

**Untersuchungen zur Bedeutung des
Vitamin D-Rezeptors für den Intestinaltrakt
am murinen Versuchsmodell**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Ernährungswissenschaften (Dr. troph.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät III
Agrar- und Ernährungswissenschaften,
Geowissenschaften und Informatik



der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Diplom-Ernährungswissenschaftler Hagen Kühne

geboren am 24.10.1983 in Frankfurt (Oder)

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. G. I. Stangl

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. K. Eder

Verteidigungstermin: 19.06.2017

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	I
TABELLENVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
1 EINLEITUNG	1
Vitamin D – Synthese und Metabolismus.....	1
Der Vitamin D-Rezeptor	2
Zum Einfluss des Vitamin D auf das Zytoskelett- und die Zellmorphologie	5
Zum Einfluss des Vitamin D auf die Epitheldurchlässigkeit des Intestinaltrakts	6
Die Vitamin D-Rezeptor-knockout-Maus.....	8
Ziele dieser Arbeit.....	9
2 MATERIAL & METHODEN	11
2.1 Einfluss des Vitamin D-Rezeptors auf das Proteomprofil von Dünndarmmukosa-zellen (Versuch I)	11
2.1.1 Versuchstiere und Diäten	11
2.1.2 Probennahme	11
2.1.3 Proteinextraktion für zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese und Western Blot Analysen	12
2.1.4 Zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese	13
2.1.5 Bestimmung der Triglyzerid- und Cholesterinkonzentrationen in Plasma und Leber	14
2.1.6 Untersuchungen zum Einfluss des Vitamin D-Versorgungsstatus auf intestinale Lipidtransporter sowie Plasma- und Leberlipide am Modelltier Ratte.....	17
2.1.7 Statistik Versuch I.....	18
2.2 Einfluss des Vitamin D-Rezeptors auf die Expression von Zelladhäsionsproteinen sowie der Morphologie des Darms (Versuch II)	19
2.2.1 Versuchstiere und Diäten	19
2.2.2 Probennahme	20
2.2.3 Histologische Untersuchungen des Dünndarms und Kolons	21
2.2.4 Statistik Versuch II.....	23
2.3 Einfluss des Vitamin D-Rezeptors auf die gastrointestinale Permeabilität des FITC-D (Versuch III)	23

2.3.1	Studiendesign, Probennahme und FITC-D Messung.....	23
2.4	Einfluss des Kalziumgehalts der Diät auf die Kalzium- und Parathormonkonzentrationen des Serums der Vitamin D-Rezeptor-<i>knockout</i>-Mäuse (Versuch IV).....	25
2.4.1	Studiendesign	25
2.4.2	Versuchstiere.....	25
2.4.3	Diäten	25
2.4.4	Probennahme und Statistik Versuch IV	27
2.5	Analysen	27
2.5.1	Analyse der Kalzium-, Phosphat- und Parathormonkonzentrationen in Plasma und Serum.....	27
2.5.2	Genotypisierung	29
2.5.3	Genexpressionsanalysen mittels <i>realtime</i> -RT-PCR.....	29
2.5.4	Analyse von relativen Proteinmengen mittels SDS-Page und Western Blot.....	33
3	ERGEBNISSE.....	36
3.1	Einfluss des Vitamin D-Rezeptors auf das Proteomprofil von Dünndarmmukosazellen (Versuch I).....	36
3.1.1	Gewichtsentwicklung und Futteraufnahme von Vitamin D-Rezeptor- <i>knockout</i> - und Wildtyp-Mäusen.....	36
3.1.2	Plasmakonzentrationen des Kalziums, anorganischen Phosphats und Parathormons.....	36
3.1.3	Ergebnisse der Proteomanalyse der Dünndarmmukosa von Vitamin D-Rezeptor- <i>knockout</i> - und Wildtyp -Mäusen	37
3.1.4	Verifikation der Proteomdaten mittels <i>realtime</i> -RT-PCR und Western Blot.....	41
3.1.5	Expressionsanalysen intestinaler Lipidtransporter sowie Triglyzerid- und Cholesterol-Konzentrationen in Plasma und Leber von VDR-KO- und WT-Mäusen.....	45
3.1.6	Plasmakonzentrationen von Vitamin D-Metaboliten, Expressionsanalysen intestinaler Lipidtransporter sowie Triglyzerid- und Cholesterol-Konzentrationen in Plasma und Leber von Ratten nach Fütterung verschiedener Vitamin D-Gehalte	46
3.2	Einfluss des Vitamin D-Rezeptors auf die Expression von Zelladhäsionsproteinen sowie der Morphologie des Darms (Versuch II)	48
3.2.1	Futteraufnahme, Gewichtsentwicklung sowie Kalzium-, Phosphat-, Parathormonkonzentrationen im Serum von VDR-KO- und WT-Mäusen	48
3.2.2	Ergebnisse der histologischen Untersuchungen des Darmes von VDR-KO- und WT-Mäusen.....	49
3.2.3	Ergebnisse der Protein- und mRNA-Expressions-Analysen von Dünndarm- und Kolon-Gewebeproben.....	56

3.3	Einfluss des Vitamin D-Rezeptors auf die gastrointestinale Permeabilität des FITC-D (Versuch III)	61
3.4	Einfluss des Kalziumgehalts der Diät auf die Kalzium- und Parathormonkonzentrationen des Serums der Vitamin D-Rezeptor-<i>knockout</i>-Maus (Versuch IV)	61
3.4.1	Auswertung der Futterraufnahme und Körpermassenentwicklung von VDR-KO-Mäusen bei Fütterung verschiedener Kalziummengen	61
3.4.2	Analyse der Serumkonzentration an Kalzium, Phosphat und Parathormon	62
4	DISKUSSION	65
5	ZUSAMMENFASSUNG	83
6	ANHANG	89
7	LITERATURVERZEICHNIS	90

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung des endokrinen Vitamin D-Systems.....	4
Abbildung 2:	Übersicht der Zell-Zell Kontakte intestinaler Epithelzellen.	7
Abbildung 3:	Darstellung bedeutender Zell-Matrix-Kontakt Formen.	8
Abbildung 4:	Proteinspot-Muster der Dünndarmmukosa von Vitamin D-Rezeptor- <i>knockout</i> - und Wildtyp-Mäusen nach zweidimensionaler Gelelektrophorese.	38
Abbildung 5:	Gegenüberstellung der differentiell exprimierten und identifizierten Proteine von Vitamin D-Rezeptor- <i>knockout</i> (VDR-KO)- und Wildtyp (WT)-Mäusen.....	40
Abbildung 6:	Analyse der relativen Proteinexpression des 37/67 kDa <i>laminin receptor</i> mittels Western Blot.	41
Abbildung 7:	Relative mRNA-Konzentrationen Extrazellulärmatrix assoziierter Faktoren der Dünndarmmukosa von Vitamin D-Rezeptor- <i>knockout</i> (VDR-KO)- und Wildtyp (WT)-Mäusen.	42
Abbildung 8:	Relative mRNA-Konzentrationen von Zellstress assoziierten Genen in der Dünndarmmukosa von Vitamin D-Rezeptor- <i>knockout</i> (VDR-KO)- und Wildtyp (WT)-Mäusen.....	44
Abbildung 9:	Relative mRNA-Konzentrationen von Fettsäure- und Steroltransportern von Vitamin D-Rezeptor- <i>knockout</i> (VDR-KO)- und Wildtyp (WT)- Mäusen.....	45
Abbildung 10:	Plasmakonzentrationen an 25(OH)D ₃ , 24,25(OH) ₂ D ₃ und 1,25(OH) ₂ D ₃ in Ratten mit unterschiedlicher Vitamin D-Zufuhr.....	47
Abbildung 11:	Relative mRNA-Konzentration von Lipidtransportern in der Dünndarmmukosa von Ratten mit unterschiedlicher Vitamin D-Zufuhr.	47
Abbildung 12:	Repräsentative histologische Aufnahmen der einzelnen Sektionen des Dünndarms von Vitamin D-Rezeptor- <i>knockout</i> (VDR-KO)- und Wildtyp (WT)-Mäusen.....	52
Abbildung 13:	Repräsentative histologische Querschnitte des distalen Kolons.....	53
Abbildung 14:	Mikrovillillänge duodенaler Enterozyten von Vitamin D-Rezeptor- <i>knockout</i> (VDR-KO)- und Wildtyp (WT)-Mäusen.....	54
Abbildung 15:	<i>Tight junction</i> Weite des duodenalen Enterozyten von Vitamin D-Rezeptor- <i>knockout</i> (VDR-KO)- und Wildtyp (WT)-Mäusen.....	55

Abbildung 16:	<i>Ezrin</i> -Expression in Duodenum und Kolon. Analyse der <i>ezrin</i> -Expression von Vitamin D-Rezeptor- <i>knockout</i> (VDR-KO)- und Wildtyp (WT)-Mäusen mittels.....	56
Abbildung 17:	<i>Realtime</i> -RT-PCR-Analysen von Zell-Zell-Kontakt-Proteinen der Dünndarmmukosa.	57
Abbildung 18:	Analyse ausgewählter Zell-adhäsionsproteine der Dünndarmmukosa.	58
Abbildung 19:	Relative mRNA- und Proteinkonzentrationen von Zelladhäsionsproteinen des distalen Kolons.	60
Abbildung 20:	Kalziumkonzentrationen im Serum von VDR-KO- und WT-Mäusen bei Fütterung verschiedener Kalziumzulagen.....	63
Abbildung 21:	Parathormonkonzentrationen im Serum von VDR-KO- und WT-Mäusen bei Fütterung verschiedener Kalziumzulagen.	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammensetzung der Diät aus Versuch I.....	12
Tabelle 2:	Zusammensetzung der Diät zur Erzeugung verschiedener Vitamin D-Versorgungsstadien im Modelltier Ratte	18
Tabelle 3:	Zusammensetzung der kommerziellen <i>Rescue</i> -Diät.....	20
Tabelle 4:	Kalzium- und Phosphorgehalte der Diäten in Versuch IV	26
Tabelle 5:	Zusammensetzung der Diät in Versuch IV	26
Tabelle 6:	Liste und Spezifikationen der verwendeten Primer aus dieser Arbeit.....	31
Tabelle 7:	Ablauf der <i>realtime</i> -RT-PCR.....	33
Tabelle 8:	Übersicht über die verwendeten Antikörper	35
Tabelle 9:	Futteraufnahme und Körpermassenentwicklung von Vitamin D-Rezeptor- <i>knockout</i> - und Wildtyp-Mäusen über acht Wochen bei Fütterung einer <i>Rescue</i> -Diät	36
Tabelle 10:	Plasmakonzentrationen des Kalziums, anorganischen Phosphats und Parathormons von Vitamin D-Rezeptor- <i>knockout</i> - und Wildtyp-Mäusen nach 8-wöchiger Fütterung einer kalzium- und phosphorreichen Diät	37
Tabelle 11:	Differentiell exprimierte Proteine der Dünndarmmukosa von Vitamin D-Rezeptor- <i>knockout</i> -Mäusen in Relation zu Wildtyp-Mäusen.....	39
Tabelle 12:	Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen in Plasma, Lipoproteinen und Leber von Ratten mit unterschiedlicher Vitamin D-Zufuhr	48
Tabelle 13:	Futteraufnahme, Gewichtsentwicklung und Kalzium-, Phosphat-, Parathormonkonzentrationen im Serum fünf Monate alter VDR-KO- und WT-Mäuse	49
Tabelle 14:	Körper- und Darmlängen fünf Monate alter VDR-KO- und WT-Mäuse.....	50
Tabelle 15:	Länge der Zotten und Tiefe der Krypten des Dünndarms und Kolons fünf Monate alter VDR-KO- und WT-Mäuse	51
Tabelle 16:	Futteraufnahme und Gewichtsentwicklung von VDR-KO-Mäusen bei Fütterung unterschiedlicher Kalziumzulagen	62
Tabelle 17:	Vitamin und Mineralstoffmischung der Diäten der Versuche I und IV	89

Abkürzungsverzeichnis

2D-DIGE	Zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese
Actb	β-Actin
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	Analysis of variance
ATP	Adenosintriphosphat
Ca	Kalzium
CaCO ₃	Kalziumkarbonat
CaHPO ₄	Dikalziumphosphat
CaSR	calcium sensing receptor
CD36	Cluster of differentiation 36/fatty acid translocase;
Cdh1 / E-Cad	E-Cadherin
cDNA	Copy Desoxyribonukleinsäure
CED	Chronisch entzündliche Darmkrankheiten
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
Cld	Claudin
Col6a1	Collagen type VI (alpha 1 chain)
CYP	Cytochrome P450
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSS	Dextran sodium sulfate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-QTOF-MS/MS	Electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazellulärmatrix
Ezr	Ezrin
F11r / JAM-A	F11 receptor / Junctional adhesion molecule A
Fabp2	Fatty acid binding protein 2, intestinal
FITC-D	Fluorescein Isothiocyanate markiertes Dextran
Gapdh	Glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase
Gclc	Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit

Gclm	Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit
Gsta	Glutathione S-transferase, alpha
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDL	High density lipoprotein
Hprt	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
HRP	Horseradish Peroxidase
Hsp90b1 / GRP94	Heat shock protein 90, beta, member 1 / 94 kDa glucose-regulated protein
Hspa5 / GRP78	Heat shock 70 kDa protein 5 / 78 kDa glucose-regulated protein
Hspa8 / Hsc70	Heat shock protein 8 / heat shock cognate 71 kDa protein
ICP-OES	Inductively coupled plasma optical emission spectrometry
I-FABP	Fatty acid-binding protein 2
ILBP	Ileal lipid-binding protein
IPG	Immobilized pH gradient
Itga6 / ITGA6	Integrin alpha-6
KO	Knock-out
Krt19 / K19	Keratin, type I cytoskeletal 19
LDL	Low density lipoprotein
MARRS	membrane associated rapid response steroid binding-receptor
MMP	Matrix metalloproteinase
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
Npc1l1	Niemann-Pick C1-Like 1
Nqo1	NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
Ocln	Occludin
P	Phosphor
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PEG	Polyethylenglycol
Pgls / 6PGL	6-Phosphogluconolactonase
Ppia	Peptidylprolyl isomerase A
Psme2 / PA28β	Proteasome activator subunit 2 (PA28 beta)
PTH	Parathormon
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpsa / 37/67LR	Ribosomal protein SA / 37/67 kDa laminin receptor

RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
RXR	9-cis Retinoid-X-Rezeptor
SAP	Sodiumacetate Puffer
Scarb1	Scavenger receptor class B, member 1
Scin	Scinderin (Adseverin)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20
Tjp1 / ZO-1	Tight junction protein 1 / Zona occludens protein 1
TNF-alpha	Tumor necrosis factor alpha
Tpm3	Tropomyosin 3
TRPV6	Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6
UPR	Unfolded protein response
v/v	Volume/Volume
Vcp/p97	Valosin-containing protein
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDRE	Vitamin D-responsive element
VLDL	Very low density lipoprotein
w/v	Weight/Volume
WT	Wildtyp
Ywhaz / 14-3-3 ζ/δ	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta / 14-3-3 protein zeta/delta

1 Einleitung

Vitamin D – Synthese und Metabolismus

Calciferol, besser unter dem Trivialnamen Vitamin D bekannt, wird den Vitaminen zugeordnet, obwohl es kein essentieller Wirkstoff ist, denn Vitamin D kann endogen in der Haut gebildet werden. Vitamin D ist das Endprodukt eines photochemischen Prozesses, bei dem die Ringstruktur des 7-Dehydrocholesterol (tierischen Ursprungs, Vitamin D₃) oder des Ergosterol (pflanzlichen Ursprungs, z.B. aus Pilzen; Vitamin D₂) energiereiche ultraviolette Strahlung (UVB $\lambda = 290-315$ nm) absorbiert und aufgebrochen wird. Hierbei entsteht zunächst das Zwischenprodukt Prävitamin D, welches anschließend durch eine thermische Reaktion zu Vitamin D isomerisiert wird. Chemisch zählen die verschiedenen Vitamin D-Metabolite zu den Secosteroiden und besitzen hormonelle Wirkungen, wodurch sie entscheidend an der Regulation des Kalzium- und Knochenstoffwechsels beteiligt sind.

Das endokrine Vitamin D-System umfasst ein Transportsystem (Vitamin D-bindendes Protein) für Vitamin D und dessen Metabolite, Enzyme zur Metabolisierung (Proteine aus der Cytochrom P450 Familie) und einen spezifischen Kernrezeptor zur transkriptionellen Regulation von Vitamin D-Zielgenen (Vitamin D-Rezeptor) (Bouillon and Suda, 2014).

Zur Überführung des Vitamin D in seine biologisch aktive Form bedarf es der Einführung von Hydroxylierungen an den Positionen 1 und 25 des Vitamin D-Moleküles (Holick, 2007). In der Leber entsteht zunächst das 25-hydroxy-Vitamin D. Diese Reaktion gilt als unreguliert und wird quantitativ durch das mikrosomale Enzym *Vitamin D 25-hydroxylase* CYP2R1 katalysiert. Auch andere Cytochrom P450-abhängige Enzyme wie CYP27A1, CYP3A4 und CYP2J3 sind zur 25-Hydroxylierung des Vitamin D befähigt (Zhu et al., 2013). Im proximalen Tubulus der Niere erfolgt schließlich die Bildung des 1,25-dihydroxy-Vitamin D (1,25(OH)₂D, Calcitriol) mittels des mitochondrialen Enzyms *25-hydroxyvitamin D 1-alpha-hydroxylase* (CYP27B1). Das gebildete 1,25(OH)₂D weist die höchste natürlich vorkommende Affinität zum Vitamin D-Rezeptor auf und wird aufgrund dessen als „aktive“ Form bezeichnet (Haussler et al., 1997). Die Katabolisierung der Vitamin D-Metabolite erfolgt initial durch die Oxidation ihrer Seitenketten. Es entstehen zunächst 24-hydroxy-Varianten (mitochondriale Vitamin D 24-hydroxylase (CYP24A1)) die in weiteren Enzymkaskaden zur Calcitronsäure oxidiert werden, die wiederum über die Gallenflüssigkeit aus dem Organismus eliminiert werden kann (Prosser and Jones, 2004). Die Menge an vorhandenem 1,25(OH)₂D wird durch transkriptionelle Regulation von Enzymen der Synthese (CYP27B1) als auch des Katabolismus (CYP24A1) bestimmt. Erkenntnisse der

jüngeren Vitamin D-Forschung haben zudem gezeigt, dass eine Vielzahl extrarenaler Zellen wie Kolon-, Prostata-, Mamma-, Gehirn-, Pankreas, glatte Gefäßmuskelzellen, T-Zellen und Makrophagen ebenfalls mit CYP27B1-Aktivität ausgestattet sind und $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Hewison et al., 2007; Holick, 2008) bilden. Anzumerken ist, dass das in der Niere gebildete $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ systemisch zur Verfügung gestellt wird, während extrarenal gebildetes $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ auf auto- oder parakrine Wirkungen beschränkt ist (Adams et al., 2014). Die vorrangige Funktion des Vitamin D ist die Aufrechterhaltung der physiologischen Kalzium-Konzentration des Blutes. Dies wird durch eine aktive Vitamin D-abhängige Regulation der Kalziumaufnahme im Dünndarm sowie der Regulation der Kalzium-Retention in der Niere erreicht (Bronner, 2003; Christakos, 2012). Die Gewährleistung einer optimalen Mineralisation des Knochens ist dabei der homöostatischen Regulation der Kalziumkonzentration des Blutes untergeordnet.

Der tägliche Vitamin D-Bedarf kann durch endogene Synthese durch Einwirkung von UVB-Strahlen des Sonnenlichtes in der Haut gedeckt werden. Dennoch wird die Vitamin D-Versorgung weltweit als unzureichend eingestuft und gilt sogar als pandemisches Gesundheitsrisiko (Holick, 2008). Es wird geschätzt, dass 50 – 80% der Gesamtbevölkerung unzureichende Vitamin D-Spiegel aufweisen (Holick, 2007; Zittermann, 2010). Ursache hierfür ist einerseits die eingeschränkte endogene Synthese in der Haut aufgrund zunehmender „Indoor“ Lebensweisen, hohem Alter, dem Grad der Bekleidung, Pigmentierung der Haut, geringer UVB-Intensität (in Abhängigkeit von Breitengrad, Jahres- und Tageszeit, Sonnenscheindauer, Luftverschmutzung), körperlicher Aktivität und Gesundheitszustand (Hagenau et al., 2009; Sinha et al., 2013). Des Weiteren muss bei fehlender endogener Vitamin D-Synthese der Vitamin D-Bedarf über eine sehr begrenzte Anzahl alimentärer Quellen gedeckt werden. Dahingehend zeigen Daten der Nationalen Verzehrsstudie, dass weniger als 15% der empfohlenen täglichen Zufuhrmenge von $20\ \mu\text{g}$ Vitamin D im Bevölkerungsquerschnitt Deutschlands aufgenommen werden (Hintzpeter et al., 2008).

Der Vitamin D-Rezeptor

Vitamin D ist neben der klassischen Regulation des Kalzium- und Knochenstoffwechsels auch an der Regulation einer Vielzahl verschiedenster Stoffwechselwege beteiligt ist. Zum aktuellen Stand der Forschung wird davon ausgegangen, dass Vitamin D an der Regulierung

von bis zu 5% der Gene des menschlichen Genoms beteiligt ist (Bouillon et al., 2008). Dabei werden dessen zelluläre Wirkungen fast ausschließlich durch den Vitamin D-Rezeptor (VDR) vermittelt. Der VDR wird der Typ II Klasse der nukleären Rezeptoren zugeordnet und ist ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor (Brown et al., 1999). Nach Bindung des Liganden im C-terminalen Bereich des VDR und der damit einhergehenden Konformationsänderung, erfolgt eine Heterodimerisierung mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR). Die Heterodimerisierung ist Voraussetzung für die Ausbildung von stabilen Verbindungen zur DNA und ermöglicht die Freilegung und Aktivierung der Co-Faktor-bindenden Domäne AF2 (*activation function-2*). Der aktivierte VDR-RXR Rezeptorkomplex erkennt und bindet über Zinkfinger motive spezifische Sequenzen der DNA, die sogenannten *vitamin D responsive elements* (VDRE), in den Promotorregionen von Vitamin D-Zielgenen. Die Nukleotidsequenz eines gegebenen VDRE determiniert im Weiteren, ob an der AF2 Domäne Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren rekrutiert werden, die ihrerseits den Kondensationsgrad der DNA durch Acetylierung und Methylierung beeinflussen und somit die Transkription eines Vitamin D-Zielgenes steigern oder vermindern (Haussler et al., 2013).

Nahezu alle Zellen des tierischen Organismus exprimieren den VDR und sind Vitamin D-responsiv. (als Ausnahmen gelten bisher z.B. „adulte“ Hepatozyten) (Haussler et al., 2013; Wang et al., 2012a).

Abhängig vom Zelltyp konnte bereits gezeigt werden, dass der VDR direkt oder indirekt in die Regulation fundamentaler zellulärer Prozesse involviert ist. So zeigten experimentelle Untersuchungen an Tumorzelllinien eine Regulation des Zellzyklus, eine anti-proliferative sowie eine die Differenzierung induzierende Wirkung des $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Dusso et al., 2005). Weiter ist bekannt, dass Vitamin D die Architektur des Zytoskeletts und die Expression membranständiger Adhäsionsproteine verändert und so die Morphologie als auch die Migrationsfähigkeit einer Zelle beeinflusst (Pendás-Franco et al., 2007). Darüber hinaus ist Vitamin D an der Regulation von Phase-I- und Phase-II-Enzymen des Fremdstoffmetabolismus beteiligt und unterstützt die Eliminierung von Schadstoffen und Xenobiotika (Saeki et al., 2008). Zudem wurde gezeigt, dass Vitamin D die Freisetzung anderer Hormone und Botenstoffe mitbestimmt. So wird z.B. die Sekretion des Insulin durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ erhöht, die renale Reninsekretion inhibiert (Li et al., 2004; Wolden-Kirk et al., 2011) oder die Sezernierung anti-inflammatorischer Zytokine aus T-Zellen gefördert (Hayes et al., 2015; Van Etten and Mathieu, 2005).

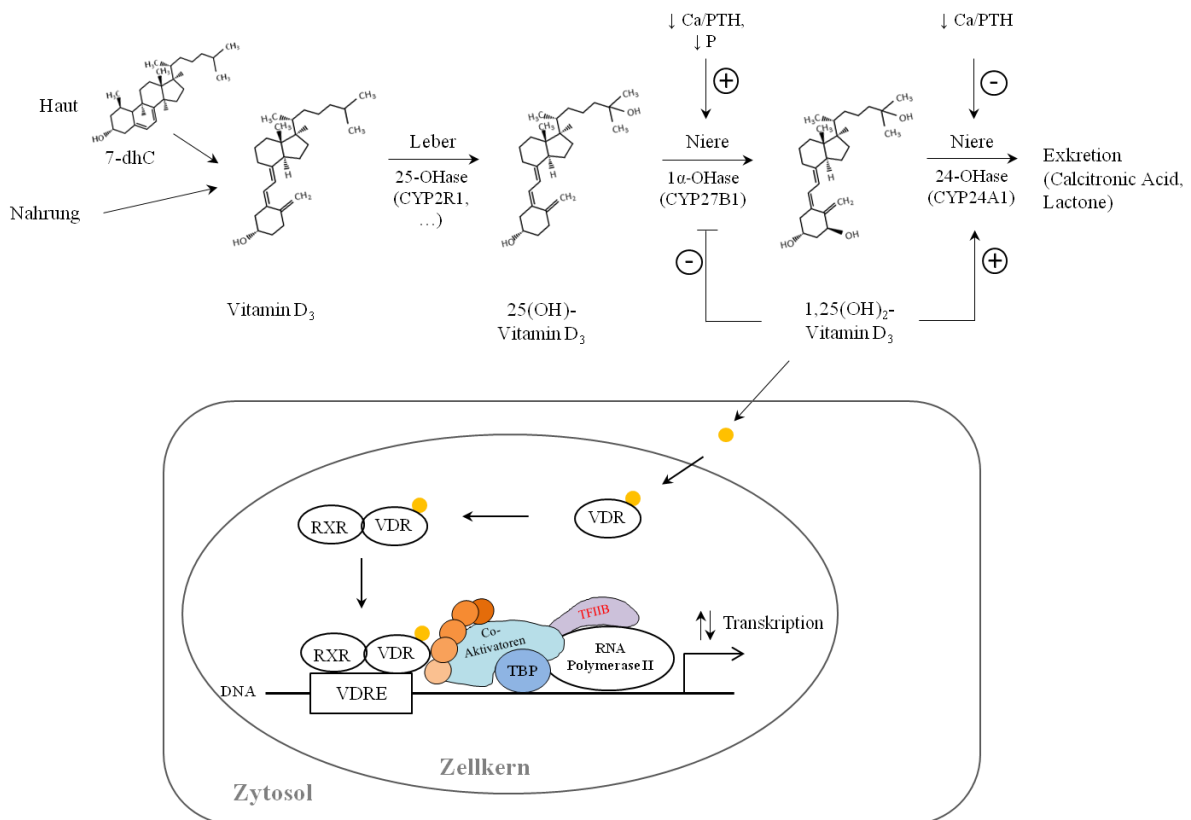


Abbildung 1: Schematische Darstellung des endokrinen Vitamin D-Systems. Vitamin D wird in der Epidermis aus 7-Dehydrocholesterol (7-dhC) synthetisiert oder über die Nahrung aufgenommen. Zur Bildung des aktiven Vitamin D-Hormones (1,25(OH)₂-Vitamin D) bedarf es einer ersten Hydroxylierung durch Cytochrome-P450 (CYP)-Enzyme in Hepatozyten und der anschließenden zweiten Hydroxylierung des Prohormons in den Tubulizellen der Niere. Nach Bindung des aktiven 1,25(OH)₂-Vitamin D an den Vitamin D-Rezeptor (VDR) erfolgt eine Heterodimerisierung mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR). Der VDR:RXR Komplex kann anschließend an sogenannte „Vitamin D response elements“ (VDRE) in der Promotorregion Vitamin D regulierter Gene binden. Es kommt zur Rekrutierung von Co-Regulatoren und Komponenten des RNA-Polymerase II Initiationskomplexes die die Transkription entsprechender Gene entweder fördern (Co-Aktivatoren) oder inhibieren (Co-Repressoren). Modifiziert nach Christakos et. al 2015.

Angesichts der vielfältigen biologischen Effekte, von denen hier nur einige exemplarisch aufgeführt wurden und der hohen Prävalenz eines Vitamin D-Mangels wird zunehmend die klinische als auch therapeutische Relevanz des Vitamin D diskutiert. Nach aktuellem Wissensstand gilt der Mangel an Vitamin D oder eine erniedrigte VDR-Proteinmenge, als Risikofaktor für die Entstehung einer Vielzahl verschiedener Krankheiten (Hossein-nezhad et al., 2013; Ramagopalan et al., 2010). Dazu zählen Krebserkrankungen (Mamma-, Prostata-, Kolon-Karzinomen) (Deeb et al., 2007), Diabetes Mellitus Typ I und Typ II (Pilz et al., 2013), Metabolisches Syndrom (Awad et al., 2012) sowie auf das Immunsystem bezogene Erkrankungen (Lang and Aspinall, 2015).

Zum Einfluss des Vitamin D auf das Zytoskelett- und die Zellmorphologie

Aus der Literatur heraus erben sich konkrete Hinweise, dass die Morphologie einzelner Zelltypen und vereinzelt sogar die übergeordnete Organarchitektur durch Vitamin D beeinflusst wird. Die Morphologie einer Zelle ist Ausdruck der strukturellen Organisation des Zytoskeletts und beruht im wesentlichen auf dem Arrangement und dem dynamischen Umbau von Mikrofilamenten, wie dem Aktin und Intermediärfilamenten, wie den Zytokeratinen (Pollard and Cooper, 2009).

In *in-vitro* Experimenten konnte nach Inkubation mit Vitamin D oder entsprechender Vitamin D-Analoga Veränderungen des Zellphänotypes beobachtet werden. Als Beispiel sei hier auf eine Studie an der humanen Brustkrebs Zelllinie MDA-MB-453 von Pendàs-Franco und Mitarbeitern verwiesen. Der Einsatz von hoch konzentriertem $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ induzierte bei diesen Zellen einen Wechsel der nativen sphärischen Zellform hin zu einer sternförmigen Struktur (Pendàs-Franco et al., 2007). Als Ursache wurde eine Vitamin D-bedingte Neuordnung der zytoskelettalen Strukturfilamente Aktin und Tubulin beschrieben. Diese Studie war eine der Ersten, die einen klaren Zusammenhang zwischen Vitamin D und der Morphologie einer Zelle, als Folge einer Beeinflussung zytoskelettaler Elemente, beschrieben hat. In Prostata-Karzinomzellen (Kelsey et al., 2014), bronchialen Epithelzellen (Brockman-Schneider et al., 2014) und dendritischen Zellen (Ferreira et al., 2009) wurden später ebenfalls morphologische Veränderungen nach Vitamin D-Behandlung beobachtet. Hinzu kommt eine Reihe anderer Studien, wie an Osteoblasten (Gronowicz, 1986; Lomri A, 1990), embryonalen und synovialen Fibroblasten (Brackman D, Trydal T, Lillehaug JR, 1992; Laragione et al., 2012)(Laragione et al., 2012), Podozyten (Chandel et al., 2013), glatten Muskelzellen (Morelli et al., 2007; Tukaj C, Bohdanowicz J, 2004) und T-Lymphozyten (Topilski et al., 2004), in denen Vitamin D-Effekte auf die Expression zytoskelettaler Proteine festgestellt wurden. In der kürzlich von Max und Mitarbeitern (2014) publizierte Studie, konnte zudem gezeigt werden, dass ein Vitamin D-Mangel direkt die Architektur des Skelettmuskelgewebes verändert (Max et al., 2014). Die in dieser Studie durchgeführten histologischen Untersuchungen der Skelettmuskulatur Vitamin D-defizienter Ratten zeigten einen reduzierten Muskelfaserumfang und einen erhöhten Anteil intermuskulären Bindegewebes (Max et al., 2014). Auch in früheren Untersuchungen an Vitamin D-defizienten Ratten wurde ein Einfluss auf Proteine des Zytoskeletts durch Vitamin D festgestellt. Dabei wurde unter anderem eine Wirkung auf die Genexpression- und/oder Proteinmenge des *β -actin*, *tubulin*, der *myosin heavy chain*, *α -internexin*, *keratin KA14* sowie dem *microtubule associated protein 2* nachgewiesen (Almeras et al., 2007; Eyles et al., 2007).

Der Enterozyt des Dünndarms ist ein hochspezialisierter Zelltypus, dessen Funktionalität maßgeblich durch die Architektur des Zytoskeletts bestimmt wird. Durch die Anordnung der strukturgebenden Filamente wird eine Polarisierung des Enterozyten in zwei funktionale Kompartimente bewirkt (Fath et al., 1993; Höfer et al., 1998). Während apikal die Resorption von Nahrungsbestandteilen erfolgt, finden auf der basolateralen Seite Transport-, Synthese- und Exportprozesse statt. Der Enterozyt ist weiterhin durch das Auftreten zahlreicher zytoplasmatischer Fortsätze auf der apikalen Seite, den Mikrovilli, gekennzeichnet. Sie dienen der Vergrößerung der resorptiven Oberfläche und bestehen aus Bündeln von Aktinfilamenten mit hohem Ordnungsgrad. Das Zytoskelett sorgt zugleich für die mechanische Stabilität des epithelialen Zellverbandes gegenüber den hohen Abriebkräften, die durch den Chymustransit hervorgerufen werden. Mikro- und Intermediärfilamente benachbarter Zellen werden hierbei indirekt mittels *adherence junction* und *desmosomen* aneinander gekoppelt. *Hemidesmosomen* verankern den Enterozyten wiederum an Matrixbestandteile der Basalmembran.

Zum Einfluss des Vitamin D auf die Epitheldurchlässigkeit des Intestinaltrakts

Darmepithelzellen bilden durch Zelladhäsionsproteine einen dichten Verband, der den Organismus gegen die Umwelt abgrenzt. Eine erhöhte Durchlässigkeit dieser Barriere kann die Translokation von Bakterien und deren Toxinen, wie auch von Nahrungsbestandteilen durch die Darmwand, begünstigen. Die Folgen sind lokale Entzündungen und Gewebeschäden, die ihrerseits die Darmbarriere weiter beeinträchtigen. Bei dauerhafter Schädigung des Darmgewebes kann es zu Absorptionsdefiziten und der Ausbildung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie z.B. Colitis Ulzerosa (Coskun, 2014) und sogar zu Leberschäden (Schnabl and Brenner, 2014) kommen.

Epitheliale Zell-Kontakte des Darmes werden in drei übergeordnete Klassen, den *tight junctions*, *adherens junctions* und *gap junctions*, eingeteilt (Abbildung 2). *Tight junctions* sind die kritischste Komponente der Darmbarriere. Sie bestehen aus vernetzten Membranproteinen benachbarter Zellen, verschließen den interzellulären Zwischenraum und limitieren die parazelluläre Diffusion durch Bildung von größen- und ionenselektiven Poren (Runkle and Mu, 2013). In Kooperation mit assoziierten Proteinen bewirken sie ebenfalls die Polarisierung der Epithelzelle in einen apikalen und einen basolateralen Bereich (Schneeberger and Lynch, 2004; Shin et al., 2006). Zu den bedeutendsten Proteinen der *tight junctions* zählen Occludin

sowie verschiedene Vertreter aus der Claudin- und Zonula Occludens-Proteinfamilie (Jeon et al., 2013). *Adherens junctions* umfassen eine Gruppe von Adhäsionsverbindungen. Zu ihnen gehören die *zonula adherense* (Adhäsionsgürtel) sowie Desmosomen und Hemidesmosomen. Sie alle verbinden Bestandteile des Zytoskelettes (Aktin- oder Keratinfilamente) einer Zelle, mit denen einer benachbarten Zelle oder mit Bestandteilen der Basalmembran und erhöhen so die mechanische Integrität des Zellverbandes. Die wichtigsten Proteine, die an der Zell-Zell Verankerung beteiligt sind, sind Cadherine, Catenine sowie Junctional adhesion molecules (JAMs). Proteine aus der Familie der Integrine oder wie der *37/67 kDa laminin receptor* erhöhen den Kontakt zur Basalmembran (Jeon et al., 2013; Khalfaoui et al., 2013). *Gap junctions* bilden hingegen porenartige Verbindungskanäle, die den Stoff- und Signalaustausch zwischen Zellen ermöglichen.

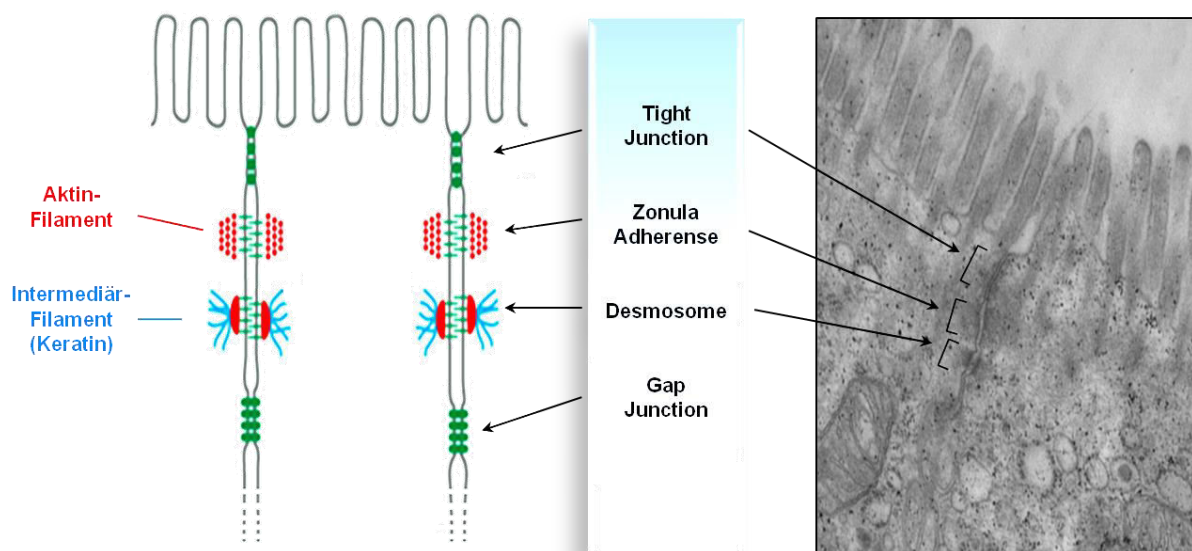


Abbildung 2: Übersicht der Zell-Zell Kontakte intestinaler Epithelzellen. Rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahme von jejunalen Epithelzellen einer C57BL/6J (Wildtyp-) Maus der Arbeitsgruppe Stangl in Kooperation mit der Abteilung für Bildgebende Verfahren der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg [Abbildung Zytoskelet incl. Mikrovilli]

In der Literatur wird davon ausgegangen, dass Vitamin D an der Etablierung der Darmbarriere beteiligt ist. Palmer und Mitarbeiter (2001) haben *in-vitro* Studie an humanen Kolon-Karzinomzellen zeigen können, dass durch die Inkubation mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sowohl Bestandteile der *tight junctions* (*occludin*, *claudin*, *zonula occludens* [ZO]-1, ZO-2) als auch der *adherence junctions* (*E-Cadherin*, *vinculin*) verstärkt exprimiert werden (Palmer, 2001). Erste *in-vivo* Experimente, die die Epithelintegrität des Darmes untersuchten, stammen von Kong et al. 2008 (Kong et al., 2008). Diese Arbeitsgruppe hat VDR-KO-Mäuse und WT-

Mäuse mit Natriumdextransulfat behandelt, einer Substanz die *tight junctions* schädigt und so eine Colitis Ulzerosa hervorruft. Die aus diesen Versuchen stammenden Ergebnisse zeigten, dass VDR-KO-Mäuse deutlich stärkere Entzündungen im Bereich der Darmwand entwickelten als WT-Mäuse. Auf Basis dieser Ergebnisse, ist eine direkte Wirkung von Vitamin D auf die Darmbarriere zu vermuten. In Zellmodellen des Darmes war ein Vitamin D-Defizit mit einer erhöhten parazellulären Epitheldurchlässigkeit verbunden sowie mit einer verminderten Bildung der *tight junction* Proteine Claudin-1 und Claudin-2 (Kong et al., 2008). Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen die Studien von Zhao und Mitarbeitern (2012) und Kim und Mitarbeitern (2013), die ebenfalls an Natriumdextransulfat induzierten Colitis-Modellen, eine direkte Wirkung des Vitamin D auf die Darmbarriere beschrieben.

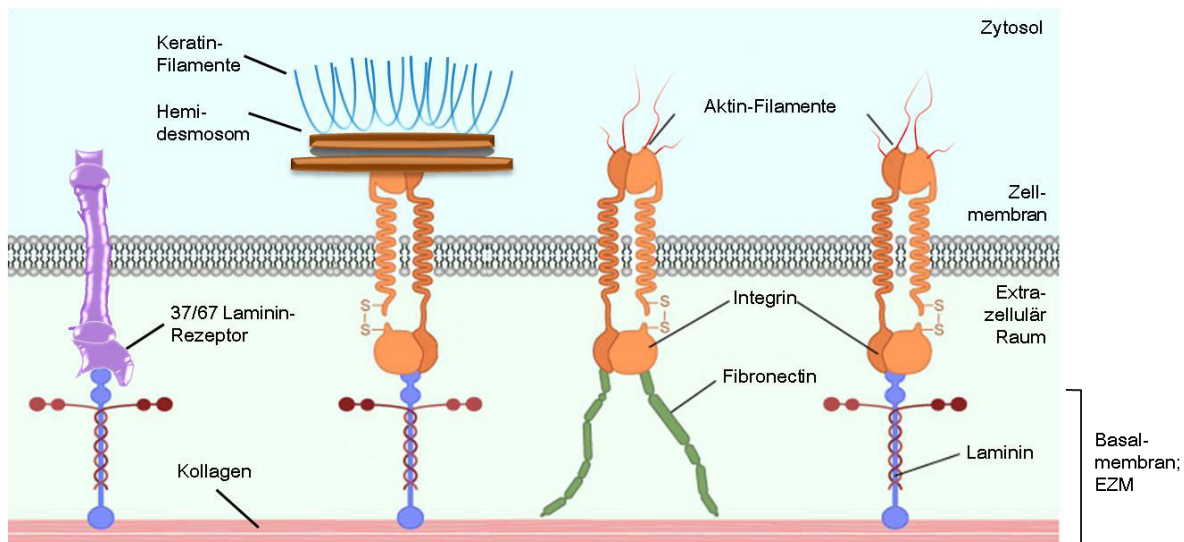


Abbildung 3: Darstellung bedeutender Zell-Matrix-Kontakt Formen. Abbildung modifiziert nach: Department of Biology - Pennsylvania State University, USA

Die Vitamin D-Rezeptor-knockout-Maus

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden am Vitamin D-Rezeptor-*knockout* (KO)-Maus Versuchsmodell durchgeführt. Dieses spezielle Mausmodell wurde 1997 von Li und Mitarbeitern etabliert und ist seither bevorzugtes Versuchsobjekt für die Aufklärung von *in-vivo* Vitamin D-Effekten und Wechselwirkungen. Diese VDR-KO-Mauslinie wurde durch die Deletion des für den zweiten Zinkfinger codierenden DNA-Abschnitts der DNA-bindenden Domäne des VDR generiert. Dadurch wurde eine Leserasterverschiebung verursacht, die zu einem frühzeitigen Abbruch der VDR-

Gentranskription führte (Li et al., 1997). Es wird somit kein VDR-Protein gebildet. Der VDR-Verlust zeigt aber keinen Einfluss auf die Reproduktion dieser Mäuse. Die natürliche Konsequenz des fehlenden VDR äußert sich primär in einer Hypokalziämie, die durch die verminderte intestinale Kalziumresorption und die eingeschränkte renale Reabsorption bedingt ist. Infolgedessen kommt es zum kompensatorischen Anstieg des Parathormonspiegels (sekundärer Hyperparathyreoidismus) und einer damit einhergehenden Kalziummobilisation im Knochen. Dies hat einen rachitischen Phänotyp (hereditäre Vitamin D-resistente Rachitis Typ II) zur Folge. Da der VDR ebenfalls essentiell an der Regeneration von epidermalen Haarfollikeln beteiligt ist, setzt mit zunehmendem Alter der Verlust der Körperbehaarung (Alopezie) ein (Teichert et al., 2010). Weiterhin wurden Minderwuchs, arterielle Hypertension, Herzhypertrophie (Bouillon et al., 2008; Demay, 2013) sowie eine allgemein reduzierte Lebenserwartung (beschrieben durch den Züchter: <http://jaxmice.jax.org>) bei VDR-KO-Mäusen beobachtet. Aus diesem Grund wird bei der Arbeit an diesem Tiermodell die Fütterung einer *Rescue*-Diät empfohlen, mit der das Kalziumdefizit der VDR-KO-Mäuse reduziert werden soll.

Ziele dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit dient der Findung und Beschreibung von nicht-klassischen Vitamin D-Effekten in Mukosazellen des Dün- und Dickdarms. Der Intestinaltrakt zählt zu den primären Vitamin D-Zielgeweben und zeichnet sich durch die quantitativ höchste VDR-Proteinexpression des Körpers aus (Wang et al., 2012b). In Anbetracht der vielfältigen biologischen Wirkungen des Vitamin D entstand daher die Hypothese, dass die Auswirkungen eines Vitamin D-Mangels besonders im Darm zu deutlichen Veränderungen führen könnten, die wiederum die Funktionalität des Darms nachteilig beeinflussen.

Die wesentlichen Funktionen des Darms sind die Absorption von Nahrungsbestandteilen und die Bildung einer Barriere gegenüber der Außenwelt. Es ist bereits seit langem bekannt, dass ein Vitamin D-Mangel die Aufnahme von Kalzium stark beeinträchtigt. Bisher kaum untersucht ist jedoch, welche Rolle Vitamin D für die Barrierefunktion des Darms und die Zellphysiologie des Enterozyten spielt. Der Enterozyt ist die zentrale Funktionseinheit des Darms, in der die Nährstoffabsorption und auch die Barrierebildung stattfinden. Im Mittelpunkt der folgenden Untersuchungen stand damit die Frage, wie sich ein ausgeprägter Vitamin D-Mangel, in Form eines VDR-KO, auf das Proteinprofil des Enterozyten auswirkt.

Da Vitamin D sowohl mit der Durchlässigkeit von Epithelien als auch mit der Regulation zytoskeletaler Proteine assoziiert wurde, galt besondere Aufmerksamkeit der Expression von Adhäsionsproteinen und der morphologischen Ausprägung des Enterozyten sowie des Darms. Zur Aufklärung dieser Fragen wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Zunächst wurde untersucht, welche Proteine durch den Verlust des VDR in ihrer Expression beeinflusst werden. Dazu wurden die Proteomprofile von Dünndarmmukosazellen von VDR-KO-Mäusen mit denen von Wildtyp (WT)-Mäusen verglichen.

Um das Auftreten VDR-KO bedingter morphologischer Veränderungen charakterisieren zu können, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen des duodenalen Enterozyten von VDR-KO- und WT-Mäusen verglichen sowie lichtmikroskopische Vergleiche der Darmabschnitte Duodenum, Jejunum, Ileum und des distalen Kolons von VDR-KO-Mäusen und WT-Mäusen durchgeführt.

Daran anknüpfend sollte die Frage geklärt werden, inwieweit Vitamin D für die Integrität der Darmbarriere relevant ist. Bisher wurden Untersuchungen zur Wirkung des Vitamin D auf die Darmdurchlässigkeit nahezu ausschließlich an Modellen mit chemisch-induzierter Darmentzündung durchgeführt. Es fehlen jedoch Daten, die den Einfluss des Vitamin D auf die Barriere eines nicht entzündlich veränderten Darms beschreiben. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob ein VDR-Defizit als alleiniges Merkmal ausreicht, um Veränderungen der Epithelintegrität des Darms hervorzurufen. Zu diesem Zweck wurde der parazelluläre Übertritt eines Permeabilitätsmarkers bestimmt, der apikale Abstand benachbarter Enterozyten ausgemessen sowie mRNA-Konzentrationen und Proteinmengen von Adhäsionsproteinen der *tight junctions* und *adherence junctions* bestimmt.

Im abschließenden Teil dieser Arbeit sollte auf die gestörte Kalziumaufnahme im VDR-KO-Mausmodell eingegangen werden. Zwar wurde in allen in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit VDR-KO-Mäusen eine *Rescue*-Diät zur Reduktion des Kalziumdefizits eingesetzt, jedoch blieb hierbei ungeklärt, ob eine Normalisierung der Kalzium- und Parathormonkonzentrationen im Serum der eingesetzten VDR-KO-Mäuse auf alimentärem Wege möglich ist. Um dieser Frage nachzugehen, sollten geeignete Kalziumzulagen in der Diät gefunden werden. Unter Berücksichtigung der Kalziumbedarfsvorgaben des American Institut of Nutrition (AIN-93G) für Nager (0,5% Kalzium (Reeves et al., 1993)) und der Literaturempfehlung der *Rescue*-Diät (2% Kalzium, Li et al, 1997), wurden daher verschiedene Diäten mit einem Kalziumanteil von 0,5% bis 4% an VDR-KO-Mäuse verfüttert und deren Wirkungen auf den Serumkalziumstatus ausgewertet.

2 Material & Methoden

2.1 Einfluss des Vitamin D-Rezeptors auf das Proteomprofil von Dünndarmmukosazellen (Versuch I)

2.1.1 Versuchstiere und Diäten

Diese Studie diente der Identifizierung von VDR beeinflussten Proteinen und deren Einordnung in die entsprechenden Zellprozesse. Dazu wurde das Proteinexpressionsprofil von Zellen der Dünndarmmukosa von VDR-KO-Mäusen mit dem von WT-Mäusen verglichen. Hierfür wurden sechs männliche VDR-KO-Mäuse (B6.129S4-Vdr^{tmlMbd}/J; Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) mit sechs männlichen WT-Mäusen (C57BL/6J; Charles River Laboratories; Sülzfeld, Deutschland) verglichen. Alle Mäuse erhielten über einen Zeitraum von acht Wochen eine sogenannte *Rescue*-Diät. Diese Diät zeichnet sich durch erhöhte Kalzium- (2%) sowie Phosphorgehalte (1,25%) aus und wurde mit Laktose (20%) angereichert. Entwickelt wurde diese Diät von Li und Mitarbeitern (1998) um den Kalziumstatus der VDR-KO-Mäuse zu verbessern und einer Rachitis vorzubeugen (Li et al., 1998). Eine Übersicht der Hauptkomponenten der Diät ist in Tabelle 1 aufgeführt. Die Vitamin-, Mineralstoff- und Spurenelementzusammensetzung (außer Kalzium und Phosphat) entsprach den Empfehlungen für wachsende Nager (Reeves et al., 1993) und ist im Anhang detailliert aufgeführt (Tabelle 17). Zu Beginn des Versuches waren die Tiere 4 bis 7 Wochen alt. Alle Tiere wurden unter konstanten klimatischen Bedingungen gehalten. Die Raumtemperatur betrug $22 \pm 1^\circ\text{C}$, die Luftfeuchte betrug 50 – 60%. Für die Versuchsdauer befanden sich die Tiere einzeln in Makrolon-Käfigen. Der Hell-/Dunkel-Rhythmus am Tag betrug jeweils 12 Stunden. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser (*ad libitum*). Die Haltungsbedingungen, der Umgang mit Versuchstieren sowie alle angewandten Prozeduren entsprachen dem geltenden Tierschutzrecht und wurden von der Tierschutzkommission des Landes Sachsen-Anhalt genehmigt (42502-5-34 MLU).

2.1.2 Probennahme

Vor der Probennahme wurden die Tiere für zehn Stunden genüchtert. Die Tötung erfolgte durch Dekapitation unter Narkose mit Diethylether. EDTA-Blut wurde für 20 min bei $1.500 \times g$ und 4°C für die Plasmagewinnung zentrifugiert und das Plasma anschließend bei -20°C

gelagert. Zur Gewinnung der Darmmukosa wurde der gesamte Dünndarm freipräpariert, mehrmals mit Kochsalzlösung (0,9%) gespült und longitudinal geöffnet. Die Mukosa von Duodenum, Jejunum und Ileum wurde mit einem Objektträger abgeschabt, gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu weiterführenden Analysen bei -80°C gelagert. Weiterhin wurde die Leber entnommen und ebenso bei -80°C gelagert.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Diät aus Versuch I

Komponente	Menge (g/kg Diät)
Casein	200
DL-Methionin	2
Saccharose	200
Laktose	200
Stärke	49,5
Cellulose	50
Kokosfett	200
Sojaöl	10
Cholesterin	1,5
Vitamin- und Mineralstoffmischung ¹	87

¹⁾ Für 2% Kalzium und 1,25% Phosphor werden 11,51 g/kg Diät Kalziumcarbonat (38% Ca) und 62,50 g/kg Diät Dikalziumphosphat (25% Ca, 20% P) eingesetzt. Vitamin- und Mineralstoffgehalte sind in Tabelle A3 des Anhangs aufgeführt.

2.1.3 Proteinextraktion für zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese und Western Blot Analysen

Zur Aufarbeitung der Dünndarmmukosa für die zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese (2D-DIGE) oder Western Blot Analysen wurden 20-30 mg Gewebe 1:10 mit Tris-HCl Puffer (50 mM, pH 7.5) inklusive Proteaseinhibitor (1:100, Roche, Mannheim, Deutschland) versetzt. Die Zellyse erfolgte mechanisch mit Hilfe des MPI FastPerp24-Systems (MP Biomedicals LLC, Illkirch Cedex, Frankreich). Die erhaltenen Homogenate wurden 15 min bei 16.000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Proteinisolate, die für die 2D-DIGE vorgesehen waren wurden direkt

weiterverarbeitet (s. 2.1.4) während Proben für Western Blot Analysen bei -80°C gelagert wurden.

2.1.4 Zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese

Um Unterschiede im Proteinexpressionsprofil von VDR-KO- und WT-Mäusen zu erfassen, wurden die unter Punkt 2.1.3 erhaltenen Proteinisolate mit Fluoreszenzfarbstoffen hoher Sensitivität markiert. Dazu wurde zunächst eine Mischprobe für jede Gruppe erstellt. Diese bestand aus jeweils gleichen Konzentrationsanteilen von Mäusen innerhalb einer Gruppe. Aus dieser Mischprobe wurden störende Salze und Kontaminaten mittels Proteinpräzipitation (ReadyPrep™ 2D Cleanup Kit, Bio-Rad, Münch, Deutschland, nach Anleitung des Herstellers) entfernt. Anschließend wurde das Proteinpellet im 2D-Puffer (7 M Urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris-HCl, pH 8.5) resuspendiert und erneut die Proteinkonzentration bestimmt (Bradford). Zur Fluoreszenzmarkierung der Mischproben wurde das Refraction-2D Kit (NH DyeAGNOSTICS GmbH, Halle (Saale), Deutschland) verwendet, bei dem der Farbstoff kovalent an Lysin-Reste eines Proteins bindet. Die Mischprobe, die aus der VDR-KO-Gruppe hervorgegangen ist, wurde mit dem Farbstoff G-Dye100 markiert. Die Markierung der WT-Probe erfolgte mit dem Farbstoff G-Dye200. Zur Normalisierung der Fluoreszenzsignale wurde ein interner Standard gebildet, der aus gleichen Proteinmengen unmarkierter VDR-KO- und WT-Mischprobe bestand und mit dem Farbstoff G-Dye300 markiert wurde.

Die vorbereiteten Proben wurden in der 1. Dimension nach ihrer Mobilität im elektrischen Feld entlang eines pH-Gradienten getrennt. Dazu wurden zunächst jeweils 5 μg markiertes Protein der VDR-KO- und WT-Mischproben sowie internem Standard in einem Reaktionsgefäß vereint und mit DeStreak-Rehydrationspuffer (GE Healthcare, München, Deutschland) inklusive Ampholyte (pH 4-7, Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland) auf 150 μl aufgefüllt (Analytisches Gel). Diese 150 μl wurden auf einen getrockneten *Immobilized pH gradient* (IPG) Streifen (pH 4–7, 7 cm, linear, Bio-Rad, München, Deutschland) aufgetragen und für wenigstens 13 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei erfolgte die Proteinbeladung des IPG-Streifens passiv durch den Flüssigkeitssog. Für die isoelektrische Fokussierung wurde eine Protean-IEF-Cell (Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet. Anschließend erfolgte die Konditionierung der prozessierten IPG-Streifen für die SDS-PAGE (2. Dimension). Die IPG-Streifen wurden zunächst 15 min in

Equilibrierungspuffer A (50 mM Tris-HCl, 6 M Urea, 2% SDS, 30% Glycerol, 2% DTT, pH 8.8) und nachfolgend 15 min in Equilibrierungspuffer B (50 mM Tris-HCl, 6 M Urea, 2% SDS, 30% Glycerol, 2,5% Iodoacetamid, pH 8.8) inkubiert. Die Trennung der Proteine nach Molekülgröße erfolgte mittels 12,5% SDS-PAGE. Es wurden sechs Replikate angefertigt. Präparative Gele wurden zur Erhaltung des Proteinmusters für 1 Stunde fixiert (50% Ethanol, 10% Essigsäure) und die Fluoreszenzsignale mit einem Typhoon Trio Laser Scanner (GE Healthcare, München, Deutschland) ausgelesen. Die vergleichende Analyse der Fluoreszenzsignalstärke zwischen VDR-KO- und WT-Proben wurde in der Delta2D Software (Decodon, Greifswald, Deutschland) durchgeführt. Für die Identifizierung wurden nur Kandidaten in Betracht gezogen, die einen Regulationsfaktor von über ± 2 aufwiesen.

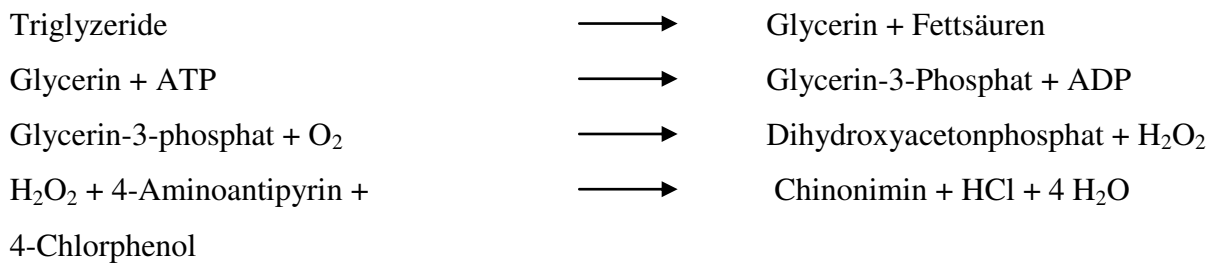
Präparative Gele zur Proteinidentifizierung wurden mit insgesamt 300 μg nicht markiertem Protein und kleinsten Mengen markiertem Protein beladen. Im Unterschied zu analytischen Gelen wurden hier die Proteine mit Kolloidalem-Coomassie-Blau sichtbar eingefärbt. Dies erlaubt das manuelle Auslösen einzelner Proteinspots aus dem Gel. Die geringe Menge an fluoreszenzmarkierter Probe ermöglichte den Abgleich des Proteinverteilungsmusters mit den analytischen Gelen. Ausgelöste Proteinspots wurden über Nacht einem Trypsin-Verdau unterzogen (Promega, Mannheim, Deutschland, in 10 mM Ammonium- Bicarbonate, pH 8.0, 37°C). Die gewonnenen Peptide wurden von den Gelrückständen separiert und mittels ESI-QTOF-MS/MS analysiert. Die erhaltenen Datensätze wurden mit der ProteinLynx Global SERVER-Software ausgewertet und mit bekannten Mausdatenbanken (SwissProt) abgeglichen. Die massenspektrometrischen Analysen wurden am Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg von Frau Dr. A. Schierhorn durchgeführt.

2.1.5 Bestimmung der Triglyzerid- und Cholesterinkonzentrationen in Plasma und Leber

Testprinzip der Triglyzeridbestimmung

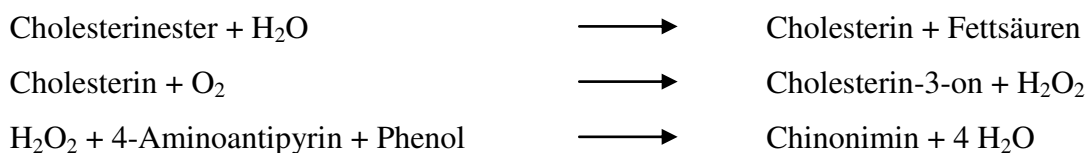
Zur Analyse der Gesamt-Triglyceride wurde das Triglyzerid-Ecoline® Testkit verwendet. Die Messung beruht auf einem enzymatischen, photometrischen Test. Die Triglyceride werden im ersten Schritt enzymatisch durch die Lipoproteinlipase in Glycerin und Fettsäuren gespalten. Am Ende der Reaktionskaskade entsteht Wasserstoffperoxid, das mit 4-Aminoantipyrin und 4-Chlorphenol zum Chinonimin reagiert und bei einer Wellenlänge von 500 nm am

Spektralphotometer (Ultrospec 3300, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) gemessen werden kann.



Testprinzip der Cholesterinbestimmung

Die Messung der Gesamtcholesterinkonzentration erfolgte unter Verwendung des Cholesterin-Ecoline® Testkits (DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers. Die Messung beruht auf einem enzymatischen, photometrischen Test. Im ersten Schritt werden die Cholesterinester durch die Cholesterinesterase hydrolytisch gespalten. Am Ende der Reaktionskaskade wird Wasserstoffperoxid gebildet. Dieser reagiert mit 4-Aminoantipyrin und Phenol zum Chinonimin, das bei einer Wellenlänge von 500 nm am Spektralphotometer (Ultrospec 3300, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) gemessen werden kann und proportional zur enthaltenen Menge Cholesterin ist.



Lipidextraktion aus Leberproben

Die Lipidextraktion aus dem Lebergewebe erfolgte nach der Methode von Hara und Radin, modifiziert nach Eder und Kirchgessner (Eder and Kirchgessner, 1994; Hara and Radin, 1978). Zur Extrahierung der Lipide wurden 400 mg Leber zerkleinert und für 18 h bei 20°C in 4 ml einer Hexan-Isopropanol-Lösung (v/v, 3:2) geschüttelt. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 2.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und der lipidhaltige Überstand (Lipidextrakt) separiert. Für die Bestimmung der Cholesterin- und Triglyceridkonzentration

der Leber wurden jeweils 15 µl des Lipidextrakts eingesetzt. Das Hexan-Isopropanol Lösungsmittel wurde abgedampft und 20 µl eines Triton X-100-Chloroform-Gemisches (w/w, 1:1) dem Lipidpellet der Proben bzw. eines entsprechenden Standards zugegeben. Nach Homogenisation wurde das Chloroform durch Verdampfung entfernt. Die im Triton X-100 gelösten Lipide wurden mit kommerziellen Testkits analysiert.

Hierbei erfolgte zunächst die Zugabe von jeweils 750 µl Reaktionsreagenz zu den Proben bzw. Standards. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur folgte die Messung der Extinktion am Spektralphotometer. Auf der Grundlage nachstehender Formeln wurden die Konzentrationen des Cholesterins und der Triglyceride der Leber berechnet:

$$C_{\text{Cholesterin}} = \Delta E_{\text{Probe}} * C_{\text{Standard}} / \Delta E_{\text{Standard}} * 25 \mu\text{g}/15 \mu\text{g} * 4000 \mu\text{l}.$$

$$C_{\text{Triglyceride}} = \Delta E_{\text{Probe}} * C_{\text{Standard}} / \Delta E_{\text{Standard}} * 50 \mu\text{g}/15 \mu\text{l} * 4000 \mu\text{l}.$$

(c=Konzentration; E=Extinktion)

Als Standard diente in Hexan gelöstes Cholesterin oder Sonnenblumenöl mit einer Konzentration von 25 µg/Ansatz bzw. 50 µl/Ansatz.

Bestimmung der Triglyzerid- und Cholesterinkonzentration im Plasma

Für die Bestimmung der Triglyzerid- und Cholesterinkonzentrationen im Plasma wurde das Ecoline®-Testkits (DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim, Deutschland) genutzt. 10-20 µl Plasma oder Standard (HV-Kalibrator, DiaSys, Holzheim, Deutschland) wurden mit 750 µl Reaktionsreagenz versetzt. Nach der Inkubation von 10-20 min bei Raumtemperatur erfolgte die Extinktionsmessung am Spektralphotometer (Ultrospec 3300, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland). Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte mittels nachstehender Formel:

$$C_{\text{Probe}} = \Delta E_{\text{Probe}} * C_{\text{Standard}} / \Delta E_{\text{Standard}}$$

Die spezifischen Standards für die Quantifizierung waren im Testkit enthalten (HV-Kalibrator, DiaSys, Holzheim, Deutschland).

2.1.6 Untersuchungen zum Einfluss des Vitamin D-Versorgungsstatus auf intestinale Lipidtransporter sowie Plasma- und Leberlipide am Modelltier Ratte

Angeregt durch die Ergebnisse der mRNA-Expressionsmessungen der intestinalen Lipidtransporter und insbesondere des CD36 aus dem VDR-KO-Modell des Versuchs I war es von Interesse, deren Ausprägung in Abhängigkeit verschiedener Vitamin D Versorgungsstufen zu untersuchen. Daher sollten am murinen Modell der Ratte die Auswirkungen eines alimentär regulierten Vitamin D-Status auf die mRNA-Expression ausgewählter Lipidtransporter der Dünndarmmukosa sowie die Konzentrationen an Triglyceriden und Cholesterin im Plasma, in den Lipoproteinen und in der Leber bestimmt werden. Dazu wurden 36 männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) im Alter von 4 Wochen auf 3 Gruppen aufgeteilt. Die jeweilige Gruppe erhielt über 2 Monate eine Diät (Tabelle 2) mit entweder 0 IE (Mangel, „M“), 1.000 IE (adäquat, „A“) oder 10.000 (reichlich, „R“) IE Vitamin D₃ pro kg. Der Vitamin D-Status der Tiere wurde über die Plasmakonzentration an 25(OH)D₃, 24,25(OH)₂D₃ (LC-MS/MS, nach (Lehmann et al., 2015) und 1,25(OH)₂D₃ (Immunoassay nach Herstellerangaben; Immunodiagnostic System GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland) ermittelt. Die Isolation der Lipoproteine aus Leber und Plasma erfolgte wie von Brandsch und Mitarbeitern beschrieben (Brandsch et al., 2010). Die Bestimmung der Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen in Leber, Plasma und den Lipoproteinfraktionen ist unter Punkt 2.1.5 aufgeführt. Gewinnung und Isolation von RNA der Dünndarmmukosa und anschließender cDNA-Synthese erfolgte gemäß Punkt 2.5.3. *Realtime*-RT-PCR-Analysen wurden ebenfalls wie in Punkt 2.5.3 beschrieben durchgeführt, wobei *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (*gapdh*) für die Normalisierung genutzt wurde. Die Nukleotidsequenzen, der in diesem Versuchsteil verwendeten Primer zur Bestimmung des *cluster of differentiation 36*, *gapdh*, *Niemann-Pick C1-like protein 1* und des *scavenger receptor class B member 1*, waren für die Ratte spezifisch und sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Diät zur Erzeugung verschiedener Vitamin D-Versorgungsstadien im Modelltier Ratte

Komponente	Menge (g/kg Diät)
Casein	200
DL-Methionin	2
Saccharose	350
Stärke	126,5
Cellulose	50
Kokosfett	200
Sojaöl (+/- Vitamin D ₃)	10
Cholesterin	1,5
Vitamin- und Mineralstoffmischung ¹	60

¹⁾ Vitamine (mit Ausnahme von Vitamin D₃) und Mineralstoffe in Anlehnung an die Empfehlungen der AIN-93G für wachsende Nager (Reeves et al. 1993); Vitamin D-Gehalt der jeweiligen Gruppe: 0 IE, 1.000 IE, 10.000 IE Vitamin D₃ pro kg Diät

2.1.7 Statistik Versuch I

Die statistische Auswertung erfolgte mittels MINITAB-Software (Version 13, Minitab Ltd., Michigan, USA). Die Stichproben wurden auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk Test sowie auf Varianzhomogenität mittels Levene-Test geprüft. Statistische Unterschiede zwischen den Mittelwerten der VDR-KO- und WT-Gruppe wurden mit dem Student's t-Test ermittelt. Unterschiede zwischen Ratten mit unterschiedlicher Vitamin D-Fütterung wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) bestimmt und bei signifikanz der Fisher's-Test als multipler Mittelwertsvergleich angewandt. Als Signifikanzgrenze wurde $P < 0,05$ festgelegt.

2.2 Einfluss des Vitamin D-Rezeptors auf die Expression von Zelladhäsionsproteinen sowie der Morphologie des Darms (Versuch II)

2.2.1 Versuchstiere und Diäten

In der zweiten Studie dieser Arbeit lag der Fokus auf der Charakterisierung von Zell-Zell-Kontakten des Enterozyten und der Morphologie des Darmes der VDR-KO-Maus. Dazu wurden männliche homozygote VDR-KO-Mäuse (n=8) (B6.129S4-Vdr^{tm1Mbd}/J) mit homozygoten WT-Mäusen (n=8) (C57BL/6J) im Alter von 5-6 Monaten verglichen. Die Tiere stammten aus eigener Zucht, ausgehend von heterozygoten Tieren der Linie B6.129S4-VDR^{tm1Mbd}/J (Jackson Laboratories). Die Bestimmung des jeweiligen Genotypes erfolgte gemäß Punkt 2.5.2. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von $22 \pm 1^\circ\text{C}$ und einer Luftfeuchte von 50 – 60% einzeln in Makrolon-Käfigen und einem 12h-Hell-12h-Dunkel-Rhythmus gehalten. Der Versuchszeitraum betrug 2 Monate. Über diesen Zeitraum erhielten die Tiere eine kommerzielle Rescue-Diät (Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest Deutschland) (Tabelle 3) und Wasser *ad libitum*. Körpermasseentwicklung und Futteraufnahme wurden wöchentlich über einen Zeitraum von sieben Wochen dokumentiert. Zu Beginn des Versuches waren die Tiere 3-4 Monate alt. Die Haltungsbedingungen, der Umgang mit Versuchstieren sowie alle angewandten Prozeduren entsprachen dem geltendem Tierschutzrecht und wurden von der Tierschutzkommission des Landes Sachsen-Anhalt (42502-2-1276MLU G) genehmigt.

Tabelle 3: Zusammensetzung der kommerziellen *Rescue*-Diät

Komponenten	Gehalt [g/kg Diät]
Getreide/Soja Grundmischung*	614
Kasein	95
L-Cystin	2
Laktose	200
Zellulose	10
Sojaöl	18
Vitamin und Spurenelement Mischung*	4
Kalziumcarbonate (CaCO ₃)	20.5
Kalziumphosphate (CaHPO ₄)	36
Zusammensetzung	Gehalt [g/kg Diät]
Rohprotein	220
Gesamt Zucker	232
Rohfaser	35
Rohfett	47
Rohasche	96
Stärke	213
Kalzium	20
Phosphor	12.5
Energiegehalt	[MJ/kg Diät]
Physiologischer Brennwert	14.21

Kalzium- und phosphorangereicherte Diät. Alle Angaben nach Hersteller (ssniff spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). *M-Z Standardfutter für die Aufzucht von Mäusen <http://www.ssniff.com>.

2.2.2 Probennahme

Vor der Probennahme wurden die Tiere für vier Stunden genüchert. Die Tötung erfolgte durch Dekapitation unter Narkose mit Diethylether. Das Blut wurde für die Serumgewinnung in Monovetten (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) für 30 min bei Raumtemperatur gelagert. Nach Zentrifugation (2400 x g, 5 min) wurde das Serum separiert und bei -20°C gelagert.

Zur Präparation des Dün- und Dickdarms, wurde der gesamte Darm freigelegt und mehrmals vorsichtig mit Kochsalzlösung (0,9%) gespült. Der Dünndarm wurde in die drei Abschnitte Duodenum, Jejunum und Ileum geteilt. Die Differenzierung erfolgte anhand anatomischer Merkmale (Pankreas, Treitz-Band). Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden 2 cm starke Gewebestücke des Duodenums, Jejunums, Ileums sowie des distalen Kolons entnommen. Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde dem Duodenum ein weiteres 0,3 cm starkes Gewebestück entnommen. Die übrigen Teile des Duodenums dienen der RNA- und Proteinisolation. Diese wurden longitudinal geöffnet, die Mukosa abgeschabt und einzeln in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Rest des distalen Kolons wurde als Ganzes schockgefroren.

2.2.3 Histologische Untersuchungen des Dünndarms und Kolons

Aufbereitung der Darmproben für die Lichtmikroskopie

Es wurden histologische Übersichtsarbeiten der Darmabschnitte Duodenum, Jejunum, Ileum und des distalen Kolons angefertigt. Dazu wurden die Gewebestücke (s. 2.2.2) zunächst in einer Lösung aus 3% Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), 0,1% Triton X-100 in PBS für zwei Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend dreimal kurz in PBS gewaschen und in Ethanol-Lösungen entwässert (beginnend mit 10%-, 30%-, 50%-Ethanol für 30 min, 70%-Ethanol über Nacht bei 4°C gefolgt von jeweils 30 min in 90%- und 100%-Ethanol). Anschließend wurden das Gewebe schrittweise mit Polyethylenglycol (PEG1500, Merck, Darmstadt, Deutschland) infiltriert. Dies erfolgte in PEG1500-Ethanol-Lösungen (PEG-EtOH) verschiedener Mischungsverhältnisse (beginnend mit PEG-EtOH (1:3) für 1 Stunde, gefolgt von PEG-EtOH (1:1, 1,5 Stunden) und PEG-EtOH (3:1, 1 Stunde) und 2 Stunden in reinem PEG1500, jeweils bei einer Temperatur von 48°C).

Histologische Untersuchungen des Dünndarms und Kolons

Eingebettete Dünndarm- sowie Kolonpräparate wurden mittels Rotationsmikrotom (Microm HM360, Thermo Scientific) in 5 µm starke Segmente geschnitten und auf Objektträger überführt, die mit einer Poly-L-Lysin Schicht überzogen waren. Anschließend wurden die

Schnitte in Hämatoxylinlösung (Harris Hämatoxylinlösung, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) getaucht, luftgetrocknet und mit Aquatex® eingedeckt (Merck AG). Es erfolgte die Messung der Zottenlänge in den einzelnen Segmenten des Dünndarms sowie der Kryptentiefe des Dün- und Dickdarms (Axiovert 200 Mikroskop und Axiovision Software, Rel. 4.8.2 Software, Carl Zeiss, Jena, Germany). Zehn bis 15 Zotten und durchschnittlich 15 Krypten wurden pro Darmabschnitt und Tier analysiert. Des Weiteren wurden die Zellkerne der Kolonkrypten mit der ImageJ Software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Maryland, USA) ausgezählt. Es wurde stets darauf geachtet, dass möglichst idealtypische Krypten für die Analysen ausgewählt wurden. Das heißt, das Kryptenlumen musste frei sein, die Zellkerne mussten deutlich voneinander abzugrenzen sein und die Krypten mussten möglichst gerade ohne Krümmungen ausgerichtet sein. Von jedem Tier wurden 15 Krypten des Kolons ausgezählt. Zusammen mit der Kryptenlänge wurde zudem das Verhältnis von Kryptenlänge zu Zellkernanzahl berechnet.

Alle lichtmikroskopischen Auswertungen wurden von zwei Personen durchgeführt und deren Ergebnisse gemittelt. Die Probenzuordnungen wurden für diese Personen verblindet.

Aufbereitung der Darmproben für die Elektronenmikroskopie

Die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. G. Hause (Biozentrum, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt. Für die Vermessung der Mikrovilli und der *tight junctions* in VDR-KO- und WT-Mäusen wurde das Duodenum für die elektronenmikroskopische Darstellung vorbereitet. Dazu wurden die Gewebestücke (s. 2.2.2) in 3% Glutaraldehyd (in 0,1 M Sodiumacetate-Puffer (SAP), pH 7.2) für zwei Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend mehrmals in SAP gewaschen und für eine Stunde in 1% Osmiumtetroxide (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) gelagert. Zur Dehydratation durchliefen die Gewebestücke eine Alkoholreihe, beginnend mit 10%, 30%, 50% für 30 min, 70% für eine Stunde und für je 30 min in 90% und 2 x 100% EtOH. Die Einbettung erfolgte schrittweise in Epoxidharz nach Spurr (Spurr, 1969). Dazu wurden die Proben zunächst für 30 min in einen 1:3-Gemisch aus Vinylcyclohexendioxid und EtOH, danach jeweils für 30 min in einem 1:1- und 3:1-Gemisch und abschließend über Nacht in reinem Vinylcyclohexendioxid inkubiert.

Elektronenmikroskopische Darstellung und Auswertung der Enterozyten

Von den eingebetteten Gewebestücken des Duodenums wurden 80 nm Ultradünnschnitte angefertigt und auf Kupferplättchen übertragen. Anschließend erfolgte die Kontrastierung der Proben nach Reynolds (Reynolds, 1963). Aufnahmen der Enterozyten wurden mit einem EM900 Transmissionselektronenmikroskop (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany) und Kamerasystem (Variospeed SSCCD camera SM-1k-120, TRS, Moorenweis, Germany) angefertigt und ausgewertet (iTEM Software, Olympus SIS, Münster, Germany).

Es wurden durchschnittlich 60 Mikrovilli und 10 *tight junctions* pro Tier ausgemessen. Die Analysen wurden verblindet und von einer nicht in den Versuch involvierten Person ausgewertet.

2.2.4 Statistik Versuch II

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der MINITAB-Software (Version 13, Minitab Ltd., Michigan, USA). Die Daten wurden auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk Test sowie auf Varianzhomogenität mittels Levene-Test geprüft. Im Falle bestehender Normalverteilung wurden Mittelwerte mit dem Student's t-Test verglichen. Bei nicht normalverteilten Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Als Signifikanzgrenze wurde $P < 0,05$ festgelegt.

2.3 Einfluss des Vitamin D-Rezeptors auf die gastrointestinale Permeabilität des FITC-D (Versuch III)

2.3.1 Studiendesign, Probennahme und FITC-D Messung

In diesem Versuch sollte die parazelluläre Durchlässigkeit des Gastrointestinaltraktes von VDR-KO- und WT-Mäusen anhand der Serumkonzentration an fluoresceinisothiocyanatmarkiertem Dextran (FITC-D) ermittelt werden. Dextran (Mw 4000, Sigma-Aldrich) ist aufgrund seines Molekulargewichtes und seiner polaren Eigenschaften nicht in der Lage, die Darmbarriere zu überwinden. Daher ist die FITC-D Fluoreszenz im Blut ein direktes Maß für die Permeabilität und die Integrität des Darmepithels.

Diese Studie wurde an jeweils vier weiblichen VDR-KO- und WT-Mäusen im Alter von vier Monaten durchgeführt. Die Tiere stammten aus eigener Zucht (s. 2.2.1). Die Bestimmung des Genotypes erfolgte gemäß Punkt 2.5.2. Alle Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Das Futter entsprach der kommerziellen Diät aus Versuch II. Alle Haltungsbedingungen entsprachen denen des Versuchs II. Versuch III folgte geltendem Tierschutzrecht und wurde von der Tierschutzkommission des Landes Sachsen-Anhalt genehmigt (42502-5-34 MLU). Vier Stunden vor der Applikation des FITC-D wurde den Tieren Futter und Wasser entzogen. FITC-D wurde den Mäusen per Schlundsonde in einer wässrigen Lösung (60 mg/100g Körpergewicht) zugeführt. Nach drei Stunden wurden die Tiere durch Dekapitation unter Ethernarkose getötet und das Serum (s. 2.2.2) gewonnen. Das FITC-D Fluoreszenzsignal des Serums wurde in einem Victor-Multilabel-Reader (Exzitation 490 nm, Emission 535nm) (PerkinElmer, Waltham, USA) gemessen und die Konzentration anhand einer Standardreihe (definierte Menge FITC-D gelöst in einem Mischserum der Maus) errechnet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mittels Student's t-Test statistisch ausgewertet (Minitab Version 13). Unterschiede in den Mittelwerten gelten als signifikant bei $P < 0,05$.

2.4 Einfluss des Kalziumgehalts der Diät auf die Kalzium- und Parathormonkonzentrationen des Serums der Vitamin D-Rezeptor-*knockout*-Mäuse (Versuch IV)

2.4.1 Studiendesign

In diesem Fütterungsversuch sollte untersucht werden, ob es gelingt den Hyperparathyreoidismus, der als Folge der gestörten Kalziumhomöostase bei VDR-KO-Mäuse auftritt, durch eine diätetische Kalziumzulage zu korrigieren. Konkret sollte die dazu benötigte alimentäre Kalziumzulage eruiert werden.

2.4.2 Versuchstiere

Für den Versuch wurden männliche VDR-KO-Mäuse und WT-Mäuse verwendet die, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, aus interner Zucht, ausgehend von heterozygoten Tieren der Linie B6.129S4-VDR^{tm1Mbd}/J (Jackson Laboratories) stammten. Die Bestimmung des jeweiligen Genotypes erfolgte wie unter Punkt 2.5.2 beschrieben. Die Tiere wurden randomisiert in vier Gruppen zu je fünf Mäusen eingeteilt. Die Fütterungsphase betrug acht Wochen. Alle Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen (12 h Hell-Dunkel-Rhythmus, konstante Umgebungstemperatur von $22 \pm 2^\circ\text{C}$, relativer Luftfeuchtigkeit von 50-60%) gehalten. Futter und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Zu Beginn des Versuches hatten die Tiere ein Alter von vier Wochen. Die Futteraufnahme wurde wöchentlich protokolliert.

2.4.3 Diäten

Die in diesem Versuch verwendeten Diäten sind auf der Basis der *Rescue*-Diät von Li und Mitarbeitern (1998) konzipiert worden. Wie bereits in Punkt 2.1.1 aufgezeigt, sind die hervorzuhebenden Charakteristika dieser Diät die hohen Kalzium- und Phosphorgehalte sowie die Verwendung von Laktose als zusätzliche Kohlenhydratquelle. Die durchgeführten Anpassungen in den Kalzium- und Phosphorgehalten sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Die Makronährstoffkomposition der Versuchsdieten ist in Tabelle 5 aufgelistet. Vitamine und

2.4.4 Probennahme und Statistik Versuch IV

Vor der Probennahme wurden die Tiere für vier Stunden genüchert. Die Tötung erfolgte durch Dekapitation unter Narkose mittels Diethylether. Das Blut wurde für die Serumgewinnung in Monovetten (Sarstedt AG & Co) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (2400 x g, 5 min) wurde das Serum separiert und bei -20°C gelagert.

Die Bestimmung der Kalzium- sowie Phosphatkonzentration im Serum erfolgte mittels photometrischer Messung mit dem Fluitest® CA CPC Calcium-Kit und dem Fluitest PHOS® Inorganic Phosphorus-Kit (s. 2.5). Die Parathormonspiegel des Serums wurden mit dem Intact Mouse PTH 1-84 ELISA (s. 2.5) bestimmt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Minitab Software. Die Daten wurden auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk Test und auf Varianzhomogenität mittels Levene-Test geprüft. Im Falle bestehender Normalverteilung wurden Mittelwerte mittels einfaktorieller Varianzanalyse verrechnet und bei statistisch signifikanten Unterschieden ($P < 0,05$) ein multipler Mittelwertvergleich (homogen: Fisher-Test, nicht homogen: Games-Howell-Test) angeschlossen. Bei nicht normalverteilten Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Als Signifikanzgrenze wurde $P < 0,05$ festgelegt.

2.5 Analysen

2.5.1 Analyse der Kalzium-, Phosphat- und Parathormonkonzentrationen in Plasma und Serum

Bestimmung der Kalziumkonzentrationen im Plasma mittels optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES)

Die Gesamtkalziumkonzentration des EDTA-Plasmas aus Versuch I wurde mittels ICP-OES bestimmt. Dazu wurden die Plasmaproben 1:40 mit destilliertem Wasser verdünnt und in das Varian 715-ES-ICP-Optical-Emission-Spektrometer-System (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA; ICP Expert II Varian 21 715-ES Instrument Software, Version 1.1.3) injiziert. Als Trägergas diente Argon. Kalzium wurde bei einer Wellenlänge von 317,933 nm gemessen.

Bestimmung der Kalziumkonzentration im Serum

In den Versuchen II, III und IV wurde die Konzentration des freien Kalziums im Serum mittels kommerziellem Testkit Fluitest® CA CPC Calcium (Analyticon® Biotechnologies AG, Lichtenfels, Deutschland) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Bei diesem Test wird o-Kresolphthalein in Anwesenheit von freiem Kalzium zu einem violetten Calcium-o-Kresolphthalein-Komplex umgesetzt. Dieser Komplex wird spektralphotometrisch bei 578 nm gemessen. Es wurden 20 µl verdünnte Serumprobe (1:3) oder Kalziumstandard mit 750 µl Arbeitsreagenz versetzt und gemessen. Die Konzentration des Serumkalziums wurde mit nachstehender Formel berechnet.

$$C_{\text{Probe}} = (\Delta E_{\text{Probe}} / \Delta E_{\text{Standard}}) * C_{\text{Standard}}$$

Bestimmung der Phosphatkonzentration im Serum

Das anorganische Phosphat im Serum wurde spektralphotometrisch mit dem Fluitest PHOS® Inorganic Phosphorus (Analyticon Biotechnologies AG, Lichtenfels, Deutschland) Kit bestimmt. Hierbei bildet Ammoniummolybdat in Gegenwart von anorganischem Phosphat einen Ammoniummolybdatophosphat-Komplex, der bei 340 nm im Spektralphotometer gemessen werden kann. Es wurden 10 µl verdünnte Probe (1:2) oder Standard mit 750 µl Arbeitsreagenz eingesetzt. Die Konzentration des Serumphosphats wurde mit nachstehender Formel berechnet.

$$C_{\text{Probe}} = (\Delta E_{\text{Probe}} / \Delta E_{\text{Standard}}) * C_{\text{Standard}}$$

Bestimmung der Parathormon (PTH)-Konzentration in Plasma und Serum

Die PTH-Spiegel im Plasma oder Serum wurden mittels intact Mouse PTH 1-84 ELISA (Immutopics, Inc., San Clemente, USA) bestimmt. Dabei werden zwei Antikörper mit der Probe Co inkubiert. Ein Antikörper ist mit Biotin konjugiert und bindet das PTH an die avidinbeschichtete Mikrotiterplatte. Der zweite Antikörper bindet die N-terminale Region des PTH und sorgt durch eine HRP-Konjugation für die Detektion des Moleküls. Die gemessene

Extinktion (450 nm und 595 nm) ist direkt proportional zur Menge an PTH der Probe. Serumproben der VDR-KO-Mäuse wurden zuvor 1:5 verdünnt. Die PTH-Konzentration wurde nach den vorgegebenen Gleichungen des Herstellers berechnet.

2.5.2 Genotypisierung

In den Versuchen II, III und IV wurden Tiere aus eigener Nachzucht verwendet. Dazu wurden heterozygote Tiere der Linie B6.129S4-VDR^{tm1Mbd}/J (Jackson Laboratories) verpaart. Nach den Mendelschen Gesetzen bestand die Folgegeneration aus ca. 25% homozygoten VDR-KO-Mäusen. Diese wurden mit Hilfe des KAPA mouse genotyping Kits (Peqlab, Erlangen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers identifiziert. Genomische DNA wurde aus Gewebepreparaten (Ohr oder Schwanzspitze) isoliert und spezifische Bereiche mittels Multiplex-PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 6 aufgeführt. Die PCR-Produkte wurden im Agariosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anhand der unterschiedlichen PCR-Produktgrößen konnten die einzelnen Tiere dem jeweiligen Genotyp eindeutig zugeordnet werden.

2.5.3 Genexpressionsanalysen mittels *realtime*-RT-PCR

RNA-Isolierung

Gesamt-RNA wurde aus 30 mg Gewebe (Dünndarmmukosa, Kolon) unter Verwendung des TriFastTM-Reagenz (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) nach Herstelleranweisung isoliert. Die Gewebeprobe wurde in Trizol für 2 min bei 15 Hz für Dünndarmmukosa und 2 x 2 min bei 15 Hz für Kolon im Tissue Lyser (QIAGEN, Hilden, Deutschland) homogenisiert und nachfolgend mit 200 µl Chloroform/ml Trizol versetzt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur folgte die Zentrifugation der Proben (14.500 x g, 4°C, 15 min). Der wässrige Überstand wurde überführt und die enthaltene RNA mit 500 µl Isopropanol/ml Trizol ausgefällt. Es schloss sich eine weitere Inkubation für 10 min und Zentrifugation (14.500 x g, 4°C, 15 min) an. Die RNA-Pellets wurden mit 75%igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert (14.500 x g, 4°C, 5 min). Nach Dekantieren des Überstandes wurden die RNA-Pellets für 20-30 min getrocknet und anschließend in Diethylpyrocarbonat

(DEPC)-Wasser für 10 min im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 900 U/min und 60°C gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte im Spektralphotometer (Ultraspec 3300) bei 260 nm. Die Proben wurden zuvor 1:100 mit einem Phosphatpuffer (1 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) verdünnt.

Für die reverse Transkription der RNA in cDNA wurden 1,2 µg der isolierten RNA, Oligo-dT18-Primer (Operon Biotechnologies, Köln, Deutschland), das Enzym RevertAid™ M-MuLV reverse Transkriptase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), 5x RT-Puffer (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und dNTP-Mix (10 mM; GeneCraft, Lüdinghausen, Deutschland) nach Vorgaben des Revert Aid™ DNA polymerization mix (Fermentas) vereint. Der Reaktionsansatz wurde im Thermocycler (Mastercycler Personal, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 42°C für 60 min inkubiert.

Die Bestimmung der relativen mRNA-Konzentration erfolgte mittels *realtime*-RT-PCR im Rotor Gene 2000 System (Corbett Research, Mortlake, Australien). Für jeden Ansatz wurden 2 µl cDNA, 1 x SYBER®Green (Sigma Aldrich), 3,5 mM MgCl₂, 1 x Colorless GoTaq® Flexi Puffer, 1,25 U GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, Mannheim, Deutschland), 0,5 mM dNTP (GeneCraft) und 26,7 pmol des spezifischen Primers (Operon oder Sigma Aldrich) mit DEPC-Wasser versetzt und auf ein Endvolumen von 20 µl gebracht. In Tabelle 6 sind alle verwendeten Primer aus dieser Arbeit aufgeführt. Die einzelnen Schritte der *realtime*-RT-PCR sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation unterlagen je nach Primer einer variablen Wiederholungszahl (12-28 Zyklen). Unter Berücksichtigung der Amplifikationseffizienz und dem *threshold cycle* (Ct) (RotorGene 4.6 Software Corbett Research) wurde anschließend nach der Methode von Pfaffl (Pfaffl, 2001) die relative mRNA-Konzentration berechnet. Für die Normalisierung der mRNA-Expressionen wurden die Daten mit den Mittelwerten zweier Referenzgene (Hprt und ppia oder gapdh) verrechnet. Zur hinreichenden Bestätigung einer korrekten und genspezifischen Amplifikation wurde die Schmelzkurve ausgewertet und die PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese geprüft.

Tabelle 6: Liste und Spezifikationen der verwendeten Primer aus dieser Arbeit

Gen	Genbank Accession No.	Primersequenz (5' → 3')	Produkt- größe [bp]	Ta [°C]
Maus:				
Actb	NM_007393.5	for: ACGGCCAGGTCATCACTATTG rev: CACAGGATTCATACCCAAGAAG	87	66
Cd36	NM_001159558.1	for: CTTGAAGAAGGAACCACTGC rev: GTTCTTTGCCACGTCATCTG	108	60
Cdh1	NM_009864.3	for: CATGTTCACTGTCAATAGGG rev: GTGTATGTAGGGTAACTCTCTC	81	60
Cldn12	NM_022890.2	for: AAATTACTGACCATAACAGCTC rev: GTGTAAATCGTCAGGTTCTTC	190	61
Cldn2	NM_016675.4	for: ACAGTTTTATTTCCACGGTC rev: CATGTTAAGGGAAACCTCAC	183	57
Col6a1	NM_009933.4	for: GCAGACATTCAGGTAGTTTC rev: TATCTATACAGATCTGGGCTG	193	57
Ezr	NM_009510.2	for: GAGAAAGATGACAAGTTGACC rev: ACTTCTTGTCGTTGAAAGAG	79	60
F11r	NM_172647.2	for: AAGAACAAAGAAAGGGACTG rev: GAGTAAGGCAAATGGACAAC	140	58
Fabp2	NM_007980.3	for: GTCTAGCAGACGGAACGGAG rev: TCTCGGACAGCAATCAGCTC	109	60
Gapdh	NM_001289726.1	for: AACGACCCCTTCATTGAC rev: TCCACGACATACTCAGCAC	191	60
Gclc	NM_010295.2	for: CCGCTGTCCAAGGTTGACGA rev: GTTGCCGCCTTTGCAGATGTC	102	60
Gclm	NM_008129.4	for: CATGCTCCGTCCTTGGAGTT rev: CTGCTCTTCACGATGACCGA	433	57
Gsta3	NM_001288617.1	for: TTGAAAAGGTGTTGAAGAGC rev: AAGAACTTCTTCACTGTGG	188	55
Hprt	NM_013556.2	for: AGGGATTTGAATCACGTTTG rev: TTTACTGGCAACATCAACAG	116	57
Hsp90b1	NM_011631.1	for: GAAACGGCAACACTTCGGTC rev: CCACACGGGATTCATAGCGA	284	60
Hspa5	NM_031165.4	for: GGAGACCATGGAAAAAGCTG rev: GCTGTATCCTCTTACCAGTTG	77	57
Hspa8	NM_031165.4	for: CACAGAGAGATTAATTGGGG rev: GTTTGGCATCAAAAAGTGTG	77	57
Il6	NM_001314054.1	for: GTCTATACTACTTCACAAGTC rev: TGCATCATCGTTGTTTCATAC	114	58
Itga6	NM_008397.4	for: CGGTCATATTTTTCAGATCC rev: GGTCAATTCTGTTAGGAGTC	75	60
Krt19	NM_008471.3	for: AACCAAGTTTGAGACAGAAC rev: CAGTAATTTCTCCTCATGG	173	57
Mmp-2	NM_008610.2	for: GAGATCTTCTTCTTCAAGGAC rev: AATAGACCCAGTACTCATTCC	181	60
Mmp-9	NM_013599.3	for: TCTTCTGGCGTGTGAGTTTCC rev: CGGTTGAAGCAAAGAAGGAGC	134	58
Npc111	NM_207242.2	for: ATCCTCATCCTGGGCTTTGC rev: GCAAGGTGATCAGGAGGTTGA	76	60

Tabelle 6 Fortführung

Gen	Genbank Accession No.	Primersequenz (5' → 3')	Produkt- größe [bp]	Ta [°C]
Nqo1	NM_008706.5	for: CCTTTCCAGAATAAGAAGACC rev: AATGCTGTAAACCAGTTGAG	171	57
Ocln	NM_008756.2	for: AAAGCAAGTTAAGGGATATG rev: TGGCATCTCTCTAAGGTTTC	128	58
Pgls	NM_025396.3	for: ACACACCTGCTCTCAAAG rev: AAGGCCTGTCTCAGTTTC	113	57
Ppia	NM_008907.1	for: GTGGTCTTTGGGAAGGTGAA rev: TTACAGGACATTGCGAGCAG	210	60
Psme2	NM_011190.3	for: GCATTCTGGTAATCACATGG rev: GGAAATGGTTGTCTGGAAAG	143	57
Rpsa	NM_011029.4	for: CTTGACGTCCTGCAGATGAA rev: GGATTCTCGATGGCAACAAT	200	60
Scarb1	NM_016741.1	for: GTCCGCATAGACCCGAGCAG rev: CCAGCGCCAAGGTCATCATC	361	60
Scin	NM_009132.2	for: GATCATCTACACATGGCAAG rev: TGAGTGGTTTGTCTTTGAAC	170	57
Tjp1	NM_009386.2	for: CTGATAGAAAGGTCTAAAGGC rev: TGAAATGTCATCTCTTTCCG	129	58
TNF-alpha	NM_013693.2	for: AGTCCGGGCAGGTCTACTTT rev: GGTCACTGTCCCAGCATCTT	232	60
Vcp	NM_009503.4	for: AAAGGCGTTCTTTTCTATGG rev: GTGCCTTGTCAAAAATTTCC	166	57
Ywhaz	NM_011740.3	for: ACTTAACATTGTGGACATCG rev: GGATGACAAATGGTCTACTG	129	57
Genotypisierung WT	NC_000081.6	for: CTCCATCCCCATGTGTCTTT rev: TTCTTCAGTGGCCAGCTCTT	382	61
Genotypisierung KO	-	for: CACGAGACTAGTGAGACGTG rev: TTCTTCAGTGGCCAGCTCTT	500	61
Ratte:				
Cd36	NM_031561.2	for: TCGTATGGTGTGCTGGACAT rev: GGCCCAGGAGCTTTATTTTC	385	60
Gapdh	NM_017008.4	for: GCATGGCCTTCCGTGTTCC rev: GGGTGGTCCAGGTTTCTTACTC	337	65
Npc1L1	NM_001002025.1	for: GGCCTCTTACTCCGCTTCTT rev: GTCTAGCCCCACGTTGATGT	141	62
Scarb1	NM_031541.1	for: GGTTTGGTGCGCCCTGTTTCTC rev: CGACGCCCTTGACGGATTTGATG	198	72

Actb β -actin; **Ta** Annealing Temperatur; **Cd36** Cluster of differentiation 36/fatty acid translocase; **Cdh1**; Cadherin 1 (E-Cad); **Cldn2** Claudin 2 (Cld-2); **Cldn12** Claudin 12 (Cld-12); **Col6a1** Collagen, type VI, alpha 1; **Ezr**, Ezrin; **F11r** F11 receptor (JAM-A); **Fabp2**, Fatty acid binding protein 2, intestinal; **Gapdh**, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; **Gclc**, Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit; **Gclm**, Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit; **Gsta3**, Glutathione S-transferase, alpha 3; **Hprt**, Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase; **Hsp90b1**, Heat shock protein 90, beta (Grp94), member 1; **Hspa5**, Heat shock 70 kDa protein 5 (GRP78); **Hspa8**, Heat shock protein 8; **Il6**, Interleukin-6; **Itga6**, Integrin alpha 6; **Krt19**, Keratin 19; **Mmp-2**, Matrix metalloproteinase 2; **Mmp-9**, Matrix metalloproteinase 9; **Npc1l1**, Niemann-Pick C1-Like 1; **Nqo1**, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1; **Ocln**, Occludin; **Pgls**, 6-phosphogluconolactonase; **Ppia**, Peptidylprolyl isomerase A; **Psme2**, Proteasome activator subunit 2 (PA28 beta); **Rpsa**, Ribosomal protein SA (37/67LR); **Scarb1**, Scavenger receptor class B, member 1; **Scin**, Scinderin (Adseverin); **Tjp1**, Tight junction protein 1 (ZO-1); **TNF-alpha**, Tumor necrosis factor alpha; **Vcp**, Valosin containing protein (VCP/p97); **Ywhaz**, Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (14-3-3 Protein ζ/δ).

Tabelle 7: Ablauf der *realtime*-RT-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	2 min
Denaturierung	95°C	20 s
Annealing	55-67°C ¹	35 s
Elongation	72°C	55 s
Finale Elongation	72°C	5 min
Schmelzkurve	50-99°C	5 s/°C

¹⁾ Annealing Temperatur des jeweiligen Primerpaars ist der Tabelle 4 zu entnehmen

Für den gelelektrophoretischen Nukleinsäurenachweis wurden Agarosegele (8% Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Eisessig, 1 mM Na₂EDTA*₂H₂O, pH 8.0)) mit Ethidiumbromid (Sigma Aldrich, Taufkirchen) verwendet. Die PCR-Proben wurden mit 1 x Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega) gemischt und der Gelelektrophorese unterzogen. Anschließend erfolgte die Visualisierung der DNA-Banden unter UV-Licht.

2.5.4 Analyse von relativen Proteinmengen mittels SDS-Page und Western Blot

Zur Auftrennung des Proteingemisches einer Probe nach Molekülgewicht wurde die von Laemmli 1970 etablierte Methode der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Die Proteinisolation ist in den jeweiligen Versuchsabschnitten beschrieben. Zunächst wurden 20-30 µg Proteinisolat einer Probe mit Ladepuffer (50 mM Tris, 2 M Glycerin, 2% SDS, 0,04% Bromphenolblau) versetzt und anschließend im Thermomixer (5 min bei 95°C und 300 rpm) denaturiert. Je nach Proteingröße wurden 10-15% SDS-Gele hergestellt und die Proteine für 1-2 h bei 100 V aufgetrennt. Als Proteinleiter wurde der Page RulerTM Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) genutzt.

Darauffolgend wurden die Proteine für 1 h bei 300 mA mittels Tank-Blot-Verfahren auf Nitrozellulose-Membranen (Whatman®, Dassel, Deutschland) transferiert und mit PonceauS (Carl Roth GmbH)-Färbung der Transfer kontrolliert. Freie Bindungsstellen der Membran wurden mit 3-5% Magermilchpulver (AppliChem, Darmstadt, Deutschland), die in TBST-

Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,2% Tween 20, pH 7.5) gelöst wurden, abgesättigt. Die Inkubationszeit der Membran mit primärem Antikörper variierte von 1 h bis zu 15 h. Der sekundäre HRP (horseradish peroxidase)-gekoppelte Antikörper wurde in der Regel für 2 h bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. Sämtliche Antikörper wurden in der entsprechenden Blocklösung (3-5% Magermilchpulver in TBST-Puffer) gelöst. Nach jeder Antikörperbehandlung wurde die Membran mehrere Minuten mit TBST-Puffer gewaschen.

Zur Detektion des Chemilumineszenzsignals des sekundären Antikörpers wurde das Amersham ECLTM Prime Western Blot Detektionsreagenz (GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, England) verwendet und mittels G:Box-Chemi-XT4 (Syngene, Cambridge, UK) detektiert. Die Chemilumineszenzsignale wurden mit der GeneSys-Software (Syngene) ausgewertet und die relative Proteinkonzentration errechnet. Für die Normalisierung der relativen Proteinkonzentrationen wurde das Referenzprotein *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) verwendet. In Tabelle 8 sind alle Antikörper, die in den einzelnen Versuchen zum Einsatz kamen, aufgelistet.

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Antikörper

Protein	SwissProt Accession No.	Hersteller	Bezeichnung
Primär-Antikörper			
67 kDa-laminin receptor	P14206	Abcam (Cambridge, England)	ab133645
β -catenin	Q02248	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	BD610154
Claudin-12	Q9ET43	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)	38-8200
Claudin-2	O88552	LifeSpan BioSciences (Seattle, USA)	Ls-C118403
E-cadherin	P09803	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	BD610182
Ezrin	P26040	Acris Antibodies (Herford, Deutschland)	AP06112PU-N
GAPDH ¹	P16858	Cell Signaling Technology (Boston, USA)	5174S
Occludin	Q61146	Acris Antibodies (Herford, Deutschland)	AP30626PU-N
Sekundär-Antikörper			
anti-Rabbit-HRP ²	-	Cell Signaling Technology (Boston, USA)	7074S
anti-Mouse-HRP ²	-	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	BD554002

¹)GAPDH, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*; ²)HRP, *Horseradish peroxidase*

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss des Vitamin D-Rezeptors auf das Proteomprofil von Dünndarm-mukosazellen (Versuch I)

3.1.1 Gewichtsentwicklung und Futteraufnahme von Vitamin D-Rezeptor-*knockout*- und Wildtyp-Mäusen

Das Anfangsgewicht der VDR-KO- und WT-Mäuse zeigte zu Beginn der Studie keinen Unterschied (Tabelle 9). Am Ende des Versuchszeitraumes war die Körpermasse der VDR-KO-Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant geringer (~12%; $P < 0,05$, Tabelle 9). Die tägliche Körpermassenzunahme der VDR-KO-Mäuse gegenüber den WT-Mäusen war signifikant geringer (~36%; $P = 0,001$, Tabelle 9). Die tägliche Futteraufnahme der VDR-KO-Mäuse im Beobachtungszeitraum war im Vergleich zur WT-Gruppe um ~7% geringer ($P < 0,05$, Tabelle 9).

Tabelle 9: Futteraufnahme und Körpermassenentwicklung von Vitamin D-Rezeptor-*knockout*- und Wildtyp-Mäusen über acht Wochen bei Fütterung einer *Rescue*-Diät

	VDR-KO	WT	P-Wert
Futteraufnahme [g/Tag]	2,66 ± 0,18*	2,86 ± 0,14	0,037
Körpermassenzunahme [g/Tag]	0,14 ± 0,05*	0,22 ± 0,02	0,001
Körpermasse Beginn [g]	15,8 ± 2,7	14,6 ± 1,2	0,327
Körpermasse final [g]	22,9 ± 3,3*	26,1 ± 1,5	0,023

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen angegeben, n=6 pro Gruppe. Vitamin D-Rezeptor-*knockout* (VDR-KO); Wildtyp (WT). *Signifikant verschieden von WT-Tieren ($P < 0,05$, Student's t-Test).

3.1.2 Plasmakonzentrationen des Kalziums, anorganischen Phosphats und Parathormons

Die Erfassung der Kalzium-, Phosphat- und Parathormon-Konzentrationen des Blutes zeigte deutliche Unterschiede in den Kalzium- und Parathormonspiegeln zwischen den beiden Versuchstiergruppen. VDR-KO-Mäuse zeigten im Mittel eine um ca. 22% niedrigere Kalziumkonzentration, ausgehend von der WT-Gruppe ($P = 0,001$, Tabelle 10). Dagegen lag die Parathormonkonzentration der VDR-KO-Mäuse 60-fach höher gegenüber den Werten der

WT-Mäuse ($P=0,001$, Tabelle 10). Dieser starke Anstieg war von einer hohen interindividuellen Varianz innerhalb der VDR-KO-Gruppe begleitet. Die Plasmakonzentration an anorganischem Phosphat unterschied sich nicht zwischen beiden Gruppen (Tabelle 10).

Tabelle 10: Plasmakonzentrationen des Kalziums, anorganischen Phosphats und Parathormons von Vitamin D-Rezeptor-*knockout*- und Wildtyp-Mäusen nach 8-wöchiger Fütterung einer kalzium- und phosphorreichen Diät

	VDR-KO	WT	P-Wert
Kalzium [mmol/l]	1,77 ± 0,24*	2,28 ± 0,04	0,001
Phosphat [mmol/l]	1,69 ± 0,26	1,63 ± 0,32	0,886
Parathormon [pg/ml]	3033 ± 2017*	50 ± 35	0,001

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen angegeben, n=6 pro Gruppe. Vitamin D-Rezeptor-*knockout* (VDR-KO); Wildtyp (WT). *Signifikant verschieden von WT-Tieren ($P<0.05$, Student's t-Test).

3.1.3 Ergebnisse der Proteomanalyse der Dünndarmmukosa von Vitamin D-Rezeptor-*knockout*- und Wildtyp -Mäusen

Das Ziel dieser Studie war es, den Einfluss eines VDR-Defizites auf das Proteinexpressionsmuster von Enterozyten des Dünndarms zu erfassen. Mit Hilfe der 2D-DIGE konnte das gewonnene Proteingemisch der Dünndarmmukosa von VDR-KO- und WT-Mäusen in 569 distinkte Spots aufgetrennt werden. Von diesen zeigten 82 Spots einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mit einer minimalen Regulationsdifferenz von Faktor ± 2 . Die Auswahl, der für die Identifikation vorgesehen Proteinspots, richtete sich im Folgenden primär nach Regulierungsstärke. Dabei wurden, wenn möglich Kandidaten mit hoher Veränderung gegenüber der WT-Gruppe bevorzugt. Ausgehend von dieser Vorselektion wurden noch technische Kriterien in Betracht gezogen, um die Qualität und Validität der Daten zu erhöhen, was zu einer Reduzierung der Kandidatenliste führte. Das heißt, es wurde darauf geachtet, dass eine klare Abgrenzung zu benachbarten Proteinspots bestand, um eine Spotvermischung zu unterbinden. Da die Identifikation von Proteinen mittels Massenspektrometrie eine gewisse Menge an biologischem Material voraussetzt, konnten auch nur besonders prominente Proteinspots ausgewertet werden. Eine visuelle Darstellung des analytischen Konsensusgels

(Zusammenführung der analytischen Gele von VDR-KO- und WT-Proben) des Proteinmusters der Dünndarmmukosa von VDR-KO- und WT-Mäusen ist in Abbildung 4 dargestellt. Zur besseren Übersicht ist in Abbildung 4 gleichzeitig die Lokalisation der identifizierten Proteine eingefügt. Von den 82 regulierten Proteinspots wurden 19 ausgewählt und mittels MS/MS 14 verschiedenen Proteinen zugeordnet. Eine Übersicht dieser Proteine sowie die Einordnung in deren Zellfunktion ist in Tabelle 11 aufgeführt. In Tabelle 11 sind zudem die Anzahl an analysierten Peptiden und deren Sequenzübereinstimmung mit den Datenbanken, als Qualitätsmerkmale der Analysen, aufgeführt. Abbildung 5 zeigt die direkte Gegenüberstellung der differentiell exprimierten und identifizierten Proteinspots.

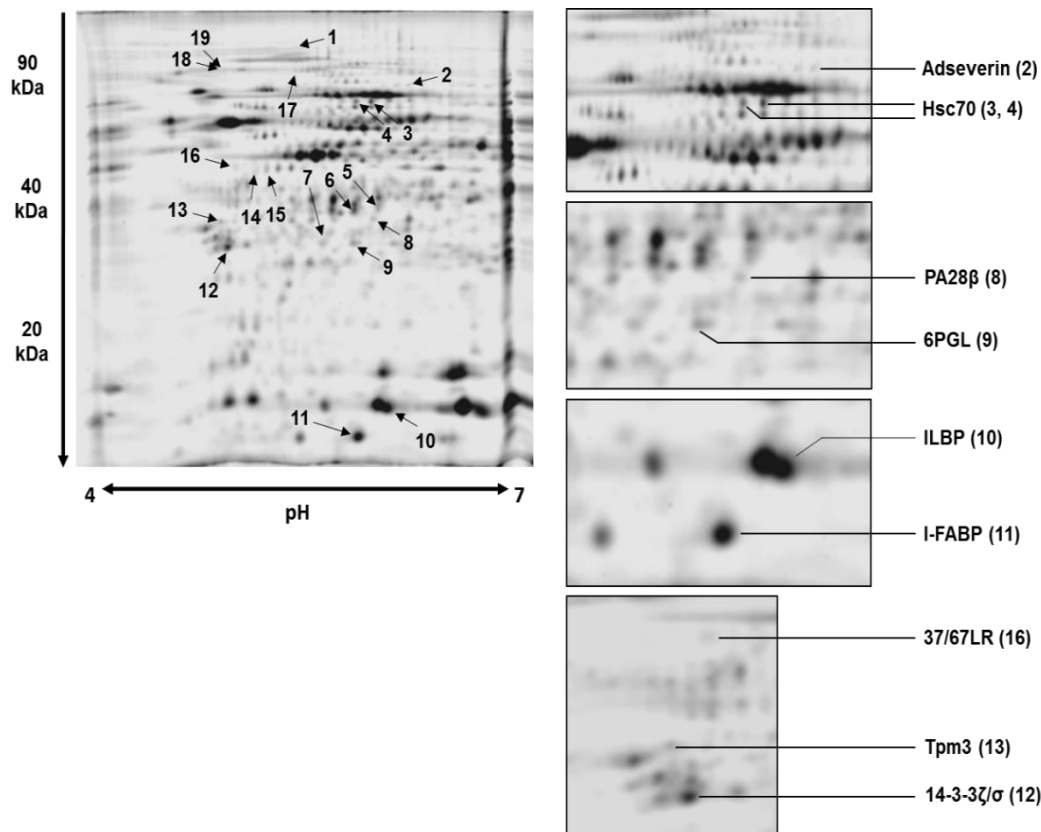


Abbildung 4: Proteinspot-Muster der Dünndarmmukosa von Vitamin D-Rezeptor-knockout- und Wildtyp-Mäusen nach zweidimensionaler Gelelektrophorese. Links: Konsensusgel analytischer Gele mit Lokalisation und Nummerierung der identifizierten Spots. Rechts: Vergrößerte Detailaufnahmen ausgewählter Bereiche des Konsensusgels. Eingeklammerte Zahlen entsprechen der Spotnummerierung aus Tabelle 10. 37/67 kDa laminin receptor (37/67LR); 94 kDa glucose-regulated protein (GRP94); Tropomyosin 3 (Tpm3); Collagen type VI (alpha 1 chain) (Col6a1); Valosin-containing protein (VCP/p97); Keratin, type I cytoskeletal 19 (K19); Proteasome activator complex subunit 2 (PA28 β); 6-phosphogluconolactonase (6PGL); Heat shock cognate 71 kDa protein (Hsc70); Ileal lipid-binding protein (ILBP); Fatty acid-binding protein 2 (I-FABP); 14-3-3 protein ζ/δ (14-3-3 ζ/δ).

Tabelle 11: Differenziell exprimierte Proteine der Dünndarmmukosa von Vitamin D-Rezeptor-*knockout*-Mäusen in Relation zu Wildtyp-Mäusen

UniProt Accession No.	Protein	Spot	Expressions- unterschied ^a	Anzahl Peptide	Sequenz- Abdeckung (%)	pI (theor.)	Funktion
P14206	37/67 kDa laminin receptor (37/67LR)	16	+10.8	9	39	4.80	Membranrezeptor für Laminin
P08113	94 kDa glucose-regulated protein (GRP94)	18, 19	+5.0, +5.5	22	28	4.74	Chaperone, Zellstress
P21107	Tropomyosin 3 (Tpm3)	13	+4.3	11	28	4.68	Zytoskelett
Q04857	Collagen type VI (alpha 1 chain) (Col6a1)	1	+4.2	9	10	5.20	Extrazellulär Matrix Bestandteil
Q01853	Valosin-containing protein (VCP/p97)	17	+3.8	18	28	5.14	Chaperon, Zellstress
P97372	Proteasome activator complex subunit 2 (PA28 β)	8	+3.1	8	40	5.54	Proteasome Aktivität
P19001	Keratin, type I cytoskeletal 19 (K19)	14, 15	+2.1, +2.9	14	39	5.28	Zytoskelett
Q60604	Adseverin	2	+2.8	18	30	5.46	Zytoskelett
P60710	β -Actin	5, 6, 7	-6.5, -4.2 -4.1	5	15-21	5.29 ^b	Zytoskelett
Q9CQ60	6-phosphogluconolactonase (6PGL)	9	-2.7	3	15	5.55	Kohlenhydrat Metabolismus
P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein (Hsc70)	3, 4	-2.5, -2.6	31	52	5.37	Chaperone, Zellstress
P51162	Ileal lipid-binding protein (ILBP)	10	-2.5	8	68	5.91	Lipid Metabolismus
P55050	Fatty acid-binding protein 2 (I-FABP)	11	-2.4	4	31	6.62	Lipid Metabolismus
P63101	14-3-3 protein ζ/δ	12	-2.3	18	63	4.73	Signaltransduktion

^{a)} Faktor des Expressionsunterschiedes, wobei “+” für eine höhere und “-“ für eine geringere Proteinexpression in der Vitamin D-Rezeptor-*knockout*-Gruppe gegenüber der Wildtyp-Gruppe steht. ^{b)} Angabe bezogen auf β -Actin als Volllängen-Protein.

Bei der Identifikation der Proteine kam es in einigen Fällen zur Mehrfachdetektion eines Proteins. Das *heat shock cognate 71 kDa protein* (Hsc70), als auch *keratin-19* (K19) und β -*actin* wurden an verschiedenen Positionen auf dem Gel, mit teilweise variablen Molekulargewichten und isoelektrischem Punkt, gefunden. Als Ursache hierfür sind posttranslationale Modifikationen oder Isoformen am wahrscheinlichsten. Zu den Proteinen der Dünndarmmukosa, die in den VDR-KO-Mäusen gegenüber dem WT-Mäusen stärker exprimiert wurden, zählen Vertreter aus dem Bereich der Zelladhäsion, wie der *37/67 kDa laminin Receptor* (37/67LR) und *collagen type VI* (Col6a1), zytoskelett-assoziierte-Proteine, wie das *tromomyosin-3* (Tpm3) und *adseverin* sowie Proteine aus der Zellstress-Regulation, wie das *94 kDa glucose-regulated protein* (GRP94) und der Proteinfaltung, *Valosin containing protein* (VCR/p97) und *Proteasome activator subunit 2* (PA28 β).

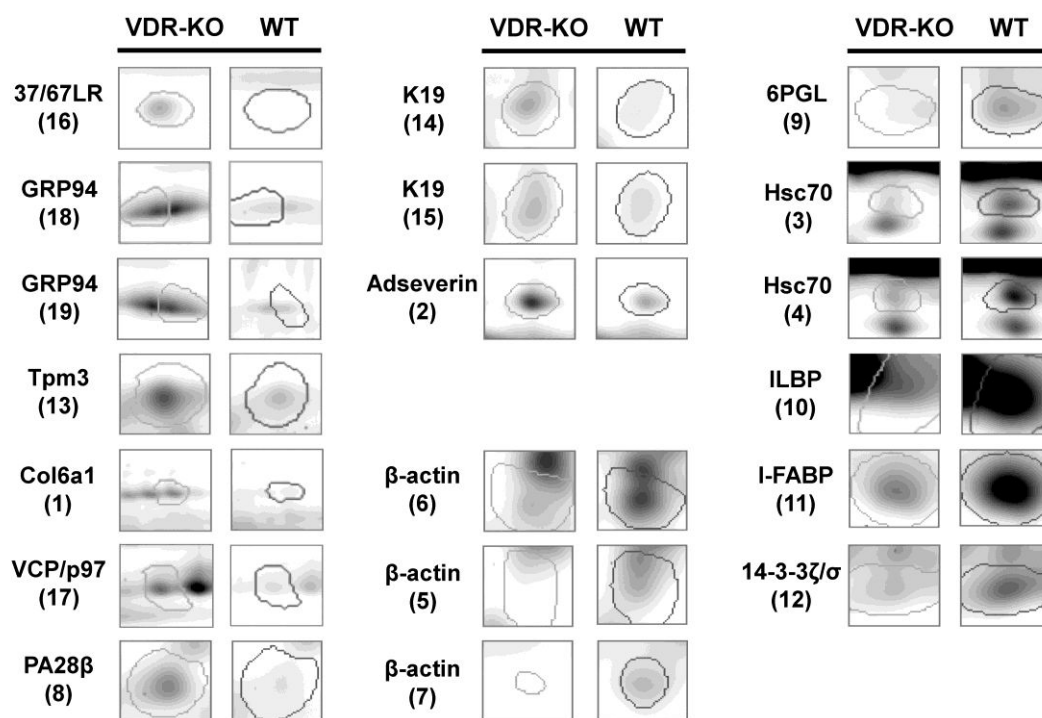


Abbildung 5: Gegenüberstellung der differentiell exprimierten und identifizierten Proteine von Vitamin D-Rezeptor-knockout (VDR-KO)- und Wildtyp (WT)-Mäusen. Proteinspots der Dünndarmmukosa von VDR-KO-Tieren (links) im direkten Vergleich zur WT-Gruppe (rechts). Eingeklammerte Zahlen entsprechen der Spotnummerierung aus Tabelle 10. *37/67 kDa laminin receptor* (37/67LR); *94 kDa glucose-regulated protein* (GRP94); *Tropomyosin 3* (Tpm3); *Collagen type VI (alpha 1 chain)* (Col6a1); *Valosin-containing protein* (VCP/p97); *Proteasome activator complex subunit 2* (PA28 β); *Keratin, type I cytoskeletal 19* (K19); *6-phosphogluconolactonase* (6PGL); *Heat shock cognate 71 kDa protein* (Hsc70); *Ileal lipid-binding protein* (ILBP); *Fatty acid-binding protein 2* (I-FABP); *14-3-3 protein ζ/δ* (14-3-3 ζ/δ).

Zu den Proteinen, die in VDR-KO-Mäusen in geringeren Mengen exprimiert wurden als in WT-Mäusen, zählten das *ileal lipid-binding protein* (ILBP) und das *fatty acid-binding protein 2* (I-FABP) (zwei intrazelluläre, fettsäurenbindende Proteine), das Zytoskelettprotein β -actin, sowie Proteine aus der Zellstress-Antwort (*6-phosphogluconolactonase* (6PGL) und *heat shock cognate 71 kDa protein* (Hsc70) und das *14-3-3 protein ζ/δ*).

3.1.4 Verifikation der Proteomdaten mittels *realtime*-RT-PCR und Western Blot

Neben der Proteinexpressionsebene, die bereits über die Proteomdaten abgedeckt wurde, war es von Interesse, inwieweit die Genexpression der jeweiligen Proteine verändert wurde. Daher wurde zusätzlich die relative mRNA-Konzentration des differenziell exprimierten Proteins untersucht. Im Falle des 37/67LR wurde aufgrund des starken Unterschieds in der Proteinexpression zusätzlich ein Western Blot angefertigt. Die Ergebnisse der Proteinexpressionsanalyse des 37/67LR mittels Western Blot zeigten ebenfalls eine stark erhöhte Expression in VDR-KO-Mäusen (Faktor $\sim +5$, $P < 0,05$) gegenüber WT-Mäusen (Abbildung 6).

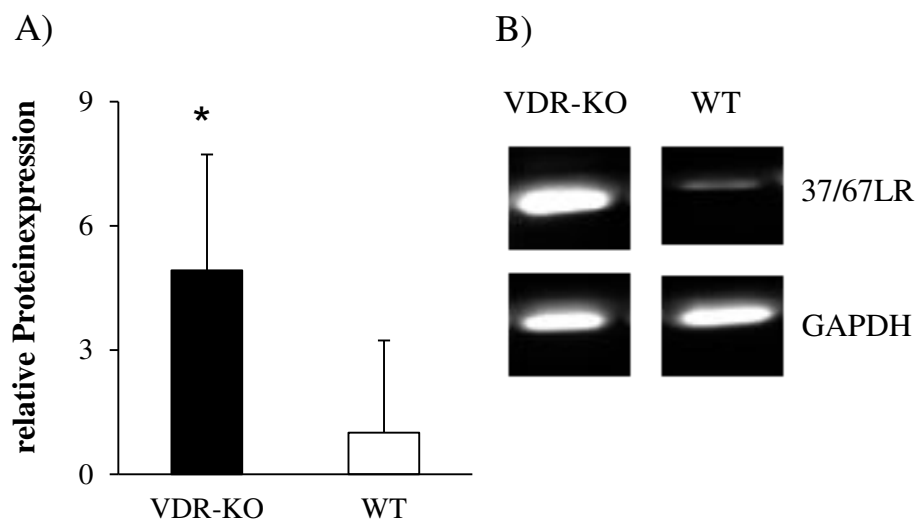


Abbildung 6: Analyse der relativen Proteinexpression des 37/67 kDa laminin receptor mittels Western Blot. A) Proteinexpression des 37/67 kDa laminin receptor (37/67LR) der Dünndarmmukosa von Vitamin D-Rezeptor-*knockout* (VDR-KO)- und Wildtyp (WT)-Mäusen. Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben, $n = 6$ pro Gruppe. *Signifikant verschieden von WT-Tieren ($P < 0,05$, Student's t-Test). B) Repräsentativer Auszug eines Immuno Blots des 37/67LR und GAPDH der Dünndarmmukosa von VDR-KO und WT-Mäusen. Zur Normalisierung diente *glyceraldehyd 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH).

Der 37/67LR fungiert als membranständiger Rezeptor für Extrazellulärmatrix (EZM)-Bestandteile. Die Bestimmung der relativen mRNA-Konzentrationen des für den 37/67LR kodierenden Gens (*Rpsa*) zeigte hingegen keinen Unterschied zwischen VDR-KO und WT-Mäusen (KO $1,10 \pm 0,67$; WT $1,0 \pm 0,45$; Abbildung 7). Ausgehend von den Proteomdaten konnte eine Häufung von EZM-assoziierten Proteinen beobachtet werden. Neben dem 37/67LR ist auch *Col6a1*, als direkter Bestandteil der EZM, durch den VDR-KO beeinflusst worden. Expressionsanalysen der *Col6a1*-mRNA zeigen eine höhere relative mRNA-Konzentration der VDR-KO-Gruppe gegenüber dem WT (KO $1,74 \pm 0,59$; WT $1,0 \pm 0,65$; $P < 0,05$, Student's t-Test Abbildung 7) und sind damit gleichgerichtet mit den Proteomdaten.

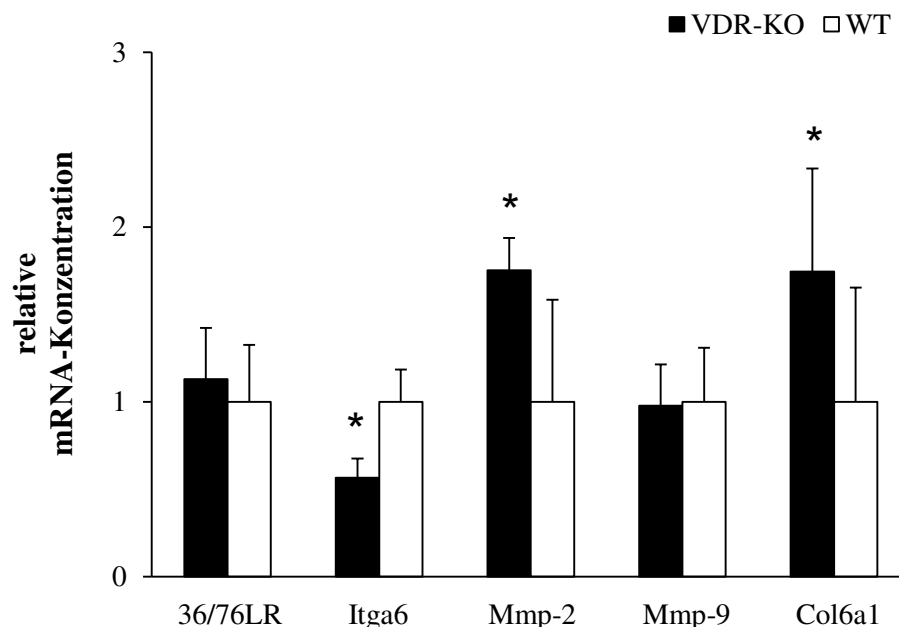


Abbildung 7: Relative mRNA-Konzentrationen Extrazellulärmatrix assoziierter Faktoren der Dünndarmmukosa von Vitamin D-Rezeptor-knockout (VDR-KO)- und Wildtyp (WT)-Mäusen.

Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben, $n = 6$ pro Gruppe. *Signifikant verschieden von WT-Tieren ($P < 0,05$, Student's t-Test). Zur Normalisierung diente *ppia* und *gapdh*. 37/67 kDa laminin receptor (37/67LR); Collagen 6a1 (*Col6a1*) Matrix metalloproteinase (Mmp); Integrin alpha 6 (*Itga6*).

Aufgrund dieser Häufung sollten weitere Gene von EZM-assoziierten Proteinen bestimmt werden. Zu diesen zählen die *matrix metalloproteinasen* (Mmp)-2 und -9 sowie *integrin alpha-6* (*Itga6*). Es handelt sich hierbei um Faktoren, die die Zusammensetzung und den Umbau der EZM regulieren bzw. die basale Adhäsion einer Zelle vermitteln. Genexpressionsanalysen der *Mmp-2* zeigten eine erhöhte relative mRNA-Expression in VDR-KO-Mäusen gegenüber dem

WT (KO $1,75 \pm 0,19$; WT $1,0 \pm 0,58$; $P < 0,05$, Abbildung 7). Mmp-9 war hingegen nicht verschieden zwischen den Gruppen. *Integrin alpha-6* ist Bestandteil von EZM-Rezeptoren die Laminin binden und ist somit an der Verankerung epithelialer Zellen an deren Basalmembran beteiligt. Die relativen mRNA-Konzentrationen des Itga6 der VDR-KO-Gruppe waren geringer, als die des WTs ($P < 0,05$; Student's t-Test, Abbildung 7). In Übereinstimmung zur Proteomanalyse waren die relativen mRNA-Konzentrationen des β -Actin (VDR-KO $0,49 \pm 0,18$, WT $1,0 \pm 0,36$; $P < 0,05$; Student's t-Test) und des 14-3-3 ζ/δ (VDR-KO $0,60 \pm 0,27$, WT $1,0 \pm 0,36$; $P < 0,05$; Student's t-Test) der VDR-KO-Gruppe gegenüber der WT-Gruppe geringer. Die Messungen der relativen mRNA-Konzentrationen des *valosin-containing protein* (VDR-KO $0,86 \pm 0,09$; WT $1,0 \pm 0,19$), *keratin 19* (VDR-KO $0,76 \pm 0,30$; WT $1,0 \pm 0,44$), *adseverin* (VDR-KO $1,04 \pm 0,43$; WT $1,0 \pm 0,33$), *fatty acid binding protein-2* (VDR-KO $1,04 \pm 0,22$; WT $1,0 \pm 0,23$), dem *heat shock cognate 71 kDa protein* (VDR-KO $0,89 \pm 0,25$; WT $1,0 \pm 0,25$), *6-phosphogluconolactonase* (VDR-KO $1,38 \pm 0,26$; WT $1,0 \pm 0,34$) zeigten keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Das *94 kDa glucose-regulated protein* (VDR-KO $0,73 \pm 0,05$; WT $1,0 \pm 0,11$; $P < 0,05$; Student's t-Test) sowie die *proteasome activator complex subunit 2* (VDR-KO $0,64 \pm 0,19$; WT $1,0 \pm 0,30$; $P < 0,05$; Student's t-Test) wiesen zwar einen signifikanten Unterschied zwischen VDR-KO und WT auf, dieser entsprach aber nicht dem Ergebnis aus der Proteomanalyse.

Des Weiteren wurde die relative mRNA-Konzentration des Hspa5 bestimmt. Hspa5 codiert für das Chaperone GRP94, das von zentraler Bedeutung für den proteasomalen Abbau fehlerhafter Proteine im endoplasmatischen Retikulum ist und damit, wie Hsc70 und GRP94, in die Stress-Abwehrmechanismen einer Zelle eingebunden ist. Die relativen mRNA-Konzentrationen des Hspa5 der VDR-KO-Gruppe zeigten signifikant geringere Werte als die der WT-Gruppe (Abbildung 8; $P < 0,05$; Student's t-Test). Um zu testen, ob Veränderungen in der Expression dieser Chaperone auf ein verändertes Aufkommen an oxidativem Zellstress hindeuten, wurden zudem die relativen mRNA-Konzentrationen von Zielgenen des „*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*“ (Nrf2)-Transkriptionsfaktors bestimmt. Bei oxidativem Stress induziert Nrf2 die Expression von Genen die ein „*antioxidant response element*“ (ARE) im Promotor tragen (Itoh et al., 1997). Hierzu zählen Enzyme des anti-oxidativen Schutzsystemes (z.B. *NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1*) und auch Enzyme, die Kofaktoren (z.B. Glutathion) oder reduzierende Äquivalente (NAD(P)H) für antioxidative Reaktionen bereitstellen (z.B. Glutamate-cysteine ligase (GCLM), Glutamylcysteine synthetase (GCLC), Glutathione S-transferasen (Gst)) (Lennicke et al., 2015). Glutathion ist ein wichtiger Partner

für Redox-Prozesse und beteiligt an Phase II Biotransformationen. Die Glutamate-cysteine ligase sowie die Glutamylcysteine synthetase regulieren jeweils die Glutathionbiosynthese. Glutathione S-transferasen katalysieren schließlich die Konjugation des Glutathion an Xenobiotika oder durch Zellstress modifizierte Proteine.

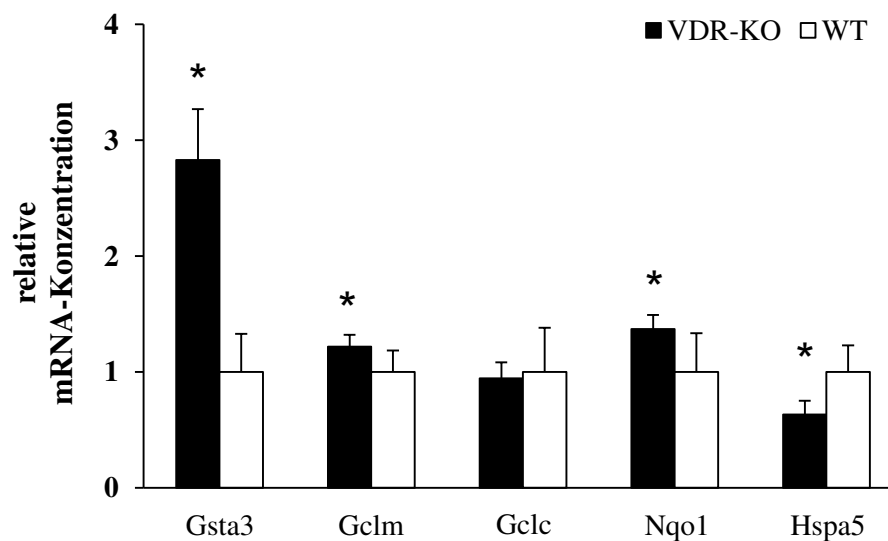


Abbildung 8: Relative mRNA-Konzentrationen von Zellstress assoziierten Genen in der Dünndarmmukosa von Vitamin D-Rezeptor-knockout (VDR-KO)- und Wildtyp (WT)-Mäusen. Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben, n = 6 pro Gruppe. *Signifikant verschieden von WT-Tieren ($P < 0,05$, Student's t-Test). Zur Normalisierung diente ppia und gapdh. *Glutamate-cysteine ligase* (Gclm); *Glutamylcysteine synthetase* (Gclc); *Glutathione S-transferase A3* (Gsta3); *NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1* (Nqo1); *Heat shock protein family A (Hsp70) member 5* (Hspa5).

Die Bestimmung von Nrf2-Zielgenen zeigte, dass die relativen Nqo1 mRNA-Konzentrationen der VDR-KO-Mäuse signifikant höher waren als die der WT-Mäuse (Abbildung 8; $P < 0,05$; Student's t-Test). Im Vergleich zur WT-Gruppe war auch die relative mRNA-Konzentration der Glutamate-cysteine ligase von VDR-KO-Mäusen erhöht (Abbildung 8; $P < 0,05$; Student's t-Test). Hingegen konnte für die Glutamylcysteine synthetase keinen Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Von den getesteten Glutathione S-transferasen, war gsta3 signifikant in der VDR-KO-Gruppe erhöht (Abbildung 8; $P < 0,05$; Student's t-Test). Die mRNA-Expression des *heat shock protein family A (Hsp70) member 5* (Hspa5) gilt ebenfalls als redox-sensitiv und war in VDR-KO-Mäusen geringer als in WT-Mäusen (Abbildung 8; $P < 0,05$; Student's t-Test).

3.1.5 Expressionsanalysen intestinaler Lipidtransporter sowie Triglyzerid- und Cholesterol-Konzentrationen in Plasma und Leber von VDR-KO- und WT-Mäusen

Da die Proteine *ileal lipid-binding protein* und *fatty acid binding protein-2* Hinweise bezüglich einer möglichen Veränderung in der intestinalen Lipidresorption aufzeigten, wurden zusätzliche Bestimmungen der mRNA-Expression weiterer Lipidtransporter sowie eine Untersuchung der Triglyzerid- und Cholesterol-Konzentrationen in Plasma und Leber durchgeführt.

Es wurden die relativen mRNA-Konzentrationen des *cluster of differentiation 36* (Cd36) in Dünndarmmukosa, Niere, Leber und epididymalem Fettgewebe bestimmt. Außerdem wurden der *scavenger receptor class B member 1* (Scarb1) und das *Niemann-Pick C1-like protein 1* (Npc111), welche jeweils in die Fettsäure und Cholesterol-Aufnahme involviert sind, in der Dünndarmmukosa bestimmt. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 9 dargestellt. Dabei traten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen in der mRNA-Expression des cd36 in der Dünndarmmukosa und dem Nierengewebe auf (Abbildung 9). Die relativen mRNA-Konzentrationen des cd36 in Leber, Niere und epididymalem Fettgewebe sowie die mRNA-Konzentrationen des scarb1 und npc111 waren zwischen den Gruppen nicht verschieden (Abbildung 9).

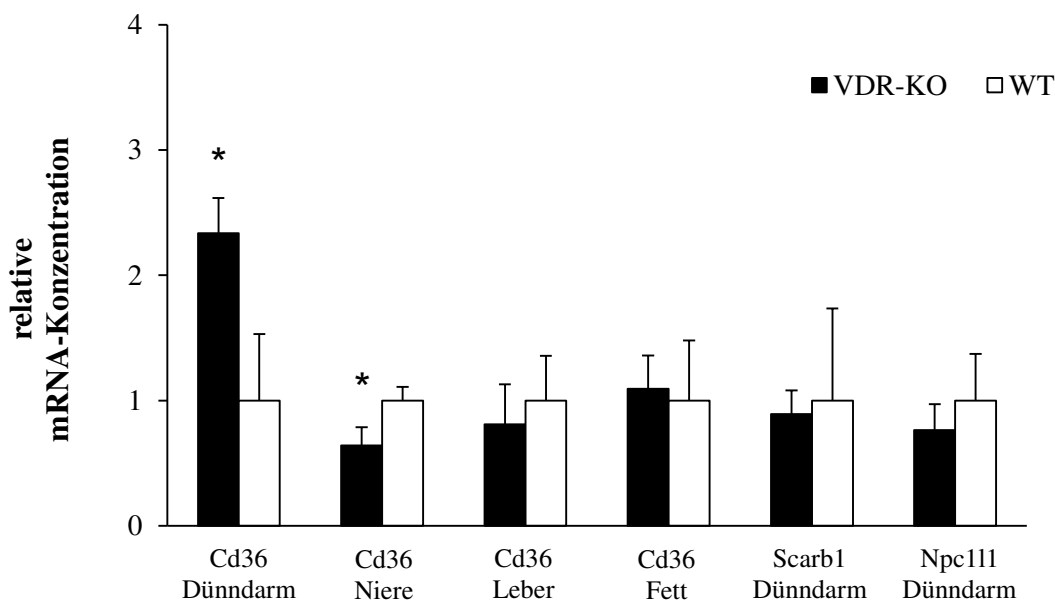


Abbildung 9: Relative mRNA-Konzentrationen von Fettsäure- und Steroltransportern von Vitamin D-Rezeptor-knockout (VDR-KO)- und Wildtyp (WT)- Mäusen. Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben, n = 6 pro Gruppe. *Signifikant verschieden von WT-Tieren ($P < 0,05$, Student's t-Test). Zur Normalisierung diente ppia und gapdh. *Cluster of differentiation 36* (Cd36); *Scavenger receptor class B member 1* (Scarb1); *Niemann-Pick C1-like protein 1* (Npc111).

Die Auswertung der Triglyzerid- und Cholesterol-Konzentrationen in Plasma und Leber zeigten jedoch keinen Unterschied zwischen VDR-KO und WT-Mäusen. Die Triglyzeridkonzentration im Plasma der VDR-KO-Mäuse betrug $1,85 \pm 0,31$ mmol/l, die der WT-Mäuse $1,71 \pm 0,48$ mmol/l. Die Triglyzeridkonzentration in der Leber der VDR-KO-Mäuse betrug $60,3 \pm 8,4$ μ mol/g, die der WT-Mäuse $57,9 \pm 8,8$ μ mol/g. Die Cholesterolkonzentration im Plasma der VDR-KO-Mäuse betrug $3,34 \pm 0,28$ mmol/l, die der WT-Mäuse $3,39 \pm 0,54$ mmol/l. Die Cholesterolkonzentration in der Leber der der VDR-KO-Mäuse betrug $10,9 \pm 1,4$ μ mol/g, die der WT-Mäuse $12,4 \pm 2,4$ μ mol/g.

3.1.6 Plasmakonzentrationen von Vitamin D-Metaboliten, Expressionsanalysen intestinaler Lipidtransporter sowie Triglyzerid- und Cholesterol-Konzentrationen in Plasma und Leber von Ratten nach Fütterung verschiedener Vitamin D-Gehalte

Die Plasmakonzentrationen an $25(\text{OH})\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ließen in Abhängigkeit von den Vitamin D-Konzentrationen in der Diät einen dosisabhängigen Anstieg erkennen. Die Konzentration des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ war bei den Tieren der Mangelgruppe um mehr als 50% niedriger als bei denen der adäquat- oder reichlich-versorgten Gruppen ($P < 0,001$ Fisher's Test). Die adäquat- oder reichlich-versorgten Gruppen unterschieden sich im $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nicht voneinander (Abbildung 10). Expressionsanalysen der Dünndarmmukosa zeigten höhere relative mRNA-Konzentrationen des *cd36* ($P < 0,04$) in den Tieren der Mangelgruppe gegenüber der Gruppe, die reichlich mit Vitamin D versorgt wurde (Abbildung 11). Die relativen mRNA-Konzentrationen der Lipidtransporter *npc111* und *scarb1* waren nicht verschieden zwischen den Gruppen. Die Triglyzerid-Konzentrationen in Plasma, VLDL und Leber sowie die Cholesterinkonzentrationen in Plasma, LDL, HDL und Leber wurden durch die unterschiedliche Vitamin D-Versorgung nicht beeinflusst (Tabelle 12).

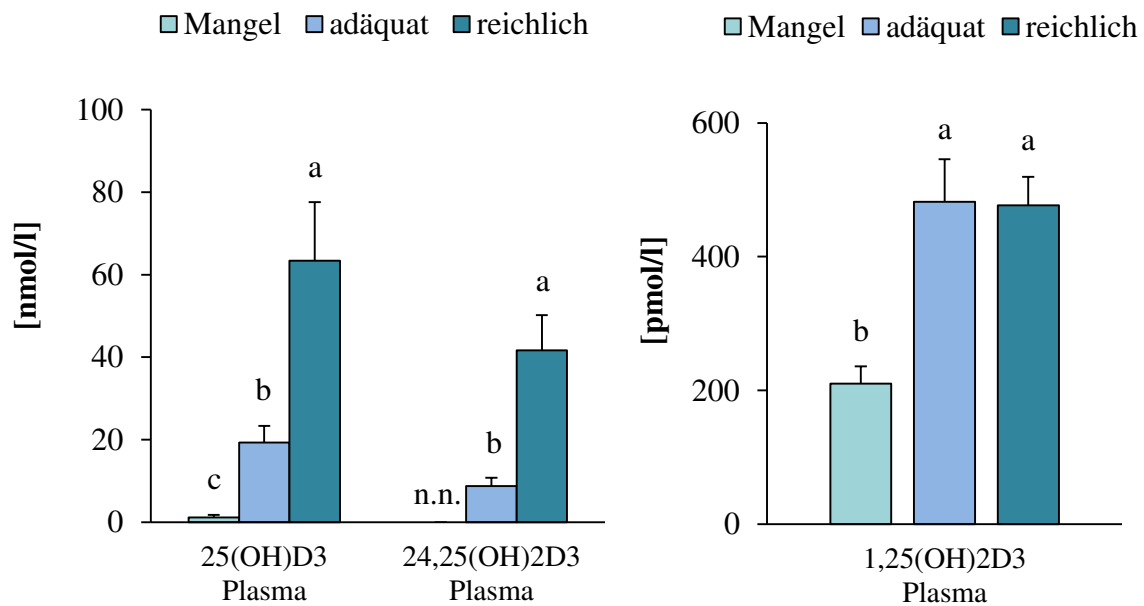


Abbildung 10: Plasmakonzentrationen an 25(OH)D₃, 24,25(OH)₂D₃ und 1,25(OH)₂D₃ in Ratten mit unterschiedlicher Vitamin D-Zufuhr.

Mittelwert ± Standardabweichung (n=12); ^{a,b,c} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (P<0,05), Fisher's Test; n.n., unterhalb der Nachweisgrenze.

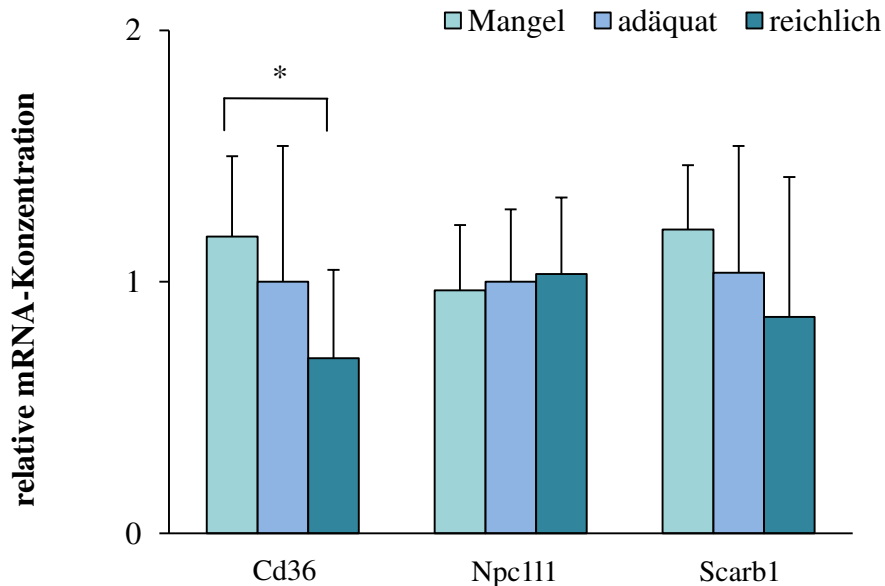


Abbildung 11: Relative mRNA-Konzentration von Lipidtransportern in der Dünndarmmukosa von Ratten mit unterschiedlicher Vitamin D-Zufuhr.

Mittelwert ± Standardabweichung (n=12). *signifikant verschieden von der reichlich versorgten Gruppe (P<0,05), Student's t-Test. Zur Normalisierung diente gapdh. Cluster of differentiation 36 (Cd36); Niemann-Pick C1-like protein 1 (Npc111); Scavenger receptor class B member 1 (Scarb1).

Tabelle 12: Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen in Plasma, Lipoproteinen und Leber von Ratten mit unterschiedlicher Vitamin D-Zufuhr

		Vitamin D ₃ -Gehalte der Diät		
		Mangel (0 IU/kg)	adäquat (1.000 IU/kg)	reichlich (10.000 IU/kg)
Triglyceridkonzentration				
Plasma	[mmol/l]	2,79 ± 0,16	2,88 ± 1,96	3,09 ± 1,04
VLDL	[mmol/l]	1,92 ± 1,02	2,22 ± 1,34	2,40 ± 0,87
Leber	[μmol/g]	85,2 ± 36,5	60,3 ± 32,8	65,2 ± 21,1
Cholesterinkonzentration				
Plasma	[mmol/l]	1,76 ± 0,47	1,80 ± 0,58	1,82 ± 0,53
LDL	[mmol/l]	0,41 ± 0,14	0,37 ± 0,14	0,38 ± 0,05
HDL	[mmol/l]	0,81 ± 0,17	0,78 ± 0,08	0,74 ± 0,07
Leber	[μmol/g]	24,8 ± 8,2	23,8 ± 10,4	24,1 ± 6,7

Mittelwerte ± Standardabweichung (n=12)

3.2 Einfluss des Vitamin D-Rezeptors auf die Expression von Zelladhäsionsproteinen sowie der Morphologie des Darms (Versuch II)

3.2.1 Futteraufnahme, Gewichtsentwicklung sowie Kalzium-, Phosphat-, Parathormonkonzentrationen im Serum von VDR-KO- und WT-Mäusen

Die tägliche Futteraufnahme zwischen VDR-KO- und WT-Mäusen unterschied sich nicht. Hingegen war die Körpermasse der VDR-KO-Mäuse bei Versuchsende um ca. 20% geringer als die der WT-Tiere (Tabelle 13). Die Serumkonzentrationen an freiem Kalzium und dem Parathormon waren zwischen den Versuchsgruppen signifikant verschieden. VDR-KO-Mäuse hatten im Mittel ~12% geringere Kalziumkonzentrationen und stark erhöhte Parathormonkonzentrationen im Vergleich zu WT-Mäusen (Tabelle 13).

Tabelle 13: Futterraufnahme, Gewichtsentwicklung und Kalzium-, Phosphat-, Parathormonkonzentrationen im Serum fünf Monate alter VDR-KO- und WT-Mäuse

	WT	VDR-KO	P-Wert
Futterraufnahme [g/d]	3,44 ± 0,09	3,47 ± 0,08	0,489
Körpermasse final [g]	33,6 ± 3,5	26,6 ± 0,7*	0,001
Kalzium [mmol/l]	3,01 ± 0,29	2,65 ± 0,27*	0,027
Phosphat [mmol/l]	2,32 ± 0,39	2,05 ± 0,55	0,306
Parathormon [pg/ml]	34,1 ± 33,8	722 ± 568**	0,010

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen angegeben, n = 8 pro Gruppe. Vitamin D-Rezeptor-*knockout* (VDR-KO); Wildtyp (WT). *Signifikant verschieden von WT-Tieren (Student's t-Test). **Signifikant verschieden von WT-Tieren (Mann-Whitney U-Test).

Bezüglich der Serumphosphatkonzentration konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Tabelle 13).

3.2.2 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen des Darmes von VDR-KO- und WT-Mäusen

3.2.2.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen des Dünndarms und Kolons

Um zu untersuchen, ob sich die Morphologie des Darms zwischen VDR-KO- und WT-Mäusen unterscheidet, wurden Gewebeschnitte des Dün- und Dickdarms angefertigt und diese licht- bzw. elektronenmikroskopisch ausgewertet. Zunächst wurde die Länge des Dünndarms und Kolons gemessen (Tabelle 14). Die absolute Länge des Dünndarms war in VDR-KO-Mäusen ~7% geringer als in WT-Mäusen. Die absolute Kolonlänge unterschied sich nicht. Da die VDR-KO-Mäuse eine kürzere Körperlänge aufwiesen als die WT-Mäuse, wurde die Dünndarm- und Kolonlänge ins Verhältnis zur Körperlänge gesetzt. Die relativen Darmlängen unterschieden sich jedoch nicht zwischen den Gruppen (Tabelle 14).

Tabelle 14: Körper- und Darmlängen fünf Monate alter VDR-KO- und WT-Mäuse

	WT	VDR-KO	P-Wert
Körperlänge [cm]	9,17 ± 0,14	8,49 ± 0,38*	0,001
Dünndarmlänge [cm]	38,9 ± 2,2	36,1 ± 1,1*	0,010
Kolonlänge [mmol/l]	7,22 ± 0,84	7,11 ± 0,69	0,794
Dünndarmlänge/Körperlänge [cm/cm]	4,21 ± 0,11	4,26 ± 0,34	0,714
Kolonlänge/Körperlänge [cm/cm]	0,78 ± 0,09	0,84 ± 0,10	0,301

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen angegeben, n = 8 pro Gruppe. Vitamin D-Rezeptor-*knockout* (VDR-KO); Wildtyp (WT). *Signifikant verschieden von WT-Tieren (P<0,05, Student`s t-Test).

Um mögliche Unterschiede in der Morphologie des Darms zu identifizieren, wurde die Länge der Dünndarmzotten der Abschnitte Duodenum, Jejunum und Ileum und darüber hinaus die Kryptentiefe der Darmsektionen Duodenum, Jejunum, Ileum sowie des distalen Kolons ausgemessen und zwischen den Gruppen verglichen. Die Ergebnisse dieser Analyse ist Tabelle 15 zusammengefasst. Bezüglich der absoluten Länge der Dünndarmzotten bestand kein Unterschied zwischen VDR-KO- und WT-Mäusen. Auch im Zotten/Krypen-Verhältnis unterschieden sich die beiden Gruppen nicht. Die Kryptentiefe des Duodenums der VDR-KO-Mäuse war tendenziell geringer als die der WT-Tiere (Tabelle 15; P<0,1; Student`s t-Test).

Tabelle 15: Länge der Zotten und Tiefe der Krypten des Dünndarms und Kolons fünf Monate alter VDR-KO- und WT-Mäuse

Gewebeabschnitt		Genotyp	MW [μm] \pm SD	P-Wert
Duodenum				
Zotten		VDR-KO	373 \pm 36,0	0,242
		WT	394 \pm 24,2	
Krypten		VDR-KO	71,8 \pm 9,0 [#]	0,077
		WT	83,9 \pm 13,8	
Zotten/Krypten Ratio		VDR-KO	5,32 \pm 1,2	4,26
		WT	4,83 \pm 0,9	
Jejunum				
Zotten		VDR-KO	325 \pm 41,0	0,666
		WT	337 \pm 48,6	
Krypten		VDR-KO	73,1 \pm 8,6	0,943
		WT	68,4 \pm 2,7	
Zotten/Krypten Ratio		VDR-KO	4,46 \pm 0,8	0,289
		WT	5,00 \pm 0,7	
Ileum				
Zotten		VDR-KO	225 \pm 28,8	0,476
		WT	205 \pm 9,2	
Krypten		VDR-KO	72,5 \pm 9,3	0,475
		WT	79,5 \pm 2,6	
Zotten/Krypten Ratio		VDR-KO	3,12 \pm 0,3	0,116
		WT	2,77 \pm 0,3	
Kolon (distal)				
Krypten		VDR-KO	142 \pm 7,5	0,225
		WT	155 \pm 22,3	

Werte sind als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichungen (SD) angegeben, n = 8 pro Gruppe. Vitamin D-Rezeptor-*knockout* (VDR-KO); Wildtyp (WT). [#]Tendenziell verschieden von WT-Tieren (P<0,1, Student's t-Test).

Der histologische Vergleich der mikroskopischen Strukturen des Dün- und Dickdarms der VDR-KO-Maus mit der WT-Variante zeigte keine auffälligen Unterschiede in deren morphologischer Ausprägung. Abbildung 12 zeigt repräsentative histologische Querschnitte des Dünndarms.

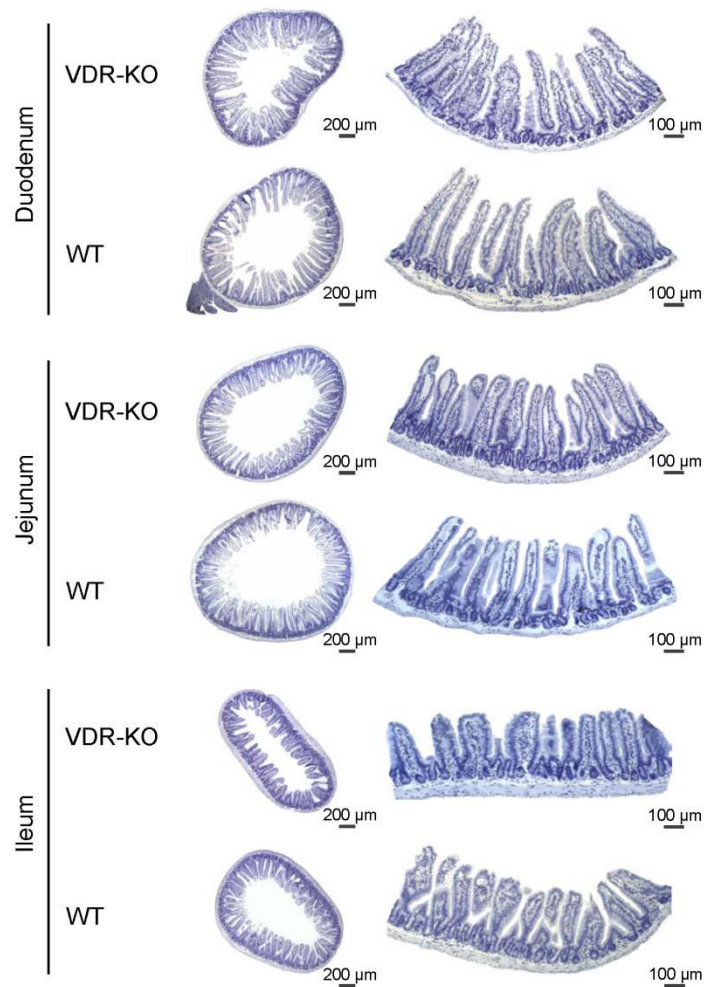


Abbildung 12: Repräsentative histologische Aufnahmen der einzelnen Sektionen des Dünndarms von Vitamin D-Rezeptor-*knockout* (VDR-KO)- und Wildtyp (WT)-Mäusen. Linke Seite: Querschnitte in 5-facher Vergrößerung. Rechte Seite: Detailabbildung eines Ausschnittes aus dem respektiven Querschnitt der linken Seite in 10-facher Vergrößerung.

In Abbildung 13 sind histologische Querschnitte des Kolons sowie vergrößerte mikroskopische Ausschnitte der Kolonkrypten dargestellt.

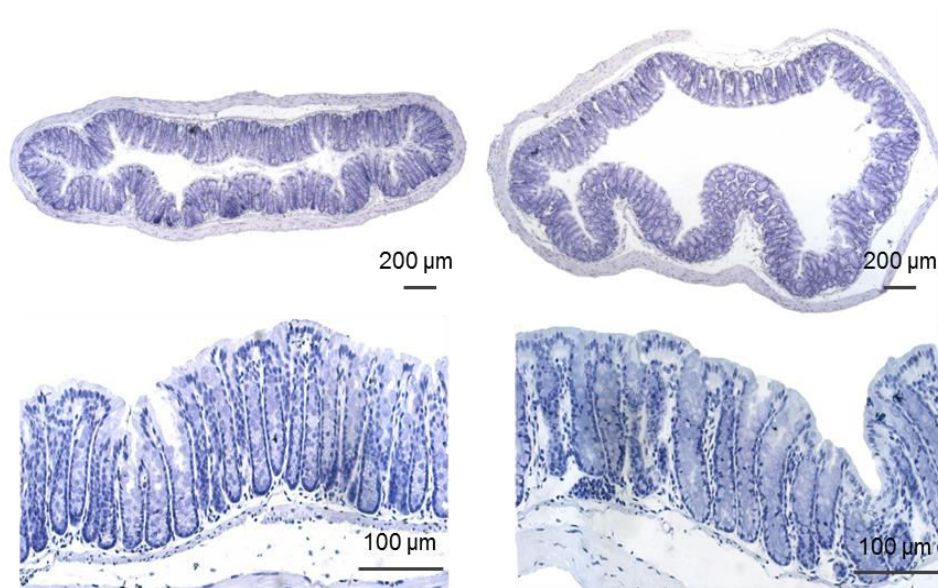


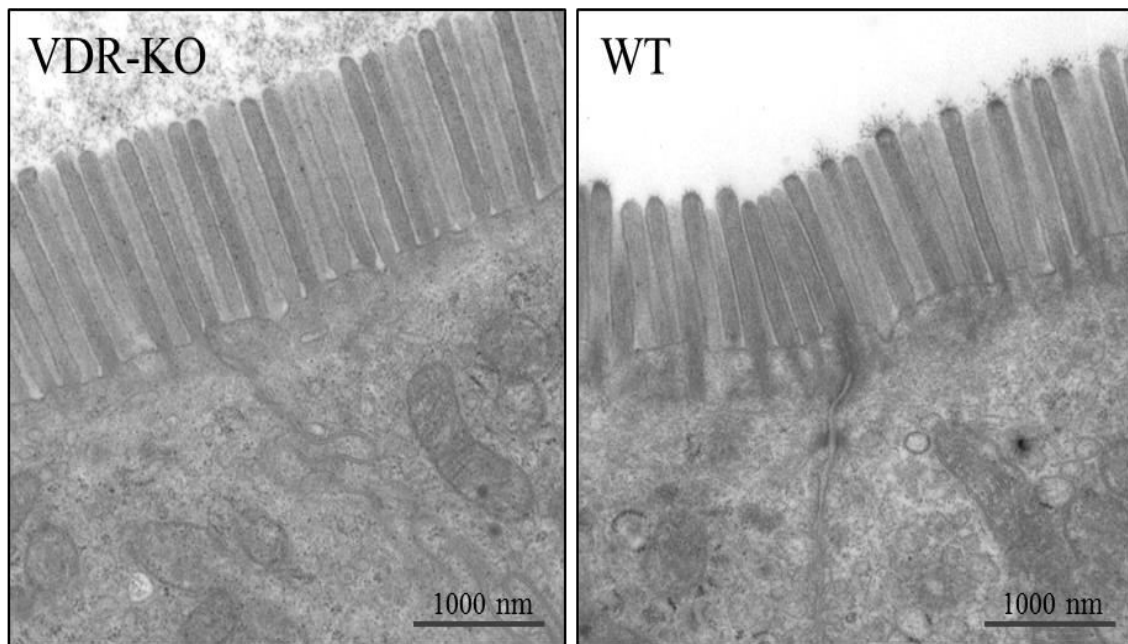
Abbildung 13: Repräsentative histologische Querschnitte des distalen Kolons.

Repräsentative Querschnittsaufnahmen des distalen Kolons von Vitamin D-Rezeptor-*knockout* (VDR-KO)- und Wildtyp (WT)-Mäusen mit Detailvergrößerung im unteren Bild. Links, VDR-KO; Rechts, WT.

3.2.2.2 Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen

Die Mikrovillillängen duodenaler Enterozyten von VDR-KO- und WT-Mäusen zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Im Durchschnitt waren die Mikrovilli der VDR-KO-Mäuse um ca. 19% länger als die der WT-Mäuse (Abbildung 14; $P < 0,05$; Student's t-Test).

A)



B)

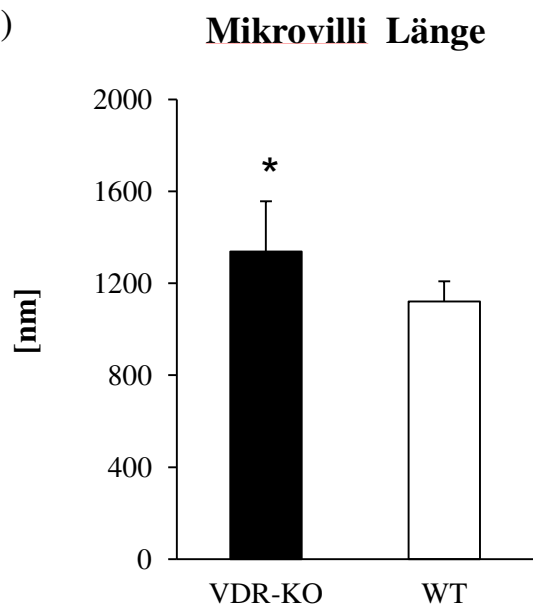
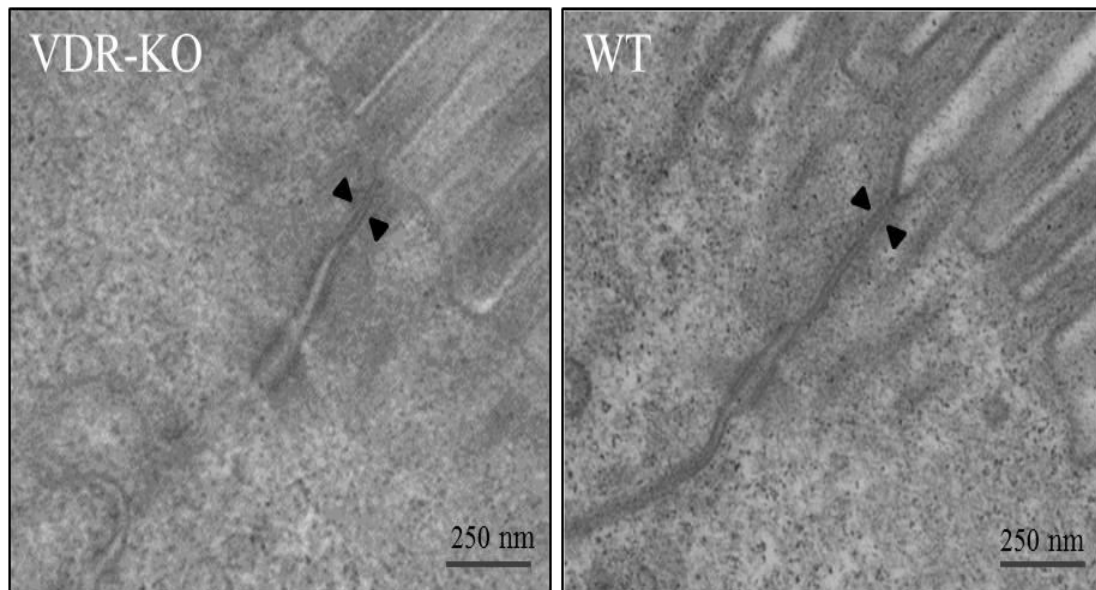


Abbildung 14: Mikrovillilänge duodenaler Enterozyten von Vitamin D-Rezeptor-knockout (VDR-KO)- und Wildtyp (WT)-Mäusen.

A) Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen des apikalen Enterozyten von VDR-KO- und WT-Mäusen. B) Auswertung der durchschnittlichen Mikrovillilänge. Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben, $n = 8$ pro Gruppe; *Signifikant verschieden von WT-Tieren ($P < 0,05$, $P < 0,05$, Student's t-Test).

Die Weite des *tight junction* Spalts, die als Indikator für die parazelluläre Durchlässigkeit eines epithelialen Zellverbandes gilt, lag bei allen Tieren im Bereich von 16,6 nm bis 18,2 nm. Allerdings unterschied sich die Weite der *tight junctions* zwischen VDR-KO- und WT-Mäusen nicht (Abbildung 15).

A)



B)

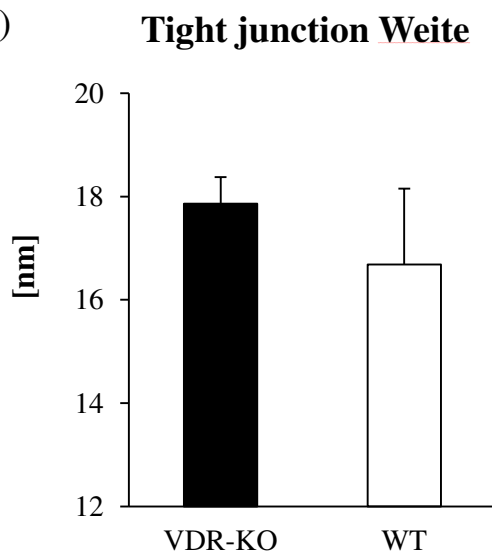


Abbildung 15: Tight junction Weite des duodenalen Enterozyten von Vitamin D-Rezeptor-knockout (VDR-KO)- und Wildtyp (WT)-Mäusen. A) Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen der *tight junction* benachbarter Enterozyten des Duodenums von VDR-KO- und WT-Mäusen. B) Auswertung der *tight junction* Weite. Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben, $n = 8$ pro Gruppe.

3.2.3 Ergebnisse der Protein- und mRNA-Expressions-Analysen von Dünndarm- und Kolon-Gewebeproben

3.2.3.1 Relative mRNA- und Proteinexpression des *ezrin* in Dünndarm und Kolon

Die Mikrovilligenese und damit auch deren Längenausprägung werden unter anderem durch das Protein Ezrin reguliert. Daher sollte die Expression des *ezrin* sowohl auf der mRNA- als auch auf der Proteinebene des Dünndarms und Kolons von VDR-KO- und WT-Mäusen bestimmt werden. Im Ergebnis war nicht nur die mRNA-Expression sondern auch die Proteinexpression des *ezrin* der Dünndarmmukosa in der VDR-KO-Gruppe signifikant höher als in der WT-Gruppe (Abbildung 16; $P < 0,05$; Student's t-Test).

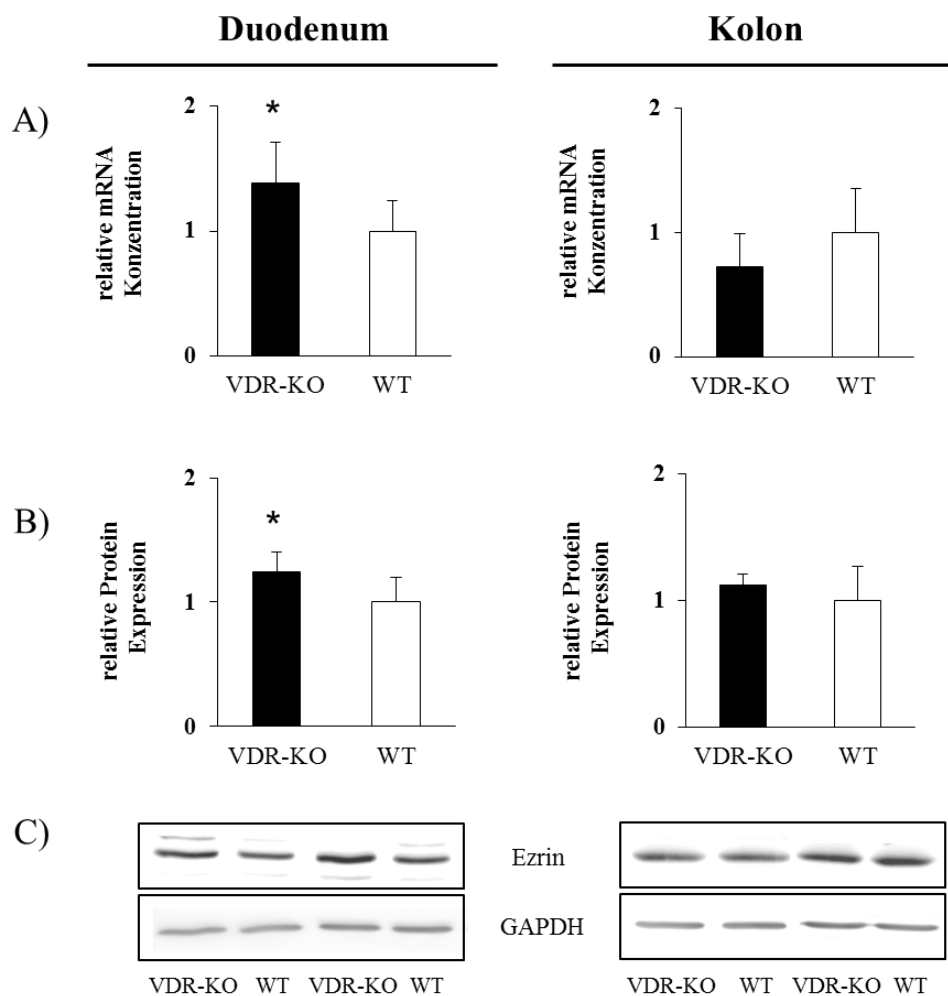


Abbildung 16: Ezrin-Expression in Duodenum und Kolon. Analyse der *ezrin*-Expression von Vitamin D-Rezeptor-knockout (VDR-KO)- und Wildtyp (WT)-Mäusen mittels A) *realtime*-RT-PCR und B) mittels Immuno Blot. C) Repräsentative Immuno-Blots von zwei Tieren je Gruppe. Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben, $n = 8$ pro Gruppe; *Signifikant verschieden von WT-Mäusen ($P < 0,05$, Student's t-test). Zur Normalisierung der mRNA-Konzentrationen diente *ppia* und *gapdh*. Die Proteinkonzentrationen wurden auf *glyceraldehyd 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) normalisiert.

Der Unterschied betrug ca. 40% bezüglich der relativen mRNA-Konzentration und ca. 25% in der Proteinexpression (Abbildung 16). Neben der Expression im Dünndarm wurde auch die Ezrinexpression im Kolon bestimmt. Hier konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abbildung 16).

3.2.3.2 Relative mRNA- und Proteinexpression von Proteinen, die an der Zelladhäsion beteiligt sind

Um der Bedeutung des VDR für die parazelluläre Permeabilität des intestinalen Epithels nachzugehen, wurde die mRNA- und Proteinexpression ausgewählter Proteine der *tight junctions* und *adherence junctions* bestimmt (Abbildung 17 und 18).

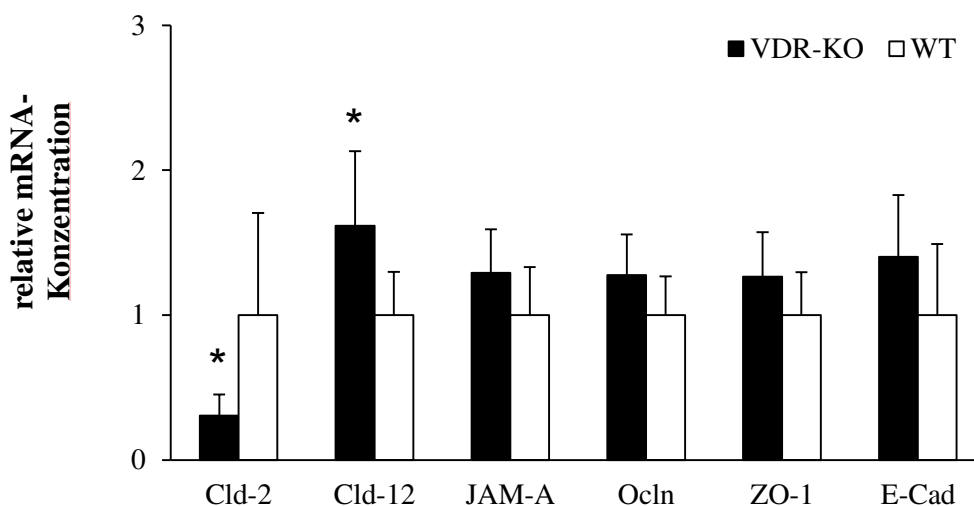


Abbildung 17: Realtime-RT-PCR-Analysen von Zell-Zell-Kontakt-Proteinen der Dünndarmmukosa. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen der relativen mRNA-Konzentrationen von Vitamin D-Rezeptor-*knockout* (VDR-KO)- und Wildtyp (WT)-Mäusen, n = 8 pro Gruppe; *Signifikant verschieden von WT-Tieren (P<0,05, P<0,05, Student's t-Test). Zur Normalisierung der mRNA-Konzentrationen diente ppia und gapdh. *Claudin-2* (Cld-2); *Claudin-12* (Cld-12); *Junctional adhesion molecule A* (JAM-A); *Occludin* (Ocln); *Zonula occludens protein-1* (ZO-1), *E-Cadherin* (E-Cad).

Besonders hervorstechend war dabei das *tight junction* Protein *claudin-2* (Cld-2), das unter anderem die parazelluläre Durchlässigkeit von Kalziumionen reguliert (Günzel and Yu, 2013). Sowohl die relative mRNA- als auch die Protein-Konzentration des Cld-2 war in der VDR-KO-Gruppe deutlich geringer als in WT-Mäusen (Abbildung 17 und 18, P<0,05, Student's t-Test). *Claudin-12* (Cld-12) ist ebenfalls mit der parazelluläre Durchlässigkeit von

Kalzium assoziiert und wurde daher ebenso in die Analysen einbezogen. Zu verzeichnen war ein Anstieg in der relativen mRNA-Konzentration der Dünndarmmukosa von VDR-KO-Mäusen (Abbildung 17, $P < 0,05$, Student's t-Test). Allerdings gab es keinen Unterschied bei der Proteinexpression des Cld-12 zwischen VDR-KO- und WT-Mäusen (Abbildung 18).

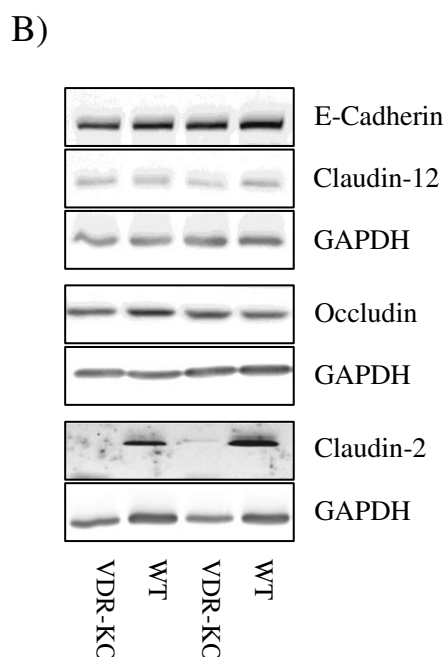
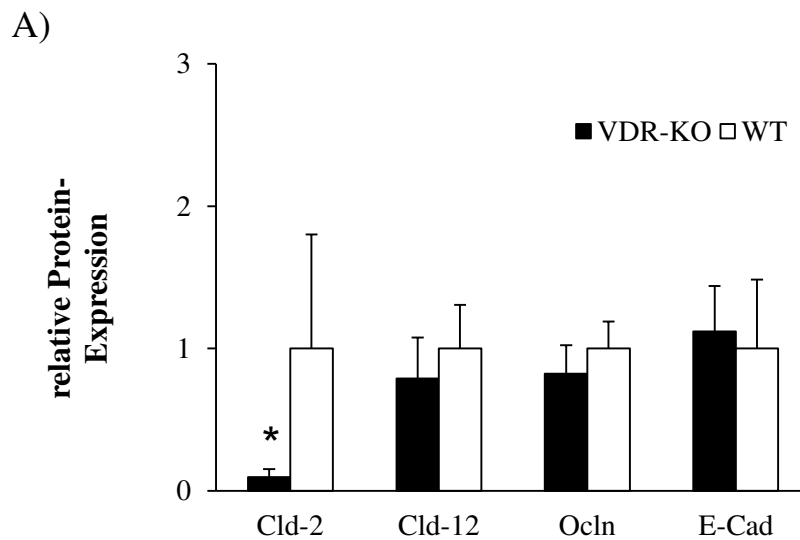


Abbildung 18: Analyse ausgewählter Zell-adhäsionsproteine der Dünndarmmukosa.

A) Zell-adhäsionsproteine von Vitamin D-Rezeptor (VDR)-*knockout* (KO)- und Wildtyp (WT)-Mäusen wurden mittels Western blot analysiert und ausgewertet. B) Repräsentative Immuno-Blots von zwei Tieren je Gruppe. Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben, $n = 8$ pro Gruppe; *Signifikant verschieden von WT-Tieren ($P < 0,05$, Student's t-Test). Zur Normalisierung diente *glyceraldehyd 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH). *Claudin-2* (Cld-2), *claudin-12* (Cld-12), *occludin* (Ocln), *E-cadherin* (E-Cad).

Bei den *tight junction* und *adherence junction* Proteinen *occludin* (Ocln), *junctional adhesion molecule A* (JAM-A), *tight junction protein ZO-1* (ZO-1) und *E-Cadherin* (E-Cad) konnten keine Unterschiede in den mRNA-Konzentrationen zwischen den Gruppen festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde im Weiteren nur die Proteinexpression der Hauptvertreter der *tight junctions* und *adherence junctions*, Ocln und E-Cad, bestimmt. Auch hier ergab sich

in den relativen Proteinkonzentrationen kein Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 18).

3.2.3.3 Relative mRNA- und Proteinexpression von Zelladhäsionsproteinen des distalen Kolons

Die Messung der analysierten Zelladhäsionsproteine im Bereich des distalen Kolons zeigte keine Unterschiede in den jeweiligen relativen Proteinkonzentrationen zwischen VDR-KO- und WT-Mäusen. Anders als im Dünndarm konnte im Kolon kein Einfluss des VDR-KO auf die Expression des Cld-2 oder Cld-12 auf mRNA- oder Proteinebene festgestellt werden (Abbildung 19). Allein beim E-Cad wurde eine geringere relative mRNA-Konzentration in der VDR-KO-Gruppe gemessen (Abbildung 19). Dieser Unterschied zeigte sich in der Proteinexpression nicht mehr (Abbildung 19). *β-catenin* wurde in die Analysen des Kolons eingeführt, da es nicht nur an der Zelladhäsion beteiligt, sondern auch mit der Entstehung von Kolonkarzinomen in Verbindung gebracht wird (Pendás-Franco et al.). Die Bestimmung der *β-catenin* mRNA- und Proteinexpression zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 19). Ähnlich der Messung in der Dünndarmmukosa konnte auch im Kolon kein Unterschied in der mRNA- oder Proteinkonzentration des Ocln, JAM-A oder ZO-1 gefunden werden (Abbildung 19).

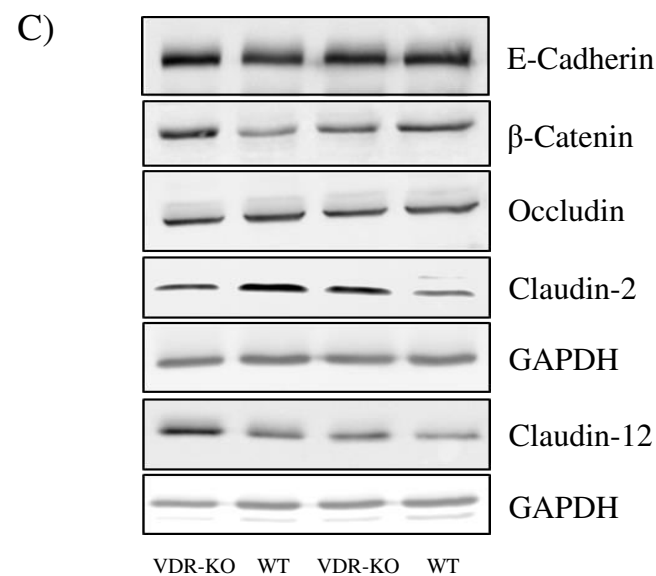
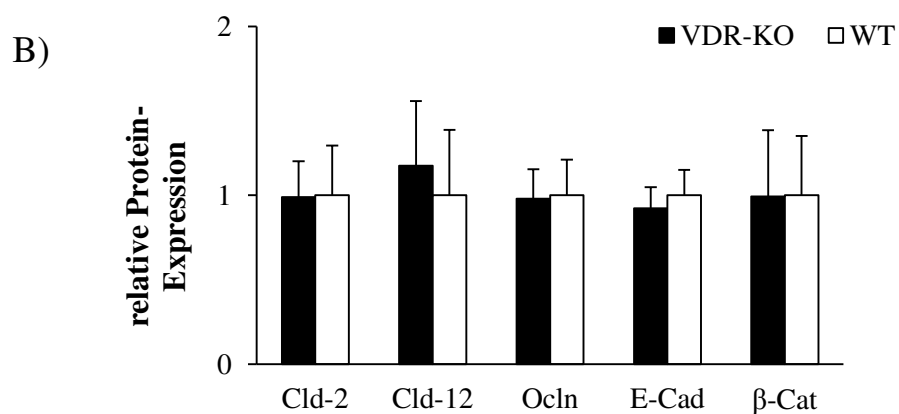
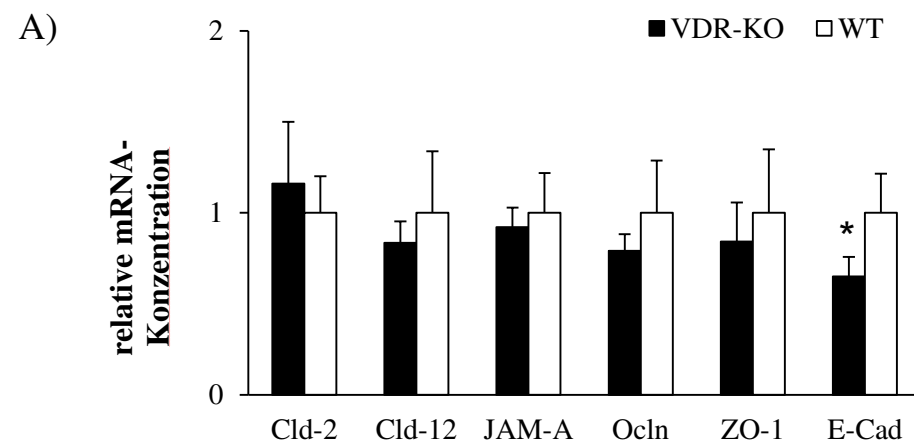


Abbildung 19: Relative mRNA- und Proteinkonzentrationen von Zelladhäsionsproteinen des distalen Kolons. Die relativen Konzentrationen des *claudin-2* (Cld-2), *claudin-12* (Cld-12), *junctional adhesion molecule A* (JAM-A), *occludin* (Ocln), *zonula occludens protein-1* (ZO-1), *E-cadherin* (E-Cad) und *β-catenin* (β-Cat) wurden mittels A) *Realtime-RT-PCR* oder B) *Western blot* analysiert. C) Repräsentative *Immuno-Blots* von zwei Tieren je Gruppe. Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen angegeben, n = 8 pro Gruppe; *Signifikant verschieden von WT-Tieren (P<0,05, Student's t-Test). Zur Normalisierung der mRNA-Konzentrationen diente *ppia* und *gapdh*. Zur Normalisierung der Proteinkonzentrationen diente *GAPDH* (*Glyceraldehyd 3-phosphate dehydrogenase*).

3.3 Einfluss des Vitamin D-Rezeptors auf die gastrointestinale Permeabilität des FITC-D (Versuch III)

Die Bestimmung der Serumkonzentration des Permeabilitätsmarkers FITC-D4000 in VDR-KO- und WT-Tieren konnte keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen aufzeigen (VDR-KO, $1,83 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$, WT, $2,79 \pm 1,67 \mu\text{g/ml}$; $n = 4$). Das heißt, die Darmbarriere entlang des gastrointestinalen Traktes ist zwischen VDR-KO- und WT-Mäusen nicht verschieden.

3.4 Einfluss des Kalziumgehalts der Diät auf die Kalzium- und Parathormonkonzentrationen des Serums der Vitamin D-Rezeptor-*knockout*-Maus (Versuch IV)

3.4.1 Auswertung der Futterraufnahme und Körpermassenentwicklung von VDR-KO-Mäusen bei Fütterung verschiedener Kalziummengen

Das mittlere Anfangsgewicht aller Gruppen war zu Beginn der Studie nicht verschieden (Tabelle 16). In der täglichen Futterraufnahme konnten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden ($P < 0,05$, Games Howell-Test, Tabelle 16). VDR-KO-Mäuse mit 4% Kalziumzulage in der Diät zeigten eine höhere Futterraufnahme sowohl gegenüber VDR-KO-Mäusen mit 0,3% oder 2% Kalzium in der Diät als auch gegenüber den WT-Mäusen mit 0,3% Kalzium in der Diät (Tabelle 16). Die Futterraufnahmen der 0,3%-WT-, 0,3%-VDR-KO- und 2%-VDR-KO-Gruppe unterschieden sich nicht (Tabelle 16). Für den Anstieg in der täglichen Futterraufnahme kann der Gesamtmineralstoffgehalt der Diät verantwortlich sein. Mit Zunahme des Kalziumgehalts nimmt die Energiedichte der Diäten entsprechend ab. Die tägliche Energieaufnahme aller Gruppen ist aber statistisch nicht verschieden, da der Energieunterschied in den Diäten vermutlich durch eine höhere Futterraufnahme ausgeglichen wurde. Obwohl die finale Körpermasse der Gruppen nicht verschieden war, konnte innerhalb des VDR-KO-Genotyps ein signifikanter Unterschied in der mittleren täglichen Körpermassenzunahme beobachtet werden. Mit steigender Kalziumanreicherung der Diät stieg auch die Körpermassenzunahme der VDR-KO-Tiere an. Die 4%-VDR-KO-Gruppe

zeigte dabei die höchste Körpermassenzunahme und lag damit signifikant über den Werten der 0,3%-VDR-KO- und 2%-VDR-KO-Gruppe ($P < 0,05$, Fisher's test, Tabelle 16).

Tabelle 16: Futtermittelaufnahme und Gewichtsentwicklung von VDR-KO-Mäusen bei Fütterung unterschiedlicher Kalziumzulagen

	Futtermittelaufnahme [g/Tag]	Energie- aufnahme [Kcal/Tag]	Körpermassen- zunahme [g/Tag]	Körpermasse Beginn [g]	Körpermasse Final [g]
0,3% Ca WT	$2,7 \pm 0,3^{yz}$	$11,1 \pm 1,0$	$0,16 \pm 0,02$	$19,3 \pm 2,7$	$27,8 \pm 2,3$
0,3% Ca VDR-KO	$2,7 \pm 0,1^z$	$11,1 \pm 0,1$	$0,14 \pm 0,04^b$	$17,5 \pm 2,5$	$25,2 \pm 1,9$
2% Ca VDR-KO	$3,0 \pm 0,2^{yz}$	$11,3 \pm 0,6$	$0,17 \pm 0,06^b$	$16,5 \pm 2,2$	$24,8 \pm 1,3$
3% Ca VDR-KO	$3,2 \pm 0,2^{xy}$	$11,6 \pm 0,6$	$0,18 \pm 0,03^{ab}$	$17,2 \pm 4,1$	$26,8 \pm 2,6$
4% Ca VDR-KO	$3,4 \pm 0,4^x$	$12,3 \pm 0,7$	$0,2 \pm 0,08^a$	$17,5 \pm 4,3$	$28,3 \pm 5,2$

VDR-KO, Vitamin D-Rezeptor-*knockout*; WT, Wildtyp; $n = 6$; ^{xyz}Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant, $P < 0,05$, Games Howell-Test. ^{ab}Werte (verglichen wurden hier nur VDR-KO Gruppen) mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant, $P < 0,05$; Fisher's Test.

3.4.2 Analyse der Serumkonzentration an Kalzium, Phosphat und Parathormon

Die Serumkalziumkonzentrationen der VDR-KO-Tiere, deren Kalziumzulagen in den jeweiligen Diäten 0,3% und 2% betragen, zeigten deutliche Unterschiede zur WT-Gruppe (Abbildung 20, $P < 0,05$, Fisher's Test). Die Kalziumkonzentrationen waren dabei um 9% (0,3%-VDR-KO-Gruppe) und 10% (2%-VDR-KO-Gruppe) geringer als bei den WT-Mäusen. Ein Anstieg in der Kalziumzulage der Diät auf 3% und 4% bewirkte einen Anstieg in der Serumkalziumkonzentration in den VDR-KO-Mäusen. Die Serumkalziumkonzentrationen der 3% und 4%-VDR-KO-Gruppe unterschieden sich nicht mehr von denen der WT-Mäuse (Abbildung 20).

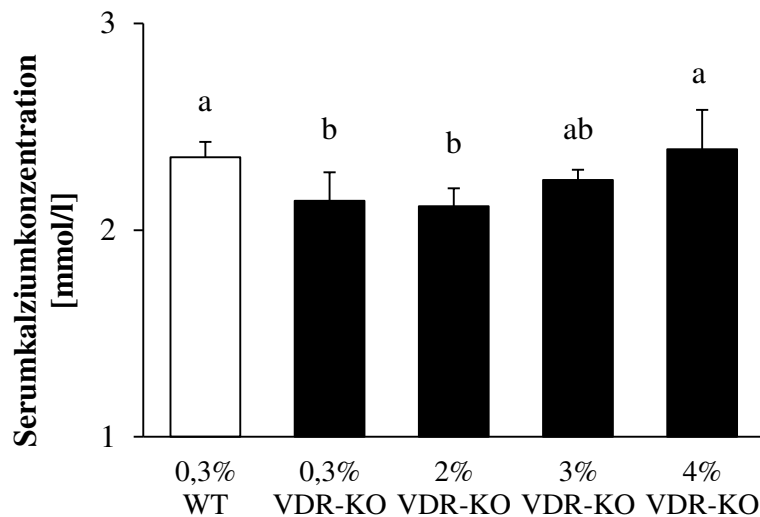


Abbildung 20: Kalziumkonzentrationen im Serum von VDR-KO- und WT-Mäusen bei Fütterung verschiedener Kalziumzulagen. Vitamin D-Rezeptor-*knockout* (VDR-KO)- und Wildtyp (WT)-Mäuse erhielten über acht Wochen eine Diät mit entweder 0,3%, 2%, 3%, oder 4% Kalziumgehalt. Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben. Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant, $P < 0,05$, Fisher's Test, $n = 6$ pro Gruppe.

Wie bereits in den vorangegangenen Studien beobachtet wurde, unterliegt das PTH hohen interindividuellen Schwankungen innerhalb der einzelnen VDR-KO-Gruppen. Die höchsten PTH-Konzentrationen mit 2.262 pg/ml wurden in der 2%-VDR-KO-Gruppe gemessen. Diese liegen um das ~65-fache über den PTH-Konzentrationen der WT-Tiere (Abbildung 21, $P < 0,001$, Fisher's Test). Die PTH-Konzentrationen der 0,3%-VDR-KO-Gruppe lagen mit 1.642 pg/ml signifikant über der 0,3%-WT-Gruppe, aber unterschieden sich nicht zur 2%-VDR-KO-Gruppe (Abbildung 21, $P < 0,001$, Fisher's Test). Die Erhöhung der Kalziumzulage der Diät auf 3% führte zu einer Reduzierung der PTH-Konzentrationen auf 584 pg/ml, was der 17-fachen mittleren PTH-Konzentration der WT-Mäuse entspricht (Abbildung 21, $P < 0,001$, Fisher's Test). Mit 4%-Kalzium in der Diät bestand kein Unterschied mehr in den PTH-Konzentrationen der VDR-KO- und WT-Mäuse (VDR-KO 14,7 pg/ml; WT 33,3 pg/ml) (Abbildung 21).

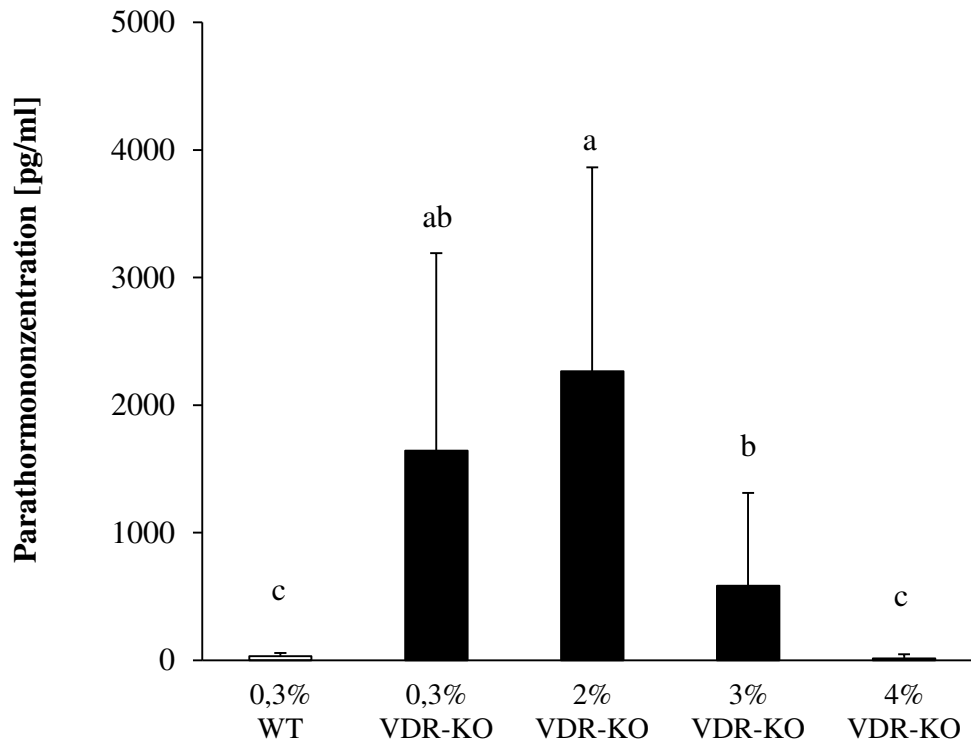


Abbildung 21: Parathormonkonzentrationen im Serum von VDR-KO- und WT-Mäusen bei Fütterung verschiedener Kalziumzulagen. Vitamin D-Rezeptor-*knockout* (VDR-KO)- und Wildtyp (WT)-Mäuse erhielten über acht Wochen eine Diät mit 0,3% bis 4% Kalziumanteil. Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben. Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant, $P < 0,05$, Fisher`s Test, $n = 6$ pro Gruppe.

Die Analyse des anorganischen Phosphats im Serum von VDR-KO und WT-Tieren zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen (0,3 WT, $2,5 \pm 0,23$ mmol/l; 0,3% VDR-KO, $2,4 \pm 0,19$ mmol/l; 2% VDR-KO, $2,58 \pm 0,51$ mmol/l; 3% VDR-KO, $2,31 \pm 0,06$ mmol/l; 4% VDR-KO, $2,37 \pm 0,19$ mmol/l; $n = 6$)

4 Diskussion

Zur Bedeutung des Vitamin D-Rezeptors für den Intestinaltrakt

Vitamin D weist viele Funktionen im Organismus auf, die über die bloße Regulation des Kalziumhaushaltes hinausgehen. Da der Darm eine besonders hohe Dichte an VDR aufweist, sollte in den Experimenten dieser Arbeit untersucht werden, welche Folgen ein Vitamin D-Defizit auf die Physiologie der Darmepithelzelle hat.

Dazu wurden vier Versuche am VDR-KO-Mausmodell und begleitend ein Versuch an Vitamin D-defizienten Ratten durchgeführt. Zunächst wurde das Proteom von Dünndarmmukosazellen von VDR-KO-Mäusen mit dem von WT-Mäusen mittels 2D-DIGE verglichen. Da die Wiederfindungsrate des Proteinbesatzes einer Zelle mit dieser Methode relativ moderat ausfällt - von den +20.000 Proteinen einer Zelle lassen sich in der Regel 500 bis 1200 der hoch abundanten Vertreter auf einem 2D-Gel abbilden – , diente diese Analyse vor allem einer ersten Richtungsweisung, um einen übergeordneten Eindruck der zellulären Veränderungen die ein VDR-Verlust hervorruft, zu gewinnen. Weiterführend wurden mRNA- und Proteinexpressionsanalysen relevanter Gene und histomorphologische Untersuchungen des Darmes vorgenommen sowie die Barriere-Eigenschaft des Darmes von VDR-KO- und WT-Mäusen getestet.

Im Resultat deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass der VDR an der Regulation von Komponenten der Zelladhäsion und des Zytoskeletts, an der Regulation von Lipidtransportern und an der Kontrolle der zellulären Stressbewältigung beteiligt ist.

Der Einfluss des Vitamin D-Rezeptors auf morphologische Merkmale des Darms

Seit Kurzem wird Vitamin D mit der morphologischen Ausprägung einzelner Zell- und Gewebetypen in Zusammenhang gebracht. Die Funktionalität des Darmes hängt in hohem Maße von seiner Morphologie ab, daher wurden in der vorliegenden Arbeit Epithelzellen des Duodenums elektronenmikroskopisch begutachtet, um zu prüfen, ob ein VDR-Verlust zu sichtbaren Veränderungen der Zellform und der zytoskelettalen Ausrichtung führt.

Es zeigte sich, dass Mikrovilli des Dünndarmenterozyten von VDR-KO-Mäusen durch eine etwa 20%ige Verlängerung gegenüber WT-Mäusen gekennzeichnet waren. Bis auf die Veränderung der Länge zeigten die Mikrovilli aber keine weiteren Auffälligkeiten. Sowohl

die typische gestreckte zylindrische Zellform, als auch die Dicke waren normal ausgebildet, was für eine koordinierte physiologische Elongation spricht. Die Mikrovilli-Elongation wurde von einer erhöhten mRNA- und Proteinexpression des *ezrin* begleitet. Die charakteristische Ausbildung von Mikrovilli zur Oberflächenvergrößerung des Enterozyten verlangt nach einem besonders hohen Grad an Organisation zytoskelettaler Komponenten. *Ezrin* vermittelt den Kontakt von Aktinfilamenten des Zytoskeletts und einer Vielzahl damit assoziierter Proteine zur Zellmembran und ist damit maßgeblich am Aufbau der Mikrovilli beteiligt (Viswanatha et al., 2014). Eine höhere *ezrin*-Expression allein könnte damit die Mikrovilli Elongation erklären, da Studien an *ezrin*-defizienten Mäusen eine direkte Assoziation zum Längenwachstum der Mikrovilli aufzeigen konnten (Saotome et al., 2004). Inwiefern der VDR direkt an der Regulation des *ezrin* beteiligt ist konnte hier nicht geklärt werden. Allerdings wird nach jetzigem Wissenstand PTH als Ezrin-Regulator in Tubulusepithelzellen der Niere beschrieben (Guo et al., 2012; Nashiki et al., 2005), sodass ein VDR-KO ebenfalls indirekt über den starken Anstieg des PTH zur Elongation der Mikrovilli beigetragen haben könnte. Es wird des Weiteren vermutet, dass *ezrin* essentiell für die Regulation der systemischen Kalziumhomöostase sein könnte, da es für die Rekrutierung und Stabilisierung von Mineralstofftransportern, wie zum Beispiel dem TRPV6, an die Zellmembran benötigt wird (Hatano et al., 2013). Möglicherweise ist der beobachtete Anstieg im *ezrin* und der Mikrovillillänge in der VDR-KO-Maus daher Teil eines Kompensationsmechanismus, um ein bestehendes Kalzium-Defizit auszugleichen - was der primären Funktion des Vitamin D und des PTH entspräche.

Bisher wurden morphologische Veränderungen in Folge eines Vitamin D-Mangels oder der Zugabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ an der Skelettmuskulatur (Endo et al., 2003; Max et al., 2014), von Immunzellen (Ooi et al., 2012), dem Pankreas (Wolden-Kirk et al., 2013) und dem Fettgewebe (Shutkowski et al. 2016) dokumentiert. Die Autoren gehen jeweils von einer Beteiligung des Vitamin D/VDR an der Organogenese und/oder der Regulation/Organisation zytoskelettaler Komponenten aus. Ein vergleichbarer Einfluss des VDR auf die Morphologie des Dünndarms oder des Kolons konnte dennoch in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Ergebnisse histologischer Untersuchungen zur Zottenlänge und Kryptentiefe in Duodenum, Jejunum, Ileum sowie des distalen Kolons von VDR-KO- und WT-Mäusen, erbrachten keine signifikanten Unterschiede. Auch die Ratio aus Zottenhöhe und Kryptentiefe zwischen VDR-KO- und WT-Mäusen war vergleichbar. Daher scheint ein VDR-Verlust die Organentwicklung des Darmes strukturell auf mikroskopischer Ebene nicht beeinträchtigt zu haben.

Inwieweit sich aus der erhöhten Mikrovillillänge eine allgemeine Anpassung in der Nährstoffaufnahme ergibt, ist aus den hier durchgeführten Versuchen nicht abzuleiten. Man würde davon ausgehen, dass eine Vergrößerung der resorptiven Darmoberfläche mit einer effizienteren Nährstoffabsorption und erhöhter Körpermasse einhergeht. Das Kalzium-Defizit der VDR-KO-Mäuse beeinträchtigt jedoch deren Knochenbau und folglich deren Wachstum (Li et al., 1997), was zu einer geringeren Körpermasse dieser Tiere führt, trotz erhöhter Nährstoffaufnahme.

Zur Bedeutung des Vitamin D-Rezeptors für die parazelluläre Barrierepermeabilität des Darms

Im Versuch II sollte der Frage nachgegangen werden, welchen Einfluss der VDR auf die Integrität der intestinalen Barriere und deren parazellulärer Permeabilität ausübt. Eine Beeinträchtigung der epithelialen Barriere des Darms und ein daraus resultierender parazellulärer Übertritt von Nahrungsbestandteilen und Pathogen zählt zu den zentralen Ursachen in der Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) (Burisch et al., 2013). Da der Vitamin D-Mangel oft mit dem Auftreten von CEDs assoziiert ist, entstand auch die Theorie, dass Vitamin D/VDR auf direktem Wege die Darmbarriere beeinflusst. Erste mechanistische Studien aus den Jahren 2009 und 2012 unterstützten diese Annahme. In diesen *in-vivo* Studien an murinen Modellen wurde nachverfolgt, inwieweit sich ein VDR-KO oder aber eine Behandlung mit 1,25(OH)₂D auf eine chemisch induzierte Kolitis (mittels dextran sodium sulfate (DSS)) auswirkt (Wong et al., 2009; Zhao et al., 2012). Es wurde postuliert, dass Vitamin D bzw. der VDR die Expression von Zell-Zell-Adhäsionsproteinen wie dem *occludin*, *tight junction protein ZO-1* oder *E-cadherin* erhöht, was zu einer Reduzierung der parazellulären Durchlässigkeit des Darms führte.

Dieses Ergebnis kann aus Sicht der vorliegenden Arbeit nicht unterstützt werden, da hier die Daten ein Einwirken des VDR auf die Barriereintegrität des Darms nicht anzeigen. So konnte kein Unterschied in der Proteinexpression des *occludin* und des *E-cadherin* in Duodenum und Kolon zwischen VDR-KO- und WT-Mäusen festgestellt werden. Beide Proteine markieren jeweils die wichtigsten Vertreter der *tight junctions* und *adherence junctions* wobei *occludin* den apikalen Zellspalt für Makromoleküle versiegelt und *E-cadherin* eine feste Zell-Zell-Adhäsion herstellt (Van Itallie and Anderson, 2014; van Roy and Berx, 2008). Fast immer sind diese Proteine bei Barrieredefekten verändert (Krug et al., 2014; Mehta et al., 2015).

Auch mRNA-Expressionsanalysen weiterer Vertreter der *tight junctions* und *adherence junctions* (β -Cat, JAM-A, ZO-1) waren zwischen VDR-KO- und WT-Mäusen nicht unterschiedlich ausgefallen. In der mikroskopischen Betrachtung der Enterozyten des Duodenums im Bereich der *tight junctions* war ebenfalls keinerlei Unterschied in der Weite des Zellspaltes von VDR-KO- und WT-Mäusen zuerkennen. Darüber hinaus war die FITC-D-Permeabilität, als Maß für den tatsächlichen parazellulären Übertritt von Makromolekülen, nicht durch den VDR beeinflusst. Zusammengenommen weisen diese Daten klar darauf hin, dass die intestinale Barriere nicht unmittelbar durch den VDR-Verlust beeinträchtigt worden ist.

Als Ursache für die Diskrepanz der vorliegenden Ergebnisse gegenüber der Literatur können mehrere Erklärungsansätze herangezogen werden. Zunächst besteht ein elementarer Unterschied im Versuchsbau. Während in den erwähnten Studien die Auswirkungen des Vitamin D auf die Darmbarriere bei bestehender (DSS-) Kolitis untersucht wurden, stand hier die Untersuchung am gesunden, unbehandelten Organismus im Vordergrund. Eine Behandlung mit DSS forciert die Entstehung einer akuten Kolitis, indem DSS selbst die Barriere destabilisiert und dadurch die Submukosa für Antigene zugänglich macht. Es kommt zur Immunantwort, was wiederum zur vermehrten Synthese und Ausschüttung pro-inflammatorischer Cytokine führt. Diese Cytokine, allen voran *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), sind charakteristisch für Barrieredefekte. Darüber hinaus ist ein Anstieg im TNF- α selbst bereits ausreichendes Signal, um die Darmbarriere durchlässiger zu machen (Shen, 2012). Daher wurden in dieser Arbeit, neben den direkten barrierebestimmenden Parametern, auch die mRNA-Expressionen pro-inflammatorischer Cytokine (TNF- α und *interleukin-6*) im Darm sowie die Gesamtlänge des Kolons, als schwacher Indikator für eine Kolon-Entzündung, bestimmt. Auch hier bestanden keine Unterschiede zwischen VDR-KO- und WT-Mäusen. Anhand dieser Daten kann nicht davon ausgegangen werden, dass der VDR unmittelbar relevant ist für die Aufrechterhaltung der Darmbarriere im gesunden, nicht entzündeten Darm. Es ist eher anzunehmen, dass im entzündlich veränderten Darm die bekannten anti-inflammatorischen Eigenschaften des Vitamin D, die eine übermäßige Bildung des TNF- α etc. verhindern (Wöbke et al., 2014; Yin and Agrawal, 2014), für die epithelprotektiven Effekte verantwortlich sind.

Einfluss des Vitamin D-Rezeptors auf die intestinale Claudin-Expression

Tight junction-Zell-Kontakte erfüllen nicht nur die Aufgabe, das Epithel luminal zu verschließen sondern regulieren auch den parazellulären Transport von Wasser und Mineralien. Dies gelingt durch die Expression von Proteinen aus der Claudin-Familie, die als wichtiger Bestandteil der *tight junctions*, je nach Zusammensetzung, ionenselektive Poren formen können. *Claudin-2* (Cldn2) und *Claudin-12* (Cldn12) sind im Zusammenhang mit Vitamin D von besonderem Interesse, da sie die passive Kalziumaufnahme entlang des Darms erleichtern, indem sie Poren für divalente Kationen bilden (Günzel and Yu, 2013). Im Jahr 2008 wurde erstmalig von der Arbeitsgruppe um Fujita und Mitarbeitern die transkriptionelle Abhängigkeit des Cldn2 und Cldn12 vom VDR beschrieben (Fujita et al., 2008). Sowohl im Dünndarm als auch im Kolon von VDR-KO-Mäusen konnte eine verminderte Cldn2 und Cldn12 mRNA- und Proteinkonzentration dokumentiert werden (Fujita et al., 2008). Zhang und Mitarbeiter erbrachten später den Nachweis, dass Cldn2 ein direktes VDR-Zielgen ist (Zhang et al., 2015). In diesen beiden Studien wurde Standardfutter mit normalen Kalziumgehalten eingesetzt. Aus Untersuchungen zum Ionentransport in der Niere weiß man aber, dass auch die jeweilige Mineralstoffkonzentration (z.B. Kalzium) regulierenden Einfluss auf die Claudin-Expression ausübt (Dimke et al., 2013; Plain et al., 2016).

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig die Frage adressiert, wie sich die Fütterung einer kalziumreichen Diät auf die Cldn2- und Cldn12-Expression im Dün- und Dickdarm von VDR-KO-Mäusen, auswirkt.

Anhand der gesammelten Daten aus dieser Arbeit kann die Studie von Fujita und Mitarbeitern (2008) in Teilen bestätigt werden. Es konnten ebenfalls im Dünndarm der VDR-KO-Mäuse sehr stark verminderte mRNA- und Proteinkonzentrationen des Cldn2 gefunden werden. Die Cldn2-Expression im Dünndarm ist somit auch bei gesteigerter Kalziumversorgung auf den VDR angewiesen. Diese VDR-Regulation des Cldn2 konnte allerdings im Kolon weder auf mRNA- noch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Weiterhin ist auch die Proteinexpression des Cldn12 in Dünndarm und Kolon in dieser Arbeit nicht durch einen VDR-KO beeinflusst worden. Daher scheint zum einen eine Cldn2-Abhängigkeit vom VDR ein gewebespezifisches Phänomen zu sein, und zum anderen scheinen Cldn2 und Cldn12 auch über VDR-unabhängige, wahrscheinlich Kalzium regulierte Signalwege, induzierbar zu sein. Damit eröffnet sich auch die Möglichkeit einer verbesserten parazellulären Kalziumaufnahme des Darmes von VDR-KO-Mäusen durch eine kalziumreiche Diät. Dem Kolon könnte hierbei sogar die größere Bedeutung zukommen, da selbst bei hohen alimentären Kalziumzulagen die

Reduktion der Cldn2-Expression im Dünndarm bestehen blieb.

Es ist bekannt, dass die Kalziumaufnahme im Kolon u.a. einem linearen nicht-sättigbarem Transportmechanismus folgt, durch den Defizite in der aktiven Kalziumabsorption kompensiert werden können (Jongwattanapisan et al., 2012; Trinidad et al., 1999). Dies bedeutet, dass bei normaler Cldn2- und Cldn12-Bildung eine quantitative Kalziumaufnahme auch in VDR-KO-Mäusen stattfinden müsste. Als unterstützend für diese Annahme können die Ergebnisse aus dem Versuch IV betrachtet werden. In diesem Versuch wurden Diäten mit 0,5% bis 4%-Kalziumanteil an VDR-KO-Mäuse gefüttert. Es zeigte sich, dass erst mit sehr hohen Kalziumzulagen in der Diät von über 2% ein linearer Anstieg der Serum-Kalziumspiegel einsetzte. Es ist daher plausibel, dass der von Fujita und Mitarbeitern (2008) beschriebene Einfluss des VDR auf die Claudin-Expression und der passiven Kalziumresorption im Darm, mit zunehmender Kalziumversorgung und damit auch einer ansteigenden luminalen Kalziumkonzentrationen, an Bedeutung verliert.

Ein konkreter Mechanismus, der diesen Zusammenhang erklären könnte, ergibt sich aus der Funktionsweise des *calcium sensing receptors* (CaSR). Der CaSR wird entlang des ganzen gastrointestinalen Traktes in Epithelzellen exprimiert, „misst“ die luminalen Kalziumkonzentration und beeinflusst den aktiven und passiven Kalziumtransport (Garg et al., 2013). Man geht bisher davon aus, dass eine Aktivierung des CaSR, entsprechend den Kalziumgehalten der Diät, die passive parazelluläre Kalziumabsorption des Darmes erhöht (Garg and Mahalle, 2013). Zudem ist der CaSR an der Regulation der Claudin-Expression in den Tubuli der Niere beteiligt (Dimke et al., 2013; Toka, 2014), was eine analoge Wirkung auch im Darm vermuten lässt.

Zusammengenommen bestätigen die Daten aus dieser Arbeit den Einfluss des VDR auf die Expression von *tight junction* Proteinen aus der Claudin-Familie des Darmes und unterstützen damit die Annahme, dass der VDR auch an der Regulation der passiven intestinalen Kalziumabsorption beteiligt ist. Die Daten deuten ebenfalls darauf hin, dass die Beeinträchtigung der passiven Kalziumaufnahme durch den VDR-Verlust durch eine Steigerung des alimentären Kalziumgehalts (potentiell durch den CaSR vermittelt) kompensiert werden kann.

Einfluss des Vitamin D-Rezeptors auf Marker der Zelladhäsion

Eine besonders auffällige Veränderung der VDR-KO-Mäuse gegenüber den WT-Mäusen war die starke Expressionssteigerung des *37/67 kDa laminin receptors (37/67LR)* in Zellen der Dünndarmmukosa. Der 37/67LR fungiert als membranständiger Rezeptor für extrazelluläres Laminin (Omar et al., 2012) und ist an der Adhäsion des Enterozyten an dessen zugrundeliegender Extrazellulärmatrix (EZM) beteiligt. Ferner konnte in dieser Arbeit ein weiterer EZM-Rezeptor, das *integrin alpha-6 (Itga6)*, mit dem VDR in Verbindung gebracht werden. Itga6 interagiert ebenfalls mit extrazellulärem Laminin und wurde in VDR-KO-Mäusen geringer exprimiert. Sowohl 37/67LR als auch Itga6 beeinflussen nicht nur die Adhäsion einer Zelle zur Basalmembran, sondern aktivieren auch intrazelluläre Signalkaskaden, die unter anderem zur Synthese und Freisetzung von Faktoren führen, durch die die Zusammensetzung der EZM aktiv umgestaltet werden kann. Zu diesen Faktoren zählen Enzyme der Klasse der *matrix metallopeptidasen (MMP)*, einer Gruppe von Collagenasen.

Aus den Ergebnissen der Proteomanalyse ging hervor, dass VDR-KO-Mäuse eine geringere Proteinmenge eines Kollagen-Vertreters (*Col6a1*) aufwiesen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Analysen verschiedener MMPs durchgeführt, mit dem Resultat, dass VDR-KO-Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen eine höhere Expression an MMP-2 im Dünndarm zeigten. Dies deutet auf eine erhöhte proteolytische-Aktivität gegenüber Kollagenen in der Dünndarmmukosa von VDR-KO-Mäusen hin.

Die Kombination aus Anpassung im Expressionsprofil von Adhäsionsproteinen und Daten, die auf eine erhöhte Dynamik in der EZM-Zusammensetzung hinweisen, sind typische Prozesse, die bei der Migration von Zellen auftreten (Vicente-Manzanares et al., 2005). Aus *in-vitro* Experimenten ist bekannt, dass der 37/67LR starken Einfluss auf die Mobilität und Migration einer Zelle ausübt. Eine erhöhte Bildung des 37/67LR korreliert dabei in hohem Maße mit einer gesteigerten Zellmigration (DiGiacomo and Meruelo, 2015; Omar et al., 2012). Der genaue Mechanismus, wie die Migration einer Zelle durch den 37/67LR beeinflusst wird, ist nicht umfassend geklärt, involviert jedoch zumindest die Rekrutierung und Aktivierung von extrazellulären Proteasen (Ardini et al., 2002; Berno et al., 2005). Diesbezüglich konnte in Untersuchungen an Tumorzelllinien ein Zusammenhang der 37/67LR-Expression zur Bildung von MMPs hergestellt werden (Givant-Horwitz et al., 2004; Poon et al., 2011), was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit steht. Ebenso ist eine Verschiebung der Itga6-Expression hin zur 37/67LR-Bildung in humanen

hämatopoetischen Stammzellen mit Migrationsprozessen assoziiert worden (Selleri et al., 2006). Somit ergeben sich eine Reihe von Indizien die andeuten, dass der VDR ebenfalls in die Regulation von Adhäsions- und Migrationsprozessen von Darmepithelzellen involviert sein könnte.

Entscheidend für die Migration von Epithelzellen des Dünndarmes aus den Krypten und entlang der Villi ist ebenfalls die intrazelluläre Neuausrichtung des Zytoskeletts. Zellbewegung verlangt ein wiederkehrendes Anheften und Ablösen der Zelle von der Basalmembran, die Schaffung von Adhäsionspunkten und der polarisierten Ausrichtung des Zytoskeletts, bestehend aus Aktin- und Keratinfilamenten (Gardel et al., 2010; Windoffer et al., 2011).

Aus den Untersuchungen dieser Arbeit ging nun hervor, dass sich VDR-KO-Mäuse in der β -actin- und *cytokeratin-19* (K19)-Proteinmenge von WT-Mäusen unterschieden. Dies wurde zudem von einer differentiellen Expression der Regulatorproteine γ -tropomyosin und *adseverin* begleitet, die jeweils in VDR-KO-Mäusen stärker exprimiert wurden. Tropomyosine sind an der Zellmigration von Nicht-Muskelzellen beteiligt, indem sie die Polymerisation von Aktinfilamenten unmittelbar unterhalb der Zellmembran regulieren und helfen assoziierte Proteine aus der Gelsolin-Familie zu rekrutieren (Lees et al., 2011). Eines dieser Proteine aus der Gelsolin-Familie ist *adseverin*. Gelsolinproteine beeinflussen direkt die Organisation des Zytoskeletts, indem sie z.B. elementare Prozesse im Auf- und Abbau von Aktinfilamenten (*depolymerisation, capping, nucleation*) übernehmen oder steuern (Li et al., 2015; Silacci et al., 2004). Daher sprechen diese Ergebnisse für eine erhöhte Dynamik im zytoskelettalen Umbau unter VDR-Verlust. Dies könnte ebenfalls als Folge bzw. der Anpassung an eine veränderte Zellmigration betrachtet werden.

Inwieweit sich hieraus auch übergeordnete Konsequenzen für den Darm ergeben, kann nur sehr eingeschränkt abgeschätzt werden. Das Epithel des Dünndarms wird im Rhythmus von 5-7 Tagen komplett erneuert. Es wäre denkbar, dass dieser Prozess durch ein erhöhtes Migrationsverhalten der Zellen beschleunigt werden könnte. Da kaum relevante Unterschiede in der Zottenlänge oder der Kryptentiefe des Darmes der VDR-KO-Mäuse gegenüber den WT-Mäusen erkennbar waren, müsste man eine erhöhte Zellteilung in den Krypten unterstellen, aus der sich ein erhöhter Gesamtzellumsatz speisen sollte. In dieser Arbeit wurden keine Analysen zur Proliferations- oder Apoptoserate durchgeführt. Jedoch wurden dem Vitamin D bereits in zahlreichen Studien anti-proliferative Eigenschaften nachgewiesen, die Anlass geben, den hier vorgestellten Sachverhalt in zukünftigen Arbeiten näher zu untersuchen.

Einfluss des Vitamin D-Rezeptors auf die Expression des CD36 und die Auswirkungen auf die Cholesterol- und Triglyceridkonzentrationen in Plasma und Leber

Eine weitere Beobachtung aus dieser Arbeit ist die differentielle Expression des Sterol- und Fettsäuretransporters CD36 in der Dünndarmmukosa von VDR-KO-Mäusen. Es konnte ein deutlicher Anstieg der CD36 mRNA-Konzentrationen in VDR-KO Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen beobachtet werden. Der CD36 ist ein membranständiges Glykoprotein, das in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen wie Epithel- und Endothelzellen, Makrophagen, Kardiomyozyten, Myozyten, Adipozyten und Hepatozyten exprimiert wird (Silverstein et al., 2010). Der CD36 fungiert vor allem als Rezeptor für langkettige Fettsäuren, Cholesterol- und Cholesterolderivate (Silverstein et al., 2010). Diese Steigerung der CD36-mRNA-Expression konnte ebenso im Rattenmodell mit alimentärem Vitamin D-Mangel nachgewiesen werden. Während die Ergebnisse aus dem VDR-KO-Mausmodell, eine Interpretation der Daten im Kontext eines absoluten Vitamin D-Mangels bzw. der fehlenden Vitamin D-Signalwirkung erlaubt, sollte mit Hilfe des Rattenmodells der Einfluss des Vitamin D-Status auf die CD36-Expression geprüft werden. Dazu wurden Ratten entweder mit einer Vitamin D-freien Diät gefüttert oder erhielten Futter mit normalen (1.000 IE Vitamin D₃ pro kg) bzw. 10 mal höheren (10.000 Vitamin D₃ pro kg) Vitamin D-Gehalten. Bemessen an den Konzentrationen des 25(OH)D-Metaboliten im Plasma konnten so drei deutlich voneinander abzugrenzende Vitamin D-Versorgungszustände etabliert werden (s. Abb. 10). Die Bestimmung der 25(OH)D-Konzentration gilt als geeignetster Parameter, um die Versorgung mit Vitamin D zu beurteilen, da die Konzentration des 25(OH)D stark mit den durch die Nahrung aufgenommen und endogen synthetisierten Vitamin D-Mengen korreliert (Holick, 2004). Auch in diesem alimentären Ansatz zeigten Ratten, die mit einer Vitamin D-freien Diät gefüttert wurden und somit einen besonders niedrigen Vitamin D-Status aufwiesen, die höchsten mRNA-Konzentrationen an CD36 in der Dünndarmmukosa. Es war weiterhin zu beobachten, dass die Expression des CD36 mit zunehmender Steigerung des Vitamin D-Gehalts der Diät schrittweise abnahmen. Daher erscheint es als wahrscheinlich anzunehmen, dass Vitamin D die transkriptionelle Expression des CD36 konzentrationsabhängig beeinflussen kann und dafür der VDR benötigt wird.

Durch seine Beteiligung an der Fettsäure- und Cholesterol-Aufnahme ist der CD36 im besonderen Maße relevant für den Lipidstoffwechsel (Brundert et al., 2011; Drover et al., 2005; Nassir et al., 2007; Wilson et al., 2016). In zahlreichen Untersuchungen konnte belegt

werden, dass ein Anstieg der CD36-Expression die Entstehung von Dyslipidämien und Lebersteatose fördert (Koonen et al., 2007; Nassir et al., 2013; Wilson et al., 2016).

Aufgrund dessen wurde untersucht, ob sich aus einem Vitamin D-Mangel auch Auswirkungen auf den Lipidstoffwechsel ergeben könnten. Es wurden Gesamt-Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen im Plasma und in der Leber von VDR-KO-Mäusen sowie die Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen in der Leber und den Lipoproteinfraktionen des Plasmas in der Ratte mit alimentärem Vitamin D-Mangel untersucht.

Diese Fragestellung ist insbesondere von Relevanz, da in epidemiologischen Studien sehr häufig ein Zusammenhang zwischen niedrigen 25(OH)D-Plasmaspiegeln und dem Auftreten von Dyslipidämien beschrieben wird. So korreliert z.B. ein Vitamin D-Mangel mit erhöhten Triglyceridkonzentrationen (Botella-Carretero et al., 2007) und erhöhten Gesamtcholesterin- sowie erhöhten LDL-Cholesterinkonzentrationen im Plasma (Karhapää et al., 2010; Martins et al., 2007; Mozos and Marginean, 2015; Rejnmark et al., 2010). Zudem koinzidiert ein unzureichender Vitamin D-Status mit einem ungünstigen LDL:HDL Verhältnis (Carbone et al., 2008), dem Auftreten von Adipositas (Pereira-Santos et al., 2015) und dem Metabolischen Syndrom (Botella-Carretero et al., 2007; Ford et al., 2005; Moy and Bulgiba, 2011; Pacifico et al., 2011).

Erstaunlicherweise zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch, dass weder die Expression des VDR, noch die Fütterung verschiedener Vitamin D-Gehalte einen relevanten Einfluss auf die Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen in Leber, Plasma oder den Lipoproteinfraktionen hatten.

Als Erklärung für diese Diskrepanz zu den benannten Literaturstellen lassen sich mehrere Begründungen heranziehen. Zunächst sind Assoziationen aus Beobachtungsstudien kein Beleg eines kausalen Zusammenhangs und i.d.R. sind derartige Studien nicht dazu konzipiert, spezifische Effekte des Vitamin D auf Blutlipide zu untersuchen. Dazu bedarf es Interventionsstudien, von denen bisher nur wenige existieren und deren Ergebnisse zum Teil im Widerspruch zueinander stehen. Beispielsweise führte in der von Zitterman und Mitarbeitern (2009) vorgestellten Studie eine Vitamin D-Supplementation bei übergewichtigen Probanden zur Reduktion der Serum-Triglyceride bei gleichzeitigem Anstieg des LDL-Cholesterin (Zittermann et al., 2009). Andere Studien konnten hingegen keinen Einfluss einer Vitamin D-Supplementation auf die Blutlipidkonzentrationen nachweisen (Jorde et al., 2010; Seibert et al., 2015).

Ein alternativer Erklärungsansatz findet sich in der „*fat sink*“-Theorie, die besagt, dass mit zunehmender Körperfettmasse die Bioverfügbarkeit des Vitamin D aus alimentären Quellen oder der Haut sinkt, da es zur verstärkten Sequestration des Vitamin D im Fettgewebe kommt (Wortsman et al., 2000). Da eine erhöhte Fettmasse üblicherweise sowohl mit veränderten Blutlipidspiegeln (Poirier et al., 2006) als auch mit erniedrigten 25(OH)D-Spiegeln im Plasma einhergeht, ist der in epidemiologischen Studien beobachtete Zusammenhang zwischen Vitamin D und Blutlipiden vermutlich auf Confounder zurückzuführen. Diese umschließen unter anderem mit Adipositas vergesellschaftete Lifestyle-Aspekte, z.B. die Tendenz zu einem ungünstigerem Ernährungsverhalten oder eine kürzere Aufenthaltsdauer im Freien.

Die Frage nach dem Zusammenhang des Vitamin D-Mangels und einer erhöhten CD36-Expression im Darm bleibt daher offen und kann hier nur im Ansatz erörtert werden.

Ein attraktives Konzept diesbezüglich kann aus den Daten der Arbeitsgruppe von Reboul und Mitarbeitern aus dem Jahr 2011 erarbeitet werden. Die Autoren präsentieren, ausgehend von *in-vitro* Experimenten, Indizien die auf einen aktiven proteinvermittelten Transport des fettlöslichen Vitamin D unter Nutzung der Lipidtransporter CD36 oder des *scavenger-receptor B1* oder des *Niemann-Pick C1-like protein 1* hinweisen (Reboul et al., 2011). Mit der Expression des CD36 entlang des Dünndarms besteht somit die Möglichkeit, dass der CD36 zur Vitamin D-Absorption aus der Nahrung beitragen könnte. Aktive Absorptionsprozesse von Nährstoffen werden oft durch die Bedürfnisse des Organismus oder der Verfügbarkeit des jeweiligen Nährstoffes reguliert. Unter der Prämisse eines aktiven CD36 vermittelten Vitamin D-Transports könnte somit die Expressionssteigerung des CD36 einen Feedback-Mechanismus darstellen, der die Vitamin D-Aufnahme im Falle eines Vitamin D-Mangels erhöht. Entgegen der CD36-mRNA-Expression haben die Ergebnisse dieser Arbeit keine Unterschiede in der mRNA-Expression des *scavenger-receptor B1* oder des *Niemann-Pick C1-like protein 1* im Darm von VDR-KO-Mäusen oder Ratten mit Vitamin D-Mangel gegenüber den jeweiligen Vergleichsgruppen ergeben.

Bedauerlicherweise konnten aus zeitlichen Gründen die Untersuchungen zum Verhältnis des Vitamin D zum CD36 nicht fortgeführt werden. Es soll daher auf das große Potenzial für Anschlußuntersuchungen hingewiesen werden.

Die Unterstellung einer transkriptionellen Regulation des CD36 durch Vitamin D führte weiterhin zur Frage, wie sich die CD36-Expression in anderen primären Vitamin D-Zielgeweben verhält. Es wurde dahingehend die CD36 mRNA-Expression in der Niere von

VDR-KO-Mäusen analysiert. Auch hier konnte ein Einfluss des VDR auf den CD36 festgestellt werden. Im Gegensatz zur Dünndarmmukosa wurde in der Niere von VDR-KO-Mäusen aber deutlich weniger CD36-mRNA gebildet. Zur weiteren Bestätigung der Regulation des CD36 durch Vitamin D, wurden auch Gewebe untersucht die zwar hohe CD36-Mengen enthalten aber kaum eine relevante VDR-Expression aufweisen. Dazu zählen das Fettgewebe und die Leber. Diese Untersuchungen konnten keinerlei Unterschiede in der CD36-mRNA-Expression des Fettgewebes oder der Leber von VDR-KO- und WT-Mäusen aufzeigen. Dadurch wird deutlich, dass die CD36-Expression nicht allein durch den Vitamin D-Status reguliert wird, sondern relevante VDR-Mengen voraussetzt und damit zell- und gewebespezifisch ist.

Unterstützt wird diese Annahme durch kürzlich publizierte Experimente der Arbeitsgruppe von Szeto und Mitarbeitern an murinen Makrophagen mit VDR-Defizit. Makrophagen gelten, als Bestandteil des Immunsystems, als Vitamin D-responsiv und verfügen über ein funktionales Vitamin D/VDR-System. Auch in diesen Untersuchungen wurde gezeigt, dass ein VDR-KO die Expression des CD36 beeinflusst, in diesem Falle wieder erhöht (Szeto et al., 2012).

Zusammenfassend zeigen die hier präsentierten Daten, dass im murinen Modell ein VDR-KO oder ein alimentärer Vitamin D-Mangel weder die Plasma- noch die Leber-Cholesterol- sowie Triglyceridspiegel beeinflusst. Zudem wird hier erstmalig eine VDR- und Vitamin D-abhängige Regulation der CD36-mRNA-Expression in der Dünndarmmukosa und der Niere beschrieben. Das Ausmaß dieser Regulation erscheint allerdings nicht ausreichend zu sein, um Plasma- oder Leberlipid-Konzentrationen nachhaltig zu beeinflussen und könnte vielmehr dazu dienen, die Vitamin D-Aufnahme in Mangelsituationen zu verbessern.

Zum Einfluss des VDR auf Faktoren zur Abwehr von Zellstress

In der vorliegenden Arbeiten konnten verschiedene Gene und Proteine identifiziert werden, deren Expression durch den VDR-KO beeinflusst wurden und entweder mit der Entstehung von endoplasmatischem Retikulum (ER)-Stress assoziiert sind oder in den Kontext der *unfolded protein response* (UPR) fallen. Dazu zählen GRP94, Hspa5, Hsc70, Vcp/97, PA28 β , 14-3-3 und 6PGL.

Das als „ER-Stress“ bezeichnete Phänomen beschreibt die Disbalance zwischen der Proteinfaltungskapazität des ER gegenüber dem Aufkommen an Proteinen, die über das ER

prozessiert werden müssen. Verursacht durch verschiedene Stressoren kommt es dabei zur abnormalen Akkumulation fehlerhafter Proteine im Inneren des ER. Als Folge dessen werden normale Zellprozesse beeinträchtigt oder gar die Zelle, im Falle exzessiven ER-Stresses, in die Apoptose geschickt (Hetz, 2012; Jäger et al., 2012). Auslöser für ER-Stress sind metabolischer, physikalischer oder aber auch oxidativer Stress. Um den negativen Auswirkungen des ER-Stresses entgegenzuwirken, stehen der Zelle verschiedene Kompensationsmechanismen zur Verfügung, die unter der „*unfolded protein response*“ (UPR) zusammengefasst werden. Dazu zählen unter anderem die Anpassung der Expression von ER-residenten Chaperonen zur Steigerung der Proteinfaltungskapazität. Desweiteren kommt es zu Aktivierung des sogenannten *endoplasmic-reticulum-associated protein degradation* (ERAD)-Weges, über welchen gezielt fehlgefaltete Proteine des ER durch einen gesteigerten ER-Export und anschließender proteasomaler Degradation eliminiert werden (Kim et al., 2015).

Das *glucose regulated protein 94* (GRP94), *valosin-containing protein* (Vcp/97) und *proteasome activator complex subunit 2* (PA28 β) lassen sich der UPR zuordnen und werden im VDR-KO verglichen mit dem stärker exprimiert. GRP94 ist ein Stress-induziertes ER-stämmiges Chaperone, welches direkt in den Prozess der Erkennung und Degradation fehlgefalteter Proteine involviert ist (Eletto et al., 2010). In diesem Zusammenhang ist auch Vcp/97 von zentraler Bedeutung, da es sowohl am Export von Proteinen aus dem ER ins Zytoplasma, als auch an deren anschließender Ubiquitinierung sowie nachfolgender Degradation maßgeblich beteiligt ist (Meyer and Wehl, 2014). PA28 β wiederum bildet mit der PA28 α -Variante eine funktionale Einheit (PA28 $\alpha\beta$) und ist Teil des 20S-Proteasome-Aktivator-Komplexes. PA28 $\alpha\beta$ wird durch ER-Stress induziert, erhöht die proteasomale Aktivität und beschleunigt somit den Abbau geschädigter Proteine (Pickering and Davies, 2012).

Diese Ergebnisse fügen sich in das Bild eines erhöhten Stress-Aufkommens in der VDR-KO-Maus ein und deuten die Induktion funktional ineinandergreifender Kontermechanismen zur Eliminierung geschädigter Proteine an.

Interessanterweise zeigen die Messungen aus dieser Arbeit aber auch eine verminderte mRNA-Expression des ebenfalls Stress-induzierten Chaperone Hspa5 in VDR-KO-Mäusen. Das Gen Hspa5 kodiert für das ER-ansässige 78 kDa *glucose-regulated protein* (GRP78), dem primären negativ Regulator der UPR (Wang et al., 2009). In der Literatur führt ein Hspa5/GRP78 knockdown zur spontanen Aktivierung der UPR und bedingt so einen Anstieg im GRP94 (Li et al., 2008).

Somit ist nicht völlig auszuschließen, dass die beschriebenen ER-Stress-Anzeichen in der VDR-KO-Maus zum Teil durch einen reduzierten Hspa5/GRP78-Feedback bedingt sein könnten.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit eine Expressionsverminderung des stressassoziierten Proteins *14-3-3* ζ/δ in VDR-KO-Mäusen beobachtet werden. *14-3-3*-Proteine sind ubiquitär vorkommende Chaperone mit verschiedenen intrazellulären Funktionen wie z.B. in der Zellzykluskontrolle und Signaltransduktionsprozessen (Aghazadeh and Papadopoulos, 2016). Zudem sind *14-3-3*-Proteine am Transport von Proteinen im ER und der Beseitigung fehlgefalteter Proteine beteiligt (Kaneko and Hachiya, 2006; O’Kelly et al., 2002). Die Expression von *14-3-3*-Proteinen ist ebenfalls eng mit dem Auftreten von ER-Stress assoziiert. Studien der jüngeren Vergangenheit zeigen, dass ein *14-3-3*-Protein-knockdown ER-Stress erhöht (Murphy et al., 2008), während eine Überexpression von *14-3-3*-Proteinen zur Reduktion von ER-Stress und der Inhibition der UPR-Kaskade inklusive einer verminderten GRP94-Bildung führt (Brennan et al., 2013). Diese Beobachtungen unterstützen den Eindruck eines erhöhten ER-Stresses in Darmmukosazellen von VDR-KO-Mäusen.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von ER-Stress und einem Vitamin D-Mangel kann über die anti-oxidativen Eigenschaften des Vitamin D diskutiert werden. Verschiedene Hinweise aus epidemiologischen und experimentellen Studien lassen darauf schließen, dass ein Vitamin D-Mangel einen Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) verursacht (Bao et al., 2008; Bhat and Ismail, 2015; Doğan et al., 2012; Gradinaru et al., 2012; Zhong et al., 2014). ROS können die Proteinfaltung im ER beeinträchtigen und somit die Bildung von ER-Stress induzieren (Cao and Kaufman, 2014; Chaudhari et al., 2014).

Aus der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass die Expression der 6-Phosphogluconolactonase (6PGL) in VDR-KO-Mäusen vermindert ist. 6PGL katalysiert den zweiten Reaktionsschritt des Pentosephosphatwegs. Durch den Pentosephosphatweg wird die Bildung des Reduktionsäquivalentes NAD(P)H sichergestellt, welches als Kofaktor wichtiger anti-oxidativer Enzyme, wie zum Beispiel den Glutathionperoxidasen, fungiert. Somit ist die NAD(P)H-Bildung essentiell für die Aufrechterhaltung der zellulären Redox-Homöostase (Riganti et al., 2012). Es liegt somit die Vermutung nahe, dass der VDR an der Regulation des Pentosephosphatwegs in Darmmukosazellen beteiligt ist. Daraus könnte sich eine reduzierte NAD(P)H-Bildung ergeben, was den Redox-Status der Zelle verändern und ein gesteigertes Maß an oxidativen Stress zur Folge haben könnte.

Unterstützend für diese Annahme ist die Arbeit von Bao und Mitarbeitern, die an humanen Prostata-Epithelzellen nach 1,25(OH)₂D-Behandlung eine Induktion der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase des Pentosephosphatwegs mit gleichzeitiger Reduktion oxidativer Zellschäden feststellen konnten (Bao et al., 2008).

Um die ROS-„Belastung“ der Darmmukosazelle von VDR-KO-Mäusen zumindest qualitativ einzuschätzen, wurden in dieser Arbeit Zielgene des „*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*“ (Nrf2) bestimmt. Der Nrf2-Transkriptionsfaktor steht im Mittelpunkt der anti-oxidativen Antwort der Zelle und eine Induktion von Nrf2-Zielgenen gilt als indirekter Nachweis eines erhöhten oxidativen Status (Gorrini et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit zeigten VDR-KO-Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen einen Expressionsanstieg verschiedener Nrf2-Zielgene: *Glutamate-cysteine ligase regulatory subunit* (Gclm); *Glutathione S-transferase A3* (Gsta3); *NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1* (Nqo1). Somit kann davon ausgegangen werden, dass zumindest Teile der anti-oxidativen Antwort in Darmmukosazellen von VDR-KO-Mäusen verstärkt aktiviert wurden, was wiederum auf einen erhöhten oxidativen Status hindeutet und letztlich eine Häufung oxidativer Proteinmodifikationen bedingen kann.

Zusammenfassend ergeben sich aus den hier vorgestellten Daten indirekte Anzeichen von erhöhtem ER- und oxidativem Zellstress in Dünndarmmukosazellen von VDR-KO-Mäusen.

Inwieweit der Vitamin D-Mangel eine Neigung zu pathologischen Veränderungen des Darmes (Review: ER-Stress: (Kaser et al., 2013; Niederreiter and Kaser, 2011); oxidativer-Stress: (Bhattacharyya et al., 2014) hervorbringt, ist hier u.a. aufgrund der kurzen Versuchsdauer nicht abzuschätzen und bedarf weiterführender Untersuchungen.

Zur Vitamin D-Rezeptor-*knockout*-Maus und der diätetischen Korrektur der Serumkalzium- und Parathormonspiegel

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind vorrangig aus Experimenten mit Vitamin D-Rezeptor-*knockout*-Mäusen entstanden. Experimente mit genetisch veränderten Organismen haben den Vorteil, dass man durch das Ausschalten eines spezifischen Gens ein solides Ursache- Wirkungsmodell etabliert. Im Falle der VDR-KO-Maus werden damit Einblicke in das Vitamin D-Wirkungsspektrum und assoziierter Mangelerscheinungen am lebenden Organismus möglich. Die Eliminierung des VDR als Transkriptionsfaktor bewirkt eine Aufhebung der genregulatorischen Wirkungen des Vitamin D. Zudem treten durch die

Simulierung eines absoluten Vitamin D-Mangels (VDR-KO) metabolische und pathophysiologische Veränderungen wesentlich stärker in Erscheinung. Folglich eignen sich VDR-KO-Mäuse besonders gut zur grundlegenden Klärung, inwieweit Vitamin D an der Regulation bestimmter Stoffwechselwege beteiligt ist.

Versuche, in denen alimentär ein Vitamin D-Mangel induziert wird sind ebenfalls gebräuchlich, haben aber den Nachteil, dass sie nur schwer mit ähnlichen Studien zu vergleichen sind, da in der Regel kein einheitlicher Vitamin D-Status erreicht werden kann. Zudem nimmt die Reduzierung der biologisch aktiven Vitamin D-Form, dem $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, viel Zeit in Anspruch.

Bisher existieren vier verschiedene VDR-KO-Maus-Linien. In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Mausmodell von Li und Mitarbeitern (1997) gearbeitet, welches dem Phänotyp der humanen Typ II Vitamin D-abhängigen Rachitis (VDDR II) entspricht (Li et al., 1997).

Zur Korrektur des rachitischen Phänotyps wird in der Literatur die Fütterung einer kalzium- (2%), phosphor- (1,25%) und laktose- (20%) angereicherten Diät vorgeschlagen (Li et al., 1998). Durch diese vergleichsweise hohen Zulagen an Kalzium und Phosphor soll das Mineralstoffdefizit der VDR-KO-Mäuse kompensiert und eine Angleichung an den Wildtyp begünstigt werden. Der Normalbedarf für Nager wurde vom *American Institut of Nutrition* (AIN-93G) auf 0,5% Kalzium und 0,3% Phosphor festgesetzt (Reeves et al., 1993). In Anlehnung an diese Literaturvorgabe wurde bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit VDR-KO-Mäusen diese kalzium-, phosphor- und laktosereiche Diät eingesetzt.

In allen hier durchgeführten Studien mit VDR-KO-Mäusen fiel auf, dass der Einsatz dieser sogenannten *Rescue*-Diät nicht zu einer angemessenen Korrektur der Kalzium- oder PTH-Konzentrationen im Blut der VDR-KO-Mäuse führte. Die Kalziumkonzentration der VDR-KO-Mäuse war deutlich geringer, als die der WT-Mäuse. Des Weiteren überstiegen die Serum-PTH-Konzentrationen der VDR-KO-Mäuse die Serum-PTH-Konzentrationen der WT-Mäuse um ein Vielfaches. Aus diesem Grund wurde in Versuch IV getestet, ob eine Diät mit höheren Kalziumgehalten (bis zu 4% Kalziumzulage) eine Normalisierung der Kalzium- oder PTH-Konzentrationen bewirken könnte. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchung geht hervor, dass Kalziumgehalte bis einschließlich 3% in der Diät nicht zur Normalisierung der Kalzium- und PTH-Spiegel des Blutes bei VDR-KO-Mäusen geeignet sind. Erst durch eine höhere Kalziumzulage von 4% konnte eine Angleichung der Kalzium- und PTH-Konzentrationen zwischen VDR-KO- und WT-Mäusen realisiert werden. Damit weichen die Ergebnisse dieser Arbeit deutlich von der durch Li und Mitarbeitern (1998) erreichten

Verbesserung des Kalziumstatus von VDR-KO-Mäusen unter *Rescue*-Diät (2%-Kalziumgehalt) ab.

Dies könnte mehrere Ursachen haben: Zum einen bestehen Unterschiede in der eingesetzten Diät. Die wesentliche Diätkomposition (2% Kalzium, 1,25% Phosphor, 20% Laktose) stimmt mit der Literaturvorgabe überein, aber der Energiegehalt und die Quelle der Makronährstoffe variieren in den Versuchen dieser Arbeit. Besonders der Energiegehalt der Diät scheint von Bedeutung. Anhand des Versuchs IV wird deutlich, dass mit abnehmender Energiedichte die Futteraufnahme steigt. Daraus ergibt sich eine höhere absolute Kalziumaufnahme. Ebenso muss die Wahl einer 2%igen Kalziumzulage als zu gering beurteilt werden. Die in Versuch IV gezeigte Normalisierung der Serum-, Kalzium- und PTH-Spiegel konnte erst bei einer Kalziumzulage von 4% erreicht werden, was nicht allein durch die geringere Energiedichte erklärt werden kann. Der Versuch IV aus der vorliegenden Arbeit ist dahingehend die bisher einzig bekannte Studie, die die Auswirkungen der diätetischen Kalziumkonzentrationen für die Serumkalzium- und PTH-Konzentrationen der VDR-KO-Maus in diesem Umfang untersucht hat. Versuch IV zeigt daher auch, dass die generelle Festlegung einer 2%igen Kalziumanreicherung der Diät, wie es von Li und Mitarbeitern (1998) vorgeschlagen wird, unzulänglich ist und bei der Erstellung einer *Rescue*-Diät die Energiedichte und letztlich die individuelle Futteraufnahme berücksichtigt werden sollten.

Zum anderen muss beachtet werden, dass Futtermittelkomponenten, die zur Produktion dieser Diäten verwendet werden, Begleitstoffe wie Phytinsäure enthalten können, welche die Verfügbarkeit von Kalzium beeinträchtigen. Weiterhin ist es möglich, dass das verwendete VDR-KO-Mausmodell nicht mit der Maus-Line aus der Originalpublikation (Li et al., 1997) identisch ist. Diese Annahme beruht auf dem Vergleich der Fellfarbe. In Li und Mitarbeitern (1997) werden Mäuse mit braunem Fell beschrieben, während die Mäuse aus dieser Arbeit schwarzes Fell hatten. Üblicherweise werden Untersuchungen an transgenen Mäusen erst in Betracht gezogen, wenn die Linie für wenigstens zehn Generationen auf den entsprechenden Zucht- und Erhaltungsstamm zurückgekreuzt wurde. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mäuse gehören zum Stamm C57BL/6J (Fellfarbe: schwarz). Im Gegensatz dazu deutet die Abbildung aus der Publikation von Li und Mitarbeitern (1997) stark darauf hin, dass Mäuse des sv/129-Stammes benutzt wurden. Der sv/129-Stamm (braunes Fell) wird in der Regel für das Einbringen von Genmanipulationen verwendet. Es erscheint demnach plausibel, dass die Rückkreuzung auf C57BL/6 später oder erst beim kommerziellen Züchter vorgenommen wurde. Damit ergibt sich zwar der gleiche VDR-KO, aber ein sonst ungleicher

genetischer Hintergrund, der zu unterschiedlichen Nährstoffanforderungen respektive höheren Kalziumbedürfnissen führen kann.

Wie bereits erläutert, ist der sekundäre Hyperparathyroidismus eine typische Begleiterscheinung eines starken Vitamin D-Mangels. Damit stellt sich die Frage, inwieweit auch erhöhte PTH-Spiegel Effekte auf den Darm ausüben könnten. Die Hauptfunktion des Parathormons besteht in der Erhöhung der Kalziumkonzentration des Blutes. Dies wird durch eine gesteigerte Kalziumfreisetzung aus dem Knochen, einer verbesserten Kalziumrückresorption durch die Niere sowie der Induktion der renalen $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -Synthese erreicht. Da der Darm nicht zu den klassischen PTH-Zielorganen zählt, mangelt es an Studien, die sich mit der PTH-Wirkung auf den Darm befassen. Bisher bekannt ist, dass der PTH-Rezeptor (PTHr) ebenfalls in Darmepithelzellen exprimiert wird (Nemere and Larsson, 2002). Der PTHr ist ein membranständiger, G-Protein-gekoppelter Rezeptor der die zellulären PTH-Effekte durch die Induktion von Signalkasaden, welche Proteinkinase A und/oder Proteinkinase C involvieren, vermittelt (Villardaga et al., 2012). Dabei scheinen die PTH-Effekte, die über den Proteinkinase A-Signalweg ausgelöst werden, Vitamin D-abhängig zu sein. So konnte gezeigt werden, dass hohe Mengen an PTH zwar die Kalziumaufnahme über den Darm steigern, dieser Effekt aber nur unter ausreichender Vitamin D-Versorgung auftritt (Nemere et al., 2000; Nemere and Norman, 1986; Nemere and Szego, 1981).

Aufgrund der ineinandergreifenden und der sich gegenseitig beeinflussenden Signalwirkungen, ist eine Differenzierung zwischen direkten VDR- oder indirekten PTH-Effekten, bzw. deren Interaktion in dieser Arbeit nicht uneingeschränkt möglich.

Allerdings gilt es zu beachten, dass ein Anstieg in den Serum-PTH Konzentrationen die natürliche Reaktion des Organismus auf einen Vitamin D-Mangel darstellt und daher in Vitamin D-Mangel Studien ebenso Berücksichtigung finden sollte.

5 Zusammenfassung

Nach aktuellem Wissensstand ist Vitamin D an der Regulation von bis zu 5% aller Gene des menschlichen Genoms beteiligt. Die genomischen Vitamin D-Wirkungen werden über den Vitamin D-Rezeptor (VDR) vermittelt, einem nukleären Transkriptionsfaktor der nach Bindung des aktiven Vitamin D-Metaboliten, 1,25(OH)₂-Vitamin D, an sogenannte Vitamin D responsive elements (VDREs) eines Zielgens bindet und dessen Expression beeinflusst. Über diesen Mechanismus steuert Vitamin D vor allem die intestinale Kalziumabsorption und trägt so maßgeblich zur systemischen Regulation der Kalziumhomöostase und der Knochenmineralisation bei. Die Entdeckung, dass der VDR in nahezu allen Geweben und Zellen des Körpers exprimiert wird lässt darauf schließen, dass Vitamin D auch Wirkungen besitzt, die nicht unmittelbar an die Kalziumregulation geknüpft sind. Dies ist besonders daran zu erkennen, dass der Vitamin D-Mangel nicht mehr nur mit den klassischen Symptomen der Osteomalazie und Rachitis, sondern mit der Entstehung einer Vielzahl von Erkrankungen wie zum Beispiel Diabetes-Mellitus, Atherosklerose und Krebs assoziiert wird. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin die Auswirkungen eines Vitamin D-Mangels auf Mukosazellen des Dün- und Dickdarms zu untersuchen und dabei fokussiert die Effekte näher zu beschreiben, die klassischer Weise nicht primär mit der Kalziumhomöostase in Verbindung stehen. Der Darm wurde ausgewählt aufgrund der hohen VDR-Expressionsdichte und der damit verbundenen hohen Sensitivität gegenüber Veränderungen im Vitamin D-Status. Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden vorrangig am VDR-knockout (KO)-Mausmodell durchgeführt, aber auch an Ratten mit unterschiedlichem Vitamin D-Status. Der genetische VDR-Verlust bei VDR-KO-Mäusen führt zur Entwicklung einer ausgeprägten Vitamin D-Mangelsymptomatik. Dieses *in-vivo* Modell erscheint damit besonders geeignet für die Erkennung zellulärer Regelkreisläufe in die Vitamin D und der VDR involviert sind. Zunächst wurde ein Vergleich des Proteinexpressionsmusters von Dünndarmmukosazellen von VDR-KO- und WT-Mäusen angestellt, um die Auswirkungen einer gestörten VDR-Signalwirkung aufzuzeigen. In diesem Versuch erhielten VDR-KO- und WT-Mäuse über einen Zeitraum von acht Wochen eine mit Kalzium (2%) und Phosphor (1,25%) angereicherte Diät. Die hohen Kalziumzulagen der Diät dienten dazu, dass sich einstellende Kalziumdefizit der VDR-KO-Mäuse zu reduzieren. Durch den Vergleich der Proteomprofile mittels gelbasierter 2D-DIGE und nachfolgenden Genexpressionsanalysen konnte der VDR mit der Regulation der Zellstress-Antwort, der Zelladhäsion und dem Zytoskelett in Verbindung gebracht werden. Konkret wurden durch den VDR-KO Zielgene des Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) und Vertreter der UPR (*unfolded protein response*) beeinflusst,

was auf erhöhte Stressniveaus (ER- und/oder oxidativer Zellstress) bei VDR-KO-Mäusen hinweist. Darüber hinaus waren VDR-KO-Mäuse gekennzeichnet durch eine veränderte Expression von Komponenten der Zell-Matrix-Adhäsion (*37/67 kDa laminin receptor, integrin alpha-6*), der Extrazellulärmatrix (*Matrix metalloproteinase-2, collagen 6a1*) und des Zytoskelets (*β-actin, keratin, adseverin*). Ferner konnte festgestellt werden, dass VDR-KO-Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen eine deutlich höhere Expression des Sterol- und Fettsäuretransporters CD36 (*cluster of differentiation 36/fatty acid translocase*) in Dünndarmmukosazellen aufwiesen. Diese erhöhte CD36-Expression konnte ebenfalls in der Dünndarmmukosa von Ratten mit alimentärem Vitamin D-Mangel beobachtet werden. Allerdings konnten keine Unterschiede in den Plasma- oder Leber Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen von VDR-KO-Mäusen oder Ratten mit Vitamin D-Mangel gegenüber den jeweiligen Kontrollgruppen festgestellt werden.

Die Beobachtung, dass bei einem VDR-KO auffällig viele Proteine verändert waren, die in die Regulation der Zelladhäsion involviert waren, war Anlass in weiteren Versuchen, sowohl Zell-Zell-Kontakte, die Morphologie des duodenalen Enterozyten als auch die Barriereintegrität des Darms näher zu untersuchen. Zur Bewertung der Zell-Zell-Kontakte wurden die wichtigsten Vertreter der *tight junctions* und *adherence junctions* quantifiziert und die parazelluläre Durchlässigkeit des Darmes für Makromoleküle ermittelt. Aus diesen Untersuchungen wurde deutlich, dass der VDR-KO im Dünndarm und Kolon weder die Expression von barrierebestimmenden Molekülen wie *occludin*, *JAM-A (junctional adhesion molecule-A)*, *ZO-1 (zona occludens protein-1)* oder dem *adherence junction* Protein *E-cadherin*, beeinträchtigt. Auch eine elektronenmikroskopische Vermessung des *tight junctions* Spaltes ergab keine Unterschiede zwischen VDR-KO- und WT-Mäusen. Der Übertritt des FITC-D, als Marker für gastrointestinale parazelluläre Permeabilität, zeigte zwischen VDR-KO- und WT-Mäusen ebenfalls keine Unterschiede. Barrieredefekte werden häufig begleitet von lokalen Entzündungen des Kolons, sodass ergänzend zur FITC-D Messung auch die Inflammationsmarker *tumor necrosis factor-alpha* und *interleukin-6* des Kolons bestimmt wurden. VDR-KO- und WT-Mäuse zeigten in diesen Parametern keine Unterschiede zueinander, womit auch eine Entzündung des Darms wahrscheinlich ausgeschlossen werden kann und von einer insgesamt intakten Darmbarriere bei VDR-KO-Mäusen auszugehen ist.

Weiterhin konnte in der Dünndarmmukosa von VDR-KO-Mäusen ein starkes Absinken der *claudin-2*-Expression registriert werden. Proteine aus der Claudin-Familie sind im Bereich der *tight junctions* lokalisiert, bilden selektive Poren und regulieren die parazelluläre Passage von

Wasser und Ionen. *Claudin-2* steht mit der passiven Kalziumaufnahme in Zusammenhang. Die Bestimmung der *claudin-2*-Expression im Kolon von VDR-KO-Mäusen zeigte hingegen keine Unterschiede mehr zu WT-Mäusen, was möglicherweise auf die hohen Kalziumgehalte in den Diäten zurückzuführen ist.

Des Weiteren wurden phänotypische Merkmale des Darms von VDR-KO-Mäusen mit denen von WT-Mäusen verglichen. Dazu wurden die einzelnen Dünndarmabschnitte (Duodenum, Jejunum, Ileum) und das distale Kolon histologisch präpariert und mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Die Vermessung der Zottenlänge und der Kryptentiefe gilt als guter Indikator zur Erkennung ausgeprägter Störungen der Organogenese des Darms. Bis auf eine tendenziell geringere Kryptentiefe im Bereich des Duodenums von VDR-KO-Tieren, konnten keine signifikanten Unterschiede in der Zottenlänge und Kryptentiefe des Dünndarmes und des Kolons zwischen VDR-KO- und WT-Mäusen festgestellt werden. Jedoch zeigte die Betrachtung der ultrastrukturellen Merkmale des duodenalen Enterozyten mittels Elektronenmikroskopie längere Mikrovilli in VDR-KO-Mäusen gegenüber dem Wildtyp. Diese Elongation betrug ca. 19% und wurde von einer gesteigerten mRNA- und Proteinexpression des *ezrin*, einem essentiellen Regulator der Mikrovillimorphogenese, begleitet. Ezrin beeinflusst unter anderem die Organisation des Zytoskeletts an der Mikrovilli Basis und unterstützt damit die Beobachtung dieser Arbeit, dass der VDR an der Regulation zytoskeletaler Komponenten beteiligt ist.

Die Arbeit an einem Rachitismodell, wie das der VDR-KO-Maus, bedingt aufgrund der geringeren Kalziumspiegel des Blutes, das Auftreten eines sekundären Hyperparathyreoidismus. Da sowohl Kalzium als auch das Parathormon (PTH) eigenständige Wirkungen besitzen, ist die Interpretation einzelner Ergebnisse oft nicht eindeutig dem VDR zuzuordnen. Daher sollte diese Arbeit auch dazu dienen, herauszufinden inwieweit die Serumkalzium- und PTH-Konzentrationen der VDR-KO-Maus durch alimentäre Kalziumzugaben normalisiert werden können und die dazu benötigte Menge möglichst genau zu ermitteln. Es stellte sich heraus, dass es für eine adäquate Angleichung der Serumkalzium- und PTH-Konzentrationen der VDR-KO-Mäuse an den Wildtyp einen Kalziumgehalt in der Diät von 4% bedurfte.

Summary

According to current knowledge, vitamin D is involved in the regulation of up to 5% of all genes of the human genome. The vitamin D receptor (VDR), a nuclear transcription factor, mediates the genomic vitamin D effects. Once activated, by 1,25(OH)₂-vitamin D, the VDR binds to vitamin D responsive elements (VDREs) in the promotor of target genes and either enhances or silences gene transcription. Through this mechanism, vitamin D controls the active intestinal calcium absorption and thus it regulates systemic calcium homeostasis and bone mineralization. The VDR is expressed in almost all types of tissues and cells in the body. New vitamin D functions have been discovered, that were not directly related to calcium regulation, linking vitamin D deficiency not only to osteomalacia or rickets, but rather to a variety of different diseases such as diabetes mellitus, atherosclerosis and cancer.

The aim of this work was to identify and describe new non-calcium related vitamin D functions in the intestine. The intestine was chosen due to its high VDR density and the associated sensitivity to changes in the vitamin D status. All studies in this work were conducted by comparing VDR-*knockout* (KO) mice with corresponding wildtype (WT) mice or rats with vitamin D deficiency. The ablation of the VDR causes severe vitamin D deficiency. Therefore, the VDR-KO mouse seemed particularly suitable for the detection of vitamin D and VDR controlled cellular processes.

Two-dimensional gel electrophoresis was used as a first step to elucidate the consequences of an impaired VDR signaling on the protein profile in mucosa cells of VDR-KO mice. In this trial VDR-KO and WT mice received a diet enriched with calcium (2%) and phosphor (1.25%) over a period of eight weeks. The high calcium concentrations of the diet aimed to reduce the naturally occurring calcium deficit of the VDR-KO mice. By analyzing the proteome profile and subsequently the gene expression, it has been shown, that the VDR was involved in the regulation of the cell-stress response, cell-adhesion and the cytoskeleton. In detail, the VDR-KO caused the induction of Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2)-target genes and altered members of the UPR (unfolded protein response) indicating increased cellular stress levels (endoplasmatic reticulum- and/or oxidative-stress) in VDR-KO mice. In addition, the VDR-KO was accompanied by an altered expression of components related to cell-matrix adhesion (37/67 laminin receptor, integrin alpha-6), the extracellular matrix (matrix metalloproteinase-2, collagen6a1) and of the cytoskeleton (β -actin, keratin, adseverin). Furthermore there was a significantly higher expression of the sterol and fatty acid transporter CD36/FAT (cluster of differentiation 36/fatty acid translocase) in intestinal mucosa cells of VDR-KO animals. The increase in CD36 expression was also observed in intestinal cells of

rats with alimentary vitamin D-deficiency. However, the analysis of plasma and liver lipids of VDR-KO mice and vitamin D-deficient rats did not show detectable differences compared to control animals.

Due to the accumulation of proteins associated with cell-adhesion in VDR-KO mice, the following experiments focused on the characterization of cell-cell contacts, the morphology of duodenal enterocytes as well as intestinal epithelial barrier integrity. To evaluate cell-cell contacts of intestinal mucosa cells, the major tight junction and adherence junction proteins were quantified and the paracellular permeability of the gut was determined. It appeared that a VDR-KO did not influence the expression of barrier determining components such as occludin, JAM-A (junctional adhesion molecule-A), ZO-1 (zona occuldens protein-1) or the adherence junctions protein e-cadherin, neither in the small intestine nor in the colon. In addition, the measurement of the tight junction gap width by electron microscopy revealed no differences between the groups. Also, the epithelial transfer of FITC-D, a marker for gastrointestinal paracellular permeability, showed no difference between VDR-KO and WT-mice. Local inflammation is a common feature of intestinal barrier defects. To detect local inflammatory responses in the colon mRNA-expression levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 were determined. VDR-KO and WT mice showed no differences in these parameters, indicating that the colon of VDR-KO mice is not inflamed and the intestinal barrier of VDR-KO mice is not compromised.

Furthermore, the data suggested a strong decrease in the expression of claudin-2 in the small intestine of VDR-KO mice. Claudins are structural proteins spanning the tight junction gap and control the paracellular movement of water and ions by forming ion-selective pores. Claudin-2 is involved in the passive intestinal absorption of calcium. In contrast to the small intestine, claudin-2 expression was not altered in the colon of VDR-KO mice. This might be due to the high calcium content of the diet.

Furthermore, morphological characteristics of the intestine of VDR-KO and WT- mice were compared. Therefore, segments of the small intestine (duodenum, jejunum, ileum) and the distal colon were histologically prepared and stained with hematoxylin-eosin to quantify morphologic structures. The villus length and crypt depth is considered to be a good indicator for detecting severe defects in the organogenesis of the gut. Except for a trend towards a lower crypt depth in the duodenum of VDR-KO mice no significant differences in the villus length and crypt depth of the small intestine and the colon between VDR-KO and WT animals were present. However, electron microscopy of ultrastructural features of duodenal enterocytes revealed a 19% increase in microvilli length in VDR-KO mice compared to WT

mice. This elongation was accompanied by an increased mRNA-expression and protein-abundance of the essential microvilli-morphogenesis regulator ezrin. Ezrin also regulates the organization of the cytoskeleton at the microvilli basis thus supporting the observation that the VDR is involved in the regulation of cytoskeletal components.

Due to the low blood calcium levels in VDR-KO mice, a strong increase in parathormon (PTH) levels became evident. Since PTH exhibits independent functions as well, the interpretation of the current results can be challenging if discrimination between unique VDR or PTH actions would be necessary. Therefore this work intended to clarify whether the serum calcium and PTH levels of VDR-KO mice can be normalized by dietary manipulation (calcium supplementation). According to the observations of this work, 4% calcium supplementation was needed to achieve adequate comparability of VDR-KO mice to WT mice regarding serum calcium- and PTH concentrations.

6 Anhang

Tabelle 17: Vitamin und Mineralstoffmischung der Diäten der Versuche I und IV

Vitamine		[mg/kg Diät]	
Vitamin A (500.000 IU/g)			10,0
Tocopherolacetat			150
Vitamin K			1,5
Thiamin-HCl			6,0
Riboflavin			6,1
Pyridoxin-HCl			7,0
Ca-Pantothenat			16,0
Folsäure			2
Nicotinsäure			30,0
Biotin			20,0
Cyanocobalamin			2,6
Vitamin D ₃			2,5
Cholinchlorid			2000
Mengenelemente	Verbindung	Anteil	[g/kg Diät]
Magnesium	Magnesiumoxid	50% Mg	1,0
Kalium	Kaliumchlorid	52% K	6,9
Natrium	Natriumchlorid	39% Na	2,6
Chlorid		61% Cl	
Spurenelemente	[mg/kg Diät]		
Eisen	Eisensulfat	30% Fe	116
Zink	Zinkoxid	79% Zn	38,0
Mangan	Manganoxid	62% Mn	16,0
Kupfer	Kupfersulfat	25% Cu	24,0
Selen	Natriumselenit	45% Se	0,33
Jod	Calciumjodat	62% J	0,32
Schwefel	wird über andere Quellen abgedeckt		
Molybdän	Ammoniummolybat	54,3% Md	0,28

7 Literaturverzeichnis

- Adams, J.S., Rafison, B., Witzel, S., Reyes, R.E., Shieh, A., Chun, R., Zavala, K., Hewison, M., Liu, P.T., 2014. Regulation of the extrarenal CYP27B1-hydroxylase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 144 Pt A, 22–7. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.12.009
- Aghazadeh, Y., Papadopoulos, V., 2016. The role of the 14-3-3 protein family in health, disease, and drug development. *Drug Discov. Today* 21, 278–87. doi:10.1016/j.drudis.2015.09.012
- Almeras, L., Eyles, D., Benech, P., Laffite, D., Villard, C., Patatian, A., Boucraut, J., Mackay-Sim, A., McGrath, J., Féron, F., 2007. Developmental vitamin D deficiency alters brain protein expression in the adult rat: implications for neuropsychiatric disorders. *Proteomics* 7, 769–80. doi:10.1002/pmic.200600392
- Ardini, E., Sporchia, B., Pollegioni, L., Modugno, M., Ghirelli, C., Castiglioni, F., Tagliabue, E., Ménard, S., 2002. Identification of a novel function for 67-kDa laminin receptor: increase in laminin degradation rate and release of motility fragments. *Cancer Res.* 62, 1321–5.
- Awad, A.B., Alappat, L., Valerio, M., 2012. Vitamin d and metabolic syndrome risk factors: evidence and mechanisms. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 52, 103–12. doi:10.1080/10408391003785458
- Bao, B.-Y., Ting, H.-J., Hsu, J.-W., Lee, Y.-F., 2008. Protective role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. *Int. J. cancer* 122, 2699–706. doi:10.1002/ijc.23460
- Berno, V., Porrini, D., Castiglioni, F., Campiglio, M., Casalini, P., Pupa, S.M., Balsari, A., Ménard, S., Tagliabue, E., 2005. The 67 kDa laminin receptor increases tumor aggressiveness by remodeling laminin-1. *Endocr. Relat. Cancer* 12, 393–406. doi:10.1677/erc.1.00870
- Bhat, M., Ismail, A., 2015. Vitamin D treatment protects against and reverses oxidative stress induced muscle proteolysis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 152, 171–9. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.05.012
- Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., Crowe, S.E., 2014. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol. Rev.* 94, 329–54. doi:10.1152/physrev.00040.2012
- Botella-Carretero, J.I., Alvarez-Blasco, F., Villafruela, J.J., Balsa, J.A., Vázquez, C., Escobar-Morreale, H.F., 2007. Vitamin D deficiency is associated with the metabolic syndrome in morbid obesity. *Clin. Nutr.* 26, 573–80. doi:10.1016/j.clnu.2007.05.009
- Bouillon, R., Carmeliet, G., Verlinden, L., van Etten, E., Verstuyf, A., Luderer, H.F., Lieben, L., Mathieu, C., Demay, M., 2008. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr. Rev.* 29, 726–76. doi:10.1210/er.2008-0004
- Bouillon, R., Suda, T., 2014. Vitamin D: calcium and bone homeostasis during evolution. *Bonekey Rep.* 3, 480. doi:10.1038/bonekey.2013.214

- Brackman D, Trydal T, Lillehaug JR, A.D., 1992. Reorganization of the cytoskeleton and morphological changes induced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in C3H/10T1/2 mouse embryo fibroblasts: relation to inhibition of proliferation. *Exp Cell Res.* 485–93.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–54.
- Brandsch, C., Kappis, D., Weisse, K., Stangl, G.I., 2010. Effects of untreated and thermally treated lupin protein on plasma and liver lipids of rats fed a hypercholesterolemic high fat or high carbohydrate diet. *Plant Foods Hum. Nutr.* 65, 410–6. doi:10.1007/s11130-010-0201-5
- Brennan, G.P., Jimenez-Mateos, E.M., McKiernan, R.C., Engel, T., Tzivion, G., Henshall, D.C., 2013. Transgenic overexpression of 14-3-3 zeta protects hippocampus against endoplasmic reticulum stress and status epilepticus in vivo. *PLoS One* 8, e54491. doi:10.1371/journal.pone.0054491
- Brockman-Schneider, R.A., Pickles, R.J., Gern, J.E., 2014. Effects of vitamin D on airway epithelial cell morphology and rhinovirus replication. *PLoS One* 9, e86755. doi:10.1371/journal.pone.0086755
- Bronner, F., 2003. Mechanisms of intestinal calcium absorption. *J. Cell. Biochem.* 88, 387–93. doi:10.1002/jcb.10330
- Brown, A.J., Dusso, A., Slatopolsky, E., Alex, J., Vita-, E.S., 1999. Vitamin D. *Am. J. Physiol.* 277, F157-75.
- Brundert, M., Heeren, J., Merkel, M., Carambia, A., Herkel, J., Groitl, P., Dobner, T., Ramakrishnan, R., Moore, K.J., Rinninger, F., 2011. Scavenger receptor CD36 mediates uptake of high density lipoproteins in mice and by cultured cells. *J. Lipid Res.* 52, 745–58. doi:10.1194/jlr.M011981
- Burisch, J., Jess, T., Martinato, M., Lakatos, P.L., 2013. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J. Crohns. Colitis* 7, 322–37. doi:10.1016/j.crohns.2013.01.010
- Cao, S.S., Kaufman, R.J., 2014. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress in Cell Fate Decision and Human Disease. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 396–413. doi:10.1089/ars.2014.5851
- Carbone, L.D., Rosenberg, E.W., Tolley, E.A., Holick, M.F., Hughes, T.A., Watsky, M.A., Barrow, K.D., Chen, T.C., Wilkin, N.K., Bhattacharya, S.K., Dowdy, J.C., Sayre, R.M., Weber, K.T., 2008. 25-Hydroxyvitamin D, cholesterol, and ultraviolet irradiation. *Metabolism.* 57, 741–8. doi:10.1016/j.metabol.2008.01.011
- Chandel, N., Sharma, B., Husain, M., Salhan, D., Singh, T., Rai, P., Mathieson, P.W., Saleem, M. a, Malhotra, A., Singhal, P.C., 2013. HIV compromises integrity of the podocyte actin cytoskeleton through downregulation of the vitamin D receptor. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 304, F1347-57. doi:10.1152/ajprenal.00717.2012

- Chaudhari, N., Talwar, P., Parimisetty, A., Lefebvre d'Helencourt, C., Ramanan, P., 2014. A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 213. doi:10.3389/fncel.2014.00213
- Christakos, S., 2012. Mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on intestinal calcium absorption. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 13, 39–44. doi:10.1007/s11154-011-9197-x
- Coskun, M., 2014. Intestinal Epithelium in Inflammatory Bowel Disease. *Front. Med.* 1, 1–5. doi:10.3389/fmed.2014.00024
- Deeb, K.K., Trump, D.L., Johnson, C.S., 2007. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* 7, 684–700. doi:10.1038/nrc2196
- Demay, M.B., 2013. Physiological insights from the vitamin D receptor knockout mouse. *Calcif. Tissue Int.* 92, 99–105. doi:10.1007/s00223-012-9633-2
- DiGiacomo, V., Meruelo, D., 2015. Looking into laminin receptor: critical discussion regarding the non-integrin 37/67-kDa laminin receptor/RPSA protein. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* doi:10.1111/brv.12170
- Dimke, H., Desai, P., Borovac, J., Lau, A., Pan, W., Alexander, R.T., 2013. Activation of the Ca(2+)-sensing receptor increases renal claudin-14 expression and urinary Ca(2+) excretion. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 304, F761-9. doi:10.1152/ajprenal.00263.2012
- Doğan, M., Cesur, Y., Zehra Doğan, Ş., Kaba, S., Bulan, K., Cemek, M., 2012. Oxidant/antioxidant system markers and trace element levels in children with nutritional rickets. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 25, 1129–39. doi:10.1515/jpem-2012-0153
- Drover, V.A., Ajmal, M., Nassir, F., Davidson, N.O., Nauli, A.M., Sahoo, D., Tso, P., Abumrad, N.A., 2005. CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood 115, 1–8. doi:10.1172/JCI200521514.1290
- Dusso, A.S., Brown, A.J., Slatopolsky, E., Adriana, S., Am, V.D., 2005. Vitamin D. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 289, 8–28. doi:10.1152/ajprenal.00336.2004.
- Eder, K., Kirchgessner, M., 1994. Levels of polyunsaturated fatty acids in tissues from zinc-deficient rats fed a linseed oil diet. *Lipids* 29, 839–44.
- Eletto, D., Dersh, D., Argon, Y., 2010. GRP94 in ER quality control and stress responses. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 479–85. doi:10.1016/j.semcdb.2010.03.004
- Endo, I., Inoue, D., Mitsui, T., Umaki, Y., Akaike, M., Yoshizawa, T., Kato, S., Matsumoto, T., 2003. Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors. *Endocrinology* 144, 5138–44. doi:10.1210/en.2003-0502
- Eyles, D., Almeras, L., Benech, P., Patatian, a, Mackay-Sim, a, McGrath, J., Féron, F., 2007. Developmental vitamin D deficiency alters the expression of genes encoding mitochondrial, cytoskeletal and synaptic proteins in the adult rat brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 103, 538–45. doi:10.1016/j.jsbmb.2006.12.096

- Fath, K.R., Mamajiwalla, S.N., Burgess, D.R., 1993. The cytoskeleton in development of epithelial cell polarity. *J. Cell Sci. Suppl.* 17, 65–73.
- Ferreira, G.B., van Etten, E., Lage, K., Hansen, D.A., Moreau, Y., Workman, C.T., Waer, M., Verstuyf, A., Waelkens, E., Overbergh, L., Mathieu, C., 2009. Proteome analysis demonstrates profound alterations in human dendritic cell nature by TX527, an analogue of vitamin D. *Proteomics* 9, 3752–64. doi:10.1002/pmic.200800848
- Ford, E.S., Ajani, U.A., McGuire, L.C., Liu, S., 2005. Concentrations of serum vitamin D and the metabolic syndrome among U.S. adults. *Diabetes Care* 28, 1228–30.
- Fujita, H., Sugimoto, K., Inatomi, S., Maeda, T., Osanai, M., Uchiyama, Y., Yamamoto, Y., Wada, T., Kojima, T., Yokozaki, H., Yamashita, T., Kato, S., Sawada, N., Chiba, H., 2008. Tight Junction Proteins Claudin-2 and -12 Are Critical for Vitamin D-dependent Ca²⁺ Absorption between Enterocytes. *Mol. Biol. Cell* 19, 1912–1921. doi:10.1091/mbc.E07
- Gardel, M.L., Schneider, I.C., Aratyn-Schaus, Y., Waterman, C.M., 2010. Mechanical Integration of Actin and Adhesion Dynamics in Cell Migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 315–333. doi:10.1146/annurev.cellbio.011209.122036
- Garg, M., Kalra, S., Mahalle, N., 2013. The intestinal calcistat: Determinant of clinical vitamin D deficiency. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 17, 780–3. doi:10.4103/2230-8210.117187
- Garg, M.K., Mahalle, N., 2013. Calcium homeostasis, and clinical or subclinical vitamin D deficiency--can a hypothesis of “intestinal calcistat” explain it all? *Med. Hypotheses* 81, 253–8. doi:10.1016/j.mehy.2013.04.035
- Givant-Horwitz, V., Davidson, B., Reich, R., 2004. Laminin-Induced signaling in tumor cells: The role of the Mr 67,000 laminin receptor. *CANCER Res.* 64, 3572–3579.
- Gorrini, C., Harris, I.S., Mak, T.W., 2013. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 931–47. doi:10.1038/nrd4002
- Gradinaru, D., Borsa, C., Ionescu, C., Margina, D., Prada, G.I., Jansen, E., 2012. Vitamin D status and oxidative stress markers in the elderly with impaired fasting glucose and type 2 diabetes mellitus. *Aging Clin. Exp. Res.* 24, 595–602. doi:10.3275/8591
- Gronowicz, G., 1986. The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the cytoskeleton of rat calvaria and rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) osteoblastic cells. *J Bone Min. Res.* 441–455.
- Günzel, D., Yu, A.S.L., 2013. Claudins and the modulation of tight junction permeability., *Physiological reviews.* doi:10.1152/physrev.00019.2012
- Guo, J., Song, L., Liu, M., Mahon, M.J., 2012. Fluorescent ligand-directed co-localization of the parathyroid hormone 1 receptor with the brush-border scaffold complex of the proximal tubule reveals hormone-dependent changes in ezrin immunoreactivity consistent with inactivation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1823, 2243–2253. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.09.010

- Hagenau, T., Vest, R., Gissel, T.N., Poulsen, C.S., Erlandsen, M., Mosekilde, L., Vestergaard, P., 2009. Global vitamin D levels in relation to age, gender, skin pigmentation and latitude: An ecologic meta-regression analysis. *Osteoporos. Int.* 20, 133–140. doi:10.1007/s00198-008-0626-y
- Hara, A., Radin, N., 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* 90, 420–6.
- Hatano, R., Fujii, E., Segawa, H., Mukaisho, K., Matsubara, M., Miyamoto, K.-I., Hattori, T., Sugihara, H., Asano, S., 2013. Ezrin, a membrane cytoskeletal cross-linker, is essential for the regulation of phosphate and calcium homeostasis. *Kidney Int.* 83, 41–9. doi:10.1038/ki.2012.308
- Haussler, M.R., Haussler, C. a., Jurutka, P.W., Thompson, P.D., Hsieh, J.C., Remus, L.S., Selznick, S.H., Whitfield, G.K., 1997. The vitamin D hormone and its nuclear receptor: Molecular actions and disease states. *J. Endocrinol.* 154, S57-73. doi:10.1677/joe.0.154S057
- Haussler, M.R., Whitfield, G.K., Kaneko, I., Haussler, C.A., Hsieh, D., Hsieh, J.-C., Jurutka, P.W., 2013. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcif. Tissue Int.* 92, 77–98. doi:10.1007/s00223-012-9619-0
- Hayes, C.E., Hubler, S.L., Moore, J.R., Barta, L.E., Praska, C.E., Nashold, F.E., 2015. Vitamin D Actions on CD4+ T Cells in Autoimmune Disease. *Front. Immunol.* 6, 1–22. doi:10.3389/fimmu.2015.00100
- Hetz, C., 2012. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 89–102. doi:10.1038/nrm3270
- Hewison, M., Burke, F., Evans, K.N., Lammas, D.A., Sansom, D.M., Liu, P., Modlin, R.L., Adams, J.S., 2007. Extra-renal 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in human health and disease. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 103, 316–21. doi:10.1016/j.jsbmb.2006.12.078
- Hintzpeter, B., Mensink, G.B.M., Thierfelder, W., Müller, M.J., Scheidt-Nave, C., 2008. Vitamin D status and health correlates among German adults. *Eur. J. Clin. Nutr.* 62, 1079–89. doi:10.1038/sj.ejcn.1602825
- Höfer, D., Jöns, T., Kraemer, J., Drenckhahn, D., 1998. From cytoskeleton to polarity and chemoreception in the gut epithelium. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 859, 75–84. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb11112.x
- Holick, M.F., 2008. The vitamin D deficiency pandemic and consequences for nonskeletal health: mechanisms of action. *Mol. Aspects Med.* 29, 361–8. doi:10.1016/j.mam.2008.08.008
- Holick, M.F., 2007. Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* 357, 266–81. doi:10.1056/NEJMra070553
- Holick, M.F., 2004. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 362–71.

- Hosseini-nezhad, A., Spira, A., Holick, M.F., 2013. Influence of vitamin D status and vitamin D3 supplementation on genome wide expression of white blood cells: a randomized double-blind clinical trial. *PLoS One* 8, e58725. doi:10.1371/journal.pone.0058725
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., Nabeshima, Y., 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 313–22.
- Jäger, R., Bertrand, M.J.M., Gorman, A.M., Vandenabeele, P., Samali, A., 2012. The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress. *Biol. Cell* 104, 259–70. doi:10.1111/boc.201100055
- Jeon, M.K., Klaus, C., Kaemmerer, E., Gassler, N., 2013. Intestinal barrier: Molecular pathways and modifiers. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 4, 94–9. doi:10.4291/wjgp.v4.i4.94
- Jongwattanapisan, P., Suntornsaratoon, P., Wongdee, K., Dorkkam, N., Krishnamra, N., Charoenphanthdu, N., 2012. Impaired body calcium metabolism with low bone density and compensatory colonic calcium absorption in cecectomized rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302, E852-63. doi:10.1152/ajpendo.00503.2011
- Jorde, R., Sneve, M., Torjesen, P., Figenschau, Y., 2010. No improvement in cardiovascular risk factors in overweight and obese subjects after supplementation with vitamin D3 for 1 year. *J. Intern. Med.* 267, 462–72. doi:10.1111/j.1365-2796.2009.02181.x
- Kaneko, K., Hachiya, N., 2006. The alternative role of 14-3-3 zeta as a sweeper of misfolded proteins in disease conditions. *Med Hypotheses* 67, 169–97. doi:10.1016/j.mehy.2006.01.019
- Karhapää, P., Pihlajamäki, J., Pörsti, I., Kastarinen, M., Mustonen, J., Niemelä, O., Kuusisto, J., 2010. Diverse associations of 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxy-vitamin D with dyslipidaemias. *J. Intern. Med.* 268, 604–10. doi:10.1111/j.1365-2796.2010.02279.x
- Kaser, A., Adolph, T.E., Blumberg, R.S., 2013. The unfolded protein response and gastrointestinal disease. *Semin. Immunopathol.* 35, 307–19. doi:10.1007/s00281-013-0377-5
- Kelsey, L., Katoch, P., Ray, A., Mitra, S., Chakraborty, S., Lin, M.-F., Mehta, P.P., 2014. Vitamin D3 regulates the formation and degradation of gap junctions in androgen-responsive human prostate cancer cells. *PLoS One* 9, e106437. doi:10.1371/journal.pone.0106437
- Khalfaoui, T., Groulx, J.-F., Sabra, G., Guezguez, A., Basora, N., Vermette, P., Beaulieu, J.-F., 2013. Laminin receptor 37/67LR regulates adhesion and proliferation of normal human intestinal epithelial cells. *PLoS One* 8, e74337. doi:10.1371/journal.pone.0074337
- Kim, H., Bhattacharya, A., Qi, L., 2015. Endoplasmic reticulum quality control in cancer: friend or foe. *Semin Cancer Biol* 33, 25–33.

- Kong, J., Zhang, Z., Musch, M.W., Ning, G., Sun, J., Hart, J., Bissonnette, M., Li, Y.C., 2008. Novel role of the vitamin D receptor in maintaining the integrity of the intestinal mucosal barrier. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294, G208-16. doi:10.1152/ajpgi.00398.2007
- Koonen, D.P.Y., Jacobs, L., Febbraio, M., Young, M.E., Soltys, C.M., 2007. Increased Hepatic CD36 Expression Contributes to Dyslipidemia Associated With Diet-Induced Obesity 56. doi:10.2337/db07-0907.ALT
- Krug, S.M., Schulzke, J.D., Fromm, M., 2014. Tight junction , selective permeability , and related diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 36, 166–176. doi:10.1016/j.semcdb.2014.09.002
- Lang, P., Aspinal, R., 2015. Can We Translate Vitamin D Immunomodulating Effect on Innate and Adaptive Immunity to Vaccine Response? *Nutrients* 7, 2044–2060. doi:10.3390/nu7032044
- Laragione, T., Shah, A., Gulko, P.S., 2012. The vitamin D receptor regulates rheumatoid arthritis synovial fibroblast invasion and morphology. *Mol. Med.* 18, 194–200. doi:10.2119/molmed.2011.00410
- Lees, J.G., Bach, C.T.T., Neill, G.M.O., 2011. Interior decoration tropomyosin in actin dynamics and cell migration. *Cell Adh. Migr.* 5, 181–186. doi:10.4161/cam.5.2.
- Lehmann, U., Riedel, A., Hirche, F., Brandsch, C., Girndt, M., Ulrich, C., Seibert, E., Henning, C., Glomb, M.A., Dierkes, J., Stangl, G.I., 2015. Vitamin D3 supplementation: Response and predictors of vitamin D3 metabolites - A randomized controlled trial. *Clin. Nutr.* doi:10.1016/j.clnu.2015.04.021
- Lennicke, C., Rahn, J., Lichtenfels, R., Wessjohann, L.A., Seliger, B., 2015. Hydrogen peroxide - production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Commun. Signal.* 13, 39. doi:10.1186/s12964-015-0118-6
- Li, J., Ni, M., Lee, B., Barron, E., Hinton, D.R., Lee, A.S., 2008. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell Death Differ.* 15, 1460–71. doi:10.1038/cdd.2008.81
- Li, X., Jiang, H., Huang, Y., Gong, Q., Wang, J., Ling, J., 2015. Expression and function of the actin-severing protein adseverin in the proliferation, migration, and differentiation of dental pulp cells. *J. Endod.* 41, 493–500. doi:10.1016/j.joen.2014.11.030
- Li, Y.C., Amling, M., Pirro, A.E., Priemel, M., Meuse, J., Baron, R., Delling, G., Demay, M.B., 1998. Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice. *Endocrinology* 139, 4391–4396. doi:10.1210/endo.139.10.6262
- Li, Y.C., Pirro, a E., Amling, M., Delling, G., Baron, R., Bronson, R., Demay, M.B., 1997. Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 9831–5.
- Li, Y.C., Qiao, G., Uskokovic, M., Xiang, W., Zheng, W., Kong, J., 2004. Vitamin D: A

- negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 89–90, 387–392. doi:10.1016/j.jsbmb.2004.03.004
- Lomri A, M.P., 1990. Changes in cytoskeletal proteins in response to parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D in human osteoblastic cells. *Bone Miner.* 1–12.
- Martins, D., Wolf, M., Pan, D., Zadshir, A., Tareen, N., Thadhani, R., Felsenfeld, A., Levine, B., Mehrotra, R., Norris, K., 2007. Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in the United States: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch. Intern. Med.* 167, 1159–65. doi:10.1001/archinte.167.11.1159
- Max, D., Brandsch, C., Schumann, S., Kühne, H., Frommhagen, M., Schutkowski, A., Hirche, F., Staeger, M.S., Stangl, G.I., 2014. Maternal vitamin D deficiency causes smaller muscle fibers and altered transcript levels of genes involved in protein degradation, myogenesis, and cytoskeleton organization in the newborn rat. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 343–52. doi:10.1002/mnfr.201300360
- Mehta, S., Nijhuis, A., Kumagai, T., Lindsay, J., Silver, A., 2015. Defects in the adherens junction complex (E-cadherin/ β -catenin) in inflammatory bowel disease. *Cell Tissue Res.* 360, 749–60. doi:10.1007/s00441-014-1994-6
- Meyer, H., Weihl, C.C., 2014. The VCP/p97 system at a glance: connecting cellular function to disease pathogenesis. *J. Cell Sci.* 127, 3877–3883. doi:10.1242/jcs.093831
- Morelli, A., Vignozzi, L., Filippi, S., Vannelli, G.B., Ambrosini, S., Mancina, R., Crescioli, C., Donati, S., Fibbi, B., Colli, E., Adorini, L., Maggi, M., 2007. BXL- 628 , AVitamin D Receptor Agonist Effective in Benign Prostatic HyperplasiaT treatment , Prevents RhoA Activation and Inhibits RhoA / Rho Kinase Signaling in Rat and Human Bladder 247, 234–247. doi:10.1002/pros
- Moy, F.-M., Bulgiba, A., 2011. High prevalence of vitamin D insufficiency and its association with obesity and metabolic syndrome among Malay adults in Kuala Lumpur, Malaysia. *BMC Public Health* 11, 735. doi:10.1186/1471-2458-11-735
- Mozos, I., Marginean, O., 2015. Links between Vitamin D Deficiency and Cardiovascular Diseases. *Biomed Res. Int.* 2015, 109275. doi:10.1155/2015/109275
- Murphy, N., Bonner, H.P., Ward, M.W., Murphy, B.M., Prehn, J.H.M., Henshall, D.C., 2008. Depletion of 14-3-3 zeta elicits endoplasmic reticulum stress and cell death, and increases vulnerability to kainate-induced injury in mouse hippocampal cultures. *J. Neurochem.* 106, 978–88. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05447.x
- Nashiki, K., Taketani, Y., Takeichi, T., Sawada, N., Yamamoto, H., Ichikawa, M., Arai, H., Miyamoto, K.-I., Takeda, E., 2005. Role of membrane microdomains in PTH-mediated down-regulation of NaPi-IIa in opossum kidney cells. *Kidney Int.* 68, 1137–47. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00505.x
- Nassir, F., Adewole, O.L., Brunt, E.M., Abumrad, N.A., 2013. CD36 deletion reduces VLDL secretion, modulates liver prostaglandins, and exacerbates hepatic steatosis in ob/ob mice. *J. Lipid Res.* 54, 2988–97. doi:10.1194/jlr.M037812

- Nassir, F., Wilson, B., Han, X., Gross, R.W., Abumrad, N. a., 2007. CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. *J. Biol. Chem.* 282, 19493–19501. doi:10.1074/jbc.M703330200
- Nemere, I., Larsson, D., 2002. Does PTH have a direct effect on intestine? *J. Cell. Biochem.* 86, 29–34. doi:10.1002/jcb.10199
- Nemere, I., Norman, A.W., 1986. Parathyroid hormone stimulates calcium transport in perfused duodena from normal chicks: comparison with the rapid (transcaltachic) effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* 119, 1406–8. doi:10.1210/endo-119-3-1406
- Nemere, I., Ray, R., McManus, W., 2000. Immunochemical studies on the putative plasmalemmal receptor for 1, 25(OH)(2)D(3). I. Chick intestine. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278, E1104-14.
- Nemere, I., Szego, C.M., 1981. Early actions of parathyroid hormone and 1,25-dihydroxycholecalciferol in isolated epithelial cells from rat intestine: I. Limited lysosomal enzyme release and calcium uptake. *Endocrinology* 108, 1450–1462.
- Niederreiter, L., Kaser, A., 2011. Endoplasmic reticulum stress and inflammatory bowel disease. *Acta Gastroenterol. Belg.* 74, 330–3.
- O’Kelly, I., Butler, M., Zilberberg, N., Goldstein, S., 2002. Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* 111, 577–88.
- Omar, A., Reusch, U., Knackmuss, S., Little, M., Weiss, S.F.T., 2012. Anti-LRP/LR-specific antibody IgG1-iS18 significantly reduces adhesion and invasion of metastatic lung, cervix, colon and prostate cancer cells. *J. Mol. Biol.* 419, 102–9. doi:10.1016/j.jmb.2012.02.035
- Ooi, J.H., Chen, J., Cantorna, M.T., 2012. Vitamin D regulation of immune function in the gut: why do T cells have vitamin D receptors? *Mol. Aspects Med.* 33, 77–82. doi:10.1016/j.mam.2011.10.014
- Pacifico, L., Anania, C., Osborn, J.F., Ferraro, F., Bonci, E., Olivero, E., Chiesa, C., 2011. Low 25(OH)D₃ levels are associated with total adiposity, metabolic syndrome, and hypertension in Caucasian children and adolescents. *Eur. J. Endocrinol.* 165, 603–11. doi:10.1530/EJE-11-0545
- Palmer, H.G., 2001. Vitamin D₃ promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J. Cell Biol.* 154, 369–388. doi:10.1083/jcb.200102028
- Pendás-Franco, N., Aguilera, O., Pereira, F., González-Sancho, J.M., Muñoz, A.,. Vitamin D and Wnt/beta-catenin pathway in colon cancer: role and regulation of DICKKOPF genes. *Anticancer Res.* 28, 2613–23.
- Pendás-Franco, N., González-Sancho, J.M., Suárez, Y., Aguilera, O., Steinmeyer, A., Gamallo, C., Berciano, M.T., Lafarga, M., Muñoz, A., 2007. Vitamin D regulates the

- phenotype of human breast cancer cells. *Differentiation*. 75, 193–207. doi:10.1111/j.1432-0436.2006.00131.x
- Pereira-Santos, M., Costa, P.R.F., Assis, A.M.O., Santos, C.A.S.T., Santos, D.B., 2015. Obesity and vitamin D deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Obes. Rev.* 16, 341–9. doi:10.1111/obr.12239
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Pickering, A.M., Davies, K.J.A., 2012. Differential roles of proteasome and immunoproteasome regulators Pa28 $\alpha\beta$, Pa28 γ and Pa200 in the degradation of oxidized proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 523, 181–90. doi:10.1016/j.abb.2012.04.018
- Pilz, S., Kienreich, K., Rutters, F., de Jongh, R., van Ballegooijen, A.J., Grübler, M., Tomaschitz, A., Dekker, J.M., 2013. Role of vitamin D in the development of insulin resistance and type 2 diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 13, 261–70. doi:10.1007/s11892-012-0358-4
- Plain, A., Wulfmeyer, V.C., Milatz, S., Kliez, A., Hou, J., Bleich, M., Himmerkus, N., 2016. Corticomedullary difference in the effects of dietary Ca(2+) on tight junction properties in thick ascending limbs of Henle's loop. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 468, 293–303. doi:10.1007/s00424-015-1748-7
- Poirier, P., Giles, T.D., Bray, G.A., Hong, Y., Stern, J.S., Pi-Sunyer, F.X., Eckel, R.H., 2006. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical. *Circulation* 113, 898–918. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.171016
- Pollard, T.D., Cooper, J. a, 2009. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326, 1208–1212. doi:10.1126/science.1175862
- Poon, S.L., Klausen, C., Hammond, G.L., Leung, P.C.K., 2011. 37-kDa laminin receptor precursor mediates GnRH-II-induced MMP-2 expression and invasiveness in ovarian cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 25, 327–38. doi:10.1210/me.2010-0334
- Prosser, D.E., Jones, G., 2004. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem. Sci.* 29, 664–73. doi:10.1016/j.tibs.2004.10.005
- Ramagopalan, S. V, Heger, A., Berlanga, A.J., Maugeri, N.J., Lincoln, M.R., Burrell, A., Handunnetthi, L., Handel, A.E., Disanto, G., Orton, S.-M., Watson, C.T., Morahan, J.M., Giovannoni, G., Ponting, C.P., Ebers, G.C., Knight, J.C., 2010. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. *Genome Res.* 20, 1352–60. doi:10.1101/gr.107920.110
- Reboul, E., Goncalves, A., Comera, C., Bott, R., Nowicki, M., Landrier, J.-F., Jourdeuil-Rahmani, D., Dufour, C., Collet, X., Borel, P., 2011. Vitamin D intestinal absorption is not a simple passive diffusion: evidences for involvement of cholesterol transporters. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 691–702. doi:10.1002/mnfr.201000553

- Reeves, P.G., Nielsen, F.H., Fahey, G.C., 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 123, 1939–51.
- Rejnmark, L., Vestergaard, P., Heickendorff, L., Mosekilde, L., 2010. Simvastatin does not affect vitamin d status, but low vitamin d levels are associated with dyslipidemia: results from a randomised, controlled trial. *Int. J. Endocrinol.* 2010, 957174. doi:10.1155/2010/957174
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208–212.
- Riganti, C., Gazzano, E., Polimeni, M., Aldieri, E., Ghigo, D., 2012. The pentose phosphate pathway: an antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 421–36. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.006
- Runkle, E.A., Mu, D., 2013. Tight junction proteins: from barrier to tumorigenesis. *Cancer Lett.* 337, 41–8. doi:10.1016/j.canlet.2013.05.038
- Saeki, M., Kurose, K., Tohkin, M., Hasegawa, R., 2008. Identification of the functional vitamin D response elements in the human MDR1 gene. *Biochem. Pharmacol.* 76, 531–542. doi:10.1016/j.bcp.2008.05.030
- Saotome, I., Curto, M., McClatchey, A.I., 2004. Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine. *Dev. Cell* 6, 855–64. doi:10.1016/j.devcel.2004.05.007
- Schnabl, B., Brenner, D. a., 2014. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. *Gastroenterology* 146, 1513–1524. doi:10.1053/j.gastro.2014.01.020
- Schneeberger, E.E., Lynch, R.D., 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286, C1213–28. doi:10.1152/ajpcell.00558.2003
- Seibert, E., Lehmann, U., Riedel, A., Ulrich, C., Hirche, F., Brandsch, C., Dierkes, J., Girndt, M., Stangl, G.I., 2015. Vitamin D3 supplementation does not modify cardiovascular risk profile of adults with inadequate vitamin D status. *Eur. J. Nutr.* doi:10.1007/s00394-015-1106-8
- Selleri, C., Ragno, P., Ricci, P., Visconte, V., Scarpato, N., Carriero, M.V., Rotoli, B., Rossi, G., Montuori, N., 2006. The metastasis-associated 67-kDa laminin receptor is involved in G-CSF-induced hematopoietic stem cell mobilization. *Blood* 108, 2476–84. doi:10.1182/blood-2005-11-012625
- Shen, L., 2012. Tight junctions on the move: molecular mechanisms for epithelial barrier regulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1258, 9–18. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06613.x
- Shin, K., Fogg, V.C., Margolis, B., 2006. Tight junctions and cell polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 207–35. doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104219
- Silacci, P., Mazzolai, L., Gauci, C., Stergiopoulos, N., Yin, H.L., Hayoz, D., 2004. Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 2614–

23. doi:10.1007/s00018-004-4225-6

Silverstein, R.L., Li, W., Park, Y.M., Rahaman, S.O., 2010. Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: implications in atherosclerosis and thrombosis. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 121, 206–20.

Sinha, A., Cheetham, T.D., Pearce, S.H.S., 2013. Prevention and treatment of vitamin D deficiency. *Calcif. Tissue Int.* 92, 207–215. doi:10.1007/s00223-012-9663-9

Spurr, A., 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26, 31–43. doi:10.1016/S0022-5320(69)90033-1

Szeto, F.L., Reardon, C. a, Yoon, D., Wang, Y., Wong, K.E., Chen, Y., Kong, J., Liu, S.Q., Thadhani, R., Getz, G.S., Li, Y.C., 2012. Vitamin D receptor signaling inhibits atherosclerosis in mice. *Mol. Endocrinol.* 26, 1091–101. doi:10.1210/me.2011-1329

Teichert, A., Elalieh, H., Bikle, D., 2010. Disruption of the hedgehog signaling pathway contributes to the hair follicle cycling deficiency in Vdr knockout mice. *J. Cell. Physiol.* 225, 482–9. doi:10.1002/jcp.22227

Toka, H.R., 2014. New functional aspects of the extracellular calcium-sensing receptor. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 23, 352–60. doi:10.1097/01.mnh.0000447016.21228.e0

Topilski, I., Flaishon, L., Naveh, Y., Harmelin, A., Levo, Y., Shachar, I., 2004. The anti-inflammatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on Th2 cells in vivo are due in part to the control of integrin-mediated T lymphocyte homing. *Eur. J. Immunol.* 34, 1068–76. doi:10.1002/eji.200324532

Trinidad, T.P., Wolever, T.M., Thompson, L.U., 1999. Effects of calcium concentration, acetate, and propionate on calcium absorption in the human distal colon. *Nutrition* 15, 529–33.

Tukaj C, Bohdanowicz J, K.-J.J., 2004. The growth and differentiation of aortal smooth muscle cells after calcitriol treatment are associated with microtubule reorganisation -- an in vitro study. *Folia Morphol (Warsz)* 51–7.

Van Etten, E., Mathieu, C., 2005. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: Basic concepts. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 97, 93–101. doi:10.1016/j.jsbmb.2005.06.002

Van Itallie, C.M., Anderson, J.M., 2014. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin. Cell Dev. Biol.* 1–9. doi:10.1016/j.semcdb.2014.08.011

van Roy, F., Berx, G., 2008. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3756–88. doi:10.1007/s00018-008-8281-1

Vicente-Manzanares, M., Webb, D.J., Horwitz, A.R., 2005. Cell migration at a glance. *J. Cell Sci.* 118, 4917–9. doi:10.1242/jcs.02662

Vilardaga, J.P., Gardella, T.J., Wehbi, V.L., Feinstein, T.N., 2012. Non-canonical signaling of the PTH receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 423–431. doi:10.1016/j.tips.2012.05.004

- Viswanatha, R., Bretscher, A., Garbett, D., 2014. Dynamics of ezrin and EBP50 in regulating microvilli on the apical aspect of epithelial cells. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 189–94. doi:10.1042/BST20130263
- Wang, M., Wey, S., Zhang, Y., Ye, R., Lee, A.S., 2009. Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2307–16. doi:10.1089/ars.2009.2485
- Wang, Y., Zhu, J., DeLuca, H.F., 2012a. Where is the vitamin D receptor? *Arch. Biochem. Biophys.* 523, 123–33. doi:10.1016/j.abb.2012.04.001
- Wilson, C.G., Tran, J.L., Erion, D.M., Vera, N.B., Febbraio, M., Weiss, E.J., 2016. Hepatocyte-Specific Disruption of CD36 Attenuates Fatty Liver and Improves Insulin Sensitivity in HFD-Fed Mice. *Endocrinology* 157, 570–85. doi:10.1210/en.2015-1866
- Windoffer, R., Beil, M., Magin, T.M., Leube, R.E., 2011. Cytoskeleton in motion: the dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia. *J. Cell Biol.* 194, 669–78. doi:10.1083/jcb.201008095
- Wöbke, T.K., Sorg, B.L., Steinhilber, D., 2014. Vitamin D in inflammatory diseases. *Front. Physiol.* 5, 244. doi:10.3389/fphys.2014.00244
- Wolden-Kirk, H., Overbergh, L., Christesen, H.T., Brusgaard, K., Mathieu, C., 2011. Vitamin D and diabetes: Its importance for beta cell and immune function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 347, 106–120. doi:10.1016/j.mce.2011.08.016
- Wolden-Kirk, H., Overbergh, L., Gysemans, C., Brusgaard, K., Naamane, N., Van Lommel, L., Schuit, F., Eizirik, D.L., Christesen, H., Mathieu, C., 2013. Unraveling the effects of 1,25OH₂D₃ on global gene expression in pancreatic islets. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 136, 68–79. doi:10.1016/j.jsbmb.2012.10.017
- Wong, K.E., Szeto, F.L., Zhang, W., Ye, H., Kong, J., Zhang, Z., Sun, X.J., Li, Y.C., 2009. Involvement of the vitamin D receptor in energy metabolism: regulation of uncoupling proteins. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E820-8. doi:10.1152/ajpendo.90763.2008
- Wortsman, J., Matsuoka, L.Y., Chen, T.C., Lu, Z., Holick, M.F., 2000. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 690–3.
- Yin, K., Agrawal, D.K., 2014. Vitamin D and inflammatory diseases. *J. Inflamm. Res.* 7, 69–87. doi:10.2147/JIR.S63898
- Zhang, Y., Wu, S., Lu, R., Zhou, D., Zhou, J., Carmeliet, G., Petrof, E., Claud, E.C., Sun, J., 2015. Tight junction CLDN2 gene is a direct target of the vitamin D receptor. *Sci. Rep.* 5, 10642. doi:10.1038/srep10642
- Zhao, H., Zhang, H., Wu, H., Li, H., Liu, L., Guo, J., Li, C., Shih, D.Q., Zhang, X., 2012. Protective role of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ in the mucosal injury and epithelial barrier disruption in DSS-induced acute colitis in mice. *BMC Gastroenterol.* 12, 57. doi:10.1186/1471-230X-12-57

- Zhong, W., Gu, B., Gu, Y., Groome, L.J., Sun, J., Wang, Y., 2014. Activation of vitamin D receptor promotes VEGF and CuZn-SOD expression in endothelial cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 140, 56–62. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.11.017
- Zhu, J.G., Ochalek, J.T., Kaufmann, M., Jones, G., Deluca, H.F., 2013. CYP2R1 is a major, but not exclusive, contributor to 25-hydroxyvitamin D production in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 15650–15655. doi:10.1073/pnas.1315006110
- Zittermann, A., 2010. The estimated benefits of vitamin D for Germany. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 1164–71. doi:10.1002/mnfr.200900494
- Zittermann, A., Frisch, S., Berthold, H.K., Go, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Stehle, P., 2009. Vitamin D supplementation enhances the beneficial effects of weight loss on cardiovascular disease risk markers 1 – 4 2006, 1321–1327. doi:10.3945/ajcn.2008.27004.1

Lebenslauf

Name: Kühne
Vorname: Hagen
Geburtsdatum: 24.10.1983
Geburtsort: Frankfurt (Oder)
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1991/1995 Grundschule, Frankfurt (Oder)
1996/2003 Friedrichsgymnasium, Frankfurt (Oder)
Abschluss: Abitur, 2003

Akademische Ausbildung: 2004/2010 Studium der Ernährungswissenschaften
am Institut für Ernährungswissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Abschluss: Diplom, 2009

*Thema der Diplomarbeit: „Untersuchung zur
Regulation des Maus- γ -BBD-Genes durch PPAR α
mit Hilfe eines dualen Luciferase-Reporter-
Assays“*

2010/2016 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Wissenschaftlicher Mitarbeiter (-2013)/
Promotionsstudium der Ernährungswissenschaften
am Institut für Ernährungswissenschaften

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema:

„Untersuchungen zur Bedeutung des
Vitamin D-Rezeptors für den Intestinaltrakt
am murinen Versuchsmodell“

selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn entnommen wurden, habe ich in jedem einzelnen Fall durch Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde von mir in gleicher oder ähnlicher Form an keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Es wurden bisher keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen.

Ort & Abgabedatum

Hagen Kühne

Danksagung

Mein Dank ist an all jene Kollegen, Familienmitglieder und Freunde gerichtet, die mich über die letzten Jahren bei der Entstehung dieser Arbeit sowohl fachlich als auch menschlich unterstützt und mir beigestanden haben.

Im Besonderen möchte Ich mich bei Frau Prof. Dr. Gabriele I. Stangl bedanken, einerseits für die Überlassung dieses erfüllenden Themas sowie für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und andererseits für die Unterstützung bei der Anfertigung der Veröffentlichungen und der kritischen Auseinandersetzung mit meiner Dissertationsschrift.

Großer Dank gebührt Frau Dr. Corinna Brandsch für die zahlreichen praktischen Hilfestellungen, die konstruktiven Gespräche, für das Mantra des effizienten Arbeitens und natürlich für die vielen Albernheiten die sie zu ertragen bereit war.

Weiterhin möchte Ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Ernährungswissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfe bei der Probenentnahme und Probenaufarbeitung, danken.

Außerdem möchte Ich mich bei Frau Prof Dr. Christiana Cordes von der Hochschule Anhalt und Herrn Dr. Gerd Hausse von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die enge Zusammenarbeit bedanken.

Besonders danken möchte Ich auch Tobias Gräber und Claudia Lennicke für den täglich stattfindenden fachlichen Gedankenaustausch und für ihre Sicht der Dinge. Darüber hinaus danke ich Tobias, Claudia, Dr. Sandra Winkler und Dr. Nadine Schmidt für ihre Freundschaft.

Abschließend möchte Ich mich bei meinen Eltern für ihre (oft stark strapazierte) Geduld und ihre verständnisvolle Unterstützung bedanken.