

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluss der Vitamin D-vermittelten Modulation auf die  
gräserpollenspezifische Immuntherapie**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nora Schumacher  
aus Berlin

Datum der Promotion: 01.03.2019

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Abstrakt .....</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>9</b>
<b>3.1</b>	<b>Typ-I-Allergien .....</b>	<b>9</b>
3.1.1	Epidemiologie in Deutschland .....	9
3.1.2	Pathophysiologie und Symptomatik.....	10
<b>3.2</b>	<b>Therapie der allergischen Rhinokonjunktivitis .....</b>	<b>11</b>
3.2.1	Gegenwärtiger Stand .....	11
3.2.2	Subkutane Immuntherapie.....	12
3.2.3	Adjuvanzien .....	14
<b>3.3</b>	<b>Vitamin D .....</b>	<b>15</b>
3.3.1	Bedeutung und Stoffwechsel.....	15
3.3.2	Vitamin D als Immunmodulator .....	17
<b>3.4</b>	<b>Fragestellung .....</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1</b>	<b>Probanden.....</b>	<b>20</b>
<b>4.2</b>	<b>Studienmedikamente.....</b>	<b>21</b>
<b>4.3</b>	<b>Gebrauchsmaterialien.....</b>	<b>21</b>
4.3.1	Antikörper .....	21
4.3.2	Reagenzien .....	21
4.3.3	Pufferlösungen .....	22
4.3.4	Testlösungen.....	22
4.3.5	Laborgeräte.....	23

4.3.6	Verbrauchsmaterialien .....	23
<b>4.4</b>	<b>Computersoftware.....</b>	<b>24</b>
<b>4.5</b>	<b>Klinische Methoden .....</b>	<b>24</b>
4.5.1	Studiendesign .....	24
4.5.2	Erhebungsparameter.....	25
4.5.2.1	Allergieanamnese und Gesundheitsstatus.....	25
4.5.2.2	Retrospektive Symptombetrachtung.....	27
4.5.2.3	Prick-Testung.....	27
4.5.2.4	Intrakutantestung.....	27
4.5.2.5	Bestimmung von Gesamt-IgE und gräser-spezifischen IgE .....	28
4.5.2.6	25-Hydroxyvitamin D <sub>3</sub> -Bestimmung.....	29
4.5.3	Studienmedikation.....	29
4.5.3.1	Gräserpollenspezifische subkutane Immuntherapie .....	29
4.5.3.2	Gabe von Vitamin D <sub>3</sub> und Neutralöl.....	30
4.5.4	Blutentnahme und Aufbereitung der Blutproben .....	31
<b>4.6</b>	<b>Experimentelle Methoden .....</b>	<b>31</b>
4.6.1	Enzyme-linked Immunosorbent Assay .....	31
4.6.2	Gräser-spezifischer IgE-ELISA.....	31
4.6.3	Gräser-spezifischer IgG4-ELISA .....	32
<b>4.7</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
<b>5.1</b>	<b>Beschreibung der Studienpopulation.....</b>	<b>35</b>
<b>5.2</b>	<b>Einfluss von Vitamin D auf die klinische Immunantwort.....</b>	<b>38</b>
5.2.1	Entwicklung der klinischen Immunantwort über den Erhebungszeitraum .....	38
5.2.2	Abhängigkeit zur Vitamin D <sub>3</sub> /Placebo-Supplementation .....	39
<b>5.3</b>	<b>Einfluss von Vitamin D auf die retrospektive Symptombetrachtung....</b>	<b>40</b>
<b>5.4</b>	<b>Einfluss von Vitamin D auf die Produktion von sIgE und sIgG4 .....</b>	<b>41</b>
5.4.1	sIgE.....	41

5.4.2	sIgG4 .....	43
5.4.3	sIgE/sIgG4-Ratio.....	45
<b>5.5</b>	<b>Verträglichkeit.....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>48</b>
<b>6.1</b>	<b>Evaluation der Kohorte .....</b>	<b>48</b>
<b>6.2</b>	<b>Einfluss von Vitamin D auf die klinische Immunantwort.....</b>	<b>49</b>
<b>6.3</b>	<b>Einfluss von Vitamin D auf die retrospektive Symptombetrachtung....</b>	<b>50</b>
<b>6.4</b>	<b>Einfluss von Vitamin D auf die Produktion von sIgE und sIgG4 .....</b>	<b>51</b>
<b>6.5</b>	<b>Verträglichkeit der spezifischen Immuntherapie .....</b>	<b>53</b>
<b>6.6</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>Tabellen- und Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>57</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>67</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>68</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>72</b>

# 1 Abkürzungsverzeichnis

AID	aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase
AP	alkalische Phosphatase
APZ	antigenpräsentierende Zelle(n)
ARK	allergische Rhinokonjunktivitis
BE	biologische Einheit
BMI	Körpergewichtsindex (Body-Mass-Index)
BSA	Bovine Serum Albumin
CAP	Kapazität (capacity)
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Antigen 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)
DGAKI	Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FEV <sub>1</sub>	forciertes expiratorisches (Atem-)Volumen in einer Sekunde
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
GINA	Global Initiative for Asthma
hCG	humanes Choriongonadotropin
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
I.E.	internationale Einheit
IL	Interleukin
K	Konzentration
kU	Kiloeinheit (kiloUnit)
LU	Laboreinheit (laboratory unit)
LZP	Lebenszeitprävalenz
MPL	Monophosphoryl-Lipid-A
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NV	Normalverteilung
p	Signifikanz, p-Wert
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
r	Korrelationskoeffizient
RM	repeated measures (ANOVA)
rSB	retrospektive Symptombetrachtung

RT	Raumtemperatur
SBE	standardisierte biologische Einheit
SD	Standardabweichung (standard deviation)
sIgE	gräserpezifisches Immunglobulin E
sIgG4	gräserpezifisches Immunglobulin G4
SIT	subkutane Immuntherapie
TBS(T)	tris-buffered Saline (+ Tween 20)
TE	Therapieeinheit
TGF- $\beta$	transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ (transforming growth factor $\beta$ )
TH1	T-Helfer-1-Zellen
TH2	T-Helfer-2-Zellen
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Treg	T-regulatorische Zellen
UE	unerwünschtes Ereignis
V	Visite
VD <sup>+</sup>	Vitamin D <sub>3</sub> -supplementierte Subgruppe
VD <sup>-</sup>	Placebo-(Kontroll-)Gruppe
VDBP	Vitamin D-bindendes Protein
VDR	Vitamin D-Rezeptor
W	Woche

## 2 Abstrakt

Die allergenspezifische Immuntherapie ist die einzige kausale Behandlung der IgE-vermittelten Typ-I-Allergie. Aktuell wird über einen Zusammenhang der steigenden Allergieprävalenz zum global auftretenden Vitamin D-Mangel diskutiert. Neben seiner Bedeutung im Kalziumhaushalt wird dem Vitamin D eine immunmodulatorische Schlüsselrolle bei der Prävention allergischer Erkrankungen und der Beeinflussung entzündlicher Prozesse zugesprochen. Die Verstärkung der tolerogenen Effekte der Immuntherapie durch eine parallele Vitamin D<sub>3</sub>-Gabe wurde in aktuellen *in vitro* und *in vivo* Studien gezeigt. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bedeutung einer Vitamin D-vermittelten Modulation auf die gräserpollenspezifische Immuntherapie placebokontrolliert prospektiv zu untersuchen.

In einer dreijährigen randomisierten Interventionsstudie erfolgte parallel zur präseasonalen gräserpollenspezifischen subkutanen Immuntherapie eine Supplementation von Vitamin D<sub>3</sub>. Der potentielle Einfluss des Vitamin D<sub>3</sub> wurde anhand zuvor definierter klinischer und immunologischer Endpunkte untersucht. Die vorliegende Arbeit basiert auf den Daten und Ergebnissen des ersten Behandlungsjahres.

Primärer Endpunkt der Studie war der Quaddeldurchmesser in der Intrakutantestung vor und nach der Behandlung. Als sekundäre Endpunkte wurden das gräser-spezifische IgE und das gräser-spezifische IgG4 detektiert. Die retrospektive Symptombetrachtung, die Einnahme studienrelevanter Medikamente und das Auftreten unerwünschter Ereignisse dienten zur Beurteilung der klinischen Wirksamkeit.

Nach dem ersten Behandlungsjahr waren keine Vitamin D<sub>3</sub>-abhängigen Veränderungen in den primären und sekundären Endpunkten statistisch nachweisbar. Jedoch zeigte sich in der Vitamin D<sub>3</sub>-supplementierten Gruppe eine gräser-spezifische Immunglobulinantwort, die auf ein verbessertes Therapieansprechen hinweisen könnte.

In Zusammenschau der Ergebnisse zeigen die erhobenen klinischen und immunologischen Daten eine temporäre Toleranzentwicklung gegenüber dem Gräserallergen, die unabhängig der Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation erfolgte. Hinweise für eine immunmodulatorische Wirkung des Vitamin D wurden aufgezeigt. Es bedarf weiterführender Analysen um den Einfluss von Vitamin D<sub>3</sub> in den Folgejahren zu beurteilen. Darüber hinaus sind größer angelegte Studien erforderlich, um das immunmodulatorische Potential der adjuvanten Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation weiter zu untersuchen.

## Abstract

Allergen specific immunotherapy is the only causal therapy of IgE-induced type I hypersensitivity. An association between the increasing allergy prevalence and the global vitamin D deficiency has been extensively discussed. Besides its function in calcium homeostasis, vitamin D has been proposed to play a key role in the prevention of allergic diseases and the modulation of inflammatory processes. Recent *in vitro* and *in vivo* studies suggest an increase of tolerogenic effects of immunotherapy by vitamin D<sub>3</sub> supplementation. In the present study we aimed to analyze the immune modulatory effects of vitamin D supplementation in the context of grass pollen specific immunotherapy.

In a placebo controlled randomized three-year study a preseasonal grass pollen specific immunotherapy was performed in conjunction with vitamin D<sub>3</sub> supplementation. The therapeutical influence of vitamin D<sub>3</sub> was analyzed in respect of preassigned clinical and immunological end points. The results of this thesis represent the data obtained within the first year of treatment.

The primary end point of this study was the skin wheal diameter decrease of intracutaneous testing before and after one year of therapy. As secondary end points, grass pollen specific IgE and specific IgG4 were detected. A retrospective symptom score, a record of antiallergic medication and the onset of adverse events were used to assess clinical efficacy and tolerability.

After the first year of treatment no significant alterations were detected in the primary and secondary end points related to vitamin D<sub>3</sub> supplementation. However, the grass pollen specific immunoglobulins suggest an improved treatment response within the vitamin D<sub>3</sub> supplemented group.

In conclusion the clinical and immunological outcomes of this placebo controlled prospective trial using grass pollen specific immunotherapy suggest a temporary tolerance towards grass pollen irrespective of vitamin D<sub>3</sub> supplementation. Evidence for the potential immune modulatory role of vitamin D<sub>3</sub> has been identified. The vitamin D<sub>3</sub>-related effects need to be confirmed in a follow-up study. Further investigations with an increased number of patients are required to better define the immunological potential of the adjuvant vitamin D<sub>3</sub> supplementation upon specific immunotherapy.

## 3 Einleitung

### 3.1 Typ-I-Allergien

#### 3.1.1 Epidemiologie in Deutschland

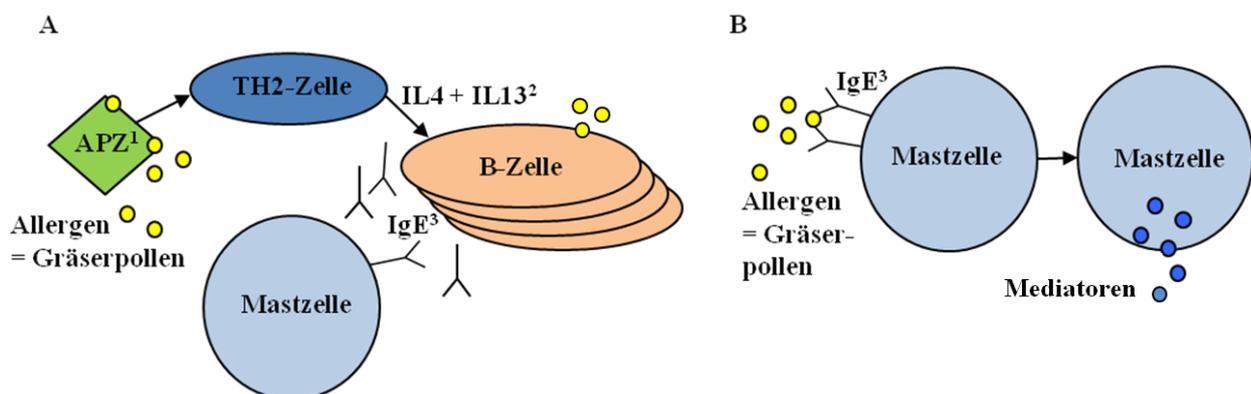
Gemäß der 2013 erschienenen Folgerhebung zur Bundesgesundheitsstudie des Robert-Koch-Instituts liegt die Lebenszeitprävalenz (LZP) allergischer Erkrankungen in Deutschland bei 30 %. Dabei steht die allergische Rhinokonjunktivitis (ARK, im Volksmund Heuschnupfen genannt) mit einer LZP von 14,8 % an erster Stelle der Typ-I-Allergien.<sup>1</sup> Sie zählt zum Formenkreis der atopischen Erkrankungen und soll im Folgenden als Hauptvertreter der Typ-I-Allergien thematisiert werden. Atopie bezeichnet die Neigung zu Immunglobulin E (IgE)-vermittelten Überempfindlichkeitsreaktionen des adaptiven Immunsystems auf harmlose Umweltstoffe. Zu den häufigsten Auslösern zählen Pollen, Katzenhaare, Hausstaubmilben und Schimmelpilze.<sup>2</sup>

Neben der ARK gehören das allergische Asthma bronchiale (LZP von 8,6 %) und die atopische Dermatitis (LZP von 3,5 %) zu den häufigsten Manifestationen Typ-I-allergischer Erkrankungen. Das Vorliegen einer allergischen Erkrankung begünstigt das Auftreten weiterer Typ-I-allergischer Erkrankungen. Das Risiko bei bestehender ARK zusätzlich an Asthma zu erkranken, ist 3,2-fach erhöht.<sup>3,4</sup> Bis zum 39. Lebensjahr ist eine ansteigende und anschließend eine abnehmende Prävalenz der ARK zu beobachten. Unter den 0-17 Jährigen weisen prozentual mehr Jungen eine ARK-Symptomatik auf, bei den Erwachsenen sind signifikant mehr Frauen (16,5 %) als Männer (13 %) betroffen.<sup>1,5</sup> Als Teil der westlichen Industrienationen existiert in Deutschland eine nachweislich höhere LZP atopischer Erkrankungen als in Ländern eines geringeren Entwicklungsstands.<sup>2</sup> Diverse Kausalitäten werden diskutiert. In Folge erhöhter Hygienestandards ist die Konfrontation des kleinkindlichen Immunsystems mit mikrobiellen Bestandteilen vermindert und führt zu einer mangelnden Aktivierung der spezifischen Abwehr. Studien belegen, dass der frühzeitige Kontakt mit Parasiten und Mikroben (z.B. beim Aufwachsen auf einem Bauernhof) mit einer verminderten Allergieprävalenz einhergeht.<sup>6,7</sup> Die mit einem modernen Lebensstil assoziierte verkürzte Stilldauer Neugeborener, passiver und aktiver Tabakkonsum, Mangel an probiotischen und  $\omega$ 3-Fettsäure-haltigen Nahrungsmitteln, die Belastung mit Umwelttoxinen wie Feinstaub und Ozon und der vermehrte Einsatz von Antibiotika im Kindesalter sind als Risikofaktoren diskutiert worden.<sup>8-11</sup> Die Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI) hat diesbezüglich eine großangelegte Metaanalyse themenrelevanter Studien durchgeführt und eine aktuelle Leitlinie zur Allergieprävention erstellt.<sup>12</sup> In Anbetracht der unverändert hohen Prävalenz allergischer

Erkrankungen ist die Etablierung effizienter Therapiemaßnahmen notwendig.<sup>13,14</sup>

### 3.1.2 Pathophysiologie und Symptomatik

Bereits 1963 etablierten die Engländer *Coombs* und *Gell* eine bis heute angewandte Einteilung allergischer Erkrankungen nach ihrem Pathomechanismus in vier Allergietypen.<sup>15</sup> Dabei stellen die Typ-I-Allergien, auch Allergie vom Soforttyp genannt, den am häufigsten vorkommenden Subtyp dar. Kleinste Mengen eines spezifischen Allergens können nach zuvor erfolgter Sensibilisierung eine IgE-vermittelte überschießende Immunantwort auslösen. Die Reaktionen reichen von milden Heuschnupfsymptomen bis zum anaphylaktischen Schock und somit potentiell tödlichen Verläufen. Nach Angaben im „*Weißbuch – Allergie in Deutschland*“ ist die Allergieneigung zu 70 % genetisch und bis zu 30 % durch die Umwelt bestimmt.<sup>2</sup> So sind beispielsweise Mutationen des Barriereproteins Filagrin signifikant mit atopischen Erkrankungen assoziiert.<sup>16</sup> Jede Struktur mit einem Molekulargewicht > 5000 Dalton kann Auslöser einer Typ-I-Allergie werden. Dabei zählen die im Rahmen dieser Studie verwendeten Gräserpollen (der Spezies Wiesenlieschgras) zu den klassischen Vertretern der Inhalationsallergene.<sup>17</sup> Abbildung 1 stellt den Pathomechanismus der Typ-I-Allergie am Beispiel von Gräserpollen vereinfacht dar.



**Abbildung 1: Pathomechanismus der Typ-I-Allergie.** (A) Sensibilisierung und (B) Effektorphase. <sup>1</sup>antigenpräsentierende Zelle, <sup>2</sup>Interleukin (IL) 4 und 13, <sup>3</sup>Immunglobulin E.

Die Sensibilisierung eines Individuums erfolgt bei Erstkontakt zumeist in den ersten Lebensjahren.<sup>18</sup> Das inhalede Allergen wird vom angeborenen Immunsystem als Fremdkörper erkannt und prozessiert. Das erfolgt durch antigenpräsentierende Zellen (APZ) wie den dendritischen Zellen der Nasenrachenschleimhaut. Allergenbruchstücke (Epitope) werden über den MHC-II-Rezeptor naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert. Es folgt die Entwicklung allergenspezifischer

aktivierter T-Helfer(TH)-2-Zellen.<sup>19</sup> Sie synthetisieren proentzündliche Interleukine (IL-), u.a. IL-4 und IL-13.<sup>20</sup> Zeitgleich werden naive B-Zellen durch eine direkte Bindung des Allergens an den B-Zell-Rezeptor aktiviert. Die Interaktion der gräser-spezifisch aktivierten B- und T-Zellen unter Stimulation des IL-4 und IL-13 führt zur Differenzierung IgE-produzierender Plasmazellen.<sup>21</sup> Das gräser-spezifische IgE wird im Folgenden durch sIgE abgekürzt. Es bindet hochaffin an den FcεRI-Rezeptor auf Mastzellen, basophilen Granulozyten und bestimmten APZ z.B. den Langerhans-Zellen.<sup>22</sup> So liegt es überwiegend gebunden vor, kann aber im Blut der sensibilisierten Personen durch *in vitro* Testverfahren nachgewiesen werden. Die Sensibilisierungsphase verläuft symptomlos. Kommt es zu einem erneuten Allergenkontakt während der Gräserpollensaison<sup>23</sup> tritt die Effektorphase als Sofortreaktion ein. Die Gräserpollen binden nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an das sIgE. Werden zwei sIgE auf der Oberfläche einer Mastzelle durch Allergenbindung kreuzvernetzt, kommt es zur Degranulation von präformierten Histamin und im Verlauf neu gebildeter Mediatoren wie Prostaglandinen und Leukotrienen und der Bildung weiterer gewebeaktiver Substanzen (initiale Immunantwort).<sup>24</sup> Die Entzündungsmediatoren bewirken eine erhöhte Permeabilität der Gefäße, die zur Rötung und Schwellung der Schleimhäute führt. Über H<sub>1</sub>-Rezeptoren vermittelt Histamin eine Bronchokonstriktion, was u.a. die Assoziation von ARK und allergischem Asthma erklärt.<sup>25</sup> Die Reizung der Nerven löst Juckreiz und Brennen mit reflektorisch vermehrter Sekretbildung aus. Das Vollbild der ARK resultiert phänotypisch in einer Entzündung der Nasenrachenschleimhaut mit obstruierter und/oder laufender Nase, Niesattacken, brennenden und tränenden Augen, und ggf. asthmatischen Beschwerden.<sup>26</sup> Durch positive Rückkopplungsprozesse (späte Immunantwort) wird die Entzündungsreaktion potenziert (Priming). Umbauprozesse am beteiligten Gewebe (Remodeling) führen zu irreversiblen Schäden und Chronifizierung der Erkrankung.<sup>22,24</sup> 40 % aller Betroffenen leiden bereits ganzjährig unter Heuschnupfensymptomen. Resultierende Abgeschlagenheit, Schlafstörungen und Konzentrationsdefizite bedingen Einschränkungen im Berufsleben und Alltag. Die zuletzt 1996 von der Gesundheitsberichterstattung des Bundes veröffentlichten Daten umfassen 239 Millionen Euro an direkten (Behandlung, Fachmaterial, Arzt-besuche) und indirekten (Arbeitsausfall, Umschulung) Kosten für die ARK-Therapie.<sup>27</sup>

## **3.2 Therapie der allergischen Rhinokonjunktivitis**

### **3.2.1 Gegenwärtiger Stand**

Primär sollte durch Allergen-karenz das Auslösen der überschießenden Immunreaktion vermieden werden. Ist der Allergenkontakt wie bei der Gräserpollenallergie unvermeidbar, kann eine

gezielte Pharmakotherapie die Symptome mindern. Dabei stellt die Kombination aus Antihistaminika der zweiten Generation [Inhibition der H<sub>1</sub>(Histamin)-Rezeptoren ohne anticholinergische und sedierende Nebenwirkung] und lokalen Steroiden (Inhibition der Transkription proentzündlicher Mediatoren) mit einer Symptomminderung von circa 20 % ein Behandlungskonzept dar.<sup>20,28</sup> Bei milderer Verlaufsformen der ARK können auch  $\alpha$ -Adrenorezeptor-Agonisten (Abschwellen der Schleimhäute) und/oder Nasenspülungen mit Natriumchlorid angewandt werden.<sup>28</sup> Ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung der ARK ist der Einsatz spezifischer Antikörper zur gezielten Hemmung proentzündlicher Prozesse. Während verschiedene gegen Zytokine gerichtete Antikörper noch in Tiermodellen untersucht werden, ist unter dem Namen Omalizumab bereits ein IgE-Antikörper zur Behandlung des schweren Asthmas zugelassen.<sup>29</sup> Die Wirksamkeit von Omalizumab konnte auch zur Behandlung weiterer Allergien, wie der ARK und der Urtikaria nachgewiesen werden, ist aber kostenintensiv.<sup>22,30</sup> Einen ähnlichen Ansatz stellt die Blockade der IgE-Rezeptoren CD23 und Fc $\epsilon$ RI bzw. die Hemmung rezeptorassoziierter Oberflächenmoleküle, die sich auf Mastzellen befinden, dar.<sup>31</sup> Obwohl die Pharmakotherapie effizient ist, so stellt sie dennoch keine kausale Therapieform der ARK dar und kann dem Betroffenen nur temporär Linderung verschaffen.<sup>28</sup>

### **3.2.2 Subkutane Immuntherapie**

Die spezifische Immuntherapie ist seit über 100 Jahren die einzig kausale Therapieform einer Typ-I-Allergie.<sup>24</sup> Sie sollte gemäß der S2k-Leitlinie der DGAKI durchgeführt werden.<sup>13</sup> Diese Leitlinie wurde durch nationale Fachgesellschaften und Fachverbände mit allergologischem Anteil (z.B. Dermatologie, Pädiatrie, HNO) interdisziplinär entwickelt und im Zuge neuer Erkenntnisse im internationalen Austausch aktualisiert.<sup>13,32</sup> Bei der subkutanen Applikationsform werden dem Patienten über einen empfohlenen Zeitraum von drei bis fünf Jahren repetitiv hohe Dosen des spezifischen Allergens in das Unterhautgewebe injiziert.<sup>2,13</sup> Die Behandlung wird im Zeitraum der Allergiekarenz (außerhalb der Gräserpollensaison bei Gräserpollenallergie) und nach dem genauen Dosierungsschema des Herstellers (hier: Allergopharma, Deutschland) durchgeführt. Mit Hilfe jahrzehntelanger Forschung konnten essentielle Mechanismen der spezifischen und unspezifischen Immunantwort als Reaktion auf die subkutane Immuntherapie (SIT) identifiziert werden. Die wiederholte Gabe eines Allergens beeinflusst sowohl die initiale als auch die verzögerte Immunantwort.<sup>24,33</sup> Bisher ungeklärt ist die Modulation der APZ, in Folge dessen es an Stelle einer pathognomonischen TH2-Zellantwort zu einer Aktivierung von TH1-Zellen und regulatorischen T-Zellen (Treg) kommt.<sup>33,34</sup> Diese produzieren ihrerseits ein

„antiallergisches“ Zytokinmilieu.<sup>24</sup> Dabei nehmen die über den Transkriptionsfaktor Foxp3<sup>+</sup>-gesteuerten Treg eine Schlüsselrolle ein.<sup>20,35</sup> Sie mindern über die Ausschüttung von IL-10 und dem transformierenden Wachstumsfaktor (TGF- $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ ) die TH2-Zellantwort.<sup>33,35</sup> IL-10 und TGF- $\beta$  bewirken eine Suppression von Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten sowie sIgE-produzierenden Plasmazellen.<sup>20</sup> Die verstärkte Proliferation spezifisch IgG4 (sIgG4)-sekretierender Plasmazellen mit verstärkter IgG4-Bildung führt zu einem Abfangen der Allergene und unterbindet somit eine sIgE-vermittelte Immunreaktion.<sup>20,24</sup> Bereits während der SIT sind in der Schleimhaut des Nasenrachenraumes und im Patientenserum eine verringerte Anzahl proinflammatorischer Zellen und erhöhte Zellzahlen von Treg und humoralen sIgG4 nachweisbar. Die allergiebedingte initiale Erhöhung des sIgE im Rahmen der primären Immunantwort ist im Verlauf der Behandlung regredient.<sup>20</sup> Neben der Ausbildung einer anhaltenden allergenspezifischen immunologischen Toleranz wird mit Hilfe der SIT das Risiko für allergisches Asthma und/oder einer weiteren Typ-I-Allergie vermindert.<sup>24,36</sup> Dem gegenüber stehen der hohe zeitliche Aufwand der SIT und die damit verbundenen hohen indirekten Kosten und begrenzte Adhärenz der Patienten.<sup>2,37</sup> Zudem treten bei 0,1-5 % der Patienten in Folge der subkutanen Injektionen systemische Nebenwirkungen wie allergische Rhinokonjunktivitis, Urtikaria oder auch anaphylaktische Reaktionen auf.<sup>20,38</sup> So ist es für die Allergieforschung eine große Herausforderung, die spezifische Immuntherapie in Bezug auf die hohe immunmodulatorische Effizienz mit schnellen und langandauernden Effekten bei möglichst geringen Nebenwirkungen zu optimieren.<sup>37,39</sup> Ein Ansatzpunkt ist die chemische Modifikation der zu injizierenden Allergene anhand ihrer chemischen Struktur. Die so genannten Allergoide enthalten immunstimulatorische T-Zell-Epitope, interagieren jedoch nicht mit sIgE, da die Proteine durch eine chemische Behandlung z.B. mit Glutaraldehyd in ihrer Struktur beeinflusst werden.<sup>33,37</sup>

Des Weiteren werden natürliche Allergensequenzen und/oder ihre Derivate mit Nukleotiden, synthetischen Strukturproteinen oder weiteren immunmodulatorischen Substanzen wie Monophosphoryl-Lipid-A (MPL) fusioniert bzw. gemeinsam appliziert, um die immunologische Potenz zu verstärken.<sup>40-42</sup> Die zur Injektion zugelassenen Allergenextrakte unterliegen den Richtlinien des Paul-Ehrlich-Instituts.<sup>43</sup> In dieser Arbeit wurde ein 6-Gräserpollen-Allergoid (Allergovit<sup>®</sup>, Allergopharma, Deutschland) in einer Aluminiumhydroxidsuspension verwendet.<sup>44</sup> Ein weiterer Ansatzpunkt für die Optimierung der spezifischen Immuntherapie ist die Darreichungsform. Neben der subkutanen Applikation erwies sich die sublinguale Immuntherapie in zahlreichen Studien als wirksam bei einfacherer Durchführbarkeit.<sup>28</sup>

Insbesondere bei Kindern kann die häusliche Einnahme von Tabletten mit einer höheren Anwendungsrate einhergehen.<sup>45</sup> Mit der intralymphatischen oder epidermalen Gabe von Allergenextrakten gibt es zwei weitere Alternativen zur SIT, die mit weniger Injektionen und verringerter Allergendosis in ersten klinischen Studien positive Therapieresultate zeigten.<sup>41,46</sup>

### 3.2.3 Adjuvantien

Der dritte Ansatzpunkt der Allergieforschung in Bezug auf die spezifische Immuntherapie beinhaltet die Kombination mit immunmodulatorisch wirksamen Adjuvantien. Dazu gehören Substanzen, die durch ihre Wirkung auf das Immunsystem die Effektivität der Therapie optimieren sollen. Aluminiumsalze sind das am längsten verwendete und weltweit meist genutzte Depotadjuvans der SIT.<sup>47</sup> Durch seine adsorbierenden Eigenschaften wird die Allergenfreisetzung in das Gewebe verzögert, Unverträglichkeitsreaktionen seitens des Patienten gemindert und der Bedarf an subkutanen Injektionen reduziert.<sup>48</sup> Bedenken gegenüber einer Langzeitanwendung von Aluminiumsalzen werden aufgrund vermehrter Entzündungen an der Injektionsstelle sowie einer möglichen Akkumulation im Gewebe mit u.a. neuronalen Folgeschäden kontrovers diskutiert.<sup>49</sup> Eine 2015 vom Paul-Ehrlich-Institut initiierte dreijährige Studie soll die Risikobewertung der Aluminiumexposition durch Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel klären.<sup>50</sup> Alternativ wird die Aminosäure L-Tyrosin als Kurzzeitdepotadjuvans der SIT eingesetzt. Es führt zu einer verlängerten Bioverfügbarkeit der Allergene mit einer verbesserten Verträglichkeit der Immuntherapie und einer verstärkten Induktion von IgG4-Antikörpern.<sup>51</sup> Gegenüber Aluminiumhydroxid konnte bei dem Einsatz von L-Tyrosin als Adjuvans ein verringerter initialer IgE-Anstieg nachgewiesen werden.<sup>52</sup> Zudem besitzt das L-Tyrosin eine geringere Halbwertszeit, wodurch das Risiko einer Akkumulation vermindert ist.<sup>51</sup> In einer zweiten Generation von Adjuvantien ist seit 2011 das unter 3.2.2 erwähnte Lipopolysaccharidderivat MPL auf dem Markt. Als Toll-like-Rezeptor-4-Agonist supprimiert das MPL die TH2-Zellantwort zu Gunsten einer verstärkten Antwort von TH1-Zellen und Treg.<sup>53</sup> Darüber hinaus zeigte sich im Rahmen der SIT bereits nach vier subkutanen Injektionen eine signifikante Verbesserung der klinischen und immunologischen Daten.<sup>54,55</sup> Weiterhin gibt es vielversprechende Ergebnisse zum Einsatz von MPL bei der SLIT sowie zur Kombination der Adjuvantien MPL und L-Tyrosin.<sup>56,57</sup>

Eine weitere Anwendung ist die präventive Verabreichung von Omalizumab vor und während der Immuntherapie. Es wurde gezeigt, dass IgE-Antikörper im Kontext der SIT das Risiko für anaphylaktische Reaktionen und den Bedarf an Antiallergika senken sowie die Lungenfunktion

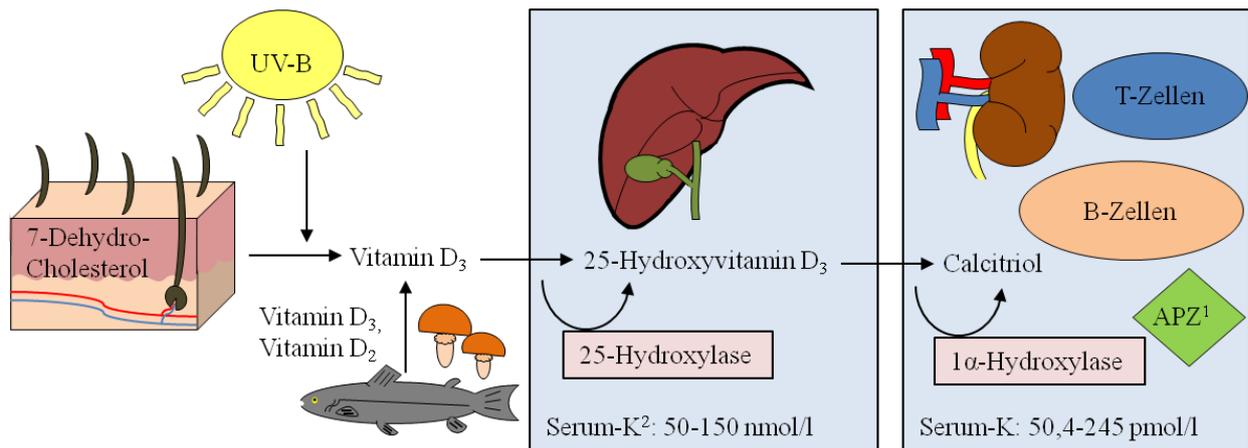
und die Verträglichkeit höherer SIT-Dosen verbessern.<sup>58</sup> Auch Patienten mit schwerem Bronchialasthma waren unter Omalizumabeinnahme in der Lage, eine Immuntherapie zu erhalten.<sup>59</sup> Die Forschungsgruppe um *Hadi Maazi* konnte in einem Asthma-Mausmodell zeigen, dass die Aktivierung des inhibierenden Oberflächenrezeptors zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Antigen 4 (CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) auf naiven T-Zellen durch die Gabe von CTLA-4-Agonisten die Positiveffekte der SIT deutlich verstärkt.<sup>60</sup> In einem anderen Mausmodell wurde durch adjuvant eingesetzte Laktobazillen (*Lactobacillus paracasei*) der SIT-induzierte Therapieerfolg ebenfalls verstärkt. Gegenüber der Kontrollgruppe war bei der SIT kombiniert mit Laktobazillen ein signifikanter Anstieg von Treg und IL-10 zu verzeichnen.<sup>61</sup> Ein Effekt von Adjuvantien aus dem Bereich der Komplementär- und Alternativmedizin konnte nach den Anforderungen der evidenzbasierten Medizin nicht nachgewiesen werden.<sup>62,63</sup> Weiterhin wird vielen Nahrungsmitteln wie Obst und Gemüse, Pestwurz und Fischöl mit einem hohen Anteil an  $\omega$ 3-Fettsäuren ein protektiver Einfluss auf das Immunsystem zugesprochen.<sup>12,64,65</sup> Inwiefern diese Nahrungsbestandteile eine adjuvante Funktion neben der SIT einnehmen können, muss in weiterführenden klinischen Studien untersucht werden.

### **3.3 Vitamin D**

#### **3.3.1 Bedeutung und Stoffwechsel**

Vitamin D gehört zur Gruppe der fettlöslichen Vitamine. In seiner biologisch aktiven Form, dem Calcitriol (1,25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, im Folgenden Calcitriol genannt), fungiert es im Körper als Steroidhormon mit pleiotroper Wirkung.<sup>66</sup> Die Bereitstellung erfolgt zu über 90 % durch die UV-induzierte endogene Synthese in der Haut. Das in der Epidermis physiologisch gespeicherte 7-Dihydrocholesterol wird in einer fotochemischen Reaktion mittels UVB-Strahlung zu Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) umgewandelt. Mit dem geringen Anteil des über die Nahrung aufgenommenen Vitamin D<sub>3</sub> und Vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol) wird es mit dem Vitamin D-bindendem Protein (VDBP) über die Blutbahn in die Leber transportiert. Dort wird es durch Vitamin D-25-Hydroxylase zu 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> katalysiert.<sup>67</sup> 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> fungiert als Speichermetabolit im Fettgewebe und dient als laborchemischer Indikator des mittel- bis längerfristigen Vitamin D-Status.<sup>68</sup> VDBP-gebunden gelangt es zum Zielgewebe, wo die bedarfsabhängige Umwandlung zum biologisch aktiven Calcitriol erfolgt. Als Agonist des nukleären Vitamin D-Rezeptors (VDR) greift Calcitriol in die Proteinbiosynthese der Zellen ein. Die Aktivierung ist streng über das Cytochrom P450-Enzym 1 $\alpha$ -Hydroxylase reguliert und durch negative Rückkopplungsprozesse limitiert. Durch die gleichzeitige Induktion der

24-Hydroxylase wird Calcitriol zur wasserlöslichen Calcitroinsäure abgebaut und über die Gallewege eliminiert.<sup>67</sup> Somit wird eine konstante Serumkonzentration von 50,4-245 pmol/l des reaktiven Calcitriol gewährleistet.<sup>69</sup> Mit einer Halbwertszeit von fünf bis acht Stunden ist es stärker reguliert als das 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> mit Referenzwerten zwischen 50-150 nmol/l und einer Halbwertszeit von 96 Tagen.<sup>70,71</sup> In Abbildung 2 ist der Vitamin D-Metabolismus grafisch dargestellt.



**Abbildung 2: Exemplarische Darstellung des Vitamin D-Metabolismus.** <sup>1</sup>antigen-präsentierende Zelle, <sup>2</sup>Konzentration.

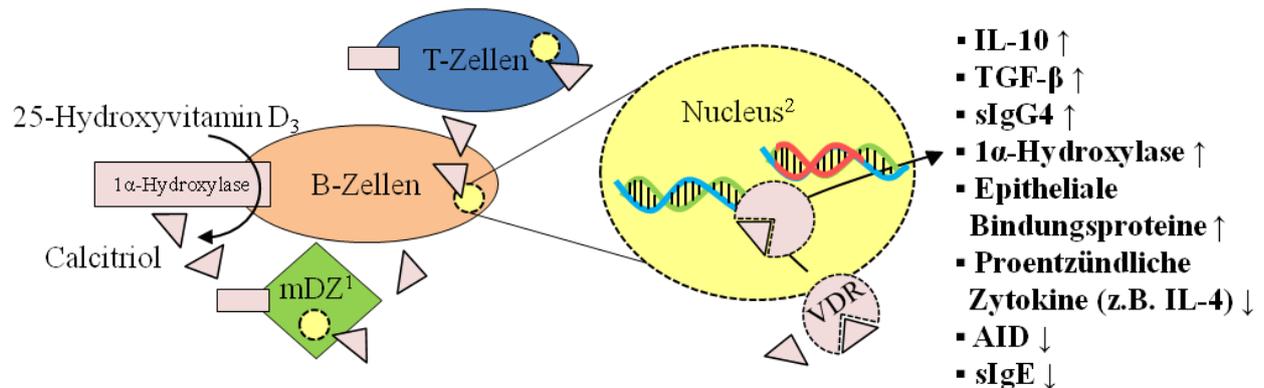
Die größte Bedeutung besitzt Vitamin D für die Kalziumhomöostase. In einem Regelkreis mit Parathormon, Kalzium und Phosphat reguliert es über bestimmte Organsysteme wie dem Darm, den Knochen, der Niere und der Nebenschilddrüse den Kalziumhaushalt.<sup>67,72</sup> Seit Beginn des 20. Jahrhunderts ist die Relevanz von Vitamin D zur Prävention von Rachitis, Osteomalazie und Osteoporose bekannt.<sup>73</sup> Darüber hinaus ist die Beteiligung von Vitamin D bei kardiovaskulären, autoimmunen, atopischen und myeloproliferativen Erkrankungen von großem Interesse.<sup>67,74</sup> So gibt es zahlreiche Studien, die einen Mangel von Vitamin D unter anderem mit einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkt, Bluthochdruck, multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis, atopischer Dermatitis und verschiedenen Karzinomen in Verbindung bringen.<sup>75-80</sup> Ein Vitamin D-Mangel ist definiert als eine Serumkonzentration von 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> < 50,0 nmol/l, wobei in aktuellen Metaanalysen ein Wert von  $\geq 80,0$  nmol/l für einen optimalen Vitamin D-Haushalt genannt wird.<sup>67,81</sup> Um diesen längerfristig zu gewährleisten, ist eine tägliche Versorgung von insgesamt 2000-4000 I.E. erforderlich.<sup>82,83</sup> Zur Abdeckung von Vitamin D<sub>3</sub> und D<sub>2</sub> über die Nahrung empfiehlt die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) eine tägliche Aufnahme von 400 I.E. für Säuglinge und 800 I.E. für alle Kinder und Erwachsenen ab dem

zweiten Lebensjahr.<sup>84</sup> Vitamin D<sub>3</sub>-haltige Lebensmittel wie Lebertran und Fisch als auch Vitamin D<sub>2</sub>-haltige Produkte wie Shiitaken (Pilzart aus Ostasien) decken durch ihren geringen hiesigen Verzehr nur einen Bruchteil des täglichen Bedarfs.<sup>67,82</sup> Die obligatorische Sonnenexposition wird durch vermehrte Innenraumtätigkeit, erhöhte Abschirmung vor UVB-Strahlung durch Sonnenschutz und innerstädtischen Smog stark reduziert. Insbesondere über die Wintermonate bleibt eine Kompensation durch die endogene Synthese aus.<sup>67</sup> Dazu kommen eine verminderte Fähigkeit zur endogenen 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Bildung mit zunehmenden Alter sowie eine Assoziation von Vitamin D-Defizienz und Fettleibigkeit.<sup>85</sup> Als Konsequenz leiden 61,6 % der deutschen Bevölkerung den Großteil des Jahres an einem relativen Vitamin D-Mangel.<sup>86</sup> In anderen von Vitamin D-Mangel betroffenen Ländern wie Australien, Großbritannien, Kanada oder den USA ist bereits eine Anreicherung vielverzehrter Lebensmittel wie der Trinkmilch und Margarine zur zusätzlichen Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation etabliert.<sup>73</sup> Ab einer täglichen Zufuhr von 40.000-100.000 I.E. über ein bis zwei Monate kann es zu einer Vitamin D-Intoxikation kommen.<sup>72</sup> Dabei kann der VDR direkt durch zu hohe Calcitriolgaben oder indirekt durch Überdosierung des Vitamin D<sub>3</sub> und dem resultierenden Überangebot an 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> aktiviert werden. Trotz geringerer Affinität als Calcitriol ist 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> ebenfalls in der Lage an den VDR zu binden.<sup>87</sup> Primäre Folge der Hypervitaminose D ist die Hyperkalzämie mit Hyperkalzurie. Diese kann ihrerseits zu Herzrhythmusstörungen, Niereninsuffizienz und Verkalkungen parenchymatöser Organe führen.<sup>72,88</sup> Aus diesem Grund sollte eine therapeutische Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation ab 5000 I.E. pro Tag unter ärztlicher Beobachtung mit regelmäßiger Kontrolle des Kalzium-, Phosphat- und 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Serumspiegels erfolgen. Je nach Schweregrad der Intoxikation muss die Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation gestoppt, eine kalziumarmer Diät mit forcierter Diurese eingeleitet, die Gabe von Calcitonin und Glukokortikoiden in Betracht gezogen und die Therapie notfalls zur Hämodialyse eskaliert werden.<sup>72</sup>

### **3.3.2 Vitamin D als Immunmodulator**

Calcitriol ist ein potenter Immunmodulator. Diese Aussage beruht auf der Erkenntnis, dass verschiedene Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems über einen VDR verfügen und gleichzeitig mittels der 1 $\alpha$ -Hydroxylase Calcitriol aus seiner inerten Vorstufe synthetisieren können.<sup>87</sup> Dazu zählen aktivierte T-Zellen, B-Zellen, myeloide dendritische Zellen und Makrophagen.<sup>89-92</sup> Auto- und parakrin zur Verfügung gestelltes Calcitriol moduliert die Transkription von über 290 Genen, die ihrerseits über 80 Stoffwechselwege kontrollieren.<sup>73</sup> Im Rahmen antigenvermittelter Entzündungsreaktionen reguliert es tolerogene Funktionen des

angeborenen und erworbenen Immunsystems, vermindert die TH1- und TH2-abhängige Sekretion proinflammatorischer Mediatoren und moduliert die humorale Immunantwort. Calcitriol verbessert durch die Synthese von Bindungsproteinen die Epithelbarriere und den Schutz vor dem Eindringen von Allergenen durch das Epithel.<sup>93</sup> Die von myeloiden dendritischen Zellen abhängige TH1/TH2-Aktivierung wird dosisabhängig inhibiert und die Rekrutierung von Foxp3<sup>+</sup>-Treg u.a. durch Chemokinsekretion gefördert.<sup>90,94</sup> Das führt zu einer verminderten Ausschüttung von entzündungsfördernden Zytokinen (IL-4, IL-13, IFN- $\gamma$ ) und einer geringeren Transkription der aktivierungsinduzierten Cytidin-Desaminase (AID), die für die Immunglobulinproduktion und den Klassenwechsel eine wichtige Rolle spielt. Die Proliferation IgE-produzierender Plasmazellen wird unterbunden.<sup>95</sup> Entsprechend zu den Treg produzieren VDR-aktivierte B-Zellen verstärkt tolerogenes IL-10.<sup>89,96</sup> Die autokrine Stimulation durch VDR-Aktivierung erhöht die Präsenz von IL-10- und TGF- $\beta$ -sekretierender Foxp3<sup>+</sup>-Treg, die ihrerseits ein antiinflammatorisches Milieu begünstigen.<sup>24,97</sup> Darüber hinaus kommt es zur Hochregulation IgG4-produzierender Plasmazellen und Verdrängung von IgE-Plasmazellen.<sup>98</sup> Zur Veranschaulichung ist der Wirkmechanismus des Calcitriols in Abbildung 3 vereinfacht dargestellt.



**Abbildung 3: Wirkmechanismus des Calcitriols.** <sup>1</sup>myeloide dendritische Zelle, <sup>2</sup>exemplarisch für alle VDR-exprimierenden Zellen.

In Anbetracht der vielfältigen dem Calcitriol zugeschriebenen immunmodulatorischen Eigenschaften ist das wissenschaftliche Interesse bezüglich Vitamin D und dessen Einfluss zur Prävention und Behandlung IgE-vermittelter Erkrankungen stetig gewachsen.<sup>93</sup> In bisherigen *in vitro* und *in vivo* Studien (am Mausmodell) konnte ein inverser Zusammenhang zwischen 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> und IgE-Bildung durch periphere Plasmazellen gezeigt werden.<sup>99,100</sup> Auch epidemiologische Studien legen nahe, dass eine suffiziente Vitamin D<sub>3</sub>-Zufuhr während

der Schwangerschaft und über die ersten Lebensjahre das Risiko an ARK, atopischer Dermatitis und allergischem Asthma zu erkranken, vermindern kann.<sup>101-103</sup> Des Weiteren wurde ein Vitamin D-Mangel mit vermehrten Sensibilisierungsraten, schweren Verläufen und erhöhtem Medikamentenbedarf (vor allem an Steroiden) Betroffener assoziiert.<sup>101,104</sup> Im Rahmen einer allergenspezifischen Immuntherapie kann gemäß der oben genannten Wirkung des Vitamin D auf das Immunsystem die adjuvante Vitamin D<sub>3</sub>-Gabe die Ausbildung einer längerfristigen immunologischen Toleranz gegenüber dem Allergen begünstigen. Die initiale IgE-vermittelte Immunantwort wird vermindert und somit eine schnellere Symptomreduktion gefördert.<sup>105-107</sup> Evidenzbasierte Studien zur Effektivität einer gräserpollenspezifischen SIT mit adjuvant-therapeutischer Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation sind bisher nicht im großen Umfang durchgeführt und veröffentlicht worden und sollte mit der vorliegenden ProGIT-Studie erstmals prospektiv placebokontrolliert untersucht werden.

### **3.4 Fragestellung**

Die im Zuge der gräserpollenspezifischen Immuntherapie repetitiv verabreichten Allergendosen aktivieren allergenspezifische Immunzellen. Durch die gleichzeitige Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation in therapeutischen Dosierungen wird den Immunzellen genügend 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> zur Metabolisierung in aktives Calcitriol zur Verfügung gestellt.<sup>105</sup> Basierend auf dieser Annahme und der zuvor beschriebenen immunmodulatorischen Eigenschaften des Calcitriols sollten folgende Fragen mit Hilfe der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

- Lässt sich bei einer Vitamin D<sub>3</sub>-supplementierten Gruppe im Vergleich zu einer Placebo-Kontrollgruppe eine veränderte primäre Immunantwort in der Intrakutantestung nachweisen?
- Ist gegenüber der Placebo-Kontrollgruppe eine Reduktion der ARK-spezifischen Symptome in der retrospektiven Symptombetrachtung, die Einnahme von Bedarfsmedikation und das Auftreten von (SIT)-assoziierten Nebenwirkungen zu beobachten?
- Verstärkt Calcitriol die Effektivität der SIT durch einen schnelleren Wirkeintritt der Allergentoleranz und einer nachhaltigen Modulation der humoralen Immunantwort (sIgE und sIgG4) mit verlängerter Remission der ARK?

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Probanden

Anhand der in Tabelle 1 aufgeführten Ein- und Ausschlusskriterien konnten 34 von insgesamt 51 rekrutierten Probanden als Teilnehmer der Studie ausgewählt und mit einer Randomnummer R-01 bis R-34 anonymisiert werden. Alle Probanden haben nach zuvor erfolgter mündlicher und schriftlicher Aufklärung eine Einverständniserklärung (gem. AMG § 40 (1) 3b) unterzeichnet. Die Kohorte setzte sich zu Studienbeginn aus 22 männlichen und 12 weiblichen Probanden im Alter von 19-53 Jahren zusammen. Ein bereits randomisierter Proband wurde vor Therapiebeginn aufgrund exazerbierten Asthmas von der Studie ausgeschlossen. Die verbleibenden 33 Probanden wurden auf zwei Subgruppen aufgeteilt. Bei 16 Probanden erfolgte parallel zur SIT eine Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation, 17 Probanden erhielten ein Placebo.

Zum Nachuntersuchungstermin lag bei einer Probandin eine Schwangerschaft vor, zu einem Probanden war der Kontakt abgebrochen und die Serumprobe eines weiteren Probanden konnte in Folge eines technischen Fehlers nicht ausgewertet werden.

Eine vollständige Analyse war von 30 Probanden möglich. Abbildung 7 unter 5.1 zeigt die Studienpopulation gemäß CONSORT 2010 „Standard für Transparenz klinischer Studien“ (The CONSORT Group, USA).

**Tabelle 1: Ein- und Ausschlusskriterien zur Studienteilnahme.** <sup>1</sup>ausgenommen Hypothyreose

Nr.	Einschlusskriterium	Ausschlusskriterium
1.	Einwilligungserklärung vorhanden	Verstärkte UV-Exposition
2.	Erforderliches Alter: 18-55 Jahre	Immuntherapie vor < 2 Jahren
3.	25-Hydroxyvitamin D <sub>3</sub> -Konzentration im Probandenserum < 80,0 nmol/l	Anwendung verschreibungspflichtiger Substanzen <sup>1</sup>
4.	Gräserpolleninduzierte Rhinokonjunktivitis ≥ 2 Jahre	Bestehen einer schweren Grund- oder Begleiterkrankung <sup>1</sup>
5.	Positive Prick-Testung auf Gräserpollen (> 3mm)	Schwangerschaft oder Stillzeit
6.	Positive Intrakutantestung auf Gräserpollen (> 5mm)	Impfung < 7 Tage vor SIT
7.	Gräserpezifisches IgE (sIgE) ≥ 0,7 kU/ml (CAP ≥ 2)	Abweichung der erhobenen Laborwerte um den Faktor 2

8.	Lungenfunktion: FEV <sub>1</sub> ≥ 70 %	Instabiles allergisches Asthma (GINA III-IV)
9.	Retrospektive Symptombetrachtung (rSB) ≥ 12 Punkte	Bestehen einer Kontraindikation gegenüber der verabreichten Medikation

## 4.2 Studienmedikamente

Medikament	Wirkstoff	Dosierung	Hersteller
Allergovit® Gräser	Gräserpollen 100 %, Allergoide in Depotform	Injektion subkutan, Aufdosierung nach Herstellervorgabe	Allergopharma, Deutschland
Neutralöl	Mittelkettige Triglyceride (ohne Wirkung)	Oral, 8 Tropfen pro Tag	Fagron, Niederlande
Vigantol® Öl, GI-L/00, Fachinformation September 2010	Cholecalciferol, 500 µg (20.000 I.E.)/ml = 30 Tropfen	Oral, 8 Tropfen = 133 µg (5.333 I.E.) pro Tag	Merck, Deutschland

## 4.3 Gebrauchsmaterialien

### 4.3.1 Antikörper

Antikörper	Klon	Katalognr.	Hersteller
Anti-human IgE, biotinyliert	HP6029	9250-08	Southern Biotec, USA & Canada
Anti-human IgG4, HRP	Polyklonal	MH 1742	Caltag, UK

### 4.3.2 Reagenzien

Reagenz	Spezifikation	CAS-Nr.	Hersteller
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	1,0 mg/Tablette	64285-73-0	Sigma-Aldrich, USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	Fraktion V, pH 7,0	9048-46-8	Serva, Deutschland
Diethanolamin	≥ 98 %	111-42-2	Sigma-Aldrich, USA
para-Nitrophenylphosphat (pNPP)	15,0 mg/Tablette	333338-18-4	Sigma-Aldrich, USA
Saccharose	5 %	57-50-1	Merck, Deutschland
Schwefelsäure	≥ 96 %, 1,0 mol/l	7664-93-9	Merck, Deutschland

Streptavidin-gekoppelte alkalische Phosphatase		50-245Z	ZYMED, Österreich
Tween 20	0,05 %	9005-64-5	Sigma-Aldrich, USA
Wasserstoffperoxid	30 %	7722-84-1	Merck, Deutschland

### 4.3.3 Pufferlösungen

Puffer	Zusammensetzung	Konzentration
BSA- Blockpuffer	3 %-iges BSA 1 x TBS 0,05 %-iges Tween 20	0,003 mmol/l
Beschichtungspuffer, pH 9,6	Natriumhydrogencarbonat, NaHCO <sub>3</sub> Natriumchlorid, NaCl Natriumcarbonat, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	350 mmol/l 150 mmol/l 15 mmol/l
Saccharose-Blockpuffer	5 %-ige Saccharose 1 x TBS 0,05 %-iges Tween 20	0,003 mmol/l
Substratpuffer (AP), pH 9,9	Diethanolamin, (HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH Magnesiumchlorid, MgCl <sub>2</sub>	5,1 mmol/l 1,0 mmol/l
TBS (10 x), pH 7,4	Trizma Base, Natriumchlorid, NaCl	100 mmol/l 1,5 mol/l
TMB-Substratpuffer, pH 5,5	Dinatriumhydrogenphosphat, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Zitronensäure, C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	51,3 mmol/l 24,8 mmol/l

### 4.3.4 Testlösungen

Testlösung	Allergen/Wirkstoff	Konzentration	Hersteller
Antigen	<i>Phleum pratense</i> , g6	5,0 µg/ml	Allergopharma, Deutschland
Intrakutan- testlösung,	006 Gräser, Lyophilisat	500 SBE/ml	Allergopharma, Deutschland
Prick- Testlösung	006 Gräser 129 Hasel 115 Erle	50.000 SBE/ml 50.000 BE/ml 50.000 BE/ml	Allergopharma, Deutschland

	108 Birke 106 Beifuß 725 <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> 400 <i>Alternaria alternata</i> 309 Katzenhaar	50.000 SBE/ml 50.000 SBE/ml 50.000 SBE/ml 10.000 SBE/ml 50.000 SBE/ml	
Negativkontrolle	901 Natriumchlorid	9,0 mg/ml	Allergopharma, Deutschland
Positivkontrolle	902 Histamin Prick-Testung Intrakutantestung	1,0 mg/ml 0,1 mg/ml	Allergopharma, Deutschland

#### 4.3.5 Laborgeräte

Laborgerät	Spezifikation	Hersteller
ELISA Platten Lesegerät	MRX Microplate Reader	Dynex Technologies, USA
Gefrierschrank	-20°C, TKF380 -80°C, HeraFreeze	EUREKA, Deutschland Heraeus, Deutschland
Inkubator	Heracell®	Heraeus, Deutschland
Kühlschrank	4°C	EUREKA, Deutschland
Pipetten	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Brand, Deutschland
Schüttler	KS 501	IKA®, Deutschland
Vortex-Mixer	Reax 2000	Heidolph, Deutschland
Zentrifuge	Multifuge 4 KR	Heraeus, Deutschland

#### 4.3.6 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Spezifikation	Hersteller
Allergie Lanzetten		Herez, Deutschland
BD Microlance™ 3	27 ½ ", 0,4 x 13,0 mm	Becton Dickenson, USA
BD Plastikpak™	1,0 ml	Becton Dickenson, USA
BD Vacutainer® K <sub>2</sub> EDTA	2,0 ml	Becton Dickenson, USA
BD Vacutainer® Lithium Heparin <sup>N</sup>	6,0 ml	Becton Dickenson, USA

BD Vacutainer® Safety-Lok™		Becton Dickenson, USA
BD Vacutainer® SST™ II Advance	8,5 ml, Silikapartikel	Becton Dickenson, USA
Biosphere® Pipettenspitzen	0,5-20 µl, 2-100 µl, 100-1000 µl	Sarstedt, Deutschland
ELISA Platten	Nunc Immuno 96 MicroWell™	Thermo Scientific, USA
Ndd EasyOne™ Spirometer		ndd Medical Technologies, USA
Quaddelmesslineal		Hal Allergy, Deutschland
Reaktionsgefäß	0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 50 ml	Sarstedt, Deutschland Becton Dickenson, USA
hCG Einstufen- Schwangerschaftstest	Testkassette für Urin und Serum	Innovacon, USA
Serologische Einmalpipette	5 ml, 10 ml, 25 ml	Becton Dickenson, USA
Softasept® N	74 % Ethanol, 10 % 2-Propanol	Braun, Deutschland

#### 4.4 Computersoftware

Computersoftware	Version	Entwickler
EasyWare®	2.7.1.0	ndd Medical Technologies, USA
EndNote®	X7	Clarivate Analytics, USA
Microsoft Office®	2003 und 2010	Microsoft Corporation, USA
Prism®	5.00	GraphPad Software Inc., USA
Revelation™	G3.2	Dynex Technologies, USA

#### 4.5 Klinische Methoden

##### 4.5.1 Studiendesign

Zu Studienbeginn lag die Einwilligung der lokalen Ethikkommission (gem. AMG § 42 (1) und GCP-V § 7), die Genehmigung der Bundesoberbehörde, einschließlich dem Paul-Ehrlich-Institut und dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (gem. AMG § 42 (2) und GCP-V § 7), sowie die Meldung bei der zuständigen Landesbehörde (gem. AMG § 67) vor. Die ProGIT-Studie ist ein Investigator-initiated-trial unter der Leitung von Frau *Professor Worm* von der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Sie wurde durch Mittel des SFB650 (TP5) zum Teil unterstützt. Die SIT-Gräserprodukte

wurden freundlicherweise von der Firma Allergopharma unentgeltlich bereitgestellt. Über einen Zeitraum von drei Jahren, beginnend im Oktober 2011, wurde die doppelblinde placebokontrollierte prospektive Studie durchgeführt. Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Daten des ersten Studienjahres erhoben, ausgewertet und dargestellt. Primärer Endpunkt war die Reaktivität in der Intrakutantestung vor und nach Einleitung der spezifischen Immuntherapie. Sekundäre Endpunkte der ProGIT-Studie, die in der vorliegenden Arbeit ausgewertet wurden, waren die retrospektive Symptombetrachtung, die Produktion der gräser-spezifischen Immun-globuline IgE und IgG4 sowie die Evaluation der Verträglichkeit. Der zeitliche Verlauf der Untersuchung ist in Abbildung 4 dargestellt. Vor Beginn der 17-wöchigen Behandlungsphase erfolgte die verblindete Zuteilung der Probanden mit Hilfe der externen Etikettierung der Studienmedikation (gem. GCP-V § 5) durch die Charité Apotheke in die Vitamin D<sub>3</sub>-supplementierte Gruppe (VD<sup>+</sup>) und eine Placebo-Kontrollgruppe (VD<sup>-</sup>).



**Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf der ProGIT-Untersuchung.** <sup>1</sup>Visite; <sup>2</sup>Woche.

## 4.5.2 Erhebungsparameter

### 4.5.2.1 Allergianamnese und Gesundheitsstatus

Die allgemeine Anamnese wurde zur Erhebung von Alter, Geschlecht, Körpergröße und -gewicht, worüber sich der BMI (Body Mass Index) berechnen ließ, durchgeführt, sowie zur Erfassung möglicher Ausschlusskriterien. Bei der detaillierten Allergianamnese wurden alle studienrelevanten Parameter erhoben. Dazu zählten die Dauer und die subjektiv empfundene Intensität der bestehenden Gräserpollenallergie. Ein besonderer Fokus lag auf der Erfragung bisheriger Therapieansätze einschließlich bereits erfolgter Immuntherapien oder der symptomatischen bzw. chronischen Einnahme von antiallergisch wirksamen Medikamenten sowie das Bestehen parallel aufgetretenen allergischen Asthma bronchiale und/oder einer atopischer Dermatitis. Bei der körperlichen Untersuchung wurden bei jedem Probanden die Vitalparameter (Blutdruck und Puls) und ein individueller Ganzkörperstatus erhoben, ein Lungenfunktionstest mittels Spirometer zur Bestimmung der Einsekundenkapazität (FEV<sub>1</sub>, forciertes expiratorisches

Volumen in einer Sekunde) durchgeführt und bei allen Frauen eine Schwangerschaft mit Hilfe eines standardisierten Urin-Schwangerschaftstests ausgeschlossen. Zur Eingangsuntersuchung, bei Visite 5, bei Visite 10 und zur Nachuntersuchung wurde den Probanden venöses Blut peripher entnommen und auf die in Tabelle 2 aufgeführten Sicherheitslaborparameter überprüft. Die Blutanalyse erfolgte durch das zertifizierte Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH.

**Tabelle 2: Sicherheitslaborparameter mit zugehörigem Referenzbereich.** <sup>1</sup>Angaben des Instituts für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie, Charité-Universitätsmedizin Berlin.

Parameter	Material	Referenzbereich <sup>1</sup>	
		Männer	Frauen
Kalzium	Heparin-Plasma	2,15-2,65 mmol/l	
Phosphor	Heparin-Plasma	0,8-1,5 mmol/l	
Kreatinin	Heparin-Plasma	< 1,2 mg/dl	< 1,0 mg/dl
Leukozyten	EDTA-Blut	4,5-11,0 /nl	
Neutrophile Granulozyten	EDTA-Blut	1,8-7,7 /nl	
Eosinophile Granulozyten	EDTA-Blut	< 0,7 /nl	
Basophile Granulozyten	EDTA-Blut	0,01-0,1 /nl	0,01-0,09 /nl
Monozyten	EDTA-Blut	0,2-1,0 /nl	
Erythrozyten	EDTA-Blut	4,6-6,2 /pl	3,9-5,4 /pl
Hämoglobin	EDTA-Blut	14,0-17,5 g/dl	12,0-15,7 g/dl
Hämatokrit	EDTA-Blut	0,4-0,52 l/l	0,35-0,47 l/l
Thrombozyten	EDTA-Blut	150-400 /nl	

Zur Absicherung einer gesundheitsverträglichen Studienteilnahme fand neben den regelmäßigen Blutkontrollen zu Beginn jeder Visite die Erhebung einer aktuellen Kurzanamnese statt. Diese bezog sich auf das mögliche Vorliegen gesundheitsbeeinträchtigender Ereignisse (unerwünschtes Ereignis, UE), die Einnahme von Medikamenten, die Verträglichkeit der Studienmedikation, die Wahrung der Ein- und Ausschlusskriterien sowie der Bereitschaft zur Studienteilnahme. Lag ein solches Ereignis vor, insofern es nicht zum sofortigen Ausschluss aus der Studie führte, wurde dieses gemäß der Ausprägung einem Schweregrad (leicht, moderat, schwer) zugeordnet und ein möglicher kausaler Zusammenhang zum Studienablauf dokumentiert.

#### 4.5.2.2 Retrospektive Symptombetrachtung

Die retrospektive Symptombetrachtung (rSB) diente der subjektiven Bewertung der individuell erlebten Rhinokonjunktivitisbeschwerden durch den Probanden selbst. Dabei sollten die einzelnen Symptome zum Zeitpunkt ihrer schwersten Ausprägung während der vergangenen Gräserpollensaison 2011 mit einer Punktzahl bemessen werden. Dazu zählten eine laufende Nase, eine juckende Nase, eine verstopfte Nase, Niesen, juckende Augen, rote Augen und tränende Augen, Husten, Giemen und Atemnot. Die Bewertung erfolgte von „0“ - keine Beschwerden, über „1“ - leichte Beschwerden, „2“ - mittlere Beschwerden bis „3“ - starke Beschwerden. Die Summe der Punkte stellte den subjektiv empfundenen Leidensdruck dar. Bei der Nachuntersuchung wurde die rSB erneut erhoben, nun als subjektive Symptombewertung der Gräserpollensaison 2012. Die beiden Ergebnisse wurden im Anschluss verglichen und als Indikator des subjektiven Therapieerfolgs herangezogen.

#### 4.5.2.3 Prick-Testung

Die Prick-Testung ist das Standard-Hauttestverfahren bei der Diagnostik IgE-vermittelter Typ-I-Reaktionen. Bei der Eingangsuntersuchung wurden alle Probanden bezüglich einer Sensibilisierung gegenüber Gräsern, Hasel, Birke, Beifuß, Erle, Katzenhaar, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Hausstaubmilbe) und *Alternaria alternata* (Schimmelpilz) getestet. Die Durchführung erfolgte nach den Empfehlungen des Global Allergy and Asthma European Network (Ga<sup>2</sup>len) und Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA).<sup>25,108</sup> Als Positivkontrolle wurde Histamin und als Negativkontrolle Natriumchlorid verwendet. Die für die Testung vorgesehene Unterarminnenseite wurde vor und nach der Testung großzügig mit Softasept<sup>®</sup> N desinfiziert. Das Durchdringen der Hautbarriere erfolgte mittels einer Lanzette. Zur Quantifizierung der allergischen Reaktion wurde die Quaddelgröße mit Hilfe eines Quaddelmesslineals ermittelt. Zeigte sich bei der Negativkontrolle keine Reaktion sowie eine  $\geq 3$  mm große Quaddel bei der Positivkontrolle wurde die Untersuchung beurteilt. Ab einem Quaddeldurchmesser von 3 mm wurde die Reaktion auf das jeweilige Allergen als positiv eingestuft. Im weiteren Verlauf wurde die Prick-Testung mit dem Gräserallergen, der Positivkontrolle und der Negativkontrolle zur Visite 10 und zur Nachuntersuchung wiederholt.

#### 4.5.2.4 Intrakutantestung

Die Intrakutantestung besitzt eine höhere Sensitivität gegenüber der Prick-Testung. Dementsprechend wurde in dieser Studie die *in vivo* IgE-Reaktivität bei der Intrakutantestung als

Primärparameter verwendet. Zugleich stellte die Intrakutantestreaktion den primären Endpunkt der Studie dar. Die Testung erfolgte zu drei Zeitpunkten, bei der Eingangsuntersuchung (Woche 0), zur Visite 11 (Woche 18) und zur Nachuntersuchung (Woche 44). Nach Vorgabe der DGAKI<sup>109</sup> verlief die Testung in folgenden Schritten:

1. Desinfektion einer (zuvor unbehandelten) Unterarminnenfläche mit Softasept<sup>®</sup> N
2. Aufziehen der Testlösung in eine sterile BD Plastikpak<sup>™</sup>-Spritze
3. Streng intrakutane Injektion von 0,02-0,05 ml über eine BD Microlance<sup>™</sup> 3-Kanüle
4. Titration und Injektion der Allergenlösung in den Stufen 0,5, 5, 50 und 500 SBE/ml
5. Injektion von Histamin als Positiv- und Natriumchlorid als Negativkontrolle
6. Ablesen der Quaddelgröße mittels Quaddelmesslineal nach 15 Minuten

Ab einem Quaddeldurchmesser von  $\geq 5$  mm galt das Ergebnis als positive Reaktion. Für jede Injektion wurden neue Spritzen und Kanülen verwendet. Der Abstand zwischen den jeweiligen Injektionen betrug 3 cm, bei den höchsten Konzentrationen 50 und 500 SBE/ml 5 cm. Die Allergenkonzentrationen wurden in SBE/ml und BE/ml angegeben.

#### **4.5.2.5 Bestimmung von Gesamt-IgE und gräser-spezifischen IgE**

Bei der Eingangsuntersuchung wurden bei allen Probanden Gesamt-IgE und gräser-spezifisches IgE (sIgE) über das interdisziplinäre Allergie-Speziallabor der Charité – Universitätsmedizin Berlin mittels ImmunoCAP Technologie, ein Sandwich-ELISA von Thermo Scientific, bestimmt. Zur Detektion des sIgE wurde *Phleum pratense* (g6, Lieschgras) als Antigen verwendet. Im Anschluss ließ sich jeder Proband anhand seiner sIgE-Konzentration in eine in Tabelle 3 aufgelistete durch Phadia<sup>®</sup> etablierte Klassifizierung in CAP-Klassen einordnen. Die Referenzwerte für Gesamt-IgE liegen bei einem Erwachsenen bei 25-94 kU/l. Die darauffolgenden Messungen des sIgE zu Visite 1, Visite 5, Visite 10 und zur Nachuntersuchung erfolgten im Forschungslabor von Prof. Dr. med. M. Worm.

**Tabelle 3: CAP-Klassifizierung der sIgE-Serumkonzentration.**

CAP-Klasse	Serum-Konzentration in kU/l
0	< 0,35 kU/l
1	0,35-0,7 kU/l
2	0,7-3,5 kU/l
3	3,5-17,5 kU/l
4	17,5-50 kU/l
5	50-100 kU/l
6	> 100 kU/l

#### **4.5.2.6 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Bestimmung**

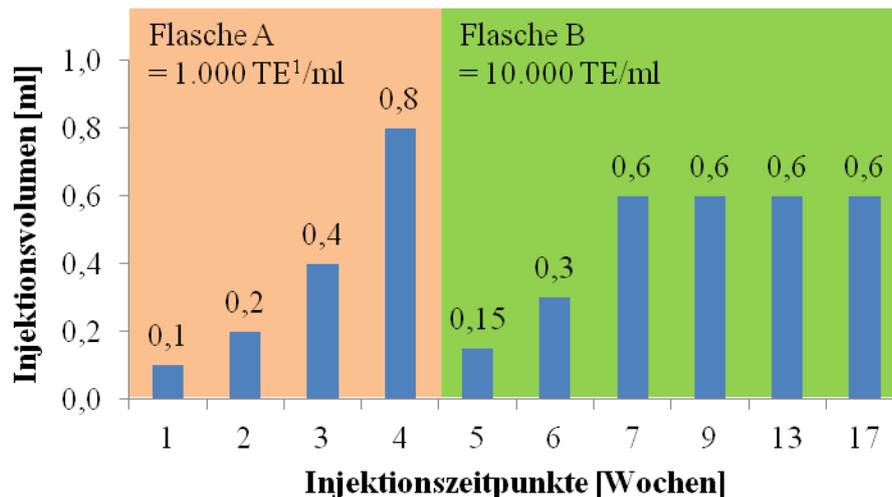
Die Referenzwerte für den im Blutserum nachgewiesenen Speichermetaboliten des Vitamin D 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> liegen bei 50,0-150,0 nmol/l.<sup>71</sup> Bei einem Wert < 80,0 nmol/l konnte der Proband in die ProGIT-Studie eingeschlossen werden. Dafür wurde die 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Konzentration im Blutserum jedes Probanden bei der Eingangsuntersuchung im zertifizierten Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH mittels Bindungsassay mit tritiummarkiertem Vitamin ermittelt. Zur Vermeidung eines unkontrollierten 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Anstiegs bei Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation sowie zur Sicherung der Studienkonformität durch die Probanden wurde die Messung zur Visite 5, zur Visite 10 und zur Nachuntersuchung wiederholt. Die Begutachtung der Werte fand durch eine studienunabhängige qualifizierte Person statt.

#### **4.5.3 Studienmedikation**

##### **4.5.3.1 Gräserpollenspezifische subkutane Immuntherapie**

Für die gräserpollenspezifische SIT wurde eine Injektionslösung mit chemisch modifizierten Gräserallergenen (Allergoide) verwendet. Aufgrund der weiteren Bestandteile Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, Aluminiumhydroxid, Wasser und Phenol lagen die Pollenallergene in Depotform als Adsorbat vor. In zwei 3,0 ml Glasflaschen (Flasche A und B) unterschiedlicher Allergenkonzentration wurde die Injektionslösung bei 2°C-8°C im Kühlschrank gelagert. Nach dem obligatorischen Aufschütteln der Suspension zeigte die Lösung eine deutliche Trübung. Innerhalb der präseasonalen 17-wöchigen Behandlungsphase erhielt jeder Proband nach Vorgabe des Herstellers (Allergopharma, Deutschland) die SIT. Das Dosierungsschema ist in Abbildung 5 dargestellt. Die Injektion erfolgte über eine steril aufgezoogene 1,0 ml BD Plastikpak<sup>TM</sup>-Spritze mit BD Microlance<sup>TM</sup> 3-Kanüle nach vorheriger großzügiger Desinfektion der Injektionsstelle

mit Softasept® N tief subkutan an der Streckseite des Oberarms. Im Anschluss wurde die Einstichstelle für fünf Minuten komprimiert und der Proband zum Ausschluss anaphylaktischer Reaktionen für 30 Minuten überwacht.



**Abbildung 5: Dosierungsschema der SIT.** Modifiziert nach der Allergopharma Gebrauchsinformation. <sup>1</sup>Therapieeinheiten.

Die Dosissteigerung erfolgte bei jedem Probanden entsprechend der individuellen Verträglichkeit. Nach Anbruch der SIT-Flasche war diese 12 Monate haltbar. Die SIT wurde durch einen qualifizierten allergologisch erfahrenen Facharzt durchgeführt.

#### 4.5.3.2 Gabe von Vitamin D<sub>3</sub> und Neutralöl

Alle Probanden erhielten doppelblind und placebokontrolliert eine Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation mit Vigantol® Öl bzw. dessen Trägersubstanz Neutralöl im Verhältnis 1:1. Vigantol® Öl enthält Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol), welches zum Speichermetabolit 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> metabolisiert wird. Es wurden täglich acht Tropfen der Medikation oral mit einem Löffel Flüssigkeit verdünnt eingenommen. Das entsprach einer Menge von 133 µg Vitamin D<sub>3</sub> (5.333 I.E.) pro Tag über einen Zeitraum von 17 Wochen. Die Trägersubstanz bestand aus mittelkettigen Fettsäuren, gewonnen aus Kokosöl, die gleichzeitig das dem Vigantol® Öl in Geruch und Aussehen identische Neutralöl bildete. Die Einnahme des Placebos erfolgte nach gleichem Schema. Beide Substanzen wurden über die Charité Apotheke bezogen und als Studienpräparate in einheitliche Tropfflaschen umgefüllt. Die Aufbewahrung war drei Jahre möglich und geschah bei Raumtemperatur (RT) und lichtgeschützt.

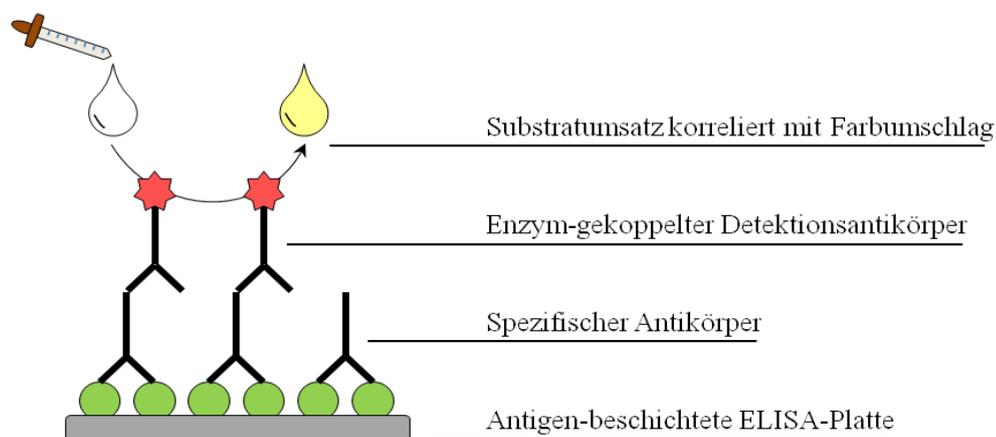
#### 4.5.4 Blutentnahme und Aufbereitung der Blutproben

Die Blutentnahme bei den Probanden richtete sich nach den allgemein geltenden Leitlinien zur Gewinnung peripheren venösen Blutes. Zur experimentellen Bestimmung der Immunglobulin-konzentration von sIgE und sIgG4 im Forschungslabor von Frau *Prof. Dr. med. M. Worm* wurden zu den Visiten 1, 5, 10 und zur Nachuntersuchung zwei Serumröhrchen Blut entnommen und im Anschluss bei 20°C und 2200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde abgenommen und auf Aliquots à 50 µl pro 0,2 ml Reaktionsgefäß aufgeteilt.

### 4.6 Experimentelle Methoden

#### 4.6.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Das Prinzip des indirekten enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) beruht auf der Detektion von spezifischen Antikörpern (Erstantikörper), die an die auf der Mikrotiterplatte gebundenen kongruenten Antigene binden. Durch Zugabe eines Detektionsantikörpers werden die Erstantikörper markiert und die quantitativ proportionale Umsetzung eines Substrats ausgelöst. Letzteres wird durch einen Farbumschlag angezeigt und mittels eines ELISA-Lesegerätes in Laboreinheiten (LU/ml, laboratory unit) berechnet. In Abbildung 6 ist der Aufbau eines indirekten ELISA grafisch veranschaulicht.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung eines indirekten ELISA.**

#### 4.6.2 Gräserpezifischer IgE-ELISA

Eine Immuno 96 MicroWell™-Platte wurde mit 5 µg/ml *Phleum pratense* (Lieschgras) Extrakt in 100 µl/Loch Puffer über Nacht bei 4°C beschichtet. Im Anschluss an die Beschichtung und nach jedem weiteren Inkubationsschritt wurde die Platte mit 200 µl/Loch TBST dreimalig gewaschen. Zur Blockierung der unspezifischen Proteinbindungsstellen erfolgte die Inkubation mit

300 µl/Loch BSA-Blockpufferlösung bei Raumtemperatur für zwei Stunden. Die spezifische Bindung des sIgE an das Gräserallergen fand nach Verdünnung der Proben in 100 µl/Loch TBST bei 4°C über Nacht statt. Die Detektion des gebundenen sIgE erfolgte mittels eines Zweitantikörpers (biotinyliertes anti-IgE). Anschließend wurde die Platte mit Streptavidin-gekoppelter Alkalischer Phosphatase für eine Stunde bei RT inkubiert. Für die Farbreaktion wurde Substratpuffer verwendet und die Menge an umgesetztem Substrat bei einer Wellenlänge von 405 und 690 nm gemessen. Als Negativkontrollen wurden Plattenlöcher ohne Antigenbeschichtung und ohne Serumzugabe mit untersucht.

#### 4.6.3 Gräserspezifischer IgG4-ELISA

Der sIgG4-ELISA verlief nahezu analog zum sIgE-ELISA. Verwendet wurde Blockpuffer, HRP-gekoppeltes anti-IgG4 als Detektionsantikörper sowie TMB-Substrat-Puffer ohne Streptavidin-Alkalische Phosphatase. Der einsetzende Farbumschlag wurde unter Verwendung von Schwefelsäure abgestoppt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des ELISA-Lesegerätes bei 450 und 560 nm.

### 4.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde auf Grundlage der im ersten Jahr der ProGIT-Studie erstellten ProGIT-Datenbank durchgeführt. Die Studienpopulation umfasst 33 Probanden, die die Behandlungsphase protokollgemäß (definiert im ProGIT-Protokoll nach erfolgter Intraokutantesung zur Woche 18) abgeschlossen haben. In Tabelle 4 ist die Gruppenstärke mit den darauf basierenden statistisch ausgewerteten Endpunkten dargestellt.

**Tabelle 4: Gruppenstärke zur statistischen Auswertung der Endpunkte.** <sup>1</sup>Kontaktverlust, <sup>2</sup>Schwangerschaft (Blutentnahme zur Immunglobulinanalyse erfolgt), <sup>3</sup>technischer Fehler, <sup>4</sup>unerwünschtes Ereignis.

Endpunkt	Zeitpunkt [Woche]	Probanden [Anzahl]			
		Gesamt	VD <sup>+</sup>	VD <sup>-</sup>	Ausschluss
25-Hydroxyvitamin D <sub>3</sub> - Bestimmung [nmol/l]	0	33	16	17	0
	5	33	16	17	0
	17	33	16	17	0
	44	32	15	17	1 <sup>1</sup>

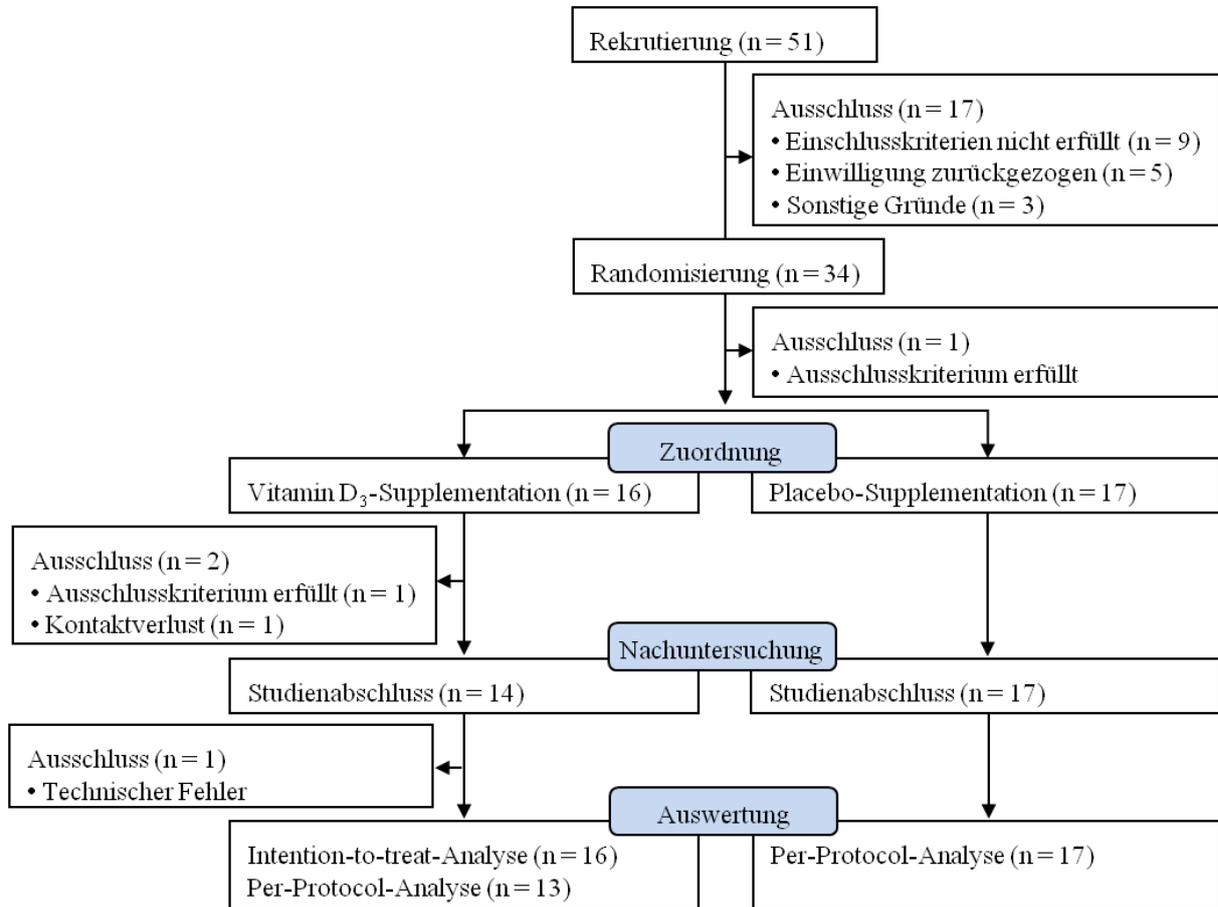
Intrakutantestung [mm], primärer Endpunkt	0	33	16	17	0
	18	33	16	17	0
	44	31	14	17	2 <sup>1,2</sup>
IgE [LU/ml], sekundärer Endpunkt	1	33	16	17	0
	5	33	16	17	0
	17	33	16	17	0
	44	31	14	17	2 <sup>1,3</sup>
IgG4 [LU/ml], sekundärer Endpunkt	1	33	16	17	0
	5	33	16	17	0
	17	33	16	17	0
	44	31	14	17	2 <sup>1,3</sup>
rSB [Punkte], sekundärer Endpunkt	0	33	16	17	0
	44	32	15	17	1 <sup>1</sup>
Verträglichkeit [Anzahl an UEs <sup>4</sup> ]	1-18	33	16	17	1
Einnahme [Anzahl] studienrelevanter Medikamente	1-44	32	15	17	1 <sup>1</sup>

Die Zuordnung jedes Probanden zur Vitamin D<sub>3</sub>- und Placebo-Gruppe erfolgte nach offizieller Entblindung am 22.01.2015 durch die Charité Apotheke. Die Auswertung der Datenmenge erfolgte mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism<sup>®</sup>. Zunächst wurde eine Probandencharakterisierung mit Hilfe der deskriptiven Statistik erstellt. Die auszuwertenden Merkmale wurden innerhalb einer Subgruppe mittels *D'Agostino-Pearson*-Test auf ihre Normalverteilung hin überprüft und der Mittelwert plus Standardabweichung bzw. bei nicht normal verteilten Daten der Median plus Datenintervall dargestellt. Im Anschluss konnte jedes Merkmal zwischen den Subgruppen (intergruppal) auf signifikante Unterschiede hin überprüft werden. Dafür wurde der unpaarte *t*-Test (Normalverteilung) und der *Mann-Whitney-U* Test (keine Normalverteilung) angewandt. Ein signifikantes Ergebnis lag vor, wenn ein berechneter Zusammenhang zwischen zwei Daten bzw. Datenmengen mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  fehlinterpretiert wurde. Die Darstellung des Immunglobulinverlaufs der gesamten Kohorte über vier Zeitpunkte mit abhängigen, nicht normalverteilten Daten erfolgte über die 1 Way ANOVA mittels *Friedman* Tests. Die Auswertung der Intrakutantestung für die gesamte Kohorte in Abhängigkeit der Zeit erfolgte mittels 1 Way ANOVA mit *Tukey's* multiplen Vergleichstest für normalverteilte Daten. Zur differenzierten Betrachtung der klinischen und laborchemischen Ergebnisse in Abhängigkeit

der Vitamin D<sub>3</sub>/Placebo-Supplementation wurde die 2 Way ANOVA mit *Sidak's* Korrektur durchgeführt. Analog erfolgte die Auswertung der rSB. Signifikanzberechnungen innerhalb einer Subgruppe (intragruppal) wurden bei normalverteilten Daten mittels 1 Way ANOVA RM (repeated measures) mit *Tukey's* multiplen Vergleichstest und bei nicht normalverteilten Daten mittels *Friedman* Test mit *Dunn's* multiplen Vergleichstest durchgeführt. Korrelationen wurden nach *Spearman* berechnet. Dabei zeigt der Korrelationskoeffizient  $r$  einen positiven Zusammenhang ( $r > 0$ ), keinen Zusammenhang ( $r = 0$ ) oder einen negativen Zusammenhang ( $r < 0$ ) zwischen zwei Parametern an. Die Monografie wurde mit Hilfe des Textverarbeitungsprogramms Microsoft Word<sup>®</sup> und dem Literaturverwaltungsprogramm EndNote<sup>®</sup> X7 erstellt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Beschreibung der Studienpopulation



**Abbildung 7: Darstellung der Studienpopulation gemäß CONSORT 2010.**

Abbildung 7 veranschaulicht die Studienpopulation über den einjährigen Erhebungszeitraum. Anhand definierter Ein- und Ausschlusskriterien (siehe 4.1, Tabelle 1) konnten von 51 rekrutierten Probanden 34 randomisiert werden. Von den 17 ausgeschlossenen Probanden zogen fünf ihre Einwilligung zurück, neun erfüllten die Einschlusskriterien nicht und bei drei Probanden lagen sonstige Ausschlussgründe vor. Ein bereits randomisierter Proband musste aufgrund exazerbierter Asthma bronchiale ( $FEV_1 < 70\%$ ) noch vor Behandlungsbeginn gemäß Protokoll von der Studie ausgeschlossen werden. Die 18-wöchige gräserpollenspezifische SIT erfolgte mit 33 Studienteilnehmern. Davon erhielten 16 Probanden eine parallele Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation ( $VD^+$ ) und 17 Probanden das Placebo ( $VD^-$ ). Über den Behandlungszeitraum traten keine Studienabbrüche auf. Zum Nachuntersuchungstermin schlossen 31 der 33 Probanden das erste Studienjahr protokollgemäß ab. Innerhalb der  $VD^+$ -Gruppe ging zu einem Probanden

der Kontakt verloren, bei zwei weiteren konnten aufgrund von Schwangerschaft und eines technischen Fehlers nur partiell Daten erhoben und in die finale Auswertung inkludiert werden. In die Intention-to-treat-Analyse konnten abhängig vom analysierten End- und Zeitpunkt (siehe 4.7, Tabelle 4) 31 bis 33 Datensätze einbezogen werden. Die Abbruchrate der Gesamtkohorte über den betrachteten Studienzeitraum lag bei 11,8 %. Damit ergab sich für die VD<sup>+</sup>-Gruppe ein Verlust von -18,8 % der Gruppenstärke. Die Per-Protocol-Analyse war mit 30 Datensätzen möglich.

**Tabelle 5: Probandencharakterisierung.** Statistik: Test auf Normalverteilung nach *D'Agostino-Pearson*, Normalverteilung (NV) mit Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (MW  $\pm$  SD), nicht NV mit Median und Intervall, Signifikanzberechnung mittels ungepaartem *t*-Test und *Mann-Whitney-U*-Test. <sup>1</sup>Vitamin D<sub>3</sub>-supplementierte Gruppe, <sup>2</sup>Placebo-Gruppe, <sup>3</sup>Signifikanzwert, <sup>4</sup>Body-Mass-Index, <sup>5</sup>allergische Rhinokonjunktivitis, <sup>6</sup>retrospektive Symptombetrachtung, <sup>7</sup>gräserpezifisches IgE.

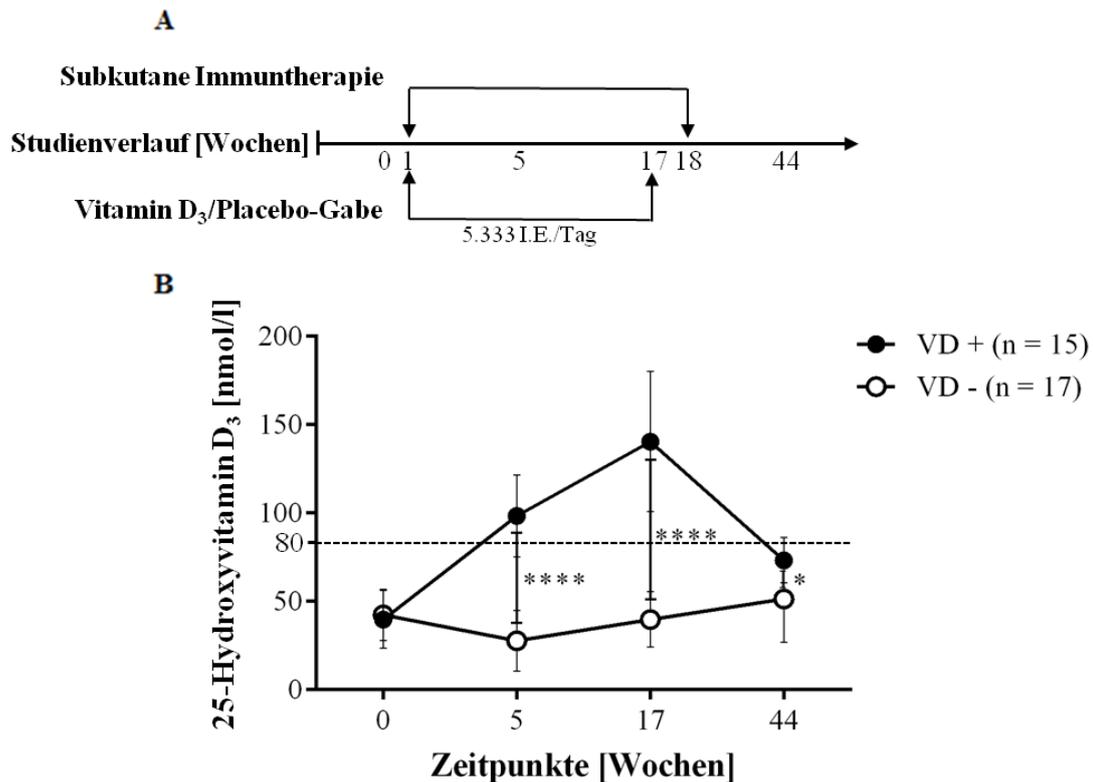
Merkmal		VD <sup>+</sup> (n = 16) <sup>1</sup>	VD <sup>-</sup> (n = 17) <sup>2</sup>	p-Wert <sup>3</sup>
Geschlecht	Männlich	9 (56%)	12 (71%)	0,41
Alter [Jahre]	MW $\pm$ SD	33 $\pm$ 9	32 $\pm$ 10	0,83
BMI <sup>4</sup> [kg/m <sup>2</sup> ]	MW $\pm$ SD	24 $\pm$ 4	23 $\pm$ 3	0,87
Dauer der ARK <sup>5</sup> [Jahre bis 2012]	MW $\pm$ SD	20 $\pm$ 10	18 $\pm$ 8	0,44
rSB <sup>6</sup> Saison 2011 [Punkte]	Median (Intervall)	21 (12-25)	16 (14-25)	0,18
Gesamt-IgE [kU/l]	Median (Intervall)	83,7 (16-611)	130,0 (39-1636)	0,22
sIgE <sup>7</sup> [kU/l]	Median (Intervall)	14,3 (1-100)	21,3 (1-100)	0,34
Gräserpollensensitivität in Prick-Testung [mm]	MW $\pm$ SD	8,6 $\pm$ 3,0	9,0 $\pm$ 3,6	0,68
Sensitivität weiterer Allergien in Prick-Testung [Anzahl (%)]	Haselnuss	8 (50)	10 (59)	0,63
	Erle	10 (63)	11 (65)	0,91
	Birke	9 (56)	11 (65)	0,64
	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	3 (19)	4 (24)	0,60
	Katzenhaar	5 (31)	6 (35)	0,83
	<i>Alternaria alternata</i>	1 (6)	2 (12)	0,61
	Beifuß	6 (38)	8 (47)	0,60
Sensitivität in der Intrakutantestung bei 500 SBE/ml [mm]	MW $\pm$ SD	16,2 $\pm$ 4,2	17,2 $\pm$ 3,6	0,47

25-Hydroxyvitamin D <sub>3</sub> - Ausgangswert [nmol/l]	MW ± SD	40,3 ± 16,2	42,5 ± 14,5	0,69
Nebendiagnosen [Anzahl (%)]	Asthma bronchiale Atopische Dermatitis	8 (50) 5 (31)	6 (35) 2 (12)	0,41 0,19

Die in Tabelle 5 dargestellten demografischen und klinischen Parameter dienen zur Charakterisierung der Subgruppen VD<sup>+</sup> (n = 16) und VD<sup>-</sup> (n = 17) zu Studienbeginn. Im Vergleich der Ausgangswerte konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Die einzelnen Merkmale wurden mittels *D'Agostino-Pearson* auf ihre Normalverteilung hin überprüft. Normalverteilte Daten sind durch den Mittelwert (± Standardabweichung), nicht normal verteilte Daten durch den Median (Intervall) dargestellt. Das mittlere Alter der Gesamtkohorte (n = 33) lag bei 32 (± 9,5) Jahren, der Frauenanteil lag bei 36 % und 94 % der Probanden waren kaukasischer Herkunft. Der durchschnittliche BMI ergab 23 (± 3,6) kg/m<sup>2</sup>. ARK-bezogene Parameter beschrieben unter den Studienteilnehmern eine mittlere Erkrankungsdauer von 19 (± 9) Jahren, eine Beurteilung der Gräserpollensaison 2011 mit durchschnittlichen 18 (12-25) Punkten in der rSB sowie eine Bestimmung des Gesamt-IgE von 101 (16-1636) kU/l und des sIgE von 17,6 (1-100) kU/l. Die in der Probandencharakterisierung in Tabelle 5 gezeigten Gesamt-IgE und sIgE-Werte wurden im Interdisziplinären Allergiespeziallabor der Charité – Universitätsmedizin Berlin erhoben. Die Intrakutantestung ergab eine im Mittel 8,8 (± 3,2) mm große Quaddel. 42,4 % der Kohorte litten parallel an einem Asthma bronchiale, 21,2 % an einer atopischen Dermatitis. Die anfängliche mittlere 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Serumkonzentration aller Studienteilnehmer lag bei 40,7 (± 15,4) nmol/l.

Parallel zur 17-wöchigen gräserpollenspezifischen SIT erfolgte in der VD<sup>+</sup>-Gruppe eine Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation von 5.333 I.E. pro Tag. Die Placebo-Kontrollgruppe erhielt eine äquivalente Menge Neutralöl. Die Behandlungsphasen sind in Abbildung 8 (A) dargestellt. Der zeitliche Verlauf dient zur Orientierung der unter (B) grafisch veranschaulichten Entwicklung des 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Serumspiegels in Abhängigkeit der Vitamin D<sub>3</sub>/Placebo-Gabe. Zu Studienbeginn (Woche 0) lag der 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Ausgangswert innerhalb der Kohorte bei 40,7 (± 15,4) nmol/l. Unter Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation (n = 15, siehe 4.7, Tabelle 4) stieg der Wert in den ersten fünf Wochen von 40,3 nmol/l auf 98,4 nmol/l an, bis zum Abschluss der gräserpollenspezifischen SIT (Woche 17) auf 140,0 nmol/l. Die Behandlung sistierte über die Gräserpollensaison. Der erneut zur Nachuntersuchung (Woche 44) erhobene 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Wert war in der VD<sup>+</sup>-Gruppe auf 73,3 nmol/l abgefallen. In der

Placebo-Gruppe (n = 17) fiel der 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Spiegel von initialen 42,5 nmol/l (Woche 0) auf 27,7 nmol/l (Woche 5) ab, stieg über den weiteren Behandlungsverlauf auf 39,8 nmol/l (Woche 17) an und erreichte zur Nachuntersuchung (Woche 44) den Höchstwert von 51,4 nmol/l. Ein signifikanter Unterschied in der Beeinflussung des 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Spiegels konnte zu jedem Zeitpunkt zwischen den Subgruppen nachgewiesen werden (Interaktion der Subgruppen, \*p ≤ 0,05, \*\*\*\*p ≤ 0,0001).



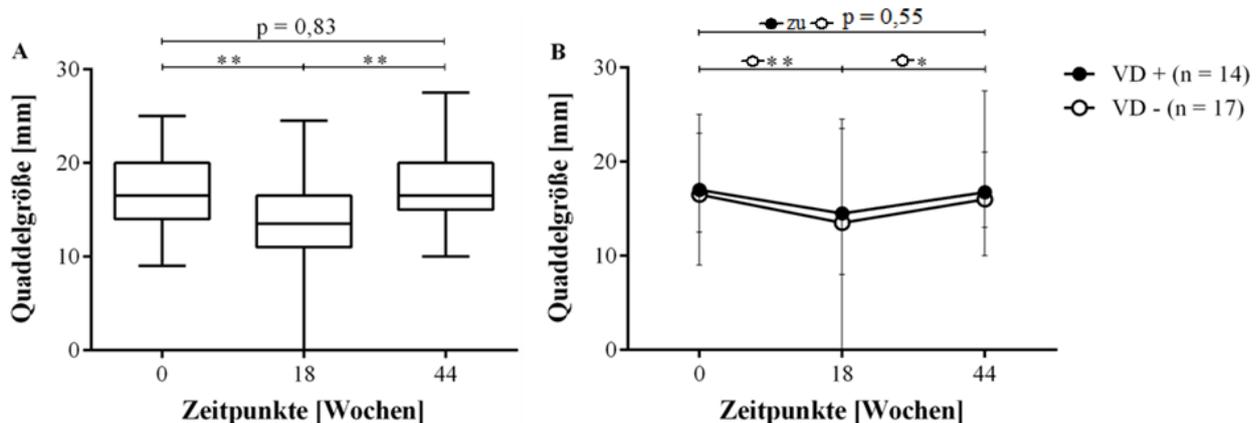
**Abbildung 8: Vitamin D<sub>3</sub>/Placebo-Supplementation.** (A) Behandlungsphasen im Studienverlauf und (B) 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Serumspiegel bei der Vitamin D<sub>3</sub>-supplementierten Gruppe (VD<sup>+</sup>) zur Placebo-Gruppe (VD<sup>-</sup>). Statistik: 2 Way ANOVA mit *Sidak's* multiplem Vergleichstest, NV mit MW ± SD, \*p ≤ 0,05, \*\*\*\*p ≤ 0,0001.

## 5.2 Einfluss von Vitamin D auf die klinische Immunantwort

### 5.2.1 Entwicklung der klinischen Immunantwort über den Erhebungszeitraum

Die Reaktivität mit 500 SBE/ml Gräserextrakt in der Intrakutantestung stellte den primären Endpunkt der Studie dar. Nach der lokalen Injektion von 500 SBE/ml Gräserlösung entstand eine Quaddel, dessen Durchmesser erhoben wurde. Die Intrakutantestung wurde vor der Behandlung (Woche 0), nach erfolgter Behandlung (Woche 18) und zur Nachuntersuchung (Woche 44)

durchgeführt. Abbildung 9 veranschaulicht die Ergebnisse der Intrakutantestreaktion über den Erhebungszeitraum. Grafik (A) zeigt den Verlauf der Gesamtkohorte (n = 31, siehe 4.7, Tabelle 4) mit einem initialen Quaddeldurchmesser von 16,8 ( $\pm$  4,0) mm. Zur zweiten Messung (Woche 18) verringerte sich der Quaddeldurchmesser signifikant (\*\*p  $\leq$  0,01) über den Behandlungszeitraum auf 13,7 ( $\pm$  4,7) mm. Das entspricht einem Abfall von -18,5 % vom Ausgangswert (Woche 0). Während der Gräserpollensaison stieg der Quaddeldurchmesser um 26 % auf 17,3 ( $\pm$  3,6) mm an. Der erneute Anstieg war ebenfalls signifikant (\*\*p  $\leq$  0,01). Ein messbarer Unterschied zwischen dem Ausgangswert (Woche 0) und dem Wert der Nachuntersuchung (Woche 44) konnte nicht ermittelt werden (p = 0,83).



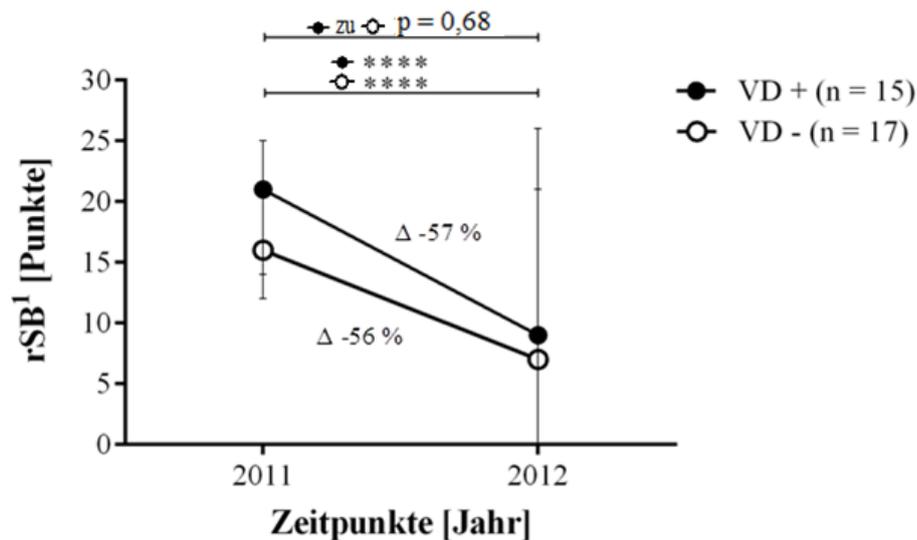
**Abbildung 9: Intrakutantestreaktion über den Erhebungszeitraum.** Quaddeldurchmesser [mm] bei Injektion von 500 SBE/ml Gräserlösung; (A) Gesamtkohorte (n = 31) und (B) in Abhängigkeit der Vitamin D<sub>3</sub>/Placebo-Supplementation. Statistik: (A) 1 Way ANOVA repeated measures (RM) mit *Tukey's* multiplem Vergleichstest, NV mit MW  $\pm$  SD, \*\*p  $\leq$  0,01. (B) 2 Way ANOVA mit *Sidak's* multiplem Vergleichstest, keine NV mit Median und Intervall. Signifikanzberechnung intragruppal mittels 1 Way ANOVA RM (VD<sup>+</sup>) mit *Tukey's* multiplem Vergleichstest und *Friedman* Test (VD<sup>-</sup>, keine NV) mit *Dunn's* multiplem Vergleichstest, \*p  $\leq$  0,05, \*\*p  $\leq$  0,01.

## 5.2.2 Abhängigkeit zur Vitamin D<sub>3</sub>/Placebo-Supplementation

Grafik (B) der Abbildung 9 zeigt die Entwicklung der Reaktivität in der Intrakutantestung in Abhängigkeit der Vitamin D<sub>3</sub>-/Placebo-Gabe. Die zu Studienbeginn (Woche 0) ermittelte Reaktivität in der Intrakutantestung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Subgruppen (p = 0,53). Der initiale Quaddeldurchmesser betrug in der VD<sup>+</sup>-Gruppe 17,0 (9-23) mm und in der VD<sup>-</sup>-Gruppe 16,5 (12,5-25) mm. Der zeitliche Verlauf der Messwerte innerhalb einer

Subgruppe (intragruppal) gestaltete sich analog zur Gesamtkohorte. In der  $VD^+$ -Gruppe verkleinerte sich der initiale Quaddeldurchmesser um -14,7 % auf 14,5 (0-24,5) mm zur zweiten Messung (Woche 18) und vergrößerte sich erneut um 15,9 % auf 16,8 (10-21) mm zur Nachuntersuchung (Woche 44) an. Die Ab- und Zunahme der Messwerte waren zu den einzelnen Zeitpunkten nicht statistisch signifikant. In der  $VD^-$ -Gruppe verkleinerte sich der initiale Quaddeldurchmesser signifikant (\*\* $p \leq 0,01$ ) um -18,2 % auf 13,5 (8-23,5) mm (Woche 18) und vergrößerte sich erneut signifikant (\* $p \leq 0,05$ ) um 18,5 % auf 16,0 (13-27,5) mm zur Nachuntersuchung (Woche 44) an. In beiden Subgruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ausgangs- und den Nachuntersuchungswerten ermitteln. In der Betrachtung der Subgruppen zueinander (intergruppal) ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der  $VD^+$ -Gruppe und der  $VD^-$ -Gruppe darstellen (Interaktion der Subgruppen,  $p = 0,55$ ).

### 5.3 Einfluss von Vitamin D auf die retrospektive Symptombetrachtung



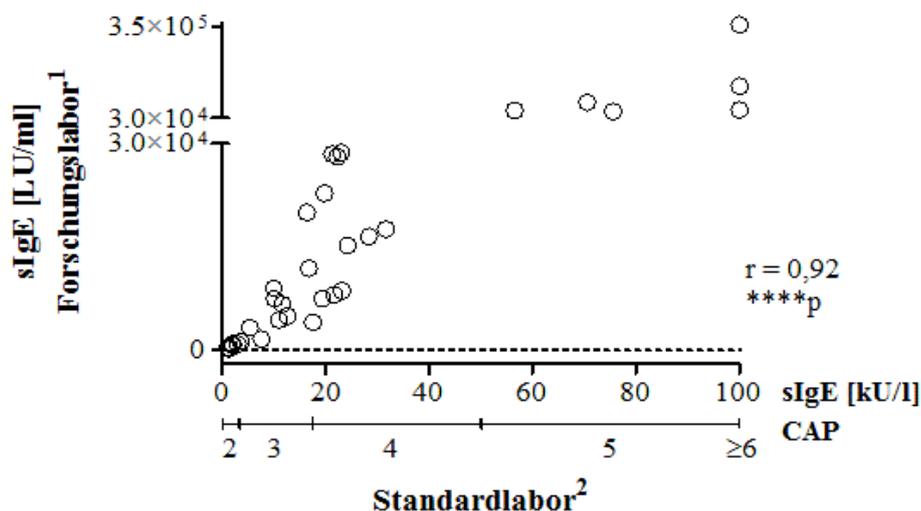
**Abbildung 10: Retrospektive Symptombetrachtung in Abhängigkeit der Vitamin D<sub>3</sub>/Placebo-Supplementation.** Vergleich der Gräserpollensaison 2011 (vor SIT) und 2012 (nach SIT). Statistik: 2 Way ANOVA mit *Sidak's* multiplem Vergleichstest, keine NV mit Median und Intervall. Signifikanzberechnung intragrupal mittels gepaarten *t*-Test ( $VD^+$ ) und *Mann-Whitney-U*-Test ( $VD^-$ ), \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ . <sup>1</sup>retrospektive Symptombetrachtung.

Bei der rSB wurde in einer nachträglichen subjektiven Bewertung der vergangenen Gräserpollensaison jedem individuell erlebten ARK-Symptom (siehe 4.5.2.2) ein Punktwert von „0“ – keine Beschwerden bis „3“ – starke Beschwerden zugeordnet. Die Summe der Punkte

stellte den subjektiv empfundenen Leidensdruck jedes Probanden dar. Dabei wurde die rSB der vergangenen Gräserpollensaison 2011 mit der sich an die Behandlung anschließenden Gräserpollensaison 2012 verglichen. Die Erfragung der rSB in der Gesamtkohorte (n = 33) von 2011 ergab zu Studienbeginn einen Punktwert von 18 (12-25). Dieser fiel in der darauffolgenden rSB der Gräserpollensaison 2012 auf 9 (0-26) Punkte ab. Der ARK-bedingte Leidensdruck konnte signifikant (\*\*\*\*p ≤ 0,0001) um -50 % in der Gesamtkohorte reduziert werden. In Abbildung 10 ist die rSB in Abhängigkeit der Vitamin D<sub>3</sub>/Placebo-Gabe dargestellt. Die Ausgangswerte der Subgruppen waren mit 21 (12-25) Punkten bei der VD<sup>+</sup>-Gruppe (n = 15, siehe 4.7, Tabelle 4) und 16 (14-25) Punkten bei der VD<sup>-</sup>-Gruppe (n = 17) ohne statistisch messbaren Unterschied (p = 0,18, in Grafik nicht gezeigt). In der VD<sup>+</sup>-Gruppe fiel die rSB um -57 % auf 9 (0-21) Punkte ab, in der VD<sup>-</sup>-Gruppe um -56 % auf 7 (0-26) Punkte. Ein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit der Vitamin D<sub>3</sub>/Placebo-Supplementation war nicht nachweisbar (Interaktion der Subgruppen, p = 0,68).

## 5.4 Einfluss von Vitamin D auf die Produktion von sIgE und sIgG4

### 5.4.1 sIgE



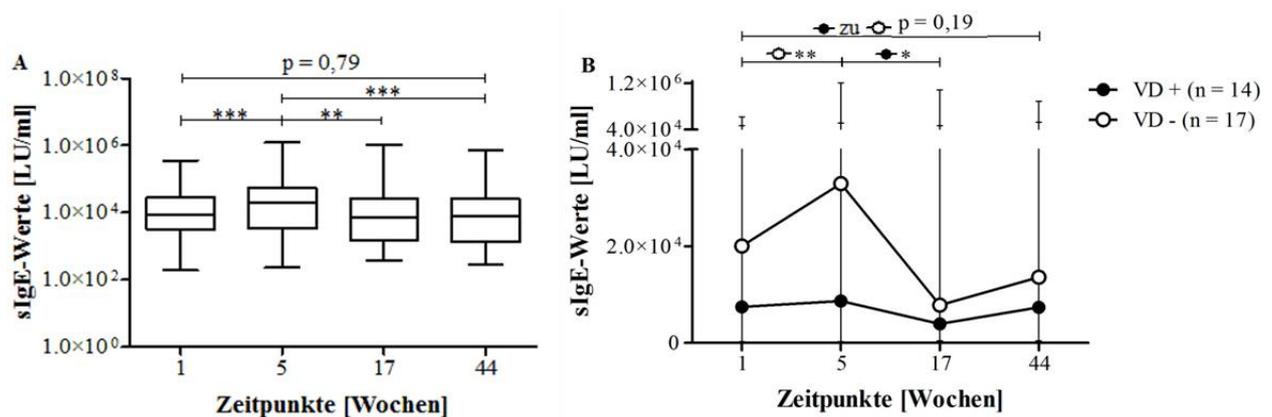
**Abbildung 11: Korrelation der sIgE-Messung im Forschungslabor und Standardlabor.**

Statistik: Korrelationsberechnung nach *Spearman*, n = 33, \*\*\*\*p ≤ 0,0001. <sup>1</sup>im Forschungslabor von Prof. Dr. med. M. Worm, <sup>2</sup>im Interdisziplinären Allergie-Speziallabor der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

Die Serumkonzentrationen der gräser-spezifischen Immunglobuline IgE und IgG4 wurden mittels

eines indirekten ELISA (siehe 4.6.1) im Forschungslabor von *Prof. Dr. med. M. Worm* bestimmt. Vier Zeitpunkte wurden gemessen: Vor der Behandlungsphase (Woche 1), während der SIT-Aufdosierungsphase (Woche 5), nach Abschluss der SIT (Woche 17) und zur Nachuntersuchung (Woche 44).

Zur Validierung der im Forschungslabor etablierten Methoden erfolgte eine externe Messung identischer Proben (der Woche 1) im Interdisziplinären Allergie-Speziallabor der Charité – Universitätsmedizin Berlin. In Abbildung 11 ist die Korrelation der im Forschungs- und Standardlabor erhobenen sIgE-Werte dargestellt. Es liegt eine signifikante Übereinstimmung (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ) der Werte bei einem Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,92$  vor. Parallel erfolgte die Zuordnung der analysierten Probandenseren ( $n = 33$ ) in die durch Phadia® etablierte Klassifizierung in CAP-Klassen (siehe 4.5.2.5). Es ließen sich 18 % ( $n = 6$ ) in CAP 2, 30 % ( $n = 10$ ) in CAP 3, 33 % ( $n = 11$ ) in CAP 4 und jeweils 9 % ( $n = 3$ ) in CAP 5 und CAP 6 einordnen. Die Entwicklung der viermalig über den Erhebungszeitraum gemessenen sIgE-Werte ist in Abbildung 12 grafisch veranschaulicht.



**Abbildung 12: sIgE-Serumkonzentration über den Erhebungszeitraum.** (A) Gesamtkohorte ( $n = 31$ ) und (B) in Abhängigkeit der Vitamin D<sub>3</sub>/Placebo-Supplementation. Statistik: (A) *Friedman* Test mit *Dunn's* multiplem Vergleichstest, keine NV mit Median und Intervall, \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ . (B) 2 Way ANOVA mit *Sidak's* multiplem Vergleichstest, keine NV mit Median und Intervall. Signifikanzberechnung intragruppal mittels *Friedman* Test mit *Dunn's* multiplem Vergleichstest, \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ .

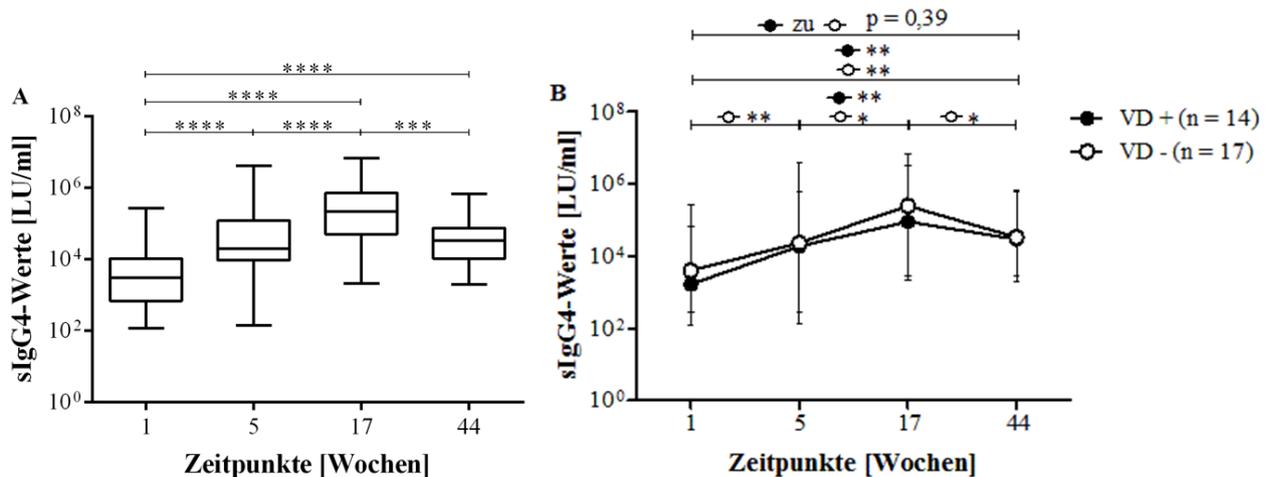
Der unter (A) abgebildete sIgE-Verlauf der Gesamtkohorte ( $n = 31$ , siehe 4.7, Tabelle 4) zeigt einen signifikanten Anstieg (\*\*\*) der sIgE-Konzentration vom Ausgangswert (Woche 1) mit 8598 (192-358.000) LU/ml (Laboreinheit pro ml) zum zweiten Messzeitpunkt

(Woche 5) mit 19.400 (227-1.210.000) LU/ml. Das entspricht einem prozentualen Anstieg von 125,6 %. Zum Abschluss der SIT (Woche 17) fiel die sIgE-Konzentration signifikant (\*\* $p \leq 0,01$ ) um -15,51 % unter den Ausgangswert auf 7264 (378-1.030.000) LU/ml. Über die Gräserpollensaison war ein erneuter Anstieg auf 7501 (295-748.000) LU/ml (Woche 44) zu verzeichnen. Zwischen dem Ausgangswert (Woche 1) und der sIgE-Konzentration zur Nachuntersuchung (Woche 44) konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden ( $p = 0,79$ ). In Abbildung (B) ist der sIgE-Verlauf in Abhängigkeit der Vitamin D<sub>3</sub>/Placebo-Supplementation dargestellt. Die Ausgangswerte (Woche 1) der VD<sup>+</sup>-Gruppe und VD<sup>-</sup>-Gruppe waren ohne statistisch messbaren Unterschied ( $p = 0,14$ ). In beiden Subgruppen war der Verlauf zu dem, der unter (A) gezeigten Gesamtkohorte, vergleichbar. Bei Betrachtung der intragruppalen Entwicklung war für die VD<sup>+</sup>-Gruppe ein signifikanter Abfall (\* $p \leq 0,05$ ) der sIgE-Konzentration von 8691 (311-199.000) LU/ml (Woche 5) auf 3959 (437-143.000) LU/ml (Woche 17) zu verzeichnen. Das entspricht einer verringerten sIgE-Konzentration von -46,9 % zum Ausgangswert (Woche 1). In der VD<sup>-</sup>-Gruppe war kein signifikanter Abfall der sIgE-Konzentration über denselben Zeitraum (Woche 5 zu Woche 17) statistisch nachweisbar. Jedoch kam es zu einem signifikanten Anstieg (\*\* $p \leq 0,01$ ) des sIgE-Ausgangswerts (Woche 1) von 20.000 (192-358.000) LU/ml auf 32.900 (227-1.210.000) LU/ml zum zweiten Messzeitpunkt (Woche 5). Das entspricht einem Anstieg von 64,5 %. In der VD<sup>+</sup>-Gruppe war über denselben Zeitraum ein Anstieg von 16,6 % statistisch nicht signifikant. In beiden Subgruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ausgangs- (Woche 1) und den Nachuntersuchungswerten (Woche 44) ermitteln. Darüber hinaus war kein intergruppaler Vitamin D<sub>3</sub>-assoziierter Unterschied zwischen den Subgruppen nachzuweisen (Interaktion der Subgruppen,  $p = 0,19$ ).

#### 5.4.2 sIgG4

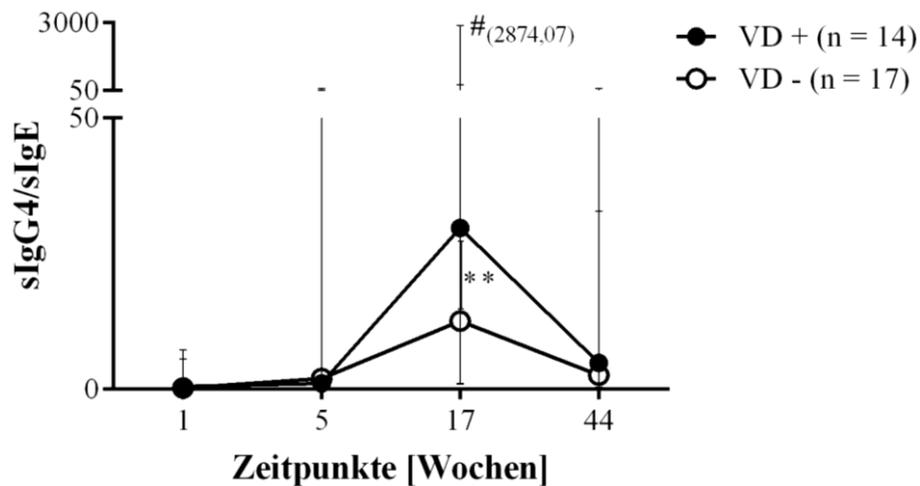
Analog zu der in Abbildung 12 veranschaulichten sIgE-Entwicklung ist in Abbildung 13 der sIgG4-Verlauf über den Erhebungszeitraum grafisch dargestellt. Die unter (A) abgebildete Gesamtkohorte ( $n = 31$ , siehe 4.7, Tabelle 4) zeigt einen kontinuierlichen und signifikanten (\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\* $p \leq 0,0001$ ) Anstieg der sIgG4-Serumkonzentration über die Behandlungsphase (Woche 1 bis Woche 17). Dabei stiegen die sIgG4-Werte von anfänglichen 3008 (117-265.000) LU/ml auf 218.000 (2096-6.610.000) LU/ml an. Über die Gräserpollensaison (zur Woche 44) fiel die sIgG4-Serumkonzentration auf 33.506 (1945-681.000) LU/ml ab, blieb jedoch im Vergleich zum Ausgangswert (Woche 1) über

das 11-fache erhöht ( $****p \leq 0,0001$ ). Der unter **(B)** dargestellte sIgG4-Verlauf in Abhängigkeit der Vitamin D<sub>3</sub>/Placebo-Supplementation ist mit dem, der unter **(A)** gezeigten Gesamtkohorte, vergleichbar. Die Ausgangswerte (Woche 1) der Subgruppen waren ohne statistisch messbaren Unterschied ( $p = 0,48$ ). In der VD<sup>+</sup>-Gruppe zeigte sich ein signifikanter ( $**p \leq 0,01$ ) intragruppaler Anstieg der sIgG4-Konzentration von 18.875 (140-588.000) LU/ml (Woche 5) auf 90.338 (2096-6.610.000) LU/ml, dem 54-fachen des Ausgangswerts (Woche 1). In der VD<sup>-</sup>-Gruppe ließ sich ein signifikanter ( $**p \leq 0,01$ ,  $*p \leq 0,05$ ) intragruppaler Anstieg über die gesamte Behandlungsphase (Woche 1 bis Woche 17) nachweisen. Zur Beendigung der SIT (Woche 17) ist der sIgG4-Wert in der VD<sup>-</sup>-Gruppe um das 61-fache von 4021 (278-65.900) auf 249.000 (2989-3.370.000) angestiegen. Der Abfall der sIgG4-Konzentration über die Gräserpollensaison (Woche 17 bis Woche 44) war in der VD<sup>-</sup>-Gruppe im Gegensatz zur VD<sup>+</sup>-Gruppe signifikant ( $*p \leq 0,05$ ). Für beide Subgruppen konnte ein signifikanter ( $**p \leq 0,01$ ) intragruppaler Anstieg, für die VD<sup>+</sup>-Gruppe um das 18-fache und für die VD<sup>-</sup>-Gruppe um das 8-fache, der sIgG4-Konzentration über den gesamten Erhebungszeitraum (Woche 1 bis Woche 44) nachgewiesen werden. Ein intergruppaler Unterschied zwischen der VD<sup>+</sup>-Gruppe und der VD<sup>-</sup>-Gruppe ergab keinen signifikanten Unterschied (Interaktion der Subgruppen,  $p = 0,39$ ).



**Abbildung 13: sIgG4-Serumkonzentration über den Erhebungszeitraum. (A)** Gesamtkohorte ( $n = 31$ ) und **(B)** in Abhängigkeit der Vitamin D<sub>3</sub>/Placebo-Supplementation. Statistik: **(A)** Friedman Test mit Dunn's multiplem Vergleichstest, keine NV mit Median und Intervall,  $***p \leq 0,001$ ,  $****p \leq 0,0001$ . **(B)** 2 Way ANOVA mit Sidak's multiplem Vergleichstest, keine NV mit Median und Intervall. Signifikanzberechnung intragruppaler mittels Friedman Test mit Dunn's multiplem Vergleichstest,  $*p \leq 0,05$ ,  $**p \leq 0,01$ .

### 5.4.3 sIgE/sIgG4-Ratio



**Abbildung 14: sIgG4/sIgE-Ratio in Abhängigkeit der Vitamin D<sub>3</sub>/Placebo-Supplementation.** Statistik: 2 Way ANOVA mit *Sidak's* multiplem Vergleichstest, keine NV mit Median und Intervall, \*\* $p \leq 0,01$ . #Maximalwert mittels Extremwertanalyse nach *Tukey* als *kein* Ausreißer definiert.

In Abbildung 14 sind die über vier Zeitpunkte ermittelten sIgG4- und sIgE-Serumkonzentrationen zueinander ins Verhältnis gesetzt und in Abhängigkeit der Vitamin D<sub>3</sub>/Placebo-Gabe grafisch dargestellt. Dabei ließ sich eine statistisch signifikant (\*\* $p \leq 0,01$ ) größere sIgG4/sIgE-Ratio in der VD<sup>+</sup>-Gruppe zum Abschluss der SIT (Woche 17) nachweisen. Zu den weiteren Zeitpunkten war kein Unterschied zwischen den Subgruppen messbar.

## 5.5 Verträglichkeit

Zur Evaluation einer gesundheitsverträglichen Studienteilnahme wurden das Auftreten von UEs sowie die bedarfsabhängige Einnahme studienrelevanter Medikamente dokumentiert. In Tabelle 6 sind alle SIT-bedingten UEs aufgelistet, die durch ihr zeitliches und phänotypisches Auftreten als Reaktion auf die Studienmedikation Allergovit<sup>®</sup> Gräser (Allergopharma, Deutschland) wahrscheinlich waren. Anhand der Ausprägung wurde das UE einem Schweregrad von leicht über moderat bis schwer zugeordnet. Über den Zeitraum der SIT-Aufdosierung (Woche 1 bis Woche 5) waren in der VD<sup>+</sup>-Gruppe sechs UEs, davon zwei leichte und vier moderate zu verzeichnen. In der VD<sup>-</sup>-Gruppe war ein moderates UE aufgetreten. Während der SIT-Erhaltungsphase (Woche 5 bis Woche 18) sind in beiden Subgruppen sieben UEs

dokumentiert worden, davon ein leichtes und sechs moderate in der VD<sup>+</sup>-Gruppe, zwei leichte und fünf moderate in der VD<sup>-</sup>-Gruppe. Anhand statistischer Berechnungen ließ sich in der VD<sup>-</sup>-Gruppe eine signifikant (\*p ≤ 0,05) erhöhte Anzahl an UEs in der Erhaltungsphase gegenüber der Aufdosierungsphase nachweisen. In der VD<sup>+</sup>-Gruppe zeigte sich hingegen keine intragruppale signifikante (p = 0,50) Ab- oder Zunahme von UEs. Intergruppal konnte während der Aufdosierungsphase ein signifikanter (\*p ≤ 0,05) Unterschied zwischen den Subgruppen bestimmt werden. Unter Beachtung des Schweregrads war das Auftreten eines moderaten UE in der VD<sup>+</sup>-Gruppe drei Mal und das eines leichten UE zwei Mal häufiger als in der VD<sup>-</sup>-Gruppe. Während der Erhaltungsphase konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Subgruppen bestimmt werden (p = 0,79). Eine Unverträglichkeit gegenüber den Studienpräparaten Viganol<sup>®</sup> Öl (Merck, Deutschland) oder dessen Trägersubstanz Neutralöl (Fagron, Deutschland) wurde nicht ermittelt (siehe 4.5.3.2).

**Tabelle 6: Verträglichkeit der Studienmedikation.** Statistik: Signifikanzberechnung intragruppal mittels *Wilcoxon*-Test und intergruppal mittels *Mann-Whitney-U*-Test, keine NV, \*p ≤ 0,05. <sup>1</sup>Unerwünschtes Ereignis: leicht (lokale Schwellung der SIT-Injektionsstelle ≤ 8 cm, milde ARK-Symptomatik bis 30 Minuten nach SIT), moderat (lokale Schwellung der SIT-Injektionsstelle > 8 cm, ARK-Symptomatik bis 48 Stunden nach SIT), schwer (lebensbedrohliche systemische Reaktion, anaphylaktischer Schock, Angioödem).

Woche	VD <sup>+</sup> (n = 16)		VD <sup>-</sup> (n = 17)	
	1 - 5	5 - 18	1 - 5	5 - 18
Gesamtanzahl UE <sup>1</sup>	6	7	1	7
leicht	2	1	0	2
moderat	4	6	1	5
schwer	0	0	0	0
Intragruppale Signifikanz	p = 0,50		0,03*	
Intergruppale Signifikanz	1-5	0,04*		
	5-18		p = 0,79	

In Tabelle 7 ist der Bedarf an studienrelevanten Medikamenten dargestellt. Dabei wurde die Einnahmehäufigkeit von Antiallergika, Antiasthmatica und topischen Steroiden über den Erhebungszeitraum dokumentiert. In der VD<sup>+</sup>-Gruppe (n = 15, siehe 4.7, Tabelle 4) war während

der SIT-Aufdosierungsphase (Woche 1 bis Woche 5) die sechsmalige Einnahme von Antiallergika, die zweimalige Anwendung von Antiasthmatica und der einmalige Gebrauch von topischen Steroiden protokolliert worden. Das steigerte sich während der SIT-Erhaltungsphase (Woche 5 bis Woche 18) auf die achtmalige Einnahme von Antiallergika, zweimalige Anwendung von Antiasthmatica und den dreimaligen Gebrauch von topischen Steroiden. Über die Gräserpollensaison kam es zur zweimaligen Anwendung topischer Steroide. Der Bedarf an studienrelevanten Medikamenten zeigte einen signifikanten ( $*p \leq 0,05$ ) intragruppalen Unterschied über den Erhebungszeitraum. In der  $VD^-$ -Gruppe wurden zweimalig Antiallergika während der SIT-Aufdosierungsphase und sechsmalig während der SIT-Erhaltungsphase angewandt. Über die Gräserpollensaison war kein Gebrauch von studienrelevanten Medikamenten protokolliert worden. Der Bedarf dieser nahm in der  $VD^-$ -Gruppe ebenfalls einen signifikanten intragruppalen Verlauf ( $**p \leq 0,01$ ) über den Erhebungszeitraum. Es konnte kein signifikanter intergruppaler Unterschied zwischen den Subgruppen festgestellt werden ( $p = 0,31$ ).

**Tabelle 7: Einnahme studienrelevanter Medikamente.** Statistik: Signifikanzberechnung intragruppal mittels *Friedman* Test mit *Dunn's* multiplem Vergleichstest und intergruppal mittels 2 Way ANOVA, keine NV,  $*p \leq 0,05$ ,  $**p \leq 0,01$ .

Woche	$VD^+$ (n = 15)			$VD^-$ (n = 17)		
	SIT + Vitamin D <sub>3</sub> /Placebo ←-----→			SIT + Vitamin D <sub>3</sub> /Placebo ←-----→		
	1 - 5	5 - 18	18 - 44	1 - 5	5 - 18	18 - 44
<b>Antiallergika</b>	6	8	0	2	6	0
<b>Antiasthmatica</b>	2	2	0	0	0	0
<b>topische Steroide</b>	1	3	2	0	0	0
<b>Intragruppale Signifikanz</b>	<b>0,02**</b>			<b>0,009**</b>		
<b>Intergruppale Signifikanz</b>	p = 0,31					

## 6 Diskussion

Die Bedeutung von Vitamin D wird sowohl bezüglich der Prävalenz als auch der Therapie von allergischen Erkrankungen kontrovers diskutiert. Repräsentative klinische Studien zur kritischen Beurteilung des Vitamin D als Immunmodulator liegen bisher nur sehr begrenzt vor.<sup>110</sup> Im Rahmen der hier vorgelegten ProGIT-Studie erfolgte eine dreijährige gräserpollenspezifische Immuntherapie mit adjuvanter Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation in einem randomisierten placebokontrollierten Studiendesign. Die vorliegende Arbeit basiert auf den Daten und Ergebnissen des ersten Studienjahres. Die erhobenen klinischen und immunologischen Parameter werden im Folgenden kritisch bewertet und im Kontext vergleichbarer Studien diskutiert.

### 6.1 Evaluation der Kohorte

Die Untersuchungsgruppe umfasste 33 randomisierte Probanden, die in einem doppelblind Verfahren in eine Vitamin D<sub>3</sub>-supplementierte Gruppe (VD<sup>+</sup>, n = 16) und in eine Placebo-Kontrollgruppe (VD<sup>-</sup>, n = 17) aufgeteilt wurden. Die jeweilige Gruppenstärke war mit denen früherer subkutaner explorativer Immuntherapiestudien vergleichbar.<sup>35,104,106</sup> Die zur Probandenrekrutierung erhobenen demografischen und klinischen Charakteristika zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Subgruppen. Dabei war die vergleichbare Ausprägung der ARK in ihrer Qualität (rSB 2011) und Quantität (sIgE und Sensitivität in der Intrakutan- und Prick-Testung) für eine repräsentative Verlaufsanalyse von besonderer Bedeutung. Eine mögliche Datenverzerrung durch chronisch-entzündliche Erkrankungen, eine systemische Steroideinnahme oder eine zeitnah erfolgte Immuntherapie wurden durch die Ausschlusskriterien vermieden. Beide Subgruppen wiesen zu Studienbeginn einen Vitamin D-Mangel auf. Wie erwartet, stieg die 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Serumkonzentration in der VD<sup>+</sup>-Gruppe signifikant an. Dabei erreichte sie innerhalb von fünf Wochen ein Vitamin D-suffizientes Level  $\geq 80$  nmol/l<sup>67</sup> und nach 17 Wochen einen 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Spiegel im oberen Referenzbereich. In der VD<sup>-</sup>-Gruppe fiel der Wert bis zur 5. Woche kontinuierlich ab und stagnierte über den Behandlungszeitraum im Vitamin D-defizienten Bereich. Der mit Hilfe der 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Bestimmung objektivierbare Erfolg der Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation in der VD<sup>+</sup>-Gruppe ermöglicht eine Aussage über die Effektivität der gräserpollenspezifischen SIT bei Vitamin D-suffizienten im Vergleich zu Vitamin D-defizienten Individuen. Der Kurvenverlauf mit Anstieg des 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Spiegels in der VD<sup>+</sup>-Gruppe weist auf eine hohe Einnahmezuvverlässigkeit innerhalb der aktiv supplementierten Gruppe hin. Die zur Nachuntersuchung gemessenen 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Spiegel in der VD<sup>+</sup>-Gruppe bestätigen

die Beobachtung, dass ein Großteil der Bevölkerung den Vitamin D<sub>3</sub>-Bedarf auch während der UV-reichen Phase des Jahres nicht ausreichend erzielt und sich auch keine Reserve für die UVB-strahlungsarmen Wintermonate aufbaut.<sup>67</sup> Die genauen Wechselwirkungen zwischen Vitamin D<sub>3</sub>-Aufnahme, 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Sättigung und der tatsächlichen Calcitriolbereitstellung sind bisher ungeklärt.<sup>82</sup> Zahlreiche Umstände können einen Einfluss auf den 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Spiegel haben. Hierzu gehören genetische Faktoren wie die VDBP-Konzentration, VDR-Polymorphismen oder Faktoren, die die 1 $\alpha$ -Hydroxylase- und 24 Hydroxylase-Aktivität beeinflussen sowie das Lebensalter und der Körperfettanteil.<sup>67,111</sup> In welcher Weise diese Einflussfaktoren das Ergebnis der vorliegenden Studie beeinflusst haben könnten, bleibt zum jetzigen Zeitpunkt unbeantwortet. Hinsichtlich Lebensalter und Körperfettanteil ist jedoch festzustellen, dass bei einem durchschnittlichen Probandenalter von 32 Jahren und einem mittleren BMI von 23 kg/m<sup>2</sup> bezüglich dieser Faktoren eine negative Beeinflussung der endogenen Calcitriolsynthese als unwahrscheinlich anzunehmen ist.<sup>85</sup>

## 6.2 Einfluss von Vitamin D auf die klinische Immunantwort

Sowohl in der Vitamin D<sub>3</sub>- als auch in der Placebo-Gruppe kam es zu einer signifikanten Reduktion der Hauttestreaktivität über den Behandlungszeitraum. Diese äußerte sich in einer Abnahme des Quaddeldurchmessers nach wiederholter Injektion des Allergenextraktes (Intrakutantestung) nach Abschluss der Behandlungsphase. Das spricht für eine erfolgreiche Unterdrückung der initialen sIgE-abhängigen Immunantwort nach Einleitung der Immuntherapie und bestätigt die Erkenntnisse früherer Immuntherapiestudien.<sup>35</sup> Ein analoger Abfall des sIgE zum Ausgangswert war nicht signifikant, hingegen konnte ein deutlicher sIgG4-Anstieg über den gesamten Behandlungszeitraum verzeichnet werden. Diese Beobachtung entspräche dem zuvor beschriebenen Wirkmechanismus, nach dem SIT-induzierte tolerogene APZ über die Induktion Foxp3<sup>+</sup>-Treg zur Bildung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  führen. Sie bewirken eine Suppression von Mastzellen und sIgE-produzierenden Plasmazellen.<sup>29,81</sup> Gleichzeitig kommt es zur vermehrten Proliferation sIgG4-spezifischer Plasmazellen, welche die intrakutan injizierten Allergene „abfangen“.<sup>112</sup> Die dem Calcitriol zugeschriebene Verstärkung dieser immunmodifizierenden Prozesse<sup>94,105,106</sup> wurde über den betrachteten Zeitraum nicht deutlich. In einer vergleichbaren Studie thematisierten *Baris* und Kollegen, dass ein Vitamin D-Defizit zu Beginn der SIT die potentielle supportive Wirkung des Calcitriols über die ersten Behandlungswochen verzögere.<sup>104</sup> Demnach wäre von einer signifikant verstärkten Hemmung der primären Immunantwort erst in den Folgejahren auszugehen, in denen die erneute SIT-Gabe bei einer

Vitamin D-suffizienten gegenüber einer Vitamin D-defizienten Subgruppe erfolgt. *Francis* und Kollegen zeigten, dass die Wirkung der SIT von der injizierten Allergendosis abhängig ist.<sup>113</sup> Ein derartiger Zusammenhang wäre für die immunmodulatorische Wirkung des Calcitriols ebenfalls denkbar. In Folge einer vermehrten Aktivierung VDR-exponierender Immunzellen durch hohe Allergeninjektionen könnten die u.a. durch *Holick* beschriebenen auto- und parakrinen Wirkungen des Calcitriols verstärkt werden.<sup>73</sup> Dies sollte neben der Untersuchung der genauen Mechanismen der endogenen Calcitriolbereitstellung, in weiterführenden Studien, untersucht werden. Betrachtet man die Entwicklung der Intrakutantestreaktion von Beendigung der Behandlung über die Gräserpollensaison bis zum Nachuntersuchungstermin stieg die Reaktivität erneut an. Im Sinne einer transienten Toleranzentwicklung blieb ein Langzeiteffekt aus. Diese Befunde entsprechen den Beobachtungen früherer Untersuchungen, die zeigen, dass die immunmodulatorischen Effekte der SIT besonders nach dem zweiten und dritten Behandlungsjahr deutlich werden.<sup>36,44</sup> Erst die repetitive Stimulation des adaptiven Immunsystems durch wiederholte Allergenexposition führt zu anhaltenden immunologischen Effekten.<sup>114</sup> In einer vierjährigen SIT-Studie von Walker und Kollegen zeigte sich die primäre Immunantwort im Gegensatz zur verzögerten Reaktion in der Intrakutantestung sogar unbeeinflusst über den gesamten Studienzeitraum.<sup>115</sup> An Stelle einer präseasonalen Immuntherapie ist denkbar, dass eine perenniale Zufuhr kontrollierter Allergendosen die Aufrechterhaltung der immunogenen Toleranz fördert und die Calcitriolwirkung optimiert.<sup>105,116</sup> Darüber hinaus wäre in zukünftigen Studien eine Fortführung der Vitamin D<sub>3</sub>/Placebo-Supplementation mit engmaschiger Kontrolle des 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Serumspiegels auch während der Sommermonate (über die Gräserpollensaison) sinnvoll, um dem erneuten Abfall der 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Konzentration in der VD<sup>+</sup>-Gruppe entgegenzuwirken und den Einfluss eines ganzjährig suffizienten Vitamin D-Haushalts auf die Ergebnisse der Nachuntersuchung beurteilen zu können. Zum jetzigen Zeitpunkt lässt sich anhand der erhobenen Daten des ersten Studienjahres zwar keine Vitamin D-abhängige Modulation des primären Endpunktes in der Intrakutantestung nachweisen, jedoch fand sich ein Einfluss suffizienter Vitamin D-Level auf die humorale Immunantwort.

### **6.3 Einfluss von Vitamin D auf die retrospektive Symptombetrachtung**

Die retrospektive Betrachtung der ARK-Symptome hat sich in beiden Subgruppen von der Gräserpollensaison 2011 (vor Behandlung) zur Gräserpollensaison 2012 (nach Behandlung) signifikant verbessert. Die Probanden bewerteten ARK-typische Beschwerden der oberen Atemwege und Augen als regredient oder ausbleibend, was in einem deutlich

verringerten persönlichen Leidensdruck sowie einem subjektiven Therapieerfolg resultierte. Übereinstimmende Ergebnisse erzielten vorherige Immuntherapiestudien mit analoger Bewertung der ARK-Symptome.<sup>13,117</sup> Eine Symptomreduktion durch eine verminderte Allergenexposition seitens der Probanden oder eine geringere Pollenbelastung 2012 im Vergleich zu den Vorjahren lag nicht vor. Gemäß der Daten von der Stiftung Deutscher Polleninformationsdienst nahm die Gräserpollenkonzentration von 2011 zu 2012 sogar um 11 % zu.<sup>23</sup> Darüber hinaus spiegelte sich die Abnahme der ARK-Beschwerden in dem signifikant verminderten Bedarf von studienrelevanten symptomlindernden Medikamenten in der Gräserpollensaison 2012 wider. Unsere Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen von *Calderon* und Kollegen, die in einer repräsentativen Metaanalyse eine SIT-induzierte signifikante Reduktion der ARK-Symptome sowie des Medikamentenbedarfs durch eine SIT zeigen.<sup>118</sup> Ein signifikanter Unterschied zwischen den Subgruppen war nicht nachweisbar. Entsprechend der anfänglich wahrgenommenen ARK-Symptome der vorangegangenen Gräserpollensaison 2011 profitierte die Vitamin D<sub>3</sub>-supplementierte Subgruppe in analoger Weise von der SIT wie die Placebo-Gruppe. In der bereits zuvor erwähnten Studie von *Baris* und Kollegen mit einer *Dermatophagoides pteronyssinus* (Hausstaub)-spezifischen SIT bei asthmatischen Kindern mit/ohne Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation konnte eine Vitamin D<sub>3</sub>-assoziierte Symptomminderung nachgewiesen werden.<sup>104</sup> *Majak* und Kollegen bestätigten die Erkenntnisse der 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-abhängigen verstärkten Symptomreduktion und des verminderten Steroidbedarfs in zwei randomisierten SIT-Studien bei asthmatischen Kindern. In den Untersuchungen von *Baris* und *Majak* erfolgte die Symptombetrachtung jedoch zeitgleich zum Behandlungszeitraum.<sup>104,106</sup> Anstelle einer retrospektiven Symptombetrachtung wäre bei einer zeitnahen Erhebung der Beschwerden unter unmittelbarer Allergenexposition von einer realeren und repräsentativeren Einschätzung auszugehen. Mögliche Subgruppenunterschiede wären leichter zu erfassen gewesen.

#### **6.4 Einfluss von Vitamin D auf die Produktion von sIgE und sIgG4**

Im Rahmen der SIT ließen sich Veränderungen der spezifischen humoralen sIgE- und sIgG4-Antwort nachweisen. Die Validierung der zur sIgE-Bestimmung etablierten Methode erfolgte durch eine externe Kontrollmessung identischer Proben. Bei Betrachtung des sIgE-Kurvenverlaufs war ein Subgruppenunterschied in den sIgE-Ausgangswerten sichtbar, jedoch statistisch nicht signifikant. Während der ersten fünf Behandlungswochen war erwartungsgemäß ein deutlicher sIgE-Anstieg nach Einleitung der SIT zu verzeichnen. Ursächlich könnte die durch *Erazo* und Kollegen beschriebene allergeninduzierte Aktivierung von

sIgE-Gedächtniszellen und deren reaktive Umwandlung in sIgE-produzierende Plasmazellen sein.<sup>119</sup> Der initiale sIgE-Anstieg war unter Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation nicht signifikant. Bei vergleichbarer Ausgangssituation der Subgruppen könnte das auf eine bereits durch *Heine* und Kollegen beschriebene calcitriolinduzierte Hemmung IgE-produzierender Plasmazellen und auf eine vermehrte Produktion des tolerogenen Zytokins IL-10 hindeuten.<sup>89</sup> In den darauffolgenden Wochen der Behandlung verringerte sich die sIgE-Konzentration beider Subgruppen übereinstimmend mit den Erkenntnissen zahlreicher vorheriger Immuntherapiestudien.<sup>13,113</sup> In der VD<sup>+</sup>-Gruppe lag ein statistisch signifikanter Abfall der sIgE-Werte vor, dessen mögliche Kausalität zu einer supportiv antientzündlichen Vitamin D<sub>3</sub>-Wirkung in den Folgejahren überprüft werden muss. Der Anstieg des sIgG4-Serumspiegels verlief in beiden Subgruppen signifikant über den gesamten Betrachtungszeitraum. Das bestätigt den von *Nouri-Aria* beschriebenen Effekt der SIT-induzierten IL-10-abhängigen IgG4-Immunantwort.<sup>120</sup> Die sIgG4-Konzentration ist noch zum Nachuntersuchungstermin signifikant erhöht und somit nachhaltig in beiden Subgruppen verändert. Dabei sind die sIgG4-Werte in der VD<sup>+</sup>-Gruppe stärker angestiegen und im Gegensatz zur VD<sup>-</sup>-Gruppe nicht signifikant während der Gräserpollensaison abgefallen. Das ist ein möglicher Hinweis darauf, dass es während der Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation in Folge erhöhter IL-10-Ausschüttung zu einer vermehrten Differenzierung zu sIgG4-produzierenden Plasmazellen kommt.<sup>89,98</sup> In der intergruppalen Betrachtung ließ sich ein signifikanter Unterschied in der sIgG4/sIgE-Ratio nach Durchführung der SIT bestimmen. Die unter Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation zu sIgG4 verschobene humorale Immunantwort könnte möglicherweise auf ein besseres Therapieansprechen hinweisen.<sup>112</sup>

In Zusammenschau der klinischen und laborchemischen Ergebnisse über den Behandlungszeitraum ergab sich folgendes Bild: Eine sich im Rahmen der SIT entwickelnde immunologische Toleranz gegenüber dem Gräserallergen lässt sich anhand der erhobenen Daten bestätigen. Die sIgE-Abnahme bei kontinuierlichem sIgG4-Anstieg sowie die abgeschwächte primäre Immunantwort in der Intrakutantestung stimmen mit den Beobachtungen früherer SIT-Studien überein.<sup>29,112</sup> Die zum Nachuntersuchungstermin erhobenen Daten zeigten, ausgenommen dem sIgG4, einen reversiblen Verlauf der primären und sekundären Endpunkte. So wiesen *Ali* und Kollegen nach, dass die Langzeitwirkung der allergenspezifischen immunologischen Toleranz mit der Dauer der spezifischen Immuntherapie korreliert.<sup>36</sup> Um eine nachhaltige immunologische Toleranz gegenüber dem Allergen zu erzielen, ist deshalb in aktuellen Leitlinien die repetitive Gabe hoher Allergendosen über drei bis fünf Jahre empfohlen.<sup>13</sup> Darüber hinaus zeigte die Arbeitsgruppe um *Louisa E. Jeffery* in einer *in vitro* Studie mit humanen Immunzellen, dass für

eine dauerhafte calcitriolabhängige Immunmodulation in Form IL-10-vermittelter anti-entzündlicher Prozesse eine kontinuierliche Restimulation mit Antigenen erforderlich sei.<sup>114</sup> Eine Vitamin D<sub>3</sub>-assoziierte Beeinflussung der im Rahmen der SIT eintretenden Immunreaktionen ließ sich in keiner der studienrelevanten Endpunkte mit statistischer Signifikanz nachweisen. Die Frage nach einem objektiven und subjektiven Therapievorteil unter Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation ist aufgrund der vorliegenden Daten nicht möglich. Beide Subgruppen profitierten in vergleichbarem Ausmaß von der SIT. Jedoch ließen sich interessante Befunde in der intragruppalen Betrachtung der Subgruppen aufzeigen, insbesondere in Bezug auf die humorale Immunantwort, die auf ein verbessertes Therapieansprechen über einen Behandlungszeitraum von drei Jahren hinweisen könnten.

## 6.5 Verträglichkeit der spezifischen Immuntherapie

Die im Rahmen der ProGIT-Studie durchgeführte SIT erfolgte mit einem zugelassenen Studienpräparat nach Darreichungs- und Aufdosierungsschema des Herstellers. Trotz der Verwendung modifizierter Allergene mit reduzierter sIgE-Affinität traten UEs im Sinne einer Soforttypreaktion auf.<sup>44</sup> Um die Verträglichkeit der SIT zu objektivieren, wurden einerseits die über den Behandlungszeitraum aufgetretenen UEs in ihrem Schweregrad dokumentiert, andererseits der Bedarf von symptomlindernden Medikamenten über den Beobachtungszeitraum protokolliert. Interessanterweise spiegelte die Anzahl an UEs den abgeschwächten initialen sIgE-Anstieg in der VD<sup>+</sup>-Gruppe nicht wider. Während der Aufdosierungsphase sind in der VD<sup>+</sup>-Gruppe signifikant häufiger SIT-assoziierte UEs aufgetreten als in der VD<sup>-</sup>-Gruppe. Eine daraufhin untersuchte Kausalität zu den anfänglich erhobenen personenbezogenen Daten ließ sich nicht ermitteln. Jedes aufgetretene UE konnte durch die Anwendung von Antiallergika unproblematisch therapiert werden. Ausgeprägte systemische Reaktionen traten zu keinem Zeitpunkt der Studie auf. Das stimmt mit den Beobachtungen von *Calderon* und Kollegen überein, bei denen die mittels Metaanalyse bewerteten Studien sehr selten das Auftreten von schweren UEs zeigten. Auch unerwünschte Langzeitfolgen einer SIT wurden bisher nicht dokumentiert.<sup>118</sup> Während der Erhaltungsphase kam es nur in der VD<sup>-</sup>-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der UEs. Möglicherweise könnte das Folge einer in der VD<sup>+</sup>-Gruppe zu diesem Zeitpunkt signifikant verbesserten sIgE/sIgG4-Ratio mit resultierender Toleranzentwicklung gegenüber dem Gräserallergen sein. Übereinstimmend mit den Erkenntnissen früherer Studien nahm der Bedarf an symptomlindernden Medikamenten in beiden Subgruppen nach der SIT signifikant ab.<sup>118</sup>

Die tägliche Supplementation von 5.333 IE Vitamin D<sub>3</sub> pro Tag wurde ohne klinische oder

laborchemische Hinweise auf eine potenzielle Hyperkalzämie toleriert. Anhand des anfänglichen 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Defizits, der streng gewählten Ein- und Ausschlusskriterien, der zu Grunde liegenden Hersteller- und Sicherheitsanweisungen<sup>72</sup> sowie der engmaschigen Kontrollen von Blutbild und Befinden des Probanden war das Eintreten einer Vitamin D-Intoxikation nicht zu erwarten. Zumal in aktuellen Studien deutlich höhere Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementationen als unbedenklich eingeschätzt wurden.<sup>82,121</sup> In Zusammenschau der Ergebnisse fand sich kein Hinweis auf eine Vitamin D-assoziierte Beeinflussung der SIT-Verträglichkeit. Jedoch lässt sich anhand der Daten, die von *Holick* beschriebene durch Steroide bewirkte Inaktivierung lokal bereitgestellten Calcitriols nicht ausschließen.<sup>67</sup> Die potentiell antiinflammatorische Wirkung des supplementierten Vitamin D<sub>3</sub> könnte bei den betroffenen Asthmatikern gehemmt worden sein. Die bisherigen Ergebnisse müssen weitergehend untersucht werden, um die dem Vitamin D in vergleichbaren Studien zugesprochenen tolerogeneren Effekt zu bestätigen.<sup>104,106,107</sup> Indessen gab es keine Hinweise für die durch *Wjst* beschriebene Rolle des Vitamin D als proinflammatorische Substanz.<sup>122</sup>

## 6.6 Ausblick

Die bisherigen Erkenntnisse werden durch die Fortführung der Studie um zwei Jahre erweitert. Gemäß früherer SIT-Studien sowie aktueller Leitlinien ist nach drei Jahren mit einer Langzeitwirkung der immunologischen Toleranz gegenüber dem Gräserallergen zu rechnen.<sup>13,113</sup> Die unter Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation nachgewiesenen intragruppalen Veränderungen erscheinen vielversprechend für mögliche signifikante intergruppalen Unterschiede in den Folgejahren. Dabei könnte sich der suffiziente 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Spiegel und die signifikant erhöhte sIgG4-Konzentration in der VD<sup>+</sup>-Gruppe als förderlich erweisen. An Stelle des Quaddeldurchmessers in der Intrakutantestung erscheint die sIgE-Konzentration als primärer Endpunkt und Verlaufsparemeter geeigneter. Auch wäre die Erhebung eines konjunktivalen Provokationstest vor und nach der Therapie als zusätzlicher klinischer Vergleichstest sinnvoll.

Darüber hinaus ist die Etablierung großer multizentrischer SIT-Studien für eine repräsentative Gruppenstärke erforderlich. Dabei wäre die Umstellung auf alternative Applikationsverfahren für eine höhere Teilnahmebereitschaft der Probanden und die mögliche Ausweitung der gräserpollenspezifischen Immuntherapie auf eine perenniale Applikation nützlich. Es gibt Hinweise darauf, dass die kontinuierliche Allergenexposition die Effektivität des Calcitriols verstärkt.<sup>105,114,116</sup> Die sublinguale Immuntherapie ist neben der SIT eine etablierte Darreichungsform.<sup>45</sup> Zusätzlich werden in randomisierten Studien die vielversprechenden Resultate der

intralymphatischen und epikutanen Immuntherapie geprüft. Diese zeigten bisher eine stärkere immunmodulatorische Effizienz, weniger Nebenwirkungen und im Fall der epikutanen Applikation eine patientenfreundlichere Handhabung als die SIT.<sup>123</sup> Des Weiteren bedarf es optimierter Studienprotokolle, die ein genaueres Verständnis der calcitriolabhängigen immunmodulatorischen Prozesse erlauben. Beispielsweise könnte eine kontinuierliche (ganz-jährige) Supplementation von Vitamin D<sub>3</sub>, gegebenenfalls in höherer Dosierung, mit eng-maschigen Kontrollen des 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Spiegels den Einfluss eines suffizienten Vitamin D-Haushalts auf die SIT realistischer aufzeigen. Es gibt bereits neue Ansätze, bei denen die Gabe ko-adjuanter synergistisch wirkender Substanzen (z.B. IL-2) die Calcitriolwirkung nachweislich verbessern konnte und die direkte Calcitriol-Antigen-Kopplung einen gezielteren therapeutischen Effekt zeigte.<sup>114,124</sup> Diese vielversprechenden Erkenntnisse sollten in pro-spektiven kontrollierten Studien weiter untersucht und gegebenenfalls bestätigt werden.

## 7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Ein- und Ausschlusskriterien zur Studienteilnahme.....	20
Tabelle 2: Sicherheitslaborparameter mit zugehörigem Referenzbereich.....	26
Tabelle 3: CAP-Klassifizierung der sIgE-Serumkonzentration .....	29
Tabelle 4: Gruppenstärke zur statistischen Auswertung der Endpunkte .....	32
Tabelle 5: Probandencharakterisierung .....	36
Tabelle 6: Verträglichkeit der Studienmedikation .....	46
Tabelle 7: Einnahme studienrelevanter Medikamente .....	47
Abbildung 1: Pathomechanismus der Typ-I-Allergie .....	10
Abbildung 2: Exemplarische Darstellung des Vitamin D-Metabolismus .....	16
Abbildung 3: Wirkmechanismus des Calcitriols .....	18
Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf der ProGIT-Untersuchung .....	25
Abbildung 5: Dosierungsschema der SIT.....	30
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines indirekten ELISA.....	31
Abbildung 7: Darstellung der Studienpopulation gemäß CONSORT 2010.....	35
Abbildung 8: Vitamin D <sub>3</sub> /Placebo-Supplementation .....	38
Abbildung 9: Intrakutantestreaktion über den Erhebungszeitraum.....	39
Abbildung 10: Retrospektive Symptombetrachtung in Abhängigkeit der Vitamin D <sub>3</sub> /Placebo- Supplementation.....	40
Abbildung 11: Korrelation der sIgE-Messung im Forschungslabor und Standardlabor .....	41
Abbildung 12: sIgE-Serumkonzentration über den Erhebungszeitraum .....	42
Abbildung 13: sIgG4-Serumkonzentration über den Erhebungszeitraum .....	44
Abbildung 14: sIgG4/sIgE-Ratio in Abhängigkeit der Vitamin D <sub>3</sub> /Placebo-Supplementation .....	45

## 8 Literaturverzeichnis

1. Langen U, Schmitz R, Steppuhn H. [Prevalence of allergic diseases in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2013;56(5-6):698-706.
2. Ring J, Bachert C, Bauer CP, Czech W. Weißbuch - Allergie in Deutschland. Vol 3. München: Springer Medizin © Urban & Vogel GmbH; 2010.
3. Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N, Aria Workshop G, World Health O. Allergic rhinitis and its impact on asthma. J Allergy Clin Immunol. 2001;108(5 Suppl):S147-334.
4. Werner-Busse A, Kostev K, Heine G, Worm M. Impact of comorbidities on the treatment of atopic dermatitis in clinical practice. Int J Clin Pharmacol Ther. 2014;52(9):726-731.
5. Lange M, Butschalowsky HG, Jentsch F, Kuhnert R, Schaffrath Rosario A, Schlaud M, Kamtsiuris P, Ki GGSSG. [The first KiGGS follow-up (KiGGS Wave 1): study conduct, sample design, and response]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2014;57(7):747-761.
6. Genuneit J. Exposure to farming environments in childhood and asthma and wheeze in rural populations: a systematic review with meta-analysis. Pediatr Allergy Immunol. 2012;23(6):509-518.
7. Yazdanbakhsh M, Matricardi PM. Parasites and the hygiene hypothesis: regulating the immune system? Clin Rev Allergy Immunol. 2004;26(1):15-24.
8. Halken S. Prevention of allergic disease in childhood: clinical and epidemiological aspects of primary and secondary allergy prevention. Pediatr Allergy Immunol. 2004;15 Suppl 16:4-5, 9-32.
9. Saulyte J, Rigueira C, Montes-Martinez A, Khudyakov P, Takkouche B. Active or passive exposure to tobacco smoking and allergic rhinitis, allergic dermatitis, and food allergy in adults and children: a systematic review and meta-analysis. PLoS Med. 2014;11(3):e1001611.
10. Behrendt H, Alessandrini F, Buters J, Kramer U, Koren H, Ring J. Environmental pollution and allergy: historical aspects. Chem Immunol Allergy. 2014;100:268-277.
11. Khalkhali HR, Oshnouei S, Salarilak S, Rahimi Rad M, Karamyar M, Khashabi J. Effects of antibiotic consumption on children 2-8 years of age developing asthma. Epidemiol Health. 2014;36:e2014006.
12. Schäfer T, Bauer CP, Beyer K, Bufe A, Friedrichs F, Gieler U, Gronke G. S3-Leitlinie Allergieprävention - Update 2014. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI) und der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (DGKJ). 2014.
13. Pfaar O, Bachert C, Bufe A, Buhl R, Ebner C, Eng P, Friedrichs F, Fuchs T, Hamelmann E, Hartwig-Bade D, Hering T, Huttegger I, Jung K, Klimek L, Kopp MV, Merk H, Rabe U, Saloga J, Schmid-Grendelmeier P, Schuster A, Schwerk N, Sitter H, Umpfenbach U, Wedi B, Wohrl S, Worm M, Kleine-Tebbe J, Kaul S, Schwalfenberg A. Guideline on allergen-specific

- immunotherapy in IgE-mediated allergic diseases: S2k Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI), the Society for Pediatric Allergy and Environmental Medicine (GPA), the Medical Association of German Allergologists (AeDA), the Austrian Society for Allergy and Immunology (OGAI), the Swiss Society for Allergy and Immunology (SGAI), the German Society of Dermatology (DDG), the German Society of Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery (DGHNO-KHC), the German Society of Pediatrics and Adolescent Medicine (DGKJ), the Society for Pediatric Pneumology (GPP), the German Respiratory Society (DGP), the German Association of ENT Surgeons (BV-HNO), the Professional Federation of Paediatricians and Youth Doctors (BVKJ), the Federal Association of Pulmonologists (BDP) and the German Dermatologists Association (BVDD). *Allergo J Int.* 2014;23(8):282-319.
14. Bergmann KC, Heinrich J, Niemann H. Current status of allergy prevalence in Germany: Position paper of the Environmental Medicine Commission of the Robert Koch Institute. *Allergo J Int.* 2016;25:6-10.
  15. Schumacher P. Biophysikalische Therapie der Allergien: erweiterte Bioresonanztherapie: Georg Thieme Verlag; 2004.
  16. van den Oord RA, Sheikh A. Filaggrin gene defects and risk of developing allergic sensitisation and allergic disorders: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2009;339:b2433.
  17. Mari A, Rasi C, Palazzo P, Scala E. Allergen databases: current status and perspectives. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2009;9(5):376-383.
  18. Langen U. [Classification of specific IgE antibodies in children with hay fever and other atopic diseases in Germany. Results of the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2012;55(3):318-328.
  19. Coffman RL. Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. *Nat Immunol.* 2006;7(6):539-541.
  20. Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(3):218-230.
  21. Greiner AN, Hellings PW, Rotiroti G, Scadding GK. Allergic rhinitis. *Lancet.* 2011;378(9809):2112-2122.
  22. Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(3):205-217.
  23. Deutscher Polleninformationsdienst (PID) - Pollenvorhersage, Analysen und Studien. [www.pollenstiftung.de](http://www.pollenstiftung.de). Accessed 13.03.2017.
  24. Larché M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(10):761-771.
  25. Bousquet J, Khaltayev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, Zuberbier T, Baena-Cagnani

- CE, Canonica GW, van Weel C, Agache I, Ait-Khaled N, Bachert C, Blaiss MS, Bonini S, Boulet LP, Bousquet PJ, Camargos P, Carlsen KH, Chen Y, Custovic A, Dahl R, Demoly P, Douagui H, Durham SR, van Wijk RG, Kalayci O, Kaliner MA, Kim YY, Kowalski ML, Kuna P, Le LT, Lemiere C, Li J, Lockey RF, Mavale-Manuel S, Meltzer EO, Mohammad Y, Mullol J, Naclerio R, O'Hehir RE, Ohta K, Ouedraogo S, Palkonen S, Papadopoulos N, Passalacqua G, Pawankar R, Popov TA, Rabe KF, Rosado-Pinto J, Scadding GK, Simons FE, Toskala E, Valovirta E, van Cauwenberge P, Wang DY, Wickman M, Yawn BP, Yorgancioglu A, Yusuf OM, Zar H, Annesi-Maesano I, Bateman ED, Ben Kheder A, Boakye DA, Bouchard J, Burney P, Busse WW, Chan-Yeung M, Chavannes NH, Chuchalin A, Dolen WK, Emuzyte R, Grouse L, Humbert M, Jackson C, Johnston SL, Keith PK, Kemp JP, Klossek JM, Larenas-Linnemann D, Lipworth B, Malo JL, Marshall GD, Naspitz C, Nekam K, Niggemann B, Nizankowska-Mogilnicka E, Okamoto Y, Orru MP, Potter P, Price D, Stoloff SW, Vandenplas O, Viegi G, Williams D, Organization WH, GA(2)LEN, AllerGen. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*. 2008;63 Suppl 86:8-160.
26. Merk H, Ott H. *Allergie-Taschenbuch: Für Studium und Praxis*: ABW Wissenschaftsverlag; 2008.
  27. Renz H, Kaminski A, Pfefferle PI. *Allergieforschung in Deutschland: Ein Atlas mit Bestandsaufnahme, Defizit- und Bedarfsanalyse*. Deutsche Gesellschaft für Allergologie und Klinische Immunologie (DGAKI). 2008;2:10.
  28. Solelhac G, Charpin D. Management of allergic rhinitis. *F1000Prime Rep*. 2014;6:94.
  29. Holgate ST. New strategies with anti-IgE in allergic diseases. *World Allergy Organ J*. 2014;7(1):17.
  30. Maurer M, Rosén K, Hsieh HJ, Saini S, Grattan C, Giménez-Arnau A, Agarwal S, Doyle R, Canvin J, Kaplan A, Casale T. Omalizumab for the treatment of chronic idiopathic or spontaneous urticaria. *N Engl J Med*. 2013;368(10):924-935.
  31. Rossi AB, Herlaar E, Braselmann S, Huynh S, Taylor V, Frances R, Issakani SD, Argade A, Singh R, Payan DG, Masuda ES. Identification of the Syk kinase inhibitor R112 by a human mast cell screen. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(3):749-755.
  32. Padjas A, Kehar R, Aleem S, Mejza F, Bousquet J, Schünemann HJ, Brożek JL. Methodological rigor and reporting of clinical practice guidelines in patients with allergic rhinitis: QuGAR study. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(3):777-783.e774.
  33. Valenta R, Campana R, Marth K, van Hage M. Allergen-specific immunotherapy: from therapeutic vaccines to prophylactic approaches. *J Intern Med*. 2012;272(2):144-157.
  34. Kool M, Hammad H, Lambrecht BN. Cellular networks controlling Th2 polarization in allergy and immunity. *F1000 Biol Rep*. 2012;4:6.
  35. Radulovic S, Jacobson MR, Durham SR, Nouri-Aria KT. Grass pollen immunotherapy induces

- Foxp3-expressing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> cells in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(6):1467-1472, 1472.e1461.
36. Ali I, Goksal K, Ozan B, Gulsen D. Long-term allergen-specific immunotherapy correlates with long-term allergen-specific immunological tolerance. *Adv Ther*. 2008;25(1):29-36.
  37. Akdis M. New treatments for allergen immunotherapy. *World Allergy Organ J*. 2014;7(1):23.
  38. Williams AP, Krishna MT, Frew AJ. The safety of immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(4):513-514.
  39. Soyka MB, van de Veen W, Holzmann D, Akdis M, Akdis CA. Scientific foundations of allergen-specific immunotherapy for allergic disease. *Chest*. 2014;146(5):1347-1357.
  40. Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG, Balcer-Whaley SL, Khattignavong AP, Lindblad R, Li H, Coffman R, Seyfert V, Eiden JJ, Broide D, Immune Tolerance Network G. Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N Engl J Med*. 2006;355(14):1445-1455.
  41. Zaleska A, Eiwegger T, Soyer O, van de Veen W, Rhyner C, Soyka MB, Bekpen C, Demiroz D, Treis A, Sollner S, Palomares O, Kwok WW, Rose H, Senti G, Kundig TM, Ozoren N, Jutel M, Akdis CA, Cramer R, Akdis M. Immune regulation by intralymphatic immunotherapy with modular allergen translocation MAT vaccine. *Allergy*. 2014;69(9):1162-1170.
  42. Rosewich M, Schulze J, Eickmeier O, Telles T, Rose MA, Schubert R, Zielen S. Tolerance induction after specific immunotherapy with pollen allergoids adjuvanted by monophosphoryl lipid A in children. *Clin Exp Immunol*. 2010;160(3):403-410.
  43. Paul-Ehrlich Institut. Allergene zur subkutanen Immuntherapie: Gräser-/ Getreide-/ Kräuterpollen. <http://www.pei.de/DE/arzneimittel/allergene/therapie-allergene/subkutan/graeser/graeser-getreidekraeuter-pollen-node.html>. Accessed 15.05.2017.
  44. Corrigan CJ, Kettner J, Doemer C, Cromwell O, Narkus A. Efficacy and safety of preseasonal-specific immunotherapy with an aluminium-adsorbed six-grass pollen allergoid. *Allergy*. 2005;60(6):801-807.
  45. Chelladurai Y, Lin SY. Effectiveness of subcutaneous versus sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: current update. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014;22(3):211-215.
  46. Senti G, von Moos S, Tay F, Graf N, Sonderegger T, Johansen P, Kundig TM. Epicutaneous allergen-specific immunotherapy ameliorates grass pollen-induced rhinoconjunctivitis: A double-blind, placebo-controlled dose escalation study. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(1):128-135.
  47. Kramer MF, Heath MD. Aluminium in allergen-specific subcutaneous immunotherapy--a German perspective. *Vaccine*. 2014;32(33):4140-4148.
  48. Casale TB, Stokes JR. Immunotherapy: what lies beyond. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(3):612-619: quiz 620.
  49. Jensen-Jarolim E. Aluminium in Allergies and Allergen immunotherapy. *World Allergy Organ J*.

2015;8(1):7.

50. Paul-Ehrlich Institut. Entwicklung eines PBTK-Modells für die Risikobewertung der Aluminiumexposition durch Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel. <http://www.pei.de/DE/forschung/forschungsprogramm/forschungsfoerderung/forschungsfoerderung-inhalt.html>. Accessed 15.05.2017.
51. Baldrick P, Richardson D, Wheeler AW. Review of L-tyrosine confirming its safe human use as an adjuvant. *J Appl Toxicol*. 2002;22(5):333-344.
52. Klimek L, Schmidt-Weber CB, Kramer MF, Skinner MA, Heath MD. Clinical use of adjuvants in allergen-immunotherapy. *Expert Rev Clin Immunol*. 2017;13(6):599-610.
53. Puggioni F, Durham SR, Francis JN. Monophosphoryl lipid A (MPL) promotes allergen-induced immune deviation in favour of Th1 responses. *Allergy*. 2005;60(5):678-684.
54. Drachenberg KJ, Wheeler AW, Stuebner P, Horak F. A well-tolerated grass pollen-specific allergy vaccine containing a novel adjuvant, monophosphoryl lipid A, reduces allergic symptoms after only four preseasonal injections. *Allergy*. 2001;56(6):498-505.
55. Mothes N, Heinzkill M, Drachenberg KJ, Sperr WR, Krauth MT, Majlesi Y, Semper H, Valent P, Niederberger V, Kraft D, Valenta R. Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(9):1198-1208.
56. DuBuske LM, Frew AJ, Horak F, Keith PK, Corrigan CJ, Aberer W, Holdich T, von Weikersthal-Drachenberg KJ. Ultrashort-specific immunotherapy successfully treats seasonal allergic rhinoconjunctivitis to grass pollen. *Allergy Asthma Proc*. 2011;32(3):239-247.
57. Pfaar O, Barth C, Jaschke C, Hormann K, Klimek L. Sublingual allergen-specific immunotherapy adjuvanted with monophosphoryl lipid A: a phase I/IIa study. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;154(4):336-344.
58. Kopp MV, Hamelmann E, Bendiks M, Zielen S, Kamin W, Bergmann KC, Klein C, Wahn U, group Ds. Transient impact of omalizumab in pollen allergic patients undergoing specific immunotherapy. *Pediatr Allergy Immunol*. 2013;24(5):427-433.
59. Massanari M, Nelson H, Casale T, Busse W, Kianifard F, Geba GP, Zeldin RK. Effect of pretreatment with omalizumab on the tolerability of specific immunotherapy in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2):383-389.
60. Maazi H, Shirinbak S, den Boef LE, Fallarino F, Volpi C, Nawijn MC, van Oosterhout AJ. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4-immunoglobulin G is a potent adjuvant for experimental allergen immunotherapy. *Clin Exp Immunol*. 2013;172(1):113-120.
61. Petrarca C, Lazzarin F, Lanuti P, Marchisio M, Miscia S, Rossi C, Braga M, Mistrello G, Di Gioacchino M. *Lactobacillus paracasei* Lp6 favors immune modulation induced by allergoid

- treatment in ragweed sensitized mice. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011;24(4):881-893.
62. Bellavite P, Marzotto M, Chirumbolo S, Conforti A. Advances in homeopathy and immunology: a review of clinical research. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011;3:1363-1389.
  63. Passalacqua G, Bousquet PJ, Carlsen KH, Kemp J, Lockey RF, Niggemann B, Pawankar R, Price D, Bousquet J. ARIA update: I--Systematic review of complementary and alternative medicine for rhinitis and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(5):1054-1062.
  64. Shek LP, Chong MF, Lim JY, Soh SE, Chong YS. Role of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids in infant allergies and respiratory diseases. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:730568.
  65. Moyad MA. Conventional, complementary, and alternative options for seasonal allergies. *Urol Nurs*. 2008;28(3):227-228.
  66. Lin R, White JH. The pleiotropic actions of vitamin D. *Bioessays*. 2004;26(1):21-28.
  67. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357(3):266-281.
  68. Hollis BW. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J Nutr*. 2005;135(2):317-322.
  69. Referenzbereich 1,25-OH-Vitamin D3 ab dem 18.Lebensjahr. Labor Berlin - Charité Vivantes Services GmbH.  
<http://www.laborberlin.com/leistungsverzeichnis.html?ue1=177&k=8&u=956&search=1,25-OH-Vitamin%20D3>. Accessed 05.06.2016.
  70. Vieth R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. *Am J Clin Nutr*. 1999;69(5):842-856.
  71. Referenzbereich 25-OH-Vitamin D3 ab dem 2.Lebensjahr. Labor Berlin - Charité Vivantes Services GmbH.  
[http://www.laborberlin.com/leistungsverzeichnis.html?k=8&ue1=177&u=955&index=.](http://www.laborberlin.com/leistungsverzeichnis.html?k=8&ue1=177&u=955&index=) Accessed 15.06.2016.
  72. Fachinformation Vigantol® Öl 20.000 I.E./ml. Rote Liste Service GmbH. Zul.-Nr.: 6154275.00.01. Deutschland: Merck Serono GmbH; 2015.
  73. Holick MF. Biological Effects of Sunlight, Ultraviolet Radiation, Visible Light, Infrared Radiation and Vitamin D for Health. *Anticancer Res*. 2016;36(3):1345-1356.
  74. Peterlik M, Cross HS. Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases. *Eur J Clin Invest*. 2005;35(5):290-304.
  75. Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, Rimm EB. 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study. *Arch Intern Med*. 2008;168(11):1174-1180.
  76. Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, Kinkeldei J, Boehm BO, Weihrauch G, Maerz W. Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin d and 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med*.

2008;168(12):1340-1349.

77. Krause R, Buhring M, Hopfenmuller W, Holick MF, Sharma AM. Ultraviolet B and blood pressure. *Lancet*. 1998;352(9129):709-710.
78. Spach KM, Nashold FE, Dittel BN, Hayes CE. IL-10 signaling is essential for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2006;177(9):6030-6037.
79. Hallau J, Hamann L, Schumann RR, Worm M, Heine G. A Promoter Polymorphism of the Vitamin D Metabolism Gene Cyp24a1 is Associated with Severe Atopic Dermatitis in Adults. *Acta Derm Venereol*. 2016;96(2):169-172.
80. Grant WB. Roles of Solar UVB and Vitamin D in Reducing Cancer Risk and Increasing Survival. *Anticancer Res*. 2016;36(3):1357-1370.
81. Mirzakhani H, Al-Garawi A, Weiss ST, Litonjua AA. Vitamin D and the development of allergic disease: how important is it? *Clin Exp Allergy*. 2015;45(1):114-125.
82. Heaney RP, Armas LA. Quantifying the vitamin D economy. *Nutr Rev*. 2015;73(1):51-67.
83. Vieth R, Bischoff-Ferrari H, Boucher BJ, Dawson-Hughes B, Garland CF, Heaney RP, Holick MF, Hollis BW, Lamberg-Allardt C, McGrath JJ, Norman AW, Scragg R, Whiting SJ, Willett WC, Zittermann A. The urgent need to recommend an intake of vitamin D that is effective. *Am J Clin Nutr*. 2007;85(3):649-650.
84. German Nutrition S. New reference values for vitamin D. *Ann Nutr Metab*. 2012;60(4):241-246.
85. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006;92(1):4-8.
86. Rabenberg M, Scheidt-Nave C, Busch MA, Rieckmann N, Hintzpeter B, Mensink GB. Vitamin D status among adults in Germany--results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1). *BMC Public Health*. 2015;15:641.
87. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289(1):F8-28.
88. Perez-Barrios C, Hernandez-Alvarez E, Blanco-Navarro I, Perez-Sacristan B, Granado-Lorencio F. Prevalence of hypercalcemia related to hypervitaminosis D in clinical practice. *Clin Nutr*. 2016.
89. Heine G, Niesner U, Chang HD, Steinmeyer A, Zugel U, Zuberbier T, Radbruch A, Worm M. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> promotes IL-10 production in human B cells. *Eur J Immunol*. 2008;38(8):2210-2218.
90. Penna G, Amuchastegui S, Giarratana N, Daniel KC, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 2007;178(1):145-153.
91. Sigmundsdottir H, Pan J, Debes GF, Alt C, Habtezion A, Soler D, Butcher EC. DCs metabolize sunlight-induced vitamin D<sub>3</sub> to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat Immunol*. 2007;8(3):285-293.
92. Kreutz M, Andreesen R, Krause SW, Szabo A, Ritz E, Reichel H. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>

- production and vitamin D<sub>3</sub> receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages. *Blood*. 1993;82(4):1300-1307.
93. Adams JS, Hewison M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008;4(2):80-90.
  94. Urry Z, Xystrakis E, Richards DF, McDonald J, Sattar Z, Cousins DJ, Corrigan CJ, Hickman E, Brown Z, Hawrylowicz CM. Ligation of TLR9 induced on human IL-10-secreting Tregs by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> abrogates regulatory function. *J Clin Invest*. 2009;119(2):387-398.
  95. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. 2000;102(5):553-563.
  96. Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S, Peek E, Urry Z, Richards DF, Adikibi T, Pridgeon C, Dallman M, Loke TK, Robinson DS, Barrat FJ, O'Garra A, Lavender P, Lee TH, Corrigan C, Hawrylowicz CM. Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest*. 2006;116(1):146-155.
  97. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:221-241.
  98. Heine G, Drozdenko G, Grun JR, Chang HD, Radbruch A, Worm M. Autocrine IL-10 promotes human B-cell differentiation into IgM- or IgG-secreting plasmablasts. *Eur J Immunol*. 2014;44(6):1615-1621.
  99. Hartmann B, Heine G, Babina M, Steinmeyer A, Zugel U, Radbruch A, Worm M. Targeting the vitamin D receptor inhibits the B cell-dependent allergic immune response. *Allergy*. 2011;66(4):540-548.
  100. Heine G, Anton K, Henz BM, Worm M. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits anti-CD40 plus IL-4-mediated IgE production in vitro. *Eur J Immunol*. 2002;32(12):3395-3404.
  101. Brehm JM, Schuemann B, Fuhlbrigge AL, Hollis BW, Strunk RC, Zeiger RS, Weiss ST, Litonjua AA, Childhood Asthma Management Program Research G. Serum vitamin D levels and severe asthma exacerbations in the Childhood Asthma Management Program study. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(1):52-58 e55.
  102. Erkkola M, Kaila M, Nwaru BI, Kronberg-Kippila C, Ahonen S, Nevalainen J, Veijola R, Pekkanen J, Ilonen J, Simell O, Knip M, Virtanen SM. Maternal vitamin D intake during pregnancy is inversely associated with asthma and allergic rhinitis in 5-year-old children. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(6):875-882.
  103. Peroni DG, Piacentini GL, Cametti E, Chinellato I, Boner AL. Correlation between serum 25-hydroxyvitamin D levels and severity of atopic dermatitis in children. *Br J Dermatol*. 2011;164(5):1078-1082.
  104. Baris S, Kiykim A, Ozen A, Tulunay A, Karakoc-Aydiner E, Barlan IB. Vitamin D as an adjunct to subcutaneous allergen immunotherapy in asthmatic children sensitized to house dust mite. *Allergy*.

2014;69(2):246-253.

105. Heine G, Tabeling C, Hartmann B, Gonzalez Calera CR, Kuhl AA, Lindner J, Radbruch A, Witzentrath M, Worm M. 25-hydroxyvitamin D3 promotes the long-term effect of specific immunotherapy in a murine allergy model. *J Immunol.* 2014;193(3):1017-1023.
106. Majak P, Jerzynska J, Smejda K, Stelmach I, Timler D, Stelmach W. Correlation of vitamin D with Foxp3 induction and steroid-sparing effect of immunotherapy in asthmatic children. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2012;109(5):329-335.
107. Taher YA, van Esch BC, Hofman GA, Henricks PA, van Oosterhout AJ. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 potentiates the beneficial effects of allergen immunotherapy in a mouse model of allergic asthma: role for IL-10 and TGF-beta. *J Immunol.* 2008;180(8):5211-5221.
108. Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C, Papadopoulos NG, Bousquet PJ, Burney PG, Canonica GW, Carlsen KH, Cox L, Haahtela T, Lodrup Carlsen KC, Price D, Samolinski B, Simons FE, Wickman M, Annesi-Maesano I, Baena-Cagnani CE, Bergmann KC, Bindslev-Jensen C, Casale TB, Chiriac A, Cruz AA, Dubakiene R, Durham SR, Fokkens WJ, Gerth-van-Wijk R, Kalayci O, Kowalski ML, Mari A, Mullol J, Nazamova-Baranova L, O'Hehir RE, Ohta K, Panzner P, Passalacqua G, Ring J, Rogala B, Romano A, Ryan D, Schmid-Grendelmeier P, Todo-Bom A, Valenta R, Woehrl S, Yusuf OM, Zuberbier T, Demoly P, Global A, Asthma European N, Allergic R, its Impact on A. Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy.* 2012;67(1):18-24.
109. Rueff F, Bergmann KC, Brockow K, Fuchs T, Grubl A, Jung K, Klimek L, Musken H, Pfaar O, Przybilla B, Sitter H, Wehrmann W, German Society for A, Clinical I. [Skin tests for diagnostics of allergic immediate-type reactions. Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology]. *Pneumologie.* 2011;65(8):484-495.
110. Akbar NA, Zacharek MA. Vitamin D: immunomodulation of asthma, allergic rhinitis, and chronic rhinosinusitis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011;19(3):224-228.
111. Heine G, Hoefler N, Franke A, Nothling U, Schumann RR, Hamann L, Worm M. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with severe atopic dermatitis in adults. *Br J Dermatol.* 2013;168(4):855-858.
112. Immunglobulin- und IgG-Subklassenanalyse im Serum. Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam MVZ GbR, IMD  
<http://www.imd-berlin.de/spezielle-kompetenzen/immundefekte/untersuchungsverfahren/immunglobulin-und-igg-subklassenanalyse.html>. Accessed 29.06.2016.
113. Francis JN, James LK, Paraskevopoulos G, Wong C, Calderon MA, Durham SR, Till SJ. Grass pollen immunotherapy: IL-10 induction and suppression of late responses precedes IgG4 inhibitory antibody activity. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(5):1120-1125 e1122.
114. Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, Walker LS, Lammas DA, Raza K, Sansom DM. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of

- inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol*. 2009;183(9):5458-5467.
115. Walker SM, Varney VA, Gaga M, Jacobson MR, Durham SR. Grass pollen immunotherapy: efficacy and safety during a 4-year follow-up study. *Allergy*. 1995;50(5):405-413.
  116. Pajno GB, Caminiti L, Crisafulli G, Vita D, Valenzise M, De Luca R, Passalacqua G. Direct comparison between continuous and coseasonal regimen for sublingual immunotherapy in children with grass allergy: a randomized controlled study. *Pediatr Allergy Immunol*. 2011;22(8):803-807.
  117. Creticos PS, Esch RE, Couroux P, Gentile D, D'Angelo P, Whitlow B, Alexander M, Coyne TC. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of standardized ragweed sublingual-liquid immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(3):751-758.
  118. Calderon MA, Alves B, Jacobson M, Hurwitz B, Sheikh A, Durham S. Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007(1):CD001936.
  119. Erazo A, Kutchukhidze N, Leung M, Christ AP, Urban JF, Jr., Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Unique maturation program of the IgE response in vivo. *Immunity*. 2007;26(2):191-203.
  120. Nouri-Aria KT, Wachholz PA, Francis JN, Jacobson MR, Walker SM, Wilcock LK, Staple SQ, Aalberse RC, Till SJ, Durham SR. Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J Immunol*. 2004;172(5):3252-3259.
  121. Veugelers PJ, Ekwaru JP. A statistical error in the estimation of the recommended dietary allowance for vitamin D. *Nutrients*. 2014;6(10):4472-4475.
  122. Wjst M. The vitamin D slant on allergy. *Pediatr Allergy Immunol*. 2006;17(7):477-483.
  123. Aricigil M, Muluk NB, Sakarya EU, Sakalar EG, Senturk M, Reisacher WR, Cingi C. New routes of allergen immunotherapy. *Am J Rhinol Allergy*. 2016;30(6):193-197.
  124. Grundstrom J, Neimert-Andersson T, Kemi C, Nilsson OB, Saarne T, Andersson M, van Hage M, Gafvelin G. Covalent coupling of vitamin D3 to the major cat allergen Fel d 1 improves the effects of allergen-specific immunotherapy in a mouse model for cat allergy. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012;157(2):136-146.

## 9 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nora Schumacher, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

»Einfluss der Vitamin D-vermittelten Modulation auf die gräserpollenspezifische Immuntherapie«

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 Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) 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.“

Berlin, den 23.07.2017

---

Nora Schumacher

## **10 Lebenslauf**

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







## 11 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Margitta Worm für ihre geduldige und engagierte Betreuung, Herr Priv.-Doz. Dr. Guido Heine für den wissenschaftlichen Austausch und Enthusiasmus sowie meinen Kollegen, insbesondere Frau Ariane Lungwitz und Herr Dennis Ernst für ihre ermutigende und humorvolle Unterstützung.

Desweiteren möchte ich mich herzlich bei allen Teilnehmern der Studie für ihre Zeit und Mitarbeit bedanken.

Durchhaltevermögen und Durchblick verdanke ich den motivierenden Worten und dem Zuspruch meiner Freunde, im Besonderen Frau Maxi Hübner, Frau Luise Rehn und Frau Julia Kühn.

Abschließend möchte ich mich bei meinem Lebenspartner Herr Kenny-Davis Schlüter und meiner Familie für ihren liebevollen Rückhalt bedanken. Meiner Schwester Frau Dr. Anne Schumacher, meiner Mama Frau Kerstin Schumacher und meiner Oma Frau Christel Rietze verdanke ich den Rückenwind für all die kleinen und großen Schritte meines Lebens.