

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Untersuchungen zur Bedeutung der Niere für die Aufrechterhaltung
der Calcium-Homöostase bei Schaf und Ziege**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Veterinärmedizin
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)

vorgelegt von
Gesine Herm
Leipzig

Hannover 2014

Meinen Eltern gewidmet

Teile der folgenden Arbeit wurden bereits auf folgender Tagung vorgestellt:

Herm, G., Schröder, B., Breves, G., Wilkens, M. (2014)

Are there species differences in renal vitamin D metabolism of small ruminants?

21. Tagung der Fachgruppe Physiologie und Biochemie der Deutschen

Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V.

13. - 15. Februar 2014 in Zürich (Schweiz)

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
1. Einleitung.....	1
2. Literaturübersicht.....	3
2.1 Aufrechterhaltung der Calcium- und Phosphat-Homöostase	3
2.1.1 Calcitriol.....	4
2.1.2 Parathormon	6
2.1.3 Calcitonin	7
2.2 Renaler Vitamin D-Metabolismus: CYP27B1 und CYP24A1.....	9
2.3 Mechanismen des renalen Calcium-Transports.....	12
2.3.1 Parazellulärer Calcium-Transport in der Niere	13
2.3.2 Transzellulärer Calcium-Transport in der Niere	14
2.3.2.1 Einstrom über die apikale Membran.....	15
2.3.2.2 Transport durch das Cytosol	16
2.3.2.3 Ausschleusung über die basolaterale Membran.....	17
2.4 Regulation der renalen Calcium-Exkretion	18
2.4.1 Regulation des transzellulären Calcium-Transports	18
2.4.1.1 Calcitriol	18
2.4.1.2 Parathormon.....	19
2.4.1.3 Calcium.....	20
2.4.1.4 pH-Wert	21
2.4.1.5 Östrogene	21
2.4.2 Regulation des parazellulären Calcium-Transports	22
2.4.2.1 Calcitriol	22
2.4.2.2 Parathormon.....	22
2.4.2.3 Calcium.....	23
2.5 Mechanismen und Regulation der renalen Phosphat-Exkretion.....	24
2.6 Calcium-Homöostase monogastrischer Spezies: Bedeutung der Niere	25
2.6.1 Bedeutung der Niere in Situationen einer alimentären Calcium-Restriktion.....	26
2.6.2 Bedeutung der Niere in der Laktation	27

Inhaltsverzeichnis

2.7	Calcium-Homöostase des Wiederkäuers: Bedeutung der Niere.....	28
2.7.1	Bedeutung der Niere in Situationen einer alimentären Calcium-Restriktion.....	28
2.7.2	Bedeutung der Niere in der Laktation	32
3.	Material und Methoden.....	34
3.1	Tierversuche	34
3.2	Tötung der Tiere und Entnahme der Gewebeproben.....	35
3.3	Präparative Methoden.....	35
3.3.1	RNA-Isolierung.....	35
3.3.2	Synthese von cDNA	36
3.3.3	Rohmembranpräparation	37
3.3.4	Cytosolpräparation	37
3.3.5	Isolierung von Zellkernextrakten	38
3.3.6	Bestimmung der Proteinkonzentration in Gewebepreparationen.....	39
3.4	Expressionsstudien	40
3.4.1	RNA-Nachweis	40
3.4.1.1	PCR zum qualitativen Nachweis der RNA-Expression.....	44
3.4.1.2	Klonierung zur Herstellung einer Standardreihe	46
3.4.1.2.1	Aufreinigung der PCR-Produkte für die Ligation	46
3.4.1.2.2	Klonierung des PCR-Produktes	46
3.4.1.2.3	Herstellung einer Verdünnungsreihe	49
3.4.1.3	PCR zum quantitativen Nachweis der RNA-Expression.....	49
3.4.1.3.1	SYBR Green [®] <i>Real Time</i> RT PCR	49
3.4.1.3.2	TaqMan [®] <i>Real Time</i> RT PCR.....	50
3.4.2	Protein-Nachweis	52
3.4.2.1	SDS-PAGE	52
3.4.2.2	<i>Blotting</i>	53
3.4.2.3	Blockierung.....	54
3.4.2.4	Immundetektion von Proteinen.....	54
3.4.2.5	Normalisieren.....	59
3.4.2.6	„Strippen“	59
3.4.2.7	Auswertung	60

Inhaltsverzeichnis

3.5	Statistische Auswertung	61
4.	Ergebnisse	62
4.1	Transzellulärer Calcium-Transport.....	65
4.1.1	TRPV5 (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)	65
4.1.2	TRPV5 (Versuch „Laktation“)	66
4.1.3	CaBP _{D28K} (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)	67
4.1.4	CaBP _{D28K} (Versuch „Laktation“)	68
4.1.5	NCX1 (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)	69
4.1.6	NCX1 (Versuch „Laktation“)	70
4.2	Phosphat-Resorption.....	71
4.2.1	NaPi2a (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)	71
4.2.2	NaPi2a (Versuch „Laktation“)	72
4.3	Rezeptoren	73
4.3.1	PTHrP (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)	73
4.3.2	PTHrP (Versuch „Laktation“)	74
4.3.3	VDR (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)	75
4.3.4	VDR (Versuch „Laktation“)	76
4.4	Enzyme	77
4.4.1	CYP27B1 (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)	77
4.4.2	CYP27B1 (Versuch „Laktation“)	78
4.4.3	CYP24A1 (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)	79
4.4.4	CYP24A1 (Versuch „Laktation“)	80
5.	Diskussion.....	81
5.1	Beurteilung der angewandten Methoden	81
5.1.1	<i>Real Time</i> RT PCR.....	81
5.1.2	<i>Western Blot</i> -Analyse.....	82
5.1.3	Nachweis des VDR in Zellkernisolaten	83
5.2	Trans- und parazellulärer Calcium-Transport	84
5.2.1	Effekte der alimentären Calcium-Restriktion	84
5.2.2	Effekte der Calcitriol-Behandlung	89
5.2.3	Effekte der Laktation.....	91

Inhaltsverzeichnis

5.3	Phosphat-Resorption.....	95
5.3.1	Effekte der alimentären Calcium-Restriktion	95
5.3.2	Effekte der Calcitriol-Behandlung	96
5.3.3	Effekte der Laktation.....	97
5.4	Enzyme und Rezeptoren	97
5.4.1	Effekte der alimentären Calcium-Restriktion	98
5.4.2	Effekte der Calcitriol-Behandlung	100
5.4.3	Effekte der Laktation.....	104
5.5	Schlussfolgerungen und Ausblick	105
6.	Zusammenfassung.....	108
7.	Summary	111
8.	Literaturverzeichnis	114
9.	Anhang.....	140
10.	Danksagung.....	143

Abkürzungsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ANOVA	Analysis Of Variance (Varianzanalyse)
A. dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ATP(ase)	Adenosintri-phosphat(ase)
bp	base pairs (Basenpaare)
Ca	Calcium
Ca ²⁺	ionisiertes Calcium
CaBP _{D28k}	Calbindin-D _{28K}
CaCO-2 cells	Colorectal Adenocarcinoma cells (colorektale Adenokarzinom-Zellen)
CaSR	Calcium Sensing Receptor
CaRE	Calcium Responsive Element
cDNA	complementary Desoxyribonucleic Acid (komplementäre DNA)
Ct	Cycle treshold
CYP27B1	Cytochrom P 27B1 (1 α -Hydroxylase)
CYP24A1	Cytochrom P 24A1 (24-Hydroxylase)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FE	Fraktionelle Exkretion
ff.	folgende
FGF 23	Fibroblast Growth Factor 23 (Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23)
g	Gramm
g	Vielfaches der Erd- oder Normalbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

Abkürzungsverzeichnis

h	hour (Stunde) beziehungsweise hours (Stunden)
HEK cells	Human Embryonic Kidney cells (humane embryonale Nierenzellen)
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IPTG	Isopropyl- β -D-Galaktopyranosid
kDA	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
lacZ-Gen	für das Enzym β -Galactosidase kodierendes Gen von E.coli
MARRS receptor	Membrane Associated Rapid Response Steroid Binding receptor
MDBK cells	Madin-Darby Bovine Kidney cells (bovine Nierenzellen)
min	minute (Minute) beziehungsweise minutes (Minuten)
ml	Milliliter
μ l	Microliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCX1	Natrium-Calcium Exchanger 1 (Natrium-Calcium-Austauscher 1)
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NaHCO ₃	Natrium-Bikarbonat
NKCC2	Natrium-Kalium-Chlorid-Transporter
<i>p</i>	probability value (Irrtumswahrscheinlichkeit)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PBST	Phosphate Buffered Saline + Tween (Phosphat-gepufferte Salzlösung + Polysorbat)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PMCA	Plasma Membrane Calcium ATPase (Plasmamembran-Calcium-ATPase)

Abkürzungsverzeichnis

PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
PTH	Parathormon
PTHR	Parathormon-Rezeptor
PTHrP	Parathyroid Hormone-related Peptide
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
ROMK	Renal Outer Medullary Potassium channel
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	second (Sekunde) beziehungsweise seconds (Sekunden)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat (Natriumdodecylsulfat)
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAL	Thick Ascending Limb (dicker aufsteigender Ast der Henle-Schleife)
TRPV5 channel	Transient Receptor Potential Vanilloid 5 channel
TRPV6 channel	Transient Receptor Potential Vanilloid 6 channel
TS	Trockensubstanz
U	Unit (Einheit) beziehungsweise Units (Einheiten)
V	Volt
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDRE	Vitamin D Responsive Element
Vol	Volumen
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2.1: Calcium-Resorption entlang des Nephrons.....	13
Abbildung 2.2: Klassisches Modell des renalen transzellulären Calcium-Transports.....	17
Abbildung 2.3: Fraktionelle Calcium- und Phosphat-Exkretion Calcium-restriktiv gefütterter Schafe und Ziegen in Relation zu den bei adäquat mit Calcium versorgten Kontrolltieren gemessenen Werten.....	30
Abbildung 2.4: Calcium- und Phosphat-Spiegel im Plasma von über eine Dauer von vier bis acht Wochen Calcium-restriktiv gefütterten Schafen und Ziegen	31
Abbildung 2.5: Calcitriol- und CrossLaps [®] -Spiegel im Serum bzw. Plasma von über eine Dauer von vier bis acht Wochen Calcium-restriktiv gefütterten Schafen und Ziegen.....	31
Abbildung 4.1: TRPV5-Expression (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)	65
Abbildung 4.2: TRPV5-Expression (Versuch „Laktation“)	66
Abbildung 4.3: CaBP _{D28K} -Expression (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)	67
Abbildung 4.4: CaBP _{D28K} -Expression (Versuch „Laktation“)	68
Abbildung 4.5: NCX1-Expression (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)	69
Abbildung 4.6: NCX1-Expression (Versuch „Laktation“)	70
Abbildung 4.7: NaPi2a-Expression (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)	71
Abbildung 4.8: NaPi2a-Expression (Versuch „Laktation“)	72
Abbildung 4.9: PTHR-Expression (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)	73
Abbildung 4.10: PTHR-Expression (Versuch „Laktation“)	74
Abbildung 4.11: VDR-Expression (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)	75
Abbildung 4.12: VDR-Expression (Versuch „Laktation“)	76
Abbildung 4.13: CYP27B1-Expression (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)	77
Abbildung 4.14: CYP27B1-Expression (Versuch „Laktation“)	78
Abbildung 4.15: CYP24A1-Expression (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)	79
Abbildung 4.16: CYP24A1-Expression (Versuch „Laktation“)	80

Tabellenverzeichnis

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1: Mittlere tägliche Aufnahme an Nährstoffen und Mineralstoffen pro Tier und Tag während der Versuche zur alimentären Calcium-Restriktion	29
Tabelle 2.2: Fraktionelle Calcium- und Phosphat-Exkretion von über eine Dauer von vier bis acht Wochen Calcium-restriktiv gefütterten Schafen und Ziegen	30
Tabelle 3.1: PCR- <i>Primer</i> zum Nachweis von PTHR, VDR, CYP27B1 und CYP24A1	45
Tabelle 3.2: Pipettierschema der Reaktionsansätze für die qualitative PCR	45
Tabelle 3.3: PCR-Protokoll für die qualitative PCR (PTH, VDR, CYP27B1 und CYP24A1)	45
Tabelle 3.4: Pipettierschema der Reaktionsansätze für die SYBR Green [®] <i>Real Time</i> RT PCR	50
Tabelle 3.5: Inkubationsbedingungen der SYBR Green [®] <i>Real Time</i> RT PCR	50
Tabelle 3.6: Pipettierschema der Reaktionsansätze für die TaqMan [®] <i>Real Time</i> RT PCR	51
Tabelle 3.7: Inkubationsbedingungen der TaqMan [®] <i>Real Time</i> RT PCR	51
Tabelle 3.8: <i>Primer</i> und Sonden für den Nachweis von GAPDH, TRPV5, CaBP _{D28K} , NCX1 und NaPi2a	51
Tabelle 3.10: Antikörperinkubationsbedingungen für die Villin-Detektion	60

1. Einleitung

Hochleistende Milchkühe sind im peripartalen Zeitraum nicht selten von Störungen der Calcium-Homöostase betroffen. Die Ursache für das Auftreten subklinischer und klinischer Hypocalcämien scheint bei diesen Tieren in einer unzureichenden Adaptation der Calcium-homöostatischen Mechanismen an den aufgrund der Laktation erhöhten Calcium-Bedarf zu liegen (Horst et al., 2005). Die hohe Inzidenz der Hypocalcämie, das Auftreten von Folgeerkrankungen und Fertilitätsstörungen begründen die enorme wirtschaftliche Bedeutung dieser Erkrankung (Curtis et al., 1983; Goff u. Horst, 1997; Martinez et al., 2012).

In Studien, die Ursachen und mögliche Maßnahmen zur Prävention der Hypocalcämie untersuchen, werden aus Gründen der Praktikabilität häufig Schafe oder Ziegen an Stelle von Rindern eingesetzt. Bei beiden Spezies treten Hypocalcämien auf. Sie unterscheiden sich jedoch deutlich hinsichtlich ihres Futteraufnahmeverhaltens, ihrer Milchleistung sowie des Zeitpunktes der Erkrankung im Verlauf des Reproduktionszyklus‘ (Hofmann, 1989; Oetzel, 1988). Daher stellt sich die Frage, welche dieser Spezies am besten als Modelltier für das Rind geeignet ist. Um die Calcium-homöostatischen Mechanismen kleiner Wiederkäuer genauer zu charakterisieren, untersuchten aktuelle Studien die Reaktion von Schafen und Ziegen auf eine durch restriktive Calcium-Zufuhr induzierte Calcium-Mangelsituation (Wilkens et al., 2010, 2012). Die Ergebnisse zeigen, dass sich auch die Adaptations-Mechanismen der beiden Spezies – zumindest auf intestinaler Ebene und in Bezug auf die kompensatorische Knochenmobilisation – deutlich unterscheiden. Dabei ergaben sich Hinweise auf einen Zusammenhang mit Unterschieden im Vitamin D-Metabolismus, welche schon im Rahmen früherer Untersuchungen zur alimentären Calcium-Restriktion an Schafen und Ziegen beobachtet werden konnten (Schröder et al., 1997, 1999; Wilkens et al., 2010, 2012).

Eine Gemeinsamkeit der Wiederkäuerspezies scheint jedoch in der mangelnden Anpassung der renalen Calcium- und Phosphat-Exkretion an die Höhe der Calcium-Zufuhr zu bestehen. Während eine alimentäre Calcium-Restriktion bei monogastrischen Spezies eine Verminderung der renalen Calcium-Exkretion bei gleichzeitiger Steigerung der Phosphat-

Einleitung

Ausscheidung zur Folge hat (Doorn et al., 2004; Zhang et al., 2008), konnte sowohl bei Rindern als auch bei Schafen und Ziegen trotz deutlicher Reduktion der Calcium-Zufuhr keine Änderung der renalen Exkretion dieser Makromineralien festgestellt werden (Braithwaite, 1975; Taylor et al., 2009; Wilkens et al., 2010, 2012). In der Laktation hingegen kam es bei Schafen und Rindern zu einer Verminderung der renalen Calcium-Exkretion und zu einer Zunahme der Phosphat-Ausscheidung (Braithwaite et al., 1969; Ulutaş et al., 2003), wie sie auch bei laktierenden monogastrischen Spezies, z.B. Ratten (Brommage, 1989), beobachtet wird. Studien an Calcium-restriktiv gefütterten und an laktierenden Nagern zeigten, dass die Verminderung der Calcium-Ausscheidung bei diesen Spezies offenbar auf eine Expressionssteigerung von am transzellulären Calcium-Transport beteiligten Strukturen in der Niere zurückzuführen ist (van Cromphaut et al., 2003; Ko et al., 2009). Für den Wiederkäuer fehlen entsprechende Studien bislang. Dabei könnten sich Kenntnisse über mögliche laktationsassoziierte Änderungen des renalen Calcium-Transports sowie insbesondere des renalen Vitamin D-Metabolismus‘ dieser Spezies nicht nur hinsichtlich der Eignung von Schaf und Ziege als Modelltier für das Rind, sondern auch in Hinblick auf Pathogenese und Therapie der Hypocalcämie als aufschlussreich erweisen.

Es war daher das Ziel dieser Arbeit, die Funktion der Niere im Rahmen der Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase von Schafen und Ziegen genauer zu charakterisieren. Dazu erfolgte die Untersuchung von renalem Gewebe von Schafen und Ziegen, deren Calcium-Haushalt durch eine alimentäre Calcium-Restriktion oder durch die Laktation beansprucht war. Zudem wurde Nierengewebe untersucht, das von Tieren stammte, die mit dem biologisch aktiven Vitamin D-Metaboliten Calcitriol behandelt worden waren. Die Expression von am transzellulären Calcium- und Phosphat-Transport sowie direkt und indirekt am renalen Vitamin D-Metabolismus beteiligten Strukturen wurde semiquantitativ auf Transkriptions- und Translations-Ebene bestimmt.

2. Literaturübersicht

2.1 Aufrechterhaltung der Calcium- und Phosphat-Homöostase

Rund 99% des Gesamtkörperbestandes an Calcium liegen als Hydroxylapatit, einer Verbindung mit Phosphat, im Skelett vor. Calcium und Phosphat dienen in dieser Form als Strukturelemente der Mineralisation von Knochen und Zähnen, die gleichzeitig den Hauptspeicherort der beiden Makromineralien darstellen (Berner u. Shike, 1988; Ramasamy, 2006).

Etwa die Hälfte des im Plasma enthaltenen Calciums ist ionisiert (Friedman u. Gesek, 1995). Ionisiertes Calcium ist an der Regulation einer Vielzahl von lebenswichtigen Prozessen im Organismus beteiligt. In seiner Funktion als *Second Messenger* sorgt es für den regelgerechten Ablauf der Muskelkontraktion, der Erregungsübertragung an Synapsen und moduliert die Sekretion von Enzymen und Hormonen sowie die Expression von Genen. Darüber hinaus sind Calcium-Ionen als Gerinnungsfaktor an der Hämostase beteiligt (Ramasamy, 2006).

Die entsprechend strenge Regulation insbesondere der extrazellulären Calcium-Konzentration erfolgt in erster Linie unter dem Einfluss von Calcitriol (siehe Kapitel 2.1.1) und Parathormon (PTH) (siehe Kapitel 2.1.2). Durch die teils synergistischen, teils antagonistischen Effekte dieser Hormone auf die Absorption, Mobilisation beziehungsweise Resorption von Calcium in Gastrointestinaltrakt, Knochen und Niere wird die Calcium-Konzentration im Plasma innerhalb eines engen Rahmens konstant gehalten. Bei den meisten Säugetierspezies liegt sie – in Abhängigkeit von Art, Alter, Reproduktionsstatus und Leistungsniveau eines Individuums – zwischen 2,2 und 2,5 mmol/l (Horst et al., 2005).

Phosphat spielt unter anderem eine entscheidende Rolle in der Nukleinsäure-Synthese, der ATP-Bildung sowie als Cofaktor zahlreicher Enzyme. Eine koordinierte Regulation der Calcium- und Phosphat-Konzentrationen im Plasma ist insbesondere erforderlich, um ein Überschreiten des Löslichkeitsproduktes zu verhindern, welches zur Ablagerung von Calcium-Phosphat-Kristallen in Gelenken, Organen und Gefäßwänden führen kann (Goodman et al., 2000; Harmeyer u. Schlumbohm, 2004). Calcium- und Phosphat-Haushalt sind daher eng miteinander verbunden. Ihre Regulation erfolgt zu großen Teilen durch die gleichen Hormone und Kontrollsysteme.

2.1.1 Calcitriol

Calcitriol ist der Vitamin D-Metabolit mit der höchsten biologischen Aktivität. Es handelt sich um ein Steroidhormon, das durch zweifache Hydroxylierung aus dem mit pflanzlicher Nahrung aufgenommenen Prohormon Ergocalciferol (Vitamin D₂) oder dem in tierischer Nahrung enthaltenen Prohormon Cholecalciferol (Vitamin D₃) gebildet wird. Ein variabler Anteil des Cholecalciferols kann zudem der körpereigenen, UV-Licht-abhängigen Synthese in der Haut entstammen.

Die folgenden Ausführungen beziehen sich zunächst auf das in der Blutbahn zirkulierende, endokrin wirksame Calcitriol, welches an der Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase maßgeblich beteiligt ist. Am Ende des Kapitels wird kurz auf den Metabolismus des para- und autokrin aktiven Calcitriols eingegangen.

Die erste Hydroxylierung des Vitamins D am C25-Atom erfolgt in der Leber. Ergebnisse neuerer Studien aus dem Humanbereich sprechen dafür, dass es sich bei dem verantwortlichen Enzym um das Cytochrom P450 2R1 (CYP2R1) handelt (Cheng et al., 2004; Shinkyo et al., 2004). Die Höhe des 25-Hydroxyvitamin D-Plasmaspiegels korreliert mit der alimentären Zufuhr und cutanen Syntheserate des Prohormons (Holick, 1981). Vor diesem Hintergrund erscheint es unwahrscheinlich, dass die 25-Hydroxylierung durch das CYP2R1 einer strengen Regulation unterliegt. Die zweite Hydroxylierung am C1-Atom erfolgt in der Niere und wird durch das Cytochrom P450 27B1 (CYP27B1 beziehungsweise 1 α -Hydroxylase) katalysiert. Dessen Expression wird ebenso streng, jedoch genau entgegengesetzt zu der des Calcitriol-inaktivierenden Enzyms, des Cytochroms P450 24A1 (CYP24A1 oder 24-Hydroxylase), reguliert (siehe Kapitel 2.2).

Im Anschluss an die zweite Hydroxylierung gelangt das Calcitriol über den Blutweg zu Darm, Knochen, Niere und Nebenschilddrüse, wo es seine endokrinen Effekte über einen genomischen Weg vermittelt. Nach Bindung an den Vitamin D-Rezeptor (VDR), einen Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktor, bilden die beiden Strukturen gemeinsam mit dem *Retinoid X Receptor* (RXR) ein Heterodimer, welches in der Promotorregion bestimmter Gene mit *Vitamin D Responsive Elements* (VDRE) interagiert und so deren Transkription moduliert (Kimmel-Jehan et al., 1997; MacDonald et al., 1993). Minimale Unterschiede in der Nukleotidsequenz der VDRE entscheiden darüber, ob sie transkriptionssteigernde oder -hemmende Effekte vermitteln, es sich also um sogenannte positive oder negative VDRE

Literaturübersicht

handelt (Darwish u. DeLuca, 1996; Koszewski et al., 1999). In diesem Zusammenhang hat die Rekrutierung von Coaktivatoren oder -repressoren einen wesentlichen Einfluss auf den transkriptionsmodulierenden Effekt. Coaktivatoren der SRC/p160-Familie besitzen beispielsweise Histon-Acetyltransferase-Aktivität und tragen somit zur Entfaltung der DNA bei (Rachez u. Freedman, 2000). Dem gegenüber stehen unter anderem Corepressoren mit Histon-Deacetylase-Komponenten, die eine Exposition des Chromatins und somit letztendlich die Initiierung der Transkription verhindern (Dusso, 2005).

Naturgemäß treten die genomisch-vermittelten Effekte des Calcitriols erst mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung ein, so dass seine Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase vornehmlich in der Anpassung der Absorption, Exkretion und Mobilisation von Calcium an einen mittel- bis längerfristig andauernden Calcium-Mangel oder -Überschuss besteht.

Über eine Expressionssteigerung der am aktiven Calcium-Transport beteiligten Strukturen in Darm und Niere vermittelt Calcitriol beim monogastrischen Tier eine Zunahme der intestinalen Calcium-Aufnahme und eine Verminderung der renalen Calcium-Ausscheidung (Hoenderop, 2005). Es stimuliert die Aufnahme von Phosphat über den Darm (Walling, 1977), wobei es sich dabei um einen posttranskriptionellen Effekt handeln könnte, wie unter anderem Versuche an Mäusen zeigten (Hattenhauer et al., 1999). Die knochenaufbauende Wirkung des Calcitriols ist eher den indirekten Effekten zuzuordnen und wahrscheinlich auf die vermehrte Bereitstellung von Calcium und Phosphat zurückzuführen (Brown et al., 1999). Bei der Calcitriol-vermittelten Freisetzung von Calcium und Phosphat aus dem Knochen handelt es sich um einen PTH-abhängigen Effekt (Pechet et al., 1967). Im Sinne einer negativen Rückkopplung hemmt Calcitriol zudem die PTH-Sekretion aus der Nebenschilddrüse, wie erstmals in Studien an Ratten gezeigt werden konnte (Chertow et al., 1975).

In vielen Geweben wurden auch nicht-genomische, schnelle Effekte des Calcitriols beobachtet, die offensichtlich über membranständige Rezeptoren vermittelt werden und deren Bedeutung noch nicht in allen Fällen vollständig geklärt ist (Dusso, 2005). Auf diese Weise scheint Calcitriol über eine Modulation der intrazellulären Calcium-Konzentration und Enzym-Expression den Lipidstoffwechsel humaner Adipozyten zu beeinflussen (Shi, 2001). Im Hodengewebe von Ratten steigert es die Calcium-Aufnahme über eine Aktivierung von

Literaturübersicht

Proteinkinasen (Zanatta et al., 2011) und in Chondrozyten sind verschiedene nicht-genomische Effekte beschrieben worden, die offensichtlich auch Einfluss auf die Struktur und den Calcifizierungsgrad der extrazellulären Matrix nehmen (Boyan et al., 1994). Gut untersucht ist der als „Transcaltachia“ bezeichnete, transzelluläre Calcium-Transport im Duodenum von Hühnern, der schon wenige Minuten nach Beginn der vaskulären Perfusion des isolierten Darmabschnittes mit Calcitriol zu einer signifikanten Zunahme der Calcium-Aufnahme aus dem Lumen führt. Dieser nicht-genomische Effekt wird offensichtlich über den membranständigen $1,25D_3$ -MARRS (*Membrane Associated Rapid Response Steroid Binding*)-Rezeptor vermittelt (Nemere et al., 1994, 2004). Interessanterweise bestehen aber Hinweise darauf, dass die Existenz eines funktionsfähigen VDR eine Voraussetzung für den regelgerechten Ablauf der nicht-genomischen Effekte darstellt (Erben et al., 2002).

Neben seiner Funktion in der Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase ist Calcitriol als parakrin und autokrin wirksames Hormon an der Regulation der Zellproliferation und -differenzierung vieler verschiedener Gewebe beteiligt. Synthese und Metabolismus des Hormons erfolgen in diesem Fall lokal und werden, obwohl durch die gleichen Enzyme katalysiert, durch andere Faktoren wie Cytokine und Wachstumsfaktoren reguliert (Schuster, 2011).

2.1.2 Parathormon

Parathormon (PTH) ist ein aus 84 Aminosäuren bestehendes Peptidhormon, welches in den Nebenschilddrüsen gebildet und dessen Sekretion durch den *Calcium Sensing Receptor* (CaSR) kontrolliert wird. Dieser Rezeptor ist somit an der kurzfristigen Regulation der extrazellulären Calcium-Konzentration entscheidend beteiligt. Dementsprechend erfolgt die Freisetzung des in Sekretgranula gespeicherten Hormons innerhalb von Sekunden nach Absinken der Plasmakonzentration des ionisierten Calciums (Brown u. MacLeod, 2001). Niedrige Calcium- und hohe Phosphat-Spiegel sowie Östrogen steigern die PTH-Gen-Expression (Ramasamy, 2006). Calcitriol spielt als Vermittler eines negativen *Feedback-Mechanismus* eine entscheidende Rolle. Sein hemmender Effekt auf die PTH-Expression wurde erstmals in Versuchen an Ratten beobachtet (Okazaki et al., 1988; Silver et al., 1986). In Studien an bovinen Zellkulturen konnte zudem ein antiproliferativer Effekt des Calcitriols auf das Nebenschilddrüsengewebe gezeigt werden (Nygren et al., 1988). In diesem Zusammenhang gelang der Nachweis eines negativen VDRE in der Promotorregion des humanen PTH-Gens (Demay et al., 1992; Okazaki et al., 1988).

Spezifische Parathormonrezeptoren sind vornehmlich in Niere und Knochen lokalisiert, die lange Zeit als die einzigen Zielorgane des PTH galten. Zumindest indirekt fördert PTH jedoch neben dem renalen auch den intestinalen, Calcitriol-abhängigen, aktiven Calcium-Transport, da es durch die Steigerung der 1α -Hydroxylase-Expression in der Niere zu einem Anstieg der Calcitriol-Plasmaspiegel beiträgt (Ramasamy, 2006). Darüber hinaus sprechen das Vorkommen von PTH-Rezeptoren (PTHr) im Darm von Ratten und Hühnern sowie der Nachweis einer PTH-induzierten Steigerung der Calcium-Aufnahme in isolierte Enterozyten dieser Spezies für die Existenz direkter PTH-Effekte auf den Darm (Nemere u. Larsson, 2002).

In der Niere vermittelt PTH seine Effekte durch Bindung an den in der apikalen und basolateralen Membran lokalisierten Parathormon-Rezeptor vom Typ 1 (PTHr1) und nachfolgende Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden (Amizuka et al., 1997; Ramasamy, 2006). Verschiedene *In-vitro*- und *In-vivo*-Versuche mit unterschiedlichen Nagerspezies und Kaninchen zeigten, dass die auf diese Weise ausgelöste Steigerung der tubulären Calcium-Resorptionsrate im distalen Nephron (Greger et al., 1978) offensichtlich auf eine Stimulation der apikalen Calcium-Aufnahme (Bacskai u. Friedman, 1990) sowie der Expression der am Calcium-Transport beteiligten Strukturen (van Abel et al., 2005) und eventuell auch der basolateralen Ausschleusung des Calciums (Tsukamoto et al., 1992) zurückzuführen ist.

Untersuchungen an Nierenzellen vom Opossum konnten zeigen, dass PTH durch Internalisierung und Abbau des für die Phosphat-Aufnahme verantwortlichen Transporters NaPi2a in den proximalen Tubuli der Niere (Pfister et al., 1997) sowie durch Verminderung der NaPi2a-mRNA-Stabilität (Murray et al., 2013) zudem die renale Phosphat-Exkretion erhöht.

Am Knochen stimuliert PTH die Freisetzung von Calcium und Phosphat. Dementsprechend wird insbesondere in der Humanmedizin ein langfristig erhöhter PTH-Spiegel als entscheidende Ursache einer verminderten Knochendichte angesehen (Ramasamy, 2006).

2.1.3 Calcitonin

Während einer Hypercalcämie wird das Peptidhormon Calcitonin aus den C-Zellen der Schilddrüse freigesetzt. Durch Hemmung der resorptiven Osteoklastentätigkeit vermindert es

Literaturübersicht

die PTH-induzierte Calcium- und Phosphat-Mobilisation aus dem Knochen und trägt so zur Normalisierung der Plasmaspiegel bei (Pechet et al., 1967). Welche Funktion Calcitonin in der Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase unter physiologischen Bedingungen hat, ist noch nicht abschließend geklärt. So unterscheiden sich Calcium-, Phosphat-, Calcitriol- und PTH-Spiegel homozygoter Calcitonin-*Knockout*-Mäuse nicht von denen des Wildtyps und die Tiere zeigen keine phänotypischen Auffälligkeiten (Hoff et al., 2002).

Auch hinsichtlich einer physiologischen Bedeutung des Calcitonins für die Regulation des Knochenstoffwechsels existieren widersprüchliche Erkenntnisse. So wurde in dem oben aufgeführten Mäuseversuch eine signifikante Zunahme der Knochendichte bei homozygoten Calcitonin-Deletionsmutanten beobachtet (Hoff et al., 2002). In einer humanmedizinischen Studie konnte hingegen kein Zusammenhang zwischen anhaltend erniedrigten beziehungsweise erhöhten Calcitonin-Plasmaspiegeln und dem Grad der Knochenmineralisierung festgestellt werden (Hurley et al., 1987). In anderen Studien beobachtete man eine Abnahme der Mineralisierung des Knochens nach totaler Thyroidektomie (Mcdermott et al., 1983).

Ähnlich uneinheitliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen zum Einfluss des Calcitonins auf die renale Calcium-Exkretion. Während die Ergebnisse einiger Untersuchungen an Ratten und Hunden gegen eine Beeinflussung der renalen Calcium-Exkretion durch Calcitonin sprechen (Anast et al., 1967; Nishiki et al., 2003; Puschett et al., 1974), belegen andere überraschenderweise eine Calcitonin-vermittelte Hemmung der Calcium-Ausscheidung über den Urin bei der Ratte (Carney u. Thompson, 1998; Rasmussen et al., 1967; Sørensen u. Hindberg, 1972). So bewirkte die intravenöse Verabreichung von Calcitonin eine signifikante Abnahme der renalen Calcium-Exkretion thyroparathyroidektomierter Ratten, offenbar vermittelt durch eine Steigerung der Resorptionsrate im Bereich der Henle'schen Schleife (Elalouf et al., 1984). In Versuchen am isolierten Mausnephron konnte gezeigt werden, dass Calcitonin die Calcium-Resorption im kortikalen dicken aufsteigenden Ast der Henle'schen Schleife steigert (Di Stefano et al., 1990). Andere Untersuchungen weisen auf eine Bedeutung der medullären Henle-Schleifen sowie distal gelegener Nephronabschnitte hin. Die Uneinheitlichkeit der Ergebnisse mag auch darin begründet sein, dass der Effekt einer Calcitonin-Behandlung auf den renalen Calcium-Transport sowohl dosis- als auch speziesabhängig variiert, was unter anderem auf Unterschiede in der Verteilung der Calcitonin-Rezeptoren zurückzuführen ist (Friedman u. Gesek, 1995).

2.2 Renaler Vitamin D-Metabolismus: CYP27B1 und CYP24A1

Die Aktivierung und Inaktivierung des im Blut zirkulierenden Vitamins D erfolgt durch die in den proximalen Tubulusepithelien der Niere exprimierten Enzyme CYP27B1 und CYP24A1, die auf diese Weise die Höhe des Calcitriol-Spiegels regulieren (Anderson et al., 2003) und somit auch die Höhe des Calcium- und Phosphat-Spiegels beeinflussen (Zittermann et al., 2013). Da eine zu starke Abnahme oder ein zu starker Anstieg der Calcitriol-, Calcium- und/oder Phosphat-Konzentrationen im Blut schwerwiegende Folgen wie Rachitis, Osteomalazie, Tetanien, Paresen, Herzversagen oder Gefäß- und Weichgewebe-Calcifizierungen (Kamalov et al., 2010; Oetzel, 1988; Ohnishi et al., 2009; Zittermann et al., 2013) nach sich ziehen und somit lebensbedrohliche Folgen haben können, unterliegt die Expression der beiden Hydroxylasen einer strengen Kontrolle (Suzuki et al., 2008), an der zahlreiche Faktoren beteiligt sind.

So konnte bei thyroparathyroidektomierten Tieren – anders als bei intakten Kontrolltieren – ein Anstieg der Calcitriol-Spiegel trotz restriktiver Calcium-Zufuhr nur nach Verabreichung von Nebenschilddrüsenextrakt beobachtet werden (Garabedian et al., 1972), der somit auf die Wirkung des PTH zurückgeführt wurde. Später konnte in Versuchen an renalen Zellkulturen eine expressionsstimulierende Wirkung des PTH auf die CYP27B1-Expression gezeigt werden, wobei dieser Effekt über cAMP (cyclisches Adenosin-Monophosphat) vermittelt wurde (Brenza u. DeLuca, 2000; Brenza et al., 1998). Bland et al. (1999) beobachteten nach Zugabe von PTH in das Zellkulturmedium eine signifikante Aktivitätssteigerung sowie eine Steigerung der Protein-Expression der 1α -Hydroxylase. Ergebnisse derselben Versuchsreihe sprechen darüber hinaus für die Existenz eines direkten, PTH-unabhängigen Effekts des Calcium-Spiegels auf die CYP27B1-Expression. So exprimierten humane proximale Tubulusepithelzellen in Medium mit niedrigem Calcium-Gehalt etwa fünfmal mehr CYP27B1 als in Medium mit physiologischem Calcium-Gehalt (Bland et al., 1999). In einem Fütterungsversuch mit Mäusen, die Diäten mit unterschiedlich hohem Calcium-Gehalt erhalten hatten, konnte interessanterweise kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe des PTH-Spiegels und der renalen CYP27B1-mRNA-Expression beobachtet werden. Da jedoch wiederum die Tiere, die am wenigsten Calcium über das Futter erhalten hatten, am meisten CYP27B1-mRNA in der Niere exprimierten, wurde geschlussfolgert, dass womöglich die Höhe des Calcium-Spiegels den regulierenden Faktor darstellen könnte (Anderson et al., 2003). Auch die Höhe des Phosphat-Spiegels scheint die CYP27B1-Expression zu

Literaturübersicht

beeinflussen. Bereits 1973 wurde in Versuchen an Ratten beobachtet, dass eine alimentäre Phosphat-Restriktion auch bei thyroparathyroidektomierten Tieren zu einem Anstieg des Calcitriol-Spiegels führte, der umso stärker ausfiel, je niedriger die Phosphat-Konzentration im Serum war (Tanaka u. DeLuca, 1973). Den aktuellen Kenntnissen zur Folge wird dieser PTH-unabhängige Effekt über eine Steigerung der CYP27B1-Expression in den proximalen Tubulusepithelien vermittelt (Perwad u. Portale, 2011). Eine Abnahme der Phosphat-Spiegel geht jedoch auch mit einer Abnahme der Plasmakonzentration des FGF 23 (*Fibroblast Growth Factor 23*) einher. Dieses Phosphatonin wird nicht nur in Situationen eines erhöhten Phosphat-Spiegels, sondern auch als Reaktion auf steigende Calcitriol-Spiegel vermehrt aus dem Knochen freigesetzt und wirkt nachweislich direkt hemmend auf die CYP27B1-Expression (Perwad et al., 2007; Shimada et al., 2003). Somit stellt sich die Frage, inwieweit es sich bei den Phosphat-abhängigen Effekten um direkte oder indirekte, zumindest zum Teil über FGF 23 vermittelte Effekte handelt (Perwad u. Portale, 2011).

Calcitriol selbst vermindert über *Feedback*-Mechanismen die Expression der renalen 1α -Hydroxylase. So reagierten Ratten und auch Mäuse auf eine Calcitriol-Behandlung mit einer Verminderung der CYP27B1-mRNA-Expression (Beckman u. DeLuca, 2002; Chow et al., 2013). Dieser Effekt konnte auch bei thyroparathyroidektomierten Tieren beobachtet werden und scheint somit unabhängig von PTH zu sein (Brenza u. DeLuca, 2000). VDR-*Knockout*-Mäuse wiesen im Vergleich zu Kontrolltieren eine stark erhöhte CYP27B1-mRNA-Expression sowie deutlich höhere Calcitriol-Spiegel auf (Kato et al., 1999; Murayama et al., 1999). Auch konnte in *In-vitro*-Versuchen an proximalen Tubulusepithelien eine deutliche Verminderung der Calcitriol-Produktion nach Zugabe von Calcitriol in das Medium beobachtet werden (Bland et al., 1999). Murayama et al. (1998) gelang der Nachweis eines negativen regulatorischen Elements für Calcitriol in der Promotorregion des humanen 1α -Hydroxylase-Gens. Weiterführende *In-vitro*-Studien zeigten, dass Calcitriol die PTH-induzierte Steigerung der 1α -Hydroxylase-Expression in proximalen Tubulusepithelien der Maus inhibiert (Murayama et al., 1999). All diese Beobachtungen sprechen für einen direkten Calcitriol-vermittelten *Feedback*-Mechanismus. Brenza et al. (1998) konnten hingegen kein VDRE in der untersuchten Promotor-Sequenz des CYP27B1-Gens nachweisen. Darüber hinaus beobachteten sie auch keine Calcitriol-induzierte Verminderung der 1α -Hydroxylase-Expression im Zellkulturversuch (Brenza u. DeLuca, 2000). Insbesondere vor diesem Hintergrund muss bedacht werden, dass womöglich auch FGF 23 zu der negativen Rückkopplung beiträgt. Dafür spricht, neben der direkt expressionshemmenden Wirkung des

Literaturübersicht

Phosphatonins auf CYP27B1 und des Calcitriol-vermittelten Anstiegs der FGF 23-Konzentration im Blut, auch die Tatsache, dass FGF 23-*Knockout*-Mäuse gegenüber Wildtyp-Mäusen signifikant erhöhte Calcitriol-Spiegel aufweisen (Sitara et al., 2004).

Die Regulation der CYP24A1-Expression erfolgt genau entgegengesetzt zu der des CYP27B1. Dabei induziert Calcitriol selbst die Expression des für seine Inaktivierung verantwortlichen Enzyms. Dies konnte im Tierversuch unter anderem an Ratten und Mäusen gezeigt werden, welche auf eine Calcitriol-Behandlung mit einer signifikanten Steigerung der 24-Hydroxylase-Expression in der Niere reagierten (Beckman u. DeLuca, 2002; Chow et al., 2011, 2013). In der Promotor-Region des CYP24A1-Gens der Ratte und des Menschen wurden zudem jeweils zwei VDRE nachgewiesen, über die in *Reporter Gene Assays* eine Calcitriol-induzierte Expressionssteigerung vermittelt werden konnte (Chen u. DeLuca, 1995; Ohya et al., 1994). Diese Beobachtungen belegen, dass Calcitriol ein äußerst potenter Induktor der CYP24A1-Expression ist. Erhöhte PTH-Spiegel hingegen vermindern die CYP24A1-Expression in der Niere. Bei Calcium-restriktiv gefütterten Ratten konnte ein signifikanter Anstieg der PTH- und Calcitriol-Spiegel beobachtet werden. Gleichzeitig war im Nierengewebe dieser Tiere keine 24-Hydroxylase-Aktivität mehr messbar (Beckman et al., 1995). Dass eine stark verminderte Expression des Enzyms die Ursache für die nicht nachweisbare Enzymaktivität darstellte, scheint angesichts der Ergebnisse anderer *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien wahrscheinlich. So verminderte die intravenöse Applikation von PTH oder cAMP eine Calcitriol-vermittelte Expressionssteigerung des Enzyms in der Niere von Ratten deutlich (Shinki et al., 1992). Auch in porzinen Nierenzellkulturen konnte eine Abnahme der 24-Hydroxylase-Expression sowohl durch PTH als auch durch den Adenylyl-Cyclase-Stimulator Forskolin herbeigeführt werden, was für einen über den PTHR vermittelten Effekt spricht (Zierold et al., 2002). Ein weiterer Faktor, der die CYP24A1-Expression beeinflusst, ist die alimentäre Phosphat-Zufuhr, beziehungsweise der Phosphat-Plasmaspiegel. Ratten reagierten auf eine restriktive Phosphat-Zufuhr mit einer signifikanten Abnahme der CYP24-mRNA-Expression und auch die Enzymaktivität der 24-Hydroxylase im Nierengewebe dieser Tiere war deutlich vermindert (Wu et al., 1996). Auch wenn die durch Variation der Phosphat-Zufuhr ausgelösten Änderungen des Calcitriol-Spiegels unabhängig von der Konzentration des PTH oder des ionisierten Calciums im Blut auftreten (Portale et al., 1986), stellt sich in diesem Fall wiederum die Frage, inwieweit es sich um einen direkten oder einen indirekten, FGF 23-abhängigen Effekt handelt. Tatsächlich belegen

verschiedene *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien einen expressionsstimulierenden Effekt dieses Phosphatonins auf die 24-Hydroxylase (Perwad u. Portale, 2011).

Die Anpassung der Expressionsraten beider Enzyme erfolgt sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene sehr schnell, was wiederum ihre enorme Bedeutung für die Kontrolle des Calcitriol- und folglich des Calcium-Spiegels unterstreicht. So wurde für das renale CYP27B1-Protein von Hühnern eine Halbwertszeit von nur etwa 2,5 h ermittelt (Tanaka et al., 1972). Chow et al. untersuchten die Höhe der Calcitriol- und PTH-Spiegel sowie der Expressionsraten von CYP24A1 und CYP27B1 in der Niere von Mäusen im zeitlichen Verlauf nach einer Calcitriol-Behandlung. Dazu wurde den Tieren alle 48 h Calcitriol in pharmakologischer Dosierung verabreicht. Die Tötung erfolgte in unterschiedlichem zeitlichem Abstand zu der Behandlung. Es zeigte sich, dass die mRNA-Expression mit einer Verzögerung von etwa 3 bis 9 h nach dem Calcitriol-*Peak Maximal*- beziehungsweise Minimalniveau (CYP27B1) erreichte. Dabei stieg und sank die Menge an CYP24A1-Protein nahezu zeitgleich mit der der mRNA. Die CYP27B1-Protein-Expression wurde in dieser Studie nicht untersucht (Chow et al., 2013). In einem anderen Versuch an Mäusen war die CYP24A1-Expression in der Niere 4 bis 8 h nach Verabreichung einer pharmakologischen Dosis Calcitriol auf Höchstwerte angestiegen. Die Enzym-Aktivität erreichte ebenfalls bereits nach 8 h Maximal-Niveau (Akeno et al., 1997).

2.3 Mechanismen des renalen Calcium-Transports

Die Mechanismen des renalen Calcium-Transports wurden bisher ausschließlich an monogastrischen Spezies, insbesondere an Labornagern, untersucht. Die folgenden Ausführungen zu Ablauf und Regulation des renalen Calcium-Transports beschreiben daher die Verhältnisse beim monogastrischen Tier.

Etwa die Hälfte des Plasma-Calciums liegt in ionisierter Form vor. Dieser Anteil des Calciums kann glomerulär filtriert werden, während proteingebundenes Calcium nicht filtrierbar ist. In der Regel scheiden Säugetiere nur einen geringen Anteil des glomerulär filtrierten Calciums mit dem Harn aus, wobei allerdings speziesspezifische Unterschiede bestehen (siehe Kapitel 2.6).

Der größte Teil der Calcium-Ionen wird im proximalen Tubulus und dem dicken aufsteigenden Ast der Henle'schen Schleife passiv und parazellulär resorbiert. Die distalen

Nephronabschnitte dienen hingegen der Feineinstellung der renalen Calcium-Exkretion. Der Calcium-Transport erfolgt hier aktiv (Howard et al., 1959) und transzellulär und unterliegt der hormonellen Kontrolle insbesondere durch PTH und Calcitriol (Friedman u. Gesek, 1995) (siehe Abbildung 2.1).

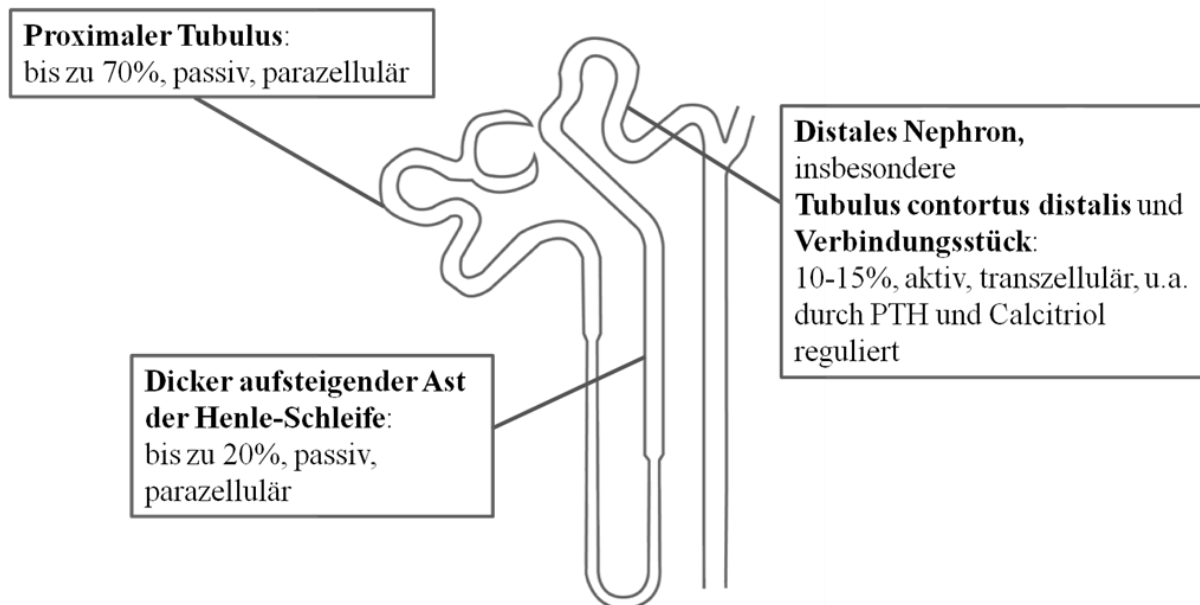


Abbildung 2.1: Calcium-Resorption entlang des Nephrons

Erläuterungen im Text (Kapitel 2.3.1 und 2.3.2 ff.)

2.3.1 Parazellulärer Calcium-Transport in der Niere

Bis zu 70% der glomerulär filtrierte Calcium-Ionen werden bereits in den proximalen Tubulussegmenten resorbiert. Micropunktionsstudien zeigten, dass bei Ratten rund zwei Drittel des glomerulär filtrierte Calciums im Tubulus contortus proximalis resorbiert werden (Lassiter et al., 1963). Mit Hilfe derselben Methode durchgeführte Versuche lieferten Hinweise darauf, dass bei dieser Spezies etwa weitere 10% der Calcium-Ionen im geraden Anteil des proximalen Tubulus resorbiert werden müssen (Jamison et al., 1974; Lassiter et al., 1963; de Rouffignac et al., 1973). Beim Kaninchen konnte dieser Wert durch Microperfusionstudien an isolierten Tubuli bestätigt werden (Rouse et al., 1980). Im dicken aufsteigenden Ast der Henle'schen Schleife werden bei der Ratte circa 20% des filtrierte Calciums resorbiert (Lassiter et al., 1963).

Triebkraft für diesen passiven, parazellulär erfolgenden Calcium-Transport über die *Tight Junctions* ist der elektrochemische Gradient, der in Abhängigkeit von der luminalen Calcium-

Konzentration und der transepithelialen Potenzialdifferenz variiert. Insbesondere in den proximalen Tubuli trägt der so genannte *Solvent-Drag*-Mechanismus zur passiven, parazellulären Resorption der Calcium-Ionen bei (Friedman u. Gesek, 1995; Hoenderop, 2005). Dabei entsteht in Folge des aktiven Transports von Natrium-Ionen, Glucose und Aminosäuren aus dem Lumen in Richtung Blutbahn ein osmotischer Gradient, der zu einer Zunahme der parazellulären Resorption von Wasser und den darin gelösten Ionen führt (Karbach, 1992). Im dicken aufsteigenden Ast der Henle'schen Schleife fördert insbesondere das lumenpositive Potenzial die Calcium-Resorption, wie Untersuchungen am isolierten Nephron von Maus und Kaninchen zeigen konnten (Shareghi u. Agus, 1982; Di Stefano et al., 1993).

Einige Untersuchungen lieferten zudem Hinweise darauf, dass bestimmte *Tight-Junction*-Proteine als eine Art Calcium-Kanal fungieren. Da die Expression dieser Proteine und damit auch die Calcium-Permeabilität der *Tight Junctions* offenbar einer Regulation durch verschiedene Hormone unterliegen, handelt es sich bei der parazellulären Calcium-Resorption nicht um einen Diffusionsprozess im definitionsgemäßen Sinne (Hoenderop, 2004; Tang u. Goodenough, 2003) (siehe Kapitel 2.4.2 ff.).

2.3.2 Transzellulärer Calcium-Transport in der Niere

Die distalen Segmente des Nephrons, insbesondere der Tubulus contortus distalis und das Verbindungsstück sind für die Feineinstellung der renalen Calcium-Exkretion verantwortlich. Bis zu 15% der glomerulär filtrierte Calcium-Ionen können dort entgegen eines elektrochemischen Gradienten resorbiert werden. Auch aufgrund der niedrigen Calcium-Permeabilität der *Tight Junctions* in diesen Abschnitten ist ein aktiver, transzellulärer Transportmechanismus erforderlich (Hoenderop, 2005). Prinzipiell lässt sich der transzelluläre Calcium-Transport in mindestens drei Teilschritte untergliedern. So folgt auf die apikale Aufnahme des Calciums (erster Schritt) der cytosolische Transfer in Richtung der basolateralen Membran (zweiter Schritt), wo dann die Ausschleusung der Calcium-Ionen aus der Zelle (dritter Schritt) erfolgt (Bronner et al., 1986). Dieser Transportprozess wird durch Calcitriol stimuliert, wie unter anderem Versuche an Mäusen und renalen Zellkulturen vom Kaninchen zeigen konnten (Bindels et al., 1991; Hoenderop et al., 2005). Auch PTH ist an der Regulation der transzellulären Calcium-Resorption im distalen Nephron beteiligt (Bindels et al., 1991; Hoenderop, 2005). Daneben existieren eine Reihe weiterer Faktoren, die die Effizienz dieses Transportvorgangs beeinflussen können (siehe Kapitel 2.4.1 ff.).

2.3.2.1 Einstrom über die apikale Membran

Die Calcium-Ionen gelangen durch spezifische, in der apikalen Membran gelegene Calcium-Kanäle (TRPV5 und TRPV6) in die Zelle, wobei ein ausgeprägter elektrochemischer Gradient die Triebkraft für den passiven Einstrom ins Cytosol darstellt. 1999 gelangen zunächst Nachweis und Charakterisierung des Calcium-Kanals TRPV5 in Niere, Dünndarm und Plazenta vom Kaninchen (Hoenderop et al., 1999). Kurz darauf wurde der TRPV6-Kanal im intestinalen Gewebe der Ratte nachgewiesen (Peng et al., 1999). Beide Kanäle konnten im Folgenden auch im Nierengewebe der Maus gezeigt werden (Suzuki et al., 2000). Die Ergebnisse von *In-situ*-Hybridisierungsstudien belegen die Existenz des TRPV5-, nicht aber des TRPV6-Kanals, in der Niere vom Schaf (Wilkens, 2006).

TRPV5 und 6 werden aufgrund ihrer molekularen Struktur der TRP (*Transient Receptor Potential*)-Familie zugeordnet. Diese Proteine bestehen aus vier Untereinheiten mit sechs Transmembrandomänen, mehreren N-terminalen Ankyrin-Motiven und weisen charakteristische Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinasen A und C auf (Hoenderop et al., 1999; Peng et al., 1999). Ihre Zugehörigkeit zur TRPV (*Transient Receptor Potential Vanilloid*)-Subfamilie, der zudem die Kationenkanäle TRPV1 bis 4 angehören, begründet sich auf Sequenzhomologien. Anders als bei den übrigen TRPV-Kanälen handelt es sich bei TRPV5 und 6 um hochselektive Calcium-Kanäle, die bei physiologischen Membranpotenzialen konstitutiv geöffnet sind. Ein Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration sowie ein Abfall des extrazellulären pH-Wertes hemmen die Calcium-Aufnahme über diese Kanäle (Hoenderop et al., 1999; Peng et al., 1999; Vennekens et al., 2000). TRPV5 und 6 sind gemeinsam mit dem cytosolischen Calcium-Transportprotein Calbindin-D_{28K}, dem Natrium-Calcium-Austauscher NCX1 und der Plasmamembran-Calcium-ATPase PMCA1b (siehe Kapitel 2.3.2.2 und 2.3.2.3) in den distalen Nephronsegmenten, insbesondere dem Tubulus contortus distalis und dem Verbindungsstück lokalisiert, wobei jedoch speziesspezifische Unterschiede bestehen (Hoenderop et al., 2000; Loffing u. Kaissling, 2003; Nijenhuis et al., 2003). Obwohl diese beiden Calcium-Kanäle in der Niere – wie in vielen anderen Organen auch – bei vielen Spezies coexprimiert werden, stellt hier offensichtlich TRPV5 die bedeutendere Isoform dar, was sich sowohl in einer höheren Expressionsdichte als auch in einem stärkeren Ansprechen auf Calcitriol zeigt, wie Studien an Mäusen zeigen konnten (Van Cromphaut et al., 2001; Nijenhuis et al., 2003; Song et al., 2003).

2.3.2.2 Transport durch das Cytosol

Für den Transfer der Calcium-Ionen durch das Cytosol, der den zweiten Teilschritt des transzellulären Transportprozesses darstellt, sind die Calcium-bindenden Proteine Calbindin-D_{28K} und Calbindin-D_{9K} (CaBP_{D28K}, CaBP_{D9K}) verantwortlich. Darüber hinaus verhindern sie einen zu hohen Anstieg der Konzentration freier Calcium-Ionen im Cytosol (Schröder et al., 1996), welcher aufgrund der *Second Messenger*-Funktion des Calciums zu einer unkontrollierten Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden führen würde. Der kurzfristige Anstieg der Calcium-Konzentration wird jedoch aufgrund der verhältnismäßig langsamen Kinetik der Calbindine nicht beeinträchtigt, so dass eine Initiierung funktioneller *Second Messenger*-Signale möglich ist (Koster et al., 1995), wie *In-vitro*-Versuche an renalen Zellkulturen vom Kaninchen zeigen konnten.

Bei der Namensgebung von CaBP_{D28K} und CaBP_{D9K} waren Funktion und Molekulargewicht ausschlaggebend. Tatsächlich unterscheiden sich Sequenz und somit auch Struktur der Calbindine jedoch deutlich (Fullmer u. Wasserman, 1981, 1987). Während CaBP_{D28K} vier Calcium-Bindungsstellen aufweist, kann CaBP_{D9K} nur zwei Calcium-Ionen binden (Bredderman u. Wasserman, 1974; Szébenyi u. Moffat, 1986).

CaBP_{D28K} wurde erstmals 1966 im Darm von Hühnern nachgewiesen (Wasserman u. Taylor, 1966), CaBP_{D9K} wenig später im intestinalen Gewebe von Ratten (Kallfelz et al., 1967). Offensichtlich exprimieren Vögel ausschließlich CaBP_{D28K}, während bei Säugetieren beide Calbindin-Typen nachgewiesen werden konnten. Bei Ihnen dient CaBP_{D9K} als intestinales und CaBP_{D28K} als renales Calcium-Transportprotein. Im Nierengewebe einiger Säugetierspezies werden die beiden Calbindin-Formen coexprimiert (Hoenderop, 2005; Thomasset et al., 1982; Wilkens, 2006), wobei die in Mäusen beobachtete membranassoziierte Lokalisation des CaBP_{D9K} eher gegen eine Funktion als cytosolisches *Shuttle*-Protein spricht (Hoenderop et al., 2002). Auch Untersuchungen an *Knockout*-Mäusen zeigten, dass CaBP_{D9K} für die renale Calcium-Resorption von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint. So war die renale Calcium-Exkretion bei CaBP_{D28K}-Deletionsmutanten doppelt so hoch wie beim Wildtyp, während zwischen CaBP_{D9K}-*Knockout*- und den entsprechenden Wildtyp-Mäusen keine Unterschiede in der renalen Calcium-Ausscheidung festgestellt werden konnten (Lee et al., 2007; Sooy et al., 2000). Die Bedeutung der Calbindine für den transzellulären Calcium-Transport wird durch die Colokalisation mit anderen an diesem Prozess beteiligten Proteinen unterstrichen (Hoenderop et al., 2000). In der Niere werden diese Strukturen ihrer Funktion

entsprechend insbesondere in den distalen Nephronabschnitten exprimiert (Loffing et al., 2001).

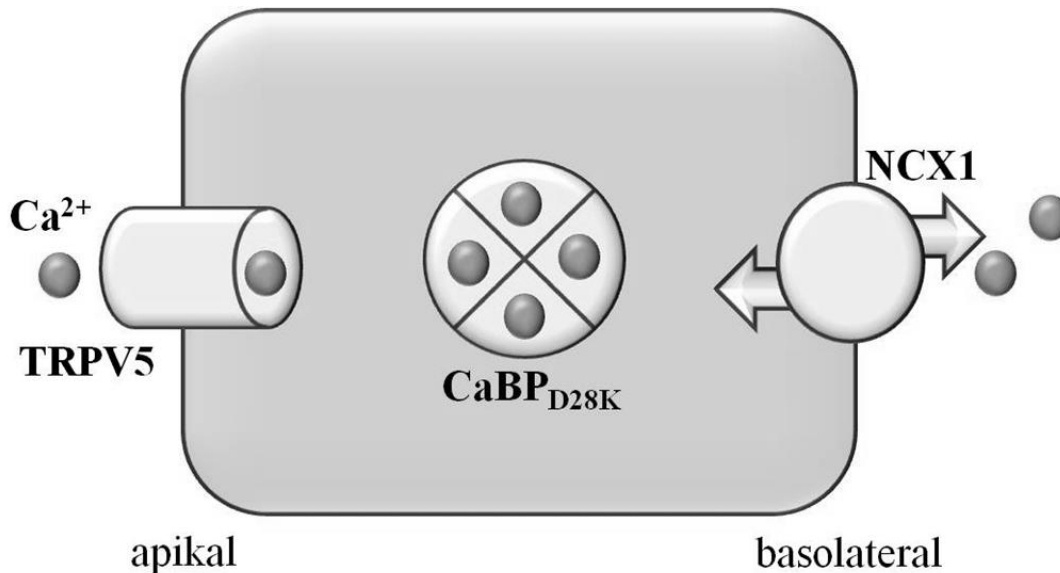


Abbildung 2.2: Klassisches Modell des renalen transzellulären Calcium-Transports
Erläuterungen im Text (Kapitel 2.3.2 ff.)

2.3.2.3 Ausschleusung über die basolaterale Membran

Im dritten Teilschritt des Transportprozesses werden die Calcium-Ionen gegen den elektrochemischen Gradienten über die basolaterale Membran aus der Zelle ausgeschleust. In der Niere erfolgt dies in erster Linie durch den sekundär aktiven Natrium-Calcium-Austauscher NCX1 (Nicoll et al., 1990), während die primär aktive, Plasmamembran-Calcium-ATPase PMCA (Ghijssen et al., 1982) hier von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint. So führte in *In-vitro*-Versuchen an Zellkulturen, die aus distalen Tubulusepithelzellen von Kaninchen generiert wurden, eine Entfernung der Natrium-Ionen aus dem basolateralen Kompartiment zu einer Abnahme der Calcium-Transportrate um nahezu 70% (Bindels et al., 1992). Zudem scheint die Expression des in der Niere bedeutsamen PMCA-Isotyps 1b (Kip u. Strehler, 2003) weniger streng durch Calcitriol reguliert zu sein. In 1α -Hydroxylase-*Knockout*-Mäusen wurde beispielsweise eine deutliche Abnahme der renalen NCX1-Expression beobachtet, wohingegen die PMCA1b-Expression nicht signifikant vermindert war (Hoenderop et al., 2002). In Versuchen an MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*)-Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass rund zwei Drittel des Calciums über den NCX1 aus

der Zelle transportiert werden (Bindels et al., 1992; Hoenderop et al., 2002; Kip u. Strehler, 2003).

2.4 Regulation der renalen Calcium-Exkretion

Auch die Studien, die die Regulation des renalen Calcium-Transports auf molekularbiologischer Ebene untersucht haben, wurden ausschließlich an monogastrischen Spezies durchgeführt, so dass sich die folgenden Unterkapitel auf die Verhältnisse beim Monogastrier beziehen.

2.4.1 Regulation des transzellulären Calcium-Transports

Im Folgenden wird insbesondere auf die – nach jetzigem Kenntnisstand – bedeutsamsten Regulationsmechanismen eingegangen. Weitere Faktoren sind bekannt, jedoch bisher weitaus weniger intensiv untersucht worden.

2.4.1.1 Calcitriol

Schon früh wurde vermutet, dass der stimulierende Effekt des Vitamin D auf den intestinalen Calcium-Transport auf die Wirkung des damals gerade entdeckten Metaboliten Calcitriol zurückzuführen ist (Haussler et al., 1968; Myrtle et al., 1970). Inzwischen ist allgemein anerkannt, dass Calcitriol den Vitamin D-Metaboliten mit der höchsten biologischen Aktivität darstellt und dass es den aktiven transzellulären Calcium-Transport stimuliert, indem es die Expression Calcium-transportierender Proteine über den genomischen Weg steigert (Hoenderop et al., 2005) (siehe auch Kapitel 2.1.1). Die bei Labornagern beobachtete Calcitriol-vermittelte Zunahme der renalen TRPV5- (Nijenhuis et al., 2003; Song et al., 2003), Calbindin- (Cao et al., 2002; Song et al., 2003; Varghese et al., 1988) und womöglich auch der NCX1-Gen-Expression (Hoenderop et al., 2002) bewirkt eine Erhöhung der Calcium-Resorptionsrate und somit die Verminderung der Calcium-Ausscheidung über den Urin, was wiederum zur Erhöhung des Calcium-Plasmaspiegels beiträgt (Hoenderop et al., 2002). Die Colokalisation eben dieser Proteine mit dem VDR, der für die Vermittlung dieses Effekts unabdingbar ist (Xi et al., 2011), konnte auch im distalen Nephron des Menschen gezeigt werden (Kumar et al., 1994) und unterstreicht die Bedeutung des Calcitriols für die Regulation des aktiven Calcium-Transportes in der Niere monogastrischer Spezies. Während VDRE in der Promotorregion des humanen TRPV6- sowie des humanen und murinen TRPV5-Gens (Meyer et al., 2006; Müller et al., 2000; Weber et al., 2001), der CaBP-Gene

von Maus und Ratte (Darwish u. DeLuca, 1992; Gill u. Christakos, 1993) und des PMCA1b-Gens des Menschen (Glendenning et al., 2000) nachgewiesen wurden, gelang dies bis jetzt nicht für das NCX1-Gen. Auch aufgrund widersprüchlicher Versuchsergebnisse ist noch nicht abschließend geklärt, ob die Expression dieses Natrium-Calcium-Austauschers durch Calcitriol reguliert wird. So hatte Calcitriol in Primärzellkulturen distaler Nephronsegmente keinen deutlichen Effekt auf die mRNA- und Protein-Expression von NCX1 (Van Baal et al., 1996). Andererseits bewirkte eine Calcitriol-Behandlung bei der Maus neben einer deutlichen Zunahme der mRNA-Expression von TRPV5 auch eine signifikante Steigerung der NCX1-Expression in der Niere (Hoenderop et al., 2002). In einer anderen Studie an Ratten konnte infolge einer Calcitriol-Behandlung wiederum keine statistisch relevante Expressionssteigerung des renalen NCX1 beobachtet werden (Frick et al., 2013). Während bei VDR-*Knockout*-Mäusen vom Leuven-Typ keine Abnahme der NCX1-RNA-Expression in der Niere beobachtet werden konnte, reduzierten sich die Expressionsraten bei VDR-Deletionsmutanten vom Tokyo-Typ etwa um die Hälfte (Van Cromphaut et al., 2001).

2.4.1.2 Parathormon

Eine entscheidende Rolle in der Regulation des renalen Calcium-Transports spielt auch das Peptidhormon PTH (Kapitel 2.1.2). Die vermehrte Freisetzung dieses Hormons in Situationen eines sinkenden Calcium-Plasmaspiegels bewirkt eine Aktivitätssteigerung der renalen 1α -Hydroxylase und somit einen Anstieg der Calcitriol-Spiegel (Ramasamy, 2006). Dieser wiederum vermittelt über die bereits genannten Mechanismen eine Steigerung der renalen Calcium-Resorption.

Neben diesem Calcitriol-abhängigen PTH-Effekt sind jedoch auch direkte Effekte dieses Hormons auf den transzellulären Calcium-Transport in der Niere beschrieben worden. So steigert PTH die Aufnahme von Calcium in Tubulusepithelzellen durch Verminderung der Endocytoserate sowie Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit des apikalen Calcium-Kanals TRPV5, wie Untersuchungen an renalen Zellkulturen zeigen konnten (Cha et al., 2008; de Groot et al., 2009). Ergebnisse aus Versuchen an Ratten sprechen zudem für eine Regulation der Expression der am renalen Calcium-Transport beteiligten Strukturen durch PTH. In Folge einer Parathyroidektomie konnte bei diesen Tieren eine signifikante Abnahme der renalen TRPV5-, CaBP_{D28K}- und NCX1-Expression beobachtet werden. Nach Behandlung mit PTH normalisierten sich die Expressionsraten der Calcium-transportierenden Proteine, wohingegen die Expression des CaSR, des VDR und auch die Höhe des Calcitriol-Spiegels

nicht durch die exogene PTH-Zufuhr beeinflusst wurden (van Abel et al., 2005). Bereits ein Jahr zuvor wurde in einem Versuch an renalen Primärzellkulturen eine Expressionssteigerung des TRPV5-Gens infolge der Zugabe von PTH beobachtet (Okano et al., 2004). Zudem scheint PTH die Calcium-Ausschleusung über die Plasmamembran-Calcium-ATPase PMCA1b zu stimulieren. So konnte in Versuchen an basolateralen Membranvesikeln distaler Tubuli von Ratten nach Zugabe von PTH eine Aktivitätssteigerung des Transporters beobachtet werden, die auf einer Erhöhung der Affinität zu Calcium beruhte (Tsukamoto et al., 1992).

2.4.1.3 Calcium

Neben den in Abhängigkeit vom Calcium-Plasmaspiegel freigesetzten Hormonen können die Höhe der Calcium-Konzentration im Blut und im Primärharn selbst und damit auch die alimentäre Calcium-Zufuhr den transzellulären Calcium-Transport in der Niere beeinflussen. In einem Versuch an Mäusen zeigten homozygote 1α -Hydroxylase-Deletionsmutanten ein klinisches Erscheinungsbild, das dem von Patienten mit Pseudo-Vitamin D-Mangel-Rachitis entsprach. Auf molekularbiologischer Ebene fiel eine im Vergleich zu heterozygoten, phänotypisch gesunden Deletionsmutanten signifikant verminderte mRNA-Expression von TRPV5, CaBP_{D28K} und NCX1 in der Niere auf. Eine deutliche Abnahme der TRPV5- und CaBP_{D28K}-Expression konnte auch auf Proteinebene beobachtet werden. Während sich bei den homozygoten *Knockout*-Mäusen nach Fütterung einer Diät mit hohem Calcium-Gehalt die Expressionsraten dieser Proteine und auch der vormals deutlich erniedrigte Calcium-Plasmaspiegel normalisierten, kam es bei den heterozygoten Deletionsmutanten zu einer Abnahme der renalen Expression dieser Strukturen (Hoenderop et al., 2002). Diese Ergebnisse sprechen für einen genomisch-vermittelten Effekt des Calciums, wobei der genaue Mechanismus noch unbekannt ist. Daneben können entsprechende Effekte auch über den CaSR vermittelt werden. Topala et al. konnten zeigen, dass dieser im distalen Nephron gemeinsam mit dem TRPV5-Kanal in der luminalen Membran exprimiert wird. In *In-vitro*-Versuchen führte eine Aktivierung des CaSR im distalen Nephron über eine Initiierung von Signalkaskaden zur Erhöhung des Calcium-Einstroms über den TRPV5-Kanal. Dabei scheint eine Phosphorylierung von TRPV5 eine Verminderung der konstitutiven Endocytoserate zu bewirken (Topala et al., 2009).

2.4.1.4 pH-Wert

Inwieweit der pH-Wert des Primärharns an der Regulation des transzellulären Calcium-Transports in der Niere beteiligt ist, ist noch nicht abschließend geklärt. In Studien an Mäusen führte die durch orale Verabreichung von NH_4Cl oder dem Carboanhydrase-Hemmer Azetolamid induzierte metabolische Azidose zu einer Abnahme der TRPV5- und $\text{CaBP}_{\text{D28K}}$ -mRNA- und Protein-Expression in der Niere und zu einer Zunahme der renalen Calcium-Exkretion, wohingegen die durch Gabe von NaHCO_3 ausgelöste metabolische Alkalose eine Zunahme der Expression dieser Strukturen und eine Abnahme der Calcium-Ausscheidung über den Urin bewirkte. Da zumindest die Effekte der Alkalose auch in TRPV5-*Knockout*-Mäusen beobachtet wurden, ist davon auszugehen, dass in diesem Fall zusätzliche Mechanismen zu der Verringerung der Calcium-Exkretion beigetragen haben müssen (Nijenhuis et al., 2006). In Versuchen an HEK (*Human Embryonic Kidney*)-Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass eine Verringerung des pH-Wertes im Medium von 7,4 auf 6,0 zu einer signifikanten Abnahme des Calcium-Einstroms über den TRPV5-Kanal führte, wobei dieser Effekt offenbar nicht auf eine Änderung der Expression des Proteins beruhte (Vennekens et al., 2001). Dies spricht dafür, dass der pH-Wert die Transportaktivität auch auf posttranskriptioneller Ebene beeinflussen kann.

2.4.1.5 Östrogene

Dass Östrogene an der Regulation des renalen Calcium-Transportes beteiligt sein können, konnte in verschiedenen Tierversuchen gezeigt werden. So erhöhte eine Behandlung mit 17β -Estradiol in pharmakologischer Dosis die TRPV5-, $\text{CaBP}_{\text{D28K}}$ -, NCX1- und PMCA1b-mRNA-Expression sowie die TRPV5-Protein-Expression in der Niere ovariectomierter Mäuse signifikant (van Abel et al., 2002). Östrogen-Rezeptor α -*Knockout*-Mäuse wiesen trotz physiologischer Calcitriol-Spiegel und einer mit Wildtyp-Mäusen vergleichbaren renalen VDR-Expression eine signifikant verringerte mRNA-Expression der am renalen Calcium-Transport beteiligten Strukturen auf. In einem weiteren Teilprojekt der gleichen Studie konnte bei ovariectomierten VDR-*Knockout*- und Wildtyp-Mäusen eine Verdopplung der renalen TRPV5-mRNA-Expression durch Östrogenbehandlung erreicht werden (van Cromphaut et al., 2003). Folglich können Östrogene offensichtlich unabhängig von Calcitriol die Expression von am Calcium-Transport beteiligten Proteinen regulieren, wobei der Östrogen-Rezeptor α eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. In der Promotorregion des TRPV6-Gens der Maus konnte zudem ein *Estrogen-Responsive Element* nachgewiesen werden (Weber et al., 2001).

2.4.2 Regulation des parazellulären Calcium-Transports

Lange Zeit wurde der parazelluläre Calcium-Transport als reiner Diffusionsprozess verstanden. Da dieser vornehmlich durch den transepithelialen elektrochemischen Gradienten angetrieben wird, beeinflussen alle Faktoren, die dessen Größe verändern, auch indirekt die Resorptionsrate der Calcium-Ionen (Hoenderop, 2005). Tatsächlich unterliegen aber auch die als interzelluläre Barriere fungierenden *Tight Junctions* dem Einfluss verschiedener regulierender Faktoren, die auf diese Weise ebenfalls die Effizienz des parazellulären Calcium-Transports modulieren. In verschiedenen Untersuchungen wurde beobachtet, dass bestimmte Komponenten dieser interzellulären Barriere als eine Art Ionenkanal fungieren können (Tang u. Goodenough, 2003), wobei es sich dabei offenbar um porenformende Untereinheiten der so genannten Claudine handelt (Colegio et al., 2002).

2.4.2.1 Calcitriol

Die Expression der Claudine wird unter anderem durch Calcitriol beeinflusst. So weisen *VDR-Knockout*-Mäuse eine verminderte Expression von Claudin 2 und 12 im intestinalen Gewebe auf, während in epithelialen colorectalen Adenocarcinom-Zellen (*CaCo-2*-Zellen) eine Expressionssteigerung nach Calcitriol-Behandlung beobachtet werden kann. Eine Überexpression der Proteine resultiert in einer Zunahme des parazellulären Calcium-Transports, was deren Bedeutung für die intestinale Calcium-Absorption unterstreicht (Fujita et al., 2008). Zur Calcitriol-abhängigen Regulation der renalen *Tight Junction*-Proteine existieren bisher kaum Daten. Efrati et al. untersuchten die Regulation des humanen Claudin 16-Gens in verschiedenen Nierenzellkulturen. Das entsprechende Protein bildet im Bereich der *Tight Junctions* Poren aus, die für bivalente Kationen selektiv permeabel sind. Im Rahmen dieser Studie wurde in *Reporter Gene Assays* interessanterweise ein hemmender Effekt des Calcitriols auf die Transkription des Claudin 16-Gens beobachtet, der jedoch nicht über ein VDRE sondern offenbar über ein *PPRE* (*Peroxisome Proliferator Response Element*) vermittelt wurde (Efrati et al, 2004). Es ist zudem denkbar, dass darüber hinaus positive VDRE in nicht untersuchten Bereichen dieses Gens existieren.

2.4.2.2 Parathormon

Im Zellkulturversuch steigerte PTH im dicken aufsteigenden Ast der Henle'schen Schleife die passive Calcium-Resorption, wobei die entsprechenden Untersuchungen am isolierten Tubulus-Segment keine Rückschlüsse auf den zugrundeliegenden Mechanismus zuließen. So

wurde beispielsweise die transmembranäre Potenzialdifferenz durch die Zugabe von PTH ins Medium nicht beeinflusst (Shareghi u. Agus, 1982). Andere *In-vitro*-Versuche am dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife der Maus zeigten, dass die Steigerung der Calcium-Resorptionsrate durch PTH auf eine Permeabilitätssteigerung der *Tight Junctions* zurückzuführen ist (Wittner et al., 1993).

2.4.2.3 Calcium

Auch der Calcium-Plasmaspiegel selbst hat Einfluss auf die parazelluläre Calcium-Resorptionsrate. Hohe Konzentrationen ionisierten Calciums scheinen im Bereich des aufsteigenden Astes der Henle'schen Schleife über den dort basolateral lokalisierten CaSR (Riccardi et al., 1998) einen negativen *Feedback*-Mechanismus zu initiieren, der eine Verminderung der parazellulären Calcium-Resorption zur Folge hat. Eine hohe Calcium-Zufuhr, infolge von Calcitriol-Gaben erhöhter Calcium-Plasmaspiegel sowie die Gabe von Calcimimetika bewirkten beispielsweise eine Zunahme der renalen Claudin 14-Expression. Im Rahmen derselben Studie durchgeführte Versuche an Nierenzellkulturen konnten zeigen, dass eine Überexpression dieses Claudins zu einer Zunahme des transepithelialen Widerstandes und einer Abnahme der parazellulären Calcium-Fluxraten führten (Dimke et al., 2013). Hinweise auf die Existenz eines entsprechenden *Feedback*-Mechanismus ergaben sich auch im Rahmen der Untersuchung von Erbkrankheiten. So konnte eine autosomal dominant vererbte, aktivierende Mutation des CaSR-Gens als Ursache einer hypocalcämischen Hypercalciurie identifiziert werden (Dimke et al., 2009). Mäuse, die keinen renalen CaSR exprimieren, zeigten bei erhöhter Calcium-Zufuhr eine im Vergleich zu Kontrolltieren mit funktionsfähigem CaSR signifikant verminderte Calcium-Exkretion über den Urin. Die renale Expression von Claudin 14 war bei diesen Tieren vermindert, während eine Zunahme der Claudin 16-Expression beobachtet werden konnte. Claudin 16 ermöglicht die Resorption von Kationen wie Calcium und Magnesium aus der Tubulusflüssigkeit. Des Weiteren fielen die CaSR-*Knockout*-Mäuse durch eine etwa vierfach höhere Expression des im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife lokalisierten $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC2) -Cotransporters auf. Eine gesteigerte Aktivität dieses an sich elektroneutralen Transporters bedingt aufgrund eines vermehrten Rückstroms der Kalium-Ionen ins Lumen und einer zunehmenden Ausschleusung von Chlorid-Ionen über die basolaterale Membran eine Erhöhung des lumenpositiven Potenzials (Houillier u. Paillard, 2003), wodurch die parazelluläre Resorption von Calcium gesteigert wird (Toka et al., 2012). Die extrazelluläre Calcium-Konzentration beeinflusst also die Expression verschiedener Claudine und des NKCC2-Cotransporters und

somit letztendlich die parazelluläre Resorption von Calcium, wobei diese Effekte offensichtlich über den CaSR vermittelt werden.

2.5 Mechanismen und Regulation der renalen Phosphat-Exkretion

Glomerulär filtrierte Phosphat-Ionen werden im proximalen Tubulus sekundär aktiv resorbiert, wobei bisher nur die für die apikale Aufnahme des Phosphats verantwortlichen Transporter identifiziert werden konnten (Magagnin et al., 1993; Murer u. Biber, 1997). Unklar ist hingegen, welche Mechanismen für den intrazellulären Transport und die basolaterale Ausschleusung des Phosphats verantwortlich sind.

Der Großteil des Phosphats wird durch den Natrium-Phosphat-Cotransporter NaPi2a in die Zelle transportiert, ein geringerer Anteil durch den NaPi2c-Transporter, der insbesondere in juvenilen Individuen von Bedeutung zu sein scheint (Forster et al., 2006). PTH vermittelt die Internalisierung beider NaPi-Transporter, was innerhalb weniger Stunden zu einer deutlichen Abnahme der Transporter-Dichte in der apikalen Membran führt (Lanzano et al., 2011). Darüber hinaus scheint ein längerfristig erhöhter PTH-Spiegel über eine Reduktion der mRNA-Stabilität auch die NaPi2a-mRNA-Expression zu vermindern (Murray et al., 2013). So konnte bei Ratten mit chronisch erhöhtem PTH-Spiegel eine Abnahme der NaPi2a-mRNA-Expression um mehr als die Hälfte beobachtet werden (Dranitzki Elhalel et al., 2004). In Versuchen an parathyroidektomierten Ratten hatte eine Calcitriol-Behandlung über einen Zeitraum von sieben Tagen eine Verminderung der renalen NaPi2a-mRNA-Expression zur Folge. Dieser Effekt verstärkte sich, wenn die Tiere zeitgleich Calcitriol und PTH erhielten (Friedlaender et al., 2001). Auch die Phosphat-Zufuhr über das Futter scheint die NaPi-Expression zu beeinflussen. Bei Ratten führte eine einwöchige alimentäre Phosphat-Restriktion zu einer Zunahme sowohl der mRNA- und Protein-Expression von NaPi2a im proximalen Tubulus, wohingegen eine akute Erhöhung der Phosphat-Zufuhr über das Futter lediglich eine Zunahme der Transporter-Dichte zur Folge hatte (Levi et al., 1994; Ritthaler et al., 1999). Da im Rahmen dieser Studien keine Plasmaparameter untersucht wurden, bleibt jedoch unklar, ob es sich hierbei um direkte oder indirekte, beispielsweise über PTH oder ein Phosphatonin vermittelte Effekte handelte. Eine hohe Phosphat-Zufuhr über das Futter, aber auch ein hoher Calcitriol-Spiegel stimulieren beispielsweise die Synthese und folglich auch die Freisetzung des Phosphatonins FGF 23 aus Osteoblasten und Osteoklasten (Jüppner et al., 2010). Bei Mäusen bewirkte die Injektion von FGF 23 eine Abnahme der renalen NaPi2a-mRNA- und -Protein-Expression, wobei dieser Effekt unabhängig von einem Anstieg der

PTH-Spiegel auftrat und auch bei parathyroidektomierten Tieren beobachtet werden konnte (Shimada et al., 2003). Womöglich kann auch der Glucocorticoid-Spiegel die Phosphat-Exkretion über die Niere beeinflussen. So bewirkte die Verabreichung von Glucocorticoiden in Untersuchungen an Ratten eine Zunahme der Phosphat-Exkretion, die auf eine Verminderung der Natrium-abhängigen Phosphat-Aufnahme im proximalen Tubulus zurückzuführen war (Freiberg et al., 1982; Turner et al., 1982). Auch eine azidotische Stoffwechsellage hat bei der Ratte eine Hemmung der renalen Phosphat-Resorption zur Folge, wobei dieser Effekt bei einer über 12 h anhaltenden Azidose über eine verminderte mRNA- und Protein-Expression des NaPi2a-Gens vermittelt wird, wohingegen in den ersten Stunden eher die vermehrte Internalisierung des Transporters von Bedeutung zu sein scheint (Ambühl et al., 1998). Nach Entfernung der Nebennieren bleibt der Phosphat-diuretische Effekt einer metabolischen Azidose hingegen aus. Bei diesen Tieren konnte jedoch durch Behandlung mit dem Glucocorticoid Dexamethason – unabhängig vom Säure-Basen-Status – eine entsprechende Steigerung der renalen Phosphat-Ausscheidung ausgelöst werden (Boross et al., 1986). Dies könnte darauf hinweisen, dass die bei azidotischen Tieren beobachtete Abnahme der Phosphat-Resorption indirekt über eine vermehrte Glucocorticoid-Sekretion aus der Nebenniere vermittelt wird, wobei in dieser Studie ein Zusammenhang mit der Höhe der PTH-Spiegel nicht untersucht wurde und folglich nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann.

2.6 Calcium-Homöostase monogastrischer Spezies: Bedeutung der Niere

Die Niere ist in doppelter Hinsicht entscheidend an der Regulation des Calcium-Haushaltes beteiligt: Zum Einen wird in der Niere das Hormon Calcitriol gebildet, das durch die Steuerung von Calcium-Transport- und -Mobilisationsprozessen in Gastrointestinaltrakt, Niere und Knochen grundlegend zur Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase beiträgt (siehe Kapitel 2.1.1). Zum Anderen stellt die renale Calcium-Exkretionsrate eine der „Stellgrößen“ der Calcium-Homöostase dar.

Dabei wird in der Regel nur ein kleiner Anteil des glomerulär-filtrierte Calciums über den Urin ausgeschieden. So werden beim Hund etwa 99% des glomerulär filtrierte Calciums resorbiert (Belén García-Rodríguez et al., 2003; Chen u. Neuman, 1955), bei Ratten liegen die Resorptionsraten mit 99% bis zu 99,8% im gleichen Bereich (Lassiter et al., 1963; Roy u. Seely, 1981) und auch in Versuchen mit Kaninchen betrug die Fraktionelle Calcium-Exkretion bei adäquater Calcium-Zufuhr rund 1% (Whiting u. Quamme, 1984). In Calcium-Überschuss- oder -Mangelsituationen wird die renale Calcium-Exkretionsrate bei

monogastrischen Spezies entsprechend gesteigert beziehungsweise vermindert, wie unter anderem Studien an Ratten, Kaninchen und Hunden zeigen konnten (Brommage, 1989; Whiting u. Quamme, 1984; Zawada et al., 1986). Dabei bestehen deutliche Speziesunterschiede in der Adaptationsfähigkeit der renalen Calcium-Ausscheidung an eine inadäquate Zufuhr des Mengenelements. Insbesondere Pflanzenfresser wie das Pferd und das Kaninchen, die im Hinblick auf die Ausscheidung von Makromineralien über den Urin aufgrund des ebenfalls alkalischen Harn-pHs eher mit Wiederkäuern vergleichbar sind als Fleischfresser, reagieren auf ein Überangebot von Calcium mit der Ausscheidung sehr großer Calcium-Mengen über den Urin. So konnte die renale Calcium-Exkretion von Kaninchen durch Infusion einer hochkonzentrierten Calcium-Lösung um etwa das 20-fache gesteigert werden (Peart et al., 1986). In einer anderen Studie lag die Fraktionelle Calcium-Exkretion von Kaninchen nach Fütterung einer Diät mit hohem Calcium-Gehalt (1,89%) bei etwa 6%, während adäquat mit Calcium versorgte Kontrolltiere lediglich Werte von rund 1% erreichten (Whiting u. Quamme, 1984). Auch bei Pferden kann die Fraktionelle Calcium-Exkretion bei hoher alimentärer Zufuhr auf bis zu 6,7% ansteigen (Morris et al., 1984). Im Gegensatz dazu erhöhte sich die Fraktionelle Calcium-Exkretion bei Hunden infolge der Fütterung eines Calcium- und Vitamin D-reichen Futters lediglich von 0,7% auf 1,7%, obwohl die Diät eine Hypercalcämie verursachte (Zawada et al., 1986).

2.6.1 Bedeutung der Niere in Situationen einer alimentären Calcium-Restriktion

In Situationen eines Calcium-Mangels bedingt das Absinken des Calcium-Plasmaspiegels eine vermehrte Freisetzung von PTH aus den Nebenschilddrüsen. PTH stimuliert die Expression der renalen 1α -Hydroxylase und vermittelt so einen Anstieg der Calcitriol-Spiegel. Unter dem Einfluss der beiden Hormone kommt es zu einer Steigerung der intestinalen Calcium-Absorption, der Freisetzung von Calcium aus dem Knochen und zu einer Abnahme der renalen Calcium-Exkretion (siehe auch Kapitel 2.1.1 und 2.1.2). So trägt bei monogastrischen Spezies in Calcium-Mangelsituationen die Verminderung der Calcium-Ausscheidung über den Urin zur Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase bei. Zum Beispiel verringerte sich bei Kaninchen, die mit einem Futter mit niedrigem Calcium-Gehalt (0,29%) versorgt worden waren, die innerhalb von 24 h über den Urin ausgeschiedene Calcium-Menge beispielsweise um 46% im Vergleich zu adäquat gefütterten Kontrolltieren (Whiting u. Quamme, 1984). In einem Fütterungsversuch mit Pferden, die wie Kaninchen als Pflanzenfresser einen eher alkalischen Harn-pH aufweisen und in dieser Hinsicht den Wiederkäuern ähneln, führte eine Reduktion der täglichen Calcium-Zufuhr von

242 mg/kg KGW auf 29 mg/kg KGW zu einer signifikanten Verminderung der renalen Calcium-Exkretion von 33 mg/kg KGW auf 5,5 mg/kg KGW (Schryver et al., 1970) und bei Ratten sank der Calcium-Creatinin-Quotient im Urin infolge einer Verringerung des Calcium-Gehalts im Futter von 1,2% auf 0,1% um etwa 85% (Zhang et al., 2008).

Dass diese Verminderung der renalen Calcium-Exkretion beim monogastrischen Tier offensichtlich auf eine Expressionssteigerung der am transepithelialen Calcium-Transport beteiligten Strukturen zurückzuführen ist, wurde bisher ausschließlich in Studien an Labornagern gezeigt. So stieg die TRPV5- und CaBP_{D28K}-mRNA-Expression in der Niere von Calcium-restriktiv gefütterten Ratten signifikant an (Ko et al., 2009). Eine signifikant höhere Expression der renalen TRPV5- und Calbindin-mRNA konnte auch bei Mäusen in Situationen einer vergleichsweise niedrigeren alimentären Calcium-Zufuhr beobachtet werden (Hoenderop et al., 2002). Bislang fehlen entsprechende Untersuchungen an anderen Spezies.

2.6.2 Bedeutung der Niere in der Laktation

In der Laktation führt der Calcium-Verlust über die Milch zu einer Belastung des Calcium-Haushaltes. Dabei bestehen deutliche Speziesunterschiede. Während beim Menschen der Calcium-Bedarf während der Laktation im Vergleich zur Endphase der Gravidität um etwa 75% geringer ist, müssen laktierende Ratten schon direkt nach der Geburt immerhin 50% der in späten Trächtigkeit bereitgestellten Calcium-Menge in die Milch sezernieren. Mit zunehmendem Wachstum der Jungen steigt der Calcium-Bedarf bei dieser Spezies innerhalb weniger Tage weiter an. In dieser Phase entwickeln die Tiere oftmals eine geringgradige Hypocalcämie und es kommt zu einem zusätzlichen Anstieg der bereits erhöhten PTH- und Calcitriol-Spiegel (Boass et al., 1997; Horst et al., 2005). Neben einer deutlichen Steigerung der intestinalen Calcium-Aufnahme (Halloran et al., 1980) zählt auch hier die Verminderung der renalen Calcium-Exkretion zu den adaptiven Mechanismen. So zeigten laktierende Ratten in den ersten zwei Wochen nach der Geburt ihrer Jungen eine um 75% reduzierte Calcium-Ausscheidung über den Urin bei gleichzeitig signifikant erhöhtem Calcitriol-Spiegel (Brommage, 1989). Womöglich ist auch hier die Ursache in einer deutlichen Zunahme der Expression Calcium-transportierender Strukturen zu suchen. Zumindest bei der Maus konnte eine signifikante Steigerung der TRPV5- und Calbindin-mRNA-Expression in der Laktation beobachtet werden (van Cromphaut et al., 2003).

2.7 Calcium-Homöostase des Wiederkäuers: Bedeutung der Niere

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind nur wenige Studien durchgeführt worden, die sich mit den renalen Calcium-homöostatischen Mechanismen der Wiederkäuerspezies beschäftigen. Insbesondere molekularbiologische Untersuchungen zur Regulation des renalen Calcium-Transports und Vitamin D-Metabolismus⁴ fehlen bislang. Eine abschließende Beurteilung der Bedeutung der Niere für die Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase des Wiederkäuers ist daher zurzeit noch nicht möglich.

Bei den im Folgenden aufgeführten Daten handelt es sich zum großen Teil um Ergebnisse von Bilanzstudien. Diese zeigen, dass Wiederkäuer – anders als monogastrische Tiere (siehe Kapitel 2.6.1) – auf eine alimentäre Calcium-Restriktion nicht mit einer Verminderung der renalen Calcium-Exkretion reagieren.

Inwieweit beim laktierenden Wiederkäuer renale calcium-homöostatischer Mechanismen von Bedeutung sind, lässt sich anhand der vorhandenen Daten, die insbesondere Änderungen von relevanten Blut-Parametern in der Peripartalperiode sowie die Ergebnisse einiger weniger Bilanzstudien umfassen, ebenfalls nur unzureichend beurteilen.

2.7.1 Bedeutung der Niere in Situationen einer alimentären Calcium-Restriktion

Die Ergebnisse verschiedener Bilanzstudien an Wiederkäuern weisen darauf hin, dass bei diesen Spezies eine „renale Calcium-Konservierung“ als Mechanismus zur Kompensation eines ungenügenden Calcium-Angebots keine entscheidende Rolle zu spielen scheint. So wurde der Calcium-Gehalt des Urins nicht laktierender, tragender Milchkühe durch eine Reduktion der täglichen Calcium-Zufuhr von 32 g auf 16 g nicht beeinflusst (Martz et al., 1999). Auch in Bilanzstudien an laktierenden Milchkühen, die Futter mit hohem (1,03%), mittlerem (0,78%) oder niedrigem (0,52%) Calcium-Gehalt erhielten, konnte keine Änderung der renalen Calcium-Exkretion in Abhängigkeit von der Diät beobachtet werden (Taylor et al., 2009). Calcium-defiziente Schafe zeigten keine signifikante Abnahme der Calcium-Ausscheidung über den Urin bei Verminderung der alimentären Calcium-Zufuhr von 317 mg/kg KGW auf 16 mg/kg KGW (Braithwaite, 1975).

In einem im Physiologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführten Fütterungsversuch an Schafen (siehe auch Kapitel 3.1) bewirkte eine verminderte Calcium-Aufnahme über die Dauer von vier bis acht Wochen (siehe Tabelle 2.1) zwar eine signifikante

Abnahme der Calcium-Plasmaspiegel und einen signifikanten Anstieg der Spiegel von Phosphat-, Calcitriol- und des Knochenresorptionsmarkers CrossLaps® im Blut (Abbildung 2.4 und 2.5). Auch hier wurde jedoch die Fraktionelle Exkretion von Calcium und Phosphat nicht durch die alimentäre Calcium-Restriktion beeinflusst (Wilkins et al., 2010) (siehe Abbildung 2.3 und Tabelle 2.2).

Tabelle 2.1: Mittlere tägliche Aufnahme an Nährstoffen und Mineralstoffen pro Tier und Tag (als Teilgröße des über vier Wochen ermittelten Gruppenmittelwertes) in g oder % der TS ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, jeweils zehn Tiere je Gruppe) während der Versuche zur alimentären Calcium-Restriktion

	Ca-Restriktion Schafe	Kontrolle Schafe	Ca-Restriktion Ziegen	Kontrolle Ziegen
TS [g]	1010 ± 15	1124 ± 12	651 ± 13	644 ± 11
ME [MJ]	9,4 ± 0,11	10,0 ± 0,10	6,16 ± 0,09	6,13 ± 0,07
Calcium [g]	2,60 ± 0,04	10,37 ± 0,10	1,43 ± 0,03	7,09 ± 0,03
Phosphor [g]	4,17 ± 0,04	4,24 ± 0,04	3,04 ± 0,01	3,08 ± 0,01
Magnesium [g]	1,80 ± 0,02	1,80 ± 0,02	1,32 ± 0,02	1,27 ± 0,01
Natrium [g]	0,95 ± 0,01	1,03 ± 0,01	0,61 ± 0,01	0,66 ± 0,01
Rohfett [%]	4,4	4,8	5,0	4,9
Rohfaser [%]	24,2	25,8	21,8	21,6
Rohprotein [%]	13,1	11,6	15,0	14,5
Stärke + Zucker [%]	20,8	18,8	23,0	22,5

Ein entsprechender Fütterungsversuch wurde zudem mit Ziegen durchgeführt (siehe Tabelle 2.1). Auch bei dieser Spezies konnte kein Unterschied in der Fraktionellen Calcium- und Phosphat-Exkretion adäquat mit Calcium versorgter Tiere und Calcium-restriktiv gefütterter Individuen beobachtet werden (siehe Abbildung 2.3 und Tabelle 2.2).

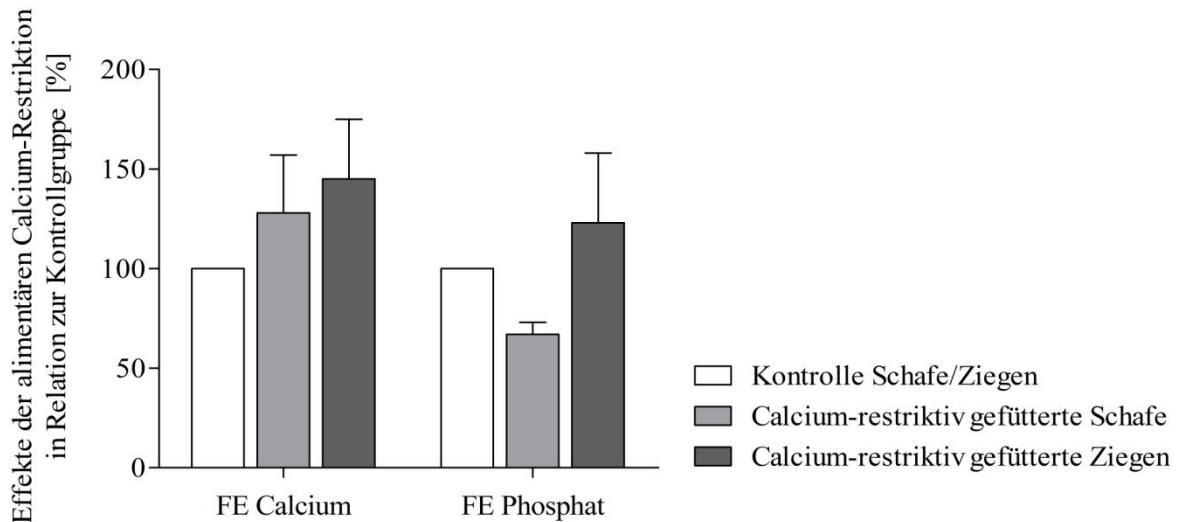


Abbildung 2.3: Fraktionelle Calcium- und Phosphat-Exkretion Calcium-restriktiv gefütterter Schafe und Ziegen in Relation zu den bei adäquat mit Calcium versorgten Kontrolltieren gemessenen Werten ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, jeweils zehn Tiere je Gruppe).

Tabelle 2.2: Fraktionelle Calcium- und Phosphat-Exkretion von über eine Dauer von vier bis acht Wochen Calcium-restriktiv gefütterten Schafen und Ziegen ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, jeweils zehn Tiere je Gruppe)

	Ca-Restriktion Schafe	Kontrolle Schafe	Ca-Restriktion Ziegen	Kontrolle Ziegen
FE_{Ca} [%]	1,06 ± 0,24	0,83 ± 0,22	1,03 ± 0,21	0,71 ± 0,13
FE_{Po} [%]	0,82 ± 0,07	1,23 ± 0,23	2,79 ± 0,80	2,26 ± 0,84

Wie in Abbildung 2.4 ersichtlich wird, kam es jedoch bei den Ziegen – anders als bei den Schafen – nicht zu einem Abfall der Calcium-Plasmaspiegel und auch die Phosphat-Plasmaspiegel blieben konstant. Im Rahmen weiterführender Untersuchungen konnte bei dieser Spezies eine deutliche Steigerung der intestinalen Calcium-Aufnahme beobachtet werden (Wilkins et al., 2012), wohingegen die Schafe vorrangig mit einer Verstärkung der Knochenresorption auf die restriktive Calcium-Zufuhr reagierten (Wilkins et al., 2011).

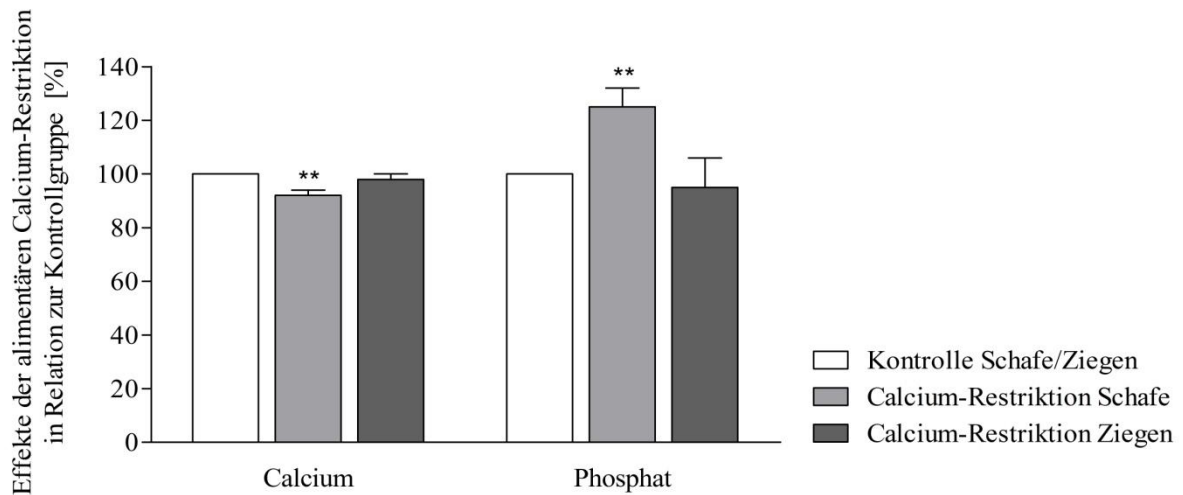


Abbildung 2.4: Calcium- und Phosphat-Spiegel im Plasma von über eine Dauer von vier bis acht Wochen Calcium-restriktiv gefütterten Schafen und Ziegen in Relation zu den bei adäquat mit Calcium versorgten Kontrolltieren gemessenen Werten ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, jeweils zehn Tiere je Gruppe).

Vor diesem Hintergrund fiel der im Vergleich zu den Schafen deutlich stärkere Anstieg der Calcitriol-Spiegel der Ziegen auf (Wilkins et al., 2012) (siehe Abbildung 2.5). Bereits in früheren Untersuchungen war beobachtet worden, dass Ziegen auf eine alimentäre Calcium-Restriktion mit einem im Vergleich zu Schafen mehr als doppelt so starken Anstieg der Calcitriol-Spiegel reagierten (Schröder et al., 1997, 1999).

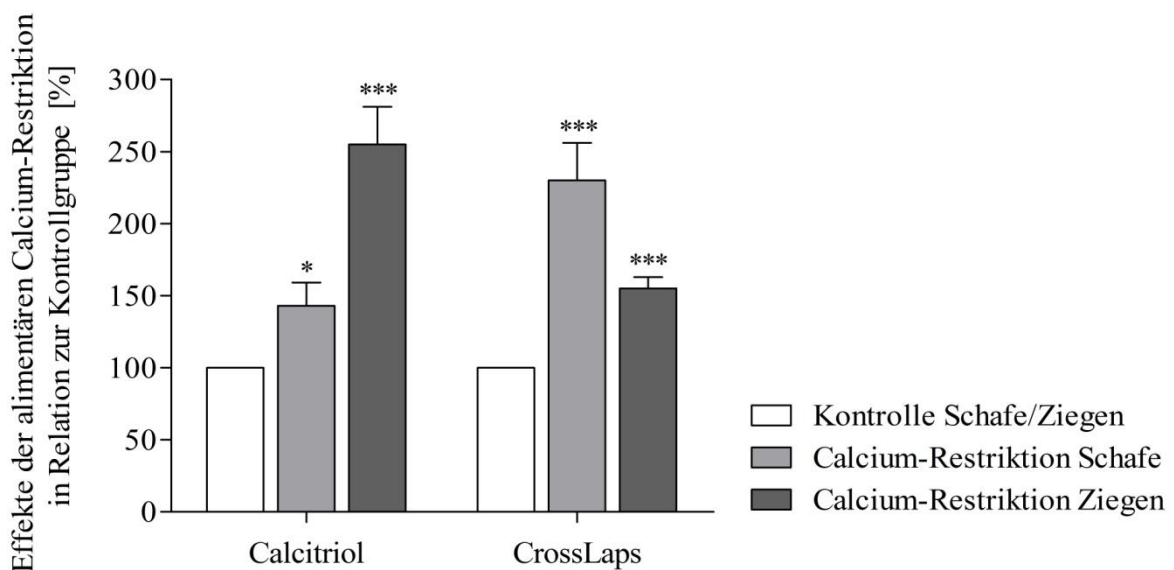


Abbildung 2.5: Calcitriol- und CrossLaps®-Spiegel im Serum bzw. Plasma von über eine Dauer von vier bis acht Wochen Calcium-restriktiv gefütterten Schafen und Ziegen in Relation zu den bei adäquat mit Calcium versorgten Kontrolltieren gemessenen Werten ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, jeweils zehn Tiere je Gruppe).

Unklar ist, worin die Ursachen für diesen Unterschied in der hormonellen Reaktion bestehen und inwieweit er die Fähigkeit zur Kompensation des Calcium-Mangels – insbesondere im Hinblick auf eine Steigerung der intestinalen Calcium-Aufnahme – tatsächlich beeinflusst.

2.7.2 Bedeutung der Niere in der Laktation

Beim Wiederkäuer treten im Zusammenhang mit der Laktation nicht selten Calcium-Mangelzustände auf, die auf die erhöhten Calcium-Verluste über die Milch zurückzuführen sind. Bei Milchkühen stellt insbesondere der frühe postpartale Zeitraum eine kritische Phase dar, denn anders als beim Menschen oder der Ratte übersteigt der Calcium-Bedarf beim Rind mit dem Einsetzen der Laktation den Bedarf während der späten Gravidität um ein Vielfaches. Nicht selten führt dieser drastische Anstieg des Calcium-Bedarfs zu einem Abfall der Calcium-Plasmaspiegel, insbesondere wenn adaptive Mechanismen erst zeitverzögert oder unzureichend aktiv werden (Horst et al., 2005).

Tatsächlich konnte bei Milchkühen mit dem Einsetzen der Laktation eine signifikante Abnahme der Fraktionellen Calcium-Exkretion von rund 0,83% auf etwa 0,38% beobachtet werden (Ulutaş et al., 2003). Angesichts der Tatsache, dass es sich bei einer FE_{Ca} von 0,83% bereits um einen sehr niedrigen Wert handelt, kann diese Abnahme nur einen minimalen positiven Effekt auf die Calcium-Homöostase haben. Auch laktierende Schafe scheiden mit 1,2 mg/kg KGW im Vergleich zu trockenstehenden Schafen (4,1 mg/kg KGW) zwar signifikant weniger Calcium über den Urin aus, tragen damit aber kaum zum Ausgleich des täglichen Calcium-Defizits von rund 30 mg/kg KGW bei.

Eine Adaptation des renalen Vitamin D-Metabolismus hingegen scheint zumindest bei laktierenden Ziegen und Rindern entscheidend zur Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase beizutragen. So konnte bei Milchkühen direkt nach der Abkalbung neben einem Abfall der Calcium-Plasmaspiegel ein Anstieg der PTH- und Calcitriol-Spiegel beobachtet werden, wobei die Höhe des Calcium-Spiegels negativ mit der Höhe des PTH- und Calcitriol-Spiegels korrelierte, während eine positive Korrelation zwischen der Höhe des PTH- und des Calcitriol-Spiegels vorlag (Horst et al., 1978). Laktierende Ziegen reagierten auf eine Entfernung der Nebenschilddrüsen, die am zehnten Tag nach dem Ablammen durchgeführt wurde, mit einem Abfall der Calcitriol-Spiegel und entwickelten innerhalb von sieben Tagen eine Hypocalcämie und Hypophosphatämie. Diese Effekte konnten durch Infusion von PTH wieder umgekehrt werden, so dass sich Calcium- und Phosphat-Spiegel normalisierten,

Literaturübersicht

während ein deutlicher Anstieg der Calcitriol-Konzentration zu verzeichnen war (Hove et al., 1984). Für die Regulation des renalen Vitamin D-Metabolismus laktierender Ziegen und Rinder scheint PTH somit von grundlegender Bedeutung zu sein.

Gemäß dem aktuellen Kenntnisstand scheint eine verminderte PTH-Sensitivität von Niere und Knochen einen entscheidenden Faktor in der Pathogenese der Hypocalcämie der Milchkuh darzustellen. Die reduzierte Ansprechbarkeit dieser Organe auf PTH steht offenbar im Zusammenhang mit einem hohen Kaliumionen-Gehalt des *ante partum* angebotenen Futters, welches eine alkalisierende Wirkung hat (Horst et al., 2005). Dies konnte in verschiedenen Fütterungsversuchen an Milchkühen gezeigt werden. Dabei wiesen Tiere, die präpartal eine anionenreiche, azidifizierende Diät erhalten hatten, nach der Abkalbung trotz vergleichbarer PTH-Konzentrationen signifikant höhere Calcitriol- und Calcium-Spiegel auf als Tiere, die mit kationenreichem Futter gefüttert worden waren. Die Hypocalcämie-Inzidenz konnte so deutlich vermindert werden, was womöglich auf eine stärkere Zunahme der Knochenmobilisationsrate und der intestinalen Calcium-Absorption zurückgeführt werden kann (Abu Damir et al., 1994; Goff et al., 1991). Dass tatsächlich die verminderte Wirksamkeit des PTH zur Dekompensation des Calcium-Mangels führt, wird durch die Ergebnisse eines weiteren Fütterungsversuches verdeutlicht. Im Rahmen dieses Versuches wurden tragende Milchkühe, die zuvor ein kationen- oder anionenreiches Futter erhalten hatten mit PTH behandelt. Daraufhin kam es bei letzteren zu einem signifikant stärkeren Anstieg der Calcitriol- und Calcium-Spiegel (Goff et al., 2014). Entsprechende Untersuchungen, die den Zusammenhang zwischen der Expression der am Vitamin D-Stoffwechsel beteiligten Enzyme und Rezeptoren und der Höhe des Calcitriol-Spiegels laktierender Wiederkäuer untersuchen, wurden jedoch bislang nicht durchgeführt.

3. Material und Methoden

Die Anschriften der im Text genannten Firmen sind in alphabetischer Reihenfolge im Anhang A aufgeführt.

Die in dieser Studie untersuchten Gewebeproben stammten von Schafen und Ziegen, die im Rahmen verschiedener bereits abgeschlossener Tierversuche im Physiologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover gehalten wurden. Der Aufbau dieser Versuche, deren Ziel die Charakterisierung der Calcium-homöostatischen Mechanismen dieser Spezies war, wird in diesem Kapitel kurz dargestellt. Ihr Entwurf sowie ihre Durchführung und Betreuung waren nicht Teil dieses Dissertationsvorhabens.

3.1 Tierversuche

Um die Effekte einer alimentären Calcium-Restriktion, einer Calcitriol-Behandlung sowie einer Kombination beider Faktoren zu untersuchen, wurden jeweils 20 weibliche Ziegen (Weiße Deutsche Edelziege) und Schafe (Suffolk) auf zwei Fütterungsgruppen aufgeteilt. Die zehn Tiere in der Kontrollgruppe wurden bedarfsdeckend versorgt, der Calcium-Gehalt des Futters der Schafe betrug 0,92%, der des Futters der Ziegen 1,10%. Die übrigen zehn Tiere erhielten eine Calcium-restriktive Diät (Calcium-Gehalt 0,26% und 0,22% im Futter der Schafe beziehungsweise Ziegen). Am Ende der Fütterungsphase, deren Dauer vier bis acht Wochen betrug, wurde jeweils fünf Tieren jeder Fütterungsgruppe Calcitriol in pharmakologischer Dosierung intravenös verabreicht, während die übrigen fünf Tiere ein Placebo erhielten; 12 h nach dieser Behandlung wurden die Tiere getötet.

Um den Einfluss der Laktation auf die Calcium-homöostatischen Mechanismen von Schaf und Ziege zu untersuchen, wurden fünf multipare Schafe (Ostfriesisches Milchschaaf) und Ziegen (Saanen-Ziege) direkt nach der Geburt von ihren Lämmern getrennt. In den folgenden 20 Tagen wurden die Tiere dreimal täglich gemolken. Während des Melkens erhielten die Tiere Kraftfutter (Calcium-Gehalt 0,9%), wobei die Menge des Kraftfutters an die Milchleistung des jeweiligen Tieres angepasst wurde (800 g Futter pro kg Milch). An Tag 21 *post partum* wurden die Tiere getötet. Die Schafe gaben zu diesem Zeitpunkt etwa 40 g Milch

pro kg KGW und Tag, bei den Ziegen war die Milchleistung mit rund 86 g pro kg KGW und Tag mehr als doppelt so hoch.

Weitere fünf Ziegen und Schafe der gleichen Rassen und des gleichen Alters wurden nach dreimonatiger Laktation trocken gestellt. Dazu wurde das Melken eingestellt und die Kraftfuttermenge auf 25 g pro 10 kg KGW herabgesetzt. Weitere sechs Wochen später wurden die Tiere getötet.

3.2 Tötung der Tiere und Entnahme der Gewebeproben

Nach Betäubung der Tiere durch Bolzenschuss wurde der Tod durch Entbluten mittels Kehlschnitt herbeigeführt. Unmittelbar nach Eintritt des Todes wurde die Bauchhöhle der Tiere eröffnet. Die Entnahme der Nieren erfolgte innerhalb von 5 min nach der Tötung. Nach Spülung der Nieren in eisgekühlter Kochsalzlösung und Entfernung der Nierenkapsel wurde das kortikale Nierengewebe zerkleinert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Das Gewebe wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

3.3 Präparative Methoden

Die Zusammensetzung selbst hergestellter Lösungen ist aus Gründen der Übersichtlichkeit im Anhang B aufgeführt.

3.3.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus dem kortikalen Nierengewebe erfolgte unter Verwendung des „RNeasy® Plus Mini Kits“ (Qiagen). Bis auf die Zerkleinerung des Gewebes zu Beginn und die Elution der RNA im letzten Schritt wurden alle Präparationsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Zentrifugation wurde die „Biofuge® pico“ (Heraeus Instruments) mit dem Rotor 3325 verwendet. Alle Zentrifugationen erfolgten mit einer Beschleunigung von 10 000 g.

Vor Beginn der eigentlichen Präparation wurden die Pufferlösungen RLT Plus und RPE gemäß den Herstellerangaben vorbereitet. Der RLT Plus-Puffer wurde mit 1% β -Mercaptoethanol zur Spaltung der Disulfidbrücken versetzt, während dem RPE-Puffer das vierfache Volumen an Ethanol (100%) zugesetzt wurde.

Material und Methoden

Das bei -80°C gelagerte Gewebe wurde zunächst in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser mit einem Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben. Etwa 30 mg dieses pulverisierten Gewebes wurden in ein in flüssigem Stickstoff vorgekühltes 2 ml-Reaktionsgefäß eingewogen. Nach Zugabe von jeweils 600 μl RLT-Plus-Puffer erfolgte die Homogenisierung des Gemisches durch mehrmaliges Aufziehen mit einer 1 ml-Einmalspritze und einer 0,45 x 23 mm großen Einmalkanüle (B. Braun Melsungen AG).

Eine erste 3-minütige Zentrifugation diente der Abscheidung der Zelltrümmer am Boden des Reaktionsgefäßes. Der Überstand wurde anschließend auf eine gDNA-Eliminationssäule überführt. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation wurde die Eliminationssäule verworfen. Dem Durchfluss wurden 550 μl 70%iges Ethanol zugefügt, um die enthaltene RNA auszufällen. Dieses Gemisch wurde in zwei Durchgängen auf eine RNeasy[®]-Säule überführt und jeweils 1 min zentrifugiert, um eine Anlagerung der gefällten RNA an die Kieselgelmembran im Inneren der Säule zu erreichen. Im Anschluss wurde der Durchfluss verworfen. In einem ersten Waschschrift wurden dann 700 μl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und diese 1 min zentrifugiert. Es folgten eine 1-minütige und eine 2-minütige Zentrifugation nach Zugabe von jeweils 500 μl RPE-Puffer. Nach jedem einzelnen Waschschrift wurde der Durchfluss verworfen. Eine weitere 1-minütige Zentrifugation diente der Trocknung der RNeasy[®]-Säule, die danach in ein neues Reaktionsgefäß verbracht wurde. Nach Zugabe von 50 μl RNase-freien Wassers auf die RNeasy[®]-Säule wurde diese ein letztes Mal 1 min lang zentrifugiert, um die Gesamt-RNA zu eluieren. Die RNA-Konzentration der Eluate wurde durch photometrische Bestimmung des RNA-Gehalts eigens für diesen Zweck hergestellter Verdünnungen ermittelt (Eppendorf Biophotometer[®]). Dazu wurden jeweils 2 μl des Gesamt-RNA-Isolates mit 68 μl A. dest. vermengt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Isolate dann bei -80°C gelagert.

3.3.2 Synthese von cDNA

Die Synthese von cDNA aus der isolierten Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des „Taqman Reverse Transcription Reagents Kits“ (Applied Biosystems, Roche Molecular Systems) durchgeführt. Dazu wurde ein zu 200 ng RNA äquivalentes Aliquot der Gesamt-RNA-Isolate mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 9,6 μl ergänzt. Dann wurden jeder Probe jeweils 15,4 μl eines so genannten *Master Mixes* zugesetzt. Dieser war zuvor durch Vermengen von jeweils 2,5 μl zehnfach Puffer, 5,5 μl MgCl_2 (25 mM), 5 μl dNTPs (10 mM), 0,625 μl Oligo(dT)-*Primern*, 0,625 μl Random-hexamer-*Primern*, 0,5 μl RNase-Inhibitor

und 0,68 µl Reverser Transkriptase (50 U/µl) je Probe hergestellt worden. Im Anschluss erfolgte die cDNA-Synthese durch Inkubation des Gemisches im *Thermocycler* (MyCycler, Bio-Rad) gemäß folgendem Protokoll: 10 min bei 25°C, 45 min bei 48°C, 5 min bei 95°C, Abkühlen auf 4°C. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.3 Rohmembranpräparation

Zur Präparation der Rohmembranen aus dem kortikalen Nierengewebe wurde eine modifizierte Version der Methode nach OSSWALD et al. (2005) angewandt. Dazu wurde zunächst etwa 1 g des Gewebes mit 10 ml eisgekühltem Homogenisierungspuffer und 50 µl PMSF (20 mM in DMSO) versetzt und mit Hilfe eines Potters homogenisiert. Eine anschließende Zentrifugation der Homogenate bei 2000 g und 4°C für 20 min (Optima™ L-70K Ultrazentrifuge, Beckman Coulter®, Rotor 40 Ti) diente der Abscheidung von Zelltrümmern, Zellkernen und Mitochondrien am Boden des Probengefäßes. Daher wurde das entstandene Pellet im Anschluss verworfen, während der Überstand bei 4000 g und 4°C für 60 min zentrifugiert wurde. Durch diese Zentrifugation wurden die Plasmamembran-Fractionen am Boden des Zentrifugenröhrchens in Form eines Pellets abgeschieden, während die cytosolischen Proteine im Überstand in Lösung blieben, so dass durch Verwerfen des Überstandes eine weitgehende Trennung dieser Fraktionen erreicht werden konnte. Das Pellet wurde daraufhin mit einer 1 ml-Einmalspritze und einer 0,45 x 0,23 mm großen Einmalkanüle (B. Braun Melsungen AG) in eisgekühltem Resuspensions-Puffer mit Proteaseninhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich) resuspendiert. Das erforderliche Volumen dieser beiden Lösungen wurde auf die Größe des Pellets abgestimmt, wobei je 0,1 cm Pelletdurchmesser 100 µl Resuspensions-Puffer und je 100 µl des Resuspensions-Puffers 1,5 µl Proteaseninhibitor-Cocktail verwendet wurden. Die Proteinkonzentrationen in den Präparationen wurden dann photometrisch bestimmt (Kapitel 3.3.6), um davon nachfolgend Aliquots mit 40 µg bzw. 50 µg Gesamtprotein abzutheilen. Die Präparationen und die Aliquots wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

3.3.4 Cytosolpräparation

Die Präparation des Cytosols aus dem kortikalen Nierengewebe erfolgte nach der Methode von SCHRÖDER et al. (2001). Dazu wurden etwa 0,2 g des Gewebes in ein kleines Pottergefäß eingewogen. Dem Gewebe wurde eisgekühlter Cytosolpräparationspuffer im Verhältnis 1:10 zugefügt und es wurde mit Hilfe eines Potters und durch nachfolgendes

Aufziehen mit einer 1 ml-Einmalspritze und einer 0,45 x 23 mm großen Einmalkanüle (B. Braun Melsungen AG) homogenisiert. Das Homogenat wurde dann in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation der Homogenate bei 17 500 g und 4°C für 30 min (Megafuge 1.0R mit dem Rotor 3041, Heraeus Instruments) wurde eine Abscheidung der Zelltrümmer und -membranen am Boden des Gefäßes erreicht. Der Überstand, der die cytosolischen Proteine enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, während das Pellet verworfen wurde. Im Anschluss erfolgten die Bestimmung der Proteinkonzentration der Cytosolpräparationen (siehe Kapitel 3.3.6) und das Aufteilen eines Teilvolumens der Originalpräparation in Aliquots mit einem Proteingehalt von 10 µg. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Cytosolpräparationen und Aliquots bei -20°C gelagert.

3.3.5 Isolierung von Zellkernextrakten

Zur Isolierung der Zellkernextrakte aus dem kortikalen Nierengewebe wurde die Methode nach Walters et al. (1980) mit der Methode nach Simpson und DeLuca (1982) kombiniert. Zunächst wurden zwischen 0,5 und 1 g des Gewebes in flüssigem Stickstoff gemörsert und in ein Pottergefäß gegeben. Nach Zugabe von 5 ml eisgekühltem Tris-EDTA-DTT-(TED)-Puffer wurde das pulverisierte Gewebe unter Kühlung durch zehnmaliges Pottern weiter zerkleinert. Anschließend wurde das Homogenat in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C 15 min mit 600 g (Megafuge 1.0R mit dem Rotor 7570E, Heraeus Instruments) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Rohzellkernpellet in 5 ml TED-Puffer resuspendiert und die Zentrifugation wiederholt. Während der Überstand wiederum verworfen wurde, wurde das Pellet in drei Volumenteilen Kalium (K)-TED-Puffer resuspendiert. Das Homogenat wurde in Portionen von etwa 1 ml auf 2 ml-Reaktionsgefäße verteilt und 1 h lang bei 4°C im Thermomixer (Thermomix_1440, B. Braun) inkubiert. Alle 5 min wurden die Proben 20 s lang mit 1400 rpm geschüttelt. Die hohe Kalium-Konzentration, die niedrigen Temperaturen sowie die mechanische Belastung bewirkten ein Aufbrechen der Zellkerne. Durch eine anschließende 15-minütige Zentrifugation bei 17 500 g und 4°C (Megafuge 1.0R mit dem Rotor 3041, Heraeus Instruments) wurden die Zellkernmembran-Bestandteile am Boden des Reaktionsgefäßes abgeschieden, während die Zellkerninhalte im Überstand verblieben. Dieser wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (Kapitel 3.3.6) und Herstellung von Aliquots mit einem Gesamtprotein-Gehalt von 25 µg wurden die Zellkernisolate und Aliquots bei -20°C gelagert.

3.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration in Gewebepräparationen

Die Proteinkonzentrationen der Gesamtmembran- und Cytosolpräparationen sowie der Zellkernisolate wurden photometrisch unter Verwendung des „Bio-Rad Protein-Assays“ (Bio-Rad) bestimmt. Der in diesem Assay eingesetzte Farbstoff „Coomassie-Brillant-Blau G-250“ weist in Abhängigkeit vom pH-Wert unterschiedliche Absorptionsmaxima auf. In saurer Lösung bindet der Farbstoff an Proteinstrukturen und wird von der kationischen in seine anionische Form überführt. Dabei verschiebt sich sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm, was einem Farbwechsel von rot zu blau entspricht. Je höher die Proteinkonzentration in der zu untersuchenden Lösung ist, desto mehr blaue Farbstoffmoleküle liegen vor, wodurch die Extinktion bei Durchstrahlung der Lösung mit Licht entsprechender Wellenlänge zunimmt. Die Inkubation der Probe mit dem Detergenz Saponin vor Zugabe des Farbreagens verbessert die Darstellung der Proteinbindungsstellen. Durch zeitgleiche Bestimmung der Proteinkonzentration in Proteinstandards mit bekannter Konzentration (Bio-Rad Protein Standard) kann mit Hilfe eines linearen Regressionsmodells die Proteinkonzentration in den Proben ermittelt werden.

Direkt im Anschluss an die Präparation wurden die Gewebepräparationen für die Messung der Proteinkonzentration mit *A. dest.* verdünnt (Zellkernisolate 1:5, Cytosolpräparationen 1:20, Rohmembranpräparationen 1:20). 50 µl dieser Verdünnung wurden je Ansatz benötigt. Um die Standardreihe anzusetzen, wurden die Proteinstandards nach Herstellerangaben mit *A. dest.* vermischt, so dass die γ -Globulin-Konzentrationen bei einem Volumen von 50 µl 0,147, 0,294, 0,441 und 0,588 mg/ml betragen. Die Proben der Standardreihe und die verdünnten Proben, jeweils als Doppelansatz vorliegend, wurden im Verhältnis 1:1 mit 1%iger Saponinlösung vermischt. Für die Bestimmung des Leerwerts wurden entsprechend 50 µl *A. dest.* mit Saponin vermengt. Nach 20-minütiger Inkubation wurden alle Proben mit je 2,5 ml des 1:5 mit *A. dest.* verdünnten Farbreagens vermischt und weitere 15 min inkubiert. Mit einer Wellenlänge von 595 nm wurde im Anschluss die Extinktion der Proben gegen den Leerwert gemessen (Beckman DU[®] 640 Spectrophotometer, Beckman Coulter[®]). Unter Verwendung der Extinktions- und Konzentrationswerte der Standardreihe erfolgte computergestützt die Erstellung der Regressionsgeraden, die zur Berechnung der Proteinkonzentrationen der Proben diente.

3.4 Expressionsstudien

Die Expression der am Calcium-Transport beteiligten Strukturen TRPV5, CaBP_{D28K} und NCX1, des Parathormon-Rezeptors und des Vitamin D-Rezeptors sowie der Enzyme CYP27B1 und CYP24A1 im kortikalen Nierengewebe wurde mittels *Real Time Reverse Transcription PCR (Real Time RT PCR)* auf Transkriptionsebene untersucht. Dabei diente die aus der isolierten RNA synthetisierte cDNA (Kapitel 3.3.2) als Ausgangsmaterial für diese Expressionsstudien. Darüber hinaus wurde die Expression von TRPV5, CaBP_{D28K}, NCX1, sowie des PTHR und des VDR mit Hilfe von *Western Blot*-Analysen auf Translationsebene untersucht. Hier wurden für den semiquantitativen Nachweis von TRPV5, NCX1 und des Parathormon-Rezeptors Rohmembranpräparationen (Kapitel 3.3.3) verwendet, während für den CaBP_{D28K}-*Western Blot* Cytosolpräparationen (Kapitel 3.3.4) genutzt wurden. Der Nachweis des Vitamin D-Rezeptors erfolgte unter Verwendung von Zellkernisolaten (Kapitel 3.3.5).

3.4.1 RNA-Nachweis

Mit Hilfe der PCR können Teilabschnitte der DNA *in vitro* vervielfältigt werden. Dies wird durch eine zyklische Wiederholung einer in der Regel dreiphasigen Reaktion erreicht. In der so genannten Denaturierungs-Phase werden die Proben zunächst auf 95°C erhitzt, wodurch es zur Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basenpaaren und damit zur Trennung der Doppelstränge kommt. In der darauf folgenden *Annealing*-Phase ermöglicht eine Absenkung der Temperatur auf etwa 55-65°C die Anlagerung so genannter *Primer* an die Matrizenstränge. Dabei handelt es sich um kurze, synthetisch hergestellte Oligonucleotide, deren Sequenz komplementär zur Anfangsbeziehungsweise Endsequenz des zu untersuchenden DNA-Abschnittes ist. Die optimale *Annealing*-Temperatur der *Primer* wird unter anderem von ihrer Basenzusammensetzung, ihrer Sequenz und von der Kationenkonzentration im Medium beeinflusst. Durch eine Erhöhung der Temperatur auf 72°C werden in der Elongations-Phase optimale Arbeitsbedingungen für die Taq-Polymerase geschaffen. Dieses Enzym katalysiert – von den an den Einzelstrang gebundenen *Primern* ausgehend – die Synthese von jeweils zur Matrize komplementären Strängen aus dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphate). Nach Beendigung der Elongations-Phase beginnt mit der Denaturierungs-Phase ein neuer Zyklus. Die Dauer der einzelnen Phasen ist von der Länge des PCR-Produktes abhängig. Theoretisch sollte es mit jedem Zyklus zu einer Verdopplung der Amplifikate kommen, ihre Anzahl sollte also exponentiell zunehmen. Tatsächlich ist gerade in den ersten Zyklen der PCR die Menge an

cDNA in der Probe relativ gering und somit die Wahrscheinlichkeit, dass *Primer* und Polymerase an den gesuchten DNA-Abschnitt binden nicht besonders hoch. Die Phase der exponentiellen Zunahme beginnt daher erst nach einigen Zyklen und endet, wenn es aufgrund der großen Zahl von PCR-Produkten schließlich vermehrt zu Fehlpaarungen der Amplifikate untereinander kommt, die Substratmengen zu gering sind und es durch die Temperatureinwirkung zu einem zunehmenden Integritätsverlust von Nucleotiden und Polymerasen kommt.

Bei einer *Real Time* RT PCR wird die Anzahl der Amplifikate direkt während des Laufes und somit in Echtzeit bestimmt. RT steht dabei für *Reverse Transcription* und bezeichnet die Umschreibung von RNA in cDNA durch das Enzym Reverse Transkriptase. Der Einsatz einer Standardreihe mit bekannter Anzahl von DNA-Fragmenten ermöglicht bei dieser Art der PCR die rechnerische Ermittlung des ursprünglichen cDNA-Gehalts des betreffenden Gens in den Proben. Dieser erlaubt wiederum Rückschlüsse auf den RNA-Gehalt dieses Gens in der jeweiligen Probe.

Um eine Standardreihe für jedes zu untersuchende Gen herstellen zu können, ist zunächst die Vervielfältigung eines entsprechenden DNA-Fragments mittels Klonierung erforderlich (Kapitel 3.4.1.2 ff.). Eine qualitative PCR (Kapitel 3.4.1.1) dient in diesem Zusammenhang vor allem der Amplifizierung des gewünschten DNA-Fragments. Die Spezifität der Amplifikate muss zunächst mittels Gelelektrophorese und Sequenzierung überprüft werden, bevor diese für die Klonierung eingesetzt werden können.

Die mit Hilfe einer *Real Time* RT PCR ermittelten quantitativen Unterschiede des RNA-Gehalts verschiedener Proben können auch durch Unterschiede der Gesamt-RNA-Mengen in den Reaktionsansätzen für die cDNA-Synthese begründet sein, die wiederum infolge von Degradationsprozessen auftreten können. Um entsprechende Effekte zu relativieren, ist eine Normalisierung der ermittelten Werte erforderlich. Dazu werden die gemessenen RNA-Gehalte auf die RNA-Gehalte eines konstant exprimierten Referenzgens - beispielsweise des GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) - oder β -Actin-Gens – in der gleichen Probe bezogen, das heißt, es wird der Quotient aus diesen beiden Werten gebildet.

Material und Methoden

Eine Variante der *Real Time* RT PCR ist die SYBR[®] Green-PCR. Der fluoreszierende Farbstoff „SYBR[®] Green I“ zeigt nach Bindung an doppelsträngige DNA eine deutlich stärkere Fluoreszenz als nach Bindung an Einzelstrang-DNA oder RNA. In der Phase der exponentiellen Zunahme der Amplifikate verhält sich der Anstieg der Fluoreszenz‘ zudem proportional zur Anzahl der DNA-Fragmente in der Probe, so dass eine quantitative Bestimmung der Amplifikate möglich ist. Dazu muss zunächst der individuelle Ct-Wert ($Ct = Cycle\ threshold$) jeder Probe ermittelt werden. Er gibt an, ab welchem Zyklus die gemessene Fluoreszenz die Hintergrund-Fluoreszenz signifikant übersteigt und kennzeichnet die exponentielle Phase. Da zwischen Ct-Wert und dem logarithmierten Wert der in der Probe ursprünglich enthaltenen cDNA-Menge eine lineare antiproportionale Beziehung besteht, kann durch Auftragen der jeweiligen Werte der Standardreihe gegeneinander eine Standardkurve generiert werden. Nach Bestimmung des individuellen Ct-Werts der Proben kann mit Hilfe dieser Standardkurve ihr ursprünglicher Gehalt an cDNA-Kopien des untersuchten Abschnitts ermittelt werden. Sowohl die Bestimmung des Ct-Werts, als auch das Generieren der Standardkurve und die Ermittlung des cDNA-Gehalts der Proben erfolgen computergestützt mit Hilfe einer speziellen Analyse-Software (Bio-Rad CFX Manager).

Da der Farbstoff „SYBR[®] Green I“ unspezifisch an doppelsträngige Nukleinsäuren bindet, ist es erforderlich, im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen. Dazu wird die Temperatur langsam von 55°C auf 95°C erhöht. Die individuelle Schmelztemperatur doppelsträngiger Nukleinsäuren wird durch ihre Länge sowie ihren Gehalt an Guanin und Cytosin beeinflusst, wobei spezifische PCR-Produkte in der Regel bei höheren Temperaturen denaturieren als unspezifische *Primer*-Dimere. Wird die Intensität des Fluoreszenzsignals gegen die Temperatur aufgetragen, ist die Unterscheidung der erwünschten DNA-Moleküle von unerwünschten fehlgepaarten Nukleinsäuren anhand des Kurvenverlaufs möglich.

Eine weitere Variante der *Real Time* RT PCR mit im Vergleich zur SYBR[®] Green-PCR deutlich höherer Spezifität ist die TaqMan[®]-PCR. Der Einsatz einer so genannten Sonde ermöglicht hier den gezielten und ausschließlichen Nachweis des gewünschten PCR-Produktes. Dabei handelt es sich um ein kurzes Oligonukleotid, dessen Sequenz komplementär zu einem mittig gelegenen Abschnitt des von den *Primern* flankierten Bereichs ist. Während die Sonde am 5'-Ende einen *Reporter* (FAM, 6-Carboxy-Fluorescein) trägt, befindet sich am 3'-Ende der so genannte *Quencher* (TAMRA, 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin oder auch BBQ, BBQ-650-DT CEP). Bei dem *Reporter* handelt es sich um einen

Farbstoff, der auf Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge mit Fluoreszenz reagiert. *Quencher* hingegen sind Farbstoff-Moleküle, die die Fluoreszenz der *Reporter* in ihrer nahen Umgebung abfangen. Solange *Reporter* und *Quencher* innerhalb der intakten Sonde räumlich nah beieinander liegen, unterdrückt der *Quencher* das vom *Reporter* ausgehende Fluoreszenz-Signal. In der Elongations-Phase kommt es jedoch aufgrund der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase zur Hydrolyse der hybridisierten Sonde. Die räumliche Trennung von *Reporter* und *Quencher* resultiert in einen Anstieg der Fluoreszenz', der sich proportional zur Anreicherung des Amplifikats verhält. Nur eine Replikation des gewünschten DNA-Abschnitts führt folglich zu einer Zunahme des Fluoreszenz-Signals, was die hohe Spezifität dieser PCR erklärt. Das Protokoll der TaqMan[®] PCR weicht von der klassischen, dreiphasigen Version dahingehend ab, dass *Annealing* und Elongation kombiniert in einem Schritt bei einer Temperatur von 60°C ablaufen. Dies ist erforderlich, da die Hybridisierung der Sonde – anders als die der Primer – während der Elongation nicht zusätzlich durch die Polymerase stabilisiert wird und sie sich daher bei höheren Temperaturen von der Matrize lösen würde.

Die TaqMan[®]-PCR-*Primer* (TIB MOLBIOL), Sonden und Standardreihen für den quantitativen Nachweis der RNA von GAPDH, TRPV5, CaBP_{D28K}, NCX1 und NaPi2a sowie deren Einsatz auf Nierengewebe waren bereits im Rahmen früherer Studien in der Arbeitsgruppe etabliert worden. Für den Nachweis von CYP27B1, CYP24A1 sowie PTHR und VDR standen noch keine *Primer* und Standardreihen zur Verfügung. Hier erfolgte die Etablierung neuer SYBR[®] Green-*Assays* nach folgendem Prinzip: Zunächst wurden mit Hilfe des Internetportals „NCBI/Primer-BLAST“ geeignete *Primer*-Sequenzen ausgewählt. Die Herstellung der entsprechenden *Primer* erfolgte dann durch das Unternehmen „Invitrogen™ life technologies™“. Nachfolgend wurden diese *Primer* in der qualitativen PCR (Kapitel 3.4.1.1) eingesetzt, um ihre Eignung und Spezifität zu überprüfen. Die *Primer*, deren Einsatz sich im Rahmen dieser PCR bewährte, wurden zunächst einem Effizienztest unterzogen. Dazu wurden sie in einer *Real Time* RT PCR auf Verdünnungsreihen renaler cDNA eingesetzt. Nur *Primer*, bei deren Einsatz eine nahezu lineare Zunahme der Amplifikatmenge über mindestens drei Logarithmusstufen zu beobachten war und deren Effizienz dementsprechend zwischen 90% und 105% lag, wurden nachfolgend in einer sogenannten präparativen PCR verwendet, die der Vervielfältigung der gewünschten Gensequenz diente. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und das Protokoll der präparativen PCR stimmen mit denen der qualitativen PCR überein. Die Amplifikate wurden im Anschluss an diese PCR

aufgereinigt (Kapitel 3.4.1.2.1) und nur ein Teil der PCR-Produkte wurde anschließend auf ein Gel aufgetragen, um die Spezifität der Amplifikate zu überprüfen, bevor ein weiteres Teilvolumen der DNA-Lösung zur Sequenzierung an die Firma „GATC biotech“ versandt wurde. Stimmt die ermittelte Sequenz mit der Zielsequenz überein, wurden die verbleibenden Amplifikate für die Klonierung genutzt, um auf diese Weise Standardreihen für die *Real Time* PCR herzustellen (Kapitel 3.4.1.2.3).

Die Sequenzen der im Rahmen der Etablierung ausgewählten und daraufhin in der SYBR Green[®] *Real Time* RT PCR (Kapitel 3.4.1.3.1) eingesetzten *Primer* sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

3.4.1.1 PCR zum qualitativen Nachweis der RNA-Expression

Unter Verwendung der aus dem kortikalen Nierengewebe gewonnenen cDNA (Kapitel 3.3.2) von Schaf und Ziege wurde eine qualitative PCR durchgeführt. Diese diente einerseits dem Nachweis der Expression der zu untersuchenden Gene, andererseits als Erfolgskontrolle der cDNA-Synthese. Vor allem war diese PCR jedoch von grundlegender Bedeutung für die Etablierung neuer *Primer*. In Tabelle 3.2 sind die Pipettierschemata dargestellt, nach denen die Reaktionsgemische unter Verwendung des „FastStart Taq DNA Polymerase Kits“ (Roche Applied Science) angesetzt wurden. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Reaktionsansatz, der anstatt mit cDNA mit 2 µl hochreinem Wasser „Rotipuran[®] Low organic“ (Roth) ergänzt wurde. Die Reaktionsgemische wurden gemäß den in Tabelle 3.3 dargestellten Protokollen im *Thermocycler* (MyCycler, BIO-RAD) inkubiert.

Die PCR-Produkte wurden anschließend mit „Roti-Load DNA Puffer“ (Roth) vermengt und mit dem Größenstandard „pUC19 ready to use Marker“ (Roth) in einem 2%igen Agarose-TAE-Gel aufgetragen. Das Gel enthielt den Farbstoff „Midori Green Advance“ (Biozym Scientific) und konnte so direkt im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte (100 V) unter UV-Licht untersucht werden. Durch den Vergleich der Position der nun sichtbaren Banden mit denen des Größenstandards war es möglich, die Größe der PCR-Produkte abzuschätzen und so die Spezifität der *Primer* zu beurteilen.

Tabelle 3.1: PCR-Primer zum Nachweis von PTHR, VDR, CYP27B1 und CYP24A1

Gen (Gene Accession #)	Primer-Sequenz (forward und reverse)
PTHR (XM_004018673.1)	for 5'-atc aac atc gtg cgg gtt ct-3' rev 5'-agc ctg tac ctc acc att gc-3'
VDR (XM_004007435.1)	for 5'-gca ctt cct tac ctg acc cc-3' rev 5'-ccg ctt gag gat cat ctc cc-3'
CYP27B1 (XM_004006518.1)	for 5'-acc tgg aaa ttc ccg tgt cc-3' rev 5'-gat gct tct ctc agg cac ca-3'
CYP24A1 (NM_001191417.1)	for 5'-gag gcc tca aga aac agc ac-3' rev 5'-ctg acc ctc tgc cag tct tc-3'

Tabelle 3.2: Pipettierschema der Reaktionsansätze für die qualitative PCR

Gebrauchslösungen	c der Gebrauchslösung	c im Reaktionsansatz	Vol im Reaktionsansatz [µl]
H₂O (Rotipuran[®])			9,2
10x PCR-Puffer	zehnfach	einfach	2,0
MgCl₂	25 mmol/l	1,5 mmol/l	1,2
dNTP	10 mmol/l	0,2 mmol/l	0,4
Primer sense	5 µmol/l	0,625 µmol/l	2,5
Primer antisense	5 µmol/l	0,625 µmol/l	2,5
Taq-Polymerase	5 U/l	0,02 U/µl	0,2
cDNA bzw. H₂O (Rotipuran[®])			2,0
Gesamtvolumen			20,0

Tabelle 3.3: PCR-Protokoll für die qualitative PCR (PTHR, VDR, CYP27B1 und CYP24A1)

I	II	III	IV
Aktivierung der DNA-Polymerase	PCR-Zyklen (n = 30)	finale Elongation	Kühlung
10 min 95°C	30 s 95°C 15 s 60°C 30 s 72°C	10 min 72°C	∞ 4°C

3.4.1.2 Klonierung zur Herstellung einer Standardreihe

3.4.1.2.1 Aufreinigung der PCR-Produkte für die Ligation

Vor Beginn der Klonierung mussten die PCR-Produkte von überschüssigen *Primern*, Enzymen und Salzen befreit werden. Für diese Aufreinigung wurde das „MinElute PCR Purification Kit“ (Qiagen) verwendet.

Zunächst wurde die Pufferlösung PE mit 100%igem Ethanol versetzt. In einem ersten Aufreinigungs-Schritt wurde dann das PCR-Produkt mit dem fünffachen Volumen an PB-Puffer vermengt und auf eine „MinElute-Säule“ in einem 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Eine 1-minütige Zentrifugation bei 10 000 g in der Biofuge[®] pico (Heraeus instruments) diente der Bindung der DNA-Fragmente an die Säule. Der Durchfluss wurde folglich im Anschluss verworfen. Anschließend wurden 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben und 1 min bei 10 000 g zentrifugiert, um eine weitere Reinigung der DNA zu erreichen. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen und die „MinElute-Säule“ erneut 1 min bei 10 000 g zentrifugiert. Dadurch wurde eine Trocknung der DNA erreicht. Die „MinElute-Säule“ wurde daraufhin in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß verbracht. Nach Zugabe von 33 µl hochreinem Wasser „Rotipuran[®] Low organic“ (ROTH) auf die Säule folgte eine 1-minütige Inkubation, bevor eine letzte 1-minütige Zentrifugation bei 10 000 g die Freisetzung der Amplifikate aus der Säule bewirkte. Ein Teil des nun im Reaktionsgefäß befindlichen Eluats wurde wiederum für eine Gelelektrophorese verwendet, um den Erfolg der PCR und der nachfolgenden Aufreinigung zu kontrollieren. Ein weiterer Anteil wurde für eine Sequenzierung der Amplifikate im Kettenabbruch-Verfahren benötigt, mit der die Firma „GATC Biotech AG“ beauftragt wurde. Durch Vergleich der ermittelten Sequenzen mit den bereits veröffentlichten Sequenzen der entsprechenden Spezies mit Hilfe des Algorithmus „BLAST“ konnte dann die Spezifität der Amplifikate überprüft werden.

3.4.1.2.2 Klonierung des PCR-Produktes

In unserem Fall diente die Klonierung der gezielten Vervielfältigung eines bestimmten Genabschnitts zwecks anschließender Herstellung einer Standardreihe für dieses Gen. Der Vorgang der Klonierung kann in drei grundlegende Arbeitsschritte unterteilt werden: Die Ligation stellt den ersten Schritt dar. Dabei wird das gewünschte DNA-Fragment in einen Vektor integriert, bei dem es sich in der Regel um ein bakterielles Plasmid handelt. Das entsprechende DNA-Fragment wurde zuvor in einer PCR, wie im Kapitel 3.4.1.1 beschrieben,

amplifiziert. Dabei diente cDNA aus kortikalem Nierengewebe von Schafen und von Ziegen als Matrize.

Der zweite Schritt der Klonierung – die so genannte Transformation – bewirkt die Aufnahme des Vektors in Bakterienzellen. Nach erfolgreicher Kultivierung der transformierten Bakterien stellt die Präparation des Plasmids den letzten Schritt dar.

Ligation

Als Vektor diente „pGEM[®]-T Easy“ (pGEM[®]-T Easy Vector System II, Promega). Dieses Plasmid enthält neben einem Ampicillin-Resistenzgen eine *Multiple Cloning Region*, welche innerhalb des für die β -Galactosidase codierenden lacZ-Gens liegt. Diese Eigenschaften waren im weiteren Verlauf der Klonierung für die Selektion von geeigneten Bakterienkolonien von grundlegender Bedeutung. Der Vektor liegt in linearisierter Form vor, wobei die freien Enden einen Thymidin-Überhang aufweisen. Dies unterstützt die Ligation, da die Taq-Polymerase während der Synthese der DNA-Stränge Überhänge der zu Thymidin komplementären Nukleinbase Adenosin stehen lässt.

Um die Integration des Amplifikats in den Vektor zu erreichen, wurden 3 μ l des aufgereinigten Amplifikats, 50 ng „pGEM[®]-T Easy“, 5 μ l „2x Rapid Ligation Buffer“ und 1 μ l T4-DNA-Ligase vermengt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Transformation

Zunächst wurden 2 μ l des Ligationsansatzes mit 30 μ l der E. Coli-Zellen „JM109 Competent Cells“ (pGEM[®]-T Easy Vector System II, Promega) vermischt. Auf eine 20-minütige Inkubation auf Eis folgte dann die Hitzeschock-Transformation. Dazu wurde die Zellsuspension in einem Heizblock (Eppendorf Thermomixer 5436) 45 s lang bei einer Temperatur von 42°C erwärmt. Direkt im Anschluss wurden die Zellen weitere 2 min auf Eis inkubiert. Um die Regeneration der Bakterienzellen zu unterstützen, wurden die Zellsuspensionen dann mit 570 μ l LB-Flüssigmedium ohne Antibiotikazusatz vermengt und 2 h bei 37°C und 150 rpm im Schüttelinkubator (GFL 3031) inkubiert. In der Zwischenzeit wurden LB-Agar-Platten mit einem Ampicillin-Gehalt von 25 μ g/ml mit je 40 μ l X-Gal (50 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid) und 60 μ l IPTG-Lösung (100 mM Isopropyl- β -D-Galaktopyranosid) bestrichen. X-Gal ist eine aus Galaktose und Indoxyl bestehende Verbindung. Bakterien mit intaktem LacZ-Gen können diese mit Hilfe

Material und Methoden

des Enzyms β -Galaktosidase spalten, woraufhin das freigesetzte Indoxyl mit Luftsauerstoff zu dem blauen Farbstoff Indigo reagiert. Kolonien aus Bakterien mit intaktem LacZ-Gen färben sich folglich blau, während eine Zerstörung des Gens infolge der Integration des DNA-Fragments eine weiße Färbung der entsprechenden Kolonien bewirkt. IPTG dient in diesem Zusammenhang der Aktivierung des Lac-Operons. Es vermittelt diesen Effekt durch Bindung des inhibitorischen LacI-Proteins.

Im Anschluss an die Regeneration wurden jeweils 100 μ l der Bakterienzell-Suspension gleichmäßig auf den Selektivnährböden ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Da auf diesen Nährböden nur Ampicillin-resistente Bakterien wachsen können, ist die Kolonienbildung ein Zeichen einer erfolgreichen Transformation mit dem Resistenz-vermittelnden Plasmid. Eine Blaufärbung der Kolonien resultiert – wie bereits oben beschrieben – aus einer β -Galaktosidase-Aktivität und ist somit ein Beleg dafür, dass diese Bakterienzellen ein intaktes LacZ-Gen besitzen. Für die Integration des Amplifikats in die *Multiple Cloning Region* im lac-Operon spricht hingegen eine weiße Färbung der Kolonien. Entsprechend wurden jeweils zwei weiße Kolonien ausgewählt, um Subkulturen in LB-Flüssigmedium anzulegen. Dazu wurde Material von jeweils einer einzelnen Kolonie in 3 ml Medium mit 6 μ l Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C bei 150 rpm im Schüttelinkubator inkubiert.

Plasmidpräparation

Zur Plasmidpräparation, die nach dem Prinzip der alkalischen Lyse erfolgte, wurde das „Qiagen Plasmid Mini Kit“ (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Zunächst wurde die Übernachtskultur in zwei Schritten in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und jeweils 5 min bei Raumtemperatur und 6000 g in der Biofuge[®] pico (Heraeus instruments) mit dem Rotor 3325 zentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluss an die Zentrifugationen verworfen. Das Bakterien-Pellet wurde in 300 μ l P1-Puffer resuspendiert, um dann durch Zugabe von 300 μ l P2-Puffer in einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur eine Lyse der Zellwände zu erreichen. Im Anschluss bewirkte die Zugabe von 300 μ l des Puffers P3 mit anschließender 5-minütiger Inkubation auf Eis eine Ausfällung der bakteriellen DNA. Durch eine 10-minütige Zentrifugation mit 10 000 g bei Raumtemperatur kam es zur Abscheidung der bakteriellen DNA und von Zelltrümmern am Boden des Reaktionsgefäßes, wohingegen die Plasmid-DNA aufgrund ihrer geringen Größe im Überstand verblieb. Um diese an eine spezielle Qiagen-Säule binden zu können, musste die Säule zunächst mit QBT-Puffer

equilibriert werden. Dazu wurde jeweils 1 ml des Puffers auf die Säule gegeben. Nachdem die gesamte Puffermenge der Schwerkraft folgend durch die Säule getropft war, wurden in zwei aufeinanderfolgenden Waschsritten je 2 ml QC-Puffer auf die Säule überführt. Auch in diesem Fall wurde abgewartet, bis die gesamte Flüssigkeit die Säule passiert hatte. Die Plasmid-DNA wurde durch Beladen der Säule mit 800 µl QF-Puffer in ein neues Reaktionsgefäß eluiert. Durch Vermengen des Eluats mit 560 µl Isopropanol wurde diese DNA präzipitiert. Eine anschließende 30-minütige Zentrifugation bei 10 000 g führte zur Abscheidung der Plasmid-DNA am Boden des Reaktionsgefäßes. Das so entstandene Pellet wurde nach Lufttrocknung in 50 µl TE-Puffer gelöst. Im Anschluss an die Präparation wurden Reinheit und DNA-Konzentration der Plasmid-DNA-Lösung photometrisch (BioPhotometer, Eppendorf AG) bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Präparationen bei -20°C gelagert.

3.4.1.2.3 Herstellung einer Verdünnungsreihe

Zunächst musste ermittelt werden, welches Volumen der Plasmid-DNA-Präparation benötigt wird, um 50 µl einer Lösung mit einer Konzentration von 10^{10} Kopien pro 2 µl herzustellen. Dabei war die Anzahl der Amplifikate in 2 µl der Lösung ausschlaggebend, da dieses Volumen in der PCR eingesetzt wurde. Unter Berücksichtigung der Größe des Vektors und des *Inserts* sowie der Plasmid-Konzentration wurde das entsprechende Volumen rechnerisch ermittelt. Nach Herstellung der entsprechenden Verdünnung wurde diese in weiteren Schritten jeweils 1:10 verdünnt, wobei die höchste Verdünnungsstufe eine Konzentration von 10^2 Kopien pro 2 µl aufwies. Zur Verdünnung wurde hochreines Wasser „Rotipuran® Low organic“ (Roth) verwendet. Nachfolgend wurde mittels *Real Time* RT PCR die Effizienz der *Primer* auf den verschiedenen Standardreihen getestet. Es wurden nur die Verdünnungsreihen als Standardreihen eingesetzt, bei deren Verwendung die *Primer* eine Effizienz zwischen 90% und 105% erreicht hatten.

3.4.1.3 PCR zum quantitativen Nachweis der RNA-Expression

3.4.1.3.1 SYBR Green® *Real Time* RT PCR

Die Expression des VDR-, PTHR-, CYP27B1- und CYP24A1-Gens wurde mit Hilfe der SYBR Green® *Real Time* RT PCR bestimmt. Dazu wurde der „KAPA™ SYBR® FAST Universal PCR Master Mix 2x“ (KAPA™ Biosystems, PEQLAB) verwendet. Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze sowie die Inkubationsbedingungen (Cycler

CFX96™, Bio-Rad) sind in den Tabellen 3.4 und 3.5 dargestellt. Die Sequenzen der im Rahmen der qualitativen PCR (Kapitel 3.4.1.1) etablierten *Primer* sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Alle Proben wurden im Doppelansatz untersucht. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, der anstelle von cDNA hochreines Wasser „Rotipuran® Low organic“ (ROTH) enthielt.

Tabelle 3.4: Pipettierschema der Reaktionsansätze für die SYBR Green® Real Time RT PCR

Gebrauchslösungen	c der Gebrauchslösung	c im Reaktionsansatz	Vol im Reaktionsansatz [µl]
H ₂ O (Rotipuran®)			6,4
KAPA™ MM-Puffer	zweifach	einfach	10,0
<i>Primer sense</i>	5 µmol/l	0,2 µmol/l	0,8
<i>Primer antisense</i>	5 µmol/l	0,2 µmol/l	0,8
cDNA bzw. H ₂ O (Rotipuran®)			2,0
Gesamtvolumen			20,0

Tabelle 3.5: Inkubationsbedingungen der SYBR Green® Real Time RT PCR

I Aktivierung der DNA-Polymerase	II PCR-Zyklen (n=40)	III Schmelzkurvenanalyse
3 min 95°C	3 s 95°C 20 s 60°C	10 min 55°C + 0,5°C/10s bis auf 95°C

3.4.1.3.2 TaqMan® Real Time RT PCR

Die Expression von GAPDH, TRPV5, CaBP_{D28K}, NCX1 und NaPi2a wurde mit der TaqMan® Real Time RT PCR unter Verwendung des „TaqMan® Gene Expression Master Mixes“ (Applied Biosystems) bestimmt. Die genaue Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist der Tabelle 3.6 zu entnehmen. Auch in diesem Fall wurden alle Proben im Doppelansatz untersucht. Ein Inkubationsansatz, der statt cDNA hochreines Wasser „Rotipuran® Low organic“ (ROTH) enthielt, wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Die zur spezifischen Quantifizierung der Amplifikate verwendeten *Primer* und Sonden sowie die Reaktionsbedingungen (Cycler CFX96™, Bio-Rad) sind den Tabellen 3.7 und 3.8 zu entnehmen.

Tabelle 3.6: Pipettierschema der Reaktionsansätze für die TaqMan® Real Time RT PCR

Gebrauchslösungen	c der Gebrauchslösung	c im Reaktionsansatz	Vol im Reaktionsansatz [µl]
H ₂ O (Rotipuran®)			6,4
TaqMan® MM-Puffer	zweifach	einfach	10,0
Primer sense	5 µmol/l	0,2 µmol/l	0,8
Primer antisense	5 µmol/l	0,2 µmol/l	0,8
cDNA bzw. H ₂ O (Rotipuran®)			2,0
Gesamtvolumen			20,0

Tabelle 3.7: Inkubationsbedingungen der TaqMan® Real Time RT PCR

I	II Aktivierung der DNA- Polymerase	III PCR-Zyklen (n = 40)
2 min 50°C	10 min 95°C	15 s 95°C 1 min 60°C

Tabelle 3.8: Primer und Sonden für den Nachweis von GAPDH, TRPV5, CaBP_{D28K}, NCX1 und NaPi2a

Gen	Primer (forward und reverse)	Sonde
GAPDH	for 5'-caaggtcatccatgaccacttt-3' rev 5'-cggaaggccatccaca-3'	FAM-ctgtccacgccatcactgccacc-TMR
TRPV5	for 5'-ggacaggaagggtcg-3' rev 5'-aggaggaaggacaaggcat-3'	FAM-cggtgactgaaagcgggcttct-BBQ
CaBP _{D28K}	for 5'-gtggatcagtatgggcagagagat-3' rev 5'-gaagttcttctgtgggtaacacat-3'	FAM-agccaactctacaattcctattttccat-BBQ
NCX1	for 5'-agagctgccctcctgtttt-3' rev 5'-gccaatcatgaggatggaga-3'	FAM-acgtgatgcactttctgactgtgttct-BBQ
NaPi2a	for 5'-ccaccgtacagactgctttaa-3' rev 5'-catttccagggtggcatt-3'	FAM-tggctgtcagttctgggtgctct-BBQ

3.4.2 Protein-Nachweis

Das *Western Blot*-Verfahren ermöglicht die semiquantitative Bestimmung der Protein-Expression. Dazu werden zunächst Proben mit definiertem Gesamtproteingehalt auf ein Gel aufgetragen. Während der anschließenden Elektrophorese erfolgt unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes die Auftrennung der enthaltenen Proteine entsprechend ihrer jeweiligen Größe. Proteine gleicher Größe sammeln sich im Gel auf gleicher Höhe an und bilden dadurch so genannte Proteinbanden. Um diese sichtbar zu machen und ihre Position mit den Banden des mitgeführten Größenstandards vergleichen zu können, muss zunächst ein *Blotting* erfolgen. Darunter versteht man den Elektrotransfer der im Gel enthaltenen Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran unter Erhalt des Verteilungsmusters der Banden. Eine reversible, unspezifische Färbung der Proteine im Anschluss an das *Blotting* dient als Erfolgskontrolle der vorangegangenen Arbeitsschritte. Nachfolgend kann dann mittels spezifischer Antikörper eine Immundetektion durchgeführt werden.

Es handelt sich beim *Western Blot* um ein semiquantitatives Nachweisverfahren, da letztendlich ein von dem Antikörper-Enzym-Konjugat ausgehendes Signal detektiert wird, dessen Intensität mit der Menge des untersuchten Proteins korreliert. Eine absolute Bestimmung der Anzahl der einzelnen Proteinmoleküle in der Bande ist jedoch nicht möglich. Der Vergleich der Proteingehalte verschiedener Proben ist zudem nur zwischen Proben derselben Membran möglich, da neben dem Proteingehalt auch Unterschiede im Ablauf der Elektrophorese, des *Blotting*-Schrittes und der Immundetektion die Signalstärke beeinflussen.

Die Aliquots der Rohmembran- und Cytosolpräparation sowie der Zellkernisolate wurden auf Eis aufgetaut. Die Probenvorbereitung sowie das Denaturierungsverfahren, die Elektrophorese und die Antikörperinkubation variierten in Abhängigkeit von dem nachzuweisenden Protein. Sie sind in der Tabelle 3.9 dargestellt.

3.4.2.1 SDS-PAGE

Zum Nachweis von TRPV5, NCX1 und PTHR erfolgte zunächst die Auftrennung der in den Rohmembranpräparationen enthaltenen Proteine mittels einer diskontinuierlichen SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach LAEMMLI (1970). Der Einsatz des negativ geladenen Detergenz SDS bewirkt eine Linearisierung der Proteine und verleiht ihnen ein einheitliches Ladungs-Masse-Verhältnis. Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgt daher insbesondere aufgrund der unterschiedlichen Größe der

Proteine. Eine Beeinflussung der elektrophoretischen Beweglichkeit durch Eigenladung, Sekundär- und Tertiärstruktur wird verhindert. Das Prinzip einer diskontinuierlichen Gelelektrophorese beruht auf Unterschieden in Gelstruktur, pH-Wert, Ionenstärke der Puffer sowie Art der Ionen im Gel- und Elektrodenpuffer und führt zu einer Konzentrierung der Proben im Sammelgel, bevor deren Auftrennung im Trenngel erfolgt. So erzielt man unabhängig vom Probenvolumen die Entstehung scharfer Banden. Nachdem die vorbereiteten Proben sowie der Größenstandard auf die SDS-Gele (Sammelgel 4,75% Acrylamid, Trenngel 8,5% Acrylamid) aufgetragen worden waren erfolgte die Elektrophorese. Der verwendete Elektrophoresepuffer entsprach in seiner Zusammensetzung einem SDS-haltigen Tris-Glycin-Puffersystem. Die angelegte Spannung betrug zunächst 60 V. Als die Proben das Trenngel erreicht hatten wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Banden des Größenstandards im relevanten Bereich eine ausreichende Auftrennung aufwiesen.

Auch für den Nachweis des intranukleären VDR wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE eingesetzt. Das Trenngel war in diesem Fall jedoch höher konzentriert (10% Acrylamid), um die elektrophoretische Beweglichkeit und somit Laufgeschwindigkeit des relativ kleinen Moleküls zu reduzieren. Zum Einsatz kam der gleiche Elektrophoresepuffer, der auch beim TRPV5-, NCX1- und PTHR-Nachweis verwendet wurde.

Der CaBP_{D28K}-Nachweis erfolgte nach Auftrennung der in den Cytosolpräparationen enthaltenen Proteine in einer diskontinuierlichen Tricin-SDS-PAGE (Sammelgel 4% Acrylamid, Trenngel 16% Acrylamid) nach SCHAEGGER und VON JAGOW (1987). Diese Form der Elektrophorese ist insbesondere zur Auftrennung kleinerer Proteine mit einer Größe von 1 bis zu 100 kDa geeignet. Anders als bei den bisher beschriebenen *Western Blots* wird hier ein Tricin-haltiger Kathodenpuffer eingesetzt, der in den von den Gelhalterungen begrenzten Raum gefüllt wird. Im äußeren Bereich des Tanks befindet sich Anodenpuffer.

3.4.2.2 *Blotting*

Voraussetzung für den erfolgreichen Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulose-Membran (GE Healthcare Amersham Hybond-ECL) ist der unmittelbare Kontakt der beiden Strukturen während des *Blottings*. In einem ersten Schritt wurden daher Gele und Membranen aufeinander liegend in spezielle Kassetten eingespannt. Diese wurden wiederum zusammen mit einem Kühlelement in einem mit *Blotting*-Puffer gefüllten Tank

fixiert. Unter dem Einfluss eines senkrecht zu den Gelen verlaufenden elektrischen Feldes erfolgte dann der Transfer der Proteine auf die Membran. Im Anschluss wurden die Membranen 1 bis 2 min in Ponceau-Rot-Lösung gefärbt. Die unspezifische Färbung aller Proteine ermöglicht eine Erfolgskontrolle der vorangegangenen Arbeitsschritte. Eine Entfärbung wurde durch Schwenken und wiederholtes Spülen der Membranen in PBS erreicht. Die Bedingungen des *Blottings* sind der Tabelle 3.9 zu entnehmen.

3.4.2.3 Blockierung

Aufgrund der hohen Proteinbindungs-Kapazität der Nitrocellulose-Membran besteht die Gefahr, dass die im Rahmen der Immundetektion eingesetzten Antikörper unspezifisch binden. Um dies zu vermeiden, wurden die Membranen mit in PBST gelöstem Magermilchpulver, wie in der Tabelle 3.9 beschrieben, inkubiert. Die im Milchpulver enthaltenen Proteine blockieren dabei unspezifische Proteinbindungsstellen.

3.4.2.4 Immundetektion von Proteinen

Am darauffolgenden Tag erfolgte die Immundetektion der zu untersuchenden Strukturen. Eine erste Inkubation mit einem spezifischen Primär-Antikörper ermöglichte dessen Bindung an das betreffende Protein. Durch einen anschließenden Waschschrift wurden ungebundene Antikörper von der Membran entfernt. In einem zweiten Inkubationsschritt wurde die Membran mit einem gegen den Primär-Antikörper gerichteten Sekundär-Antikörper inkubiert. Dieser Sekundär-Antikörper ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP = *Horseradish Peroxidase*) konjugiert. Ein weiterer Waschschrift bewirkte wiederum die Entfernung ungebundener Antikörper. Die Protokolle für die Antikörperinkubation unterscheiden sich in Abhängigkeit vom nachzuweisenden Protein. Sie sind der Tabelle 3.9 zu entnehmen.

Alle Membranen wurden im Anschluss an den letzten Waschschrift mehrmals mit PBS und *A. dest.* gespült, bevor sie 5 min mit dem Substrat der Meerrettichperoxidase „SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate“ (Thermo Scientific) inkubiert wurden. Das daraufhin im Bereich der Sekundär-Antikörper entstehende Chemilumineszenz-Signal wurde in einem *Gel Imager* (ChemiDoc™ BioRad) detektiert. Unter der Voraussetzung, dass sowohl Primär- als auch Sekundär-Antikörper spezifisch gebunden haben, ist die Stärke dieses Signals ein Maß für die in der Probe enthaltene Menge des entsprechenden Proteins. Um Fehlsignale infolge unspezifischer Bindung des Sekundär-Antikörpers erkennen zu können,

Material und Methoden

wurde eine identische Membran ausschließlich mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert. Eventuell auftretende Banden auf dieser Kontrollmembran wurden in der Auswertung der mit beiden Antikörpern inkubierten Membran nicht berücksichtigt. Die Spezifität der auf dieser Membran entstehenden Banden wurde zudem durch den Vergleich ihrer Position mit den Banden des Größenstandards überprüft.

Im Rahmen der *Western Blot*-Analysen des VDR und PTHR wurden ein biotinylierter und ein mit Streptavidin und HRP konjugierter Sekundär-Antikörper verwendet, um eine Verstärkung der Signalintensität zu erreichen.

Tabelle 3.9: Western Blot-Analysen von TRPV5, NCX1, PTHR, VDR und CaBP_{D28K}

	TRPV5	NCX1	PTHR	VDR	CaBP _{D28K}
Proteingehalt der Aliquots	50 µg	40 µg	50 µg	25 µg, Aceton-gefällt	10 µg
Probenbearbeitung	Zentrifugation: 5 min, 10000 g, Pellet in 8 µl Denaturierungspuffer „Hannover zweifach“ mit 5% DTT resuspendieren	Zentrifugation: 10 min, bei Raumtemperatur Pellet in 8 µl Denaturierungspuffer „Hannover zweifach“ mit 5% β-Mercaptoethanol resuspendieren	Zentrifugation: 35 min, 15558 g, 4°C; 8 µl Denaturierungspuffer „Hannover zweifach“ auf das Pellet geben, 15 min bei 33°C im Heizblock inkubieren, Pellet im Denaturierungspuffer resuspendieren	Zentrifugation 5 min, 10 000 g, Pellet in Denaturierungspuffer „Hannover vierfach“ mit 10% DTT resuspendieren, Hitzedenaturierung: 20 min 70°C	Aliquot 1:1 mit Cytosolpräparationspuffer vermengen, dann das doppelten Volumen des Denaturierungspuffers „Lämmli“ mit 5% β-Mercaptoethanol dazu geben, alles vermischen, Hitzedenaturierung: 5 min 95°C
Größenstandard	Thermo Scientific Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder 26625	Thermo Scientific Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder 26625	Thermo Scientific PageRuler™ Prestained Protein Ladder 26617	Thermo Scientific PageRuler™ Prestained Protein Ladder 26617	Thermo Scientific PageRuler™ Prestained Protein Ladder 26617
Elektrophorese	SDS-PAGE 8,5% Acrylamid; Sammelgel: 60 V, Trenngel: 120 V	SDS-PAGE 8,5% Acrylamid; Sammelgel: 60 V, Trenngel: 120 V	SDS-PAGE 10% Acrylamid; Sammelgel: 60 V, Trenngel: 120 V	SDS-PAGE 10% Acrylamid; Sammelgel: 60 V, Trenngel: 120 V	Tricin-SDS-PAGE 16% Acrylamid; Sammelgel: 30 V, Trenngel: 150 V
Blotting	100 V, 90 min Tank-Blot-System	100 V, 90 min Tank-Blot-System	100 V, 120 min Tank-Blot-System	100 V, 90 min Tank-Blot-System	100 V, 90 min Tank-Blot-System

Blockierung	in 5%iger PBST-Milch über Nacht bei 4°C, danach kurz mit PBS spülen	in 5%iger PBST-Milch über Nacht bei 4°C, danach kurz mit PBS spülen	in 10%iger PBST-Milch 2 h bei Raumtemperatur danach kurz mit PBS spülen	in 10%iger PBST-Milch über Nacht bei 4°C danach kurz mit PBS spülen	in 10%iger PBST-Milch über Nacht bei 4°C danach nicht mit PBS spülen
Primärer Antikörper	Rabbit Anti-TRPV5 (R98) (Santa Cruz sc-30187) 1:800 in PBST, 2 h bei Raumtemperatur	Mouse Anti-NCX1 (6H2) (abcam ab6495) 1:500 in 5%iger PBST-Milch, 2 h bei Raumtemperatur	Mouse Anti-PTHR1 (05-517) (Upstate Biotechnology) 1:300 in PBST, über Nacht bei 4°C	Rat Anti-VDR (9A7) (ALX-804-021) (Enzo) 1:1000 in PBST, 1 h bei Raumtemperatur	Mouse Anti-CaBP _{D28K} (300) (swant) 1:2500 in 5%iger PBST-Milch, 1 h bei Raumtemperatur
Waschen	fünfmal 10 min in PBST schwenken, danach kurz mit PBS spülen	fünfmal 10 min in PBST schwenken	fünfmal Spülen mit PBST, 10 min in PBST schwenken, dreimal Spülen mit PBST	viermal 10 min in PBST schwenken	viermal 10 min in PBST schwenken
Sekundärer Antikörper	HRP Anti-rabbit (9169) (Sigma-Aldrich) 1:20000 in 5%iger PBST-Milch, 2 h bei Raumtemperatur	HRP Anti-mouse (A2304) (Sigma-Aldrich) 1:10 000 in 5%iger PBST-Milch, 1 h bei Raumtemperatur	Mouse Anti-IgG biotinyliert (115-065-146) (Dianova) 1:1000 in PBST 1 h bei Raumtemperatur	Rat Anti-IgG biotinyliert (GE-Healthcare) 1:4000 in PBST, 1 h bei Raumtemperatur	HRP Anti-mouse (A2304) (Sigma-Aldrich) 1:20000 in 5%iger PBST-Milch, 1 h bei Raumtemperatur

Waschen	fünfmal 10 min in PBST schwenken	viermal 10 min in PBST schwenken	fünfmal Spülen mit PBST, 10 min in PBST schwenken, dreimal Spülen mit PBST	viermal 10 min in PBST schwenken	viermal 10 min in PBST schwenken
2. Sekundärer Antikörper	entfällt	entfällt	Streptavidin-HRP (RPN 1231) (GE-Healthcare) 1:10 000 in PBST, 20 min bei Raumtemperatur	Streptavidin-HRP (RPN 1231) (GE-Healthcare) 1:10 000 in PBST, 20 min bei Raumtemperatur	entfällt
Waschen	entfällt	entfällt	siehe oben	entfällt	entfällt

3.4.2.5 Normalisieren

Die *Western Blot*-Analyse dient dem Vergleich des Gehalts eines bestimmten Proteins in verschiedenen Proben. Da die Intensität des Chemilumineszenz-Signals erheblich durch die Menge des aufgetragenen Proteingemisches beeinflusst wird und in dieser Hinsicht gewisse Unterschiede unvermeidbar sind, wird die Expression des untersuchten Proteins auf die eines konstant exprimierten Proteins bezogen. Dieser Vorgang des Normalisierens dient weiterhin dazu, die aus einer generell abweichenden Proteinexpressionsrate resultierenden Unterschiede im Gehalt des jeweiligen Proteins auszugleichen.

Für das cytosolische Protein CaBP_{D28K} stand kein als interner Standard geeignetes Protein zur Verfügung. Zur Normalisierung der für TRPV5-, NCX1-, VDR- und PTHR ermittelten Werte wurde das Actin-assoziierte Protein Villin eingesetzt. Im Anschluss an die TRPV5- und NCX1-Detektion wurden die Membranen zunächst 10 min in PBST geschwenkt, bevor mit der Antikörperinkubation zur Detektion des Villins begonnen wurden.

Die Bedingungen der Antikörperinkubationen sind in Tabelle 3.10 dargestellt. Prinzip und Ablauf der eigentlichen Detektion sind in Kapitel 3.4.2.4 beschrieben.

3.4.2.6 „Strippen“

Aufgrund ähnlicher Größe der Proteine und der damit verbundenen Gefahr der Überlagerung von Signalen mussten die Antikörper nach der PTHR-Detektion zunächst von der Membran entfernt werden (so genanntes „Strippen“ der Membranen), bevor mit der Villin-Inkubation begonnen werden konnte. Dazu wurde die Membran zunächst 30 min in PBST geschwenkt. Dann wurde sie eine weitere halbe Stunde unter ständiger Bewegung bei einer Temperatur von 60°C mit „Roti-free Ready to use Stripping Buffer“ (Roth) inkubiert. Nach zwei 15-minütigen Waschschritten in PBST im abkühlenden Ofen wurde die Membran erneut 2 h lang in 5%iger PBST-Milch blockiert und dann kurz mit PBST abgespült, bevor mit der Antikörperinkubation (siehe Tabelle 3.10) begonnen wurde.

Tabelle 3.9: Antikörperinkubationsbedingungen für die Villin-Detektion

Villin	
Primärer Antikörper	Mouse Anti-chicken Villin (Labgen CTS2192) 1:8000 in PBST, 30 min bei Raumtemperatur
Waschen	fünfmal mit PBST spülen, 10 min in PBST schwenken, dreimal mit PBST spülen
Sekundärer Antikörper	HRP Anti-mouse (Sigma-Aldrich A2304) 1:25000 in PBST, 20 min bei Raumtemperatur
Waschen	fünfmal mit PBST spülen, 20 min in PBST schwenken, dreimal mit PBST spülen

3.4.2.7 Auswertung

Das Abbildungssystem „ChemiDoc™“ (Bio-Rad) detektiert das im Bereich des gesuchten Proteins entstehende Chemilumineszenz-Signal und stellt die entsprechenden Banden bildlich dar. Die optische Dichte dieser Banden ist von der Stärke des Signals abhängig und kann mit dem PC-Programm „Quantity One“ (Bio-Rad) bestimmt werden. Es handelt sich bei der optischen Dichte um das Produkt aus der Fläche unter der Kurve und der Pixeldichte (Intensität) und somit um eine dimensionslose Größe.

Da der Vergleich von Proteinbanden aus den bereits genannten Gründen (Kapitel 3.4.2) nur innerhalb einer Membran möglich ist, war es bei entsprechend hoher Tierzahl erforderlich, auf jedem Gel die Proben der jeweiligen Gruppe jeweils gegen die Proben der Kontrollgruppe aufzutragen. In dem Versuch zum Einfluss einer alimentären Calcium-Restriktion und einer Calcitriol-Behandlung auf die Calcium-Homöostase war dies die Gruppe der adäquat mit Calcium versorgten, Placebo-behandelten Tiere. Bei den Proben aus den Versuchen zum Einfluss der Laktation auf die Calcium-Homöostase war dies aufgrund der geringeren Anzahl

nicht erforderlich. Proben laktierender und trockenstehender Tiere konnten hier jeweils gemeinsam auf ein Gel aufgetragen werden.

3.5 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung sowie die Darstellung der Daten wurde das Computerprogramm „GraphPad Prism 6“ (GraphPad Software) verwendet. Alle innerhalb einer Gruppe erhobenen Werte wurden zunächst mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Gauß'sche Normalverteilung geprüft. Mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (2-way ANOVA) wurde untersucht, inwieweit die Faktoren „Calcium-Restriktion“ und „Calcitriol-Behandlung“ die RNA-Expressionsraten beeinflussten und ob eine Interaktion der Faktoren bestand. Im Anschluss wurde der *Sidak's post-test for multiple comparisons* durchgeführt.

Auch die im Rahmen der *Western Blot*-Analysen erhobenen Daten wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (2-way ANOVA) untersucht. Da jedoch die Proben der verschiedenen Versuchsgruppen auf unterschiedlichen Membranen aufgetragen worden waren (Kapitel 3.4.2.7), konnten die entsprechenden Daten nicht direkt miteinander verglichen werden. Stattdessen wurde zunächst aus den Werten der auf jeder der drei Membranen aufgetragenen Proben der Kontrolltiere der Mittelwert gebildet. Dieser Wert wurde dann gleich 1 gesetzt und die Daten der drei übrigen Versuchsgruppen in Relation dazu dargestellt.

Die Daten der laktierenden und trockengestellten Tiere wurden mit Hilfe des ungepaarten t-Tests (*Unpaired t-Test*) untersucht.

Im Folgenden werden in den Darstellungen der Daten der arithmetische Mittelwert (\bar{x}) und Standardfehler (SEM) angegeben. Für die Signifikanzangaben gilt:

$p > 0,10$	n.s. nicht signifikant
$p \leq 0,10$	(*) statistische Tendenz
$p \leq 0,05$	* schwach signifikant
$p \leq 0,01$	** signifikant
$p \leq 0,001$	*** hoch signifikant

4. Ergebnisse

Die RNA-Expression der für den renalen Calcium-Transport verantwortlichen Strukturen TRPV5 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 5*), CaBP_{D28K} (Calbindin-D_{28K}) und NCX1 (Natrium-Calcium-Austauscher 1), des Natrium-Phosphat-Cotransporters NaPi2a, der am Vitamin D-Metabolismus beteiligten Enzyme CYP27B1 (1 α -Hydroxylase) und CYP24A1 (24-Hydroxylase) sowie des Parathormon-Rezeptors (PTHr) und Vitamin D-Rezeptors (VDR) im Nierengewebe der Schafe und Ziegen wurde mittels *Real Time* RT PCR untersucht. Darüber hinaus wurde die Protein-Expression des TRPV5-, CaBP_{D28K}-, NCX1-, VDR- und PTHr-Gens mittels *Western Blot*-Analyse semiquantitativ bestimmt.

Nach Ermittlung des Gehalts an CYP27B1-, CYP24A1-, VDR- und PTHr-Transkripten mit Hilfe der SYBR Green[®] *Real Time* RT PCR wurden diese Werte zu den ermittelten RNA-Mengen des GAPDH-Gens in Relation gesetzt. Um die RNA-Expression von TRPV5, CaBP_{D28K}, NCX1 und NaPi2a quantitativ zu bestimmen wurde eine TaqMan[®] *Real Time* RT PCR durchgeführt. Auch hier diente das GAPDH-Gen als *Housekeeping Gene*. Der quantitative Nachweis gelang in allen untersuchten Proben problemlos. Die für die Negativkontrollen ermittelten Werte lagen stets unterhalb der Nachweisgrenze.

Für die am renalen Calcium-Transport beteiligten Strukturen sowie die beiden Hormonrezeptoren erfolgte zudem die Bestimmung mittels *Western Blot*-Analyse. Im Rahmen der *Western Blot*-Analysen wurde jeweils ein „Duplikat“ jedes Gels mitgeführt. Die entsprechende Membran wurde auch im Anschluss an den Blot wie das „Original“ behandelt, jedoch ausschließlich mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert. Durch Vergleich des Bandenmusters der beiden Membranen nach erfolgter Detektion des Chemilumineszenz-Signals konnten die auf unspezifische Bindung des Sekundär-Antikörpers zurückzuführenden Banden, und somit auch das tatsächlich vom Primär-Antikörper ausgehenden Signal, identifiziert werden. Um die Spezifität des Primär-Antikörpers zu überprüfen wurde zudem, wenn verfügbar, das jeweilige antigene Peptid neben den Proben auf das Gel mit aufgetragen und die Lage der resultierenden Banden verglichen.

Die Normalisierung der für den PTHr bestimmten Werte gestaltete sich schwierig. Grundsätzlich konnten beim PTHr-Western Blot zwei für PTHr spezifische Banden auf einer Höhe von etwa 90 kDa und 45 kDa detektiert werden. Eine weitere Bande auf etwa

Ergebnisse

72 kDa resultierte aus dem vom Sekundär-Antikörper ausgehenden Signal. Die Villin-Bande erschien auf einer Höhe von etwa 95 kDa. Um eine Überlagerung des Chemilumineszenz-Signals zu vermeiden war es daher erforderlich, die Membranen nach Detektion der PTHR-Banden zu „strippen“ (siehe Kapitel 3.4.2.6). Eine alternative Detektion der β -Actin-Bande war aus zwei Gründen nicht möglich: Zum Einen wäre das entsprechende Signal auf einer Höhe von 43 kDa zu erwarten gewesen, womit sich die Banden wiederum überlagert hätten. Zum anderen kann β -Actin nur als Proteinstandard verwendet werden, wenn die aufgetragene Menge an Gesamtprotein sehr gering ist. So konnten bereits in einem Bereich zwischen 7,55 μ g und 1,88 μ g aufgetragenem Gesamtprotein keine Unterschiede in der Signalintensität nach β -Actin-Detektion beobachtet werden, das heißt die Menge des Standards korrelierte offenbar nicht mit der aufgetragenen Proteinmenge (Dittmer u. Dittmer, 2006). Die im Anschluss an das Strippen durchgeführte Antikörperinkubation zwecks Detektion des Standards Villin bereitete jedoch Probleme. Es ergab sich ein sehr unregelmäßiges Bandenmuster, wobei einzelne Banden – unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit des beprobten Tieres – eine zum Teil um mehrere Zehnerpotenzen geringere optische Dichte aufwiesen als andere. Bei Wiederholung des *Western Blots* war dieses Bandenmuster nicht reproduzierbar; stattdessen wiesen andere Banden eine stark abweichende optische Dichte auf. Da die Villin-Detektion bei ungestripten Membranen stets ein homogenes Bild lieferte und reproduzierbar war, scheint ein Zusammenhang mit dem Vorgang des „Strippens“ wahrscheinlich. Daher bestand die Überlegung, die Membranen vor Detektion der PTHR-Banden zu zerschneiden und nur eine der beiden Banden zu detektieren, um den anderen Teil der Membran ausschließlich für die Detektion des Proteinstandards zu nutzen. Die für die einzelnen Banden ermittelten Werte trugen jedoch sowohl gruppenintern als auch gruppenübergreifend zu unterschiedlichen Anteilen zum Gesamtwert bei. So unterschied sich der Quotient aus Optischer Dichte der oberen Bande und der Summe der Optischen Dichte beider Banden um mehr als 10%. Darüber hinaus war auch eine Normalisierung im Anschluss an eine *Indian Ink*-Färbung der Membranen beim PTHR-*Western Blot* nicht möglich, da die gestripten Membranen – vermutlich aufgrund reduzierter Proteinmengen – keine klar abgrenzbaren, kräftigen Banden aufwiesen.

Aus diesem Grund musste im Fall des PTHR-*Western Blots* auf eine Normalisierung auf Villin verzichtet werden. Stattdessen wurde auf die aufgetragene Proteinmenge normalisiert.

Ergebnisse

Ebenso wurde im Fall des VDR-*Western Blots* verfahren, da die Aussagekraft einer Normalisierung der VDR-Gehalte auf Villin vor dem Hintergrund der Lokalisation des Villins in der Bürstensaummembran (Rodman et al., 1986) und der Tatsache, dass der VDR aus Zellkernisolaten detektiert wurde, äußerst begrenzt gewesen wäre.

Für das cytosolische Protein CaBP_{D28K} standen von vorneherein keine Antikörper für möglicherweise als internen Standard geeignete Proteine zur Verfügung.

Die bei beiden Spezies auf RNA- und gegebenenfalls auch Protein-Ebene ermittelten Ergebnisse sind im Folgenden für jedes untersuchte Gen jeweils nebeneinander dargestellt, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen. Dabei werden für jedes Gen zunächst die Ergebnisse aus dem Versuch zur alimentären Calcium-Restriktion und/oder Calcitriol-Behandlung (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“) und direkt darauf folgend die Ergebnisse aus den Untersuchungen an laktierenden und trockenstehenden Schafen und Ziegen (Versuch „Laktation“) aufgeführt. Der für die Gruppe der adäquat-gefütterten, Placebo-behandelten Tiere sowie der Gruppe der trockenstehenden Tiere ermittelte Mittelwert wurde jeweils gleich 1 gesetzt und die Expression der anderen Gruppen zu diesem Wert in Relation gesetzt.

4.1 Transzellulärer Calcium-Transport

4.1.1 TRPV5 (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)

Die RNA- und Protein-Expression des TRPV5-Gens in der Niere der Schafe und Ziegen ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Bei beiden Spezies bewirkte die Calcitriol-Behandlung eine Steigerung der Expression des Calcium-Kanals auf RNA-Ebene. Bei den Schafen führte die alimentäre Calcium-Restriktion zu einer Abnahme der Protein-Expression von TRPV5.

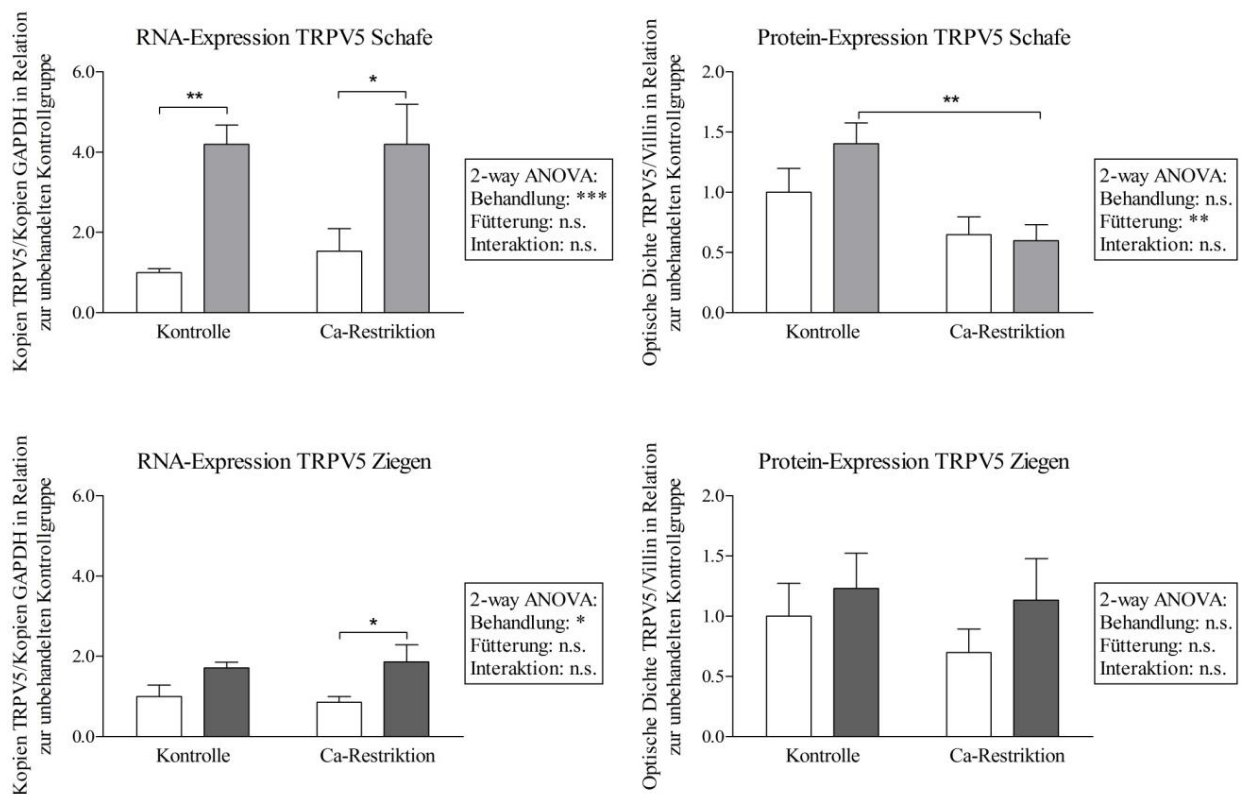


Abbildung 4.1: TRPV5-Expression (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)

Darstellung der normalisierten RNA- und Protein-Gehalte von TRPV5 in der Niere adäquat bzw. restriktiv mit Calcium versorgter Schafe und Ziegen 12 h nach Calcitriol- (dunkle Säulen) bzw. Placebo-Behandlung (weiße Säulen), jeweils in Relation zur unbehandelten Kontrollgruppe ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, jeweils fünf Tiere je Gruppe);

Ergebnisse der 2-way ANOVA: *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$

Ergebnisse des Sidak's post-test for multiple comparisons: *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$

4.1.2 TRPV5 (Versuch „Laktation“)

Abbildung 4.2 zeigt die Expression des TRPV5-Gens in der Niere von laktierenden und trockenstehenden Schafen und Ziegen. Bei den Schafen wurde die RNA-Expression des TRPV5-Gens nicht durch die Laktation beeinflusst, wohingegen die Protein-Expression tendenziell vermindert war. Laktierende Ziegen wiesen im Vergleich zu den trockenstehenden Individuen eine signifikant verminderte RNA-Expression des Calcium-Kanals auf. Auf Protein-Ebene konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Rein augenscheinlich wiesen jedoch auch hier die laktierenden Ziegen eine im Vergleich zu den trockenstehenden Ziegen geringere Expression auf.

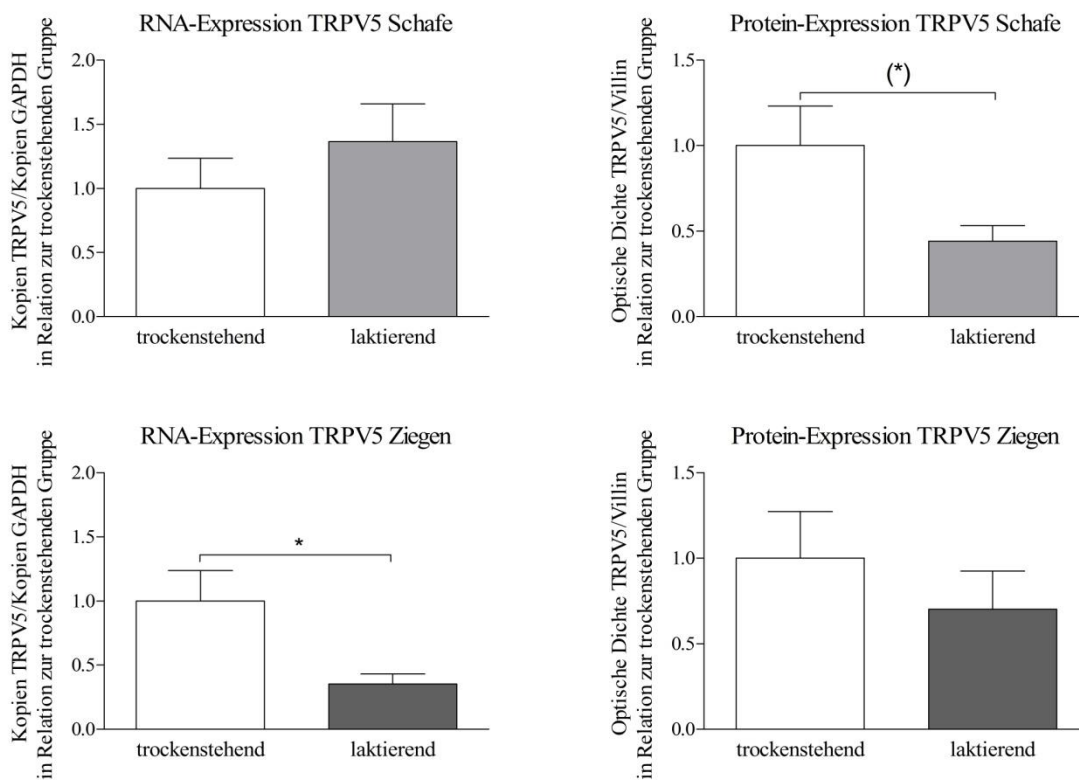


Abbildung 4.2: TRPV5-Expression (Versuch „Laktation“)

Darstellung der normalisierten RNA- und Protein-Gehalte von TRPV5 in der Niere von Schafen und Ziegen in der dritten Laktationswoche (dunkle Säulen) bzw. sechs Wochen nach Trockenstellung (weiße Säulen), jeweils in Relation zur Gruppe der trockenstehenden Tiere ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, jeweils fünf Tiere je Gruppe);

Ergebnisse des ungepaarten t-Tests: (*): $p \leq 0,1$, *: $p \leq 0,05$

Ergebnisse

4.1.3 CaBP_{D28K} (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)

Wie aus Abbildung 4.3 ersichtlich wird, verminderte die alimentäre Calcium-Restriktion sowohl beim Schaf als auch bei der Ziege die renale CaBP_{D28K}-Expression, wobei dieser Fütterungs-Effekt lediglich bei den Ziegen auch auf RNA-Ebene statistisch belegt werden konnte. Weiterhin fiel auf, dass die Calcitriol-Behandlung die CaBP_{D28K}-RNA-Expression bei Calcium-restriktiv gefütterten Tieren auf ein mit den Kontrollgruppen vergleichbares Niveau zu steigern schien, während bei adäquat ernährten Tieren keine zusätzliche Erhöhung der Expression durch die Behandlung induziert wurde. Eine entsprechende statistische Tendenz konnte allerdings nur bei der Ziege nachgewiesen werden.

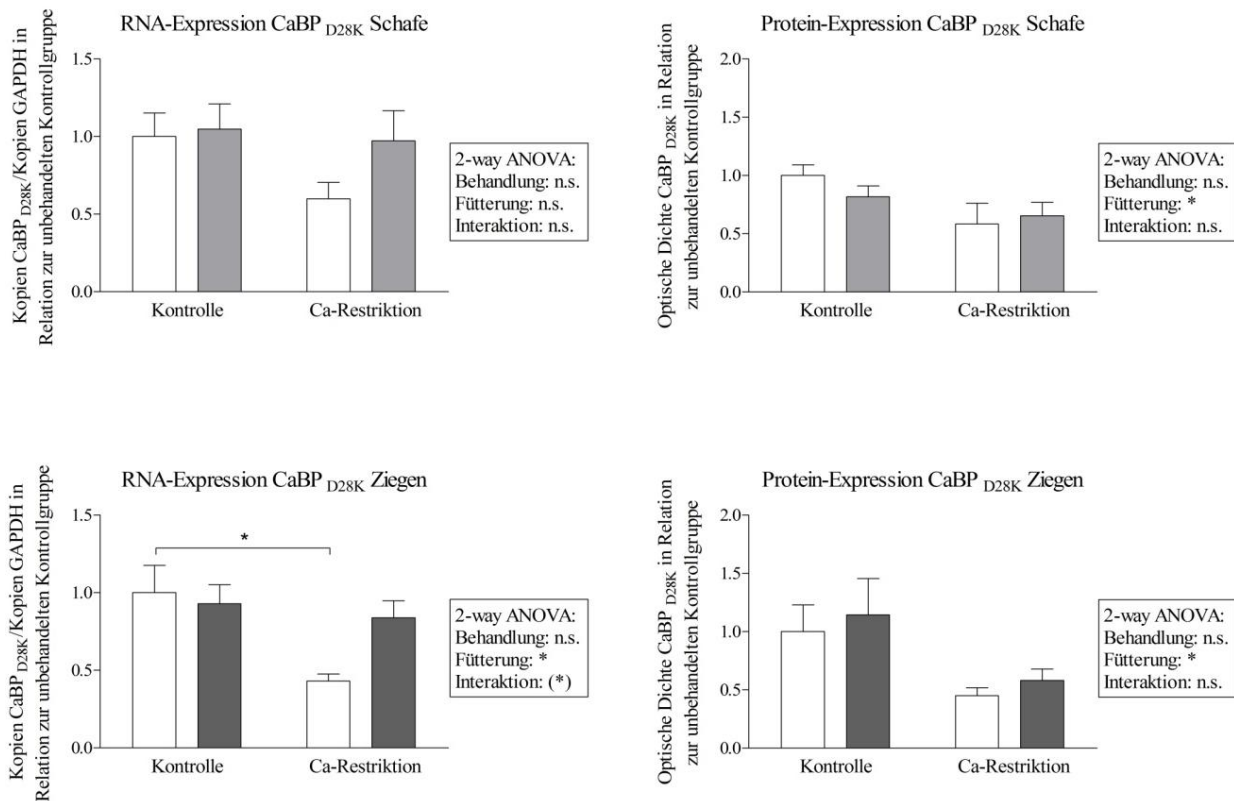


Abbildung 4.3: CaBP_{D28K}-Expression (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)

Darstellung der normalisierten RNA- sowie der Protein-Gehalte von CaBP_{D28K} in der Niere adäquat bzw. restriktiv mit Calcium versorgter Schafe und Ziegen 12 h nach Calcitriol- (dunkle Säulen) bzw. Placebo-Behandlung (weiße Säulen), jeweils in Relation zur unbehandelten Kontrollgruppe ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, jeweils fünf Tiere je Gruppe);

Ergebnisse der 2-way ANOVA: (*): $p \leq 0,1$, *: $p \leq 0,05$

Ergebnisse des Sidak's *post-test for multiple comparisons*: *: $p \leq 0,05$

4.1.4 CaBP_{D28K} (Versuch „Laktation“)

Laktierende Ziegen wiesen eine deutlich geringere RNA-Expression des CaBP_{D28K}-Gens auf als trockenstehende Tiere. Auf Protein-Ebene war ein entsprechender Unterschied statistisch nicht belegbar. Beim Schaf konnten keine Unterschiede bezüglich der renalen CaBP_{D28K}-Expression laktierender und trockenstehender Tiere beobachtet werden (siehe Abbildung 4.4).

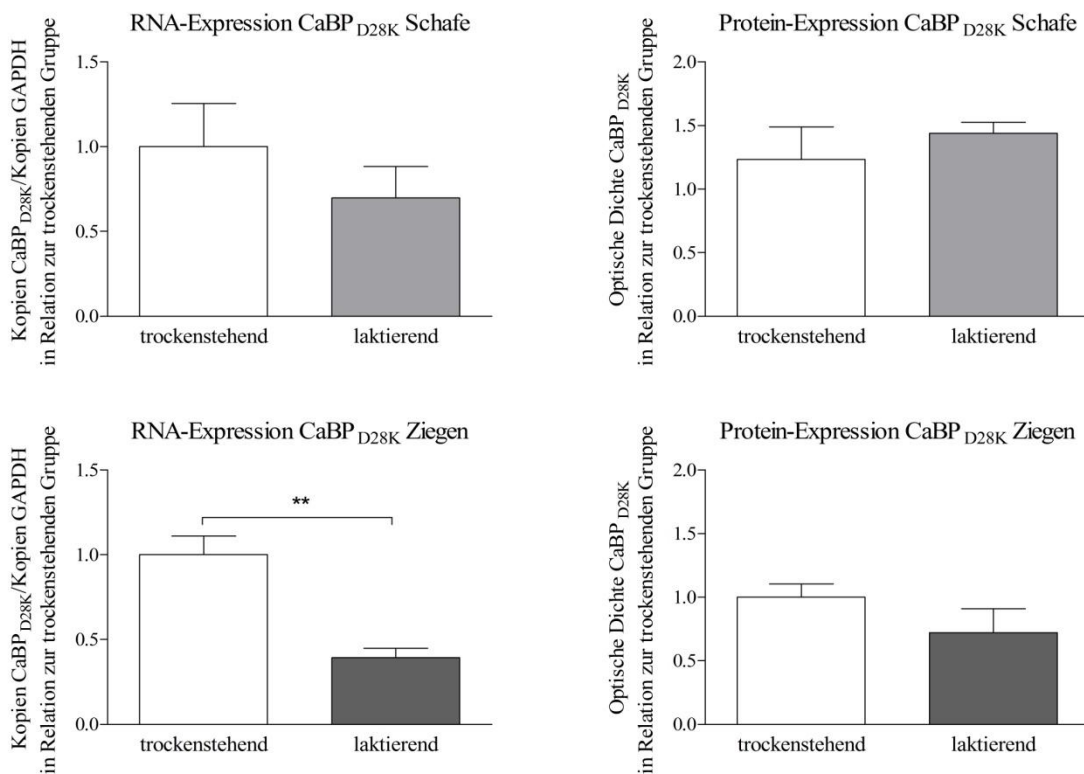


Abbildung 4.4: CaBP_{D28K}-Expression (Versuch „Laktation“)

Darstellung der normalisierten RNA- sowie der Protein-Gehalte von CaBP_{D28K} in der Niere von Schafen und Ziegen in der dritten Laktationswoche (dunkle Säulen) bzw. sechs Wochen nach Trockenstellung (weiße Säulen), jeweils in Relation zur Gruppe der trockenstehenden Tiere ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, jeweils fünf Tiere je Gruppe. Die Probe eines trockenstehenden Schafes konnte nicht erfolgreich präpariert werden. Daher wurde der für dieses Tier ermittelte Wert in der statistischen Auswertung der *Western Blot*-Analyse nicht berücksichtigt (n = 4).); Ergebnisse des ungepaarten t-Tests: **: $p \leq 0,01$

4.1.5 NCX1 (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)

Die RNA- und Protein-Expression des NCX1-Gens Calcium-restriktiv gefütterter und/oder Calcitriol-behandelter Ziegen und Schafe ist in Abbildung 4.5 jeweils in Relation zur Expression der unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. Bei beiden Spezies bedingte die Calcium-Restriktion eine Abnahme der renalen NCX1-Protein-Expression. Dieser Effekt war zumindest beim Schaf auch auf RNA-Ebene statistisch nachweisbar. Bei den Ziegen konnte hier hingegen ein Behandlungs-Effekt beobachtet werden. Infolge der Calcitriol-Gabe kam es bei dieser Spezies zu einer Steigerung der RNA-Expression des NCX1-Gens.

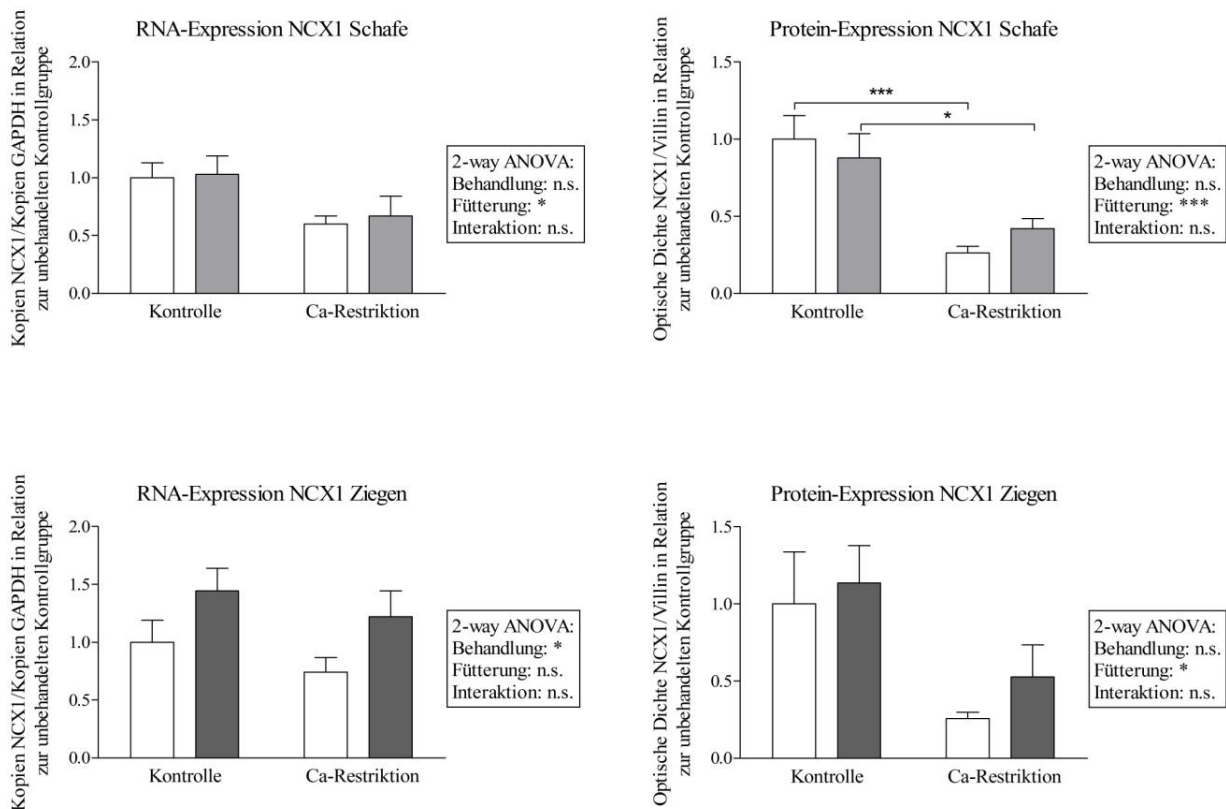


Abbildung 4.5: NCX1-Expression (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)

Darstellung der normalisierten RNA- und Protein-Gehalte von NCX1 in der Niere adäquat bzw. restriktiv mit Calcium versorgter Schafe und Ziegen 12 h nach Calcitriol- (dunkle Säulen) bzw. Placebo-Behandlung (weiße Säulen), jeweils in Relation zur unbehandelten Kontrollgruppe ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, jeweils fünf Tiere je Gruppe);

Ergebnisse der 2-way ANOVA: *: $p \leq 0,05$, ***: $p \leq 0,001$

Ergebnisse des Sidak's post-test for multiple comparisons: *: $p \leq 0,05$, ***: $p \leq 0,001$

4.1.6 NCX1 (Versuch „Laktation“)

Abbildung 4.6 zeigt die RNA- und Protein-Expression des NCX1-Gens in der Niere laktierender und trockenstehender Schafe und Ziegen. Die im Vergleich zu trockenstehenden Tieren augenscheinlich etwas geringere Expression des Natrium-Calcium-Austauschers bei laktierenden Schafen war sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene statistisch nicht belegbar. Bei laktierenden Ziegen konnten hingegen eine im Vergleich zu den trockenstehenden Tieren signifikant geringere NCX1-RNA-Expression sowie eine tendenziell verminderte Protein-Expression des NCX1-Gens beobachtet werden.

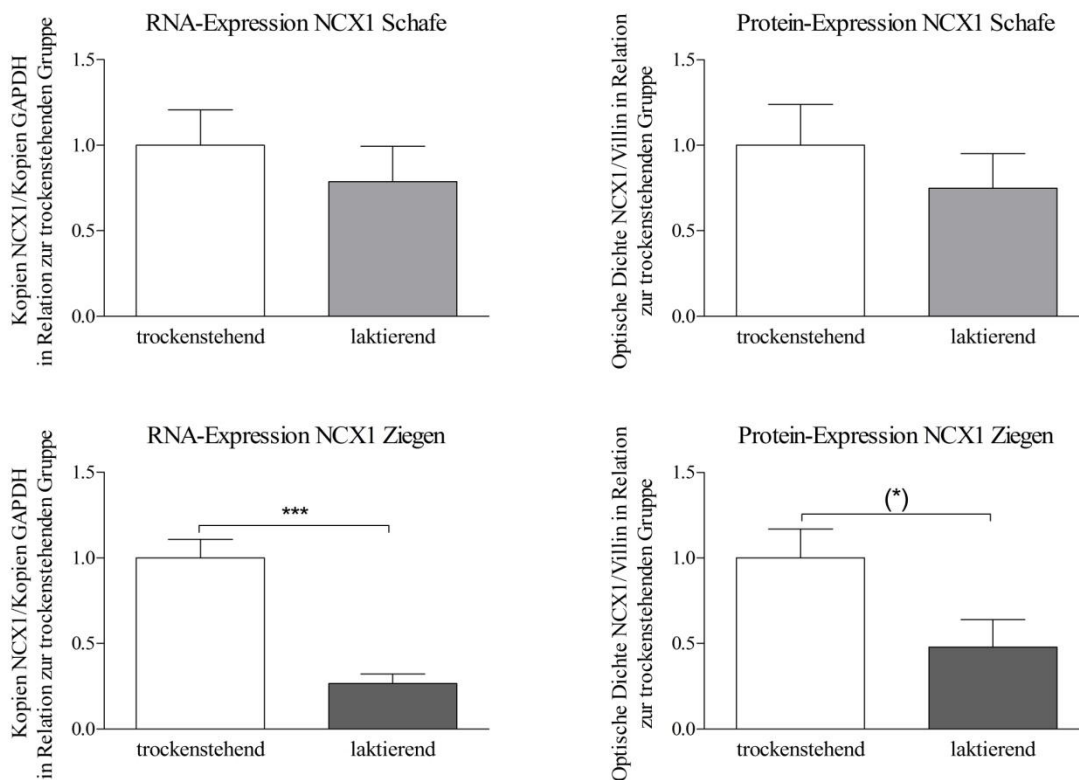


Abbildung 4.6: NCX1-Expression (Versuch „Laktation“)

Darstellung der normalisierten RNA- und Protein-Gehalte von NCX1 in der Niere von Schafen und Ziegen in der dritten Laktationswoche (dunkle Säulen) bzw. sechs Wochen nach Trockenstellung (weiße Säulen), jeweils in Relation zur Gruppe der trockenstehenden Tiere ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, jeweils fünf Tiere je Gruppe);

Ergebnisse des ungepaarten t-Tests: (*): $p \leq 0,1$, ***: $p \leq 0,001$

4.2 Phosphat-Resorption

Da für den Nachweis des NaPi2a-Proteins kein funktionierender spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, wurde die Expression des NaPi2a-Gens ausschließlich auf RNA-Ebene untersucht.

4.2.1 NaPi2a (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)

Sowohl beim Schaf als auch bei der Ziege schien die renale Expression des Natrium-Phosphat-Cotransporters NaPi2a bei Calcitriol-behandelten Tieren geringer zu sein als bei Placebo-behandelten Tieren (siehe Abbildung 4.7). Eine entsprechende statistische Tendenz bestand jedoch nur im Fall der Ziegen, wohingegen bei den Schafen aufgrund einer großen Streuung der Werte ein Behandlungs-Effekt statistisch nicht nachweisbar war.

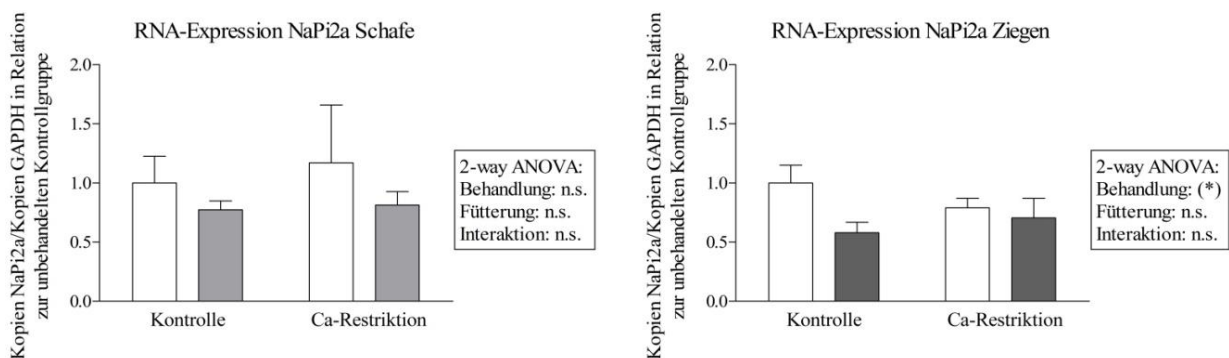


Abbildung 4.7: NaPi2a-Expression (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)

Darstellung der normalisierten RNA-Gehalte von NaPi2a in der Niere adäquat bzw. restriktiv mit Calcium versorgter Schafe und Ziegen 12 h nach Calcitriol- (dunkle Säulen) bzw. Placebo-Behandlung (weiße Säulen), jeweils in Relation zur unbehandelten Kontrollgruppe ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, jeweils fünf Tiere je Gruppe);
 Ergebnisse der 2-way ANOVA: (*): $p \leq 0,1$
Sidak's post-test for multiple comparisons

4.2.2 NaPi2a (Versuch „Laktation“)

Die RNA-Expression des NaPi2a-Gens in der Niere laktierender und trockenstehender Schafe und Ziegen ist in Abbildung 4.8 dargestellt. Die im Vergleich zu den trockenstehenden Individuen geringere RNA-Expression des NaPi2a-Gens erlangte aufgrund großer Streuung der Werte in der trockenstehenden Gruppe weder beim Schaf noch bei der Ziege statistische Signifikanz.

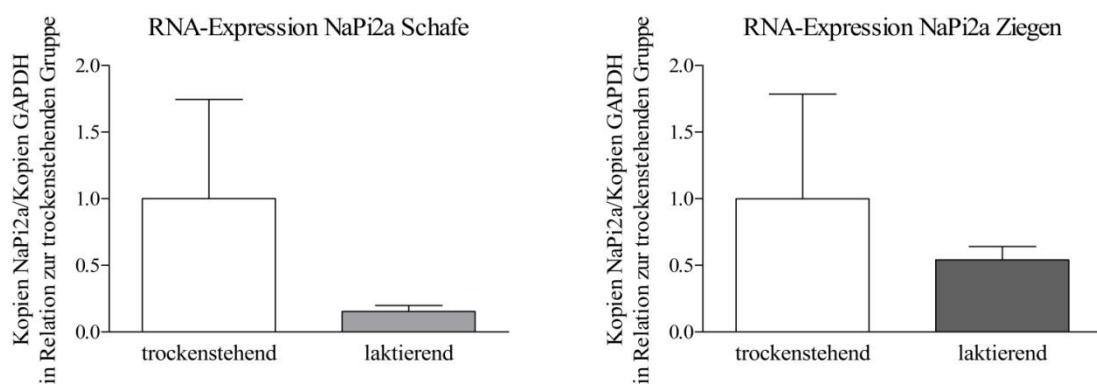


Abbildung 4.8: NaPi2a-Expression (Versuch „Laktation“)

Darstellung der normalisierten RNA-Gehalte von TRPV5 in der Niere von Schafen und Ziegen in der dritten Laktationswoche (dunkle Säulen) bzw. sechs Wochen nach Trockenstellung (weiße Säulen), jeweils in Relation zur Gruppe der trockenstehenden Tiere ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, jeweils fünf Tiere je Gruppe); ungepaarter t-Test

4.3 Rezeptoren

4.3.1 PTHR (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)

Wie aus Abbildung 4.9 ersichtlich wird, wurde die PTHR-RNA-Expression bei beiden Spezies weder durch die alimentäre Calcium-Restriktion noch durch die Calcitriol-Behandlung beeinflusst. Beim Schaf konnte jedoch eine tendenzielle Zunahme der Protein-Expression des PTHR-Gens infolge der Calcitriol-Behandlung beobachtet werden.

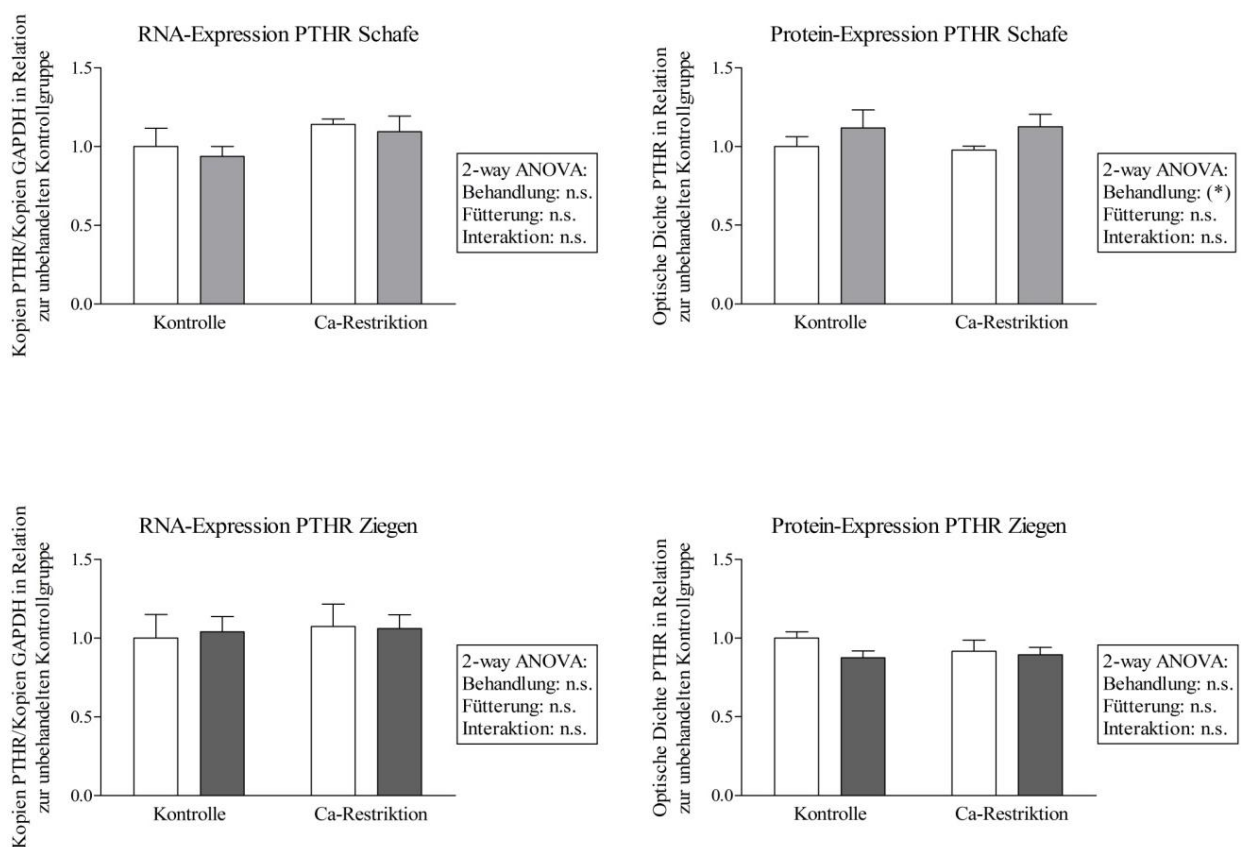


Abbildung 4.9: PTHR-Expression (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)

Darstellung der normalisierten RNA- sowie der Protein-Gehalte von PTHR in der Niere adäquat bzw. restriktiv mit Calcium versorgter Schafe und Ziegen 12 h nach Calcitriol- (dunkle Säulen) bzw. Placebo-Behandlung (weiße Säulen), jeweils in Relation zur unbehandelten Kontrollgruppe ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, jeweils fünf Tiere je Gruppe; für den PTHR-Western Blot der Schafe standen in der unbehandelten Kontrollgruppe Gesammembran-Präparate von nur vier Tieren zur Verfügung);

Ergebnisse der 2-way ANOVA: (*): $p \leq 0,1$

Sidak's post-test for multiple comparisons

4.3.2 PTHR (Versuch „Laktation“)

Abbildung 4.10 zeigt, dass weder beim Schaf, noch bei der Ziege Unterschiede in der Expression des PTHR-Gens in der Niere laktierender und trockenstehender Tiere bestanden.

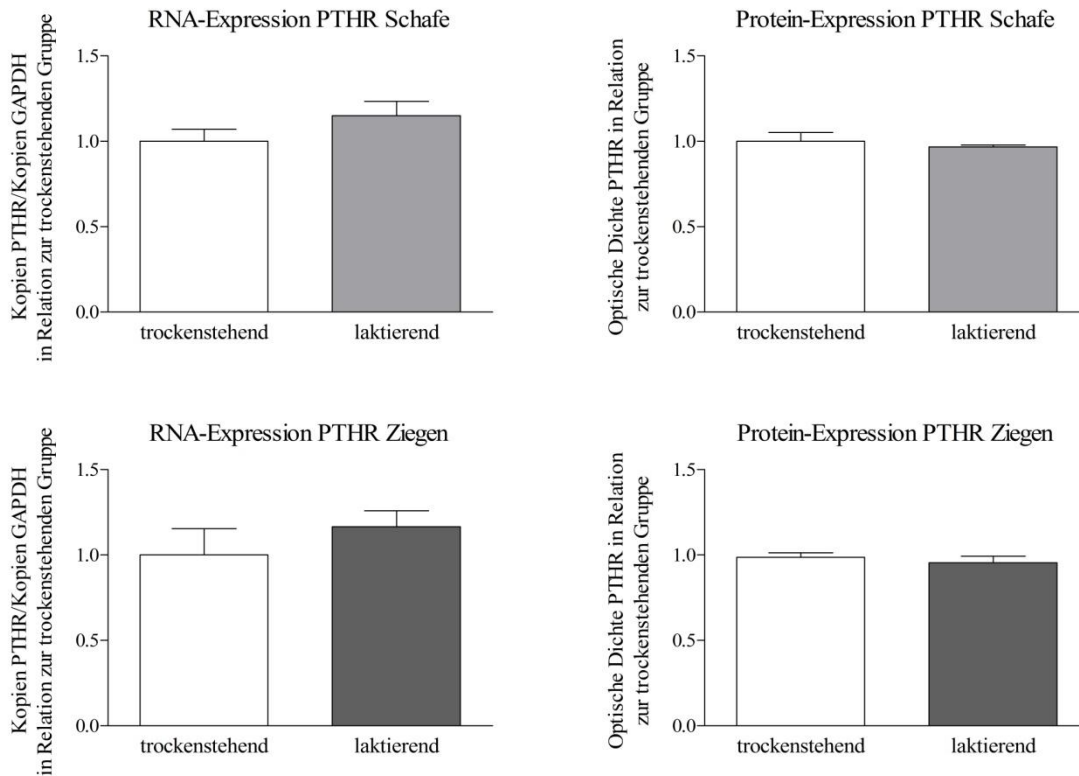


Abbildung 4.10: PTHR-Expression (Versuch „Laktation“)

Darstellung der normalisierten RNA- und Protein-Gehalte von PTHR in der Niere von Schafen und Ziegen in der dritten Laktationswoche (dunkle Säulen) bzw. sechs Wochen nach Trockenstellung (weiße Säulen), jeweils in Relation zur Gruppe der trockenstehenden Tiere ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, jeweils fünf Tiere je Gruppe); ungepaarter t-Test

4.3.3 VDR (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)

Die unter Verwendung renaler Zellkernisolate ermittelte Expression des VDR-Gens auf RNA- und Protein-Ebene ist in Abbildung 4.11 dargestellt. Während die RNA-Expression beim Schaf durch die Calcitriol-Behandlung erhöht wurde, konnte aufgrund zu großer Streuung auf Protein-Ebene nur eine entsprechende Tendenz nachgewiesen werden. Bei den Ziegen zeigten Calcium-restriktiv gefütterte Tiere eine tendenzielle Verminderung der VDR-Protein-Expression; die RNA-Expression wurde durch keinen der beiden Faktoren beeinflusst.

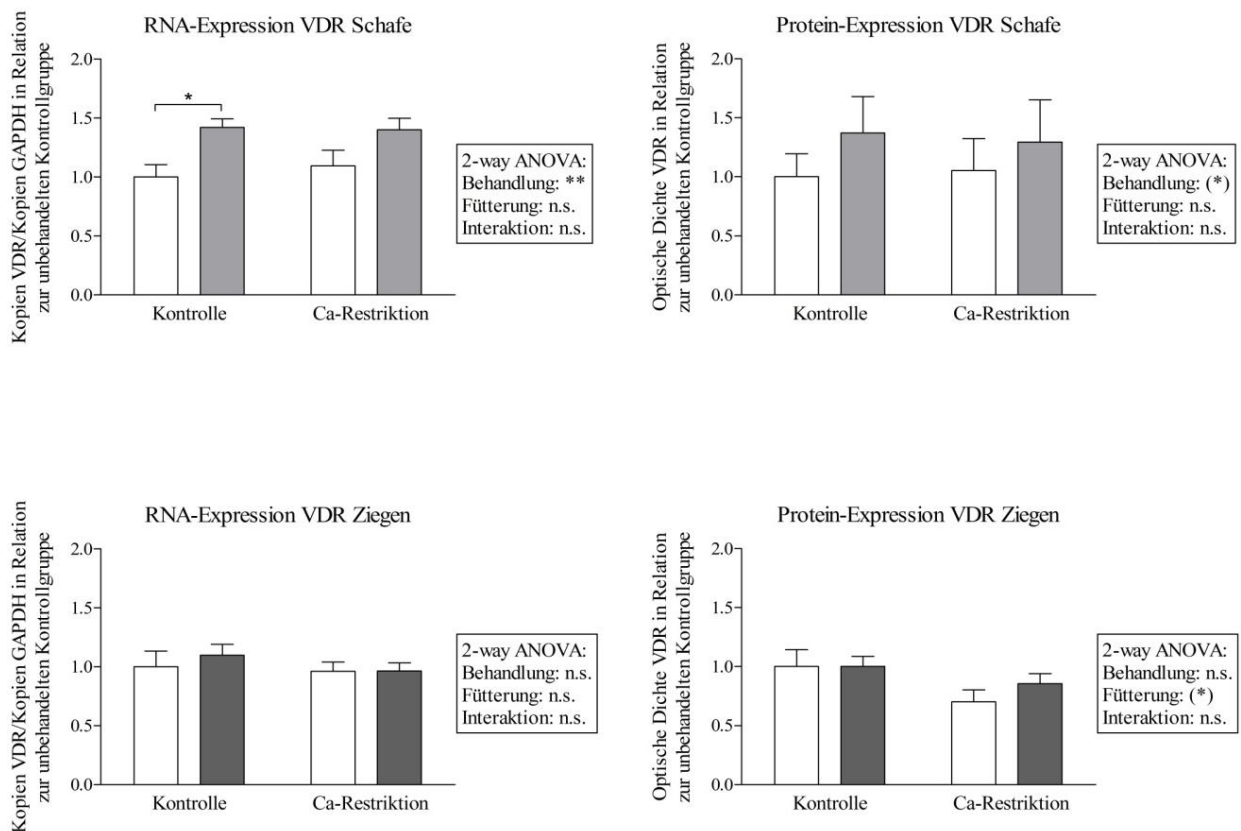


Abbildung 4.11: VDR-Expression (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)

Darstellung der normalisierten RNA- sowie der Protein-Gehalte von VDR in der Niere adäquat bzw. restriktiv mit Calcium versorgter Schafe und Ziegen 12 h nach Calcitriol- (dunkle Säulen) bzw. Placbo-Behandlung (weiße Säulen), jeweils in Relation zur unbehandelten Kontrollgruppe ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, jeweils fünf Tiere je Gruppe);

Ergebnisse der 2-way ANOVA: (*): $p \leq 0,1$, **: $p \leq 0,01$

Ergebnisse des Sidak's post-test for multiple comparisons: *: $p \leq 0,05$

4.3.4 VDR (Versuch „Laktation“)

Wie aus Abbildung 4.12 ersichtlich wird, konnten keine signifikanten Unterschiede in der renalen Expression des VDR-Gens laktierender und trockenstehender Schafen und Ziegen festgestellt werden. Während die Menge der in den Zellkernisolaten laktierender Schafe nachgewiesener Amplifikate in etwa der in der trockenstehenden Gruppe ermittelten Menge entsprach, schien die Protein-Menge in den Isolaten der laktierenden Schafe geringer zu sein als die der trockenstehenden Schafe. Bei der Ziege erschien die VDR-Expression sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene in der Laktation etwas geringer als nach erfolgter Trockenstellung. Diese Unterschiede erreichten jedoch in keinem Fall statistische Signifikanz.

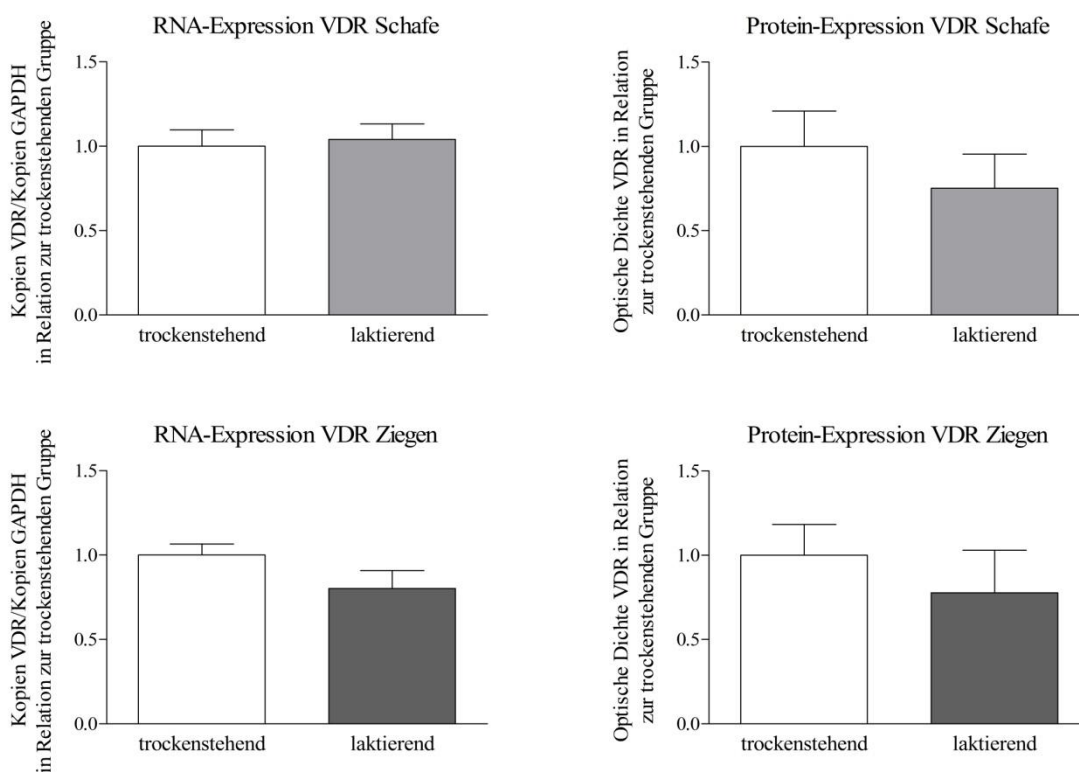


Abbildung 4.12: VDR-Expression (Versuch „Laktation“)

Darstellung der normalisierten RNA- und der Protein-Gehalte von VDR in der Niere von Schafen und Ziegen in der dritten Laktationswoche (dunkle Säulen) bzw. sechs Wochen nach Trockenstellung (weiße Säulen), jeweils in Relation zur Gruppe der trockenstehenden Tiere ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, jeweils fünf Tiere je Gruppe); ungepaarter t-Test

4.4 Enzyme

Da keine speziesspezifischen Antikörper zur Verfügung standen, wurde lediglich die RNA-Expression des CYP27B1- und CYP24A1-Gens untersucht.

4.4.1 CYP27B1 (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)

Abbildung 4.13 zeigt die RNA-Expression des CYP27B1-Gens in der Niere. Bei beiden Spezies führte die restriktive Calcium-Zufuhr zu einer deutlichen Steigerung der Expression dieses Enzyms auf etwa das zwölffache (Schafe) beziehungsweise achtfache (Ziegen) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Bei adäquat mit Calcium versorgten Tieren verminderte die Calcitriol-Behandlung die Expression der 1α -Hydroxylase in vergleichbarem Umfang um 86% (Schafe) beziehungsweise 82% (Ziegen). Während die Calcitriol-Behandlung bei Calcium-restriktiv gefütterten Schafen zu einer Verminderung der Expressionsraten auf etwa 29% der für die unbehandelten Kontrolltiere ermittelten Werte führte, nahm die CYP27B1-Expression bei den restriktiv mit Calcium versorgten Ziegen infolge der Calcitriol-Behandlung deutlich weniger stark ab und betrug rund 94% im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

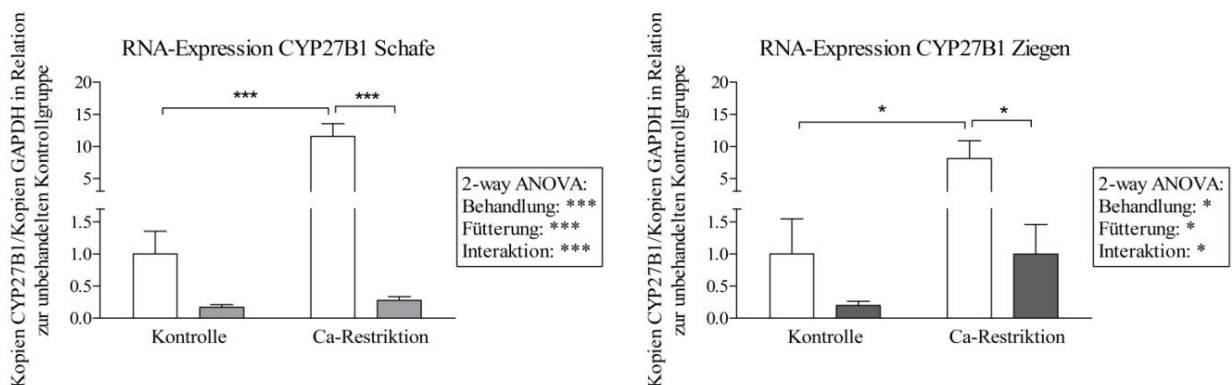


Abbildung 4.13: CYP27B1-Expression (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)

Darstellung der normalisierten RNA-Gehalte von CYP27B1 in der Niere adäquat bzw. restriktiv mit Calcium versorgter Schafe und Ziegen 12 h nach Calcitriol- (dunkle Säulen) bzw. Placeto-Behandlung (weiße Säulen), jeweils in Relation zur unbehandelten Kontrollgruppe ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, jeweils fünf Tiere je Gruppe);

Ergebnisse der 2-way ANOVA: *: $p \leq 0,05$, ***: $p \leq 0,001$

Ergebnisse des Sidak's post-test for multiple comparisons: *: $p \leq 0,05$, ***: $p \leq 0,001$

4.4.2 CYP27B1 (Versuch „Laktation“)

Die RNA-Expression des CYP27B1-Gens in der Niere trockenstehender und laktierender Schafe und Ziegen ist in Abbildung 4.14 dargestellt. Beim Schaf schienen laktierende Individuen mehr CYP27B1-RNA zu exprimieren als trockenstehende Tiere, wobei dieser Unterschied aufgrund großer Streuung insbesondere in der Gruppe der laktierenden Tiere keine Signifikanz besaß. Die CYP27B1- Expression laktierender Ziegen entsprach in etwa der der trockengestellten Tiere.

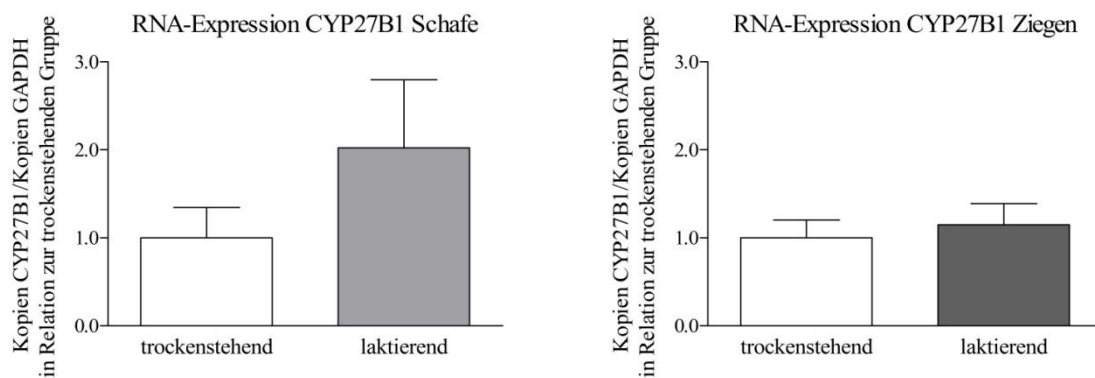


Abbildung 4.14: CYP27B1-Expression (Versuch „Laktation“)

Darstellung der normalisierten RNA-Gehalte von CYP27B1 in der Niere von Schafen und Ziegen in der dritten Laktationswoche (dunkle Säulen) bzw. sechs Wochen nach Trockenstellung (weiße Säulen), jeweils in Relation zur Gruppe der trockenstehenden Tiere ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, jeweils fünf Tiere je Gruppe); ungepaarter t-Test

4.4.3 CYP24A1 (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)

Wie aus Abbildung 4.15 ersichtlich wird, führte die Calcitriol-Behandlung bei beiden Spezies zu einer deutlichen Steigerung der CYP24A1-RNA-Expression. Im Vergleich zu den Tieren der unbehandelten Kontrollgruppe wiesen Calcitriol-behandelte Schafe unabhängig von der Calcium-Zufuhr eine etwa 20-fach erhöhte Expression der 24-Hydroxylase auf. Bei den Ziegen war dieser Behandlungs-Effekt in der Calcium-restriktiv gefütterten Gruppe deutlich schwächer ausgeprägt als bei den adäquat mit Calcium versorgten Tieren: Während bei den erstgenannten die Expression etwa 41-mal höher war als in der unbehandelten Kontrollgruppe, war sie bei letzteren lediglich um den Faktor 14 erhöht, wobei sowohl für den Fütterungs-Effekt als auch für die Interaktion eine statistische Signifikanz nachgewiesen werden konnte. Calcium-restriktiv gefütterte Schafe wiesen zudem eine um etwa 80% höhere CYP24A1-Expression auf als Schafe auf der Kontrolldiät, wohingegen die restriktiv mit Calcium versorgten Ziegen nur rund 20% mehr CYP24A1 exprimierten.

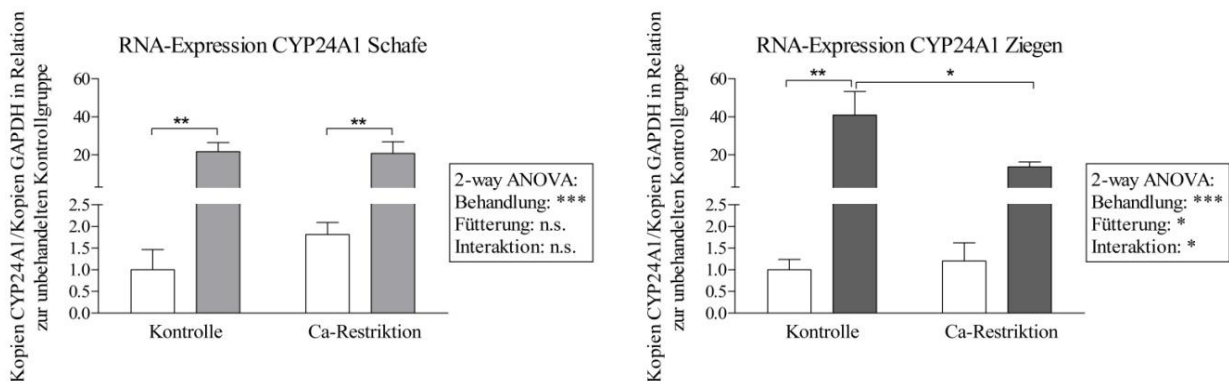


Abbildung 4.15: CYP24A1-Expression (Versuch „Calcium-Restriktion/Calcitriol“)

Darstellung der normalisierten RNA-Gehalte von CYP24A1 in der Niere adäquat bzw. restriktiv mit Calcium versorgter Schafe und Ziegen 12 h nach Calcitriol- (dunkle Säulen) bzw. Placebo-Behandlung (weiße Säulen), jeweils in Relation zur unbehandelten Kontrollgruppe ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, jeweils fünf Tiere je Gruppe);

Ergebnisse der 2-way ANOVA: *: $p \leq 0,05$, ***: $p \leq 0,001$

Ergebnisse des Sidak's post-test for multiple comparisons: *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$

4.4.4 CYP24A1 (Versuch „Laktation“)

Sowohl Schafe als auch Ziegen wiesen in der Laktation eine geringere renale CYP24A1-RNA-Expression auf als trockenstehende Tiere (Abbildung 4.16). Bei den Ziegen lag hier eine statistische Tendenz vor, wohingegen der für die Schafe ermittelte p -Wert knapp über 0,1 lag.

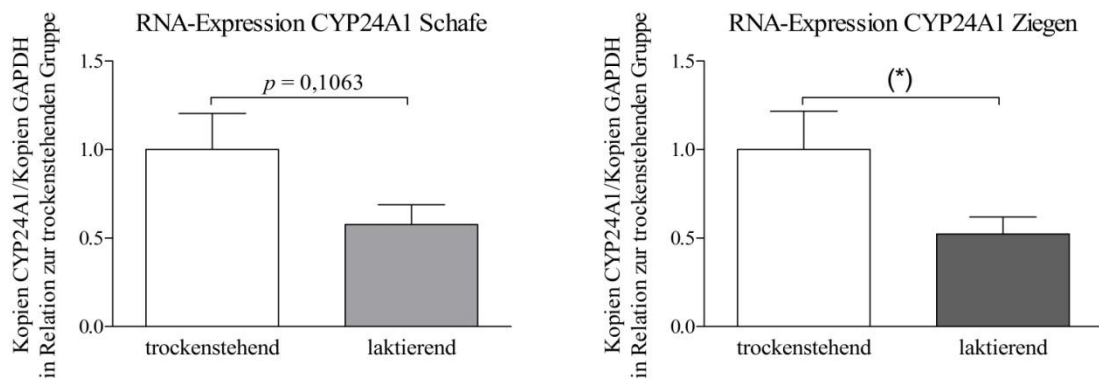


Abbildung 4.16: CYP24A1-Expression (Versuch „Laktation“)

Darstellung der normalisierten RNA-Gehalte von CYP24A1 in der Niere von Schafen und Ziegen in der dritten Laktationswoche (dunkle Säulen) bzw. sechs Wochen nach Trockenstellung (weiße Säulen), jeweils in Relation zur Gruppe der trockenstehenden Tiere ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, jeweils fünf Tiere je Gruppe);

Ergebnisse des ungepaarten t-Tests: (*): $p \leq 0,1$

5. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die Regulation des renalen Calcium-Transports sowie der renalen Calcitriol-Synthese und -Katabolisierung bei Schaf und Ziege mit den für monogastrische Spezies beschriebenen Mechanismen übereinstimmen und ob in dieser Hinsicht Unterschiede zwischen diesen beiden Wiederkäuerspezies existieren. Dazu wurde mit Hilfe molekularbiologischer Methoden die Expression von am renalen Calcium-Transport und Vitamin D-Metabolismus beteiligten Strukturen in Nierengewebe von Schafen und Ziegen untersucht, die im Rahmen verschiedener Versuchsvorhaben im Physiologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover gehalten worden waren. Ein Teil der untersuchten Proben stammte von Tieren, die während eines Tierversuchs restriktiv beziehungsweise adäquat mit Calcium versorgt und/oder mit Calcitriol behandelt worden waren. Zudem wurde Nierengewebe von laktierenden und trockenstehenden Schafen und Ziegen vergleichend untersucht.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen in den Kontext des bisherigen Kenntnisstandes gesetzt und ihre mögliche physiologische Bedeutung diskutiert.

5.1 Beurteilung der angewandten Methoden

5.1.1 *Real Time RT PCR*

Um den Effekt einer alimentären Calcium-Restriktion, einer Calcitriol-Behandlung sowie der Laktation auf die RNA-Expression von am Calcium-Transport und am Vitamin D-Metabolismus beteiligten Strukturen zu untersuchen, wurde die Methode der *Real Time RT PCR* angewandt.

Vor der Umschreibung der RNA in cDNA wurde mit Hilfe photometrischer Untersuchungen zunächst die Reinheit der RNA-Isolate bestimmt. Eingesetzt wurden nur Präparate, bei denen der Quotient aus der bei Durchstrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessenen Extinktion zwischen 1,7 und 2,0 lag. Die Durchführung einer PCR zum Nachweis der Expression von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) im Anschluss an jede Umschreibung diente als deren Erfolgskontrolle.

Zudem wurde GAPDH als interner Standard zur Normalisierung eingesetzt. Wie unter anderem in Versuchen an Ratten (Anderson et al., 2004; Cabiati et al., 2012), aber auch in Studien an Rindern (Lisowski et al., 2008) gezeigt werden konnte, wird das GAPDH-Gen im Nierengewebe verschiedener Individuen in vergleichbarem Umfang exprimiert und ist somit als *Housekeeping Gene* zur Normalisierung geeignet. Ein expressionsstimulierender Effekt der Calcitriol-Behandlung auf die GAPDH-RNA-Expression, wie er in Versuchen an humanen Mammakarzinom-Zellen auftrat (Desprez et al., 1992), wurde in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet.

Im Rahmen der Etablierung neuer *Primer* (PTHr, VDR, CYP24A1, CYP27B1) wurde die Spezifität der gewonnenen Amplifikate durch deren Sequenzierung und den Abgleich der Sequenzen mit den in der Datenbank des NCBI aufgeführten speziesspezifischen Sequenzen überprüft, bevor sie routinemäßig zur Quantifizierung der Transkription eingesetzt wurden. Die Effizienzen der PCR-Assays wurden mit cDNA-Verdünnungsreihen und entsprechenden Standardreihen aus verdünnten, das entsprechende Amplifikat als Insert tragenden Plasmiden getestet. Sie lagen zwischen 90 und 105%.

Um sicherzustellen, dass die im Rahmen der SYBR[®] Green PCR gemessenen Fluoreszenzsignale auf das gesuchte PCR-Produkt zurückzuführen sind, wurde im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

5.1.2 *Western Blot-Analyse*

Die Expression der am renalen Calcium-Transport beteiligten Strukturen sowie des VDR und des PTHr wurde zusätzlich mittels *Western Blot-Analyse* untersucht, um mögliche Effekte der alimentären Calcium-Restriktion, der Calcitriol-Behandlung sowie der Laktation auf die Protein-Expression der entsprechenden Gene feststellen zu können.

Zur Normalisierung wurde das Actin-bindende Protein Villin eingesetzt, das vornehmlich in den Mikrovilli von Epithelzellen des Darms und des proximalen Nieren-Tubulus lokalisiert ist (Rodman et al., 1986). Aufgrund von Problemen bei der Villin-Detektion auf „gestrippten“ Membranen musste bei der Auswertung der PTHr-*Western Blots* auf eine Normalisierung verzichtet werden (siehe Kapitel 4). Stattdessen wurde in diesem Fall sowie im Fall des VDR- und des CaBP_{D28K}-*Western Blots*, für die aufgrund der Verwendung von Zellkern-

beziehungsweise Cytosol-Isolaten keine geeigneten Normalisierungs-Systeme zur Verfügung standen, auf die aufgetragene Proteinmenge normalisiert.

Zum Zweck der Auswertung erfolgte der Vergleich der semiquantitativ bestimmten Werte nur zwischen Proben, die gemeinsam auf ein Gel aufgetragen und später zusammen auf eine Membran transferiert worden waren. Nur unter dieser Bedingung ist eine identische Behandlung der Proben während des *Western Blots* gewährleistet und damit eine Vergleichbarkeit gegeben. Aufgrund der hohen Probenanzahl war es im Rahmen der Untersuchung der Proben aus dem „Calcium-Restriktions-/Calcitriol-Versuch“ nicht möglich, alle Proben zusammen auf ein Gel aufzutragen. Stattdessen wurden hier die Proben jeder einzelnen Versuchsgruppe jeweils mit den Proben der unbehandelten Kontrollgruppe alternierend auf ein Gel aufgetragen. Im Anschluss an die Bestimmung der Optischen Dichte wurden die Werte der verschiedenen Gruppen jeweils zum Mittelwert der für die unbehandelte Kontrollgruppe bestimmten Werte in Relation gesetzt.

5.1.3 Nachweis des VDR in Zellkernisolaten

Grundsätzlich stellt sich die Frage, ob zwecks semiquantitativer Bestimmung des VDR-Protein-Gehalts einer Gewebeprobe die Verwendung von Zellkernisolaten sinnvoll ist, oder ob stattdessen besser Gesamtzell-Lysate oder aus der jeweiligen Probe gewonnene Zellkern- und Cytosol-Fractionen genutzt werden sollten. Tatsächlich belegen die Ergebnisse verschiedener Studien neben einer nukleären auch die cytosolische Lokalisation des VDR. Demnach erfolgt nach Bindung des Calcitriols der Transfer dieser cytoplasmatischen VDR in den Zellkern. So führte beispielsweise die Zerstörung des mikrotubulären Apparates in humanen Monozyten zu einer Blockade der Calcitriol-vermittelten CYP24A1-Induktion (Kamimura et al., 1995). Walters et al. untersuchten bereits 1985 die subzelluläre Lokalisation des VDR in renalen Zellkulturen, indem sie unter anderem den Rezeptor im nukleären und cytoplasmatischen Kompartiment nachwiesen. Dabei zeigte sich, dass sich rund 70% der freien VDR im Cytoplasma befanden, wohingegen in Calcitriol-behandelten Zellen 90% der Hormon-Rezeptor-Komplexe im Zellkern lokalisiert waren (Walters et al., 1986). Später wurden zunehmend Immunfluoreszenz-Techniken zur Untersuchung der intrazellulären Verteilung des VDR genutzt. Auch in diesen Studien zeigte sich oftmals eine Calcitriol-induzierte Umverteilung cytoplasmatischer Rezeptoren in den Nukleus. So hatte die Kultivierung von Fibroblasten in Calcitriol- und Östrogen-freiem Medium eine ausschließlich cytoplasmatische Lokalisation des VDR zur Folge. Eine Zugabe von Calcitriol löste eine

Umverteilung des VDR in den Nukleus aus, wobei ein gewisser Anteil im Cytoplasma verblieb (Barsony et al., 1990). In einer weiterführenden Studie wurden gentechnisch veränderte renale Zellkulturen, die einen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten VDR exprimierten, eingesetzt. Während vor der Calcitriol-Behandlung der Zellkern nur zu etwa 25% zur Gesamtfluoreszenz der Zellen beitrug, stieg der Anteil nach Calcitriol-Gabe auf rund 70% an (Racz u. Barsony, 1999).

Es bleibt also festzuhalten, dass der VDR sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma lokalisiert ist, wobei unter dem Einfluss von Calcitriol der Anteil nukleärer Rezeptoren deutlich zunimmt. Unklar ist, inwieweit die Menge von cytoplasmatischem und nukleären VDR korreliert, ob das Verhältnis der beiden Größen zum Beispiel auch durch den Zellzyklus beeinflusst wird und inwiefern die Modulation der Expressionsrate des VDR von Bedeutung ist. So wäre es denkbar, dass cytoplasmatisch vorliegende Rezeptoren quasi als schnell verfügbare Reserve dienen und eine Anpassung der Expression des Rezeptors erst bei anhaltend hohem Bedarf erfolgt. Hinzu kommt, dass die Ergebnisse von *In-vitro*-Versuchen nicht einfach auf die Vorgänge *in vivo* übertragen werden können. Die Ergebnisse der oben angeführten Studien sprechen jedoch dafür, dass gerade in Situationen eines Calcium-Mangels, unter dem Einfluss eines entsprechend erhöhten Calcitriol-Spiegels, eine vermehrt nukleäre Lokalisation des VDR erwartet werden kann. Demzufolge entspräche der Nachweis des VDR aus Zellkernisolaten eher einer funktionellen Untersuchung, die Unterschiede in der Menge transkriptionell aktiver VDR aufdeckt, als einer Untersuchung der Gesamt-Expression dieses Rezeptors.

5.2 Trans- und parazellulärer Calcium-Transport

5.2.1 Effekte der alimentären Calcium-Restriktion

Weder beim Schaf noch bei der Ziege bewirkte die alimentäre Calcium-Restriktion eine Steigerung der Expression der am renalen Calcium-Transport beteiligten Strukturen. Während bei Calcium-restriktiv gefütterten Mäusen eine signifikante Zunahme der mRNA-Expression des TRPV5- und CaBP_{D28K}-Gens beobachtet werden konnte (Ko et al., 2009), kam es beim kleinen Wiederkäuer infolge der verminderten Calcium-Zufuhr zum Teil sogar zu einer signifikanten Abnahme der RNA- und Protein-Expression von TRPV5, CaBP_{D28K} und auch NCX1. Dies erklärt zunächst einmal, warum es bei keiner der beiden Spezies zu einer Verminderung der Fraktionellen Calcium-Exkretion unter alimentärer Calcium-Restriktion

kam. Andererseits widerspricht diese Art der Reaktion dem von monogastrischen Spezies bekannten Prinzip der Calcitriol-induzierten Expressionssteigerung der renalen Calcium-transportierenden Strukturen. Schließlich waren die Calcitriol-Konzentrationen im Blut der restriktiv mit Calcium versorgten Schafe und Ziegen gegenüber denen der Kontrolltiere signifikant erhöht.

In diesem Zusammenhang muss berücksichtigt werden, dass Wiederkäuer generell sehr wenig Calcium über den Urin ausscheiden. Während Ponys auf eine Reduktion der täglichen Calcium-Zufuhr von 242 mg/kg KGW auf 29 mg/kg KGW mit einer signifikanten Abnahme der renalen Calcium-Exkretion von 33 mg/kg KGW auf 5,5 mg/kg KGW reagierten (Schryver et al., 1970), konnte bei Schafen, die eine Ration mit 275 mg Calcium/kg KGW oder 25 mg Calcium/kg KGW erhielten, kein signifikanter Unterschied in der renalen Calcium-Ausscheidung beobachtet werden. Stattdessen war hier die über den Urin ausgeschiedene Calcium-Menge mit 1,7 mg/kg KGW (hohe Calcium-Zufuhr) und 2,3 mg/kg KGW (niedrige Calcium-Zufuhr) in beiden Fällen sehr gering (Braithwaite, 1975). Man könnte daraus schlussfolgern, dass die renalen Calcium-Resorptionsmechanismen beim Wiederkäuer ständig auf gleichbleibend hohem Niveau aktiv sind und eine weitere, Calcitriol-vermittelte Steigerung der Resorptionsrate in Calcium-Mangelsituationen grundsätzlich nicht möglich ist.

Es stellt sich jedoch die Frage, warum die Expression der am Calcium-Transport beteiligten Strukturen unter Calcium-Restriktion sogar abnahm. Denkbar ist, dass beim Wiederkäuer in dieser Situation insbesondere die weiter proximal gelegenen Tubulusabschnitte zur Kompensation des Calcium-Mangels beitragen. Dies würde erklären, warum die Fraktionelle Calcium-Exkretion bei den Ziegen und Schafen trotz verminderter Expression der Calcium-Transporter nicht anstieg (Wilkens et al., 2010, 2012). In Versuchen an Mäusen wurde gezeigt, dass eine Abnahme der renalen Calcium-Ausscheidung unabhängig von einer Steigerung der aktiven Calcium-Resorption im distalen Nephron auftreten kann. Bei diesen Tieren konnte trotz unveränderter Expressionsdichte des TRPV5 und CaBP_{D28K} eine Verminderung der Fraktionellen Calcium-Exkretion beobachtet werden, die offenbar auf eine Erhöhung der Calcium-Resorptionsrate in proximal gelegenen Nephronsegmenten zurückzuführen war. Der möglicherweise Calcitonin-vermittelte Effekt betraf zudem auch TRPV5-*Knockout*-Mäuse, so dass eine bloße Erhöhung der Transportrate im distalen Nephron keine Erklärung für die beobachtete Abnahme der Fraktionellen Calcium-Exkretion darstellt (Hsu et al., 2010).

Diskussion

Eine solche Steigerung der Calcium-Resorption in weiter proximal gelegenen Nephronabschnitten könnte auf verschiedene Mechanismen zurückgeführt werden. Insbesondere die Calcium-Resorption im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife (TAL: *Thick Ascending Limb*) wird durch eine Vielzahl verschiedener Faktoren reguliert und an den aktuellen Calcium-Bedarf angepasst.

Gemäß der klassischen Theorie wird die parazellulär und passiv erfolgende Resorption im TAL allein durch die Höhe des lumenpositiven Potenzials beeinflusst. Dabei spielen insbesondere die Expression und Aktivität des apikal lokalisierten NKCC2 (Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter 2), des apikalen Kalium-Kanals ROMK (*Renal Outer Medullary Potassium Channel*) und der basolateral exprimierten Natrium-Kalium-ATPase eine entscheidende Rolle. So hat eine Steigerung der Kalium-, Natrium- und Chlorid-Aufnahme über den NKCC2 in die Zelle auch eine vermehrte Ausschleusung des Kaliums in das Tubuluslumen (ROMK) und des Chlorids in den Extrazellulärraum zur Folge. Der daraus resultierende Anstieg des lumenpositiven Potenzials steigert die parazelluläre Calcium-Resorption in diesem Bereich des Nephrons (Miller, 2013). Dementsprechend sollte eine über diesen Mechanismus ausgelöste Änderung der renalen Calcium-Exkretion – zumindest theoretisch – auch von einer gleichgerichteten Änderung der Natrium- und Chlorid-Exkretion begleitet werden. Ratten reagierten zum Beispiel auf eine Vitamin D-induzierte Hypercalcämie mit einer verminderten Expression des NKCC2, der Natrium-Kalium-ATPase sowie einer Zunahme der Fraktionellen Calcium- und Natrium-Exkretion (Wang et al., 2002). Da eine Aktivierung des CaSR (*Calcium Sensing Receptor*) durch hohe Calcium-Konzentrationen in der Extrazellulärflüssigkeit eine Inhibition des NKCC2, des ROMK und der Natrium-Kalium-ATPase bewirkt (Gamba u. Friedman, 2009), führt dies zu einer Verminderung der passiven Calcium-Resorption im TAL. Folglich kann im umgekehrten Fall eine verminderte Calcium-Konzentration in der Extrazellulärflüssigkeit zur Steigerung der Calcium-Resorption beitragen. Darüber hinaus bedingt eine Abnahme des Calcium-Spiegels eine Zunahme der PTH-Sekretion (Brown u. MacLeod, 2001). Weil PTH über eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration die Aktivität des NKCC2 und ROMK steigert und so das lumenpositive Potenzial erhöht (Gamba u. Friedman, 2009), wird auch über diesen Weg die Calcium-Resorption stimuliert.

Neuere Studien belegen allerdings, dass neben der Höhe des lumenpositiven Potenzials auch die Calcium-Permeabilität der *Tight Junctions* die Effizienz der parazellulären Calcium-

Diskussion

Resorption im TAL beeinflusst. Diese variiert unter anderem in Abhängigkeit vom Expressionsmuster verschiedener Claudine, auf das offenbar wiederum der Calcium-Spiegel und der CaSR Einfluss nehmen. So reagierten Mäuse, die keinen renalen CaSR exprimierten, auf eine hohe Calcium-Zufuhr mit einer im Vergleich zu Kontrolltieren deutlich geringeren Calcium-Exkretion über den Urin. Neben einer etwa vierfach erhöhten NKCC2-Expression fielen dabei eine im Vergleich zum Wildtyp höhere Claudin 16-Expression sowie eine verminderte Claudin 14-Expression auf. Während Claudin 16 für divalente Kationen permeable Poren im Bereich der *Tight Junctions* ausbildet, reduziert die Claudin 14-Expression die Calcium-Permeabilität in diesem Bereich (Toka et al., 2012).

Darüber hinaus weisen einige Studien auf die Existenz eines PTH-abhängigen, aktiven, transzellulären Calcium-Transportes im kortikalen TAL hin (Dai u. Quamme, 1994; Suki et al., 1980). Welche Strukturen an diesem transzellulären, PTH-abhängigen Transport beteiligt sind, ist noch unklar. Womöglich wird die apikale Calcium-Aufnahme aber durch eine PTH-induzierte Insertion Dihydropyridin-sensitiver Calcium-Kanäle in die luminal Membran des kortikalen TAL gefördert, wie sie in *In-vitro*-Versuchen an Nierenzellen der Maus beobachtet wurde (Bacskai u. Friedman, 1990). Darüber hinaus weisen die Ergebnisse einer Studie, die die basolateralen Transportprozesse im TAL des Kaninchen untersuchte, darauf hin, dass die Calcium-Ausschleusung in diesem Nephronabschnitt eher durch eine primär aktive Calcium-ATPase als über einen Natrium-Calcium-Austauscher vermittelt wird (Hanaoka et al., 1993). Offenbar unterliegt dieser PTH-abhängige transzelluläre Calcium-Transport jedoch ebenfalls einer zusätzlichen Regulation durch den CaSR. In funktionellen Untersuchungen an isolierten kortikalen TAL von Mäusen verdoppelte sich die Calcium-Resorptionsrate nach Zugabe von PTH, wobei weder die Natrium-Resorptionsrate noch die transepitheliale Potenzialdifferenz beeinflusst wurden. Eine Aktivierung des CaSR über verschiedene Calcimimetika inhibierte diesen PTH-Effekt, wiederum ohne eine Änderung der Potenzialdifferenz oder der Natrium-Transportrate zu bewirken (Motoyama u. Friedman, 2002).

Um zu überprüfen, ob bei den Ziegen und Schafen eine kompensatorische Steigerung der Calcium-Resorption im TAL zur Konstanthaltung der Fraktionellen Exkretion beigetragen haben könnte, wäre die Untersuchung der Expression des NKCC2, des ROMK, der Natrium-Kalium-ATPase und gegebenenfalls der Claudine 14 und 16 im Nierengewebe hilfreich. Daneben könnten die Bestimmung des Natrium- und Chlorid-Gehalts im Urin der Tiere und der Vergleich dieser Werte mit dem Calcium-Gehalt des Urins wichtige Hinweise darauf

Diskussion

liefern, ob ein möglicher Effekt auf eine Änderung der Natrium-, Kalium- und Chlorid-Transportprozesse zurückzuführen ist.

Unter der Annahme, dass die Calcium-Resorptionsprozesse in der Niere der Schafe und Ziegen tatsächlich vom distalen Tubulus in den TAL verlagert wurden, ist davon auszugehen, dass dies eine Abnahme der luminalen Calcium-Konzentration in den weiter distal gelegenen Nephronabschnitten zur Folge hatte. Möglicherweise stellte diese Abnahme der Calcium-Konzentration in der Tubulusflüssigkeit auch die Ursache für die Verminderung der TRPV5-, CaBP_{D28K}- und/oder NCX1-Expression im distalen Nephron der Ziegen und Schafe dar. Immunhistochemischen Untersuchungen zu Folge ist der CaSR im distalen Tubulus contortus und im Verbindungsstück – anders als im TAL – in der apikalen Membran der Tubulusepithelien lokalisiert. Eine Aktivierung des Rezeptors hatte in *In-vitro*-Versuchen eine Zunahme des Calcium-Einstroms über den TRPV5-Kanal zur Folge, wobei dieser Effekt über eine Aktivierung der Proteinkinase C und nachfolgende Phosphorylierung des Kanals vermittelt wurde. Offenbar verhindert diese die konstitutive Internalisierung des Kanals (Cha et al., 2008; Topala et al., 2009). Dies spricht dafür, dass die TRPV5-Dichte in der Membran und folglich die Calcium-Resorption im distalen Nephron mit abnehmender Calcium-Konzentration der Tubulusflüssigkeit vermindert und auf diese Weise an den aktuellen Bedarf angepasst wird. Wie Versuche an Nierenzellkulturen vom Kaninchen zeigen konnten, bewirkt eine Blockade des Calcium-Einstroms durch den Calcium-Kanal-Blocker „Ruthenium Red“ zudem eine signifikante Abnahme der CaBP_{D28K}- und NCX1-mRNA-Expression im distalen Nephron, was die Autoren zu der Annahme bewegte, die Expression dieser beiden Strukturen würde durch die über den TRPV5-Kanal aufgenommene Calcium-Menge moduliert (van Abel et al., 2005). Darauf weisen auch die Ergebnisse von Expressionsstudien hin, die an Calcium-restriktiv gefütterten TRPV5-*Knockout*-Mäusen durchgeführt wurden. In der Niere dieser Tiere konnte trotz signifikant erhöhter PTH- und Calcitriol-Spiegel eine signifikante Verminderung der CaBP_{D28K}-Expression beobachtet werden (Gkika et al., 2006). In einer anderen Studie an TRPV5-*Knockout*-Mäusen wurden neben eines stark erhöhten Calcitriol-Spiegels eine signifikante Abnahme sowohl der CaBP_{D28K}- als auch der NCX1-Expression festgestellt (Renkema et al., 2005). In Anbetracht dieser Beobachtungen erscheint es nicht unwahrscheinlich, dass bei den untersuchten Ziegen und Schafen die infolge der nach proximal verlagerten Calcium-Resorption verminderte Calcium-Konzentration im distalen Nephron zur Abnahme der TRPV5- und somit auch der CaBP_{D28K}- und NCX1-Expression beigetragen haben könnte. Dass hier womöglich die luminal Calcium-Konzentration und

nicht etwa der Calcium-Plasmaspiegel den entscheidenden Faktor darstellt, würde zudem erklären, warum die Abnahme der Expression auch bei den Ziegen beobachtet werden konnte, die ja trotz alimentärer Calcium-Restriktion keine Hypocalcämie entwickelten.

5.2.2 Effekte der Calcitriol-Behandlung

Gegen die Hypothese von der nicht durch Calcitriol regulierbaren aktiven Calcium-Resorption im distalen Nephron sprechen die beobachteten expressionsstimulierenden Effekte der Calcitriol-Behandlung. So exprimierten Calcitriol-behandelte Schafe und Ziegen unter anderem signifikant mehr TRPV5-RNA. Bei den Ziegen wurde zudem eine signifikante Steigerung der NCX1-RNA-Expression infolge der Calcitriol-Behandlung beobachtet. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die exogene Zufuhr des Vitamin D-Metaboliten einen Anstieg des Calcitriol-Spiegels um etwa das 100-fache und somit auf deutlich supraphysiologisches Niveau bewirkte (Wilkens et al., 2010, 2012). Anscheinend stellte hier die Höhe des Spiegels den entscheidenden Unterschied dar. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass daneben auch der Calcitriol-induzierte Anstieg der Calcium-Plasmaspiegel (Wilkens et al., 2010, 2012) über eine Erhöhung der luminalen Calcium-Konzentration im distalen Nephron zu einer Expressionssteigerung beigetragen hat. Zumindest die CaBP_{D28K}- und NCX1-mRNA-Expression wird offenbar auch durch die lokale Calcium-Konzentration moduliert (siehe Kapitel 5.2.1).

Die Ergebnisse des CaBP_{D28K}-*Western Blots* zeigten keinen signifikanten Effekt der Calcitriol-Behandlung. Auf RNA-Ebene fiel jedoch auf, dass die Calcitriol-Behandlung die durch die Diät verringerten Expressionsraten Calcium-restriktiv gefütterter Tiere (Kapitel 5.2.1) in etwa auf das Niveau der Kontrollgruppe steigern konnte. Dies könnte wiederum in Zusammenhang mit einem Anstieg der Calcium-Spiegel stehen, der bei beiden Spezies im Anschluss an die Calcitriol-Gabe beobachtet werden konnte (Wilkens et al., 2010, 2012). Es stellt sich jedoch die Frage, warum dieser Effekt nur bei Calcium-restriktiv gefütterten Tieren auftrat. Vor diesem Hintergrund sind die Ergebnisse von Untersuchungen an CYP27B1-Knockout-Mäusen von besonderem Interesse. Bei diesen Tieren, die unter einer Calcium- und Calcitriol-Defizienz litten, führte allein die Aufnahme eines Futters mit hohem Calcium-Gehalt zu einer signifikanten Steigerung der am renalen Calcium-Transport beteiligten Strukturen. Bei heterozygoten Deletionsmutanten, die weder eine Hypocalcämie noch eine Calcitriol-Defizienz aufwiesen, bedingte die gleiche Diät jedoch eine Abnahme der Expression dieser Transporter (Hoenderop et al., 2002). Angesichts dieser Beobachtung ergibt

Diskussion

sich die Frage, warum auch die Calcium-restriktiv gefütterten Ziegen, die normocalcämisch waren und deren Calcitriol-Spiegel deutlich stärker angestiegen waren als die der Schafe, mit einer Erhöhung der CaBP_{D28K}-RNA-Expression auf die Calcitriol-Behandlung reagierten. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass auch in diesem Fall die Höhe der Calcium-Konzentration im Lumen und den Epithelien des distalen Tubulus den ausschlaggebenden Faktor darstellte. Unter der Annahme, dass bei den Calcium-restriktiv gefütterten Ziegen und Schafen eine Verlagerung der Calcium-Resorption aus dem distalen Tubulus in weiter proximal gelegene Segmente stattgefunden hatte, sollte die Calcium-Konzentration im distalen Nephron bei beiden Spezies vermindert sein. Enomoto et al. (1992) beobachteten jedenfalls im Rahmen von *In-vitro*-Studien, dass die Calcium-Konzentration im Medium nicht nur die Calcitriol-induzierte CaBP_{D28K}-mRNA-Expression modulierte, sondern auch die basale mRNA-Expression des Gens beeinflusste. Dieser direkte, offenbar Calcitriol-unabhängige Effekt der Calcium-Konzentration auf die Calbindin-Expression könnte über ein CaRE (*Calcium Responsive Element*) vermittelt worden sein, welches bislang jedoch ausschließlich im CaBP_{D28K}-Gen humaner Purkinje-Zellen nachgewiesen wurde (Arnold u. Heintz, 1997).

Dass ein stimulierender Effekt der Calcitriol-Behandlung auf die TRPV5-, CaBP_{D28K}- und NCX1-RNA-Expression in keinem einzigen der Fälle auch auf Protein-Ebene beobachtet werden konnte, ist wahrscheinlich auf die Kürze des Zeitintervalls zwischen Behandlung und Tötung der Schafe und Ziegen zurückzuführen. Während beispielsweise die renale TRPV5-mRNA-Expression bei Mäusen bereits 3 h nach einer Calcitriol-Behandlung signifikant erhöht und nach 9 h weiter angestiegen war (Okano et al., 2004) und auch in einem weiteren Versuch die mRNA-Expressionsraten Calcitriol-regulierter Gene (unter anderem CYP24A1 und TRPV6) in der Niere innerhalb von 3 bis 9 h nach der Calcitriol-Behandlung auf Maximalwerte angestiegen waren, erreichte die TRPV6-Protein-Expression erst nach etwa 24 h den Höchstwert (Chow et al., 2013). Im Nierengewebe Calcitriol-behandelter Mäuse war selbst der mRNA-Gehalt des CaBP_{D28K}-Gens erst 24 h nach der Behandlung auf Maximalniveau angestiegen (Song et al., 2003). Die CaBP_{D28K}-Protein-Expression im Duodenum Vitamin-D-defizienter Hühner stieg zudem innerhalb von 24 h nach Vitamin D₃-Gabe im Vergleich zur mRNA-Expression des Gens weniger als halb so stark an (Fullmer, 1990).

5.2.3 Effekte der Laktation

Laktierende Schafe und Ziegen zeigten im Vergleich zu trockenstehenden Tieren keine Steigerung der Expression renaler Calcium-transportierender Strukturen. Während Mäuse auf diese Belastung des Calcium-Haushalts mit einer signifikanten Zunahme der TRPV5- und CaBP_{D28K}-mRNA-Expression in der Niere reagierten (van Cromphaut et al., 2003), konnte bei den untersuchten Ziegen und Schafen, ähnlich wie unter alimentärer Calcium-Restriktion, zum Teil sogar eine Abnahme der TRPV5-, CaBP_{D28K}- und NCX1-Expression beobachtet werden. Angesichts der bei laktierenden Schafen und Rindern beobachteten Verminderung der renalen Calcium-Exkretion (Braithwaite et al., 1969; Ulutaş et al., 2003) überraschen diese Ergebnisse. Hier stellt sich die Frage, ob es in der Laktation womöglich zu einer starken Steigerung der Calcium-Resorption in weiter proximal gelegenen Tubulusabschnitten gekommen ist, die eine Abnahme der Calcium-Resorption im distalen Nephron kompensieren konnte. Dafür spricht auch, dass die Calcium-Creatinin-Ratio im Harn laktierender Ziegen und Schafe nicht höher war als bei trockenstehenden beziehungsweise tragenden Tieren (Wilkens, unveröffentlichte Daten).

Grundsätzlich ist zu bedenken, dass während der Laktation zusätzliche Hormone in die Regulation des Calcium-Haushalts eingreifen, welche beim nicht laktierenden Tier keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen. Dass in dieser Situation beispielsweise die Höhe des Calcitriol-Spiegels nicht immer den ausschlaggebenden Faktor für die Regulation der renalen Calcium-Exkretion darstellen muss, zeigen auch die Ergebnisse des oben aufgeführten Versuchs, in dem unter anderem die Expression intestinaler und renaler Calcium-transportierender Strukturen bei laktierenden VDR-*Knockout*- und Wildtyp-Mäusen untersucht wurde. Dabei konnte eine signifikante Steigerung der TRPV5- und CaBP_{D28K}-Expression in der Niere der Wildtyp-Mäuse gezeigt werden. Die Calcitriol-Spiegel dieser Tiere waren jedoch nicht erhöht (van Cromphaut et al., 2003). Interessanterweise wurde beim Schaf in einem Zeitraum von zehn Tagen vor bis zehn Tagen nach dem Ablammen keine Änderung der Calcitriol-Plasmaspiegel beobachtet (Wilkens et al., 2014). Die Calcitriol-Konzentrationen im Blut der trächtigen und laktierenden Schafe unterschieden sich zudem nicht von den bei trockenstehenden Tieren gemessenen Konzentrationen (Richter, 2013). Auch Paulson und Langman (1990) konnten bei Schafen keine Erhöhung der Calcitriol-Spiegel in der Trächtigkeit feststellen. Dies weist darauf hin, dass womöglich andere Botenstoffe für die Vermittlung einer laktationsassoziierten Resorptionssteigerung in der Niere verantwortlich sind.

Diskussion

Folglich stellt sich die Frage, welche weiteren Faktoren speziell in der Laktation eine Verlagerung der Calcium-Resorption aus dem distalen Tubulus in weiter proximal gelegene Nephronabschnitte induzieren könnten.

Ein Hormon, dessen Spiegel auch beim Wiederkäuer mit dem Einsetzen der Laktation deutlich ansteigen, ist das Prolaktin. Durch das Saugen des Jungtiers beziehungsweise den Melkvorgang wird ein zusätzlicher, kurzfristiger Anstieg der Prolaktin-Konzentration im Blut induziert, wie unter anderem Untersuchungen an Rindern und Ziegen belegen (Hart, 1974; Johke, 1969, 1970). In Versuchen an Ratten konnte gezeigt werden, dass das Peptidhormon die renale Calcium-Ausscheidung vermindert (Lotinun et al., 1998). Während die Prolaktin-Effekte auf die intestinale Calcium-Absorption auch auf funktioneller und molekularbiologischer Ebene untersucht wurden, fehlen bislang Studien, die den Mechanismus der Prolaktin-induzierten Exkretions-Verminderung in der Niere untersuchen. Im Darm konnte jedoch, neben einer Stimulation der Expression am Calcium-Transport beteiligter Strukturen (Ajibade et al., 2010; Wongdee u. Charoenphandhu, 2013), in *In-vitro*-Versuchen auch eine innerhalb kurzer Zeit erfolgende, Calcitriol-unabhängige Steigerung der Calcium-Absorption beobachtet werden, welche offenbar über eine Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden vermittelt wird. Die Erhöhung der Calcium-Absorptionsrate resultierte dabei aus einer Zunahme des transzellulären und des parazellulären Calcium-Transports. Während erstere offenbar auf eine vermehrte Calcium-Aufnahme über einen spannungsabhängigen Calcium-Kanal zurückzuführen ist, wird die parazelluläre Absorptionsrate über eine Erhöhung der Kationen-Permeabilität der *Tight Junctions* gesteigert (Jantarajit et al., 2007; Thongon et al., 2008, 2009). Der Prolaktinrezeptor wird auch in der Niere exprimiert, wie unter anderen Untersuchungen von renalem Gewebe der Ratte und des Kaninchens zeigen (Dusanter-Fourt et al., 1991; Nagano u. Kelly, 1994). Es ist somit nicht auszuschließen, dass Prolaktin den trans- und parazellulären Calcium-Transport in der Niere über ähnliche Mechanismen steigert.

Ein weiteres Hormon, das ähnlich wie Prolaktin in der Laktation an Bedeutung gewinnt, ist das PTHrP (*Parathormone Related Peptide*). Das Peptidhormon bindet an den gleichen Rezeptor wie PTH; seine Sekretion wird jedoch – anders als die von PTH – nicht durch einen Anstieg der Calcium-Konzentration im Blut gehemmt (Friedman u. Gesek, 1995; Kovacs u. Kronenberg, 1997). Prolaktin selbst induziert die PTHrP-Expression in der Brustdrüse (Thiede, 1989). Bei der laktierenden Ziege wurde im Bereich des Euters ein signifikanter

Diskussion

venös-arterieller PTHrP-Konzentrationsgradient beobachtet. Dies spricht dafür, dass das im Blut zirkulierende PTHrP, dessen Konzentration peripartal Höchstwerte erreichte, aus der Milchdrüse der Tiere stammte. Eine Behandlung der Ziegen mit dem Prolaktin-Antagonisten Bromocriptin bedingte eine Abnahme der venösen PTHrP-Spiegel, was zudem die Funktion des Prolaktins als Induktor der PTHrP-Sekretion unterstreicht (Ratcliffe et al., 1992). Horwitz et al. konnten zeigen, dass PTHrP beim Menschen die von PTH bekannten Effekte vermittelt. So bewirkte die Infusion von PTHrP unter anderem eine Verminderung der Fraktionellen Calcium-Exkretion von 6,5% auf etwa 3,5% (Horwitz et al., 2003). Dass bei thyroparathyroidektomierten Ratten durch Behandlung mit PTHrP ein ähnlich starker Anstieg der renalen cAMP-Exkretion erreicht werden konnte wie durch die Behandlung mit PTH, spricht für einen identischen Wirkmechanismus von PTHrP und PTH (Yates et al., 1988). Bei laktierenden Ratten kam es nach dem Säugen der Jungen zu einem Anstieg der renalen cAMP-Exkretion, wobei dieser Effekt auch bei thyroparathyroidektomierten Tieren beobachtet werden konnte (Yamamoto et al., 1991). Dies legt die Vermutung nahe, dass PTHrP, und nicht PTH, beim laktierenden Individuum über eine Steigerung der Calcium-Resorption im TAL zu einer Verminderung der renalen Calcium-Ausscheidung beiträgt.

Es existieren also durchaus Hormone, die bei den laktierenden Schafen und Ziegen zu einer grundlegenden Steigerung der Calcium-Resorption in proximal des distalen Tubulus gelegenen Nephronabschnitten beigetragen haben könnten. Da die entsprechenden Transportmechanismen – insbesondere die am transzellulären Calcium-Transport im TAL beteiligten Strukturen – aber noch unbekannt sind, würden nur funktionelle Untersuchungen, idealerweise an isolierten Nephronsegmenten, Aufschluss darüber geben, inwieweit Prolaktin und PTHrP eine Zunahme der Calcium-Resorption, beispielsweise im TAL, bewirken. In diesem Zusammenhang wäre außerdem eine Bestimmung der Prolaktin- und PTHrP-Konzentrationen im Blut sowie der Calcium- und cAMP-Konzentrationen im Urin der Tiere im Zeitverlauf hilfreich, um Hinweise auf mögliche Effekte der Botenstoffe auf die renale Calcium-Exkretion zu erhalten. Im Rahmen einer Bilanzstudie an Rindern wurde beispielsweise mit Einsetzen der Laktation neben einer signifikanten Abnahme der Fraktionellen Calcium-Exkretion eine signifikante Zunahme der Fraktionellen Natrium- und Chlorid-Exkretion beobachtet (Ulutaş et al., 2003). Somit scheint – zumindest in diesem Fall – die Steigerung der Calcium-Resorption unabhängig von einer Zunahme der Natrium-, Kalium- und Chlorid-Resorption im TAL erfolgt zu sein (siehe auch Kapitel 5.2.1.).

Diskussion

Dass die Expression Calcium-transportierender Strukturen im Nierengewebe laktierender Schafe und Ziegen zum Teil vermindert, ihre renale Calcium-Exkretion jedoch nicht erhöht war, spricht also für eine Verlagerung der Calcium-Resorption aus dem distalen Tubulus in proximal gelegenen Nephronabschnitte. Auffällig war, dass bei der Ziege, anders als beim Schaf, die Anzahl der Amplifivate von TRPV5, CaBP_{D28K} und NCX1 in der Niere laktierender Individuen in allen drei Fällen signifikant vermindert war. In diesem Zusammenhang stellt sich zunächst die Frage, ob Unterschiede in der Milchleistung der Schafe und Ziegen diesen Speziesunterschied erklären können. Zumindest ein daraus resultierendes größeres Calcium-Defizit der Ziegen kann als Ursache mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden: Zwar war zum Zeitpunkt der Tötung die täglich ermolkene Milchmenge bei den Ziegen etwa doppelt so hoch wie bei den Schafen (Wilkens et al., 2014), so dass man eine entsprechend stärkere Belastung des Calcium-Haushalts vermuten könnte. Diese stärkere Belastung könnte sich wiederum in einem Expressionsmuster widerspiegelt haben, wie es unter alimentärer Calcium-Restriktion beobachtet wurde. Jedoch war im Rahmen des Tierversuches versucht worden, derartige Unterschiede in der Beanspruchung des Calcium-Stoffwechsels durch eine genau an die individuelle Milchleistung angepasste Kraftfutter-Rationierung auszugleichen. Es ist natürlich möglich, dass Kompensationsmechanismen, die mit Einsetzen der Laktation aktiviert wurden, erst nach einer längeren Adaptationsphase einen vollständigen Ausgleich eines Calcium-Mangels ermöglichen. So ist für Milchkühe beschrieben, dass erst sechs bis acht Wochen nach der Geburt, mit Zunahme der Futteraufnahme-Kapazität und Steigerung intestinaler Absorptionsmechanismen, die Calcium-Homöostase wiederhergestellt ist (Baldwin et al., 2004; Horst et al., 2005). Auch Schafe erreichten frühestens in der fünften Laktationswoche eine positive Calcium-Bilanz (Braithwaite et al., 1969). So könnten die Ziegen trotz bedarfsdeckender Fütterung zu wenig Calcium aufgenommen haben. Dagegen spricht, dass die Calcium- und Calcitriol-Spiegel im Blut der Ziegen sowie die Osteocalcin-Crosslaps-Ratio sich bereits zehn Tage nach dem Ablammen normalisierten (Wilkens et al., 2014), so dass davon auszugehen ist, dass zu diesem Zeitpunkt eine Kompensation des Calcium-Mangels bereits erfolgt war. Nicht auszuschließen ist hingegen, dass die höhere Milchleistung der Ziegen – wie bei Rindern (Kensinger et al., 1979; Mollett u. Malven, 1982) – mit einem höheren Prolaktin-Spiegel assoziiert war. Eine verhältnismäßig stärkere Zunahme der Calcium-Resorption in proximal gelegenen Tubulusabschnitten könnte zu einer stärkeren Abnahme der Expression Calcium-transportierender Strukturen im distalen Nephron geführt haben (siehe Kapitel 5.2.1).

Theoretisch könnte auch die Fütterung der Tiere die Ursache für den Speziesunterschied in der TRPV5-, CaBP_{D28K}- und NCX1-Expression darstellen. Aufgrund der etwa doppelt so hohen Milchleistung erhielten die Ziegen auch die doppelte Menge an Kraftfutter. In einem Fütterungsversuch an Schafen wurde beobachtet, dass die Tiere auf die Gabe hoher Kraftfuttermengen mit einem Abfall des Bikarbonat-Spiegels und einer erhöhten Ausscheidung von Laktat und Calcium über den Urin reagierten (Huntington et al., 1981). In Versuchen an Mäusen konnte zudem gezeigt werden, dass die nach Induktion einer metabolischen Azidose beobachtete erhöhte Calcium-Ausscheidung über den Urin auf eine signifikante Verminderung der TRPV5- und CaBP_{D28K}-mRNA- und Protein-Expression in der Niere zurückzuführen ist (Nijenhuis et al., 2006). Die im Vergleich zum Schaf stärkere Verminderung der Expression Calcium-transportierender Strukturen in der Niere der Ziege könnte jedoch auch das Resultat einer aufgrund der Azidose verhältnismäßig stärkeren Zunahme der parazellulären Calcium-Resorption im TAL darstellen. So ist die NKCC2-Expression in der Niere unter azidotischen Bedingungen erhöht (Attmane-Elakeb et al., 1998; Karim et al., 2003). Womöglich erlaubt dies eine stärkere Verminderung der TRPV5-, CaBP_{D28K}- und NCX1-Expression im distalen Nephron der Ziegen (siehe auch Kapitel 5.2.1).

5.3 Phosphat-Resorption

Die renale Phosphat-Exkretion kann durch eine PTH-induzierte Internalisierung des NaPi2a-Transporters sehr schnell gesteigert werden (Lanzano et al., 2011). Lange Zeit stand diese kurzfristige, nicht-genomische Regulation des Natrium-Phosphat-Cotransporters im Vordergrund, wenn es um die wissenschaftliche Untersuchung der renalen Phosphat-Ausscheidung ging. Tatsächlich zeigen neuere Studien, dass auch die Expression des NaPi2a-Gens einer Regulation unterliegt (Friedlaender et al., 2001; Moe et al., 2011; Murray et al., 2013b) und offenbar insbesondere in Situationen eines anhaltenden Calcium-Mangels an Bedeutung gewinnt (Dranitzki Elhalel et al., 2004).

5.3.1 Effekte der alimentären Calcium-Restriktion

Die alimentäre Calcium-Restriktion hatte keinen hemmenden Einfluss auf die renale NaPi2a-RNA-Expression der Schafe und Ziegen. Dies erklärt, warum es trotz restriktiver Calcium-Zufuhr nicht zu einer Zunahme der Fraktionellen Phosphat-Exkretion kam (Wilkins et al., 2010, 2012). Beim Schaf konnte zudem neben einem signifikanten Abfall der Calcium-

Plasmaspiegel auch ein signifikanter Anstieg der Phosphat-Spiegel festgestellt werden (Wilkens et al., 2010). Diese Beobachtungen sprechen gegen eine ausschließlich posttranskriptionelle Regulation, die alternativ zu einer Steigerung der Phosphat-Exkretion hätte beitragen können. Vielleicht bestand – insbesondere beim Schaf, das unter restriktiver Calcium-Zufuhr eine Hypocalcämie entwickelte – ein Zusammenhang mit einem relativen Calcitriol-Mangel. Denn anders als im Darm scheint Calcitriol in der Niere die Phosphat-Aufnahme über Natrium-Phosphat-Cotransporter zu hemmen. So konnten Friedlaender et al. (2001) eine signifikante Abnahme der renalen NaPi2a-mRNA- und -Protein-Expression bei parathyroidektomierten Ratten beobachten, nachdem diese eine Woche lang Calcitriol über eine osmotische Minipumpe erhalten hatten. Möglicherweise reagieren Wiederkäuer aber auch generell nicht mit einer Anpassung der renalen Phosphat-Exkretion auf eine alimentäre Calcium-Restriktion. So unterschied sich die renale Phosphat-Ausscheidung zwischen Schafen, die täglich rund 275 mg Calcium pro kg KGW erhalten hatten und Schafen, die mit etwa 25 mg pro kg KGW deutlich weniger Calcium aufnehmen konnten, nicht signifikant (Braithwaite, 1975). Die renale Phosphat-Exkretion laktierender Milchkühe wurde durch die Reduktion des Calcium-Gehalts im Futter von 1,1% auf 0,45% nicht beeinflusst (Taylor et al., 2009). Auch bei nicht laktierenden, im letzten Trächtigkeitsdrittel tragenden Milchkühen konnte durch eine Verminderung der Calcium-Zufuhr von 32 g auf 16 g pro Tag keine Änderung der über den Urin ausgeschiedenen Phosphat-Menge erreicht werden (Martz et al., 1999).

5.3.2 Effekte der Calcitriol-Behandlung

Bei den Ziegen bewirkte die Calcitriol-Behandlung eine tendenzielle Verminderung der NaPi2a-RNA-Expression in der Niere. Wie bereits beschrieben, reagierten parathyroidektomierte Ratten auf eine einwöchige Calcitriol-Behandlung ebenfalls mit einer signifikanten Abnahme der NaPi2a-mRNA-Expression. Dass dieser Effekt nur bei der Ziege beobachtet werden konnte, ist vielleicht auf eine höhere PTH-Sensitivität dieser Spezies zurückzuführen. So konnte in jenem Rattenversuch eine zusätzliche Verminderung der Expression erreicht werden, wenn PTH und Calcitriol zusammen infundiert wurden (Friedlaender et al., 2001). Andererseits könnten die Ziegen auch mit einer vergleichsweise stärkeren FGF 23-Freisetzung auf die Calcitriol-Behandlung reagiert haben. In Versuchen an Mäusen kam es infolge einer einmaligen Calcitriol-Injektion zu einem signifikanten Anstieg der FGF 23-Plasmaspiegel, wobei ein Zusammenhang mit Änderungen des Phosphat-Spiegels

ausgeschlossen werden konnte. Die Verabreichung dieses Phosphatonins bewirkte eine deutliche Abnahme der renalen NaPi2a-Expression (Shimada et al., 2003).

5.3.3 Effekte der Laktation

Laktierende Schafe und Ziegen wiesen eine geringere NaPi2a-RNA-Expression auf als trockenstehende Individuen, wobei der Unterschied statistisch nicht signifikant war. Die Phosphat-Creatinin-Ratios im Urin der laktierenden Schafe und Ziegen unterschieden sich zudem nicht von den bei den trockenstehenden Tieren ermittelten Ratios (Wilkins, unveröffentlichte Daten). Dies spricht dafür, dass die NaPi2a-Dichte in der apikalen Membran nicht vermindert war. Die Abnahme der RNA-Expression des NaPi2a-Gens ist womöglich auf eine laktationsassoziierte Zunahme der Knochenmobilisation zurückzuführen. Als Reaktion auf steigende Phosphat-Plasmaspiegel kommt es in diesem Zusammenhang zu einer vermehrten Freisetzung des Phosphatonins FGF 23, der wiederum die NaPi2a-mRNA-Expression hemmt, wie in Versuchen an Mäusen beobachtet wurde (Shimada et al., 2003). Daneben könnten auch anhaltend erhöhte Calcitriol- und PTH-Spiegel zur Verminderung der RNA-Expression beigetragen haben. Wie bereits in Kapitel 5.3.2 beschrieben, hatte die Verabreichung dieser Hormone über einen Zeitraum von einer Woche einen hemmenden Effekt auf die NaPi2a-Expression im Nierengewebe von Ratten (Friedlaender et al., 2001). Dagegen spricht, dass bei den Schafen zumindest innerhalb von zehn Tagen vor und nach der Geburt kein Anstieg der Calcitriol-Spiegel beobachtet werden konnte (Wilkins et al., 2014) und die Calcitriol-Konzentrationen im Blut dieser Tiere sich auch nicht von den bei trockenstehenden Schafen gemessenen Werten unterschieden (Richter, 2013).

5.4 Enzyme und Rezeptoren

Zunächst einmal ist darauf hinzuweisen, dass die Ergebnisse der CYP27B1- und CYP24A1-PCR vermutlich eine ausreichende Aussagekraft hinsichtlich der Protein-Expression dieser Enzyme besitzen. Verschiedene Studien liefern Hinweise darauf, dass sich diese stets ähnlich zur RNA-Expression verhält. Dies ist eventuell darauf zurückzuführen, dass die Expression von CYP27B1 und CYP24A1 aufgrund ihrer Funktion als Determinanten der Calcitriol-Konzentration im Blut (Anderson et al., 2003) verhältnismäßig streng, schnell und auch kurzfristig reguliert wird. So wurde für das renale CYP27B1-Protein von Hühnern eine Halbwertszeit von nur 2,5 h ermittelt (Tanaka et al., 1972). Chow et al. (2013) konnten zeigen, dass die Protein-Expression von CYP24A1 in der Niere von Mäusen nahezu zeitgleich

mit der mRNA-Expression der Enzyme stieg, beziehungsweise fiel. Darüber hinaus belegen die Ergebnisse einer Studie, die die Regulation der 24-Hydroxylase im Nierengewebe von Ratten untersuchte, dass die mRNA-Expression und die Enzymaktivität der renalen 24-Hydroxylase eng miteinander assoziiert sind (Shinki et al., 1992).

5.4.1 Effekte der alimentären Calcium-Restriktion

Bei beiden Spezies führte die alimentäre Calcium-Restriktion zu einer signifikanten Steigerung der CYP27B1-RNA-Expression. Dies entspricht Beobachtungen, die in ähnlichen Versuchen an anderen Spezies gemacht wurden. So kommt es bei Mäusen und Ratten auf einer Calcium-restriktiven Diät zu einem deutlichen Anstieg der Calcitriol-Spiegel (van Cromphaut et al., 2003; Garabedian et al., 1972), der offenbar auf eine signifikante Zunahme der CYP27B1-Expression zurückzuführen ist (Anderson et al., 2003). Grundsätzlich wird die Zunahme der renalen 1α -Hydroxylase-Expression unter restriktiver Calcium-Zufuhr auf einen Abfall der Calcium-Plasmaspiegel und den darauf folgenden Anstieg der PTH-Spiegel zurückgeführt (siehe Kapitel 2.1.2). Der Calcium-Spiegel der Ziegen war jedoch nach vier- bis achtwöchiger Calcium-Restriktion ähnlich hoch wie der der adäquat versorgten Kontrolltiere (Wilkins et al., 2010), während die PTH-Spiegel in Ermangelung eines für den kleinen Wiederkäuer geeigneten Nachweisverfahrens nicht bestimmt werden konnten. Angesichts dieser Beobachtung stellt sich die Frage, warum im Nierengewebe der Ziegen dennoch eine derartige Expressionssteigerung dieses Enzyms beobachtet werden konnte. Eine mögliche Erklärung ist, dass auch die Ziegen anfangs mit einem Abfall der Calcium-Spiegel reagierten, der aber aufgrund der Anpassung des renalen Vitamin D-Metabolismus‘ an den Calcium-Mangel trotz anhaltend niedriger Calcium-Zufuhr kompensiert werden konnte. Tatsächlich wird die PTH-Sekretionsrate dynamisch an die Höhe des Calcium-Spiegels angepasst, so dass auch ein Abfall der Calcium-Konzentration innerhalb des physiologischen Bereichs eine Zunahme der PTH-Freisetzung bewirkt (Brown u. MacLeod, 2001). Womöglich reagieren die kompensatorischen Mechanismen bei der Ziege sensibler als beim Schaf, so dass insbesondere in Situationen einer anhaltend verminderten Calcium-Zufuhr auch ein minimaler Abfall des Calcium-Plasmaspiegels eine Zunahme der PTH-Sekretion ermöglicht, die wiederum die Aufrechterhaltung der hohen CYP27B1-Expressionsraten erlaubt. Auch eine vergleichsweise höhere PTH-Sensitivität könnte in diesem Zusammenhang eine Erklärung darstellen. So gelten eine reduzierte PTH-Sensitivität und eine damit assoziierte Insuffizienz der renalen Calcitriol-Synthese als wichtige Faktoren in der Pathogenese der Hypocalcämie der Milchkuh (Goff et al., 2014; Horst et al., 2005), wobei die

Diskussion

zugrundeliegenden Mechanismen bislang noch nicht auf molekularbiologischer Ebene untersucht wurden. Eine Zunahme der renalen PTHR-Expression unter restriktiver Calcium-Zufuhr, die einen entscheidenden Hinweis auf eine erhöhte PTH-Sensitivität darstellen würde, konnte bei den Ziegen zumindest nicht beobachtet werden. Vielmehr wurde die PTHR-Expression weder bei den Schafen, noch bei den Ziegen durch die Calcium-Restriktion beeinflusst.

Da die RNA-Expression der 1α -Hydroxylase unter Calcium-Restriktion beim Schaf stärker zunahm als bei der Ziege, scheint hier – zumindest auf den ersten Blick – nicht die Ursache für den bei der Ziege beobachteten deutlich stärkeren Anstieg der Calcitriol-Spiegel zu liegen. Auch wenn in Versuchen an Mäusen die Menge der renalen CYP27B1- und CYP24A1-Amplifikate mit der Höhe des Calcitriol-Spiegels korrelierte (Anderson et al., 2003), sollte die abschließende Beurteilung eines möglichen Zusammenhangs zwischen renaler Enzym-Dichte und dem Anstieg der Calcitriol-Spiegel jedoch erst im Anschluss an eine Untersuchung der Protein-Expression und idealerweise auch der Aktivität des Enzyms erfolgen.

Die Expression der renalen 24-Hydroxylase wurde weder beim Schaf, noch bei der Ziege durch die restriktive Calcium-Zufuhr signifikant verändert. Während die Anzahl der Amplifikate bei Calcium-restriktiv und adäquat mit Calcium versorgten Ziegen jedoch vergleichbar war, lag sie beim Schaf auf Calcium-Mangeldiät etwa 80% höher als bei den adäquat versorgten Schafen. Dies erscheint zunächst überraschend, insbesondere angesichts der Tatsache, dass die Spiegel von Calcitriol, das als wichtigster Induktor der CYP24A1-Expression gilt, bei der Ziege signifikant stärker angestiegen waren als beim Schaf. Ähnliches beobachtete man jedoch auch bei Mäusen. So exprimierten Tiere, deren Futter nur 0,05% Calcium enthielt, trotz vergleichsweise höherer Calcitriol-Konzentrationen im Blut signifikant weniger CYP24-mRNA in der Niere als ihre Artgenossen, die genügend Calcium über das Futter erhalten hatten (Anderson et al., 2003). Beckman et al. konnten im Nierengewebe Calcium-restriktiv gefütterter Ratten überhaupt keine 24-Hydroxylase-Aktivität messen, obwohl die Calcitriol-Spiegel der Tiere signifikant erhöht waren (Beckman et al., 1995). In beiden Studien wurde diese Beobachtung durch eine verminderte Expression des renalen VDR erklärt, die die Modulation der CYP24A1-Expression durch Calcitriol einschränke. Die hohen Calcitriol-Spiegel stünden somit nicht im Widerspruch zu der schwachen oder fehlenden CYP24A1-Induktion, sondern resultierten aus der Blockade der Induktion dieses Enzyms, die wiederum durch die starke Verminderung der VDR-Expression erreicht würde.

Interessanterweise konnte bei der Ziege, nicht aber beim Schaf, eine tendenzielle Verminderung der VDR-Protein-Expression unter alimentärer Calcium-Restriktion beobachtet werden, so dass ein möglicher Zusammenhang mit der in dieser Situation vergleichsweise geringeren CYP24A1-Expression nicht ausgeschlossen werden kann (siehe auch Kapitel 5.4.2).

5.4.2 Effekte der Calcitriol-Behandlung

Bei beiden Spezies führte die Calcitriol-Behandlung zu einer signifikanten Verminderung der CYP27B1-RNA-Expression. Dass sich die Aktivität beziehungsweise die Expression der renalen 1α -Hydroxylase infolge einer Calcitriol-Behandlung deutlich reduziert, konnte bereits bei verschiedenen Spezies, unter anderem auch beim Rind, gezeigt werden (Beckman u. DeLuca, 2002; Brenza u. DeLuca, 2000; Chow et al., 2013; Engstrom et al., 1987).

Während dieser negative *Feedback*-Mechanismus beim Schaf in beiden Fütterungsgruppen zu einer Verminderung der Expression auf vergleichbares Niveau führte, war der expressionshemmende Effekt bei den Ziegen unter Calcium-Restriktion deutlich weniger stark ausgeprägt als unter adäquater Calcium-Zufuhr.

Ähnliches war bei CYP24A1 zu beobachten: Die Calcitriol-Behandlung steigerte die Expression beim Schaf unabhängig von der Calcium-Zufuhr auf etwa gleiches Niveau, während bei der Ziege die Expression unter Calcium-restriktiven Bedingungen deutlich weniger stark gesteigert wurde als unter adäquater Calcium-Zufuhr.

Die Calcitriol-abhängige Regulation der CYP27B1- und CYP24A1-Expression scheint also bei der Ziege, nicht aber beim Schaf, durch die aktuelle Calcium-Zufuhr beeinflusst zu werden. Tatsächlich liefern einige Studien Hinweise auf eine Anpassung der Calcitriol-regulierten Expression der beiden Enzyme an die aktuelle Calcium-Zufuhr, beziehungsweise die Höhe des Calcium-Spiegels. Beckman et al. (1995) konnten zeigen, dass es bei Calcium-restriktiv gefütterten Ratten infolge einer Vitamin D₃-Behandlung zu einer deutlich weniger starken Verminderung der renalen 1α -Hydroxylase-Aktivität kam, als bei adäquat mit Calcium-versorgten Tieren. Während die 24-Hydroxylase-Aktivität bei den normocalcämischen Kontrolltieren durch die Vitamin D₃-Behandlung um mehr als das 40-fache gesteigert wurde, war bei den restriktiv mit Calcium versorgten, hypocalcämischen Ratten trotz der Behandlung keine 24-Hydroxylase-Aktivität messbar. Dabei fiel auf, dass die

Diskussion

VDR-Dichte im Nierengewebe der Calcium-restriktiv gefütterten Tiere signifikant vermindert war. In einer weiterführenden Studie bewirkte die Vitamin D₃-Behandlung bei Ratten auf Calcium-Mangel-Diät – anders als bei adäquat versorgten Tieren – weder eine Hemmung der renalen CYP27B1-Expression noch eine Steigerung der CYP24A1-Expression in der Niere, obwohl die Calcitriol-Spiegel auf deutlich supraphysiologisches Niveau erhöht wurden. Zudem war der renale VDR bei diesen Tieren nicht nachweisbar (Beckman u. DeLuca, 2002). Shinki et al. (1992) beobachteten ebenfalls eine Abnahme der Calcitriol-vermittelten Expressionssteigerung der 24-Hydroxylase in der Niere von Ratten nachdem den Tieren PTH oder cAMP injiziert worden war. Dabei verminderte sich die Expression des renalen VDR parallel mit der des CYP24A1. Die Autoren schlussfolgerten, dass es in Calcium-Mangelsituationen zu einer PTH-induzierten Abnahme der renalen VDR-Expression kommt, wodurch der negative *Feedback*-Mechanismus auf die 1 α -Hydroxylase sowie eine Steigerung der 24-Hydroxylase-Induktion infolge steigender Calcitriol-Spiegel verhindert werden. Dass die Verminderung der VDR-Expression tatsächlich in aller erster Linie die proximalen Tubulusepithelien der Niere betrifft, zeigen die Ergebnisse einer Studie, in der unter anderem die VDR- und CYP24-mRNA-Expression im proximalen Tubulus und kortikalen Sammelrohr Calcium-restriktiv und adäquat gefütterter Ratten untersucht wurde. Dabei zeigte sich, dass die alimentäre Calcium-Restriktion zu einer signifikanten Abnahme der VDR- und 24-Hydroxylase Expression im proximalen Tubulus führte, während in den Epithelien des kortikalen Sammelrohrs keine Änderung, beziehungsweise sogar eine Zunahme der Expression beobachtet wurde. Interessanterweise kam es bei intakten Ratten zu einer stärkeren Reduktion der VDR- und CYP24A1-Expression als bei den ebenfalls untersuchten thyroparathyroidektomierten Tieren, was wiederum für eine Beteiligung des PTH an diesem regulatorischen Mechanismus spricht (Iida et al., 1995). In einer anderen Studie, in der *in vitro* unter anderem der Einfluss des PTH auf die Expression des VDR und der 1 α -Hydroxylase in renalen Tubulusepithelien untersucht wurde, vermittelte das Hormon im proximalen Tubulus eine Verminderung der VDR-Genexpression und eine Steigerung der CYP27B1-Genexpression, während es im distalen Tubulus zu einer Steigerung der VDR-Expression infolge der PTH-Zugabe kam (Bajwa et al., 2008).

Tatsächlich exprimierten die Calcium-restriktiv gefütterten Ziegen tendenziell weniger VDR-Protein in der Niere als ihre adäquat mit Calcium versorgten Artgenossen. Womöglich erklärt dies, warum der Calcitriol-Effekt auf die CYP27B1- und CYP24A1-Expression nur bei dieser Spezies unter alimentärer Calcium-Restriktion jeweils schwächer ausgeprägt war als unter

Diskussion

adäquater Calcium-Zufuhr. Allerdings war die VDR-Expression – anders als in den oben aufgeführten Studien – ausschließlich auf Protein-Ebene und zudem deutlich weniger stark vermindert. Laut Maiti et al. (2007) tragen die proximalen Tubuli mit rund 70% zur Masse des renalen Cortex bei. Unklar ist, ob dies auch auf die Wiederkäuer-Niere zutrifft oder ob hier das Verhältnis von proximalen zu distalen Tubuli in der Nierenrinde abweicht. Eventuell wurde eine (stärkere) Abnahme der VDR-Expression im proximalen Tubulus durch eine Steigerung im distalen Tubulus maskiert. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass die Speziesunterschiede in der Reaktion auf die Calcitriol-Behandlung in direktem Zusammenhang mit Unterschieden in der PTH-Sekretion oder -Wirksamkeit stehen und nicht durch die VDR-Dichte beeinflusst wurden. Die Ergebnisse mehrerer *In-vitro*-Studien sprechen jedenfalls dafür, dass zumindest die PTH-induzierte Verminderung der 24-Hydroxylase-Expression auch unabhängig von einer Abnahme der VDR-Expression erfolgen kann. So verhinderte die Zugabe von PTH in das Medium die Calcitriol-vermittelte Expressions- und Aktivitätssteigerung der 24-Hydroxylase in proximalen Tubulusepithelzellen trotz unveränderter VDR-Expression. Vielmehr konnte der Effekt auf eine PTH-vermittelte Abnahme der mRNA-Stabilität des Enzyms zurückgeführt werden (Zierold et al., 2000, 2002).

Interessanterweise wurde beim Schaf eine Zunahme der VDR-Expression infolge der Calcitriol-Behandlung beobachtet. Dieser Behandlungseffekt betraf – zumindest auf Proteinebene – beide Fütterungsgruppen im gleichen Maße, was wahrscheinlich erklärt, warum bei den Calcitriol-behandelten Schafen die CYP27B1- und die CYP24A1-Expression unabhängig von der Calcium-Zufuhr im vergleichbarem Umfang vermindert, beziehungsweise gesteigert wurde. Darüber hinaus könnte die Calcitriol-induzierte Steigerung der VDR-Expression bei dieser Spezies auf einen relativen Calcitriol-Mangel hinweisen. Die Tatsache, dass die Schafe auf die restriktive Calcium-Zufuhr mit einem deutlich geringeren Anstieg der Calcitriol-Spiegel reagierten und es bei dieser Spezies, anders als bei den Ziegen, zu einem signifikanten Abfall der Calcium-Plasmaspiegel kam, bewegt zu dieser Annahme. Zudem konnten bei Schafen bereits im Rahmen früherer Versuchsvorhaben eine im Vergleich zu Ziegen deutlich schwächere Erhöhung der Calcitriol-Spiegel sowie ein Abfall der Calcium-Spiegel beobachtet werden (Schröder et al., 1997, 1999). Vor diesem Hintergrund erscheinen die Ergebnisse einer Studie, die den Effekt einer Calcitriol-Behandlung auf die renale VDR-Expression von Mäusen untersuchte, von besonderem Interesse: Nur bei Calcitriol-defizienten Tieren kam es zu einer signifikanten Steigerung der VDR-mRNA-Expression (Healy et al.,

Diskussion

2003). Unabhängig davon, ob die Calcitriol-induzierte Steigerung der VDR-Expression ein Anzeichen einer Calcitriol-Defizienz ist oder nicht, ist ein Zusammenhang mit dem Calcitriol-induzierten Anstieg der Calcium-Spiegel nicht auszuschließen. Dieser fiel beim Schaf deutlich stärker aus als bei der Ziege (Wilkens et al., 2010, 2012). So führte in *In-vitro*-Versuchen allein die Erhöhung der Calcium-Konzentration im Medium zu einer Expressionssteigerung des VDR-Proteins in proximalen Tubuluszellen (Bajwa et al., 2008; Maiti et al., 2008). Sandgren und DeLuca (1990) konnten bei Vitamin D-defizienten Ratten eine signifikante Zunahme der renalen VDR-Dichte infolge eines Anstiegs der Serum-Calcium-Spiegel beobachten.

Auch die PTHR-Expression wurde beim Schaf durch die Calcitriol-Behandlung gesteigert, wenn auch nur tendenziell und ausschließlich auf Protein-Ebene. Die renale PTHR-mRNA-Expression von hypocalcämischen Mäusen, die eine Calcium- und Vitamin D₃-restriktive Diät erhalten hatten, war vermindert, was von den Autoren auf die Calcitriol-Defizienz zurückgeführt wurde (Ko et al., 2009). Insbesondere aufgrund der Tatsache, dass Calcitriol selbst im Sinne einer negativen Rückkopplung die PTH-Expression (Demay et al., 1992; Okazaki et al., 1988; Silver et al., 1986) und damit -Sekretion hemmt, stellt sich aber die Frage, ob es sich in diesem Fall tatsächlich um einen direkten Calcitriol-Effekt handeln kann. So vermittelt Calcitriol in Osteoblasten keine Steigerung, sondern eine Hemmung der PTHR-Expression (Amizuka et al., 1999). Während also beim Schaf sowohl die VDR- als auch die PTHR-Expression durch die Calcitriol-Behandlung gesteigert wurden, hatte diese bei der Ziege keinerlei Einfluss auf die Expression dieser Rezeptoren. Dies stützt wiederum die Hypothese, dass die Calcium-restriktiv gefütterten Schafe, im Gegensatz zu den Ziegen, möglicherweise unter einer Calcitriol-Defizienz litten.

Unabhängig davon, ob der jeweils deutlich schwächere Effekt der Calcitriol-Behandlung auf die CYP27B1- und CYP24A1-RNA-Expression in der Niere Calcium-restriktiv gefütterter Ziegen auf die in dieser Situation tendenziell verminderte VDR-Protein-Expression und/oder auf einen womöglich höheren PTH-Spiegel beziehungsweise eine höhere PTH-Sensitivität zurückzuführen ist, kann ein Zusammenhang der Expression des CYP24A1-Enzyms mit dem stärkeren Anstieg der Calcitriol-Spiegel bei dieser Spezies nicht ausgeschlossen werden. Insbesondere angesichts der Tatsache, dass die Schafe unter Calcium-Restriktion rund 80% mehr CYP24A1-RNA exprimierten als unter adäquater Calcium-Zufuhr, die Calcium-restriktiv gefütterten Ziegen ihre CYP24A1-Expression jedoch kaum steigerten, stellt sich die

Frage, ob eventuell eine ebenfalls verminderte CYP24A1-Protein-Expression eine vergleichsweise geringere Katabolisierung des Calcitriols bedingt und damit einen stärkeren Anstieg des Calcitriol-Spiegels ermöglicht haben könnte. Geht man davon aus, dass tatsächlich die verminderte VDR-Dichte die Ursache für die vergleichsweise niedrigere CYP24A1-Expression Calcium-restriktiv gefütterter Ziegen darstellt, ergibt sich die Frage, warum die CYP27B1-Expression weniger stark anstieg als beim Schaf. Womöglich ist es aber tatsächlich so, dass insbesondere die 24-Hydroxylase-Expression über die VDR-Dichte reguliert wird. So konnten Anderson et al. (2004) in Versuchen an Mäusen zeigen, dass nur die renale mRNA-Expression von CYP24A1, nicht aber die von CYP27B1, positiv mit der renalen VDR-Dichte korreliert.

5.4.3 Effekte der Laktation

Während sich die 1α -Hydroxylase-RNA-Expression laktierender und trockenstehender Individuen bei beiden Spezies nicht signifikant voneinander unterschied, exprimierten sowohl die Schafe als auch die Ziegen in der Laktation tendenziell weniger CYP24A1-RNA. Womöglich besteht hier ein Zusammenhang mit der etwas geringeren Expression des renalen VDR. So wiesen tragende und laktierende Ratten eine im Vergleich zu nicht laktierenden, nicht tragenden Ratten signifikant geringere Expression der renalen 24-Hydroxylase und des renalen VDR auf. Die 1α -Hydroxylase-Expression war bei diesen Tieren hingegen signifikant erhöht. Bei Ratten, bei denen keine Trächtigkeits- beziehungsweise laktationsassoziierte Abnahme der renalen VDR- und CYP24A1-Expression beobachtet werden konnte, wurden signifikant niedrigere Calcitriol-Spiegel festgestellt (Goyal et al., 2014). Womöglich handelt es sich bei der Verminderung der renalen VDR- und 24-Hydroxylase-Expression um einen Mechanismus, der der Aufrechterhaltung hoher Calcitriol-Spiegel in Calcium-Mangelsituationen unterschiedlicher Genese dient. Entsprechende Beobachtungen wurden jedenfalls auch in Versuchen zum Einfluss der alimentären Calcium-Restriktion auf die Expression dieser Strukturen gemacht (Beckman u. DeLuca, 2002; Beckman et al., 1995; Iida et al., 1995) (siehe Kapitel 5.4.1). Wie bereits beschrieben, unterschieden sich jedoch die Calcitriol-Plasmaspiegel der Schafe in der Laktation und in der späten Trächtigkeit nicht signifikant voneinander (Wilkens et al., 2014), was eher gegen einen Zusammenhang zwischen VDR- und CYP24A1-Expression und der Höhe der Calcitriol-Spiegel bei dieser Spezies spricht.

5.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die untersuchten Schafe und Ziegen sowohl in der Laktation als auch unter alimentärer Calcium-Restriktion – anders als monogastrische Spezies – nicht mit einer Steigerung, sondern oftmals sogar mit einer Verminderung der Expression renaler Calcium-transportierender Strukturen reagierten. Sie weisen zudem darauf hin, dass es stattdessen zu einer Steigerung der Calcium-Resorption in weiter proximal gelegenen Nephronabschnitten kommt.

Um die der Resorptionssteigerung zugrunde liegenden Mechanismen genauer zu untersuchen und beurteilen zu können, ob vorrangig der aktive transzelluläre oder aber der passive parazelluläre Calcium-Transport zunimmt, wäre die Durchführung weiterer Bilanzstudien erforderlich, in denen neben der Fraktionellen Calcium-Exkretion auch die Fraktionelle Exkretion anderer Ionen (Natrium, Kalium, Chlorid) sowie die Konzentration des *Second Messengers* cAMP im Harn untersucht wird. Mittels funktioneller Studien an isolierten Nephronsegmenten könnte untersucht werden, ob und wie verschiedene Hormone die Calcium-Resorption in den unterschiedlichen Nephronsegmenten des Wiederkäuers modulieren können. Quantitative Bestimmungen des Claudin 16-, Claudin 14-, Claudin 12-, des NKCC2- und des ROMK-Gehalts im Nierengewebe könnten darüber hinaus genauere Hinweise auf den Mechanismus der Resorptionssteigerung geben. Sowohl im Hinblick auf die Regulation des renalen Calcium-Transports als auch des renalen Vitamin D-Metabolismus des laktierenden Wiederkäuers wäre es erforderlich, die Konzentration verschiedener Calcium-homöostatisch bedeutsamer Hormone, die Höhe des Calcium- und Phosphat-Spiegels sowie die Fraktionelle Calcium- und Phosphat-Exkretion laktierender Tiere auch am Tag der Tötung zu bestimmen. In Kombination mit den Daten der Exkretionsstudien könnte insbesondere die Höhe der zeitgleich bestimmten PTHrP- und Prolaktin-Spiegel Hinweise auf die Bedeutung dieser Hormone für die Regulation der renalen Calcium-Exkretion in der Laktation geben.

Die Ergebnisse der strukturellen Untersuchungen zeigen zudem, dass die Verabreichung von Calcitriol in pharmakologischer Dosierung – im Gegensatz zu dem endogenen Anstieg der Calcitriol-Spiegel – auch beim Wiederkäuer einen expressionsstimulierenden Effekt auf Calcium-transportierende Strukturen in der Niere vermitteln kann. Um auszuschließen, dass es sich dabei nicht um einen indirekten, über einen Anstieg der Calcium-Konzentration vermittelten Effekt handelt, wären *In-vitro*-Studien an renalen Zellkulturen vom Wiederkäuer durchzuführen. Auch könnte man die Promotorregion der entsprechenden Gene mittels *Race*

PCR, Sequenzanalysen und *Reporter Gene Assays* auf die Existenz eines positiven VDRE hin untersuchen. Auf welche Weise die unter alleiniger Calcium-Restriktion beobachtete Expressionsverminderung Calcium-transportierender Strukturen vermittelt wurde, ist unklar. Womöglich könnte hier die Untersuchung der Expression von Coaktivatoren und Corepressoren des VDR wichtige Hinweise liefern. Andererseits könnte in *In-vitro*-Studien untersucht werden, inwieweit eine Aktivierung des CaSR im distalen Nephron des Wiederkäuers Einfluss auf den TRPV5-vermittelten Calcium-Einstrom sowie die Expression von CaBP_{D28K} und NCX1 hat.

Die Expressionsstudien lieferten interessante Hinweise auf Speziesunterschiede im renalen Vitamin D-Metabolismus von Schaf und Ziege. So variierte die Calcitriol-abhängige Regulation der 1 α - und 24-Hydroxylase-Expression bei der Ziege, nicht aber beim Schaf, in Abhängigkeit von der alimentären Calcium-Zufuhr. Ob ein Zusammenhang zwischen der unter Calcium-restriktiven Bedingungen offenbar schwächeren Induktion der 24-Hydroxylase-RNA-Expression und dem signifikant stärkeren Anstieg der Calcitriol-Plasmaspiegel der Ziege in eben dieser Situation besteht, ist eine wichtige Frage. In diesem Kontext ist in allererster Linie eine Untersuchung der Proteinexpression des Enzyms sowie idealerweise auch der Enzymaktivität erforderlich, bevor entsprechende Schlüsse gezogen werden können. Dabei stellt sich auch die Frage, ob die tendenzielle Verminderung der VDR-Dichte im Nierengewebe und/oder die Höhe des PTH-Spiegels für die Schwächung der Calcitriol-Effekte bei Calcium-restriktiv gefütterten Ziegen verantwortlich zu machen sind und ob es sich dabei um eine – von monogastrischen Spezies bekannte – Form der Adaptation an Calcium-Mangelzustände handelt. Eine „speziesspezifische Calcitriol-Defizienz“ des Schafes, für deren Vorliegen auch die beobachteten expressionsstimulierenden Effekte der Calcitriol-Behandlung auf den renalen VDR und PTHR sprechen, könnte wiederum im Zusammenhang mit dem Fehlen eines solchen Adaptations-Mechanismus stehen. Der quantitative Nachweis von VDR, CYP24A1 und CYP27B1 in proximalen und distalen Tubulusepithelien von adäquat und restriktiv mit Calcium versorgten und insbesondere von laktierenden Tieren sowie der anschließende Vergleich der ermittelten Werte könnten hier wichtige Anhaltspunkte geben. Um den Einfluss des PTH beurteilen zu können muss zunächst eine Methode zum Nachweis des Peptidhormons im Blut oviner und capriner Spezies entwickelt werden. Die Hypothese einer „physiologischen Calcitriol-Defizienz der Schafe“ müsste zudem durch Durchführung der entsprechenden Bilanz- und Expressionsstudien an möglichst vielen Schafen verschiedener Rassen und Altersstufen überprüft werden.

Schlussfolgerungen und Ausblick

Weiterhin ist es erforderlich, auch Nierengewebe von Rindern den beschriebenen molekularbiologischen Untersuchungen zu unterziehen, um beurteilen zu können, inwieweit die renalen Calcium-homöostatische Mechanismen des Rindes eher denen des Schafes oder denen der Ziege ähneln.

Sollte sich im Rahmen dieser Untersuchungen herausstellen, dass beim Wiederkäuer oder bei einzelnen Wiederkäuerspezies in Calcium-Mangelsituationen die renale VDR- und folglich die CYP24A1-Expression der Faktor ist, der die Höhe des Calcitriol-Spiegels limitiert, könnten womöglich CYP24A1-Inhibitoren eine neue Option in der Therapie der Hypocalcämie der Milchkuh darstellen. In diesem Zusammenhang wäre es besonders interessant, Nierengewebe von an Gebärparese erkrankten Ziegen und Rindern zu untersuchen, um zu überprüfen, ob die zumindest beim Rind pathogenetisch bedeutsame herabgesetzte PTH-Sensitivität sich auch auf die Expression des renalen VDR und der renalen Hydroxylasen und somit auf die Höhe des Calcitriol-Spiegels auswirkt.

6. Zusammenfassung

Gesine Herm

Untersuchungen zur Bedeutung der Niere für die Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase bei Schaf und Ziege

Insbesondere hochleistende Milchkühe entwickeln im peripartalen Zeitraum häufig Hypocalcämien. In Studien, die die Pathogenese und Therapie der Gebärfähigkeit der Milchkuh untersuchen, werden oftmals Schafe und Ziegen als Modelltier für das Rind eingesetzt, obwohl Hinweise darauf bestehen, dass sich die Calcium-homöostatischen Mechanismen der drei Wiederkäuerspezies in einigen Punkten unterscheiden. Darüber hinaus sind insbesondere die renalen Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase bei Wiederkäuern bisher kaum untersucht worden. Daher wurde im Rahmen dieser Dissertation die Expression der am transzellulären renalen Calcium-Transport sowie der direkt und indirekt am renalen Vitamin D-Metabolismus beteiligten Strukturen im Nierengewebe von Calcium-restriktiv- und adäquat gefütterten, zum Teil Calcitriol-behandelten sowie von laktierenden und trockenstehenden Schafen und Ziegen untersucht, um zu überprüfen, welche Bedeutung die Niere für die Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase bei diesen Spezies hat. Dazu wurde die RNA-Expression von TRPV5, CaBP_{D28K}, NCX1, NaPi2a, PTHR, VDR, CYP24A1 und CYP27B1 mittels *Real Time* RT PCR untersucht. Die Expression von TRPV5, CaBP_{D28K}, NCX1, PTHR und VDR wurde zusätzlich mittels *Western Blot*-Analysen auf Proteinebene untersucht. Daneben konnten zum Teil auch Daten zur Höhe der Calcium-, Phosphat- und Calcitriol-Spiegel sowie der renalen Calcium- und Phosphat-Ausscheidung in die Auswertung miteinbezogen werden, welche im Rahmen bereits abgeschlossener Versuchsvorhaben gewonnen worden waren.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl laktierende als auch Calcium-restriktiv gefütterte Schafe und Ziegen – anders als monogastrische Spezies – nicht mit einer Steigerung der Expression Calcium-transportierender Strukturen in der Niere reagierten. Oftmals kam es sogar zu einer Abnahme der Expression von TRPV5, CaBP_{D28K} und/oder NCX1, sodass angesichts der Tatsache, dass die renale Calcium-Exkretion dieser Tiere nicht zugenommen hatte, davon ausgegangen werden kann, dass es stattdessen zu einer kompensatorischen Steigerung der Calcium-Resorption in weiter proximal gelegenen Abschnitten gekommen war.

Zusammenfassung

Obwohl eine Verminderung der Transporter-Expression zum Teil auch trotz signifikanten Anstiegs der endogenen Calcitriol-Spiegel beobachtet werden konnte, hatte die Behandlung mit Calcitriol in pharmakologischer Dosis in einigen Fällen eine signifikante Expressionssteigerung der Calcium-transportierenden Strukturen zur Folge. Dass diese lediglich auf RNA-Ebene beobachtet werden konnte, ist vermutlich auf die Kürze der Zeitspanne zwischen Behandlung und Tötung der Tiere zurückzuführen, wie durch Vergleich mit entsprechenden Daten ähnlicher Versuche gezeigt werden konnte. Letztendlich spricht der beobachtete Behandlungs-Effekt gegen die zunächst – auch vor dem Hintergrund der Ergebnisse verschiedener Bilanzstudien – aufgestellte Hypothese eines nicht durch Calcitriol regulierbaren renalen Calcium-Transports.

Was die Anpassung renaler Calcium-Transportmechanismen an Belastungen des Calcium-Haushalts betrifft, existieren also grundlegende Unterschiede zwischen monogastrischen Spezies und kleinen Wiederkäuern, wobei angesichts der der wissenschaftlichen Literatur entnommenen Daten der Mechanismus einer „renalen Calcium-Konservierung“ grundsätzlich eher von vergleichsweise geringer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase des Wiederkäuers sein kann. Die Regulation des renalen Vitamin D-Metabolismus‘ folgt jedoch grundsätzlich ähnlichen Prinzipien und eine adäquate Erhöhung der Calcitriol-Spiegel scheint ebenso bedeutsam für den Ausgleich eines Calcium-Defizits zu sein wie beim monogastrischen Tier. Darauf wiesen bereits die Ergebnisse des Fütterungsversuches hin, in dem die Ziegen mit einem deutlich stärkeren Anstieg des Calcitriol-Spiegels auf die alimentäre Calcium-Restriktion reagiert hatten als die Schafe und in dem nur die Ziegen den Calcium-Mangel erfolgreich kompensieren konnten. Vor diesem Hintergrund sind die Ergebnisse der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Expressionsstudien besonders interessant, da sie zeigen, dass bei der Ziege, nicht aber beim Schaf die Expression der Vitamin D-metabolisierenden Enzyme an die aktuelle Calcium-Zufuhr angepasst wurde. Womöglich lässt sich dies auf die tendenziell verminderte VDR-Dichte in der Niere der Ziegen zurückführen und erklärt den bei dieser Spezies deutlich stärkeren Anstieg der Calcitriol-Spiegel. Daher stellt sich die Frage, ob der von Labornagern bekannte Mechanismus einer PTH-vermittelten Reduktion der renalen VDR-Expression zwecks Verminderung der Calcitriol-abhängigen CYP24A1-Induktion in Calcium-Mangelsituationen auch beim Wiederkäuer eine Rolle spielt und ob in diesem Zusammenhang Speziesunterschiede existieren. Da eine reduzierte PTH-Sensitivität und eine damit einhergehende Calcitriol-Defizienz entscheidende Faktoren in der Pathogenese der

Zusammenfassung

Hypocalcämie der Milchkuh darstellen, wäre die Untersuchung der renalen Expression des VDR und der 24-Hydroxylase sowie der Höhe der PTH-Spiegel im Blut hypocalcämischer Wiederkäuer von besonderem Interesse.

7. Summary

Gesine Herm

Studies on the importance of the kidney for the maintenance of calcium homeostasis in sheep and goats

High yielding dairy cows may suffer from periparturient hypocalcaemia. Many investigations on the pathogenesis and therapy of such hypocalcaemia have studied sheep and goats instead of cattle. However, the results of some of these investigations have identified significant differences in calcium-homeostatic mechanisms between these ruminant species. Moreover, the role of the kidney in the maintenance of calcium homeostasis in ruminants is still poorly understood. Hence, the aim of the research reported in this thesis was to clarify how renal mechanisms contribute to the maintenance of calcium homeostasis in sheep and goats and to determine whether these mechanisms differ between these species. Therefore, we examined the expression of molecular structures involved in calcium transport and vitamin D metabolism in renal tissues of sheep and goats which were a) fed calcium-restricted or calcium-adequate diets and treated with calcitriol or a placebo and b) lactating or dried-off. RNA expression of TRPV5, CaBP_{D28K}, NCX1, NaPi2a, PTHR, VDR, CYP24A1 and CYP27B1 was determined using Real Time RT PCR. In addition, protein expression of TRPV5, CaBP_{D28K}, NCX1, PTHR and VDR was investigated by Western Blot analysis. Furthermore, plasma levels of calcium, phosphate and calcitriol as well as the excretion rates of calcium and phosphate, which had all been obtained in the course of earlier studies, were incorporated into the overall comparison of calcium homeostasis between sheep and goats.

In contrast to monogastric species, sheep and goats did not react with an upregulation of the expression of molecular structures for renal calcium transport during lactation or dietary calcium restriction. In many cases, even downregulation of the expression of TRPV5, CaBP_{D28K} and/or NCX1 was observed. Since renal calcium excretion of these animals had remained unchanged, it was concluded that calcium resorption must have been shifted to more proximal parts of the nephron, presumably to the thick ascending limb of the loop of Henle.

While sheep and goats were on a calcium-restricted diet, a decline in transporter expression could be observed despite increasing calcitriol plasma levels. Nevertheless, treatment with pharmacological doses of calcitriol led to a significant increase in the RNA expression of

Summary

calcium transporting structures in several cases. The comparison of our data to those in published similar studies suggests that the time span between calcitriol treatment and sacrifice of our animals was too short to allow a manifestation of the effect on the level of these proteins. Regardless of this, the observed effect of our calcitriol treatment does not support the hypothesis of a calcitriol-independent renal calcium transport mechanism in small ruminants which had been proposed from the results of several published balance studies.

Consequently, the adaptation of renal calcium transport processes to stresses of calcium balance appears to differ fundamentally between monogastric species and small ruminants. Since renal calcium excretion in ruminant species is normally very low, the mechanism of renal calcium conservation cannot be of primary importance for the maintenance of calcium homeostasis in ruminants.

However, regulation of renal vitamin D metabolism seems to follow the same principles as in monogastric species and an adequate increase in calcitriol plasma levels appears to be of great importance in adaptation to a calcium deficit. This becomes obvious if one considers the results of the feeding trials: goats, in comparison to sheep responded with a significantly greater rise in calcitriol plasma levels to alimentary calcium restriction and were also able to maintain stable plasma calcium levels.

Against this background further results obtained in the course of this research are of special interest, since they indicate that in goats, but not in sheep, expression of vitamin D metabolising enzymes in the kidney varies according to the actual supply of calcium. This can possibly be attributed to the observed trend of reduction in renal VDR protein expression in the goat and may explain the greater rise of calcitriol plasma levels observed in this species. Furthermore, both lactating sheep and goats showed a slight decrease in CYP24A1 RNA expression. These observations lead to the question, of whether the mechanism in calcium deprived rodents of a PTH-induced reduction of the calcitriol-dependent induction of CYP24A1, which seems to contribute to an adequate elevation of calcitriol plasma levels in these species, might also be of importance in ruminants.

Since a reduced sensitivity to PTH and a consequent calcitriol deficiency are considered to be the main factors in the pathogenesis of hypocalcemia in dairy cows, it would be of great

Summary

interest to examine the expression of VDR and CYP24A1 in renal tissues and the PTH concentrations in blood samples of ruminants suffering from peripartal paresis.

8. Literaturverzeichnis

ABU DAMIR, H., PHILLIPPO, M., THORP, B.H., MILNE, J.S., DICK, L. u. NEVISON, I.M. (1994):

Effects of dietary acidity on calcium balance and mobilisation, bone morphology and 1,25 dihydroxyvitamin D in prepartal dairy cows.

Res. Vet. Sci. 56, 310–318.

VAN ABEL, M., HOENDEROP, J.G.J., DARDENNE, O., ST. ARNAUD, R., VAN OS, C.H., VAN LEEUWEN, H.J.P.T.M. u. BINDELS, R.J.M. (2002):

1,25-Dihydroxyvitamin D₃-Independent Stimulatory Effect of Estrogen on the Expression of ECaC1 in the Kidney.

J. Am. Soc. Nephrol. 13, 2102–2109.

VAN ABEL, M., HOENDEROP, J.G., VAN DER KEMP, A.W., FRIEDLAENDER, M.M., VAN LEEUWEN, J.P. u. BINDELS, R.J. (2005):

Coordinated control of renal Ca²⁺ transport proteins by parathyroid hormone.

Kidney Int. 68, 1708–1721.

AJIBADE, D.V., DHAWAN, P., FECHNER, A.J., MEYER, M.B., PIKE, J.W. u. CHRISTAKOS, S. (2010):

Evidence for a Role of Prolactin in Calcium Homeostasis: Regulation of Intestinal Transient Receptor Potential Vanilloid Type 6, Intestinal Calcium Absorption, and the 25-Hydroxyvitamin D₃ 1 α Hydroxylase Gene by Prolactin.

Endocrinology 151, 2974–2984.

AKENO, N., SAIKATSU, S., KAWANE, T. u. HORIUCHI, N. (1997):

Mouse vitamin D-24-hydroxylase: molecular cloning, tissue distribution, and transcriptional regulation by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃.

Endocrinology 138, 2233–2240.

ALONSO, V., MAGYAR, C.E., WANG, B., BISELLO, A. u. FRIEDMAN, P.A. (2011):

Ubiquitination-deubiquitination balance dictates ligand-stimulated PTHR sorting.

J. Bone Miner. Res. 26, 2923–2934.

AMBÜHL, P., ZAJICEK, H., WANG, H., PUTTAPARTHI, K. u. LEVI, M. (1998):

Regulation of renal phosphate transport by acute and chronic metabolic acidosis in the rat.

Kidney Int. 53, 1288–1298.

AMIZUKA, N., LEE, H., KWAN, M., ARAZANI, A., WARSHAWSKY, H., HENDY, G., OZAWA, H., WHITE, J. u. GOLTZMAN, D. (1997):

Cell-specific expression of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene in kidney from kidney-specific and ubiquitous promoters.

Endocrinology 138, 469–481.

AMIZUKA, N., KWAN, M.Y., GOLTZMAN, D., OZAWA, H., WHITE, J.H. u. OTHERS (1999):

Vitamin D₃ differentially regulates parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor expression in bone and cartilage.

J. Clin. Invest. 103, 373–381.

Literaturverzeichnis

- ANAST, C., ARNAUD, C.D., RASMUSSEN, H. u. TENENHOUSE, A. (1967):
Thyrocalcitonin and the response to parathyroid hormone.
J. Clin. Invest. 46, 57–64.
- ANDERSON, P.H., O'LOUGHLIN, P.D., MAY, B.K. u. MORRIS, H.A. (2003):
Quantification of mRNA for the vitamin D metabolizing enzymes CYP27B1 and CYP24 and vitamin D receptor in kidney using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction.
J. Mol. Endocrinol. 31, 123–132.
- ANDERSON, P.H., O'LOUGHLIN, P.D., MAY, B.K. u. MORRIS, H.A. (2004):
Determinants of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D₃ levels: the role of renal synthesis and catabolism of vitamin D.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 89-90, 111–113.
- ARNOLD, D.B. u. HEINTZ, N. (1997):
A calcium responsive element that regulates expression of two calcium binding proteins in Purkinje cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. 94, 8842–8847.
- ATTMANE-ELAKEB, A., MOUNT, D.B., SIBELLA, V., VERNIMMEN, C., HEBERT, S.C. u. BICHARA, M. (1998):
Stimulation by in Vivo and in Vitro Metabolic Acidosis of Expression of rBSC-1, the Na⁺-K⁺(NH₄⁺)-2Cl⁻ Cotransporter of the Rat Medullary Thick Ascending Limb.
J. Biol. Chem. 273, 33681–33691.
- VAN BAAL, J., YU, A., HARTOG, A., FRANSEN, J., WILLEMS, P., LYTTON, J. u. BINDELS, R. (1996):
Localization and regulation by vitamin D of calcium transport proteins in rabbit cortical collecting system.
Am. J. Physiol. 271, F985–F993.
- BACSKAI, B. u. FRIEDMAN, P. (1990):
Activation of latent Ca²⁺ channels in renal epithelial cells by parathyroid hormone.
Nature 347, 388–391.
- BAJWA, A., FORSTER, M.N., MAITI, A., WOOLBRIGHT, B.L. u. BECKMAN, M.J. (2008):
Specific regulation of CYP27B1 and VDR in proximal versus distal renal cells.
Arch. Biochem. Biophys. 477, 33–42.
- BALDWIN, R.L., MCLEOD, K.R. u. CAPUCO, A.V. (2004):
Visceral Tissue Growth and Proliferation During the Bovine Lactation Cycle.
J. Dairy Sci. 87, 2977–2986.
- BARSONY, J., PIKE, J.W., DELUCA, H.F. u. MARX, S.J. (1990):
Immunocytology with microwave-fixed fibroblasts shows 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃-dependent rapid and estrogen-dependent slow reorganization of vitamin D receptors.
J. Cell Biol. 111, 2385–2395.
- BECKMAN, M.J. u. DELUCA, H.F. (2002):
Regulation of renal vitamin D receptor is an important determinant of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ levels in vivo.
Arch. Biochem. Biophys. 401, 44–52.

BECKMAN, M.J., JOHNSON, J.A., GOFF, J.P., REINHARDT, T.A., BEITZ, D.C. u. HORST, R.L. (1995):

The Role of Dietary Calcium in the Physiology of Vitamin D Toxicity: Excess Dietary Vitamin D₃ Blunts Parathyroid Hormone Induction of Kidney 1-Hydroxylase.
Arch. Biochem. Biophys. 319, 535–539.

BELÉN GARCÍA-RODRÍGUEZ, M., PÉREZ-GARCÍA, C.C., ÁNGELES RÍOS-GRANJA, M., CANO-RÁBANO, M.J., PENA-PENABAD, M., GALLEGU-MORALES, D., GARCÍA-PARTIDA, P. u. DIEZ-PRieto, I. (2003):

Renal handling of calcium and phosphorus in experimental renal hyperparathyroidism in dogs.

Vet. Res. 34, 379–387.

BERNER, Y. u. SHIKE, M. (1988):

Consequences of phosphate imbalance.

Annu. Rev. Nutr. 8, 121–148.

BINDELS, R., HARTOG, A., TIMMERMANS, J. u. VAN OS, C. (1991):

Active Ca²⁺ transport in primary cultures of rabbit kidney CCD: stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and PTH.

Am. J. Physiol. 261, F799–F807.

BINDELS, R.J.M., RAMAKERS, P.L.M., DEMPSTER, J.A., HARTOG, A. u. VAN OS, C.H. (1992):

Role of Na⁺/Ca²⁺ exchange in transcellular Ca²⁺ transport across primary cultures of rabbit kidney collecting system.

Pflugers Arch. 420, 566–572.

BLAND, R., WALKER, E.A., HUGHES, S.V., STEWART, P.M., u. HEWISON, M. (1999):
Constitutive Expression of 25-Hydroxyvitamin D₃-1 α -Hydroxylase in a Transformed Human Proximal Tubule Cell Line: Evidence for Direct Regulation of Vitamin D Metabolism by Calcium.

Endocrinology 140, 2027–2034.

BOASS, A., GARNER, S.C., SCHULTZ, V.L. u. TOVERUD, S.U. (1997):

Regulation of serum calcitriol by serum ionized calcium in rats during pregnancy and lactation.

J. Bone Miner. Res. 12, 909–914.

BOROSS, M., KINSELLA, J., CHENG, L. u. SACKTOR, B. (1986):

Glucocorticoids and metabolic acidosis-induced renal transports of inorganic phosphate, calcium, and NH₄.

Am. J. Physiol. 250, F827–F833.

BOYAN, B.D., DEAN, D.D., SYLVIA, V.L. u. SCHWARTZ, Z. (1994):

Nongenomic regulation of extracellular matrix events by vitamin D metabolites.

J. Cell. Biochem. 56, 331–339.

BRAITHWAITE, G. (1975):

Studies on the absorption and retention of calcium and phosphorus by young and mature Ca-deficient sheep.

Br. J. Nutr. 34, 311–324.

- BRAITHWAITE, G.D., GLASCOCK, R.F. u. RIAZUDDIN, S. (1969):
Calcium metabolism in lactating ewes.
Br. J. Nutr. 23, 827–834.
- BREDDERMAN, P.J. u. WASSERMAN, R.H. (1974):
Chemical composition, affinity for calcium, and related properties of the vitamin D dependent calcium-binding protein.
Biochemistry (Mosc.) 13, 1687–1694.
- BRENZA, H.L. u. DELUCA, H.F. (2000):
Regulation of 25-Hydroxyvitamin D₃ 1 α -Hydroxylase Gene Expression by Parathyroid Hormone and 1,25-Dihydroxyvitamin D₃.
Arch. Biochem. Biophys. 381, 143–152.
- BRENZA, H.L., KIMMEL-JEHAN, C., JEHAN, F., SHINKI, T., WAKINO, S., ANAZAWA, H., SUDA, T. u. DELUCA, H.F. (1998):
Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase gene promoter.
Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 1387–1391.
- BROMMAGE, R. (1989):
Measurement of calcium and phosphorus fluxes during lactation in the rat.
J. Nutr. 119, 428–438.
- BRONNER, F., PANSU, D. u. STEIN, W.D. (1986):
An analysis of intestinal calcium transport across the rat intestine.
Am. J. Physiol. 250, G561–G569.
- BROWN, E.M. u. MACLEOD, R.J. (2001):
Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling.
Physiol. Rev. 81, 239–298.
- BROWN, A.J., DUSSO, A. u. SLATOPOLSKY, E. (1999):
Vitamin D.
Am. J. Physiol. - Ren. Physiol. 277, F 157–175.
- CABIATI, M., RAUCCI, S., CASELLI, C., GUZZARDI, M.A., D'AMICO, A., PRESCIMONE, T., GIANNESI, D. u. DEL RY, S. (2012):
Tissue-specific selection of stable reference genes for real-time PCR normalization in an obese rat model.
J. Mol. Endocrinol. 48, 251–260.
- CAO, L.P., BOLT, M.J.G., WEI, M., SITRIN, M.D. u. CHUN LI, Y. (2002):
Regulation of Calbindin-D9k Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and Parathyroid Hormone in Mouse Primary Renal Tubular Cells.
Arch. Biochem. Biophys. 400, 118–124.
- CARNEY, S. u. THOMPSON, L. (1998):
Chronic calcitonin administration and renal calcium transport in the rat.
Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 25, 236–239.
- CHA, S.K., WU, T. u. HUANG, C.L. (2008):
Protein kinase C inhibits caveolae-mediated endocytosis of TRPV5.
Am. J. Physiol. - Ren. Physiol. 294, F1212–F1221.

Literaturverzeichnis

- CHEN, K. u. DELUCA, H. (1995):
Cloning of the human $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements.
Biochim. Biophys. Acta 1263, 1–9.
- CHEN, P. u. NEUMAN, W. (1955):
Renal Excretion of Calcium by the Dog.
Am. J. Physiol. 180, 623–631.
- CHENG, J.B., LEVINE, M.A., BELL, N.H., MANGELSDORF, D.J. u. RUSSELL, D.W. (2004):
Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 7711–7715.
- CHERTOW, B.S., BAYLINK, D.J., WERGEDAL, J.E., SU, M.H. u. NORMAN, A.W. (1975):
Decrease in serum immunoreactive parathyroid hormone in rats and in parathyroid hormone secretion in vitro by 1,25-dihydroxycholecalciferol.
J. Clin. Invest. 56, 668–678.
- CHOW, E.C.Y., SONDERVAN, M., JIN, C., GROOTHUIS, G.M.M. u. PANG, K.S. (2011):
Comparative effects of doxercalciferol (1α -hydroxyvitamin D₂) versus calcitriol ($1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃) on the expression of transporters and enzymes in the rat *in vivo*.
J. Pharm. Sci. 100, 1594–1604.
- CHOW, E.C.Y., QUACH, H.P., VIETH, R. u. PANG, K.S. (2013):
Temporal changes in tissue $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃, vitamin D receptor target genes, and calcium and PTH levels after $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ treatment in mice.
Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab. 304, E977–E989.
- COLEGIO, O.R., VAN ITALLIE, C.M., MCCREA, H.J., RAHNER, C. u. ANDERSON, J.M. (2002):
Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells.
Am. J. Physiol. - Cell Physiol. 283, C142–C147.
- VAN CROMPHAUT, S., RUMMENS, K., STOCKMANS, I., VAN HERCK, E., DIJCKS, F., EDER VEEN, A., CARMELIET, P., VERHAEGHE, J., BOUILLON, R. u. CARMELIET, G. (2003):
Intestinal Calcium Transporter Genes Are Upregulated by Estrogens and the Reproductive Cycle Through Vitamin D Receptor-Independent Mechanisms.
J. Bone Miner. Res. 18, 1725–1736.
- VAN CROMPHAUT, S.J., DEWERCHIN, M., HOENDEROP, J.G., STOCKMANS, I., VAN HERCK, E., KATO, S., BINDELS, R.J., COLLEN, D., CARMELIET, P. u. BOUILLON, R. (2001):
Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor–knockout mice: Functional and molecular aspects.
Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 13324–13329.

- CURTIS, C., ERB, H., SNIFFEN, C., POWERS, P., SMITH, M., WHITE, M., HILLMAN, R. u. PEARSON, E. (1983):
Association of parturient hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 183, 559–561.
- DAI, L. u. QUAMME, G. (1994):
Hormone-mediated Ca^{2+} transients in isolated renal cortical thick ascending limb cells.
Pflugers Arch. 427, 1–8.
- DARWISH, H.M. u. DELUCA, H.F. (1992):
Identification of a 1,25-dihydroxyvitamin D_3 -response element in the 5'-flanking region of the rat calbindin D-9k gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 603–607.
- DARWISH, H.M. u. DELUCA, H.F. (1996):
Analysis of Binding of the 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 Receptor to Positive and Negative Vitamin D Response Elements.
Arch. Biochem. Biophys. 334, 223–234.
- DEMAY, M.B., KIERNAN, M.S., DELUCA, H.F. u. KRONENBERG, H.M. (1992):
Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D_3 receptor and mediate transcriptional repression in response to 1,25-dihydroxyvitamin D_3 .
Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 8097–8101.
- DESPREZ, P.Y., POUJOL, D. u. SAEZ, S. (1992):
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, EC 1.2. 1.12.) gene expression in two malignant human mammary epithelial cell lines: BT-20 and MCF-7. Regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D_3 (1, 25-(OH) $_2\text{D}_3$).
Cancer Lett. 64, 219–224.
- DIMKE, H., HOENDEROP, J.G.J. u. BINDELS, R.J. (2009):
Hereditary tubular transport disorders: implications for renal handling of Ca^{2+} and Mg^{2+} .
Clin. Sci. (Lond.) 118, 1–18.
- DIMKE, H., DESAI, P., BOROVAC, J., LAU, A., PAN, W. u. ALEXANDER, R.T. (2013):
Activation of the Ca^{2+} -sensing receptor increases renal claudin-14 expression and urinary Ca^{2+} excretion.
Am. J. Physiol. - Ren. Physiol. 304, F761–F769.
- DITTMER, A. u. DITTMER, J. (2006):
 β -Actin is not a reliable loading control in Western blot analysis.
Electrophoresis 27, 2844–2845.
- VAN DOORN, D., SPEK, M.E., EVERTS, H., WOUTERSE, H. u. BEYNEN, A.C. (2004):
The influence of calcium intake on phosphorus digestibility in mature ponies.
J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 88, 412–418.
- DRANITZKI ELHALEL, M., WALD, H., RUBINGER, D., GAL-MOSCOVICI, A., INOUE, M., LEVI, M. u. POPOVTZER, M. (2004):
Regulation of NaPi-IIa mRNA and transporter protein in chronic renal failure: role of parathyroid hormone (PTH) and dietary phosphate (Pi).
Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol. 449: 265-270

- DUSANTER-FOURT, I., GAYE, P., BELAIR, L., PETRIDOU, B., KELLY, P.A. u. DJIANE, J. (1991):
Prolactin receptor gene expression in the rabbit: identification, characterization and tissue distribution of several prolactin receptor messenger RNAs encoding a unique precursor.
Mol. Cell. Endocrinol. 77, 181–192.
- DUSSO, A.S. (2005):
Vitamin D.
Am. J. Physiol. - Ren. Physiol. 289, F8–F28.
- EFRATI, E., ARSENTIEV-ROZENFELD, J. u. ZELIKOVIC, I. (2004):
The human paracellin-1 gene (hPCLN-1): renal epithelial cell-specific expression and regulation.
Am. J. Physiol. - Ren. Physiol. 288, F272–F283.
- ELALOUF, J.M., ROINEL, N. u. DE ROUFFIGNAC, C. (1984):
ADH-like effects of calcitonin on electrolyte transport by Henle's loop of rat kidney.
Am. J. Physiol. 246, F213–F220.
- ENGSTROM, G., GOFF, J., HORST, R. u. REINHARDT, T. (1987):
Regulation of calf renal 25-hydroxyvitamin D-hydroxylase activities by calcium-regulating hormones.
J. Dairy Sci. 70, 2266–2271.
- ENOMOTO, H., HENDY, G., ANDREWS, G. u. CLEMENS, T. (1992):
Regulation of avian calbindin-D_{28K} gene expression in primary chick kidney cells: importance of posttranscriptional mechanisms and calcium ion concentration.
Endocrinology 130, 3467–3474.
- FORSTER, I., HERNANDO, N., BIBER, J. u. MURER, H. (2006):
Proximal tubular handling of phosphate: A molecular perspective.
Kidney Int. 70, 1548–1559.
- FREIBERG, J., KINSELLA, J. u. SACKTOR, B. (1982):
Glucocorticoids increase the Na⁺-H⁺ exchange and decrease the Na⁺ gradient-dependent phosphate-uptake systems in renal brush border membrane vesicles.
Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 4932–4936.
- FRICK, K.K., ASPLIN, J.R., FAVUS, M.J., CULBERTSON, C., KRIEGER, N.S. u. BUSHINSKY, D.A. (2013):
Increased biological response to 1,25(OH)₂D₃ in genetic hypercalciuric stone-forming rats.
Am. J. Physiol. - Ren. Physiol. 304, F718–F726.
- FRIEDLAENDER, M., WALD, H., DRANITZKI-ELHALEL, M., ZAJICEK, H., LEVI, M. u. POPOVTZER, M. (2001):
Vitamin D reduces renal NaPi-2 in PTH-infused rats: complexity of vitamin D action on renal P(i) handling.
Am. J. Physiol. - Ren. Physiol. 281, F428–F433.

- FRIEDMAN, P.A. u. GESEK, F.A. (1995):
Cellular Calcium Transport in Renal Epithelia: Measurement, Mechanisms, and Regulation.
Physiol. Rev. 75, 429–471.
- FUJITA, H., SUGIMOTO, K., INATOMI, S., MAEDA, T., OSANAI, M., UCHIYAMA, Y.,
YAMAMOTO, Y., WADA, T., KOJIMA, T. u. YOKOZAKI, H. (2008):
Tight junction proteins claudin-2 and-12 are critical for vitamin D-dependent Ca^{2+} absorption
between enterocytes.
Mol. Biol. Cell 19, 1912–1921.
- FULLMER, C. (1990):
Regulation of intestinal calbindin- $\text{D}_{28\text{K}}$ gene expression: a solution hybridization study.
Arch. Biochem. Biophys. 283, 193–199.
- FULLMER, C.S. u. WASSERMAN, R.H. (1981):
The amino acid sequence of bovine intestinal calcium-binding protein.
J. Biol. Chem. 256, 5669–5674.
- FULLMER, C.S. u. WASSERMAN, R.H. (1987):
Chicken intestinal 28-kilodalton calbindin-D: complete amino acid sequence and structural
considerations.
Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 4772–4776.
- GAMBA, G. u. FRIEDMAN, P.A. (2009):
Thick ascending limb: the $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ co-transporter, NKCC2, and the calcium-sensing
receptor, CaSR.
Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol. 458, 61–76.
- GARABEDIAN, M., HOLICK, M.F., DELUCA, H.F. u. BOYLE, I.T. (1972):
Control of 25-hydroxycholecalciferol metabolism by parathyroid glands.
Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 1673–1676.
- GHIJSEN, W., DE JONG, M. u. VAN OS, C. (1982):
ATP-dependent calcium transport and its correlation with Ca^{2+} -ATPase activity in basolateral
plasma membranes of rat duodenum.
Biochim. Biophys. Acta 689, 327–336.
- GILL, R.K. u. CHRISTAKOS, S. (1993):
Identification of sequence elements in mouse calbindin- $\text{D}_{28\text{K}}$ gene that confer
1,25-dihydroxyvitamin D_3 -and butyrate-inducible responses.
Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 2984–2988.
- GKIKA, D., HSU, Y.-J., VAN DER KEMP, A.W., CHRISTAKOS, S., BINDELS, R.J. u.
HOENDEROP, J.G. (2006):
Critical Role of the Epithelial Ca^{2+} Channel TRPV5 in Active Ca^{2+} Reabsorption as Revealed
by TRPV5/Calbindin- $\text{D}_{28\text{K}}$ Knockout Mice.
J. Am. Soc. Nephrol. 17, 3020–3027.
- GLENDENNING, P., RATAJCZAK, T., PRINCE, R.L., GARAMSZEGI, N. u. STREHLER,
E.E. (2000):
The Promoter Region of the Human PMCA1 Gene Mediates Transcriptional Downregulation

by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 277, 722–728.

GOFF, J.P., HORST, R.L., MUELLER, F.J., MILLER, J.K., KIESS, G.A. u. DOWLEN, H.H. (1991):

Addition of chloride to a prepartal diet high in cations increases 1,25-dihydroxyvitamin D response to hypocalcemia preventing milk fever.

J. Dairy Sci. 74, 3863–3871.

GOFF, J.P. u. HORST, R.L. (1997):

Physiological Changes at Parturition and their Relationship to Metabolic Disorders.

J. Dairy Sci. 80, 1260–1268.

GOFF, J.P., LIESEGANG, A. u. HORST, R.L. (2014):

Diet-induced pseudohypoparathyroidism: A hypocalcemia and milk fever risk factor.

J. Dairy Sci. 97, 1520–1528.

GOODMAN, W.G., GOLDIN, J., KUIZON, B.D., YOON, C., GALES, B., SIDER, D., WANG, Y., CHUNG, J., EMERICK, A. u. GREASER, L. (2000):

Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis.

N. Engl. J. Med. 342, 1478–1483.

GOYAL, R., ZHANG, L., BLOOD, A.B., BAYLINK, D.J., LONGO, L.D., OSHIRO, B. u. MATA-GREENWOOD, E. (2014):

Characterization of an animal model of pregnancy-induced vitamin D deficiency due to metabolic gene dysregulation.

Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab. 306, E256–E266.

GREGER, R., LANG, F. u. OBERLEITHNER, H. (1978):

Distal site of calcium reabsorption in the rat nephron.

Pflugers Arch. 374, 153–157.

DE GROOT, T., LEE, K., LANGESLAG, M., XI, Q., JALINK, K., BINDELS, R.J.M. u. HOENDEROP, J.G.J. (2009):

Parathyroid Hormone Activates TRPV5 via PKA-Dependent Phosphorylation.

J. Am. Soc. Nephrol. 20, 1693–1704.

HALLORAN, B.P. u. DELUCA, H.F. (1980):

Calcium transport in small intestine during pregnancy and lactation.

Am. J. Physiol. 239, E64–E68.

HANAOKA, K., SAKAI, O., IMAI, M. u. YOSHITOMI, K. (1993):

Mechanisms of calcium transport across the basolateral membrane of the rabbit cortical thick ascending limb of Henle's loop.

Pflugers Arch. 422, 339–346.

HARMEYER, J. u. SCHLUMBOHM, C. (2004):

Effects of pharmacological doses of Vitamin D₃ on mineral balance and profiles of plasma Vitamin D₃ metabolites in horses.

J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 89-90, 595–600.

- HART, I. (1974):
The relationship between lactation and the release of prolactin and growth hormone in the goat.
J. Reprod. Fertil. 39, 485–499.
- HATTENHAUER, O., TRAEBERT, M., MURER, H. u. BIBER, J. (1999):
Regulation of small intestinal Na-P_i type IIb cotransporter by dietary phosphate intake.
Am. J. Physiol. 277, G756–G762.
- HAUSSLER, M.R., MYRTLE, J.F. u. NORMAN, A.W. (1968):
The association of a metabolite of vitamin D₃ with intestinal mucosa chromatin in vivo.
J. Biol. Chem. 243, 4055–4064.
- HEALY, K.D., ZELLA, J.B., PRAHL, J.M. u. DELUCA, H.F. (2003):
Regulation of the murine renal vitamin D receptor by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and calcium.
Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 9733–9737.
- HOENDEROP, J.G.J. u. BINDELS, R.J.M. (2004):
Epithelial Ca²⁺ and Mg²⁺ Channels in Health and Disease.
J. Am. Soc. Nephrol. 16, 15–26.
- HOENDEROP, J.G.J., NILIUS, B. u. BINDELS, R.J.M. (2005):
Calcium Absorption Across Epithelia.
Physiol. Rev. 85, 373–422.
- HOENDEROP, J., HARTOG, A., STUIVER, M., DOUCET, A., WILLEMS, P. u. BINDELS, R. (2000):
Localization of the epithelial Ca²⁺ channel in rabbit kidney and intestine.
J. Am. Soc. Nephrol. 11, 1171–1178.
- HOENDEROP, J., DARDENNE, O., VAN ABEL, M., VAN DER KEMP, A., VAN OS, C., ST-ARNAUD, R. u. BINDELS, R. (2002):
Modulation of renal Ca²⁺ transport protein genes by dietary Ca²⁺ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in 25-hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase knockout mice.
FASEB J 16, 1398–1406.
- HOENDEROP, J.G., VAN DER KEMP, A.W., HARTOG, A., VAN DE GRAAF, S.F., VAN OS, C.H., WILLEMS, P.H. u. BINDELS, R.J. (1999):
Molecular identification of the apical Ca²⁺ channel in 1,25-dihydroxyvitamin D₃-responsive epithelia.
J. Biol. Chem. 274, 8375–8378.
- HOFF, A.O., CATALA-LEHNEN, P., THOMAS, P.M., PRIEMEL, M., RUEGER, J.M., NASONKIN, I., BRADLEY, A., HUGHES, M.R., ORDONEZ, N., COTE, G.J., AMLING, M. u. GAGEL, R.F. (2002):
Increased bone mass is an unexpected phenotype associated with deletion of the calcitonin gene.
J. Clin. Invest. 110, 1849–1857.
- HOFMANN, R.R. (1989):
Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system.
Oecologia 78, 443–457.

HOLICK, M.F. (1981):

The cutaneous photosynthesis of previtamin D₃: a unique photoendocrine system.
J. Invest. Dermatol. 77, 51–58.

HORST, R.L., JORGENSEN, N.A. u. DELUCA, H.F. (1978):

Plasma 1,25-dihydroxyvitamin D and parathyroid hormone levels in parturient dairy cows.
Am. J. Physiol. - Endo. Met. 235, E634–E637

HORST, R.L., GOFF, J.P. u. REINHARDT, T.A. (2005):

Adapting to the Transition Between Gestation and Lactation: Differences Between Rat, Human and Dairy Cow.
J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 10, 141–156.

HORWITZ, M.J., TEDESCO, M.B., SEREIKA, S.M., HOLLIS, B.W., GARCIA-OCAÑA, A. u. STEWART, A.F. (2003):

Direct Comparison of Sustained Infusion of Human Parathyroid Hormone-Related Protein-(1–36) [hPTHrP-(1–36)] Versus hPTH-(1–34) on Serum Calcium, Plasma 1,25-Dihydroxyvitamin D Concentrations, and Fractional Calcium Excretion in Healthy Human Volunteers.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 88, 1603–1609.

HOUILLIER, P. u. PAILLARD, M. (2003):

Calcium-sensing receptor and renal cation handling.
Nephrol. Dial. Transplant. 18, 2467–2470.

HOVE, K., HORST, R., LITLEDIKE, E. u. BEITZ, D. (1984):

Infusions of parathyroid hormone in ruminants: hypercalcemia and reduced plasma 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations.
Endocrinology 114, 897–903.

HOWARD, P., WILDE, W. u. MALVIN, R. (1959):

Localization of renal calcium transport; effect of calcium loads and of gluconate anion on water, sodium and potassium.
Am. J. Physiol. 197, 337–341.

HSU, Y.J., DIMKE, H., HOENDEROP, J.G.J. u. BINDELS, R.J.M. (2010):

Calcitonin-stimulated renal Ca²⁺ reabsorption occurs independently of TRPV5.
Nephrol. Dial. Transplant. 25, 1428–1435.

HUNTINGTON, G., BRITTON, R. u. PRIOR, R. (1981):

Feed intake, rumen fluid volume and turnover, nitrogen and mineral balance and acid-base status of wethers changed from low to high concentrate diets.
J. Anim. Sci. 52, 1376–1387.

HURLEY, D., TIEGS, R., WAHNER HW, H. u. HEATH, H. (1987):

Axial and appendicular bone mineral density in patients with long-term deficiency or excess of calcitonin.
N. Engl. J. Med. 317, 537–541.

IIDA, K., SHINKI, T., YAMAGUCHI, A., DELUCA, H.F., KUROKAWA, K. u. SUDA, T. (1995):

A possible role of vitamin D receptors in regulating vitamin D activation in the kidney.
Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 6112–6116.

- JAMISON, R., FREY, N. u. LACY, F. (1974):
Calcium reabsorption in the thin loop of Henle.
Am. J. Physiol. 227, 745–751.
- JANTARAJIT, W., THONGON, N., PANDARANANDAKA, J., TEERAPORNPUNTAKIT, J., KRISHNAMRA, N. u. CHAROENPHANDHU, N. (2007):
Prolactin-stimulated transepithelial calcium transport in duodenum and Caco-2 monolayer are mediated by the phosphoinositide 3-kinase pathway.
Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab. 293, E372–E384.
- JOHKE, T. (1969):
Prolactin release in response to milking stimulus in the cow and goat estimated by radioimmunoassay.
Endocrinol. Jpn. 16, 179–185.
- JOHKE, T. (1970):
Factors affecting the plasma prolactin level in the cow and the goat as determined by radioimmunoassay.
Endocrinol. Jpn. 17, 393–401.
- JÜPPNER, H., WOLF, M. u. SALUSKY, I.B. (2010):
FGF-23: More than a regulator of renal phosphate handling?
J. Bone Miner. Res. 25, 2091–2097.
- KALLFELZ, F., TAYLOR, A. u. WASSERMAN, R. (1967):
Vitamin D-induced calcium binding factor in rat intestinal mucosa.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125, 54–58.
- KAMALOV, G., BHATTACHARYA, S.K. u. WEBER, K.T. (2010):
Congestive Heart Failure: Where Homeostasis Begets Dyshomeostasis:
J. Cardiovasc. Pharmacol. 56, 320–328.
- KAMIMURA, S., GALLIENI, M., ZHONG, M., BERON, W., SLATOPOLSKY, E. u. DUSSO, A. (1995):
Microtubules Mediate Cellular 25-Hydroxyvitamin D₃ Trafficking and the Genomic Response to 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in Normal Human Monocytes.
J. Biol. Chem. 270, 22160–22166.
- KARBACH, U. (1992):
Paracellular Calcium Transport Across the Small Intestine.
J. Nutr. 122, 672–677.
- KARIM, Z., ATTMANE-ELAKEB, A., SIBELLA, V. u. BICHARA, M. (2003):
Acid pH Increases the Stability of BSC1/NKCC2 mRNA in the Medullary Thick Ascending Limb.
J. Am. Soc. Nephrol. 14, 2229–2236.
- KATO, S., TAKEYAMA, K., KITANAKA, S., MURAYAMA, A., SEKINE, K. u. YOSHIZAWA, T. (1999):
In vivo function of VDR in gene expression-VDR knock-out mice.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 69, 247–251.

- KENSINGER, R., BAUMAN, D. u. COLLIER, R. (1979):
Season and Treatment Effects on Serum Prolactin and Milk Yield during Induced Lactation.
J. Dairy Sci. 62, 1880–1888.
- KIMMEL-JEHAN, C., JEHAN, F. u. DELUCA, H. (1997):
Salt concentration determines 1,25-dihydroxyvitamin D₃ dependency of vitamin D receptor-retinoid X receptor-vitamin D-responsive element complex formation.
Arch. Biochem. Biophys. 341, 75–80.
- KIP, S. u. STREHLER, E. (2003):
Characterization of PMCA isoforms and their contribution to transcellular Ca²⁺ flux in MDCK cells.
Am. J. Physiol. - Ren. Physiol 284, F122–F132.
- KO, S.-H., LEE, G.-S., VO, T.T.B., JUNG, E.-M., CHOI, K.-C., CHEUNG, K.-W., KIM, J.W., PARK, J.-G., OH, G.T. u. JEUNG, E.-B. (2009):
Dietary Calcium and 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Regulate Transcription of Calcium Transporter Genes in Calbindin-D9k Knockout Mice.
J. Reprod. Dev. 55, 137–142.
- KOSTER, H., HARTOG, A., VAN OS, C. u. BINDELS, R. (1995):
Calbindin-D_{28k} facilitates cytosolic calcium diffusion without interfering with calcium signaling.
Cell Calcium 18, 187–196.
- KOSZEWSKI, N.J., ASHOK, S. u. RUSSELL, J. (1999):
Turning a negative into a positive: Vitamin D receptor interactions with the avian parathyroid hormone response element.
Mol. Endocrinol. 13, 455–465.
- KOVACS, C.S. u. KRONENBERG, H.M. (1997):
Maternal-Fetal Calcium and Bone Metabolism During Pregnancy, Puerperium, and Lactation
1. Endocr. Rev. 18, 832–872.
- KUMAR, R., SCHAEFER, J., GRANDE, J. u. ROCHE, P. (1994):
Immunolocalization of calcitriol receptor, 24-hydroxylase cytochrome P-450, and calbindin D_{28k} in human kidney.
Am. J. Physiol. 266, F477–F485.
- LAEMMLI, U.K. (1970):
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680–685.
- LANZANO, L., LEI, T., OKAMURA, K., GIRAL, H., CALDAS, Y., MASIHZADEH, O., GRATTON, E., LEVI, M. u. BLAINE, J. (2011):
Differential modulation of the molecular dynamics of the type IIa and IIc sodium phosphate cotransporters by parathyroid hormone.
Am. J. Physiol. - Cell Physiol. 301, C850–C861.
- LASSITER, W.E., GOTTSCHALK, C.W. u. MYLLE, M. (1963):
Micropuncture study of renal tubular reabsorption of calcium in normal rodents.
Am. J. Physiol. 204, 771–775.

- LEE, G.-S., LEE, K.-Y., CHOI, K.-C., RYU, Y.-H., PAIK, S.G., OH, G.T. u. JEUNG, E.-B. (2007):
Phenotype of a Calbindin-D9k Gene Knockout Is Compensated for by the Induction of Other Calcium Transporter Genes in a Mouse Model.
J. Bone Miner. Res. 22, 1968–1978.
- LISOWSKI, P., PIERZCHAŁA, M., GOŚCIK, J., PAREEK, C.S. u. ZWIERZCHOWSKI, L. (2008):
Evaluation of reference genes for studies of gene expression in the bovine liver, kidney, pituitary, and thyroid.
J. Appl. Genet. 49, 367–372.
- LOFFING, J. u. KAISSLING, B. (2003):
Sodium and calcium transport pathways along the mammalian distal nephron: from rabbit to human.
Am. J. Physiol. - Ren. Physiol. 284, F628–F643.
- LOFFING, J., LOFFING-CUENI, D., VALDERRABANO, V., KLÄUSLI, L., HEBERT, S., ROSSIER, B., HOENDEROP, J., BINDELS, R. u. KAISSLING, B. (2001):
Distribution of transcellular calcium and sodium transport pathways along mouse distal nephron.
Am. J. Physiol. 281, F1021–F1027.
- LOTINUN, S., LIMLOMWONGSE, L. u. KRISHNAMRA, N. (1998):
The study of a physiological significance of prolactin in the regulation of calcium metabolism during pregnancy and lactation in rats.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 76, 218–228.
- MACDONALD, P.N., DOWD, D.R., NAKAJIMA, S., GALLIGAN, M.A., REEDER, M.C., HAUSSLER, C.A., OZATO, K. u. HAUSSLER, M.R. (1993):
Retinoid X receptors stimulate and 9-cis retinoic acid inhibits 1,25-dihydroxyvitamin D₃-activated expression of the rat osteocalcin gene.
Mol. Cell. Biol. 13, 5907–5917.
- MAGAGNIN, S., WERNER, A., MARKOVICH, D., SORRIBAS, V., STANGE, G., BIBER, J., AND MURER, H. (1993):
Expression cloning of human and rat renal cortex Na/P_i cotransport.
Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 5979–5983.
- MAITI, A. u. BECKMAN, M.J. (2007):
Extracellular calcium is a direct effector of VDR levels in proximal tubule epithelial cells that counter-balances effects of PTH on renal Vitamin D metabolism.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 103, 504–508.
- MAITI, A., HAIT, N.C. u. BECKMAN, M.J. (2008):
Extracellular Calcium-sensing Receptor Activation Induces Vitamin D Receptor Levels in Proximal Kidney HK-2G Cells by a Mechanism That Requires Phosphorylation of p38 α MAPK.
J. Biol. Chem. 283, 175–183.

Literaturverzeichnis

- MARTINEZ, N., RISCO, C.A., LIMA, F.S., BISINOTTO, R.S., GRECO, L.F., RIBEIRO, E.S., MAUNSELL, F., GALVÃO, K. u. SANTOS, J.E.P. (2012):
Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease.
J. Dairy Sci. 95, 7158–7172.
- MARTZ, F.A., BELO, A.T., WEISS, M.F. u. BELYEA, R.L. (1999):
True absorption of calcium and phosphorus from corn silage fed to nonlactating, pregnant dairy cows.
J. Dairy Sci. 82, 618–622.
- MCDERMOTT, M.T., KIDD, G.S., BLUE, P., GHAED, V. u. HOFELDT, F.D. (1983):
Reduced Bone Mineral Content in Totally Thyroidectomized Patients: Possible Effect of Calcitonin Deficiency.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 56, 936–939.
- MEYER, M.B., WATANUKI, M., KIM, S., SHEVDE, N.K. u. PIKE, J.W. (2006):
The Human Transient Receptor Potential Vanilloid Type 6 Distal Promoter Contains Multiple Vitamin D Receptor Binding Sites that Mediate Activation by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in Intestinal Cells.
Mol. Endocrinol. 20, 1447–1461.
- MILLER, R. (2013):
Control of renal calcium, phosphate, electrolyte, and water excretion by the calcium-sensing receptor.
Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 27, 345–358.
- MOE, S.M., RADCLIFFE, J.S., WHITE, K.E., GATTONE, V.H., SEIFERT, M.F., CHEN, X., ALDRIDGE, B. u. CHEN, N.X. (2011):
The pathophysiology of early-stage chronic kidney disease-mineral bone disorder (CKD-MBD) and response to phosphate binders in the rat.
J. Bone Miner. Res. 26, 2672–2681.
- MOLLETT, T. u. MALVEN, P. (1982):
Chronological Profiles of Prolactin and Growth Hormone in Lactating Cows.
J. Dairy Sci. 65, 211–216.
- MORRIS, D., DIVERS, T. u. WHITLOCK, R. (1984):
Renal clearance and fractional excretion of electrolytes over a 24-hour period in horses.
Am. J. Vet. Res. 45, 2431–2435.
- MOTOYAMA, H. u. FRIEDMAN, P. (2002):
Calcium-sensing receptor regulation of PTH-dependent calcium absorption by mouse cortical ascending limbs.
Am. J. Physiol. - Ren. Physiol. 283, F399–F406.
- MÜLLER, D., HOENDEROP, J.G.J., MERKX, G.F.M., VAN OS, C.H. u. BINDELS, R.J.M. (2000):
Gene Structure and Chromosomal Mapping of Human Epithelial Calcium Channel.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 275, 47–52.

MURAYAMA, A., TAKEYAMA, K.-I., KITANAKA, S., KODERA, Y., KAWAGUCHI, Y., HOSOYA, T. u. KATO, S. (1999):
Positive and Negative Regulations of the Renal 25-Hydroxyvitamin D₃ 1 α -Hydroxylase Gene by Parathyroid Hormone, Calcitonin and 1 α ,25(OH)₂D₃ in Intact Animals.
Endocrinology 140, 2224–2231.

MURAYAMA, A., TAKEYAMA, K., KITANAKA, S., KODERA, Y., HOSOYA, T., AND KATO, S.(1998):
The Promoter of the Human 25-Hydroxyvitamin D₃ 1 α -Hydroxylase Gene Confers Positive and Negative Responsiveness to PTH, Calcitonin and 1 α ,25(OH)₂D₃.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 249, 11–16.

MURER, H. u. BIBER, J. (1997):
A molecular view of proximal tubular inorganic phosphate (P_i) reabsorption and of its regulation.
Pflugers Arch. 433, 379–389.

MURRAY, R.D., HOLTHOUSER, K., CLARK, B.J., SALYER, S.A., BARATI, M.T., KHUNDMIRI, S.J. u. LEDERER, E.D. (2013):
Parathyroid hormone (PTH) decreases sodium-phosphate cotransporter type IIa (NpT2a) mRNA stability.
Am. J. Physiol. - Ren. Physiol. 304, F1076–F1085.

MYRTLE, J.F., HAUSSLER, M.R. u. NORMAN, A.W. (1970):
Evidence for the biologically active form of cholecalciferol in the intestine.
J. Biol. Chem. 245, 1190–1196.

NAGANO, M. u. KELLY, P. (1994):
Tissue Distribution and Regulation of Rat Prolactin Receptor Gene Expression. Quantitative Analysis by Polymerase Chain Reaction.
J. Biol. Chem. 269, 13337–13345.

NEMERE, I. u. LARSSON, D. (2002):
Does PTH have a direct effect on intestine?
J. Cell. Biochem. 86, 29–34.

NEMERE, I., DORMANEN, M.C., HAMMOND, M.W., OKAMURA, W.H. u. NORMAN, A.W. (1994):
Identification of a Specific Binding Protein for 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ in Basal-Lateral Membranes of Chick Intestinal Epithelium and Relationship to Transcaltachia.
J. Biol. Chem. 269, 23750–23756.

NEMERE, I., SAFFORD, S.E., ROHE, B., DESOUSA, M.M. u. FARACH-CARSON, M.C. (2004):
Identification and characterization of 1,25D₃-membrane-associated rapid response, steroid (1,25D₃-MARRS) binding protein.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 89-90, 281–285.

NICOLL, D., LONGONI, S. u. PHILIPSON, K. (1990):
Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger.
Science 250, 562–565.

- NIJENHUIS, T., HOENDEROP, J.G.J., VAN DER KEMP, A.W.C.M. u. BINDELS, R.J.M. (2003):
Localization and Regulation of the Epithelial Ca²⁺ Channel TRPV6 in the Kidney.
J. Am. Soc. Nephrol. 14, 2731–2740.
- NIJENHUIS, T., RENKEMA, K.Y., HOENDEROP, J.G.J. u. BINDELS, R.J.M. (2006):
Acid-Base Status Determines the Renal Expression of Ca²⁺ and Mg²⁺ Transport Proteins.
J. Am. Soc. Nephrol. 17, 617–626.
- NISHIKI, K., TSURUOKA, S., WAKAUMI, M., YAMAMOTO, H., KOYAMA, A. u. FUJIMURA, A. (2003):
Dosing time-dependent variation in the hypocalcemic effect of calcitonin in rat.
Eur. J. Pharmacol. 460, 171–175.
- NYGREN, P., LARSSON, R., JOHANSSON, H., LJUNGHALL, S. u. RASTAD, J. (1988):
1, 25(OH)₂D₃ inhibits hormone secretion and proliferation but not functional dedifferentiation of cultured bovine parathyroid cells.
Calcif. Tissue Int. 43, 213–218.
- OETZEL, G. (1988):
Parturient paresis and hypocalcemia in ruminant livestock.
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pr. 4, 351–364.
- OHNISHI, M., NAKATANI, T., LANSKE, B. u. RAZZAQUE, M.S. (2009):
Reversal of mineral ion homeostasis and soft-tissue calcification of klotho knockout mice by deletion of vitamin D 1 α -hydroxylase.
Kidney Int. 75, 1166–1172.
- OHYAMA, Y., OZONO, K., UCHIDA, M., SHINKI, T., KATO, S., SUDA, T., YAMAMOTO, O., NOSHIRO, M. u. KATO, Y. (1994):
Identification of a Vitamin D-responsive Element in the 5'-Flanking Region of the Rat 25-Hydroxyvitamin D₃ 24-Hydroxylase Gene.
J. Biol. Chem. 269, 10545–10550.
- OKANO, T., TSUGAWA, N., MORISHITA, A. u. KATO, S. (2004):
Regulation of gene expression of epithelial calcium channels in intestine and kidney of mice by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 89-90, 335–338.
- OKAZAKI, T., IGARASHI, T. u. KRONENBERG, H. (1988):
5'-flanking region of the parathyroid hormone gene mediates negative regulation by 1,25(OH)₂ vitamin D₃.
J. Biol. Chem. 263, 2203–2208.
- OSSWALD, C., BAUMGARTEN, K., STUMPEL, F., GORBOULEV, V., AKIMJANOVA, M., KNOBELOCH, K.P., HORAK, I., KLUGE, R., JOOST, H.G. u. KOEPESELL, H. (2005):
Mice without the regulator gene *RSC1A1* exhibit increased Na⁺-D-glucose cotransport in small intestine and develop obesity.
Mol. Cell. Biol. 25, 78–87

Literaturverzeichnis

- PAULSON, S.K. u. LANGMAN, C. (1990):
Plasma vitamin D metabolite levels in pregnant and nonpregnant ewes.
Comp. Biochem. Physiol. 96A, 347–349.
- PEART, W.S., RODDIS, S.A. u. UNWIN, R.J. (1986):
Renal electrolyte excretion and renin release during calcium and parathormone infusions in conscious rabbits.
J. Physiol. 373, 329–341.
- PECHET, M.M., BOBADILLA, E., CARROLL, E.L. u. HESSE, R.H. (1967):
Regulation of bone resorption and formation: influences of thyrocalcitonin, parathyroid hormone, neutral phosphate and vitamin D₃.
Am. J. Med. 43, 696–710.
- PENG, J.-B., CHEN, X.-Z., BERGER, U.V., VASSILEV, P.M., TSUKAGUCHI, H., BROWN, E.M. u. HEDIGER, M.A. (1999):
Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption.
J. Biol. Chem. 274, 22739–22746.
- PERWAD, F. u. PORTALE, A.A. (2011):
Vitamin D metabolism in the kidney: Regulation by phosphorus and fibroblast growth factor 23.
Mol. Cell. Endocrinol. 347, 17–24.
- PERWAD, F., ZHANG, M.Y.H., TENENHOUSE, H.S. u. PORTALE, A.A. (2007):
Fibroblast growth factor 23 impairs phosphorus and vitamin D metabolism in vivo and suppresses 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase expression in vitro.
Am. J. Physiol. - Ren. Physiol. 293, F1577–F1583.
- PFISTER, M.F., LEDERER, E., FORGO, J., ZIEGLER, U., LÖTSCHER, M., QUABIUS, E.S., BIBER, J. u. MURER, H. (1997):
Parathyroid hormone-dependent degradation of type II Na⁺/P_i cotransporters.
J. Biol. Chem. 272, 20125–20130.
- PORTALE, A.A., HALLORAN, B.P., MURPHY, M.M., AND MORRIS JR, R.C. (1986):
Oral intake of phosphorus can determine the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D by determining its production rate in humans.
J. Clin. Invest. 77, 7–12.
- PUSCHETT, J.B., BECK JR, W.S., JELONEK, A. u. FERNANDEZ, P.C. (1974):
Study of the renal tubular interactions of thyrocalcitonin, cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate, 25-hydroxycholecalciferol, and calcium ion.
J. Clin. Invest. 53, 756.
- RACHEZ, C. u. FREEDMAN, L.P. (2000):
Mechanisms of gene regulation by vitamin D₃ receptor: a network of coactivator interactions.
Gene 246, 9–21.
- RACZ, A. u. BARSONY, J. (1999):
Hormone-dependent Translocation of Vitamin D Receptors Is Linked to Transactivation.
J. Biol. Chem. 274, 19352–19360.

Literaturverzeichnis

- RAMASAMY, I. (2006):
Recent advances in physiological calcium homeostasis.
Clin. Chem. Lab. Med. 44, 237-273
- RASMUSSEN, H., ANAST, C. u. ARNAUD, C. (1967):
Thyrocalcitonin, EGTA, and urinary electrolyte excretion.
J. Clin. Invest. 46, 746.
- RATCLIFFE, W., THOMPSON, G., CARE, A. u. PEAKER, M. (1992):
Production of parathyroid hormone-related protein by the mammary gland of the goat.
J. Endocrinol. 133, 87–93.
- RENKEMA, K.Y., NIJENHUIS, T., VAN DER EERDEN, B.C.J., VAN DER KEMP, A.W.C.M, WEINANS, H., VAN LEEUWEN, J.P.T.M, BINDELS, R.J.M. u. HOENDEROP, J.G.J. (2005):
Hypervitaminosis D Mediates Compensatory Ca²⁺ Hyperabsorption in TRPV5 Knockout Mice.
J. Am. Soc. Nephrol. 16, 3188–3195.
- RICCARDI, D., HALL, A., CHATTOPADHYAY, N., XU, J., BROWN, E. u. HEBERT, S. (1998):
Localization of the extracellular Ca²⁺/polyvalent cation-sensing protein in rat kidney.
Am. J. Physiol. 274, F611–F622.
- RICHTER, J. (2013):
Untersuchungen zum Einfluss der Laktation auf die gastrointestinale Calcium-und Phosphat-Absorption bei Schaf und Ziege.
Bibliothek der Tierärztlichen Hochschule Hannover.
- RODMAN, J., MOOSEKER, M. u. FARQUHAR, M. (1986):
Cytoskeletal proteins of the rat kidney proximal tubule brush border.
Eur. J. Cell. Biol. 42, 319–327.
- DE ROUFFIGNAC, C., MOREL, F., MOSS, N. u. ROINEL, N. (1973):
Micropuncture study of water and electrolyte movements along the loop of Henle in *Psammomys* with special reference to magnesium, calcium and phosphorus.
Pflugers Arch. 344, 309–326.
- ROUSE, D., NG, R.C. u. SUKI, W.N. (1980):
Calcium transport in the pars recta and thin descending limb of Henle of the rabbit, perfused in vitro.
J. Clin. Invest. 65, 37–42.
- ROY, D. u. SEELY, J. (1981):
Effect of glucose on renal excretion of electrolytes in the rat.
Am. J. Physiol. 240, F17–F24.
- SANDGREN, M.E. u. DELUCA, H.F. (1990):
Serum calcium and vitamin D regulate 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor concentration in rat kidney in vivo.
Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 4312–4314.

Literaturverzeichnis

- SCHAGGER, H. u. VON JAGOW, G. (1987):
Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.
Anal. Biochem. 166, 368–379.
- SCHRÖDER, B., SCHLUMBOHM, C., KAUNE, R. u. BREVES, G. (1996):
Role of calbindin-D_{9k} in buffering cytosolic free Ca²⁺ ions in pig duodenal enterocytes.
J. Physiol. 492, 715–722.
- SCHRÖDER, B., RITTMANN, I., PFEFFER, E. u. BREVES, G. (1997):
In vitro studies on calcium absorption from the gastrointestinal tract in small ruminants.
J. Comp. Physiol. B 167, 43–51.
- SCHRÖDER, B., VÖSSING, S. u. BREVES, G. (1999):
In vitro studies on active calcium absorption from ovine rumen.
J. Comp. Physiol. B 169, 487–494.
- SCHRYVER, H., CRAIG, P. u. HINTZ, H. (1970):
Calcium metabolism in ponies fed varying levels of calcium.
J. Nutr. 100, 955–964.
- SCHUSTER, I. (2011):
Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system.
Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics 1814, 186–199.
- SHAREGHI, G.R. u. AGUS, Z.S. (1982):
Magnesium transport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of the rabbit.
J. Clin. Invest. 69, 759–769.
- SHI, H., NORMAN, A.W., OKAMURA, W.H., SEN, A. u. ZEMEL, M.B. (2001):
1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ modulates human adipocyte metabolism via nongenomic action.
FASEB J. 15, 2751-2753
- SHIMADA, T., HASEGAWA, H., YAMAZAKI, Y., MUTO, T., HINO, R., TAKEUCHI, Y., FUJITA, T., NAKAHARA, K., FUKUMOTO, S. u. YAMASHITA, T. (2003):
FGF-23 Is a Potent Regulator of Vitamin D Metabolism and Phosphate Homeostasis.
J. Bone Miner. Res. 19, 429–435.
- SHINKI, T., JIN, C., NISHIMURA, A., NAGAI, Y., OHYAMA, Y., NOSHIRO, M., OKUDA, K. u. SUDA, T. (1992):
Parathyroid hormone inhibits 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase mRNA expression stimulated by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in rat kidney but not in intestine.
J. Biol. Chem. 267, 13757–13762.
- SHINKYO, R., SAKAKI, T., KAMAKURA, M., OHTA, M. u. INOUE, K. (2004):
Metabolism of vitamin D by human microsomal CYP2R1.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 324, 451–457.

- SILVER, J., NAVEH-MANY, T., MAYER, H., SCHMELZER, H.J. u. POPOVTZER, M.M. (1986):
Regulation by vitamin D metabolites of parathyroid hormone gene transcription in vivo in the rat.
J. Clin. Invest. 78, 1296–1301.
- SIMPSON, R.U. u. DELUCA, H.F. (1982):
Purification of chicken intestinal receptor for $1\alpha,25$ -hydroxyvitamin D_3 apparent homogeneity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 16–20.
- SITARA, D., RAZZAQUE, M.S., HESSE, M., YOGANATHAN, S., TAGUCHI, T., ERBEN, R.G., JUPPNER, H. u. LANSKE, B. (2004):
Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23 results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in *Phex*-deficient mice.
Matrix Biol. 23, 421–432.
- SONG, Y., PENG, X., PORTA, A., TAKANAGA, H., PENG, J.-B., HEDIGER, M.A., FLEET, J.C. u. CHRISTAKOS, S. (2003):
Calcium Transporter 1 and Epithelial Calcium Channel Messenger Ribonucleic Acid Are Differentially Regulated by $1,25$ Dihydroxyvitamin D_3 in the Intestine and Kidney of Mice.
Endocrinology 144, 3885–3894.
- SOOY, K., KOHUT, J. u. CHRISTAKOS, S. (2000):
The role of calbindin and $1,25$ dihydroxyvitamin D_3 in the kidney.
Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 9, 341–347.
- SØRENSEN, O.H. u. HINDBERG, I. (1972):
The acute and prolonged effect of porcine calcitonin on urine electrolyte excretion in intact and parathyroidectomized rats.
Acta Endocrinol. (Copenh.) 70, 295–307.
- DI STEFANO, A., WITTNER, M., NITSCHKE, R., BRAITSCH, R., GREGER, R., BAILLY, C., AMIEL, C., ROINEL, N. u. DE ROUFFIGNAC, C. (1990):
Effects of parathyroid hormone and calcitonin on Na^+ , Cl^- , K^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+} transport in cortical and medullary thick ascending limbs of mouse kidney.
Pflugers Arch. 417, 161–167.
- DI STEFANO, A., ROINEL, N., DE ROUFFIGNAC, C. u. WITTNER, M. (1993):
Transepithelial Ca^{2+} and Mg^{2+} transport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of the mouse is a voltage-dependent process.
Ren. Physiol. Biochem. 16, 157–166.
- SUKI, W., ROUSE, D., RC, N. u. KOKKO, J. (1980):
Calcium transport in the thick ascending limb of Henle. Heterogeneity of function in the medullary and cortical segments.
J. Clin. Invest. 66, 1004–1009.
- SUZUKI, M., ISHIBASHI, K., OOKI, G., TSURUOKA, S. u. IMAI, M. (2000):
Electrophysiologic Characteristics of the Ca-Permeable Channels, ECaC and CaT, in the Kidney.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 274, 344–349.

- SUZUKI, Y., LANDOWSKI, C.P. u. HEDIGER, M.A. (2008):
Mechanisms and Regulation of Epithelial Ca²⁺ Absorption in Health and Disease.
Annu. Rev. Physiol. 70, 257–271.
- SZEBENYI, D. u. MOFFAT, K. (1986):
The refined structure of vitamin D-dependent calcium-binding protein from bovine intestine.
Molecular details, ion binding, and implications for the structure of other calcium-binding
proteins.
J. Bio. Chem. 261, 8761–8777.
- TANAKA, Y. u. DELUCA, H. (1973):
The control of 25-hydroxyvitamin D metabolism by inorganic phosphorus.
Arch. Biochem. Biophys. 154, 566–574.
- TANAKA, Y., CHEN, T. u. DELUCA, H. (1972):
Dependence of 25-hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase regulation on RNA and protein
synthesis.
Arch. Biochem. Biophys. 152, 291–298.
- TANG, V. u. GOODENOUGH, D. (2003):
Paracellular ion channel at the tight junction.
Biophys. J. 84, 1660–1673.
- TAYLOR, M.S., KNOWLTON, K.F., MCGILLIARD, M.L., SWECKER, W.S.,
FERGUSON, J.D., WU, Z. u. HANIGAN, M.D. (2009):
Dietary calcium has little effect on mineral balance and bone mineral metabolism through
twenty weeks of lactation in Holstein cows.
J. Dairy Sci. 92, 223–237.
- THIEDE, M. (1989):
The mRNA encoding a parathyroid hormone-like peptide is produced in mammary tissue in
response to elevations in serum prolactin.
Mol. Endocrinol. 3, 1443–1447.
- THOMASSET, M., PARKES, C. u. CUISINIER-GLEIZES, P. (1982):
Rat calcium-binding proteins: distribution, development, and vitamin D dependence.
Am. J. Physiol. 243, E483–E488.
- THONGON, N., NAKKRASAE, L. -I., THONGBUNCHOO, J., KRISHNAMRA, N. u.
CHAROENPHANDHU, N. (2008):
Prolactin stimulates transepithelial calcium transport and modulates paracellular
permselectivity in Caco-2 monolayer: mediation by PKC and ROCK pathways.
Am. J. Physiol. - Cell Physiol. 294, C1158–C1168.
- THONGON, N., NAKKRASAE, L. -I., THONGBUNCHOO, J., KRISHNAMRA, N. u.
CHAROENPHANDHU, N. (2009):
Enhancement of calcium transport in Caco-2 monolayer through PKC-dependent Ca_v1.3-
mediated transcellular and rectifying paracellular pathways by prolactin.
Am. J. Physiol. - Cell Physiol. 296, C1373–C1382.

- TOKA, H.R., AL-ROMAIIH, K., KOSHY, J.M., DIBARTOLO, S., KOS, C.H., QUINN, S.J., CURHAN, G.C., MOUNT, D.B., BROWN, E.M. u. POLLAK, M.R. (2012):
Deficiency of the Calcium-Sensing Receptor in the Kidney Causes Parathyroid Hormone-Independent Hypocalciuria.
J. Am. Soc. Nephrol. 23, 1879–1890.
- TOPALA, C.N., SCHOEBER, J.P.H., SEARCHFIELD, L.E., RICCARDI, D., HOENDEROP, J.G.J. u. BINDELS, R.J.M. (2009):
Activation of the Ca^{2+} -sensing receptor stimulates the activity of the epithelial Ca^{2+} channel TRPV5.
Cell Calcium 45, 331–339.
- TSUKAMOTO, Y., SAKA, S. u. SAITOH, M. (1992):
Parathyroid hormone stimulates ATP-dependent calcium pump activity by a different mode in proximal and distal tubules of the rat.
Biochim. Biophys. Acta 1103, 163–171.
- TURNER, S.T., KIEBZAK, G.M. u. DOUSA, T.P. (1982):
Mechanism of glucocorticoid effect on renal transport of phosphate.
Am. J. Physiol. 243, C227–C236.
- ULUTAŞ, B., ÖZLEM, M.B., ULUTAŞ, P.A., EREN, V. u. PAŞA, S. (2003):
Fractional excretion of electrolytes during pre-and postpartum periods in cows.
Acta Vet. Hung. 51, 521–528.
- VARGHESE, S., LEE, S., HUANG, Y.-C. u. CHRISTAKOS, S. (1988):
Analysis of rat vitamin D-dependent calbindin- $\text{D}_{28\text{k}}$ gene expression.
J. Biol. Chem. 263, 9776–9784.
- VENNEKENS, R., HOENDEROP, J., PRENEN, J., STUIVER, M., WILLEMS, P., DROOGMANS, G., NILIUS, B. u. BINDELS, R. (2000):
Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca^{2+} channel.
J. Biol. Chem. 6, 3963–3969.
- VENNEKENS, R., PRENEN, J., HOENDEROP, J., BINDELS, R., DROOGMANS, G. u. NILIUS, B. (2001):
Modulation of the epithelial Ca^{2+} channel ECaC by extracellular pH.
Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. 442, 237–242.
- WALLING, M. (1977):
Intestinal Ca and phosphate transport: differential responses to vitamin D_3 metabolites.
Am. J. Physiol. 233, E488–E494.
- WALTERS, M.R., HUNZIKER, W. u. NORMAN, A.W. (1980):
Cytosol preparations are inadequate for quantitating unoccupied receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D_3 .
J. Recept. Res. 1, 313–327
- WALTERS, S., REINHARDT, T., DOMINICK, M., HORST, R. u. LITLEDIKE, E. (1986):
Intracellular location of unoccupied 1,25-dihydroxyvitamin D receptors: a nuclear-cytoplasmic equilibrium.
Arch. Biochem. Biophys. 246, 366–373.

Literaturverzeichnis

- WANG, W., KWON, T., LI, C., FROKIAER, J., KNEPPER, M. u. NIELSEN, S. (2002):
Reduced expression of Na-K-2Cl cotransporter in medullary TAL in vitamin D-induced hypercalcemia in rats.
Am. J. Physiol. - Ren. Physiol 282, F35–F44.
- WASSERMAN, R. u. TAYLOR, A. (1966):
Vitamin d3-induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa.
Science 152, 791–793.
- WEBER, K., ERBEN, R.G., RUMP, A. u. ADAMSKI, J. (2001):
Gene Structure and Regulation of the Murine Epithelial Calcium Channels ECaC1 and 2.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 289, 1287–1294.
- WHITING, S. u. QUAMME, G. (1984):
Effects of dietary calcium on renal calcium, magnesium and phosphate excretion by the rabbit.
Min. Electrolyte Metab. 10, 217–221.
- WILKENS, M.R. (2006):
Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zum transepithelialen Calcium-Transport beim Schaf.
Bibliothek der Tierärztlichen Hochschule Hannover.
- WILKENS, M.R., MROCHEN, N., BREVES, G. u. SCHRÖDER, B. (2010):
Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on calcium and phosphorus homeostasis in sheep fed diets either adequate or restricted in calcium content.
Domest. Anim. Endocrinol. 38, 190–199.
- WILKENS, M.R., MROCHEN, N., BREVES, G. u. SCHRÖDER, B. (2011):
Gastrointestinal calcium absorption in sheep is mostly insensitive to an alimentary induced challenge of calcium homeostasis.
Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 158, 199–207.
- WILKENS, M.R., RICHTER, J., FRASER, D.R., LIESEGANG, A., BREVES, G. u. SCHRÖDER, B. (2012):
In contrast to sheep, goats adapt to dietary calcium restriction by increasing intestinal absorption of calcium.
Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 163, 396–406.
- WILKENS, M.R., LIESEGANG, A., RICHTER, J., FRASER, D.R., BREVES, G. u. SCHRÖDER, B. (2014):
Differences in peripartal plasma parameters related to calcium homeostasis of dairy sheep and goats in comparison with cows.
J. Dairy Res. 81, 1–8.
- WITTNER, M., MANDON, B., ROINEL, N., DE ROUFFIGNAC, C. u. DI STEFANO, A. (1993):
Hormonal stimulation of Ca²⁺ and Mg²⁺ transport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of the mouse: evidence for a change in the paracellular pathway permeability.
Pflugers Arch. 423, 387–396.

- WONGDEE, K. u. CHAROENPHANDHU, N. (2013):
Regulation of epithelial calcium transport by prolactin: From fish to mammals.
Gen. Comp. Endocrinol. 181, 235–240.
- WU, S., FINCH, J., ZHONG, M., SLATOPOLSKY, E., GRIEFF, M. u. BROWN, A.J. (1996):
Expression of the renal 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase gene: regulation by dietary phosphate.
Am. J. Physiol. - Ren. Fluid Electrolyte Physiol. 271, F203–F208.
- XI, Q., WANG, S., YE, Z., LIU, J., YU, X., ZHU, Z., SU, S., BAI, J. u. LI, C. (2011):
Adenovirus-delivered microRNA targeting the vitamin D receptor reduces intracellular Ca²⁺ concentrations by regulating the expression of Ca²⁺-transport proteins in renal epithelial cells.
BJU Int. 107, 1314–1319.
- YAMAMOTO, M., DUONG, L., FISHER, J., THIEDE, M., CAULFIELD, M. u. ROSENBLATT, M. (1991):
Suckling-mediated increases in urinary phosphate and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate excretion in lactating rats: possible systemic effects of parathyroid hormone-related protein.
Endocrinology 129, 2614–2622.
- YATES, A.J., GUTIERREZ, G.E., SMOLENS, P., TRAVIS, P.S., KATZ, M.S., AUFDEMORTE, T.B., BOYCE, B.F., HYMER, T.K., POSER, J.W. u. MUNDY, G.R. (1988):
Effects of a synthetic peptide of a parathyroid hormone-related protein on calcium homeostasis, renal tubular calcium reabsorption, and bone metabolism in vivo and in vitro in rodents.
J. Clin. Invest. 81, 932.
- ZANATTA, L., ZAMONER, A., GONÇALVES, R., ZANATTA, A.P., BOURAÏMA-LELONG, H., BOIS, C., CARREAU, S. u. SILVA, F.R.M.B. (2011):
Effect of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in plasma membrane targets in immature rat testis: Ionic channels and gamma-glutamyl transpeptidase activity.
Arch. Biochem. Biophys. 515, 46–53.
- ZAWADA, E.T., TERWEE, J.A. u. MCCLUNG, D.E. (1986):
Systemic and renal vascular responses to dietary calcium and vitamin D.
Hypertension 8, 975–982.
- ZHANG, Y., LAI, W.-P., LEUNG, P.-C., CHE, C.-T. u. WONG, M.-S. (2008):
Improvement of Ca balance by Fructus Ligustri Lucidi extract in aged female rats.
Osteoporos. Int. 19, 235–242.
- ZIEROLD, C., REINHOLZ, G.G., MINGS, J.A., PRAHL, J.M. u. DELUCA, H.F. (2000):
Regulation of the Porcine 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-24-Hydroxylase (CYP24) by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and Parathyroid Hormone in AOK-B50 Cells.
Arch. Biochem. Biophys. 381, 323–327.
- ZIEROLD, C., MINGS, J., PRAHL, J., REINHOLZ, G. u. DELUCA, H. (2002):
Protein synthesis is required for optimal induction of 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase, osteocalcin, and osteopontin mRNA by 1,25-dihydroxyvitamin D₃.
Arch. Biochem. Biophys. 404, 18–24.

Literaturverzeichnis

ZITTERMANN, A., PROKOP, S., GUMMERT, J.F. u. BORGERMANN, J. (2013):
Safety issues of vitamin D supplementation.
Anti-Cancer Agents Med. Chem. Former. Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents 13, 4–10.

9. Anhang

A. Firmenverzeichnis

Firma	Anschrift
abcam[®]	Abcam plc, 330 Cambridge Science Park Cambridge, CB4 0FL, UK
Beckman Coulter GmbH	Europapark Fichtenhain B13, 47807 Krefeld
Bio-Rad Laboratories GmbH	Heidemannstrasse 164, 80939 München
Biozym Scientific GmbH	Steinbrinksweg 27, 31840 Hessisch Oldendorf
B. Braun Melsungen AG	D-34209 Melsungen
Enzo[®] Life Sciences, Inc.	Shanghai (S): Flat J, 10/F., Block B, Yue Da InterNAtional Plaza, 1118 Chang Shou Road, CN-20042
Eppendorf AG	Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg
GATC Biotech AG	GATC Biotech AG (Hauptsitz) European Genome and Diagnostics Centre Jakob-Stadler-Platz 7, 78467 Konstanz
GE Healthcare Europe GmbH	Munziger Str. 5, 79111 Freiburg
GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH	Schulze-Delitzsch-Straße 4, 30939 Burgwedel
GraphPad Software, Inc.	2236 Avenida de la Playa, La Jolla, CA 92037 USA
Heraeus Holding GmbH	Heraeusstraße 12-14, 63450 Hanau
(Invitrogen) Life Technologies GmbH	Frankfurter Straße 129 B, 64293 Darmstadt
PEQLAB Biotechnologie GmbH	Carl-Thiersch-Str. 2b, D-91052 Erlangen
Promega GmbH	Schildkrötstraße 15, 68199 Mannheim
Qiagen GmbH	Qiagen Straße 1, 40724 Hilden
Roche Applied Science	Sandhofer Str. 116, 68305 Mannheim
Roche Molecular Systems, Inc.	1080 U.S. 202, Branchburg, NJ 08876 USA
ROTH Carl Roth GmbH & Co. KG	Schoemperlenstraße 3-5, 76185 Karlsruhe
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Bergheimer Str. 89-2, 69115 Heidelberg
Sarstedt AG & Co	Sarstedtstraße, 51582 Nümbrecht
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Riedstrasse 2, 89555 Steinheim
swant Swiss antibodies	Postfach 327, 1723 Marly, Schweiz
Thermo Fisher Scientific, Inc.	81 Wyman Street, Waltham, MA 02454 USA
TIB Molbiol	Syntheselabor GmbH, Eresburgstr. 22-23 D-12103 Berlin
Upstate Biotechnology, Inc.	10 Old Barn Rd, Lake Placid NY New York, United States 12946

B. Selbst hergestellte Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Anodenpuffer	0,1 mol/l Tris pH 8,9
Blotting-Puffer	25 mmol/l Tris, basisch 192 mmol/l Glycin 20% v/v Methanol
Cytosolpräparationspuffer	10 mmol/l Tris-HCL 0,5 mmol/l EDTA 0,1% SDS 0,1 mmol/l PMSF: unmittelbar vor Anwendung dazugeben pH 7,4
Denaturierungspuffer „Hannover“ zweifach konzentriert	1 ml Glycerin 3 ml SDS [10%] 1,25 ml Sammelgelpuffer 0,5 ml gesättigte Bromphenolblau-Lösung ad 10 ml A. bidest. (steril)
Denaturierungspuffer “Hannover” vierfach konzentriert	2 ml Glycerin 3 ml SDS [20 %] 2,5 ml Sammelgelpuffer 1 ml gesättigte Bromphenolblau-Lösung ad 10 ml A. bidest. (steril)
Denaturierungspuffer “Lämmlı”	2 ml Glycerin 4 ml SDS [10%] 1 ml Tris-HCl [1 M] 0,5 ml gesättigte Bromphenolblau-Lösung ad 10 ml A. bidest. pH 6,8
Elektrophoresepuffer	25 mmol/l Tris, basisch 192 mmol/l Glycin 0,1 % SDS
Homogenisierungspuffer	20 mmol/l Tris 250 mmol/l Saccharose 5 mmol/l EGTA 5 mmol/l MgSO ₄ •7H ₂ O pH 7,5
Kathodenpuffer	0,1 mol/l Tris 0,1 mol/l Tricin 0,1% SDS
K-TED-Puffer	300 mmol/l KCl 50 mmol/l Tris, basisch 1,5 mmol/l EDTA 5 mmol/l DTT 0,8 mmol/l PMSF pH 7,4
PBS	137 mmol/l NaCl 3 mmol/l KCl 2 mmol/l KH ₂ PO ₄ 9 mmol/l Na ₂ HPO ₄

Anhang

PBST	1 ml Tween 20 ad 1000 ml PBS	
Ponceau Rot-Lösung	20 mg Ponceau 2R 10 ml Essigsäure (3%)	
Resuspensionspuffer	10 mmol/l Tris, basisch 150 mmol/l NaCl pH 7,4	
Sammelgelpuffer	1 mol/l Tris-HCl ad 100 ml A. bidest. pH 6,8	
SDS-Gel	<u>Sammelgel 4,75% (4 Gele)</u> 7,3 ml A. bidest. 1,25 ml ROTI-Gel 40 1,25 ml Sammelgelpuffer 100 µl SDS [10%] 100 µl APS-Lösung [10%] 5 µl TEMED	<u>Trenngel 8,5 % (4 Gele)</u> 6,66 ml A. bidest. 3,75 ml ROTI-Gel 40 6,48 ml Trenngelpuffer 171 µl SDS [10%] 138 µl APS-Lösung [10%] 13,8 µl TEMED
TED-Puffer	50 mmol/l Tris, basisch 1,5 mmol/l EDTA 5 mmol/l DTT 0,8 mmol/l PMSF pH 7,4	
Trenngelpuffer	1 mol/l Tris-HCl ad 100 ml A. bidest. pH 8,8	
Tricin-SDS-Gel	<u>Sammelgel 4% (4 Gele)</u> 1,25 ml ROTI-Gel 40 3,0 ml dreifach-Puffer 7,75 ml A. bidest. 90 µl APS-Lösung [10%] 9 µl TEMED	<u>Trenngel 16% (4 Gele)</u> 7,5 ml ROTI-Gel 40 6,0 ml dreifach-Puffer 1,8 g Glycerol 2,7 ml A. bidest. 60 µl APS-Lösung [10%] 6 µl TEMED

10. Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt und mir geholfen haben. Mein herzlicher Dank gilt:

... Herrn Prof. Dr. G. Breves für die finanzielle Unterstützung und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

... Herrn Apl. Prof. Dr. B. Schröder für die Überlassung des interessanten Themas und die fachliche Unterstützung.

... Frau Dr. Mirja Wilkens für die unglaublich tolle Betreuung und alles, was ich von Dir lernen durfte! Ohne Deine Hilfe bei allen Fragen und Problemen rund um Labor, Statistik, Vorträge, Publikation und Dissertation wäre das Projekt „Doktorarbeit“ wahrscheinlich längst noch nicht abgeschlossen. Vielen, vielen Dank nicht zuletzt auch für Deine beneidenswerte Gelassenheit und Deinen Humor angesichts verschiedener „Labor-Katastrophen“ und der versuchten „Entführung“ deines Hundes.

... Herrn Prof. David Fraser, für die überaus wertvollen Verbesserungsvorschläge für die englischsprachige Zusammenfassung dieser Arbeit.

... Frau Dr. Alexandra Muscher-Banse, für die Ratschläge in Bezug auf die VDR- und PTHR-Western Blot-Analysen und sonstige Labor-Problemchen.

... Frau Dr. Stefanie Klinger, für Deine Tipps und Tricks und das Lachen über meine offensichtlich doch nicht so gravierenden Probleme.

... Frau Karin Hustedt, Frau Nadine Schnepel und Frau Bärbel Leppich für Eure Unterstützung bei Laborarbeiten aller Art, eure Geduld und das Bewahren eines kühlen Kopfes in scheinbar aussichtslosen Situationen im Laboralltag.

... Frau Dr. Johanna Stahl, dafür, dass Du mir bereits im PJ so viel beigebracht hast und den Alltag im Doktorrandenzimmer durch Deine unvergleichliche Art, Sachverhalte darzustellen und zu kommentieren, um einiges unterhaltsamer gemacht hast.

... Frau Dr. Jana Horn, für Waffeln, Tiramisu und Hundespaziergänge und für Deine Vorbildfunktion in puncto „gelassen promovieren“.

... Frau Dr. Vera Rohne für unsere kurze, aber schöne gemeinsame Zeit im „kleinen Büro“ inklusiver zahlreicher Ratschläge zum Zitieren, Formatieren und zur Jobsuche.

... Frau Dr. Susanne Riede für Deine Besuche im kleinen Büro, die für mich immer eine willkommene Abwechslung waren. Und dafür, dass Du so genügsam meine Süßigkeiten-Reste verzehrt hast.

... den VMTA-Praktikantinnen Petty und Annegret für Eure Hilfe im Labor. Tausend Dank!

Danksagung

... allen Doktoranden, Studenten und Praktikanten im großen Doktorandenzimmer für eine sehr lustige Zeit, fachfremde und fachspezifische Diskussionen, gemeinsame Mensabesuche und verschiedene Formen des Feierabend-Entertainments.

... Kristin Elfers, die mir als Mitbewohnerin, Kollegin und als Freundin nicht nur in Bezug auf die Arbeit im Labor mit Rat und Tat zur Seite stand, sondern auch immer ein offenes Ohr für alle meine Sorgen hatte und sich für keinen noch so albernem Spaß zu schade war. Unser gemeinsamer Alltag wird mir sehr fehlen! Und: „3 ml sind schon wenig!“.

... Fredo, für die herausragende Vorbildfunktion als „Patient“ in der Übung „Herzultraschall und EKG beim Hund“ sowie das geduldige Warten und Füße-Wärmen unterm Schreibtisch.

... meiner Familie und meinen Freunden: Danke für Eure Unterstützung und Euer Vertrauen in meine Fähigkeiten und dafür, dass Ihr immer für mich da seid!

... und natürlich Tilo, für Alles!