

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zusammenhang zwischen Vitamin-D-Rezeptor-Gen-
Polymorphismen und atopischer Dermatitis -
Eine Fall-Kontroll-Studie

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nadja Höfer

aus Marienberg

Datum der Promotion: 11.12.2015

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	3
ABSTRACT	5
1. EINLEITUNG	6
1.1. ATOPISCHE DERMATITIS	6
1.1.1. Klinik	6
1.1.2. Epidemiologie	7
1.1.3. Ätiopathogenese	7
1.2. VITAMIN D3 UND VITAMIN-D-REZEPTOR	14
1.2.1. Metabolismus	14
1.2.2. Vitamin-D-Rezeptor	16
1.2.3. VDR-SNPs	17
1.2.4. Wirkung von VD	20
1.2.5. VD-Substitution und -Defizienz	24
2. FRAGESTELLUNG	25
3. MATERIAL UND METHODEN	27
3.1. MATERIAL	27
Studienpopulation	27
3.2. METHODEN	28
3.2.1. Literaturrecherche	28
3.2.2. Genotypisierung	28
3.2.3. Haplotypenanalyse	33
3.2.4. Funktionelle Analysen	35
3.2.5. Statistische Analyse	39
4. ERGEBNISSE	40
4.1. KLINISCHE DATEN	40
4.2. GENOTYPISIERUNG	41
Vergleich der Fallgruppe und der Patienten mit schweren Verläufen mit der Kontrollgruppe	41
4.3. HAPLOTYPENANALYSE	45
4.3.1. Kopplungsanalyse	45
4.3.2. Vergleich der Haplotypenhäufigkeiten der Fallgruppe und der Patienten mit schweren Verläufen mit der Kontrollgruppe	46
4.4. IN-VITRO-STIMULATION HUMANER MONOZYTEN MIT AAC- UND GCT-HAPLOTYP	47
4.4.1. Auswahl der Probanden	48
4.4.2. Reinheit der Monozyten	48
4.4.3. VDR	50
4.4.4. CYP27B1	50
4.4.5. CYP24A1	51
4.4.6. LL37	52
4.4.7. TNF α und IL6	53
5. DISKUSSION	55
6. LITERATURVERZEICHNIS	65
7. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	74
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	75
9. ANHANG	76
10. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	86
11. LEBENS LAUF	88
12. PUBLIKATIONS LISTE	89
13. DANKSAGUNG	90

Zusammenfassung

Atopische Dermatitis (AD) ist eine chronisch verlaufende entzündliche Hauterkrankung mit stark ansteigender Prävalenz. Die multifaktorielle Pathogenese von AD beinhaltet sowohl exogene als auch genetische Faktoren und immunologische Veränderungen, einschließlich einer verminderten Barrierefunktion der Haut und einer übersteigerten kutanen T-Helferzell-Infiltration. Vitamin D (VD), das über die Bindung an den nukleären Vitamin-D-Rezeptor (VDR) als Transkriptionsfaktor wirkt, hat immunmodulatorische Funktionen. Es steigert die antimikrobielle Aktivität der unspezifischen Immunität und moduliert die Stärke der Entzündungsreaktion. Über die Häufigkeit von Polymorphismen im *VDR*-Gen bei Patienten mit AD lagen bisher keine Daten vor. Um Assoziationen zu detektieren, wurde in einer Fall-Kontroll-Studie die Verteilung von *VDR*-Polymorphismen und deren Haplotypen untersucht und die mögliche funktionelle Relevanz charakterisiert.

265 AD-Patienten, von denen 142 unter schwerer AD (SCORAD>40) leiden, und 265 alters- und geschlechtsangepasste gesunde Kontrollen wurden für die *VDR*-Genpolymorphismen *fokI* (rs2228570), *bsmI* (rs1544410), *apaI* (rs7975232) und *taqI* (rs731236) genotypisiert sowie deren Haplotypen analysiert. Monozyten gesunder Spender mit den identifizierten Haplotypen AAC und GCT (n=4) wurden für die basale und VD-induzierte Expression des VDR und VDR-responsiver Gene und ferner der VD-induzierten Sekretion von TNF α und IL6 mittels quantitativer PCR und ELISA untersucht.

Es gibt keine signifikanten Unterschiede in der Genotyp- und Allelverteilung zwischen der Patientengruppe mit AD und der Kontrollgruppe. Allerdings treten das *bsmI* A-Allel, das *apaI* A-Allel und das *taqI* C-Allel signifikant häufiger in der Kontrollgruppe als bei Patienten mit schwerer AD auf (jeweils p=0,009; p=0,006; p=0,007). Die Kopplungsanalyse zeigt, dass *bsmI*, *apaI* und *taqI* in einem starken Kopplungsungleichgewicht stehen ($D' \geq 0,98$). In der Haplotypenanalyse findet sich eine signifikante Häufung des AAC-Haplotyps in der Kontrollgruppe im Vergleich zu AD-Patienten beziehungsweise AD-Patienten mit schweren Verläufen (jeweils p=0,03; p=0,016). Der GCT-Haplotyp tritt häufiger bei schwerer AD auf, sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe (p=0,005) als auch zu Patienten mit milden oder moderaten Verläufen (p=0,011). In funktionellen Versuchen gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen AAC- und GCT-Haplotyp in der basalen Expression und nach kurzfristiger Aktivierung des VDR.

VDR-Genpolymorphismen und ihre Haplotypen treten mit signifikant unterschiedlicher Häufigkeit bei AD-Patienten insbesondere mit schweren

Krankheitsverläufen im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf. Dies kann auf einen Einfluss von *VDR*-Polymorphismen auf den Erkrankungsverlauf von AD hindeuten.

Stichwörter

Atopische Dermatitis, Vitamin-D-Rezeptor, Einzelnukleotidpolymorphismen,
Haplotyp

Abstract

Atopic dermatitis (AD) is a frequent chronically relapsing, inflammatory disorder with strongly increasing prevalence. It results of both exogenous and host factors, which include genetic variations and immunologic alterations, for example barrier dysfunction of the skin and overreaching cutaneous T helper cell infiltration. Vitamin D (VD), acting as a transcription factor through binding to the nuclear vitamin D receptor (VDR), has immunomodulatory functions. Augmented antimicrobial activity in innate immunity and modulation of the inflammatory response has been shown. Polymorphisms in the *VDR* gene, which may influence VD activity, have not been studied in AD patients yet. In a case-control study the frequency of *VDR* polymorphisms and their haplotypes were determined and possible functional relevance between haplotypes were characterized.

265 AD patients, of whom 142 suffer from severe AD (SCORAD>40), and 265 age- and gender-matched healthy controls were genotyped for the common *VDR* gene polymorphisms *fokI* (rs2228570), *bsmI* (rs1544410), *apaI* (rs7975232), and *taqI* (rs731236). Monocytes of healthy donors with identified haplotypes GCT and AAC (n=4) were analyzed by quantitative PCR and ELISA for basal and VD-induced gene expression of VDR and its target genes and VD-induced release of TNF α and IL6.

There are no significant differences in the frequencies of the considered polymorphisms between AD patients and healthy controls. Compared to patients suffering from severe AD, the *bsmI* A-allele, the *apaI* A-allele, and the *taqI* C-allele are overrepresented in healthy controls (p=0.009; p=0.006; p=0.007, respectively). *bsmI*, *apaI* and *taqI* are in a high linkage disequilibrium ($D' \geq 0.98$). The AAC-haplotype is more frequent in controls compared to AD patients (p=0.03) and compared to patients with severe AD (p=0.016). Whereas, the GCT-haplotype is overrepresented in severe AD patients compared to controls (p=0.005) and compared to patients with mild or moderate AD (p=0.011). Molecular analyses indicate no significant differences in basal gene expression and short-term VDR activation between GCT and AAC haplotype carriers.

VDR polymorphisms and their haplotypes occur with significant different frequency in AD patients compared to healthy controls indicating an effect on AD and disease severity.

Keywords

Atopic dermatitis, vitamin D receptor, single nucleotide polymorphism, haplotype

1. Einleitung

1.1. Atopische Dermatitis¹

Bereits im 4. Jahrhundert vor Christus beschrieb Hippokrates⁵ eine Hauterkrankung, die sich durch Juckreiz am ganzen Körper und Lichenifikation auszeichnet. Wise und Sulzberg⁶ führten in den 1930er Jahren den Begriff atopische Dermatitis (AD) für eine weitverbreitete chronische oder chronisch rezidivierende entzündliche Hauterkrankung mit starkem Pruritus ein. Definitionsgemäß stellt AD eine nicht kontagiöse, entzündliche Hauterkrankung mit Barrieredefekt dar, die Lokalisation und Morphologie altersabhängig ändert⁷. Verwendete Synonyme für AD sind neben konstitutionellem Ekzem (Koch) auch asthma eczema prurigo complex (Drake), Neurodermatitis disseminata (Lomholt) und endogenes oder atopisches Ekzem sowie Neurodermitis.

1.1.1. Klinik

Leitsymptom der AD ist Pruritus, der - wie auch trockene Haut - allen Stadien gemein ist und die Lebensqualität der Betroffenen erheblich einschränkt. Die Hauteffloreszenzen reichen je nach Lebensalter und Krankheitsstadium von nässenden Erythemen mit erythematösen Papeln und Vesikeln oder sekundären Exkorationen mit serösen Exsudationen und serohämorrhagischen Krusten bis hin zu blasser, schuppender, lichenifizierter Haut. Im Säuglingsalter tritt ein sogenannter krustiger Milchschorf im Wangen- und Stirnbereich auf, auch Ekzeme im Windelbereich sind beschrieben. Im Kleinkindalter ist ein generalisiertes und nässendes Ekzem typisch, was sich im Jugendalter zu einem erythematösen, nässenden und schuppenden Beugenekzem in Kniekehlen und Ellenbeugen entwickelt. Im Erwachsenenalter liegt häufig ein Ekzem im Gesichts-, Brust- oder Schulterbereich vor, jedoch sind auch umschriebene Ekzeme, beispielsweise ein Lidexzem, und Rhagaden typisch. Im höheren Alter kann sich eine Erythrodermia atopica entwickeln.

¹ Quellen für gesamten Abschnitt, soweit nicht anders vermerkt: 1. Altmeyer MB-B. *Dermatologie Allergologie Umweltmedizin*. Vol 1: Springer Verlag Berlin 2002, 2. Bieber T. Atopic dermatitis. *The New England journal of medicine*. Apr 3 2008;358(14):1483-1494, 3. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *The Journal of clinical investigation*. Mar 2004;113(5):651-657, 4. Stingl S. *Dermatologie Venerologie 11.1.3 G*. Vol 2: Prof. Dr. Peter Fritsch, Springer Verlag Berlin; 2004.

1.1.2. Epidemiologie

AD ist heute eine der häufigsten Hauterkrankungen. In den letzten Jahren stieg die Prävalenz in industrialisierten Ländern um das Zwei- bis Dreifache und wird auf 10 bis 20 % bei Kindern und 1 bis 3 % bei Erwachsenen ³ bei einer Lebenszeitprävalenz von etwa 20 % ⁸ geschätzt. Das Erkrankungsalter liegt bei mehr als der Hälfte der Patienten im ersten Lebensjahr und 90 % werden in den ersten 5 Lebensjahren diagnostiziert, was zur early-onset-AD zusammengefasst wird. Bei bis zu 70 % der betroffenen Kinder gehen die Symptome bis zur Pubertät zurück. Späte sogenannte late-onset-Manifestationen im Erwachsenenalter sind ebenfalls beschrieben.

1.1.3. Ätiopathogenese ²

„In [...] an eczematous reaction in the skin, there are two prime factors involved. The first, and the more important, is a constitutional or internal factor, relating to the individual himself. The second is an external factor. It is upon the relative balance and interplay between these two that the appellation of the disease is based.“

Morgan JK, Sensitization and eczema. Occupational medicine (London) 1953; 3:274-282

Wie bereits vor mehr als 50 Jahren von Morgan ¹¹ beschrieben, wird AD durch ein komplexes Zusammenspiel von ätiologischen Faktoren bedingt, das sowohl Umwelt- als auch genetische Faktoren umfasst. Der initiale Mechanismus wird kontrovers diskutiert und ist vermutlich heterogen. Eine genetische Prädisposition für AD belegen epidemiologische Beobachtungen: Bei ungefähr 60 % der Erkrankten liegt eine positive Familienanamnese für Atopien vor ⁴. Weiterhin besteht zwischen eineiigen Zwillingen eine Konkordanzrate von 84 bis 72 % für AD, bei zweieiigen Zwillingen beträgt diese nur 23 bis 21 % ¹⁰. Durch den Einfluss von Umweltfaktoren, wie Reizstoffe und Allergene, können unterschiedliche lokale Prävalenzen, die zum Teil innerhalb von genetisch homogenen Gruppen beobachtet wurden, erklärt werden. AD wird mit allergischer Rhinokonjunktivitis und allergischem Asthma bronchiale, die häufig kombiniert auftreten, zu der sogenannten „atopischen Triade“ zusammengefasst

² Quellen für gesamten Abschnitt, soweit nicht anders vermerkt: 3. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *The Journal of clinical investigation*. Mar 2004;113(5):651-657. 9. Barnes KC. An update on the genetics of atopic dermatitis: scratching the surface in 2009. *The Journal of allergy and clinical immunology*. Jan 2010;125(1):16-29 e11-11; quiz 30-11, 10. Cookson WO, Moffatt MF. The genetics of atopic dermatitis. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. Oct 2002;2(5):383-387.

und zu den Typ-I-Allergien oder Soforttyp-Allergien gezählt. Erstmals wurde der Begriff Atopie von Coca und Cooke 1923¹² eingeführt. Als gemeinsame Ursache liegt diesen Erkrankungen eine überschießende Immunreaktion auf andernfalls harmlose Umweltantigene zugrunde.

Die Pathomechanismen des AD manifestieren sich in der Haut, die in drei Schichten unterteilt wird: von außen nach innen Epidermis, Dermis und Subkutis. Die Epidermis, der bei der AD die größte Bedeutung zukommt, besteht zum großen Teil aus Keratinozyten, ihr Aufbau ist schematisch in Abb. 1 dargestellt. Durch sie wird ein biologischer, chemischer und physikalischer Schutz gegen das Austreten von Wasser und Elektrolyten sowie das Eindringen von Mikroben und Allergenen ermöglicht. Essenziell für den Schutz gegen Mikroben sind die sogenannten antimikrobiellen Peptide (AMP), die einen wichtigen Bestandteil der unspezifischen Immunität darstellen, indem sie einerseits Mikroben abtöten und die Wundheilung fördern sowie andererseits die Immunantwort modulieren¹³. Zu den wichtigsten AMP zählen das humane Cathelicidin LL37 und Defensine wie die humanen β -Defensine (HBD). LL37 wird in Monozyten, Keratinozyten und anderen Zellen der unspezifischen und spezifischen Abwehr sowie in verschiedensten Epithelien bei Infektion, Entzündung und Verletzung induziert¹⁴.

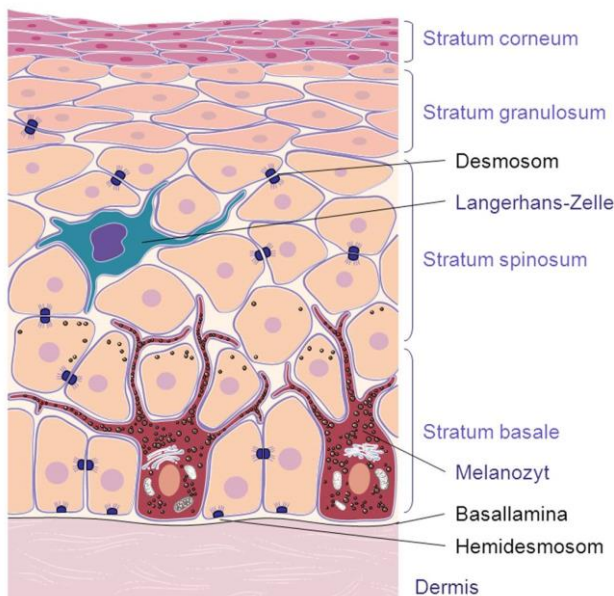


Abb. 1: schematischer Aufbau der Epidermis

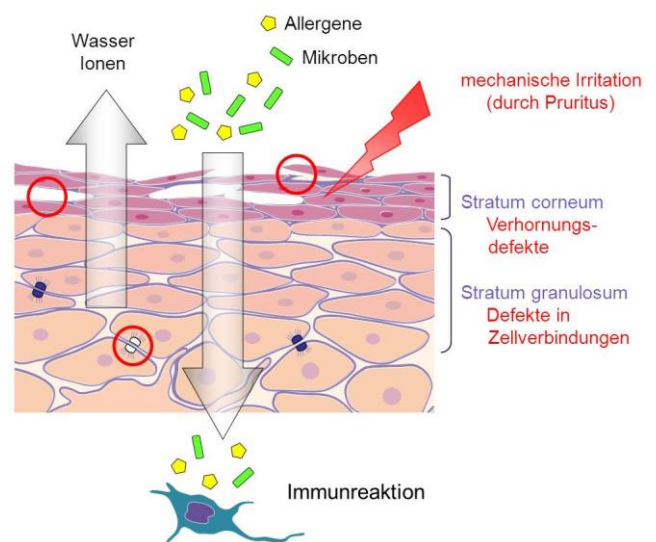


Abb. 2: gestörte Barrierefunktion der Haut bei AD

Die Barrierefunktion der Haut als essenzieller Teil der unspezifischen Immunität ist bei der AD vermindert (siehe Abb. 2)^{15,16}. Zum einen ist die Verhornung durch fehlerhafte Zell-Zellverbindungen mittels Desmosomen gestört. Zum anderen ist ein Mangel oder eine

veränderte Zusammensetzung der im Stratum granulosum gebildeten Lipide und Proteine, wie AMP und Filaggrin¹⁷, und ferner eine gesteigerte Aktivität von Serinproteasen bekannt. Es wurden Assoziationen zwischen AD und Genen epidermaler und epithelialer Strukturproteine sowie Genen, die in die Regulation der epidermalen Differenzierung und der kutanen Entzündungsreaktion eingreifen, gefunden. Von besonderem Interesse sind hier die Gene, die innerhalb des sogenannten epidermalen Differenzierungskomplexes auf 1q21 liegen. Am gesichertsten ist die Assoziation mit Mutationen im Gen für das kutane Strukturprotein Filaggrin, kurz für filament-aggregating protein, auf Chromosom 1q21.3. Das AMP LL37 wird in akuten AD-Läsionen geringer exprimiert als bei Gesunden¹⁸, was die Wundheilung verzögern, pathologische mikrobielle Besiedlungen begünstigen und somit eine höhere Infektussuszeptibilität mit sich bringen kann.

Aufgrund der gestörten Barriere können neben Allergenen, Reiz- und Schadstoffen auch Mikroben eindringen. Resultierend weist die Haut von AD-Patienten nicht nur eine stärkere Antigenpenetration, sondern auch eine höhere Suszeptibilität für bakterielle, virale und Pilzinfektionen auf. Typisch sind chronische bakterielle und virale Besiedlungen mit zum Teil sehr hoher Erregerlast, insbesondere durch Herpesviren¹⁹ sowie durch *Staphylokokkus aureus*, von der mehr als 80 % der Patienten betroffen sind¹⁵. Aufgrund des Leitsymptoms Juckreiz und des hieraus resultierenden Kratzreflexes kann es zur Ausbildung eines Circulus vitiosus kommen (siehe Abb. 3): Infolge des Kratzens entstehen mechanische Traumata mit lokaler inflammatorischer Reaktion und verstärkter Perfusion, die wiederum die Juckreizschwelle, beispielsweise durch Nervenendschäden, herabsetzen.

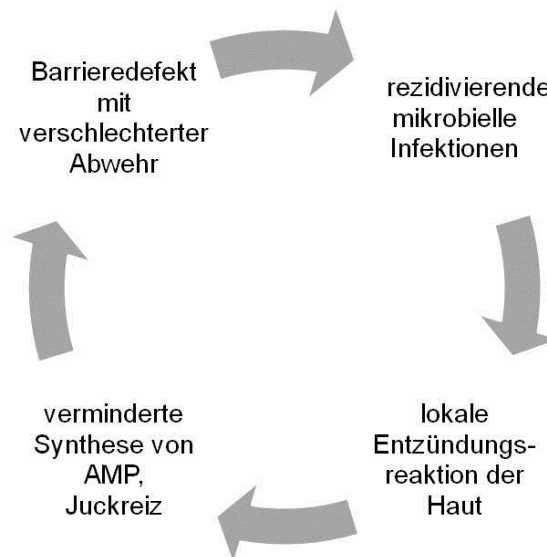


Abb. 3: **Circulus vitiosus in der Pathogenese der AD**
AMP, antimikrobielles Peptid.

Bei der AD ist die Erkennung von Mikroben und Allergenen durch das unspezifische und spezifische Immunsystem aufgrund der Modifikation von Zellinteraktion, -kommunikation und -migration verändert. Eindringende Mikroben werden zunächst durch das unspezifische Immunsystem über Pattern Recognition Receptors (PRR) erkannt, zu denen beispielsweise Toll-like-Rezeptoren (TLR) und CD14 (CD, Cluster of differentiation, Oberflächenprotein) zählen. Dies löst eine Entzündungsreaktion aus, die die Synthese von Zytokinen, Chemokinen und die Rekrutierung weiterer Immunzellen, wie neutrophile Granulozyten, beinhaltet. Die Stärke dieser Reaktion ist einerseits entscheidend für eine erfolgreiche Erregerabwehr, andererseits kann eine überschießende Reaktion eine Gewebsschädigung zur Folge haben. Sowohl die Funktionen verschiedener PRR als auch die Migration von Immunzellen ist bei der AD gestört¹⁵. So sind Assoziationen von TLR2 SNPs mit AD beschrieben^{20,21}.

Strukturen der Mikroben und Allergene werden anschließend von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) der Epidermis, dendritischen Zellen (DC) und Langerhans-Zellen über Haupthistokompatibilitätskomplexe (major histocompatibility complex, MHC) Klasse-II-Moleküle TH-Zellen und B-Zellen präsentiert. Bei der AD differenzieren diese daraufhin vermehrt zu TH2-Zellen und IgE-produzierenden Plasmazellen aus und es bildet sich eine periphere Eosinophilie. TH-Zellen werden nach ihren Zytokinprofilen unter anderem in TH1- und TH2-Zellen unterschieden. TH1-Zellen sprechen über die von ihnen produzierten Zytokine Tumornekrosefaktor (TNF) α , Interferon (IFN) γ und Interleukin (IL) 2 vor allem die zelluläre Abwehr an. TH2-Zellen synthetisieren charakteristischerweise IL4, IL5, IL6 und IL13, über die sie die humorale Immunantwort beziehungsweise B-Zellen regulieren²² und hier die Synthese von IgE induzieren, sowie durch IL5 die Differenzierung zu eosinophilen Granulozyten fördern. Dies ist schematisch in Abb. 4 dargestellt. Es wurden Assoziationen zwischen AD und Polymorphismen in den Genen der TH2-Zytokine IL4, IL5 und IL13²³ und deren Rezeptoren beschrieben.

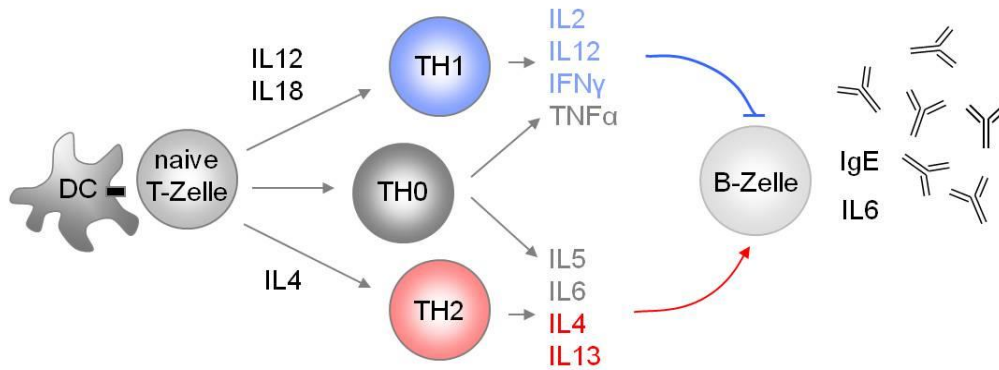


Abb. 4: **Differenzierung der TH-Zellen.**

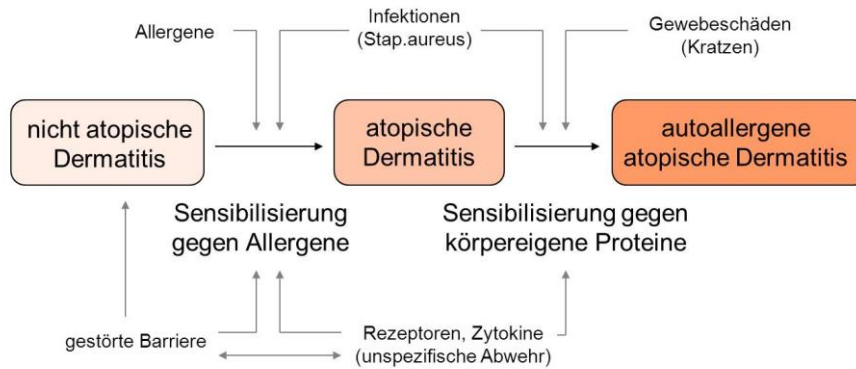
Die Polarisierung der TH-Zellen ist abhängig vom Mikromilieu und dendritischen Zellen (DC) und resultiert in unterschiedlicher Zytokinproduktion mit entsprechenden Wirkungen auf B-Zellen. IL13 und IL4 (Aktivierung über CD40, nicht gezeigt) bewirken Proliferation, IgE-Produktion und IL6-Sekretion durch B-Zellen. CD, Cluster of differentiation (Oberflächenprotein); DC, Dendritische Zelle; IL, Interleukin; TH-Zellen, T-Helferzelle. Abbildung modifiziert nach Bieber T. 2008².

Der Wechsel der Isotypenklasse von Immunglobulinen in B-Zellen ist abhängig von über CD40-vermittelte Interaktionen mit TH2-Zellen und wird von IL4, IL13 und auch TNF α und IFN γ angeregt²⁴. Die resultierenden antigenspezifischen IgE-Moleküle binden an hoch-affine IgE-Rezeptoren Fc ϵ -RI auf Mastzellen, eosinophilen Granulozyten und an niedrig-affine IgE-Rezeptoren CD23, die sich auf der Oberfläche vieler Immunzellen einschließlich B-Zellen befinden. Hier bewirken sie eine verstärkte Allergenpräsentation an T-Zellen und steigern so die spezifische Immunreaktion²⁴. Fc ϵ -RI sind ebenfalls auf der Oberfläche von kutanen Langerhans-Zellen, DC und auf Monozyten bei AD zu finden²⁵. Entsprechend wurden Mutationen im Fc ϵ -RI-Gen mit AD in Verbindung gebracht. Bei erneuter Antigenexposition kommt es zur Degranulation der Mastzellen und eosinophilen Granulozyten, wodurch Entzündungsmediatoren sowie vasoaktive und toxische Substanzen freigesetzt werden. Nach Allergenkontakt kommt es innerhalb von Stunden zu einer ekzematösen Hautveränderung. In diesen akuten Läsionen wurde eine vermehrte Migration von allergenspezifischen TH2-Zellen durch lokale Zytokin- und Chemokinsekretion der Keratinozyten und durch hautspezifische Adhäsionsmoleküle und entsprechende niedrige Spiegel von TH1-Zytokinen beschrieben²⁶.

Durch Infektionen kann es zu einer Sensibilisierung gegen entsprechende Enterotoxine kommen, die außerdem über die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors eine Proliferation der T-Zellen bewirken und die Produktion von T-Zell-rekrutierenden Chemokinen durch Keratinozyten verstärken. Es finden sich mit der Stärke der mikrobiellen Proliferation korrelierende IgE-Titer gegen diese Toxine²⁷. Die IgE-vermittelte Sensibilisierung gegen exogene Allergene kann sich im längeren Verlauf der Erkrankung auch gegen körpereigene

intrazelluläre Proteine richten, die die Produktion von Autoantikörpern und eine ständige Entzündungssituation zur Folge hat (siehe Abb. 5).

Umweltfaktoren



Genetische Faktoren

Abb. 5: Ätiologie der extrinsischen AD.

3 Phasen von AD: (1) intrinsischen AD ohne IgE-medierte Sensibilisierung; (2) Sensibilisierung gegen exogene Antigene durch genetische und Umweltfaktoren; (3) Bildung von IgEs gegen körpereigene Strukturen. Sowohl genetische als auch Umweltfaktoren beeinflussen den Krankheitsprozess. AD, Atopische Dermatitis; Ig, Immunglobulin. Abb. modifiziert nach Bieber T. 2008²

Eine weit verbreitete Erklärung für den starken Inzidenzanstieg atopischer Erkrankungen ist die „Hygiene-Hypothese“²⁸, die dies in Zusammenhang mit dem Rückgang der Exposition mit Mikroben und entsprechenden Infektionen in der frühen Kindheit setzt²⁹. Hierdurch soll es zu einer mangelnden Polarisierung der TH-Zellen in Richtung TH1 kommen, wie es bei bakteriellen und viralen Infektionen der Fall ist. Hieraus resultiert ein Überschuss an TH2-Zellen, die eine zentrale Rolle bei atopischen Erkrankungen spielen. So wurde beobachtet, dass ein perinataler Stimulus zur TH1-Polarisierung vor dem späteren Ausbilden einer AD schützt³⁰.

Auf die initiale Phase folgt eine chronische und von TH0- beziehungsweise TH1-Zellen dominierte Phase. Diese geht mit erhöhten Spiegeln der entsprechend typischen Zytokine, wie GM-CSF (Granulozyten/ Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor), INF γ und IL12, einher. Entsprechend wurden ebenfalls Assoziationen zur Genregion auf Chromosom 5q31-33 beschrieben, in der sich das Gen von GM-CSF und mehrerer TH2-Zytokine befinden³. Die betroffenen Hautregionen sind makroskopisch entzündungsfrei, enthalten aber auf histologischer Ebene einen höheren Anteil an APZ. Der Wechsel der akuten in die chronische Phase kann durch Umwelteinflüsse, wie Infektionen, die unter anderem TLR-vermittelt zu einer TH-Zelldifferenzierung zugunsten der TH1-Zellen führen, bedingt sein.

Die genetische Prädisposition für AD wird unterstrichen durch die bereits genannten zahlreichen Assoziationen mit immunmodulatorischen Genen, die beispielsweise die

leukozytäre Immunreaktion und insbesondere die T-Zell-Antwort beeinflussen, und mit Genen, die für epidermale Strukturproteine kodieren oder anderweitig in die Regulation der kutanen Entzündungsreaktion eingreifen.

AD reduziert durch physische und emotionale Belastung die Lebensqualität der Betroffenen deutlich und stellt aufgrund der hohen Prävalenz eine schwere ökonomische Belastung für das Gesundheitswesen dar. Eine kausale Therapie ist derzeit nicht möglich, symptomatische Therapieansätze sind aus medizinischer und ökonomischer Sicht verbesserungsfähig. Die Pathogenese von AD ist vielschichtig und bisher nur teilweise verstanden, auf mögliche Einflüsse von Vitamin D (VD) soll im Folgenden eingegangen werden.

1.2. Vitamin D3 und Vitamin-D-Rezeptor

1.2.1. Metabolismus³

Der VD-Metabolismus ist in Abb. 6 zusammengefasst. 7-Dehydrocholesterol stellt den aus Cholesterin gebildeten Vorläufer des Secosteroids Vitamin D₃ (VD) dar. In den Keratinozyten der Epidermis wird es durch eine photolytische Konversion unter Einwirkung von UV-B-Strahlung, die in Sonnenlicht enthalten ist, in Cholecalciferol konvertiert. Cholecalciferol oder sein Äquivalent Ergocalciferol, auch als Vitamin D₂ bezeichnet, kann ebenfalls mit der Nahrung aufgenommen beziehungsweise oral substituiert werden. Es ist in normaler Mischkost kaum enthalten, so dass davon ausgegangen wird, dass in der westlichen Gesellschaft die kutane Synthese mehr als 80 % des VD bereitstellt³².

Um aktives VD zu erzeugen, sind zwei getrennte Hydroxylierungsschritte notwendig: Zunächst wird aus Cholecalciferol 25-Hydroxyvitamin D₃ (25(OH)D, auch Calcidiol) synthetisiert. Diese Reaktion wird durch die VD-25-Hydroxylasen Cyp27A1 und CYP2R1 katalysiert. 25(OH)D ist der stabilste VD-Metabolit und macht den größten Teil des im Serum zirkulierenden VDs aus. Die Spiegel schwanken je nach Sonnenlichtexposition beziehungsweise Aufnahme mit der Nahrung und stellen ein Maß für die Versorgung mit VD dar. In einem weiteren Syntheseschritt wird aus Calcidiol durch eine 1 α -Hydroxylierung, die von dem mitochondrialen Enzym Cyp27B1 katalysiert wird, 1,25(OH)₂D₃ synthetisiert. Es wird auch als Calcitriol bezeichnet und stellt den biologisch aktivsten Metaboliten im VD-Stoffwechsel dar. Diese Reaktion ist streng reguliert und findet zum größten Teil in den Nieren, aber auch in anderen Organen statt. Interessanterweise ist CYP27B1 ebenfalls in Immunzellen zu finden, die somit über die Möglichkeit einer eigenständigen VD-Synthese verfügen³³. Neben Monozyten und DC kommt es auch in Lymphozyten vor und ist stark in Keratinozyten exprimiert. Es ist weiterhin in Keratinozyten und Fibroblasten der Haut zu finden. Die Aktivität der 1 α -Hydroxylase wird komplex reguliert. In Keratinozyten und mononukleären Zellen wird die 1 α -Hydroxylierung beispielsweise über TLR-Aktivierung und über proinflammatorische Zytokine, wie INF- γ und TNF- α , moduliert³⁴. VD induziert CYP24A1, eine 24-Hydroxylase, die die Umwandlung von 1,25(OH)₂ D₃ in 24,25-Dihydroxycholecalciferol (24,25(OH)₂D₃) katalysiert, das nur über eine geringe biologische Wirksamkeit verfügt, so dass VD über eine negative Rückkopplung seine eigene Wirksamkeit

³ Quelle für gesamten Abschnitt, soweit nicht anders vermerkt: 31. Bikle DD. Vitamin D: an ancient hormone. *Experimental dermatology*. Jan 2011;20(1):7-13.

hemmt. Eine Ausnahme des über mehrere Organe verteilt stattfindenden Metabolismus stellen epidermale Keratinozyten dar, die den gesamten Metabolismus vom Provitamin 7-Dehydrocholesterol bis zur Bildung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und dessen Abbau durchführen können.

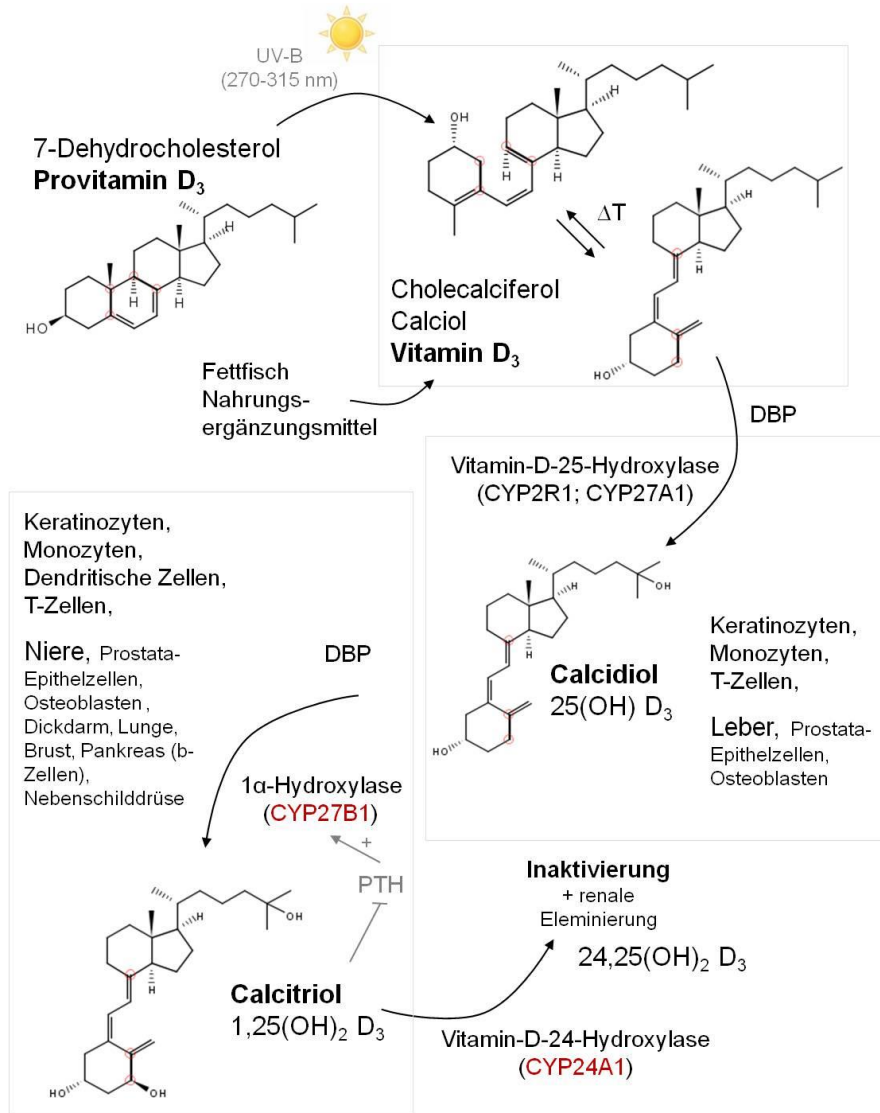


Abb. 6: Schematische Darstellung des Vitamin D₃-Metabolismus. DBP, vitamin-D-binding protein; PTH, Parathormon; UV, ultraviolet.

1.2.2. Vitamin-D-Rezeptor⁴

VD und VD-Analoga wirken auf transkriptioneller Ebene als pleiotroper Transkriptionsfaktor über die stereospezifische Bindung an seinen nukleären Rezeptor. Dieser Vitamin-D-Rezeptor (VDR) gehört zur Familie der Steroidrezeptoren und ist ein intrazelluläres Polypeptid mit einer Größe von 50 kDa bestehend aus 427 Aminosäuren. Mit Retinoid-X-Rezeptoren (RXR) als nukleäre Hilfsfaktoren bildet der VDR Heterodimere, die sich an die Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid, DNA) binden. Weiterhin ist die Bildung von Heterodimeren mit Retinoid-Säure-Rezeptoren³⁸ und die Bildung von funktionell bedeutsamen VDR-Homodimeren bekannt. Die Rezeptordimere binden, reguliert durch verschiedene Korezeptorkomplexe, an jeweils spezifische Enhancer-Sequenzen, die sogenannten Vitamin-D-responsiven-Elemente (VDRE) (Abb. 7), so dass sich hier komplexe Regulationsmechanismen ergeben³⁹. Beispielsweise ist ein VDRE im Gen der 24-Hydroxylase CYP24A1 bekannt⁴⁰. Es wurden über 2.700 Bindestellen des VDR in intergenetischen und Intronregionen gefunden⁴¹ und in einer genomweiten Expressionsanalyse nach Gabe von VD verstärkte Expressionen von 291 Genen beobachtet⁴².

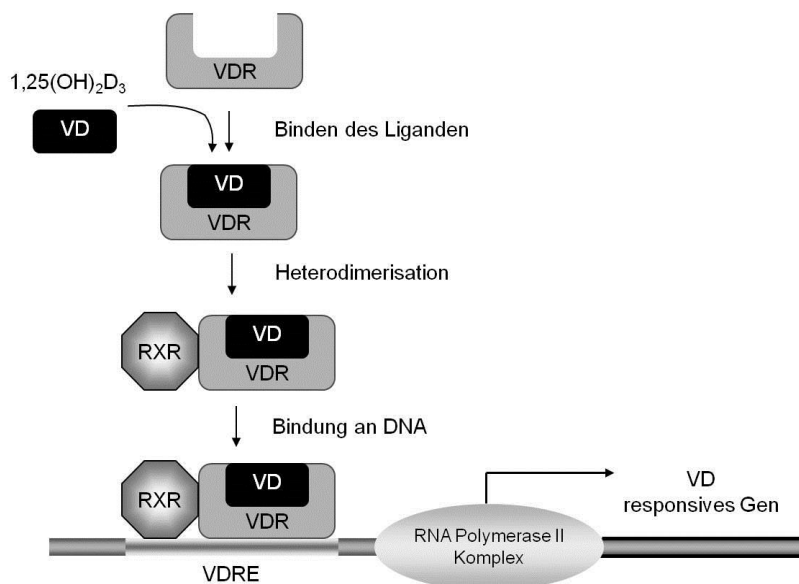


Abb. 7: **Wirkungsweise des VD-VDR-Komplexes (1).** VD, Vitamin D; VDR, Vitamin D Rezeptor; RXR, Retinoid X Rezeptoren; VDRE, Vitamin D responsives Element. Modifiziert nach³⁷.

⁴ Quellen für Abschnitt, soweit nicht anders vermerkt: 35. Christakos S, Dhawan P, Liu Y, Peng X, Porta A. New insights into the mechanisms of vitamin D action. *Journal of cellular biochemistry*. Mar 1 2003;88(4):695-705, 36. Christakos S, Raval-Pandya M, Wernyj RP, Yang W. Genomic mechanisms involved in the pleiotropic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *The Biochemical journal*. Jun 1 1996;316 (Pt 2):361-371, 37. Dusso AS. Vitamin D receptor: mechanisms for vitamin D resistance in renal failure. *Kidney international. Supplement*. Jun 2003(85):S6-9.

Weiterhin existieren Gene, deren Transkription von VD gehemmt wird, was über eine Bindung an VDR interacting repressors vermittelt wird, die an negative Vitamin-D-responsive-Elemente (nVDRE) binden (siehe Abb. 8). In dieser Weise wird die Transkription der 1α -Hydroxylase CYP27B1⁴³ und von IFN γ ⁴⁴ VDR-vermittelt gehemmt.

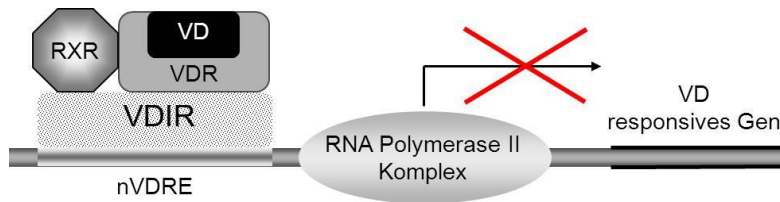


Abb. 8: **Wirkungsweise des VD-VDR-Komplexes (2).**

nVDRE, negative Vitamin-D-responsive-Element; RXR, Retinoid-X-Rezeptor; VD, Vitamin D; VDIR, VDR interacting repressors; VDR, Vitamin-D-Rezeptor. Modifiziert nach⁴³.

Des Weiteren können andere nukleäre Faktoren durch kompetitive Hemmung des VDR/RXR-Heterodimers verdrängt und so die Transkription von Genen verhindert werden, wie beispielsweise von inflammatorischen Zytokinen in aktivierten T-Zellen. Außerdem sind posttranskriptionelle Mechanismen durch Modulation der Stabilität der Boten-RNA (messenger RNA, mRNA) bekannt, wie beispielsweise bei der Inhibition von GM-CSF⁴⁵.

Der VDR wird durch VD selbst induziert. Dies kann sowohl durch eine verstärkte Transkription als auch eine erhöhte Stabilität der besetzten Rezeptoren⁴⁶ bedingt sein und ist vom Zelltyp und dem Grad der Differenzierung abhängig. Ein weiterer Modulator des VDR stellt Parathormon (PTH) dar, das ebenfalls eine Steigerung der VDR-Konzentration bewirkt⁴⁷. Auch TLR-Aktivierung bewirkt eine Hochregulation des VDR⁴⁸. In der Promoterregion des *VDR* wurden Bindestellen für weitere Transkriptionsfaktoren gefunden, beispielsweise für NF κ B, das inhibierend auf die Funktion des VDRs wirkt⁴⁹. Über die Regulation des VDR kann die Empfindlichkeit einer Zelle gegenüber VD gesteuert werden.

Der VDR wird in den meisten Geweben einschließlich in Zellen des Immunsystems^{33,50,51} und in der Haut⁵² exprimiert. Dies schließt Monozyten und Makrophagen ein^{53,54}.

1.2.3. VDR-SNPs

Einzelnukeotid-Polymorphismen (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) sind die häufigsten genetischen Variationen und bezeichnen den Wechsel einzelner Basenpaare in der DNA, die bei mindestens 1 % der Bevölkerung auftreten. Einerseits können sich SNPs auf die Genfunktion beziehungsweise die Funktionsfähigkeit des entsprechenden Proteins auswirken,

wenn sie beispielsweise in einem kodierenden Bereich lokalisiert sind und die Translation andere Aminosäuren bedingen. Andererseits können sie Einfluss auf das Expressionslevel beziehungsweise die Menge an synthetisiertem Protein haben, wenn sie in Genregionen liegen, die die Transkription oder auch die mRNA-Stabilität beeinflussen.

Es sind Mutationen im Gen des *VDR* bekannt, die dessen Funktion vollständig oder zum Teil behindern und die seltene Vitamin-D-unabhängige Form von Rachitis bedingen⁵⁵. SNPs im *VDR*-Gen sind seit mehr als 20 Jahren bekannt und es wurden zahlreiche Untersuchungen zu einzelnen SNPs, Kopplungsverhalten und Haplotypenverteilungen sowie deren funktionelle Auswirkungen durchgeführt. Die vier in dieser Arbeit betrachteten SNPs sind *fokI* (rs2228570)⁵⁶, *apaI* (rs7975232;⁵⁷), *bsmI* (rs1544410;⁵⁸) und *taqI* (rs731236). Sie sind nach entsprechenden Restriktionsendonukleasen benannt und gehören mit Häufigkeit des selteneren Allels, auch Minor Allel Frequency, von mehr als 5 % zu den weitverbreiteten beziehungsweise häufigen Polymorphismen, den sogenannten common variants. Ihre Positionen im *VDR*-Gen sind in Abb. 9 grafisch dargestellt, die genauen Lokalisationen sind Tab. 1 (Material und Methoden) zu entnehmen.

TaqI liegt im neunten Exon des *VDR*-Gens und stellt einen synonymen Polymorphismus dar. Durch ihn wird aus einem ATT- ein ATC-Kodon erzeugt, wobei beide für Isoleucin kodieren und somit die Aminosäurestruktur des *VDR*-Proteins nicht verändert wird⁵⁹. *ApaI* und *bsmI* liegen in Intron 8 und somit in einer nicht kodierenden Region und sind in der Translation stumm. *FokI* ist ein Startkodonpolymorphismus im zweiten Exon und ist ein Protein-Polymorphismus⁶⁰. Liegt das *fokI* C-Allel vor, wird ein 424 Aminosäuren langes Protein erzeugt, wohingegen das T-Allel ein neues Startkodon und somit ein Protein mit 427 Aminosäuren generiert^{61,62}.

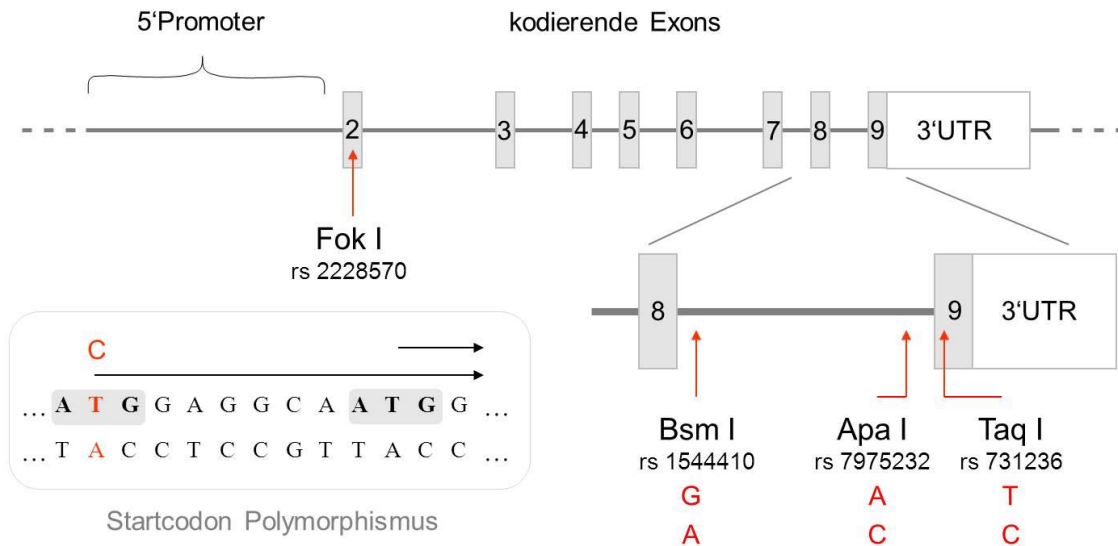


Abb. 9: Vitamin-D-Rezeptor-Gen mit untersuchten SNPs.

fokI auf Exon 2 bildet ein alternatives Startcodon, dass ein 3 Aminosäuren längeres Peptid erzeugt. *bsmI* und *apaI* liegen in Intron 8 und *taqI* auf Exon 9, wobei es keine Änderung der Aminosäuresequenz bewirkt. SNP, Single nucleotide Polymorphism; UTR, 3'untranslatierter Bereich (3' untranslated region).

Einflüsse von *VDR*-Polymorphismen auf die Wirkung von VD beziehungsweise die Funktion des *VDR* sind insbesondere für den *fokI* SNP beschrieben⁶³. Für diesen Polymorphismus sind zum Teil kontrovers diskutierte Unterschiede in der transkriptionellen Aktivität des *VDR* bekannt. Die Mehrzahl der Studien zu diesem Thema legen nahe, dass das kürzere, durch das C-Allel erzeugte Protein eine höhere Aktivität zeigt⁶⁴. Entsprechend wurde in epidemiologischen Studien Assoziationen des *fokI* TT-Genotyps beziehungsweise des T-Allels mit Tuberkulose⁶⁵ und Knochenmineralisierungstörungen⁶⁶ gefunden, auf die VD eine potenziell positive Wirkung hat.

Von den mehr als 200 bekannten SNPs im *VDR*-Gen (<http://egp.gs.washington.edu/data/vdr/vdrxx.csnp.txt> 03.07.2013), deren Auswirkungen auf die *VDR*-Funktion weitestgehend unklar sind, gehören *taqI*, *bsmI* und *fokI* zu den am häufigsten untersuchten, wobei zahlreiche Assoziationen mit entzündlichen, autoimmunen und malignen Erkrankungen beschrieben wurden. Beispiele hierfür sind im Anhang in den Tabellen Tab.A 9, Tab.A 10, Tab.A 11 und Tab.A 12 aufgelistet (Stand 04/2012). Für Atopie beziehungsweise Asthma wurden Assoziationen mit *taqI*⁶⁷, *apaI*⁶⁷⁻⁶⁹, *bsmI*⁶⁷ und auch *fokI*⁷⁰ beschrieben.

1.2.4. Wirkung von VD

VD hat vielseitige Funktionen, die sich auf verschiedene Organsysteme auswirken und deren Mechanismen bisher nicht vollständig bekannt sind. Es wirkt sowohl auto- und parakrin, wie in der Haut, als auch endokrin: Neben der Inhibition der Synthese und Sekretion von PTH fördert es die Sekretion von Thyreotropin, Prolaktin und Insulin. Die am längsten bekannten Funktionen von VD betreffen die Kalziumhomöostase. Es verstärkt die intestinale Kalzium- und Phosphatabsorption durch die Bildung von Transportproteinen und hemmt die renale Kalziumeliminierung. Es moduliert den Knochenstoffwechsel, indem es vor allem über Aktivierung von Osteoklasten und Stimulation von Osteoblasten die Mineralisierung und das Wachstum fördert. Weiterhin reguliert VD als transkriptioneller Regulator den Zellzyklus durch Stimulation der Zelldifferenzierung und Inhibition der Zellproliferation, was sich positiv auf maligne Erkrankungen auswirken kann ⁷¹.

Immunmodulation durch VD ⁵

VD hat komplexe immunmodulatorische Wirkungen. Es induziert Moleküle der unspezifischen Abwehr, wie die Zytokinproduktion, und unterdrückt Elemente des adaptiven Abwehrsystems. Es hat antimikrobielle Effekte ⁷² und bewirkt die Regulation einer maßvollen lokalen Entzündung in Form einer starken akuten und im späteren Verlauf selbstlimitierenden Immunreaktion.

Die Effekte von VD auf das Immunsystem, beispielsweise die Differenzierung von TH-Zellen, ist von der Art der Aktivierung und auch dem Kalziumstatus abhängig und kann aufgrund dessen verschiedene Auswirkungen haben ⁷³. In In-vitro-Versuchen wurden die immunmodulatorischen Effekte von VD bisher nur bei Konzentrationen festgestellt, die in vivo mit den Symptomen einer Hypervitaminose mit Hyperkalziämie und einem anabolen Knochenmetabolismus einhergehen ⁷⁴. Eine Möglichkeit, die Effekte von VD nutzbar zu machen, sind Analoga oder Derivate, die verminderte Wirkung auf die Kalziumhomöostase beziehungsweise eine verminderte systemische Wirkung zeigen. Beispiele sind ZK203278 ⁷⁵ oder das topisch angewandte Calcipotriol (MC 903) ⁷⁶, die bislang nicht systemisch angewendet wurden.

⁵ Quellen für Abschnitt, soweit nicht anders vermerkt: 33. Di Rosa M, Malaguarnera M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Vitamin D3: a helpful immuno-modulator. *Immunology*. Oct 2011;134(2):123-139, 51. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Current opinion in pharmacology*. Aug 2010;10(4):482-496.

Im Folgenden soll auf die Wirkung von VD auf einzelne Elemente des Immunsystems eingegangen werden.

Unspezifische Immunität

Inbesondere in der kutanen unspezifischen Immunantwort kann VD die Formation eines mechanischen und chemischen Abwehrschildes unterstützen. VD induziert den Transforming growth factor β_1 , dem in der Wundheilung eine große Bedeutung zukommt, und der wiederum die Synthese von VD steigert. Weiterhin ist die Synthese von epidermalen Strukturproteinen und Differenzierungsmarkern, wie Profilaggrin und Involucrin, VD-abhängig⁷⁷. Bei AD kommen diese Proteine mangelhaft vor. VD induziert AMP, allerdings sind Studienergebnisse hier zum Teil kontrovers. Im *LL37*-Gen und im Gen *DEFB4* (human defensin beta 4), das das HBD-2 kodiert, wurden VD-responsive-Elemente (VDRE) gefunden⁷⁸.

Monozyten

Monozyten sind im Blut zirkulierende, myeloide APZ und stellen die Vorläufer von Makrophagen und Teile der DC dar. VD bewirkt in Monozyten eine Ausdifferenzierung⁷⁹ und hemmt die Proliferation⁴⁵. Infolge von mikrobiellen Stimuli ist unter Einfluss von VD eine Aktivitätssteigerung, wie beispielsweise vermehrte Phagozytose⁸⁰, eine vermehrte Chemotaxis, „oxidative burst“ und Antigenpräsentation, beschrieben. Im Verlauf wird durch VD die Entzündungsreaktion gehemmt⁸¹ und die Sekretion von antiinflammatorischen Stoffen, wie beispielsweise IL10 und Prostaglandin E₂, gefördert⁸², wie auch in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) gezeigt wurde⁸³. Weiterhin inhibiert VD die Expression von TLRs⁷⁴ und die TLR-abhängige Zytokinproduktion, beispielsweise von IL6⁸⁴. Somit wird die Ansprechbarkeit der Zelle auf PAMPs und damit eine weitere, gegebenenfalls überschießende, Entzündungsreaktion gehemmt.

Dendritische Zellen

DC stellen, unter anderem wegen ihrer antigenpräsentierenden Funktion und ihrer Produktion von T-Zell-aktivierenden Zytokinen, ein Bindeglied zwischen unspezifischer und

spezifischer Immunantwort dar. Durch sie können Antigene aus peripheren Geweben in Lymphknoten präsentiert und so T-Zellen antigenspezifisch geprimt werden ⁸⁵. Die in der Epidermis zu findenden Langerhans-Zellen werden durch Antigenkontakt zu DC aktiviert. Langerhans-Zellen und inflammatorische dendritische epidermale Zellen wurden in AD-Läsionen nachgewiesen ⁸⁶ und nehmen eine Schlüsselrolle in der atopischen Pathogenese ein.

VD wirkt auf DC antiinflammatorisch und antiproliferativ. Es verzögert sowohl die Ausdifferenzierung als auch die Migration von DC ^{3,87} und steigert in reifen DC die Raten spontaner Apoptosen ⁸⁸. Weiterhin erhöht VD die Rate von tolerogener DCs und damit die immunologische Toleranz ⁸⁹. In Langerhans-Zellen wurde eine Minderung der Antigenpräsentation und damit der T-Zell-Aktivierung beschrieben ⁹⁰. VD hemmt die Transkription und Aktivierung von NF-KB ⁹¹ sowie die Produktion von IL12, das die Bildung regulatorischer DC hemmt, von IL23, wodurch eine TH1-gewichtete Immunantwort unterstützt wird ⁹², und von IFN γ .

Keratinocyten

In Keratinocyten, die den Hauptbestandteil der Epidermis bilden und maßgeblich zur unspezifischen Abwehrfunktion der Haut beitragen, wurde ebenfalls eine proliferationshemmende sowie eine differenzierungsfördernde ³¹ Wirkung von VD beschrieben ⁹³. In gesunder Haut kann VD auf Keratinocyten auch proliferativ wirken, was von der Konzentration sowie vom Differenzierungsgrad der Keratinocyten abhängig ist ⁹⁴. VD scheint weiterhin entscheidend für die kutane Homöostase zu sein: Unter Blockieren des VDRs und von Korezeptoren wurden Hyperproliferation, Fehlen von Differenzierung und eine reduzierte Expression von Filaggrin ⁹⁵ beziehungsweise unter Blockierung der 1 α -Hydroxylase eine eingeschränkte Barrierefunktion mit verlängerter Erholungszeit nach Verletzung ⁹⁶ beobachtet. In Wunden wurde eine VD-vermittelte verstärkte Expression PRR und AMP beschrieben ³⁴, wodurch Mikroben erkannt und zu ihrer Abwehr beitragen werden kann.

VD supprimiert in Keratinocyten proinflammatorische Zytokine, wie IL6 und TNF α ⁹⁷, und induziert das antiinflammatorische Zytokin IL10 sowie dessen Rezeptor ⁹⁸. Für TNF α ist allerdings in einer frühen Entzündungsphase auch eine gesteigerte Expression durch VD beschrieben ⁹⁹.

Spezifische Immunität

Eine spezifische Immunantwort wird vor allem durch ein Zusammenspiel von T- und B-Zellen generiert, die zur Gruppe der Lymphozyten zählen. In T-Zellen bewirkt VD eine Hemmung der Aktivierung, Proliferation⁸¹ und der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen sowie die Migration in Lymphknoten²² oder in entzündliche Gewebe¹⁰⁰. VD steigert die immunologische Toleranz, indem es die Aktivität regulatorischer T-Zellen unterstützt^{89,101}. Regulatorische T-Zellen fehlen in AD-Läsionen, sind allerdings vermehrt im Plasma von AD-Patienten zu finden.

Die Auswirkungen von VD auf die TH-Gewichtung sind nicht vollständig geklärt. Möglich ist eine Verminderung sowohl der TH1- als auch der TH2-Antwort^{102,103}. Es wurde ebenfalls eine verstärkte Differenzierung zu TH2-Zellen durch VD beschrieben¹⁰⁴, was sich aber in einer fortgeschrittenen Entzündung zum Teil umkehrt¹⁰⁵. Einfluss hat auch die durch VD verminderte Synthese der TH1-Zytokine IL12¹⁰⁶, IL2⁸¹, IL5, TNF α , IFN γ ³³, was eine Verschiebung in Richtung TH2-Zellen unterstützen kann. Eine Förderung der TH2-Antwort erklärt auch die protektiven Effekte von VD auf TH1-mediierte Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise Diabetes mellitus TypI.

Die Wirkung von VD auf B-Zellen wird entscheidend von der TH-Wichtung bestimmt, wobei TH2-Zytokine die Produktion von Ig durch Plasmazellen fördern. VD bewirkt hingegen auch eine Verminderung der Reifung sowie der Ig-Sekretion und -Detektion. Eine Verminderung der IgE-Produktion unter Einfluss von VD wurde in vitro¹⁰⁷ und im Mausmodell¹⁰⁸ bestätigt. Dieser Zusammenhang wird durch eine Assoziation eines Haplotyps im *CYP24A1*-Gen mit IgE-Spiegeln unterstrichen¹⁰⁹. VD steigert auch in B-Zellen die IL10-Produktion¹¹⁰.

Zusammenfassend sind die Wirkungen von VD auf Zellen des Immunsystems weitreichend und aufgrund ihrer Komplexität bisher nicht vollständig geklärt. Es gibt Schnittmengen zur Pathogenese von AD, und da wichtige Schritte der VD-Synthese lokal in der Haut stattfinden, ist der Einfluss von VD auf Hauterkrankungen von besonderem Interesse. Die genauere Erforschung des Einflusses von VD kann das Verständnis der Pathogenese von AD vergrößern und neue Therapieoptionen hervorbringen.

1.2.5. VD-Substitution und -Defizienz

Die empfohlene tägliche VD-Zufuhr liegt bei 800 internationalen Einheiten beziehungsweise 20 µg (<http://www.rki.de>; 04/12). Als Rachitisprophylaxe bei Neugeborenen wird in Deutschland eine tägliche orale Substitution von 400-500 internationalen Einheiten Calciferol empfohlen^{111,112}. In Deutschland ist bei 40 bis 45 % der Bevölkerung von einer Insuffizienz, bei weiteren 15 bis 30 % von einer Defizienz an VD auszugehen¹¹³. Die weltweite Prävalenz der VD-Defizienz wird auf eine Milliarde geschätzt³². Ein Mangel in Form einer manifesten Defizienz ist in der modernen Welt selten und in den meisten Fällen mangelnder Sonnenlicht- beziehungsweise UV-B-Exposition geschuldet. Diese ist unter anderem vom geografischen Breitengrad abhängig, so dass in Mittel- und Nordeuropa große Bevölkerungsgruppen VD-unterversorgt sind. Neben der Sonnenlichtexposition sind auch eine starke Hautpigmentierung, der Ernährungszustand, speziell Adipositas¹¹⁴, und das Alter prädisponierende Faktoren für einen VD-Mangel. Bekannte Folgen eines VD-Mangels sind, neben gestörter Muskelfunktion, Mineralisierungsstörung der Knochen mangels Kalzium und Phosphat in Form von Rachitis beziehungsweise Osteomalazie.

2. Fragestellung

VD hat komplexe immunomodulatorische Wirkungen, die in der Haut sowie in immunologischen Geweben Hauterkrankungen wie AD beeinflussen können. Zahlreiche epidemiologische Studien haben den Zusammenhang von Polymorphismen des *VDR* und verschiedenen Erkrankungen einschließlich Atopie analysiert. Eine Assoziation mit AD wurde bisher nicht untersucht. Diese Arbeit hat die Überprüfung folgender Hypothesen zum Ziel:

VD kann *VDR*-abhängig Einfluss auf AD haben, so dass sich Polymorphismen des *VDR* oder aus ihnen zusammengesetzte Haplotypen auf das Erkrankungsrisiko (H_A und H_B) und den Verlauf (H_C) von AD auswirken können. Es soll in einer Fall-Kontroll-Studie die Häufigkeiten der vier häufig untersuchten *VDR*-SNPs *fokI*, *bsml*, *apal* und *taqI* gemessen und die Haplotypen dieser SNPs untersucht werden.

H_A Die *VDR*-SNPs *fokI*, *bsml*, *apal* und *taqI* oder aus ihnen zusammengesetzte Haplotypen treten mit unterschiedlicher Häufigkeit bei AD-Patienten und bei gesunden Kontrollen auf.

Und zugehörig die Nullhypothese:

H_1 Die *VDR*-SNPs *fokI*, *bsml*, *apal* und *taqI* oder aus ihnen zusammengesetzte Haplotypen haben bei AD-Patienten und bei gesunden Kontrollen gleiche Häufigkeiten.

Um weniger stark ausgeprägte Einflüsse deutlich zu machen, sollen diese Vergleiche auch zwischen der Patientengruppe mit schweren Verläufen und den gesunden Kontrollen gemacht werden:

H_B Die *VDR*-SNPs *fokI*, *bsml*, *apal* und *taqI* oder aus ihnen zusammengesetzte Haplotypen treten mit unterschiedlicher Häufigkeit bei AD-Patienten mit schweren Verläufen und bei gesunden Kontrollen auf.

H_2 Die *VDR*-SNPs *fokI*, *bsml*, *apal* und *taqI* oder aus ihnen zusammengesetzte Haplotypen treten bei AD-Patienten mit schweren Verläufen und bei gesunden Kontrollen mit gleicher Häufigkeit auf.

Um mögliche Einflüsse auf den Krankheitsverlauf zu analysieren, soll die Fallgruppe nach klinischem Phänotyp der Erkrankung unterteilt werden (H_C).

H_C Die *VDR*-SNPs *fokI*, *bsml*, *apal* und *taqI* oder aus ihnen zusammengesetzte Haplotypen treten mit unterschiedlicher Häufigkeit bei AD-Patienten mit schweren und mild-moderaten Krankheitsverläufen auf.

- H₃ Die *VDR*-SNPs *fokI*, *bsml*, *apaI* und *taqI* oder aus ihnen zusammengesetzte Haplotypen treten mit gleicher Häufigkeit bei AD-Patienten mit schweren und mild-moderaten Krankheitsverläufen auf.

Um eine mögliche funktionelle Auswirkung der *VDR*-Polymorphismen auf den *VDR* in einer Entzündungsreaktion zu untersuchen, sollen die Genotypen beziehungsweise Haplotypen, die mit unterschiedlichen Häufigkeiten bei AD und bei gesunden Kontrollen auftreten, auf eine veränderte Expressionsrate (H_D) und veränderte Funktion des *VDR* (H_E) untersucht werden. Hierzu sollen jeweils Probanden aus der Kontrollgruppe ausgewählt und die aus Blutproben gewonnenen CD14⁺-Monozyten in einer primären Zellkultur untersucht werden. Diese Zellen sollen unstimuliert sowie nach Inkubation mit dem *VDR*-Liganden Calcitriol untersucht werden. Es sollen die *VDR*-mRNA und die mRNA der *VDR*-responsiven Gene *CYP24A1*, *CYP27B1* und *LL37* quantifiziert und ferner die Proteinmengen der inflammatorischen Zytokine TNF α und IL6 bestimmt werden.

- H_D Die *VDR*-mRNA-Mengen in Monozyten unterscheiden sich bei Trägern verschiedener *VDR*-Geno- beziehungsweise Haplotypen.
- H₄ Die *VDR*-mRNA-Mengen in Monozyten sind bei Trägern verschiedener *VDR*-Geno- beziehungsweise Haplotypen gleich.
- H_E Die mRNA-Mengen von *VDR*-responsiven Genen sowie die Mengen der ausgeschütteten inflammatorischen Zytokine unterscheiden sich in Monozyten konstitutiv, nach *VDR*-Aktivierung bei Trägern verschiedener *VDR*-Geno- beziehungsweise Haplotypen.
- H₅ Die mRNA-Mengen von *VDR*-responsiven Genen sowie die Mengen der ausgeschütteten inflammatorischen Zytokine sind in Monozyten konstitutiv, nach *VDR*-Aktivierung bei Trägern verschiedener *VDR*-Geno- beziehungsweise Haplotypen gleich.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Alle in den Versuchen verwendeten Produkte, inklusive Reagenzien, Pufferlösungen, Antikörper, Kits, Geräte und Software sind geordnet nach ihrer Verwendung beziehungsweise alphabetisch im Anhang in den Tabellen Tab.A 1, Tab.A 2, Tab.A 3, Tab.A 4, Tab.A 5 und Tab.A 6 aufgelistet.

Studienpopulation

265 Patienten mit AD wurden in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité (Campus Charité Mitte; Charitéplatz 1, 10117 Berlin) rekrutiert. Einschlusskriterien waren das Vorliegen einer AD, die von einem erfahrenen Dermatologen diagnostiziert wurde. Der Krankheitsverlauf wurde mithilfe des SCORAD-Wertes (SCORing Atopic Dermatitis) in mild bis moderaten, bei einem SCORAD kleiner oder gleich 40, und schweren Verlauf, bei einem SCORAD größer als 40, eingeteilt ¹¹⁵.

Als Kontrollgruppe wurden, passend nach Geschlecht und Alter, 199 gesunde Personen im Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité (Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte; Dorotheenstraße 96, 10117 Berlin) rekrutiert und DNA-Proben von 99 gesunden Personen im Rahmen einer Kooperation mit PopGen (<http://www.uni-kiel.de/medinfo/institut/profil/popgen/> 30.08.2013, Institut für Medizinische Informatik und Statistik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) zur Verfügung gestellt.

Alle Personen in Fall- und Kontrollgruppe sind nicht verwandt und gehören der kaukasischen Ethnie an. In der Kontrollgruppe waren die Verteilungen der Genotypen und der Allele der vier betrachteten SNPs in den Gruppen aus Berlin und Kiel nicht signifikant verschieden (2x2 χ^2 Test für Allelhäufigkeiten $p > 0,26$; 3x2 χ^2 Test für Genotyphäufigkeiten $p > 0,10$; Daten nicht gezeigt).

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin bestätigt. Alle Teilnehmer wurden über den Inhalt der Untersuchungen aufgeklärt und ihr schriftliches Einverständnis eingeholt. Die Erhebung der klinischen Daten geschah retrospektiv aus Patientenakten im Zeitraum 02/2010 bis 06/2010.

3.2. Methoden

3.2.1. Literaturrecherche

Die Literaturrecherche wurde mittels der Meta-Datenbank Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) im Zeitraum vom 22.04.2011 bis 15.06.2013 durchgeführt. Die hierfür verwendeten MeSH-Terms waren „Vitamin D“, „VDR“, „CYP27B1“, „CYP24A1“, „LL37“, „atopic dermatitis“, „*taqI*“, „rs731236“, „*apaI*“, „rs7975232“, „*bsmI*“, „rs1544410“ und „*fokI*“, „rs2228570“. Die Suche nach den vier letztgenannten Polymorphismen fand im Zeitraum 02/2012 bis 04/2012 statt. Zur Literaturverwaltung wurde der Referenzmanager Endnote (<http://endnote.com/>) verwendet.

3.2.2. Genotypisierung

DNA-Präparation

Den Probanden wurde Vollblut mittels atraumatischer Punktion einer peripheren Vene entnommen, das in EDTA-Röhrchen aufgefangen wurde. Es wurden 10 ml Blut entnommen, das bis zur weiteren Präparation bei -20 °C gelagert wurde. Es wurde DNA mit dem Qiagen Blood DNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany) nach Anweisung des Herstellers (DNA Purification from Blood or Body Fluids, www.qiagen.com/literature/handbooks, 04/2010) extrahiert. Die DNA wurde in 100 µl Elutionspuffer (Qiagen Buffer AE beziehungsweise Omega bio-Tek elution buffer) eluiert und bei -20 °C gelagert. Die Konzentration der präparierten DNA wurde mittels Absorptionsbestimmung mit einem Photometer gemessen. Hier wurde die optische Dichte der DNA-Elution mit der des Elutionspuffers verglichen. Protein- und Kohlenhydratverunreinigungen wurden über das Absorptionsmaxima bei 230 beziehungsweise 280 nm im Vergleich zum Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm ermittelt.

Echtzeit-PCR und Schmelzkurvenanalyse

Die Genotypisierung erfolgte mittels einer neu etablierten Schmelzkurvenanalyse der Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (real-time polymerase chain reaction, RT-PCR) und wurde mit der bekannten RFLP-Methode verifiziert. Informationen zu Nomenklatur und Lage der vier untersuchten Polymorphismen sind Tab. 1 zu entnehmen.

Tab. 1: **Nomenklatur der VDR-Polymorphismen.**

VDR, Vitamin D Receptor; SNP, single nucleotide Polymorphism.
Position aus <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp> (01.10.2011)

SNP	NCBI-Nr.	Lokalisation	Position [bp]	Basenwechsel (major Allel / minor Allel)
<i>fokI</i>	rs2228570	Exon 2	46559162	C / T
<i>bsml</i>	rs1544410	Intron 8	46526102	G / A
<i>apal</i>	rs7975232	Intron 8	46525104	A / C
<i>taqI</i>	rs731236	Exon 9	46525024	T / C

Für die Echtzeit-PCR wurden die gleichen Primer wie für die Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Methode (restriction fragment length polymorphism, RFLP) verwendet, die Primersequenzen sind Tab. 2 zu entnehmen. Die Hybridisierungssonden sind in Tab. 3, Reaktionsansatz und Programmablauf der RT-PCR in Tab. 4 und Tab. 5 aufgelistet. Die Versuche wurden am Light Cycler® 480 (Roche, Holding) durchgeführt und mit der zugehörigen Software (LightCycler®480 Software 1.5.0.39) ausgewertet. Beispiele für die Schmelzkurven aller Genotypen sind in Abb. 10 und entsprechende Schmelztemperaturen in Tab. 6 dargestellt. Die Maxima der Schmelzkurven für Wildtyp und homozygote Mutation beim *apal* SNP liegen mit 4 °C Differenz nah zusammen, so dass sich bei heterozygoter Mutation die zwei Maxima weniger deutlich als bei den anderen SNPs zeigen. Die Auswertbarkeit wurde durch eine weitere Methode verifiziert (siehe unten).

Tab. 2: **Primersequenzen und PCR-Bedingungen.**

F, forward; PCR, polymerase chain reaction; R, reverse; VDR, Vitamin-D-Rezeptor.

* K. Schlatterer, et al. Biochemica 2005

VDR-Polymorphismen	Primersequenzen (5' – 3')
<i>fokI</i>	F TGGCACTGACTCTGGCTCT R CCTTCACAGGTCATAGCATTGA
	4 min, 95 °C – 50 cycles (2 s, 95 °C – 20 s, 56 °C – 20 s, 72 °C)
<i>bsml</i> *	F TAGGGGGGATTCTGAGGAACTA R AGTTTTGTACCCTGCCCGC
<i>apal</i>	F CGGTCAGCAGTCATAGAGGG R GGTCGGCTAGCTTCTGGATCAT
<i>taqI</i>	= <i>apal</i>
	4 min, 95 °C – 45 cycles (5 s, 95 °C – 20 s, 60 °C – 15 s, 72 °C)

Tab. 3: **Sequenzen der Sonden für RT-PCR.**

A, Anchor; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction; S, Sensor; SNP, Single nucleotide Polymorphism; VDR, Vitamin-D-Rezeptor.

VDR-SNP	Sonden (5' – 3')	
<i>fokI</i>	S	TTCTTACAGGGACGGAGGCA – 6-FAM
	A	Cy5 – TGGCGGCCAGCACTTCCCTG – Aminohexyl
<i>bsmI*</i>	S	AGTATTGGGAATGCGCAGGCC – 6-FAM
	A	Cy5 – TCTGTGGCCCCAGGAACCCTG – Aminohexyl
<i>apaI</i>	S	Cy5 – GCACCTCACTGCTCAATC – Aminohexyl
	A	GAAGAAGGCACAGGAGCTCTCAGCTG – 6-FAM
<i>taqI</i>	S	CGCTGATCGAGGCCATCCA – 6-FAM
	A	Cy5 – GACCGCCTGTCCAACACACTGC – Aminohexyl

Tab. 4: **Reaktionsansatz der RT-PCR.**

C_{End} , Endkonzentration * für ApaI: $MgCl_2$: $V=3,0 \mu l$ $c=3,75 \text{ mM}$; $H_2O=4,5 \mu l$. BSA, Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin); dNTP, Desoxyribonukleosidtriphosphate; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction.

Stoff	V [μl]	C_{End}
DNA	2,0	$\approx 2 \text{ ng}/\mu l$
Primer F	1,0	0,5 μM
Primer R	1,0	0,5 μM
Sensor	1,0	0,2 μM
Anchor	1,0	0,2 μM
10x Puffer	2,0	1x
dNTPs	1,0	125 μM
BSA	3,0	0,3 $\mu g/\mu l$
$MgCl_2$	1,0*	1,25 mM*
Taq-Polymerase	0,5	2,5 U
H_2O	6,5*	
	<u>20,0</u>	

Tab. 5: **Programmablauf der RT-PCR**

RT-PCR, real-time polymerase chain reaction.

Programm-punkt	Zykle n	T [$^{\circ}C$]	t [s]	T-anstieg [$^{\circ}C/s$]	Mess-punkte
Preinkubation	1	95	240	4,4	-
Amplifikation	45	95	5	4,4	-
		60	20	1,5	-
		72	15	4,4	einzel
Schmelzkurve	1	95	2	4,4	-
		40	90	4,4	-
		40 - 95		0,14	fort-laufend
Kühlung	1	40	30	2,2	-

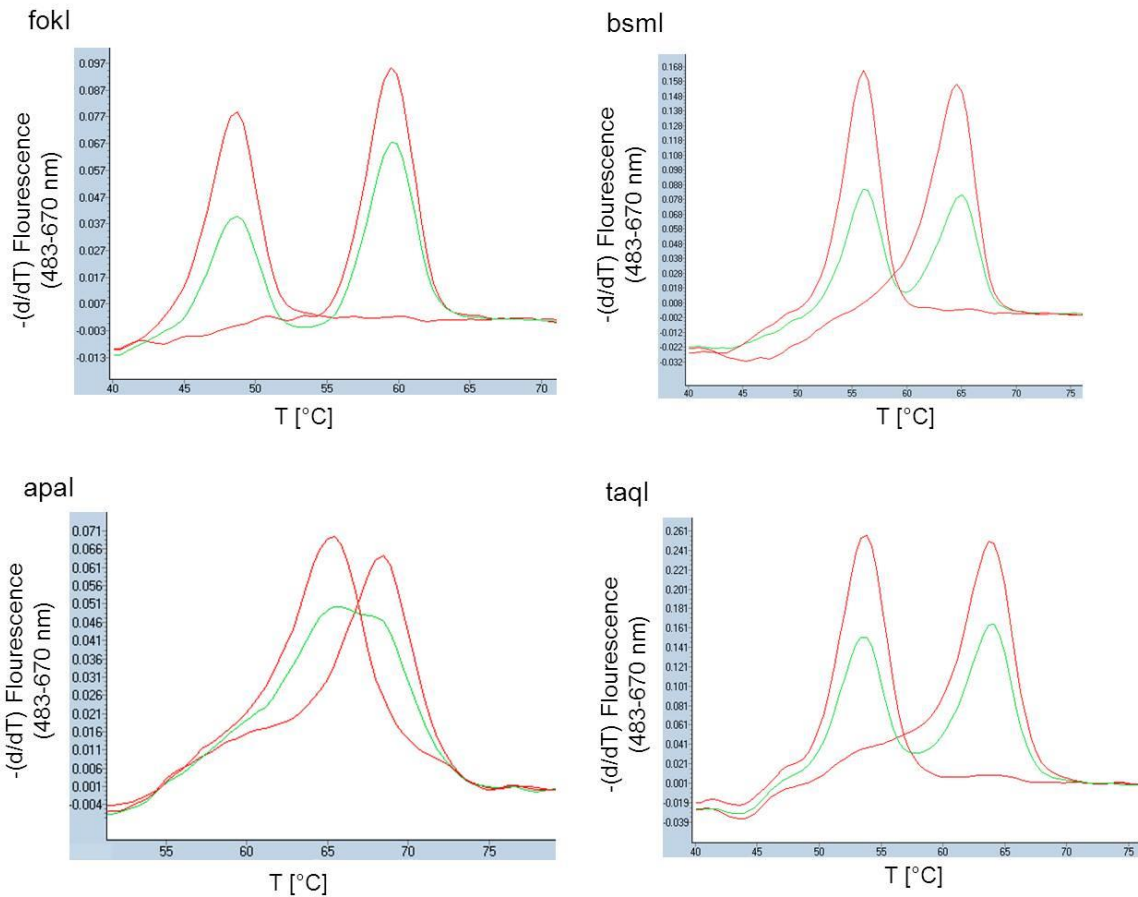


Abb. 10: **Schmelzkurvenanalyse der VDR-SNP Genotypen.**
 Grün: heterozygot mutiert; rot: Wildtyp und homozygot mutiert. SNP, Single nucleotide Polymorphism. [Bilder aus LightCycler®480 Software 1.5.0.39]

Tab. 6: **Temperaturmaxima der Schmelzkurvenanalyse.** [°C]

	<i>fokI</i>	<i>bsmI</i>	<i>apaI</i>	<i>taqI</i>
Wildtyp	59,5	65,5	69,0	54,0
Homozygot mutiert	48,5	56,0	65,0	64,5

RFLP

Zur Verifizierung der neu etablierten Schmelzkurvenanalysen wurden 50 % der Proben in der Fall- und der Kontrollgruppe mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) genotypisiert. Es erfolgte eine Amplifikation der jeweiligen DNA-Sequenzen mittels PCR und anschließender Analyse über RFLP. Die PCR wurde am Light Cycler® 480 (Roche, Holding) durchgeführt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sowie Primersequenzen, die denen der Genotypisierung entsprechen, und Reaktionsbedingungen sind in den Tab. 2 und Tab. 7

aufgelistet. Die Primer für *fokI* und *apaI/taqI* wurden von TIB Molbiol (Berlin) entworfen und wurden von TIB Molbiol (Berlin) sowie BioTeZ (Berlin) bezogen.

Tab. 7: **Reaktionsansatz der PCR (RFLP).**
dNTP, Desoxyribonukleosidtriphosphate; PCR, polymerase chain reaction; RFLP, restriction fragment length polymorphism.

Stoff	V [μ l]	Endkonzentration
DNA	2,0	$\approx 2 \text{ ng}/\mu\text{l}$
Primer F	1,0	0,5 μ M
Primer R	1,0	0,5 μ M
10x Puffer	2,0	1x
dNTPs	1,0	125 μ M
MgCl ₂	1,6	2 mM
Taq-Polymerase	0,5	2,5 U
H ₂ O	10,9	
	<u>20,0</u>	

6 μ l der PCR-Produkte wurden in einem Gesamtvolumen von 30 μ l mit 5 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease (siehe Tab. 1) und 3 μ l der von Hersteller empfohlenen 10X-Pufferlösung über Nacht bei 37 °C verdaut und anschließend mit 1/5 Volumen Ladepuffer zur Darstellung auf ein 2 % Agarosegel in 1x TBE-Puffer, das GelRedTM (Nuclein Acid Gel Stain, Biotium®, Hayward, USA; 1x) nach Empfehlung des Herstellers enthielt, aufgetragen. Laufpuffer war ebenfalls 1x TBE. Die Proben wurden bei 100 Volt elektrophoretisch aufgetrennt und deren Größe im Vergleich zur O'Gene-RulerTM-Mix-DNA-Leiter (Fermantas, St. Leon-Rot) bestimmt. Die DNA-Banden wurden mittels Transluminator G:Box und zugehöriger Software GeneSnap 7.02 (Syngene - Synoptics Group, Cambridge, UK) fotografiert und gespeichert. Schnittstellen der Endonukleasen sind schematisch in Abb. 12 dargestellt. Die erwarteten Produktlängen sind Tab. 8 zu entnehmen. Bei der Gelelektrophorese wurden auf jedem Gel Negativkontrollen ohne PCR-Produkt und DNA-Längenstandards mitgeführt und Versuche nur bei Übereinstimmung mit den erwarteten Produktlängen ausgewertet. Repräsentative Beispielbilder sind in Abb. 11 zu sehen.

Die Ergebnisse der Genotypisierung mittels Schmelzkurvenanalyse stimmten vollständig mit denen aus der RFLP überein. Insgesamt war die Genotypisierung in 97,7 % der Fälle erfolgreich. Zur Vermeidung von Auslesefehlern wurden die Versuche jeweils zweimal ausgewertet und getrennt in Datentabellen eingetragen. Abweichungen traten bei weniger als 0,5 % auf und wurden nach nochmaligem Auslesen geändert.

Tab. 8: **Restriktionsenzyme und RFLP-Produktlänge.**

bp, Basenpaare; Het, Heterozygot mutiert; Hom, Homozygot mutiert; RFLP, restriction fragment length polymorphism; SNP, Single nucleotide Polymorphism; Wt, Wildtyp.

SNP	Restriktions- endonuklease	Produktlänge [bp]		
		Wt	Het	Hom
<i>fokI</i>	<i>fokI</i>	176 (CC),	176, 126, 50 (CT)	126, 50 (TT)
<i>bsml</i>	<i>mva1269I</i>	145 (GG)	145, 87, 58 (GA)	87, 58 (AA)
<i>apal</i>	<i>apal</i>	278 (AA)	278, 192, 86 (AC)	192, 86 (CC)
<i>taqI</i>	<i>taqI</i>	278 (TT)	278, 166, 112 (TC)	166, 112 (CC)

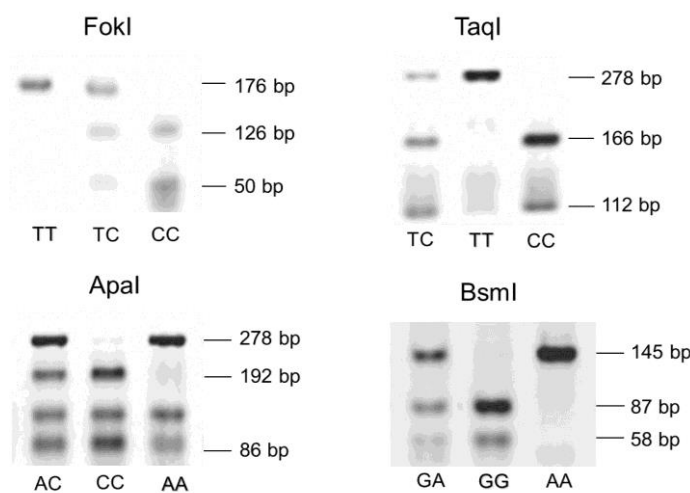


Abb. 11: **Beispielbilder der Gelelektrophorese.**
Bp, Basenpaare.

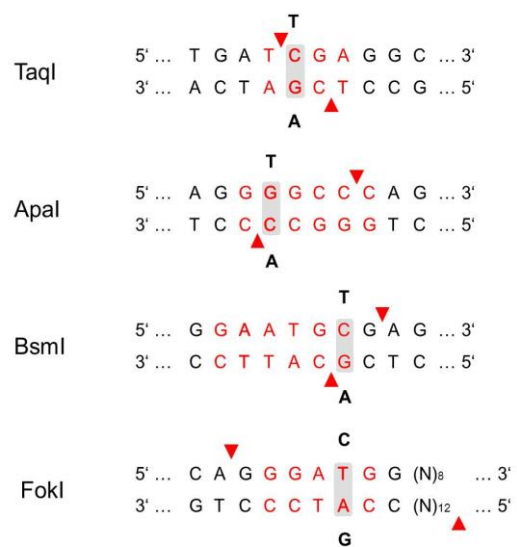


Abb. 12: **Restriktionsstellen der Restriktionsendonukleasen.**
rot: Erkennungssequenz; grau unterlegt: Basenwechsel;
▲, Schnittstelle der Endonuklease.

3.2.3. Haplotypenanalyse⁶

Als Haplotyp wird eine Sequenz von Nucleinsäuren beziehungsweise eine Kombination von Allelen auf einem einzelnen Chromosom bezeichnet. Die Abhängigkeit des gleichzeitigen Auftretens verschiedener Loci wird durch das Kopplungsungleichgewicht, auch linkage disequilibrium, beschrieben. Diese Kopplung ist umso stärker, je dichter die verschiedenen Loci auf dem Chromosom lokalisiert sind. Dies zeigt sich in der beschränkten Anzahl von Kombinationen beziehungsweise im häufigen Vorkommen einer

⁶ Quelle für Abschnitt, soweit nicht anders vermerkt: **116.** Consortium TIH. The International HapMap Project. *Nature*. Dec 18 2003;426(6968):789-796.

Allelkombination, eines Haplotyps. Bereiche mit starkem Kopplungsungleichgewicht sind durchschnittlich 10.000 bis 20.000 Basenpaare lang. In stark gekoppelten Bereichen kann durch die Bestimmung einzelner Polymorphismen auf andere beziehungsweise auf den Haplotyp geschlossen werden. Haplotypen sind in zahlreichen Genregionen zu finden, eine Haplotypenkarte des menschlichen Genoms wird im HapMap-Projekt gesammelt¹¹⁶. In dieser Arbeit wurden die normalisierten Kopplungsungleichgewichtskoeffizienten (D') mit Haploview 4.2 (<http://www.broadinstituts.org/haploview/haploview>; Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ) ermittelt.

Um die Haplotypen und deren Häufigkeit zu bestimmen, kommen neben experimentellen vor allem bioinformatische Methoden, wie die Maximum-likelihood-Methode, infrage. Diese Methode ermittelt über den Expectation-Maximization-Algorithmus (kurz EM-Algorithmus) aus zufälligen Haplotypenverteilungen die mit der höchsten Wahrscheinlichkeit. Dies wurde in der hier vorliegenden Arbeit für die vier betrachteten SNPs in Haploview 4.2 mit einem modifizierten EM-Algorithmus durchgeführt. Hierbei ist zu beachten, dass lediglich Haplotypen mit einer Häufigkeit von über 1 % berücksichtigt wurden. Seltener Haplotypen sind aufgrund des Verfahrens der Analyse, die einen Näherungswert und keine absoluten Häufigkeiten bestimmt, von geringer praktischer Relevanz.

3.2.4. Funktionelle Analysen

Der Ablauf der funktionellen Versuche ist in Abb. 13 schematisch dargestellt.

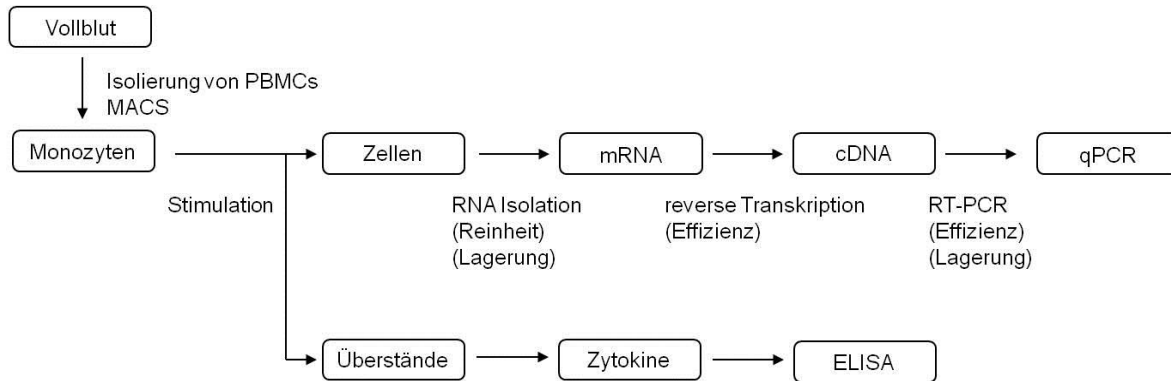


Abb. 13: **Versuchsablauf.**

(Einflussfaktoren). cDNA, complementary DNA; ELISA, Enzyme linked immunosorbent assay; MACS, magnetic-absorbent-cell-sorting-system; PBMC, Peripheral blood mononuclear cells; RNA, ribonucleic acid; RT-PCR, Real-Time PCR.

Es wurden jeweils vier Probanden mit homozygoten *bsmI-apaI-taqI* AAC- und GCT-Haplotypen aus der Kontrollgruppe ausgewählt. Die Probanden beider Gruppen hatten je paarweise ein ähnliches Alter und das gleiche Geschlecht. Es wurden anamnestisch eine aktuelle VD-Substitution oder ein symptomatischer Infekt ausgeschlossen. Den Probanden wurde mittels atraumatischer Punktion einer peripheren Vene 20 ml Vollblut in Heparinröhrchen entnommen, das schnellstmöglich nach Entnahme weiterverarbeitet wurde. Präparation und Stimulation wurden für alle Probanden zeitgleich binnen zwei Stunden durchgeführt.

Aus dem Vollblut wurden PBMC mittels der Dichtegradientenzentrifugation isoliert, indem 15 ml LSM 1077 Lymphocyte (PAA Laboratories, Cölbe) mit 1:1 mit PBS verdünntem Vollblut überschichtet und anschließend 20 min bei 1200 g ohne Bremse zentrifugiert wurde. Die dem Trennmedium aufliegenden PBMC wurden mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und in 20 ml PBS überführt. Es folgten Waschschriffe mit Zentrifugation bei 300 g für 10 min, Verwerfen des Überstandes, Resuspendieren des Zellpeletts in 20 ml PBS und eine weitere Zentrifugation bei 100 g für 15 min, Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren des Zellpaletts.

Im nächsten Arbeitsschritt wurden Monozyten, die sich durch den Oberflächenmarker CD14 auszeichnen, aus PBMC mittels magnetischer Zellseparation (MACS, magnetic-absorbent-cell-sorting-system) mit MACS CD14 MicroBeads (Miltenyi, Bergisch Gladbach) nach Anweisungen des Herstellers positiv selektiert. Die Reinheit der Monozyten gegenüber

T- und B-Lymphozyten wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS, fluorescence-activated cell sorting) an einem FACScalibur-Zytometer (BD, Heidelberg) mit FITC-gelabeltem CD14-, PE-gelabeltem CD3- und Cy5-gelabeltem CD20-Antikörpern (BD Pharming™, nach Empfehlung des Herstellers) bestimmt und mithilfe von FCS express V3 software (DeNovo, CA, USA) analysiert. Die Zellzahl lag bei allen Spendern zwischen $2,5 \times 10^6$ und 1×10^7 . Es wurden jeweils 10^6 Zellen mit 100 nmol/l Calcitriol (1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, Fluka, Dreieich) in Flachbodenplatten in 1,5 ml RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS (fetales Kälberserum), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ μ l Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin für 24 h bei 37 °C, angefeuchteter Luft und 5 %-CO₂-Atmosphäre stimuliert.

Alle Arbeitsschritte, ausgenommen die Blutentnahmen, wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach der Stimulation wurden die Überstände bei 300 g für 15 min abzentrifugiert und bei -80 °C gelagert und die Zellen in 350 μ l Buffer RA1 mit 3,5 μ l β -Mercapto-Ethanol (NucleoSpin RNA II; Macherey and Nagel, Düren) lysiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

Quantitative Echtzeit-PCR

Für die Genexpressionsanalyse mittels quantitativer RT-PCR wurde die RNA aus den 10^6 Zellen mit NucleoSpin RNA II (Macherey and Nagel, Düren) nach Anweisungen des Herstellers extrahiert und in 40 μ l RNase freiem Wasser eluiert. Bei jedem Versuch wurde eine Kontrolle ohne reverse Transkriptase mitgeführt. Jede RNA-Probe wurde mit Nanodrop 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) photometrisch quantifiziert. Die reverse Transkription von RNA in cDNA wurde mit dem High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) wie publiziert in Chang et al. ¹¹⁷ durchgeführt.

Die quantitative RT-PCR für VDR, CYP24A1, CYP27B1 und LL37 wurden am LightCycler® 480 (Roche, Holding) durchgeführt. Diese Auswertung erfolgte durch LightCycler®480 Software (1.5.0.39; Roche Applied Science, Mannheim) mittels der $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit dem Referenzgen HPRT und der Second-Derivative-Maximum-Methode. Die durch eine Standardkurve zu jedem Gen aus fünf seriellen 1:4-Verdünnungen bestimmte Effizienz (siehe Tab. 11) wurde hier eingerechnet. Die Versuche wurden für Ziel- und Referenzgene in Duplikaten durchgeführt. Die verwendeten Primer und der Programmablauf sind in den Tab. 9 und Tab. 10 aufgelistet. Der Reaktionsansatz setzte sich gemäß den Empfehlungen des Herstellers bei einem Reaktionsvolumen von 20 μ l aus je 0,5 μ M Primer

und 10 µl Fast SYBR® Green Master Mix (Roche Applied Science, Mannheim) zusammen. Ziel- und Referenzgen wurden stets im gleichen Versuch mit gleichem Mastermix gemessen. Bei jedem Versuch wurden Negativkontrollen ohne DNA-Template mitgeführt. Alle Werte ergeben sich aus Mittelwerten von je drei unabhängigen Versuchen.

Tab. 9: **Primersequenzen für quantitative RT-PCR.**

F, forward; R, reverse; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction; VDR, Vitamin-D-Rezeptor.

Target		Primersequenzen (5' – 3')
VDR	F	ACTTGCATGAGGAGGAGCAT
	R	AGGTCGGCTAGCTTCTGGAT
CYP24A1	F	CGGGTGTACCATTTACAACCTCGG
	R	CTCAACAGGCTCATTGTCTGTGG
CYP27B1	F	ATACGCTGGTCACTCTGTGTCA
	R	TGTTAGGATCTGGGCCAAAG
LL37	F	AGGATTGTGACTTCAAGAAG
	R	ATTTCTCAGAGCCCAGAAGC
HPRT	F	ATCAGACTGAAGAGCTATTGTAATGACCA
	R	TGGCTTATATCCAACACTTCGTG

Tab. 10: **Programmablauf der quantitativen RT-PCR**

RT-PCR, real-time polymerase chain reaction.

Programmpunkt	Zyklen	T [°C]	t [s]	T Anstieg [°C/s]	Messpunkte
Preinkubation	1	95	240	4,4	-
Amplifikation	35	95	12	4,4	-
		65	12	1,5	-
		72	15	4,4	einzel
Schmelzkurve	1	95	2	4,4	-
		40	90	4,4	-
		40 - 95		0,14	fortlaufend
Kühlung	1	40	30	2,2	-

Tab. 11: **Effizienz der quantitativen RT-PCR**
 RT-PCR, real-time polymerase chain reaction;
 VDR, Vitamin-D-Rezeptor.

Gen	Effizienz
VDR	1,84
CYP24A1	1,88
CYP27B1	1,97
LL37	2
HPRT	2

TNF α - und IL6-ELISA

Die Konzentrationen der Zytokine TNF α und IL6 wurden aus den Überständen mittels Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) bestimmt. Antikörper und Standards wurden von BD Biosciences PharmingTM (Heidelberg) bezogen. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Proben und Standards wurden in Duplikaten eingesetzt, wobei die Proben in zwei Verdünnungen im Verhältnis 1:5 gemessen wurden. Dabei wurden die Proben nach einem Vorversuch im Bereich 1:1 bis 1:125 so verdünnt, dass sie im Bereich der Standards lagen. Die acht Standards wurden in sieben 1:2-Verdünnungen von 2.000 pg/ml bis 31,25 pg/ml mit 0,1 M NaHCO₃ Pufferlösung (pH=8,2) hergestellt.

Es wurden Microlon 96k ELISA-Platten (Greiner Bio-one, Frickenhausen) in einem Volumen von 50 μl je Loch mit Anti-human-TNF α - beziehungsweise Anti-human-IL6-Antikörper 1:250 verdünnt in 0,1 M NaHCO₃ Pufferlösung (pH=8,2) über Nacht beschichtet. Im Anschluss wurde dreimal mit 100 μl je Loch Waschpuffer, bestehend aus 1x PBS und 0,05 % Tween, gewaschen. Zur Blockierung wurde anschließend mit 100 μl je Loch Blockierungspuffer, der sich aus 1x PBS, 2,5 % FCS und 0,05 % Tween zusammensetzt, 1 h inkubiert. Es folgten drei Waschschrte, wie oben beschrieben, und das Auftragen der Standardreihe sowie der Proben je in Duplikaten mit nachfolgender Inkubation über 2 h. Nach drei Waschschrten wurde je Loch 50 μl von 1:500 in 0,1 M NaHCO₃ Pufferlösung (pH=8,2) verdünntem biotinylierten Anti-human-TNF α -Antikörper beziehungsweise biotinylierten Anti-human-IL6-Antikörper aufgetragen und 1 h inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte und eine Inkubation mit 50 μl je Loch Streptavidin-Peroxidase, die zuvor 1:1000 in 0,1 M NaHCO₃ Pufferlösung (pH=8,2) verdünnt wurde. Nach weiteren vier Waschschrten erfolgte die Farbreaktion durch Zugabe von 50 μl TMB-Substrat je Loch und lichtgeschützte Inkubation für 5 bis 10 min. Schließlich wurde mit 1 M H₂SO₄ in einem

Volumen von 50 µl je Loch die Reaktion abgestoppt. Die Auswertung erfolgte durch die Messung der optischen Dichte bei 450 nm am SPECTRAFLOUR Plus (Tecan, Männedorf) mithilfe der Software Magellan 3 (Tecan, Männedorf). Die gemessenen optischen Dichten wurden über die Standards quantifiziert.

3.2.5. Statistische Analyse

Die klinischen Daten sowie die Ergebnisse der Genotypisierung wurden in Excel (Microsoft®Office) verwaltet und ausgewertet. Tests auf Varianzheterogenität, Normalverteilung sowie Adjustierung der Chi²-Tests nach Alters- und Geschlechtsverteilung mittels multinominaler logistischer Regression wurde in SPSS durchgeführt. Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurden durch einen Chi²-Test zwischen tatsächlichen und nach Allelfrequenzen erwarteten Genotypfrequenzen berechnet, wofür – wie auch für die Berechnung der Quotenverhältnisse (Odds Ratio, OR) mit 95% Konfidenzintervall (CI) – Excel (MS®Office) verwendet wurde.

Der Pearson's-Chi²-Test zum Vergleich der Allelfrequenzen zwischen den Gruppen wurden in SISA quantitative skills (<http://www.quantitativeskills.com> 08/12) durchgeführt. Nach Bonferroni-Korrektur wurden bei einem Signifikanzniveau von 0,05 aufgrund der vier betrachteten SNPs p-Werte unter 0,0125 als signifikant betrachtet.

Die Auswertung der ELISAs wurde in Excel (MS®Office) durchgeführt, wobei die Konzentrationen aus den gemessenen optischen Dichten über aus den Standards bestimmte bei IL6 potenzielle und bei TNFα polynomische Regressionsgeraden berechnet wurden. Die quantitative RT-PCR wurde ebenfalls in Excel (MS®Office) ausgewertet. Die Mann-Whitney-U-Tests wurden in SPSS durchgeführt. Für die grafische Darstellung der Ergebnisse wurde Graphpad Prism 5.01 verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Klinische Daten

In die Studie wurden 265 Patienten, die an AD erkrankt sind, und 265 gesunde Personen als Kontrollgruppe eingeschlossen. Die genauen Charakteristika der Studiengruppen sind Tab. 12 zu entnehmen.

Tab. 12: **Klinische Daten der Studienpopulationen.**

AD, Atopische Dermatitis; IR, Interquartilbereich; MW, Mittelwert; SD, Standardabweichung; SCORAD, SCORAD Atopic Dermatitis.

	AD	Kontrollgruppe
N	265	265
Geschlecht (%)		
Männlich	115 (43,4)	115 (43,4)
Weiblich	150 (56,6)	150 (56,6)
Alter in Jahren		
Median (IR)	34 (24-45)	31 (23-47)
SCORAD		
MW (\pm SD)	46,1 (\pm 18,5)	-
AD Krankheitsstadium	mild / moderat SCORAD \leq 40	schwer SCORAD $>$ 40
n (%)	123 (46,4)	142 (53,6)
SCORAD MW (\pm SD)	27,6 (\pm 8,0)	58,2 (\pm 11,4)
Geschlecht (%)		
männlich	43 (35,0)	72 (50,7)
weiblich	80 (65,0)	70 (49,3)
Alter in Jahren		
Median (IR)	30 (24-41)	38 (26-51)

Die Geschlechtsverteilung in beiden Gruppen ist gleich. Die Altersverteilung in Fall- und Kontrollgruppe ist nach Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,48$), so dass von einer ähnlichen Altersverteilung über beide Gruppen ausgegangen werden kann. Die SCORAD-Werte der Fallgruppe sind nicht normalverteilt (Kolmogorov-Smirnov-Test $p=0,01$).

Durch die Einteilung der Fallgruppe in milde und moderate sowie schwere Verläufe nach SCORAD kleiner oder gleich 40 beziehungsweise größer 40 ergeben sich zwei Gruppen mit jeweils 123 und 142 Personen. Die SCORAD-Werte beider Untergruppen unterscheiden sich mit über 20 Punkten signifikant voneinander (Mann-Whitney-U-Test $p=0,001$).

Die Geschlechterverteilung zeigt in der Gruppe mit milden und moderaten Verläufen eine Überzahl an weiblichen Patienten, wohingegen in der Gruppe mit schweren Verläufen beide Geschlechter nahezu gleich oft vertreten sind. Dieser Unterschied zwischen den Gruppen ist nach χ^2 -Test signifikant ($p=0,01$). Die beiden Untergruppen haben eine unterschiedliche Altersverteilung, wobei die Gruppe mit schweren Verläufen nach Mann-Whitney-U-Test mit einem p -Wert von 0,007 signifikant älter ist.

4.2. Genotypisierung

Die jeweils 265 Probanden der Fall- und Kontrollgruppe wurden für die *VDR*-SNPs *taqI*, *apaI*, *bsmI* und *fokI* genotypisiert. Die Genotypverteilungen aller vier untersuchten *VDR*-SNPs liegen sowohl in der Kontrollgruppe ($p \geq 0,13$) als auch in der Fallgruppe ($p \geq 0,71$) im Hardy-Weinberg-Equilibrium.

Vergleich der Fallgruppe und der Patienten mit schweren Verläufen mit der Kontrollgruppe

Die Genotypverteilungen und Allelfrequenzen der Patientengruppe sowie der Teilgruppe mit schweren Verläufen sind jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe bezüglich der vier betrachteten SNPs *taqI*, *apaI*, *bsmI* und *fokI* in Tab. 13 dargestellt. Die Kontrollgruppe und die Teilgruppe der AD-Patienten mit schweren Verläufen unterscheiden sich hinsichtlich der Alter- und Geschlechterverteilung, so dass in den Vergleichen OR und p -Werte des 2×2 - χ^2 -Tests nach diesen Parametern adjustiert wurden.

Tab. 1313: **Allel- und Genotyphäufigkeiten in der Kontrollgruppe verglichen mit der AD-Kohorte der AD-Teilgruppe mit schweren Verläufen.**

Untersucht für die vier *VDR*-SNPs *taql*, *apal*, *bsml* und *fokl*. Nach Bonferroni-Korrektur werden p-Werte kleiner als 0,0125 als signifikant gewertet.

* 3x2-Chi²-Test für Genotypfrequenzen, ** 2x2-Chi²-Test für Allelfrequenzen; # Unterschiede in der Anzahl ergaben sich aus nicht auswertbaren Genotypisierungen; ^a, Referenz.

AD, atopische Dermatitis; CI, Konfidenzintervall; Het, Heterozygot mutiert; Hom, Homozygot mutiert; OR, Odds Ratio; SNP, Single nucleotide Polymorphism; Wt, Wildtyp; VDR, Vitamin-D-Rezeptor.

	N [#]	Wt (%)	Het (%)	Hom (%)	p-Wert*	Major allele (%)	Minor allele (%)	OR (95 % CI)	p-Wert**
<i>taql</i>									
						T	C		
Kontrolle	259	92 (35,5)	117 (45,2)	50 (19,3)		301 (58,1)	217 (41,9)	1 ^a	
AD	265	112 (42,3)	121 (45,7)	32 (12,1)	0,05	345 (65,1)	185 (35,9)	0,74 (0,58-0,96)	0,02
schwere AD	142	62 (43,2)	68 (48,7)	12 (8,1)	0,009	192 (67,6)	92 (32,4)	0,67 (0,49-0,90)	0,007
<i>apal</i>									
						A	C		
Kontrolle	261	87 (33,3)	115 (44,1)	59 (22,6)		289 (55,4)	233 (44,6)	1 ^a	
AD	264	66 (24,9)	134 (50,6)	65 (24,5)	0,10	266 (50,2)	264 (49,8)	1,23 (0,97-1,57)	0,09
schwere AD	142	29 (20,4)	72 (50,7)	41 (28,9)	0,011	130 (45,8)	154 (54,2)	1,57 (1,10-1,96)	0,006
<i>bsml</i>									
						G	A		
Kontrolle	264	95 (36,0)	113 (42,8)	56 (21,2)		303 (57,4)	225 (42,6)	1 ^a	
AD	265	108 (40,9)	121 (45,8)	35 (13,3)	0,05	337 (63,8)	191 (36,2)	0,76 (0,60-0,98)	0,03
schwere AD	142	62 (43,7)	65 (45,8)	15 (10,6)	0,015	189 (66,5)	95 (33,5)	0,68 (0,50-0,91)	0,009
<i>fokl</i>									
						C	T		
Kontrolle	263	92 (35,0)	132 (50,2)	39 (14,8)		316 (60,1)	210 (39,9)	1 ^a	
AD	265	89 (33,6)	124 (46,8)	52 (19,6)	0,34	302 (57,0)	228 (43,0)	1,14 (0,89-1,45)	0,31
schwere AD	142	48 (33,8)	64 (45,1)	30 (21,1)	0,26	160 (56,3)	124 (43,7)	1,17 (0,87-1,56)	0,35

Der Vergleich der Allelfrequenzen ergibt zwischen AD- und Kontrollgruppe für keinen der vier betrachteten SNPs signifikante Unterschiede ($p \geq 0,02$). Bei den Gegenüberstellungen der Allelfrequenzen lassen sich bei *taql* C-Allel ($p = 0,02$) und *bsml* A-Allel ($p = 0,03$) jeweils Tendenzen zum häufigeren Auftreten in der Kontrollgruppe ausmachen, die aber bei einem Signifikanzniveau von 0,0125 nach Bonferroni-Korrektur nicht signifikant verschieden sind. Das *apal* A-Allel tritt ebenfalls häufiger in der

Kontrollgruppe auf, wobei dieser Unterschied mit einem p-Wert von 0,09 weniger deutlich ausgeprägt ist. Ähnliche Tendenzen für diese Allele zeigen sich auch im Vergleich innerhalb der Fallgruppe zwischen Patienten mit schwerem und mit mildem oder moderatem Verlauf (Daten nicht gezeigt). Die Allelverteilung des *fokI* SNPs unterscheidet sich nicht signifikant in den genannten Vergleichen.

Im Vergleich der Gruppe der AD-Patienten mit schweren Verläufen mit der Kontrollgruppe zeigen sich signifikante Unterschiede in den Verteilungen der Allele: das *taqI* C-Allel tritt mit einem p-Wert von 0,007, das *apaI* A-Allel mit 0,006 und das *bsmI* A-Allel mit 0,009 signifikant häufiger bei Kontrollen auf. Für *fokI* ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in der Allelverteilung bei beiden Vergleichen.

Die Häufigkeiten, mit der die drei möglichen Genotypen Wildtyp, heterozygot und homozygot mutiert auftreten, wurde mit einem 2x3-Chi²-Test verglichen (siehe Tab. 13). Weiterhin wurden jeweils die Frequenz der Wildtyp- und heterozygot mutierten mit homozygot mutierten Genotypen (dominantes Modell) und der Wildtypgenotypen mit heterozygot und homozygot mutierten Genotypen (rezessives Modell) mittels 2x2-Chi²-Test auf signifikante Unterschiede getestet. Die p-Werte sowie OR und 95% CI sind in Tab. 14 aufgelistet.

Tab. 14: Häufigkeiten von homozygoten Mutationen und Wildtypen in der Kontrollgruppe verglichen mit der AD-Kohorte und der AD-Teilgruppe mit schweren Verläufen.

Untersucht für die vier VDR-SNPs *taql*, *apal*, *bsml* und *fokl*. Es wurden jeweils Wt mit Het (rezessives Modell) und Het mit Hom (dominantes Modell) kombiniert. Nach Bonferroni-Korrektur werden nur p-Werte kleiner als 0,0125 als signifikant gewertet. * 2x2 Chi² Test; # Unterschiede in der Anzahl ergaben sich aus nicht auswertbaren Genotypisierungen; ^a, Referenz. AD, Atopische Dermatitis; CI, Konfidenzintervall; Het, Heterozygot mutiert; Hom, Homozygot mutiert; OR, Odds Ratio; SNP, Single nucleotide Polymorphism; Wt, Wildtyp.

	N [#]	Wt (%)	Het (%)	Hom (%)
<i>taql</i>		TT	TC	CC
Kontrolle	259	92 (35,5)	117 (45,2)	50 (19,3)
AD	265	112 (42,3)	121 (45,7)	32 (12,1)
p-Wert* OR (95%CI)	rezessiv	p = 0,02 1,74 (1,08-2,81)		1 ^a
	dominant	1 ^a	p = 0,13 0,76 (0,54-1,09)	
schwere AD	142	62 (43,7)	68 (48,7)	12 (8,1)
p-Wert* OR (95%CI)	rezessiv	p = 0,006 2,59 (1,32-5,08)		1 ^a
	dominant	1 ^a	p = 0,07 0,68 (0,44-1,04)	
<i>apal</i>		AA	AC	CC
Kontrolle	261	87 (33,3)	115 (44,1)	59 (22,6)
AD	264	66 (24,9)	134 (50,6)	65 (24,5)
p-Wert* OR (95%CI)	rezessiv	p = 0,68 0,92 (0,61-1,37)		1 ^a
	dominant	1 ^a	p = 0,03 1,51 (1,03-2,20)	
schwere AD	142	29 (20,4)	72 (50,7)	41 (28,9)
p-Wert* OR (95%CI)	rezessiv	p = 0,11 0,68 (0,43-1,09)		1 ^a
	dominant	1 ^a	p = 0,010 1,90 (1,17-3,08)	

	N [#]	Wt (%)	Het (%)	Hom (%)
<i>bsml</i>		GG	GA	AA
Kontrolle	264	95 (36,0)	113 (42,8)	56 (21,2)
AD	265	108 (40,9)	121 (45,8)	35 (13,3)
p-Wert* OR (95%CI)	rezessiv	p = 0,016 1,76 (1,11-2,79)		1 ^a
	dominant	1 ^a	p = 0,28 0,82 (0,58-1,17)	
schwere AD	142	62 (43,7)	65 (45,8)	15 (10,6)
p-Wert* OR (95%CI)	rezessiv	p = 0,010 2,24 (1,21-4,15)		1 ^a
	dominant	1 ^a	p = 0,08 0,69 (0,45-1,05)	
<i>fokl</i>		CC	CT	TT
Kontrolle	263	92 (35,0)	132 (50,2)	39 (14,8)
AD	265	89 (33,6)	124 (46,8)	52 (19,6)
p-Wert* OR (95%CI)	rezessiv	p = 0,14 0,71 (0,45-1,12)		1 ^a
	dominant	1 ^a	p = 0,67 1,08 (0,76-1,55)	
schwere AD	142	48 (33,8)	64 (45,1)	30 (21,1)
p-Wert* OR (95%CI)	rezessiv	p = 0,14 0,67 (0,39-1,14)		1 ^a
	dominant	1 ^a	p = 0,97 0,99 (0,64-1,53)	

Für den *taql* SNPs sind in der Kontrollgruppe analog zur Häufigkeit des C-Allels signifikant mehr homozygot mutierte Probanden als bei AD-Patienten mit schweren Verläufen zu finden (p=0,006). Auch der 3x2-Chi²-Test der drei Genotypen in diesen Gruppen ergibt ein häufigeres Vorkommen von homozygoten Mutationen in der Kontrollgruppe mit einem deutlich unter dem Signifikanzniveau liegenden p-Wert von 0,009 (siehe Tab. 13). Bei *apal* tritt der Wildtyp signifikant häufiger in der Kontrollgruppe

verglichen mit der Patientengruppe mit schweren Verläufen auf ($p=0,01$). Dieser Unterschied zeigt sich auch im 2×3 -Chi²-Test signifikant ($p= 0,011$) mit deutlich mehr Wildtypen in der Kontrollgruppe. In ähnlicher Weise sind bei *bsml* ebenfalls im Vergleich zur Fallgruppe mit schweren Verläufen in der Kontrollgruppe signifikant mehr Probanden mit homozygot mutiertem Genotyp ($p= 0,010$). Hier ergibt der 3×2 -Chi²-Test für die Genotypverteilung in diesen Gruppen nur einen p-Wert von 0,015, wobei homozygote Mutationen auch hier in der Kontrollgruppe deutlich häufiger vorkommen. Für *fokl* ergeben sich weder signifikante Unterschiede in der Genotypverteilung zwischen Kontrollgruppe und gesamter Fallgruppe, noch zwischen Kontrollgruppe und der Subgruppe der AD-Patienten mit schweren Verläufen.

Die Gegenüberstellung der Patientengruppe mit milden und moderaten Verläufen gegen die Kontrollgruppe ergibt keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

4.3. Haplotypenanalyse

4.3.1. Kopplungsanalyse

Die Kopplungsanalyse der vier SNPs *taql*, *apal*, *bsml* und *fokl* ergibt eine starke Kopplung zwischen *bsml* und *taql* ($D'=98$) sowie *bsml* und *apal* und zwischen *apal* und *taql* (jeweils $D'=99$), wie Abb. 14 entnommen, werden kann. Die Kopplungsanalyse zeigt sowohl für alle genotypisierten Probanden zusammen genommen, als auch für die Kontroll- und Fallgruppe sowie die Patientenuntergruppen mit milden oder moderaten beziehungsweise schweren Verläufen einzeln ähnliche D' -Werte (Daten nicht gezeigt).

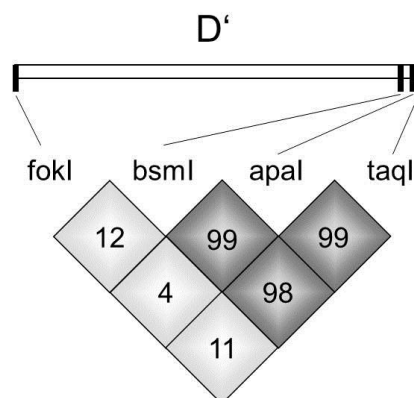


Abb. 14: D' der VDR-SNPs *fokl*, *bsml*, *apal* und *taql*. $n=530$. Modifiziert nach Datenanalyse in Haploview. D' , standardisiertes Kopplungsungleichgewicht. SNP, Single nucleotide Polymorphism; VDR, Vitamin-D-Rezeptor.

Für den *fokI* SNP ergeben sich geringe D'-Werte, so dass dieser SNP mit den anderen drei betrachteten SNPs nur schwach gekoppelt ist. Aufgrund der starken Kopplung zwischen *bsml*, *apal* und *taqI* wurden neben den Haplotypen für die vier genotypisierten SNPs auch separat die Haplotypen dieser drei Polymorphismen bestimmt.

4.3.2. Vergleich der Haplotypenhäufigkeiten der Fallgruppe und der Patienten mit schweren Verläufen mit der Kontrollgruppe

Die Haplotypenanalyse wurde in den oben beschriebenen Gruppen von je 265 AD-Patienten und gesunden Probanden durchgeführt. Die prozentualen Häufigkeiten der Haplotypen sind in Tab. 15 aufgelistet.

Tab. 15: Haplotypenverteilung in der Kontrollgruppe im Vergleich zur gesamten AD-Kohorte und zur AD-Teilgruppe mit schweren Verläufen.

(A) für die VDR-SNPs *fokI*, *bsml*, *apal* und *taqI* und (B) *bsml*, *apal* und *taqI*. Berechnet durch Haploview. Es werden nur Haplotypen mit einer Häufigkeit > 1% genannt.

* 2x2 Chi²-Test; # Unterschiede in der Anzahl ergaben sich aus nicht-auswertbaren Genotypisierungen, wobei nur Individuen mit mindestens 50 % bekannten Genotypen (mindestens 2 SNPs) eingeschlossen wurden.

AD, atopische Dermatitis; CI, Konfidenzintervall; OR, Odds Ratio; SNP, Single nucleotide Polymorphism.

A

<i>fokI</i>	<i>bsml</i>	<i>apal</i>	<i>taqI</i>	Kontrolle (%) n=264 [#]	AD (%) n=265	p-Wert*	OR (95 % CI)	schwere AD (%) n=148	p-Wert*	OR (95 % CI)
C	G	C	T	25,7	27,9	0,41	0,87 (0,67-1,15)	29,9	0,16	0,80 (0,58-1,09)
C	A	A	C	26,6	21,2	0,040	1,35 (1,02-1,79)	19,9	0,028	1,47 (1,04-2,07)
T	G	C	T	19,0	21,9	0,24	0,83 (0,62-1,13)	24,9	0,06	0,72 (0,51-1,01)
T	A	A	C	14,4	13,3	0,61	1,10 (0,77-1,55)	12,5	0,52	1,15 (0,76-1,76)
T	G	A	T	5,9	7,3	0,35	0,79 (0,49-1,29)	5,5	1,00	1,00 (0,54-1,86)
C	G	A	T	6,7	6,4	0,86	1,04 (0,64-1,70)	6,3	0,71	1,12 (0,63-1,99)
C	A	A	T	1,1	1,3	0,81	0,88 (0,29-2,66)	-	-	-

B

<i>bsml</i>	<i>apal</i>	<i>taqI</i>	Kontrolle (%) n=264 [#]	AD (%) n=265	p-Wert*	OR (95 % CI)	schwere AD (%) n=148	p-Wert*	OR (95 % CI)
G	C	T	44,6	49,8	0,09	0,81 (0,64-1,04)	54,7	0,005	0,66 (0,49-0,88)
A	A	C	41,0	34,5	0,030	1,32 (1,03-1,69)	32,4	0,016	1,44 (1,07-1,94)
G	A	T	12,6	13,8	0,58	0,90 (0,63-1,29)	11,8	0,76	1,07 (0,69-1,65)
A	A	T	1,6	1,5	0,97	1,02 (0,38-2,74)	1,0	0,54	1,52 (0,41-5,71)

Bei der Gegenüberstellung der gesamten AD-Patientengruppe mit den gesunden Kontrollen ergeben sich für den CAAC-Haplotyp (*fokI*, *bsmI*, *apaI*, *taqI*) und dem AAC-Haplotyp (*bsmI*, *apaI*, *taqI*) signifikante Unterschiede (jeweils $p=0,04$ und $p=0,03$). Beide Haplotypen treten häufiger bei den Kontrollen als in der Fallgruppe auf und entsprechen somit den oben gezeigten Ergebnissen der Genotypisierung, in der ebenfalls das *bsmI* A-Allel, das *apaI* A-Allel und das *taqI* C-Allel tendenziell häufiger in der Kontrollgruppe auftreten. Das Einbeziehen des *fokI* SNPs, der in geringer Kopplung zu den anderen SNPs steht, mindert diesen Effekt, wobei die beiden Haplotypen CAAC und TAAC, die den AAC-Haplotyp (*bsmI*, *apaI*, *taqI*) enthalten, häufiger in der Kontrollgruppe vorkommen. Dies bestätigt sich in dem signifikanteren p-Wert bei Ausschluss von *fokI* aus der Haplotypenanalyse.

Der Vergleich der Haplotypenhäufigkeiten bei Patienten mit schweren Verläufen mit der Kontrollgruppe zeigt ähnliche Unterschiede mit signifikanteren p-Werten: CAAC ($p=0,028$) und AAC ($p=0,016$) kommen häufiger in der Kontrollgruppe als in der Gruppe der AD-Patienten mit schweren Verläufen vor. Bei der Analyse der Haplotypen der drei SNPs *bsmI*, *apaI* und *taqI* ist der GCT signifikant häufiger in der Fallgruppe mit schweren Verläufen ($p=0,005$). Dieser Haplotyp ist ebenfalls im Vergleich innerhalb der Fallgruppe zwischen Patienten mit schwerem und mit mildem oder moderatem Krankheitsverlauf signifikant häufiger in der Gruppe mit schweren Verläufen ($p=0,011$; OR 0,64 bei 95 % CI 0,45-0,90; Daten nicht gezeigt).

4.4. In-vitro-Stimulation humaner Monozyten mit AAC- und GCT-Haplotyp

Um zu überprüfen, ob sich die oben beschriebene signifikante Häufung eines VDR-Haplotyps bei schwerer AD direkt funktionell auswirkt, wurde in vitro die Reaktion von primären Monozyten, die den VDR konstitutiv exprimieren, auf die Stimulation mit dem physiologischen aktivierenden Liganden Calcitriol untersucht. Monozyten zählen zu den APZ und differenzieren bei entsprechenden Stimuli in gewebständige Makrophagen und DC aus. Bei AD ist eine veränderte Funktionsweise dieser Zellen bekannt, die sich unter anderem in einer verstärkten Responsivität und einem längeren Überleben äußert¹¹⁸. Insbesondere durch die Möglichkeit einer primären Kultivierung und ihrer Bedeutung für AD sind Monozyten für funktionelle Versuche geeignet. Es wurde auf mRNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR für die Expression der VDR-Zielgene *Cyp27B1*, *Cyp24A1*, *LL37* und des VDR selbst sowie auf

Proteinebene durch ELISA die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL6 bestimmt.

4.4.1. Auswahl der Probanden

Aus der Kontrollgruppe wurden acht Probanden so ausgewählt, dass die Haplotypen GCT und AAC (*bsml*, *apaI*, *taqI*) der drei *VDR*-SNPs *bsml*, *apaI* und *taqI* bei jeweils vier Probanden in Form von Wildtyp- beziehungsweise homozygot mutierten Genotypen auftraten.

4.4.2. Reinheit der Monozyten

Die aus Vollblut aufgereinigten Monozyten wurden mittels Durchflusszytometrie mit Antikörpern gegen die Oberflächenmerkmale CD14, CD3 und CD20 charakterisiert. Die Reinheit der Monozyten betrug nach diesem Messverfahren bei allen Probanden mehr als 98%. Ein repräsentatives Beispiel ist in Abb. 15 dargestellt.

Das Oberflächenprotein CD14 ist Ko-Rezeptor des TLR-4 und wird vor allem auf undifferenzierten Monozyten beziehungsweise ausdifferenzierten Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert und kann folglich als Marker für diese Zellen verwendet werden. CD3 ist ein Oberflächenmerkmal für T-Lymphozyten, es stellt einen Teil des T-Zell-Rezeptors dar. CD20 charakterisiert B-Zellen, so dass mit einer CD3-CD20-Doppelfärbung die T- und B-Zellen im Rest der nicht durch CD14 MicoBeads MACS selektierten PBMCs dargestellt werden (siehe Abb. 15.B).

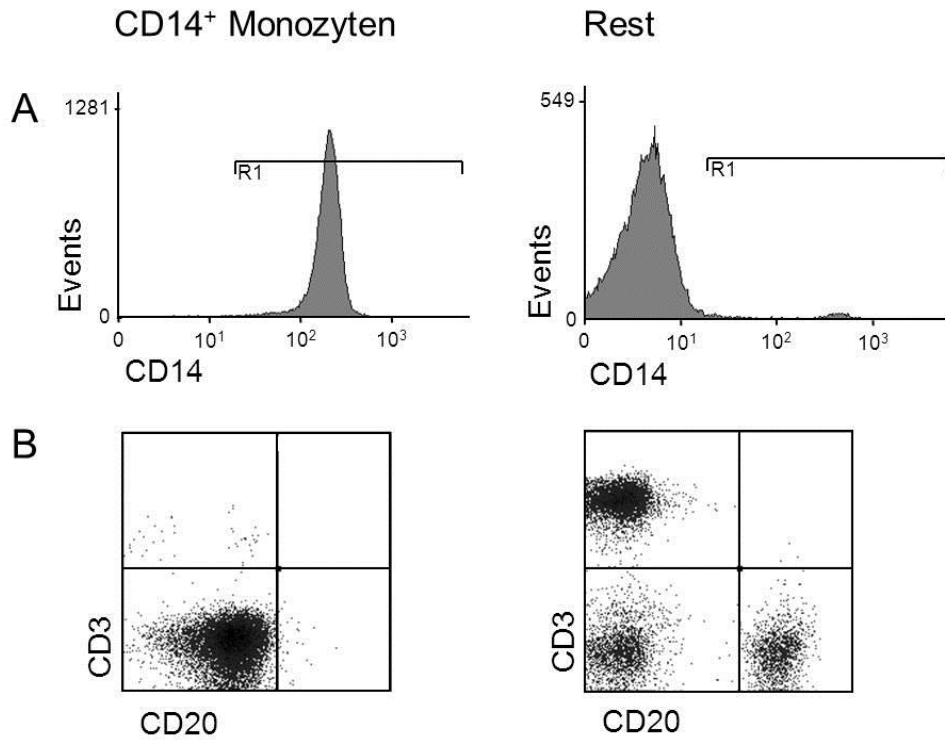


Abb. 15: **Durchflusszytometrie zur Reinheitsbestimmung der CD14-Fraktion**

Nach MACS mit CD14 Microbeads. Rest: PBMCs nach Dichtegradientenzentrifugation, die nicht durch MACS selektiert wurden. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel der 8 Probanden. (A) CD14⁺ Zellen (in R1) >98%. (B) CD3-CD20-Doppelfärbung.

CD, Cluster of differentiation (Oberflächenprotein). MACS, magnetic-absorbent-cell-sorting-system; PBMC, Peripheral blood mononuclear cells.

4.4.3. VDR

Um den Einfluss des Haplotyps auf die Expression des *VDR* zu bestimmen, wurde mittels quantitativer RT-PCR die relative *VDR*-mRNA-Menge mit und ohne 24-stündige Stimulation durch den Calcitriol bestimmt. Der *VDR* wird in Monozyten bei *VDR*-Aktivierung induziert¹¹⁹. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 dargestellt.

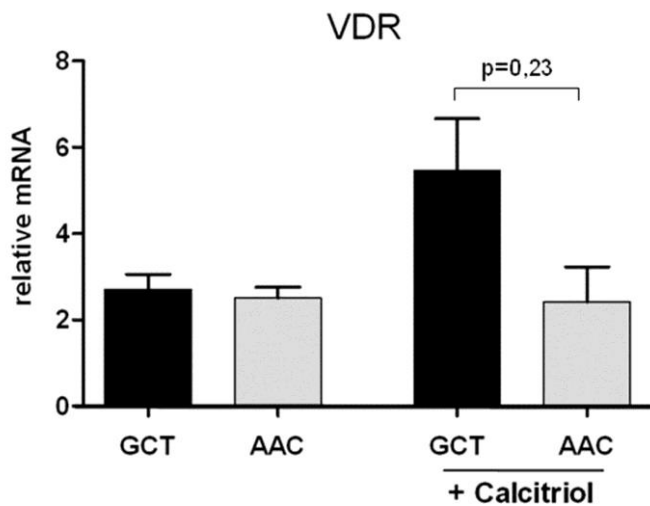


Abb. 16: **Quantifizierung der VDR-mRNA in Monozyten mit unterschiedlichen Haplotypen.** Ohne Stimulation und nach 24 h Stimulation mit 100 nM Calcitriol. Mittelwert und SEM gezeigt; n=4. mRNA, messenger ribonucleic acid; VDR, Vitamin-D-Rezeptor.

Ohne Stimulation ergeben sich ähnliche Werte für Monozyten beider Haplotypen. Nach Calcitriol-Stimulation ist die *VDR*-Hochregulation beim GCT-Haplotype mit einer zweifachen Steigerung tendenziell, aber nicht signifikant höher als beim AAC-Haplotype ($p=0,23$; Fold Change AAC 1,1 und GCT 1,9).

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der *VDR*-Expression bezüglich der Haplotypen mit und ohne *VDR*-Aktivierung, so dass aus diesem Versuch keine eindeutigen Rückschlüsse auf deren funktionelle Konsequenz gezogen werden kann. Der Trend zu verstärkter Expression bei GCT-Haplotypen unter *VDR*-Aktivierung deutet auf eine stärkere Wirksamkeit des Calcitriols bei diesem Haplotypen hin. Aufschluss über mögliche funktionelle Folgen der tendenziell unterschiedlichen *VDR*-Expression kann die Untersuchung von *VDR*-Zielgenen in Gegenwart von Calcitriol liefern.

4.4.4. CYP27B1

Die 1α -Hydroxylase CYP27B1 wird bei *VDR*-Aktivierung vermindert exprimiert⁴³. Die relativen mRNA-Spiegel von CYP27B1 der Zellen mit AAC- und GCT-Haplotype wurden ohne Stimulation und nach 24-stündiger Stimulation mit Calcitriol gemessen. Die mittels

quantitativer RT-PCR bestimmten relativen mRNA-Spiegel für das Enzym CYP27B1 sind in Abb. 17 dargestellt.

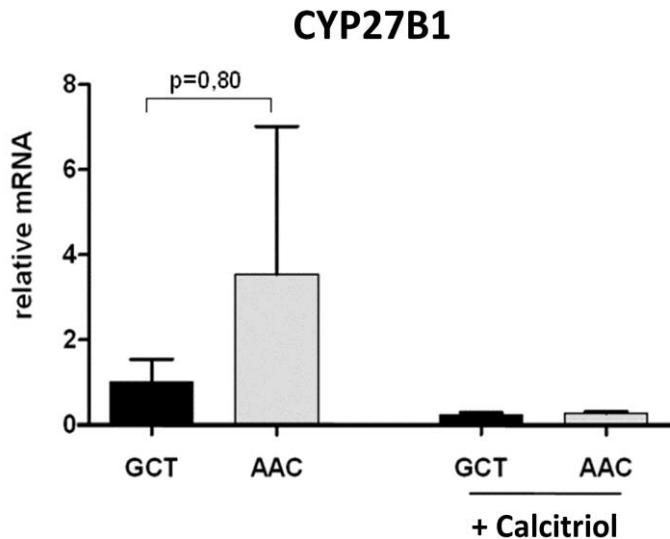


Abb. 17: Quantifizierung der CYP27B1-mRNA in Monozyten mit unterschiedlichen Haplotypen.

Ohne Stimulation und nach 24 h Stimulation mit 100 nM Calcitriol. Mittelwert und SEM gezeigt; n=4. mRNA, messenger ribonucleic acid; VDR, Vitamin-D-Rezeptor.

In der basalen Expression zeigten sich große Schwankungen innerhalb der Gruppen, weshalb dieser Versuch nur sehr eingeschränkt auswertbar ist. Man könnte eine Tendenz zu höheren basalen CYP27B1-Spiegeln bei Monozyten von Probanden mit AAC-Haplotyp im Vergleich zu GCT-Haplotypen ausmachen ($p=0,80$), deren Mittelwert 3,5-fach höher liegt. CYP27B1 wird infolge von VDR-Aktivierung herunterreguliert. Erwartungsgemäß finden sich nach eintägiger Inkubation mit Calcitriol in beiden Genotypen auf ein ähnliches Level erniedrigte Konzentrationen. In Zellen mit AAC-Haplotyp ist CYP27B1 nach VDR-Aktivierung mit einer Reduktion um Faktor 13 stärker herunterreguliert als in Zellen mit GCT-Haplotyp (Fold Change -4). Insgesamt zeigen sich weder signifikante Unterschiede in der CYP27B1-Expression basal und mit VDR-Aktivierung noch im Vergleich der Fold Changes der beiden Haplotypen (Daten nicht gezeigt).

4.4.5. CYP24A1

In Abb. 18 sind die ermittelten CYP24A1-Spiegel in Zellen von Probanden mit GCT- und AAC-Haplotyp (*bsml*, *apal*, *taql*) nach 24-stündiger Stimulation mit Calcitriol dargestellt.

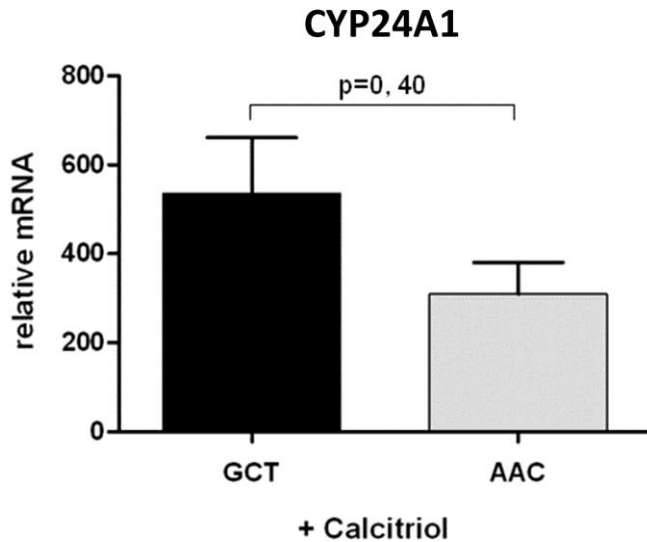


Abb. 18: **Quantifizierung der CYP24A1-mRNA in Monozyten mit unterschiedlichen Haplotypen.** Nach 24 h Stimulation mit 100 nM Calcitriol. Mittelwert und SEM gezeigt, n=4). mRNA, messenger ribonucleic acid; VDR, Vitamin-D-Rezeptor.

Ohne Zugabe von Calcitriol lagen die Spiegel unter der Nachweisgrenze (C_p -Werte des Zielgens > 35 bei normalen C_p Werten für das Referenzgen; Daten nicht gezeigt), entsprechend ruhender, nicht in vivo voraktivierter Monozyten. Durch VDR-Aktivierung wird CYP24A1 induziert⁴⁰. Dementsprechend ist nach 24-stündiger Inkubation mit Calcitriol die Expression von CYP24A1 in Monozyten nachweisbar, insbesondere bei Probanden mit GCT-Haplotyp im Vergleich zum AAC-Haplotyp (Fold Change 1,6; $p=0,4$). Auch hier zeigen sich zwischen den beiden Haplotypen keine signifikanten Unterschiede bei der VDR-Aktivierung. Allerdings kann eine Tendenz zu höheren CYP24A1-mRNA-Spiegeln bei GCT-Haplotyp ein Hinweis auf eine möglicherweise verstärkte VDR-Aktivität in Anwesenheit des GCT-Haplotyps sein. Die CYP24A1-Expression ist bei den Probanden beider Haplotypen jeweils proportional zur VDR-Expression (Daten nicht gezeigt).

4.4.6. LL37

Die relativen mRNA-Spiegel von LL37 gemessen nach VDR-Aktivierung durch 24-stündige Stimulation mit Calcitriol sind in Abb. 19 dargestellt.

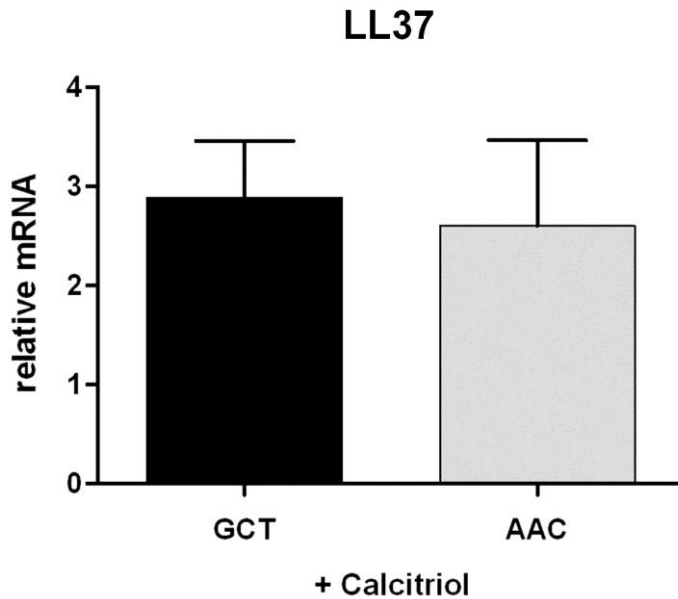


Abb. 19: **Quantifizierung der LL37-mRNA in Monozyten mit unterschiedlichen Haplotypen.** Nach 24 h Stimulation mit 100 nM Calcitriol. Mittelwert und SEM gezeigt; n=4. mRNA, messenger ribonucleic acid; VDR, Vitamin-D-Rezeptor.

Die basale Expression liegt unter der Nachweisgrenze (C_p -Werte des Zielgens > 35 bei normalen C_p -Werten für Referenzgen; Daten nicht gezeigt). Bei Inkubation mit Calcitriol, dass über eine VDR-Aktivierung LL37 induziert ⁷⁸, ergaben sich für beide Genotypen ähnliche LL37-mRNA-Spiegel und somit kein Hinweis auf ein Unterschied zwischen den Haplotypen.

4.4.7. TNF α und IL6

TNF α und IL6 zählen zu den primär von monozytären Zellen produzierten Zytokinen, den sogenannten Monokinen. Sie haben als proinflammatorische Zytokine Schlüsselfunktionen in der Regulation der Entzündungs- und Immunreaktion ¹²⁰. In AD-Hautläsionen ist TNF α einer der proinflammatorischen Zytokine, die über die Aktivierung von vaskulären Endothelzellen zur Invasion weiterer Entzündungszellen führen ³. In der Pathogenese der AD kann ihm eine Rolle in der allergischen Reaktion, beispielsweise durch eine verstärkte IgE-Produktion, zukommen. Entsprechend korreliert IL6 zum Teil mit der Erkrankungsschwere von AD ¹²¹.

Die nach VDR-Aktivierung durch ELISA bestimmten TNF α -Spiegel in den Überständen sind in Abb. 20 dargestellt. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem AAC- und dem GCT-Haplotyp.

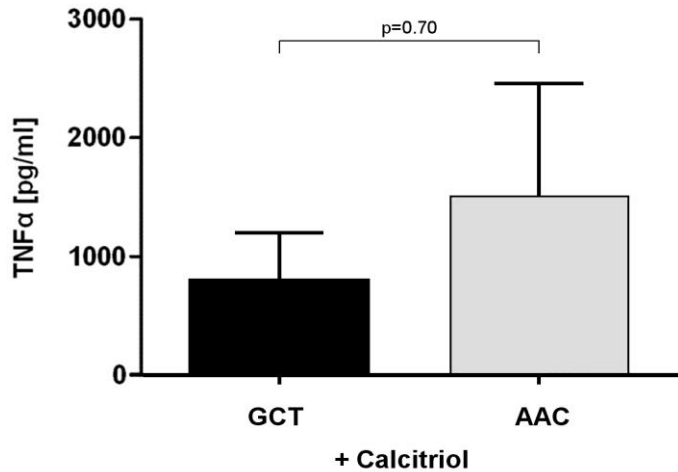


Abb. 20: **TNFα-Konzentration in Monozyten unterschiedlicher Haplotypen.**

bsml apal taql Haplotypen GCT und AAC. Nach 24 h Stimulation mit 100 nM Calcitriol. Mittelwert und SEM gezeigt; n=4. n.d., nicht detektiert; TNF, Tumornekrosefaktor.

Es findet sich trotz des fehlenden signifikanten Unterschieds zwischen den Haplotypen eine Tendenz zu niedrigeren TNFα-Werten bei Zellen mit GCT-Haplotyp. Ausgehend von einer inhibitorischen Wirkung von VD auf die TNFα-Synthese von Monozyten könnte das auf eine stärkere qualitative oder quantitative Wirkung des VDR bei GCT-Haplotyp hinweisen.

Die Ergebnisse für IL6 sind in Abb. 21 dargestellt. Hier zeigen sich keine signifikanten Unterschiede, wobei trotz heterogener Verteilung der Messwerte eine Tendenz zu höheren IL6-Konzentrationen bei Zellen mit GCT-Haplotyp im Vergleich zu Zellen mit AAC-Haplotyp erkennbar ist (Fold Change 2,43; p=0,62).

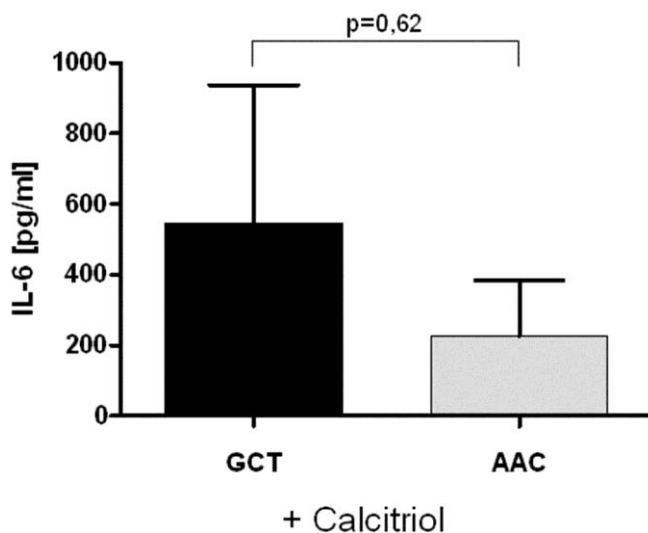


Abb. 21: **IL6-Konzentration in Monozyten unterschiedlicher Haplotypen (1).**

bsml apal taql Haplotypen GCT und AAC. Nach 24 h Stimulation mit 100 nM Calcitriol. Mittelwert und SEM gezeigt; n=4. IL, Interleukin.

5. Diskussion

Die Wirkung von VD auf AD, insbesondere dessen Erkrankungsrisiko und Verlauf, ist bisher nicht geklärt. Ein Einfluss der VDR-Funktion auf AD, die durch *VDR*-Polymorphismen verändert werden kann, sind zum Zeitpunkt der Recherche noch nicht untersucht worden. In der vorliegenden Arbeit wurden in einer Fall-Kontroll-Studie signifikante unterschiedliche Häufigkeiten der *VDR*-Polymorphismen *bsmI*, *apaI* und *taqI* und der aus ihnen zusammengesetzten Haplotypen bei AD, insbesondere bei schwerem klinischen Verlauf, identifiziert. In funktionellen Versuchen konnten keine Hinweise auf eine direkt zugrundeliegende veränderte VDR-Aktivität in kurzzeitigen Ex-vivo-Untersuchungen gefunden werden.

Klinische Daten

Die Häufigkeiten der *VDR*-SNPs wurden bei jeweils 265 Probanden umfassenden Gruppen von gesunden Personen und AD-Patienten gemessen. Die Rekrutierung der Fallgruppe fand in der Sprechstunde für AD der Hautklinik der Charité Berlin statt, die Teilnahme von Seiten der Patienten war freiwillig. Fall- und Kontrollgruppe sind miteinander vergleichbar, da sie eine gleiche Geschlechterverteilung und eine ähnliche Altersverteilung aufweisen. Die Fallgruppe wurde in eine Gruppe mit schweren und eine mit leichten oder moderaten Verläufen eingeteilt. Die mittleren SCORAD-Werte in den Gruppen unterscheiden sich statistisch signifikant, so dass die vorgenommene Einteilung sinnvoll ist. Die Gruppe der Patienten mit schweren Verläufen ist signifikant älter als die mit milden oder moderaten Verläufen. Ursache hierfür könnte der progrediente Verlauf der AD sein, wodurch sich starke Symptome meist nach langjähriger Erkrankung und somit im höheren Lebensalter einstellen. Weiterhin ist bekannt, dass die sogenannten late-onset-Patienten, die erst im fortgeschrittenen Erwachsenenalter erkranken, meist unter schwereren Krankheitsverläufen leiden ¹, was das Durchschnittsalter dieser Gruppe anhebt. In der Gruppe mit leichten oder moderaten Verläufen überwiegen weibliche Patienten, wohingegen in der Gruppe mit schweren Verläufen etwa gleich viele männliche und weibliche Patienten vorkommen. Dieser Überhang könnte durch die Rekrutierung bedingt sein, die freiwillig war. Das weibliche Geschlecht ist als Risikofaktor für schwerere und lange Krankheitsverläufe bekannt ¹²².

Genotypisierung und Haplotypenanalyse

Die Genotypverteilungen aller Gruppen bei den vier betrachteten SNPs liegen stets im Hardy-Weinberg-Equilibrium beziehungsweise sind mit p-Werten über 0,13 nicht signifikant von der Genotypverteilung einer idealen Population verschieden. Die Allelverteilungen der im Rahmen dieser Arbeit genotypisierten SNPs in der Kontrollgruppe unterscheidet sich nur gering von den Daten der entsprechenden kaukasischen Kohorten aus dem internationalen HapMap-Projekt (2005; <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>; 02/2012). Die Häufigkeiten der jeweils selteneren Allele sind um nicht mehr als 4 % verschieden. Die in dieser Arbeit untersuchten *VDR*-SNPs und deren Kopplung wurden bereits in anderen Studien untersucht. Beispiele für die Ergebnisse der Kopplungsanalysen anderer Studien im Vergleich zur vorliegenden Arbeit sind in Tab.A 7 im Anhang dargestellt, wobei ein deutlich erhöhtes Kopplungsungleichgewicht zwischen *bsmI*, *apaI* und *taqI* bestätigt wird. Dies kann durch den geringen Abstand von weniger als 1.000 Bp zwischen den einzelnen SNPs erklärt werden. Der *fokI*-SNP zeigt keine Kopplung mit den anderen hier untersuchten Polymorphismen. Die in dieser Arbeit ermittelten Haplotypen wurden in anderen Studien mit ähnlicher Verteilung bestimmt, einige Beispiele für die vier hier häufigsten Haplotypen sind in Tab.A 8 im Anhang dargestellt.

Die Haplotypen CAAC (*fokI*, *bsmI*, *apaI*, *taqI*) und AAC (*bsmI*, *apaI*, *taqI*) treten in dieser Arbeit signifikant häufiger bei gesunden Kontrollen als in der Fallgruppe auf ($p=0,04$ und $p=0,03$). H_1 kann somit abgelehnt werden. Mit der Nullhypothese zum Vergleich der Kontrollgruppe mit der Fallgruppe mit schweren Verläufen kann wie folgt verfahren werden: Die Allele *taqI* C, *apaI* A und *bsmI* A ($p=0,007$; $p=0,006$ und $p=0,009$) und die Genotypen *taqI* CC, *apaI* AA und *bsmI* AA ($p=0,006$; $p=0,010$ und $p=0,01$) treten signifikant häufiger in der Kontrollgruppe als in der Gruppe der AD-Patienten mit schweren Verläufen auf. In der Haplotypenanalyse sind die CAAC-Haplotypen (*fokI*, *bsmI*, *apaI*, *taqI*) und AAC-Haplotypen (*bsmI*, *apaI*, *taqI*) bei den Kontrollen im Vergleich zur Fallgruppe mit schweren Verläufen signifikant häufiger ($p=0,028$ und $p=0,016$). Der ebenfalls häufig vorkommende GCT-Haplotyp tritt in der Fallgruppe mit schweren Verläufen verglichen mit der Kontrollgruppe häufiger auf ($p=0,005$). H_2 kann folglich ebenfalls verworfen werden. Der häufig vorkommende GCT-Haplotyp (*bsmI*, *apaI*, *taqI*) tritt im Vergleich der Fallgruppe mit schweren Verläufen mit der Fallgruppe mit milden oder moderaten Verläufen häufiger in erstgenannter Gruppe auf ($p=0,011$). H_3 kann somit in gleicher Weise abgelehnt werden.

Zusammenfassend sind das *taqI* C-Allel und der CC-Genotyp, das *apaI* A-Allel beziehungsweise der AA-Genotyp, das *bsmI* A-Allel und der AA-Genotyp und die aus ihnen

zusammengesetzten Haplotypen CAAC und AAC protektiv gegenüber einer Erkrankung beziehungsweise einer schweren Ausprägung von AD. Gegensätzliches gilt für den GCT-Haplotyp. Diese Ergebnisse sprechen für einen Einfluss des VDR auf AD. Da diese Allele und Haplotypen auch in der gesunden Kontrollgruppe häufig vorkommen, können sie nur einen von vielen Faktoren im Erkrankungsmechanismus und Verlauf der AD darstellen.

Assoziationen von *VDR*-SNPs mit Asthma, Atopie, atopischem Asthma und Atemwegshyperreaktivität¹²³ sind beschrieben. Eine Verbindung des *taqI* T-Allels mit Atopie und Asthma wurde in einer Familien-basierten Assoziationsanalyse-Studie beobachtet⁶⁷. Der protektive Effekt des *apaI* A-Allels wurde in einer chinesischen Studie⁶⁸ für allergisches Asthma und in einer kanadischen Studie für Atopie und allergisches Asthma bestätigt⁶⁷. Die Transmission des *apaI* C-Allels war in einer Kohorte mit Asthma vermindert⁶⁹. Die in dieser Arbeit gefundene Assoziation des *bsmI* G-Allels mit AD wurde für Atopie und allergisches Asthma bestätigt⁶⁷. Es wurde ebenfalls eine Assoziation des *fokI* SNPs mit schwererer Asthma-Symptomatik und erhöhten IgE-Spiegeln beschrieben⁷⁰.

Der *fokI*-SNP zeigt in dieser Arbeit im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und gesamter Fallgruppe oder der AD-Patienten mit schweren Verläufen weder signifikante Unterschiede in der Allelverteilung ($p \geq 0,26$) noch in der Genotypverteilung ($p \geq 0,14$). Auch bei der Gegenüberstellung innerhalb der Fallgruppe nach klinischem Verlauf ergeben sich keine nennenswerten Unterschiede in Allel- und Genotypverteilung ($p \geq 0,71$). Für Haplotypen, die den *fokI*-SNP enthalten, wurden in dieser Arbeit, mit Ausnahme des CAAC-Haplotyps, ebenfalls keine signifikant verschiedenen Häufigkeiten gefunden. Diese Arbeit kann folglich keine Hinweise auf eine Verbindung zwischen *fokI* SNPs und AD liefern.

Unterschiedliche Ergebnisse bei genetisch-epidemiologischen Studien treten häufig auf. Dies kann durch die genetische Verschiedenheit der betrachteten Populationen bedingt sein, die in spezifischen Gen-Gen-Interaktionen und Allelfrequenzen divergieren. So unterscheiden sich die Kopplungsungleichgewichte der betrachteten *VDR*-SNPs zum Teil zwischen Populationen¹²⁴ und Ethnien¹²⁵. Weiterhin kann es durch die Heterogenität und den schubhaften Verlauf von AD zu erschweren Klassifikationen kommen und so mögliche Unterschiede abgeschwächt werden.

Die beobachteten unterschiedlichen Häufigkeiten der SNPs und Haplotypen bei AD können sowohl auf einen direkten funktionellen Effekt auf die Funktion des VDR als auch auf eine Kopplung mit biologisch-funktionell wirksamen Polymorphismen in einer anderen Region des *VDR*-Gens oder in Nachbargenen zurückzuführen sein. Aufgrund der Lokalisation

von *bsml*, *apaI* und *taqI* nahe des 3'Endes des *VDR*-Gens dehnt sich das Kopplungsungleichgewicht mit großer Wahrscheinlichkeit auf den 3'untranslatierten Bereich des *VDR*-Gens aus und Kopplungen mit funktionalen Polymorphismen in diesem Bereich sind möglich. Der 3'untranslatierte Bereich beeinflusst durch Modulation der mRNA-Stabilität die transkriptionelle Aktivität des Gens und somit dessen Expression. Im Fall des *VDR* kann sich dies auf die *VDR*-vermittelte Wirkung von VD und damit auf die Transkription von VD-responsiven Genen auswirken. Um solche Mechanismen zu analysieren, sind weitere Untersuchungen unter Einbeziehung weiterer SNPs nötig. Nur so können Konfundierungseffekte anderer Polymorphismen, wie von Uitterlinden et al.¹²⁶ beispielhaft beschrieben, in die Ergebnisinterpretation einbezogen werden. Veränderungen in verschiedensten Genen mit einzeln marginalen Einflüssen auf Funktion oder Menge von Proteinen können zusammen in synergistischer oder additiver Wirkung wesentlich zur Erkrankung oder zum Krankheitsverlauf beitragen.

In der Pathogenese der AD sind in- und extrinsische Faktoren beziehungsweise genetische und Umweltfaktoren verknüpft, so dass neben den Gen-Gen-Interaktionen auch Gen-Umwelt-Interaktionen von Bedeutung sind. Hautpflege, Komorbiditäten, insbesondere Hautinfektionen, Exposition mit Reizstoffen und der Kontakt zu Allergenen beeinflussen den Krankheitsverlauf und können so die Ergebnisse von Studien als Störfaktoren verändern¹²⁷ und einen möglichen Effekt von *VDR*-SNPs auf AD abschwächen oder ihn maskieren. In wenigen der zum Thema genetischer Assoziationen mit AD veröffentlichten Artikel werden Umweltfaktoren berücksichtigt. So wurde in einer Studie die Verbindung zwischen einem Polymorphismus im Filaggrin-Gen und neonataler Exposition mit Katzenhaar betrachtet und ein erhöhtes Risiko, im ersten Lebensjahr ein Ekzem zu entwickeln, festgestellt, wenn zusätzlich zum Vorliegen der Mutation Exposition zu Katzenallergenen besteht¹²⁸. Für die Probanden dieser Arbeit konnten keine solchen Informationen einbezogen werden. Dies sollte in zukünftigen Studien vor allem in Hinblick auf den VD-Status berücksichtigt werden, da die Effekte der *VDR*-SNPs auf AD wesentlich von der VD-Versorgung, also der Sonnenexposition oder der nutritiven VD-Substitution, abhängen. Aufgrund der relativ äquatorfernen Lage der Rekrutierungsorte Berlin und Kiel sowie der hohen Inzidenz, ist eine VD-Defizienz bei einem Teil der Probanden wahrscheinlich.

Funktionelle Analysen

Es wurden funktionelle Versuche an Monozyten von je vier gesunden Spendern, die homozygote Träger der GCT- und AAC-Haplotypen (*bsml*, *apal*, *taql*) sind, durchgeführt, um mögliche Ursachen der unterschiedlichen Häufigkeiten der Haplotypen bei AD nachzuvollziehen. In Bezug auf die in dieser Arbeit aufgestellten Hypothesen muss folgendermaßen verfahren werden: H_4 kann nicht verworfen werden, da kein signifikanter Unterschied zwischen den *VDR*-mRNA-Mengen bei Trägern des GCT-Haplotyps und des AAC-Haplotyps ermittelt wurden. Die basale Expression von *VDR* in Monozyten ist beschrieben⁵³, ebenso wie die Steigerung nach Inkubation mit VD¹²⁹, was auf eine erhöhte Stabilität des *VDR* zurückgeführt wird⁴⁶. Im Gegensatz zu den nicht signifikanten Ergebnissen dieser Arbeit ist eine stärkere Transkription des *VDR* bei Vorliegen des AAC-Haplotypen im Vergleich zum GCT-Haplotyp beschrieben^{130,131}. H_5 kann ebenfalls nicht abgelehnt werden, da in keinem der Vergleiche die mRNA-Spiegel von *VDR*, *CYP24A1*, *CYP27B1* und *LL37* sowie die Proteinmengen von $TNF\alpha$ und *IL6* in den Überständen konstitutiv und nach *VDR*-Aktivierung signifikante Unterschiede aufwiesen. Somit kann kein Rückschluss auf eine veränderte Funktion des *VDR* gezogen werden.

Der *VDR*, der durch seine eigene Aktivierung hochreguliert wird, zeigt nur beim GCT-Haplotyp die erwartete Steigerung der *VDR*-mRNA-Konzentration. *CYP27B1* ist über ein nVDRE negativ an die Aktivität des *VDR* gekoppelt. Dies bestätigt sich in den erniedrigten mRNA-Spiegeln nach Inkubation mit VD. Die Quantifizierungen von *CYP24A1* und *LL37*, die beide durch *VDR*-Aktivierung induziert werden, ergaben bei unstimulierten Monozyten Werte unter der Nachweisgrenze und nach Inkubation mit Calcitriol erwartungsgemäß nachweisbare Konzentrationen. Inwiefern in Monozyten die Synthese von *IL6* und $TNF\alpha$ durch VD beziehungsweise *VDR*-Aktivierung beeinflusst wird, ist kontrovers, wobei eine von der Zelldifferenzierung abhängige Wirkung denkbar ist. In Monozyten inhibiert VD die Produktion von *IL6* und $TNF\alpha$ ¹³². Entsprechend wurden erniedrigte *IL6*- und $TNF\alpha$ -Serumspiegel nach VD-Einnahme beschrieben¹³³. Gegensätzlicherweise wurden in Monozyten, die in VD kultiviert wurden, eine erhöhte Sekretion von $TNF\alpha$ beobachtet^{134,135}. In den Versuchen dieser Arbeit zeigten sich im Vergleich der Haplotypen keine signifikanten Unterschiede der Konzentrationen von *IL6* und $TNF\alpha$ nach *VDR*-Aktivierung.

Der Aufbau der funktionellen Versuche stellt ein stark vereinfachtes Modell einer in vivo komplexen Reaktion dar. In vivo beruht AD auf einem Wechselspiel verschiedener

Aktivierungs- und Regulationsmechanismen in Zellen der unspezifischen und spezifischen Immunantwort der Haut, zum größten Teil Keratinozyten und monozytäre Zellen, und in anderen Geweben, wie T- und B-Zellen in regionären Lymphknoten. Daher können die hier gemachten Untersuchungen nur einen Teil der Immunreaktion nachbilden, ohne dabei längerfristige Prozesse und Interaktionen zwischen den verschiedenen Instanzen der Immunantwort einzubeziehen, wie sie beispielsweise bei allergischen Reaktionen nach einer Sensibilisierung stattfindet. Es ist denkbar, dass andere Regelkreise Einfluss auf die Enzym- und Zytokinproduktion haben und die Ergebnisse verfälschen, so dass Rückschlüsse aus diesen Versuchen nur begrenzt gezogen werden können. Trotzdem kann dieser Ansatz einzelne Erklärungsmöglichkeiten für genetisch-epidemiologisch beobachtete Phänomene liefern. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte in Betracht gezogen werden, dass sich die Wirkung von VD auf isolierte Monozyten von der auf Vorläuferzellen und ausdifferenzierte Makrophagen unterscheiden kann. Die Verwendung primärer humaner Zellen ist ein Vorteil dieser Arbeit gegenüber anderen Studien, in denen im Tierversuch oder mit Zellkulturen aus Tumorzellen gearbeitet wurde, da nur limitiert Rückschlüsse auf die humane Pathogenese *in vivo* gezogen werden können. Allerdings ergeben sich bei *Ex-vivo*-Versuchen größere Variationen durch interindividuelle Unterschiede. In dieser Arbeit unterscheiden sich beispielsweise die relativen Konzentrationen der VDR-mRNA um bis zu Faktor acht. Dies bedingt die hohen Standardabweichungen in allen Versuchen und könnte in weiterführenden Studien durch Eliminierung hier nicht betrachteter Störfaktoren sowie der Erhöhung der Probandenzahl vermindert werden.

Funktionelle Relevanz der GCT- und AAC-Haplotypen

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lassen sich keine Rückschlüsse über die funktionelle Relevanz der AAC- und GCT-Haplotypen der VDR-Polymorphismen *bsmI*, *apaI* und *taqI* ziehen. Denkbar ist, dass sich ein funktioneller Effekt weniger in Monozyten und deutlicher in anderen Zellen, wie beispielsweise Keratinozyten oder dendritischen Zellen, zeigt und sich so auf Erkrankungen wie AD auswirkt. Die Wirkung auf weitere immunologische Zellen und deren Wechselwirkungen wären bei weiteren Untersuchungen von Interesse und konnten in dieser Arbeit nicht betrachtet werden. In zahlreichen Studien wurden Hinweise auf eine veränderte Funktionalität der untersuchten Haplotypen und die in ihnen enthaltenen SNPs gefunden, wobei die Ergebnisse kontrovers sind. Dies kann auf die zum Teil großen Unterschiede im Versuchsaufbau zurückzuführen sein.

Es wurden sowohl vermehrte VDR-mRNA-Mengen bei GCT-¹³⁶ als auch bei AAC-Haplotyp^{131,137} beschrieben. Für einen in Exon 9 des VDR-Gens liegenden polymorphen Mikrosatellit wurde eine starke Kopplung an den *bsml* SNP beobachtet¹²⁵, wobei die lange Variante mit dem GCT-, die kurze mit dem AAC-Haplotyp (*bsml*, *apal*, *fokI*) gekoppelt ist¹³¹. Für die lange Variante dieses Mikrosatelits wurde eine höhere Aktivität beschrieben⁶⁰, was somit auf eine verstärkte Funktion bei GCT-Haplotyp hinweist.

Für die funktionellen Auswirkungen der einzelnen SNPs wurden ebenfalls zum Teil kontroverse Ergebnisse ermittelt. Eine erhöhte VDR-Wirksamkeit in der Therapie von Psoriasis wurde für das *taqI* T-Allel, das im GCT-Haplotyp enthalten ist, gefunden^{138,139}. Im Gegensatz hierzu wurden Assoziationen dieses Allels mit Psoriasis¹⁴⁰ und Erkrankungen beschrieben, für die ein VD-Mangel prädisponiert^{141,142}. Das *apal* C-Allel, das im GCT-Haplotyp enthalten ist, ist vermindert bei mit VD-Mangel assoziierten Erkrankungen zu finden¹⁴², wobei gegensätzlich hierzu auch eine verminderte Aktivität des VDR in Form von verminderter Knochenmineralisierung bei *apal* CC-Genotyp beschrieben wurde^{143,144}. Für das *bsml* G-Allel, das im GCT-Haplotyp enthalten ist, wurden erhöhte VDR-mRNA-Spiegel¹⁴⁵ und höhere Spiegel von VDR-Zielgenen¹⁴⁶ gemessen. Für dieses Allel beziehungsweise den GG-Genotyp wurde eine höhere Aktivität, gemessen an der Knochendichte, beobachtet^{131,147,148}. Gegenseitlicher Weise wurden höhere VDR-mRNA-Spiegel beim *bsml* AA-Genotyp¹⁴⁹ und ein besseres Ansprechen auf die VD-Substitutions-Therapie bei einer Knochenmineralisierungstörung beim *bsml* A-Allel festgestellt¹⁵⁰. In weiteren Studien konnte kein Effekt des *bsml* SNPs auf VDR-mRNA¹⁵¹ sowie VD-Serumspiegel¹⁵² gefunden werden.

Zusammenfassend sind die Studien zu den VDR-Haplotypen AAC und GCT kontrovers, eine möglicherweise höhere Aktivität des GCT-Haplotyps wurde allerdings zum Teil bestätigt. Trotz der nicht signifikanten Unterschiede in den funktionellen Versuchen dieser Arbeit lassen sich Tendenzen zu verstärkter VDR- und CYP24A1-Expression und eine verminderte TNF α -Produktion unter VDR-Aktivierung und einer höheren CYP27B1-Expression bei GCT-Haplotypen erkennen, so dass eine stärkere Wirksamkeit des Calcitriols bei diesem Haplotypen möglich erscheinen. Dies ist in zukünftigen Versuchen zu verifizieren.

Vitamin D bei atopischer Dermatitis

Die Ergebnisse der funktionellen Analysen dieser Arbeit lassen auf keinen Mechanismus schließen, durch den VD AD beeinflusst, jedoch legen die Unterschiede in der Allel- und Haplotypenverteilung einen Einfluss des VDR nahe. Die Bedeutung von VD bei AD wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Prävalenz von AD mit sinkender

geografischer Breite und niedriger mittlerer Jahresaußentemperatur abnimmt¹⁵³, wobei sich diese Faktoren auf die UV-Exposition und damit auf die kutane Syntheseschritte von VD auswirken. Es wurde ein positiver Einfluss von subtropischem im Vergleich zu nordeuropäischem Klima auf AD-Ekzeme beobachtet (n=30)¹⁵⁴. Bei niedrigen VD-Spiegeln wurde entsprechend ein höheres Risiko an AD zu erkranken ermittelt^{155,156}.

Es wird über einen Zusammenhang zwischen der stark ansteigenden Inzidenz von allergischen Erkrankungen und dem ebenfalls häufigen Mangel an VD spekuliert¹⁵⁷. Beides könnte auf Veränderungen durch den westlichen Lebensstil zurückzuführen sein, der durch verbesserte Hygiene, das häufigere Vorkommen von Adipositas, Verschmutzung der Umwelt, aber auch verminderte Sonnenexposition durch verlängerten Aufenthalt in geschlossenen Räumen gekennzeichnet ist. Auch diese Faktoren beeinflussen den VD-Status. Es wurde eine Prädisposition für AD bei perinatalem VD-Mangel (n=231)¹⁵⁸ und eine inverse Korrelation zwischen Krankheitsverlauf und VD-Spiegeln bei von AD betroffenen Kindern (n=37)¹⁵⁹ beschrieben. Dem entgegengesetzt wird ein negativer Einfluss von VD auf allergische Erkrankungen für möglich gehalten. So wird die VD-Zufuhr während der Schwangerschaft als einer der Faktoren vorgeschlagen, der zum raschen Anstieg der Häufigkeit von Allergien in den letzten Jahrzehnten beigetragen hat, da sowohl die Substitution von VD als auch die Inzidenz atopischer Erkrankungen in ähnlicher zeitlicher und geografischer Weise zunahm¹⁶⁰. Entsprechend wurde bei höheren maternalen VD-Serumspiegeln eine Tendenz zum häufigeren Auftreten von AD beobachtet (n=440)¹⁶¹. Ähnlich wurde eine Korrelation zwischen der in der Schwangerschaft sowie in der Kindheit eingenommenen VD-Menge und der Häufigkeit von Atopie beziehungsweise AD beschrieben^{162,163}. Eine Untersuchung von Nabelschnurblut ergab einen nichtlinearen Zusammenhang zwischen VD-Spiegeln und der an IgE-Spiegeln gemessenen allergischen Sensibilisierung, die sowohl bei niedrigen als auch hohen VD-Spiegeln erhöht war¹⁶⁴, so dass sich ein Mangel ebenso wie ein Überschuss an VD negativ auf atopische Krankheiten einschließlich der AD auswirken würde.

Die Pathogenese von AD ist nicht vollständig geklärt, so dass eine kausale Therapie bisher nicht möglich ist und die Behandlung symptomatisch erfolgt. Als chronisch entzündliche Hauterkrankung hat AD eine multifaktorielle Pathogenese mit einem Barrieredefekt, verstärkter Infektuszeptibilität und Antigenpenetration, einer modifizierten Erkennung von Mikroben, chronischen Infektionen sowie allergenspezifischer Sensibilisierung mit modifiziertem Zytokinmuster und TH1/2-Gewichtung. Die derzeitige Therapie von AD beinhaltet neben allgemeinen Maßnahmen, wie das Meiden von Allergenen

und Hautpflege, verschiedene Ansatzpunkte, die die immunologischen Dysfunktionen ausgleichen ¹⁶⁵. Durch eine spezielle Hautpflege können Lipidmangel und Überaktivität von Serinproteasen und somit die Barrieredysfunktion ausgeglichen werden ¹⁶. Antihistaminika können begrenzt den Pruritus mindern. Gegen die Superinfektionen von AD-Läsionen werden lokal antiseptische Lotionen und zeitweise Antibiotika angewendet, die die Symptomatik verbessern ¹⁶⁶. Langfristig kann das Ausmaß der Entzündung durch eine effektive immunsuppressive Therapie gemindert werden. Die zur Verfügung stehenden Immunsuppressiva sind allerdings aufgrund unerwünschter Wirkungen, wie Hautatrophie bei Kortikosteroiden und Toxizität bei Kalzineurininhibitoren, nur beschränkt einsetzbar. Angriffspunkte für zukünftige AD-Therapeutika bieten, neben einer allgemein immunsuppressiven Therapie, eine allergenspezifische Immuntherapie beziehungsweise gegen T-Zell-Aktivierung oder gegen die TH2-Antwort gerichtete Therapeutika.

Verschiedene Aspekte der teilweise kontrovers diskutierten immunmodulatorischen Wirkungen von VD könnten mit dem Krankheitsbild der AD in Beziehung gesetzt werden und machen eine therapeutische Anwendung zur Unterstützung der immunsuppressiven und antibiotischen Behandlung denkbar. Ein positiver Effekt von VD kann durch dessen steigernde Wirkung auf die unspezifische Abwehr und damit effektive Erregerabwehr, durch verstärkte Aktivität von APZ und Synthese von AMP sowie durch die entzündungshemmende Wirkung, die sich in der Steigerung immunologischer Toleranz äußert, bedingt sein. Weiterhin hemmt VD die Synthese proinflammatorischer Zytokine sowie die Zellproliferation und -differenzierung, es mindert die Ansprechbarkeit der Zellen auf Entzündungsreize, die Zellmigration und Antigenpräsentation sowie die Synthese von Immunglobulinen. Mögliche negative Wirkungen von VD auf AD können von dessen Wirkung auf die TH1/2-Gewichtung ausgehen. Es wurde gezeigt, dass VDR-Liganden AD-ähnliche Symptome auslösen, die durch eine Verschiebung Richtung TH2 bedingt sein können ¹⁶⁷.

Derzeit wird VD vor allem in der Therapie von Knochenmineralisierungsstörungen eingesetzt. Es stellt außerdem eine mögliche Therapieoption oder -ergänzung bei chronisch-entzündlichen und Autoimmunerkrankungen ^{71,76} dar, wobei es synergistische Effekte auf Immunsuppressiva haben kann ^{168,169}. VD kann ebenfalls in der Therapie von Infektionen eingesetzt werden ⁷⁶. Entsprechend wurde ein positiver Einfluss auf die Infektuszeptibilität beschrieben ^{170,171}. Des Weiteren erscheint die Anwendung in der Therapie kardiovaskulärer, maligner und metabolischer Krankheiten möglich ⁷⁶. Bisherige Rückschlüsse der Wirkung von VD auf allergische Erkrankungen sind widersprüchlich, da größere prospektive und

randomisierte Studien zur Wirkung von VD und zu Auswirkungen von der VD-Defizienz auf atopische Erkrankungen fehlen und so auch therapeutische Möglichkeiten nicht geklärt sind.

VD beziehungsweise dessen Derivate werden in der Dermatologie bereits in der Therapie von inflammatorischen, hyperproliferativen und infektiösen Hauterkrankungen, wie Psoriasis, Vitiligo, Akne und Rosacea, angewendet. Eine Therapie mit VD zur Behandlung von AD ist denkbar, wurde bisher allerdings kaum eingesetzt. Die bislang wenigen Studien zum Thema, die teilweise heterogen in Bezug auf die VD-Grenzwerte, die Krankheitsklassifikation sowie den Studienumfang sind, lassen hier keine definitive Therapieempfehlung zu. Es zeigt sich jedoch nach der VD-Supplementation eine klinische Besserung von AD¹⁷²⁻¹⁷⁵ mit einer verminderten Anzahl von CD4+ T-Zellen und einer verbesserten Funktion von regulatorischen T-Zellen¹⁷⁶. In einer Pilotstudie wurden Kinder mit AD placebokontrolliert mit VD behandelt, wobei sich eine nicht signifikante klinische Besserung zeigte (n=11)¹⁷⁷. Entsprechend wurde nach VD-Gabe bei AD-Patienten ein Anstieg der kutanen LL37-Expression gefunden¹⁷⁸. Dieser Einfluss auf die Synthese von AMP konnte allerdings in einer weiteren interventionellen Studie nicht bestätigt werden¹⁷⁹.

Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein protektiver Effekt von *taqI* C-Allel und CC-Genotyp, *apaI* A-Allel beziehungsweise AA-Genotyp, *bsmI* A-Allel und AA-Genotyp und den Haplotypen CAAC und AAC gegenüber einer Erkrankung beziehungsweise einer schweren Ausprägung von AD gefunden. Durch genetisch-epidemiologische Studien wie diese besteht die Möglichkeit, epidemiologische Daten mit Erkenntnissen auf molekularer Ebene zu verknüpfen. In Ex-vivo-Versuchen konnte keine Ursache einer zugrundeliegenden veränderten Funktionsweise des VDR gefunden werden. Um den in dieser Arbeit signifikant verschieden verteilten Allelen und Haplotypen eine praktische Bedeutung zu geben, sind zunächst weitere Studien zu deren funktionellen Auswirkungen, gegebenenfalls auch in gekoppelten Genbereichen, nötig. Es wäre denkbar, sie in eine zukünftige individualisierte Therapie der AD¹⁸⁰ einzubringen, wobei beispielsweise bei Vorhandensein des für einen schweren Verlauf prädisponierenden GCT-Haplotyps eine aggressivere Therapie mit engmaschigeren Kontrollen vorstellbar wäre. VD beeinflusst große Teile der immunologischen Ursachen von AD, wobei die Effekte teilweise gegensätzlich beschrieben wurden. Sobald diese geklärt sind, kann der VD-Status in Therapiepläne oder in die Prävention von AD einbezogen werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Altmeyer MB-B. *Dermatologie Allergologie Umweltmedizin*. Vol 1: Springer Verlag Berlin 2002.
2. Bieber T. Atopic dermatitis. *The New England journal of medicine*. Apr 3 2008;358(14):1483-1494.
3. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *The Journal of clinical investigation*. Mar 2004;113(5):651-657.
4. Stingl S. *Dermatologie Venerologie 11.1.3 G*. Vol 2: Prof. Dr. Peter Fritsch, Springer Verlag Berlin; 2004.
5. Smith WD eat. Hippocrates (vol 7). *Cambridge, MA: Harvard University Press*. 1994:p. 159.
6. Wise F SM. *The 1933 year book of dermatology and syphilology*1933.
7. AWMF. S2-Leitlinie Dermatologie: Neurodermitis. <http://www.awmf.org/>. 2011.
8. Mortz CG, Lauritsen JM, Bindslev-Jensen C, Andersen KE. Prevalence of atopic dermatitis, asthma, allergic rhinitis, and hand and contact dermatitis in adolescents. The Odense Adolescence Cohort Study on Atopic Diseases and Dermatitis. *The British journal of dermatology*. Mar 2001;144(3):523-532.
9. Barnes KC. An update on the genetics of atopic dermatitis: scratching the surface in 2009. *The Journal of allergy and clinical immunology*. Jan 2010;125(1):16-29 e11-11; quiz 30-11.
10. Cookson WO, Moffatt MF. The genetics of atopic dermatitis. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. Oct 2002;2(5):383-387.
11. Morgan J. Sensitization and eczema. *Occupational Medicine (London)*. 1953(3):274–282.
12. Coca AF CR. On the classification on the phenomenon of hypersensitivities. *J.Immunol*. 1923(8):163-182.
13. Dorschner RA, Pestonjamasp VK, Tamakuwala S, et al. Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A Streptococcus. *The Journal of investigative dermatology*. Jul 2001;117(1):91-97.
14. Zanetti M. The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. *Current issues in molecular biology*. Jul 2005;7(2):179-196.
15. De Benedetto A, Agnihotri R, McGirt LY, Bankova LG, Beck LA. Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects? *The Journal of investigative dermatology*. Jan 2009;129(1):14-30.
16. Elias PM, Hatano Y, Williams ML. Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: outside-inside-outside pathogenic mechanisms. *The Journal of allergy and clinical immunology*. Jun 2008;121(6):1337-1343.
17. O'Regan GM, Sandilands A, McLean WH, Irvine AD. Filaggrin in atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. Oct 2008;122(4):689-693.
18. Ong PY, Ohtake T, Brandt C, et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *The New England journal of medicine*. Oct 10 2002;347(15):1151-1160.
19. Beck LA, Boguniewicz M, Hata T, et al. Phenotype of atopic dermatitis subjects with a history of eczema herpeticum. *The Journal of allergy and clinical immunology*. Aug 2009;124(2):260-269, 269 e261-267.
20. Ahmad-Nejad P, Mrabet-Dahbi S, Breuer K, et al. The toll-like receptor 2 R753Q polymorphism defines a subgroup of patients with atopic dermatitis having severe phenotype. *The Journal of allergy and clinical immunology*. Mar 2004;113(3):565-567.
21. Oh DY, Schumann RR, Hamann L, Neumann K, Worm M, Heine G. Association of the toll-like receptor 2 A-16934T promoter polymorphism with severe atopic dermatitis. *Allergy*. Nov 2009;64(11):1608-1615.
22. Topilski I, Flaishon L, Naveh Y, Harmelin A, Levo Y, Shachar I. The anti-inflammatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on Th2 cells in vivo are due in part to the control of integrin-mediated T lymphocyte homing. *European journal of immunology*. Apr 2004;34(4):1068-1076.
23. Liu X, Beaty TH, Deindl P, et al. Associations between total serum IgE levels and the 6 potentially functional variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study. *The Journal of allergy and clinical immunology*. Aug 2003;112(2):382-388.

24. Geha RS, Jabara HH, Brodeur SR. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nature reviews. Immunology*. Sep 2003;3(9):721-732.
25. Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nature reviews. Immunology*. Mar 2008;8(3):205-217.
26. Nomura I, Goleva E, Howell MD, et al. Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol*. Sep 15 2003;171(6):3262-3269.
27. Bunikowski R, Mielke M, Skarabis H, et al. Prevalence and role of serum IgE antibodies to the Staphylococcus aureus-derived superantigens SEA and SEB in children with atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. Jan 1999;103(1 Pt 1):119-124.
28. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. Nov 18 1989;299(6710):1259-1260.
29. Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*. Apr 19 2002;296(5567):490-494.
30. Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. May 31 2003;361(9372):1869-1871.
31. Bikle DD. Vitamin D: an ancient hormone. *Experimental dermatology*. Jan 2011;20(1):7-13.
32. Holick MF. Vitamin D deficiency. *The New England journal of medicine*. Jul 19 2007;357(3):266-281.
33. Di Rosa M, Malaguarnera M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Vitamin D3: a helpful immunomodulator. *Immunology*. Oct 2011;134(2):123-139.
34. Schaubert J, Dorschner RA, Coda AB, et al. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *The Journal of clinical investigation*. Mar 2007;117(3):803-811.
35. Christakos S, Dhawan P, Liu Y, Peng X, Porta A. New insights into the mechanisms of vitamin D action. *Journal of cellular biochemistry*. Mar 1 2003;88(4):695-705.
36. Christakos S, Raval-Pandya M, Wernyj RP, Yang W. Genomic mechanisms involved in the pleiotropic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *The Biochemical journal*. Jun 1 1996;316 (Pt 2):361-371.
37. Dusso AS. Vitamin D receptor: mechanisms for vitamin D resistance in renal failure. *Kidney international. Supplement*. Jun 2003(85):S6-9.
38. Schrader M, Bendik I, Becker-Andre M, Carlberg C. Interaction between retinoic acid and vitamin D signaling pathways. *The Journal of biological chemistry*. Aug 25 1993;268(24):17830-17836.
39. Issa LL, Leong GM, Eisman JA. Molecular mechanism of vitamin D receptor action. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*. Dec 1998;47(12):451-475.
40. Kumar R, Iachini DN, Neilsen PM, et al. Systematic characterisation of the rat and human CYP24A1 promoter. *Molecular and cellular endocrinology*. Aug 30 2010;325(1-2):46-53.
41. Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ, et al. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. *Genome research*. Oct 2010;20(10):1352-1360.
42. Hossein-nezhad A, Spira A, Holick MF. Influence of vitamin D status and vitamin D3 supplementation on genome wide expression of white blood cells: a randomized double-blind clinical trial. *PloS one*. 2013;8(3):e58725.
43. Kim MS, Fujiki R, Kitagawa H, Kato S. 1alpha,25(OH)2D3-induced DNA methylation suppresses the human CYP27B1 gene. *Molecular and cellular endocrinology*. Feb 2007;265-266:168-173.
44. Cippitelli M, Santoni A. Vitamin D3: a transcriptional modulator of the interferon-gamma gene. *European journal of immunology*. Oct 1998;28(10):3017-3030.
45. Tobler A, Miller CW, Norman AW, Koeffler HP. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates the expression of a lymphokine (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) posttranscriptionally. *The Journal of clinical investigation*. Jun 1988;81(6):1819-1823.
46. Wiese RJ, Uhland-Smith A, Ross TK, Prah J, DeLuca HF. Up-regulation of the vitamin D receptor in response to 1,25-dihydroxyvitamin D3 results from ligand-induced stabilization. *The Journal of biological chemistry*. Oct 5 1992;267(28):20082-20086.
47. Krishnan AV, Cramer SD, Bringhurst FR, Feldman D. Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors by parathyroid hormone in osteoblastic cells: role of second messenger pathways. *Endocrinology*. Feb 1995;136(2):705-712.

48. Liu PT, Stenger S, Li H, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*. Mar 24 2006;311(5768):1770-1773.
49. Farmer PK, He X, Schmitz ML, Rubin J, Nanes MS. Inhibitory effect of NF-kappaB on 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and retinoid X receptor function. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. Jul 2000;279(1):E213-220.
50. Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Dec 2001;15(14):2579-2585.
51. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Current opinion in pharmacology*. Aug 2010;10(4):482-496.
52. Milde P, Hauser U, Simon T, et al. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in normal and psoriatic skin. *The Journal of investigative dermatology*. Aug 1991;97(2):230-239.
53. Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. *Science*. Sep 16 1983;221(4616):1181-1183.
54. Gambhir V, Kim J, Siddiqui S, et al. Influence of 1,25-dihydroxy vitamin D3 on TLR4-induced activation of antigen presenting cells is dependent on the order of receptor engagement. *Immunobiology*. Sep 2011;216(9):988-996.
55. Malloy PJ, Pike JW, Feldman D. The vitamin D receptor and the syndrome of hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets. *Endocrine reviews*. Apr 1999;20(2):156-188.
56. Saijo T, Ito M, Takeda E, et al. A unique mutation in the vitamin D receptor gene in three Japanese patients with vitamin D-dependent rickets type II: utility of single-strand conformation polymorphism analysis for heterozygous carrier detection. *American journal of human genetics*. Sep 1991;49(3):668-673.
57. Faraco JH, Morrison NA, Baker A, Shine J, Frossard PM. ApaI dimorphism at the human vitamin D receptor gene locus. *Nucleic acids research*. Mar 11 1989;17(5):2150.
58. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Aug 1 1992;89(15):6665-6669.
59. Farrow S. Allelic variation and the vitamin D receptor. *Lancet*. May 21 1994;343(8908):1242.
60. Whitfield GK, Remus LS, Jurutka PW, et al. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. *Molecular and cellular endocrinology*. May 25 2001;177(1-2):145-159.
61. Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. Jun 1997;12(6):915-921.
62. Gross C, Krishnan AV, Malloy PJ, Eccleshall TR, Zhao XY, Feldman D. The vitamin D receptor gene start codon polymorphism: a functional analysis of FokI variants. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. Nov 1998;13(11):1691-1699.
63. Colin EM, Weel AE, Uitterlinden AG, et al. Consequences of vitamin D receptor gene polymorphisms for growth inhibition of cultured human peripheral blood mononuclear cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D3. *Clinical endocrinology*. Feb 2000;52(2):211-216.
64. Jurutka PW, Remus LS, Whitfield GK, et al. The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Mol Endocrinol*. Mar 2000;14(3):401-420.
65. Wilkinson RJ, Llewelyn M, Toossi Z, et al. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet*. Feb 19 2000;355(9204):618-621.
66. Harris SS, Eccleshall TR, Gross C, Dawson-Hughes B, Feldman D. The vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. Jul 1997;12(7):1043-1048.
67. Poon AH, Laprise C, Lemire M, et al. Association of vitamin D receptor genetic variants with susceptibility to asthma and atopy. *American journal of respiratory and critical care medicine*. Nov 1 2004;170(9):967-973.
68. Saadi A, Gao G, Li H, Wei C, Gong Y, Liu Q. Association study between vitamin D receptor gene polymorphisms and asthma in the Chinese Han population: a case-control study. *BMC medical genetics*. 2009;10:71.

69. Raby BA, Lazarus R, Silverman EK, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with childhood and adult asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. Nov 15 2004;170(10):1057-1065.
70. Pillai DK, Iqbal SF, Benton AS, et al. Associations between genetic variants in vitamin D metabolism and asthma characteristics in young African Americans: a pilot study. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*. Aug 2011;59(6):938-946.
71. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocrine reviews*. Aug 2005;26(5):662-687.
72. Youssef DA, Miller CW, El-Abbassi AM, et al. Antimicrobial implications of vitamin D. *Dermato-endocrinology*. Oct 2011;3(4):220-229.
73. Cantorna MT, Zhu Y, Froicu M, Wittke A. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, and the immune system. *The American journal of clinical nutrition*. Dec 2004;80(6 Suppl):1717S-1720S.
74. Sadeghi K, Wessner B, Laggner U, et al. Vitamin D₃ down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *European journal of immunology*. Feb 2006;36(2):361-370.
75. Zugel U, Steinmeyer A, May E, Lehmann M, Asadullah K. Immunomodulation by a novel, dissociated Vitamin D analogue. *Experimental dermatology*. Jul 2009;18(7):619-627.
76. Plum LA, DeLuca HF. Vitamin D, disease and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Drug discovery*. Dec 2010;9(12):941-955.
77. Xie Z, Komuves L, Yu QC, et al. Lack of the vitamin D receptor is associated with reduced epidermal differentiation and hair follicle growth. *The Journal of investigative dermatology*. Jan 2002;118(1):11-16.
78. Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol*. Sep 1 2004;173(5):2909-2912.
79. O'Kelly J, Hisatake J, Hisatake Y, Bishop J, Norman A, Koeffler HP. Normal myelopoiesis but abnormal T lymphocyte responses in vitamin D receptor knockout mice. *The Journal of clinical investigation*. Apr 2002;109(8):1091-1099.
80. Xu H, Soruri A, Gieseler RK, Peters JH. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ exerts opposing effects to IL-4 on MHC class-II antigen expression, accessory activity, and phagocytosis of human monocytes. *Scandinavian journal of immunology*. Dec 1993;38(6):535-540.
81. Rigby WF, Stacy T, Fanger MW. Inhibition of T lymphocyte mitogenesis by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol). *The Journal of clinical investigation*. Oct 1984;74(4):1451-1455.
82. Koren R, Ravid A, Rotem C, Shohami E, Liberman UA, Novogrodsky A. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ enhances prostaglandin E₂ production by monocytes. A mechanism which partially accounts for the antiproliferative effect of 1,25(OH)₂D₃ on lymphocytes. *FEBS letters*. Sep 1 1986;205(1):113-116.
83. Coussens A, Timms PM, Boucher BJ, et al. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits matrix metalloproteinases induced by Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunology*. Aug 2009;127(4):539-548.
84. Dickie LJ, Church LD, Coulthard LR, Mathews RJ, Emery P, McDermott MF. Vitamin D₃ down-regulates intracellular Toll-like receptor 9 expression and Toll-like receptor 9-induced IL-6 production in human monocytes. *Rheumatology (Oxford)*. Aug 2010;49(8):1466-1471.
85. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*. 2002;20:197-216.
86. Wollenberg A, Kraft S, Hanau D, Bieber T. Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. *The Journal of investigative dermatology*. Mar 1996;106(3):446-453.
87. Piemonti L, Monti P, Sironi M, et al. Vitamin D₃ affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. May 1 2000;164(9):4443-4451.
88. Penna G, Adorini L. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol*. Mar 1 2000;164(5):2405-2411.
89. Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, Smiroldo S, Davalli AM, Adorini L. Regulatory T cells induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol*. Aug 15 2001;167(4):1945-1953.

90. Dam TN, Moller B, Hindkjaer J, Kragballe K. The vitamin D3 analog calcipotriol suppresses the number and antigen-presenting function of Langerhans cells in normal human skin. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research.* Apr 1996;1(1):72-77.
91. Dong X, Lutz W, Schroeder TM, et al. Regulation of relB in dendritic cells by means of modulated association of vitamin D receptor and histone deacetylase 3 with the promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* Nov 1 2005;102(44):16007-16012.
92. Pedersen AW, Holmstrom K, Jensen SS, et al. Phenotypic and functional markers for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3)-modified regulatory dendritic cells. *Clinical and experimental immunology.* Jul 2009;157(1):48-59.
93. Kragballe K, Wildfang IL. Calcipotriol (MC 903), a novel vitamin D3 analogue stimulates terminal differentiation and inhibits proliferation of cultured human keratinocytes. *Archives of dermatological research.* 1990;282(3):164-167.
94. Itin PH, Pittelkow MR, Kumar R. Effects of vitamin D metabolites on proliferation and differentiation of cultured human epidermal keratinocytes grown in serum-free or defined culture medium. *Endocrinology.* Nov 1994;135(5):1793-1798.
95. Oda Y, Ishikawa MH, Hawker NP, Yun QC, Bikle DD. Differential role of two VDR coactivators, DRIP205 and SRC-3, in keratinocyte proliferation and differentiation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* Mar 2007;103(3-5):776-780.
96. Bikle DD, Chang S, Crumrine D, et al. Mice lacking 25OHD 1alpha-hydroxylase demonstrate decreased epidermal differentiation and barrier function. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* May 2004;89-90(1-5):347-353.
97. Gurlek A, Pittelkow MR, Kumar R. Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3): implications in cell growth and differentiation. *Endocrine reviews.* Dec 2002;23(6):763-786.
98. Michel G, Gailis A, Jarzebska-Deussen B, Muschen A, Mirmohammadsadegh A, Ruzicka T. 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ and calcipotriol induce IL-10 receptor gene expression in human epidermal cells. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.].* Jan 1997;46(1):32-34.
99. Geilen CC, Bektas M, Wieder T, Kodelja V, Goerdt S, Orfanos CE. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ induces sphingomyelin hydrolysis in HaCaT cells via tumor necrosis factor alpha. *The Journal of biological chemistry.* Apr 4 1997;272(14):8997-9001.
100. Yamanaka K, Dimitroff CJ, Fuhlbrigge RC, et al. Vitamins A and D are potent inhibitors of cutaneous lymphocyte-associated antigen expression. *The Journal of allergy and clinical immunology.* Jan 2008;121(1):148-157 e143.
101. Chambers ES, Hawrylowicz CM. The impact of vitamin D on regulatory T cells. *Current allergy and asthma reports.* Feb 2011;11(1):29-36.
102. Pichler J, Gerstmayr M, Szepfalusi Z, Urbanek R, Peterlik M, Willheim M. 1 alpha,25(OH)₂D₃ inhibits not only Th1 but also Th2 differentiation in human cord blood T cells. *Pediatric research.* Jul 2002;52(1):12-18.
103. Li M, Messaddeq N, Teletin M, Pasquali JL, Metzger D, Chambon P. Retinoid X receptor ablation in adult mouse keratinocytes generates an atopic dermatitis triggered by thymic stromal lymphopoietin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* Oct 11 2005;102(41):14795-14800.
104. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol.* Nov 1 2001;167(9):4974-4980.
105. Matheu V, Back O, Mondoc E, Issazadeh-Navikas S. Dual effects of vitamin D-induced alteration of TH1/TH2 cytokine expression: enhancing IgE production and decreasing airway eosinophilia in murine allergic airway disease. *The Journal of allergy and clinical immunology.* Sep 2003;112(3):585-592.
106. D'Ambrosio D, Cippitelli M, Cocciolo MG, et al. Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *The Journal of clinical investigation.* Jan 1 1998;101(1):252-262.
107. Heine G, Anton K, Henz BM, Worm M. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits anti-CD40 plus IL-4-mediated IgE production in vitro. *European journal of immunology.* Dec 2002;32(12):3395-3404.
108. Hartmann B, Heine G, Babina M, et al. Targeting the vitamin D receptor inhibits the B cell-dependent allergic immune response. *Allergy.* Apr 2011;66(4):540-548.

109. Wjst M, Altmüller J, Faus-Kessler T, Braig C, Bahnweg M, Andre E. Asthma families show transmission disequilibrium of gene variants in the vitamin D metabolism and signalling pathway. *Respiratory research*. 2006;7:60.
110. Heine G, Niesner U, Chang HD, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells. *European journal of immunology*. Aug 2008;38(8):2210-2218.
111. DGE. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr Vitamin D. *Neuer Umschau Buchverlag, Neustadt a.d.Weinstraße*. 2012;1. Auflage; 4. korrigierter Nachdruck.
112. Herting E, VK, Gonser M., Bassler D., Hentschel R. und Groneck P. awmf-Leitlinie: Betreuung von gesunden reifen Neugeborenen in der Geburtsklinik. 2013.
113. Zittermann A. The estimated benefits of vitamin D for Germany. *Molecular nutrition & food research*. Aug 2010;54(8):1164-1171.
114. Cheng S, Massaro JM, Fox CS, et al. Adiposity, cardiometabolic risk, and vitamin D status: the Framingham Heart Study. *Diabetes*. Jan 2010;59(1):242-248.
115. Darsow U, Wollenberg A, Simon D, et al. ETFAD/EADV eczema task force 2009 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. Mar 2010;24(3):317-328.
116. Consortium TIH. The International HapMap Project. *Nature*. Dec 18 2003;426(6968):789-796.
117. Chang HD, Helbig C, Tykocinski L, et al. Expression of IL-10 in Th memory lymphocytes is conditional on IL-12 or IL-4, unless the IL-10 gene is imprinted by GATA-3. *European journal of immunology*. Mar 2007;37(3):807-817.
118. Bratton DL, Hamid Q, Boguniewicz M, Doherty DE, Kailey JM, Leung DY. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor contributes to enhanced monocyte survival in chronic atopic dermatitis. *The Journal of clinical investigation*. Jan 1995;95(1):211-218.
119. Lee Y, Inaba M, DeLuca HF, Mellon WS. Immunological identification of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human promyelocytic leukemic cells (HL-60) during homologous regulation. *The Journal of biological chemistry*. Aug 15 1989;264(23):13701-13705.
120. Bendtzen K. Interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. *Immunology letters*. Nov 1988;19(3):183-191.
121. Bender BG, Ballard R, Canono B, Murphy JR, Leung DY. Disease severity, scratching, and sleep quality in patients with atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Mar 2008;58(3):415-420.
122. Rystedt I. Prognostic factors in atopic dermatitis. *Acta dermato-venereologica*. 1985;65(3):206-213.
123. Daley D, Lemire M, Akhbar L, et al. Analyses of associations with asthma in four asthma population samples from Canada and Australia. *Human genetics*. May 2009;125(4):445-459.
124. Ramos-Lopez E, Kuryłowicz A, Bednarczyk T, Paunkovic J, Seidl C, Badenhop K. Vitamin D receptor polymorphisms are associated with Graves' disease in German and Polish but not in Serbian patients. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. Oct 2005;15(10):1125-1130.
125. Ingles SA, Haile RW, Henderson BE, et al. Strength of linkage disequilibrium between two vitamin D receptor markers in five ethnic groups: implications for association studies. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. Feb 1997;6(2):93-98.
126. Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, van Leeuwen H, Pols HA. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. May 2004;89-90(1-5):187-193.
127. Jones AP, Tulic MK, Rueter K, Prescott SL. Vitamin D and allergic disease: sunlight at the end of the tunnel? *Nutrients*. Jan 2012;4(1):13-28.
128. Bisgaard H, Simpson A, Palmer CN, et al. Gene-environment interaction in the onset of eczema in infancy: filaggrin loss-of-function mutations enhanced by neonatal cat exposure. *PLoS medicine*. Jun 24 2008;5(6):e131.
129. Veldman CM, Cantorna MT, DeLuca HF. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Archives of biochemistry and biophysics*. Feb 15 2000;374(2):334-338.
130. Carling T, Rastad J, Akerstrom G, Westin G. Vitamin D receptor (VDR) and parathyroid hormone messenger ribonucleic acid levels correspond to polymorphic VDR alleles in human parathyroid tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. Jul 1998;83(7):2255-2259.

131. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*. Jan 20 1994;367(6460):284-287.
132. Muller K, Haahr PM, Diamant M, Rieneck K, Kharazmi A, Bendtzen K. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits cytokine production by human blood monocytes at the post-transcriptional level. *Cytokine*. Nov 1992;4(6):506-512.
133. Stubbs JR, Idiculla A, Slusser J, Menard R, Quarles LD. Cholecalciferol supplementation alters calcitriol-responsive monocyte proteins and decreases inflammatory cytokines in ESRD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. Feb 2010;21(2):353-361.
134. Rook GA, Taverne J, Leveton C, Steele J. The role of gamma-interferon, vitamin D3 metabolites and tumour necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology*. Oct 1987;62(2):229-234.
135. Abu-Amer Y, Bar-Shavit Z. Regulation of TNF-alpha release from bone marrow-derived macrophages by vitamin D. *Journal of cellular biochemistry*. Aug 1994;55(4):435-444.
136. Verbeek W, Gombart AF, Shiohara M, Campbell M, Koeffler HP. Vitamin D receptor: no evidence for allele-specific mRNA stability in cells which are heterozygous for the Taq I restriction enzyme polymorphism. *Biochemical and biophysical research communications*. Sep 8 1997;238(1):77-80.
137. Carling T, Ridefelt P, Hellman P, Rastad J, Akerstrom G. Vitamin D receptor polymorphisms correlate to parathyroid cell function in primary hyperparathyroidism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. Jun 1997;82(6):1772-1775.
138. Ryan C, Renfro L, Collins P, Kirby B, Rogers S. Clinical and genetic predictors of response to narrowband ultraviolet B for the treatment of chronic plaque psoriasis. *The British journal of dermatology*. Nov 2010;163(5):1056-1063.
139. Halsall JA, Osborne JE, Pringle JH, Hutchinson PE. Vitamin D receptor gene polymorphisms, particularly the novel A-1012G promoter polymorphism, are associated with vitamin D3 responsiveness and non-familial susceptibility in psoriasis. *Pharmacogenetics and genomics*. May 2005;15(5):349-355.
140. Saeki H, Asano N, Tsunemi Y, et al. Polymorphisms of vitamin D receptor gene in Japanese patients with psoriasis vulgaris. *Journal of dermatological science*. Nov 2002;30(2):167-171.
141. Tajouri L, Ovcacic M, Curtain R, et al. Variation in the vitamin D receptor gene is associated with multiple sclerosis in an Australian population. *Journal of neurogenetics*. Jan-Mar 2005;19(1):25-38.
142. Panierakis C, Goulielmos G, Mamoulakis D, Petraki E, Papavasiliou E, Galanakis E. Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Crete, Greece. *Clin Immunol*. Nov 2009;133(2):276-281.
143. Sainz J, Van Tornout JM, Loro ML, Sayre J, Roe TF, Gilsanz V. Vitamin D-receptor gene polymorphisms and bone density in prepubertal American girls of Mexican descent. *The New England journal of medicine*. Jul 10 1997;337(2):77-82.
144. Bell NH, Morrison NA, Nguyen TV, Eisman J, Hollis BW. ApaI polymorphisms of the vitamin D receptor predict bone density of the lumbar spine and not racial difference in bone density in young men. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. Feb 2001;137(2):133-140.
145. Luo XY, Yang MH, Wu FX, et al. Vitamin D receptor gene BsmI polymorphism B allele, but not BB genotype, is associated with systemic lupus erythematosus in a Han Chinese population. *Lupus*. Jan 2012;21(1):53-59.
146. Howard G, Nguyen T, Morrison N, et al. Genetic influences on bone density: physiological correlates of vitamin D receptor gene alleles in premenopausal women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. Sep 1995;80(9):2800-2805.
147. Suh KT, Eun IS, Lee JS. Polymorphism in vitamin D receptor is associated with bone mineral density in patients with adolescent idiopathic scoliosis. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*. Sep 2010;19(9):1545-1550.
148. Kiel DP, Myers RH, Cupples LA, et al. The BsmI vitamin D receptor restriction fragment length polymorphism (bb) influences the effect of calcium intake on bone mineral density. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. Jul 1997;12(7):1049-1057.
149. Torres C, Sanchez de la Torre M, Garcia-Moruja C, et al. Immunophenotype of vitamin D receptor polymorphism associated to risk of HIV-1 infection and rate of disease progression. *Current HIV research*. Sep 2010;8(6):487-492.

150. Graafmans WC, Lips P, Ooms ME, van Leeuwen JP, Pols HA, Uitterlinden AG. The effect of vitamin D supplementation on the bone mineral density of the femoral neck is associated with vitamin D receptor genotype. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. Aug 1997;12(8):1241-1245.
151. Mocharla H, Butch AW, Pappas AA, et al. Quantification of vitamin D receptor mRNA by competitive polymerase chain reaction in PBMC: lack of correspondence with common allelic variants. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. May 1997;12(5):726-733.
152. Jenab M, McKay J, Bueno-de-Mesquita HB, et al. Vitamin D receptor and calcium sensing receptor polymorphisms and the risk of colorectal cancer in European populations. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. Sep 2009;18(9):2485-2491.
153. Weiland SK, Husing A, Strachan DP, Rzehak P, Pearce N. Climate and the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinitis, and atopic eczema in children. *Occupational and environmental medicine*. Jul 2004;61(7):609-615.
154. Byremo G, Rod G, Carlsen KH. Effect of climatic change in children with atopic eczema. *Allergy*. Dec 2006;61(12):1403-1410.
155. Oren E, Banerji A, Camargo CA, Jr. Vitamin D and atopic disorders in an obese population screened for vitamin D deficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*. Feb 2008;121(2):533-534.
156. Baek JH, Shin YH, Chung IH, et al. The Link between Serum Vitamin D Level, Sensitization to Food Allergens, and the Severity of Atopic Dermatitis in Infancy. *The Journal of pediatrics*. Oct 2014;165(4):849-854 e841.
157. Vassallo MF, Camargo CA, Jr. Potential mechanisms for the hypothesized link between sunshine, vitamin D, and food allergy in children. *The Journal of allergy and clinical immunology*. Aug 2010;126(2):217-222.
158. Jones AP, Palmer D, Zhang G, Prescott SL. Cord blood 25-hydroxyvitamin D3 and allergic disease during infancy. *Pediatrics*. Nov 2012;130(5):e1128-1135.
159. Peroni DG, Piacentini GL, Cametti E, Chinellato I, Boner AL. Correlation between serum 25-hydroxyvitamin D levels and severity of atopic dermatitis in children. *The British journal of dermatology*. May 2011;164(5):1078-1082.
160. Wjst M. Introduction of oral vitamin D supplementation and the rise of the allergy pandemic. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*. Dec 2009;5(1):8.
161. Gale CR, Robinson SM, Harvey NC, et al. Maternal vitamin D status during pregnancy and child outcomes. *European journal of clinical nutrition*. Jan 2008;62(1):68-77.
162. Back O, Blomquist HK, Hernell O, Stenberg B. Does vitamin D intake during infancy promote the development of atopic allergy? *Acta dermato-venereologica*. 2009;89(1):28-32.
163. Hypponen E, Sovio U, Wjst M, et al. Infant vitamin d supplementation and allergic conditions in adulthood: northern Finland birth cohort 1966. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Dec 2004;1037:84-95.
164. Rothers J, Wright AL, Stern DA, Halonen M, Camargo CA, Jr. Cord blood 25-hydroxyvitamin D levels are associated with aeroallergen sensitization in children from Tucson, Arizona. *The Journal of allergy and clinical immunology*. Nov 2011;128(5):1093-1099 e1091-1095.
165. Darsow U, Wollenberg A, Simon D, et al. Difficult to control atopic dermatitis. *The World Allergy Organization journal*. 2013;6(1):6.
166. Breuer K, S HA, Kapp A, Werfel T. Staphylococcus aureus: colonizing features and influence of an antibacterial treatment in adults with atopic dermatitis. *The British journal of dermatology*. Jul 2002;147(1):55-61.
167. Li M, Hener P, Zhang Z, Kato S, Metzger D, Chambon P. Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Aug 1 2006;103(31):11736-11741.
168. van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. Oct 2005;97(1-2):93-101.
169. Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S, et al. Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *The Journal of clinical investigation*. Jan 2006;116(1):146-155.

170. Ginde AA, Mansbach JM, Camargo CA, Jr. Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Archives of internal medicine*. Feb 23 2009;169(4):384-390.
171. Nnoaham KE, Clarke A. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *International journal of epidemiology*. Feb 2008;37(1):113-119.
172. Samochocki Z, Bogaczewicz J, Jeziorkowska R, et al. Vitamin D effects in atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Aug 2013;69(2):238-244.
173. Javanbakht MH, Keshavarz SA, Djalali M, et al. Randomized controlled trial using vitamins E and D supplementation in atopic dermatitis. *The Journal of dermatological treatment*. Jun 2011;22(3):144-150.
174. Amestejani M, Salehi BS, Vasigh M, et al. Vitamin D supplementation in the treatment of atopic dermatitis: a clinical trial study. *Journal of drugs in dermatology : JDD*. Mar 2012;11(3):327-330.
175. Camargo CA, Jr., Ganmaa D, Sidbury R, Erdenedelger K, Radnaakhand N, Khandsuren B. Randomized trial of vitamin D supplementation for winter-related atopic dermatitis in children. *The Journal of allergy and clinical immunology*. Oct 2014;134(4):831-835 e831.
176. Hartmann B, Riedel R, Jorss K, et al. Vitamin D receptor activation improves allergen-triggered eczema in mice. *The Journal of investigative dermatology*. Feb 2012;132(2):330-336.
177. Sidbury R, Sullivan AF, Thadhani RI, Camargo CA, Jr. Randomized controlled trial of vitamin D supplementation for winter-related atopic dermatitis in Boston: a pilot study. *The British journal of dermatology*. Jul 2008;159(1):245-247.
178. Hata TR, Kotol P, Jackson M, et al. Administration of oral vitamin D induces cathelicidin production in atopic individuals. *The Journal of allergy and clinical immunology*. Oct 2008;122(4):829-831.
179. Hata TR, Audish D, Kotol P, et al. A randomized controlled double-blind investigation of the effects of vitamin D dietary supplementation in subjects with atopic dermatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. May 3 2013.
180. Bieber T. Atopic dermatitis 2.0: from the clinical phenotype to the molecular taxonomy and stratified medicine. *Allergy*. Dec 2012;67(12):1475-1482.
181. Gapska P, Scott RJ, Serrano-Fernandez P, et al. Vitamin D receptor variants and the malignant melanoma risk: a population-based study. *Cancer epidemiology*. Aug 2009;33(2):103-107.
182. Martin RJ, McKnight AJ, Patterson CC, Sadlier DM, Maxwell AP. A rare haplotype of the vitamin D receptor gene is protective against diabetic nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. Feb 2010;25(2):497-503.
183. Dogan I, Onen HI, Yurdakul AS, et al. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and risk of lung cancer. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. Aug 2009;15(8):BR232-242.
184. Agliardi C, Guerini FR, Saresella M, et al. Vitamin D receptor (VDR) gene SNPs influence VDR expression and modulate protection from multiple sclerosis in HLA-DRB1*15-positive individuals. *Brain, behavior, and immunity*. Oct 2011;25(7):1460-1467.
185. Hama T, Norizoe C, Suga H, et al. Prognostic significance of vitamin D receptor polymorphisms in head and neck squamous cell carcinoma. *PloS one*. 2011;6(12):e29634.

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1: schematischer Aufbau der Epidermis	8
Abb. 2: gestörte Barrierefunktion der Haut bei AD	8
Abb. 3: Circulus vitiosus in der Pathogenese der AD	9
Abb. 4: Differenzierung der TH-Zellen.	11
Abb. 5: Ätiologie der extrinsischen AD.....	12
Abb. 6: Schematische Darstellung des Vitamin D3-Metabolismus.....	15
Abb. 7: Wirkungsweise des VD-VDR-Komplexes (1).	16
Abb. 8: Wirkungsweise des VD-VDR-Komplexes (2).	17
Abb. 9: Vitamin-D-Rezeptor-Gen mit untersuchten SNPs.	19
Abb. 10: Schmelzkurvenanalyse der VDR-SNP Genotypen.	31
Abb. 11: Beispielbilder der Gelelektrophorese.	33
Abb. 12: Restriktionsstellen der Restriktionsendonukleasen.....	33
Abb. 13: Versuchsablauf.	35
Abb. 14: D' der VDR-SNPs <i>fokl</i> , <i>bsml</i> , <i>apal</i> und <i>taql</i>	45
Abb. 15: Durchflusszytometrie zur Reinheitsbestimmung der CD14-Fraktion	49
Abb. 16: Quantifizierung der VDR-mRNA in Monozyten mit unterschiedlichen Haplotypen.	50
Abb. 17: Quantifizierung der CYP27B1-mRNA in Monozyten mit unterschiedlichen Haplotypen.	51
Abb. 18: Quantifizierung der CYP24A1-mRNA in Monozyten mit unterschiedlichen Haplotypen.	52
Abb. 19: Quantifizierung der LL37-mRNA in Monozyten mit unterschiedlichen Haplotypen.....	53
Abb. 20: TNF α -Konzentration in Monozyten unterschiedlicher Haplotypen.....	54
Abb. 21: IL6-Konzentration in Monozyten unterschiedlicher Haplotypen (1).	54

Tabellen

Tab. 1: Nomenklatur der VDR-Polymorphismen.	29
Tab. 2: Primersequenzen und PCR-Bedingungen.	29
Tab. 3: Sequenzen der Sonden für RT-PCR.....	30
Tab. 4: Reaktionsansatz der RT-PCR.....	30
Tab. 5: Programmablauf der RT-PCR.....	30
Tab. 6: Temperaturmaxima der Schmelzkurvenanalyse. [°C].....	31
Tab. 7: Reaktionsansatz der PCR (RFLP).	32
Tab. 8: Restriktionsenzyme und RFLP-Produktlänge.	33
Tab. 9: Primersequenzen für quantitative RT-PCR.....	37
Tab. 10: Programmablauf der quantitativen RT-PCR	37
Tab. 11: Effizienz der quantitativen RT-PCR	38
Tab. 12: Klinische Daten der Studienpopulationen.	40
Tab. 13: Allel- und Genotyphäufigkeiten in der Kontrollgruppe verglichen mit der AD-Kohorte der AD-Teilgruppe mit schweren Verläufen.	42
Tab. 14: Häufigkeiten von homozygoten Mutationen und Wildtypen in der Kontrollgruppe verglichen mit der AD-Kohorte und der AD-Teilgruppe mit schweren Verläufen.	44
Tab. 15: Haplotypenverteilung in der Kontrollgruppe im Vergleich zur gesamten AD-Kohorte und zur AD-Teilgruppe mit schweren Verläufen.	46
Tab.A 1: Reagenzien	76
Tab.A 2: Pufferlösungen.....	77
Tab.A 3: Antikörper und Standards	77
Tab.A 4: Kits	77
Tab.A 5: Geräte	78
Tab.A 6: Software und Datenbanken	79
Tab.A 7: D' (r ²) der VDR-SNPs mit Beispielen anderer Studien.	80
Tab.A 8: Häufigkeit der VDR-SNPs in anderen Studien.	80
Tab.A 9: Studien zum VDR-SNP <i>taql</i>	81
Tab.A 10: Studien zum VDR-SNP <i>apal</i>	82
Tab.A 11: Studien zum VDR-SNP <i>bsml</i>	83
Tab.A 12: Studien zum VDR-SNP <i>fokl</i>	84

8. Abkürzungsverzeichnis

25(OH)D	Calcidiol; 25-Hydroxy-Vitamin-D ₃
AD	atopische Dermatitis
AMP	antimikrobielles Peptid
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
CD	Oberflächenprotein (Cluster of differentiation)
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Fcε-RI	hochaffiner IgE-Rezeptor
GM-CSF	Granulozyten/ Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor)
HBD	humanes β-Defensin
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
MACS	magnetic-absorbent-cell-sorting-system
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
nVDRE	negatives Vitamin-D-responsive-Element
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PRR	Pattern-Recognition Receptor
PTH	Parathormon
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (restriction fragment length polymorphism)
RT-PCR	Echtzeit-PCR (Real-Time PCR)
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SCORAD	Diagnoseschema: SCORing Atopic Dermatitis
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism)
TH-Zelle	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
VD	Vitamin D; 1α,25-Dihydroxy-Vitamin-D ₃ (1,25(OH) ₂ D ₃). Bei Serumspiegeln 25(OH)D
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VDRE	Vitamin-D-responsives-Element

9. Anhang

Tab.A 1: **Reagenzien**

BSA, Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin); ELISA, Enzyme linked immunosorbent assay; FCS, fetales Kälberserum (fetal calf serum); MACS, magnetic-absorbent-cell-sorting-system; RFLP, restriction fragment length polymorphism; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction.

Produkt	Hersteller	Kat.-Nr.
Aqua B.Braun Ecotainer®	B. Braun Melsungen AG, Melsungen	
<u>Blutentnahme</u>		
BD Vacutainer® EDTA Tube	BD, Plymouth, UK	367835
BD Vacutainer® Safety-Lok™	BD, Plymouth, UK	367281
Blood Collection Set (sterile Punktionskanüle)		
<u>PRC/ RFLP</u>		
FIREPol® DNA Polymerase	Solis Biodyne, Wien, AU	08-13-0000S
dNTP MIX (20 mM of each)	Solis Biodyne, Wien, AU	02-31-00020
10x Reaction Buffer BD	Solis Biodyne, Wien, AU	
MgCl ₂	Solis Biodyne, Wien, AU	
FokI	New England BioLabs Inc., Frankfurt am Main	R0109L
Mva1269I (BsmI)	Fermentas, St. Leon-Rot	ER0962
Apal	Fermentas, St. Leon-Rot	ER1411
TaqI	Fermentas, St. Leon-Rot	ER0671
<u>Gelelektrophorese</u>		
GelRed™ Nuclein Acid Gel Stain	Biotium®, Hayward, USA	41003
Sea Kem® LE Agarose	Lonza - Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf	50004
O'Gene Ruler™ DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot	SM1173
<u>PCR (Schmelzkurvenanalyse)</u>		
BSA	New England BioLabs Inc., Frankfurt am Main	B9001S
Primer und Sonden	TIB Molbiol, Berlin; BioTeZ, Berlin	-
<u>RT-PCR</u>		
SYBR® Green PCR Master Mix	Roche, Mannheim	4364344
<u>Zellkultur</u>		
RPMI 1640	Gibco BRL Life Technologies, Darmstadt	31870-074
Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, AU	
L-Glutamin	Biochrom KG	K 0282
Penicillin/Streptomycin	Biochrom KG, Berlin	A 2210
LSM 1077 Lymphocyte	PAA Laboratories, Pasching, AU	J15-004
FCS	PAA Laboratories, Pasching, AU	A15-151
FCS	Biochrom KG	
PBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	PAA, Pasching, AU	H15-002
β-Mercapto-Ethanol	SigmaAldrich, Hamburg	M7522-250ML
<u>MACS</u>		
MACS® CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach	130-050-201
<u>Stimulation</u>		
Calcitriol (1,25(OH) ₂ VD)	Fluka, Dreieich	D1530-10UG
Pam3-Cys	EMC microcollections, Tübingen	L2000
<u>ELISA</u>		
ELISA-Plate Microlon 96k	Greiner Bio-one, Frickenhausen	675001
Tween® 20	Roth, Karlsruhe	9127.1
TMB Substrat Solution	eBioscience, Frankfurt	00-4201-56

Tab.A 2: **Pufferlösungen**

ELISA, Enzyme linked immunosorbent assay.

Puffer	Zusammensetzung
ELISA Pufferlösung	0,1 M NaHCO ₃ ; pH=8,2
PBS Waschpuffer (für ELISA)	1x PBS + 0,05 % Tween 20
TBE (1x)	89 mM TRIS + 89 mM Borsäure + 2 mM EDAT-Na ₂

Tab.A 3: **Antikörper und Standards**

CD, Cluster of differentiation; IL, Interleukin; TNF, Tumornekrosefaktor.

Zielantigen / Protein	Spezies	Hersteller	Kat.-nr.
CD14 (FITC)	human	BD Pharming™, Heidelberg	555397
CD3 (PE)	human	BD Pharming™, Heidelberg	555340
CD19 (Cy5)	human	BD Pharming™, Heidelberg	555414
TNFα capture	human	BD Pharming™, Heidelberg	551220
TNFα Detection	human	BD Pharming™, Heidelberg	554511
TNFα Standard	human	BD Pharming™, Heidelberg	554618
IL6 capture	human	BD Pharming™, Heidelberg	554543
IL6 Detection	human	BD Pharming™, Heidelberg	554546
IL6 Standard	human	BD Pharming™, Heidelberg	550071

Tab.A 4: **Kits**

Name	Hersteller	Kat.-Nr.
E.Z.N.A. Blood DNA Kit	Omega Bio-tek, GA, USA	D3392-02
Qiagen Blood DNA Kit	Qiagen, Hilden	51104
NucleoSpin RNA II	Macherey and Nagel, Düren	740955.250
High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt	4368814

Tab.A 5: **Geräte**

ELISA, Enzyme linked immunosorbent assay; FACS, Fluorescence-activated cell sorting; MACS, magnetic-absorbent-cell-sorting-system.

Gerät / Name	Hersteller
<u>Zentrifugen</u>	
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge / Eppendorf Centrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg
Laborzentrifuge / Avanti™ 30 Centrifuge	Beckmann, Krefeld
<u>ELISA/Photometer</u>	
SPECTRAFLOUR Plus	Tecan, Männedorf, CH
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Nano Drop 1000	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
<u>Automatisierte Geräte</u>	
Light Cycler® II	Roche, Mannheim
Light Cycler® 480	Roche, Mannheim
Biometra T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
<u>Waage</u>	
Kern 822	Kern, Balingen
<u>Lichtmikroskop</u>	
WILOVERT 30	Helmut Hund, Wetzlar
<u>Inkubator (Hybridisierungssofen)</u>	
Mini Oven MK II	MWG Biotech, Ebersberg
<u>Gelelektrophorese</u>	
Electrophoresis Power Supply ST305	Life Technologies, Darmstadt
Gelelektrophorese-Kammer	Biozym Diagnostik, Oldenburg
G:Box	Syngene - Synoptics Group, Cambridge, UK
<u>MACS</u>	
autoMACS® Pro Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
<u>Zellkultur</u>	
Sicherheitswerkbank	
Hera Safe	Hera instruments, VWR, Dresden
Antair BSK	Anthos Microsystems, Krefeld
Absaugpumpe	KNF Neuberger, Freiburg
Zählkammer: Neubauer-improved (0610030)	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen
<u>FACS</u>	
BD FACScalibur™ Durchflusszytometer	BD, Heidelberg
<u>sonstiges</u>	
Heracell 150 (CO ₂ Inkubator, Brutschrank)	Thermo scientific, Bonn
Micro-Chef FM A 935Q	Moulinex, Offenbach
Pipetten	Eppendorf, Hamburg

Tab.A 6: **Software und Datenbanken**

ELISA, Enzyme linked immunosorbent assay; FACS, Fluorescence-activated cell sorting; RT-PCR, real-time polymerase chain reaction.

Name (Datum)	Hersteller	Verwendung
BD CellQuest™ Pro Software	BD, Heidelberg	FACS Analyse
Endnote X5	http://endnote.com/	Referenzmanager
FCS express V3 software	DeNovo, CA, USA	FACS Analyse
GeneSnap 7.02	Syngene - Synoptics Group, Cambridge, UK	Fotos der Gelelektrophorese Grafikerstellung;
Graphpad Prism 5.01	Graphpad Software Inc	Statistische Auswertung
Haploview 4.2 (29.04.2008)	Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ www.broadinstitute.org/haploview	Kopplungs- und Haplotypenanalyse
HapMap	International HapMap Project	SNP Informationen
LightCycler®480 Software 1.5.0.39	Roche, Mannheim	Auswertung der RT-PCR
Magellan 3 V 3.00.12	Tecan, Männedorf	ELISA Auswertung
MS Office 2003 (Word, Excel, Powerpoint)	Microsoft Inc.	Datenerfassung /-analyse, Textverarbeitung, Grafikerstellung
PubMed www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed	NCBI, National Center for Biotechnology	Literaturrecherche
SISA quantitative skills	Simple Interactive Statistical Analysis http://www.quantitativeskills.com	Statistische Analyse
SKETCHElv1.51 (30.03.2011)	Molecule drawing tool www.gnu.org	Strukturformeln
SPSS 19.0.0.1	IBM SPSS Inc, Chicago, Ill	Statistische Analyse
XLSTAT	http://www.xlstat.com	Statistische Analyse

Tab.A 7: **D' (r²) der VDR-SNPs mit Beispielen anderer Studien.**
 SNP, Single nucleotide Polymorphism; VDR, Vitamin-D-Rezeptor.

		vor- liegende Arbeit, DE (n=530)	¹⁸¹ , PL (n= 2303)	¹⁸² , GB (n=1329)	⁶⁷ , CA (n=1139)	⁶⁹ , US (n=582 Familien)	¹⁸³ , TR (n=294)	¹⁸⁴ , SA (n=627)	¹⁸⁵ , JP (n=205)
SNP1	SNP 2	D' (r ²)	D'	D'	D'	r ²	D'	r ²	D'
<i>fokI</i>	<i>bsml</i>	12 (0)	3	6	17	0	-	0	4
<i>fokI</i>	<i>apal</i>	4 (0)	-	2	27	0	-	0	11
<i>fokI</i>	<i>taqI</i>	11 (0)	0	0	19	0	-	0	26
<i>bsml</i>	<i>apal</i>	99 (57)	-	74	99	>70	92	41	38
<i>bsml</i>	<i>taqI</i>	98 (91)	96	76	100	>70	88	84	23
<i>apal</i>	<i>taqI</i>	99 (54)	-	97	97	>70	93	44	78

Tab.A 8: **Häufigkeit der VDR-SNPs in anderen Studien.**

in %. RFLP, restriction fragment length polymorphism; n, Probandenzahl; SNP, Single nucleotide Polymorphism; VDR, Vitamin-D Rezeptor.

Studie (Autor; Jahr)	Methode	GCT	AAC	GAT	AAT	Land	n
vorliegende Arbeit	Haploview	44,6	41,0	12,6	1,6	DE	265
Review							
Uitterlinden, A. G., Y. Fang, J. B. van Meurs, H. van Leeuwen and H. A. Pols (2004). "Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states." <i>J Steroid Biochem Mol Biol</i> 89-90 (1-5): 187-193.	-	43,0	39,0	11,0	-	-	?
Martin, R. J., A. J. McKnight, C. C. Patterson, D. M. Sadlier and A. P. Maxwell (2010). "A rare haplotype of the vitamin D receptor gene is protective against diabetic nephropathy." <i>Nephrol Dial Transplant</i> 25 (2): 497-503.		39,8	32,0	13,2	2,4	GB	674
Beydoun, M. A., E. L. Ding, H. A. Beydoun, T. Tanaka, L. Ferrucci and A. B. Zonderman (2012). "Vitamin D receptor and megalin gene polymorphisms and their associations with longitudinal cognitive change in US adults." <i>Am J Clin Nutr</i> 95 (1): 163-178.	SNPHAP	45,6	40,5	13,5	-	US	702
Poon, A. H., C. Laprise, M. Lemire, A. Montpetit, D. Sinnett, E. Schurr and T. J. Hudson (2004). "Association of vitamin D receptor genetic variants with susceptibility to asthma and atopy." <i>Am J Respir Crit Care Med</i> 170 (9): 967-973.	Haploview	44,8	39,0	14,0	-	CA	1139 (ges.)
Dogan, I., H. I. Onen, A. S. Yurdakul, E. Konac, C. Ozturk, A. Varol and A. Ekmekci (2009). "Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and risk of lung cancer." <i>Med Sci Monit</i> 15 (8): BR232-242.	Haploview	36,1	39,6	18,0	4,0	TR	156
Penna-Martinez, M., E. Ramos-Lopez, J. Stern, N. Hinsch, M. L. Hansmann, I. Selinski, F. Grunwald, C. Vorlander, R. A. Wahl, W. O. Bechstein, S. Zeuzem, K. Holzer and K. Badenhop (2009). "Vitamin D receptor polymorphisms in differentiated thyroid carcinoma." <i>Thyroid</i> 19 (6): 623-628.	Haploview	36,8	35,5	12,5	7,0	DE	321
Uitterlinden, A. G., H. A. Pols, H. Burger, Q. Huang, P. L. Van Daele, C. M. Van Duijn, A. Hofman, J. C. Birkenhager and J. P. Van Leeuwen (1996). "A large-scale population-based study of the association of vitamin D receptor gene polymorphisms with bone mineral density." <i>J Bone Miner Res</i> 11 (9): 1241-1248.	kombinierter RFLP	47,7	40,4	10,9	-	NL	1782

Tab.A 9: **Studien zum VDR-SNP taql.**

(Stand 04/2012).n, Probandenzahl (in Fallgruppe).

AD, atopische Dermatitis; SNP, Single nucleotide Polymorphism; VDR, Vitamin-D-Rezeptor.

Allel [X] / Genotyp [XX]	Assoziierte Erkrankung	n	Land	Studie
C; CC	protektiv für AD	265	DE	vorliegende Arbeit
T	allergisches Asthma, Atopie	367	CA	Poon AH, Laprise C, Lemire M, et al. Association of vitamin D receptor genetic variants with susceptibility to asthma and atopy. <i>American journal of respiratory and critical care medicine</i> 2004; 170 (9): 967-73.
TT	Chronische Periodonitis	1338	CN	Deng H, Liu F, Pan Y, Jin X, Wang H, Cao J. Bsm1, Taql, Apal, and FokI polymorphisms in the vitamin D receptor gene and periodontitis: a meta-analysis of 15 studies including 1338 cases and 1302 controls. <i>Journal of clinical periodontology</i> 2011; 38 (3): 199-207.
CC	Morbus Crohn	245	GB	Simmons JD, Mullighan C, Welsh KI, Jewell DP. Vitamin D receptor gene polymorphism: association with Crohn's disease susceptibility. <i>Gut</i> 2000; 47 (2): 211-4.
T/TT	Diabetes mellitus Typ I	100	GR	Panierakis C, Goulielmos G, Mamoulakis D, Petraki E, Papavasiliou E, Galanakis E. Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Crete, Greece. <i>Clin Immunol</i> 2009; 133 (2): 276-81.
TT	Diabetes mellitus Typ I	75	DE	Fassbender WJ, Goertz B, Weismuller K, et al. VDR gene polymorphisms are overrepresented in german patients with type 1 diabetes compared to healthy controls without effect on biochemical parameters of bone metabolism. <i>Hormone and metabolic research</i> 2002; 34 (6): 330-7.
C	Multiple Sklerose	104	AU	Tajouri, L., M. Ovcaric, R. Curtain, M. P. Johnson, L. R. Griffiths, P. Csurhes, M. P. Pender and R. A. Lea (2005). "Variation in the vitamin D receptor gene is associated with multiple sclerosis in an Australian population." <i>J Neurogenet</i> 19 (1): 25-38.
C	Prostatakrebs	550	GB	Bonilla C, Hooker S, Mason T, Bock CH, Kittles RA. Prostate cancer susceptibility Loci identified on chromosome 12 in African Americans. <i>PloS one</i> 2011; 6 (2): e16044.
T	Brustkrebs	549	ES	Barroso E, Fernandez LP, Milne RL, et al. Genetic analysis of the vitamin D receptor gene in two epithelial cancers: melanoma and breast cancer case-control studies. <i>BMC cancer</i> 2008; 8 : 385.
TT	Lungenkrebs	137	TR	Dogan I, Onen HI, Yurdakul AS, et al. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and risk of lung cancer. <i>Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research</i> 2009; 15 (8): BR232-42.
CC	frühere chirurgische Menopause	153	US	Dvornyk V, Long JR, Liu PY, Shen H, Recker RR, Deng HW. Polymorphisms of the vitamin D receptor gene predict the onset of surgical menopause in Caucasian females. <i>Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology</i> 2006; 22 (10): 552-6.
T	Psoriasis vulgaris	115	JP	Saeki H, Asano N, Tsunemi Y, et al. Polymorphisms of vitamin D receptor gene in Japanese patients with psoriasis vulgaris. <i>Journal of dermatological science</i> 2002; 30 (2): 167-71.

Tab.A 10: **Studien zum VDR-SNP apal.**

(Stand 04/2012).

AD, atopische Dermatitis; n, Probandenzahl (in Fallgruppe); SNP, Single nucleotide Polymorphism; VDR, Vitamin D Rezeptor.

Allel [X] / Genotyp [XX]	Assoziierte Erkrankung	n	Land	Studie
A; AA	protektiv für AD	265	DE	vorliegende Arbeit
C	Allergisches Astma, Atopie	367	CA	Poon AH, Laprise C, Lemire M, et al. Association of vitamin D receptor genetic variants with susceptibility to asthma and atopy. <i>American journal of respiratory and critical care medicine</i> 2004; 170 (9): 967-73.
C	Allergisches Asthma	582	US	Raby BA, Lazarus R, Silverman EK, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with childhood and adult asthma. <i>American journal of respiratory and critical care medicine</i> 2004; 170 (10): 1057-65.
C	Allergisches Asthma	567	CN	Saadi A, Gao G, Li H, Wei C, Gong Y, Liu Q. Association study between vitamin D receptor gene polymorphisms and asthma in the Chinese Han population: a case-control study. <i>BMC medical genetics</i> 2009; 10 : 71.
C	verminderte Knochenmineralisierung	100	US	Sainz J, Van Tornout JM, Loro ML, Sayre J, Roe TF, Gilsanz V. Vitamin D-receptor gene polymorphisms and bone density in prepubertal American girls of Mexican descent. <i>The New England journal of medicine</i> 1997; 337 (2): 77-82.
CC	Verminderte Knochenmineralisierung	83	US	Bell, N. H., N. A. Morrison, T. V. Nguyen, J. Eisman and B. W. Hollis (2001). "Apal polymorphisms of the vitamin D receptor predict bone density of the lumbar spine and not racial difference in bone density in young men." <i>J Lab Clin Med</i> 137 (2): 133-140.
A	lumbale Bandscheiben degeneration	178	CN	Yuan HY, Tang Y, Liang YX, et al. Matrix metalloproteinase-3 and vitamin d receptor genetic polymorphisms, and their interactions with occupational exposure in lumbar disc degeneration. <i>Journal of occupational health</i> 2010; 52 (1): 23-30.
?	Geburtsgewicht	138	US	Swamy GK, Garrett ME, Miranda ML, Ashley-Koch AE. Maternal vitamin D receptor genetic variation contributes to infant birthweight among black mothers. <i>American journal of medical genetics Part A</i> 2011; 155A (6): 1264-71.
A/AA	Diabetes mellitus Typ I	100	GR	Panierakis C, Goulielmos G, Mamoulakis D, Petraki E, Papavasiliou E, Galanakis E. Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Crete, Greece. <i>Clin Immunol</i> 2009; 133 (2): 276-81.
AA	Chronische Periodontitis	1338	CN	Deng H, Liu F, Pan Y, Jin X, Wang H, Cao J, Bsmi, Taql, Apal, and Fokl polymorphisms in the vitamin D receptor gene and periodontitis: a meta-analysis of 15 studies including 1338 cases and 1302 controls. <i>Journal of clinical periodontology</i> 2011; 38 (3): 199-207.
C	Follikulärer Schilddrüsenkrebs	40	DE	Penna-Martinez M, Ramos-Lopez E, Stern J, et al. Vitamin D receptor polymorphisms in differentiated thyroid carcinoma. <i>Thyroid : official journal of the American Thyroid Association</i> 2009; 19 (6): 623-8.
CC	Prastatakrebs (nicht familiär)	133	TR	Onen IH, Ekmekci A, Eroglu M, Konac E, Yesil S, Biri H. Association of genetic polymorphisms in vitamin D receptor gene and susceptibility to sporadic prostate cancer. <i>Experimental biology and medicine</i> 2008; 233 (12): 1608-14.
A	Eierstockkrebs (epithelial)	72	US	Lurie G, Wilkens LR, Thompson PJ, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and epithelial ovarian cancer risk. <i>Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology</i> 2007; 16 (12): 2566-71.

Tab.A 11: Studien zum VDR-SNP bsm1.

(Stand 04/2012). AD, atopische Dermatitis; n, Probandenzahl (in Fallgruppe); SLE, systemische Lupus erythematosus; SNP, Single nucleotide Polymorphism; VDR, Vitamin-D-Rezeptor.

Allel [X] / Genotyp [XX]	assoziierte Erkrankung	n	Land	Studie
A; AA	protektiv für AD	265	DE	vorliegende Arbeit
G	Allergisches Asthma, Atopie	367	CA	Poon AH, Laprise C, Lemire M, et al. Association of vitamin D receptor genetic variants with susceptibility to asthma and atopy. <i>American journal of respiratory and critical care medicine</i> 2004; 170 (9): 967-73.
A	verminderte Knochenmineralisierung	100	US	Sainz J, Van Tornout JM, Loro ML, et al. Vitamin D-receptor gene polymorphisms and bone density in prepubertal American girls of Mexican descent. <i>N Engl J Med</i> 1997; 337 (2): 77-82.
AA	Knochendichteminderung	198	KR	Suh KT, Eun IS, Lee JS. Polymorphism in vitamin D receptor is associated with bone mineral density in patients with adolescent idiopathic scoliosis. <i>European spine journal</i> 2010; 19 (9): 1545-50.
AA	Knochendichteminderung	698	BE	Vandevyver C, Wylin T, Cassiman JJ, Raus J, Geusens P. Influence of the vitamin D receptor gene alleles on bone mineral density in postmenopausal and osteoporotic women. <i>Journal of bone and mineral research</i> 1997; 12 (2): 241-7.
A	gestörte Knochenmineralisierung	94	US	Kiel DP, Myers RH, Cupples LA, et al. The Bsm1 vitamin D receptor restriction fragment length polymorphism (bb) influences the effect of calcium intake on bone mineral density. <i>Journal of bone and mineral research</i> 1997; 12 (7): 1049-57.
A	Verminderte Knochendichte	42	AU	Morrison, N. A., J. C. Qi, A. Tokita, P. J. Kelly, L. Crofts, T. V. Nguyen, P. N. Sambrook and J. A. Eisman (1994). "Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles." <i>Nature</i> 367 (6460): 284-287.
G	Diabetes mellitus Typ I	100	GR	Panierakis C, Goulielmos G, Mamoulakis D, Petraki E, Papavasiliou E, Galanakis E. Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Crete, Greece. <i>Clin Immunol</i> 2009; 133 (2): 276-81.
G	Diabetes mellitus Typ I	93	GB	McDermott MF, Ramachandran A, Ogunkolade BW, et al. Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indian Asians. <i>Diabetologia</i> 1997; 40 (8): 971-5.
GG	Psoriasis vulgaris	115	JP	Saeki H, Asano N, Tsunemi Y, et al. Polymorphisms of vitamin D receptor gene in Japanese patients with psoriasis vulgaris. <i>Journal of dermatological science</i> 2002; 30 (2): 167-71.
G	Primäre biliäre Zirrhose	74	DE	Vogel A, Strassburg CP, Manns MP. Genetic association of vitamin D receptor polymorphisms with primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. <i>Hepatology</i> 2002; 35 (1): 126-31.
GG	Chronische Periodontitis	1338	CN	Deng H, Liu F, Pan Y, Jin X, Wang H, Cao J. Bsm1, TaqI, Apal, and FokI polymorphisms in the vitamin D receptor gene and periodontitis: a meta-analysis of 15 studies including 1338 cases and 1302 controls. <i>Journal of clinical periodontology</i> 2011; 38 (3): 199-207.
AA	AIDS Progression; HIV-I Resistenz		ES	Torres C, Sanchez d.l. Torre M, Garcia-M. C, et al. Immuno-phenotype of vitamin D receptor polymorphism associated to risk of HIV-1 infection and rate of disease progression. <i>Current HIV research</i> 2010; 8 (6): 487-92.
A	Diabetes mellitus TypII	368	SA	Al-Daghri NM, Al-Attas O, Alokail MS, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and HLA DRB1*04 cosegregation in Saudi type 2 diabetes patients. <i>J Immunol</i> 2012; 188 (3): 1325-32.
A	SLE Nephritis	337	CN	Luo XY, Yang MH, Wu FX, et al. Vitamin D receptor gene Bsm1 polymorphism B allele, but not BB genotype, is associated with systemic lupus erythematosus in a Han Chinese population. <i>Lupus</i> 2012; 21 (1):53-9.
AA	Übergewicht	176	PL	Filus A, Trzmiel A, Kuliczowska-Plaksej J, et al. Relationship between vitamin D receptor Bsm1 and FokI polymorphisms and anthropometric and biochemical parameters describing metabolic syndrome. <i>The aging male</i> 2008; 11 (3): 134-9.
G	Morbus Basedow	789	DE	Ramos-Lopez E, Kurylowicz A, Bednarczuk T, Paunkovic J, Seidl C, Badenhop K. Vitamin D receptor polymorphisms are associated with Graves' disease in German and Polish but not in Serbian patients. <i>Thyroid</i> 2005; 15 (10): 1125-30.
A	Melanom	3676	US	Orlow I, Roy P, Reiner AS, et al. Vitamin D receptor polymorphisms in patients with cutaneous melanoma. <i>Int. J. Cancer</i> 2012; 130 (2): 405-18.
G	Dickdarmkrebs	1248	FR	Jenab M, McKay J, Bueno-de-Mesquita HB, et al. Vitamin D receptor and calcium sensing receptor polymorphisms and the risk of colorectal cancer in European populations. <i>Cancer epidemiology, biomarkers & prevention</i> 2009; 18 (9): 2485-91.

zu Tab.A 12: **Studien zum VDR-SNP bsm1.**

Allel [X] / Genotyp [XX]	assoziierte Erkrankung	n	Land	Studie
GG	Brustkrebs (fortgeschritten)	5080	FR	McKay JD, McCullough ML, Ziegler RG, et al. Vitamin D receptor polymorphisms and breast cancer risk: results from the National Cancer Institute Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. <i>Cancer epidemiology, biomarkers & prevention</i> 2009; 18 (1): 297-305.
AA	frühere chirurgische Menopause	153	US	Dvornyk V, Long JR, Deng HW, et al. Polymorphisms of the vitamin D receptor gene predict the onset of surgical menopause in Caucasian females. <i>Gynecological endocrinology</i> 2006; 22 (10): 552-6.

Tab.A 13: **Studien zum VDR-SNP fok1.**

(Stand 04/2012). n, Probandenzahl (in Fallgruppe); SNP, Single nucleotide Polymorphism; VRD, Vitamin-D-Rezeptor.

Allel [X] / Genotyp [XX]	assoziierte Erkrankung	n	Land	Studie
-	-	265	DE	vorliegende Arbeit
?	Asthma, erhöhte IgE Spiegel	139	US	Pillai DK, Iqbal SF, Benton AS, et al. Associations between genetic variants in vitamin D metabolism and asthma characteristics in young African Americans: a pilot study. <i>J Invest Med</i> 2011; 59 (6): 938-46.
T	Tuberkulose	91	US	Wilkinson RJ, Llewelyn M, Toossi Z, et al. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. <i>Lancet</i> 2000; 355 (9204): 618-21.
TT	Knochendicht eminderung, Osteoporose	82	US	Harris SS, Eccleshall TR, Gross C, et al. The vitamin D receptor start codon polymorphism (Fok1) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. <i>J Bone Miner Res</i> 1997; 12 (7): 1043-8.
CC	Knochendicht eminderung	201	TR	Kurt O, Yilmaz-Aydogan H, Uyar M et al. Evaluation of ERalpha and VDR gene polymorphisms in relation to bone mineral density in Turkish postmenopausal women. <i>Mol biol rep</i> 2012; 39 (6): 6723-30.
T	Knochendicht eminderung	239	JP	Arai, H., K. Miyamoto, Y. Taketani, H. Yamamoto, Y. Iemori, K. Morita, T. Tonai, T. Nishisho, S. Mori and E. Takeda (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." <i>J Bone Miner Res</i> 12 (6): 915-921.
C/CC	Diabetes mellitus Typ1	100	GR	Panierakis C, Goulielmos G, Mamoulakis D et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Crete, Greece. <i>Clin Immunol</i> 2009; 133 (2): 276-81.
CC	Insulin-sensitivität	49	US	Chiu KC, Chuang LM, Yoon C. The vitamin D receptor polymorphism in the translation initiation codon is a risk factor for insulin resistance in glucose tolerant Caucasians. <i>BMC medical genetics</i> 2001; 2 : 2.
C	Insulin-sensitivität	176	PL	Filus A, Trzmiel A, Kuliczowska-Plaksej J, et al. Relationship between vitamin D receptor Bsm1 and Fok1 polymorphisms and anthropometric and biochemical parameters describing metabolic syndrome. <i>The aging male</i> 2008; 11 (3): 134-9.
T	Autoimmune Hepatitis	123	DE	Vogel A, Strassburg CP, Manns MP. Genetic association of vitamin D receptor polymorphisms with primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. <i>Hepatology</i> 2002; 35 (1): 126-31.
CC	Generalisierte aggressive Periodontitis	93	KR	Park KS, Nam JH, Choi J. The short vitamin D receptor is associated with increased risk for generalized aggressive periodontitis. <i>Journal of clinical periodontology</i> 2006; 33 (8): 524-8.
C	Generalisierte aggressive Periodontitis	51	CN	Li S, Yang MH, Zeng CA, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms in Chinese patients with generalized aggressive periodontitis. <i>Journal of periodontal research</i> 2008; 43 (3): 360-3.
CC	Multiple Sklerose	641	IT	Agliardi C, Guerini FR, Saresella M, et al. Vitamin D receptor (VDR) gene SNPs influence VDR expression and modulate protection from multiple sclerosis in HLA-DRB1*15-positive individuals. <i>Brain behav immun</i> 2011; 25 (7):1460-7.

zu Tab.A 14: Studien zum VDR-SNP *fokl*.

Allel [X] / Genotyp [XX]	assoziierte Erkrankung	n	Land	Studie
T	schwerer Verlauf von Morbus Parkinson	137	JP	Suzuki M, Yoshioka M, Hashimoto M, et al. 25-hydroxyvitamin D, vitamin D receptor gene polymorphisms, and severity of Parkinson's disease. <i>Movement disorders</i> 2012; 27 (2): 264-71.
T	Brustkrebs	549	ES	Barroso E, Fernandez LP, Milne RL, et al. Genetic analysis of the vitamin D receptor gene in two epithelial cancers: melanoma and breast cancer case-control studies. <i>BMC cancer</i> 2008; 8 : 385.
T	Brustkrebs	5080	FR	McKay JD, McCullough ML, Ziegler RG, et al. Vitamin D receptor polymorphisms and breast cancer risk: results from the National Cancer Institute Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. <i>Cancer epidemiology, biomarkers & prevention</i> 2009; 18 (1): 297-305.
TT	Protektiv für Brustkrebs	1077	US	Anderson LN, Cotterchio M, Cole DE, Knight JA. Vitamin D-related genetic variants, interactions with vitamin D exposure, and breast cancer risk among Caucasian women in Ontario. <i>Cancer epidemiology, biomarkers & prevention</i> 2011; 20 (8): 1708-17.
T	Eierstock- krebs	1764	US	Lurie G, Wilkens LR, Thompson PJ, et al. Vitamin D receptor rs2228570 polymorphism and invasive ovarian carcinoma risk: pooled analysis in five studies within the Ovarian Cancer Association Consortium. <i>Int J Cancer</i> 2011; 128 (4): 936-43.
T	Follikulärer Schilddrüsen- krebs	40	DE	Penna-Martinez M, Ramos-Lopez E, Stern J, et al. Vitamin D receptor polymorphisms in differentiated thyroid carcinoma. <i>Thyroid : official journal of the American Thyroid Association</i> 2009; 19 (6): 623-8.

10. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nadja Höfer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Zusammenhang zwischen Vitamin-D-Rezeptor-Gen-Polymorphismen und atopischer Dermatitis - Eine Fall-Kontroll-Studie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträge anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zur Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und den Resultaten (insbesondere Abbildungen, Grafiken und Tabellen) entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Nadja Höfer hatte folgenden Anteil an den aufgeführten Publikationen:

Publikation 1:

Artikel Heine G, Hoefler N, Franke A, Nöthling U, Schumann RR, Hamann L, Worm M, Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with severe atopic dermatitis in adults, Br J Dermatol. 2013

Beitrag im Einzelnen: Genotypisierung, Datenverwaltung, statistische Analyse, Erstellen der Tabellen und Teile der Abbildungen.

Publikation 2:

Artikel Hamann L, Koch A, Sur S, Hoefler N, Glaeser C, Schulz S, Gross M, Franke A, Nöthlings U, Zacharowski K, Schumann RR., Association of a common TLR-6 polymorphism with coronary artery disease - implications for healthy ageing? Immun Ageing. 2013

Beitrag im Einzelnen: Genotypisierung, statistische Analyse, Erstellen von Tabellen.

Publikation 3:

Poster Hoefler, N., Heine, G., Schumann, R.R., Hamann, L., Worm, M. Association of Vitamin D receptor polymorphisms with severe atopic dermatitis. 23th European students' conference. Berlin, 17.09.2012.

Beitrag im Einzelnen: Genotypisierung, Datenverwaltung, statistische Analyse, Erstellen des Posters, Präsentation.

Publikation 4:

Poster Hoefler, N., Heine, G., Schumann, R.R., Hamann, L., Worm, M. Assoziation von Vitamin-D-Rezeptor-Gen-Polymorphismen mit schwerer atopischer Dermatitis. 4. Posterkongress RSM. Berlin, 05.07.2013

Beitrag im Einzelnen: Genotypisierung, Datenverwaltung, statistische Analyse, Erstellen des Posters, Präsentation.

Datum

Unterschrift

Stempel

des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Datum

Unterschrift

des Doktoranden

11. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Artikel

Heine G, Hoefler N, Franke A, Nöthling U, Schumann RR, Hamann L, Worm M.

Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with severe atopic dermatitis in adults
Br J Dermatol., 2013 Apr;168(4):855-8. doi: 10.1111/bjd.12077. Epub 2013 Mar 13. PMID:
23034014. (G.H. and N.H. contributed equally to this work.)

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden in dem obengenannten Artikel publiziert.

Hamann L, Koch A, Sur S, Hoefler N, Glaeser C, Schulz S, Gross M, Franke A, Nöthlings U,
Zacharowski K, Schumann RR.

Association of a common TLR-6 polymorphism with coronary artery disease - implications
for healthy ageing?

Immun Ageing. 2013 Oct 30;10(1):43. doi: 10.1186/1742-4933-10-43. PMID: 24498948.

Poster

Hoefler, N., Heine, G., Schumann, R.R., Hamann, L., Worm, M. Association of Vitamin D
receptor polymorphisms with severe atopic dermatitis. 23th European students' conference.
Berlin, 17.09.2012. Winner of poster session dermatology

Hoefler, N., Heine, G., Schumann, R.R., Hamann, L., Worm, M. Assoziation von Vitamin-D-
Rezeptor-Gen-Polymorphismen mit schwerer atopischer Dermatitis. 4. Posterkongress RSM.
Berlin, 05.07.2013

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden in den obengenannten Postern präsentiert.

12. Danksagung

Ich bedanke mich bei PD. Dr. Lutz Hamann für die fachliche Betreuung, das Interesse an dieser Arbeit und der organisatorischen Unterstützung.

Dankbar bin ich ebenfalls den weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schumann für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, die angenehme Arbeitsatmosphäre und insbesondere Fränzi Creutzburg und Diana Wöllner für die freundliche, geduldige Einarbeitung und hilfsbereite Unterstützung bei der Laborarbeit.

Danken möchte ich ebenso PD Dr. Guido Heine für sein Engagement in der Kooperation zwischen dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene (Charité Universitätsmedizin Berlin, CBF) und der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité (Charité Universitätsmedizin Berlin, CCM), und dabei vor allem für die Rekrutierung der Fallgruppe und der Organisation der funktionellen Analysen sowie für seine Unterstützung bei deren Auswertung. Hier erhielt ich auch die Hilfe verschiedener Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Worm, bei denen ich mich auf diesem Wege gleichfalls bedanken möchte.

Weiterhin danke ich Anne Radigk für die hilfreiche Beratung bei der Niederschrift dieser Arbeit.

Mein größter Dank gilt meiner Familie für ihren stetigen Rückhalt.