesamtcalciumkonzentration im Plasma beim Menschen beträgt 2,5 mmol/l, davon sind 40% an Proteine gebunden (Forth et al., 2001). Bei Haussäugetieren liegt der Anteil an ionisiertem Calcium im Plasma bei 40 – 50 Prozent. Die Gesamtcalciumkonzentration schwankt unter physiologischen Bedingungen je nach Spezies, Lebensalter und Reproduktionsstadium in einem Bereich von 2,25 mmol/l bis 2,99 mmol/l und beträgt beim adulten Schwein im Blutplasma 2,5 ($\pm 0,25$) mmol/l und beim Ferkel 2,74 ($\pm 0,37$) mmol/l (KOLB, 1989a).

Als universeller sekundärer Transmitter erfüllt Calcium in seiner ionisierten Form unzählige Aufgaben in den verschiedensten Zellen des Organismus. Regulatorische Einflüsse auf Abläufe des Zellzyklus gehören ebenso zu diesen Aufgaben (TOMBES und BORISY, 1989), wie die Aktivierung und Steuerung von Ionenpumpen und

Enzymen (NOWICKY und THOMAS, 2002). Ionisiertes Calcium ist nicht nur in der Lage, Neurotransmitter präsynaptisch freizusetzen (HEIDELBERGER et al., 1994), sondern auch die Fusionierung intrazellulärer Kompartimente zu ermöglichen (BECKERS und BALCH, 1989). An der Regulation der Herz- und Skelettmuskulatur (BERRIDGE, 2003; VAN BREEMEN und SAIDA, 1989), sowie in der Blutgerinnung (JACKSON und NEMERSON, 1980) ist Ca^{2+} ebenfalls wesentlich beteiligt. Zu den weiteren Aufgaben zählen die Kontrolle der Sekretion vieler Drüsen (MUALLEM, 1989) und der intestinale Elektrolyttransport (DONOWITZ und WELSH, 1986). Als Stabilisator von Zellmembranen wirkt Ca^{2+} durch die Beeinflussung von Natriumkanälen. Ist die extrazelluläre Calciumkonzentration hoch, sinkt die Erregbarkeit von Nerven- und Muskelzellen. Bei hypocalämischen Zuständen hingegen steigt die Erregbarkeit dieser Zellen deutlich an (FORTH et al., 2001).

2.2.2 Systemische Regulation

Da ionisiertes Calcium viele Funktionen hat ist eine strenge Regulation der Calciumgehalts im Blut von immenser Bedeutung. Bei der Regulierung des extrazellulären Ca^{2+} -Spiegels spielt das Vitamin D-Hormonsystem und seine Zielorgane Darm, Niere, Nebenschilddrüse und Knochenskelett einen wichtige Rolle (siehe Punkt 2.1.2.). In vergleichsweise geringem Umfang ist das Calcitonin (Peptidhormon) an der Steuerung der Calciumhomöostase beteiligt (HOFF et al., 2002). Im Gegensatz dazu, nimmt das in der Glandula Parathyroidea (Nebenschilddrüse) gebildete und dort in Sekretgranula deponierte Peptidhormon PTH eine zentrale Stellung bei der systemischen Regulation des Calciumhaushaltes ein. Bei Hypocalämie wird über Calcium-empfindliche Rezeptoren (CaR), die Freisetzung des aus 84 Aminosäuren bestehenden Hormons innerhalb von Sekunden induziert (BROWN und McLEOD, 2001). Stimulierende Wirkung auf die PTH Expression haben nicht nur niedrige Calcium- und Phosphatspiegel im Plasma, sondern auch Östrogene. Am knöchernen Skelett, das auch als Calciumspeicher dient, bewirkt PTH einhergehend mit einer Demineralisierung, eine Freisetzung von Calcium. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass intermittierende Gaben des Hormons auf das Knochenskelett eine anabole Wirkung aufweisen, wobei noch nicht geklärt ist, welche Mechanismen diesem Prozess zugrunde liegen (RAMASAMY, 2006). Die tubuläre Rückresorption von Calcium in der Niere wird ebenfalls dem PTH zugeschrieben (GREGER et al., 1978). Allerdings konnte hier die Beteiligung von Proteinkinase A- und Proteinkinase C-abhängigen Prozessen nachgewiesen werden

(FRIEDMAN et al., 1996). Ob das PTH eine direkte Wirkung auf den Darm besitzt ist noch unbekannt, aber der Nachweis von PTH-Rezeptoren im Duodenum der Ratte wurde bereits erbracht (GENTILI et al., 2003).

2.2.3 Zelluläre Regulation

Auch intrazellulär ist eine strenge Regulation des Ca^{2+} -Gehalts von essentieller Bedeutung um seine Funktion als „second messenger“ zu ermöglichen. Bei der Ca^{2+} -abhängigen Signalübermittlung kommt es zu einer bis zu 100-fachen Konzentrationserhöhung der freien Calciumionen in der Zelle, im Vergleich zur Normalkonzentration im Ruhezustand von circa 100 nmol/l. Diese rasche intrazelluläre Konzentrationsänderung des ionisierten Calciums stellt ein funktionelles Signal dar (BROWN, 1991; NEMERE und NORMAN, 1991). Um das Ruheniveau in der Zelle und somit den elektrochemischen Gradienten zu erhalten, muss die freie Ca^{2+} -Konzentration minimiert werden, wobei zwei Möglichkeit zur Verfügung stehen; einerseits die Ausschleusung (siehe Punkt 2.2.4.1.) oder andererseits die Bindung der Calciumionen. Die Speicherung des Ca^{2+} kann zum Beispiel in Zellorganellen wie dem endoplasmatischem Retikulum erfolgen. Aber auch die Bindung an Proteine gewährleistet eine Inaktivierung der Calciumionen (CARAFOLI, 1987). Calmodulin, ein Calcium-bindendes Protein, agiert beispielsweise als zentrales regulatorisches Element in den von Calcium medierten Prozessen in der Zelle (O'DAY, 2003). Eine besonders große Pufferkapazität für Calcium-Ionen benötigen Zellen die an der Calciumabsorption im Intestinaltrakt beteiligt sind. Hierbei spielen zwei Vitamin D-abhängige Proteine (siehe Punkt 2.1.2.) eine große Rolle, die für den ungefährlichen Transport des ionisierten Calciums durch die Zelle sorgen. Das Calbindin D9k (Molekülmasse von 9 kDa) wurde aus Säugetier-Enterozyten (KALLFELZ, 1967) und das Calbindin D28k (Molekülmasse von 28 kDa) aus Vogel-Enterozyten (WASSERMAN und TAYLOR, 1966) isoliert.

2.2.4 Die intestinale Calciumaufnahme

Die Calciumabsorption erfolgt über Epithelien des Darmtraktes, der Niere, der Placenta, der Milchdrüse und der Kiemen bei Fischen. Die bedeutensten Arten des Ca^{2+} -Transportes über Epithelien sind einerseits die parazelluläre Route und andererseits die transzelluläre Route (HOENDEROP et al., 2005; BELKACEMI et al., 2005).

2.2.4.1 Der transzelluläre Calciumtransport

Den aktiven, Vitamin D-abhängigen, sättigbaren transzellulären Calciumtransport (siehe Abb. 3), kann man in drei Schritte untergliedern (BRONNER et al., 1986).

- Calcium-Einstrom in die Zelle
- Intrazelluläre Transport des Calciums
- Ausschleusung des Calciums aus der Zelle

Der Calcium-Einstrom in die Zelle

Der Einstrom von Calciumionen über die apikale Membran ist relativ einfach möglich, da das Zellinnere gegenüber dem Extrazellulärraum negativ geladen ist. Die Potentialdifferenz beträgt ca. 50 mV. Ausserdem beträgt die Konzentration von freien Calciumionen in der Zelle nur 0,1 bis 1 $\mu\text{mol/l}$, wodurch dieser elektrochemische Gradient den Influx erleichtert (FULLMER, 1992). Die für den Einstrom verantwortlichen epithelialen Calciumkanäle (ECaC1 und ECaC2) gehören zu einer schnell wachsenden Genfamilie, die derzeit über 20 Gene umfasst. Das erste Mitglied dieser Familie der transienten-Rezeptor-Potentialkanälen (TRP) wurde in einer *Drosophila*-Mutante entdeckt, die Abnormalitäten in der Phototransduktion des Sehorgans aufwies. Mittlerweile werden die TRP in drei Subklassen mit jeweils mehr als sechs Genen gegliedert. Sie sind involviert in die verschiedensten Funktionen, so wie der Übertragung von Reizen wie Schmerz (TRPV1), Hitze (TRPV2) und Kälte (TRPM8). TRPV5 (ECaC1, CaT2) und TRPV6 (ECaC2, CaT1), die zwei epithelialen Calcium-Kanäle gehören zur TRP-V (Vanilloid)-Subfamilie, die sich wegen ihrer hohen Calcium-Selektivität von den vergleichbaren anderen Mitgliedern abheben (BOUILLON et al., 2003).

Die Säugetier-TRP-V Familie umfasst, unterteilt in Bezug auf der Basisstruktur und die Funktion, vier Untergruppen. Alle diese Kanäle besitzen sechs Transmembrandomänen und 3-5 NH₂-terminale, repetitive Ankyrin Motive (Abb.1) (PEDERSEN et al., 2005). Die Funktion der Calciumkanäle wird durch niedrige extrazelluläre pH-Werte, sowie hohen intrazellulären Calcium-Spiegel inhibiert. Bei physiologischen Membranpotentialen sind sie grundlegend geöffnet. Ein spezieller

Mechanismus zum Öffnen dieser Kanäle ist bislang nicht bekannt (VENNEKENS et al. 2000; HOENDEROP et al. 2000).

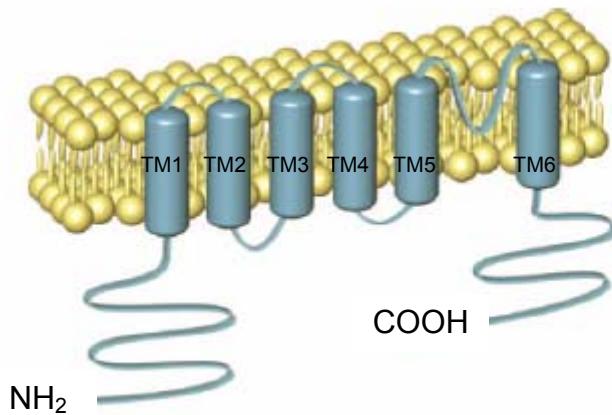


Abb. 1. Der strukturelle Aufbau der epithelialen Ca^{2+} -Kanäle TRPV5 und TRPV6. Die Zellmembran (gelb) wird durch 6 Transmembransegmente (TM) durchbrochen. Zwischen TM5 und TM6 befindet sich ein hydrophober Abschnitt von dem angenommen wird, dass es sich dabei um den Poren-bildenden Teil der Kanäle handelt. Weiters sind die langen NH_2 - und COOH -Enden des Proteins Zytosol-seitig erkennbar (nach HOENDEROP et al., 2005).

Der intrazelluläre Transport des Calciums

Die hauptverantwortlichen Proteine Calbindin-D9k und Calbindin-D28k für den Transport des Calciums durch die Zelle wurden bereits im Punkt 2.2.3. angesprochen. Im Säuger ist das Calbindin-D9k im Darm und Calbindin-D28k in der Niere am höchsten exprimiert, wobei beim Vogel Calbindin-D28k sowohl im Darm als auch in der Niere nachgewiesen wurde. Speziesunterschiede in der Verteilung der Calbindine kommen, wie zum Beispiel bei der Maus, wo Calbindin-D9k in der Niere ebenfalls von Bedeutung ist, vor. Diese cytosolischen Proteine sollen dem ionisierten Calcium als Transportvehikel dienen und so die Diffusion zwischen der apikalen und basolateralen Zelloberfläche erleichtern (HOENDEROP et al., 2005). Trotz keiner nennenswerten Sequenzhomologien erfüllen, abgesehen von der unterschiedlichen Transportkapazität von vier Ionen Calcium (Calbindin-D28K) und zwei Ionen Calcium (Calbindin-D9K) pro Molekül, beide Proteine die gleiche Funktion (JOHNSON und KUMAR, 1994). Durch die Bindung der Calciumionen kann die Konzentration des freien Ca^{2+} in der Zelle niedrig gehalten werden und die Funktion des Calciums als sekundärer Transmitter wird nicht gestört (KOSTER et al., 1995). Ein anderer Ansatz,

der die Bewegung des Calciums zur basolateralen Zellmembran erklären soll, ist das Vesikel-Modell. Dabei werden die in Zelle transportierten Calciumionen mit Hilfe von Lysosomen sequestriert und die entstehenden Vesikel über das Zytoskelett transportiert (LARSSON und NEMERE, 2002). Obwohl bekannt ist, dass die Calbindine ebenfalls mit diesen Lysosomen assoziiert sind, ist ihre Rolle in diesem Modell noch nicht geklärt.

Die Ausschleusung des Calciums aus der Zelle

Ca^{2+} muss gegen einen beträchtlichen elektrochemischen Gradienten aus der Zelle transportiert werden. Dazu stehen zwei Calcium-Transporter an der basolateralen Zellmembran von Absorptionszellen zur Verfügung. Einerseits werden die Calciumionen über einen Ionen-Austausch-Mechanismus (NCX, Na/Ca-Tauscher) und andererseits über Calcium-ATPasen (PMCA) aus der Zelle befördert. Bis dato sind drei NCX in Säugetieren identifiziert worden, wobei NCX2 und NCX3 nur in Muskel und Gehirn exprimiert werden. Vier Gene codieren für die verschiedenen Isoformen PMCA1-4 der Calcium-ATPasen, deren Varianz zusätzlich durch alternatives Splicen erhöht wird. Im Dünndarm wird der größte Teil des Calciums über die PMCA1b aktiv aus den Enterozyten transportiert (HOENDEROP et al., 2005). Im Gegensatz dazu wurde in Nieren-Zellkulturen beobachtet, dass rund zwei Drittel des Calciums über NCX1 und das restliche Drittel über PMCA1b und PMCA4b herausgeschleust wird (KIP und STREHLER, 2003).

Der aktive Ca^{2+} -Transport in der postnatalen Lebensphase ist, wie in zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen an unterschiedlichen Spezies gezeigt wurde, ein $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -unabhängiger Prozess. Versuche mit PVDR 1-Ferkeln (siehe Punkt 2.5.2) ergaben, dass trotz verringelter $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -Plasmagehalte, die Ferkel *post partum* normocalcämisch waren und bis zur vierten Lebenswoche vergleichbare intestinale Calciumabsorptionsraten wie gesunde Kontrolltiere aufwiesen (LACHENMAIER-CURRLE und HARMEYER, 1988). Es wird angenommen, dass 1 - 14 Tage alte Ferkel Ca^{2+} mit Unterstützung eines aktiven Prozesses absorbieren. In wie weit $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ eine Rolle bei diesem Mechanismus spielt, konnte aber nicht geklärt werden (RADDE et al., 1980). Durch Ca^{2+} -Fluxratenmessungen mit Dünndarmepithelien von PVDR 1-Ferkeln konnten Transportmechanismen für Calcium gezeigt werden, die unabhängig von Calcitriolspiegeln funktionieren. Da

diese Mechanismen ihre Wirkung im Absetzalter verlieren und das Vitamin D-System wegen $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -Mangels nicht einsatzfähig ist, stagniert die aktive Ca^{2+} -Absorption bei diesen Schweinen (Schröder et al., 1993).

Die Abbildung 2 zeigt zusammenfassend in den Punkten 2.2.4.1. und 2.2.4.2. besprochenen transzellulären sowie den parazellulären epithelialen Calciumtransport.

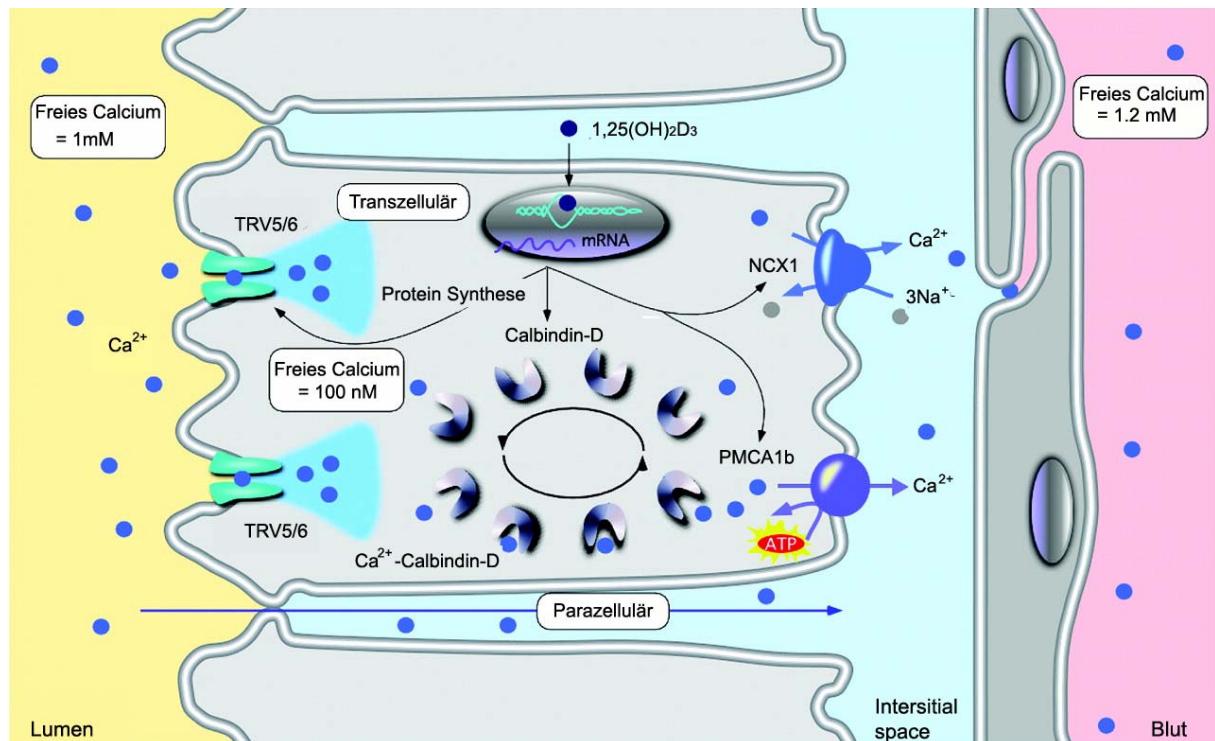


Abb. 2. Epithelialer Ca^{2+} -Transport. Der aktive Vitamin-D-abhängige Transport findet in der Zelle (grau) statt. Die Möglichkeiten des $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ über genomische Wirkung die Calciumaufnahme zu stimulieren sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Der parazelluläre Ca^{2+} -Transport ist durch den blauen Pfeil dargestellt. Damit Calciumionen über diese Route in den Interzellularraum (Interstitial space) vordringen können, müssen sie die Barriere der Tight junctions, die Engstelle zwischen Lumen (gelb) und Interzellulärraum (blau) überwinden (nach HOENDEROP et al., 2005).

2.2.4.2 Der parazelluläre Calciumtransport

Der passive, parazelluläre Calciumtransport stützt sich auf einen energieunabhängigen, nicht-sättigbaren Mechanismus. Dieser Prozess kann, sowohl im distalen Dünndarm (BRONNER, 1992; NELLANS, 1990) als auch, je nach

Calciumkonzentration des Chymus, auch im gesamten Dünndarm (PANSU et al., 1983a) stattfinden. Bei Diäten mit hohem Calciumanteil wird der Anteil des parazellulären Transports gegenüber dem aktiven, sättigbaren Transport, auf bis zu fünfzig Prozent geschätzt (NELLANS, 1988; NELLANS, 1990). Die Calciumkonzentration des Futters, der Darmabschnitt, die entsprechende transmurale Potentialdifferenz und die Aufenthaltsdauer des Chymus sind die Parameter, die diesen Prozentsatz bestimmen. Am Dünndarmepithel von Ratten wurde die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ auf den parazellulären Transport von Ca^{2+} und den Marker Mannitol getestet. Das Ergebnis zeigte einen gleichzeitigen Anstieg der bi-direkionalen Fluxraten, sowohl von Calciumionen, als auch von Mannitol. Die Zunahme der Transportraten wurde dem Calcitriol, über eine mögliche Modulation der Tight junctions, zugeschrieben (KARBACH, 1992). Neugeborene Ratten nehmen bis zum dritten Lebenstag Calcium fast nur über die parazelluläre Route auf. Anschließend verschiebt sich das Verhältnis der beteiligten Transportmöglichkeiten zu Gunsten des aktiven Vitamin D-abhängigen Transports. Der Anstieg des aktiven Transportmechanismus, geht mit einer Konzentrationserhöhung des Vitamin D-abhängigen Calbindin-D9k im Duodenum einher. Bis zum 35. Tag *post partum* nimmt der Anteil des parazellulären Transports ab und bleibt ab diesem Zeitpunkt konstant (PANSU et al., 1983b). Diese Daten legen den Schluss nahe, dass Calcium bis zum dritten Lebenstag Vitamin D-unabhängig absorbiert wird.

Alle Nahrungs- oder Futterbestandteile, die die Löslichkeit des Calciums erhöhen und erhalten, sollten die passive Diffusion stimulieren. Einige Milchproteine, insbesondere die von Casein abgeleiteten Phosphopeptide und Aminosäuren (L-Lysin und L-Arginin), bilden lösliche Chelatkomplexe, die leichter absorbiert werden können (LEE et al., 1983; MYKKÄNEN und WASSERMAN, 1980). Lactose und andere Kohlenhydrate, die langsam absorbiert werden, haben auch einen positiven Effekt auf die Resorption von Calciumionen. Der dafür verantwortliche Mechanismus gibt aber noch Anlass zur Diskussion. Es wird generell angenommen, dass Lactose, zumindest in hohen Dosen, die passive Absorption von Calcium in der Abwesenheit von Vitamin D erhöht. Einhergehend mit dieser Steigerung nimmt die Konzentration des intestinalen Calciumbindungsproteins und der Anteil des aktiven Calciumtransports ab (GUÉGUEN und POINTILLART, 2000; PANSU et al., 1979). Die Senkung des pH-Wertes im Chymus durch mikrobielle Prozesse wurde als Ursache genannt (BERGEIM, 1926). Aber auch in der Anwesenheit von Antibiotika

(Neomycin) konnte ein positiver Einfluss von Lactose nachgewiesen werden (WASSERMAN und LENGEMANN, 1960). Die Theorie, dass auch Lactose in der Lage ist, mit Calcium einen hoch resorbierbaren Komplex zu bilden (CHARLEY und SALTMAN, 1963), konnte nicht bewiesen werden (PANSU et al., 1979). Alle Moleküle, die die Osmolarität des Chymus im Ileum erhöhen, stimulieren wahrscheinlich die passive Diffusion des Calciums (PANSU et al., 1979). Andererseits scheinen manche Aminosäuren im Interzellulärspalt durch Kontraktion des Zytoskeletts ihre Wirkung zu entfalten (BRONNER, 1992).

Mit Xylitol angereicherte Futtermittel erhöhen die Calciumabsorption im Darm von Ratten. Es wurde vermutet, dass dieser Effekt von einer Komplexbildung des Polyols mit Calcium verursacht wird (HÄMÄLÄINEN et al., 1985). Bei Xylitol handelt es sich um einen Polyalkohol, der aus fünf Kohlenstoffatomen aufgebaut ist und in den meisten Früchten, Beeren und Pflanzen vorkommt. Er dient auch als Energiequelle für intravenöse Ernährung, weil Xylitol auch in jenen Geweben verstoffwechselt werden kann, in denen eine erhebliche Insulinresistenz die effektive Utilisation von Glukose verhindert (MATTILA et al., 1998). Studien belegen, dass Xylitol einen positiven Einfluss hinsichtlich Calcium- und Phosphorgehalt auf die Knochensubstanz von Ratten hat (KNUUTTILA et al., 1989). Zusätzlich trägt diese Supplementierung zur Förderung der Kalzifizierung von Calcium-defizienten Knochen (HÄMÄLÄINEN et al., 1990) und zu einer Verminderung der Knochenresorption bei (SVANBERG und KNUUTTILA, 1994a). Diese Ergebnisse ließen auch auf eine Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften schließen, die auch experimentell bestätigt werden konnte (MATTILA et al., 1998). Zusätzlich zeigten SVANBERG und KNUUTTILA, dass ovariektomierte Ratten mit Hilfe von Xylitol vor Knochenmineralverlust geschützt werden konnten (SVANBERG und KNUUTTILA, 1994b).

Die parazelluläre Passage von gelösten Stoffen, wird über Tight Junctions reguliert, die an der luminalen Seite benachbarter Epithelzellen lokalisiert sind (MITIC et al., 2000). Tight Junctions werden ihrerseits über intrazelluläre Signaltransduktion gesteuert (KARCZEWSKI und GROOT, 2000). Es wurde berichtet, dass die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch die Phosphorylierung der regulatorischen leichten Ketten von Myosin zu einer Öffnung der Tight Junctions führt. Diese Öffnung resultiert aus der Kondensation von Aktin-Mikrofilamenten, ausgelöst durch das Calmodulin-regulierte Protein MLCK (Myosin-light-chain-kinase)

(LINDMARK et al., 1998; MA et al., 2000), dessen Aktivierung seinerseits über die Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung erfolgt (VETTER und LECLERC, 2003). Außerdem konnte beobachtet werden, dass die von Maltitol (reduzierte Maltose, ein Zuckeralkohol) stimulierte Calcium-Absorption durch einen Calmodulin-Antagonisten aufgehoben wurde (KISHI et al., 1996). Diese Resultate lassen die Hypothese zu, dass die von unverdaubaren Sacchariden erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen für die Erhöhung der parazellulären Calciumabsorption verantwortlich sind. Andere Substanzen fördern die parazelluläre Permeabilität ebenfalls durch Signaltransduktion wie zum Beispiel Lysophosphatidyl-Cholin (SAWAI et al., 2002) und Natriumcaprinat (TOMITA et al., 1996). Studien haben gezeigt, dass die orale Aufnahme von unverdaubaren Sacchariden die Calciumabsorption in Ratten (SUZUKI et al., 1998; HARA et al., 2000) und in humanen Freiwilligen (VAN DEN HEUVEL et al., 1999) erhöhten. Ein favorisierter Mechanismus, der diesem Effekt zugrunde liegen könnte ist, die Lösung der Calciumsalze durch Säuren, die durch mikrobielle Fermentation der Saccharide im Dickdarm entstehen (SUZUKI et al., 1998; VAN DEN HEUVEL et al., 1999; HARA et al., 2000; YOUNES et al., 1996).

Kontrovers dazu wurde allerdings gezeigt, dass der Dünndarm durch unverdaubare Saccharide über andere potentielle Mechanismen zur vermehrten Calciumabsorption stimuliert werden kann. Und zwar über die parazelluläre Route, durch die direkte Anregung des Dünndarmepithels durch intakte Saccharide (MINEO et al., 2001; 2002a). In *in vitro*-Studien mit isoliertem intestinalem Epithel von Ratten wurde Difruktosedianhydrid III, IV (DFA III, IV, beides Disaccharide), Frukto-Oligosaccharide und Maltitol getestet. Das Ergebnis zeigte, dass alle Substanzen die parazelluläre Aufnahme des Calciums verstärkten (MINEO et al., 2001; 2002b). Der zelluläre Mechanismus jedoch, wie Saccharide die parazelluläre Permeabilität erhöhten, konnte nicht geklärt werden. In weiterer Folge wurden an isolierten Rattenenterozyten aus dem Jejunum getestet, ob diese Substanzen sie in der Lage sind die intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen zu beeinflussen. Die Behandlung mit Glycerol und dem Vehikel ergab, dass im Gegensatz zu den anderen überprüften Substanzen, keine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zu beobachten war. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass nicht nur die mechanische und osmotische Stimulation der unverdaubaren Saccharide der einzige Effekt ist, sondern möglicherweise auch die Strukturerkennung der Enterozyten und die

anschließende Ca-Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen. Das Profil der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration variierte nämlich zwischen den verschiedenen Sacchariden. Die Resultate deuten auch an, dass eher die Struktur und nicht die Größe des Moleküls den entscheidenden Anteil an der Induktion der Signaltransduktion inne hat (SUZUKI und HARA, 2004).

Lactulose, ein synthetisches Disaccharid, ist nicht im Dünndarm aber im Dickdarm durch Mikroorganismen aufschließbar. Es existieren einige Studien, die die positive Wirkung von Lactulose auf die Absorption von Calcium belegen. In einem Fütterungsversuch mit männlichen Ratten im Alter von 5 bis 38 Wochen, wurde mit Hilfe von Isotopenverhältnissen auf die intestinale Calcium-Absorption geschlossen. Dabei wurde festgestellt, dass Lactulose im Vergleich zur Lactose die Calciumaufnahme stärker stimuliert. Die einzelnen Zuckerkomponenten von Lactulose, Galaktose und Fruktose, beeinflussten die intestinale Ca-Aufnahme nicht. Die Entfernung des Zäkums störte diesen Effekt nicht, woraus geschlossen wurde, dass Lactulose seine Wirkung wahrscheinlich im Dünndarm entfaltet (BROMMAGE et al., 1993). Fütterungsversuche mit Hunden bestätigten die Ergebnisse dieser Versuche (BEYNE et al., 2001).

Durch solche Tiermodelle ermutigt, wurde der Einfluss von Lactulose auf die Calciumaufnahme von Frauen nach den Wechseljahren getestet. Die perorale Aufnahme von 10 g Lactulose pro Tag, neun Tage lang, erhöhte die Calcium-Absorption signifikant (VAN HEUVEL et al., 1999).

2.3 Das Pankreas

2.3.1 Anatomie und Histologie

Anatomische Verhältnisse beim Schwein

Das mittlere Organgewicht der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) beim adulten Schwein mit über hundert Kilogramm Körpergewicht beträgt 110-150 g, wobei der Ernährungszustand einen stärkeren Einfluss als das Körpergewicht zu haben scheint.

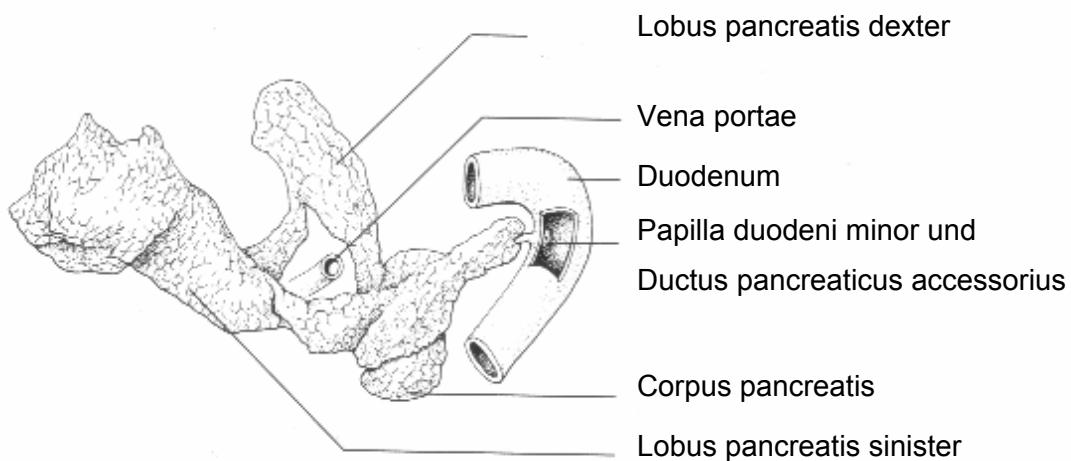


Abb. 3. Das Pankreas des Schweins (König et al, 1999)

Der Pankreaskörper (*Corpus pancreatis*) verbindet den kleineren rechten Lappen (*Lobus pancreatis dexter*) mit dem größeren linken Lappen (*Lobus pancreatis sinister*). Die zur Leber ziehende Pfortader, wird vom sogenannten *Anulus pancreatis*, umschlossen. Dieser besteht aus einer gabelförmigen Überbrückung, die den rechten mit dem linken Lappen des Organs verbindet und zusätzlich mit dem Pankreaskörper in Kontakt steht (siehe Abb. 3). Der linke Lappen entspringt aus dem der kleinen Kurvatur des Magen anliegenden Korpus und verläuft zwischen dem dorsokaudalen Rand der Milz und dem kranialen Nierenpol der linken Niere bis zur linken Bauchwand. Der rechte Lappen erstreckt sich vom Korpus im *Ligamentum hepatoduodenale* bzw. *Mesoduodenum* entlang der *Pars cranialis* und der *Pars descendens duodeni* zum kranialen Nierenpol der rechten Niere. Im Duodenumgekröse reicht das gabelförmige Verbindungsstück bis zur *Flexura duodeni caudalis* und wird ventral vom *Processus caudatus* der Leber begrenzt.

Von den beiden angelegten Ausführungsgängen des exokrinen Pankreas, bleibt im Laufe der Entwicklung nur der dorsale erhalten. Dieser *Ductus pancreaticus accessorius* mündet, vom rechten Lappen entspringend, in der *Papilla duodeni minor* der *Pars descendens duodeni* in den Dünndarm ein (VOLLMERHAUS und ROOS, 1999).

Das Pankreas lässt sich in zwei Komponenten unterteilen, die unterschiedliche Funktionen ausführen. Einerseits der exokrine (*Pars exocrina pancreatis*) und andererseits der endokrine Anteil (*Pars endocrina pancreatis*, Inselapparat). In seinem Aufbau ähnelt der exokrine Teil der Bauchspeicheldrüse der Struktur der Ohrspeicheldrüse (*Glandula parotis*) und stellt eine tubulo-azinöse, zusammengesetzte seröse Drüse dar. Die Einzelzellen, die die traubenförmigen Endstücke (*Azini*) bilden, besitzen alle Eigenschaften (wie beispielsweise ein ausgeprägtes rauhes endoplasmatisches Retikulum) die notwendig sind um Proteine zu sezernieren. Im Golgi-Apparat werden auszuschleusende Proteine wie unter anderem Trypsinogen und Chymotrypsinogen mit einer Transportmembran versehen und in Granula, auch Zymogengranula genannt, in der Zelle gespeichert (BÖCK und LIEBIG, 2004). Die exozytierten Zymogengranula werden über das Schaltstück (*Ductus intercalatus*) in die intralobulären Ausführungsgänge (*Ductus intralobulares*) befördert. Die *Ductus intralobulares* münden ihrerseits in die größeren *Ductus interlobulares*, deren Inhalt über höchstens zwei Pankreasgänge (*Ductus pancreatici*) in das Lumen des Duodenum abgegeben wird (MOISMANN und KOHLER, 1990). Erst im Dünndarm werden alle enzymatisch wirksamen Substanzen durch Sekrete der Darmschleimhaut aktiviert. Die Anzahl der Zymogengranula in den Acinuszellen ist vom Ernährungsstatus abhängig. Die Kontrolle über Zusammensetzung und Freisetzung des Pankreasaffes, erfolgt über die Hormone Gastrin, Sekretin und Cholezystokinin unter Mitwirkung des *Nervus Vagus*.

Die Langerhans-Inseln oder Pankreasinseln (*Insulae pancreaticae*) stellen den kleinen endokrinen Anteil (1-2% des Volumens) des Pankreas dar. Diese abgegrenzten Zellgruppen sind unterschiedlich groß (0,02 - 0,4 mm) und liegen haufenförmig im exokrinen Pankreas verteilt vor. Die endokrinen Zellen sind um fenestrierte Kapillaren angeordnet. In diesem Bereich sind auch markfreie Axonenden nachweisbar. Pankreas-Inseln setzen sich aus unterschiedlichen Zelltypen zusammen, die durch einfache Hämatoxylin-Eosin-Färbung nicht von einander unterscheidbar sind.

A (α)-Zellen besitzen argyrophile (mit Silber anfärbbar) elektronenmikroskopisch dichte Granula, die mit Glukagon gefüllt sind. Die Anzahl der α -Zellen sinkt beim Schwein *post partum* schnell von 50% auf 20% ab.

B (β)-Zellen bilden mit 60-80% der Inselzellen den größten Anteil. Die im Elektronenmikroskop ersichtliche kristalline Innenstruktur der Granula, die mit dem Peptidhormon Insulin gefüllt sind, ist charakteristisch für diesen Zelltyp.

Noch nicht geklärt ist die Funktion der C-Zellen. Sie enthalten keine lichtmikroskopisch nachweisbare Granula und es wird diskutiert ob es sich um undifferenzierte Stammzellen handelt. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass mit diesen Zellen inaktive A- und B-Zellen vorliegen.

Die Somatostatin-produzierenden D (δ)-Zellen, kommen beispielsweise beim Hund auf einen Anteil von fünf Prozent der Inselzellen. Ihre Granula stellen sich elektronenmikroskopisch klein (150-300 nm) und nicht sehr dicht dar.

Pankreas-Polypeptid (PP), vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP) und Cholezystokinin-Pankreozym (CCK) sind Produkte der sehr kleinen Gruppe von Inselzellen, den F-Zellen (PP-Zellen) (BÖCK und LIEBIG, 2004).

2.3.2 Entwicklung

Die Bauchspeicheldrüse entsteht aus zwei verschiedenen Anlagen, aus dem dorsalen und dem ventralen Anteil (JOHANSSON und GRAPIN-BOTTON, 2002; ALUMETS, 1983). In der Ratte, mit einer Tragezeit von 21 Tagen, entsteht der dorsale Pankreas am 11. Embryonaltag aus dem Duodenum, wobei der ventrale Teil aus dem Endoderm des hepatischen Divertikulums am Embryonaltag 12 gebildet wird. Diese Teile fusionieren später am 13. Embryonaltag. Das Drüsengewebe des Pankreas entsteht aus der Bildung und Zurückbildung von Zell-Schnüren dieser primordialen Masse. Die Endstücke der Schnüre nehmen immer mehr die charakteristische Form von pankreatischen Acini an. Ab dem 15. Embryonaltag sind Inseln identifizierbar. Einzelne endokrine Zellen, die zuerst von Duktus-Zellen nicht zu unterscheiden sind, entfernen sich von diesen, bevor sie sich zu Inseln vereinigen. Es wird vermutet, dass Adhesions-Molekülen an der Migration und Verschmelzung beteiligt sind (JOHANSSON und GRAPIN-BOTTON, 2002).

Beim Schwein mit einer Tragzeit von rund 120 Tagen werden die dorsale und die ventrale Pankreasanlage zwischen dem 20. und 29. Embryonaltag gebildet. Die Entwicklung der Bauchspeicheldrüse schreitet beim Schwein viel langsamer voran als bei der Ratte. Zellen, die eine mäßige Immunreaktivität für Insulin aufweisen,

können ab der vierten Woche Trächtigkeit nachgewiesen werden. Ab der 10. Woche Gravidität erscheinen Insulin-anfärbbare Zellen im duodenalen Anteil des Pankreas, die aus der ventralen Keimanlage entstammen. Am Anfang der dreizehnten Woche der Tragezeit sind für Insulin stark immunreaktive Zellen über das ganze Parenchym verteilt. Jedoch nicht vor dem zehnten bis dreizehnten Tag nach der Geburt setzen sich die Zellhaufen zu Inseln zusammen (ALUMETS, 1983; HAMMERMAN, 2006).

2.3.3 Insulin und Insulinsekretion

Insulin, ein Peptidhormon, ist aus zwei Aminosäurenketten, der A-Kette und B-Kette zusammengesetzt. Die Verbindung der Ketten erfolgt mittels zwei Disulfidbrücken. Es wird angenommen, dass das Monomer die aktive Form des Hormons darstellt. Es bilden sich auch Dimere und Hexamere, die mit Zinkionen komplexieren. Es existieren einige Spezies-bedingte Unterschiede in der Aminosäuren-Komposition des Insulins, die jedoch klein sind. Zum Beispiel unterscheiden sich Rinder, Schafe, Pferde, Hunde und Wale nur auf den Positionen 8,9 und 10 der A-Kette. Daraus resultiert, dass die biologischen Aktivitäten von Insulin nicht sehr Spezies-spezifisch sind.

Die Synthese des Hormons, ähnlich der Produktion anderer Peptidhormone, beginnt im rauen endoplasmatischen Retikulum der β -Zellen. Vom Präproinsulin wird ein Peptidfragment abgespalten, um Proinsulin zu bilden. Die Ringform erhält das Proinsulin durch die Verbindung der Peptidenden durch Disulfidbrücken. Es folgt der Transport des Proteins in den Golgi-Apparat, in dessen Vesikel durch einen proteolytischen Prozess das C-Peptid abgespalten wird. Das nun entstandene Insulin wird in Granula gespeichert.

Die Metabolisierung des Insulins erfolgt hauptsächlich in Leber und Niere. Enzyme reduzieren die verbindenden Disulfidbrücken und die so frei vorliegenden Ketten A und B werden für Proteasen zugänglich. Die Halbwertszeit des Peptidhormons liegt bei rund 10 Minuten (CUNNINGHAM, 2002; KOLB, 1989b).

Die Insulinsekretion der β -Zellen wird über den Blutweg, den parakrinen Weg sowie durch adrenerge, cholinerge und peptiderge Nervenfasern beeinflusst. Die Regulation unter physiologischen Bedingungen, erfolgt hauptsächlich über Glukose und andere Nährstoffe. Dabei stellt die Aufnahme von Glukose über die Glukosetransporterisoform 2 (GLUT2) in die β -Zelle, den ersten Schritt dar. Durch den glykolytischen Abbau wird die ATP-Konzentration erhöht, was zu einer Veränderung des ATP-ADP-Quotienten führt. Aus der Schließung der Kalium-ATP-

Kanäle, resultiert eine Depolarisation der Zelle. Dadurch wird ein Ca^{2+} -Influx induziert, der in Kombination mit erhöhten Transportraten von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen und der intrazellulären Entleerung von Calciumspeichern die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle stark erhöht. Dadurch werden unter anderem Proteinkinase A, Proteinkinase C und Calcium-Calmodulin-Kinase phosphoryliert. Daraufhin kommt es zu einer Translokation Insulin-gefüllter Granula in Richtung Plasmamembran, wo das Peptidhormon schließlich mittels Exozytose freigesetzt wird (MÜLLER-WIELAND und HÄRING, 2004).

2.3.4 Wirkungsweisen des Insulins

Insulin entfaltet seine Wirkung an der Zielzelle über einen Rezeptor, der aus zwei Untereinheiten (Dimer) zusammengesetzt ist. Diese zwei Untereinheiten bestehen aus jeweils einer α - und einer β -Kette. Die α -Untereinheit befindet sich extrazellulär, während es sich bei der β -Untereinheit um ein Transmembranprotein handelt, dessen größter Anteil im Zellinneren zu liegen kommt. Bindet nun Insulin an die zwei α -Ketten, tritt es dabei, zwei verschiedene Oberflächen präsentierend, mit den beiden identen α -Ketten in Kontakt und es kommt es zu einer Annäherung der Ketten, wodurch die Signaltransduktion ausgelöst wird. Die β -Untereinheit des Insulinrezeptors beinhaltet eine Proteinkinasedomäne. Bei der Insulinrezeptorkinase handelt es sich um eine Tyrosinkinase, die in der Lage, ist den Transfer eines Phosphatrests von ATP auf die Hydroxylgruppe eines Tyrosinrests zu katalysieren. Über Insulinrezeptorsubstrate (IRS) wird nun dieses Signal an eine Lipidkinase, die Phosphoinositid-3-kinase, weitergeleitet, die Phosphatidylinositol-(3,4)-Diphosphat (PIP_2) zu Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Triphosphat (PIP_3) umwandelt. Im Zuge dieser Signaltransduktionskette werden daraufhin die Proteinkinasen PDK1 und Akt aktiviert. Akt ist nun in der Lage Zellbestandteile zu phosphorylieren, die für die Regulation der Bewegung des Glukosetransporters (GLUT4) an die Zelloberfläche von großer Bedeutung sind. Dieser Transporter wird somit über Insulin gesteuert und sorgt für den essentiellen Eintritt von Glukose in vielen Zelltypen.

GLUT4 gehört einer Proteininfamilie an, deren Mitglieder folgende Charakteristika aufweisen: Eine 500 Aminosäuren lange Polypeptidkette mit 12 Transmembranhelices. GLUT1 und GLUT3 sind für die Grundversorgung mit Glukose fast aller Säugetierzellen zuständig, GLUT2 dient, da er nur bei hohem Glukosespiegel das Kohlenhydrat in die Zelle transportiert, als Messinstrument des Pankreas. So ist das Organ in der Lage, die Insulinsekretion den jeweiligen

Verhältnissen anzupassen. GLUT2 wird auch in der Leber exprimiert, wo es die Funktion innehat, nur in Zeiten von hohen Glukosekonzentrationen im Blut den raschen Einstrom von Glukose in die Hepatozyten zu gewährleisten. GLUT5 vervollständigt diese Familie als hauptsächlicher Fruktosetransporter (BERG et al, 2007).

Es ist bekannt, dass viele Gene durch Insulin in ihrer Transkription beeinflusst werden. Bis jetzt konnten aber keine *cis*-Elemente bzw. *trans*-Faktoren gefunden werden, die für die Weiterleitung des Insulinstimulus auf einen Promotor verantwortlich sind. Daraus wurde geschlussfolgert, dass Insulin über Modulation bestehender Transkriptionseinrichtungen (Faktoren oder Komplexe) die Expression verschiedener Gene verändert. Somit ist die Wirkung von Insulin in unterschiedlichen Zellen, vom Angebot der vorliegenden Transkriptionsfaktoren abhängig. So gesehen könnte ein genetischer Defekt im Signaltransduktionsabschnitt der Genregulation, mit einer modulierten Expression verschiedener Gene verbunden sein. Eine Verbindung zwischen dem Insulinrezeptor und der Aktivierung von genregulatorischen Prozessen stellt zum Beispiel die MAP-Kinase-Kaskade dar (MÜLLER-WIELAND und HÄRING, 2004).

2.4 Einfluss des Vitamin-D-Hormonsystem und der Calcium-Homöostase auf die endokrine Pankreasfunktion

Es ist derzeit nicht klar, ob die Assoziation zwischen Vitamin D-Hormonsystem und Diabetes auf einer direkten Modulation der β -Zellfunktion oder einer indirekten immunmodulatorischen Wirkung beruht.

2.4.1 Wirkung des Vitamin-D-Hormonsystems über die Modulation des Immunsystems auf die endokrine Pankreasfunktion

Seitdem gezeigt wurde, dass in vielen Immunzellen VDR exprimiert wird, insbesondere in den Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen sowie in aktivierten T-Lymphozyten, wird angenommen, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ eine modulatorische Wirkung auf das Immunsystem ausübt. Daher wurden in den letzten Jahren große Bemühungen unternommen diese potentielle Funktion des $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ aufzuklären.

Zytokine, die von Antigen-präsentierenden Zellen für die Rekrutierung und Aktivierung von T-Zellen sezerniert werden, könnten direkt von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$

beeinflusst werden. So beschreiben einige Autoren eine Inhibition von IL-12 durch 1,25(OH)₂D und seiner Analoga. Dieses Zytokin ist ein regulatorischer Faktor des Immunsystems, das wahrscheinlich einerseits die Entwicklung der CD4 T-Helfer-Zellen Typ 1 (Th1-Zellen) stimuliert und andererseits die Reifung von CD4 T-Helfer-Zellen Typ 2 (Th2-Zellen) inhibiert (MATHIEU et al., 2005).

Arbeiten weisen darauf hin, dass die Reduktion von Th1-Zellen und die gleichzeitige Erhöhung der Anzahl an Th2-Zellen durch 1,25(OH)₂D eine kontrollierte Immunantwort ermöglichen (BOONSTRA et al., 2001; CANTORNA et al., 1998). Die Wirkung von Th2-Zellen wird in der Literatur kontrovers beschrieben. Einige Arbeitsgruppen sehen in der Sekretion von IL-4 und IL-10 von Th2-Zellen, eine Inhibition der Th1-Funktion und somit eine Schutzwirkung gegen die Zerstörung der β -Zellen (RAPOPORT et al., 1993, PENNLINE et al., 1994). Im Gegensatz dazu, scheinen andere Studien zu zeigen, dass Th2-Zellen die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen und B-Zellen stimulieren und so die Nekrose von β -Zellen unterstützen (ALMAWI et al., 1999). Den Zytokinen IL-2 und INF- γ , die charakteristisch für Th1-Zell-medierte Antworten sind, werden die Initiation und das Andauern der autoimmunen Entzündungsreaktion zugeschrieben (CANTORNA und MAHON, 2004).

Die Wirkung von 1,25(OH)₂D beschränkt sich möglicherweise nicht auf die Autoimmunreaktion allein. *In vitro*-Experimente zeigen eine hemmende Wirkung von 1,25(OH)₂D auf den CD95(FAS)-Rezeptor, über dessen Aktivierung beim Diabetes mellitus Typ 1 die meisten β -Zellen in Apoptose gehen (RIACHY et al., 2006).

Ausserdem wurde gezeigt, dass die Verabreichung von Vitamin D in den ersten Lebensjahren das Risiko an Diabetes mellitus Typ 1 zu erkranken mindert (STENE und JONER, 2003; HYPPONEN et al., 2001).

Der Verdacht, dass der Vitamin D-Status einen großen Einfluss auf die Entstehung von einigen Autoimmunkrankheiten hat, verdichtet sich immer mehr. Daten deuten auf eine Verbindung von Vitamin D und Diabetes mellitus Typ 1, Multiple Sklerose, Inflammatory bowel diseases und Gelenksrheumatismus. Das Faktum, dass Vitamin D mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht wird, lässt darauf schließen, dass Vitamin D als Umweltfaktor an der Kontrolle der Autoimmuntoleranz teilnimmt (CANTORNA und MAHON, 2004).

2.4.2 Wirkung des Vitamin-D-Hormonsystems und der Calciumhomöostase auf die Insulinsekretion

Wirkung des Vitamin-D-Hormonsystems auf die Insulinsekretion

Die Expression des VDR (JOHNSON et al., 1994) und der 1 α -Hydroxylase in der β -Zelle (BLAND et al., 2004) lassen auf einen Einfluss des Vitamin D auf den endokrinen Pankreas schließen. VDR-Knockout-Mäuse zeigen eine um 60% reduzierte maximale Insulinsekretion. Die Einschränkung der Glukosetoleranz nach subkutaner und oraler Glukosebelastung wurde ebenfalls beobachtet (ZEITZ et al., 2003). Die Anwesenheit eines VDRE im humanen Insulin-Rezeptor-Gen-Promoter zeigt, einen möglichen Einfluss des Vitamin-D-Hormonsystem auf die Insulinssynthese (MAESTRO et al., 2003). Die transkriptionale Aktivierung des humanen Insulin-Rezeptor-Gens durch 1,25(OH)₂D konnte von der Arbeitsgruppe CALLE 2002 gezeigt werden (MAESTRO et al., 2002). Die Bedeutung der Vitamin D Versorgung auf die endokrinen Pankreasfunktion der Ratte sowohl *in vitro* (BOURLON et al., 1999; NORMA et al., 1980; KADOWAKI und NORMAN; 1984; TANAKA et al., 1984) als auch *in vivo* (CADE und NORMAN, 1986; CHERTOW et al., 1983) wurde in zahlreichen Studien beschrieben. Auch die Wiederherstellung der physiologischen Insulinsekretion durch Gabe von Vitamin D gilt als Hinweis für die positiven Effekte des 1,25(OH)₂D auf die endokrine Wirkung des Pankreas (BOURLON et al., 1999; NORMA et al., 1980; TANAKA et al., 1984; CADE und NORMAN, 1986; CLARK et al, 1981).

Wirkung des Calciums auf die Insulinsekretion

Bereits 1967 wurde erkannt, dass Veränderungen des Calciumflusses einen negativen Effekt auf den Calcium-abhängigen Prozess der Insulinsekretion haben können (MILNER und HALES, 1967). Untersuchungen haben gezeigt, dass Diabetiker mit Hypocalcämie eine verminderte Insulinausschüttung aufweisen (YASUDA et al., 1975; GEDIK und ZILELI, 1977). Eine andere Studie belegte, dass die Glucose-induzierte Insulinfreisetzung mit oralen Calcium-Applikationen gesteigert werden kann (FUJITA et al., 1978). Bei Patienten, die gegen 1,25(OH)₂D resistent waren, entwickelten sich erst während hypocalcämischer Zustände abnormale Insulinsekretionswerte (HOCHBERG et al., 1985). Wie wichtig Calcium für die richtige Funktion der β -Zelle ist, zeigt auch der Versuch mit Vitamin D-depletierten

Ratten, die durch Sättigung des Calciumhaushaltes normale Glukosetoleranzen und Insulinsekretionen aufwiesen (BEAULIEU et al., 1993)

Das Vitamin-D-Hormonsystem und die Calciumhomöostase sind zwei eng miteinander gekoppelte Systeme. Daher ist es nach wie vor problematisch die individuellen Effekte der einzelnen Systeme auf die β -Zellen zu separieren. Es wird aber angenommen, dass die indirekte Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ auf die endokrine Pankreasfunktion über die Regulation der Calciumverteilung im Organismus vermittelt wird.

Die Rolle des Vitamin-D-Hormonsystems für die Aufrechterhaltung des Calciumhaushaltes, sowohl auf systemischer als auch auf zellulärer Ebene, wurde bereits in den Punkten 2.2.2. und 2.2.3. beschrieben. So sorgt Vitamin D für einen physiologischen extrazellulären Calcium-Spiegel, der einen geregelten Calcium-Fluss durch die Zellmembranen gewährleistet und somit für eine adäquate Menge an freien Ca^{2+} -Ionen in der β -Zelle sowie in anderen Körperzellen sorgt (PITTAS et al., 2007). Dass die Regulation des Calciumflusses und des freien Ca^{2+} -Gehalts in der β -Zelle dem Vitamin D-abhängigen, cytosolischen Calbindin D28k obliegen könnte, wurde in einer Studie mit Calbindin D28k-Knockout-Mäusen und β -Zell-Linien gezeigt (SOOY et al., 1999).

Des Weiteren haben Vitamin D und Calcium einen nicht unwesentlichen Einfluss auf das Zielgewebe des Insulins. So stimuliert beispielsweise Vitamin D die Expression von Insulin-Rezeptoren und steigert die Insulinantwort für den Glukosetransport *in vitro* (MAESTRO et al., 2000). Zusätzlich kommt auch dem Calcium eine essentielle Aufgabe für Insulin-vermittelte, intrazelluläre Prozesse zu und zwar in Geweben wie der quergestreiften Muskulatur und dem Fettgewebe (OJUKA, 2004; WRIGHT et al., 2004; WILLIAMS et al., 1990). Ein sehr straffe Regulierung des freien Ca^{2+} -Gehalts wird benötigt, um die optimale Insulin-Antwort zu gewährleisten (DRAZNIN et al., 1987). Steigt oder sinkt dessen Gehalt in primären Insulin-Zielgeweben, kommt es zu einer Modulierung der Insulin-Funktionen (DRAZNIN et al., 1987; SEGAL et al., 1990; ZEMEL, 1998; DRAZNIN et al., 1988; PITTAS et al., 2007).

2.5 Tiermodell Schwein

2.5.1 PVDR 1–Erkrankung beim Menschen

Die Pseudo-Vitamin-D-Mangelrachitis Typ I (PVDR 1) ist eine äußerst seltene, autosomal rezessiv vererbte Erkrankung und äußert sich hauptsächlich durch Rachitis und hypocalcämische Zustände, die von einem sekundären Hyperparathyreoidismus begleitet werden. Ein weiteres Charakteristikum dieser Erkrankung sind niedrige bis undetektierbare $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -Konzentrationen im Serum. Zusätzlich ist der Plasma-Phosphor-Gehalt ebenfalls reduziert und der Spiegel der alkalischen Phosphatase erhöht. Die Funktion der Nieren, sowie des Darms, sind nicht beeinträchtigt.

Von Fraser und Salter 1958 und Jesserer 1961, wurde PVDR-1 als eigenständige Krankheit eingestuft und 1961 von Prader als eindeutig eigenständig bezeichnet (FRASER und SALTER, 1958; JESSERER, 1961; PRADER et al. 1961). Als Ursache dieser Erkrankung wird die Bildung einer defekten 1α -Hydroxylase (CYP27B1) angesehen. Die Therapie der PVDR 1-Erkrankung mit physiologischen Vitamin D-Dosen ist nicht möglich, da dieser Krankheit kein Vitamin D-Mangel zugrunde liegt. Die Symptome können aber, entweder mit einer Verabreichung von 1 bis 1,75 µg 1α -Hydroxycholecalciferol (1α -(OH)D) oder 1 µg 1,25-Dihydroxycholecalciferol beseitigt werden. Ebenfalls ist eine erfolgreiche Bekämpfung der Symptome möglich, indem man mit pharmakologischen Dosen (1,25 bis 2,5 mg/d) von Vitamin D therapiert (SMITH et al. 1999).

2.5.2 PVDR 1–Erkrankung beim Schwein

Zwei Jahre nach der Charakterisierung der PVDR 1-Erkrankung beim Menschen, beschrieb Plonait im Jahr 1963 eine ähnliche vererbbarer Krankheit beim Saugferkel. Nach einigen Jahren der intensiveren Erforschung dieser Erkrankung, entdeckte man mehrere Parallelen mit der menschlichen PVDR 1 (HARMEYER und PLONAIT, 1967). Nahezu alle klinischen Symptome, sowie die Ätiologie, Pathogenese und die biochemischen Kriterien entsprechen der Erkrankung des Menschen. Die mangelnde renale 1α -Hydroxylierung, die im gesunden Individuum durch das Enzym CYP27B1 erfolgt (siehe Punkt 2.1.1), ist charakteristisch für beide Erkrankungen, wie auch *in vitro*-Studien mit Schweine-Nierenhomogenaten bestätigten (WINKLER et al., 1986).

Klinische Symptome kann man bei den meisten PVDR 1-Ferkel im Alter von 3,5 bis 5 Wochen beobachten (HARMEYER, 1982; PLONAIT, 1969). Dennoch sind bereits einige Blutparameter rund 7 Tage vor den ersten klinischen Symptomen verändert. Dazu gehören niedrige Calcium- und Phosphatkonzentrationen im Blut, sowie erhöhte Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase (HARMEYER, 1991). Vermehrte Liegezeiten und passiveres Verhalten, sowie stumpfes Borstenkleid sind die ersten Anzeichen der Erkrankung. Im Gegensatz zu gesunden Ferkeln bleiben sie in der Entwicklung zurück und weisen eine blasses, weiße Hautfarbe auf. Zwei bis fünf Tage später kann man Verkrümmungen der Gliedmaßen und daraus resultierende Gelenksschmerzen und Schreckhaftigkeit beobachten. Die Verkrümmungen bleiben nicht nur auf die Gliedmaßen beschränkt, sondern betreffen auch die Wirbelsäule, Rippen (rachitischer Rosenkranz) und Nasenrücken. Die deformierten Extremitäten, speziell bei schnellwachsenden Rassen, können der Aufgabe den Rumpf zu stützen nicht mehr ausreichend nachkommen. Die Folge ist ein Fortbewegen auf den Karpal- und Tarsalgelenken, wodurch die Futteraufnahme erschwert wird. Frakturen und Kotabsatzprobleme durch Verformungen des Beckens sind ebenfalls Symptome dieser Erkrankung. Die erhöhte Anfälligkeit auf Atemwegsinfekte kann einerseits auf die Problematik eines deformierten Brustkorbs, andererseits auf eine potentielle Immunschwäche zurückgeführt werden (STRODER, 1973). Der Tod tritt ohne Therapie im Alter zwischen drei und fünf Monaten, bei kleineren Rassen (Minipigs) zwischen fünf und sieben Monaten ein (HARMEYER, 1991).

Um diese schwerwiegende, vererbbares Erkrankung besser erforschen zu können, wurde sie mittels künstlicher Besamung auch auf Minipigs übertragen. Auf diese Weise konnte beobachtet werden, dass die schnellwachsenden homozygoten Landrasseferkel, schneller erkrankten als die langsamer wachsenden homozygoten Minipigschweine. Das zeitliche Auftreten der klinischen Symptome variiert sehr stark. Es zeigte sich, dass sogar innerhalb eines Wurfes mehrere Wochen Unterschied auftreten können. Dieses Zeitfenster, kann bei unterschiedlichen Würfen noch größer ausfallen (LACHENMAIER-CURRLE und HARMEYER, 1988).

2.5.3 Tiermodell PVDR 1-Schwein

Als Tiermodell benutzten wir eine Schweinelinie mit einer Mutation im Vitamin-D-Hormonsystem, die am Institut für Physiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover entdeckt und weitergezüchtet wurde. Sie zeichnet sich durch Rachitis mit ihren Kardinalsymptomen Hypocalcämie und sekundärem Hyperparathyreodismus

aus. Wie bereits beschrieben ähnelt die Erkrankung dieser Zuchlinie sehr stark der humanen PVDR 1-Erkrankung (PLONAIT, 1969). Die Ursache dieser Erkrankung beim Schwein konnte von HARABASZ im Jahr 2007 auf eine Splice-Site-Mutation in der Splice-Donor-Site von Intron 6 (IVS6+1G>A) im 1 α -Hydroxylase-Gen zurückgeführt werden. Das Resultat dieser Mutation, ist eine Deletion des Exon 6 in der mRNA. Diese wirkt sich in einem Frameshift und in einem verfrühten Stop-Codon aus. Als Folge kann keine funktionstüchtige 1 α -Hydroxylase (CYP27B1) gebildet werden (HARABASZ, 2007). Orale Glukosetoleranzstudien zeigten eine reduzierte Insulinsekretion bei PVDR 1-Schweinen, wie sie analog bei VDR-Knockout Mäusen beobachtet wurden (HARMEYER et al., 1985; ZEITZ, et al., 2003). Die Glukose-induzierte Insulinsekretion ließ sich mit Hilfe von Calciuminfusionen annähernd auf Normalwerte erhöhen. Im Gegensatz dazu führte dieser Ansatz im Mausmodell nicht zu einer Verbesserung der Insulinsekretion. Andererseits gelang es, die hypocalcämischen PVDR 1-Ferkel mit Applikationen von 1,25(OH)₂D auf glukose-induzierte Insulinsekretionsmengen zu bringen, die über dem Normalwert lagen. Es wurde daraus geschlossen, dass der Calciumhaushalt der β -Zellen möglicherweise direkt von 1,25(OH)₂D beeinflusst wird (HARMEYER et al., 1985). Die Veränderung der intrazellulären Calcium-Signaltranduktionsmechanismen könnte der Schlüssel sein, um den Effekt des Vitamin-D-Hormonsystems auf die Insulinsekretion zu verstehen. Für eine hinreichende Erklärung der Zusammenhänge kann dieses Tiermodell von großem Nutzen sein.

3 Material und Methode

3.1 Tiermaterial

Dank der homozygoten PVDR 1-Schweine, die uns freundlicherweise von Prof. J. Harmeyer, Institut für Tierphysiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover, überlassen wurden, konnten wir eine Versuchsschweinezucht für unsere Belange etablieren. Durch Einkreuzen von Minipigs und Hängebauchschweinen konnte die Körpergröße der Versuchstiere reduziert werden. Die Zucht der heterozygoten Elterngeneration und der homozygoten Tiere für den Wirkungstest mit adulten Schweinen wurde von Dr. Zuzanna Harabasz (HARABASZ, 2007) durchgeführt. Die Tierversuche wurden an der Veterinärmedizinischen Universität Wien (VUW) und deren Forschungseinrichtungen durchgeführt und von der universitären Ethikkommission (Aktenzeichen BMBWK-68.205/0035-BrGt/2006) genehmigt.

Um den Ausbruch der PVDR 1-Erkrankung der homozygoten Schweine zu verhindern, wurden die Tiere nach folgendem Schema intramuskulär (i.m.) mit Vitamin D (Duphafral®; Fort Dodge Veterinaria, Vall De Bianya, Spanien) therapiert:

Tab. 1. Vitamin-D-Behandlungsplan

| Lebensalter der Schweine | einmalige Vitamin D-Gabe pro Schwein |
|--------------------------|--------------------------------------|
| 1. Monat | 150 000 I.E |
| 2. Monat | 200 000 I.E |
| 3. Monat | 250 000 I.E |
| 4,5. Monat | 300 000 I.E |
| 6. Monat | 500 000 I.E |
| 7,5. Monat | 600 000 I.E |
| 9. Monat | 800 000 I.E |
| 10. Monat | 800 000 I.E |

I.E. Internationale Einheiten

Ab dem 10. Lebensmonat wurde die Behandlung mit 800 000 – 1 Mill. I.E. im Abstand von 8 Wochen weitergeführt. Die Dosierung und das Therapie-Intervall müssen auf den Reproduktionsstatus, die Rasse und das Körnergewicht, abgestimmt werden.

Die Verpaarung der Genotypen wurde den jeweiligen Erfordernissen der Versuche angepasst.

- (a) Für die Erzeugung der heterozygoten Elterntiere wurden Wildtyp-Schweine mit homozygoten Tieren für die autosomal, rezessiv vererbbares PVDR 1-Punktmutation verpaart.
- (b) Für den Wirkungstest mit adulten Schweinen wurden homozygote PVDR 1-Schweine mittels Verpaarung von homozygoten Tieren erzeugt.
- (c) Die Verpaarung von heterozygoten Schweinen wurde zur Erzeugung der Versuchstiere für die Toleranzversuche und den Calcium²⁺-Verlaufsversuch mit SGS-Test durchgeführt, um alle möglichen Genotypen zu erhalten.
- (d) Die Erzeugung der Versuchstiere für den Wirkungstest mit Ferkeln erfolgte mittels Verpaarung von heterozygoten und homozygoten Tieren. Dieses Verpaarungsschema sollte eine große Anzahl an homozygoten PVDR 1-Ferkeln pro Wurf gewährleisten.

3.2 Genotypisierung

3.2.1 DNA–Gewinnung

Mit TypiFix Eartags (Nextec GmbH, Leverkusen) wurden einerseits Gewebeproben erhalten und andererseits die dauerhafte Markierung der Tiere erreicht. Mit Hilfe des dazugehörigen DNA-Isolationskits (Nextec GmbH, Leverkusen), konnte aus den Hautstanzen der Ohrmarken nach folgendem Prozedere die DNA gewonnen werden: Die Ohrmarkenstanzen wurden mit einem Lysispuffer in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 60°C und 300 U/min lysiert. Anschließend wurde das Lysat über eine equilibrierte Reinigungs-Säule gereinigt, die DNA eluiert und bei -20°C gelagert.

3.2.2 Amplification Refractory Mutation System PCR

Die Grundlage dieses Verfahrens ist die Erkennung der vorliegenden Punktmutation, die einem Single Nucleotide Polymorphismus (SNP) entspricht. Eine molekulargenetische Methode, um diese Mutation detektieren zu können, ist das Amplifikations-Refraktär-Mutations-System (ARMS-PCR), das von Dr. Zuzanna

Harabasz im Rahmen Ihrer Dissertation für diese Genotypisierung etabliert und umfangreich beschrieben (HARABASZ, 2007) wurde. Das Grundprinzip dieser Genotypisierung liegt in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit zwei verschiedenen Vorwärts-Primern. Der erste Primer (A) soll spezifisch an der Punktmutation (SNP) binden, wobei der andere (G) an der Wildtyp-DNA-Sequenz bindet. Die Reaktion wird durch eine fluoreszenzmarkierte Sonde (TaqMan-Prinzip), die durch die Endonuklease-Aktivität der TaqDNA-Polymerase abverdaut wird, detektierbar gemacht.

Tab. 2. Die Reagenzien und Reaktionsgefäße für den Assay

| |
|---|
| MgCl₂ (Solis Biodyne, Tartu, Estland) |
| 10 x Buffer B (Solis Biodyne, Tartu, Estland) |
| dNTP-Mix (Quiagen, Hilden, Deutschland) |
| Primer (Invitrogen GmbH, Lofer, Österreich) |
| Sonde (Metabion, Martinsried, Deutschland) |
| SmartTaq-Polymerase (Medigen, Nowosibirsk, Russland) |
| klare 0,5 ml-PCR-Reaktionsgefäße (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich) |

Tab. 3. Der Reaktionsansatz für die SNP-PCR

| Stock Lösung | Endkonzentration |
|--------------------------------|------------------|
| Wasser | x |
| 0.1 M MgCl ₂ | 3.5 mM |
| 10 x Puffer B (Solis Biodyne) | 1x |
| dNTP mix (je 2 mM) | 200 µM |
| CYP27B1-A/G-f (10 µm) | 250 nM |
| CYP27B1-r (10 µm) | 250 nM |
| CYP27B1-Fam-Sonde | 100 nM |
| SmartTaq (5 µM, Solis Biodyne) | 1U/20 µL RXN |
| DNA | 2 µl |
| Reaktionsvolumen | 20 µl |

Zwei Ansätze pro Tier für je Primer A und G sind für die Genotypisierung notwendig. Die PCR wurde auf dem Gerät Mx 3000p (Stratagene, La Jolla, USA) mit der Software Mx pro durchgeführt.

Das für die PCR verwendete Temperatur-Programm:

- 5 Minuten Aktivierung der SmartTaq-Polymerase 95°C
- 30 Sekunden Denaturierung 95°C
- 1 Minute Annealing 60°C
- Zyklen: 45

Dieses Two-step Programm wurde gewählt, da der Elongation-Schritt bei 72°C wegen des kurzen Amplicons nicht notwendig ist. Für die vollständige Elongation reicht die Aufheizphase des folgenden Zyklus aus.

3.3 Probennahme

Die Blutgewinnung erfolgte bei den adulten Schweinen durch die Punktion der Vena jugularis externa mittels Einmalkanülen 1,2 x 100 mm (TSK Laboratory, Japan). Während dieses Eingriffes wurden die Tiere mit einer Oberkieferschlinge fixiert. Die Ferkel wurden für die Blutabnahme durch manuelles Halten in Rückenlage und Streckung des Kopfes fixiert. Anschließend wurde mit Einmalkanülen 0,6 x 30 mm (Terumo, Leuven, Belgien) Blut aus der Vena jugularis externa entnommen. Für die Blutentnahme wurden 2,6 ml-Lithium-Heparin S-Monovetten (20 I.E. Heparin/ml Blut, Fa. Sarstedt, Nümbrecht) für die adulten Schweine und 1,2 ml-Lithium-Heparin S-Monovetten (35 I.E. Heparin/ml Blut, Fa. Sarstedt, Nümbrecht) für die Ferkel verwendet.

3.4 Messung der Konzentration von ionisiertem Calcium im heparinisiertem Vollblut

Innerhalb einer Stunde nach der Blutabnahme wurde die Konzentration des ionisierten Calciums mit dem Elektrolytanalysator 9180 (AVL, Bad Homburg, BRD) im eisgekühlten, heparinisierten Vollblut bestimmt. Durch Vorversuche konnte bewiesen werden, dass eine einstündige Lagerung auf Eis keinen Einfluss auf die Messergebnisse hat.

3.5 Fütterungsversuche

Die Futtermischungen für die Versuche unter den Punkten 3.5.1., 3.5.2. und 3.5.3. wurden vom Lehr- und Forschungsgut (Kremesberg, Pottenstein, Österreich) der Veterinärmedizinischen Universität Wien (VUW) gemischt. Die Milchaustauscherfutter (MAT) für den Versuch unter Punkt 3.5.4. wurden von der H. Wilhelm Schaumann GmbH & Co KG (Brunn a. Gebirge, Österreich) gemischt.

Die Rationen, die am Lehr- und Forschungsgut hergestellt wurden, sind mit Hilfe des Programms WinFumi Version 4. (Hybrimin®, Töllkirchen, Österreich) berechnet worden. Die angegebenen Bedarfswerte sind vom Institut für Ernährung der VUW festgelegt worden. Die MAT-Rationen wurden in Kooperation mit Schaumann und deren Software erstellt. Alle Werte der Rationen beziehen sich auf die ursprüngliche Substanz (uS), die im Gegensatz zur Trockensubstanz dem Futtermittel inklusive Wassergehalt entspricht. Die für das Schwein umsetzbare Energie aus den Futtermitteln, wird in den Tabellen (Futter-Inhaltsstoffe) als ME-Schwein bezeichnet. Die Mineralfuttermittel von der Firma Schaumann für Ferkel und Zuchtsauen werden als Schaumaphos F bzw. Z bezeichnet. Tabelle 4 gibt Auskunft über die Testsubstanzen und Futterbestandteile, die in den Fütterungsversuche verwendet worden sind, sowie deren Bezugsquellen.

Tab. 4. Die Testsubstanzen und die für die Versuche notwendigen Futterbestandteile

| |
|---|
| Lactose (Lactoprot, Hartberg, Österreich) |
| Lactulose (Fresenius Kabi, Linz, Österreich) (Sirup wurde getrocknet: JSC Felizata Holding, Moskau, Russland) |
| Xylitol (Roquette, Lestrem, Frankreich) |
| Maltitol (Roquette, Lestrem, Frankreich) |
| Difruktosedianhydrid (DFA III) (FANCL Corporation, Yokohama, Japan) |
| Calciumlaktat (Prochema Handels-GmbH, Wien, Österreich) |
| Mononatriumphosphat (Richter Pharma, Wels, Österreich) |
| Futtercellulose (Phrikolat GmbH, Siegburg, Deutschland) |

Die übrigen Bestandteile der jeweiligen Futtermischungen wurden von der jeweiligen Mischinstitution bezogen.

3.5.1 Toleranzversuche

Das Verpaarungsschema für diesen Versuch ist unter Punkt 3.1.(c) angeführt. Den Ferkeln wurde ab dem 10. Lebenstag das Versuchsfutter 1 mit dem geringstem Gehalt an Testsubstanz angeboten. Nach dem Absetzen (42. Lebenstag) wurde ab dem 49. Lebenstag das Versuchsfutter 2 verfüttert. Die Ferkel wurden am 56. Lebenstag, nach siebentägiger Fütterung des Versuchsfutters 2, auf die letzte Konzentrationsstufe, das Versuchsfutter 3, umgestellt. Die Ferkel wurden von Geburt an wurfweise bis zum Versuchende in einer Box auf Teilspaltenboden und Stroh gehalten. Die Fütterung erfolgte *ad libitum* mit ständigem Wasserzugang und das Lichtprogramm wurde auf 12h Licht- / 12h Dunkel-Phase eingestellt. Die Verträglichkeit wurde anhand der Kotkonsistenz, die mehrmals am Tag überprüft wurde, Allgemeinverhalten und Gewichtszunahmen beurteilt. Die Gewichtsbestimmung der Probanden fand zweimal wöchentlich mit der Waage Spider III (Metzler-Toledo GmbH, Greifensee, Schweiz) statt. Die verwendeten Tierzahlen und die Konzentrationen der Testsubstanzen im Futter sind in der Tabelle 5 angeführt. Tabelle 6 bis Tabelle 13 geben die Rohstoffe und Inhaltstoffe der verwendeten Futtermischungen an.

Tab. 5. Die Testsubstanzen und ihre Konzentrationen im Futter

| Substanz | Ferkel-Anzahl | Konzentration Versuchsfutter 1 | Konzentration Versuchsfutter 2 | Konzentration Versuchsfutter 3 |
|-----------|---------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Lactose | 4 | 12,5 | 25,0 | 50 |
| Lactulose | 7 | 3,5 | 7,0 | 14 |
| Xylitol | 8 | 5,0 | 10,0 | 20 |
| Maltitol | 4 | 3,5 | 7,0 | 14 |

Konzentrationen in Gewichtsprozent (%) der uS

Tab. 6. Lactose-Futtermischungen 1 – 3 und ihre Rohstoffe

| Rohstoff | Futter 1 | Futter 2 | Futter 3 |
|-----------------------|----------|----------|----------|
| | Anteil % | Anteil % | Anteil % |
| Weizen | 26,68 | 21,00 | - |
| Sojaextraktionsschrot | 26,46 | 30,54 | 37,49 |
| Gerste 2 zeilig | 14,00 | 2,00 | - |
| Lactose | 12,50 | 25,00 | 50,00 |

| | | | |
|-------------------|------|------|------|
| Dicalciumphosphat | 5,50 | 5,50 | 5,80 |
| Molkefett | 5,00 | 5,00 | - |
| Schaumaphos F | 3,50 | 3,50 | 3,50 |
| Bierhefe | 2,00 | 2,70 | - |
| Sojaöl | 1,50 | 2,00 | - |
| Futtercellulose | 1,50 | 1,50 | 2,00 |
| Schaumacid | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| Methionin | 0,27 | 0,30 | 0,35 |
| Natriumchlorid | 0,20 | 0,20 | 0,15 |
| Lysin HCL | 0,20 | 0,11 | 0,05 |
| Threonin | 0,14 | 0,10 | 0,11 |
| Tryptophan | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| Summe | 100 | 100 | 100 |

Alle Angaben in Gewichtsprozent (%)

Tab. 7. Lactose-Futtermischungen 1 – 3 und ihre Inhaltsstoffe

| | Futter 1 | Futter 2 | Futter 3 | |
|-----------------|----------|----------|----------|--------|
| Inhaltsstoff | Gehalt | Gehalt | Gehalt | Bedarf |
| Trockensubstanz | 84,66 | 85,13 | 89,96 | - |
| Rohprotein | 18,67 | 18,82 | 18,37 | 18,60 |
| Rohfett | 5,31 | 5,58 | 0,75 | 6,00 |
| Rohfaser | 3,81 | 3,33 | 3,15 | 5,00 |
| Rohasche | 3,16 | 3,03 | 2,43 | - |
| Calcium | 2,14 | 2,13 | 2,19 | 2,10 |
| Phosphor | 1,29 | 1,23 | 1,21 | 1,20 |
| ME-Schwein | 13,00 | 13,34 | 12,97 | 13,00 |
| Lysin | 1,46 | 1,46 | 1,48 | 1,45 |
| Methionin | 0,62 | 0,64 | 0,68 | 0,44 |
| Meth.+Cystin | 0,87 | 0,88 | 0,89 | 0,87 |
| Tryptophan | 0,29 | 0,29 | 0,30 | 0,29 |
| Threonin | 0,87 | 0,87 | 0,87 | 0,87 |

Angaben in Gewichtsprozent (%) in der uS, ausgenommen ME-Schwein, MJ/kg

Tab. 8. Lactulose-Futtermischungen 1 – 3 und ihre Rohstoffe

| Rohstoff | Futter 1 | Futter 2 | Futter 3 |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Anteil % | Anteil % | Anteil % |
| Weizen | 36,00 | 34,78 | 28,00 |
| Sojaextraktionsschrot | 24,72 | 29,00 | 30,00 |
| Gerste 2 zeilig | 15,05 | 7,93 | 6,49 |
| Dicalciumphosphat | 5,35 | 5,40 | 5,50 |
| Molkefett | 5,00 | 5,00 | 5,00 |
| Lactulose | 3,50 | 7,00 | 14,00 |
| Schaumaphos F | 3,50 | 3,50 | 3,50 |
| Bierhefe | 2,00 | 2,80 | 2,80 |
| Sojaöl | 2,00 | 2,00 | 2,00 |
| Futtercellulose | 1,50 | 1,50 | 1,60 |
| Schaumacid | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| Methionin | 0,25 | 0,22 | 0,24 |
| Lysin HCL | 0,25 | 0,06 | 0,05 |
| Natriumchlorid | 0,20 | 0,20 | 0,20 |
| Threonin | 0,13 | 0,07 | 0,08 |
| Tryptophan | 0,05 | 0,04 | 0,04 |
| Summe | 100 | 100 | 100 |

Alle Angaben in Gewichtsprozent (%)

Tab. 9. Lactulose-Futtermischungen 1 – 3 und ihre Inhaltsstoffe

| | Futter 1 | Futter 2 | Futter 3 | |
|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|
| Inhaltsstoff | Gehalt | Gehalt | Gehalt | Bedarf |
| Trockensubstanz | 84,43 | 84,55 | 84,78 | - |
| Rohprotein | 19,07 | 20,23 | 19,77 | 18,60 |
| Rohfett | 5,97 | 5,91 | 5,78 | 6,00 |
| Rohfaser | 4,04 | 3,91 | 3,80 | 5,00 |
| Rohasche | 3,28 | 3,35 | 3,24 | - |
| Calcium | 2,10 | 2,11 | 2,13 | 2,10 |
| Phosphor | 1,30 | 1,28 | 1,27 | 1,20 |
| ME-Schwein | 12,89 | 12,87 | 12,68 | 13,00 |

| | | | | |
|--------------|------|------|------|------|
| Lysin | 1,48 | 1,45 | 1,45 | 1,45 |
| Methionin | 0,61 | 0,60 | 0,61 | 0,44 |
| Meth.+Cystin | 0,87 | 0,87 | 0,87 | 0,87 |
| Tryptophan | 0,29 | 0,30 | 0,30 | 0,29 |
| Threonin | 0,87 | 0,87 | 0,87 | 0,87 |

Angaben in Gewichtsprozent (%) in der uS, ausgenommen ME-Schwein, MJ/kg

Tab. 10. Xylitol-Futtermischungen 1 – 3 und ihre Rohstoffe

| Rohstoff | Futter 1 | Futter 2 | Futter 3 |
|-----------------------|----------|----------|----------|
| | Anteil % | Anteil % | Anteil % |
| Weizen | 38,00 | 36,11 | 23,80 |
| Sojaextraktionsschrot | 25,00 | 30,00 | 29,00 |
| Gerste 2 zeilig | 10,48 | 2,46 | 5,00 |
| Dicalciumphosphat | 5,40 | 5,50 | 5,50 |
| Xylitol | 5,00 | 10,00 | 20,00 |
| Molkefett | 5,00 | 5,00 | 5,60 |
| Schaumaphos F | 3,50 | 3,50 | 3,50 |
| Bierhefe | 2,80 | 2,80 | 3,00 |
| Sojaöl | 2,00 | 2,00 | 2,00 |
| Futtercellulose | 1,50 | 1,50 | 1,28 |
| Schaumacid | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| Methionin | 0,25 | 0,22 | 0,30 |
| Natriumchlorid | 0,20 | 0,20 | 0,20 |
| Lysin HCL | 0,19 | 0,10 | 0,15 |
| Threonin | 0,13 | 0,06 | 0,12 |
| Tryptophan | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| Summe | 100 | 100 | 100 |

Alle Angaben in Gewichtsprozent (%)

Tab. 11. Xylitol-Futtermischungen 1 – 3 und ihre Inhaltsstoffe

| Inhaltsstoff | Futter 1 | Futter 2 | Futter 3 | Bedarf |
|-----------------|----------|----------|----------|--------|
| | Gehalt | Gehalt | Gehalt | |
| Trockensubstanz | 84,40 | 84,47 | 84,07 | - |
| Rohprotein | 19,15 | 20,34 | 18,90 | 18,60 |

| | | | | |
|--------------|-------|-------|-------|-------|
| Rohfett | 5,94 | 5,85 | 5,96 | 6,00 |
| Rohfaser | 3,96 | 3,73 | 3,32 | 5,00 |
| Rohasche | 3,27 | 3,31 | 3,13 | - |
| Calcium | 2,12 | 2,14 | 2,13 | 2,10 |
| Phosphor | 1,30 | 1,28 | 1,25 | 1,20 |
| ME-Schwein | 12,80 | 12,68 | 12,29 | 13,00 |
| Lysin | 1,45 | 1,50 | 1,48 | 1,45 |
| Methionin | 0,61 | 0,60 | 0,65 | 0,44 |
| Meth.+Cystin | 0,87 | 0,87 | 0,89 | 0,87 |
| Tryptophan | 0,29 | 0,31 | 0,29 | 0,29 |
| Threonin | 0,87 | 0,87 | 0,87 | 0,87 |

Angaben in Gewichtsprozent (%) in der uS, ausgenommen ME-Schwein, MJ/kg

Tab. 12. Maltitol-Futtermischungen 1 – 3 und ihre Rohstoffe

| Rohstoff | Futter 1 | Futter 2 | Futter 3 |
|-----------------------|----------|----------|----------|
| | Anteil % | Anteil % | Anteil % |
| Weizen | 36,00 | 34,78 | 28,00 |
| Sojaextraktionsschrot | 24,72 | 29,00 | 30,00 |
| Gerste 2 zeilig | 15,07 | 7,93 | 6,48 |
| Dicalciumphosphat | 5,35 | 5,40 | 5,50 |
| Molkefett | 5,00 | 5,00 | 5,00 |
| Maltitol | 3,50 | 7,00 | 14,00 |
| Schaumaphos F | 3,50 | 3,50 | 3,50 |
| Bierhefe | 2,00 | 2,80 | 2,80 |
| Sojaöl | 2,00 | 2,00 | 2,00 |
| Futtercellulose | 1,50 | 1,50 | 1,60 |
| Schaumacid | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| Methionin | 0,25 | 0,22 | 0,24 |
| Lysin HCL | 0,23 | 0,06 | 0,06 |
| Natriumchlorid | 0,20 | 0,20 | 0,20 |
| Threonin | 0,13 | 0,07 | 0,08 |
| Tryptophan | 0,05 | 0,04 | 0,04 |
| Summe | 100 | 100 | 100 |

Alle Angaben in Gewichtsprozent (%)

Tab. 13. Maltitol-Futtermischungen 1 – 3 und ihre Inhaltsstoffe

| | Futter 1 | Futter 2 | Futter 3 | |
|-----------------|----------|----------|----------|--------|
| Inhaltsstoff | Gehalt | Gehalt | Gehalt | Bedarf |
| Trockensubstanz | 84,36 | 84,41 | 84,51 | - |
| Rohprotein | 19,05 | 20,23 | 19,78 | 18,60 |
| Rohfett | 5,97 | 5,91 | 5,78 | 6,00 |
| Rohfaser | 4,04 | 3,91 | 3,80 | 5,00 |
| Rohasche | 3,28 | 3,35 | 3,24 | - |
| Calcium | 2,10 | 2,11 | 2,13 | 2,10 |
| Phosphor | 1,30 | 1,28 | 1,27 | 1,20 |
| ME-Schwein | 12,83 | 12,75 | 12,44 | 13,00 |
| Lysin | 1,46 | 1,45 | 1,45 | 1,45 |
| Methionin | 0,61 | 0,60 | 0,61 | 0,44 |
| Meth.+Cystin | 0,87 | 0,87 | 0,87 | 0,87 |
| Tryptophan | 0,29 | 0,30 | 0,30 | 0,29 |
| Threonin | 0,87 | 0,87 | 0,87 | 0,87 |

Angaben in Gewichtsprozent (%) in der uS, ausgenommen ME-Schwein, MJ/kg

3.5.2 Wirkungstests mit adulten Schweinen

Nach Toleranzprüfung der Zusatzstoffe wurden die Substanzen auf ihr Vermögen hin, die Calciumresorption zu fördern, getestet. Bei einem Wurf, bestehend aus 11 PVDR 1-Schweinen im Alter von 10 Monaten, wurden die seit Geburt durchgeführten Vitamin-D-Substitutionen (siehe Punkt 3.1) eingestellt. Das für diesen Wurf verwendete Verpaarungsschema ist unter Punkt 3.1.(b) angeführt. Die Konzentrationen von ionisiertem Calcium im heparinisierten Vollblut wurden durch regelmäßige Messungen, die 1 bis 2-mal wöchentlich stattfanden, ermittelt. Als die ionisierten Calcium-Werte auf 1,1 mmol/l abgefallen waren, wurde mit den Versuchen begonnen. In Anlehnung an die Vorversuche wurden die Schweine 7 Tage lang mit Futtermischungen gefüttert, die die halbe Konzentration des eigentlichen Wirkungstestfutters enthielten. Um diese Konzentration zu erreichen, wurde das Wirkungstestfutter mit der Maximalkonzentration an Testsubstanz mit einem Futter gemischt, das keinen Test-Zusatz enthielt. Da der Verdünnungseffekt den erhöhten Ca-/Phosphatgehalt nicht beeinflussen sollte, enthielt dieses Misch-Futter ebenfalls

erhöhte Werte dieser Futterinhaltsstoffe. Sonst entsprach es dem Standardfutter. Dieser Gewöhnungsphase folgte dann die 17-tägige Phase der Wirkungsüberprüfung, wobei die Konzentrationen der Testsubstanzen in den Futterrationen, den jeweiligen Versuchssituationen angepasst, erhöht wurden. Nach notwendigen Vitamin-D-Behandlungen und einer Auswaschphase mit Fütterung der Standard-Diät, wurden die Schweine wieder für die nächsten Testsubstanzen in den Versuch genommen. Als Versuchsstart galt abermals das Erreichen des Schwellenwertes von 1,1 mmol/l ionisiertem Calcium im heparinisierten Vollblut. Nach den Experimenten wurde die Vitamin-D-Prophylaxe weitergeführt. Die Versuchstiere wurden in Gruppen von zwei bis vier Tieren mit ständigem Wasserzugang auf Teilspaltenböden und Stroh gehalten. Die Fütterung erfolgte zweimal täglich (1400 g/(Schwein*d)) und das Lichtprogramm wurde auf 12h Licht- / 12h Dunkel-Phase eingestellt. Die verwendeten Tiere und die Konzentrationen der Testsubstanzen im Futter sind in der Tabelle 14 angeführt. Tabelle 15 bis Tabelle 20 geben die Rohstoffe und Inhaltstoffe der verwendeten Futtermischungen an.

Tab. 14. Die Testsubstanzen und ihre Konzentrationen in den Futtermitteln

| Testsubstanzen | Tiere, OM-Nr. | Gewöhnungskonz. | Wirkungskonz. |
|------------------|--------------------|-----------------|---------------|
| Lactose | 700, 704, 705, 706 | 17,5 | 35 |
| Xylitol | 698, 699, 701, 702 | 15 | 30 |
| Maltitol | 697, 703, 707 | 15 | 30 |
| Lactulose | 704, 705, 706, 707 | 10 | 20 |
| DFA III | 697, 700, 701, 702 | 3 | 6 |

OM-Nr. Ohrmarkennummer, Konzentrationen in Gewichtsprozent (%) in der uS

Tab. 15. Lactose- und Xylitol-Futtermischungen und ihre Rohstoffe

| Wirkungstestfutter | Lactose | Xylitol |
|-----------------------|----------|----------|
| Rohstoff | Anteil % | Anteil % |
| Lactose | 35,00 | - |
| Xylitol | - | 30,00 |
| Sojaextraktionsschrot | 17,00 | 15,00 |
| Trockenschnitzel | 12,55 | 3,00 |
| Gerste 2 zeilig | 10,00 | 15,55 |
| Hafer | 10,00 | 16,00 |

| | | |
|---------------------|------|------|
| Weizen | 6,00 | 9,50 |
| Dicalciumphosphat | 4,70 | 5,00 |
| Schaumaphos Z | 2,00 | 2,00 |
| Calciumlaktat | 2,00 | 2,00 |
| Sojaöl | - | 1,20 |
| Mononatriumphosphat | 0,70 | 0,65 |
| Methionin | 0,05 | 0,05 |
| Lysin HCL | - | 0,05 |
| Summe | 100 | 100 |

Alle Angaben in Gewichtsprozent (%)

Tab. 16. Lactose- und Xylitol-Futtermischungen und ihre Inhaltsstoffe

| Wirkungstestfutter | Lactose | Xylitol | |
|---------------------------|----------------|----------------|---------------|
| Inhaltsstoff | Gehalt | Gehalt | Bedarf |
| Trockensubstanz | 88,89 | 87,99 | - |
| Rohprotein | 12,12 | 12,01 | 12,00 |
| Rohfett | 1,19 | 2,75 | - |
| Rohfaser | 4,52 | 3,68 | 5,00 |
| Rohasche | 7,70 | 7,71 | - |
| Calcium | 2,14 | 2,15 | 2,10 |
| Phosphor | 1,22 | 1,30 | 1,20 |
| ME-Schwein | 11,46 | 10,70 | 11,40 |
| Lysin | 0,69 | 0,68 | 0,50 |
| Methionin | 0,24 | 0,23 | 0,15 |
| Meth.+Cystin | 0,44 | 0,46 | 0,32 |
| Tryptophan | 0,15 | 0,15 | 0,10 |
| Threonin | 0,49 | 0,46 | 0,32 |

Angaben in Gewichtsprozent (%) in der uS, ausgenommen ME-Schwein, MJ/kg

Tab. 17. Maltitol- und Lactulose-Futtermischungen und ihre Rohstoffe

| Wirkungstestfutter | Maltitol | Lactulose |
|---------------------------|-----------------|------------------|
| Rohstoff | Anteil % | Anteil % |
| Maltitol | 30,00 | - |
| Lactulose | - | 20,00 |

| | | |
|-----------------------|-------|-------|
| Hafer | 16,00 | 8,00 |
| Gerste 2 zeilig | 15,55 | 27,00 |
| Sojaextraktionsschrot | 15,00 | 12,00 |
| Weizen | 9,50 | 23,05 |
| Dicalciumphosphat | 5,00 | 5,10 |
| Trockenschnitzel | 3,00 | - |
| Schaumaphos Z | 2,00 | 2,00 |
| Calciumlaktat | 2,00 | 2,00 |
| Sojaöl | 1,20 | 0,50 |
| Mononatriumphosphat | 0,65 | - |
| Natriumchlorid | - | 0,25 |
| Lysin HCL | 0,05 | - |
| Methionin | 0,05 | 0,10 |
| Summe | 100 | 100 |

Alle Angaben in Gewichtsprozent (%)

Tab. 18. Maltitol- und Lactulose-Futtermischungen und ihre Inhaltsstoffe

| Wirkungstestfutter | Maltitol | Lactulose | |
|---------------------------|-----------------|------------------|---------------|
| Inhaltsstoff | Gehalt | Gehalt | Bedarf |
| Trockensubstanz | 87,99 | 88,19 | - |
| Rohprotein | 12,01 | 12,21 | 12,00 |
| Rohfett | 2,75 | 2,05 | - |
| Rohfaser | 3,68 | 10,30 | 5,00 |
| Rohasche | 7,71 | 7,60 | - |
| Calcium | 2,15 | 2,16 | 2,10 |
| Phosphor | 1,30 | 1,25 | 1,20 |
| ME-Schwein | 10,70 | 10,44 | 11,40 |
| Lysin | 0,68 | 0,59 | 0,50 |
| Methionin | 0,23 | 0,29 | 0,15 |
| Meth.+Cystin | 0,46 | 0,53 | 0,32 |
| Tryptophan | 0,15 | 0,15 | 0,10 |
| Threonin | 0,46 | 0,45 | 0,32 |

Angaben in Gewichtsprozent (%) in der uS, ausgenommen ME-Schwein, MJ/kg

Tab. 19. Die DFA III- und Mischrations-Futtermischungen und ihre Rohstoffe

| Wirkungstestfutter | DFA III | Mischrations |
|---------------------------|-----------------|---------------------|
| Rohstoff | Anteil % | Anteil % |
| DFA III | 6,00 | - |
| Gerste 2 zeilig | 30,00 | 32,00 |
| Hafer | 17,60 | 19,60 |
| Weizen | 17,00 | 19,00 |
| Trockenschnitzel | 10,00 | 10,00 |
| Sojaextraktionsschrot | 9,00 | 9,00 |
| Dicalciumphosphat | 4,60 | 4,60 |
| Schaumaphos Z | 2,00 | 2,00 |
| Calciumlaktat | 2,00 | 2,00 |
| Sojaöl | 1,20 | 1,20 |
| Mononatriumphosphat | 0,50 | 0,50 |
| Lysin HCL | 0,05 | 0,05 |
| Methionin | 0,05 | 0,05 |
| | 100 | 100 |

Alle Angaben in Gewichtsprozent (%)

Tab. 20. DFA III- und Mischrations-Futtermischungen und ihre Inhaltsstoffe

| Wirkungstestfutter | DFA III | Mischrations | |
|---------------------------|----------------|---------------------|---------------|
| Inhaltsstoff | Gehalt | Gehalt | Bedarf |
| Trockensubstanz | 87,94 | 87,88 | - |
| Rohprotein | 12,30 | 12,96 | 12,00 |
| Rohfett | 3,16 | 3,33 | - |
| Rohfaser | 7,78 | 6,08 | 5,00 |
| Rohasche | 7,74 | 7,87 | - |
| Calcium | 2,12 | 2,13 | 2,10 |
| Phosphor | 1,28 | 1,30 | 1,20 |
| ME-Schwein | 10,65 | 11,08 | 11,40 |
| Lysin | 0,61 | 0,63 | 0,50 |
| Methionin | 0,25 | 0,26 | 0,15 |
| Meth.+Cystin | 0,49 | 0,51 | 0,32 |

| | | | |
|------------|------|------|------|
| Tryptophan | 0,15 | 0,16 | 0,10 |
| Threonin | 0,46 | 0,48 | 0,32 |

Angaben in Gewichtsprozent (%) in der uS, ausgenommen ME-Schwein, MJ/kg

3.5.3 Calcium²⁺-Verlaufsversuch mit Saugferkeln und SGS-Test (Static glucose stimulation)

Verlaufsversuch

Das Ziel dieser Studie war einerseits die Entwicklung des Verlaufs des ionisierten Calciums im ersten Lebensabschnitt zu dokumentieren und andererseits den Status der Calciumhomöostase vor den *in vitro*-Versuchen zu überprüfen.

Dieser Versuch wurde mit drei Würfen (24 Ferkel) durchgeführt. Das Verpaarungsschema ist unter Punkt 3.1.(c) angeführt. Die Ferkel wurden in den ersten vier Lebenswochen ausschließlich mit Sauenmilch ernährt. In der fünften Lebenswoche wurden die Ferkel zusätzlich mit konventionellem Ergänzungsfutter für Saugferkel (Kremesberg, Pottenstein, Österreich) gefüttert um eine sanfte Umstellung zum Alleinfutter zu gewährleisten. Das Absetzen erfolgte am Ende der fünften Lebenswoche und im Alter von 6 Wochen wurde der Versuch beendet. Blutproben wurde ab dem 7. Tag *post partum* zweimal wöchentlich nach dem im Punkt 3.3 beschriebenen Prozedere entnommen. Die Aufstellung entsprach der im Punkt 3.5.1 bereits beschriebenen.

SGS-Test

Die Ferkel wurden mit 0,25 ml/kg 10% Ketamin Lösung (CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) und 0,05 ml/kg Stresnil® Lösung (Janssen, Neuss, Deutschland) intravenös (i.v.) narkotisiert und nach Überprüfung der Interdigitalreflexe durch Durchtrennung der großen Halsgefäße entblutet. Nun wurde das Darmkonvolut samt Pankreas durch die eröffnete Bauchhöhle entnommen und in einer Organschale abgelegt. Anschließend wurde das Pankreas isoliert und in eine mit eisgekühltem Penicillin/Streptomycin-haltigem (1%) RPMI 1640-Medium (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) gefüllten Petrischale verbracht und dort mit Pinzette und einer Schere von sichtbaren Fett- und Bindegewebe befreit. Die Schritte vom Entbluten bis zur Ablage in dem eisgekühlten RPMI 1640-Medium erfolgten innerhalb von 10 Minuten. Der linke Lappen (Milzschenkel) des Pankreas wurde abgetrennt und nach der Abwage in ein 200 ml-Schraubglas (Schott AG, Mainz, Deutschland) mit

eisgekühlter HTK-Lösung (Custodiol®, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Deutschland) gelegt. Die HTK-Lösung enthielt 1 mg Collagenase P (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) pro ml Lösung. Pro Gramm Pankreas wurden 10 ml dieser Mischung vorgelegt. Um den Organ-Teil optimal vor dem Selbstverdau zu schützen, wurden mindestens 20 ml dieser Lösung mit Hilfe einer Einmalkanüle 0,7 x 30 mm (Braun, Melsungen, Deutschland) in das Organ injiziert. Nach einer Stunde wurde der Milzschenkel in einer Petrischale nochmals gereinigt und in rund 2x2 mm große Stücke geschnitten. Nach der Rückführung des Pankreas in das Schraubglas, wurden 4 Glaskugeln mit einem Durchmesser von 1,5 cm zugesetzt und im Schüttelinkubator 3031 (GFL, Burgwedel, Deutschland) 30 Minuten bei 37°C und 200 U/min der Aufschluss durchgeführt. Um den Verdau des Organs und die Trennung zwischen exokrinen und endokrinen Anteil zu überprüfen, entnahm man einen ml und färbte die β -Zellen mit 0,5 ml einer 0,1% Dithizon-Lösung (Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz). Die Kontrolle der angefärbten Lösung erfolgte in einer Petrischale unter einem Stereomikroskop (Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland). Nach positiver Beurteilung des Verdaus, wurde der Inhalt des Schraubglases in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (TPP, Trasadingen, Schweiz) überführt und bei 6°C für 1 Minute bei 100 x g zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5810R, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit reiner HTK-Lösung zum Entschwellen überschichtet. Nach 30 min bei 4°C und der abermaligen Zentrifugation (6°C, 1 Minute, 100 x g) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml HBSS-Lösung (MP Biomedicals, Inc., Illkirch, Frankreich) resuspendiert.

Anschließend wurde die HBSS-Lösung mit dem suspendierten Gewebe mit 10 ml Histopaque 1119 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und 10 ml Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) unterschichtet. Die folgende 18 minütige Zentrifugation wurde bei Raumtemperatur und 280 x g durchgeführt. Um die Schicht mit den meisten Langerhans Inseln zu finden, wurden 0,5 ml-Proben gezogen, mit Dithizon-Lösung angefärbt und unter dem Stereomikroskop betrachtet. Wenn diese Schicht identifiziert werden konnte, wurde sie durch Abpipettieren isoliert und zweimal mit 10-20 ml HBSS gewaschen (Abzentrifugation: Raumtemperatur, 1 Minute, 250 x g). Darauf wurden die Inseln in Advanced RPMI 1640-Medium (Invitrogen GmbH, Lofer, Österreich) in 10 cm, unbehandelten Petrischalen im Brutschrank (Heraeus Cytoperm 8080, Wien,

Österreich) bei 37°C, Luftfeuchte 95% und 5% CO₂ kultiviert und am zweiten Tag dem SGS-Test zugeführt. Für die Durchführung der SGS-Tests wurden 24-Loch-Zellkulturplatten (TPP, Trasadingen, Schweiz) und 12 µm Filtereinsätze (Millipore Corporation, Billerica, USA) verwendet. Abb. 3 zeigt die Lage der Einsätze und Inseln in den Vertiefungen der Zellkulturplatte.

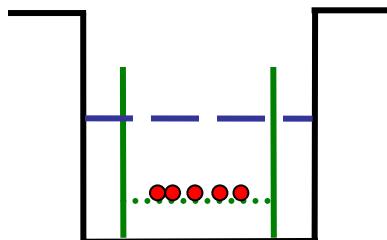


Abb. 4. Position der Filter-Einsätze in der Zellkulturplatte im Querschnitt. In grün ist der Einsatz dargestellt, in dem sich die Langerhans-Inseln (rot) befinden. Die blau-strichlierte Linie, zeigt den Flüssigkeitsstand des Mediums in der Zellkulturplatte (schwarz).

Da der Einsatz auf Füßen stand, kommunizierte das Medium im Einsatz mit dem der Lochplatte. Somit war eine gleichmäßige Verteilung des gebildeten Insulins in beiden Kompartimenten gewährleistet. Die praktische Durchführung des SGS-Tests ist in Abb. 5 skizziert.

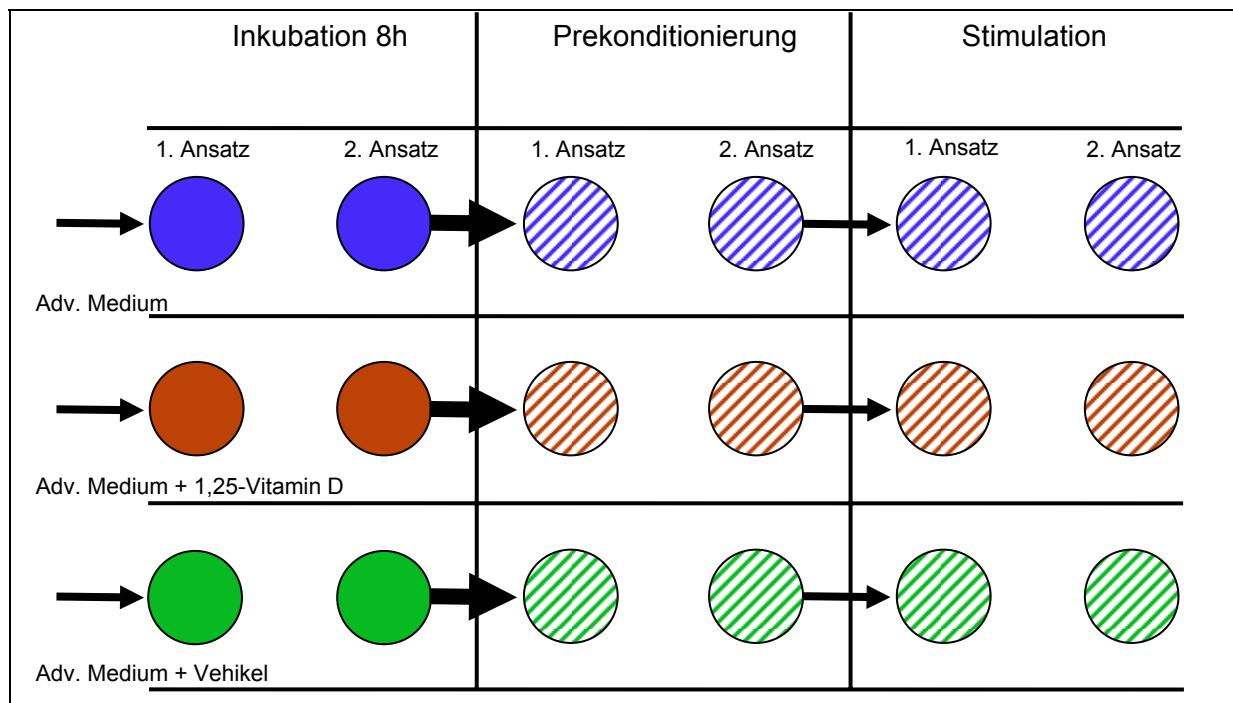


Abb. 5. Schema für die Durchführung des SGS-Tests. Die verschiedenen Vorinkubationsvarianten sind farblich gekennzeichnet. Blau steht für reines Medium, rot für einen Vitamin D-Zusatz und grün für eine Vehikel-Beimischung. Die Pfeile zeigen die Richtung des Arbeitsverlaufs an, der in Inkubation, Prekonditionierung und Stimulation unterteilt ist. Die dicken Pfeile symbolisieren Waschschrifte. Adv. Advanced

Um den Einfluss von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ auf die Insulinsekretion zu überprüfen, wurden jeweils zwei Ansätze pro Tier mit Advanced Medium RPMI 1640, Advanced Medium RPMI 1640 plus $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Schering AG, Berlin, Deutschland) in einer Konzentration von 10^{-8} mol/l und Advanced Medium RPMI 1640 mit dem Vehikel Alkohol (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) in einer Konzentration von 1% vorinkubiert.

Je 20 Inseln wurden manuell in die mit Advanced Medium RPMI 1640 benetzten Einsätze gepickt und anschließend 8h im Brutschrank bei 37°C (Luftfeuchte 95% und 5% CO_2) in den verschiedenen Medien bebrütet.

Anschließend wurden die Inseln in den Filter-Einsätzen dreimal mit HBSS gewaschen, um bereits gebildetes Insulin und Glucose zu entfernen. Daraufhin folgte der einstündige Schritt der Prekonditionierung, wobei die Einsätze mit den Inseln in die nächsten Vertiefungen, der Lochplatte gefüllt mit HBSS, gestellt wurden.

Nach diesem Prozedere wurde mit Glucose (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) die Insulinsekretion stimuliert. Dies wurde erreicht, indem man die Einsätze aus den Prekonditionierungs-Vertiefungen in die Vertiefungen versetzte, die mit jeweils einem Milliliter 27 mol/l Glucose-haltiger HBSS gefüllt waren.

Nach zehn Minuten wurden 500 μl entnommen. Die so gewonnenen Proben wurden bis zur Analyse mittels porzinen Insulin ELISA-Assay (Mercodia, Uppsala, Schweden) bei -20°C gelagert.

3.5.4 Wirkungstests mit Saugferkeln

Ferkel sind in der Lage, in den ersten Lebenstagen intestinal Calcium Vitamin D-unabhängig zu absorbieren. Diese Fähigkeit sollte ausgenutzt werden, um normocalcämische Bedingungen zu schaffen, da Normocalcämie dietetisch bei adulten PVDR 1-Schweinen nicht etabliert werden konnte. Das Verpaarungsschema für die Wirkungstests mit Saugferkeln wird im Punkt 3.1.(d) beschrieben. Die Fütterung erfolgte in diesem Versuch nur mit Sauenmilch und Milchaustauschfutter (MAT). Ebenso wie in den Futtermitteln aus Versuch 3.5.2., waren die Calcium- und Phosphatgehalte auf 2,1% bzw. 1,2% in den MAT erhöht worden, um ein Erreichen der Normocalcämie zu erleichtern. Als Kontrolle wurde ein MAT angeboten, das analog erhöhte Calcium- und Phosphatgehalte aufwies. Die verwendeten Tierzahlen, Substanzen und deren Konzentrationen in den MAT sind in Tabelle 21 angeführt.

Tabelle 22 und Tabelle 23 geben die Rohstoffe und Inhaltstoffe der verwendeten MAT an.

Tab. 21. Tierzahlen und Konzentrationen der Substanzen im MAT

| Substanzen | Anzahl der Ferkel | Konzentration im MAT |
|------------------|-------------------|----------------------|
| Xylitol | 8 | 30 % |
| DFA III | 10 | 6 % |
| Kontrolle | 9 | - |

Ab dem 7. Tag *post partum* wurde das MAT mit den Wirkstoffen zur Gewöhnung angeboten. Nach dem Absetzen der Ferkel am 22. Lebenstag wurden die MAT weitergefüttert. Um die Wirkung dieser Fütterung auf die Calciumhomöostase beurteilen zu können, wurde ab dem Absetzen der Ferkel 2 mal pro Woche Blut abgenommen und ionisiertes Calcium gemessen. Die Vorgehensweise dabei ist im Punkt 3.3. angeführt. Bis zum 21. Lebenstag entsprach die Haltung jener der im Punkt 3.5.1. beschriebenen. Am 22. Lebenstag wurden die Schweine an die VUW transportiert und in Stoffwechselkäfige mit Kunststoff-Vollspaltenböden am Institut für Ernährung der VUW eingestellt. Pro Stoffwechselkäfig wurden bis zu maximal fünf Ferkel auf einer Grundfläche von 1,7 m² gehalten. Die Tiere wurden über Tröge um 8:00, 12:00, 15:30 und 20:00 Uhr mit Futter versorgt. Wasser stand den Ferkeln *ad libitum* zur Verfügung.

Tab. 22. Rohstoffe der MAT

| Rohstoffe | Kontrolle | DFA III | Xylitol |
|---------------------|-----------|---------|---------|
| Bi-Lactal Premium | 90,65 | 84,35 | 50,00 |
| Sojaproteinkonz. | - | - | 8,85 |
| Calciumlaktat | 6,70 | 6,65 | 7,50 |
| Monocalciumphosphat | 2,65 | 3,00 | 3,65 |
| Xylitol | - | - | 30,00 |
| DFAIII | - | 6,00 | - |
| Summe | 100 | 100 | 100 |

Alle Angaben in Gewichtsprozent (%)

Tab. 23. Inhaltsstoffe der MAT

| Milchaustauscher Futter | DFA III | Xylitol | Kontrolle | Bi-Lactal Premium |
|----------------------------|---------|---------|-----------|----------------------|
| Inhaltsstoff | Gehalt | Gehalt | Gehalt | Gehalt |
| ME-Schwein | 14,3 | 12,5 | 15,0 | 16,5 |
| Rohprotein | 16,5 | 15,5 | 17,5 | 19,5 |
| Rohfett | 11,5 | 7,0 | 12,0 | 13,5 |
| Calcium | 2,1 | 2,1 | 2,1 | 0,8 |
| Phosphor | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 0,7 |
| Lysin | 1,5 | 1,2 | 1,6 | 1,8 |
| Methionin | 0,5 | 0,4 | 0,6 | 0,6 |
| Meth.+Cystin | 0,8 | 0,7 | 0,9 | 1,0 |
| Tryptophan | 0,3 | 0,2 | 0,3 | 0,3 |
| Threonin | 1,0 | 0,8 | 1,1 | 1,2 |

Angaben in Gewichtsprozent (%) bezogen auf uS, ausgenommen ME-Schwein, MJ/kg

3.6 Statistische Auswertung

Das Programm SPSS.14.0 für Windows wurde für die statistische Auswertung der Daten herangezogen.

Die Ergebnisse der Punkte 4.4. und 4.6. wurden mittels One way ANOVA und dem Post-hoc-Test nach Duncan analysiert. Zusätzlich wurde der Kaplan-Meier-Test zur Beurteilung des Überlebens verwendet. Der ungepaarte T-Test diente der Datenanalyse des SGS-Versuches (Punkt 4.5.).

4 Ergebnisse

In einigen Studien wurde gezeigt, dass das Vitamin-D-Hormonsystem die endokrine Pankreasfunktion beeinflusst. Das uns zur Verfügung stehende PVDR 1-Schwein stellt aufgrund seines Defekts in der $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin-D-Synthese ein geeignetes Modell zur Erforschung der Wirkung von $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D auf den endokrinen Teil der Bauchspeicheldrüse dar. Die Erstellung von Vitamin D-unabhängigen normocalcämischen Bedingungen ist aber Voraussetzung, um den direkten Einfluss des Vitamin D auf die Langerhans-Inseln *in vivo* zu evaluieren, da Hypocalcämie an sich eine verminderte Funktion des endokrinen Pankreas mit sich bringt. Dem Versuch Normocalcämie dietetisch zu erzeugen, gingen Toleranztests voraus, um einen negativen Effekt der Futterzusätze auf die Gesundheit der Versuchsschweine auszuschließen.

4.1 Schweinezucht und Genotypisierung

Für die Durchführung der Versuche war es essentiell die Genotypen der Versuchstiere früh und korrekt festzustellen, um eine richtige Gruppeneinteilung gewährleisten zu können. In dieser Studie wurden 86 Schweine miteinbezogen, von denen 14 Tiere den Genotyp Wildtyp besaßen. 37 Schweine waren heterozygote und 35 Tiere homozygote Merkmalsträger der PVDR 1-Erkrankung. Die Zucht ist im Punkt 3.1. beschrieben. Die Genotypenbestimmung erfolgte mittels ARMS-qPCR.

4.2 Toleranzversuche

Um zu testen, ob die Wirkstoffe, die die Calciumaufnahme erhöhen sollen, keinen negativen Einfluss auf die Entwicklung der Ferkel haben, wurden Toleranzversuche durchgeführt. Ziel war es, die maximalen Konzentrationen zu ermitteln, die ohne Folgen auf die Gewichtsentwicklung, Kotkonsistenz und Allgemeinverhalten der Probanden verfütterbar sind.

Die Verträglichkeit der Substanzen Maltitol, Xylitol, Lactose und Lactulose, wurde daher anhand dieser Parameter beurteilt.

4.2.1 Kotkonsistenz

Außer bei Versuchsfutter 2 und 3 der Lactose-Gruppe kam es bei keinem Wirkstoff zu einer optisch erkennbaren Veränderung der Fäzes oder einer Beeinträchtigung des Verhaltens.

Nach der Umstellung des Lactose-Versuchsfutters 1 auf das Versuchsfutter 2 am 54. Lebenstag, konnten am 57. Lebenstag erstmalig Anteile von breiigem Kot in der Box gefunden werden. Am 61. Lebenstag, der letzten Futterumstellung auf das Versuchsfutter 3, konnte eine nochmalige Reduktion der Kot-Konsistenz optisch erkannt werden. In dieser letzten Versuchsphase bis zum 67. Lebenstag wurde geformter, breiiger und dünnflüssiger Kot in gleichen Anteilen gefunden. Zu keiner Zeit des Versuches war jedoch eine Änderung des Allgemeinverhaltens der 4 Ferkel festzustellen.

4.2.2 Körpergewichtsentwicklung

Die verschiedenen Testsubstanzen wirkten sich, wie in der Abb. 6 ersichtlich, nicht wesentlich auf die Körpergewichtsentwicklungen der Versuchsgruppen aus. Auch die Erhöhungszeitpunkte der Konzentrationen der getesteten Kohlenhydrate in den Rationen schlagen sich in den Verlaufskurven kaum nieder.

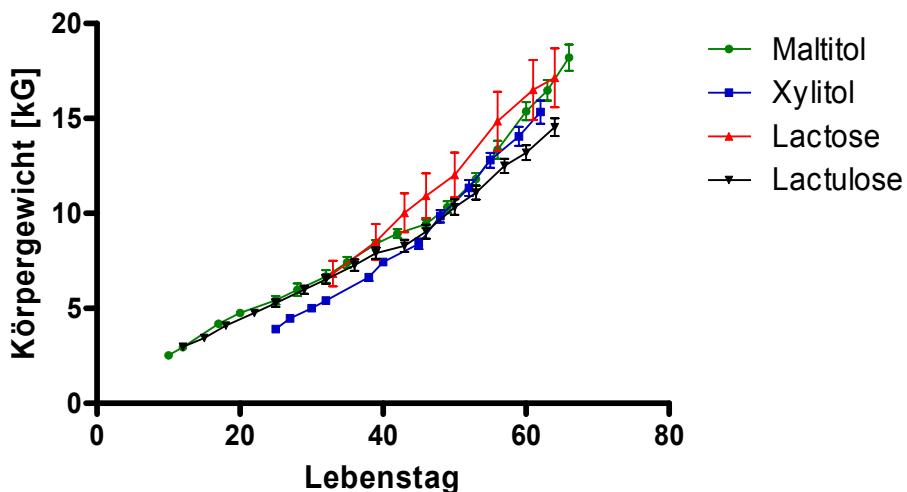


Abb. 6. Gewichtsentwicklung der Ferkel, die mit verschiedenen Versuchsfutter-Zusätzen gefüttert wurden. Die Tierzahlen der Versuchsgruppen betrugen für Maltitol n=4, Xylitol n=8, Lactose n=4 und Lactulose n=7; MW \pm S.E.M.

Anhand der Toleranzversuche, die keine negativen Effekte der Substanzen zeigten, wurden die Konzentrationen für den Wirkungstest mit adulten Schweinen wie in Tabelle 24 ersichtlich festgelegt.

Tab. 24. Festlegung der maximalen Konzentrationen der Wirkstoffe im Wirkungstestfutter

| Wirkstoff | Max. Konz. im Toleranzversuch | Max. Konz. im Wirkungstest mit ad. Schweinen |
|------------------|-------------------------------|--|
| Maltitol | 14 % uS | 30 % uS |
| Xylitol | 20 % uS | 30 % uS |
| Lactose | 50 % uS | 35 % uS |
| Lactulose | 14 % uS | 20 % uS |

uS: ursprüngliche Substanz, Max. Konz., Maximalkonzentrationen, ad., adulten

4.3 Wirkungstests mit adulten Schweinen

Nach Toleranzprüfung der Zusatzstoffe wurden die Substanzen auf ihr Vermögen hin getestet, Normocalcämie in den adulten PVDR 1-Schweinen zu erstellen. Bei 11 PVDR 1-Schweinen im Alter von 10-Monaten wurden die seit der 4. Lebenswoche durchgeführten Vitamin-D-Substitutionen beendet. Als die ionisierten Calcium-Werte auf 1,1 mmol/l abgefallen waren, wurden die Schweine 7 Tage lang mit Futter versorgt, das die halbe Konzentration des Zusatzstoffes des eigentlichen Wirkungstestfutters enthielt. Dieser 7-tägigen Phase folgten die Wirkungsüberprüfungen mit Wirkungstestfutter, wobei die Konzentrationen der Testsubstanzen auf die Maximalwerte erhöht wurden. Nach Erstellung von Normocalcämie durch Vitamin-D-Behandlungen und einer Auswaschphase mit Fütterung der Standard-Diät, wurden die Schweine wieder für die nächsten Testsubstanzen in den Versuch genommen. In der Abb. 7 A-E wurde der Tag 0 als der Tag bezeichnet, an dem der Fütterungsstart des Wirkungstestfutters erfolgte. Mit keiner der getesteten Substanzen in den verwendeten Konzentrationsbereichen war es möglich, normocalcämische Bedingungen (Abb. 7 A-E, grauer Bereich) im PVDR 1-Schwein zu schaffen. Trotzdem zeigen Xylitol (Abb. 7 B) und im geringerem Ausmaß Lactulose (Abb. 7 D) eine tendenzielle Erhöhung des ionisierten Calciumspiegels im Vollblut. In Anlehnung an diese Versuche wurden anschließend

Wirkungstests mit Ferkeln durchgeführt, um eine Beeinflussung der Wirkung der Substanzen durch das Alter der Versuchstiere auszuschließen.

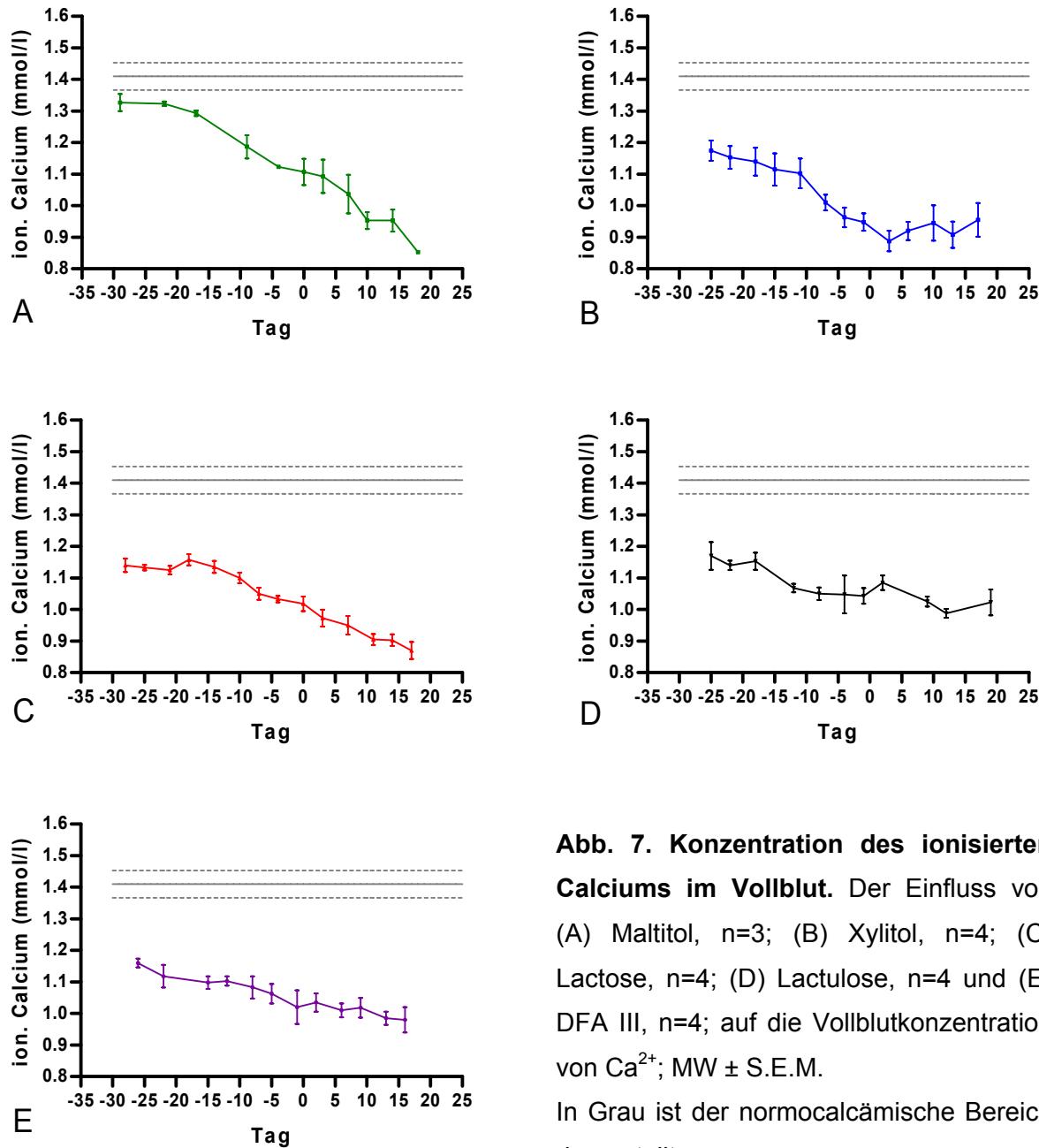


Abb. 7. Konzentration des ionisierten Calciums im Vollblut. Der Einfluss von (A) Maltitol, n=3; (B) Xylitol, n=4; (C) Lactose, n=4; (D) Lactulose, n=4 und (E) DFA III, n=4; auf die Vollblutkonzentration von Ca^{2+} ; MW \pm S.E.M.
In Grau ist der normocalcämische Bereich dargestellt.

4.4 Verlaufstudie des ionisierten Calciumgehalts im Vollblut von Ferkeln

Diese Studie wurde durchgeführt, um einerseits den Verlauf des ionisierten Calciums im ersten Lebensabschnitt zu bestimmen und andererseits den Calciumstatus vor den *in vitro*-Untersuchungen (siehe Punkt 3.5.3.) zu überprüfen.

Da wir in unseren Versuchen Tiere verwendet haben, die einen anderen genetischen Hintergrund besitzen als Versuchsschweine in bereits publizierten Studien, konnten wir leider nicht auf diese Daten zurückgreifen.

Die Ernährung der Ferkel erfolgte in den ersten vier Lebenswochen ausschließlich mit Sauenmilch. Ab der fünften Lebenswoche wurde den Ferkeln zusätzlich konventionelles Ergänzungsfutter für Saugferkel angeboten, um eine Gewöhnung ans Alleinfutter zu erreichen. Eine Woche vor dem Versuchsende, das im Alter von 6 Wochen stattfand, wurden die Ferkel von der Sau abgesetzt. Diese Woche der mutterlosen Aufzucht wurde eingeschoben, um den Einfluss der Vitamin-D-haltigen Muttermilch so gering wie möglich zu halten.

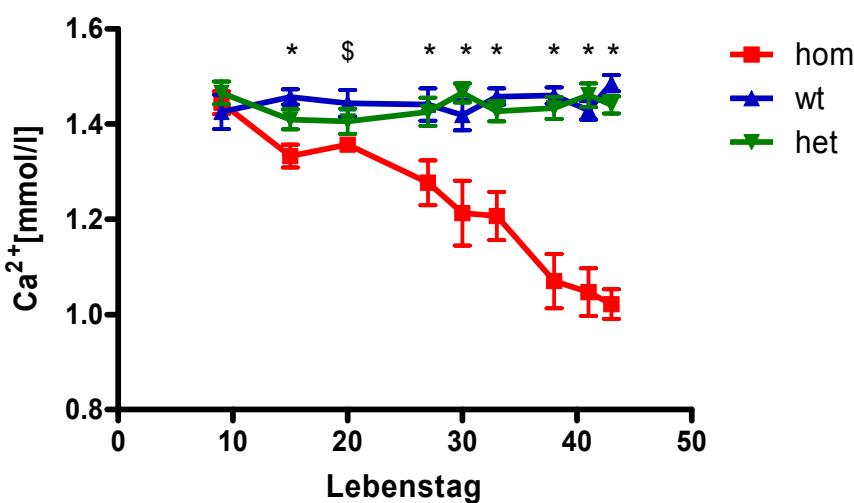


Abb. 8. Entwicklung des ionisierten Calciumgehaltes im Vollblut von PVDR 1-Ferkeln.
 hom, homozygote Merkmalsträger der PVDR 1-Erkrankung, n=6; het, heterozygote Merkmalsträger der PVDR 1-Erkrankung, n=9; wt, Wildtyp, n=9. * entspricht $p < 0,05$ (hom vs. het, wt); \$ entspricht $p < 0,05$ (hom vs. wt); MW \pm S.E.M.

Abb. 8 zeigt, dass kein signifikanter Unterschied des ionisierten Calciumgehaltes im Vollblut zwischen den heterozygoten Ferkeln und den Wildtyp-Ferkeln besteht. Allerdings ist bereits am Tag 15 ein signifikanter Unterschied zwischen den

homozygoten Tieren und den Wildtyp-Tieren bzw. den heterozygoten Ferkeln zu beobachten. Die homozygoten Ferkel waren zum Zeitpunkt der Organentnahme für den SGS-Test bereits deutlich hypocalcämisch, zeigten jedoch keine gesundheitlichen Beeinträchtigungen.

4.5 SGS-Test

Der SGS-Test soll Aufschluss geben, ob sich *in vitro* die Glucose-stimulierte Insulinsekretion der Langerhans-Inseln von PVDR 1-Schweinen und von Wildtyp-Schweinen unterscheiden. Weiters sollte die Wirkung von Vitamin D auf die Insulinsekretion der beiden Genotypen evaluiert werden.

20 Inseln wurden 8 Stunden in den drei verschiedenen Medien (Medium, Medium plus 1,25(OH)₂-Vitamin D und Medium plus dem Vehikel Alkohol) inkubiert. Nach einem einstündigen Prekonditionierungs-Schritt, wurden die Inseln mit einer Glucose-Lösung stimuliert und Proben nach 10 Minuten gezogen. Die Proben wurden mittels porzinem Insulin ELISA-Assay ausgewertet.

Insulinsekretion nach 10 Minuten

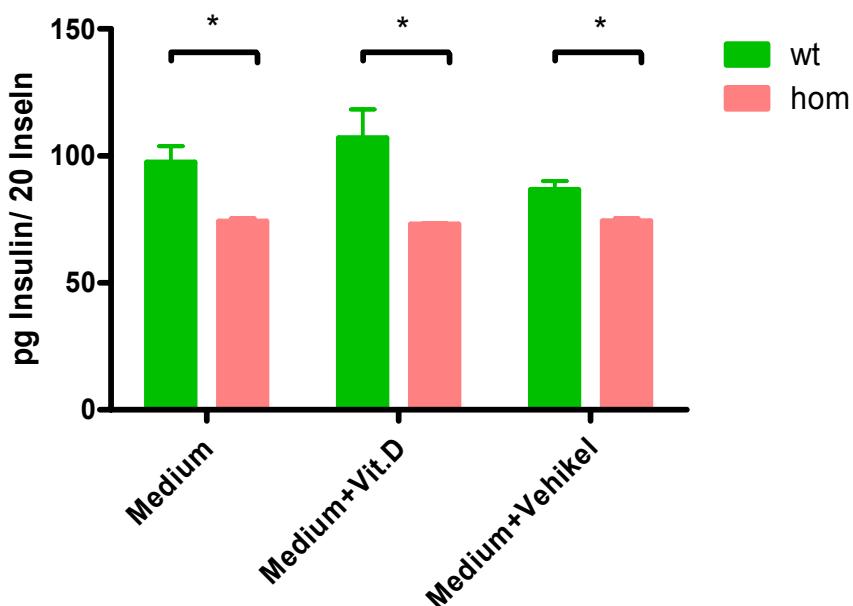


Abb. 9. Glucose-induzierte Insulinsekretion nach 10 Minuten. hom, Pankreas-Inseln von homozygoten Merkmalträgern (n=4) der PVDR 1-Erkrankung; wt, Pankreas-Inseln von Ferkeln (n=5) mit dem Genotyp Wildtyp; MW \pm S.E.M.* entspricht $p < 0,05$

In diesem Versuch (Abb. 9) konnte eine signifikant geringere Insulinsekretion der homozygoten Tiere unabhängig vom Medium gezeigt werden. Eine stimulierende Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{-Vitamin-D}$ auf die Insulinsekretion der PVDR 1-Inseln konnte nicht detektiert werden. Dennoch konnte zumindest eine tendenzielle Verbesserung der Insulinsekretion durch Zugabe von $1,25(\text{OH})_2\text{-Vitamin D}$ der Inseln der Wildtyp-Tiere erkannt werden.

4.6 Wirkungstests mit Ferkeln

Da mit den Wirkungstests bei adulten PVDR 1-Schweinen (Punkt 4.3.) das Ziel Normocalcämie zu etablieren nicht erreicht werden konnte, wurde ein Wirkungstest mit Ferkeln durchgeführt. Es ist bekannt, dass Ferkel in den ersten Lebenstagen die Möglichkeit besitzen, Vitamin D-unabhängig intestinal Calcium zu absorbieren (Punkt 2.2.4.) wurde versucht mittels eines speziellen Milchaustauscherfutters (MAT) die Calciumhomöostase positiv zu beeinflussen. Die Versuchs-MAT unterschieden sich durch die Beimischung von DFA III (6%) (MAT DFA III) und Xylitol (30%) und eine Steigerung des Calcium/Phosphor-Gehaltes vom konventionellen MAT. Die

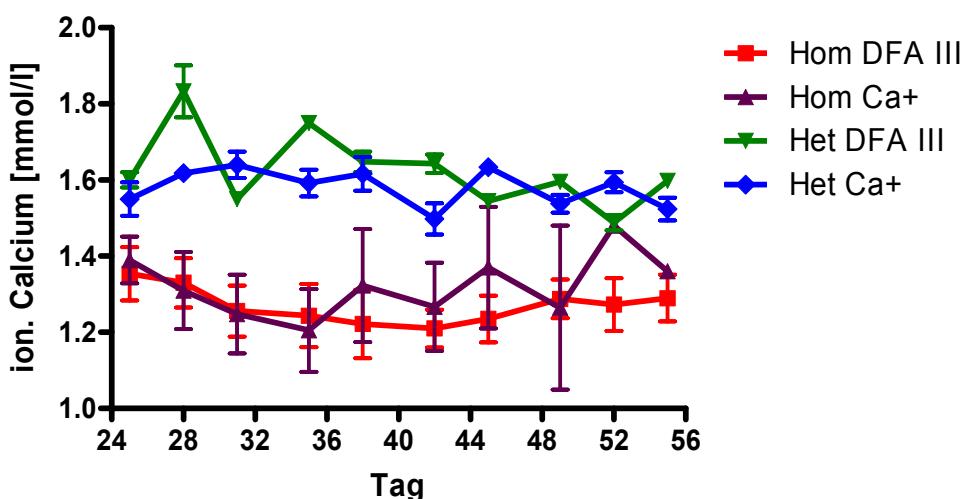


Abb. 10. Verlauf des ionisierten Calciumgehaltes im Vollblut von Ferkeln bei Aufzucht mit unterschiedlich supplementierten MAT. Hom DFA III: homozygote Merkmalträger der PVDR 1-Erkrankung (n=5) gefüttert mit MAT DFA III; Hom Ca+: homozygote Merkmalträger der PVDR 1-Erkrankung (n=4) gefüttert mit MAT Ca+; Het DFA III: heterozygote Merkmalträger der PVDR 1-Erkrankung (n=4) gefüttert mit MAT DFA III; Het Ca+: heterozygote Merkmalträger der PVDR 1-Erkrankung (n=5) gefüttert mit MAT Ca+; MW \pm S.E.M.

Kontrollgruppe wurde mit einem MAT (MAT Ca+) versorgt, das als einzige Änderung zum herkömmlichen MAT einen erhöhten Calcium/Phosphor-Gehalt aufwies.

Abbildung 10 zeigt, dass die Angleichung der ionisierten Calciumwerte der homozygoten Tiere an die der heterozygoten Tiere durch Zufüttern von DFA III (6%) nicht erreicht werden konnte. Dennoch scheint DFA III einen Einfluss auf den Calciumhaushalt von Ferkeln zu haben, die ein funktionfähiges Vitamin-D-Hormonsystem besitzen. Diese Tendenz ist besonders am Tag 28 und 35 an den Calcium-Messwerten der het DFA III Gruppe ersichtlich.

In der Versuchsphase konnten bei allen hom-Versuchsgruppen klinische Ausbrüche der PVDR 1-Erkrankung beobachtet werden. Resultierend aus den klinisch notwendigen Versuchsabbrüchen reduzierten sich die Tierzahlen der Versuchsgruppen. In der Gruppe hom DFA III musste ein Ferkel am 32. Lebenstag euthanasiert werden. Die Gruppe hom Ca+ wurde durch mehrere Ausfälle dezimiert. Am 38., 44, und 50. Lebenstag wurde jeweils ein Ferkel eingeschläfert.

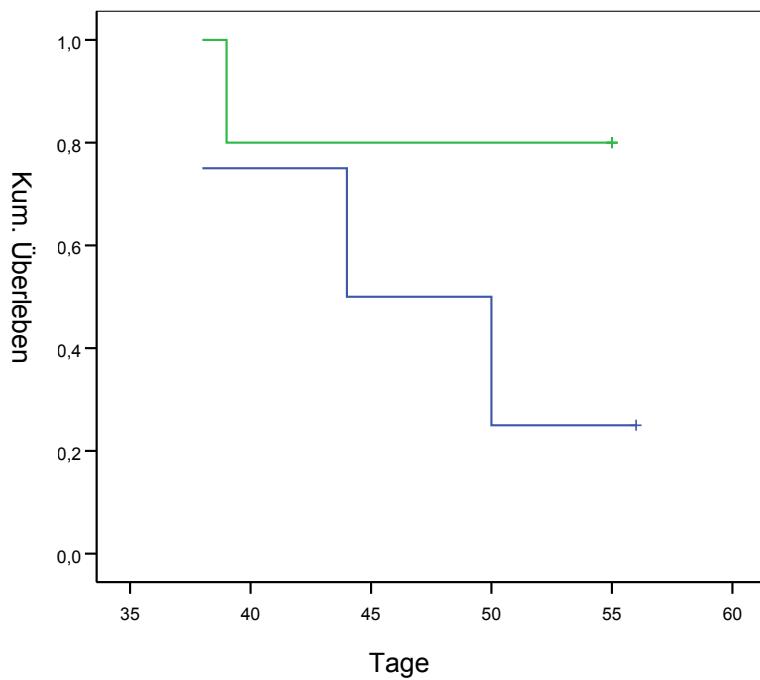


Abb. 11. Überlebensfunktion. Während der Versuchsperiode hat die hom DFA III Gruppe (grüne Linie) eine Überlebensrate von 80%, die hom Ca+ Gruppe (blaue Linie) eine Überlebensrate von 25%.

Die Überlebensfunktion in Abb. 11 und der Gruppenvergleich in Abb. 12 lassen auf einen positiven Einfluss des DFA III auf den klinischen Ausbruch der Erkrankung schließen. Wie in der Abb. 11 dargestellt, ist ein deutlicher Unterschied im Überleben der hom DFA III Gruppe mit 80% und der Ca+ Gruppe mit 25% sichtbar.

Die Überlebensrate spiegelt sich in auch in der Abbildung 12 wieder. Die Versuchstiere der DFA III Gruppe überwiegen am 55. Lebenstag. Ein Ferkel (792) zeigte vom 43. bis 45. Lebenstag die Symptome eines beginnenden Ausbruches der PVDR 1-Erkrankung, wie vermehrtes Liegen und Fressunlust. Diese Symptome verschwanden jedoch und die Konzentration des ionisierten Calciums stabilisierte sich.

Dass der Abfall des ionisierten Calciums im Blut der PVDR 1-Ferkel individuell verschieden ist, zeigt das Tier 808, das als einziges seiner Gruppe (hom Ca+) die ganze Versuchsdauer ohne Symptome aufzuweisen überlebt. Am 52. Lebenstag erreicht sein Gehalt an ionisiertem Calcium im Blut sogar fast den der het DFA III Gruppe (siehe Abb.10).

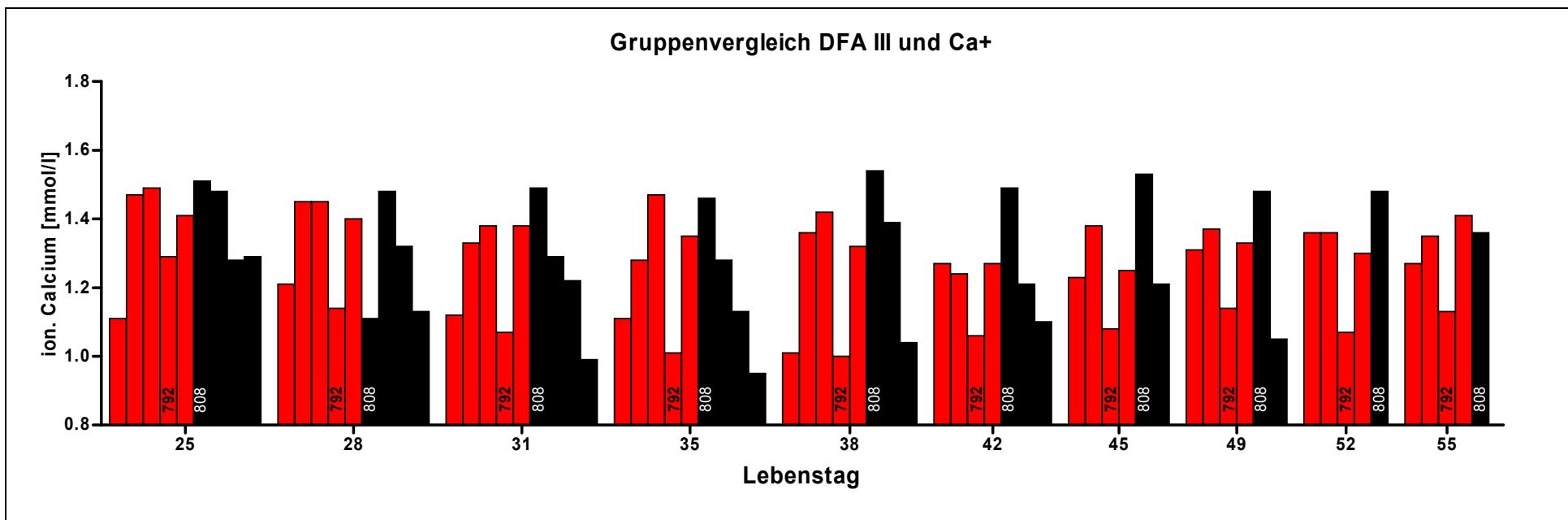


Abb. 12. Gruppenvergleich der Werte des ionisierten Calciums im Vollblut. Die roten Balken stellen die Messwerte der Tiere der hom DFA III Gruppe und die schwarzen Balken die der hom Ca+ Gruppe dar. Die Messwerte der Tiere 792 und 808 wurden beschriftet.

Der Versuch, über den Wirkstoff Xylitol im MAT normocalcämische Bedingungen im Ferkel zu schaffen, scheiterte an der Proteinversorgung der Probanden. Die Tiere nahmen das Sojaprotein mit dem der Milchaustauscher angereichert wurde, in zu geringem Ausmaß auf. Die Gewichtsentwicklung blieb dadurch hinter den anderen Gruppen signifikant zurück. Keine signifikanten Unterschiede des mittleren Körpergewichts wurden in den anderen Versuchsgruppen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Die Angleichung der ionisierten Calciumspiegel der homozygoten Tiere an die heterozygoten Tiere konnte mit einem DFA III-Zusatz in dieser Konzentration im MAT nicht erreicht werden. Dennoch scheint sich der Zusatz positiv auf die klinischen Symptome der PVDR 1-Erkrankung auszuwirken.

5 Diskussion

Die PVDR 1-Versuchstiere müssen Vitamin D-unabhängige normocalcämische Bedingungen aufweisen, um den direkten Einfluss von Vitamin D auf die Langerhans-Inseln *in vivo* ersichtlich zu machen. Da es bekannt ist, dass Hypocalcämie an sich die Funktion des endokrinen Pankreas beeinträchtigt, wurde mit Hilfe von speziellen Diäten versucht, diese normocalcämischen Bedingungen zu erzeugen. Die dafür verwendeten Futterzusätze wurden zuvor in Toleranztests verfüttert, um einen negativen Effekt auf die Gesundheit der Versuchsschweine auszuschließen.

Diese Vorversuche waren zusätzlich Grundlage zur Feststellung der verträglichen Konzentrationen der Wirkstoffe in den jeweiligen Futtermischungen der weiteren Untersuchungen. Die in diesem Test verwendeten Konzentrationen wurden aus Arbeiten übernommen, die sich bereits mit den Testsubstanzen beschäftigt hatten. So befassten sich finnische Forscher mit der Wirkung von Xylitol auf die Knochenmechanik von Ratten. In diesen Studien wurden Futtermittel verwendet, die bis zu 20% Xylitol beinhalteten. Dabei wurden transiente Durchfälle beobachtet, die aber nach einer adäquaten Adoptionsphase wieder verschwanden (MATTILA et al., 1999). Unsere Experimente ergaben, dass ein Zusatz von 20% bis 30% Xylitol im Futter weder im Ferkel noch im adulten Schwein Diarröh verursacht.

Die Verträglichkeit von Lactose in verschiedenen Konzentrationsstufen wurde beim Schwein bereits getestet (AHLBORN, 1993). Im Gegensatz zu dem letztgenannten Versuch, bei dem rund 5 Monate alten Minipigs Rationen bis 56% Lactose in der Trockenmasse ohne Probleme verfüttert werden konnten, trat breiiger Kot bei unseren Versuchen bereits bei einer verfütterten Konzentration von 25% Lactose in der ursprünglichen Substanz auf. Beim Anbieten einer Futtermischung mit 50% in der ursprünglichen Substanz wurde zusätzlich auch das Auftreten von flüssigem Kot beobachtet. Der Grund für die unterschiedliche Verträglichkeit könnte sein, dass das Alter der Tiere im vorliegenden Versuch maximal 65 Tage betrug. Bei unserem Wirkungstest mit adulten Schweinen führte die Verwendung von 35% Lactose in der Ration zu keinem Durchfall.

Im Fall von Maltitol lagen noch keine vergleichbaren Daten über die Verträglichkeit bei Ferkeln oder adulten Schweinen vor. Allerdings war bekannt, dass 10% Maltitol

im Futter von Ratten (GODA et al, 1992; 1995) keine Verdauungstörungen verursachen, ebenso wenig wie die von uns getesteten 14% Maltitol bei Ferkeln und 20% bei adulten Schweinen.

Weiters wurden Fütterungsversuche mit Lactulose beschrieben, bei denen 14% der Substanz in der Trockenmasse nur geringfügige Beeinflussung des Kotes bewirkte (KAMPHUES et al., 2003). Diese Konzentration im Testfutter unseres Vorversuchs wirkte sich weder auf die Gewichtszunahme noch auf die Gesundheit unserer Ferkel aus. Der Einsatz von 20% Lactulose bei den adulten Schweinen im Wirkungstest erzielte dasselbe Resultat.

Auf die Testung von Difruktosedianhydrid III (DFA III) im Vorversuch wurde verzichtet, da mehrere Studien, sowohl mit Ratten als auch mit humanen Probanden durchgeführt worden waren und daher keine Intoleranz bei einer Verfütterung von 6% in der Ration zu befürchten war.

Für die Durchführung der Tests wurde die Gruppenhaltung der Einzelhaltung unter dem Aspekts des Wohlbefindens der Versuchtiere vorgezogen. Wie in der Abb. 6 ersichtlich unterscheiden sich die vier Testsubstanzen in ihrer Wirkung auf die Körpergewichtsentwicklung der Versuchsferkel trotz verschieden großer Würfe nur marginal.

Das Ergebnis des Wirkungstests mit adulten Schweinen zeigt, dass es nicht möglich ist, mit den von uns verwendeten Konzentrationen an Lactose, Lactulose, Maltitol, Xylitol und DFA III im Futter Normocalcämie bei adulten PVDR 1-Schweinen zu erreichen. Das Alter der mit Vitamin D vortherapierten Schweine dieses Versuchs, betrug rund 10 Monate.

Unser Ergebnis bezüglich der Testsubstanz Lactose deckt sich mit dem Resultat einer Forschungsgruppe, die mit einem anderen Versuchsaufbau die Wirkung von Lactose auf PVDR 1-Schweine getestet hat (SCHLUMBOHM et al., 2004).

Jedoch scheint es bei der Xylitol-Gruppe ab dem 4. Tag der Gewöhnungsfütterung einen Aufwärtstrend der ionisierten Calciumwerte im Vollblut zu geben (Abb. 7 B). Diesen Effekt, wenn auch deutlich schwächer, erzielten wir durch die Lactulose-Fütterung von 20% im Futter am 3. Tag des Wirkungstests (Abb. 7 D). Dieser positiven Entwicklung der ionisierten Calciumwerte folgte dann ein Einbruch, dessen Tiefpunkt am 12. Tag des Tests erreicht war. Die letzten zwei Drittel der

Verlaufskurve wies aber wieder eine tendenzielle Steigerung der Calciumwerte auf. Die Konzentrationen des ionisierten Calciums im Vollblut jener Schweine, die mit Lactose, Maltitol und DFA III supplementiertes Futter erhielten, sanken kontinuierlich und zeigten nur minimale Reaktionen auf die Zufütterung dieser Substanzen.

Ein Problem bei diesen Versuchen ergab sich aus der Tatsache, dass trotz enger genetischer Verwandtschaft (Wurfgeschwister) die Tiere sehr individuell auf die Beendigung der Vitamin D-Therapie reagierten. Aus diesem Grund kann die kumulative Steigung der Kurven nicht zur Auswertung herangezogen werden. Beispielsweise besitzt die Kurve der Maltitol-Gruppe (Abb. 7 A) grundsätzlich eine größere Steigung als jene der DFA III-Gruppe (Abb. 7 E). Daraus kann aber nicht geschlussfolgert werden, welche Substanz eine bessere oder schlechtere Wirkung auf die Calciumaufnahme hat.

Des Weiteren scheint auch der Zeitpunkt des Versuchs einen Effekt auf die Abnahme des ionisierten Calciums im Blut zu haben. Nicht gezeigte Daten bekräftigen die Vermutung, dass eine gewisse Adaption an den chronischen Calciummangel eintritt. Durch mehrmalige Wiederholung von Testphasen, Vitamin-D-Therapien und Auswaschphasen (siehe Punkt 3.5.2), verlängerte sich einerseits die Absinkdauer und andererseits stellte sich der ionisierte Calciumgehalt auf einen Wert von rund 1 mmol/l Ca^{2+} im Blut ein. In dieser teilweise mehrmonatigen Plateau-Phase sind keine klinischen Symptome einer PVDR 1-Erkrankung erkennbar gewesen. Daher war es auch nicht möglich, die zwei geplanten Kontrollgruppen-Versuche durchzuführen. Mit Hilfe dieser Gruppen hätte der Abfall des ionisierten Calciumgehaltes im Blut (i) mit konventionellem Futter und (ii) mit konventionellem Futter mit gesteigertem Calcium/Phosphorgehalt dokumentiert werden sollen. Für eine neuerliche Testung dieser oder anderer Substanzen wäre daher ein anderer Versuchsaufbau mit einer erhöhten Tierzahl, um die individuellen Abfallgeschwindigkeiten des ionisierten Calciumgehaltes im Blut besser berücksichtigen zu können in Betracht zu ziehen.

Hinsichtlich neuer Experimente sollte auch die verringerte Futteraufnahme (Daten nicht gezeigt) der in den Versuchsfuttermischungen enthaltenen Zuckeralkohole Xylitol und Maltitol berücksichtigt werden. Aufgrund ihrer starken Süßkraft werden diese Substanzen auch als Zuckeraustauschstoffe verwendet. Die Gewöhnung an so stark gesüßtes Futter kann sich bei adulten Schweinen als problematisch erweisen.

Da die Etablierung von Normocalcämie bei adulten Schweinen nicht den gewünschten Erfolg brachte, wurde um die Vitamin-D-unabhängige Calciumaufnahme in diesem Lebensabschnitt zu nutzen ein Fütterungsversuch mit Ferkeln durchgeführt.

Der Wirkungstest mit Ferkeln zeigte, dass das Anbieten von MAT mit gesteigerten Calcium- und Phosphorgehalten mit und ohne DFA III zu erhöhten ionisierten Calciumwerten im Vollblut von Ferkeln führte, als im Vergleich zu Saugferkel die mit Sauenmilch und Zusatzfutter ernährt wurden (Abb. 10 und Abb. 8). Dies traf auf heterozygote sowie homozygote Ferkel zu. Die Ferkel im Wirkungstest (Abb. 10) wurden am 22. Lebenstag abgesetzt und anschließend in Stoffwechselkäfigen gehalten. Im Gegensatz dazu, wurden die Ferkel im Verlaufsversuch (Abb. 8) nach der 5. Lebenswoche abgesetzt und auf Teilspaltenboden aufgestallt.

Die erhöhten ionisierten Calciumwerte der heterozygoten Ferkel in der DFA III-Gruppe schienen sich im Versuchsverlauf allmählich im physiologischen Bereich einzupendeln. Diese Daten legen nahe, dass DFA III die Calciumaufnahme in den heterozygoten Tieren stimuliert und daher eine Gegenregulation notwendig ist, um die anfangs erhöhten Calciumwerte abzusenken (Abb. 10).

Die höhere Überlebensrate der homozygoten Tiere in der DFA III-Gruppe im Gegensatz zur Ca+-Gruppe weist darauf hin, dass möglicherweise ein Zusammenhang zwischen dem Ausbruch der PVDR 1-Erkrankung und der An- bzw. Abwesenheit von DFA III im MAT besteht. Um diese Theorien zu bestätigen und um signifikante Unterschiede zu erhalten, müsste dieser Fütterungsversuch mit einer größeren Tierzahl wiederholt werden, damit der Einfluss einzelner Tiere auf das Gesamtergebnis reduziert werden kann.

Ob Xylitol im MAT ähnliche Effekte bei den Versuchstieren auslöst, konnte wegen der schlechten Gewichtszunahme der Probanden und der geringen Tieranzahl von nur zwei homozygoten Tieren im Wurf mit 8 Ferkeln nicht untersucht werden. Hauptverantwortlich für die schlechte Entwicklung der Tiere war nicht der fehlende Gehalt an Rohprotein im MAT (siehe Tab. 22 und Tab. 23) sondern die mangelhafte Aufnahme des Sojaproteinkonzentrats, das sich zu schnell im angerührten MAT absetzte. Somit ist entweder eine Reduktion des Kohlenhydratanteils (Xylitol) oder die Verwendung einer anderen Proteinquelle eine grundlegende Voraussetzung für einen möglichen Folgeversuch.

Durch den Verlust eines Wurfes konnte die Wirksubstanz Lactulose im MAT nicht auf dessen Effekt auf die Konzentration des ionisierten Calciums im Vollblut von Ferkeln geprüft werden. Ebenso konnte keine Kontrollgruppe mit handelsüblichem, konventionellem MAT getestet werden.

Der Vergleich des Ca^{2+} -Gehaltes im Vollblut von homozygoten, heterozygoten und Wildtyp-Ferkeln im Verlaufsversuch zeigte, dass bereits ab dem 15. Lebenstag ein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren des homozygoten Genotyps und den Ferkeln der übrigen Genotypen besteht (Abb. 8). Um *in vivo*-Versuche, die normocalcämische Bedingungen benötigen, durchführen zu können, müssten mit diesen spätestens am 15. Lebenstag begonnen werden. Ob aber die Entwicklung und die Erreichung der vollen Funktionsfähigkeit aller Organsysteme bis zu diesem Zeitpunkt völlig abgeschlossen sind, bedarf weiterer Untersuchungen.

Der SGS-Test der Pankreas-Inseln von 43 Tage alten homozygoten und Wildtyp-Ferkeln ergab das Resultat, dass die Insulinsekretion bei Wildtyp-Tieren signifikant höher ist als bei homozygoten Tieren. Weiters bestand nur bei den Wildtyp-Tieren die Tendenz zu einer gesteigerten Insulinsekretion, durch Inkubation mit $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D. Warum $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D, trotz vorhandenem VDR in den homozygoten Ferkel keinen positiven Einfluss auf die Insulinsekretion der Inselzellen hat, könnte damit erklärt werden, dass die Expression von VDR oder anderen Proteinen durch höhere $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin-D- oder Ca-Konzentrationen im Blut beeinflusst wird. Da diese homozygoten Versuchstiere nie physiologische $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin-D-Gehalte aufwiesen, könnte zu wenig VDR exprimiert worden sein. Dadurch könnte die Synthese vieler Proteine, unter anderem Insulin, moduliert worden sein (BOURLON et al 1999). Allerdings ist zurzeit sehr wenig über die Regulation der Bildung von VDR im endokrinen Pankreas bekannt.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, wurde von einer Arbeitgruppe aus den U.S.A. um vielfach höhere Insulinsekretion nach Glucose-Stimulation bei Schweine-Langerhans-Inseln beobachtet. Sie verwendeten ein Durchfluss-System mit 20% porzinem Serum im Medium (CHING et al, 2001). Wir hingegen verwendeten ein statisches System mit einem Serum-freien Medium, da wir den Einfluss, des im Serum enthaltenen Vitamin D minimieren wollten. Ausserdem sollte aufgrund von Erkenntnissen, die am EASD Islet Study Group Symposium 2007, Brüssel, Belgien

vorgestellt wurden, generell auf Serum in der Kultur vor Glucosestimulationsversuchen verzichtet werden, da angenommen wird, dass hyperphysiologische Insulinsekretionen provoziert werden. Dafür spricht auch, dass die Sekretionsmengen einiger präsentierter Studien, bei denen Mäuse- und Menscheninseln getestet wurden vergleichbare Ergebnisse lieferten, wie die von uns bestimmten (SPEIDEL et al., 2007; RAMRACHEYA et al., 2007). Vom Einsatz von fötalem Kälberserum wird wegen dem Gehalt an teilweise noch unbekannten Faktoren, die Wachstum und Insulinsekretion beeinflussen können, ebenfalls abgeraten. Des Weiteren ist fötales Serum auch bei der Anwendung für Zellen aus reiferen oder adulten Zellen als unphysiologisch anzusehen.

Die verminderte Reaktion der Inseln aus den homozygoten Tieren auf den Glucosestimulus im Vergleich zu jenen aus Wildtyp-Ferkeln, könnte an einer Beeinträchtigung durch die hypocalcämischen Bedingungen bereits zu Lebzeiten liegen. Auf diese Beeinträchtigung könnte sich die Insel-Isolation zusätzlich negativ auswirken.

Die Durchführung der SGS-Tests in und mit Glasgeräten, sowie der Testung von freischwimmenden Inseln wären für weitere Untersuchungen eine Überlegung wert, da der Insulinverlust durch Adhäsion an Kunststoffmaterialien nicht unterschätzt werden darf.

Die aus dieser Studie hervorgegangenen interessanten Ansatzpunkte könnten mit Hilfe neuer Versuche mit höheren Tierzahlen und optimierter Methodik neue Ergebnisse liefern, die die Interaktion des Vitamin-D-Hormonsystems mit der endokrinen Pankreasfunktion näher beleuchten.

6 Zusammenfassung

Verschiedene Studien deuten auf eine Beteiligung des Vitamin-D-Hormonsystems in der Entwicklung von Diabetes mellitus hin. Aufgrund eines Defekts in der $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin-D-Synthese stellt das PVDR 1-Schwein ein sehr gutes Modell zur Erforschung der Wirkung von $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D auf das endokrine Pankreas dar. Die Evaluierung des direkten Einflusses von Vitamin D auf die Langerhans Inseln *in vivo* erfordert, dass in den Versuchstieren Vitamin D-unabhängige normocalcämische Bedingungen herrschen, da Hypocalcämie per se eine verminderte Funktion des endokrinen Pankreas mit sich bringt. Der Hauptteil dieser Arbeit bestand in den Bestrebungen, diese normocalcämischen Bedingungen dietatisch mit Lactose, Lactulose, Maltitol, Xylitol und Difruktosedianhydrid III (DFA III) zu erzeugen. Vor der Testung der Substanzen auf deren Vermögen den ionisierten Calciumspiegel im Blut zu erhöhen, wurden Toleranztests durchgeführt, um einen negativen Effekt auf die Gesundheit der Versuchsschweine auszuschließen. Die Wirkungstests mit adulten Schweinen ergaben, dass Normocalcämie durch die Zufütterung von Lactose (35%), Lactulose (20%), Maltitol (30%), Xylitol (30%) oder DFA III (6%) in der ursprünglichen Substanz beim PVDR 1-Schwein nicht erreicht werden kann. Dennoch konnten wir zeigen, dass vor allem Xylitol und in abgeschwächter Form auch Lactulose eine tendenzielle Steigerung des ionisierten Calciumgehaltes im Vollblut von homozygoten Schweinen bewirkt. Nachdem in adulten Schweinen keine Normocalcämie mittels unterschiedlich angereichertem Futter erreicht werden konnte, sollte im zweiten Teil der Arbeit überprüft werden, ob mit Hilfe von supplementierten Milchaustauscherfutter (MAT) eine Normalisierung des Calciumhaushaltes bei PVDR 1-Ferkeln möglich ist. Bei heterozygoten Ferkeln hatte DFA III tendenziell einen positiven Effekt auf die Calcium-Konzentration im Blut. Bei homozygoten Ferkeln zeigte sich jedoch kein Effekt auf die Calcium-Konzentration im Blut. Deutliche Unterschiede in den Überlebensraten der Versuchsgruppen, nämlich 80% in der DFA III- und 25% in der Kontrollgruppe, lassen darauf schließen, dass DFA III eine günstige Wirkung auf die Entwicklung der Rachitis bei PVDR 1-Ferkeln hat. Zusätzliche *in vitro*-Untersuchungen mit Langerhans-Inseln von Wildtyp- und PVDR 1-Ferkeln, durchgeführt um die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D auf die Insulinsekretion zu überprüfen, ergaben, dass Vitamin D-stimulierte Wildtyp-Inseln höhere Insulinsekretionen aufwiesen. Die Insulinsekretionen der Pankreas-Inseln von

PVDR 1-Tieren, die signifikant niedriger waren als die der Wildtyp-Ferkel, konnten jedoch durch $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D nicht gesteigert werden. Aufbauend auf diese Studie könnten Folgeversuche mit anderen Substanzen und höheren Tierzahlen diesem Tiermodell eine höhere Aussagekraft verleihen.

7 Summary

Investigations regarding the dietary normalization of the calcium homeostasis and *in vitro* insulin secretion of Langerhans islets from PVDR 1 pigs

Several studies indicate an association between the vitamin D hormone system and diabetes mellitus. In this work we employed the PVDR 1 pig, which is characterized by a defect in $1,25(\text{OH})_2$ vitamin D synthesis, to further investigate the roll of vitamin D for the endocrine pancreas. To evaluate direct influences of vitamin D it is necessary to establish normocalcemic conditions. Therefore, the main focus of this project was to generate normocalcemia in PVDR 1 homozygous pigs by testing different rescue diets. Within this study normal food was supplemented with lactose, lactulose, maltitol, xylitol and difructoseanhydride (DFA III). The tolerance to these substances was evaluated in preliminary tests. In the final experiments, the diets offered to adult PVDR 1 pigs were supplemented with 35% lactose, 20% lactulose, 30% maltitol, 30% xylitol or 6% DFA III, respectively. Unfortunately, none of these diets was able to increase ionized calcium levels. However, xylitol and to a lesser extent lactulose induced slight increases in calcium values.

Aim of the second part of the study was to establish normocalcemia in piglets by feeding milk replacer supplemented with xylitol or DFA III. Here, we could show that in piglets heterozygous for PVDR 1, i.e., harboring a functional vitamin D hormone system, DFA III as a dietary supplement seemed to exert a positive effect on the calcium balance. No significant effect on blood calcium concentration could be detected in homozygous piglets. Additionally, the survival rates of the DFA III treated homozygous group were clearly elevated to 80% as compared with the control group (25%), suggesting an positive influence of DFA III on the manifestation of the PVDR 1 disease.

Further, we examined the ability of $1,25(\text{OH})_2$ vitamin D to stimulate insulin secretion in *in vitro* experiments. Although insulin secretion of islets from homozygous PVDR 1 pigs was significantly reduced compared to wildtype, vitamin D was not able to normalize the reduced insulin secretory capacity in PVDR 1 islets. In contrast, vitamin D increased insulin secretion in wildtype islets.

Further studies with higher animal numbers and additional dietary supplements might increase the utility of the PVDR 1 pig model.

8 Literaturverzeichnis

- AHLBORN, H.H., 1993, Einfluß von Lactose auf die scheinbare Verdaulichkeit (praecaecal und insgesamt) von Stickstoff und Mineralstoffen beim Schwein. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.
- ALMAWI, W.Y., TAMIM, H. und AZAR, S.T., 1999, Clinical review 103: T helper type 1 and 2 cytokines mediate the onset and progression of type I (insulin-dependent) diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**: 1497-1502
- ALROY, I., TOWERS, T.L. und FREEDMAN, L.P., 1995, Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 5789-5799
- ALUMETS, J., HAKANSON, R. und SUNDLER, F., 1983, Ontogeny of endocrine cells in porcine gut and pancreas. *Gastroenterology*. **85**: 1359-1372
- AXEN, E., und BERGMAN, T. und WIKVALL, K., 1992, Purification and characterization of a vitamin D₃ 25-hydroxylase from pig liver microsomes. *Biochem. J.* **287**: 725-731
- BARTH, C.A., PFEUFFER M. und SCHOLTISSEK J., 1990, Animal models for the study of lipid metabolism, with particular reference to the Göttingen minipig. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **S20**: 39-49
- BEAULIEU, C., KESTEKIAN, R., HAVRANKOVA, J. und GASCON-BARRE, M., 1993, Calcium is essential in normalizing intolerance to glucose that accompanies vitamin D depletion in vivo. *Diabetes* **42**: 35-42
- BECKERS, C.J. und BALCH, W.E., 1989, Calcium and GTP: essential components in vesicular trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *J. Cell. Biol.* **108**: 1245-1256
- BELKACEMI, L., BÉDARD, I., SIMONEAU, L. und LAFOND, J., 2005, Calcium channels, transporters and exchangers in placenta: a review. *Cell Calcium* **37**: 1-8
- BENTOUIMOU, N., VAUGELADE, P., BERNARD, F., CHERBUT, C. und DARCY-VRILLON, B., 1997, Compared metabolic effects of seaweed fibres in pigs and humans. *EAAP Publ.* **88**: 57-60
- BERG, J.M., TYMOCZKO, J.L. und STRYER, L., 2007, Signaltransduktionswege. In: *Biochemie*. 6.Auflage, Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, pp. 439-440; 510
- BERGEIM, O., 1926, intestinal chemistry. V. Carbohydrates and calcium and

- phosphorus absorption. *J. Biol. Chem.* **70**: 35
- BERRIDGE, M.J., 2003, Cardiac calcium signalling. *Biochem. Soc. Trans.* **31**: 930-933
- BEYNE, A.C., KAPPERT, H.J. und YU, S., 2001, Dietary lactulose decreases apparent nitrogen absorption and increases apparent calcium and magnesium absorption in healthy dogs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* **85**: 67-72
- BLAND, R., HUGHES, S.V., STEWART, P.M. und HEWISON, M., 1998, Direct regulation of 25-hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase by calcium in a human proximal tubule cell line. *Bone* **23**: S260
- BLAND, R., MARKOVIC, D., HILLS, C.E., HUGHES, S.V., CHAN, S.L., SQUIRES, P.E. und HEWISON, M., 2004, Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase in pancreatic islets. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **89-90**: 121-125
- BÖCK, P. und LIEBICH, H., 2004, Endokrines System. In: *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere*. 4. Auflage (Ed.: Liebich H.), Schattauer GmbH, Stuttgart, pp. 184-186; 236-237
- BOONSTRA, A., BARRAT, F.J., CRAIN, C., HEATH, V.L., SAVELKOUL, H.F. und O'GARRA, A., 2001, 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J. Immunol.* **167**: 4974-4980
- BOUILLOU, R., VAN CROMPHAUT, S. und CARMELIET, G., 2003, Intestinal calcium absorption: molecular vitamin D mediated mechanisms. *J. Cell. Biochem.* **88** : 332-339
- BOURLON, P.M., BILLAUDEL, B. und FAURE-DUSSERT, A., 1999, influence of vitamin D3 deficiency and 1,25 dihydroxyvitamin D3 on de novo insulin biosynthesis in the islets of the rat endocrine pancreas. *J. Endocrinol.* **160**: 87-95
- BOYAN, B.D., DEAN, D.D., SYLVIA, V.L. und SCHWARTZ, Z., 1994, Nongenomic regulation of extracellular matrix events by vitamin D metabolites. *J. Cell. Biochem.* **56**: 331-339
- BRECHBÜHLER, T., KAESLIN, M. und WYLER, F., 1984, Reference values for various blood constituents in young minipigs. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **22**:301-304
- BROMMAGE, R., BINACUA, C., ANTILLE, S. und CARRIE, A.L., 1993, Intestinal calcium absorption in rats is stimulated by dietary lactulose and other resistant sugars. *J. Nutr.* **123**: 2186-2194

- BRONNER, F., 1992, Current concepts of calcium absorption: An overview. *J. Nutr.* **122**: 641-643
- BRONNER, F., PANSU, D. und STEIN, W.D., 1986, An analysis of intestinal calcium transport across the rat intestine. *Am. J. Physiol.* **250**: G561-G569
- BROWN, A.J., DUSSO, A. und SLATOPOLSKY, E., 1999, Vitamin D. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **277**: 157-175
- BROWN, A.J., ZHONG, M., FINCH, J., RITTER, C. und SLATOPOLSKY, E., 1995, The roles of calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the regulation of vitamin D receptor expression by rat parathyroid glands. *Endocrinology* **136**: 1419-1425
- BROWN, E.M. und MACLEOD, R.J., 2001, Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol. Rev.* **81**: 239-297
- BROWN, E.M., 1991, Extracellular Ca²⁺ sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca²⁺ and other ions as extracellular (first) messenger. *Physiol. Rev.* **71**: 371-411
- CADE, C. und NORMAN, A.W., 1986, Vitamin D3 improves impaired glucose tolerance an insulin secretion in the vitamin D-deficient rat in vivo. *Endocrinology* **119**: 84-90
- CANTORNA, M.T., WOODWARD, W.D., HAYES, C.E. und DELUCA, H.F., 1998, 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a positive regulator for the two anti-encephalitogenic cytokines TGF-beta 1 and IL-4. *J. Immunol.* **160**: 5314-5319
- CANTORNA, M.T. und MAHON, B.D, 2004, Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **229**: 1136-1142
- CARAFOLI, E., 1987, Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 395-433
- CHAPMAN, M.J., und GOLDSTEIN, S., 1976, Comparison of the serum low density lipoprotein and of its apoprotein in the pig, rhesus monkey and baboon with that in man. *Atherosclerosis* **25**: 267-291
- CHARLEY, P. und SALTMAN, P., 1963, Chelation of calcium by lactose: its role in transport mechanisms. *Science* **139**: 1205-1208
- CHENG, J.B., LEVINE, M.A., BELL, N.H., MANGELSDORF, D.J. und RUSSEL, D.W., 2004, Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 7711-7715

- CHENG, J.B., MOTOLA, D.L., MANGELSDORF, D.J. und RUSSEL, D.W., 2003, Deorphanization of cytochrome P450 2R1: a microsomal vitamin D 25-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **278**: 38084-38093
- CHERTOW, B.S., SIVITZ, W.I., BARANETSKY, N.G., CLARK, S.A., WAITE, A. und DELUCA, H.F., 1983, Cellular mechanisms of insulin release: the effects of vitamin D deficiency and repletion on rat insulin secretion. *Endocrinology* **113**: 1511-1518
- CHING, C.D., HARLAND, R.C., COLLINS, B.H., KENDALL, W., HOBBS, H. und OPARA, E.C., 2001, A reliable method for isolation of viable porcine islet cells. *Arch. Surg.* **136**: 276-279
- CLARK, S.A., STUMPF, W.E. und SAR, M., 1981, Effect of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on insulin secretion. *Diabetes* **30**: 382-386
- CUNNINGHAM, J.G., 2002, Endocrine glands and their functions. In: *Textbook of veterinary physiology*. Third edition, (Ed.: Greco D., Stabenfeldt G.H.) Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, pp. 360-361
- DARDENNE, O., PRUD'HOMME, J., ARABIAN, A., GLORIEUX, F.H. und ST-ARNAUD, R., 2001, Target inactivation of the 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase gene (CYP27B1) creates an animal model of pseudovitamin D-deficiency rickets. *Endocrinology* **142**: 3135-3141
- DIXON, J.L., STOOPS, J.D., PARKER, J.L., LAUGHLIN, M.H., WEISMAN, G.A. und STUREK, M., 1999, Dyslipidemia and vascular dysfunction in diabetic pigs fed an atherogenic diet. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**: 2981-2992
- DONG, X., CRAIG, T., XING, N., BACHMAN, L.A., PAYA, C.V., WEIH, F., MCKEAN, D.J., KUMAR, R. und GRIFFIN, M.D., 2003, Direct transcriptional regulation of Rel B by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogs: physiologic and therapeutic implications for dendritic cell function. *J. Biol. Chem.* **278**: 49378-49385
- DONOWITZ, M. und WELSH, M.J., 1986, Ca²⁺ an cytosolic AMP in regulation of intestinal Na, K, and Cl transport. *Annu. Rev. Physiol.* **48**: 135-150
- DRAZNIN, B., SUSSMAN, K., KAO, M., LEWIS, D. und SHERMAN, N., 1987, The existence of an optimal range of cytosolic free calcium for insulin-stimulated glucose transport in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **262**: 14385-14388
- DRAZNIN, B., SUSSMAN, K.E., ECKEL, R.H., KAO, M., YOST, T. und SHERMAN, N.A., 1988, Possible role of cytosolic free calcium concentrations in

- mediating insulin resistance of obesity and hyperinsulinemia. *J. Clin. Invest.* **82**: 1848-1852
- DUSSO, A.S., BROWN, A.J. und SLATOPOLSKY, E., 2005, Vitamin D. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **289**: F8-F28
- DUSSO, A.S., THADHANI, R. und SLATOPOLSKY, E., 2004, Vitamin D receptor and analogs. *Semin. Nephrol.* **24**: 10-16
- ELLEGAARD, L., JOERGENSEN, K.D., KLASTRUP, S., HANSEN, A.K. und SVENDSEN, O., 1995, Haematologic and clinical chemical values in 3 and 6 months old Göttingen minipigs. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* **22**: 239-248
- ERBEN, R.G., 2005, Knochen und Calciumhomöostase. In: *Physiologie der Haustiere* (Ed.: von Engelhardt W, Breves G), Enke, Stuttgart, pp. 580-587
- ERBEN, R.G., SOEGIARTO, D.W., WEBER, K., ZEITZ, U., LIEBERHERR, M., GNIADECKI, R., MÖLLER, G., ADAMSKI, J. und BALLING, R., 2002, Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D. *Mol Endocrinol.* **16**: 1524-1537
- FORTH, W., HENSCHLER, D., und RUMMEL, W., 2001, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer Verlag München, Jena; Auflage: 8, pp 535-537
- FRASER, D. und SALTER, R.B., 1958, The diagnosis and management of various types of rickets. *Pediatr. Clin. Nort. Amer.* **5**: 417-441
- FRASER, D.R. and KODICEK, E., 1970, Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite. *Nature* **228**: 764-766
- FRIEDMAN, P.A., COUTERMARSH, B.A., KENNEDY, S.M. und GESEK, F.A., 1996, Parathyroid hormone stimulation of calcium transport is mediated by dual signaling mechanisms involving protein kinase A and protein kinase C. *Endocrinology* **137**: 13-20
- FUJITA, T., SAKAGAMI, Y., TOMITA, T., OKAMOTO, Y. und OKU, H., 1978, Insulin secretion after oral calcium load. *Endocrinol. Jpn.* **25**: 645-648
- FULLMER, C.S., 1992, Intestinal calcium absorption: calcium entry. *J. Nutr.* **122**: 644-650
- GARBEDIAN, M., HOLICK, M.F., DELUCA, H.F. und BOYLE, I.T., 1972, Control of 25-hydroxycolecalciferol metabolism by parathyroid glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 1673-1676
- GEDIK, O. und ZILELI, M.S., 1977, Effects of hypocalcemia and theophylline on

- glucose tolerance and insulin release in human beings. *Diabetes* **26**: 813-819
- GENTILI, C., MORELLI, S. und RUSSO DE BOLAND, A., 2003, Characterization of PTH/PTHrP receptor in rat duodenum: effects of ageing. *J. Cell. Biochem.* **88**: 1157-1167
- GODA, T., SURUGA, K., TAKASE, S., EZAWA, I. und HOSOYA, N., 1995, Dietary maltitol increases calcium content and breaking force of femoral bone in ovariectomized rats. *J. Nutr.* **125**: 2869-2873
- GODA, T., YAMADA, M., TAKASE, S. und HOSOYA, N., 1992, Effect of maltitol on intestinal calcium absorption in the rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokio)* **38**: 277-286
- GREGER, R., LANG, F. und OBERLEITHNER, H., 1978, Distal site of calcium reabsorption in the rat nephron. *Pflügers Arch.* **374**: 153-157
- GUÉGUEN, L. und POINTILLART, A., 2000, The bioavailability of dietary calcium. *J. Am. Coll. Nutr.* **19**: 119S-136S
- HÄMÄLÄINEN, M.M., KNUUTTILA, M., SVANBERG, M. und KOSKINEN, T., 1990, Comparison or the effect of gluconate, lactose and xylitol on bone recalcification in calcium-deficient rats. *Bone* **11**: 429-438
- HÄMÄLÄINEN, M.M., MÄKINEN, K.K., PARVIAINEN, M.T. und KOSKINEN, T., 1985, Peroral xylitol increases intestinal calcium absorption in the rat independently of vitamin D action. *Miner Electrolyte Metab.* **11**: 178-181
- HAMMERMAN, M., 2006, Growing new endocrine pancreas in situ. *Clin. Exp. Nephrol.* **10**: 1-7
- HARA, H., SUZUKI, T. und AOYAMA, Y., 2000, Ingestion of soluble dietary fibre, polydextrose, increases calcium absorption and bone mineralization in normal and total-gastrectomized rats. *Br. J. Nutr.* **84**: 655-661
- HARABASZ, Z., 2007, Die molekulare Charakterisierung des Gendefektes bei PVDR 1-Schweinen. München, LMU, Diss.
- HARANT, H., ANDREW, P.J., REDDY, G.S., FOGLAR, E. und LINDLEY, I.J., 1997, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and a variety of its natural metabolites transcriptionally repress nuclear-factor- κ B-mediated interleukin-8 gene expression. *Eur. J. Biochem.* **250**: 63-71
- HARMEYER, J. und PLONAIT, H., 1967, [Generalized hyperaminoaciduria with hereditary rickets in pig]. *Helv. Paediatr. Acta* **22**: 216-229
- HARMEYER, J., 1982, Inherited disturbance of vitamin D metabolism in pigs, 2nd

- World Cong. Genetics II: 64-75
- HARMEYER, J., 1991, Die Bedeutung von Tiermodellen bei der Erforschung menschlicher Krankheiten; drei Beispiele von Erkrankungen des Skeletts. In: Qualitätskriterien der Versuchstierforschung: Ergebnisse aus dem Sonderforschungsbereich „Versuchstierforschung“ der Medizinischen und Tierärztlichen Hochschule Hannover/ Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ed.: Gärtner K), VCH, Weinheim, pp. 307-374
- HARMEYER, J., KNORZ, S., DWENGER, A. und WINKLER, I., 1985, The effect of vitamin D on B-cell activity on the endocrine pancreas. *Zentralbl. Veterinärmed. A* **32**: 606-615
- HEIDELBERGER, R., HEINEMANN, C., NEHER, E. und MATTHEWS, G., 1994, Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature* **371**: 513-515
- HOCHBERG, Z., BOROCHOWITZ, Z., BENDERLI, A., VARDI, P., OREN, S., SPIRER, Z., HEYMAN, I. und WEISMAN, Y., 1985, Does 1,25-dihydroxyvitamin D participate in the regulation of hormone release from endocrine glands? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **60**: 57-61
- HOENDEROP, J.G., MÜLLER, D., SUZUKI, M., VAN OS, C.H. und BINDELS, R.J., 2000, Epithelial calcium channel: gate-keeper of active calcium reabsorption. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **9**: 335-340
- HOENDEROP, J.G.J., NILIUS, B. und BINDELS, R.J.M., 2005, Calcium absorption across epithelia. *Physiol. Rev.* **85**: 373-422
- HOFF, A.O., CATALA-LEHNEN, P., THOMAS, P.M., PRIEMEL, M., RUEGER, J.M., NASOKIN, I., BRADLEY, A., HUGHES, M.R., ORDONEZ, N., COTE, G.J., AMELING, M. und GAGEL, R.F., 2002, Increased bone mass is an unexpected phenotype associated with deletion of the calcitonin gene. *J. Clin. Invest.* **110**: 1849-1857
- HOLICK, M.F., 1981, The cutaneous photosynthesis of previtamin D₃: a unique photoendocrine system. *J. Invest. Dermatol.* **77**: 51-58
- HOLICK, M.F., FROMMER, J.E., McNEILL, S.C., RICHTAND, N.M., HENLEY, J.W. and POTTS, J.T., Jr., 1977, Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D₃ in skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **76**: 107-114
- HOSSEINPOUR, F., IBRANOVIC, I., TANG, W. und WIKVALL, K., 2003, 25-Hydroxylation of vitamin D₃ in primary cultures of pig hepatocytes: evidence for a

- role of both CYP2D25 and CYP27A1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**: 877-883
- HUGE, A., WEBER, E. und EHRLEIN, H.J., 1995, Effects of enteral feedback inhibition on motility, luminal flow, and absorption of nutrients in proximal gut of minipigs. *Dig. Dis. Sci.* **40**: 1024-1034
- HYPPONEN E, LAARA, E., REUNANEN, A., JARVELIN, M.R. und VIRTANEN, S.M., 2001, Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* **358**: 1500-1503
- JACKSON, C.M. und NEMERSON, Y., 1980, Blood coagulation. *Annu. Rev. Biochem.* **49**: 765-811
- JAY, T.R., HEALD, K.A., CARLESS, N.J., TOPHAM D. und DOWNING, R., 1999, The distribution of porcine pancreatic beta-cells at ages 5, 12 and 24 weeks. *Xenotransplantation* **6**: 131-140
- JESSERER, H., 1961, Zur Pathologie des Calciumstoffwechsels. *Z. Ernährungswiss.* **SUPPI. 1**: 81-89
- JOERGENSEN, K.D., ELLEGAARD, L., KLASTRUP, S. und SVENDSEN, O., 1998, Haematological and clinical chemical values in pregnant and juvenile Göttingen minipigs. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* **25**: 181-190
- JOHANSSON, K.A. und GRAPIN-BOTTON, A., 2002, Development and diseases of the pancreas. *Clin. Genet.* **62**: 14-23
- JOHNSON, J.A. und KUMAR, R., 1994, Renal an intestinal calcium transport: roles of vitamin D and vitamin D-dependent calcium binding proteins. *Semin. Nephrol.* **14**: 119-128
- JOHNSON, J.A., GRANDE, J.P., ROCHE, P.C. und KUMAR, R., 1994, Immunohistochemical localization of the 1,25(OH)2D3 receptor and calbindin D28k in human and rat pancreas. *Am. J. Physiol.* **267**: E356-E360
- KADOWAKI, S. und NORMAN, A.W., 1984, Dietary vitamin D is essential for normal insulin secretion from the perfused rat pancreas. *J. Clin. Invest.* **73**: 759-766
- KALLFELZ, F.A., TAYLOR, A.N. und WASSERMAN, R.H., 1967, Vitamin D-induced calcium binding factor in rat intestinal mucosa. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **125**: 54-58
- KAMPHUES, J., TABELING, R. und STUKE, O., 2003, Possible interesting dietetic effects of lactulose as a feed additive in pig feed. *Dtsch. Tierärztl.*

- Wochenschr. **110**: 365-368
- KARBACH, U., 1992, Paracellular calcium transport across the small intestine. J. Nutr. **122**: 672-677
- KARCZEWSKI, J. und GROOT, J., 2000, Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions III. Tight junction regulation by intracellular messengers: differences in response within and between epithelia. Am. J. Physiol. **279**: G660-G665
- KIP, S.N. und STREHLER, E.E., 2003, Characterization of PMCA isoforms and their contribution to transcellular Ca^{2+} flux in MDCK cells. Am. J. Physiol. Renal. Physiol. **284**: F122-F132
- KISHI, K, GODA, T. und TAKASE, S., 1996, Maltitol increases transepithelial diffusional transfer of Ca in rat ileum. Life Sci. **59**: 1133-1140
- KNUUTTILA, M. und HÄMÄLÄINEN, M.M., 1994a, Dietary xylitol retards bone resorption in rats. Miner. Electrolyte Metab. **20**: 153-157
- KNUUTTILA, M. und HÄMÄLÄINEN, M.M., 1994b, Dietary xylitol prevents ovariectomy-induced changes of bone inorganic fraction in rats. Bone Miner. **26**: 81-88
- KNUUTTILA, M., SVANBERG, M. und HÄMÄLÄINEN, M.M., 1989, Alterations in rat bone composition related to polyol supplementation of the diet. Bone Miner. **6**: 25-31
- KOLB, E., 1989a, Die Physiologie der Körperflüssigkeiten. In: Lehrbuch der Physiologie der Haustiere, Band 1, 5. Auflage (Ed.: Kolbe E.) VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 397-398
- KOLB, E., 1989b, Die Hormone. In: Lehrbuch der Physiologie der Haustiere, Band 1, 5. Auflage (Ed.: Kolbe E.) VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 106
- KÖNIG, H.E., SAUTET, J. und LIEBICH, H.G., 1999, Verdauungsapparat (*apparatus digestorius*). In: Anatomie der Haussäugetiere-Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. (Ed.: König H.E., Liebich H.G.) Schattauer Verlags-GmbH, Stuttgart, pp. 79
- KOSTER, H.P.G., HARTOG, A., VAN OS, C.H. und BINDELS, R.J., 1995, Calbindin-D_{28K} facilitates cytosolic calcium diffusion without interfering with calcium signaling. Cell Calcium **18**: 187-196
- LACHENMAIER-CURRLE, U. und HARMEYER, J., 1988, Intestinal absorption of calcium in newborn piglets. Role of vitamin D. Biol. Neonate. **53**: 327-335

- LARSEN, M.O., ROLIN, B., WILKEN, M., CARR, R.D., SVENDSEN, O. und BOLLEN, P., 2001, Parameters of glucose and lipid metabolism in the male Gottingen minipig: influence of age, body weight, and breeding family. *Comp. Med.* **51**: 2001-2012
- LARSSON, D. und NEMERE, I., 2002, Vectorial transcellular calcium transport in intestine: integration of current models. *J. Biomed. Biotechnol.* **2**: 117-119
- LEE, Y.S., NOGUCHI, T. und NAITO, H., 1983, Intestinal absorption of calcium in rats given diets containing casein or aminoacid mixtures: The role of casein phosphopeptides. *Brit. J. Nutr.* **49**: 67-76
- LEHESTE, J.R., MELSEN, F., WELLNER, M., JANSEN, P., SCHLICHTING, U., RENNER-MÜLLER, I., ANDREASSEN, T.T., WOLF, E., BACHMANN, S., NYKJAER, A. und WILLNOW, T.E., 2003, Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect. *FASEB J.* **17**: 247-249
- LI, Y.C., AMERLING, M., PIRRO, A.E., PRIEMEL, M., MEUSE, J., BARON, R., DELLING, G. und DEMAY, M.B., 1998, Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice. *Endocrinology* **139**: 4391-4396
- LINDMARK, T., KIMURA, Y. und ARTURSSON, P., 1998, Absorption enhancement through intracellular regulation of tight junction permeability by medium chain fatty acids in Caco-2 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **284**: 362-369
- LIU, S.M., KOSZEWSKI, N., LUPEZ, M., MALLUCHE, H.H., OLIVERA, A. und RUSSELL, J., 1996, Characterization of a response element in the 5'-flanking region of the avian (chicken) PTH gene that mediates negative regulation of gene transcription by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and binds the vitamin D3 receptor. *Mol. Endocrinol.* **10**: 206-215
- LIU, W., YU, W.R., CARLING, T., JUHLIN, C., RASTAD, J., RIDEFELT, P., AKERSTRÖM, G. und HELLMAN, P., 1998, Regulation of gp330/megalin expression by vitamins A and D. *Eur. J. Clin. Invest.* **28**: 100-107
- MA, T.Y., HOA, N.T., TRAN, D.D., BUI, V., PEDRAM, A., MILLS, S. und MERRYFIELD, M., 2000, Cytochalasin B modulation of Caco-2 tight junction barrier: role of myosin light chain kinase. *Am. J. Physiol.* **279**: G875-G885
- MAESTRO, B., CAMPION, J., DAVILA, N. und CALLE, C., 2000, Stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of insulin receptor expression and insulin responsiveness for glucose transport in U-937 human promonocytic cells. *Endocr.*

J. **47**: 383-391

MAESTRO, B., DAVILA, N., CARRANZA, M.C. und CALLE, C., 2003, Identification of a vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **84**: 223-230

MAESTRO, B., MOLERO, S., BAJO, S., DAVILA, N. und CALLE, C., 2002, Transcriptional activation of the human insulin receptor gene by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Cell. Biochem. Funct.* **20**: 227-232

MATHIEU, C., GYSEMANS, C., GIULIETTI, A. und BOUILLOUN, R., 2005, Vitamin D and diabetes. *Diabetologia*. **48**: 1247-1257

MILLER, E.R. und ULLREY, D.E., 1987 The pig as a model for human nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* **7**: 361-382

MILNER, R.D. und HALES, C.N., 1967, The role of calcium and magnesium in Insulin secretion from rabbit pancreas studied in vitro. *Diabetologia* **3**: 47-49

MINEO, H., HARA, H., KIKUCHI, H., SAKURAI, H. und TOMITA, F., 2001, Various indigestible saccharides enhance net calcium transport from the epithelium of the small and large intestine of rats in vitro. *J. Nutr.* **131**: 3243-3246

MINEO, H., HARA, H., SHIGEMATSU, N., OKUHARA, Y. und TOMITA, F., 2002a, Melibiose, difructose anhydride III and difructose anhydride IV enhance net calcium absorption in rat small and large intestinal epithelium by increasing the passage of tight junctions in vitro. *J. Nutr.* **132**: 3394-3399

MINEO, H., HARA, H., und TOMITA, F., 2002b, Sugar alcohols enhance calcium transport from rat small and large intestine epithelium in vitro. *Dig. Dis. Sci.* **47**: 1326-1333

MITIC, L.L., VAN ITALLIE, C.M. und ANDERSON, J.M., 2000, Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am. J. Physiol.* **279**: G250-G254

MOISMANN, W. und KOHLER, T., 1990, Verdauungsorgane. In: *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere*. (Ed.: Moismann W., Kohler T.), Verlag Paul Parey, Hamburg, Berlin, pp. 175-176

MUALLEM, S., 1989, Calcium transport pathways of pancreatic acinar cells. *Annu. Rev. Physiol.* **51**: 83-105

MÜLLER-WIELAND, D. und HÄRING, S., 2004, Diabetes mellitus. In: *Molekularmedizinische Grundlagen von Endokrinopathien*. (Ed.: Ganten D.,

- Ruckpaul K.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg pp. 239; 237
- MURAKAMI, T., HITOMI, S., OHTSUKA, A., TAGUCHI, T. und FUJITA, T., 1997, Pancreatic insulo-acinar portal systems in human, rats and some other mammal: scanning electron microscopy of vascular casts. *Microsc. Res. Tech.* **37**: 478-488
- MYKKÄNEN, H.M. und WASSERMAN, R.H., 1980, Enhanced absorption of calcium by casein phosphopeptides in rachitic and normal chicks. *J. Nutr.* **110**: 2141-2148
- NAGPAL, S., NA, S. und RATHNACHALAM, R., 2005, Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr. Rev.* **26**: 662-687
- NELLANS, H.N., 1988, Contributions of cellular and paracellular pathways to transepithelial intestinal calcium transport. *Prog. Clin. Biol. Res.* **252**: 269-276
- NELLANS, H.N., 1990, Intestinal calcium absorption. Interplay of paracellular and cellular pathway. *Min. Eletrol. Metab.* **16**: 101-108
- NEMERE, I. and NORMAN, A.W., 1990, Transcaltachia, vesicular calcium transport, and microtubule-associated calbindin-D28K: emerging views of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated intestinal calcium absorption. *Miner. Electrolyte. Metab.* **16**: 109-114
- NEMERE, I. und NORMAN, A.W., 1991, Transport of calcium. In: *Handbook of physiology, The gastrointestinal system (Section 6), Intestinal absorption and secretion (Vol. IV)* (Ed.: Schultz SG, Field M, Frizell RA), Am. Physiological Society, Bethesda, MD, USA, pp. 337-360
- NEMERE, I., YOSHIMOTO, Y. und NORMAN, A.W., 1984, Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within fourteen minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* **115**: 1476-1483
- NORMAN, A.W., FRANKEL, J.B., HELDT, A.M. und GRODSKY, G.M., 1980, Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science* **209**: 823-825
- NOWYCKY, M.C. und THOMAS, P., 2002, Intracellular calcium signaling. *J. Cell. Sci.* **115**: 3715-3716
- O'DAY, D.H., 2003, CaMBOT: profiling and characterizing calmodulin-bindin proteins. *Cell. Signal.* **15**: 347-354
- OHYAMA, Y. und YAMASAKI, T., 2004, Eight cytochrome P450s catalyze vitamin D metabolism. *Front. Biosci.* **9**: 3007-3018
- OJUKA, E.O., 2004, Role of calcium and AMP kinase in the regulation of mitochondrial biogenesis and GLUT4 levels in muscle. *Proc. Nutr. Soc.* **63**: 275-

278

- OKANO, T., YASUMURA, M., MIZUNO, K. und KOBAYASHI, T., 1977, Photochemical conversion of 7-dehydrocholesterol into vitamin D₃ in rat skins. *J Nutr Sci Vitaminol* **23**: 165-168
- OMDAHL, J.L., BOBROVNIKOVA, E.V., ANNALORA, A., CHEN, P. und SERDA, R., 2003, Expression, structure-function, and molecular modeling of vitamin D P450s. *J. Cell. Biochem.* **88**: 356-362
- OMDAHL, J.L., GRAY, R.W., BOYLE, I.T., KNUTSON, J. und DELUCA, H.F., 1972, Regulation of metabolism of 25-hydroxycholecalciferol by kidney tissue in vitro by dietary calcium. *Nat. New. Biol.* **273**: 63-64
- PANDA, D.K., MIAO, D., TREMBLAY, M.L., SIROIS, J., FAROOKHI, R., HENDY, G.N. und GOLTZMAN, D., 2001, Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase enzyme: evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 7498-7503
- PANSU, D., BELLATON, C. ROCHE, C. und BRONNER, F., 1983a, Duodenal and ileal calcium absorption in the rat and effects of vitamin D. *Am. J. Physiol.* **244**: G695-G700
- PANSU, D., BELLATON, C. und BRONNER, F., 1979, Effect of lactose on duodenal calcium-binding protein and calcium absorption. *J. Nutr.* **109**: 508-512
- PANSU, D., BELLATON, C. und BRONNER, F., 1983b, Developmental changes in the mechanisms of duodenal calcium transport in the rat. *Am. J. Physiol.*, **244**: G20-G26
- PEDERSEN, S.F., OWSIANIK, G. und NILIUS, B., 2005, TRP channels: an overview. *Cell Calcium* **38**: 233-252
- PENNLINE, K.J., ROQUE-GAFFNEY, E. und MONAHAN, M., 1994, Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **71**: 169-175
- PITTAS, A.G., LAU, J., HU, F.B. und DAWSON-HUGHES, B., 2007, The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**: 2017-2029
- PLONAIT, H., 1963, Eine nicht ernährungsbedingte Rachitis beim Schwein. XVII. Welt-Tierärzte-Kongreß Hannover 1333-1334
- PLONAIT, H., 1969, Erbliche Rachitis der Saugferkel: Pathogenese und Therapie. *Zentralbl. Veterinärmed. A* **16**: 271-316

- POSTLIND, H. und WIKVALL, K., 1988, Purification of a cytochrome P-450 from pig kidney microsomes catalysing the 25-hydroxylation of vitamin D₃. *Biochem. J.* **253**: 549-552
- PRADER, A., ILLIG, R. und HEIERLI, E., 1961, Eine besondere Form der primären Vitamin-D-resistenten Rachitis mit Hypocalcämie und autosomal-dominantem Erbgang: die hereditäre Pseudo-Mangel-Rachitis. *Helv. Paediatr. Acta* **16**: 452-468
- RADDE, I.C., DAVIS, D., SHEEPERS, J. und MCKERCHER, H.G., 1980, Bidirectional transmucosal ⁴⁵Ca and ³²P fluxes across the small intestine of the young piglet: Relationship to intestinal Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase activity and postnatal age. In: *Pediatric diseases related to calcium* (Ed.: De Luca, H.F. und Anast, C.S.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 153-163
- RAMASAMY, I., 2006, Recent advances in physiological calcium homeostasis. *Clin. Chem. Lab. Med.* **44**: 237-273
- RAMRACHEYA, R.D., BRAUN, M. und RORSMAN, P., 2007, Characterisation of voltage-gated ion channels in human pancreatic beta-cells. Short Communication, EASD Islet Study Group Symposium 2007
- RAPOPORT, M.J., JARAMILLO, A., ZIPRIS, D., LAZARUS, A.H., SERREZE, D.V., LEITER, E.H., CYOPICK, P., DANSKA, J.S. und DELOVITCH, T.L., 1993, Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Exp. Med.* **178**: 87-99
- RIACHY, R., VANDEWALLE, B. MOERMAN, E., BELAICH, S., LUKOWIAK, B., GMYR, V., MUHARRAM, G., KERR CONTE, J. und PATTOU, F., 2006, 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ protects human pancreatic islets against cytokine-induced apoptosis via down-regulation of the Fas receptor. *Apoptosis* **11**: 151-159
- SAWAI, T., LAMPMAN, R., HUA, Y., SEGURA, B., DRONGOWSKI, R.A., CORAN, A.G. und HARMON, C.M., 2002, Lysophosphatidylcholine alters enterocyte monolayer permeability via a protein kinase C/Ca²⁺ mechanism. *Pediatr. Surg. Int.* **18**: 591-594
- SCHLUMBOHM, C. und HARMEYER, J., 2004, Dietary additions of lactose, casein and soy protein exerted only moderate effects on calcium homeostasis in calcitriol deficient piglets. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **89-90**: 605-609
- SCHRÖDER, B., KAUNE, R., SCHLUMBOHM, C., BREVES, G. und HARMEYER, J., 1993, Evidence of vitamin D-independent active calcium

- absorption in newborn piglets. *Calcif. Tissue Int.* **52**, 305-309
- SEGAL, S., LLOYD, S., SHERMAN, N., SUSSMAN, K. und DRAZNIN, B., 1990, Postprandial changes in cytosolic free calcium and glucose uptake in adipocytes in obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Horm. Res.* **34**: 39-44
- SHINKI, T., SHIMADA, H., WAKINO, S., ANAZAWA, H., HAYASHI, M., SARUTA, T., DELUCA, H.F. und SUDA, T., 1997, Cloning an expression of rat 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 12920-12925
- SMITH, S.J., RUCKA, A.K., BERRY, J.L., DAVIES, M., MYLCHREEST, S., PATERSON, C.R., HEATH, D.A., TASSABEHJI, M., READ, A.P., MEE, A.P. und MAWER, E.B., 1999, Novel mutations in the 1alpha-hydroxylase (P450c1) gene in three families with pseudovitamin D-deficiency rickets resulting in loss of functional enzyme activity in blood-derived macrophages. *J. Bone Miner. Res.* **14**: 730-739
- SOOY, K., SCHERMERHORN, T., NODA, M., SURANA, M., RHOTEN, W.B., MEYER, M., FLEISCHER, N., SHARP, G.W. und CHRISTAKOS, S., 1999, Calbindin-D(28k) controls [Ca(2+)] (i) and insulin release. Evidence obtained from calcbindin-d(28k) knockout mice and β -cell lines. *J. Biol. Chem.* **274**: 34343-34349
- SPEIDEL, D., SALEHI, A., OBERMUELLER, S., LUNDQUIST, I., BROSE, N., RENSTRÖM, E. und RORSMAN, P., 2007, CAPS1 and CAPS2 proteins regulate stability and recruitment of insulin granules. Short Communication, EASD Islet Study Group Symposium 2007
- STEFAN, Y., GRASSO, S., PERRELET, A. und ORCI, L., 1983, A quantitative immunofluorescent study of the endocrine cell populations in the developing human pancreas. *Diabetes* **32**: 293-301
- STENE, L.C. und JONER, G., 2003, Use of cod liver oil during the first year of life is associated with lower risk of childhood-onset type 1 diabetes: a large, population-based, case-control study. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**: 1128-1134
- STRODER, J., 1973, [Infection resistance in rickets]. *Monatschr. Kinderheilkd.* **121**: 354-359
- SUZUKI, T. und HARA, H., 2004, Various non-digestible saccharides increase intracellular calcium ion concentration in rat small-intestinal entrocytes. *Br. J. Nutr.* **92**: 751-755

- SUZUKI, T., HARA, H., KASAI, T. und TOMITA, F., 1998, Effects of difructose anhydride III on calcium absorption in small and large intestines of rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 837-841
- SWINDLE, M.M. und SMITH, A.C., 1998, Comparative anatomy and physiology of the pig. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* **25**: 11-21
- TAKEUCHI, A., REDDY, G.S., KOBAYASHI, T., OKANO, T., PARK, J. und SHARMA, S., 1998, Nuclear faktor of activated T cells (NFAT) as a molecular target for 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3-mediated effects. *J. Immunol.* **160**: 209-218
- TANAKA, Y. und DELUCA, H.F., 1973, The control of 25-hydroxyvitamin D metabolism by inorganic phosphorus. *Arch. Biochem. Biophys.* **154**: 566-574
- TANAKA, Y., SEINO, Y., ISHIDA, M., YAMAOKA, K., YABUCHI, H., ISHIDA, H., SEINO, S., SEINO, Y. und IMURA, H., 1984, Effect of vitamin D3 on the pancreatic secretion of insulin and somatostatin. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* **105**: 528-533
- TOMBES, R.M. und BORISY, G.G., 1989, Intracellular free calcium and mitosis in mammalian cells: anaphase onset is calcium modulated, but is not triggered by a brief transient. *J. Cell. Biol.* **109**: 627-636
- TOMITA, M., HAYASHI, M. und AWAZU, S., 1996, Absorption-enhancing mechanism of EDTA, caprate and decanoylcarnitine in Caco-2 cells. *J. Pharm. Sci.* **85**: 608-611
- VAN ABEL, M., HOENDEROP, J.G., VAN DER KEMP, A.W., VAN LEEUWEN, J.P. und BINDELS R.J., 2003, regulation of epithelial C²⁺ channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **285**: G78-G85
- VAN BREEMEN, C. und SAIDA, K., 1989, Cellular mechanisms regulating [Ca²⁺]_i smooth muscle. *Annu. Rev. Physiol.* **51**: 315-329
- VAN DEN HEUVEL, E.G., MUYS, T., VAN DOKKUM, W. und SCHAAFSMA, G., 1999, Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**: 544-548
- VAN DEN HEUVEL, E.G., MUIJS, T., VAN DOKKUM, W. und SCHAAFSMA, G., 1999, Lactulose stimulates calcium absorption in postmenopausal women. *J. Bone. Miner. Res.* **14**: 1211-1216
- VENNEKENS, R., HOENDEROP, J.G., PRENEN, J., STUIVER, M., WIILLEMS, P.H., DROOGMANS, G. NILIUS, B. und BINDELS, R.J., 2000, Permeation and

- gating properties of the novel epithelial Ca^{2+} -channel. *J. Biol. Chem.* **275**: 3963-3969
- VETTER, S.W. und LECLERC, E., 2003, Novel aspects of calmodulin target recognition and activation. *Eur. J. Biochem.* **270**: 404-414
- VOLLMERHAUS, B. und ROOS, H., 1999, Speiseröhre, Magen, Darm, Darmanhangdrüsen. In: Nickel H., Schummer E. und Seiferle E. Lehrbuch der Anatomie der Haussäugetiere Band II, Eingeweide. 8. Auflage (Ed.: Frewein F., Gasse H., Leiser R., Roos H., Thomé H., Vollmerhaus B. und Waibl H.), Verlag Paul Parey, Hamburg, Berlin, pp. 167
- WASSERMAN, R.H. und LENGEMANN, F.W., 1960, Further observations on lactose stimulation of the gastrointestinal absorption of calcium and strontium in the rat. *J. Nutr.* **70**: 377-384
- WASSERMAN, R.H. und TAYLOR, A.N., 1966, Vitamin D_3 -induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa. *Science* **152**: 791-793
- WILLIAMS, P.F., CATERSON, I.D., COONEY, G.J., ZILKENS, R.R. und TURTLE, J.R., 1990, High affinity insulin binding and insulin receptor-effector coupling: modulation by Ca^{2+} . *Cell. Calcium* **11**: 547-556
- WINKLER, I., SCHREINER, F., und HARMEYER, J., 1986, Absence of renal 25-hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase activity in a pig strain with vitamin D-dependent rickets. *Calcif. Tissue Int.* **38**: 87-94
- WRIGHT, D.C., HUCKER, K.A., HOLLOSZY, J.O. und HAN, D.H., 2004, Ca^{2+} and AMPK both mediate stimulation of glucose transport by muscle contractions. *Diabetes* **53**: 330-335
- YAMADA, S., SHIMIZU, M. und YAMAMOTO, K., 2003, Structure-function relationships of vitamin D including ligand recognition by the vitamin D receptor. *Med. Res. Rev.* **23**: 89-115
- YASUDA, K., HURUKAWA, Y., OKUYAMA, M., KIKUCHI, M. und YOSHINAGA, K., 1975, Glucose tolerance and insulin secretion in patients with parathyroid disorders. Effect of serum calcium on insulin release. *N. Engl. J. Med.* **292**: 501-504
- YOUNES, H., DEMIGNE, C. und REMESY, C., 1996, Acidic fermentation in the caecum increases absorption of calcium and magnesium in the large intestine of the rat. *Br. J. Nutr.* **75**: 301-314
- ZEITZ, U., WEBER, K., SOEGIARTO, D.W., WOLF, E., BALLING, R. und

ERBEN, R.G., 2003, Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *FASEB J.* **17**: 509-511

ZEMEL, M.B., 1998, Nutritional and endocrine modulation of intracellular calcium: implications in obesity, insulin resistance and hypertension. *Mol. Cell. Biochem.* **188**: 129-136

9 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Univ. Prof. DDr. Reinhold Erben für die Überlassung des interessanten Themas und der Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Für deinen großen Einsatz in allen Belangen unseres Projektes und dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest und mir in schwierigen Situationen Kraft gegeben hast, möchte ich mich bei dir, Susanna, ganz, ganz herzlich bedanken.

Dir, Sonja, danke ich für die gute Zusammenarbeit, das freundliche Arbeitsklima und dein großes Engagement bei diesem Projekt.

Ebenfalls möchte ich mich beim Graduierten-Kolleg 1029 für die Kollegialität und der Gewährung des Stipendiums bedanken, ohne dessen finanzielle Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Besonderer Dank gebührt Jannis für seine große Mithilfe bei der Besorgung so mancher wichtiger Utensilien.

Für die großzügige Unterstützung in statistischen Belangen bedanke ich mich bei Frau Dr. Monika Skalicky.

Ohne die Mithilfe des Lehr- und Forschungsguts der VMU und dem Institut für Ernährung der VMU wäre eine Durchführung des Projektes nicht möglich gewesen. Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Dr. Tina Leeb und Frau Ao. Univ. Prof. Dr. Iben für deren große Unterstützung.

Auch die Tierpfleger Martin, Sylvia und beide Karins hatten einen großen Anteil am Gelingen dieses Projektes.

Großer Dank gebührt auch allen Firmen, die Produkte für dieses Projekt zur Verfügung gestellt haben. Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Raffaseder (Firma Schaumann) für die erfolgreiche Kooperation bedanken.

Danke sage ich auch Herrn Ao. Univ. Prof. Dr. rer. nat. Ralf Steinborn für dessen Unterstützung in Genotypisierungs-Fragen.

Sowohl in Wien als auch in München möchte ich Claudi und Sieglinde für ihren beispiellosen Einsatz danken. Bei meinen Kolleginnen Tine, Katharina, Kathrin und Leo möchte ich mich für die nette Arbeitsatmosphäre und freundliche Mithilfe danken.

Bei Verena möchte ich mich sehr herzlich für die Bereitstellung ihres großen Erfahrungsschatzes danken, die dieser Arbeit sehr zu Gute kam.

Abschließend danke ich meinen Eltern, die mich mit großer Ausdauer gestützt und in schweren Zeiten aufgebaut haben.

Vielen Dank!

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Bernhard Ludwig
Geburtsdaten: geboren am 07.01.1978 in Wildendürnbach Österreich
Staatsangehörigkeit: Österreich
Familienstand: ledig

Schulbildung

1984 - 1988 Volksschule Wildendürnbach
1988 - 1992 Bundesgymnasium (Unterstufe) Laa/Thaya
1992 - 1997 Höhere Bundes- Lehr und Versuchsanstalt für chemische Industrie, Wien, Ausbildungszweig: technische Chemie
Juni 1997 Reifeprüfung

Präsenzdienst

September 1997 – Götzendorf (NÖ)
Mai 1998

Studium

1998 - 2004 Studium zum Magister der Veterinärmedizin an der Veterinärmedizinischen Universität Wien
ab April 2005 Tätigkeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien, Veterinärplatz 1, 1210 Wien
seit Juli 2005 Beginn der Dissertation unter der Leitung von Privat-Dozent Dr. Dr. R.G. Erben am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der Tierärztlichen Fakultät der Universität München im Rahmen des GRK 1029-Projekts „Rolle des Vitamin-D-Hormon-systems für die Insulinsekretion beim Schwein“.