

Aus dem Institut der Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Untersuchung von Sequenzalterationen des Vitamin-D-Rezeptor-Gens
im Hinblick auf Hypocalcämie und Gebärparese bei Milchkühen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Maria Agnes Reiche
Tierärztin aus Halle an der Saale

Berlin 2011
Journal-Nr.: 3491

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. H. Martens
Zweiter Gutachter: PD Dr. K. Borchers
Dritter Gutachter: Prof. Dr. K. Peters

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

dairy cows, parturient paresis, vitamin D, cholecalciferol, calcium, homeostasis,
hypocalcaemia, genetic variation, DNA sequencing

Tag der Promotion: 28.06.2011

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-007-2

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Die Hypocalcämie der Milchkuh	3
2.1.1	Regulation des Calcium-Haushalts bei der Kuh	7
2.2	Calcium-Homöostase	9
2.2.1	Calcium	9
2.2.2	Calcium-sensitiver Rezeptor (CaSR)	10
2.2.3	Parathormon (PTH)	11
2.2.4	Calcitonin	13
2.2.5	Calcitriol	13
2.3	Hypocalcämie-Management	18
2.3.1	Prävention	18
2.3.2	Therapie	21
2.3.3	Zucht	21
2.4	Ursachenforschung	23
2.5	Vitamin-D-Rezeptor (VDR)	27
2.5.1	Aufbau und Funktionsweise des VDR	27
2.5.2	Vorkommen	32
2.5.3	Zielproteine	33
2.5.4	Polymorphismen und Punktmutationen des VDR	34
2.6	Zusammenfassung und daraus resultierende Aufgabenstellung	37
3	Versuchstiere, Material und Methoden	39
3.1	Versuchstiere	39
3.1.1	Der Betrieb	39
3.1.2	Probennahme	39
3.2	Probenaufbereitung	41
3.2.1	DNA-Isolierung	41
3.2.2	Primeretablierung und PCR	41
3.2.3	Agarosegelelektrophorese	45
3.2.4	Sequenzierung	46
3.3	Statistik	49

3.3.1	Kontingenztafeln	49
3.3.2	<i>Fisher's exact probability-Test</i>	50
3.3.3	Freeman-Halton's Erweiterung des <i>Fisher's exact probability-Test</i>	51
3.3.4	Rechenbeispiel	51
4	Ergebnisse	53
4.1	Sequenzierung	53
4.2	Statistik	53
4.3	Fragment 1	55
4.4	Fragment 2	58
4.5	Fragment 7	61
4.6	Fragment 10	65
4.7	mRNA und Aminosäuresequenz des VDR	69
5	Diskussion	72
5.1	Gebärparese als ökonomisches Problem in der Milchviehhaltung	72
5.2	VDR-Gen-Polymorphismen als Ursache für Hypocalcämien bei der Milchkuh?	75
5.3	Möglichkeiten der Untersuchung auf Gen-Alterationen	77
5.3.1	Sequenzieren als Methode der Wahl	80
5.3.2	Lokalisation der sequenzierten Gen-Bereiche	80
5.3.3	Anzahl der Einzel-Basen-Alterationen und Vorliegen von SNPs	81
5.3.4	Berechnung einer möglichen Korrelation	81
5.3.5	Limitierende Faktoren	82
5.3.6	Genetische Kartierung der Rindergenoms	82
5.4	Gefundene Gen-Sequenz-Variationen	83
5.5	Schlussfolgerungen	84
6	Zusammenfassung	85
7	Summary	87
8	Literaturverzeichnis	89
9	Abbildungsverzeichnis	110
10	Tabellenverzeichnis	113
11	Formelverzeichnis	115
	Publikationsverzeichnis	116
	Danksagungen	117
	Selbstständigkeitserklärung	118

Abkürzungen und Definitionen

25(OH)D ₃	Calcidiol, 25-Hydroxycholecalciferol
1,25(OH) ₂ D ₃	Calcitriol, 1,25-Dihydroxycholecalciferol
24,25(OH) ₂ D ₃	24,25-Dihydroxycholecalciferol
24F-1,25(OH) ₂ D ₃	synthetisches Analogon von 1,25(OH) ₂ D ₃
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AF-2-Domäne	<i>ligand-dependent activation function domain</i> (engl.)
Aminosäuren	Carbonsäuren mit einer oder mehreren Aminogruppen, die die Primärstruktur von Proteinen bilden: Glycin, Alanin, Serin, Threonin, Valin, Leucin, Isoleucin, Asparaginsäure, Asparagin, Glutaminsäure, Glutamin, Arginin, Lysin, Cystein, Methionin, Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, Histidin, Prolin
Basen	Adenin (A), Thymin (T), Cytosin (C) und Guanin (G) sind Bestandteile der DNA. Ihre Reihenfolge bestimmt den genetischen Code der DNA
BCS	<i>body condition score</i> (engl.)
Ca	chemisches Symbol für Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
Calbindin	Calcium-bindendes Protein
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i> (engl.)
CaSR	Calcium-sensitiver Rezeptor
Cl ⁻	ionisierte Form von Chlorid
COOH	Carboxygruppe, funktionelle Gruppe der Carbonsäure
CYP	Enzyme der Cytochrom P450-Familie, Schlüsselenzyme des Vitamin-D-Metabolismus
d	<i>day</i> (engl.)
DBD	DNA-bindende Domäne
DBP	Vitamin-D-bindendes-Protein
DCAD	<i>dietary cation anion difference</i> (engl.), Verhältnis zwischen Kationen und Anionen einer Futter-Ration
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (engl.)
DRIP	<i>vitamin D receptor interaction protein</i> (engl.)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Chelatkomplexbildner mit Calcium
ERK	<i>extracellular response activated kinase</i> (engl.)
g	Gramm, 1x10 ⁻³ kg
g	Fallbeschleunigung, Einheit der relativen Zentrifugalkraft
h	<i>hour</i> (engl.)
hnRNPs	<i>heterogenous nuclear ribonucleoproteins</i> (engl.)
HVDRR	<i>hereditary vitamin D resistance rickets</i> (engl.)
HWZ	Halbwertszeit
IDBPs	<i>intracellular vitamin D binding proteins</i> (engl.)
IE	Internationale Einheiten
i.m.	<i>intra muscularis</i> (lat.), in den Muskel
in vitro	<i>im Glas</i> (lat.), Experiment in kontrollierter künstlicher Umgebung
i.v.	intravenös, in die Vene
K ⁺	ionisierte Form von Kalium
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm, 1x10 ³ g, SI-Basiseinheit der Masse
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
l	Liter, Volumeneinheit
MF	Milchfieber
mg	Milligramm, 1x10 ⁻³ g

Mio	Million
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i> (engl.)
m	Meter, SI-Basiseinheit der Strecke
mmol	Millimol, 1×10^{-3} mol
Mol	SI-Basiseinheit der Stoffmenge, entspricht $6,022 \times 10^{23}$ Teilchen
mRNA	<i>messenger RNA</i> (engl.)
mval	millival, val= Grammäquivalent
Na	chemisches Symbol für Natrium
Na ⁺	ionisierte Form von Natrium
NH ₂	Aminogruppe
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
Nm	Nanometer, 10^{-9} m
NXC	Natrium-Calcium-Austauscher
OD	optische Dichte, Extinktion
OPG	Osteoprotegerin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (engl.)
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (lat.), negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PGF2 α	Prostaglandin F2 α
PTH	Parathormon
PTH1Rez	Rezeptor 1 des Parathormons
PTHrP	<i>parathyroid hormone-related peptide</i> (engl.)
pmol	picomol, 10^{-12} mol
PMCA	<i>plasma membrane calcium ATPase</i> (engl.)
<i>pr\grave{a} partum</i>	(lat.) vor der Geburt
<i>post partum</i>	(lat.) nach der Geburt
RANK	<i>receptor activator of NF-κB</i> (engl.)
RANKL	<i>receptor activator of NF- κB ligand</i> (engl.)
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i> (engl.)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (engl.)
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
s.c.	<i>sub cutan</i> (lat.), unter die Haut
<i>second messenger</i>	(engl.) sekundärer Botenstoff
<i>solvent drag</i>	(engl.) Mitnahme eines gelösten Substrates durch Wasser als Lösungsmittel
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> (engl.)
SO ₄ ²⁻	ionisierte Form von Sulfat
Tab.	Tabelle
TAFs	<i>TBP associated factors</i> (engl.)
TATA-Box	regulatorische DNA-Sequenz in der Promotorregion eines Gens
TBP	<i>TATA-Box binding protein</i> (engl.)
TFIIB	<i>basal transcription factor IIB</i> (engl.)
<i>tight junctions</i>	(engl.) Schlussleiste, <i>Zonula occludens</i> (lat.)
TS	Trockensubstanz
TRPV5/6	<i>transient receptor potential cation channel subfamily V/ VI</i> (engl.)
UV Licht	Ultraviolettes Licht, Licht der Wellenlänge 1 - 380nm
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VDRE	<i>vitamin D response element</i> (engl.)
VDRE-BP	<i>VDRE-binding proteins</i> (engl.)
Vitamine	vom Körper nicht selbst synthetisierbare lebenswichtige organische Verbindungen, die mit der Nahrung zugeführt werden müssen
Wo	Wochen
X ² -Test	Chi-Quadrat-Test zur Berechnung von Korrelationen
Zn	chemisches Symbol für Zink

1 Einleitung

Durch die Rinderzucht der letzten Jahrzehnte wurde die Milchleistung der einzelnen Milchkuh in Deutschland beträchtlich gesteigert. So gibt eine Kuh heute durchschnittlich 8000 Liter Milch pro Jahr, fast doppelt so viel wie noch vor 50 Jahren. Doch die hohe Milchleistung hat eine kürzere Lebensdauer zur Folge, bedingt durch Krankheiten wie Fruchtbarkeitsstörungen, Euter- und Klauenentzündungen (Brade 2005).

Eine der wichtigsten Erkrankungen der modernen Milchkuh ist die peripartale Hypocalcämie. Aufgrund der hohen Einsatzleistung kann die Kuh die mit der einsetzenden Laktation plötzlich benötigten Calciummengen oft nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung stellen. Als Hauptrisikofaktor der klinisch manifesten Hypocalcämie (Gebärparese, Milchfieber) zählt das Herdenmanagement, also die Milchfieberprophylaxe und -therapie. Fallzahlen von 5 bis 80% sind in unterschiedlichen Herden beschrieben worden (DeGaris und Lean 2008). Die unterschiedliche Suszeptibilität (Anfälligkeit) innerhalb einer Herde kann damit aber nicht begründet werden. Verschiedene Gründe werden als Verursacher der Gebärparese diskutiert: hohe Calcium- oder Kationen-Gehalte im Futter, Überfütterung oder eine genetische Prädisposition.

Für die Regulation der Calcium-Homöostase im Körper sind drei körpereigene Botenstoffe verantwortlich: Parathormon, das Vitamin-D-Hormon Calcitriol und Calcitonin. Die Wirkung von Calcitriol wird über den Vitamin-D-Rezeptor (VDR) vermittelt. Der VDR ist in vielen Geweben ausgeprägt, wobei die wichtigsten Calcium-Homöostase-beeinflussenden Gewebe Magen-Darm-Trakt, Niere und Knochen sind. Dort vermittelt der VDR die zelluläre Antwort auf eine Stimulation mit Calcitriol, wie zum Beispiel die vermehrte Proteinbiosynthese von Calciumtransportern.

In der Humanmedizin sind Sequenzalterationen des VDR-Gens wiederholt mit krankheitsbedingenden Veränderungen der Calcium-Homöostase in Zusammenhang gebracht worden, unter anderem mit Fraktur-Häufigkeit und Osteoporose. Bezerra et al. konnten unterschiedliche Milchcalciumgehalte bei jungen brasilianischen Müttern mit definierten VDR-Gen-Sequenz-Variationen korrelieren (Bezerra *et al.* 2008).

Arbeitshypothese der vorliegenden Arbeit ist daher der Zusammenhang zwischen VDR-Gensequenz-Variationen und einer Anfälligkeit zur Entwicklung von Hypocalcämie bei Milchkühen. Dazu soll das VDR-Gen von Milchkühen mit und ohne vorangegangene Hypocalcämie sequenziert und eventuelle Gensequenz-Variationen mit der Krankengeschichte korreliert werden.

Bei Verifizierung der Arbeitshypothese ergeben sich züchterische Möglichkeiten, mittels einer in Deutschland bereits etablierten, genomischen Untersuchung, Tiere auf Suszeptibilität zur Gebärparese zu untersuchen und dieses bei der Zuchtauswahl zu berücksichtigen.

2 Literaturübersicht

Im folgenden Kapitel soll der derzeitige Wissensstand über Aufbau, Funktion und Vorkommen des Vitamin-D-Rezeptors und sein Einfluss auf die Calcium-Homöostase beschrieben werden. Einleitend wird die Hypocalcämie bei der Milchkuh vorgestellt und die Grundzusammenhänge von Vitamin-D-Haushalt, Calcium-Homöostase und deren Regulation werden erklärt. Im Anschluss wird das Management der Gebärparese dargestellt und eine Übersicht über die möglichen Ursachen gegeben. Im letzten Kapitel folgt die Vorstellung des Vitamin-D-Rezeptors als möglicher Faktor einer erhöhten Hypocalcämie-Suszeptibilität.

2.1 Die Hypocalcämie der Milchkuh

Die Hypocalcämie gehört zu den bedeutendsten peripartalen Erkrankungen des Mineralstoffwechsels der Milchkuh. Zum Zeitpunkt der einsetzenden Laktation kommt es zu einem sprunghaften Anstieg des Calciumbedarfs aufgrund einer erhöhten Abgabe in Kolostrum und Milch. Der Mehrbedarf an Calcium wird durch erhöhte Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt, Freisetzung aus dem Knochen und reduziertem renalen Verlust gesichert. Diese Adaptation der Regulationsmechanismen der Calcium-Homöostase erfolgt individuell unterschiedlich schnell und führt bei einer erheblichen Anzahl von Tieren zumindest vorübergehend zu Blut-Calcium-Werten unterhalb des physiologischen Schwellenwertes von 2,0¹mmol/l (Hypocalcämie). Tritt sie subklinisch auf, also ohne klinische Symptome, ist sie Wegbereiter einer Vielzahl von peripartalen Erkrankungen wie Mastitis, Labmagenverlagerung, Ketose oder Nachgeburtsverhaltung (Goff 2008).

Fällt die Calcium-Konzentration unter 1,4mmol/l kommt es zur Ausbildung klinischer Symptome wie erniedrigter Körpertemperatur, Ataxie, Tremor oder schlaffer Lähmung mit

¹ Die gegebenen Schwellenwerte für Blut-Calcium-Konzentrationen (2,0 und 1,4mmol/l) sind als Richtwerte zu verstehen und können beim einzelnen Tier abweichen.

Festliegen (DeGaris und Lean 2008). Bei der frisch laktierenden Milchkuh wird dieses Krankheitsbild Milchfieber oder Gebärparese genannt. Die Gebärparese und die mit Begleiterkrankungen vergesellschaftete subklinische Hypocalcämie führen zu Produktionsausfällen und Einbußen durch Tierarztkosten und hohe Remontierungsraten.

Klinik: Die klinische Manifestation der Hypocalcämie wird als Gebärparese bezeichnet und in drei Stadien eingeteilt (Tab. 1). Klinische Symptome treten typischerweise 1-2 Tage nach dem Abkalben auf.

Tab. 1: Einteilung der Gebärparese-Stadien anhand klinischer Symptome nach (Staufenbiel 2004)

Stadium	Klinische Symptome
1	Ataxie und Tremor
2a	Festliegen des Tieres in Brustlage bei ungestörtem Sensorium
2b	Festliegen des Tieres in Brustlage bei gestörtem Sensorium
3	Festliegen des Tieres in Seitenlage bei stark gestörtem Sensorium, Gebärkoma

Durch einen Mangel an Calcium wird die Kontraktilität des Muskels negativ beeinflusst (Goff 2006), es kommt zu einer schlaffen Lähmung. Untherapiert führt die Gebärparese infolge unzureichender Herzmuskelfunktion und eines Blutdruckabfalls zum Tod (Reinhardt *et al.* 1988). Tiere, die sich trotz erfolgter Therapie nicht erholen, werden als *downer cows* bezeichnet (Barlet und Davicco 1992). Die Prognose wird als schlecht eingeschätzt, wenn durch das Festliegen bedingte Schädigungen von Muskeln oder Nerven hinzukommen.

Pathogenese: Die Ursache der hypocalcämischen Gebärparese der Milchkuh ist die erhöhte Calcium-Abgabe zu Laktationsbeginn (Abb. 1). Die Gesamtmenge des extrazellulären Calcium-Pools beträgt ca. 8-10g, die im Blutplasma vorhandenen Calciumreserven (2,0 - 2,5mmol Ca/l) belaufen sich sogar nur auf ca. 3g (Horst *et al.* 1997; Goff 2008).

DeGaris *et al.* geben den Calcium-Verlust mit 30g/d während der Trächtigkeit (davon ca. 15g über Verdauungstrakt und Urin und ca. 15g für das fetale Wachstum) und 50g/d mit Einsetzen der Laktation an (DeGaris und Lean 2008). Horst und Goff geben hingegen den Calcium-Verlust mit 10-12g während der Trockenstehzeit und >30g mit der einsetzenden

Laktation an (Goff *et al.* 1991; Horst *et al.* 1997). Um die benötigten Calcium-Mengen zur Verfügung zu stellen, muss der extrazelluläre Calcium-Pool vier- bis fünf-mal pro Tag ersetzt werden. Dieser Calcium-Verlust wird nicht allein über eine erhöhte Resorption aus dem Darm und reduzierte renale Ausscheidung, sondern durch zusätzliche Calcium-Mobilisierung aus dem Knochen ersetzt. Die Milchkuh befindet sich dann wie die meisten Säugetiere in einer Laktationsosteoporose, sie verliert ca. 9-13% ihres Knochen-Calciums in den ersten vier Laktationswochen (Goff 2008).

Übersteigt der akute Calcium-Verlust die Mobilisierungsfähigkeit des Organismus, entwickelt sich eine Hypocalcämie mit subklinischem (1,4- 2,0mmol/l) oder klinischem Erscheinungsbild (<1,4mmol/l).

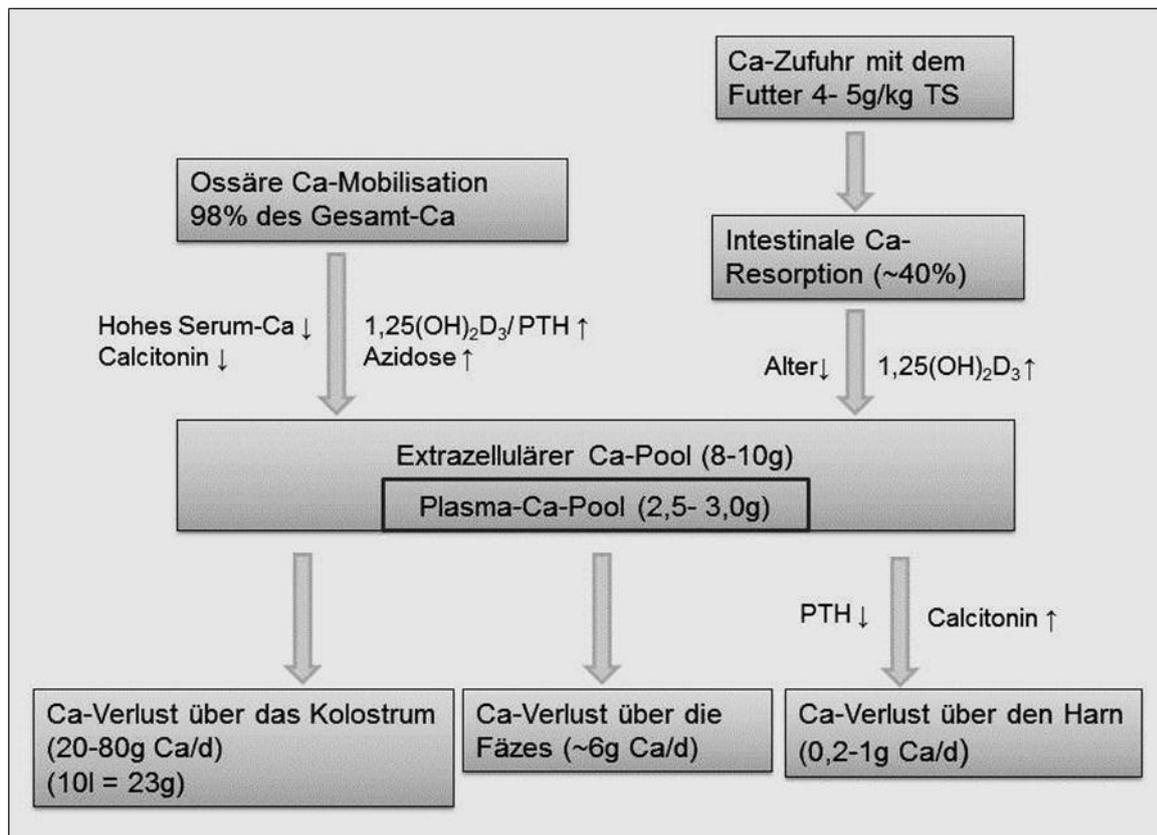


Abb. 1: Pathogenese der hypocalcämischen Gebärparese am Beispiel einer peripartalen Kuh mit ca. 500kg Lebendgewicht. Der Calcium-Verlust mit dem Kolostrum übersteigt die intestinale Calcium-Absorption und die ossäre Mobilisierungsfähigkeit. Modifiziert nach (Goff *et al.* 1991).

Mit Hypocalcämie assoziierte Erkrankungen:

Man geht davon aus, dass nur 5% aller hypocalcämischen Kühe tatsächlich festliegen, eine große Anzahl von Kühen aber unerkant unter subklinischen Hypocalcämien und damit assoziierten Erkrankungen leiden

(Abb. 2). In den USA hat man subklinische Erkrankungsraten von 25% bei Erstkalbinnen und bis zu 42% bei Kühen in der 6. Laktation gemessen (Reinhardt *et al.* 2010). Leicht erniedrigte Blut-Calcium-Werte führen zu reduziertem Fressverhalten, schwacher Pansen- und Darmaktivität, beeinträchtigter Produktivität (Goff 2008) und erhöhter Anfälligkeit für infektiöse Krankheiten durch Immunsuppression. Durch die herabgesetzte Motilität von Pansen und Labmagen (Daniel 1983) erhöht sich die Gefahr einer Labmagenverlagerung (Coppock 1974) und durch die Reduzierung der Futteraufnahme (Energiedefizit) wird vermehrt Körperfett freigesetzt, was wiederum die Gefahr der Lipidose mit anschließender Ketose erhöht. Durch die herabgesetzte Kontraktilität des Zitzenschließmuskels wird die Gefahr einer aufsteigenden Mastitis nach dem Melken erhöht (Goff 2008). Curtis *et al.* fanden einen hochgradig signifikanten Zusammenhang zwischen periparturienter Hypocalcämie und Festliegen, Nachgeburtsverhaltung, Ketose und Mastitis und einen signifikanten Zusammenhang zwischen Gebärparese und koliformer Mastitis (Curtis *et al.* 1983). Erb *et al.* stellten fest, dass Milchfieber das Auftreten von Reproduktionsstörungen um das 1,6- 2,4-fache steigert und indirekt zu schlechten Trächtigkeitsraten und erhöhten Merzungsraten beiträgt (Erb *et al.* 1985). Da Calcium außerdem eine Schlüsselrolle in der Immunzell-Aktivierung innehat, trägt Hypocalcämie durch erniedrigte Calciumgehalte in peripheren mononukleären Blutzellen zu einer periparturienten Immunsuppression bei (Kimura *et al.* 2006).

Auswirkung von Calciummangel

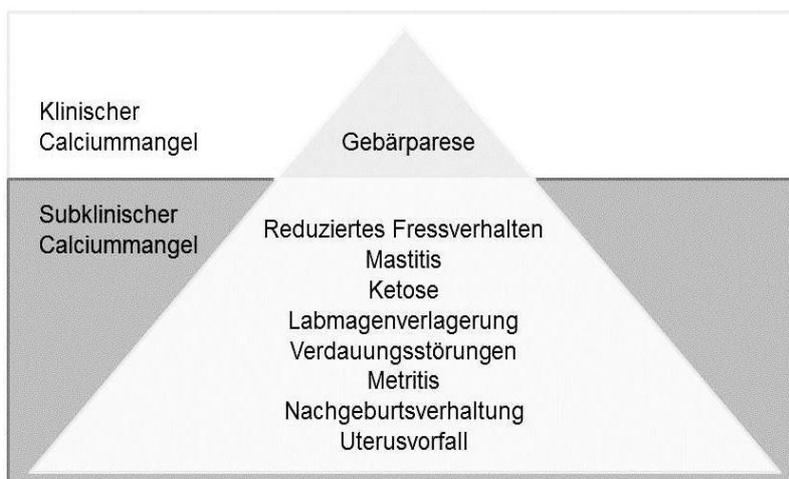


Abb. 2: Eisberg-Modell nach Staufenbiel modifiziert nach (Zieger 2001). Nur etwa 5% der Kühe mit peripartaler Hypocalcämie liegen fest. Die meisten Tiere erkranken subklinisch und leiden an begleitenden Erkrankungen, die durch den veränderten Calciumhaushalt, Innappetenz oder die damit einhergehende Immunsuppression begünstigt werden.

2.1.1 Regulation des Calcium-Haushalts bei der Kuh

Die Regulation des Calcium-Haushalts mithilfe von Vitamin D, beziehungsweise dem Vitamin-D-Hormon Calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), erfolgt bei der Kuh wie in Abb. 3 skizziert². In der Regel ist der passive Calcium-Transport für die Calciumversorgung einer nicht-laktierenden, tragenden Kuh ausreichend (Goff *et al.* 1991). Mit Einsetzen der Laktation und den damit verbundenen Calciumverlusten wird jedoch auch der aktive Calciumtransport benötigt.

Als Folge einer Hypocalcämie wird Parathormon (PTH) aus der Nebenschilddrüse freigesetzt. PTH regt in den Knochen eine erhöhte Calciummobilisation durch indirekte Stimulation der Osteoklasten an, steigert die renale Calcium-Reabsorption und stimuliert die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese in der Niere. Der durch PTH stimulierte Anstieg von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Blut erfolgt mit einer Verzögerung von etwa 10–12 Stunden (Blum *et al.* 1983), so dass die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -abhängigen Kompensationsmechanismen zum Anstieg des Calcium-Spiegels verzögert einsetzen.

Die Calcium-Zufuhr in der Früh-laktation ist vor allem durch Calcium-Absorption aus dem Darm gesichert (Ramberg *et al.* 1984), die Freisetzung von Calcium aus dem Knochen erfolgt erst zwei Wochen *post partum* (Horst *et al.* 1978).

Diese bekannte Kaskade der Regulationsschritte des Calcium-Haushalts der Kuh bietet jedoch keine befriedigende Erklärung für die große Variation beim Auftreten von Hypocalcämien.

² Eine ausführliche Beschreibung der Regulationsmechanismen der Calcium-Homöostase erfolgt im Kapitel 2.2 (Calcium-Homöostase).

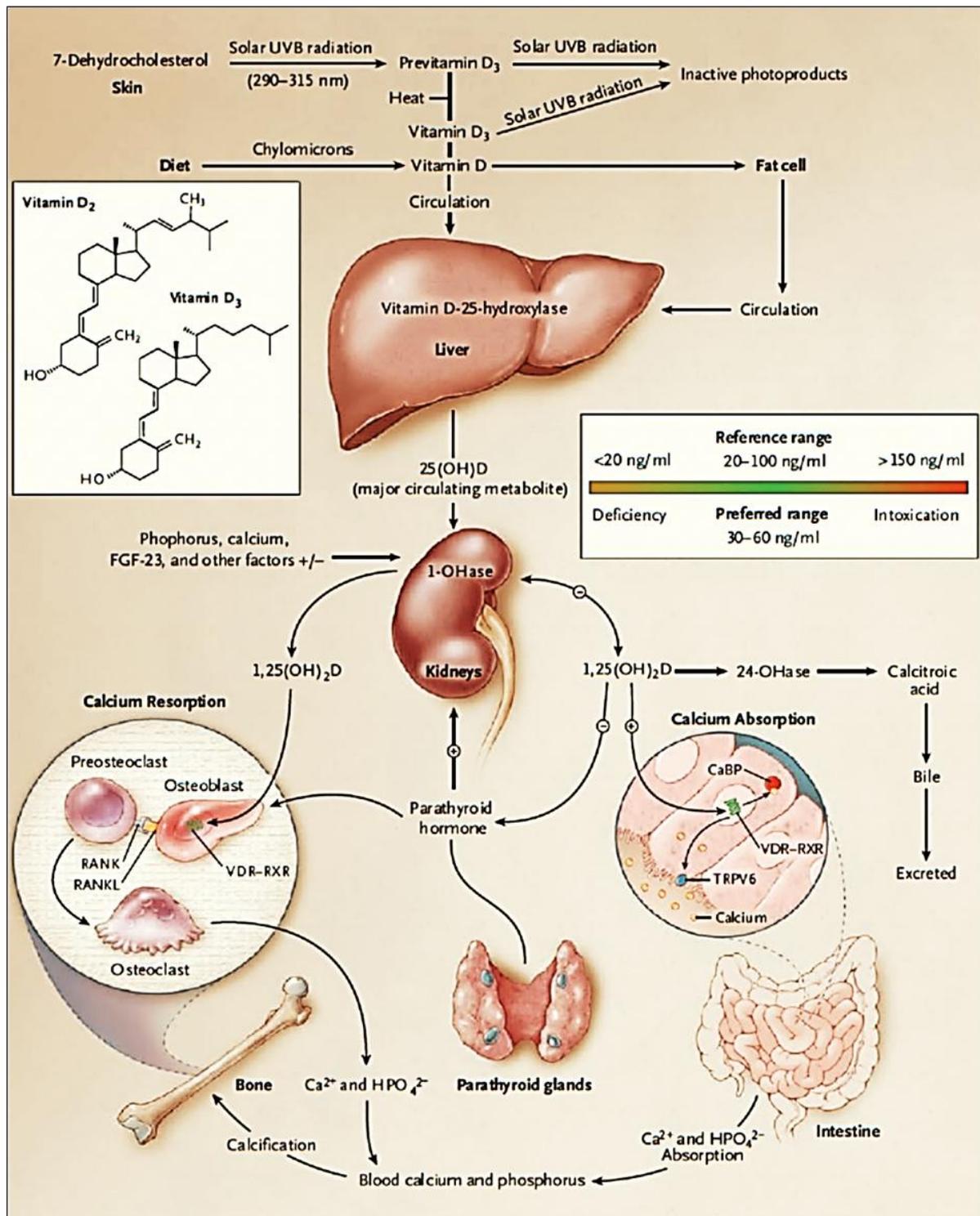


Abb. 3: Schematische Darstellung der an der Steigerung bzw. Senkung der Blut-Calcium-Konzentration beteiligten Regelkreisläufe, nach (Holick 2007). Vitamin D (Aufnahme mit der Nahrung oder Eigensynthese in der Haut) wird unreguliert in der Leber zu Calcidiol ($25(\text{OH})\text{D}$) hydroxyliert. Die Umwandlung von Calcidiol zu Calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, 1,25-Dihydroxycholecalciferol) in der Niere erfolgt streng reguliert und wird primär durch PTH induziert, das aus der Nebenschilddrüse freigesetzt wird, wenn die Blut-Calcium-Konzentration abfällt. Die Wirkungen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Zielorgane Knochen, Niere und Darm sind vereinfacht dargestellt. In Knochen und Magen-Darm-Trakt wird die Calcitriol-Wirkung über den Vitamin-D-Rezeptor vermittelt.

2.2 Calcium-Homöostase

Calcium erfüllt vielfältige biochemische und physiologische Aufgaben im Säugetier. So ist Calcium an der Blutgerinnung, an der Stabilisierung des Ruhemembranpotentials von Nerven- und Muskelzellen, der synaptischen Reizübertragung durch Transmitterfreisetzung, sowie der Muskelkontraktion (elektromechanische Kopplung) beteiligt. Ferner fungiert es in vielen Zellen als *second messenger* von Hormonen und Transkriptionsfaktoren und ist essentiell für die Mineralisierung von Knochengewebe und damit für die Stabilität des Skeletts (Hoenderop *et al.* 2005).

Bei Abfall der Calcium-Konzentration in der extrazellulären Flüssigkeit kommt es durch Destabilisierung des Ruhemembranpotentials zu einer erniedrigten Reizschwelle in erregbaren Zellen und zu Funktionsbeeinträchtigungen von Nerven und Muskeln (Schröder und Schemann 2000). Bei langanhaltender hochgradiger Hypocalcämie kommt es zu lebensbedrohlichen Ausfallserscheinungen.

Aufgrund des breiten Aufgabenspektrums ist der Calcium-Gehalt im Blut in engen physiologischen Grenzen reguliert. Die Regulation erfolgt im Wesentlichen über die drei Hormone Calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), Parathormon (PTH) und Calcitonin (Bringham und Kronenberg 1998), wobei PTH in der Nebenschilddrüse, Calcitriol in zwei Schritten in Leber und Niere synthetisiert wird und Calcitonin in den C-Zellen der Schilddrüse bereitgestellt wird (Abb. 3). Die Resorption von Calcium erfolgt im Magen-Darm-Trakt, seine Speicherung im Knochen. In den Nieren wird außerdem die Calcium-Ausscheidung reguliert.

2.2.1 Calcium

Der Körper von Wirbeltieren besteht zu ca. 2% aus Calcium, wobei sich 99% im Knochen und nur 1% des Calciums in den Weichteilen befinden (Kaune 2000). Die Netto-Aufnahme von Calcium im Dünndarm beträgt etwa 20-25% des mit der Nahrung aufgenommenen Calciums, da es im Darm sowohl resorbiert als auch sezerniert wird. Die Ausscheidung von Calcium erfolgt zu 80-90% über den Darm. Da ca. 40% des Calciums im Blut an Proteine gebunden vorliegt, werden nur 60% des Blut-Calciums in der Niere frei filtriert. Ca. 1% des in der Niere filtrierten Calciums wird ausgeschieden, 60% werden im proximalen Tubulus (parazellulär durch Diffusion und *solvent drag*), 30% im dicken Teil der aufsteigenden Henleschleife (passiv entlang des Konzentrationsgradienten) und 9% über distale

Nephronsegmente resorbiert. Die Re-Absorption in der Niere erfolgt vorwiegend passiv, via *solvent drag* (Fromm und Hierholzer 2000). Die Feinabstimmung erfolgt im distalen Tubulus, wo das verbleibende, filtrierte Calcium transzellulär reabsorbiert wird (Mensenkamp *et al.* 2006). Die renale Calcium-Ausscheidung ist bei Wiederkäuern gering und beträgt nur 0,2 - 1g Calcium pro Tag (Abb. 1).

2.2.2 Calcium-sensitiver Rezeptor (CaSR)

Calcium-sensitive Rezeptoren (CaSR) sind transmembrane, G-Protein-gekoppelte Oberflächen-Rezeptoren auf Calcium-sensitiven Zellen, welche auf Änderungen der extrazellulären Calcium-Konzentration reagieren. Sie sind unter anderem in Hormon-sezernierenden Zellen der Nebenschilddrüse, Calcitonin-sezernierenden Zellen der Schilddrüse und im gesamten Nephron in der Niere zu finden. In der Nebenschilddrüse reguliert der CaSR die Genexpression, Synthese und Sekretion von Parathormon (Abb. 4) und die Zellproliferation der Nebenschilddrüse. In den C-Zellen der Schilddrüse beeinflusst der CaSR die Sekretion von Calcitonin (Carmeliet *et al.* 2003). CaSR können sowohl stimulierend als auch inhibierend auf die Hormonsekretion einwirken (Brown 1999). In der Niere reguliert der CaSR die tubuläre Reabsorption von Calcium und Magnesium (Riccardi *et al.* 1998). Unabhängig von Zellen, die der Regulation der Calcium-Homöostase dienen, befindet sich der CaSR in vielen weiteren Geweben (Darm, Knochen, Gehirn), wo er auf Zellproliferation und Ionen-Transport einwirkt (Brown und MacLeod 2001).

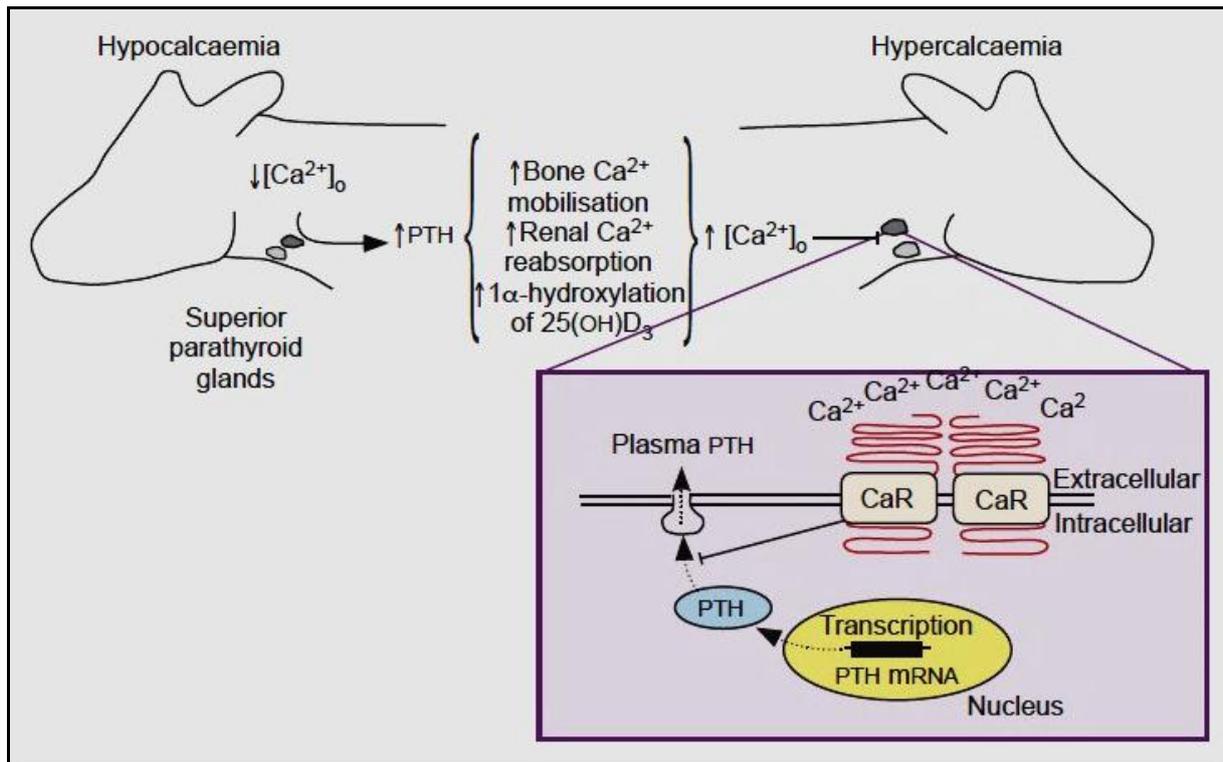


Abb. 4: Wirkung des Calcium-sensitiven Rezeptors (CaSR/ CaR) auf die Genexpression, Synthese und Sekretion von PTH nach (Murray *et al.* 2008). Die durch den CaSR vermittelte Kontrolle der PTH-Synthese und -Sekretion ist von zentraler Bedeutung für die Calcium-Homöostase von Säugetieren. Eine niedrige Calcium-Konzentration (ionisierten Calciums) stimuliert die Ausschüttung von PTH, welches eine Erhöhung des Blut-Calcium-Spiegels vermittelt. Bei hohen Calcium-Konzentrationen (ionisierten Calciums) wird die PTH Sekretion über den CaSR inhibiert und dadurch der Blut Calcium-Spiegel gesenkt.

2.2.3 Parathormon (PTH)

Parathormon, ein Polypeptid aus 84 Aminosäuren, wird in den Epithelkörperchen der Nebenschilddrüse gebildet. Bei einem Abfall der Calcium-Konzentration im Blut, gemessen durch Calcium-sensitive Rezeptoren (CaSR) auf PTH-sezernierenden Zellen (Abb. 4), wird es vermehrt gebildet und freigesetzt (Nemeth und Scarpa 1987; Brown *et al.* 1993), durch hohe Konzentrationen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Blut wird die PTH-Gen-Transkription gehemmt (Carmeliet *et al.* 2003). Die Wirkung von PTH in den Zielorganen wird über den G-Proteingekoppelten PTH1-Rezeptor (PTH1R) vermittelt (Mannstadt *et al.* 1999).

Eine durch PTH induzierte schnelle Calcium-Abgabe aus dem Knochen trägt relativ kurzfristig zur Steigerung der Calcium-Konzentration im Blut bei, von geringer Bedeutung ist beim Wiederkäuer die ebenfalls durch PTH induzierte erhöhte Calcium-Rückresorption und Phosphat-Exkretion in der Niere. In den proximalen Tubulus-Zellen der Niere wirkt PTH

cAMP-vermittelt stimulierend auf die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Synthese aus $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Rost *et al.* 1981). St-Arnaud *et al.* haben steigende 1α -Hydroxylase-mRNA-Konzentrationen unter PTH-Medikation gezeigt (St-Arnaud *et al.* 1997), welche durch den direkten Einfluss von PTH auf die Gentranskription der 1α -Hydroxylase erklärt wird (Brenza *et al.* 1998; Murayama *et al.* 1998). Die 1α -Hydroxylase ist ein streng reguliertes Enzym, welches $25(\text{OH})\text{D}_3$ zum aktiven $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hydroxyliert. Am Knochen induziert PTH neben einer schnellen Calcium-Abgabe aus dem ossären Calcium-Pool eine Langzeit-Änderung über eine indirekte Wirkung auf den osteoklastischen Knochenabbau. In Osteoblasten stimuliert es die Produktion von *receptor activator of NF- κ B-ligand* (RANKL), ein Rezeptor-Protein welches über den von Osteoklasten exprimierten Rezeptor RANK (*receptor activator of NF- κ B*) auf die Osteoklasten-Reifung Einfluss nimmt (Dusso *et al.* 2005). Osteoklasten bewirken den Abbau von Knochen und damit die Freisetzung von Calcium. Des Weiteren beeinflusst PTH in Osteoblasten Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, Regulationsmoleküle und Zell-Zyklus-Regulations-Proteine und nimmt dadurch Einfluss auf Osteoblasten-Proliferation, -Differenzierung und -Funktion (Datta und Abou-Samra 2009). Außerdem wirkt PTH inhibierend auf die Osteoprotegerin-Synthese (Lee und Lorenzo 1999), einem hormonellen Regulator der Knochenresorption. Osteoprotegerin (OPG) ist Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Familie und blockiert im extrazellulären Milieu die Osteoklastogenese und -differenzierung (Simonet *et al.* 1997) durch Konkurrenz mit RANKL um RANK (Lacey *et al.* 1998), wodurch es dem osteoklastischen Knochenabbau entgegen wirkt.

Die dargestellten Vorgänge sind auch für das Rind zutreffend. Die Ausschüttung von PTH ist zeitnah nach Abfall des Calcium-Spiegels gemessen worden (Blum *et al.* 1983).

Neben Parathormon wirkt ein dem PTH ähnliches Protein auf die Calcium-Homöostase ein. *Parathyroid hormone-related peptide* (PTHrP) wird im Gegensatz zu PTH in vielen Geweben wie Haut, Blutgefäßen, glatter Muskulatur, Knochen und Niere exprimiert (Datta und Abou-Samra 2009). Es weist Sequenzhomologien mit PTH auf, welche es ihm ermöglichen mit renalen und ossären PTH1R zu interagieren und dadurch dieselben Zellreaktionen wie PTH auszulösen (Goltzman *et al.* 1989). Versuche mit PTHrP-Gen Ablationen resultieren unter anderem in gestörter Skelettentwicklung (Karaplis *et al.* 1994). In *in vitro* Versuchen wurde gezeigt, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Calcium-Konzentration- und zeitabhängig inhibierend oder stimulierend auf die Synthese von PTHrP wirkt (Kremer *et al.* 1991), wobei ein inhibitorisches

response element (spezifische DNA-Bindungsstelle) für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Promotor-Abschnitt des PTHrP-Gens eindeutig bestimmt wurde (Kremer *et al.* 1996). Diese Zusammenhänge sind für die Hypocalcämie bzw. Gebärparese des Wiederkäuers aber wahrscheinlich nicht relevant.

2.2.4 Calcitonin

Calcitonin, ein Polypeptid aus 32 Aminosäuren, wird in den parafollikulären C-Zellen der Schilddrüse gebildet. Calcitonin ist der wichtigste Antagonist von PTH, es wirkt einer Hypercalcämie entgegen. Bei zu starkem Anstieg der Blut-Calcium-Konzentration, ebenfalls durch Calcium-sensitive-Rezeptoren gemessen (Fudge und Kovacs 2004), wird Calcitonin sezerniert. Es hemmt die Calcium-Resorption aus dem Knochen (Murayama *et al.* 1998) und stimuliert die Calcium-Ausscheidung mit dem Harn (Bijvoet *et al.* 1971; Warshawsky *et al.* 1980). In der Niere stimuliert es außerdem die 1α -Hydroxylase (Galante *et al.* 1972; Murayama *et al.* 1998) und induziert dadurch indirekt die Synthese von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wiederum inhibiert die Synthese von Calcitonin (Naveh-Manly und Silver 1988) durch direkte Beeinflussung der Gen-Expression über ein negatives *response element* in der das Calcitonin-Gen umgebenden DNA (Peleg *et al.* 1993).

In einer Studie mit durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induzierter Hypercalcämie bei Rindern, senkte Calcitonin den Blut-Calcium-Spiegel erfolgreich (Barlet 1980). Nicht ausreichend geklärt ist, warum das Fehlen oder eine Überproduktion von Calcitonin nicht zu einer Entgleisung des Calcium-Haushalts führt (Erben 2010).

2.2.5 Calcitriol

Vitamin D ist ein fettlöslicher, steroidähnlicher Wirkstoff und wird auch anti-rachitisches Vitamin genannt (Pschyrembel 2007a). Es wird über die Nahrung aufgenommen oder durch UV-Strahlung in der Haut aus einem Cholesterol-Derivat (7-Dehydrocholesterol) synthetisiert. Damit gehört Vitamin D strenggenommen nicht zu den Vitaminen, da es bei ausreichender UV-Exposition vom Körper selbst synthetisiert werden kann.

Im Körper wird Vitamin D durch zweifache Hydroxylierung an C_1 und C_{25} zum wirksamen Vitamin-D-Hormon Calcitriol synthetisiert. Die erste Hydroxylierung erfolgt unreguliert, also lediglich abhängig von der Substratmenge, in der Leber an C_{25} durch die D_3 -25-Hydroxylase (CYP27), einem mitochondrialen und mikrosomalen Cytochrom p-450-Enzym (Cheng *et al.*

2003). Es entsteht $25(\text{OH})\text{D}_3$ (Calcidiol, 25-Hydroxycholecalciferol), welches selbst metabolisch nicht aktiv ist, aber als Indikator der Vitamin-D-Versorgung angesehen werden kann (DeLuca 2004). Durch die zweite Hydroxylierung in der Niere an C_1 entsteht das aktive $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Calcitriol, 1,25-Dihydroxycholecalciferol) (Holick *et al.* 1971). Die Reaktion erfolgt durch das Enzym $25(\text{OH})\text{D}_3$ -1 α -Hydroxylase (CYP1 α) in den proximalen Tubuluszellen der Niere, welches durch hohe $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentrationen gehemmt (Gray *et al.* 1972) und niedrige Calcium-Konzentrationen induziert wird (Armbrecht *et al.* 1999). Aktiviert wird die 1 α -Hydroxylase durch PTH (Kap. 2.2.3) und Calcitonin (Kap. 2.2.4). Die 1 α -Hydroxylase wurde auch in extra-renalen Geweben nachgewiesen (Murayama *et al.* 1999). $25(\text{OH})\text{D}_3$ kann auch an anderen C-Atomen hydroxyliert werden, so zum Beispiel an C_{24} durch die $25(\text{OH})\text{D}_3$ -24-Hydroxylase (CYP24) in allen Zielzellen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Jones *et al.* 1998). $25(\text{OH})\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ haben jedoch nur ein Hundertstel der Bindungsaffinität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Dusso *et al.* 2005). Man geht davon aus, dass $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sowohl Abbauprodukt ist, als auch eine eigene nicht-genomische Wirkung auf den Knochenstoffwechsel durch Modifizierung der Knochenmatrix und Kalzifikation hat (Boyan *et al.* 1994). Die Induktion der 24-Hydroxylase durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird von PTH moduliert (Armbrecht und Hodam 1994; Armbrecht *et al.* 1997).

Die zelluläre Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird durch den intrazellulären VDR vermittelt³. Wichtigste Funktion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist die Erhöhung der Blut-Calcium-Konzentration durch Mobilisierung von Calcium aus dem Knochen, Erhöhung der intestinalen Calcium- und Phosphat-Resorption und die Steigerung der renalen Calcium-Reabsorption durch Steigerung der Synthese der entsprechenden Proteine. Unter anderem wird auch die Gen-Expression des VDR durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ geregelt (Zella *et al.* 2006).

1,25(OH)₂D₃-vermittelte Calcium-Resorption: Der epitheliale Calcium-Transport erfolgt in der Niere und im Dünndarm trans- und parazellulär (Abb. 5).

Bei parazellulärer Aufnahme müssen die Calcium-Ionen *tight junctions* überwinden. Der Transport des Calciums verläuft dabei passiv, abhängig von Konzentrationsgradient und elektrischem Gradient. Die *tight junctions* werden durch Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine und andere Faktoren moduliert (Hoenderop *et al.* 2005).

Der transzelluläre Calcium-Transport verläuft mithilfe mehrerer Transportproteine. Calcium wird in der Niere vorwiegend über TRPV5- (*transient receptor potential cation channel*

³ Eine genaue Beschreibung der VDR-vermittelten Abläufe erfolgt im Kapitel 2.5 (Vitamin-D-Rezeptor).

subfamily V, ECaC1, CaT2) Kanäle (Hoenderop *et al.* 1999) und im Magen-Darm-Trakt vorwiegend über TRPV6- (ECaC2, CaT1) Kanäle (Peng *et al.* 1999) in die Zelle geleitet. Dieser Influx verläuft entlang eines großen Konzentrationsgradienten und ist von der Anzahl der Kanäle abhängig. Die Anzahl der Kanäle wird von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reguliert (Hoenderop *et al.* 2005). Zusätzlich besitzen die TRPV-Kanäle Calcium-abhängige Autoregulations-Mechanismen, die zu schneller Inaktivierung und langsamer Down-Regulierung führen (Vennekens *et al.* 2000). TRPV5-Kanäle werden durch das Hormon Klotho aktiviert (Alexander *et al.* 2009), welches bei Mutation unter anderem mit Osteoporose und schnellerem Altern in Verbindung gebracht wird (Kuro-o *et al.* 1997).

Trotz hoher Calcium-Transport-Raten, ist die zytosolische Konzentration freier Calcium-Ionen in der Zelle gering. Das lässt sich folgendermaßen erklären: in der Zelle vermitteln *calcium-binding proteins*, sogenannte Calbindine, den Transport des Calciums von der apikalen zur basolateralen Seite der Zelle (Abb. 5) und wirken durch die Calcium-Bindung gleichzeitig als Calcium-Puffer. So wird der Calcium-Gradient für den Influx in die Zelle aufrechterhalten. Auch Calbindin wird von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reguliert (Feher und Wasserman 1979; Feher *et al.* 1992). Bekannt sind zwei Typen des Calbindins: Calbindin_{9k}, welches bei Säugetieren vor allem im Dünndarm vorkommt, und Calbindin_{28k}, welches bei Säugetieren vor allem in den Nierenzellen zu finden ist. Unklar ist, ob Calbindin wie andere Calcium-bindende Proteine (z.B. Troponin C) mit spannungsabhängigen Calcium-Kanälen kommuniziert (Hoenderop *et al.* 2005).

Der Efflux von Calcium erfolgt gegen einen Konzentrationsgradienten durch zwei bekannte Calcium-Transporter in der basolateralen Membran. Bekannt sind ein Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) und eine Calcium-ATPase (*plasma membrane calcium ATPase*, PMCA). In der Niere wird Calcium vor allem über NCX heraustransportiert (Bindels *et al.* 1992). NCX wird durch PTH (Hoenderop *et al.* 2005) und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reguliert, wie mit Vitamin-D-defizienten *knock-out* Mäusen bestätigt wurde (Hoenderop *et al.* 2002). Von den Calcium-Pumpen (PMCA) sind vier Isoformen bekannt (PMCA 1-4). Im Dünndarm ist PMCA1b vorherrschender Calcium-Transporter, während NCX nur gering ausgeprägt ist. Auch PMCA wird durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reguliert (Cai *et al.* 1993; Kip und Strehler 2004).

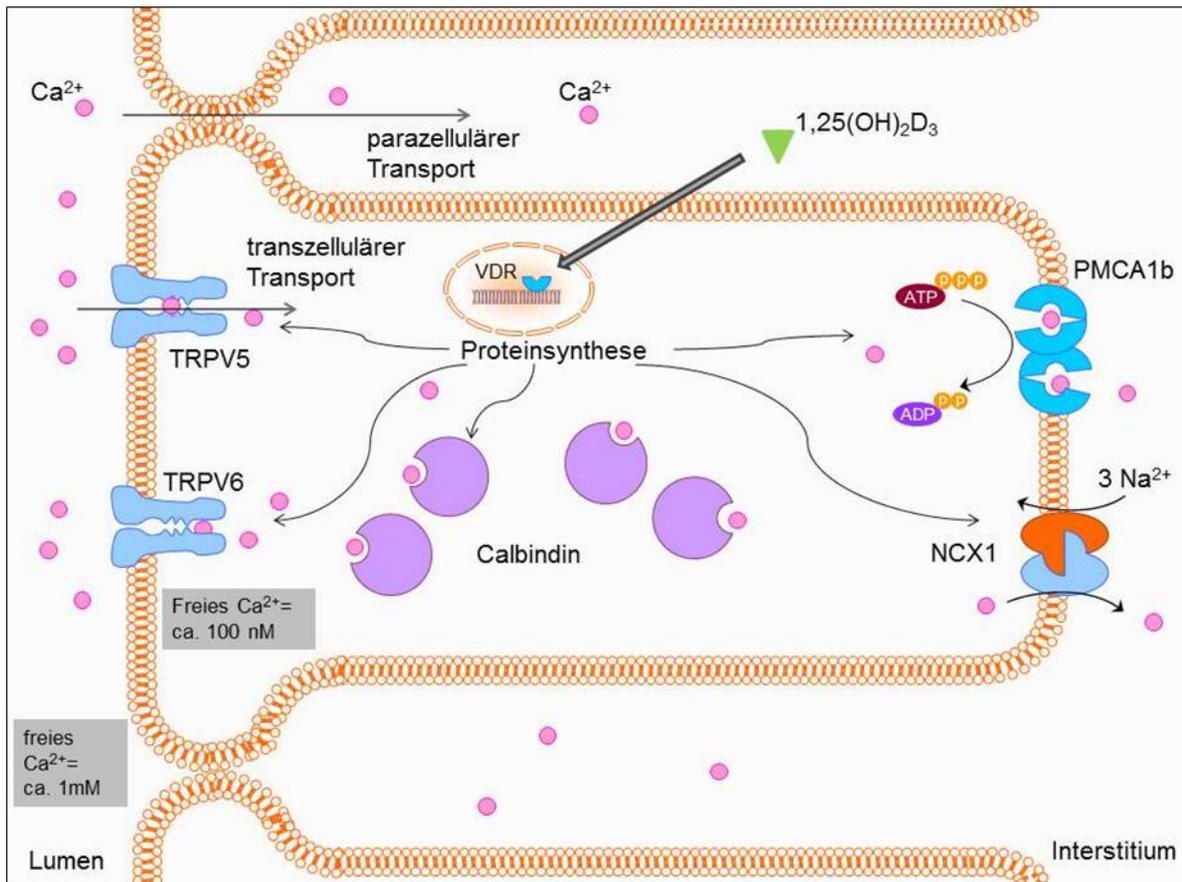


Abb. 5: Schematische Darstellung der para- und transzellulären Calcium-Absorption, modifiziert nach (Hoenderop *et al.* 2005). Der passive, parazelluläre Transport verläuft über *tight junctions* entlang eines Konzentrationsgradienten. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reguliert die Calcium-Aufnahme durch Stimulation der Transportproteine TRPV5/6, Calbindins, NCX1 und PMCA1b. Die Absorption erfolgt in 3 Schritten: Calcium gelangt über TRPV5/6 Kanäle in der apikalen Membran in das Zellinnere, wird dort von Calbindins zur basolateralen Seite transportiert und über Calcium-ATPasen (PMCA) oder Na/Ca-Austauscher (NCX) in das Interstitium befördert.

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -vermittelte Calcium-Mobilisation aus dem Knochen: Wie PTH (Kap. 2.2.3) wirkt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ über die Stimulierung der Expression von RANKL auf die Reifung osteoklastischer Vorläuferzellen (Kitazawa *et al.* 1999) und hemmt die Bildung von OPG, was ebenfalls zur Osteoklastogenese beiträgt (Kondo *et al.* 2004). Wie PTH bewirkt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ also die Reifung der Osteoklasten und damit den Abbau von Knochenmatrix, wodurch die Calcium-Freisetzung gefördert wird (Teitelbaum 2000).

Phosphat und Calciumhaushalt: Die klassische Beschreibung der Regulation des Calcium-Stoffwechsels über PTH, Calcitriol und deren Zielorgane schließt auch Effekte auf den Phosphat-Haushalt ein. So wird z.B. die Phosphat-Absorption aus dem Darm durch Calcitriol bzw. die renale Phosphat-Ausscheidung durch PTH erhöht. Diese Verbindung des Phosphat-Stoffwechsels mit der Regulation des Calcium-Haushalts erklärt aber eine Reihe von Beobachtungen über Abweichungen im Phosphat-Haushalt nicht. Untersuchungen der letzten 15 Jahre haben nun gezeigt, dass offensichtlich ein Phosphat regulierendes Hormon existiert (Marsell und Jonsson 2010). Es handelt sich um den im Knochen gebildeten *fibroblast growth factor* (FGW23). Zahlreiche Untersuchungen an Versuchstieren (Maus und Ratte) sowie am Menschen mit offensichtlich erblich bedingten Störungen des Phosphat-Haushalts haben verschiedene Wirkungsmechanismen des FGW23 aufgezeigt. Es kann als gesichert angesehen werden, dass eine erhöhte Phosphat-Konzentration im Blut zur Freisetzung des FGW23 führt, der die Abgabe von PTH hemmt, in der Niere die Phosphat-Ausscheidung erhöht und in der Niere die Bildung von Calcitriol reduziert. Die Wirkungen des FGW23 auf die PTH-Freisetzung sowie die Calcitriol-Synthese tangieren die Regulation des Calcium-Haushalts (Marsell und Jonsson 2010). Die bekannte Beziehung zwischen Phosphat-Übersorgung und der Inzidenz der Gebärfähigkeit könnte eine Erklärung über die Wirkungen von FGW23 liefern (Julien *et al.* 1977; Barton *et al.* 1987), Untersuchungen über FGW23 beim Rind sind bisher jedoch nicht durchgeführt worden.

2.3 Hypocalcämie-Management

Das Management der Hypocalcämie und Gebärfähigkeit bei der Milchkuh umfasst die Prävention, Therapie und die züchterische Selektion.

2.3.1 Prävention

Um einer Gebärfähigkeit grundsätzlich entgegenzuwirken, sollte man durch ein optimiertes Management im Abkalbezeitraum folgende Punkte gewährleisten: hohe Futteraufnahme, Vermeidung der Verfettung durch Konditionsüberwachung mittels *body condition score* (BCS), rutschfeste Liegeflächen zum Vermeiden von Verletzungen durch Aufstehversuche, Minimierung der Verletzungsrisiken durch optimierten Kuhkomfort, verzögertes Ausmelken bis drei Tage nach dem Kalben, Drenchen mit Wasser oder Wirkstofflösungen nach der Geburt (Vitamine, Propylenglykol, Mengen- oder Spurenelemente) zum Beispiel über eine Nasen-Schlundsonde (Staufenbiel 2004) bzw. zur Verfügung stellen von ausreichenden Mengen warmen Wassers.

Spezielle Prophylaxe-Maßnahmen umfassen im Wesentlichen vier Strategien (Thilsing-Hansen *et al.* 2002; Staufenbiel 2004):

1. Calciumapplikation zum Geburtszeitpunkt,
2. Anionen-reiche Fütterung,
3. Calcium-restriktive Fütterung im präpartalen Zeitraum und
4. Vitamin D/ Vitamin-D-Metaboliten Gabe.

Calciumapplikation zum Geburtszeitpunkt: Große Mengen (50-125g) leicht verfügbarer Calciumsalze werden oral zur Erhöhung der passiven Calcium-Aufnahme verabreicht (Goff 2008). Staufenbiel empfiehlt CaCl_2 oder anorganische Calcium-Verbindungen einen Tag vor dem Kalben, zum Kalben, sowie 12 und 24 Stunden nach dem Kalben (Staufenbiel 2004).

Anionen-reiche Fütterung: Zur Sensitivierung von PTH und dadurch bedingter Verstärkung der intestinalen Calcium-Aufnahme und ossären Calcium-Mobilisation wird eine milde metabolische Azidose herbeigeführt (Block 1984). Durch Gabe saurer Salze (Oetzel *et al.* 1991) wird eine *dietary cation-anion difference* (DCAD) zwischen -100 und -150mval/kg

Trockensubstanz Futter angestrebt (Anionen-Überschuss). Die DCAD beschreibt die Menge der Haupt-Kationen (Na^+ und K^+) abzüglich der Haupt-Anionen (Cl^- und SO_4^{2-}). Zur Kontrolle der Wirkung der sauren Salze kann der pH im Harn gemessen werden, der idealerweise zwischen pH 6-7 liegen sollte (Staufenbiel 2004). In verschiedenen Studien wurde bewiesen, dass die Gebärpause-Inzidenz nach Fütterung saurer Salze deutlich sinkt (Block 1984; Oetzel *et al.* 1988; Oetzel 1991; Penner *et al.* 2008). Calcium sollte bei Einsatz von sauren Salzen nicht restriktiv gefüttert werden, da eine leicht azidotische Stoffwechsellage die Calciumverfügbarkeit zwar heraufsetzt, nicht jedoch das verfügbare Calcium des Körpers (Gelfert und Staufenbiel 2008). Ein Nachteil der Anionen-reichen Fütterung ist die geringere Aufnahme von Trockenmasse aufgrund der herabgesetzten Palatabilität des Futters (Thilsing-Hansen *et al.* 2002). In einer Fütterungsstudie mit CaCl_2 -versetztem Heu (und dadurch negativer DCAD) wurden allerdings keine Unterschiede in der Aufnahme der Trockenmasse im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt (Penner *et al.* 2008).

Calcium-restriktive Fütterung: Durch eine präpartale, Calcium-arme Fütterung werden die Regulationsmechanismen der Calcium-Homöostase frühzeitig aktiviert (Green *et al.* 1981) und können so nach der Kalbung effizienter arbeiten. Um Calcium restriktiv zu füttern, sollte die verabreichte Menge unter der normalerweise benötigten Tages-Dosis von 30g Calcium pro Tag liegen (Staufenbiel 2004). Herkömmliche Futtermittel sind allerdings meist Calcium-reich und ermöglichen das Herabsetzen des Calcium-Gehaltes nicht. Calciumfänger können den Calcium-Gehalt des Futter jedoch senken (Thilsing-Hansen *et al.* 2002; Wilson 2003). Die Gebärpause-Inzidenz war in Fütterungsversuchen mit 8g Ca/d (Goings *et al.* 1974), 13-18g Ca/d (Wiggers *et al.* 1975) oder 26,4g Ca/d (van de Braak *et al.* 1986) in Bezug zur Versuchsgruppe mit höherer Calcium-Aufnahme deutlich reduziert.

Vitamin D/ Vitamin-D-Metaboliten Gabe: Eine weitere Möglichkeit der Milchfieber-Prophylaxe ist die Gabe von Vitamin D oder seinen Metaboliten zur Aktivierung der Calciummobilisation. Allen Vitamin-D-Präparaten gemein ist das Auslösen eines negativen Feedbacks auf die 1α -Hydroxylase in der Niere bei hohen Dosierungen (Horst *et al.* 2005) und das Problem der Applikation in einem definierten Zeitfenster vor dem Geburtstermin, der sich nur ungenau berechnen lässt. In Tab. 2 werden verschiedene Studien und ihre Wirkung auf die Gebärpause-Inzidenz aufgeführt.

Tab. 2: Übersicht über verschiedene Studien zur Milchfieberprophylaxe mit Vitamin D, bzw. Vitamin-D-Hormon oder seinen Metaboliten. Legende: MF= Milchfieber

Vitamin D Metabolit	Dosis	Applikation	Bemerkungen	Hypocalcämie-Inzidenz (HI)	Referenz
Vitamin D	15-17,5 mio IE	32d + 25d präpartal	10 von 17 Kühen starben an Vitamin D Intoxikationen	Keine Gebärparese-Entwicklung, 22% MF-Inzidenz in der Kontrollgruppe	(Littledike und Horst 1982)
1,25(OH) ₂ D ₃	Kontrolle 0,4mg i.m.	5d präpart., Reinjektion alle 5d		33% (2 of 6) 0	(Gast <i>et al.</i> 1979)
1,25(OH) ₂ D ₃ +PGF _{2a}		i.m., kurz vor dem Kalben	Erhöhung des Plasma-Calciums bis 3d postpart.		(Yamagishi <i>et al.</i> 2005)
1,25(OH) ₂ D ₃ + Ca-reiche Diät	500µg	Oral, 24h präpart. 1-3d präpart 4-5d präpart		verhindert eine Hypocalcämie, wenn 3d präpart. verabreicht	(Hove und Kristiansen 1982)
1α-(OH)D ₃	Kontrolle 350µg i.m. 700µg i.m.	52-36h präpartum HWZ 2,1d		Hypocalcämie leichte Hypocalcämie Hypercalcämie	(Bar <i>et al.</i> 1985)
1α-(OH)D ₃	Kontrolle 350µg	i.m. Ca ²⁺ 72h präpart.	nach 72h Geburt eingeleitet	10 von 57 2 von 60	(Sachs <i>et al.</i> 1987a)
1α-(OH)D ₃	700µg 350µg	i.m. 7-9d vor dem Kalben		Keine Hypocalcämie Hypocalcämie	(Sachs <i>et al.</i> 1987b)
25(OH)D ₃	0,5-2,0mg	i.v. bei Zeichen von MF	2 von 5 ohne Rekonvaleszenz litten nicht an Hypocalcämie	6 von 11 erholten sich innerhalb von 13h	(Olson <i>et al.</i> 1973a)
25(OH)D ₃	4mg 8mg	i.m., 3d präpart.	Stärkere Effekte bei P-armer Diät	Reduzierte Milchfiebrerate	(Jorgensen <i>et al.</i> 1978)
25(OH)D ₃	2,0mg 4,0mg 8,0mg	s.c. i.m.		Schlecht prädiktive Absorptionsrate Hypocalcämieinzidenz sank von 29% auf 16% Hypocalcämieinzidenz sank von 52% auf 19%	(Olson <i>et al.</i> 1973b)
1,25(OH) ₂ D ₃	25,100,400 µg		Eingeschränkte Nierenfunktion bei 100 und 400µg Dosis, Studie mit nicht-laktierenden Kühen	Leichte Hypercalcämie und -phosphatämie Mittlere Hypercalcämie und -phosphatämie Schwere Hypercalcämie und -phosphatämie	(Goff <i>et al.</i> 1986)
24F-1,25(OH)D ₃				85% MF	
24F-1,25(OH)D ₃ + Ca-reiche Diät	Kontrolle 100µg 150µg	i.m. 1-mal/Wo, bis zur Kalbung	Keine Erhöhung der Hydroxyprolinwerte (keine Ca ²⁺ Resorption aus dem Knochen)	43% 29%	(Goff <i>et al.</i> 1988)
24F-1,25(OH)D ₃	Kontrolle			80% (8von10) 9% (1von11)	(Goff und Horst 1990)
		s.c., 7d präpart. alle 7d			

Vitamin D (Cholecalciferol) muss nach Applikation im Körper zunächst zum Vitamin-D-Hormon ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) umgebaut werden. Die wirksame Dosis liegt dabei nahe der toxischen (Goff 2008), welche Weichteil-Calcifikationen hervorruft (Littledike und Horst 1982).

2.3.2 Therapie

Die Infusion Calcium-haltiger Lösungen wird heute als Therapie der Wahl eingesetzt (Horst *et al.* 1997; Staufenbiel 2004; Horst *et al.* 2005; Gelfert *et al.* 2007). Als Richtlinie empfehlen Goff *et al.* die Infusion von 2g Calcium pro 100kg Körpergewicht bei einer Infusionsrate von 1g Calcium pro Minute. Bei zu schneller Applikation kommt es zu Herzarrhythmien oder sogar zum Herzstillstand (Goff 2008), weswegen die Gabe sorgfältig überwacht werden sollte.

2.3.3 Zucht

Zur Steigerung der Milch- und Fleischproduktion in der Rinderhaltung, werden von den Tieren Zuchtwerte für Einzelmerkmale (z.B. Kalbeverlauf, somatische Zellzahl in der Milch) erstellt, mithilfe derer die erfolgreiche Vererbung des Merkmales an die Nachkommen ausgedrückt wird. Die Zuchtwerte werden nach ökonomischen und genetischen Kriterien gewichtet und in Teilzuchtwerten zusammengeführt, welche ebenfalls gewichtet in einem Gesamtzuchtwert zusammengefasst werden. Tiere mit Zuchtwerten über dem Durchschnitt der Population (100) werden als positive Vererber bezeichnet und vermehrt in der Zucht eingesetzt, um bestimmte Merkmalsausprägungen in der Population zu verbessern (Müller und Reinecke 2004). Bislang basierte diese Zuchtwertschätzung auf der Bewertung des Phänotyps des Tieres, seiner Eltern, der Geschwister und seiner Nachkommen.

Mit molekulargenetischen Methoden kann das gesamte Genom eines Tieres seit kurzem anhand von individuellen Punktmutationen der DNA, sogenannten *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), kartiert werden (Abb. 6). Dafür stehen DNA-Chips zur Verfügung, mit denen bis zu 50000 SNPs nachgewiesen werden können. Anhand von Daten aus der Zuchtwertschätzung und mithilfe von familiären Kopplungsstudien können die Effekte der SNPs auf Leistung und Exterieur innerhalb einer Population geschätzt werden, ohne dabei die genaue Funktion eines Gens zu kennen. Der sogenannte genomische Zuchtwert ist die Summe der geschätzten Effekte aller erfassten SNPs bezüglich eines Merkmals (Brade und Brade 2010). Aufgrund der Diploidie müssen die Haplotypen (Nukleotid-Sequenzvarianten)

beider Eltern bestimmt werden, um Aussagen über die Funktionalität der Genkopien machen zu können (Hoehe *et al.* 2009).

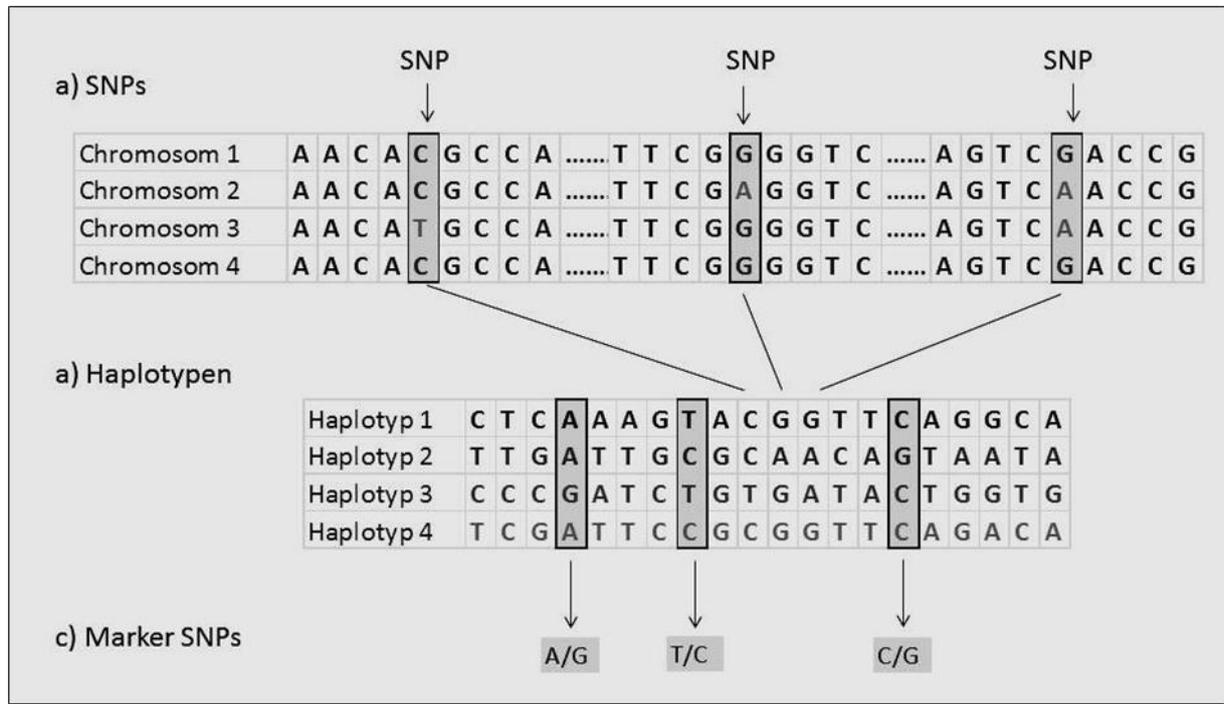


Abb. 6: SNPs, Haplotypen und Marker SNPs. a) SNP: DNA Abschnitt mit vier Versionen derselben Chromosomenregion verschiedener Individuen. Die Abschnitte sind bis auf drei Basen identisch. Jedes SNP hat zwei mögliche Allele (hier Allel C und T für SNP 1). b) Haplotypen: Ein Haplotyp besteht aus einer bestimmten Kombination von SNPs. Hier dargestellt sind die beobachteten Genotypen von 20 SNPs, welche sich über 6000 Basen der DNA erstrecken. Gezeigt werden nur die variablen Basen, einschließlich der drei SNPs aus Abschnitt a. Für diese Region, hat sich gezeigt, dass die meisten Chromosomen einer Population die Haplotypen 1-4 besitzen. c) Marker SNPs: Die Genotypisierung der drei Marker SNPs reicht aus, um die vier Haplotypen zu identifizieren. Wenn die Marker SNPs eines bestimmten Chromosoms beispielsweise das Muster A-T-C aufweisen, passt dieses Muster auf jenes des Haplotyps 1. Modifiziert nach (International HapMap Consortium 2003).

Studien haben gezeigt, dass die Prognosen mittels des genomischen Zuchtwertes zuverlässiger sind, als die durch traditionell berechnete Zuchtwerte. Je mehr Tiere und genetische Marker in die Berechnung einbezogen werden, desto größer ist die prognostische Sicherheit (VanRaden 2008). Um genetische Gemeinsamkeiten präzise zu ermitteln, sollten über 100000 verschiedene Marker verwandt werden (Meuwissen 2007). Je größer das Wissen über Genabschnitte und ihre Auswirkungen auf phänotypische Merkmale und Produktionsleistung ist, desto größer ist die rechnerische Genauigkeit (VanRaden *et al.* 2009).

Wenn in Zukunft die Zuchtwertschätzung ohne Leistungstest der Nachkommen möglich wird (Soller 1994), haben Studien eine Kostenreduzierung um 92% durch alleinige Zuchtwertmessung mittels genomischem Zuchtwert ermittelt und die Möglichkeit in Aussicht gestellt, dass genetische Änderungen in einer Population effektiver bewirkt werden können (Schaeffer 2006).

2.4 Ursachenforschung

Eine ganze Reihe von Gebärparese begünstigenden Faktoren sind seit langem bekannt. An erster Stelle steht ein fehlerhaftes Herdenmanagement mit Haltungs- und Fütterungsfehlern in der Transitphase (2-3 Wochen vor bis 3-4 Wochen nach der Kalbung) (Kap. 2.3.1). Fehler im Herdenmanagement könnten die große Breite der Gebärparese-Inzidenz von 0 - >80% in Milchviehhaltungen erklären (Mullen 1975; Lean *et al.* 2006).

Neben dem Einfluss durch reine Stallhaltung (Hardeng und Edge 2001), Klimaeinflüssen (Roche 2006) oder Überkonditionierung, das heißt einem BCS > 3,5 (Heuer *et al.* 1999; Theera *et al.* 1999; Thilsing-Hansen *et al.* 2002), werden die nachfolgenden Punkte als Ursachen für die Entstehung einer Gebärparese diskutiert.

Prädisposition durch endokrine Fehlfunktionen: Ausgeschlossen werden konnten Störungen in der hormonellen Antwort von PTH (Mayer *et al.* 1969), $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Horst *et al.* 1978) oder Calcitonin (Mayer *et al.* 1975; Shappell *et al.* 1987) auf eine Hypocalcämie. Die Hormonspiegel erkrankter Kühe waren genauso hoch oder höher als die Nicht-Erkrankter. Bandzaite *et al.* fanden eine negative Korrelation zwischen erhöhten PTH-Konzentrationen und niedrigen Calcium-Konzentrationen im Blut paretischer Kühe. Die PTH-Werte gesunder Kühe lagen zwischen 3,47 und 5,20pmol/L, die paretischer Kühe lagen zwischen 3,95 und 15,21pmol/L (Bandzaite *et al.* 2005). Murray *et al.* sehen eine herabgesetzte Osteoklasten-Sensibilität für PTH als Grund für die im Alter reduzierte ossäre Calcium-Mobilisierungsfähigkeit bei der Kuh (Murray *et al.* 2008). Armbrrecht *et al.* fanden bei alten Ratten eine reduzierte Fähigkeit von PTH, die renale $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese zu stimulieren (Armbrrecht 1986; Armbrrecht *et al.* 2003; Armbrrecht *et al.* 2007).

Smith et al. zeigten eine negative Korrelation zwischen erhöhten $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentrationen und niedrigen Calciumspiegeln bei erkrankten Kühen nach der Geburt (Smith *et al.* 1982). Barton et al. konnten in einer Studie die Gebärparese-Inzidenz durch $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Injektionen erhöhen (Barton *et al.* 1984). Horst et al. maßen bei paretischen Kühen einen präpartal erhöhten $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Wert, der mit der Geburt unter den Normwert abfiel (Horst *et al.* 1979).

Einfluss von Östrogen: Auch der Einfluss des Östrogenanstiegs am Ende der Trächtigkeit und sein Einfluss auf die Calcium-Homöostase sind untersucht worden, die Resultate sind jedoch widersprüchlich. Eine Erhöhung der VDR-Gen-Transkript-Konzentrationen wurde in mit Östrogen behandelten Ratten (Schwartz *et al.* 2000) und Mäusen (Duque *et al.* 2002) gemessen, während andere Versuchsgruppen höhere VDR-Konzentrationen in ovariectomierten Ratten maßen (Leonard *et al.* 2001). Bei paretischen Milchkühen wurden höhere Östrogenkonzentrationen als bei normo-calcämischen Kühen gemessen (Sechen *et al.* 1988).

Östrogen wird außerdem mit der Fettleber-Entwicklung (Grummer 1993) und Immunsuppression in Verbindung gebracht (Wyle und Kent 1977), die beide auch mit der Hypocalcämie vergesellschaftet sind.

Einfluss der Fütterung⁴: Während eine Calcium-reiche Diät (Jorgensen 1974) und durch Gülledüngung bedingte Kationen-reiche Diät (insbesondere Natrium und Kalium) die Gebärparese-Inzidenz erhöht (Block 1984), kann eine Calcium-arme Diät die Regulationsmechanismen der Calcium-Homöostase ebenso stimulieren (Goings *et al.* 1974; Green *et al.* 1981; Kichura *et al.* 1982) wie eine Phosphat-arme Diät (Barton *et al.* 1987). Eine Magnesium-arme Diät reduziert die Mobilisationsfähigkeit von Calcium (Contreras *et al.* 1982; van de Braak *et al.* 1987). Weiterhin stimuliert eine leicht azidotische Stoffwechsellage durch Zufütterung saurer Salze die Aktivität von PTH, welches als Folge eine erhöhte $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration im Blut induziert (Abu Damir *et al.* 1994; Phillippo *et al.* 1994).

⁴ Prävention der Gebärparese durch optimiertes Futtermanagement: Kapitel 2.3 (Hypocalcämie-Management)

Rassebedingte Prädisposition: Bei der Rasse Jersey wurde eine höhere Anfälligkeit zur Entwicklung der Hypocalcämie beschrieben (Harris 1981; Lean *et al.* 2006). Goff *et al.* fanden im Vergleich zur Rasse Holstein Frisean eine geringere Anzahl von VDR, wodurch ein Sensibilitätsverlust für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Zielgewebe hervorgerufen wird. Unterschiede der Hypocalcämie-Inzidenz innerhalb der Jersey Population können damit aber nicht erklärt werden (Goff *et al.* 1995).

Heredität: Die Heredität (Vererbbarkeit) von Gebärparese wird mit widersprüchlichen Werten zwischen 0,04 (Van Dorp *et al.* 1998) und 0,47 (Lyons *et al.* 1991) angegeben. Die meisten Werte liegen jedoch zwischen 0,09 und 0,13 (Uribe *et al.* 1995; Heringstad *et al.* 2005; Hossein-Zadeh und Ardalan 2010) und sind damit als gering einzustufen. Die Anzahl der Laktationen, bzw. das Alter, gilt als Risikofaktor zur Entwicklung einer Gebärparese (Abdel-Azim *et al.* 2005; Hossein-Zadeh und Ardalan 2010). Zusätzlich wurde über eine genetische Korrelationen zwischen Milchfieber und Ketose berichtet (Heringstad *et al.* 2005).

Altersbedingte Prädisposition: Bei Menschen (Ireland und Fordtran 1973), Kühen (Harris 1981) und Ratten (Armbrecht 1986) wurden erniedrigte Calciumaufnahme-Raten aus dem Darm mit erhöhtem Alter festgestellt.

Ebeling *et al.* stellten bei Frauen zwischen 20 und 87 Jahren eine geringere Konzentration intestinaler $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Rezeptoren (VDR) mit zunehmendem Alter fest (Ebeling *et al.* 1992). Kinyamu *et al.* sprachen der Abnahme der VDR-Konzentration jedoch nur eine Teilschuld an der abnehmenden Calcium-Aufnahme zu (Kinyamu *et al.* 1997). Andere Studien widerlegen die Abnahme der VDR mit dem Alter (Lee *et al.* 2003).

Horst *et al.* fanden bei jungen Ratten eine höhere Anzahl ungebundene VDR, aber gleiche Dissoziationskonstanten der Rezeptoren bei alten und jungen Ratten. Bei Infusion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gab es bei den jungen Ratten eine signifikant größere VDR-Hochregulierung (Horst *et al.* 1990). Liang *et al.* fanden weniger VDR- und Calbindin-mRNA in alten als in jungen Ratten (Liang *et al.* 1994). Liang *et al.* begründeten eine niedrigere Calcium-Aufnahme in isolierten Duodenumzellen alter Ratten mit niedrigen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Serum-Konzentrationen (Liang *et al.* 1989; Liang *et al.* 1991), während Wood *et al.* keine Abnahme der VDR-Konzentrationen, aber eine abnehmende Sensibilität für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ feststellten (Wood *et al.* 1998). Johnson *et al.* fanden bei 18 Monate alten Ratten außerdem eine

signifikant erhöhte Aktivität und erhöhte mRNA-Konzentration der renalen 24-Hydroxylase im Vergleich zu jüngeren Tieren (Johnson *et al.* 1995).

Auch bei der Milchkuh wurde eine erhöhte Gebärparese-Inzidenz mit zunehmendem Alter (ab der dritten Laktation) festgestellt (Curtis *et al.* 1984). Lean *et al.* fanden einen Anstieg der Gebärparese-Inzidenz von 9% pro Laktation (Lean *et al.* 2006). Gründe dafür können eine niedrigere Anzahl und Ansprechbarkeit des VDR mit erhöhtem Alter sein (Horst *et al.* 1990). Außerdem nimmt mit der Laktationszahl auch die Milchleistung zu, was einen erhöhten Calciumbedarf bei altersbedingt reduzierter Calcium-Transportrate aus dem Darm und Mobilisierungsrate aus dem Knochen mit sich führt (Horst *et al.* 2005). Liesegang *et al.* fanden jedoch bei Rindern der Rassen Holstein Frisean und Brown Swiss keine Abnahme von intestinalen VDR mit dem Alter (Liesegang *et al.* 2008).

Yamagishi *et al.* stellten in einer Studie eine negative Korrelation zwischen duodенaler Calbindin_{9k}-mRNA und dem Alter fest (Yamagishi *et al.* 2006), während Lee *et al.* eine altersbedingte Erhöhung der humanen Calbindin_{9k}-Expression im Duodenum entdeckten (Lee *et al.* 2003).

Vitamin-D-Rezeptor (VDR): Liesegang *et al.* stellten fest, dass die Anzahl des VDR bei der gesunden Kuh mit dem Zyklus der Laktation schwankt, wobei am Anfang jeder Laktation die VDR-Konzentration am geringsten ist (Liesegang *et al.* 2007). Goff *et al.* fanden aber keine unterschiedliche Anzahl der VDR im Colon gesunder und hypocalcämischer Jersey-Kühe (Goff *et al.* 1995).

In der Humanmedizin sind Variationen in der Gensequenz des VDR wiederholt als Grund für Störungen im Calciumstoffwechsel beschrieben worden. So sind Korrelationen zwischen Polymorphismen des VDR und verändertem Milch-Calcium-Gehalt, geringerer Knochendichte, erhöhtem Frakturrisiko, Osteoporose, Rachitis oder Osteomalazie nachgewiesen worden. In Studien wurde gezeigt, dass die Ansprechbarkeit des Rezeptors bei bestimmten Veränderungen herabgesetzt wird oder er in seiner Funktion maßgeblich beeinflusst wird⁵.

⁵ Eine ausführliche Erläuterung folgt in Kapitel 2.5.4 (Polymorphismen und Punktmutationen des VDR).

2.5 Vitamin-D-Rezeptor (VDR)

Die Signalverarbeitung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ über den intrazellulären Vitamin-D-Rezeptor (VDR) ist von zentraler Bedeutung bei der Umsetzung der Signalkaskade zwischen Calcitriol und der Expression Calcitriol-abhängiger Gene (DeLuca 2009) und somit der Regulation des Calcium- und Phosphor-Stoffwechsels.

Variationen der Gensequenz des VDR könnten analog zum Menschen Abweichungen in der Signalverarbeitung oder sogar einer Resistenz gegenüber Calcitriol bedingen und zu einer erhöhten Hypocalcämie-Inzidenz beitragen.

Bisher wurden mögliche Polymorphismen des Vitamin-D-Rezeptors bei der Milchkuh nicht als eine weitere Möglichkeit der individuell unterschiedlichen Signalverarbeitung und damit der Prädisposition zur Entwicklung einer Gebärparese nachgewiesen oder diskutiert.

2.5.1 Aufbau und Funktionsweise des VDR

Das 55kB lange Gen des bovinen VDR ist auf Chromosom 5 lokalisiert und enthält zehn Exons (Abb. 7).

Aufbau: Der VDR ist ein Liganden-bindender Transkriptionsfaktor aus der Gruppe der Steroidhormonrezeptoren (Fleet 2006). Durch Bindung an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aktiviert, reguliert er die Transkription von verschiedenen Genen. Er besteht aus 427 Aminosäuren und besitzt eine Hormon-bindende Domäne am COOH-Ende und zwei Zink-Finger-Motive in der hochkonservierten DNA-bindenden Domäne am NH₂-Ende, um an den Promotor (regulatorische Gensequenz) zu binden (Horst *et al.* 1994; Dusso *et al.* 2005).

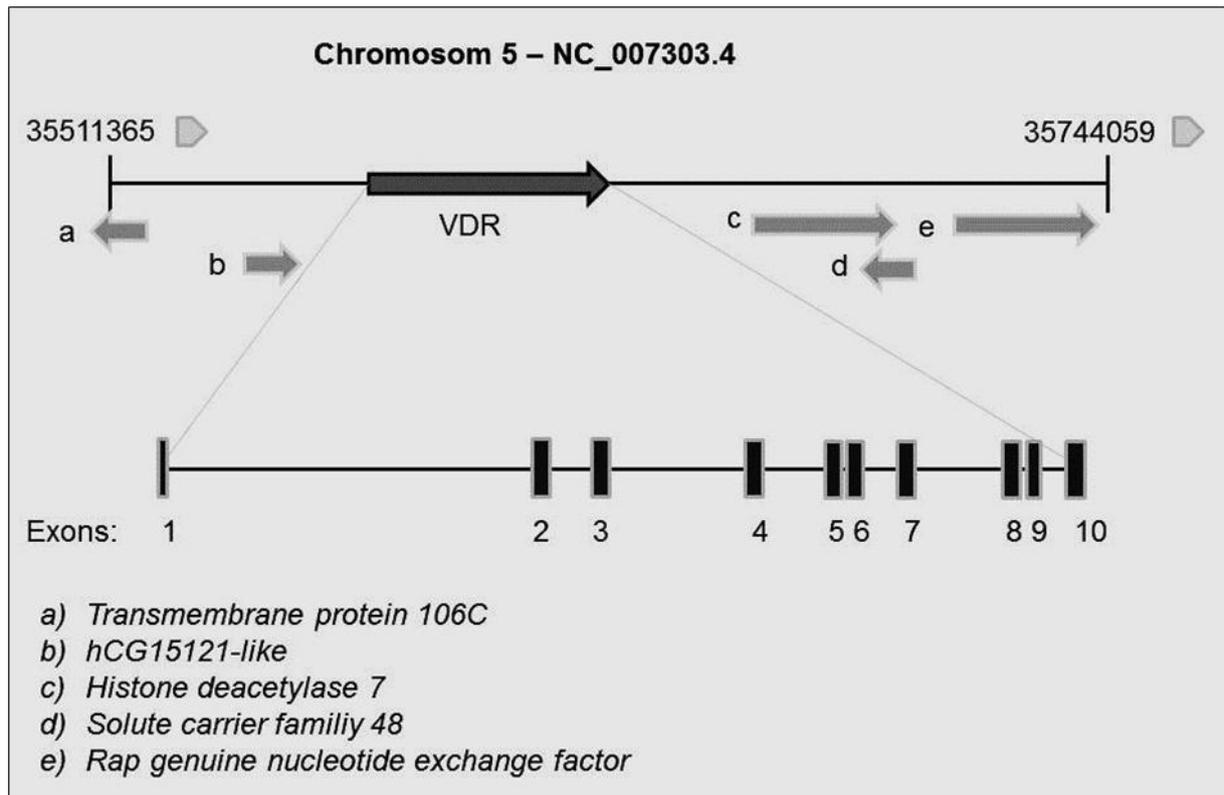


Abb. 7: Lokalisation des über 55kB langen bovinen VDR-Gens auf Chromosom 5 sowie die Anordnung der zehn Exons im Gen, modifiziert nach (NCBI 2011). a-e: Lokalisation anderer Gene auf dem Chromosom

Die in Abb. 8 dargestellten Domänen sind für die vier Hauptschritte des VDR zur Kontrolle der Gentranskription verantwortlich (Dusso *et al.* 2005).

- 1) Bindung des Liganden $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (E)
- 2) Heterodimerisation mit dem Retinoid-X-Rezeptor (H)
- 3) Bindung des Heterodimers an die DNA (DBD)
- 4) Rekrutierung der mit dem VDR interagierenden Hilfsproteine (Co-Regulatoren) zur Initiierung der Transkription (z.B. AF-2)

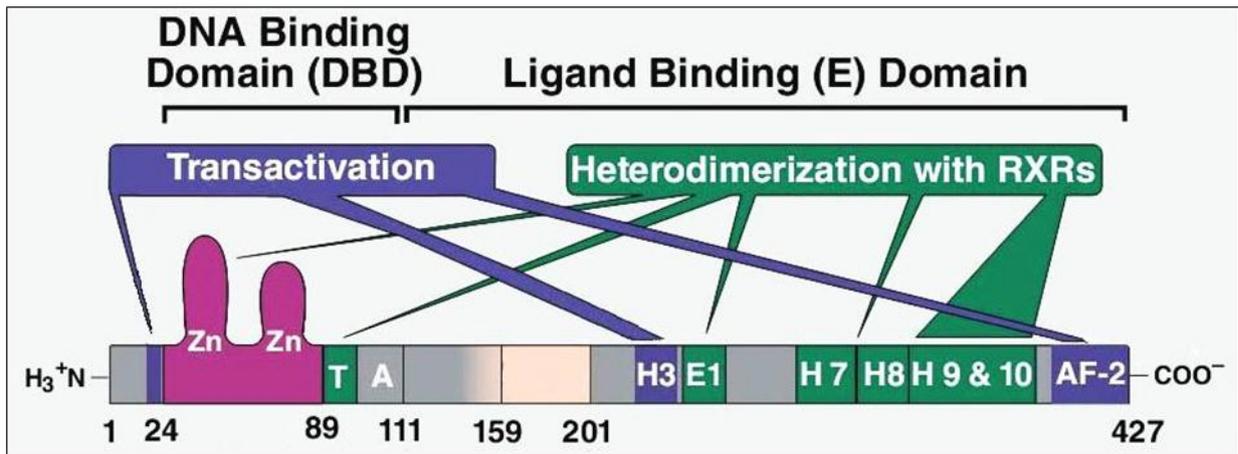


Abb. 8: Der VDR besteht aus 427 Aminosäuren. Dargestellt sind die funktionellen Domänen des humanen VDR: DNA-bindende Domäne (DBD) mit zwei Zink-Finger-Motiven (Zn) am H_3^+N -Ende, Liganden-bindende (E) Domäne mit α -Helices (H) zur Heterodimerisation mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) am COO^- -Ende und Domänen zur Transaktivierung (Konformationsänderung), insbesondere AF-2 (*ligand-dependent activation function*). Modifiziert nach (Haussler 2008).

Funktionsweise: Im Plasma an Vitamin-D-bindendes-Protein (DBP) gebunden, wird $1,25(OH)_2D_3$ zu den Zielorganen transportiert und diffundiert dort aufgrund seines lipophilen Charakters durch die Zellmembranen in die Zelle. Nach Bindung an den VDR bildet der $1,25(OH)_2D_3$ -VDR-Komplex mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) ein Dimer (MacDonald *et al.* 1993), welches sich an die Promotoren an der DNA anlagern kann. Diese Protein-Protein-Interaktion (VDR-RXR) dient der korrekten Positionierung der DNA-bindenden Domänen an ihre spezifischen DNA-Zielsequenzen (Kurokawa *et al.* 1993; Rastinejad *et al.* 1995; Haussler *et al.* 1997).

Für die Translokation aus dem Zytoplasma in den Zellkern spielt die AF-2-Domäne (*ligand-dependent activation function domain*) nahe dem $COOH$ -Ende eine wichtige Rolle. Durch die Hormonbindung wird eine Repositionierung der AF-2-Domäne herbeigeführt (Konformationsänderung), durch welche Motorproteine rekrutiert werden, die den Transport des VDR-Komplexes zur DNA steuern (Masuyama *et al.* 1997; Racz und Barsony 1999). Die Transkription wird nach Phosphorylierung des VDR (Hsieh *et al.* 1991) durch Dissoziation vom Co-Repressor und Bindung an den Co-Aktivator-Komplex initiiert (Haussler 2008).

Die Sequenz der Bindungsstelle des Hormon-Rezeptor-Komplexes an der DNA wird als *vitamin D response element* (VDRE) bezeichnet (Horst *et al.* 1994; Dusso *et al.* 2005). Den entsprechenden Bindungsabschnitt des Hormon-Rezeptor-Komplexes bezeichnet man als

HRE-Consensus-Sequenz. Sie besteht aus zwei hintereinander folgenden, identischen, meist hexamerischen Abschnitten von Nukleotiden (*direct repeats*) (Kurokawa *et al.* 1993), die durch mehrere (meist drei) Nukleotide, sogenannte Spacer, getrennt sind (Rachez und Freedman 2000; Dusso *et al.* 2005). Diese genau festgelegte Nukleotid-Abfolge gewährleistet eine spezifische Bindung der Protein-Dimere an die DNA (Perlmann *et al.* 1993).

Nach Bindung an den Promotor und Aktivierung von Hilfsproteinen stellt die RNA-Polymerase aus der im Kern vorliegenden DNA RNA her (Transkription). Die RNA verlässt den Zellkern und dient an den Ribosomen im Zytoplasma als Vorlage für die Proteinbiosynthese.

Hilfsproteine: Komplexe Zell- und Promotor-spezifische Hilfsproteine und Co-Aktivator- und Repressor-Moleküle (Abb. 9) sind an der Bindung des VDR-RXR-1,25(OH)₂D₃-Komplexes an die VDREs der Ziel-Gene und an der Transkription der Vitamin-D-abhängigen Gene beteiligt (DeLuca und Zierold 1998). Die zwei Hauptaufgaben der Hilfsproteine sind die „Lockerung“ des Chromatins und Aktivierung der RNA- Polymerase II für die Transkription. Beschrieben sind unter anderem *TATA-Box binding protein* (TBP), *TBP associated factors* (TAFs), *basal transkription factor* (TFIIB) (Haussler *et al.* 1997), p160 Co-Aktivatoren mit Histon-Acetylase-Aktivität (SRC-1, NcoA1, GRIP-1/ TIF2 und ACTR/pCIP) und der Co-Aktivatoren-Komplex DRIP (*VDR interaction protein*), welcher die RNA-Polymerase aktiviert (Christakos *et al.* 2003). Oft kommt den Hilfsproteinen eine bifunktionelle Rolle zu, je nach Konstellation induzieren oder hemmen sie die erfolgreiche Gentranskription (Dusso *et al.* 2005).

Regulationsproteine: In Versuchen mit Neuwelt-Primaten hat man außerdem zwei Gruppen von Vitamin-D-Regulationsproteinen gefunden. Zum einen *VDRE-binding proteins* (VDRE-BP), welche als dominant negative Inhibitoren die Interaktion der VDR-RXR Dimere zu ihrem VDRE blockieren. Sie gehören zur Gruppe der *heterogenous nuclear ribonucleoproteins* (hnRNPs). Man vermutet, dass diese Proteine bei Überexpression Rachitis bei den Primaten verursachen.

Die zweite Gruppe stellen die *intracellular vitamin D binding proteins* (IDBPs) dar, welche den intrazellulären Transport von Vitamin-D-Hormon und seinen Metaboliten regulieren

(Adams *et al.* 2004). Man geht davon aus, dass IDBPs zellspezifisch die Bindungsraten von VDR zu seinem Liganden modulieren (Dusso *et al.* 2005).

Der Abbau des VDR-Komplexes vollzieht sich über einen Proteosomen-Komplex, wobei die AF-2-Domäne des VDR mit *supressor for gal* (SUG1), einer Komponente des 26S-Proteosom, interagiert (Masuyama und MacDonald 1998).

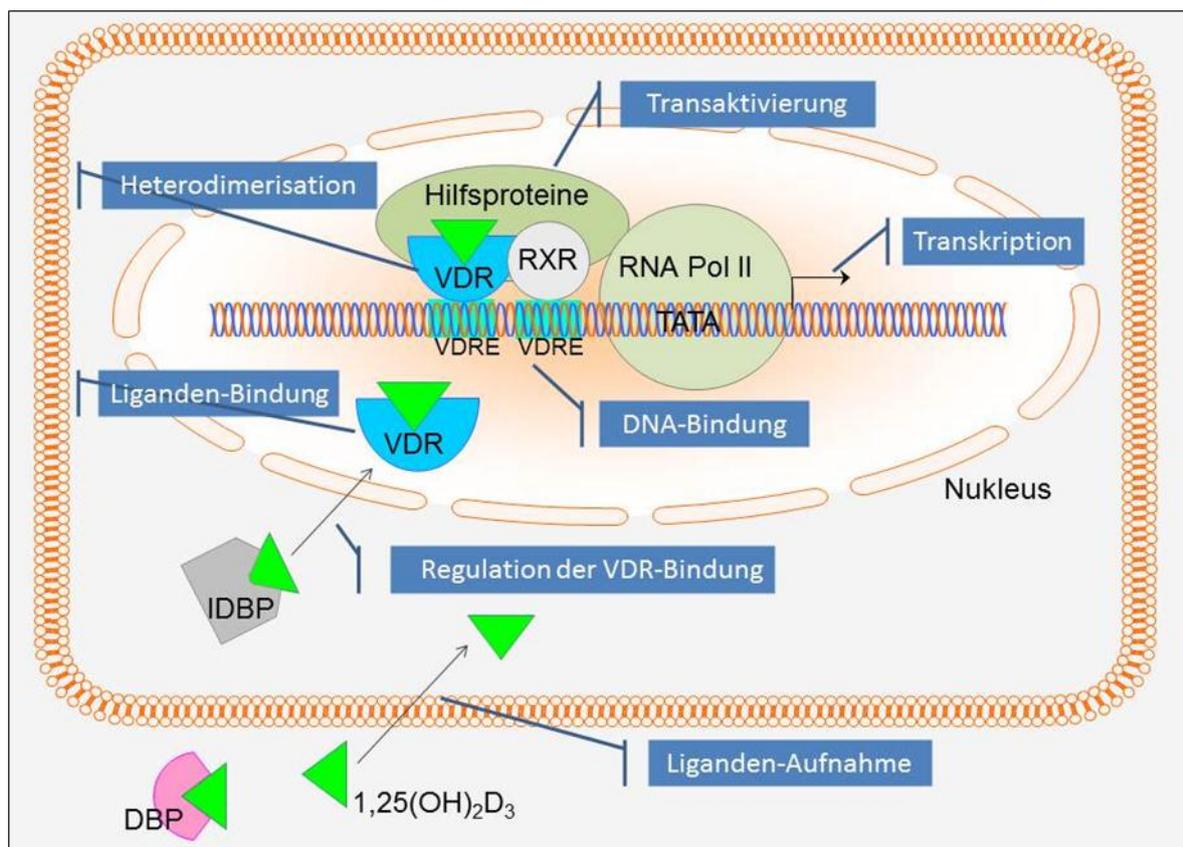


Abb. 9: Modell der Signalverarbeitung von 1,25(OH)₂D₃ über den VDR. 1,25(OH)₂D₃ zirkuliert an Vitamin-D-bindendes Protein (DBP) gebunden im Blut und diffundiert aufgrund seiner Lipophilie durch die Zellmembran der Zielzelle. Durch *intracellular vitamin D binding proteins* (IDBPs) wird 1,25(OH)₂D₃ entweder zur mitochondrialen 24-Hydroxylase transportiert und inaktiviert oder zum VDR transportiert. Der 1,25(OH)₂D₃-VDR-Komplex heterodimerisiert mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) und bindet an spezifische Sequenzen der Promotor-Region des Zielgens (VDREs). Das DNA-gebundene Heterodimer zieht Komponenten des RNA-Polymerase II-Prä-Initiations-Komplexes und nukleäre Transkriptionsregulatoren an, welche dann die Transkriptionsrate des Gens modifizieren. Modifiziert nach (Brown *et al.* 1999; Dusso *et al.* 2005).

Außer seiner Wirkung durch den VDR hat $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ noch VDR-unabhängige Zellfunktionen inne: schnelle Stimulierung von Ionen-Fluxen (Calcium-Aufnahme und Freisetzen intrazellulärer Calciumspeicher, z.B. über spannungsabhängige Calcium-Kanäle in Osteoblasten) und Aktivierung von Protein-Kinasen durch transkriptionsunabhängige Mechanismen, wie zum Beispiel Phospholipase C und D, Inositol 1,3,4-Triphosphat und 1,2-Diacylglycerol, Adenylatcyclasen, *extracellular response activated kinase* (ERK) und *mitogen activated protein kinase* (MAPK, z.B. in Leukämiezellen) oder Stimulation der Insulinsekretion im Pankreas (Fleet 2004; Norman *et al.* 2004).

2.5.2 Vorkommen

Der VDR wird nicht nur in Niere, Knochen und Darm, sondern auch in vielen anderen Geweben exprimiert (Tab. 3): z.B. Leber, Schilddrüse, Nebenniere, Brust (Berger *et al.* 1988), Epidermis, Haarschaft, Talgdrüsen, Hypophyse, Nebenschilddrüse, Gonaden, Thymus, Pankreas, Magen und Haut (Stumpf *et al.* 1979).

Tab. 3: VDR-Vorkommen in Geweben mit und ohne Beteiligung an der Calcium-Homöostase (Holick 1995)

VDR-Vorkommen in Geweben, die an der Calcium-Homöostase beteiligt sind	VDR-Vorkommen in Geweben, die nicht an der Calcium-Homöostase beteiligt sind		
Dünndarm Knochen Niere	Hypophyse Prostata Gonaden Thymus Nebenschilddrüse	Pankreas Brust Magen Plazenta Epidermis Melanozyten	Haarfollikel Dermis Monozyten Lymphozyten Myozyten Herzmuskel

Die Haut ist beispielsweise nicht nur Entstehungsort, sondern auch Zielorgan des Vitamin-D-Hormons: $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wirkt inhibierend auf die Keratinozyten-Proliferation, aber stimulierend auf die epidermale Differenzierung (Smith *et al.* 1986).

Evans *et al.* entdeckten einen Einfluss von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die fetal-plazentale Entwicklung (Evans *et al.* 2004).

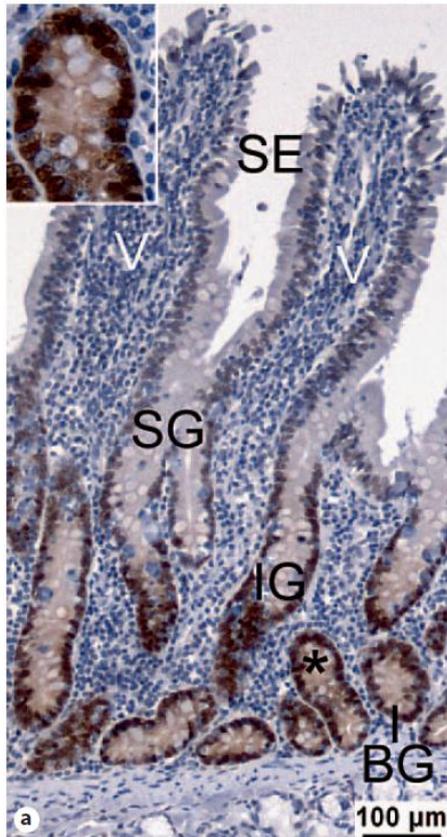


Abb. 10: Starke Expression von VDR in basalen Drüsen- und Krypten-Epithelzellen (BG) im Duodenum der Ziege (Boos *et al.* 2007). Legende: oberflächliche Epithel- (SE), Drüsen- und Krypten-Epithelzellen (SG), intermediäre Drüsen- und Krypten-Epithelzellen (IG), Villus (V)

Verteilung: Die VDR weisen ein deutliches Segment-spezifisches Verteilungsmuster in Magen-Darm-Trakt von Ziege (Boos *et al.* 2007), Schaf (Riner *et al.* 2008) und Rind (Liesegang *et al.* 2008) auf. In den genannten Studien wurde die Rezeptor-Konzentration semiquantitativ mittels nukleärer VDR-Immunreaktion gemessen. So weisen oberflächliche Enterozyten und Kryptenzellen eine geringe VDR-Konzentration auf, während basale und intermediär lokalisierte Zellen eine höhere VDR-Konzentration zeigten (Abb. 10).

Die Befunde der Segmente mit hoch exprimiertem VDR decken sich mit den Abschnitten der höchsten Calciumaufnahme (Schröder *et al.* 1997). Die Verteilung ist im *Duodenum* am stärksten und im *Colon descendens* am schwächsten ausgeprägt. Signifikante Einflüsse von Alter und Rasse konnten nicht verzeichnet werden (Liesegang *et al.* 2008)

2.5.3 Zielproteine

Der VDR beeinflusst die Expression von über 200 Genen sowohl positiv als auch negativ (Horst *et al.* 1994; Holick 2006). Neben Genen, deren Proteinprodukte die Calcium-Homöostase kontrollieren (z.B. TRPV6, Osteocalcin, 25(OH)D₃, 24-Hydroxylase, Calbindin), werden aber auch andere Proteine, wie zum Beispiel solche zur Immunmodulation beeinflusst (Christakos *et al.* 2003).

Positiv kontrollierte Gene sind unter anderem Osteopontin (Noda *et al.* 1990), Vitamin-D-24-Hydroxylase (Ohyama *et al.* 1994) und β 3-Integrin (Cao *et al.* 1993). Negativ kontrollierte VDRE (Haussler *et al.* 1995) existieren in der 5'-Region von Kollagen-Typ I (Pavlin *et al.* 1994), Sialoprotein im Knochen (Li und Sodek 1993), PTH (Demay *et al.* 1992) und *PTH-*

related peptide (Falzon 1996; Kremer *et al.* 1996). Die genauen Mechanismen, mit denen der VDR Gene sowohl positiv als auch negativ kontrolliert, sind noch nicht vollständig geklärt (Hausler *et al.* 1997). Bekannt ist aber beispielsweise, dass die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -vermittelte Down-Regulierung von PTH über den VDR ohne RXR-Bindung abläuft, was zu der Überlegung führte, dass die Repression der VDR-abhängigen Gene andere Mechanismen aufweisen könnte, als die der Stimulierung (Mackey *et al.* 1996).

2.5.4 Polymorphismen und Punktmutationen des VDR

In der Humanmedizin liegt der VDR-Forschungsschwerpunkt in der Entwicklung von Prophylaxe-Strategien gegen Rachitis, Osteoporose und Osteomalazie (Holick 2003; Holick 2006).

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden mithilfe von Restriktionsenzymen (*BsmI*, *ApaI*, *TaqI*) Nukleotid-Sequenzen bestimmter Abschnitte des menschlichen VDR-Gens untersucht, um Polymorphismen (individuelle Abweichungen der Ursprungssequenz) festzustellen. Diese allelischen Variationen des VDR wurden mit verschiedenen Krankheitskomplexen wie Osteoporose, Frakturhäufigkeit oder unterschiedlichen Calcium-Gehalten in Blut, Milch oder Knochen korreliert. Verschiedene Mutationen des VDR wurden beispielsweise für die autosomal rezessive Vitamin-D-Resistenz (*hereditary vitamin D resistance rickets*, HVDRR) verantwortlich gemacht (Rut *et al.* 1994; Malloy *et al.* 1997).

Die mithilfe der Restriktionsenzyme gefundenen Basenabweichungen lagen dabei sowohl in Intron- (*BsmI*, *ApaI*) als auch in Exon-Bereichen des VDR-Gens (*TaqI*, *FokI*). Bisher wurden jedoch nur nicht-funktionelle Polymorphismen in größeren Screening-Studien untersucht, die keinen Effekt auf die kodierende Sequenz erkennen lassen (Uitterlinden *et al.* 2002). Basen-Alterationen in Exons können direkte Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz und damit auf das Protein haben, während Alterationen in der Promotor- oder 3'UTR-Region des Gens die mRNA-Expressionsraten und -Stabilität beeinflussen können. Korrelationen zwischen Krankheitskomplexen und Polymorphismen in Intron-Bereichen werden durch gekoppelte Vererbung mit funktionellen Polymorphismen erklärt. Sie können als Marker in der Genanalyse eingesetzt werden (Uitterlinden *et al.* 2002).

Funktionelle Mutationen in Exons können je nach Lokalisation bestimmte Funktionen des VDR beeinträchtigen. Whitfield *et al.* entdeckten zwei Punktmutationen in der Ligandenbindenden Domäne des VDR (I314S, R391C), welche die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -abhängige

Transaktivierung und Heterodimerisierung mit dem RXR negativ beeinflussen (Whitfield *et al.* 1996). Mutationen im Bereich der Zinkfinger beeinflussen die DNA-Bindung (Sone *et al.* 1990), Mutationen am C-Terminus beeinflussen die Hormon-Bindung oder Heterodimerisierung (Abb. 11).

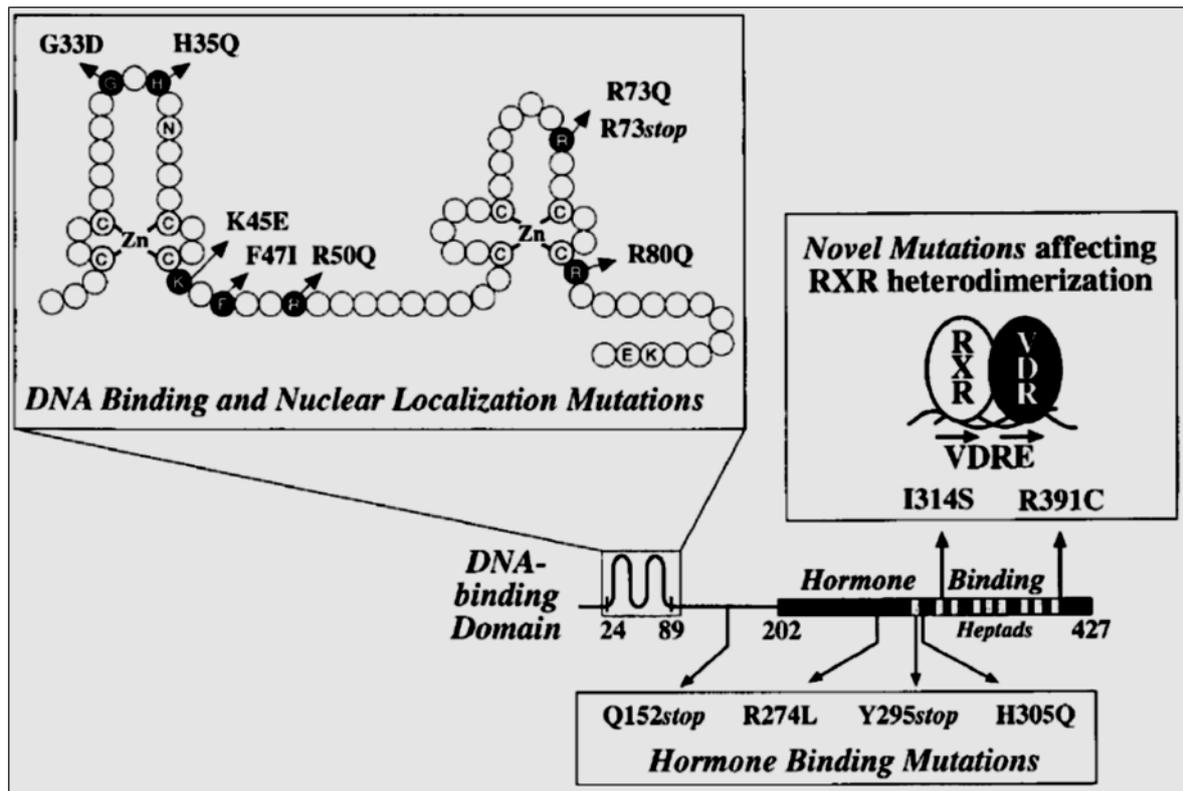


Abb. 11: Natürliche Mutationen des humanen VDR, welche zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Resistenzen führen können. Je nach Lokalisation der Mutation sind unterschiedliche Funktionen des Rezeptors gestört. Dargestellt sind bekannte Mutationen mit Auswirkungen auf die Bindung des VDR mit der DNA, auf die Bindung des VDR mit seinem Liganden und auf die Heterodimerisierung mit dem RXR. Nach (Hausler *et al.* 1997).

Verschiedene Arbeitsgruppen haben die Auswirkungen von VDR-Polymorphismen untersucht. Nachfolgend sollen drei Arbeiten stellvertretend genannt werden.

Fang *et al.* haben den Zusammenhang zwischen Polymorphismen des Vitamin-D-Rezeptors und dem Auftreten von Osteoporose untersucht. Bei 6148 Patienten mit insgesamt 937 Frakturen wurde das VDR-Gen auf 15 verschiedene SNP geprüft. Bei Patienten mit bestimmten Normabweichungen der Nukleotid-Sequenz wurde ein erhöhtes Frakturrisiko

festgestellt. Multiple Abweichungen gingen mit erniedrigten VDR-mRNA-Konzentrationen in Osteoblasten einher (Fang *et al.* 2005).

Wood *et al.* haben einen Zusammenhang zwischen Polymorphismen im humanen VDR-Gen und einem mit geringerer Knochendichte einhergehenden erhöhten Frakturrisiko aufzeigen können und stellten bei Vorliegen von Mutationen in funktionell kritischen Arealen des VDR-Gens deutliche Effekte auf den Calciumstoffwechsel fest (Wood 1998).

In einer Studie von Bezerra *et al.* wurde der Einfluss von unterschiedlichen *Apal-Bsml-Taql*-Haplotypen auf Knochenmasse und Milch-Calcium-Gehalt bei jugendlichen Müttern nachgewiesen. Die Autoren testeten Blut- und Milchproben von im Schnitt 16,4 Jahre alten laktierenden brasilianischen Müttern, analysierten deren Calcium-Aufnahme mittels des Programms *The food processor* (ESHA research) und maßen die Gesamt- und lumbale Knochendichte mittels Röntgen-Absorptiometer. Dabei fielen Unterschiede in der Knochendichte, der Milch-Calcium-Konzentration und Serum-Parathormon-Konzentration bei abweichenden VDR-Nukleotid-Sequenzen auf (Bezerra *et al.* 2008).

Die Ergebnisse von Bezerra waren ausschlaggebend für diese Studie, Genvariationen im VDR-Gen auch bei der Milchkuh zu untersuchen und auf Korrelationen mit der häufigsten Calcium-Homöostase-Entgleisung der Kuh, mit der Gebärparese, zu testen.

In BLAST konnte eine Homologie der humanen (NC_000012.11) und bovinen (NC_007303.4) VDR-DNA von 80,2% ermittelt werden. Ein *alignment* der humanen und bovinen *open reading frames* (ORF) der VDR-mRNA mit dem Programm Jellyfish® ergab eine Homologie von 88,8%, das humane und bovine VDR-Protein waren sogar zu 90% homolog.

In der Studie von Bezerra wurden jugendliche Mütter mit unterdurchschnittlichen Calcium-Einnahmen ausgesucht, um Einflüsse auf eine geringe Knochendichte in jungen Jahren zu untersuchen, die maßgeblich an der Entstehung von Osteoporose im Alter beteiligt sind.

Im Gegensatz dazu wurde in dieser Studie der Schwerpunkt auf Milchkühe in einer fortgeschrittenen Laktation mit durchschnittlichen Calcium-Einnahmen gelegt, um dem Krankheitsbild der Gebärparese Rechnung zu tragen, welches in der Regel vermehrt in einer fortgeschrittenen Laktation auftritt.

2.6 Zusammenfassung und daraus resultierende Aufgabenstellung

Die Hypocalcämie gehört zu den wichtigsten Störungen des Mineralstoffwechsels der modernen Milchviehhaltung, da zu Beginn der Laktation viele Milchkühe unter einem abfallenden Blut-Calcium-Spiegel leiden. Fällt dieser unter den physiologischen Schwellenwert von 2,0mmol/l kommt es zur Hypocalcämie. Die Hypocalcämie ist im subklinischen Bereich mit leistungsmindernden Begleiterkrankungen vergesellschaftet, im klinischen Bereich (<1,4mmol/l) kommt es zu einer schlaffen Lähmung mit Festliegen (Kap. 2.1). Der Körper reagiert auf die Hypocalcämie mit einem Anstieg von PTH und darauf folgend mit einer verstärkten Synthese von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Diese beiden Botenstoffe heben den Blut-Calcium-Spiegel durch verstärkte Calcium-Absorption aus dem Magen-Darm-Trakt, Calcium-Mobilisierung aus dem Knochen und gesteigerte Calcium-Reabsorption in der Niere (Kap. 2.2). Die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird über den intrazellulären Vitamin-D-Rezeptor vermittelt. Durch Bildung eines $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR-RXR Komplexes und darauffolgende Anlagerung an *vitamin D response elements* der DNA wird die Genexpression verschiedener Calcium-Homöostase-regulierender Proteine stimuliert. So wird zum Beispiel die Proteinbiosynthese verschiedener Calciumtransporter und -kanäle, aber auch die Synthese von PTH, VDR und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verstärkt (Kap. 2.2.5). Durch gezielte Prophylaxe-Maßnahmen, Therapieansätze und züchterischen Einfluss versucht man der Entstehung einer Hypocalcämie entgegenzuwirken (Kap. 2.3), außerdem gibt es verschiedene Ansätze, eine individuell erhöhte Anfälligkeit für die Entgleisung der Calcium-Homöostase zu erklären (Kap. 2.4). In der humanmedizinischen Forschung ist der Zusammenhang zwischen Abweichungen in der Gensequenz des VDR und Variationen seiner Funktionalität bzw. Störungen im Calciumhaushalt untersucht worden. Zwischen humaner und boviner VDR-DNA existiert eine Homologie von 80,2%, die ORF der humanen und bovinen VDR-mRNA ist sogar zu 88,8% homolog (Kap. 2.5.4).

Aufgrund der vorgestellten Literatur ergibt sich folgende Fragestellung:

Existieren Gen-Sequenz-Variationen im Vitamin-D-Rezeptor-Gen der Milchkuh, die mit einer erhöhten Anfälligkeit für Gebärparese einhergehen?

Im ersten Schritt der vorliegenden Arbeit sollen für das VDR-Protein kodierende Abschnitte des VDR-Gens (Exons) von Milchkühen sequenziert werden und auf Sequenz-Variationen zwischen den Tieren, zur veröffentlichten Sequenz auf NCBI und auf deren potentielle Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz untersucht werden.

Im zweiten Schritt sollen eventuelle Sequenzalterationen mit der Krankengeschichte (vorangegangene Hypocalcämie) der Tiere korreliert werden.

Bei Verifizierung der Arbeitshypothese ergeben sich neue Möglichkeiten, züchterisch auf die Ausprägung erwünschter und unerwünschter SNP einzuwirken.

3 Versuchstiere, Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Der Betrieb

Alle Versuchstiere stammen aus einem Milchviehbetrieb in Gotha/ Thüringen, dessen Rinderbestand hauptsächlich der Rasse Holstein Frisean angehört. Der Betrieb führt durchschnittlich 960 laktierende Kühe und 140 Färsen aus eigener Nachzucht, dazu 100 Kälber. 2007 wurde eine Milchproduktion von durchschnittlich 9600 kg Milch pro Kuh und Jahr verzeichnet (4,2 % Fett, 3,3% Eiweiß). Die Kälber werden spätestens eine Stunde *post partum* von der Mutter getrennt und in Kälberiglus aufgezogen. Weibliche Kälber werden nach vier Wochen in einen Aufzuchtbetrieb nach Wechmar, Weimar abgegeben, Fresser in einem Färsen-Aufzuchtbetrieb eingestallt und als tragende Färsen zurückgekauft. Männliche Kälber werden mit zwei bis drei Wochen verkauft. Die adulten Rinder leben in Gruppen zu 100 Tieren in Boxenlaufställen mit Spaltenboden. Die Milchgewinnung erfolgt drei Mal pro Tag in regelmäßigen Abständen im Milchkarussell.

3.1.2 Probennahme

Es wurde von 26 Milchkühen (Rasse Holstein Friesian) Blut aus der *Vena coccygea* in EDTA-Röhrchen entnommen. Das Blut wurde bei Raumtemperatur gelagert und daraus die DNA innerhalb von 48 Stunden isoliert.

Die Tiere wurden mithilfe des computergestützten Herdenmanagement-Systems ausgewählt, da in diesem alle Beobachtungen der vorangegangenen und auch der Verlauf der aktuellen Laktation aufgezeichnet wurden. So konnten Tiere ausgewählt werden, die nicht miteinander verwandt waren und sich mindestens in ihrer vierten Laktation befanden, da die Anfälligkeit für Gebärpause in der Regel mit dem Alter zunimmt (Kap. 2.4).

Die Versuchstiere wurden den folgenden zwei Gruppen zugeordnet (Tab. 4):

1. mit Vorbericht „Hypocalcämie“ in mindestens einer vorangegangenen oder der aktuellen Laktation (17 Tiere)
2. ohne vorberichtliche Störung des Calcium-Haushalts (9 Tiere)

Tab. 4: Ohrmarkennummern der 26 Versuchstiere, Angaben zu Elterntieren, Anzahl der vorangegangenen Laktationen und Einteilung in zwei Versuchsgruppen nach Krankheitsgeschichte: vorangegangene Hypocalcämie (*Hypocalcämie, Gruppe 1) oder ohne vorberichtliche Störung des Calcium-Haushalts (*ohne Störung, Gruppe 2).

	Nr.	Ohrmarke	Vater	Mutter	Laktation	Calciumhaushalt
Gruppe 1	1	63143	Lentini RF	DE1600760100	5	Hypocalcämie
	2	60698	Celsius	DE001600576620	6	Hypocalcämie
	3	60105	Diaposen	DE1600257418	6	Hypocalcämie
	4	63139	Lake	DE1600576722	5	Hypocalcämie
	5	63183	Maniser	DE1600760198	5	Hypocalcämie
	6	86374	Raimon	DE1600317471	6	Hypocalcämie
	7	42038	821511	DE001502711224	6	Hypocalcämie
	8	60854	Blackred RF	DE001600317073	6	Hypocalcämie
	9	63018	Bestow	DE001600317783	6	Hypocalcämie
	10	60852	Rudor	DE002282101531	5	Hypocalcämie
	11	63023	Hattrick	DE001600760169	5	Hypocalcämie
	12	63655	Lombi	DE1600760673	4	Hypocalcämie
	13	86045	Petterson	DE2282109110	6	Hypocalcämie
	14	86321	Heldor	DE1600317513	6	Hypocalcämie
	15	63663	Sektor	DE1600760187	4	Hypocalcämie
	16	86334	Cutis	DE2282108746	5	Hypocalcämie
	17	63168	Cadon	DE001600760324	5	Hypocalcämie
Gruppe 2	18	63455	Ciso	DE1600317647	5	ohne Störung
	19	86145	Ladin	DE002282112366	6	ohne Störung
	20	86235	Lobach	DE001600317330	5	ohne Störung
	21	63030	Pedant	DE002282109503	5	ohne Störung
	22	86588	Lukas	DE1600317700	5	ohne Störung
	23	63439	Lake	DE002282108860	5	ohne Störung
	24	86463	Johann	DE0012282101498	6	ohne Störung
	25	63511	Lynch	DE001600760778	5	ohne Störung
	26	63537	Trailor	DE001600760637	5	ohne Störung

3.2 Probenaufbereitung

3.2.1 DNA-Isolierung

In Zusammenarbeit mit dem Institut für kardiale Diagnostik und Therapie GmbH, Berlin (IKDT) wurde aus der Leukozyten-Fraktion des EDTA Blutes DNA nach in Tab. 5 ersichtlichen Schema gewonnen.

Tab. 5: Arbeitsschritte der DNA-Isolierung aus EDTA-Blut

Arbeitsschritt	Technik
Präparation der Leukozyten	3ml EDTA Blut + 12ml Erylyse Puffer (4,14g NH ₄ Cl; 0,5g KHCO ₃ ; 0,018g EDTA) Zentrifugation: 5 min bei 4000g, Überstand verworfen Insgesamt 3-mal, bis Sediment farblos
DNA-Isolation gemäß Protokoll des Herstellers	Puregene Core Kit A (Qiagen GmbH, Hilden) und Puregene Proteinase K (Qiagen GmbH, Hilden)
Konzentrationsbestimmung	mittels Photometer bei 260nm Wellenlänge, Multiplikation mit DNA Faktor: $1OD_{260nm} = 50\mu\text{g/ml}$ und Verdünnungsfaktor
Lagerung	bei -20°C

3.2.2 Primeretablierung und PCR

Acht Primerpaare wurden so ausgewählt, dass lediglich die zehn Exons (für Proteine kodierende Abschnitte) mit teilweise anschließenden Intron-Bereichen (nicht kodierende Bereiche) amplifiziert wurden (Abb. 12), da die Sequenzierung des gesamten 55kB langen bovinen VDR-Gens zu aufwendig war.

Um nur die Exons zu sequenzieren, wurden sequenz-spezifische Primer entwickelt, die nur kleine Fragmente mit den gewünschten Informationen eingrenzen. Diese Fragmente wurden dann mittels *polymerase chain reaction* (PCR) vervielfältigt und anschließend sequenziert.

Das Primerdesign erfolgte mit dem Programm „Primer3“ (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) auf Basis der *predicted version* (Version von 2008) des *bos taurus* VDR-Gens, wobei auf eine für die Sequenzierung optimierte Fragmentgröße von 400-600 Basenpaaren abgezielt wurde. Bei der Etablierung der Primer wurde eine Primer-Länge von 20 Basen bei ausgeglichenem Adenosin/Thymin- zu Cytosin/Guanin-Verhältnis und ähnliche Schmelzpunkte zwischen 55°C und 80°C angestrebt. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Primer mit- und untereinander keine Haarnadeln oder Dimere entwickeln können, welche eine korrekte Anlagerung an die DNA beeinträchtigen würden.

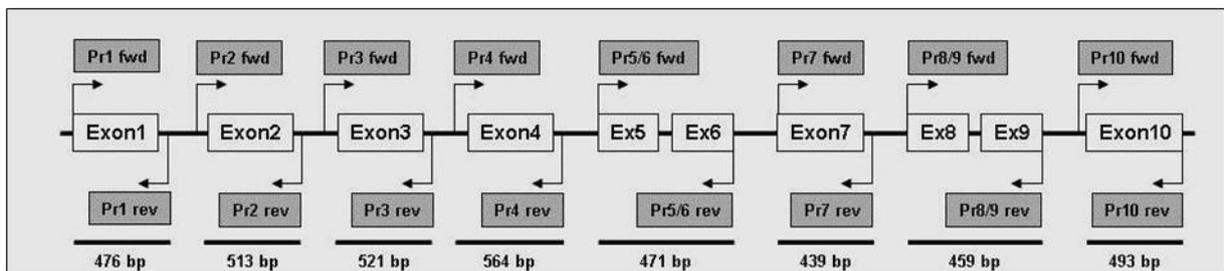


Abb. 12: Positionierung der acht Primerpaare in Exon- und Intron-Bereichen mit Angaben zu Größen der entstehenden PCR-Produkte

Die Hybridisierungstemperatur der Primerpaare für die PCR wurde anhand der Schmelzpunkte der einzelnen Primer mithilfe des Sequenzbearbeitungsprogramms von TIB Biomol (Berlin, Deutschland) optimiert.

In BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) wurden die Primer hinsichtlich unspezifischer Bindungen mit dem Rindergenom untersucht, um die Amplifikation falscher Genabschnitte zu verhindern. Dabei ergaben sich die in Tab. 6 ersichtlichen Primersequenzen und Hybridisierungstemperaturen.

Tab. 6: Exons mit zugehörigen Primerpaaren, Lokalisation, Fragmentgröße, Primernamen, (fwd: *forward*; rev: *reverse*), Schmelztemperatur, Hybridisierungstemperatur und Primersequenzen.

	Lokalisation des Exons im Gen	Größe des PCR-Fragmentes	Primername	Primersequenzen	Schmelzpunkt	Hybridisierungstemperatur
Exon 1	1...47	476 bp	Pr1 fwd	5'-agcgcggagcagcgtgc	66,8 °C	62 °C
			Pr1 rev	5'-cccattgatggcacctgcgag	62,6 °C	
Exon 2	21815...21896	510 bp	Pr2 fwd	5'-caacacagggctgtacataaagc	57,8 °C	58 °C
			Pr2 rev	5'-aggccatagatgcctagacctc	57,2 °C	
Exon 3	25299...25446	521 bp	Pr3 fwd	5'-gctcgactttgctgagcttc	56,9 °C	56 °C
			Pr3 rev	5'-ctcctaccattgatgatcagagc	55,0 °C	
Exon 4	34783...34913	563 bp	Pr4 fwd	5'-gtcacaggctctctcatgca	55,6 °C	58 °C
			Pr4 rev	5'-ctgagacttcacgctattctcaca	57,0 °C	
Exon 5/6	42153...42337 42509...42623	471 bp	Pr5/6 fwd	5'-cctgactgatgaagaagtgcag	55,9 °C	56 °C
			Pr5/6 rev	5'-ggatcactgtacctcctctccag	57,2 °C	
Exon 7	45391...45562	439 bp	Pr7 fwd	5'-gacacaatggagccaaccag	57,7 °C	56 °C
			Pr7 rev	5'-gacactgcccagtggaagttc	55,0 °C	
Exon 8/9	53438...53592	459 bp	Pr8/9 fwd	5'-acctcaccctgaggaccagatc	63,0 °C	60 °C
			Pr8/9 rev	5'-ccatctgcattgtctccccag	60,5 °C	
Exon 10	53780...53896 55394...55653	492 bp	Pr10 fwd	5'-gagacgaggtgggacaggac	58,3 °C	58 °C
			Pr10 rev	5'-gtttggcaacgagatctcctga	59,2 °C	

Die PCR wird als *in vitro* Amplifikation eines DNA-Fragmentes durch ein Primerpaar (zwei Oligonukleotidprimer) mithilfe hitzestabiler DNA-Polymerasen definiert. Die DNA-Doppelstränge werden zunächst durch Hitze denaturiert. Es folgt die Anlagerung der Primer an ihre komplementäre Basensequenz und davon ausgehend die Synthese eines neuen komplementären DNA Strangs mithilfe der DNA-Polymerase. Danach wiederholt sich der Zyklus und die DNA-Fragmente werden exponentiell vervielfältigt. Der neu-synthetisierte DNA Strang dient dabei jeweils als Matrize für alle folgenden (Lottspeich und Zorbass 1998b).

Die PCR besteht aus folgenden Phasen:

Denaturierung:	Auftrennen des Doppelstranges in Einzelstränge
Hybridisierung:	Ansetzen der Primer (Annealing)
Neusynthese:	Verlängerung des Amplifikats mittels DNA-Polymerase (Extension)
Synthese:	Elongation

In Tab. 7 sind die für den Ansatz der PCR benötigten Materialien zusammengestellt.

Tab. 7: PCR-Ansatz mit Angaben der Hersteller und der eingesetzten Materialien

Materialien	Hersteller
ca. 200ng genomische DNA (<i>templates</i>)	
2µl Primer forward (60ng/µl)	TIB Biomol GmbH, Berlin
2µl Primer reverse (60ng/µl)	TIB Biomol GmbH, Berlin
8µl 1,25 mM dNTP-Mix	Promega GmbH, Mannheim
5µl 10x PCR Puffer (mit 15 mM MgCl ₂)	Applied Biosystems, Foster City, USA
0,5µl AmpliTaq DNA-Polymerase (5U/µl)	Applied Biosystems, Foster City, USA
DEPC-Wasser ad 50µl	

Die PCR erfolgte in einem Thermocycler mit Gradientenfunktion (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg) nach dem in Tab. 8 ersichtlichen Programm.

Tab. 8: PCR-Protokoll mit Angaben von Temperatur und Zeit

		Temperatur	Zeit
Initial	Denaturierung	95°C	5 min
40 Zyklen	Denaturierung	95°C	10 sec
	Hybridisierung (Annealing)	entsprechend Tab. 6	30 sec
	Neusynthese (Extension)	72°C	60 sec
Abschließend	Synthese (Elongation)	72°C	10 min

Zur Optimierung von Primern und Proben wurden Hybridisierungstemperaturen, Probenmenge und Konzentrationen mehrfach getestet und angeglichen. Da die AmpliTaq-Poymerase bei Raumtemperatur aktiviert wird, wurde der Reaktionsansatz auf Eis pipettiert.

3.2.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Kontrolle der Fragmentgrößen wurden die PCR-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden sie mit 2µl Probenpuffer (2,38ml Glycerol, 25mg Bromphenol Blau) versetzt und auf 2µl Ethidiumbromid enthaltendes 2%iges Agarosegel aufgetragen. Zur eindeutigen Größenbestimmung der Fragmente wurde in die äußeren Geltaschen je ein DNA-Längenstandard (TrackIt 100bp DNA-Ladder, Invitrogen) pipettiert.

Die Auftrennung erfolgte bei 100 Volt für 30 Minuten nach Ladung und Größe. Die Fragmente wurden mittels GeneGenius Gel Imaging System (Syngene, Cambridge, USA) sichtbar gemacht (Abb. 13).

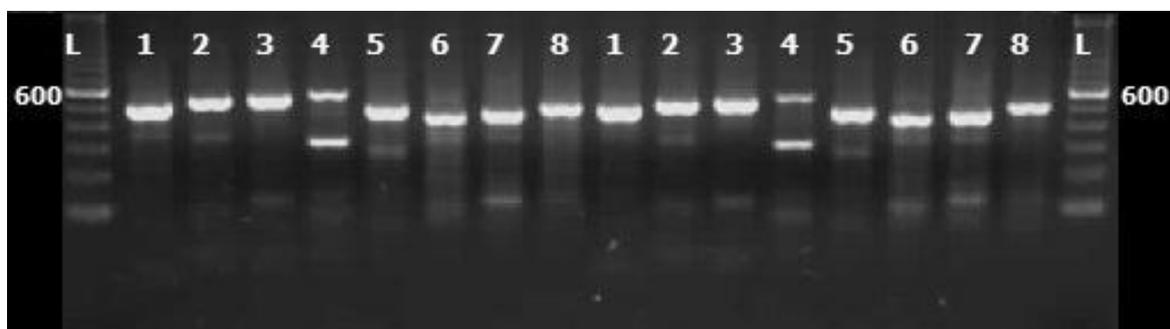


Abb. 13: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Die zu Exon 4 gehörigen Fragmente zeigen unspezifische Doppelbanden, die durch Erhöhung der Hybridisierungstemperatur später reduziert wurden.

3.2.4 Sequenzierung

Um überschüssige Primer und Nukleotide zu entfernen, wurden die PCR-Produkte vor der Sequenzierungsreaktion zunächst mit 1µl EXOSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, USA) pro 10µl Probe für 15 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung von EXOSAP-IT wurden die Proben anschließend für 15 min bei 80°C inkubiert.

Die PCR-Produkte wurden zur Herstellung von DNA-Einzelsträngen (Hin- oder Rückstrang) mit *sense* und *anti sense* Primern jeweils separat sequenziert. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit Genome Lab™ DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA) durchgeführt (Tab. 9).

Das Prinzip der DNA-Sequenzierung entspricht der Amplifizierung eines gewünschten DNA-Einzelstranges gemäß PCR, jedoch wird durch im Kit enthaltene farbmarkierte Didesoxynukleotide (Dye-Terminatoren) der Neusynthesevorgang immer wieder abgebrochen, sodass am Ende verschieden lange DNA Fragmente mit farblich markiertem Basenende entstehen. Die Reaktion erfolgte im Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) nach dem aus Tab. 10 ersichtlichen Protokoll.

Mittels Kapillarelektrophorese kann anschließend anhand der unterschiedlichen Länge der Fragmente und des eingebauten Farbstoffes die Sequenzabfolge bestimmt werden (Abb. 14).

Tab. 9: Sequenzieransatz mit Angaben der Hersteller der eingesetzten Materialien

Materialien	Hersteller
2µl DTCS Quick Start Master Mix	Beckman Coulter, Onc; Fullerton, USA
5µl Wasser (bidest)	
1µl Primer (20ng/µl)	TIB Biomol GmbH, Berlin
2µl Gereinigte Template DNA	

Tab. 10: Sequenzierungsprotokoll mit Angaben zu Temperatur und Zeit

		Temperatur	Zeit
35 Zyklen	Denaturierung	96°C	20 sec
	Hybridisierung	55°C	20 sec
	Neusynthese	60°C	2 min.

Die Sequenzierprodukte wurden mithilfe des Agencourt® CleanSEQ® Protokolls (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) auf einer Sample Mikrotiter Platte (96 well) (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) aufgereinigt. Anschließend wurde GenomeLab™ Separation Buffer (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) auf eine Puffer Mikrotiter Platte (96 well) (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) aufgetragen, auf welches anschließend das GenomeLab™ Separation Gel-LPA I (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) aufgetragen wurde.

Die Sequenzierung erfolgte im CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) mit dem Programm "LFR-60min" (Tab. 11).

Tab. 11: Sequenzierungsprotokoll

Einstellungen	LFR-60min
Capillary Temperature	50°C
Wait for temp	Yes
Denature Temperature	90°C
Denature Duration	0 sec
Pause after Denature	1 min
Injection Voltage	2,0kV
Injection Duration	15 sec
Primary Voltage Stage1	4,2kV
Total Separation Duration	60 min
Ramp Duration Stage1	5 min
Separation Voltage Stage2	4,2kV
Start Time Stage2	5 min

Die resultierenden Sequenzen wurden mithilfe des Analyseprogrammes des CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) ausgewertet. Die Basenabfolge wurde folgendermaßen angegeben: Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G), Cytosin (C). Konnte eine Base nicht eindeutig bestimmt werden, wurde sie mit „N“ (*anything*) angegeben. Die Basenzuordnung erfolgte dann durch manuelle Nachanalyse.

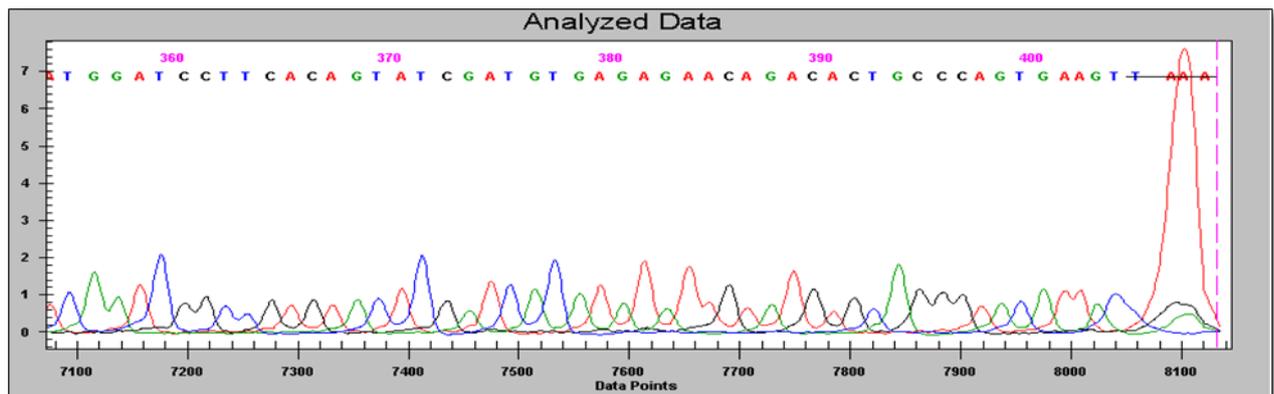


Abb. 14: Beispiel für ein Ergebnis der Sequenzierung nach einer Auftrennungszeit von 60 Minuten mit dem Programm LFR-60min. Der hohe rote Peak fungiert als Endungsmarker.

3.3 Statistik

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung der erhobenen Werte erfolgte mithilfe von Microsoft Excel, Word und PowerPoint 2010.

Die Häufigkeiten der abweichenden Sequenzalterationen wurden ermittelt und entsprechend der zugehörigen Krankheitsgeschichte (vorberichtliche Hypocalcämie/ ohne Störung) des Versuchstieres in Kontingenztafeln eingetragen. Bei einer abweichenden Basensequenz wurden 4-Felder-Kontingenztafeln eingesetzt, bei zwei abweichenden Sequenzabfolgen 6-Felder-Kontingenztafeln.

Korrelationen der verschiedenen Sequenzen zu vorberichtlichen Störungen des Calcium-Haushalts wurden mittels *Fisher's exact probability*-Test für 2x2 Felder-Tafeln (4-Felder-Kontingenztafeln) und Freeman-Halton's Erweiterung des *Fisher's exact probability*-Test für 2x3 Felder-Tafeln (6-Felder-Kontingenztafeln) ermittelt.

P-Werte < 0,05 werden als statistisch signifikant angesehen (Freeman 1951; Agresti 1992; Bender und Lange 2001).

3.3.1 Kontingenztafeln

Tab. 12: 4-Felder-Tafel,

a - d = Häufigkeiten,
fett= Randsummen, N=
a+b+c+d

	Sequenz A	Sequenz B	Σ
Hypocalcämie	a	c	a+c
ohne Störung	b	d	b+d
Σ	a+b	c+d	N

Tab. 13: 6-Felder-Tafel,

a - f = Häufigkeiten, fett=
Randsummen, N=
a+b+c+d+e+f

	Sequenz A	Sequenz B	Sequenz C	Σ
Hypocalcämie	a	c	e	a+c+e
ohne Störung	b	d	f	b+d+f
Σ	a+b	c+d	e+f	N

3.3.2 Fisher's exact probability-Test

Der *Fisher's exact probability*-Test gewährleistet im Gegensatz zum Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) auch bei Häufigkeiten < 5 pro Feld zuverlässige Wahrscheinlichkeitswerte.

Er basiert auf der Wahrscheinlichkeitsberechnung der verschiedenen möglichen Kombinationen von Zellhäufigkeiten bei festen Randsummen. Dazu werden die Wahrscheinlichkeiten (p) für den gegebenen Fall und für alle möglichen extremeren Fälle, deren Betrag (Formel 1, Formel 3) größer ist, als der der Ausgangsverteilung, berechnet und aufaddiert (Formel 2). Bei einer Gesamtwahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gilt die Nullhypothese als abgelehnt. Der Test wurde als zweiseitiger Test durchgeführt.

Nullhypothese: Die Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen Basensequenzen ist unabhängig von einer vorangegangenen Störung des Calciumstoffwechsels.

Alternativhypothese: Die Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen Basensequenzen ist nicht unabhängig von einer vorangegangenen Störung des Calciumstoffwechsels.

$$\left| \frac{a}{(a+c)} - \frac{b}{(b+d)} \right|$$

Formel 1: Berechnung des Betrages für 4-Felder-Kontingenztafeln

$$\frac{(a+b)! \cdot (a+c)! \cdot (c+d)! \cdot (b+d)!}{N! \cdot a! \cdot b! \cdot c! \cdot d!}$$

Formel 2: Berechnung von Wahrscheinlichkeiten nach dem *Fisher's exact probability*-Test

3.3.3 Freeman-Halton's Erweiterung des Fisher's exact probability-Test

Die Erweiterung des Fisher's exact probability-Test nach Freeman und Halton ermöglicht das Ausrechnen von Wahrscheinlichkeiten für drei und mehr Merkmalsausprägungen. Das Rechenprinzip entspricht dem Fisher's exact probability-Test (Formel 4).

$$\left| \frac{a}{(a+c+e)} - \frac{b}{(b+d+f)} \right|$$

Formel 3: Berechnung des Betrages für 6-Felder-Kontingenztafeln

$$\frac{(a+b)!(c+d)!(e+f)!(a+c+e)!(b+d+f)!}{N! \cdot a! \cdot b! \cdot c! \cdot d! \cdot e! \cdot f!}$$

Formel 4: Berechnung von Wahrscheinlichkeiten nach der Erweiterung nach Freeman und Halton

3.3.4 Rechenbeispiel

Die Häufigkeiten für das Auftreten der Base A oder B an Position x der DNA werden in eine Kontingenztafel eingetragen (Tab. 14).

Tab. 14: Rechenbeispiel: von 26 Tieren (N) wurde bei 12 Tieren mit Vorbericht Hypocalcämie und 9 Tieren ohne Vorbericht Hypocalcämie an Position x der DNA die Base A sequenziert. Bei 5 Tieren mit Vorbericht Hypocalcämie wurde an Position x der DNA die Base B sequenziert.

	A	B	Σ
Hypocalcämie	12	5	17
ohne Störung	9	0	9
Σ	21	5	26

Der Betrag und die Wahrscheinlichkeit der Ausgangsverteilung und anderer möglicher (extremerer) Verteilungen bei gleichen Randsummen werden anhand der genannten Formeln errechnet (Tab. 15, Tab. 16).

Tab. 15: Berechnung des Betrages und der Wahrscheinlichkeit der Ausgangsverteilung mittels *Fisher's exact probability-Test*.

Ausgangsverteilung			Betrag	Wahrscheinlichkeit
12	5	17	$\left \frac{12}{17} - \frac{9}{9} \right = 0,29$	$\frac{(12+9)! \cdot (12+5)! \cdot (5+0)! \cdot (9+0)!}{26! \cdot 12! \cdot 9! \cdot 5! \cdot 0!} = 0,094071146$
9	0	9		
21	5	26		

Tab. 16: Berechnung des Betrages und der Wahrscheinlichkeit anderer möglicher (extremere) Verteilung bei gleichen Randsummen mittels *Fisher's exact probability-Test*.

Andere Verteilungen			Betrag	Wahrscheinlichkeit
13	4	17	$\left \frac{13}{17} - \frac{8}{9} \right = 0,124$	keine Berechnung der Wahrscheinlichkeit, da Betrag kleiner als Betrag der Ausgangsverteilung (<0,29)
8	1	9		
21	5	26		
14	3	17	$\left \frac{14}{17} - \frac{7}{9} \right = 0,046$	keine Berechnung der Wahrscheinlichkeit, da Betrag kleiner als Betrag der Ausgangsverteilung (<0,29)
7	2	9		
21	5	26		
15	2	17	$\left \frac{15}{17} - \frac{6}{9} \right = 0,216$	keine Berechnung der Wahrscheinlichkeit, da Betrag kleiner als Betrag der Ausgangsverteilung (<0,29)
6	3	9		
21	5	26		
16	1	17	$\left \frac{16}{17} - \frac{5}{9} \right = 0,386$	$\frac{(16+5)! \cdot (16+1)! \cdot (1+4)! \cdot (5+4)!}{26! \cdot 16! \cdot 5! \cdot 1! \cdot 4!} = 0,032563089$
5	4	9		
21	5	26		
17	0	17	$\left \frac{17}{17} - \frac{4}{9} \right = 0,55$	$\frac{(17+4)! \cdot (17+0)! \cdot (0+5)! \cdot (4+5)!}{26! \cdot 17! \cdot 4! \cdot 0! \cdot 5!} = 0,001915475829$
4	5	9		
21	5	26		

Die errechneten Einzelwahrscheinlichkeiten werden addiert:

$$\begin{array}{r}
 0,0941 \\
 + \quad 0,0326 \\
 + \quad 0,0019 \\
 \hline
 = \quad 0,1286
 \end{array}$$

Ergebnis: Die Alternativhypothese wird abgelehnt, da $p > 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Sequenzierung

Von jedem der 26 Tiere wurden acht Fragmente im Doppelansatz in *sense* und *anti sense* Richtung sequenziert und jede Sequenz mithilfe des CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) mit der auf NCBI veröffentlichten *bos taurus* Sequenz NC_007303.4 (NCBI) der Rasse Hereford und untereinander verglichen. Eine geringfügige Abweichung der Sequenzen war aufgrund der unterschiedlichen Rassezugehörigkeiten der untersuchten Tiere (Holstein Frisean) im Vergleich zur auf NCBI publizierten Sequenz (Rasse Herford) zu erwarten. In den Fragmenten 3, 4, 5/6 und 8/9 gab es keine Abweichungen zur publizierten Sequenz oder unter den Probanden. Die Fragmente 1, 2, 7 und 10 zeigten hetero- und/ oder homozygote Variationen einzelner Basen (Tab. 17), entweder in Intron- (vier von acht) oder in Exon-Bereichen (vier von acht).

Die vier Exon-Variationen wurden auf Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz untersucht. Dazu wurde der Leserahmen der VDR-mRNA mithilfe der auf NCBI veröffentlichten Aminosäuresequenz des Vitamin-D-Rezeptor-Gens (NCBI *Reference Sequence*: NM_001167932.1) bestimmt, und die Basen-Alterationen den entsprechenden Codons zugeordnet (Kap. 4.7). Die modifizierten Codons wurden der durch sie verschlüsselten Aminosäure zugeordnet. Jede der vier Basen-Alteration resultierte dabei in einer potentiellen Veränderung der Aminosäure. Die Aminosäuresequenz wurde nicht untersucht.

Die acht Sequenz-Variationen werden nachfolgend einzeln aufgeführt: Fragment 1 (Kap. 4.3, Tab. 18, Abb. 15, Abb. 16), Fragment 2 (Kap. 4.4, Tab. 19, Abb. 17, Abb. 18), Fragment 7 (Kap. 4.5, Tab. 20, Abb. 19, Abb. 20, Abb. 21, Abb. 22) und Fragment 10 (Kap. 4.6, Tab. 21, Abb. 23, Abb. 24, Abb. 25, Abb. 26).

4.2 Statistik

Die Häufigkeit des Auftretens von Gensequenzvariationen wurde mithilfe von Kontingenztafeln mit der Inzidenz von Hypocalcämie des Spendertieres korreliert.

In keinem der Fälle gab es eine statistisch evidente Korrelation ($p > 0,05$).

Tier Nr.	Ohrmarke	Vater	Mutter	Laktation	Calcium-haushalt	Fragment 1	Fragment 2	Fragment 7	Fragment 7	Fragment 7	Fragment 7	Fragment 10	Fragment 10	Fragment 10	Fragment 10
1	63143	Lentini RF	DE1600760100	5	Hypocalcämie	147	344	106	110	336	212	365	389		
		Position des Fragments	Position in DNA NC_007303 (wenn Intron)												
2	63655	Lombi	DE1600760673	4	Hypocalcämie	374	22110	-	-	45726	55487	-	-	-	-
		Position in mRNA XM_613129 (wenn Exon)	Position in mRNA XM_613129 (wenn Exon)												
3	86045	Petterson	DE2282109110	6	Hypocalcämie	GTC/TG	GTGGG	CTG (Leu)	GCT (Ala)	TTTGA	CGGCC	AAG (Lys)	1308	AAC (Asn)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
4	86321	Heldor	DE1600317513	6	Hypocalcämie	GTTCTG	GTGICGG	CIATG	GC/TT	TTTAGA	CGC/ACC	AITAG		AITAC	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
5	60698	Celsius	DE001600576620	6	Hypocalcämie	GTTTG, GTCTG und heterozygot (GTTTG/GTCTG)	GTGGG, GTGGG und heterozygot (GTGGG/GTGGG)	CTG und heterozygot (CTG/ATG)	GCT und heterozygot (GCT/GTT)	TTTTGA und heterozygot (TTTTG/TTAGA)	CGCCC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	AAG und heterozygot (AAG/TAG)		AAC und heterozygot (AAC/TAC)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
6	60105	Diapason	DE1600257418	6	Hypocalcämie	GTTTG, GTCTG und heterozygot (GTTTG/GTCTG)	GTGGG, GTGGG und heterozygot (GTGGG/GTGGG)	CTG und heterozygot (CTG/ATG)	GCT und heterozygot (GCT/GTT)	TTTTGA und heterozygot (TTTTG/TTAGA)	CGCCC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	AAG und heterozygot (AAG/TAG)		AAC und heterozygot (AAC/TAC)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
7	63139	Lake	DE1600576722	5	Hypocalcämie	GTTTG, GTCTG und heterozygot (GTTTG/GTCTG)	GTGGG, GTGGG und heterozygot (GTGGG/GTGGG)	CTG und heterozygot (CTG/ATG)	GCT und heterozygot (GCT/GTT)	TTTTGA und heterozygot (TTTTG/TTAGA)	CGCCC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	AAG und heterozygot (AAG/TAG)		AAC und heterozygot (AAC/TAC)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
8	63183	Mamiser	DE1600760198	5	Hypocalcämie	GTTTG, GTCTG und heterozygot (GTTTG/GTCTG)	GTGGG, GTGGG und heterozygot (GTGGG/GTGGG)	CTG und heterozygot (CTG/ATG)	GCT und heterozygot (GCT/GTT)	TTTTGA und heterozygot (TTTTG/TTAGA)	CGCCC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	AAG und heterozygot (AAG/TAG)		AAC und heterozygot (AAC/TAC)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
9	63663	Sektor	DE1600760187	4	Hypocalcämie	GTTTG, GTCTG und heterozygot (GTTTG/GTCTG)	GTGGG, GTGGG und heterozygot (GTGGG/GTGGG)	CTG und heterozygot (CTG/ATG)	GCT und heterozygot (GCT/GTT)	TTTTGA und heterozygot (TTTTG/TTAGA)	CGCCC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	AAG und heterozygot (AAG/TAG)		AAC und heterozygot (AAC/TAC)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
10	86334	Cutlis	DE2282108746	5	Hypocalcämie	GTTTG, GTCTG und heterozygot (GTTTG/GTCTG)	GTGGG, GTGGG und heterozygot (GTGGG/GTGGG)	CTG und heterozygot (CTG/ATG)	GCT und heterozygot (GCT/GTT)	TTTTGA und heterozygot (TTTTG/TTAGA)	CGCCC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	AAG und heterozygot (AAG/TAG)		AAC und heterozygot (AAC/TAC)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
11	86374	Raimon	DE1600317471	6	Hypocalcämie	GTTTG, GTCTG und heterozygot (GTTTG/GTCTG)	GTGGG, GTGGG und heterozygot (GTGGG/GTGGG)	CTG und heterozygot (CTG/ATG)	GCT und heterozygot (GCT/GTT)	TTTTGA und heterozygot (TTTTG/TTAGA)	CGCCC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	AAG und heterozygot (AAG/TAG)		AAC und heterozygot (AAC/TAC)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
12	42038	821511	DE001502711224	6	Hypocalcämie	GTTTG, GTCTG und heterozygot (GTTTG/GTCTG)	GTGGG, GTGGG und heterozygot (GTGGG/GTGGG)	CTG und heterozygot (CTG/ATG)	GCT und heterozygot (GCT/GTT)	TTTTGA und heterozygot (TTTTG/TTAGA)	CGCCC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	AAG und heterozygot (AAG/TAG)		AAC und heterozygot (AAC/TAC)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
13	60854	Blackred RF	DE001600317073	6	Hypocalcämie	GTTTG, GTCTG und heterozygot (GTTTG/GTCTG)	GTGGG, GTGGG und heterozygot (GTGGG/GTGGG)	CTG und heterozygot (CTG/ATG)	GCT und heterozygot (GCT/GTT)	TTTTGA und heterozygot (TTTTG/TTAGA)	CGCCC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	AAG und heterozygot (AAG/TAG)		AAC und heterozygot (AAC/TAC)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
14	63018	Bestow	DE001600317783	6	Hypocalcämie	GTTTG, GTCTG und heterozygot (GTTTG/GTCTG)	GTGGG, GTGGG und heterozygot (GTGGG/GTGGG)	CTG und heterozygot (CTG/ATG)	GCT und heterozygot (GCT/GTT)	TTTTGA und heterozygot (TTTTG/TTAGA)	CGCCC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	AAG und heterozygot (AAG/TAG)		AAC und heterozygot (AAC/TAC)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
15	63023	Hatrick	DE001600760169	5	Hypocalcämie	GTTTG, GTCTG und heterozygot (GTTTG/GTCTG)	GTGGG, GTGGG und heterozygot (GTGGG/GTGGG)	CTG und heterozygot (CTG/ATG)	GCT und heterozygot (GCT/GTT)	TTTTGA und heterozygot (TTTTG/TTAGA)	CGCCC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	AAG und heterozygot (AAG/TAG)		AAC und heterozygot (AAC/TAC)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
16	60852	Rudor	DE002282101531	5	Hypocalcämie	GTTTG, GTCTG und heterozygot (GTTTG/GTCTG)	GTGGG, GTGGG und heterozygot (GTGGG/GTGGG)	CTG und heterozygot (CTG/ATG)	GCT und heterozygot (GCT/GTT)	TTTTGA und heterozygot (TTTTG/TTAGA)	CGCCC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	AAG und heterozygot (AAG/TAG)		AAC und heterozygot (AAC/TAC)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
17	63168	Caddon	DE001600760324	5	Hypocalcämie	GTTTG, GTCTG und heterozygot (GTTTG/GTCTG)	GTGGG, GTGGG und heterozygot (GTGGG/GTGGG)	CTG und heterozygot (CTG/ATG)	GCT und heterozygot (GCT/GTT)	TTTTGA und heterozygot (TTTTG/TTAGA)	CGCCC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	AAG und heterozygot (AAG/TAG)		AAC und heterozygot (AAC/TAC)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
18	63455	Ciso	DE1600317647	5	ohne Störung	GTTTG, GTCTG und heterozygot (GTTTG/GTCTG)	GTGGG, GTGGG und heterozygot (GTGGG/GTGGG)	CTG und heterozygot (CTG/ATG)	GCT und heterozygot (GCT/GTT)	TTTTGA und heterozygot (TTTTG/TTAGA)	CGCCC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	AAG und heterozygot (AAG/TAG)		AAC und heterozygot (AAC/TAC)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
19	86145	Ladin	DE002282112366	6	ohne Störung	GTTTG, GTCTG und heterozygot (GTTTG/GTCTG)	GTGGG, GTGGG und heterozygot (GTGGG/GTGGG)	CTG und heterozygot (CTG/ATG)	GCT und heterozygot (GCT/GTT)	TTTTGA und heterozygot (TTTTG/TTAGA)	CGCCC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	AAG und heterozygot (AAG/TAG)		AAC und heterozygot (AAC/TAC)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
20	86235	Lobach	DE001600317330	5	ohne Störung	GTTTG, GTCTG und heterozygot (GTTTG/GTCTG)	GTGGG, GTGGG und heterozygot (GTGGG/GTGGG)	CTG und heterozygot (CTG/ATG)	GCT und heterozygot (GCT/GTT)	TTTTGA und heterozygot (TTTTG/TTAGA)	CGCCC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	AAG und heterozygot (AAG/TAG)		AAC und heterozygot (AAC/TAC)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
21	63030	Pedant	DE002282109503	5	ohne Störung	GTTTG, GTCTG und heterozygot (GTTTG/GTCTG)	GTGGG, GTGGG und heterozygot (GTGGG/GTGGG)	CTG und heterozygot (CTG/ATG)	GCT und heterozygot (GCT/GTT)	TTTTGA und heterozygot (TTTTG/TTAGA)	CGCCC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	AAG und heterozygot (AAG/TAG)		AAC und heterozygot (AAC/TAC)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
22	86588	Lukas	DE1600317700	5	ohne Störung	GTTTG, GTCTG und heterozygot (GTTTG/GTCTG)	GTGGG, GTGGG und heterozygot (GTGGG/GTGGG)	CTG und heterozygot (CTG/ATG)	GCT und heterozygot (GCT/GTT)	TTTTGA und heterozygot (TTTTG/TTAGA)	CGCCC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	AAG und heterozygot (AAG/TAG)		AAC und heterozygot (AAC/TAC)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
23	63439	Lake	DE002282108860	5	ohne Störung	GTTTG, GTCTG und heterozygot (GTTTG/GTCTG)	GTGGG, GTGGG und heterozygot (GTGGG/GTGGG)	CTG und heterozygot (CTG/ATG)	GCT und heterozygot (GCT/GTT)	TTTTGA und heterozygot (TTTTG/TTAGA)	CGCCC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	AAG und heterozygot (AAG/TAG)		AAC und heterozygot (AAC/TAC)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
24	86463	Johann	DE001228210149	6	ohne Störung	GTTTG, GTCTG und heterozygot (GTTTG/GTCTG)	GTGGG, GTGGG und heterozygot (GTGGG/GTGGG)	CTG und heterozygot (CTG/ATG)	GCT und heterozygot (GCT/GTT)	TTTTGA und heterozygot (TTTTG/TTAGA)	CGCCC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	AAG und heterozygot (AAG/TAG)		AAC und heterozygot (AAC/TAC)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
25	63511	Lynch	DE001600760778	5	ohne Störung	GTTTG, GTCTG und heterozygot (GTTTG/GTCTG)	GTGGG, GTGGG und heterozygot (GTGGG/GTGGG)	CTG und heterozygot (CTG/ATG)	GCT und heterozygot (GCT/GTT)	TTTTGA und heterozygot (TTTTG/TTAGA)	CGCCC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	AAG und heterozygot (AAG/TAG)		AAC und heterozygot (AAC/TAC)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										
26	63537	Trailor	DE001600760637	5	ohne Störung	GTTTG, GTCTG und heterozygot (GTTTG/GTCTG)	GTGGG, GTGGG und heterozygot (GTGGG/GTGGG)	CTG und heterozygot (CTG/ATG)	GCT und heterozygot (GCT/GTT)	TTTTGA und heterozygot (TTTTG/TTAGA)	CGCCC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	AAG und heterozygot (AAG/TAG)		AAC und heterozygot (AAC/TAC)	
		Erwartete Sequenz (Aminosäure)	Erwartete Sequenz (Aminosäure)		Mutation										

Tab. 17: Sequenzalterationen des Vitamin-D-Rezeptor-Gens der 26 Versuchstiere. Spalten 2-6: Identifikation der Versuchstiere nach Ohrmarkennummer, Name des Vätertieres, Registrierungsnummer der Mutter, Laktationsnummer und aufgetretener Calciumhaushaltentgleisung (Hypocalcämie: Entgleisung des Calcium-Haushalts mit Calcium-Blutwerten <0,9mmol/l, ohne Störung: Störung der Calcium-Homöostase noch nie aufgetreten). Spalten 7-14: Fragmentnummer (entspricht dem enthaltenen Exon), Fragmentposition der Sequenzalteration, Position in DNA (für Sequenzalterationen in Intron-Bereichen) oder Position in mRNA (für Sequenzalterationen in Exon-Bereichen), veröffentlichte VDR-Sequenz mit unterstrichener veränderter Base, heterozygote (unterschiedliche Sequenz auf den zwei Allelen) Sequenzierergebnisse (T/C), mögliche Aminosäurenveränderung für jede allelische Variation (veröffentlichte Aminosäure (AS), AS-Nummer, ersetzte AS: Leu 271 Met), Cytosin, (C), Guanin (G), Adenosin (A), Thymin (T), Leucin (Leu), Methionin (Met), Alanin (Ala), Valin (Val), Asparagin (Asn), Tyrosin (Tyr), terminierende Aminosäure (Stop).

4.3 Fragment 1

Tab. 18: Sequenzalterationen des Vitamin-D-Rezeptor-Gens der 26 Versuchstiere in Fragment 1. Spalten 1-3: Identifikation der Versuchstiere (Tab. 17), Laktationsnummer und aufgetretener Calciumhaushaltentgleisung (Hypocalcämie: Entgleisung des Calcium-Haushalts mit Calcium-Blutwerten <0,9mmol/l, ohne Störung: Störung der Calcium-Homöostase noch nie aufgetreten). Spalte 4: Fragmentnummer (entspricht dem enthaltenen Exon), Fragmentposition der Sequenzalteration, Position in DNA (für Sequenzalterationen in Intron-Bereichen), veröffentlichte VDR-Sequenz (veränderte Base unterstrichen), heterozygote Sequenzierungsergebnisse (T/C), Cytosin (C), Guanin (G), Adenosin (A), Thymin (T).

Fragmentname		Fragment 1	
Position des Fragments		147	
Position in DNA NC_007303 (wenn Intron)		374	
Position in mRNA XM_613129 (wenn Exon)		-	
Erwartete Sequenz (Aminosäure)		GTCTG	
Mutation		GTT/CTG	
Ermittelte Sequenz		GT <u>T</u> TG, GT <u>C</u> TG und heterozygot (GTTTGG/GTCTG)	
Mögliche Aminosäure		-	
Tier Nr.	Laktation	Calcium- haushalt	Sequenzier- ergebnis
1	5	Hypocalcämie	T
2	4	Hypocalcämie	T
3	6	Hypocalcämie	C/T
4	6	Hypocalcämie	C/T
5	6	Hypocalcämie	C/T
6	6	Hypocalcämie	C
7	5	Hypocalcämie	C/T
8	5	Hypocalcämie	C/T
9	4	Hypocalcämie	T
10	5	Hypocalcämie	C/T
11	6	Hypocalcämie	C/T
12	6	Hypocalcämie	C/T
13	6	Hypocalcämie	T
14	6	Hypocalcämie	T
15	5	Hypocalcämie	C/T
16	5	Hypocalcämie	C/T
17	5	Hypocalcämie	C/T
18	5	ohne Störung	C/T
19	6	ohne Störung	C/T
20	5	ohne Störung	T
21	5	ohne Störung	T
22	5	ohne Störung	C/T
23	5	ohne Störung	C
24	6	ohne Störung	T
25	5	ohne Störung	C/T
26	5	ohne Störung	C/T

	10	20	30	40	50
Fragment 1	AGCGCGGAGC	AGCGTGCCCA	CCCGCAGGAC	CAGGTGCGCA	CCCGGGAGTG

	60	70	80	90	100
Fragment 1	GCGGGGCGAG	GGGGGTCCCA	GGATCGAGAT	TAGGCGGCGT	AGGTTTGGGG

	110	120	130	140	150
Fragment 1	GCTTTGGGAA	TTCCGGACCT	CAGTGCCCCG	GAACAAGCAC	TAGAGTCTGG
Alteration
	160	170	180	190	200
Fragment 1	GCAAACCTTG	CGACTGAGAA	CTGGGCTTTC	GTGCCCTAAG	GCTGGGGCAC

	210	220	230	240	250
Fragment 1	TAAGGGGATC	CTGAGGTCTG	AGAAAGACCT	GAAGTTCGTG	CCAGGCTGGC

	260	270	280	290	300
Fragment 1	ACGGGGAGCG	GCGAGCTCCT	CGGGGCTCAA	ACAGCTGAAC	GCAGAAATGC

	310	320	330	340	350
Fragment 1	TGCCCCGGCA	GGGTGCTCCG	CATTTGAGCA	ATCAGAAGCT	TTTGCGTCCT

	360	370	380	390	400
Fragment 1	TCCCCAGTCT	GGGCGCGGGA	GGAATAAGAC	AGCGAAGGAT	TGGCTCTCGG

	410	420	430	440	450
Fragment 1	AGGTGCTGAG	GTCTTCTGGG	GGTGGGGTGT	GTGTAGCCTT	GTTATCTTGT

	460	470			
Fragment 1	AGGGCCCATG	TATGGTCACC	TGCGAG		

Abb. 15: Im ersten Fragment, welches das erste Exon teilweise enthält, wurde eine Sequenzveränderung im Intron an 147. Stelle des Fragmentes gefunden. Statt der erwarteten Base Cytosin (C) wurde Tyrosin (T) bei 8 von 26 Tieren homozygot und bei 16 Tieren heterozygot gefunden (C-T). Das Fragment umfasst 476 Basenpaaren. Legende: Exon, Basen-Alteration, Intron

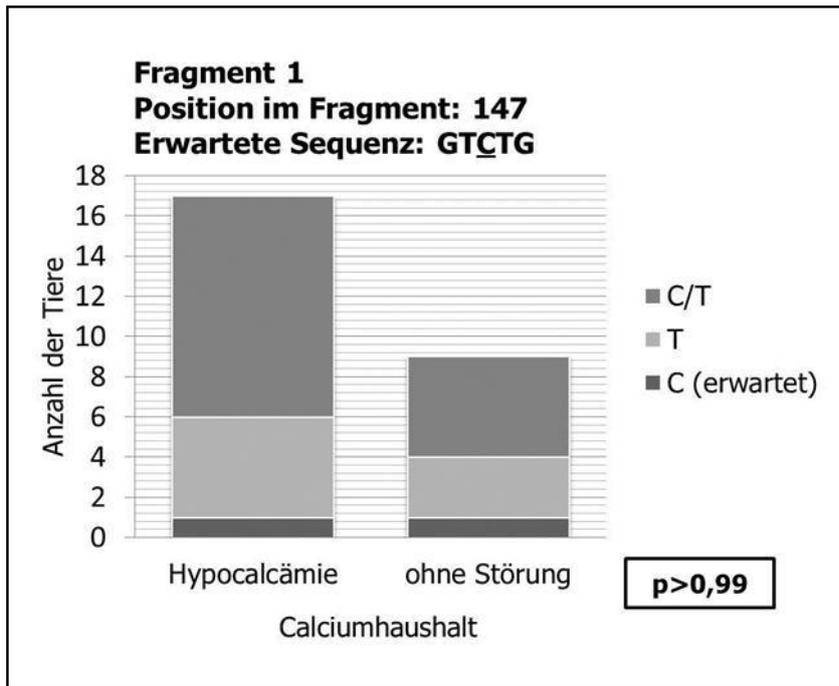


Abb. 16: Die C-T Alteration trat homozygot (T) und heterozygot (C/T) auf. Statt der erwarteten Base Cytosin an 147. Stelle des ersten Fragmentes, wurde bei 8 Tieren auf beiden Allelen Tyrosin gefunden. Davon waren 5 Tiere bereits mindestens einmal hypocalcämisch, 3 jedoch noch nie. Bei 16 Tieren war Tyrosin nur auf einem Allel zu finden. Davon waren 11 bereits mindestens einmal hypocalcämisch, 5 jedoch noch nie. Eine Korrelation zwischen Basen-Alteration und Hypocalcämie-Inzidenz gibt es nicht ($p > 0,05$).

4.4 Fragment 2

Tab. 19: Sequenzalterationen des Vitamin-D-Rezeptor-Gens der 26 Versuchstiere in Fragment 2. Spalten 1-3: Identifikation der Versuchstiere (Tab. 17), Laktationsnummer und aufgetretener Calciumhaushaltentgleisung (Hypocalcämie: Entgleisung des Calcium-Haushalts mit Calcium-Blutwerten <0,9mmol/l, ohne Störung: Störung der Calcium-Homöostase noch nie aufgetreten). Spalte 4: Fragmentnummer (entspricht dem enthaltenen Exon), Fragmentposition der Sequenzalteration, Position in DNA (für Sequenzalterationen in Intron-Bereichen), veröffentlichte VDR-Sequenz (veränderte Base unterstrichen), heterozygote Sequenziererergebnisse (T/C), Cytosin (C), Guanin (G), Adenosin (A), Thymin (T).

Fragmentname		Fragment 2	
Position des Fragments		344	
Position in DNA NC_007303 (wenn Intron)		22110	
Position in mRNA XM_613129 (wenn Exon)		-	
Erwartete Sequenz (Aminosäure)		GTGGG	
Mutation		GTG/C G	
Ermittelte Sequenz		GTGGG, GTC G und heterozygot (GTGGG/GTCGG)	
Mögliche Aminosäure		-	
Tier Nr.	Laktation	Calcium- haushalt	Sequenzier- ergebnis
1	5	Hypocalcämie	G
2	4	Hypocalcämie	G
3	6	Hypocalcämie	G/C
4	6	Hypocalcämie	C
5	6	Hypocalcämie	G/C
6	6	Hypocalcämie	C
7	5	Hypocalcämie	G/C
8	5	Hypocalcämie	G/C
9	4	Hypocalcämie	G/C
10	5	Hypocalcämie	G/C
11	6	Hypocalcämie	G/C
12	6	Hypocalcämie	G/C
13	6	Hypocalcämie	G
14	6	Hypocalcämie	C
15	5	Hypocalcämie	G/C
16	5	Hypocalcämie	C
17	5	Hypocalcämie	G/C
18	5	ohne Störung	G/C
19	6	ohne Störung	G/C
20	5	ohne Störung	G
21	5	ohne Störung	G
22	5	ohne Störung	G/C
23	5	ohne Störung	C
24	6	ohne Störung	G
25	5	ohne Störung	G/C
26	5	ohne Störung	G/C

	
		10	20	30	40	50
Fragment 2	CAACACAGGG	CTGTACATAA	AGCATTAT	TCCCTTTTTT	TCATTTCA	GA
	
		60	70	80	90	100
Fragment 2	GTCCTTTTGG	TTGGAAGCAT	CTGCGAACCC	TCACAGAAGG	GCACCCCTTG	
	
		110	120	130	140	150
Fragment 2	GCCTGACTTC	CCTGTCCCCC	TGCTCCTACA	GGTGGGTGTT	TCCTCCTCAG	
	
		160	170	180	190	200
Fragment 2	CCACAACCTC	TGGGCTTCTT	GTTTTTCGAGG	GGTGAGGCGG	GCAGGGATGT	
	
		210	220	230	240	250
Fragment 2	TGAATGGGAG	CAAATCAGAA	GGCGGTGGTC	AGAGGGAGGA	AGAGATACTG	
	
		260	270	280	290	300
Fragment 2	CCTGCCTTTG	GCAGATGTGG	CTGGGTGCAT	CCTGTGTCAG	CAGAGACCAC	
	
		310	320	330	340	350
Fragment 2	AGCAGCCCGA	AGCTGAGACC	CAGAGCTGGG	CCCAGGTCGG	GGTGGGGGCT	
AlterationGTCGG....	
	
		360	370	380	390	400
Fragment 2	CAGAGGGAGG	GGCTTGCAGA	CACCCTGGCC	AGGACCCAG	GAGGTCATCA	
	
		410	420	430	440	450
Fragment 2	GCAAGGCGGT	ATTGCCAGCC	CAACTCCCAT	CTCCTTTGTC	TCTCCTGCCC	
	
		460	470	480	490	500
Fragment 2	TCCGCAGTCT	CTGCCCTTCA	CTCCTAGCAC	TACCAGCTCT	CAGGCCATAG	
	
		510				
Fragment 2	ATGCCTAGAC	CTC				

Abb. 17: Im zweiten Fragment, welches das zweite Exon vollständig enthält, wurde eine Sequenzveränderung im Intron an 344. Stelle des Fragmentes gefunden. Statt der erwarteten Base Guanin (G) wurde bei 20 von 26 Tieren homo- oder heterozygot Cytosin (C) gefunden (G-C). Das Fragment umfasst 513 Basenpaare. Legende: **Exon**, **Basen-Alteration**, **Intron**

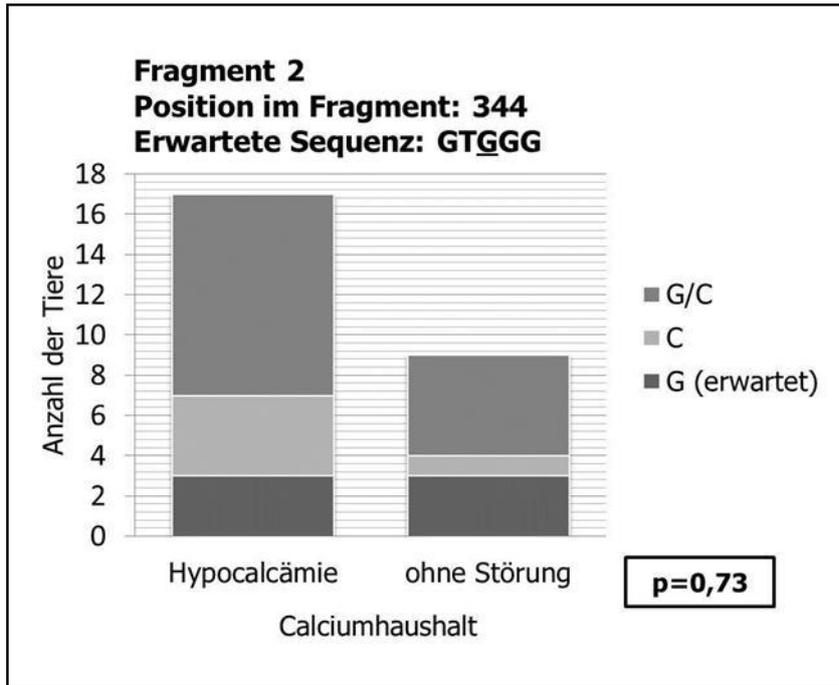


Abb. 18: Die G-C Alteration trat homozygot (C) und heterozygot (G/C) auf. Statt der erwarteten Base Guanin an 344. Stelle des zweiten Fragmentes, wurde bei 5 Tieren auf beiden Allelen Cytosin gefunden. Davon waren 4 Tiere bereits mindestens einmal hypocalcämisch, 1 jedoch noch nie. Bei 15 Tieren war Cytosin nur auf einem Allel zu finden. Davon waren 10 bereits mindestens einmal hypocalcämisch, 5 jedoch noch nie. Eine Korrelation zwischen Basen-Alteration und Hypocalcämie-Inzidenz gibt es nicht ($p > 0,05$).

4.5 Fragment 7

Tab. 20: Sequenzalterationen des Vitamin-D-Rezeptor-Gens der 26 Versuchstiere in Fragment 7. Spalten 1-3: Identifikation der Versuchstiere (Tab. 17), Laktationsnummer und aufgetretener Calciumhaushaltentgleisung (Hypocalcämie: Entgleisung des Calcium-Haushalts mit Calcium-Blutwerten <0,9mmol/l, ohne Störung: Störung der Calcium-Homöostase noch nie aufgetreten). Spalten 4-6: Fragmentnummer (entspricht dem enthaltenen Exon), Fragmentposition der Sequenzalteration, Position in DNA (für Sequenzalterationen in Intron-Bereichen) oder Position in mRNA (für Sequenzalterationen in Exon-Bereichen), veröffentlichte VDR-Sequenz (veränderte Base unterstrichen), heterozygote Sequenzierergebnisse (T/C), mögliche Aminosäurenveränderung für jede allelische Variation (veröffentlichte Aminosäure (AS), AS-Nummer, ersetzte AS: Leu 271 Met), Cytosin (C), Guanin (G), Adenosin (A), Thymin (T), Leucin (Leu), Methionin (Met), Alanin (Ala), Valin (Val).

Fragmentname	Fragment 7	Fragment 7	Fragment 7
Position des Fragments	106	110	336
Position in DNA NC_007303 (wenn Intron)	-	-	45726
Position in mRNA XM_613129 (wenn Exon)	813	817	-
Erwartete Sequenz (Aminosäure)	<u>CTG</u> (Leu)	<u>GCT</u> (Ala)	TTTGA
Mutation	C/ATG	GC/TT	TTT/AGA
Ermittelte Sequenz	<u>CTG</u> und heterozygot (CTG/ATG)	<u>GCT</u> und heterozygot (GCT/GTT)	heterozygot (TTTGA/TTAGA)
Mögliche Aminosäure	Leu 271 Met	Ala 272 Val	-

Tier Nr.	Laktation	Calciumhaushalt	Sequenzierergebnis	Sequenzierergebnis	Sequenzierergebnis
1	5	Hypocalcämie	C/A	C	T/A
2	4	Hypocalcämie	C	C	T
3	6	Hypocalcämie	C/A	C	T/A
4	6	Hypocalcämie	C/A	C	T/A
5	6	Hypocalcämie	C/A	C	T/A
6	6	Hypocalcämie	C/A	C/T	T/A
7	5	Hypocalcämie	C/A	C/T	T/A
8	5	Hypocalcämie	C/A	C/T	T/A
9	4	Hypocalcämie	C/A	C/T	T/A
10	5	Hypocalcämie	C/A	C/T	T/A
11	6	Hypocalcämie	C/A	C/T	T/A
12	6	Hypocalcämie	C/A	C/T	T/A
13	6	Hypocalcämie	C/A	C/T	T/A
14	6	Hypocalcämie	C/A	C/T	T/A
15	5	Hypocalcämie	C/A	C/T	T/A
16	5	Hypocalcämie	C/A	C/T	T/A
17	5	Hypocalcämie	C/A	C/T	T/A
18	5	ohne Störung	C/A	C/T	T/A
19	6	ohne Störung	C/A	C/T	T/A
20	5	ohne Störung	C/A	C/T	T/A
21	5	ohne Störung	C/A	C/T	T/A
22	5	ohne Störung	C/A	C/T	T/A
23	5	ohne Störung	C/A	C/T	T/A
24	6	ohne Störung	C/A	C/T	T/A
25	5	ohne Störung	C/A	C/T	T/A
26	5	ohne Störung	C/A	C/T	T/A

	10	20	30	40	50
Fragment 7	GACACAATGG AGCCAACCAG CTTCTCCAAC CAGGATCTGA ATGAAGAAGA					
	60	70	80	90	100
Fragment 7	CTCCGATGAC CTTTCTGTGA CCCTGGACCT GTCCCAGCTC TCCATGCTGC					
	110	120	130	140	150
Fragment 7	CCCACCTGGC TGACCTGGTC AGTTATAGCA TCCAGAAGGT CATCGGCTTT					
Alteration	...ACATGGT TGA.....					
	160	170	180	190	200
Fragment 7	GCCAAGATGA TCCCAGGGTT CAGGTAAGGA GCTTCTGGGA CATCCAGAAG					
	210	220	230	240	250
Fragment 7	ACAAAGTCAG AATCCTATCC TGAGCCCAA GAAGTCTTGG AAATTCTCAA					
	260	270	280	290	300
Fragment 7	CCTACTGCTT CCCAAAATAC ACCTTCAGGT CCTATCCCAG ACCTCCTAAA					
	310	320	330	340	350
Fragment 7	TCAGAATCTC TAGGCGAGGT CCAGAAATCT GTATTGAGA AGTACAGCCT					
Alteration TTAGA..					
	360	370	380	390	400
Fragment 7	CTCCAACATT ATAGGGCAGG CCAACAGTGG AAAGCCATGG ATCCTTCACA					
	410	420	430		
Fragment 7	GTATCGATGT GAGAGAACAG AACTGCCCA GTGAAGTTC					

Abb. 19: Im siebten Fragment, welches das siebte Exon vollständig enthält, wurden drei Sequenzveränderung gefunden. Davon sind zwei im Exon an 106. und 110. Stelle positioniert, die dritte wurde im Intron an 336. Stelle des Fragmentes gefunden. Statt der erwarteten Base Cytosin (C) an 106. Stelle wurde bei 25 von 26 Tieren auf einem Allel Adenin (A) gefunden (C-A). Statt der erwarteten Base Cytosin (C) an 110. Stelle wurde bei 21 von 26 Tieren auf einem Allel Tyrosin (T) gefunden (C-T). Statt der erwarteten Base Tyrosin (T) an 336. Stelle wurde bei 25 von 26 Tieren auf einem Allel Adenin (A) gefunden (T-A). Das Fragment umfasst 439 Basenpaare. Legende: Exon, Basen-Alteration, Intron.

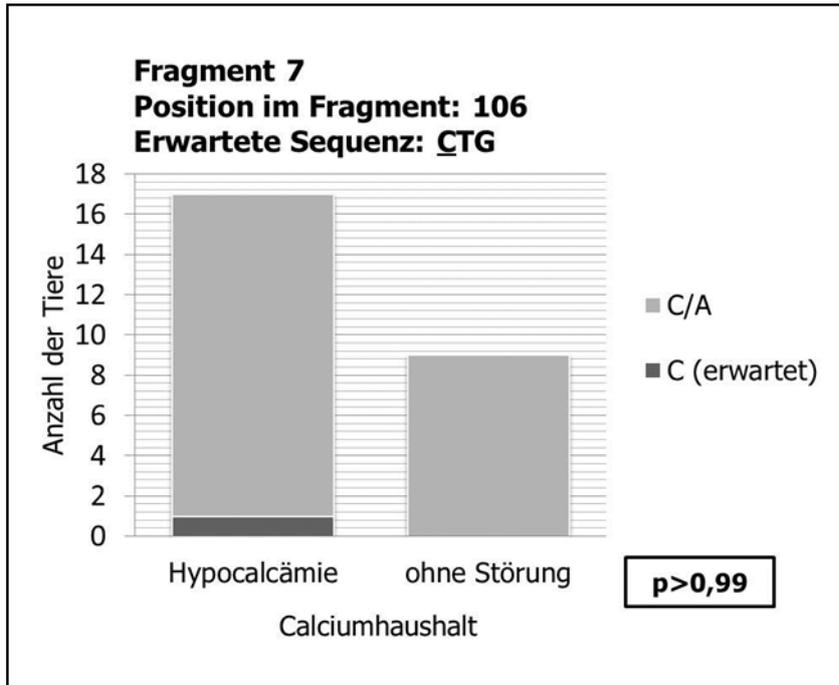


Abb. 20: Die C-A Alteration trat heterozygot (C/A) auf. Statt der erwarteten Base Cytosin an 106. Stelle des siebten Fragmentes, wurde bei 25 Tieren auf einem Allel Adenin gefunden. Davon waren 16 Tiere bereits mindestens einmal hypocalcämisch, 9 jedoch noch nie. Eine Korrelation zwischen Basen-Alteration und Hypocalcämie-Inzidenz gibt es nicht ($p > 0,05$).

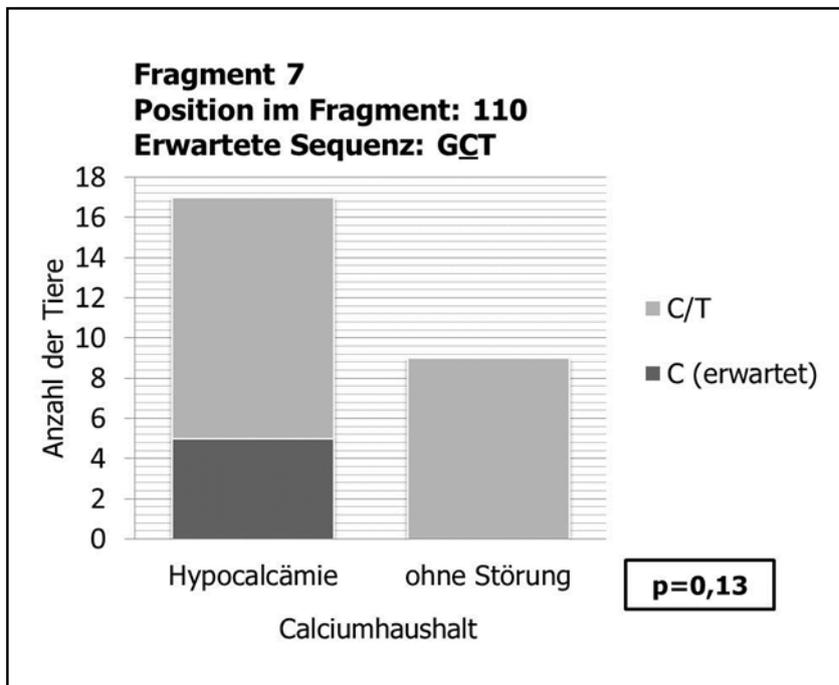


Abb. 21: Die C-T Alteration trat heterozygot (C/T) auf. Statt der erwarteten Base Cytosin an 110. Stelle des siebten Fragmentes, wurde bei 21 Tieren auf einem Allel Tyrosin gefunden. Davon waren 12 Tiere bereits mindestens einmal hypocalcämisch, 9 jedoch noch nie. Eine Korrelation zwischen Basen-Alteration und Hypocalcämie-Inzidenz gibt es nicht ($p > 0,05$).

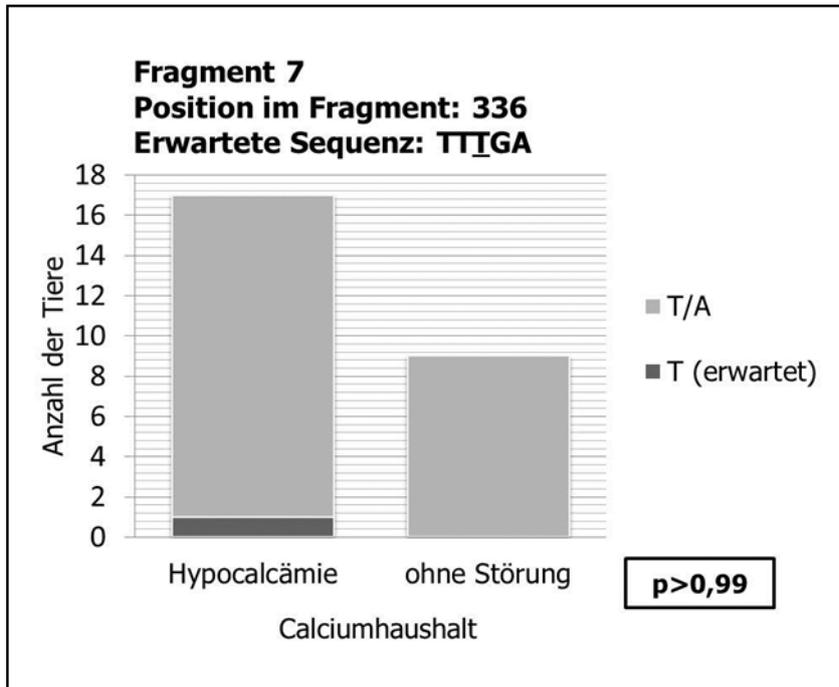


Abb. 22: Die T-A Alteration trat heterozygot (T/A) auf. Statt der erwarteten Base Tyrosin an 336. Stelle des siebten Fragmentes, wurde bei 25 Tieren auf einem Allel Adenosin gefunden. Davon waren 16 Tiere bereits mindestens einmal hypocalcämisch, 9 jedoch noch nie. Eine Korrelation zwischen Basen-Alteration und Hypocalcämie-Inzidenz gibt es nicht ($p>0,05$).

4.6 Fragment 10

Tab. 21: Sequenzalterationen des Vitamin-D-Rezeptor-Gens der 26 Versuchstiere in Fragment 10. Spalten 1-3: Identifikation der Versuchstiere (Tab. 17), Laktationsnummer und aufgetretener Calciumhaushaltentgleisung (Hypocalcämie: Entgleisung des Calcium-Haushalts mit Calcium-Blutwerten <0,9mmol/l, ohne Störung: Störung der Calcium-Homöostase noch nie aufgetreten). Spalten 4-6: Fragmentnummer (entspricht dem enthaltenen Exon), Fragmentposition der Sequenzalteration, Position in DNA (für Sequenzalterationen in Intron-Bereichen) oder Position in mRNA (für Sequenzalterationen in Exon-Bereichen), veröffentlichte VDR-Sequenz (veränderte Base unterstrichen), heterozygote Sequenzierergebnisse (T/C), mögliche Aminosäurenveränderung für jede allelische Variation (veröffentlichte Aminosäure (AS), AS-Nummer, ersetzte AS: Leu 271 Met, Cytosin (C), Guanin (G), Adenosin (A), Thymin (T), Lysin (Lys), Alanin (Ala), Asparagin (Asn), Tyrosin (Tyr), terminierende Aminosäure (Stop).

Fragmentname	Fragment 10	Fragment 10	Fragment 10
Position des Fragments	212	365	389
Position in DNA NC_007303 (wenn Intron)	55487	-	-
Position in mRNA XM_613129 (wenn Exon)	-	1284	1308
Erwartete Sequenz (Aminosäure)	CGCCC	<u>A</u> AG (Lys)	<u>A</u> AC (Asn)
Mutation	CGC/ <u>A</u> CC	A/ <u>T</u> AG	A/ <u>T</u> AC
Ermittelte Sequenz	CG <u>C</u> CC und heterozygot (CGCCC/CGACC)	<u>A</u> AG und heterozygot (AAG/TAG)	<u>A</u> AC und heterozygot (AAC/TAC)
Mögliche Aminosäure	-	Lys 428 Stop	Asn 436 Tyr

Tier Nr.	Laktation	Calciumhaushalt	Sequenzierergebnis	Sequenzierergebnis	Sequenzierergebnis
1	5	Hypocalcämie	C/A	A	A/T
2	4	Hypocalcämie	C	A	A
3	6	Hypocalcämie	C/A	A	A/T
4	6	Hypocalcämie	C/A	A/T	A/T
5	6	Hypocalcämie	C/A	A	A/T
6	6	Hypocalcämie	C	A	A/T
7	5	Hypocalcämie	C/A	A	A/T
8	5	Hypocalcämie	C/A	A	A/T
9	4	Hypocalcämie	C/A	A	A/T
10	5	Hypocalcämie	C/A	A	A/T
11	6	Hypocalcämie	C/A	A	A/T
12	6	Hypocalcämie	C/A	A	A/T
13	6	Hypocalcämie	C/A	A	A/T
14	6	Hypocalcämie	C/A	A	A/T
15	5	Hypocalcämie	C	A	A/T
16	5	Hypocalcämie	C/A	A	A/T
17	5	Hypocalcämie	C	A	A/T
18	5	ohne Störung	C/A	A	A/T
19	6	ohne Störung	C/A	A	A/T
20	5	ohne Störung	C/A	A	A/T
21	5	ohne Störung	C/A	A	A/T
22	5	ohne Störung	C/A	A	A/T
23	5	ohne Störung	C	A	A/T
24	6	ohne Störung	C	A	A/T
25	5	ohne Störung	C/A	A	A/T
26	5	ohne Störung	C	A	A/T

	10 20 30 40 50
Fragment 10	GAGACGAGGT GGGACAGGAC CAGATGACCC AGGTGGACCT GAGACTTGAT

	60 70 80 90 100
Fragment 10	CCTCAAGGCA ATGGGAAGTG GCCAAGGGGT TGGGGAGGTC TGATGTCACA

	110 120 130 140 150
Fragment 10	GATTAGCAGC CATCCAGGAG TGACCGAGGA AGGTGCTGAG GCTGGGGGTC

	160 170 180 190 200
Fragment 10	TGTCTTCGGG CTGAGGGGTG AGGGCTGGGC AGTAAGGGAC CCGACTCAGA

	210 220 230 240 250
Fragment 10	GCTCCCCCCC GCCCCCACC TCTCTGCCCA CAGACCGCCC TGGAGTGCAG
AlterationC GACC.....

	260 270 280 290 300
Fragment 10	GACGCAGCAC TGGTCGAGGC CATCCAGGAC CGCCTGTCCA ACACGCTGCA

	310 320 330 340 350
Fragment 10	GACCTACATC CGCTGCCGCC ACCCGCCCC AGGCAGCCAC CTGCTCTACG

	360 370 380 390 400
Fragment 10	CCAAGATGAT CCAGAAAGCTG GCGGACCTGC GCAGCCTGAA CGAGGAGCAC
AlterationAGTAGCT.....TGTA CGA.....

	410 420 430 440 450
Fragment 10	TCCAAGCAGT ACCGCTGCCT CTCCTTCCAG CCCGAGTCCA GCATGAAGCT

	460 470 480 490
Fragment 10	CACACCCCTC CTGTTGAGG TGTTTGCAA CGAGATCTCC TGA

Abb. 23: Im zehnten Fragment, welches das zehnte Exon vollständig enthält, wurden drei Sequenzveränderung gefunden. Davon sind zwei im Exon an 365. und 389. Stelle positioniert, die dritte wurde im Intron an 212. Stelle des Fragmentes gefunden. Statt der erwarteten Base Cytosin (C) an 212. Stelle wurde bei 19 von 26 Tieren auf einem Allel Adenin (A) gefunden (C-A). Statt der erwarteten Base Adenosin (A) an 365. Stelle wurde bei einem von 26 Tieren homozygot Tyrosin (T) gefunden (A-T). Statt der erwarteten Base Adenosin (A) an 389. Stelle wurde bei 25 von 26 Tieren auf einem Allel Tyrosin (T) gefunden (A-T). Das Fragment umfasst 492 Basenpaare. Legende: **Exon**, **Basen-Alteration**, Intron.

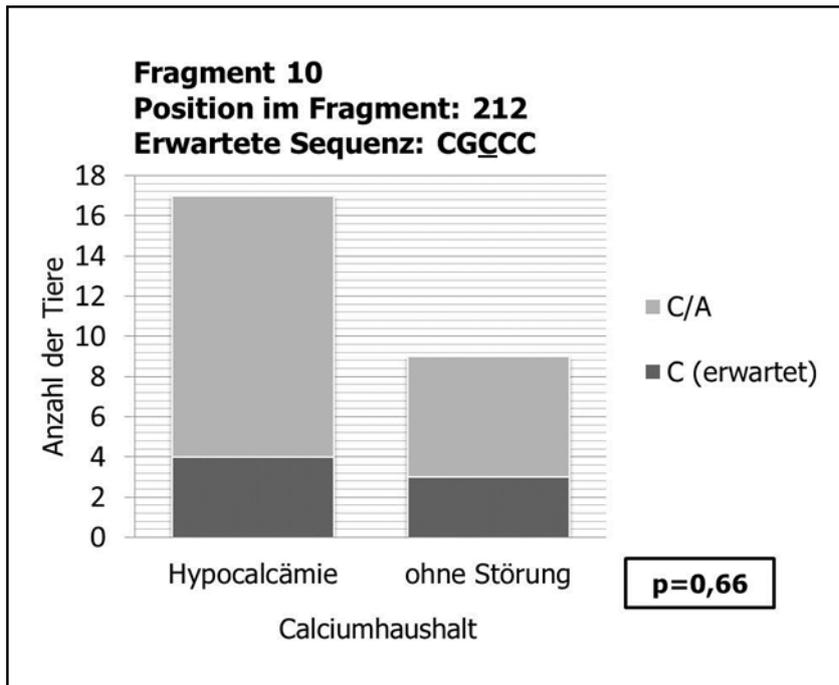


Abb. 24: Die C-A Alteration trat heterozygot (C/A) auf. Statt der erwarteten Base Cytosin an 212. Stelle des zehnten Fragmentes, wurde bei 19 Tieren auf einem Allel Adenosin gefunden. Davon waren 13 Tiere bereits mindestens einmal hypocalcämisch, 6 jedoch noch nie. Eine Korrelation zwischen Basen-Alteration und Hypocalcämie-Inzidenz gibt es nicht ($p>0,05$).

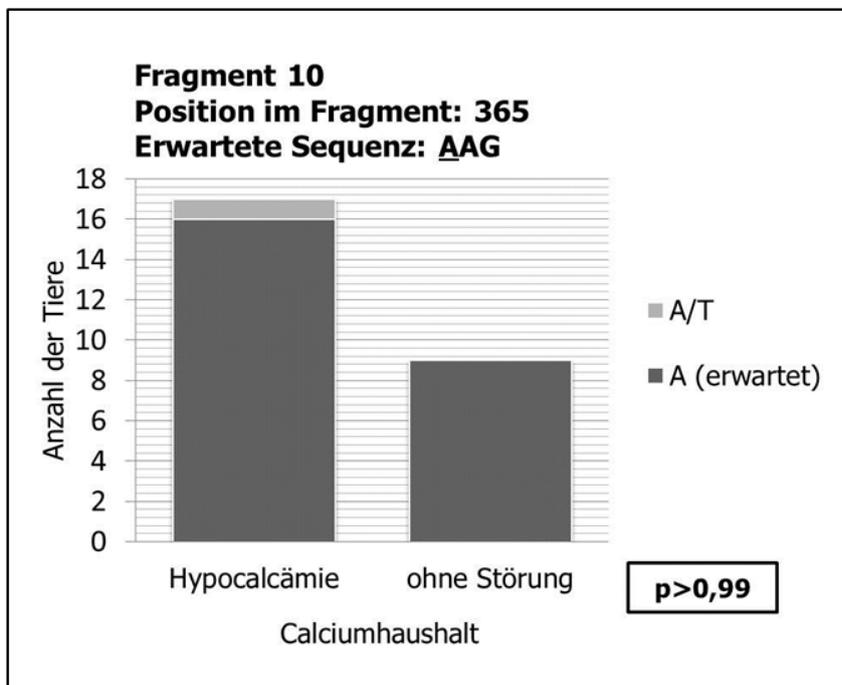


Abb. 25: Die A-T Alteration trat heterozygot (A/T) auf. Statt der erwarteten Base Adenosin an 365. Stelle des zehnten Fragments, wurde bei einem Tieren auf einem Allel Tyrosin (T) gefunden. Dieses Tier war bereits mindestens einmal hypocalcämisch. Eine Korrelation zwischen Basen-Alteration und Hypocalcämie-Inzidenz gibt es nicht ($p>0,05$).

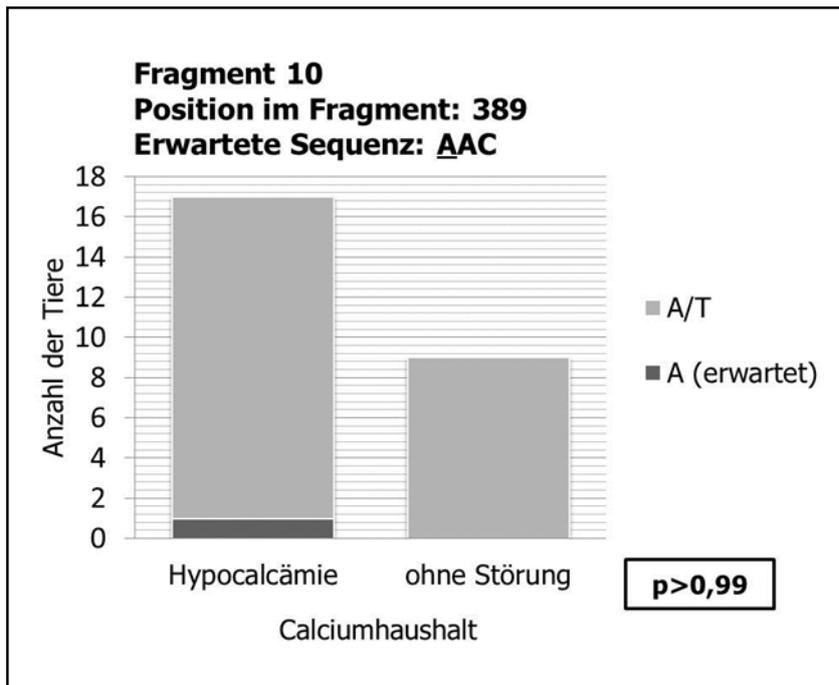


Abb. 26: Die A-T Alteration trat heterozygot (A/T) auf. Statt der erwarteten Base Adenosin an 389. Stelle des zehnten Fragmentes, wurde bei 25 Tieren auf einem Allel Tyrosin gefunden. Davon waren 16 Tiere bereits mindestens einmal hypocalcämisch, 9 jedoch noch nie. Eine Korrelation zwischen Basen-Alteration und Hypocalcämie-Inzidenz gibt es nicht ($p > 0,05$).

4.7 mRNA und Aminosäuresequenz des VDR

Die vier der acht Einzel-Basen-Alterationen, welche in Exon-Bereichen gelegen waren, verursachten potentielle Änderungen in der Aminosäuren-Sequenz auf einem Allel. Der Leserahmen zur Identifizierung der Basen-Triplets wurde durch die Aminosäure-Sequenz (NCBI *Reference Sequence*: NM_001167932.1) bestimmt (Abb. 27). In Fragment 7 änderte sich das Basen-Triplett, welches die 271. Aminosäure in der mRNA verschlüsselt, durch die Substitution C-A von CTG, kodierend für die Aminosäure Leucin, zu ATG, kodierend für die Aminosäure Methionin (Leu 271 Met). Im selben Fragment änderte sich das Basentriplett welches die 272. Aminosäure in der mRNA verschlüsselt, durch die Substitution C-T von GCT, kodierend für die Aminosäure Alanin, zu GTT, kodierend für die Aminosäure Valin (Ala 272 Val).

In Fragment 10 änderte sich das Codon durch die Substitution A-T von AAG, kodierend für die Aminosäure Lysin, zu TAG, kodierend für ein terminierendes Codon (Lys 428 Stop), und durch die zweite A-T Substitution von AAC, kodierend für die Aminosäure Asparagin, zu TAC, kodierend für die Aminosäure Tyrosin (Asn 436 Tyr).

Die Basenänderung in Fragment 10 welche den Austausch der Aminosäure Lysin zu einem terminierenden Codon verursachte (Lys 428 Stop) wurde lediglich bei einem Versuchstier heterozygot festgestellt. Eine terminierende Aminosäure führt zum Abbruch der Protein-Sequenz an dieser Stelle und kann die Funktionalität des Proteins wesentlich vermindern. Da es keine signifikante Korrelation mit der Hypocalcämie-Inzidenz gab, wurde von Tests zur Funktionalität der Sequenzalterationen (Protein-Analyse) abgesehen.

Lediglich bei einem Tier der Versuchsgruppe entsprach die vollständige Sequenz exakt der publizierten Sequenz.

3	ccg ggc gcc ggg agc gcg gag cag cgt gcc cac ccg cag gac cag	47
1	Pro Gly Ala Gly Ser Ala Glu Gln Arg Ala His Pro Gln Asp Gln	15
48	agt cct ttt ggt tgg aag cat ctg cga acc ctc aca gaa ggg cac	92
16	Ser Pro Phe Gly Trp Lys His Leu Arg Thr Leu Thr Glu Gly His	30
93	ccc ttg gcc tga ctt ccc tgt ccc cct gct cct aca gct atg gag	137
31	Pro Leu Ala End Leu Pro Cys Pro Pro Ala Pro Thr Ala Met Glu	45
138	gcg act gcg gcc agc act tcc tta cct gac cct ggc gac ttt gac	182
46	Ala Thr Ala Ala Ser Thr Ser Leu Pro Asp Pro Gly Asp Phe Asp	60
183	cgg aac gtg ccc cgg atc tgt ggg gtg tgc ggg gac cga gcc acc	227
61	Arg Asn Val Pro Arg Ile Cys Gly Val Cys Gly Asp Arg Ala Thr	75
228	ggc ttc cat ttc aac gct atg acc tgc gaa ggc tgc aaa ggc ttc	272
76	Gly Phe His Phe Asn Ala Met Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe	90
273	ttc agg cgg agc atg aag cgg aag gcg ctg ttc acc tgt ccc ttc	317
91	Phe Arg Arg Ser Met Lys Arg Lys Ala Leu Phe Thr Cys Pro Phe	105
318	aat gga gac tgc cgc atc acc aag gac aac cgc cgc cac tgc cag	362
106	Asn Gly Asp Cys Arg Ile Thr Lys Asp Asn Arg Arg His Cys Gln	120
363	gcc tgc cgg ctg aag cgc tgt att gac atc ggc atg atg aag gaa	407
121	Ala Cys Arg Leu Lys Arg Cys Ile Asp Ile Gly Met Met Lys Glu	135
408	ttc atc ctg act gat gaa gaa gtg cag cgg aag cgg gag atg atc	452
136	Phe Ile Leu Thr Asp Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg Glu Met Ile	150
453	ctc aag cgg aag gag gag gag gcc ttg aag gac agc ctg cgg ccg	497
151	Leu Lys Arg Lys Glu Glu Glu Ala Leu Lys Asp Ser Leu Arg Pro	165
498	aag ctg tca gag gag cag cag cgc atc atc acc acc ctg ctg gaa	542
166	Lys Leu Ser Glu Glu Gln Gln Arg Ile Ile Thr Thr Leu Leu Glu	180
543	gcc cac cac aag acc tac gac gac acc tac tcc gac ttc agc cag	587
181	Ala His His Lys Thr Tyr Asp Asp Thr Tyr Ser Asp Phe Ser Gln	195
588	ttc cgg cct cca gtt cgc aac agt gag gac gag ggg aac cgt cct	632
196	Phe Arg Pro Pro Val Arg Asn Ser Glu Asp Glu Gly Asn Arg Pro	210
633	ttg agg tcg ata ctc acg ccc agc ttc tct gga aac tca tcc tcc	677
211	Leu Arg Ser Ile Leu Thr Pro Ser Phe Ser Gly Asn Ser Ser Ser	225
678	tcc tgt tcg gat cac tgt acc tcc tct cca gac aca atg gag cca	722
226	Ser Cys Ser Asp His Cys Thr Ser Ser Pro Asp Thr Met Glu Pro	240
723	acc agc ttc tcc aac cag gat ctg aat gaa gaa gac tcc gat gac	767
241	Thr Ser Phe Ser Asn Gln Asp Leu Asn Glu Glu Asp Ser Asp Asp	255
768	cct tct gtg acc ctg gac ctg tcc cag ctc tcc atg ctg ccc cac	812
256	Pro Ser Val Thr Leu Asp Leu Ser Gln Leu Ser Met Leu Pro His	270
813	ctg gct gac ctg gtc agt tat agc atc cag aag gtc atc ggc ttt	857
271	Leu Ala Asp Leu Val Ser Tyr Ser Ile Gln Lys Val Ile Gly Phe	285
858	gcc aag atg atc cca ggg ttc aga gac ctc acc cct gag gac cag	902
286	Ala Lys Met Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Thr Pro Glu Asp Gln	300

903	atc gtg ctg ctg aag tcg agt gcc att gaa gtc atc atg ctt cgc	947
301	Ile Val Leu Leu Lys Ser Ser Ala Ile Glu Val Ile Met Leu Arg	315
948	tcc aac cag tcc ttc acc ctg gac gac gac atg tcc tgg acc tgt	992
316	Ser Asn Gln Ser Phe Thr Leu Asp Asp Asp Met Ser Trp Thr Cys	330
993	ggc agc ccg gac tac aag tac caa gtc agc gac gtg acc aga gcc	1037
331	Gly Ser Pro Asp Tyr Lys Tyr Gln Val Ser Asp Val Thr Arg Ala	345
1038	gga cac agc ctg gag ctc att gag ccc ctc atc aag ttc cag gtg	1082
346	Gly His Ser Leu Glu Leu Ile Glu Pro Leu Ile Lys Phe Gln Val	360
1083	ggg ctg aag aag ctg aat ttg cac gaa gag gaa cat gtc ctg ctc	1127
361	Gly Leu Lys Lys Leu Asn Leu His Glu Glu Glu His Val Leu Leu	375
1128	atg gcc atc tgc att gtc tcc cca gac cgc cct gga gtg cag gac	1172
376	Met Ala Ile Cys Ile Val Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Gln Asp	390
1173	gca gca ctg gtc gag gcc atc cag gac cgc ctg tcc aac acg ctg	1217
391	Ala Ala Leu Val Glu Ala Ile Gln Asp Arg Leu Ser Asn Thr Leu	405
1218	cag acc tac atc cgc tgc cgc cac ccg ccc cca ggc agc cac ctg	1262
406	Gln Thr Tyr Ile Arg Cys Arg His Pro Pro Pro Gly Ser His Leu	420
1263	ctc tac gcc aag atg atc cag aag ctg gcg gac ctg cgc agc ctg	1307
421	Leu Tyr Ala Lys Met Ile Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser Leu	435
1308	aac gag gag cac tcc aag cag tac cgc tgc ctc tcc ttc cag ccc	1352
436	Asn Glu Glu His Ser Lys Gln Tyr Arg Cys Leu Ser Phe Gln Pro	450
1353	gag tcc agc atg aag ctc aca ccc ctc ctg ttc gag gtg ttt ggc	1397
451	Glu Ser Ser Met Lys Leu Thr Pro Leu Leu Phe Glu Val Phe Gly	466
1398	aac gag atc tcc tga	1412
466	Asn Glu Ile Ser End	469

Abb. 27: mRNA des VDR mit verschlüsselten Aminosäuren und Basen-Alterationen. Legende: Aminosäuren des VDR, Basen-Alterationen welche potentielle Aminosäuren-Veränderungen bedingen. Angegeben ist die publizierte Sequenz.

5 Diskussion

5.1 Gebärparese als ökonomisches Problem in der Milchviehhaltung

Die Gebärparese ist trotz ihrer seit langem bekannten Pathogenese (Goff 2008) immer noch eine der kostenintensivsten Erkrankungen in der Milchviehhaltung, da die Therapie und die möglichen Folgeerkrankungen großen ökonomischen Schaden anrichten. So wurden die Kosten einer Gebärparese 1996 in den USA mit 334\$ pro Fall angegeben (Guard 1996).

Auch die hohe Fallzahl an unerkannten subklinischen Hypocalcämien (bis zu 42%) bedeuten aufgrund möglicher Komplikationen (Kap. 2.1) wie Immunsuppression, eingeschränkter Darmaktivität oder beeinträchtigter Produktivität und Korrelationen mit anderen Krankheiten wie Labmagenverlagerung (Coppock 1974) oder Nachgeburtsverhaltung (Curtis *et al.* 1983) einen wirtschaftlichen Verlust.

Meistens betrifft das Auftreten der parturienten Hypocalcämie und der Gebärparese Hochleistungskühe, die aufgrund ihrer hohen Milchleistung die Calcium-Mengen zur Produktion des Kolostrums zu Beginn der Laktation nicht mehr zur Verfügung stellen können. Dafür notwendig ist die rasche Adaptation der Regulationsmechanismen der Calcium-Homöostase, wie die intestinale Calcium-Absorption und die Calcium-Mobilisation aus dem Knochen (Kap. 2.1.1). Dieser Adaptationsprozess wird durch PTH (Kap. 2.2.3) und das Vitamin-D-Hormon $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Kap. 2.2.5.) kontrolliert. Die Signalkaskade dieser Regulationsmechanismen zur Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase, wie die Freisetzung von PTH (Goff *et al.* 1995) und der Anstieg von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Blut während einer Hypocalcämie, sind auch bei der Kuh bestätigt worden. Es wurde jedoch gezeigt, dass das Auftreten der Gebärparese nicht mit reduzierten PTH- oder $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentrationen erklärt werden kann (Blum *et al.* 1974; Horst *et al.* 1978; Goff *et al.* 1991).

Zur Prävention der Gebärparese sind vielfältige Prophylaxe-Strategien in der Milchviehhaltung gängige Praxis (Goff 2008). Diese umfassen neben der Optimierung der Haltungsbedingungen im Allgemeinen, eine Anionen-reiche und Calcium-restriktive

Fütterung, die Gabe von Vitamin D bzw. Vitamin-D-Metaboliten wenige Tage *prä partum* und die Applikation von Calcium zum Geburtszeitpunkt (Kap. 2.3.1).

Verschiedene Gründe werden als Ursache für die Anfälligkeit für das Auftreten von Gebärparese diskutiert (Kap. 2.3). Der wichtigste Einfluss bleibt das Herdenmanagement, also in erster Linie der Kuhkomfort und die präpartale Fütterung, durch welches die stark schwankenden Inzidenzen von 5-80% erklärt werden können (DeGaris und Lean 2008).

Des Weiteren scheint die Rasse einen Einfluss auf die Suszeptibilität zur Entwicklung der Gebärparese zu haben. Speziell bei Kühen der Rasse Jersey wurde eine vermehrte Anfälligkeit festgestellt. Auch das zunehmende Risiko im Alter zur Entwicklung einer Gebärparese oder Hypocalcämie ist mehrfach belegt worden (Kap. 2.4). Ein Alters-bedingter Abfall der intestinalen VDR-Konzentration wurde sowohl bei Menschen (Ebeling *et al.* 1992), als auch bei Ratten und Kühen (Horst *et al.* 1990; Liang *et al.* 1994) beschrieben. Das erklärt möglicherweise, warum Färsen seltener eine Hypocalcämie entwickeln, als Kühe in einer fortgeschrittenen Laktation. Wood *et al.* beschrieben eine abfallende intestinale Vitamin-D-Sensibilität mit dem Alter, die sich negativ auf die duodenale Calcium-Aufnahme auswirkt (Wood *et al.* 1998). Kinyamu *et al.* fanden jedoch keinen Zusammenhang zwischen einem Alters-bedingten Abfall der VDR-Konzentration und der abnehmenden Calcium-Aufnahme im Alter (Kinyamu *et al.* 1997). Andere Studien deckten wiederum überhaupt keine Abnahme der VDR-Konzentration mit dem Alter auf (Lee *et al.* 2003; Liesegang *et al.* 2008). Außerdem wurde bei allen Kühen, unabhängig vom Auftreten einer Hypocalcämie, ein Abfall der VDR-Konzentration in der Mukosa des Colons zu Beginn der Laktation beschrieben (Liesegang *et al.* 2007).

Widersprüchlich sind auch Untersuchungen zur Calbindin_{9k}-Expression im Alter. Yamagishi *et al.* beschrieben eine negative Korrelation von duodенaler Calbindin_{9k}-mRNA und dem Alter (Yamagishi *et al.* 2006), während Lee *et al.* eine erhöhte Calbindin_{9k}-Expression im kaudalen Teil des Duodenums mit zunehmendem Alter beim Menschen maßen (Lee *et al.* 2003).

Ebenfalls widersprüchlich bleiben der Einfluss von endokrinen Fehlfunktionen, die Heredität und der Einfluss von Östrogen auf die Entwicklung der Hypocalcämie. Während Schwartz *et al.* und Duque *et al.* einen Anstieg von VDR-Gen-Transkripten in mit Östrogen behandelten Ratten (Schwartz *et al.* 2000) und Mäusen (Duque *et al.* 2002) beschreiben, maßen Leonard *et al.* höhere VDR-Konzentrationen bei ovariectomierten Ratten (Leonard *et al.* 2001).

Die genannten Ursachen können das unterschiedlich häufige Auftreten der Gebärparese zwischen verschiedenen Herden, Altersgruppen und Rassen erklären. Unklar bleibt jedoch bei allen Erklärungsversuchen, warum einige Kühe derselben Herde, einer Altersgruppe und einer Rasse den Beginn der Laktation ohne Entgleisung des Calcium-Haushalts überstehen, während andere, unter denselben Bedingungen, eine subklinische oder klinische Hypocalcämie entwickeln. Da die meisten Krankheiten auf Wechselwirkungen zwischen mehreren Genen und Umweltfaktoren beruhen (Voet *et al.* 2010c), erscheint es logisch, die Ursache für eine Krankheitsanfälligkeit in genetischen Unterschieden zu suchen, wenn Tiere denselben Umweltfaktoren ausgesetzt sind.

Ein neuer Erklärungsansatz für eine erhöhte Anfälligkeit zur Entwicklung der Gebärparese könnte eine Beeinträchtigung der Funktion des Vitamin-D-Rezeptors durch Alterationen in der Sequenz des VDR-Gens sein (Kap. 5.2). Deswegen, wurde in dieser Arbeit versucht, die potentielle Rolle von VDR-Gen-Alterationen auf die Anfälligkeit für Gebärparese bei Milchkühen zu erörtern.

Mit dem Entdecken einer Gen-Alteration, die mit der Gebärparese korreliert werden kann, können diese Erkenntnisse mithilfe einer bereits etablierten Methode des genombasierten Selektionsverfahrens (Brade und Brade 2010) in die Rinderzucht einfließen. Durch Gen-Chips können mittels Oligonukleotid-Hybridanalyse Abweichungen in der Gensequenz durch Fluoreszenz-markierte Sonden aufgespürt und dargestellt werden.

Schon heute werden mittels SNP-Gen-Kartierung und Assoziationsstudien genomische Zuchtwerte für Rinder erstellt, welche in die Zuchtwertberechnung einfließen (Kap. 2.3.3).

5.2 VDR-Gen-Polymorphismen als Ursache für Hypocalcämien bei der Milchkuh?

Viele Studien in der Humanmedizin beschreiben eine positive Korrelation zwischen VDR-Gen-Polymorphismen und individuellen Abweichungen in der Regulation des Calcium-Haushalts. Beschrieben wurden unter anderem Korrelationen mit unterschiedlicher Knochendichte (Arai *et al.* 1997), verändertem Frakturrisiko (Fang *et al.* 2003), dem Ausmaß der Expression von VDR im Dünndarm (Arai *et al.* 2001) oder einer veränderten Osteoporose-Inzidenz (Wood 1998; Eisman 1999; Uitterlinden und Ralston 2006).

Meta-Analysen zeigen allerdings auch viele widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich dieser Korrelationen (Gross *et al.* 1996; Fang *et al.* 2006).

Gen-Sequenzalterationen in Exons können Einfluss auf die Aminosäure-Sequenz und damit auf die Struktur und Funktionalität der Proteine haben (Voet *et al.* 2010a), z.B. wenn Leserahmen (durch Basen-Insertion oder -Deletion) oder Codons von Basen-Mutationen beeinträchtigt sind. Da der VDR die Zellantwort auf die hormonelle Regulation einer abweichenden Blut-Calcium-Konzentration vermittelt, können sich Abweichungen in der Gen-Sequenz wesentlich auf die Proteinfunktion des VDR auswirken und das Zusammenspiel von PTH, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und der Zelle stören. Der Einfluss von VDR-Gen-Polymorphismen auf die VDR-Protein-Funktion und seinen Signalweg ist noch vielfach unerforscht. Man weiß jedoch, dass VDR-Gen-Polymorphismen einen Abfall in der [^3H]1,25(OH) $_2\text{D}_3$ -Bindungsaffinität an den VDR und eine geringere Gen-Transaktivierung (Malloy *et al.* 1997; Whitfield *et al.* 2001) oder geringere VDR-mRNA-Konzentrationen (Fang *et al.* 2005) zur Folge haben.

Da die vier Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thyrosin, bzw. Uracil in der RNA, in Triplets, also je drei Basen, die 20 möglichen Aminosäuren kodieren, gibt es mehr Kodierungsmöglichkeiten ($4^3=64$) als Aminosäuren. So werden beispielsweise Arginin, Leucin und Serin durch je sechs verschiedene Basen-Triplets, sogenannte Synonyme, verschlüsselt (Tab. 22). Diese Eigenschaft nennt man Degeneriertheit des genetischen Codes (Voet *et al.* 2010b). Bei sogenannten stummen Mutationen kommt es zum Basenaustausch und einer veränderten Triplett-Sequenz, das veränderte Triplett kodiert

jedoch für die gleiche Aminosäure, weswegen diese Basen-Alterationen keine Auswirkungen auf die Sequenz des verschlüsselten Proteins haben. Alterationen die auch eine Änderung der Aminosäure im VDR-Protein nach sich ziehen, haben je nach Lokalisation Einfluss auf die Funktion der entsprechenden Protein-Domäne. So sind Auswirkungen auf die DNA-Bindung, die Heterodimerisation mit dem RXR und die Hormonbindung mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durch Basen-Alterationen in den entsprechenden Domänen des VDR-Proteins beschrieben worden (Kap. 2.5.4).

Tab. 22: Übersicht über Verschlüsselung der Aminosäuren durch Basentriplets

1. Base	2. Base				3. Base
	U	C	A	G	
U	Phenylalanin	Serin	Tyrosin	Cystein	U
	Leucin		Stopp ^b	Stopp ^b	A
				Tryptophan	G
C	Leucin	Prolin	Histidin	Arginin	U
			Glutamin		C
					A
					G
A	Isoleucin	Threonin	Asparagin	Serin	U
			Lysin		Arginin
	Methionin ^a				A
					G
G	Valin	Alanin	Asparaginsäure	Glycin	U
			Glutaminsäure		C
					A
					G

^a Das Codon AUG fungiert auch als Initiations-Signal.

^b Stopp-Codon, terminierendes Codon

Bezerra et al. beschrieben eine Verbindung zwischen verschiedenen VDR-Genotypen und der Calcium-Konzentration in der Milch adoleszenter brasilianischer Mütter (Bezerra *et al.* 2008). Ausgehend von dieser Studie, stellten wir die Hypothese auf, dass es einen ähnlichen Mechanismus bei Milchkühen geben könnte, der eine individuelle Schwäche verursacht, die Calcium-Homöostase nach der Geburt, wenn der Calciumbedarf zur Milch-Synthese ansteigt, zu erhalten.

Der Einfluss von VDR-Gen-Alterationen auf das Auftreten von Hypocalcämie bei Milchkühen wurde nach unserem Wissensstand noch in keiner Studie untersucht.

5.3 Möglichkeiten der Untersuchung auf Gen-Alterationen

Um die Ursachen für eine Krankheit genetisch zu lokalisieren gibt es zwei Ansätze.

Zum einen die Kartierung des Erbgutes mithilfe von genetischen oder physikalischen Markern und Lokalisierung über familiäre Kopplungsanalysen und Assoziationsstudien. Diese Methode grenzt den verantwortlichen Gen-Abschnitt örtlich ein, ohne dessen Funktion zu kennen (Lottspeich und Zorbas 1998a).

Größer angelegte Studien (Reese *et al.* 2010; Childers *et al.* 2011) arbeiten an der Kartierung des gesamten Genoms, bzw. ganzer Chromosomen des Rindes. Die Bestimmung des genomischen Zuchtwertes für deutsche Holsteins anhand von geschätzten Effekten von SNPs (Kap. 2.3.3) wird seit August 2009 in Deutschland bereits erfolgsversprechend durchgeführt (VIT 2009).

Bei der zweiten Methode versucht man vom Phänotyp der Krankheit auf das Gen zu schließen, in diesem Fall den Vitamin-D-Rezeptor aufgrund seiner Funktion in der Calcium-Homöostase, und sucht spezifisch in diesem Gen nach individuellen Abweichungen in der Basensequenz (Lottspeich und Zorbas 1998a).

Zum Auffinden von Gen-Veränderungen in spezifischen DNA-Segmenten werden verschiedene Möglichkeiten beschrieben (Tab. 23). Die meisten Methoden beschreiben das spezifische Verhalten der DNA-Fragmente, wie zum Beispiel das Laufverhalten in der Gelelektrophorese oder das Bindungsverhalten mit markierten Oligo-Nukleotiden, und schließen bei unterschiedlichen Eigenschaften auf verschiedene Genotypen, ohne die Veränderung selbst zu charakterisieren. Sie werden meist als Screening-Methoden für bekannte Mutationen in Versuchen mit großen Probandenzahlen benutzt.

Die Sequenzierung erlaubt die Untersuchung einer DNA-Sequenz auf unbekannte Mutationen und ermöglicht deren Charakterisierung. Nachteile sind der hohe technische und finanzielle Aufwand.

Tab. 23: Übersicht über Methoden zum Auffinden von Gen-Alterationen mit Namen der Methoden, kurzer Erklärung und Bemerkung nach (Lottspeich und Zorbas 1998b).

Methoden	Erklärung	Bemerkungen
Sequenzierung	Genauere Identifizierung und Charakterisierung von Mutationen durch Bestimmung der Basensequenz.	Aufgrund des hohen Aufwandes nicht für Screening-Verfahren geeignet
Restriktionsfragem-längenpolymorphismus (RFLP)	Entstehung/ Verlust von Restriktions-Schnittstellen durch Mutationen. Schneiden der PCR-Produkte durch Restriktions-Enzyme und elektrophoretische Auftrennung der Fragmente. Nachweis verschiedener Fragment-Muster	Nachweis bekannter Mutationen. Einsatz als genetischer Marker bei Kartierung von Genen.
Allelspezifische Hybridisierung	Untersuchung des Hybridisierungsverhalten von PCR-Produkten mit Allel-spezifischen Sonden auf festen Oberflächen und Sichtbarmachen durch spezifische Marker	Nachweis bekannter Mutationen/ Genotypisierung.
<i>Oligonucleotide-ligation assay</i> (OLA-Technik)	Bindung zweier Oligonukleotide durch DNA-Ligase bei gleicher Sequenz	Nachweis bekannter Mutationen/ Genotypisierung.
<i>Single-strand conformation polymorphism analysis</i> (SSCP)	Denaturierung der DNA-Fragmente; unterschiedliches Laufverhalten der PCR-Produkte bei Konformations-änderung in renaturierenden Gelen durch Mutations-bedingte unterschiedliche Sekundärstruktur	Keine Charakterisierung möglich
Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE)	Unterschiedliches Laufverhalten von doppelsträngiger DNA in Gelen mit zunehmend denaturierendem Charakter	Keine Charakterisierung möglich

In Arbeiten der Humanmedizin zu Korrelationen von VDR-Polymorphismen mit unterschiedlichen Krankheiten wird meist die RFLP-Technik eingesetzt (Morrison *et al.* 1992; Wood 1998; Fang *et al.* 2006; Vupputuri *et al.* 2006; Tripathi *et al.* 2010), um den Einfluss von Mutationen auf verschiedene Krankheiten wie Krebs, Diabetes, Tuberkulose, Nieren- oder Knochen-assoziierte Krankheiten festzustellen (Valdivielso und Fernandez 2006). Die in der RFLP-Technik eingesetzten Restriktionsenzyme sind bakterielle Enzyme, die auch als „gegen Fremd-DNA gerichtetes Immunsystem“ bezeichnet werden, da sie fremde DNA-Fragmente, welche durch Viren eingeschleust wurden, an einem fremden Methylierungs-

Muster erkennen und herausschneiden, während die eigene DNA durch Modifikationsenzyme (Methylasen) spezifisch markiert ist (Pingoud 2004).

Diese Eigenschaft macht man sich zunutze, um Gen-Mutationen festzustellen. Dafür wird die zu untersuchende DNA mit Restriktionsenzymen inkubiert, diese erkennen spezifische Restriktions-Schnittstellen und spalten die DNA in Fragmente mit unterschiedlicher Länge (Botstein *et al.* 1980). Die Fragmente werden in einem Agarose-Gel der Größe nach aufgetrennt und sichtbar gemacht und die Haplotypen anhand des spezifischen Fragment-Größen-Musters bestimmt (Gross *et al.* 1996). Durch Mutationen können Restriktions-Schnittstellen entstehen oder verschwinden, wodurch sich das Fragment-Größen-Muster ändert (Vandevyver *et al.* 1997). Auch SNPs können so erkannt werden, wenn sie die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym verändern. Eine Übersicht über einige Restriktionsenzyme welche für die Analyse von VDR-Gen-Alterationen verwendet wurden gibt Tab. 24.

Tab. 24: Beispiele für in Korrelations-Studien zu VDR-Gen-Alterationen verwendete Restriktionsenzyme, mit Beispielen für Arbeitsgruppen welche Studien zum VDR durchgeführt haben. Angegeben sind außerdem der Ursprung des Restriktionsenzym, seine Erkennungs-Sequenz mit Restriktions-Schnittstellen (↓) und Lokalisation im humanen VDR-Gen.

Restriktions-enzym	Ursprung	Erkennungs-Sequenz	Lokalisation in humanem VDR-Gen	Beispiele für Arbeitsgruppen
<i>Apal</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	5'...GGGCC↓C...3' 3'...C↓CCGGG...5'	Intron 8	(Faraco <i>et al.</i> 1989; Morrison <i>et al.</i> 1992)
<i>BsmI</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	5'...GAATGCN↓...3' 3'...CTTAC↓GN...5'	Intron 8	(Morrison <i>et al.</i> 1992; Ingles <i>et al.</i> 1997; Vandevyver <i>et al.</i> 1997; Vupputuri <i>et al.</i> 2006)
<i>TaqI</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	5'...T↓CGA...3' 3'...AGC↓T...5'	Exon 9	(Morrison <i>et al.</i> 1992; Verbeek <i>et al.</i> 1997; Chang <i>et al.</i> 2000; Vupputuri <i>et al.</i> 2006)
<i>FokI</i>	<i>Flavobacterium okeanoicoites</i>	5'...GGATGN ₉ ↓...3' 3'...CCTACN ₁₃ ↓...5'	Exon 2	(Gross <i>et al.</i> 1996; Vupputuri <i>et al.</i> 2006)

5.3.1 Sequenzieren als Methode der Wahl

Da für Milchkühe bis jetzt keine bekannten Polymorphismen des VDR-Gens vorliegen, konnte die RFLP-Technik von uns nicht eingesetzt werden. Stattdessen wurden die Sequenzen der Exons des VDR in der vorliegenden Arbeit durch Sequenzieren direkt bestimmt und verglichen. Dafür wurden sequenzspezifische Primer hergestellt (Kap. 3.2.2), die lediglich die kodierenden Teile des VDR-Gens umschließen, welche dann mithilfe einer DNA-Polymerase amplifiziert wurden. Diese PCR-Produkte wurden automatisiert sequenziert und mit der veröffentlichten VDR-Gen-Sequenz (NCBI) und unter den Versuchstieren verglichen. Durch Doppelansatz wurde versucht die Möglichkeit eines Sequenzierungsfehlers zu minimieren. Die Fehleranfälligkeit für automatisierte Sequenzierungsverfahren wird mit 1% angegeben (Voet *et al.* 2010a).

Die sequenzierten Sequenzen entsprechen 7% der Gesamtlänge des VDR-Gens, enthalten aber 99% der kodierenden Bereiche. Technisch bedingt konnten im Fragment 1 die ersten ca. 10 Basen von Exon 1 nicht eindeutig ausgelesen werden.

Die in dieser Studie eingeschlossenen Tiere gehörten sämtlich der Rasse Holstein Frisean an, weswegen ein Vergleich der sequenzierten Fragmente mit der auf NCBI veröffentlichten VDR-Sequenz der Rasse Hereford lediglich eine Homologie von 99,75% zeigte.

5.3.2 Lokalisation der sequenzierten Gen-Bereiche

Die in dieser Arbeit untersuchten DNA-Segmente konzentrierten sich auf die kodierenden Bereiche der DNA, die Exons, da Basen-Alterationen in diesen Bereichen direkte Auswirkungen auf die verschlüsselten Proteine haben können. Aufgrund der Anforderung an die Herstellung der Primer, wurden auch angrenzende Intron-Bereiche sequenziert.

Es wurden jedoch auch Krankheits-assozierte Polymorphismen in nicht-kodierenden Bereichen der DNA beschrieben (Wood 1998). Diese Polymorphismen werden als nicht-funktionell bezeichnet, da sie keine direkten Auswirkungen auf das Zielprotein haben. Das Phänomen der Korrelation mit Krankheiten erklärt sich durch einen Einfluss der Alteration auf die mRNA-Expressionsrate und -Stabilität oder sogenanntes *genetic linkage*. Dieses beschreibt die Begebenheit, dass Genbereiche, je näher sie benachbart sind, häufiger gekoppelt vererbt werden (Lottspeich und Zorbas 1998a). Eine Abweichung dieser Regel wird als *linkage disequilibrium* (Uitterlinden *et al.* 2004) bezeichnet, welches besagt, dass Allel-Kombinationen in einer Population häufiger oder weniger häufig auftreten als von zwei

Allelen zu erwarten wäre. Man geht also bei mit Krankheiten assoziierten nicht-funktionellen Polymorphismen davon aus, dass ein bestimmter unbekannter (eventuell Krankheitsauslösender) Genabschnitt mit diesem gekoppelt vererbt wird.

McKay et al. haben 2007 das Ausmaß des *linkage disequilibrium* im Genom bei acht Rinderrassen kartiert (McKay et al. 2007).

Da Intron-Bereiche weniger stark konserviert sind als Exons, geht man sogar von einer höheren Anzahl von SNPs in Introns als in Exons aus (Wang et al. 1998). Eine Untersuchung der Intron-Sequenzen auf Gen-Alterationen und deren Korrelation mit der Krankheitsgeschichte Gebärparese wäre trotz der Tatsache, dass sich die Alteration nicht direkt auf das VDR-Protein auswirkt, aufschlussreich. Bei Entdeckung einer korrelierten Gen-Alteration in Intron-Bereichen des VDR ist jedoch nicht zwangsläufig auf die Kopplung mit einer funktionellen Gen-Alteration des VDR-Proteins zu schließen, da die Möglichkeit der Kopplung mit anderen Genbereichen besteht.

5.3.3 Anzahl der Einzel-Basen-Alterationen und Vorliegen von SNPs

In dem nur kleinen sequenzierten Teil des VDR-Gens (7%), sind in dieser Studie an acht Positionen der acht Fragmente bei 26 Tieren insgesamt 160 Einzel-Basen-Alterationen gefunden worden. Die sequenzierten Fragmente wurden dabei mit der auf NCBI veröffentlichten bovinen VDR-Sequenz der Rasse Hereford verglichen. Die Tiere in dieser Studie gehörten alle der Rasse Holstein Frisean an, weswegen die hohe Anzahl an Abweichungen zur veröffentlichten Sequenz nicht verwundert.

Als Gen-Polymorphismus werden Gen-Sequenzalterationen mit einer Inzidenz von 1% in der Population beschrieben (Pschyrembel 2007b). Über das Vorliegen von SNPs kann aufgrund der kleinen Versuchstierzahl nicht geurteilt werden, da keine Rückschlüsse auf die Population geschlossen werden können.

5.3.4 Berechnung einer möglichen Korrelation

Die gefundenen Sequenzalterationen wurden in Kontingenztafeln eingetragen, um mithilfe des *Fisher's exact probability*-Tests, bzw. seiner Erweiterung nach Freeman und Halton, eine Korrelation zu Gruppe 1 oder 2 (vorangegangene periparturierte Hypocalcämie ja oder nein) zu errechnen. Der χ^2 -Test konnte aufgrund der geringen Tierzahl nicht durchgeführt werden (Kap. 3.3.2).

Die ermittelten Wahrscheinlichkeiten lagen sämtlich über dem festgelegten Signifikanz-Wert von $p < 0,05$; eine Korrelation zwischen einer Basen-Alteration und dem Auftreten der Gebärparese bzw. einer periparturienten Hypocalcämie konnte nicht festgestellt werden.

5.3.5 Limitierende Faktoren

Die Gebärparese bzw. periparturierte Hypocalcämie der Milchkuh ist eine Krankheit bei deren Entstehung viele extragenetische Risiko-Faktoren von Bedeutung sind (Kap. 2.4), was die Suche nach einer genetischen Ursache erschwert. In Betracht zu ziehen sind außerdem multifaktorielle genetische Ursachen, die schwierig zu untersuchen sind.

Einschränkende Faktoren dieser Studie sind des Weiteren die geringe Versuchstier-Zahl und die geringe Anzahl erhobener Parameter.

Die geringe Tier-Zahl wurde bewusst in Kauf genommen. Zum einen wurde die Auswahl der Probanden gezielt auf eine Milchvieh-Anlage reduziert, um von gleichen Umweltbedingungen ausgehen zu können, was die Auswahl (unterschiedliche Elterntiere, bekannte Krankengeschichte, 4.-6. Laktation) erschwerte. Zum anderen lagen bis jetzt keine wissenschaftlichen Erkenntnisse vor, die die von uns aufgestellte These unterstützt und eine größer angelegte Studie gerechtfertigt hätten.

Die Vielzahl der gefundenen Basenabweichungen in dieser Studie beweist zwar die Möglichkeit der dieser Arbeit zugrunde liegenden These, konnte sie aber nicht belegen.

Ferner ist zu überlegen, in zukünftigen Untersuchungen die Bedeutung des FGW23 zu prüfen, der unabhängig von möglichen Störungen der Signalkaskade über den VDR indirekt die Regulation des Calcium-Haushalts, wie die PTH-Freisetzung und die Calcitriol-Synthese, beeinflussen kann.

5.3.6 Genetische Kartierung der Rindergenoms

Nach Beginn dieser Arbeit im Jahr 2008 wurde im Rahmen der Erstellung der *Genome Bovine Database* (bovinegenome.org) die Kartierung des bovinen Rinder-Genoms unter anderem anhand von SNPs vorgenommen. Insgesamt wurden 6769 SNPs kartiert, davon 305 auf dem Chromosom 5, jedoch keines im Bereich des VDR-Gens (Arias *et al.* 2009). In anderen Arbeiten wurden einzelne bovine Chromosomen anhand von SNPs kartiert (Marques *et al.* 2008; Nilsen *et al.* 2008).

5.4 Gefundene Gen-Sequenz-Variationen

Aus der *Vena coccygea* von 26 Milchkühen aus Gotha, Thüringen, wurde EDTA-Blut entnommen und daraus die DNA isoliert. Die DNA-Sequenzen des VDR wurden in acht Fragmenten mittels PCR amplifiziert und anschließend automatisiert sequenziert (Fragmente 1, 2, 3, 4, 5/6, 7, 8/9, 10). Die Fragmente enthalten die gleichnamigen Exons. Exons 5 und 6 und Exons 8 und 9 des VDR liegen dicht beieinander und wurden jeweils in einem Fragment sequenziert (Abb. 12). Es wurden durch Vergleich mit der veröffentlichten Sequenz acht Abweichungen in der VDR-Gen-Sequenz festgestellt, davon jeweils eine Basen-Alteration in den Fragmenten 1 und 2 und jeweils drei Basen-Alterationen in den Fragmenten 7 und 10 (Tab. 14).

Die meisten gefundenen Sequenz-Variationen betrafen nur ein Allel, sogenannte heterozygote Alterationen (Fragment 7 und 10), in zwei Fragmenten gab es auch homozygote Veränderungen, welche beide Allele betrafen (Fragment 1 und 2). Bei allen acht Gen-Variationen handelte es sich um den Austausch je einer einzelnen Basen (Substitution). Vier Alterationen waren in Intron-Bereichen (Fragment 1, 2, 7 und 10), vier Alterationen in Exon-Bereichen (Exon 7 und 10) zu finden. Die vier der acht Einzel-Basen-Alterationen, welche in Exon-Bereichen gelegen waren, verursachten potentielle Änderungen in der Aminosäure-Sequenz. Die heterozygote Basenänderung A→T in Fragment 10 an Position 365 verursachte bei einem Tier den Austausch der Aminosäure Lysin (AAG) zu einer terminierenden Aminosäure (TAG). Aufgrund der heterozygoten Ausprägung der Basensubstitution ist davon auszugehen, dass nicht das fehlerhafte Gen sondern die unveränderte Gen-Kopie des zweiten Allels exprimiert wurde, da sonst größere Abweichungen in der Funktion des VDR und damit in der Calcium-Homöostase zu erwarten gewesen wären.

5.5 Schlussfolgerungen

Die Ziele dieser Arbeit waren, herauszufinden, ob Gen-Alterationen in den Exon-Bereichen des VDR Gens existieren, und ob diese mit der Krankheitsgeschichte, in diesem Fall Entgleisung der Calcium-Homöostase, korrelieren.

Es wurden 160 Einzel-Basen-Alterationen an acht Positionen im VDR gefunden. Auf das Vorliegen von SNPs kann aufgrund der geringen Versuchstier-Zahl nicht geschlossen werden.

In Exons lokalisierte Gen-Alterationen können einen direkten Einfluss auf die Proteinstruktur oder -funktionalität besitzen. Gen-Alterationen in Intron-Bereichen der DNA können aufgrund von *genetic linkage* oder *linkage disequilibrium* jedoch ebenfalls mit Krankheiten assoziiert sein. Die Sequenzierung des vollständigen VDR-Gens erscheint deswegen sinnvoll, für die Untersuchung des VDR-Proteins ist die Sequenzierung der Exon-Bereiche jedoch ausreichend.

In dieser Studie wurde keine Korrelation zwischen Gen-Sequenzalterationen des VDR-Gens und der Krankheitsgeschichte (Hypocalcämie ja/ nein) gefunden.

Die Ergebnisse dieser Studie lassen die Annahme nicht zu, dass Alterationen der Gensequenz des VDR-Proteins einen Einfluss auf die Anfälligkeit für Gebärparese oder periparturienter Hypocalcämie bei Milchkühen haben.

6 Zusammenfassung

Untersuchung von Sequenzalterationen des Vitamin-D-Rezeptor-Gens im Hinblick auf Hypocalcämie und Gebärparese bei Milchkühen

Die peripartale Hypocalcämie der Milchkuh gehört zu den bedeutendsten Störungen des Mineralstoffwechsels in der Milchviehhaltung. In den USA wird das Auftreten von subklinischen Hypocalcämien bei Erstkalbinnen mit bis zu 25%, bei Vielkalbinnen mit 40 bis über 50% angegeben (Reinhardt *et al.* 2010), die Inzidenz für die Ausprägung klinischer Symptome wie Festliegen (Gebärparese) beträgt 5-10% (DeGaris und Lean 2008; Goff 2008). Daher sind vielfältige Prophylaxe- und Therapiekonzepte inzwischen gängige Praxis in der Milchviehhaltung.

Die Pathogenese der Hypocalcämie ist seit vielen Jahren bekannt. Der sprunghaft ansteigende Calcium-Bedarf für die Bildung von Kolostrum und Milch kann nicht schnell genug durch entsprechende Absorption aus dem Magen-Darm-Trakt bzw. Mobilisation aus dem Knochen gedeckt werden. Fällt der Blut-Calcium-Spiegel unter einen Schwellenwert, kommt es zum klinischen Bild des Festliegens.

Die Regulation des Calcium-Haushalts ist zwar vielfach und in der Sequenz der Regulationsabläufe auch bei Kühen beschrieben worden, unklar ist jedoch immer noch, warum einige Tiere die Umstellung auf den erhöhten Calcium-Bedarf ohne Ausprägung klinischer Symptome überwinden, andere hingegen nicht. Beim Menschen sind Polymorphismen des Vitamin-D-Rezeptor-Gens im Zusammenhang mit veränderter Knochendichte, Osteoporose und verändertem Calciumgehalt der Milch beschrieben worden. Da der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) die Umsetzung der Wirkungen von Calcitriol, der biologisch aktiven Form des Vitamin D, vermittelt, ist er essentiell für den Erhalt der Calcium-Homöostase. Die beim Menschen nachgewiesenen Beziehungen zwischen Alterationen des VDR und Störungen des Calcium-Haushalts überraschen daher nicht. Polymorphismen im bovinen Vitamin-D-Rezeptor-Gen könnten somit möglicherweise eine Prädisposition für die Gebärparese bzw. die Resistenz erklären. Variationen in der Nukleinsäuresequenz der

Exons können den Austausch von Aminosäuren und damit eine veränderte Proteinsequenz des Vitamin-D-Rezeptors verursachen, die wiederum eine veränderte Ansprechbarkeit des Rezeptors, beziehungsweise, je nach Lokalisation der Mutation, eine eingeschränkte Funktionalität der betroffenen Protein-Domäne bedingen kann.

Sequenzen von VDR-Exons und angrenzenden Intron-Abschnitten von 26 Milchkühen, alle in der 4.-6. Laktation, wurden mit der auf NCBI veröffentlichten Sequenz verglichen. Vier der acht entdeckten Sequenzalterationen sind auf Exons lokalisiert. Bei Vergleich der veränderten Basensequenz mit den für Aminosäuren kodierenden Triplets, wurden in allen vier Fällen potentielle Änderungen auf die Aminosäuresequenz festgestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen gefundenen Variationen in Exon- oder exonnahen Intron-Bereichen des VDR-Gens und Hypocalcämie-Inzidenz bei Milchkühen festgestellt werden ($p > 0,05$).

Da nur ein begrenzter Teil des VDR-Gens sequenziert wurde, ist eine Hypocalcämie-bedingende Basen-Alteration nicht ausgeschlossen, eine Alteration mit direkten Auswirkungen auf das VDR-Protein erscheint aber unwahrscheinlich. Aus statistischen Gründen wäre in einer fortführenden Studie außerdem eine größere Fallzahl wünschenswert. Limitierender Faktor bei der Auswahl der Probanden aus einem Betrieb, sind jedoch Kühe in ihrer 4.-6. Laktation, aus ähnlichen Haltungsbedingungen, die noch nie mit einer Hypocalcämie auffällig geworden oder verwandt sind.

7 Summary

Exploration of sequence alterations of the vitamin D receptor gene in regard to hypocalcemia and periparturient paresis in dairy cows

Periparturient hypocalcemia belongs to the most important mineral metabolism dysfunctions in dairy cows. The incidence of subclinical hypocalcemia in the USA is given with 25% in heifers and up to 40 to 50 % in older cows (Reinhardt *et al.* 2010), the incidence of clinical symptoms (downer cow syndrome) is given with 5-10% (DeGaris und Lean 2008; Goff 2008). Hence manifold prophylaxis and therapy concepts to prevent periparturient paresis are established in current practice in dairy cattle husbandry.

The aetiopathology of hypocalcemia is well known for many years. The escalating need for calcium to produce colostrum and milk at the onset of lactation cannot be covered fast enough through absorption of calcium from the gastrointestinal tract or through mobilization from the bone. Clinical symptoms occur if the blood-calcium-level drops under a defined marginal value.

The regulating steps to maintain calcium homeostasis have been described repeatedly, also in cattle, though it remains elusive why some animals are able to adjust to the increased calcium need without developing hypocalcemia, while others are not.

In humans, correlations of vitamin D receptor gene polymorphisms with lower bone density, osteoporosis and varying calcium concentration in breast milk have been reported.

Because the vitamin D receptor (VDR) moderates the effects of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, the biologically active form of vitamin D, in the cells, it is a key factor for maintaining calcium homeostasis.

Hence, proven relations between VDR alterations and disturbances in calcium balance in humans do not surprise. Alterations of the bovine VDR gene could possibly explain a predisposition for periparturient paresis or resistance of the VDR. Variations of the nucleic acid sequence can cause a replacement of amino acids and subsequent an altered protein sequence of the vitamin D receptor, that can be etiological for a modified responsiveness of

the receptor or cause an altered functionality of the VDR protein, according to the domain where the mutation is located.

Sequenced VDR exons and adjacent intronic parts of 26 dairy cows, all in their 4th to 6th lactation, were compared to the published sequence on NCBI (NC_007303.4). Four out of eight discovered alterations were localized on exons. When the modified base sequence was compared to the triplets coding for amino acids, a potential change of the amino acid sequence could be detected in all of the four cases.

Nevertheless, no correlation could be observed between located variations and hypocalcemia incidence in tested dairy cows ($p>0.05$).

Because only a limited part of the VDR gene has been sequenced for this project, a VDR gene sequence alteration causing hypocalcemia cannot be obviated, though an alteration with direct effects on the VDR protein seems improbable. For statistical reasons a greater number of animals would be preferable in a continuing study, though limiting factor in choosing probands is to find dairy cows in their 4th to 6th lactation with similar living conditions that have never experienced hypocalcemia before.

8 Literaturverzeichnis

- ABDEL-AZIM, G. A., FREEMAN, A. E., KEHRLI, M. E., JR., KELM, S. C., BURTON, J. L., KUCK, A. L. and SCHNELL, S. (2005).
Genetic basis and risk factors for infectious and noninfectious diseases in US Holsteins. I. Estimation of genetic parameters for single diseases and general health.
J Dairy Sci **88**(3): 1199-1207.
- ABU DAMIR, H., PHILLIPPO, M., THORP, B. H., MILNE, J. S., DICK, L. and NEVISON, I. M. (1994).
Effects of dietary acidity on calcium balance and mobilisation, bone morphology and 1,25 dihydroxyvitamin D in prepartal dairy cows.
Res Vet Sci **56**(3): 310-318.
- ADAMS, J. S., CHEN, H., CHUN, R., GACAD, M. A., ENCINAS, C., REN, S., NGUYEN, L., WU, S., HEWISON, M. and BARSONY, J. (2004).
Response element binding proteins and intracellular vitamin D binding proteins: novel regulators of vitamin D trafficking, action and metabolism.
J Steroid Biochem Mol Biol **89-90**(1-5): 461-465.
- AGRESTI, A. (1992).
A survey of Exact Inference for Contingency Tables.
Statistical Science **7**(1): 131-153.
- ALEXANDER, R. T., WOUDEBERG-VRENKEN, T. E., BUURMAN, J., DIJKMAN, H., VAN DER EERDEN, B. C., VAN LEEUWEN, J. P., BINDELS, R. J. and HOENDEROP, J. G. (2009).
Klotho prevents renal calcium loss.
J Am Soc Nephrol **20**(11): 2371-2379.
- ARAI, H., MIYAMOTO, K., TAKETANI, Y., YAMAMOTO, H., IEMORI, Y., MORITA, K., TONAI, T., NISHISHO, T., MORI, S. and TAKEDA, E. (1997).
A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women.
J Bone Miner Res **12**(6): 915-921.
- ARAI, H., MIYAMOTO, K. I., YOSHIDA, M., YAMAMOTO, H., TAKETANI, Y., MORITA, K., KUBOTA, M., YOSHIDA, S., IKEDA, M., WATABE, F., KANEMASA, Y. and TAKEDA, E. (2001).
The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene.
J Bone Miner Res **16**(7): 1256-1264.
- ARIAS, J. A., KEEHAN, M., FISHER, P., COPPIETERS, W. and SPELMAN, R. (2009).
A high density linkage map of the bovine genome.
BMC Genet **10**: 18.
- ARMBRECHT, H. J. (1986).
Age-related changes in calcium and phosphorus uptake by rat small intestine.
Biochim Biophys Acta **882**(3): 281-286.
- ARMBRECHT, H. J., BOLTZ, M. A. and HODAM, T. L. (2003).
PTH increases renal 25(OH)D₃-1 α -hydroxylase (CYP1 α) mRNA but not renal 1,25(OH)₂D₃ production in adult rats.
Am J Physiol Renal Physiol **284**(5): F1032-1036.

- ARMBRECHT, H. J., BOLTZ, M. A., RITTER, C. S. and BROWN, A. J. (2007).
Parathyroid hormone stimulation of the renal 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase--effect of age and free radicals.
J Steroid Biochem Mol Biol **103**(3-5): 330-333.
- ARMBRECHT, H. J., CHEN, M. L., HODAM, T. L. and BOLTZ, M. A. (1997).
Induction of 24-hydroxylase cytochrome P450 mRNA by 1,25-dihydroxyvitamin D and phorbol esters in normal rat kidney (NRK-52E) cells.
J Endocrinol **153**(2): 199-205.
- ARMBRECHT, H. J. and HODAM, T. L. (1994).
Parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D synergistically induce the 1,25-dihydroxyvitamin D-24-hydroxylase in rat UMR-106 osteoblast-like cells.
Biochem Biophys Res Commun **205**(1): 674-679.
- ARMBRECHT, H. J., HODAM, T. L., BOLTZ, M. A. and KUMAR, V. B. (1999).
Capacity of a low calcium diet to induce the renal vitamin D 1 α -hydroxylase is decreased in adult rats.
Biochem Biophys Res Commun **255**(3): 731-734.
- BANDZAITIS, V., KLIMIENE, I., SPAKAUSKAS, V. and MATUSEVICIUS, A. (2005).
Interaction between the levels of hormones and minerals in sera of healthy and sick cows.
Pol J Vet Sci **8**(4): 269-274.
- BAR, A., PERLMAN, R. and SACHS, M. (1985).
Observation on the use of 1 α -hydroxyvitamin D₃ in the prevention of bovine parturient paresis: the effect of a single injection on plasma 1 α -hydroxyvitamin D₃, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, calcium, and hydroxyproline.
J Dairy Sci **68**(8): 1952-1958.
- BARLET, J. P. (1980).
Inhibition by calcitonin of hypercalcaemia induced by 1,25-dihydroxycholecalciferol.
J Endocrinol **85**(1): 63-67.
- BARLET, J. P. and DAVICCO, M. J. (1992).
1 α -hydroxycholecalciferol for the treatment of the downer cow syndrome.
J Dairy Sci **75**(5): 1253-1256.
- BARTON, B. A., HODNETT, D. W., JORGENSEN, N. A. and DELUCA, H. F. (1984).
24,25-Dihydroxyvitamin D₃ administration increases incidence of parturient paresis.
J Dairy Sci **67**(6): 1236-1239.
- BARTON, B. A., JORGENSEN, N. A. and DELUCA, H. F. (1987).
Impact of prepartum dietary phosphorus intake on calcium homeostasis at parturition.
J Dairy Sci **70**(6): 1186-1191.
- BENDER, R. and LANGE, S. (2001).
Adjusting for multiple testing--when and how?
J Clin Epidemiol **54**(4): 343-349.
- BERGER, U., WILSON, P., MCCLELLAND, R. A., COLSTON, K., HAUSSLER, M. R., PIKE, J. W. and COOMBES, R. C. (1988).
Immunocytochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in normal human tissues.
J Clin Endocrinol Metab **67**(3): 607-613.
- BEZERRA, F. F., CABELLO, G. M., MENDONCA, L. M. and DONANGELO, C. M. (2008).
Bone mass and breast milk calcium concentration are associated with vitamin D receptor gene polymorphisms in adolescent mothers.
J Nutr **138**(2): 277-281.

- BIJVOET, O. L., VAN DER SLUYS VEER, J., DE VRIES, H. R. and VAN KOPPEN, A. T. (1971).
Natriuretic effect of calcitonin in man.
N Engl J Med **284**(13): 681-688.
- BINDELS, R. J., RAMAKERS, P. L., DEMPSTER, J. A., HARTOG, A. and VAN OS, C. H. (1992).
Role of Na⁺/Ca²⁺ exchange in transcellular Ca²⁺ transport across primary cultures of rabbit kidney collecting system.
Pflugers Arch **420**(5-6): 566-572.
- BLOCK, E. (1984).
Manipulating dietary anions and cations for prepartum dairy cows to reduce incidence of milk fever.
J Dairy Sci **67**(12): 2939-2948.
- BLUM, J. W., MAYER, G. P. and POTTS, J. T., JR. (1974).
Parathyroid hormone responses during spontaneous hypocalcemia and induced hypercalcemia in cows.
Endocrinology **95**(1): 84-92.
- BLUM, J. W., TRECHSEL, U., BORN, W., TOBLER, P. H., TAYLOR, C. M., BINSWANGER, U. and FISCHER, J. A. (1983).
Rapidly of plasma 1,25-dihydroxyvitamin D responses to hypo- and hypercalcemia in steers.
Endocrinology **113**(2): 523-526.
- BOOS, A., RINER, K., HASSIG, M. and LIESEGANG, A. (2007).
Immunohistochemical demonstration of vitamin D receptor distribution in goat intestines.
Cells Tissues Organs **186**(2): 121-128.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R. L., SKOLNICK, M. and DAVIS, R. W. (1980).
Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms.
Am J Hum Genet **32**(3): 314-331.
- BOYAN, B. D., DEAN, D. D., SYLVIA, V. L. and SCHWARTZ, Z. (1994).
Nongenomic regulation of extracellular matrix events by vitamin D metabolites.
J Cell Biochem **56**(3): 331-339.
- BRADE, W. (2005).
Nutzungsdauer und Abgangsursachen von Holsteinkühen: Konsequenzen für die Züchtung?
Der praktische Tierarzt **86**(9): 658-667.
- BRADE, W. and BRADE, E. (2010).
Genombasierte Selektion: neue Ansätze in der Rinderzüchtung - ein aktueller Überblick.
Der praktische Tierarzt **91**(10): 899-905.
- BRENZA, H. L., KIMMEL-JEHAN, C., JEHAN, F., SHINKI, T., WAKINO, S., ANAZAWA, H., SUDA, T. and DELUCA, H. F. (1998).
Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase gene promoter.
Proc Natl Acad Sci U S A **95**(4): 1387-1391.
- BRINGHURST and KRONENBERG (1998).
Williams textbook of Endocrinology.
Philadelphia, Saunders.
- BROWN, A. J., DUSSO, A. and SLATOPOLSKY, E. (1999).
Vitamin D.
Am J Physiol **277**(2 Pt 2): F157-175.
- BROWN, E. M. (1999).
Physiology and pathophysiology of the extracellular calcium-sensing receptor.
Am J Med **106**(2): 238-253.

- BROWN, E. M., GAMBA, G., RICCARDI, D., LOMBARDI, M., BUTTERS, R., KIFOR, O., SUN, A., HEDIGER, M. A., LYTTON, J. and HEBERT, S. C. (1993).
Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid.
Nature **366**(6455): 575-580.
- BROWN, E. M. and MACLEOD, R. J. (2001).
Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling.
Physiol Rev **81**(1): 239-297.
- CAI, Q., CHANDLER, J. S., WASSERMAN, R. H., KUMAR, R. and PENNISTON, J. T. (1993).
Vitamin D and adaptation to dietary calcium and phosphate deficiencies increase intestinal plasma membrane calcium pump gene expression.
Proc Natl Acad Sci U S A **90**(4): 1345-1349.
- CAO, X., ROSS, F. P., ZHANG, L., MACDONALD, P. N., CHAPPEL, J. and TEITELBAUM, S. L. (1993).
Cloning of the promoter for the avian integrin beta 3 subunit gene and its regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3.
J Biol Chem **268**(36): 27371-27380.
- CARMELIET, G., VAN CROMPHAUT, S., DACI, E., MAES, C. and BOUILLON, R. (2003).
Disorders of calcium homeostasis.
Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **17**(4): 529-546.
- CHANG, T. J., LEI, H. H., YEH, J. I., CHIU, K. C., LEE, K. C., CHEN, M. C., TAI, T. Y. and CHUANG, L. M. (2000).
Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population.
Clin Endocrinol (Oxf) **52**(5): 575-580.
- CHENG, J. B., MOTOLA, D. L., MANGELSDORF, D. J. and RUSSELL, D. W. (2003).
De-orphanization of cytochrome P450 2R1: a microsomal vitamin D 25-hydroxylase.
J Biol Chem **278**(39): 38084-38093.
- CHILDERS, C. P., REESE, J. T., SUNDARAM, J. P., VILE, D. C., DICKENS, C. M., CHILDS, K. L., SALIH, H., BENNETT, A. K., HAGEN, D. E., ADELSON, D. L. and ELSIK, C. G. (2011).
Bovine Genome Database: integrated tools for genome annotation and discovery.
Nucleic Acids Res **39**(Database issue): D830-834.
- CHRISTAKOS, S., BARLETTA, F., HUENING, M., DHAWAN, P., LIU, Y., PORTA, A. and PENG, X. (2003).
Vitamin D target proteins: function and regulation.
J Cell Biochem **88**(2): 238-244.
- CONTRERAS, P. A., MANSTON, R. and SANSOM, B. F. (1982).
Calcium mobilisation in hypomagnesaemic cattle.
Res Vet Sci **33**(1): 10-16.
- COPPOCK, C. E. (1974).
Displaced abomasum in dairy cattle: etiological factors.
J Dairy Sci **57**(8): 926-933.
- CURTIS, C. R., ERB, H. N., SNIFFEN, C. J. and SMITH, R. D. (1984).
Epidemiology of parturient paresis: predisposing factors with emphasis on dry cow feeding and management.
J Dairy Sci **67**(4): 817-825.

- CURTIS, C. R., ERB, H. N., SNIFFEN, C. J., SMITH, R. D., POWERS, P. A., SMITH, M. C., WHITE, M. E., HILLMAN, R. B. and PEARSON, E. J. (1983).
Association of parturient hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows.
J Am Vet Med Assoc **183**(5): 559-561.
- DANIEL, R. C. (1983).
Motility of the rumen and abomasum during hypocalcaemia.
Can J Comp Med **47**(3): 276-280.
- DATTA, N. S. and ABOU-SAMRA, A. B. (2009).
PTH and PTHrP signaling in osteoblasts.
Cell Signal **21**(8): 1245-1254.
- DEGARIS, P. J. and LEAN, I. J. (2008).
Milk fever in dairy cows: a review of pathophysiology and control principles.
Vet J **176**(1): 58-69.
- DELUCA, H. F. (2004).
Overview of general physiologic features and functions of vitamin D.
Am J Clin Nutr **80**(6 Suppl): 1689S-1696S.
- DELUCA, H. F. (2009).
Vitamin D and the parenteral nutrition patient.
Gastroenterology **137**(5 Suppl): S79-91.
- DELUCA, H. F. and ZIEROLD, C. (1998).
Mechanisms and functions of vitamin D.
Nutr Rev **56**(2 Pt 2): S4-10; discussion S54-75.
- DEMAY, M. B., KIERNAN, M. S., DELUCA, H. F. and KRONENBERG, H. M. (1992).
Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and mediate transcriptional repression in response to 1,25-dihydroxyvitamin D3.
Proc Natl Acad Sci U S A **89**(17): 8097-8101.
- DUQUE, G., EL ABDAIMI, K., MACORITTO, M., MILLER, M. M. and KREMER, R. (2002).
Estrogens (E2) regulate expression and response of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in bone cells: changes with aging and hormone deprivation.
Biochem Biophys Res Commun **299**(3): 446-454.
- DUSSO, A. S., BROWN, A. J. and SLATOPOLSKY, E. (2005).
Vitamin D.
Am J Physiol Renal Physiol **289**(1): F8-28.
- EBELING, P. R., SANDGREN, M. E., DIMAGNO, E. P., LANE, A. W., DELUCA, H. F. and RIGGS, B. L. (1992).
Evidence of an age-related decrease in intestinal responsiveness to vitamin D: relationship between serum 1,25-dihydroxyvitamin D3 and intestinal vitamin D receptor concentrations in normal women.
J Clin Endocrinol Metab **75**(1): 176-182.
- EISMAN, J. A. (1999).
Genetics of Osteoporosis.
Endocrine reviews **20**(6): 788.
- ERB, H. N., SMITH, R. D., OLTENACU, P. A., GUARD, C. L., HILLMAN, R. B., POWERS, P. A., SMITH, M. C. and WHITE, M. E. (1985).
Path model of reproductive disorders and performance, milk fever, mastitis, milk yield, and culling in Holstein cows.
J Dairy Sci **68**(12): 3337-3349.

- ERBEN, R. G. (2010).
Knochen und Calciumhomöostase
Physiologie der Haustiere. 3. Auflage W. V. ENGELHARDT and G. H. BREVES.
Stuttgart: Enke Verlag: 653-660.
- EVANS, K. N., BULMER, J. N., KILBY, M. D. and HEWISON, M. (2004).
Vitamin D and placental-decidual function.
J Soc Gynecol Investig **11**(5): 263-271.
- FALZON, M. (1996).
DNA sequences in the rat parathyroid hormone-related peptide gene responsible for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated transcriptional repression.
Mol Endocrinol **10**(6): 672-681.
- FANG, Y., RIVADENEIRA, F., VAN MEURS, J. B., POLS, H. A., IOANNIDIS, J. P. and UITTERLINDEN, A. G. (2006).
Vitamin D receptor gene BsmI and TaqI polymorphisms and fracture risk: A meta-analysis.
Bone **39**: 938-945.
- FANG, Y., VAN MEURS, J. B., BERGINK, A. P., HOFMAN, A., VAN DUIJN, C. M., VAN LEEUWEN, J. P., POLS, H. A. and UITTERLINDEN, A. G. (2003).
Cdx-2 polymorphism in the promoter region of the human vitamin D receptor gene determines susceptibility to fracture in the elderly.
J Bone Miner Res **18**(9): 1632-1641.
- FANG, Y., VAN MEURS, J. B., D'ALELIO, A., JHAMAI, M., ZHAO, H., RIVADENEIRA, F., HOFMAN, A., VAN LEEUWEN, J. P., JEHAN, F., POLS, H. A. and UITTERLINDEN, A. G. (2005).
Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin D receptor gene predispose to osteoporotic fracture: the rotterdam study.
Am J Hum Genet **77**(5): 807-823.
- FARACO, J. H., MORRISON, N. A., BAKER, A., SHINE, J. and FROSSARD, P. M. (1989).
Apal dimorphism at the human vitamin D receptor gene locus.
Nucleic Acids Res **17**(5): 2150.
- FEHER, J. J., FULLMER, C. S. and WASSERMAN, R. H. (1992).
Role of facilitated diffusion of calcium by calbindin in intestinal calcium absorption.
Am J Physiol **262**(2 Pt 1): C517-526.
- FEHER, J. J. and WASSERMAN, R. H. (1979).
Calcium absorption and intestinal calcium-binding protein: quantitative relationship.
Am J Physiol **236**(5): E556-561.
- FLEET, J. C. (2004).
Rapid, membrane-initiated actions of 1,25 dihydroxyvitamin D: what are they and what do they mean?
J Nutr **134**(12): 3215-3218.
- FLEET, J. C. (2006).
Molecular regulation of calcium and bone metabolism through the vitamin D receptor.
J Musculoskelet Neuronal Interact **6**(4): 336-337.
- FREEMAN, G. H. H., J. H. (1951).
Note on Exact Treatment of Contingency, Goodness of Fit and Other Problems of Significance.
Biometrika **38**(1/2): 141-149.
- FROMM, M. and HIERHOLZER, K. (2000).
Calcium.
Physiologie der Haustiere. 1. Auflage W. V. ENGELHARDT and G. BREVES.
Stuttgart: Enke Verlag: 270-271.

- FUDGE, N. J. and KOVACS, C. S. (2004).
Physiological studies in heterozygous calcium sensing receptor (CaSR) gene-ablated mice confirm that the CaSR regulates calcitonin release in vivo.
BMC Physiol **4**: 5.
- GALANTE, L., COLSTON, K. W., MACAULEY, S. J. and MACINTYRE, I. (1972).
Effect of calcitonin on vitamin D metabolism.
Nature **238**(5362): 271-273.
- GAST, D. R., HORST, R. L., JORGENSEN, N. A. and DELUCA, H. F. (1979).
Potential use of 1,25-dihydroxycholecalciferol for prevention of parturient paresis.
J Dairy Sci **62**(6): 1009-1013.
- GELFERT, C. C., ALPERS, I., DALLMEYER, M., DECKER, M., HUTING, A., LESCH, S., BAUMGARTNER, W. and STAUFENBIEL, R. (2007).
Factors affecting the success rate of treatment of recumbent dairy cows suffering from hypocalcaemia.
J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med **54**(4): 191-198.
- GELFERT, C. C. and STAUFENBIEL, R. (2008).
The role of dietary calcium concentration in the use of anionic salts to prevent parturient paresis in dairy cows.
Berl Munch Tierarztl Wochenschr **121**(7-8): 256-262.
- GOFF, J. P. (2006).
Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health.
J Dairy Sci **89**(4): 1292-1301.
- GOFF, J. P. (2008).
The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows.
Vet J **176**(1): 50-57.
- GOFF, J. P. and HORST, R. L. (1990).
Effect of subcutaneously released 24F-1,25-dihydroxyvitamin D3 on incidence of parturient paresis in dairy cows.
J Dairy Sci **73**(2): 406-412.
- GOFF, J. P., HORST, R. L., BEITZ, D. C. and LITLEDIKE, E. T. (1988).
Use of 24-F-1,25-dihydroxyvitamin D3 to prevent parturient paresis in dairy cows.
J Dairy Sci **71**(5): 1211-1219.
- GOFF, J. P., HORST, R. L., LITLEDIKE, E. T., BORIS, A. and USKOKOVIC, M. R. (1986).
Bone resorption, renal function and mineral status in cows treated with 1,25-dihydroxycholecalciferol and its 24-fluoro analogues.
J Nutr **116**(8): 1500-1510.
- GOFF, J. P., HORST, R. L., MUELLER, F. J., MILLER, J. K., KIESS, G. A. and DOWLEN, H. H. (1991).
Addition of chloride to a prepartal diet high in cations increases 1,25-dihydroxyvitamin D response to hypocalcemia preventing milk fever.
J Dairy Sci **74**(11): 3863-3871.
- GOFF, J. P., REINHARDT, T. A. and HORST, R. L. (1995).
Milk fever and dietary cation-anion balance effects on concentration of vitamin D receptor in tissue of periparturient dairy cows.
J Dairy Sci **78**(11): 2388-2394.
- GOINGS, R. L., JACOBSON, N. L., BEITZ, D. C., LITLEDIKE, E. T. and WIGGERS, K. D. (1974).
Prevention of parturient paresis by a prepartum, calcium-deficient diet.
J Dairy Sci **57**(10): 1184-1188.

- GOLTZMAN, D., HENDY, G. N. and BANVILLE, D. (1989).
Parathyroid hormone-like peptide: molecular characterization and biological properties.
Trends Endocrinol Metab **1**(1): 39-44.
- GRAY, R. W., OMDAHL, J. L., GHAZARIAN, J. G. and DELUCA, H. F. (1972).
25-Hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase. Subcellular location and properties.
J Biol Chem **247**(23): 7528-7532.
- GREEN, H. B., HORST, R. L., BEITZ, D. C. and LITTLEDIKE, E. T. (1981).
Vitamin D metabolites in plasma of cows fed a prepartum low-calcium diet for prevention of
parturient hypocalcemia.
J Dairy Sci **64**(2): 217-226.
- GROSS, C., ECCLESHALL, T. R., MALLOY, P. J., VILLA, M. L., MARCUS, R. and FELDMAN, D.
(1996).
The Presence of a Polymorphism at the Translation Initiation Site of the Vitamin D Receptor
Gene Is Associated with Low Bone Mineral Density in Postmenopausal Mexican-American
Women.
J Bone Miner Res **11**(12): 1850-1855.
- GRUMMER, R. R. (1993).
Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows.
J Dairy Sci **76**(12): 3882-3896.
- GUARD, C. (1996).
Fresh cow problems are costly: culling hurts the most.
Page 100 in Proc. 1994 Annu. Conf. Vet., Cornell Univ., Ithaca, NY.
- HARDENG, F. and EDGE, V. L. (2001).
Mastitis, ketosis, and milk fever in 31 organic and 93 conventional Norwegian dairy herds.
J Dairy Sci **84**(12): 2673-2679.
- HARRIS, D. J. (1981).
Factors predisposing to parturient paresis.
Aust Vet J **57**(8): 357-361.
- HAUSSLER, M. R., HAUSSLER, C. A., JURUTKA, P. W., THOMPSON, P. D., HSIEH, J. C., REMUS,
L. S., SELZNICK, S. H. and WHITFIELD, G. K. (1997).
The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states.
J Endocrinol **154** Suppl: S57-73.
- HAUSSLER, M. R., JURUTKA, P. W., HSIEH, J. C., THOMPSON, P. D., SELZNICK, S. H.,
HAUSSLER, C. A. and WHITFIELD, G. K. (1995).
New understanding of the molecular mechanism of receptor-mediated genomic actions of the
vitamin D hormone.
Bone **17**(2 Suppl): 33S-38S.
- HAUSSLER, M. R. H. C. A. (2008).
Vitamin D receptor: molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease
prevention.
Nutr Rev **66**(Suppl. 2): S98-S112.
- HERINGSTAD, B., CHANG, Y. M., GIANOLA, D. and KLEMETSDAL, G. (2005).
Genetic analysis of clinical mastitis, milk fever, ketosis, and retained placenta in three
lactations of Norwegian red cows.
J Dairy Sci **88**(9): 3273-3281.
- HEUER, C., SCHUKKEN, Y. H. and DOBBELAAR, P. (1999).
Postpartum body condition score and results from the first test day milk as predictors of
disease, fertility, yield, and culling in commercial dairy herds.
J Dairy Sci **82**(2): 295-304.

- HOEHE, M. R., TIMMERMANN, B. and LEHRACH, H. (2009)
Haplotypen und die systematische Analyse genetischer Variation: Krankheitsgene, „Drug Targets“ und Pharmakogenomik.
BIOspektrum, Sonderausgabe, 8. Jahrgang: 478-485.
- HOENDEROP, J. G., DARDENNE, O., VAN ABEL, M., VAN DER KEMP, A. W., VAN OS, C. H., ST - ARNAUD, R. and BINDELS, R. J. (2002).
Modulation of renal Ca²⁺ transport protein genes by dietary Ca²⁺ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in 25-hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase knockout mice.
FASEB J **16**(11): 1398-1406.
- HOENDEROP, J. G., NILIUS, B. and BINDELS, R. J. (2005).
Calcium absorption across epithelia.
Physiol Rev **85**(1): 373-422.
- HOENDEROP, J. G., VAN DER KEMP, A. W., HARTOG, A., VAN DE GRAAF, S. F., VAN OS, C. H., WILLEMS, P. H. and BINDELS, R. J. (1999).
Molecular identification of the apical Ca²⁺ channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D₃-responsive epithelia.
J Biol Chem **274**(13): 8375-8378.
- HOLICK, M. F. (1995).
Noncalcemic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and clinical applications.
Bone **17**(2 Suppl): 107S-111S.
- HOLICK, M. F. (2003).
Vitamin D: A millenium perspective.
J Cell Biochem **88**(2): 296-307.
- HOLICK, M. F. (2006).
Resurrection of vitamin D deficiency and rickets.
J Clin Invest **116**(8): 2062-2072.
- HOLICK, M. F. (2007).
Vitamin D deficiency.
N Engl J Med **357**(3): 266-281.
- HOLICK, M. F., SCHNOES, H. K., DELUCA, H. F., SUDA, T. and COUSINS, R. J. (1971).
Isolation and identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol. A metabolite of vitamin D active in intestine.
Biochemistry **10**(14): 2799-2804.
- HORST, R. L., GOFF, J. P. and REINHARDT, T. A. (1990).
Advancing age results in reduction of intestinal and bone 1,25-dihydroxyvitamin D receptor.
Endocrinology **126**(2): 1053-1057.
- HORST, R. L., GOFF, J. P. and REINHARDT, T. A. (1994).
Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow.
J Dairy Sci **77**(7): 1936-1951.
- HORST, R. L., GOFF, J. P. and REINHARDT, T. A. (2005).
Adapting to the transition between gestation and lactation: differences between rat, human and dairy cow.
J Mammary Gland Biol Neoplasia **10**(2): 141-156.
- HORST, R. L., GOFF, J. P., REINHARDT, T. A. and BUXTON, D. R. (1997).
Strategies for preventing milk fever in dairy cattle.
J Dairy Sci **80**(7): 1269-1280.

- HORST, R. L., JORGENSEN, N. A. and DELUCA, H. F. (1978).
Plasma 1,25-dihydroxyvitamin D and parathyroid hormone levels in paretic dairy cows.
Am J Physiol **235**(6): E634-637.
- HORST, R. L., SHEPARD, R. M., JORGENSEN, N. A. and DELUCA, H. F. (1979).
The determination of the vitamin D metabolites on a single plasma sample: changes during parturition in dairy cows.
Arch Biochem Biophys **192**(2): 512-523.
- HOSSEIN-ZADEH, N. G. and ARDALAN, M. (2010).
Bayesian estimates of genetic parameters for metritis, retained placenta, milk fever, and clinical mastitis in Holstein dairy cows via Gibbs sampling.
Res Vet Sci(2010), doi:10.1016/j.rvsc.2010.04.018).
- HOVE, K. and KRISTIENSEN, T. (1982).
Prevention of parturient hypocalcemia: effect of a single oral dose of 1,25-dihydroxyvitamin D₃.
J Dairy Sci **65**(10): 1934-1940.
- HSIEH, J. C., JURUTKA, P. W., GALLIGAN, M. A., TERPENING, C. M., HAUSSLER, C. A., SAMUELS, D. S., SHIMIZU, Y., SHIMIZU, N. and HAUSSLER, M. R. (1991).
Human vitamin D receptor is selectively phosphorylated by protein kinase C on serine 51, a residue crucial to its trans-activation function.
Proc Natl Acad Sci U S A **88**(20): 9315-9319.
- INGLES, S. A., HAILE, R. W., HENDERSON, B. E., KOLONEL, L. N., NAKAICHI, G., SHI, C. Y., YU, M. C., ROSS, R. K. and COETZEE, G. A. (1997).
Strength of linkage disequilibrium between two vitamin D receptor markers in five ethnic groups: implications for association studies.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **6**(2): 93-98.
- INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM, T. (2003).
The International HapMap Project.
Nature **426**(6968): 789-796.
- IRELAND, P. and FORDTRAN, J. S. (1973).
Effect of dietary calcium and age on jejunal calcium absorption in humans studied by intestinal perfusion.
J Clin Invest **52**(11): 2672-2681.
- JOHNSON, J. A., BECKMAN, M. J., PANSINI-PORTA, A., CHRISTAKOS, S., BRUNS, M. E., BEITZ, D. C., HORST, R. L. and REINHARDT, T. A. (1995).
Age and gender effects on 1,25-dihydroxyvitamin D₃-regulated gene expression.
Exp Gerontol **30**(6): 631-643.
- JONES, G., STRUGNELL, S. A. and DELUCA, H. F. (1998).
Current understanding of the molecular actions of vitamin D.
Physiol Rev **78**(4): 1193-1231.
- JORGENSEN, N. A. (1974).
Combating milk fever.
J Dairy Sci **57**(8): 933-944.
- JORGENSEN, N. A., HORST, R. L., DELUCA, H. F. and OGILVIE, M. L. (1978).
25-hydroxycholecalciferol for prevention of "milk fever" in dairy cows.
Vet Rec **103**(7): 136-138.
- JULIEN, W. E., CONRAD, H. R., HIBBS, J. W. and CRIST, W. L. (1977).
Milk fever in dairy cows. VIII. Effect of injected vitamin D₃ and calcium and phosphorus intake on incidence.
J Dairy Sci **60**(3): 431-436.

- KARAPLIS, A. C., LUZ, A., GLOWACKI, J., BRONSON, R. T., TYBULEWICZ, V. L., KRONENBERG, H. M. and MULLIGAN, R. C. (1994).
Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene.
Genes Dev **8**(3): 277-289.
- KAUNE, R. (2000).
Verteilung von Calcium und Phosphor im Körper.
Physiologie der Haustiere. 1. Auflage W. V. ENGELHARDT and G. H. BREVES.
Stuttgart: Enke Verlag: 621.
- KICHURA, T. S., HORST, R. L., BEITZ, D. C. and LITLEDIKE, E. T. (1982).
Relationships between prepartal dietary calcium and phosphorus, vitamin D metabolism, and parturient paresis in dairy cows.
J Nutr **112**(3): 480-487.
- KIMURA, K., REINHARDT, T. A. and GOFF, J. P. (2006).
Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle.
J Dairy Sci **89**(7): 2588-2595.
- KINYAMU, H. K., GALLAGHER, J. C., PRAHL, J. M., DELUCA, H. F., PETRANICK, K. M. and LANSPA, S. J. (1997).
Association between intestinal vitamin D receptor, calcium absorption, and serum 1,25 dihydroxyvitamin D in normal young and elderly women.
J Bone Miner Res **12**(6): 922-928.
- KIP, S. N. and STREHLER, E. E. (2004).
Vitamin D3 upregulates plasma membrane Ca²⁺-ATPase expression and potentiates apico-basal Ca²⁺ flux in MDCK cells.
Am J Physiol Renal Physiol **286**(2): F363-369.
- KITAZAWA, R., KITAZAWA, S. and MAEDA, S. (1999).
Promoter structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene.
Biochim Biophys Acta **1445**(1): 134-141.
- KONDO, T., KITAZAWA, R., MAEDA, S. and KITAZAWA, S. (2004).
1 alpha,25 dihydroxyvitamin D3 rapidly regulates the mouse osteoprotegerin gene through dual pathways.
J Bone Miner Res **19**(9): 1411-1419.
- KREMER, R., KARAPLIS, A. C., HENDERSON, J., GULLIVER, W., BANVILLE, D., HENDY, G. N. and GOLTZMAN, D. (1991).
Regulation of parathyroid hormone-like peptide in cultured normal human keratinocytes. Effect of growth factors and 1,25 dihydroxyvitamin D3 on gene expression and secretion.
J Clin Invest **87**(3): 884-893.
- KREMER, R., SEBAG, M., CHAMPIGNY, C., MEEROVITCH, K., HENDY, G. N., WHITE, J. and GOLTZMAN, D. (1996).
Identification and characterization of 1,25-dihydroxyvitamin D3-responsive repressor sequences in the rat parathyroid hormone-related peptide gene.
J Biol Chem **271**(27): 16310-16316.
- KURO-O, M., MATSUMURA, Y., AIZAWA, H., KAWAGUCHI, H., SUGA, T., UTSUGI, T., OHYAMA, Y., KURABAYASHI, M., KANAME, T., KUME, E., IWASAKI, H., IIDA, A., SHIRAKI-IIDA, T., NISHIKAWA, S., NAGAI, R. and NABESHIMA, Y. I. (1997).
Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing.
Nature **390**(6655): 45-51.

- KUROKAWA, R., YU, V. C., NAAR, A., KYAKUMOTO, S., HAN, Z., SILVERMAN, S., ROSENFELD, M. G. and GLASS, C. K. (1993).
Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers.
Genes Dev **7**(7B): 1423-1435.
- LACEY, D. L., TIMMS, E., TAN, H. L., KELLEY, M. J., DUNSTAN, C. R., BURGESS, T., ELLIOTT, R., COLOMBERO, A., ELLIOTT, G., SCULLY, S., HSU, H., SULLIVAN, J., HAWKINS, N., DAVY, E., CAPPARELLI, C., ELI, A., QIAN, Y. X., KAUFMAN, S., SAROSI, I., SHALHOUB, V., SENALDI, G., GUO, J., DELANEY, J. and BOYLE, W. J. (1998).
Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation.
Cell **93**(2): 165-176.
- LEAN, I. J., DEGARIS, P. J., MCNEIL, D. M. and BLOCK, E. (2006).
Hypocalcemia in dairy cows: meta-analysis and dietary cation anion difference theory revisited.
J Dairy Sci **89**(2): 669-684.
- LEE, G. S., CHOI, K. C., PARK, S. M., AN, B. S., CHO, M. C. and JEUNG, E. B. (2003).
Expression of human Calbindin-D(9k) correlated with age, vitamin D receptor and blood calcium level in the gastrointestinal tissues.
Clin Biochem **36**(4): 255-261.
- LEE, S. K. and LORENZO, J. A. (1999).
Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation.
Endocrinology **140**(8): 3552-3561.
- LEONARD, F., HAAG, M. and KRUGER, M. C. (2001).
Modulation of intestinal vitamin D receptor availability and calcium ATPase activity by essential fatty acids.
Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **64**(3): 147-150.
- LI, J. J. and SODEK, J. (1993).
Cloning and characterization of the rat bone sialoprotein gene promoter.
Biochem J **289** (Pt 3): 625-629.
- LIANG, C. T., BARNES, J., IMANAKA, S. and DELUCA, H. F. (1994).
Alterations in mRNA expression of duodenal 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and vitamin D-dependent calcium binding protein in aged Wistar rats.
Exp Gerontol **29**(2): 179-186.
- LIANG, C. T., BARNES, J., SACKTOR, B. and TAKAMOTO, S. (1991).
Alterations of duodenal vitamin D-dependent calcium-binding protein content and calcium uptake in brush border membrane vesicles in aged Wistar rats: role of 1,25-dihydroxyvitamin D3.
Endocrinology **128**(4): 1780-1784.
- LIANG, C. T., BARNES, J., TAKAMATO, S. and SACKTOR, B. (1989).
Effect of age on calcium uptake in isolated duodenum cells: role of 1,25-dihydroxyvitamin D3.
Endocrinology **124**(6): 2830-2836.
- LIESEGANG, A., RINER, K. and BOOS, A. (2007).
Effects of gestation and lactation on vitamin D receptor amounts in goats and sheep.
Domest Anim Endocrinol **33**(2): 190-202.
- LIESEGANG, A., SINGER, K. and BOOS, A. (2008).
Vitamin D receptor amounts across different segments of the gastrointestinal tract in Brown Swiss and Holstein Frisian cows of different age.
J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) **92**(3): 316-323.

- LITTLEDIKE, E. T. and HORST, R. L. (1982).
Vitamin D3 toxicity in dairy cows.
J Dairy Sci **65**(5): 749-759.
- LOTTTSPEICH, F. and ZORBAS, H. H. (1998a).
Physikalische und genetische Genkartierung.
Bioanalytik F. LOTTTSPEICH and H. ZORBAS.
Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH: 845-865.
- LOTTTSPEICH, F. and ZORBAS, H. H. (1998b).
Polymerase-Kettenreaktion.
Bioanalytik F. LOTTTSPEICH and H. ZORBAS.
Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH: 673-704.
- LYONS, D. T., FREEMAN, A. E. and KUCK, A. L. (1991).
Genetics of health traits in Holstein cattle.
J Dairy Sci **74**(3): 1092-1100.
- MACDONALD, P. N., DOWD, D. R., NAKAJIMA, S., GALLIGAN, M. A., REEDER, M. C., HAUSSLER, C. A., OZATO, K. and HAUSSLER, M. R. (1993).
Retinoid X receptors stimulate and 9-cis retinoic acid inhibits 1,25-dihydroxyvitamin D3-activated expression of the rat osteocalcin gene.
Mol Cell Biol **13**(9): 5907-5917.
- MACKEY, S. L., HEYMONT, J. L., KRONENBERG, H. M. and DEMAY, M. B. (1996).
Vitamin D receptor binding to the negative human parathyroid hormone vitamin D response element does not require the retinoid x receptor.
Mol Endocrinol **10**(3): 298-305.
- MALLOY, P. J., ECCLESHALL, T. R., GRÜNDER, VAN MALDERGEM, L., BOUILLON, R. and FELDMAN, D. (1997).
Hereditary Vitamin D Resistant Rickets Caused by a Novel Mutation in the Vitamin D Receptor That Results in Decreased Affinity for Hormone and Cellular Hyporesponsiveness.
J Clin Invest **99**(2): 297-304.
- MANNSTADT, M., JUPPNER, H. and GARDELLA, T. J. (1999).
Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties.
Am J Physiol **277**(5 Pt 2): F665-675.
- MARQUES, E., SCHNABEL, R. D., STOTHARD, P., KOLBEHDARI, D., WANG, Z., TAYLOR, J. F. and MOORE, S. S. (2008).
High density linkage disequilibrium maps of chromosome 14 in Holstein and Angus cattle.
BMC Genet **9**: 45.
- MARSELL, R. and JONSSON, K. B. (2010).
The phosphate regulating hormone fibroblast growth factor-23.
Acta Physiol (Oxf) **200**(2): 97-106.
- MASUYAMA, H., BROWNFIELD, C. M., ST-ARNAUD, R. and MACDONALD, P. N. (1997).
Evidence for ligand-dependent intramolecular folding of the AF-2 domain in vitamin D receptor-activated transcription and coactivator interaction.
Mol Endocrinol **11**(10): 1507-1517.
- MASUYAMA, H. and MACDONALD, P. N. (1998).
Proteasome-mediated degradation of the vitamin D receptor (VDR) and a putative role for SUG1 interaction with the AF-2 domain of VDR.
J Cell Biochem **71**(3): 429-440.

- MAYER, G. P., BLUM, J. W. and DEFTOS, L. J. (1975).
Diminished prepartal plasma calcitonin concentration on cows developing parturient hypocalcemia.
Endocrinology **96**(6): 1478-1485.
- MAYER, G. P., RAMBERG, C. F., JR., KRONFELD, D. S., BUCKLE, R. M., SHERWOOD, L. M., AURBACH, G. D. and POTTS, J. T., JR. (1969).
Plasma parathyroid hormone concentration in hypocalcemic parturient cows.
Am J Vet Res **30**(9): 1587-1597.
- MCKAY, S. D., SCHNABEL, R. D., MURDOCH, B. M., MATUKUMALLI, L. K., AERTS, J., COPPIETERS, W., CREWS, D., DIAS NETO, E., GILL, C. A., GAO, C., MANNEN, H., STOTHARD, P., WANG, Z., VAN TASSELL, C. P., WILLIAMS, J. L., TAYLOR, J. F. and MOORE, S. S. (2007).
Whole genome linkage disequilibrium maps in cattle.
BMC Genet **8**: 74.
- MENSENKAMP, A. R., HOENDEROP, J. G. and BINDELS, R. J. (2006).
Recent advances in renal tubular calcium reabsorption.
Curr Opin Nephrol Hypertens **15**(5): 524-529.
- MEUWISSEN, T. (2007).
Genomic selection: marker assisted selection on a genome wide scale.
J Anim Breed Genet **124**(6): 321-322.
- MORRISON, N. A., YEOMAN, R., KELLY, P. J. and EISMAN, J. A. (1992).
Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin.
Proc Natl Acad Sci U S A **89**(15): 6665-6669.
- MULLEN, P. A. (1975).
Clinical and biochemical responses to the treatment of milk fever.
Vet Rec **97**(05): 87-92.
- MÜLLER, U. and REINECKE, P. (2004).
Möglichkeiten der züchterischen Einflussnahme auf Merkmale der Tiergesundheit und Fruchtbarkeit.
Tiergesundheits- und Tierkrankheitslehre.
Stuttgart: Parey Verlag: 56-60.
- MURAYAMA, A., TAKEYAMA, K., KITANAKA, S., KODERA, Y., HOSOYA, T. and KATO, S. (1998).
The promoter of the human 25-hydroxyvitamin D3 1 alpha-hydroxylase gene confers positive and negative responsiveness to PTH, calcitonin, and 1 alpha,25(OH)2D3.
Biochem Biophys Res Commun **249**(1): 11-16.
- MURAYAMA, A., TAKEYAMA, K., KITANAKA, S., KODERA, Y., KAWAGUCHI, Y., HOSOYA, T. and KATO, S. (1999).
Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1alpha,25(OH)2D3 in intact animals.
Endocrinology **140**(5): 2224-2231.
- MURRAY, R. D., HORSFIELD, J. E., MCCORMICK, W. D., WILLIAMS, H. J. and WARD, D. (2008).
Historical and current perspectives on the treatment, control and pathogenesis of milk fever in dairy cattle.
Vet Rec **163**(19): 561-565.
- NAVEH-MANY, T. and SILVER, J. (1988).
Regulation of calcitonin gene transcription by vitamin D metabolites in vivo in the rat.
J Clin Invest **81**(1): 270-273.

- NCBI. (2011, 13.01.2011).
VDR vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor [Bos taurus] Retrieved 24.01.2011,
from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=533656.
- NEMETH, E. F. and SCARPA, A. (1987).
Rapid mobilization of cellular Ca²⁺ in bovine parathyroid cells evoked by extracellular divalent cations. Evidence for a cell surface calcium receptor.
J Biol Chem **262**(11): 5188-5196.
- NILSEN, H., HAYES, B., BERG, P. R., ROSETH, A., SUNDSAASEN, K. K., NILSEN, K. and LIEN, S. (2008).
Construction of a dense SNP map for bovine chromosome 6 to assist the assembly of the bovine genome sequence.
Anim Genet **39**(2): 97-104.
- NODA, M., VOGEL, R. L., CRAIG, A. M., PRAHL, J., DELUCA, H. F. and DENHARDT, D. T. (1990).
Identification of a DNA sequence responsible for binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhancement of mouse secreted phosphoprotein 1 (SPP-1 or osteopontin) gene expression.
Proc Natl Acad Sci U S A **87**(24): 9995-9999.
- NORMAN, A. W., MIZWICKI, M. T. and NORMAN, D. P. (2004).
Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model.
Nat Rev Drug Discov **3**(1): 27-41.
- OETZEL, G. R. (1991).
Meta-analysis of nutritional risk factors for milk fever in dairy cattle.
J Dairy Sci **74**(11): 3900-3912.
- OETZEL, G. R., FETTMAN, M. J., HAMAR, D. W. and OLSON, J. D. (1991).
Screening of anionic salts for palatability, effects on acid-base status, and urinary calcium excretion in dairy cows.
J Dairy Sci **74**(3): 965-971.
- OETZEL, G. R., OLSON, J. D., CURTIS, C. R. and FETTMAN, M. J. (1988).
Ammonium chloride and ammonium sulfate for prevention of parturient paresis in dairy cows.
J Dairy Sci **71**(12): 3302-3309.
- OHYAMA, Y., OZONO, K., UCHIDA, M., SHINKI, T., KATO, S., SUDA, T., YAMAMOTO, O., NOSHIRO, M. and KATO, Y. (1994).
Identification of a vitamin D-responsive element in the 5'-flanking region of the rat 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase gene.
J Biol Chem **269**(14): 10545-10550.
- OLSON, W. G., JORGENSEN, N. A., BRINGE, A. N., SCHULTZ, L. H. and DELUCA, H. F. (1973a).
25-Hydroxycholecalciferol (25-OHD3). I. Treatment for parturient paresis.
J Dairy Sci **56**(7): 885-888.
- OLSON, W. G., JORGENSEN, N. A., SCHULTZ, L. H. and DELUCA, H. F. (1973b).
25-Hydroxycholecalciferol (25-OHD3). II. Efficacy of parenteral administration in prevention of parturient paresis.
J Dairy Sci **56**(7): 889-895.
- PAVLIN, D., BEDALOV, A., KRONENBERG, M. S., KREAM, B. E., ROWE, D. W., SMITH, C. L., PIKE, J. W. and LICHTLER, A. C. (1994).
Analysis of regulatory regions in the COL1A1 gene responsible for 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated transcriptional repression in osteoblastic cells.
J Cell Biochem **56**(4): 490-501.

- PELEG, S., ABRUZZESE, R. V., COOPER, C. W. and GAGEL, R. F. (1993).
Down-regulation of calcitonin gene transcription by vitamin D requires two widely separated enhancer sequences.
Mol Endocrinol **7**(8): 999-1008.
- PENG, J. B., CHEN, X. Z., BERGER, U. V., VASSILEV, P. M., TSUKAGUCHI, H., BROWN, E. M. and HEDIGER, M. A. (1999).
Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption.
J Biol Chem **274**(32): 22739-22746.
- PENNER, G. B., TREMBLAY, G. F., DOW, T. and OBA, M. (2008).
Timothy hay with a low dietary cation-anion difference improves calcium homeostasis in periparturient Holstein cows.
J Dairy Sci **91**(5): 1959-1968.
- PERLMANN, T., RANGARAJAN, P. N., UMESONO, K. and EVANS, R. M. (1993).
Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs.
Genes Dev **7**(7B): 1411-1422.
- PHILLIPPO, M., REID, G. W. and NEVISON, I. M. (1994).
Parturient hypocalcaemia in dairy cows: effects of dietary acidity on plasma minerals and calciotropic hormones.
Res Vet Sci **56**(3): 303-309.
- PINGOUD, A. (2004). Restriktionsenzyme: Struktur, Funktion und Evolution [481. Sitzung am 5. November 2004 in Düsseldorf] Verlag Ferdinand Schöningh N.-W. A. D. WISSENSCHAFTEN. Paderborn, München, Wien, Zürich. **Vorträge N 464**: 28.
- PSCHYREMBEL (2007a). Calciferole. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. W. D. GRUYTER. Berlin. **261. Auflage**: 301.
- PSCHYREMBEL (2007b). Polymorphismus. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. W. D. GRUYTER. Berlin. **261. Auflage**: 1532.
- RACHEZ, C. and FREEDMAN, L. P. (2000).
Mechanisms of gene regulation by vitamin D(3) receptor: a network of coactivator interactions.
Gene **246**(1-2): 9-21.
- RACZ, A. and BARSONY, J. (1999).
Hormone-dependent translocation of vitamin D receptors is linked to transactivation.
J Biol Chem **274**(27): 19352-19360.
- RAMBERG, C. F., JR., JOHNSON, E. K., FARGO, R. D. and KRONFELD, D. S. (1984).
Calcium homeostasis in cows, with special reference to parturient hypocalcemia.
Am J Physiol **246**(5 Pt 2): R698-704.
- RASTINEJAD, F., PERLMANN, T., EVANS, R. M. and SIGLER, P. B. (1995).
Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats.
Nature **375**(6528): 203-211.
- REESE, J. T., CHILDERS, C. P., SUNDARAM, J. P., DICKENS, C. M., CHILDS, K. L., VILE, D. C. and ELSIK, C. G. (2010).
Bovine Genome Database: supporting community annotation and analysis of the *Bos taurus* genome.
BMC Genomics **11**: 645.
- REINHARDT, T. A., HORST, R. L. and GOFF, J. P. (1988).
Calcium, phosphorus, and magnesium homeostasis in ruminants.
Vet Clin North Am Food Anim Pract **4**(2): 331-350.

- REINHARDT, T. A., LIPPOLIS, J. D., MCCLUSKEY, B. J., GOFF, J. P. and HORST, R. L. (2010).
Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds.
Vet J(doi:10.1016/j.tvjl.2010.03.025).
- RICCARDI, D., HALL, A. E., CHATTOPADHYAY, N., XU, J. Z., BROWN, E. M. and HEBERT, S. C. (1998).
Localization of the extracellular Ca²⁺/polyvalent cation-sensing protein in rat kidney.
Am J Physiol **274**(3 Pt 2): F611-622.
- RINER, K., BOOS, A., HASSIG, M. and LIESEGANG, A. (2008).
Vitamin D receptor distribution in intestines of domesticated sheep *Ovis ammon f. aries*.
J Morphol **269**(2): 144-152.
- ROCHE, J. F. (2006).
The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency.
Anim Reprod Sci **96**(3-4): 282-296.
- ROST, C. R., BIKLE, D. D. and KAPLAN, R. A. (1981).
In vitro stimulation of 25-hydroxycholecalciferol 1 alpha-hydroxylation by parathyroid hormone in chick kidney slices: evidence for a role for adenosine 3',5'-monophosphate.
Endocrinology **108**(3): 1002-1006.
- RUT, A. R., HEWISON, M., KRISTJANSSON, K., LUISI, B., HUGHES, M. R. and O'RIORDAN, J. L. (1994).
Two mutations causing vitamin D resistant rickets: modelling on the basis of steroid hormone receptor DNA-binding domain crystal structures.
Clin Endocrinol (Oxf) **41**(5): 581-590.
- SACHS, M., BAR, A., NIR, O., OCHOVSKY, D., MACHNAI, B., MEIR, E., WEINER, B. Z. and MAZOR, Z. (1987a).
Efficacy of 1 alpha hydroxyvitamin D₃ in the prevention of bovine parturient paresis.
Vet Rec **120**(2): 39-42.
- SACHS, M., PERLMAN, R. and BAR, A. (1987b).
Use of 1 alpha-hydroxyvitamin D₃ in the prevention of bovine parturient paresis. IX. Early and late effects of a single injection.
J Dairy Sci **70**(8): 1671-1675.
- SCHAEFFER, L. R. (2006).
Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle.
J Anim Breed Genet **123**(4): 218-223.
- SCHRÖDER, B., RITTMANN, I., PFEFFER, E. and BREVES, G. (1997).
In vitro studies on calcium absorption from the gastrointestinal tract in small ruminants.
J Comp Physiol B **167**(1): 43-51.
- SCHRÖDER, B. and SCHEMANN, M. (2000).
Die ionale Basis des Aktionspotentials.
Physiologie der Haustiere W. V. ENGELHARDT and G. BREVES.
Stuttgart: Enke 27-31.
- SCHWARTZ, B., SMIRNOFF, P., SHANY, S. and LIEL, Y. (2000).
Estrogen controls expression and bioresponse of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in the rat colon.
Mol Cell Biochem **203**(1-2): 87-93.
- SECHEN, S. J., BREMEL, R. D. and JORGENSEN, N. A. (1988).
Prolactin, estradiol, and progesterone changes in parturient and nonparturient cows during the periparturient period.
Am J Vet Res **49**(3): 411-416.

- SHAPPELL, N. W., HERBEIN, J. H., DEFTOS, L. J. and AIELLO, R. J. (1987).
Effects of dietary calcium and age on parathyroid hormone, calcitonin and serum and milk minerals in the periparturient dairy cow.
J Nutr **117**(1): 201-207.
- SIMONET, W. S., LACEY, D. L., DUNSTAN, C. R., KELLEY, M., CHANG, M. S., LUTHY, R., NGUYEN, H. Q., WOODEN, S., BENNETT, L., BOONE, T., SHIMAMOTO, G., DEROSE, M., ELLIOTT, R., COLOMBERO, A., TAN, H. L., TRAIL, G., SULLIVAN, J., DAVY, E., BUCAY, N., RENSHAW-GEGG, L., HUGHES, T. M., HILL, D., PATTISON, W., CAMPBELL, P., SANDER, S., VAN, G., TARPLEY, J., DERBY, P., LEE, R. and BOYLE, W. J. (1997).
Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density.
Cell **89**(2): 309-319.
- SMITH, E. L., WALWORTH, N. C. and HOLICK, M. F. (1986).
Effect of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on the morphologic and biochemical differentiation of cultured human epidermal keratinocytes grown in serum-free conditions.
J Invest Dermatol **86**(6): 709-714.
- SMITH, P. N., PADILLA, M., WASSERMAN, R. H. and KALLFELZ, F. A. (1982).
Calcium and 24,25-dihydroxyvitamin D: inverse relation in cows with parturient paresis.
Calcif Tissue Int **34**(6): 564-566.
- SOLLER, M. (1994).
Marker assisted selection - an overview.
Animal Biotechnology **5**(2): 193-207.
- SONE, T., MARX, S. J., LIBERMAN, U. A. and PIKE, J. W. (1990).
A unique point mutation in the human vitamin D receptor chromosomal gene confers hereditary resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D3.
Mol Endocrinol **4**(4): 623-631.
- ST-ARNAUD, R., MESSERLIAN, S., MOIR, J. M., OMDAHL, J. L. and GLORIEUX, F. H. (1997).
The 25-hydroxyvitamin D 1-alpha-hydroxylase gene maps to the pseudovitamin D-deficiency rickets (PDDR) disease locus.
J Bone Miner Res **12**(10): 1552-1559.
- STAUFENBIEL, R. (2004).
Gebärparese.
Tiergesundheits- und Tierkrankheitslehre.
Stuttgart: Parey Verlag: 342-349.
- STUMPF, W. E., SAR, M., REID, F. A., TANAKA, Y. and DELUCA, H. F. (1979).
Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid.
Science **206**(4423): 1188-1190.
- TEITELBAUM, S. L. (2000).
Bone resorption by osteoclasts.
Science **289**(5484): 1504-1508.
- THEERA, R., THEO, W. and MATH, J. H. G. (1999).
Effect of Overfeeding During the Dry Period on the Rate of Esterification in Adipose Tissue of Dairy Cows During the Periparturient Period1.
J Dairy Sci **82**(6): 1164-1169.
- THILSING-HANSEN, T., JORGENSEN, R. J. and OSTERGAARD, S. (2002).
Milk fever control principles: a review.
Acta Vet Scand **43**(1): 1-19.

- TRIPATHI, G., SHARMA, R., SHARMA, R. K., GUPTA, S. K., SANKHWAR, S. N. and AGRAWAL, S. (2010).
Vitamin D receptor genetic variants among patients with end-stage renal disease.
Ren Fail **32**(8): 969-977.
- UITTERLINDEN, A. G., FANG, Y., BERGINK, A. P., VAN MEURS, J. B., VAN LEEUWEN, H. P. and POLS, H. A. (2002).
The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in bone biology.
Mol Cell Endocrinol **197**(1-2): 15-21.
- UITTERLINDEN, A. G., FANG, Y., VAN MEURS, J. B., VAN LEEUWEN, H. and POLS, H. A. (2004).
Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states.
J Steroid Biochem Mol Biol **89-90**(1-5): 187-193.
- UITTERLINDEN, A. G. and RALSTON, S. H. (2006).
The Association between Common Vitamin D Receptor Gene Variations and Osteoporosis: A participant-Level Meta-Analysis.
Annals of Internal Medicine **145**: 255-264.
- URIBE, H. A., KENNEDY, B. W., MARTIN, S. W. and KELTON, D. F. (1995).
Genetic parameters for common health disorders of Holstein cows.
J Dairy Sci **78**(2): 421-430.
- VALDIVIELSO, J. M. and FERNANDEZ, E. (2006).
Vitamin D receptor polymorphisms and diseases.
Clin Chim Acta **371**(1-2): 1-12.
- VAN DE BRAAK, A. E., VAN'T KLOOSTER, A. T. and MALESTEIN, A. (1987).
Influence of a deficient supply of magnesium during the dry period on the rate of calcium mobilisation by dairy cows at parturition.
Res Vet Sci **42**(1): 101-108.
- VAN DE BRAAK, A. E., VAN 'T KLOOSTER, A. T. and MALESTEIN, A. (1986).
Influence of prepartum calcium intake on calcium mobilization rate around parturition in dairy cows fed at a high prepartum feeding level.
Vet Q **8**(1): 24-37.
- VAN DORP, T. E., DEKKERS, J. C., MARTIN, S. W. and NOORDHUIZEN, J. P. (1998).
Genetic parameters of health disorders, and relationships with 305-day milk yield and conformation traits of registered Holstein cows.
J Dairy Sci **81**(8): 2264-2270.
- VANDEVYVER, C., WYLIN, T., CASSIMAN, J. J., RAUS, J. and GEUSENS, P. (1997).
Influence of the vitamin D receptor gene alleles on bone mineral density in postmenopausal and osteoporotic women.
J Bone Miner Res **12**(2): 241-247.
- VANRADEN, M. J. (2008).
Genomic data and cooperation result in faster progress.
Proceedings ICAR 36th Session: 341-346.
- VANRADEN, P. M., VAN TASSELL, C. P., WIGGANS, G. R., SONSTEGARD, T. S., SCHNABEL, R. D., TAYLOR, J. F. and SCHENKEL, F. S. (2009).
Invited review: reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls.
J Dairy Sci **92**(1): 16-24.
- VENNEKENS, R., HOENDEROP, J. G., PRENEN, J., STUIVER, M., WILLEMS, P. H., DROOGMANS, G., NILIUS, B. and BINDELS, R. J. (2000).
Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca(2+) channel.
J Biol Chem **275**(6): 3963-3969.

- VERBEEK, W., GOMBART, A. F., SHIOHARA, M., CAMPBELL, M. and KOEFFLER, H. P. (1997).
Vitamin D receptor: no evidence for allele-specific mRNA stability in cells which are heterozygous for the Taq I restriction enzyme polymorphism.
Biochem Biophys Res Commun **238**(1): 77-80.
- VIT. (2009).
Genomische Zuchtwertschätzung gestartet. Retrieved 12.03.2011,
from http://www.vit.de/fileadmin/user_upload/akutelles/Genomische_Selektion_200909.pdf.
- VOET, D. J., VOET, J. G. and PRATT, C. W. (2010a).
Nukleotide und Nukleinsäuren.
Lehrbuch der Biochemie. 2. Auflage A. BECK-SICKINGER and U. HAHN.
Weinheim: Wiley VCH. Kapitel 3.
- VOET, D. J., VOET, J. G. and PRATT, C. W. (2010b).
Proteinbiosynthese.
Lehrbuch der Biochemie. 2. Auflage A. BECK-SICKINGER and U. HAHN.
Weinheim: Wiley VCH. Kapitel 27.
- VOET, D. J., VOET, J. G. and PRATT, C. W. (2010c).
Regulation der Genexpression.
Lehrbuch der Biochemie. 2. Auflage A. BECK-SICKINGER and U. HAHN.
Weinheim: Wiley VCH. Kapitel 28.
- VUPPUTURI, M. R., GOSWAMI, R., GUPTA, N., RAY, D., TANDON, N. and KUMAR, N. (2006).
Prevalence and functional significance of 25-hydroxyvitamin D deficiency and vitamin D receptor gene polymorphisms in Asian Indians.
Am J Clin Nutr **83**(6): 1411-1419.
- WANG, D. G., FAN, J. B., SIAO, C. J., BERNO, A., YOUNG, P., SAPOLSKY, R., GHANDOUR, G., PERKINS, N., WINCHESTER, E., SPENCER, J., KRUGLYAK, L., STEIN, L., HSIE, L., TOPALOGLOU, T., HUBBELL, E., ROBINSON, E., MITTMANN, M., MORRIS, M. S., SHEN, N., KILBURN, D., RIOUX, J., NUSBAUM, C., ROZEN, S., HUDSON, T. J., LIPSHUTZ, R., CHEE, M. and LANDER, E. S. (1998).
Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome.
Science **280**(5366): 1077-1082.
- WARSHAWSKY, H., GOLTZMAN, D., ROULEAU, M. F. and BERGERON, J. J. (1980).
Direct in vivo demonstration by radioautography of specific binding sites for calcitonin in skeletal and renal tissues of the rat.
J Cell Biol **85**(3): 682-694.
- WHITFIELD, G. K., REMUS, L. S., JURUTKA, P. W., ZITZER, H., OZA, A. K., DANG, H. T., HAUSSLER, C. A., GALLIGAN, M. A., THATCHER, M. L., ENCINAS DOMINGUEZ, C. and HAUSSLER, M. R. (2001).
Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene.
Mol Cell Endocrinol **177**(1-2): 145-159.
- WHITFIELD, G. K., SELZNICK, S. H., HAUSSLER, C. A., HSIEH, J. C., GALLIGAN, M. A., JURUTKA, P. W., THOMPSON, P. D., LEE, S. M., ZERWEKH, J. E. and HAUSSLER, M. R. (1996).
Vitamin D receptors from patients with resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D₃: point mutations confer reduced transactivation in response to ligand and impaired interaction with the retinoid X receptor heterodimeric partner.
Mol Endocrinol **10**(12): 1617-1631.
- WIGGERS, K. D., NELSON, D. K. and JACOBSON, N. L. (1975).
Prevention of parturient paresis by a low-calcium diet prepartum: a field study.
J Dairy Sci **58**(3): 430-431.

- WILSON, G. F. (2003).
Development of a novel concept (Calcigard) for activation of calcium absorption capacity and prevention of milk fever.
Acta Vet Scand Suppl **97**: 77-82.
- WOOD, R. J., FLEET, J. C., CASHMAN, K., BRUNS, M. E. and DELUCA, H. F. (1998).
Intestinal calcium absorption in the aged rat: evidence of intestinal resistance to 1,25(OH)₂ vitamin D.
Endocrinology **139**(9): 3843-3848.
- WOOD, R. J. F., JAMES C. (1998).
The Genetics of Osteoporosis: Vitamin D Receptor Polymorphisms.
Annu Rev Nutr **18**: 832-858.
- WYLE, F. A. and KENT, J. R. (1977).
Immunosuppression by sex steroid hormones. The effect upon PHA- and PPD-stimulated lymphocytes.
Clin Exp Immunol **27**(3): 407-415.
- YAMAGISHI, N., AYUKAWA, Y., LEE, I., OBOSHI, K. and NAITO, Y. (2005).
Calcium metabolism in cows receiving an intramuscular injection of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ combined with prostaglandin F(2 α) closely before parturition.
J Vet Sci **6**(2): 165-167.
- YAMAGISHI, N., MIYAZAKI, M. and NAITO, Y. (2006).
The expression of genes for transepithelial calcium-transporting proteins in the bovine duodenum.
Vet J **171**(2): 363-366.
- ZELLA, L. A., KIM, S., SHEVDE, N. K. and PIKE, J. W. (2006).
Enhancers located within two introns of the vitamin D receptor gene mediate transcriptional autoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃.
Mol Endocrinol **20**(6): 1231-1247.
- ZIEGER, P. (2001).
Milchfieber – auch wenn die Kühe nicht festliegen?
Top Agrar **11**: R18-R20.

9 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Pathogenese der hypocalcämischen Gebärfähigkeit am Beispiel einer peripartalen Kuh mit ca. 500kg Lebendgewicht. Der Calcium-Verlust mit dem Kolostrum übersteigt die intestinale Calcium-Absorption und die ossäre Mobilisierungsfähigkeit. Modifiziert nach (Goff *et al.* 1991)..... 5
- Abb. 2:** Eisberg-Modell nach Staufenbiel modifiziert nach (Zieger 2001). Nur etwa 5% der Kühe mit peripartaler Hypocalcämie liegen fest. Die meisten Tiere erkranken subklinisch und leiden an begleitenden Erkrankungen, die durch den veränderten Calciumhaushalt, Inappetenz oder die damit einhergehende Immunsuppression begünstigt werden. 6
- Abb. 3:** Schematische Darstellung der an der Steigerung bzw. Senkung der Blut-Calcium-Konzentration beteiligten Regelkreisläufe, nach (Holick 2007). Vitamin D (Aufnahme mit der Nahrung oder Eigensynthese in der Haut) wird unreguliert in der Leber zu Calcidiol (25(OH)D) hydroxyliert. Die Umwandlung von Calcidiol zu Calcitriol (1,25(OH)₂D₃, 1,25-Dihydroxycholecalciferol) in der Niere erfolgt streng reguliert und wird primär durch PTH induziert, das aus der Nebenschilddrüse freigesetzt wird, wenn die Blut-Calcium-Konzentration abfällt. Die Wirkungen von 1,25(OH)₂D₃ auf die Zielorgane Knochen, Niere und Darm sind vereinfacht dargestellt. In Knochen und Magen-Darm-Trakt wird die Calcitriol-Wirkung über den Vitamin-D-Rezeptor vermittelt..... 8
- Abb. 4:** Wirkung des Calcium-sensitiven Rezeptors (CaSR/ CaR) auf die Genexpression, Synthese und Sekretion von PTH nach (Murray *et al.* 2008). Die durch den CaSR vermittelte Kontrolle der PTH-Synthese und -Sekretion ist von zentraler Bedeutung für die Calcium-Homöostase von Säugetieren. Eine niedrige Calcium-Konzentration (ionisierten Calciums) stimuliert die Ausschüttung von PTH, welches eine Erhöhung des Blut-Calcium-Spiegels vermittelt. Bei hohen Calcium-Konzentrationen (ionisierten Calciums) wird die PTH Sekretion über den CaSR inhibiert und dadurch der Blut Calcium-Spiegel gesenkt. 11
- Abb. 5:** Schematische Darstellung der para- und transzellulären Calcium-Absorption, modifiziert nach (Hoenderop *et al.* 2005). Der passive, parazelluläre Transport verläuft über *tight junctions* entlang eines Konzentrationsgradienten. 1,25(OH)₂D₃ reguliert die Calcium-Aufnahme durch Stimulation der Transportproteine TRPV5/6, Calbindins, NCX1 und PMCA1b. Die Absorption erfolgt in 3 Schritten: Calcium gelangt über TRPV5/6 Kanäle in der apikalen Membran in das Zellinnere, wird dort von Calbindins zur basolateralen Seite transportiert und über Calcium-ATPasen (PMCA) oder Na/Ca-Austauscher (NCX) in das Interstitium befördert..... 16
- Abb. 6:** SNPs, Haplotypen und Marker SNPs. a) SNP: DNA Abschnitt mit vier Versionen derselben Chromosomenregion verschiedener Individuen. Die Abschnitte sind bis auf drei Basen identisch. Jedes SNP hat zwei mögliche Allele (hier Allel C und T für SNP 1). b) Haplotypen: Ein Haplotyp besteht aus einer bestimmten Kombination von SNPs. Hier dargestellt sind die beobachteten Genotypen von 20 SNPs, welche sich über 6000 Basen der DNA erstrecken. Gezeigt werden nur die variablen Basen, einschließlich der drei SNPs aus Abschnitt a. Für diese Region, hat sich gezeigt, dass die meisten Chromosomen einer Population die Haplotypen 1-4 besitzen. c) Marker SNPs: Die Genotypisierung der drei Marker SNPs reicht aus, um die vier Haplotypen zu identifizieren. Wenn die Marker SNPs eines bestimmten Chromosoms beispielsweise das Muster A-T-C aufweisen, passt dieses Muster auf jenes des Haplotyps 1. Modifiziert nach (International HapMap Consortium 2003).22
- Abb. 7:** Lokalisation des über 55kB langen bovinen VDR-Gens auf Chromosom 5 sowie die Anordnung der zehn Exons im Gen, modifiziert nach (NCBI 2011). a-e: Lokalisation anderer Gene auf dem Chromosom 28
- Abb. 8:** Der VDR besteht aus 427 Aminosäuren. Dargestellt sind die funktionellen Domänen des humanen VDR: DNA-bindende Domäne (DBD) mit zwei Zink-Finger-Motiven (Zn) am H₃⁺N-Ende, Liganden-bindende (E) Domäne mit α -Helices (H) zur Heterodimerisation mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) am COO⁻-Ende und Domänen zur Transaktivierung (Konformationsänderung), insbesondere AF-2 (*ligand-dependent activation function*). Modifiziert nach (Haussler 2008)..... 29

- Abb. 9:** Modell der Signalverarbeitung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ über den VDR. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zirkuliert an Vitamin-D-bindendes Protein (DBP) gebunden im Blut und diffundiert aufgrund seiner Lipophilie durch die Zellmembran der Zielzelle. Durch *intracellular vitamin D binding proteins* (IDBPs) wird $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ entweder zur mitochondrialen 24-Hydroxylase transportiert und inaktiviert oder zum VDR transportiert. Der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR-Komplex heterodimerisiert mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) und bindet an spezifische Sequenzen der Promotor-Region des Zielgens (VDREs). Das DNA-gebundene Heterodimer zieht Komponenten des RNA-Polymerase II-Prä-Initiations-Komplexes und nukleäre Transkriptins-regulatoren an, welche dann die Transkriptionsrate des Gens modifizieren. Modifiziert nach (Brown *et al.* 1999; Dusso *et al.* 2005). 31
- Abb. 10:** Starke Expression von VDR in basalen Drüsen- und Krypten-Epithelzellen (BG) im Duodenum der Ziege (Boos *et al.* 2007). Legende: oberflächliche Epithel- (SE), Drüsen- und Krypten-Epithelzellen (SG), intermediäre Drüsen- und Krypten-Epithelzellen (IG), Villus (V)..... 33
- Abb. 11:** Natürliche Mutationen des humanen VDR, welche zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Resistenzen führen können. Je nach Lokalisation der Mutation sind unterschiedliche Funktionen des Rezeptors gestört. Dargestellt sind bekannte Mutationen mit Auswirkungen auf die Bindung des VDR mit der DNA, auf die Bindung des VDR mit seinem Liganden und auf die Heterodimerisierung mit dem RXR. Nach (Haussler *et al.* 1997). 35
- Abb. 12:** Positionierung der acht Primerpaare in Exon- und Intron-Bereichen mit Angaben zu Größen der entstehenden PCR-Produkte 42
- Abb. 13:** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Die zu Exon 4 gehörigen Fragmente zeigen unspezifische Doppelbanden, die durch Erhöhung der Hybridisierungstemperatur später reduziert wurden. 45
- Abb. 14:** Beispiel für ein Ergebnis der Sequenzierung nach einer Auftrennungszeit von 60 Minuten mit dem Programm LFR-60min. Der hohe rote Peak fungiert als Endungsmarker. 48
- Abb. 15:** Im ersten Fragment, welches das erste Exon teilweise enthält, wurde eine Sequenzveränderung im Intron an 147. Stelle des Fragmentes gefunden. Statt der erwarteten Base Cytosin (C) wurde Tyrosin (T) bei 8 von 26 Tieren homozygot und bei 16 Tieren heterozygot gefunden (C-T). Das Fragment umfasst 476 Basenpaare. Legende: Exon, Basen-Alteration, Intron..... 56
- Abb. 16:** Die C-T Alteration trat homozygot (T) und heterozygot (C/T) auf. Statt der erwarteten Base Cytosin an 147. Stelle des ersten Fragmentes, wurde bei 8 Tieren auf beiden Allelen Tyrosin gefunden. Davon waren 5 Tiere bereits mindestens einmal hypocalcämisch, 3 jedoch noch nie. Bei 16 Tieren war Tyrosin nur auf einem Allel zu finden. Davon waren 11 bereits mindestens einmal hypocalcämisch, 5 jedoch noch nie. Eine Korrelation zwischen Basen-Alteration und Hypocalcämie-Inzidenz gibt es nicht ($p>0,05$). 57
- Abb. 17:** Im zweiten Fragment, welches das zweite Exon vollständig enthält, wurde eine Sequenzveränderung im Intron an 344. Stelle des Fragmentes gefunden. Statt der erwarteten Base Guanin (G) wurde bei 20 von 26 Tieren homo- oder heterozygot Cytosin (C) gefunden (G-C). Das Fragment umfasst 513 Basenpaare. Legende: Exon, Basen-Alteration, Intron..... 59
- Abb. 18:** Die G-C Alteration trat homozygot (C) und heterozygot (G/C) auf. Statt der erwarteten Base Guanin an 344. Stelle des zweiten Fragmentes, wurde bei 5 Tieren auf beiden Allelen Cytosin gefunden. Davon waren 4 Tiere bereits mindestens einmal hypocalcämisch, 1 jedoch noch nie. Bei 15 Tieren war Cytosin nur auf einem Allel zu finden. Davon waren 10 bereits mindestens einmal hypocalcämisch, 5 jedoch noch nie. Eine Korrelation zwischen Basen-Alteration und Hypocalcämie-Inzidenz gibt es nicht ($p>0,05$). 60
- Abb. 19:** Im siebten Fragment, welches das siebente Exon vollständig enthält, wurden drei Sequenzveränderung gefunden. Davon sind zwei im Exon an 106. und 110. Stelle positioniert, die dritte wurde im Intron an 336. Stelle des Fragmentes gefunden. Statt der erwarteten Base Cytosin (C) an 106. Stelle wurde bei 25 von 26 Tieren auf einem Allel Adenin (A) gefunden (C-A). Statt der erwarteten Base Cytosin (C) an 110. Stelle wurde bei 21 von 26 Tieren auf einem Allel Tyrosin (T) gefunden (C-T). Statt der erwarteten Base Tyrosin (T) an 336. Stelle wurde bei 25 von 26 Tieren auf einem Allel Adenin (A) gefunden (T-A). Das Fragment umfasst 439 Basenpaare. Legende: Exon, Basen-Alteration, Intron..... 62
- Abb. 20:** Die C-A Alteration trat heterozygot (C/A) auf. Statt der erwarteten Base Cytosin an 106. Stelle des siebten Fragmentes, wurde bei 25 Tieren auf einem Allel Adenin gefunden. Davon waren 16 Tiere bereits mindestens einmal hypocalcämisch, 9 jedoch noch nie. Eine Korrelation zwischen Basen-Alteration und Hypocalcämie-Inzidenz gibt es nicht ($p>0,05$). 63

- Abb. 21:** Die C-T Alteration trat heterozygot (C/T) auf. Statt der erwarteten Base Cytosin an 110. Stelle des siebten Fragmentes, wurde bei 21 Tieren auf einem Allel Tyrosin gefunden. Davon waren 12 Tiere bereits mindestens einmal hypocalcämisch, 9 jedoch noch nie. Eine Korrelation zwischen Basen-Alteration und Hypocalcämie-Inzidenz gibt es nicht ($p > 0,05$)..... 63
- Abb. 22:** Die T-A Alteration trat heterozygot (T/A) auf. Statt der erwarteten Base Tyrosin an 336. Stelle des siebten Fragmentes, wurde bei 25 Tieren auf einem Allel Adenosin gefunden. Davon waren 16 Tiere bereits mindestens einmal hypocalcämisch, 9 jedoch noch nie. Eine Korrelation zwischen Basen-Alteration und Hypocalcämie-Inzidenz gibt es nicht ($p > 0,05$)..... 64
- Abb. 23:** Im zehnten Fragment, welches das zehnte Exon vollständig enthält, wurden drei Sequenzveränderung gefunden. Davon sind zwei im Exon an 365. und 389. Stelle positioniert, die dritte wurde im Intron an 212. Stelle des Fragmentes gefunden. Statt der erwarteten Base Cytosin (C) an 212. Stelle wurde bei 19 von 26 Tieren auf einem Allel Adenin (A) gefunden (C-A). Statt der erwarteten Base Adenosin (A) an 365. Stelle wurde bei einem von 26 Tieren homozygot Tyrosin (T) gefunden (A-T). Statt der erwarteten Base Adenosin (A) an 389. Stelle wurde bei 25 von 26 Tieren auf einem Allel Tyrosin (T) gefunden (A-T). Das Fragment umfasst 492 Basenpaare. Legende: Exon, Basen-Alteration, Intron..... 66
- Abb. 24:** Die C-A Alteration trat heterozygot (C/A) auf. Statt der erwarteten Base Cytosin an 212. Stelle des zehnten Fragmentes, wurde bei 19 Tieren auf einem Allel Adenosin gefunden. Davon waren 13 Tiere bereits mindestens einmal hypocalcämisch, 6 jedoch noch nie. Eine Korrelation zwischen Basen-Alteration und Hypocalcämie-Inzidenz gibt es nicht ($p > 0,05$)..... 67
- Abb. 25:** Die A-T Alteration trat heterozygot (A/T) auf. Statt der erwarteten Base Adenosin an 365. Stelle des zehnten Fragments, wurde bei einem Tieren auf einem Allel Tyrosin (T) gefunden. Dieses Tier war bereits mindestens einmal hypocalcämisch. Eine Korrelation zwischen Basen-Alteration und Hypocalcämie-Inzidenz gibt es nicht ($p > 0,05$). 67
- Abb. 26:** Die A-T Alteration trat heterozygot (A/T) auf. Statt der erwarteten Base Adenosin an 389. Stelle des zehnten Fragmentes, wurde bei 25 Tieren auf einem Allel Tyrosin gefunden. Davon waren 16 Tiere bereits mindestens einmal hypocalcämisch, 9 jedoch noch nie. Eine Korrelation zwischen Basen-Alteration und Hypocalcämie-Inzidenz gibt es nicht ($p > 0,05$)..... 68
- Abb. 27:** mRNA des VDR mit verschlüsselten Aminosäuren und Basen-Alterationen. Legende: Aminosäuren des VDR, Basen-Alterationen welche potentielle Aminosäuren-Veränderungen bedingen. Angegeben ist die publizierte Sequenz. 71

10 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Einteilung der Gebärparesse-Stadien anhand klinischer Symptome nach (Staufenbiel 2004)....	4
Tab. 2: Übersicht über verschiedene Studien zur Milchfieberprophylaxe mit Vitamin D, bzw. Vitamin-D-Hormon oder seinen Metaboliten. Legende: MF= Milchfieber	20
Tab. 3: VDR-Vorkommen in Geweben mit und ohne Beteiligung an der Calcium-Homöostase (Holick 1995).....	32
Tab. 4: Ohrmarkennummern der 26 Versuchstiere, Angaben zu Elterntieren, Anzahl der vorangegangenen Laktationen und Einteilung in zwei Versuchsgruppen nach Krankheitsgeschichte: vorangegangene Hypocalcämie (*Hypocalcämie, Gruppe 1) oder ohne vorherberichtliche Störung des Calcium-Haushalts (*ohne Störung, Gruppe 2).....	40
Tab. 5: Arbeitsschritte der DNA-Isolierung aus EDTA-Blut.....	41
Tab. 6: Exons mit zugehörigen Primerpaaren, Lokalisation, Fragmentgröße, Primernamen, (fwd: <i>forward</i> ; rev: <i>reverse</i>), Schmelztemperatur, Hybridisierungstemperatur und Primersequenzen.	43
Tab. 7: PCR-Ansatz mit Angaben der Hersteller und der eingesetzten Materialien	44
Tab. 8: PCR-Protokoll mit Angaben von Temperatur und Zeit	45
Tab. 9: Sequenzierungsansatz mit Angaben der Hersteller der eingesetzten Materialien.....	46
Tab. 10: Sequenzierungsprotokoll mit Angaben zu Temperatur und Zeit	46
Tab. 11: Sequenzierungsprotokoll	47
Tab. 12: 4-Felder-Tafel, a - d = Häufigkeiten, fett= Randsummen, N= a+b+c+d	49
Tab. 13: 6-Felder-Tafel, a - f = Häufigkeiten, fett= Randsummen, N= a+b+c+d+e+f	49
Tab. 14: Rechenbeispiel: von 26 Tieren (N) wurde bei 12 Tieren mit Vorbericht Hypocalcämie und 9 Tieren ohne Vorbericht Hypocalcämie an Position x der DNA die Base A sequenziert. Bei 5 Tieren mit Vorbericht Hypocalcämie wurde an Position x der DNA die Base B sequenziert.	51
Tab. 15: Berechnung des Betrages und der Wahrscheinlichkeit der Ausgangsverteilung mittels <i>Fisher's exact probability</i> -Test.	52
Tab. 16: Berechnung des Betrages und der Wahrscheinlichkeit anderer möglicher (extremere) Verteilung bei gleichen Randsummen mittels <i>Fisher's exact probability</i> -Test.....	52
Tab. 17: Sequenzalterationen des Vitamin-D-Rezeptor-Gens der 26 Versuchstiere. Spalten 2-6: Identifikation der Versuchstiere nach Ohrmarkennummer, Name des Vätertieres, Registrierungsnummer der Mutter, Laktationsnummer und aufgetretener Calciumhaushaltentgleisung (Hypocalcämie: Entgleisung des Calcium-Haushalts mit Calcium-Blutwerten <0,9mmol/l, ohne Störung: Störung der Calcium-Homöostase noch nie aufgetreten). Spalten 7-14: Fragmentnummer (entspricht dem enthaltenen Exon), Fragmentposition der Sequenzalteration, Position in DNA (für Sequenzalterationen in Intron-Bereichen) oder Position in mRNA (für Sequenzalterationen in Exon-Bereichen), veröffentlichte VDR-Sequenz mit unterstrichener veränderter Base, heterozygote (unterschiedliche Sequenz auf den zwei Allelen) Sequenzierungsergebnisse (T/C), mögliche Aminosäurenveränderung für jede allelische Variation (veröffentlichte Aminosäure (AS), AS-Nummer, ersetzte AS: Leu 271 Met), Cytosin, (C), Guanin (G), Adenosin (A), Thymin (T), Leucin (Leu), Methionin (Met), Alanin (Ala), Valin (Val), Asparagin (Asn), Tyrosin (Tyr), terminierende Aminosäure (Stop).	54

Tab. 18: Sequenzalterationen des Vitamin-D-Rezeptor-Gens der 26 Versuchstiere in Fragment 1. Spalten 1-3: Identifikation der Versuchstiere (Tab. 17), Laktationsnummer und aufgetretener Calciumhaushaltentgleisung (Hypocalcämie: Entgleisung des Calcium-Haushalts mit Calcium-Blutwerten <0,9mmol/l, ohne Störung: Störung der Calcium-Homöostase noch nie aufgetreten). Spalte 4: Fragmentnummer (entspricht dem enthaltenen Exon), Fragmentposition der Sequenzalteration, Position in DNA (für Sequenzalterationen in Intron-Bereichen), veröffentlichte VDR-Sequenz (veränderte Base unterstrichen), heterozygote Sequenzierergergebnisse (T/C), Cytosin (C), Guanin (G), Adenosin (A), Thymin (T).	55
Tab. 19: Sequenzalterationen des Vitamin-D-Rezeptor-Gens der 26 Versuchstiere in Fragment 2. Spalten 1-3: Identifikation der Versuchstiere (Tab. 17), Laktationsnummer und aufgetretener Calciumhaushaltentgleisung (Hypocalcämie: Entgleisung des Calcium-Haushalts mit Calcium-Blutwerten <0,9mmol/l, ohne Störung: Störung der Calcium-Homöostase noch nie aufgetreten). Spalte 4: Fragmentnummer (entspricht dem enthaltenen Exon), Fragmentposition der Sequenzalteration, Position in DNA (für Sequenzalterationen in Intron-Bereichen), veröffentlichte VDR-Sequenz (veränderte Base unterstrichen), heterozygote Sequenzierergergebnisse (T/C), Cytosin (C), Guanin (G), Adenosin (A), Thymin (T).	58
Tab. 20: Sequenzalterationen des Vitamin-D-Rezeptor-Gens der 26 Versuchstiere in Fragment 7. Spalten 1-3: Identifikation der Versuchstiere (Tab. 17), Laktationsnummer und aufgetretener Calciumhaushaltentgleisung (Hypocalcämie: Entgleisung des Calcium-Haushalts mit Calcium-Blutwerten <0,9mmol/l, ohne Störung: Störung der Calcium-Homöostase noch nie aufgetreten). Spalten 4-6: Fragmentnummer (entspricht dem enthaltenen Exon), Fragmentposition der Sequenzalteration, Position in DNA (für Sequenzalterationen in Intron-Bereichen) oder Position in mRNA (für Sequenzalterationen in Exon-Bereichen), veröffentlichte VDR-Sequenz (veränderte Base unterstrichen), heterozygote Sequenzierergergebnisse (T/C), mögliche Aminosäurenveränderung für jede allelische Variation (veröffentlichte Aminosäure (AS), AS-Nummer, ersetzte AS: Leu 271 Met), Cytosin (C), Guanin (G), Adenosin (A), Thymin (T), Leucin (Leu), Methionin (Met), Alanin (Ala), Valin (Val)...	61
Tab. 21: Sequenzalterationen des Vitamin-D-Rezeptor-Gens der 26 Versuchstiere in Fragment 10. Spalten 1-3: Identifikation der Versuchstiere (Tab. 17), Laktationsnummer und aufgetretener Calciumhaushaltentgleisung (Hypocalcämie: Entgleisung des Calcium-Haushalts mit Calcium-Blutwerten <0,9mmol/l, ohne Störung: Störung der Calcium-Homöostase noch nie aufgetreten). Spalten 4-6: Fragmentnummer (entspricht dem enthaltenen Exon), Fragmentposition der Sequenzalteration, Position in DNA (für Sequenzalterationen in Intron-Bereichen) oder Position in mRNA (für Sequenzalterationen in Exon-Bereichen), veröffentlichte VDR-Sequenz (veränderte Base unterstrichen), heterozygote Sequenzierergergebnisse (T/C), mögliche Aminosäurenveränderung für jede allelische Variation (veröffentlichte Aminosäure (AS), AS-Nummer, ersetzte AS: Leu 271 Met, Cytosin (C), Guanin (G), Adenosin (A), Thymin (T), Lysin (Lys), Alanin (Ala), Asparagin (Asn), Tyrosin (Tyr), terminierende Aminosäure (Stop).	65
Tab. 22: Übersicht über Verschlüsselung der Aminosäuren durch Basentriplets	76
Tab. 23: Übersicht über Methoden zum Auffinden von Gen-Alterationen mit Namen der Methoden, kurzer Erklärung und Bemerkung nach (Lottspeich und Zorbas 1998b).....	78
Tab. 24: Beispiele für in Korrelations-Studien zu VDR-Gen-Alterationen verwendete Restriktionsenzyme, mit Beispielen für Arbeitsgruppen welche Studien zum VDR durchgeführt haben. Angegeben sind außerdem der Ursprung des Restriktionsenzym, seine Erkennungs-Sequenz mit Restriktions-Schnittstellen (↓) und Lokalisation im humanen VDR-Gen.	79

11 Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung des Betrages für 4-Felder-Kontingenztafeln	50
Formel 2: Berechnung von Wahrscheinlichkeiten nach dem <i>Fisher's exact probability</i> -Test.....	50
Formel 3: Berechnung des Betrages für 6-Felder-Kontingenztafeln	51
Formel 4: Berechnung von Wahrscheinlichkeiten nach der Erweiterung nach Freeman und Halton ..	51

Publikationsverzeichnis

Allelic variations in the bovine vitamin D receptor gene: correlations with periparturient hypocalcaemia?

Reiche M, Deiner C, Moesch A, Martens H

Poster presentation on the 2011 ADSA®-ASAS Joint Annual Meeting (July 10-14, 2011, New Orleans, Louisiana)

Juni 2011 eingereicht im

Journal of dairy science

Short communication: Bovine VDR gene and hypocalcaemia

Allelic variations in the bovine vitamin D receptor gene in dairy cows: correlations with periparturient hypocalcaemia?

Deiner C, Reiche M, Lassner D, Grienitz D, Moesch A, Wenning P, Martens H

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Carolin Deiner für ihre kompetente Anleitung, alle Anregungen, die vielen Gespräche und Diskussionen und ihr Engagement bei der Realisierung dieser Arbeit, weswegen sie hier an erster Stelle stehen soll.

Ich danke Herrn Prof. Martens für die Überlassung des spannenden Themas, die Betreuung dieser Arbeit und das Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten.

Ich bedanke mich bei Herrn PhD Lassner vom IKDT für die Hilfestellung bei der Durchführung der Laborarbeiten.

Für den Beistand bei allen Fragen rund um die Laborarbeit gilt mein Dank außerdem Christiane Hoffmann.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung bedanke ich mich bei Herrn Lotz.

Für ihre Hilfe beim Gewinnen der Blutproben danke ich Anne Mösch.

Last but not least, danke ich

Lorcan für seinen Beistand und seine Hilfe in allen Fragen, unter anderem zu Kommasetzung und Stil ☺,

meinem Vater für die Bereitstellung einer Schreibmaschine und das Korrekturlesen,

meiner Schwester Anna für die Cover-Illustration,

Tine für das Teilen ihres Praxis-Wissens rund um die Kuh,

Maren für das letzte proof-reading und

Antje und meinem Vater für die Druckfinanzierung.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 30.06.2011

Maria Reiche