

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

DISSERTATION

Häufigkeit von Genpolymorphismen im Vitamin D-Signalweg  
bei Patienten mit atopischer Dermatitis

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jana Hallau

aus Bernau

Datum der Promotion: 27.02.2015

## Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Zusammenfassung .....  | 5  |
| Abstract .....   | 6  |
| 1. Einleitung.....   | 7  |
| 1.1. Atopische Dermatitis.....   | 7  |
| 1.1.1. Definition und Epidemiologie.....   | 7  |
| 1.1.2. Ätiologie und Pathogenese .....   | 8  |
| 1.2. Vitamin D-Metabolismus.....   | 10 |
| 1.2.1. Wirkmechanismus von 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> über den Vitamin D-Rezeptor.....                   | 11 |
| 1.2.2. Osteocalcin als Vitamin D-Zielgen .....   | 12 |
| 1.2.3. Regulation der 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> -Synthese durch <i>Cyp27b1</i> und <i>Cyp24a1</i> ..... | 12 |
| 1.3. <i>Cyp27b1</i> -Das Schlüsselenzym der 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> -Synthese.....                    | 14 |
| 1.3.1. <i>Cyp27b1</i> -Polymorphismus rs703842 .....   | 15 |
| 1.3.2. <i>Cyp27b1</i> -Polymorphismus rs10877012 .....   | 16 |
| 1.3.3. <i>Cyp27b1</i> -Polymorphismus rs3782130 .....  | 17 |
| 1.3.4. <i>Cyp27b1</i> -Polymorphismus rs4646536 .....  | 17 |
| 1.4. <i>Cyp24a1</i> -Das Schlüsselenzym des 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> -Katabolismus.....                | 18 |
| 1.4.1. <i>Cyp24a1</i> -Polymorphismus rs2248359 .....  | 18 |
| 1.4.2. <i>Cyp24a1</i> -Polymorphismen rs2248137 .....  | 19 |
| 1.4.3. <i>Cyp24a1</i> -Polymorphismus rs2296241 .....  | 19 |
| 1.4.4. <i>Cyp24a1</i> -Polymorphismus rs751089 .....   | 19 |
| 1.5. Die physiologische Bedeutung von Vitamin D .....  | 20 |
| 1.5.1. Die Bedeutung von Vitamin D in der Haut.....  | 20 |
| 1.5.2. Die Rolle von Vitamin D bei atopischer Dermatitis .....   | 21 |
| 2. Aufgaben- und Zielstellung der Arbeit.....  | 23 |
| 3. Material und Methoden .....   | 24 |
| 3.1. Versuchsgruppe.....   | 24 |
| 3.2. Kontrollgruppe .....  | 24 |
| 3.3. Chemikalien und Reagenzien.....   | 25 |
| 3.4. Primer und Sonden.....  | 25 |
| 3.5. Kommerzielle ELISA-Kits.....  | 26 |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 3.6.     | Geräte.....   | 26 |
| 3.7.     | Verbrauchsmaterial/Einwegmaterial .....   | 27 |
| 3.8.     | Verwendete Software .....   | 27 |
| 3.9.     | Versuchsmethoden.....   | 27 |
| 3.9.1.   | DNA-Extraktion aus Vollblut.....  | 27 |
| 3.9.2.   | Gelelektrophorese von PCR-Produkten zur Primerpaaretablierung.....  | 27 |
| 3.9.3.   | Real-time-PCR zur Genotypisierung der SNPs mittels LightCycler®.....  | 30 |
| 3.9.4.   | Serumgewinnung .....  | 33 |
| 3.9.5.   | ELISA – Enzyme linked immuno sorbent assay.....   | 33 |
| 3.9.5.1. | 25-Hydroxyvitamin D-Enzymimmunoassay.....   | 34 |
| 3.9.5.2. | Osteocalcin-Enzymimmunoassay .....  | 34 |
| 3.9.6.   | Haplotypenanalyse mittels Haploview 4.2.....  | 34 |
| 3.9.7.   | Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....   | 35 |
| 3.9.8.   | Statistische Auswertung.....  | 35 |
| 4.       | Ergebnisse.....   | 36 |
| 4.1.     | Darstellung von Fall- und Kontrollkollektiv .....   | 36 |
| 4.2.     | Evolutionäre Konservierung des <i>Cyp27b1</i> -Genes.....   | 37 |
| 4.3.     | Identische Verteilung der <i>Cyp27b1</i> -SNPs bei Fall- und Kontrollgruppe.....  | 38 |
| 4.4.     | Starke Kopplung der <i>Cyp27b1</i> -Polymorphismen.....   | 40 |
| 4.5.     | Evolutionäre Konservierung des <i>Cyp24a1</i> -Genes.....   | 42 |
| 4.6.     | Assoziation eines <i>Cyp24a1</i> -Polymorphismus mit der atopischen<br>Dermatitis .....   | 42 |
| 4.7.     | Kopplung der <i>Cyp24a1</i> -Polymorphismen .....   | 45 |
| 4.8.     | Identische Serumparameter bei Fall- und Konrollgruppe.....  | 46 |
| 4.9.     | Schwache Korrelation von 25(OH)D- und Osteocalcinsерumkonzentration.....  | 48 |
| 4.10.    | Die 25(OH)D-Serumkonzentration ist SNP unabhängig .....   | 49 |
| 4.11.    | Die Osteocalcinkonzentration ist SNP unabhängig.....  | 50 |
| 4.12.    | Keine Korrelation von 25(OH)D-Serumkonzentrationen und SCORAD.....  | 51 |
| 5.       | Diskussion .....  | 53 |
| 5.1.     | Die atopische Dermatitis und die 25(OH)D-Serumkonzentration sind<br>unabhängig von den <i>Cyp27b1</i> -Genpolymorphismen.....             | 53 |
| 5.2.     | Assoziation eines <i>Cyp24a1</i> -Genpolymorphismus mit schwerer atopischer<br>Dermatitis unabhängig der 25(OH)D-Serumkonzentration ..... | 57 |

|  |    |
|--|----|
| 5.3. Bedeutung der 25(OH)D-Konzentration für das Auftreten der atopischen Dermatitis ..... | 61 |
| 5.4. Korrelation von Osteocalcin- und 25(OH)D-Serumkonzentration bei AD.....               | 63 |
| 5.5. Limitationen der Studie .....   | 64 |
| 5.6. Ausblick .....  | 65 |
| Literaturverzeichnis .....   | 67 |
| Abbildungsverzeichnis .....  | 74 |
| Tabellenverzeichnis .....  | 75 |
| Abkürzungsverzeichnis .....  | 76 |
| Lebenslauf .....   | 79 |
| Eidesstattliche Versicherung .....   | 81 |
| Danksagung .....   | 82 |

## Zusammenfassung

Die atopische Dermatitis (AD) ist eine chronisch entzündliche Hauterkrankung, die polygen und multifaktoriell bedingt ist. Unter anderem wird der Einfluss von Vitamin D (VD), das immunmodulatorische Wirkungen vermittelt, auf die Prävalenz und Ausprägung der AD kontrovers diskutiert. Genetische Untersuchungen zeigen, dass bestimmte Vitamin D-Rezeptor-Varianten gehäuft bei schwerer AD vorkommen. Der Zusammenhang von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) in Schlüsselgenen des Vitamin D Stoffwechsels, wie *Cyp27b1* (Synthese) und *Cyp24a1* (Katalyse), und der AD bei Erwachsenen ist bislang unzureichend erforscht.

Ziel dieser Arbeit war es, die Häufigkeit von *Cyp27b1*- und *Cyp24a1*-Genpolymorphismen in Verbindung zur AD zu untersuchen. Dazu wurden 281 Patienten mit atopischer Dermatitis (126 mit milder AD, SCORAD 9-40; 155 mit schwerer AD, SCORAD > 40) und eine hautgesunde alters- und geschlechtsadaptierte Kontrollgruppe von 278 Personen rekrutiert. Die Genotypen wurden mittels quantitativer Real-time-PCR bestimmt und anschließend eine *in silico* Haplotypanalyse durchgeführt. Zusätzlich wurde in Subgruppen von 98 AD-Patienten und 45 gesunden Kontrollen die Serumkonzentration von 25-Hydroxycholecalciferol- und Osteocalcin mittels ELISA bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine identische Verteilung der Genotypen für die vier *Cyp27b1*-SNPs und dem *Cyp24a1*-SNP rs2296241 zwischen AD- und Kontrollgruppe vorliegt. Die *Cyp24a1*-Genvariante rs2248359C und der *Cyp24a1*-Haplotyp rs2248359C/rs2296241A traten gehäuft bei Patienten mit schwerer AD im Vergleich zu der Kontrollgruppe auf. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die genetische Kopplung der *Cyp27b1*-SNPs sehr eng und die der *Cyp24a1*-SNPs schwächer ist. Die Serumparameter 25-Hydroxycholecalciferol (25(OH)D) und Osteocalcin wiesen keine Korrelationen mit den untersuchten SNPs auf.

Diese Untersuchung identifiziert das C-Allel des *Cyp24b1*-SNPs rs2248359 als Risikoallel für die schwere AD bei Erwachsenen. Die vorliegenden Daten zeigen, dass der Vitamin D-Metabolismus möglicherweise für die Pathophysiologie der schweren atopischen Dermatitis zu bedenken ist. Über welchen Pathomechanismus dieser SNP den VD-Katabolismus im Detail beeinflusst, muss in nachfolgenden Analysen geklärt werden.

## Abstract

Atopic Dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease which is influenced by a number of different genes and environmental factors. The relationship between vitamin D and the prevalence as well as the severity of AD is already controversially discussed. Previous genetic studies have shown an association of a defined vitamin D receptor haplotype with severity of AD. Polymorphisms in vitamin D metabolism genes like *Cyp27b1* (synthesis) and *Cyp24a1* (catalysis) have not been studied in adults with AD yet.

Our aim was to investigate the frequency of *Cyp27b1* and *Cyp24a1* gene polymorphisms in patients with AD. 281 patients with AD [n = 126 mild/moderate AD, Scoring AD index (SCORAD) 9-40; n = 155 severe AD, SCORAD > 40] and 278 healthy, unrelated individuals, matched for age and gender before analysis, were recruited. We genotyped six single-nucleotide polymorphism (SNP) frequencies by RT-PCR with subsequent melting curve analysis. The haplotype sequences were analyzed *in silico*. 25-hydroxycholecalciferol (25(OH)D) and osteocalcin serum concentration were measured in 98 individuals with AD and 45 healthy controls by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

We found comparable frequencies of *Cyp27b1*-SNPs and *Cyp24a1*-SNP rs2296241 between the AD and the control group. A significant overrepresented major allele C of the *Cyp24a1* gene polymorphism rs2248359 and *Cyp24a1* haplotype rs2248359C/rs2296241A were identified in patients with severe AD compared to healthy controls. Additionally, *Cyp27b1*-haplotypes were tightly genetically linked as well as *Cyp24a1* gene polymorphisms were in average to high linkage disequilibrium. However, 25(OH)D and osteocalcin levels were not correlated with allelic variants of the investigated vitamin D gene polymorphisms.

Our investigation identifies the C-allele of *Cyp24a1* gene polymorphism rs2248359 as a risk allele for severe AD in adults. The present data suggest that the vitamin D metabolism might be relevant for the pathogenesis of severe AD in adults. To date it remains unclear by which pathomechanism this SNP influences the VD-catabolism in detail. This needs to be studied more closely in future studies.

## 1. Einleitung

### 1.1. Atopische Dermatitis

Die atopische Dermatitis (AD) entsteht durch ein Zusammenspiel von genetischen Faktoren (siehe Tab. 1) und multiplen Umwelteinflüssen. Dies führt zu einer Störung der Barrierefunktion der Haut und einer Dysregulation des angeboren und des adaptiven Immunsystems<sup>1</sup>. Vitamin D (VD) ist immunmodulatorisch<sup>2</sup> und nimmt Einfluss auf die Zellproliferation von Keratinozyten<sup>3</sup>. Epidemiologische Daten konnten bislang nicht klären, ob VD die AD positiv oder negativ beeinflusst<sup>2</sup>.

Tab. 1: AD-assoziierte Gene (Auswahl)

| <b>Strukturproteine/<br/>Unspezifische Abwehr</b> | <b>Spezifische Abwehr</b>   | <b>Vitamin D-Metabolismus</b>             |
|---|-----------------------------|---|
| Filaggrin (FLG) <sup>4</sup>                      | Interleukin 4 <sup>4</sup>  | Vitamin D-Rezeptor <sup>5,6</sup>         |
| β-Defensin 1 <sup>4</sup>                         | Interleukin 13 <sup>4</sup> | CYP2R1 (25-Hydroxylase-Gen) <sup>6</sup>  |
| Toll-like Rezeptor 2 <sup>4</sup>                 | Interleukin 18 <sup>4</sup> | CYP27A1 (25-Hydroxylase-Gen) <sup>6</sup> |
| CD14 <sup>4</sup>                                 | RANTES <sup>4</sup>         | CYP24A1-PFDN4 <sup>7</sup>                |

#### 1.1.1. Definition und Epidemiologie

Die AD ist eine chronisch rezidivierende inflammatorische Hauterkrankung<sup>1</sup>, deren Prävalenz sich in den letzten 30 Jahren in Industrieländern verdoppelt bis verdreifacht hat<sup>8</sup>. Bei Kindern beträgt die Prävalenz 15-25 %<sup>8</sup>, während sie bei Erwachsenen bei 1-3 % liegt<sup>9</sup>. Häufig manifestiert sich die Erkrankung schon im Säuglingsalter, als sogenannte *early-onset* AD. Innerhalb der ersten 6 Lebensmonate entwickeln 45 % der betroffenen Kinder eine AD, bei 60 % beginnt sie während der ersten zwölf Lebensmonate und bei 85% vor dem Erreichen des fünften Lebensjahres<sup>10</sup>. Bei bis zu 70 % der Betroffenen tritt eine spontane Remission bis zum Jugendalter ein. Manifestiert sich die Erkrankung erstmalig im Erwachsenenalter, spricht man von einer *late-onset* AD<sup>11</sup>. Die AD bildet zusammen mit dem allergischen Asthma bronchiale (AA) und der Rhinitis allergica (AR) den Formenkreis der Atopie<sup>1</sup>.

### 1.1.2. Ätiologie und Pathogenese

Die AD ist eine multifaktoriell und polygenetisch bedingte Erkrankung. Für die genetische Komponente spricht die in Zwillingsstudien ermittelte höhere Konkordanzrate bei monozygoten Paaren (0.72-0.86) mit AD im Vergleich zu dizygoten (0.21-23)<sup>12</sup>. Ferner besteht für Kinder von einer Mutter und/oder einem Vater mit AD ein höheres Risiko ebenfalls zu erkranken, als wenn ein Elternteil von AA oder AR betroffen ist<sup>13</sup>. Genomweite Assoziationsstudien haben ergeben, dass vor allem Mutationen von Genen, die für epidermale Strukturproteine und wichtige Elemente des Immunsystems kodieren, gehäuft mit AD assoziiert sind<sup>1</sup>. Bei Kindern zeigte der epidermale Differenzierungskomplex auf Chromosom 1q21 und der *Major histocompatibility complex* auf Chromosom 6 eine starke Assoziation mit AD<sup>14</sup>. Diese Befunde bieten Erklärungsansätze für die Pathogenese der AD, wobei man annimmt, dass sie auf einer Störung der epidermalen Hautbarriere und einer Dysregulation des angeborenen und des adaptiven Immunsystems beruht<sup>1</sup> (Abb.1).

Ein intaktes epidermales Kompartiment schützt vor dem Eindringen invasiver Organismen und vor transepidermalem Wasserverlust. Wird die epidermale Barrierefunktion der Haut durch genetische Faktoren oder Manipulation beispielsweise Kratzen gestört, erleichtert dies Mikroben oder Allergenen die Penetration dieser Schranke. Außerdem wird angenommen, dass die Abwehr invasiver Organismen durch einen Mangel an antimikrobiellen Peptiden (AMPs) in der Haut von Neurodermitikern geschwächt ist<sup>1</sup>. AMPs sind Komponenten des angeborenen Immunsystems, die sich durch antimikrobielle Funktionen auszeichnen und so das primäre chemische Schutzschild der Haut darstellen<sup>15</sup>. Eine mögliche Erklärung für den AMP-Mangel wäre das in der akuten Phase vorherrschende inflammatorische Milieu. Dieses wird durch Zytokine von T-Helfer-2-Zellen (Th<sub>2</sub>) wie Interleukin 4 (IL-4), IL-13 und IL-10 geprägt und die Induktion von AMPs wie Cathelicidin, humanes  $\beta$ -Defensin (HBD) und Dermcidin supprimiert<sup>1</sup>. Cathelicidin, in einer Peptidform LL-37, wirkt antibakteriell, antiviral und antifungal. Zudem beeinflusst es den Toll-like-Rezeptor-Signalweg von Immunzellen. Toll-like-Rezeptoren (TLRs) gehören ebenfalls zum angeborenen Immunsystem und können die AMP-Induktion auslösen<sup>15,16</sup>.

Keratinozyten sezernieren bei Störung der Hautbarriere Zytokine wie das Interleukin-7-like thymic stromal lymphopoietin (TSLP). TSLP bewirkt die Migration dendritischer Zellen in die Haut. Dendritische Zellen (DCs) sind antigen-präsentierende Zellen

(APCs), wobei besonders zwei spezifische Subpopulationen dieser Zellart eine wichtige Rolle in AD spielen. Die Langerhanszellen (LCs), die in der normalen Haut präsent sind, werden durch Antigenbindung aktiviert und präsentieren dieses den naiven T-Zellen, die sich unter Einfluss von IL-4 zu Th<sub>2</sub>-Zellen differenzieren. So nimmt man an, dass die adaptive Immunantwort durch ein Ungleichgewicht der Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>-Zellantwort gekennzeichnet ist. Der Verlauf der AD ist biphasisch. In der akuten Phase überwiegt die Th<sub>2</sub>-Polarisation, in der Th<sub>2</sub>-Zellzytokine wie IL-4, IL-5, IL-13 dominieren, die die IgE-Produktion stimulieren und auf das Gewebe wirken. Die Langerhanszellen produzieren außerdem das Monozyten-chemotaktische-Protein 1 (MCP-1) und IL-16, wodurch Monozyten in die Haut rekrutiert werden und zu inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen (IDECs) differenzieren. IDECs sezernieren in entzündeter Haut IL-12 und IL-18, was zu einem Überwiegen der Th<sub>1</sub>-Zellantwort führt. Diese kennzeichnet die chronische Phase. Das Zytokinmilieu von Th<sub>1</sub>-Zellen ist durch die Sezernierung von Interferon gamma (INF- $\gamma$ ), IL-12, IL-5 und GM-CSF (engl. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) geprägt<sup>1,17</sup>.

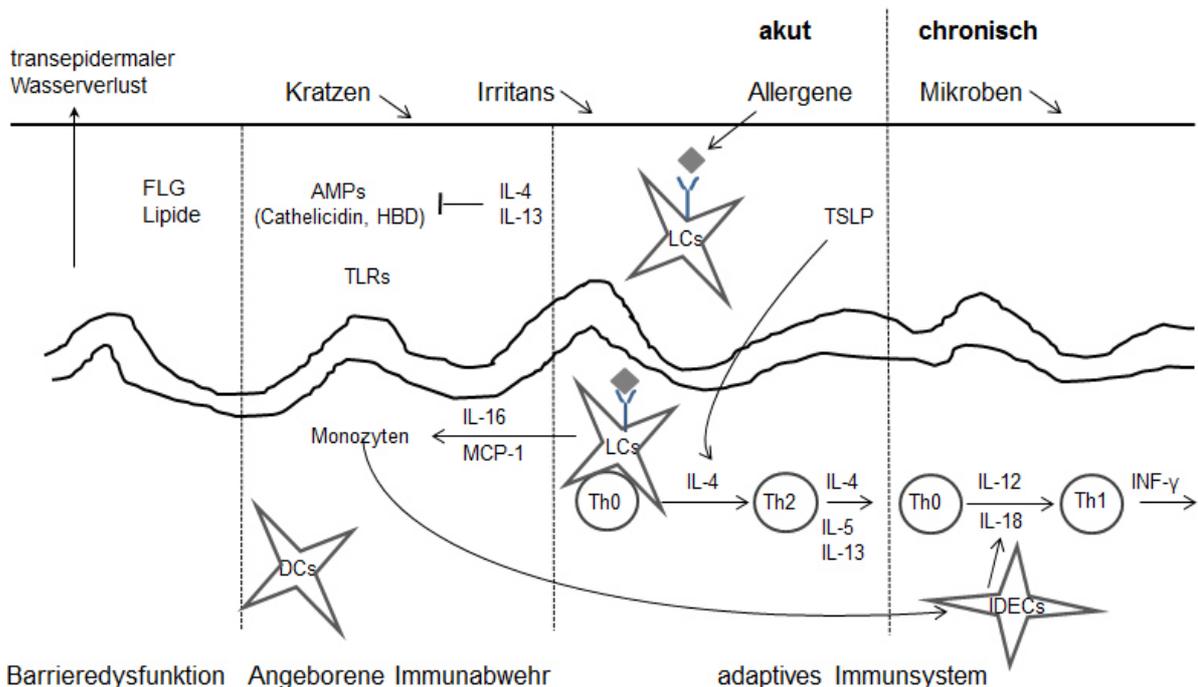


Abb. 1: Pathogenese der atopischen Dermatitis

Bei Schädigung der Haut sezernieren die Keratinozyten Zytokine, die die Th<sub>2</sub>-Zelldifferenzierung stimulieren. Th<sub>2</sub>-Zellen dominieren die akute Phase der AD. Durch die Zytokine IL-12 und IL-18 kommt es zum Wandel von Th<sub>2</sub>- zur Th<sub>1</sub>-Zellantwort, die in der chronischen Phase der AD führend ist. Die Abbildung wurde nach Leung et al. 2004 durch J. Hallau modifiziert.

## 1.2. Vitamin D-Metabolismus

Vitamin D (1,25-Dihydroxycholecalciferol) nimmt eine Sonderstellung unter den Vitaminen ein, da es im Gegensatz zu anderen Vitaminen nicht ausschließlich über die Nahrung zugeführt werden kann, sondern nach UV-Exposition vom menschlichen Körper synthetisiert wird<sup>18</sup>. Wenige Nahrungsmittel sind natürliche Quellen des Vitamins. Insbesondere fetthaltiger Fisch wie Lachs oder Makrele enthalten größere Mengen von VD. Eine weitere Besonderheit von VD ist seine Funktion als Steroidhormon<sup>19,20</sup>.

In den Keratinozyten der Epidermis wird der B-Ring des 7-Dehydrocholesterols (7-DHC) durch UVB-Strahlung (290-315 nm) aufgebrochen (Abb. 2). Dies erfolgt in allen Schichten der Haut, v.a. aber im Stratum basale und dem Stratum spinosum. Das entstandene Prävitamin D<sub>3</sub> isomerisiert spontan in einem thermosensitiven, nicht-enzymatischen Prozess zu Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol)<sup>21</sup>. Bei exzessiver UVB-Exposition konvertiert Prävitamin D<sub>3</sub> und VD<sub>3</sub> zu biologisch inaktiven Metaboliten, so dass eine Intoxikation vermieden wird. Zudem verhindert die Pigmentierung der Haut bedingt durch die vermehrte Melaninbildung, dass die UVB-Strahlung das 7-DHC in Keratinozyten erreicht<sup>22</sup>.

Der Transport der Vitamin D-Metabolite aus der Haut zur Leber erfolgt im Blut hauptsächlich durch Bindung an das Vitamin D-binding-Protein (DBP). In den Hepatozyten wird Vitamin D<sub>3</sub> durch die 25-Hydroxylase zu 25-Hydroxycholecalciferol (25(OH)D) umgewandelt<sup>19,23</sup>. Die 25(OH)D-Serumkonzentration ist zum größten Teil von der UV-Exposition abhängig, wird aber auch durch genetische Faktoren, Ernährung, Adipositas, Rauchen usw. beeinflusst<sup>24,25</sup>. Es stellt die Speicherform dar und wird als Index für den VD-Status genutzt, da seine Halbwertszeit (HWZ) mit 2-3 Wochen bedeutend länger ist, als die der biologisch aktiven Form mit einer HWZ von ca. 4 Stunden<sup>26</sup>.

Der letzte Aktivierungsschritt erfolgt hauptsächlich im proximalen Tubulus der Niere<sup>23</sup>. Durch die 25-Hydroxyvitamin D-1 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP27B1) wird 25(OH)D am C1-Atom hydroxyliert<sup>18</sup>. Es entsteht 1,25-Dihydroxycholecalciferol (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, Calcitriol)<sup>19</sup>. Extrarenal wird die 1 $\alpha$ -Hydroxylase in hohen Konzentrationen in epidermalen Keratinozyten und auch in aktivierten Immunzellen exprimiert<sup>20</sup>. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> induziert über den Vitamin D-Rezeptor die Expression des *Cyp24a1*-Gens. *Cyp24a1* kodiert für das Enzym 25-Hydroxyvitamin D-24-Hydroxylase. Dieses wird in der Zielzelle

exprimiert. Die 24-Hydroxylase inaktiviert  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und seine Vorstufe  $25(\text{OH})\text{D}$  durch die Hydroxylierung an Position 24<sup>19</sup>. Die Oxidationsreaktionen gehen mit einem Funktionsverlust einher. Die Metabolite können als wasserlösliche Calcitroinsäure<sup>19,27</sup> oder 23-Carboxylderivate ausgeschieden werden<sup>28</sup>.

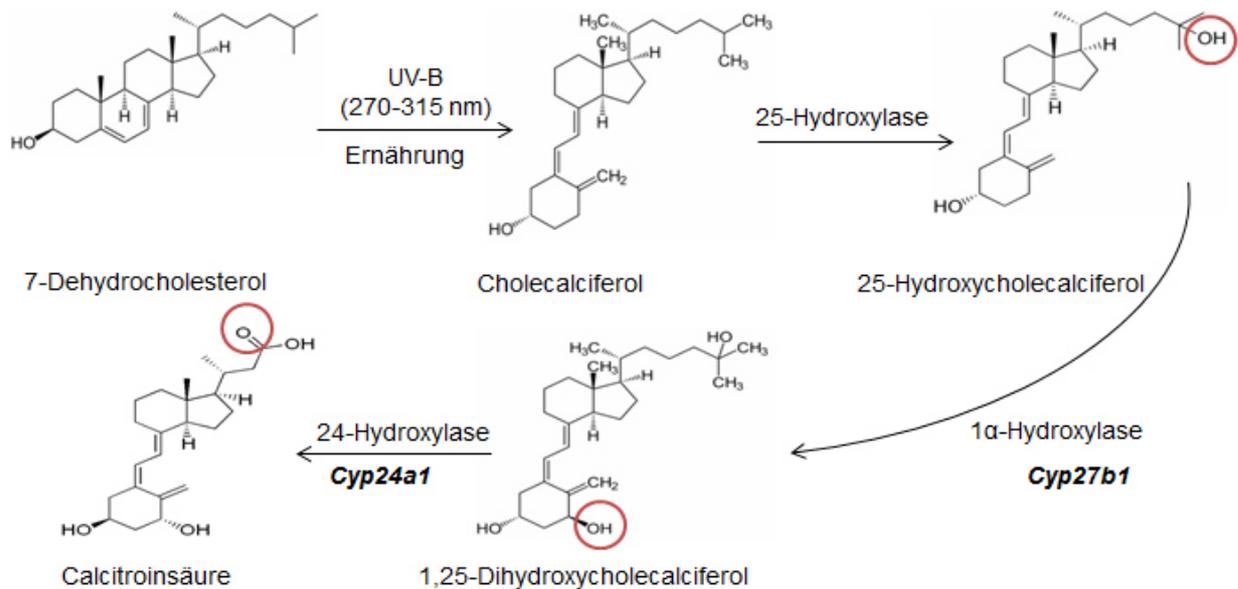


Abb. 2: Die Physiologie des Vitamin D-Stoffwechsels

7-Dehydrocholesterol wird durch UV-Strahlung in der Haut zu Cholecalciferol umgewandelt. Cholecalciferol und das pflanzliche Äquivalent Ergocalciferol können über die Nahrung zugeführt werden. In der Leber wird an Position 25 durch die 25-Hydroxylase hydroxyliert. Die funktionelle Gruppe ist rot markiert. Das Produkt 25-Hydroxycholecalciferol wird in der Niere durch die  $1\alpha$ -Hydroxylase an Position 1 hydroxyliert. Die biologisch aktive Form des Vitamin Ds, 1,25-Dihydroxycholecalciferol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) entsteht.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aktiviert durch Induktion der 24-Hydroxylase die Inaktivierung. Die Abbildung wurde nach Wjst et al. 2006 durch J. Hallau modifiziert.

### 1.2.1. Wirkmechanismus von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ über den Vitamin D-Rezeptor

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vermittelt seine biologischen Wirkungen als Steroidhormon bzw. Vitamin durch Bindung an einen nukleären Hormonrezeptor, den Vitamin D-Rezeptor (VDR) und reguliert so die Genexpression seiner Zielgene. Wang et al. 2005<sup>29</sup> identifizierten in der RNA von humanen SCC25 Zellen mittels Mikroassay-Analyse mehr als 900 direkte Zielgene. Der VDR besitzt eine hohe Affinität und Spezifität zu  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Als Nicht-Vitamin D-Liganden werden z.B. Vitamin E-Derivate oder die Arachidonsäure diskutiert. Nach Bindung des Liganden heterodimerisiert der VDR mit einem anderen nukleären Rezeptor, meist mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR). Das Heterodimer bindet an

sogenannte *vitamin D response elements* (VDRE) in der Promoterregion von Vitamin D-Zielgenen<sup>30</sup>. Durch Rekrutierung von Coaktivatoren und Corepressoren wird die Gentranskription moduliert. Die Vitamin D-Wirkung ist durch unterschiedliche Konzentration der Coregulatoren in den Geweben und die Selektivität der Gene für bestimmte Coregulatoren gewebespezifisch<sup>23</sup>.

### 1.2.2. Osteocalcin als Vitamin D-Zielgen

Osteocalcin ist ein nicht-kollagenes Protein, das im Knochen vorkommt. Hauptsächlich wird es von reifen Osteoblasten synthetisiert und sezerniert. Eine starke Expression des für Osteocalcin kodierenden Genes, *BGLAP* (engl. *bone γ-carboxylglutamic acid-containing protein*), findet sich auch in anderen Geweben beispielsweise in Ovarien, Prostata und Schilddrüse<sup>31,32</sup>. Das Gen liegt auf Chromosom 1q25-q31<sup>33</sup>. In der Promoterregion von *BLGAP* befindet sich ein VDRE, das die Genexpression durch 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> induziert. Es wurden Polymorphismen (BsmI I, Apa I) im VDR-Gen identifiziert, die die Osteocalcinerumkonzentration beeinflussen<sup>34</sup>. Posttranslational wird Osteocalcin Vitamin K-abhängig modifiziert. Durch die γ-Karboxylierung besteht eine hohe Affinität von Osteocalcin (cOC) zu Hydroxyapatit und Kalzium. Der Großteil des cOCs akkumuliert in der Knochenmatrix, während ein geringer Anteil ins Serum übergeht. Dieser dient als Marker für die Knochenmineralisierung<sup>35</sup>.

Sowohl Daten mit Tiermodellen als auch Studienergebnisse mit Diabetes mellitus Typ II-Patienten ergaben, dass Osteocalcin auch hormonell auf Glucose- und Lipidstoffwechsel wirkt. Niedrige Osteocalcin-Konzentrationen sind mit Adipositas, Glucoseintoleranz, verminderter Insulinsekretion und –sensitivität im Pankreas und geringerer Adiponectinfreisetzung im Fettgewebe assoziiert<sup>32,36</sup>.

### 1.2.3. Regulation der 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Synthese durch *Cyp27b1* und *Cyp24a1*

Die renale 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Produktion wird durch Parathormon (PTH), Kalzium (Ca)- und Phosphatkonzentration (P), den Fibroblast-Growth-Factor 23 (FGF23) und durch 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> selbst streng reguliert. Dies ist notwendig, um die Kalziumhomöostase zu gewährleisten, wodurch eine Hypo- und Hyperkalzämie vermieden wird (Abb. 3).

PTH ist ein wichtiger Stimulator der  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese, welches in den Zellen der Nebenschilddrüse produziert wird<sup>19</sup>. Bei Hypokalzämie wird PTH sezerniert und stimuliert über Induktion von *Cyp27b1* die renale  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese<sup>30</sup>. In der Folge verlangsamt sich der VD-Katabolismus durch Inhibition der 24-Hydroxylaseaktivität<sup>37</sup>. Die Nebenschilddrüsenzellen exprimieren den VDR, über den  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  durch Veränderung der Gentranskription in einem negativen Feedbackmechanismus die Synthese vom PTH supprimiert. Aber auch hohe Ca-Konzentrationen inhibieren PTH<sup>30</sup>.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inhibiert durch die Induktion von FGF23 aus dem Knochen, primär aus Osteoblasten und Osteozyten, die eigene Synthese. Unabhängig von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  kann die FGF23-Produktion auch durch hohe Phosphatkonzentrationen stimuliert werden<sup>38</sup>. Diese Mechanismen stellen sicher, dass es weder zur Hyperkalzämie noch zur Hyperphosphatämie kommt<sup>30</sup>. FGF23 und  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aktivieren *Cyp24a1* transkriptional, reprimieren *Cyp27b1* und limitieren damit die VD-Produktion<sup>39,40</sup>. *Cyp24a1* weist VDREs in der Promoterregion auf und ist somit ein klassisches VDR-Antwortgen<sup>30</sup>.

Die Repression von *Cyp27b1* erfolgt durch epigenetische Modifikationsprozesse<sup>41</sup>. In der Promoterregion des Genes wurde ein negatives VDRE identifiziert, an das direkt ein VDR-interagierender Repressor (VDIR) bindet. Die Liganden-induzierte Assoziation von VDR und VDIR resultiert in der Suppression der *Cyp27b1*-Expression durch die Rekrutierung einer Histondeacetylase<sup>42</sup>.

Die Schlüsselenzyme (CYP27B1 und CYP24A1) für den Vitamin D-Auf- und Abbau werden, wie bereits beschrieben, nicht ausschließlich renal exprimiert<sup>20</sup>.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vermittelt seine Wirkungen so nicht nur auf endokrinem, sondern auch lokal auf intra-, auto- und parakrinem Weg<sup>23</sup>. Die Regulation der extrarenalen Vitamin D-Produktion unterscheidet sich von der renalen. In Keratinozyten beispielsweise wird die  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese PTH-unabhängig durch die Verfügbarkeit von  $25(\text{OH})\text{D}$  gesteuert. Liegt eine Verletzung der Haut vor, kann durch den Tumornekrosefaktor beta 1 (TNF- $\beta_1$ ) und Aktivierung des TLR2 *Cyp27b1* induziert und somit die  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese stimuliert werden<sup>16</sup>.

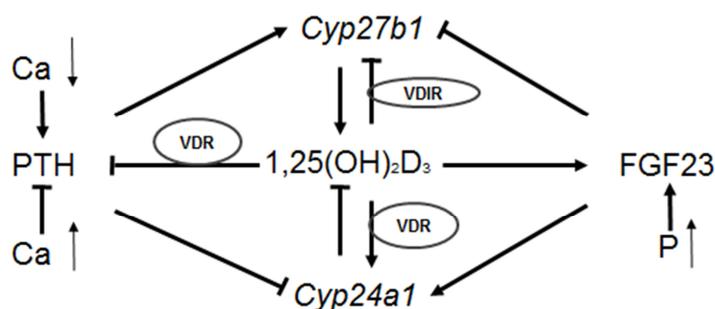


Abb. 3: Die Regulation der renalen 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Synthese über *Cyp27b1* und *Cyp24a1*. Die renale 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Synthese wird durch Parathormon (PTH), Fibroblast-Growth-Factor 23 (FGF23), Kalzium (Ca)- und Phosphatkonzentration (P) sowie 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> reguliert. PTH stimuliert, FGF23 supprimiert die 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Synthese durch Induktion bzw. Repression von *Cyp27b1* und *Cyp24a1*. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> inhibiert die eigene Synthese durch Aktivierung von *Cyp24a1* über den Vitamin D-Rezeptor (VDR) und Hemmung von *Cyp27b1* durch einen VDR-interagierenden Repressor (VDIR).

### 1.3. *Cyp27b1*-Das Schlüsselenzym der 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Synthese

Das Gen *Cyp27b1* auf Chromosom 12q13.1-3 kodiert für die 25-Hydroxyvitamin D-1 $\alpha$ -Hydroxylase<sup>43</sup>, ein Enzym der Cytochrom P450 Familie<sup>30</sup>. *Cyp27b1* erstreckt sich über eine Länge von 4.8 Kilobasen (kB) und beinhaltet 9 Exons<sup>44</sup>. Es ist für die Synthese von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> essentiell<sup>19</sup>.

Seltene Mutationen des Genes, die eine Inaktivierung der 1 $\alpha$ -Hydroxylase bewirken, führen beim Menschen zu dem Krankheitsbild der Vitamin D-abhängigen Rachitis Typ I (VDDR1)<sup>44</sup>.

Im Tiermodell zeigen *Cyp27b1*-Knockout-Mäuse nicht nur Defekte in Kalziumhomöostase und Knochenstoffwechsel, sondern auch eine Reduktion von CD4+ und CD8+ T-Zellen sowie eine zervikale Lymphadenopathie<sup>45</sup>.

Verschiedene Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) auf diesem Gen wurden als Prädiktor für die 25(OH)D-Serumkonzentration identifiziert<sup>24</sup>. Es wird daher diskutiert, dass diese Polymorphismen die Effizienz der 1 $\alpha$ -Hydroxylase reduzieren. Folglich wäre zwar die 25(OH)D-Konzentration im Serum normal bis erhöht, aber es könnte nicht ausreichend 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> synthetisiert werden<sup>46</sup>. Außerdem werden Polymorphismen des *Cyp27b1*-Gens mit Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ I und Multiple Sklerose (MS), deren Auftreten auch im Zusammenhang mit einem Vitamin D-Mangel diskutiert werden, in Verbindung gebracht<sup>47</sup>. Zu den in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen gibt es in Bezug zur AD keine Untersuchungen. Die Lage der hier untersuchten Polymorphismen ist in Abb. 4 dargestellt.

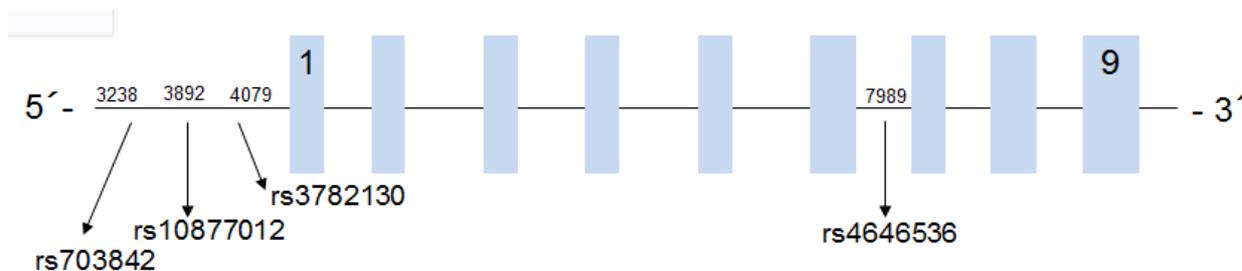


Abb. 4: Position der untersuchten SNPs auf dem Gen *Cyp27b1*

Darstellung der Struktur des Genes *Cyp27b1* im 5'-3'-Format und der Position der Polymorphismen, die in dieser Arbeit untersucht wurden. *Cyp27b1* besteht aus 9 Exons (blau). Pfeile markieren die Lokalisation der Polymorphismen.

Polymorphismen werden als Mutationen mit einer Allelfrequenz von mindestens einem 1 % in einer Population definiert<sup>48</sup>. Diese Variation innerhalb eines Nukleotids können durch verschiedene Mechanismen biologische Auswirkungen haben<sup>49</sup>. Es ist vorstellbar, dass sie zu einer gesteigerten bzw. verminderten Transkription führen, die posttranskriptionale und posttranslationale Aktivität oder auch die Tertiärstruktur des Genproduktes beeinflussen<sup>48</sup>.

Benachbarte Polymorphismen können gekoppelt vererbt werden. Durch die Kopplung ergibt sich eine nicht zufällige Kombinationen von Allelen (Haplotyp), die folglich mit einer Abweichung der erwarteten von der beobachteten Allelfrequenz verbunden ist. Dies wird als Kopplungsungleichgewicht (engl. *Linkage Disequilibrium* = LD) bezeichnet (siehe auch 3.9.6)<sup>48</sup>.

### 1.3.1. *Cyp27b1*-Polymorphismus rs703842

Der SNP rs703842 liegt in der 3'-UTR (engl. *untranslated region*) des METTL1-Genes, 1,76 kB Strang aufwärts von *Cyp27b1*<sup>50</sup>. In mehreren Studien wurde der SNP mit MS assoziiert. Das Minor-Allel C ist in den untersuchten Kontrollgruppen im Vergleich zur Gruppe MS-Patienten signifikant überrepräsentiert und stellt somit einen möglichen protektiven Faktor dar<sup>47,50,51</sup>. Orton et al.<sup>24</sup> identifizierten diesen SNP und rs4646536 bei kanadischen Zwillingen mit MS als Prädiktor für die 25(OH)D-Konzentrationen, dabei waren die mittleren Konzentrationen bei homozygot vorliegendem C-Allel signifikant niedriger<sup>24</sup>. In der Studie von Simon et al.<sup>51</sup> wurde hingegen kein Zusammenhang des SNPs mit der 25(OH)D-Serumkonzentration festgestellt.

### 1.3.2. *Cyp27b1*-Polymorphismus rs10877012

Der Polymorphismus rs10877012, auch *Cyp27b1* (-1260C>A) genannt, befindet sich im Aktivierungsprotein 2 (AP-2) Transkriptionsfaktorbindungsmotiv in der Promoterregion, 1,2 kB Strang aufwärts der Transkriptionsstartseite des Genes<sup>52,53</sup>. Mittels Reporterassays wurde der funktionelle Effekt des Polymorphismus auf *Cyp27b1* molekulargenetisch untersucht. Es zeigte sich, dass das C-Allel zu einer geringeren Genexpression führt<sup>52</sup>. Bei Diabetes mellitus Typ I-Patienten mit dem Genotyp CC wurde im Vergleich zu gesunden Kontrollen mit dieser Variante niedrigere *Cyp27b1* mRNA-Konzentrationen in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) gemessen<sup>28</sup>. Es wird beschrieben, dass das C-Allel im *Cyp27b1*-Promoter eine Transkriptionsfaktor-Bindungsseite verändert<sup>54</sup>.

Ein VD-Mangel, der sich in den meisten Studien auf die 25(OH)D-Serumkonzentration bezieht selten auf die 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Konzentration, wird mit dem gehäuften Auftreten verschiedener Erkrankungen korreliert. So wird das C-Allel mit einem erhöhten Risiko für Autoimmunerkrankungen wie M. Addison, Hashimoto Thyreoiditis, Diabetes mellitus Typ I und MS sowie Frakturen assoziiert<sup>52,55</sup>.

In zwei Studien zeigte sich, dass der Genotyp des *Cyp27b1*-Polymorphismus Einfluss auf die 25(OH)D-Konzentration hat, wobei das Assoziationsmuster in Bezug auf die Allele inkonsistent war<sup>46</sup>. So stellten Hyppönen et al.<sup>56</sup> fest, dass Träger der homozygoten Variante des C-Allel im Sommer und Herbst im Mittelwert um 5 % höhere 25(OH)D-Konzentrationen aufwiesen als homozygote Individuen für das Minor-Allel, was im Frühling und Winter nicht der Fall war. Dies führt zu der Annahme, dass die Genexpression von der Jahreszeit abhängig ist und das C-Allel eine Reduktion der 1 $\alpha$ -Hydroxylase bewirkt, wodurch weniger 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> verfügbar ist. Ramos-Lopez et al. 2008<sup>57</sup> korreliert jedoch das Vorhandensein des C-Allels im Genotyp mit niedrigeren 25(OH)D-Serumkonzentrationen bei Frauen mit einem Gestationsdiabetes, wobei sich diese nicht in Verteilung des Polymorphismus von den gesunden Kontrollen unterscheiden.

### 1.3.3. *Cyp27b1*-Polymorphismus rs3782130

Rs3782130 liegt in einem nicht evolutionär konservierten Bereich der 3'UTR bzw. Promoterregion von *Cyp27b1*<sup>58</sup>. Holt et al.<sup>58</sup> beschreiben außerdem eine Assoziation des Polymorphismus mit einer geringeren Prostatakarzinom-spezifischen Mortalität. *Cyp27b1* wird früh im neoplastischen Prozess der Prostatakarzinom-Zellen durch epigenetische Prozesse herunterreguliert<sup>59</sup>. Ein Vitamin D-Mangel wird dementsprechend mit einer erhöhten Mortalität bei Prostatakarzinom diskutiert<sup>58,59</sup>.

### 1.3.4. *Cyp27b1*-Polymorphismus rs4646536

Im Bereich von Intron 6 ist der Polymorphismus *Cyp27b1* (+2838T>C) lokalisiert<sup>53</sup>. Der SNP ist mit dem Frakturrisiko bei älteren Individuen, Autoimmun- und Krebserkrankungen assoziiert<sup>43,52,53</sup>.

Der SNP liegt eng gekoppelt mit rs703842 und rs10877012 vor<sup>47</sup>. Bailey et al.<sup>43</sup> beschreibt mit rs3782130 einen weiteren SNP, der ein hohes LD mit rs10877012 und rs4646536 ( $r^2 = 0,99$  u.  $0,97$ ) aufweist.

Wie auch rs703842 und rs10877012 ist rs4646536 mit MS in Zusammenhang gebracht worden. Das Major-Allel T ist bei erkrankten Personen signifikant überrepräsentiert<sup>47</sup>. Außerdem ist das Major Allel mit einem erhöhtem Risiko für endokrine Autoimmunerkrankungen, wie Diabetes mellitus Typ I und Hashimoto Thyreoiditis, assoziiert<sup>43,55</sup>. Bei der Inzidenz für Frakturen zeigt sich ein ähnlicher Trend für das Major Allel wie bei rs10877012. Die höchste Inzidenz haben homozygote Träger des Major-Allels T und die niedrigste Träger des homozygoten Minor-Allels C<sup>52</sup>.

Orton et al.<sup>24</sup> assoziierte wie in 1.3.1 bereits beschrieben das Minor Allel C mit niedrigeren 25(OH)D-Konzentrationen. Diese Daten deuten auf einen mit dem C-Allel verbundenen Funktionsgewinn hin. Es wurden jedoch keine biochemischen Analysen vorgenommen.

## 1.4. *Cyp24a1*-Das Schlüsselenzym des 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Katabolismus

Das Gen *Cyp24a1* erstreckt sich über 20,5 kB auf Chromosom 20q13.2-q13.3 und besteht aus 12 Exons<sup>43,53</sup>. Chen und DeLuca (1995)<sup>60</sup> beschreiben in der Promoterregion eine TATA-Box, eine CAAT-Box, GC-Boxen, zwei VDREs und AP-1- und AP-2-Bindungsseiten. *Cyp24a1* kodiert für das Enzym 25-Hydroxyvitamin D 24-Hydroxylase, das zur Cytochrom P450 Familie gehört. Die 24-Hydroxylase ist das Schlüsselenzym für den Abbau von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in eine inaktive wasserlösliche Form<sup>43,53</sup>. Mutationen des Gens, die einen kompletten bzw. nahezu vollständigen Funktionsverlust bewirken, sind Ursache für die infantile Hyperkalzämie<sup>61</sup>. Im Tiermodell wurde gezeigt, dass *Cyp24a1*-Null-Mäuse *in vivo* über 96 Stunden zur Eliminierung von exogen zugeführtem 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> aus dem Blut und Gewebe benötigen, heterozygote Tiere hingegen nur 6 bis 12 Stunden<sup>62</sup>. Eine alternative Splicevariante des Enzyms ist beschrieben, die zu einer verkürzten und katalytisch dysfunktionalen Form des Proteins führt<sup>63</sup>. Für verschiedene *Cyp24a1*-Polymorphismen wird ein schwacher Zusammenhang mit Asthma und Atopie beschrieben, wobei die Risiko-SNPs oder assoziierten Allele zwischen den untersuchten Populationen variieren<sup>64</sup>. Die Struktur des Gens und die Lage der hier untersuchten Polymorphismen werden in Abb. 5 gezeigt.

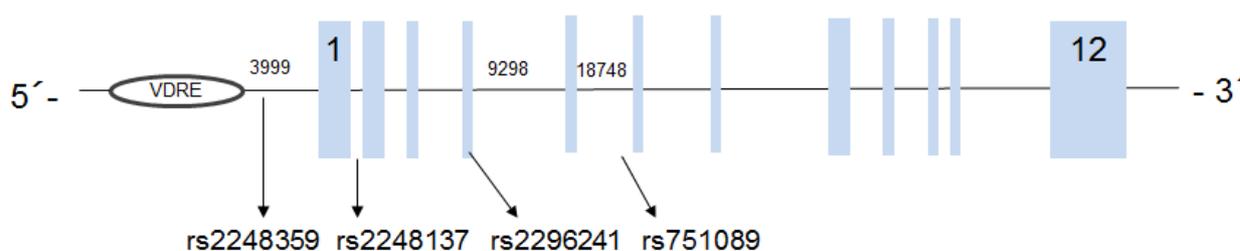


Abb. 5: Position der untersuchten SNPs auf dem Gen *Cyp24a1*

Darstellung der Struktur des Gens *Cyp24a1* im 5'-3'-Format und der Position der Polymorphismen, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Das Gen besteht aus 12 Exons (blau). Rs2248359 liegt in der Promoterregion, rs2248137 und rs751089 im Intronbereich und rs2296241 auf Exon 4. Die Pfeile markieren die Lokalisation der Polymorphismen.

### 1.4.1. *Cyp24a1*-Polymorphismus rs2248359

Rs2248359 ist in der Promoterregion des *Cyp24a1*-Genes lokalisiert<sup>64</sup>. Das C-Allel des Polymorphismus wurde in einer deutschen Studie mit Asthma-Familien<sup>65</sup> und in der

französisch-kanadischen Saguenay-Lac-Saint-Jean Studienpopulation mit einem erhöhten Asthmarisiko assoziiert<sup>60</sup>. Des Weiteren beschreiben Bossé et al.<sup>64</sup>, dass dies bei Proben von drei weiteren Studienpopulationen nicht der Fall war, wobei in der Canadian Asthma Primary Prevention Studienpopulation eine Assoziation mit Atopie gezeigt wurde. Die inkonsistenten Ergebnisse können durch eine Vielzahl an Faktoren bedingt sein so z.B. war die Definition von Asthma nicht einheitlich<sup>64</sup>.

Wjst et al.<sup>65</sup> beschreiben außerdem einen 5-Punkthaplotyp (rs2296241 : rs17219315 : rs2762942 : rs2248137 : rs2248359; GAACC) für *Cyp24a1*, der mit Asthma, Gesamt IgE, 25(OH)D- und 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Serumkonzentration assoziiert ist. Der Polymorphismus rs2248359 liegt in der deutschen Studie nicht im Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE siehe 3.9.7). Dies deutet daraufhin, dass die Ergebnisse nicht die wirkliche Verteilung der Allele in der Population wiedergeben.

#### **1.4.2. *Cyp24a1*-Polymorphismen rs2248137**

Rs2248137 liegt im Bereich des ersten Introns und ist evolutionär nicht konserviert<sup>53</sup>. Der Polymorphismus liegt, wie bereits beschrieben, gekoppelt vor und wurde in Kombination mit Asthma assoziiert<sup>65</sup>.

#### **1.4.3. *Cyp24a1*-Polymorphismus rs2296241**

Der SNP rs2296241 befindet sich auf Exon 4 in einem evolutionär konservierten Bereich (Konservierungsscore 0,99) von *Cyp24a1* und wird mit Asthma und Krebserkrankungen in Zusammenhang gebracht<sup>58,65</sup>. Die *Cyp24a1* mRNA-Expression ist in Tumoren hochreguliert und wirkt so möglicherweise der antiproliferativen Wirkung von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> durch Senkung der Konzentration des Hormones entgegen<sup>53,66</sup>.

#### **1.4.4. *Cyp24a1*-Polymorphismus rs751089**

Der SNP rs751089 ist eine A/C- Variante, die auf einem Intron des *Cyp24a1*-Genes liegt<sup>67</sup>.

## 1.5. Die physiologische Bedeutung von Vitamin D

Die klassische Funktion von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ist die Regulation der Kalziumhomöostase und des Knochenumbaus. Zudem werden noch zahlreiche andere Prozesse im menschlichen Körper durch Vitamin D-Antwortgene, die VDREs enthalten, beeinflusst. Sie betreffen neben Knochenstoffwechsel und Mineralhomöostase, das Immunsystem, den Metabolismus und den Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose<sup>30</sup>.

### 1.5.1. Die Bedeutung von Vitamin D in der Haut

Keratinocyten besitzen die Enzymausstattung zur  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese<sup>68</sup>. Proliferierende Keratinocyten, die sich hauptsächlich der Basalschicht der Haut befinden, exprimieren den VDR. Die VDR-Expression wird von dem Proliferations- und Differenzierungsstatus der Zelle sowie dem umgebenden Zytokinmilieu beeinflusst<sup>3</sup>. Durch die Bindung an seinen Rezeptor und die Änderung der Kalziumbalance induziert  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  antiproliferative und differenzierende Effekte<sup>69</sup>. In Abhängigkeit von der Konzentration hat  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  einen biphasischen Effekt auf das Wachstum der Keratinocyten. Bei Konzentrationen größer  $10^{-8}$  m hemmt es, bei Konzentrationen kleiner  $10^{-9}$  m stimuliert es das Keratinocytenwachstum, wobei das Nährmedium einen weiteren Einflussfaktor darstellt. So wirkt  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  bei Psoriasis inhibierend und in gesunder Haut proliferativ auf die Zellen<sup>3</sup>. Inflammatorische Prozesse in den Keratinocyten werden indirekt durch Hemmung der Interleukine IL-1 $\alpha$ , IL-6 und RANTES-Synthese beeinflusst<sup>2</sup>. Die Präsenz von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ist nicht nur essentiell für die autokrine Regulation der Entwicklung und die Funktion der Keratinocyten, sondern beeinflusst auch die Permeabilität der epidermalen Barriere positiv durch Induktion verschiedener Proteine wie Involucrin, Loricrin und Filaggrin, die für die Formation des Stratum corneum notwendig sind. *Cyp27b1*-Null-Mäuse zeigten eine geringere Expression dieser Proteine und eine signifikant schlechte Wundheilung bei rupturierter Barriere im Vergleich zum Wildtyp (wt)<sup>70</sup>.

Eine Verletzung oder eine bakterielle Infektion der Haut führt bei Keratinocyten im Bereich der Läsion zu einem Anstieg der  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration, da die *Cyp27b1*-Expression durch Aktivierung der TLRs 2/6 und Tumor Growth Factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )

induziert wird und somit die Konversion von 25(OH)D zu 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vermittelt über Bindung an den VDR, dessen Genexpression durch TLR-Aktivierung ebenfalls induziert wird, die Expression von TLR-2 und seinem Cofaktor CD14 und die Produktion antimikrobieller Peptide, besonders Cathelicidin<sup>16</sup>. Die Produktion von Cathelicidin wird durch 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> über das in der Promoterregion des Cathelicidin-Genes *Camp* vorhandene VDRE induziert. Weitere Elemente der Vitamin D-Signalkaskade wie Coaktivatoren oder epigenetische Veränderungen wie Histonacetylierung unterstützten die Cathelicidin-Expression<sup>15,71</sup>.

### 1.5.2. Die Rolle von Vitamin D bei atopischer Dermatitis

Die Wirkung von VD auf das Immunsystem wird in Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen wie z.B. MS<sup>47,50,51</sup> oder Diabetes mellitus Typ I<sup>28</sup> intensiv untersucht. Im Hinblick auf die AD gibt es einige wenige Studien, die sich mit dem Einfluss von VD auf die Erkrankung befassen<sup>72</sup>. Diese zeigen, dass eine Supplementation von VD<sup>73,74</sup> bzw. Phototherapie<sup>75,76</sup> zu einer Besserung des Hautbildes führen kann. So wird ein Mangel an VD als Faktor für die Störung der Barrierefunktion der Haut, die Dysregulation der adaptiven Immunantwort und die inadäquate bakterielle Abwehr bei der AD diskutiert<sup>2</sup>. Kritisch an diesen Studien sind jedoch die geringe Probandenzahl und die kurze Beobachtungsdauer<sup>72</sup>. Die Ergebnisse zum Einfluss von VD auf die AD bleiben jedoch widersprüchlich (Tab. 2). So stellen Bäck et al.<sup>77</sup> fest, dass die Einnahme von hohen VD-Konzentrationen während der ersten fünf Lebensmonate die Manifestation der AD im sechsten Lebensjahr fördert.

Die Wirkung von VD auf die Haut und das Immunsystem kann damit erklärt werden, dass der VDR von Zellen wie Keratinozyten, DCs und T-Zellen exprimiert wird<sup>2</sup>. Heine et al.<sup>5</sup> assoziieren *VDR*-Genpolymorphismen mit schwerer AD, nicht aber mit AD als solcher.

Man nimmt an, dass VD die epidermale Barrierefunktion durch Stimulation der Expression von FLG und Involucrin fördert. *Cyp27b1*-Null-Mäuse zeigen eine geringere Expression von Barriereproteinen und damit verbunden einen erhöhten transepidermalen Wasserverlust<sup>70</sup>. Ein erhöhter transepidermaler Wasserverlust ist auch ein Kennzeichen der AD<sup>1</sup>. Neben der Störung der Hautbarrierefunktion wird für die inadäquate bakterielle Abwehr der Haut bei AD eine Insuffizienz des angeborenen

Immunsystems durch die verminderte Expression an AMPs diskutiert. Die AMP-Induktion ist besonders in den Läsionen der atopischen Haut stark reduziert<sup>78</sup>. VD induziert die AMP-Expression, welche Infektionen der Haut vorbeugen<sup>16</sup>.

Außerdem beeinflusst VD die Immunantwort durch Induktion verschiedener Zytokine. In vitro führte die Behandlung von DCs mit VD zum Anstieg der IL-10-Konzentration und zum Absinken der IL-12-Konzentration. Dieses Zytokinmilieu hemmt die Maturation der DCs, fördert deren tolerogene Eigenschaften und induziert T-Suppressorzellen<sup>79</sup>. Im Tiermodell zeigt sich, dass VDR-Knockout-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp mehr INF- $\gamma$  und weniger IL-2, IL-4 und IL-5 produzieren<sup>80</sup>. Diese Ergebnisse implizieren, dass VD inhibitorische Wirkungen auf das adaptive Immunsystem, insbesondere auf die Th<sub>1</sub>-zellen, besitzt, aber die Th<sub>2</sub>-Antwort fördert<sup>2,81</sup>. Die AD ist in der akuten Phase mit einer erhöhten Th<sub>2</sub>-Aktivität assoziiert, wodurch VD hier auch negative Wirkung auf die Erkrankung haben könnte<sup>1,17</sup>.

Tab. 2: Der Einfluss von Vitamin D auf die atopische Dermatitis

| <b>VD-Wirkung</b>              | <b>positiv</b>  | <b>negativ</b>   |
|--------------------------------|---|--|
| <b>angeborenes Immunsystem</b> | AMPs (z.B. Cathelicidin)<br>FLG, Involucrin, Loricrin<br>IL-10 $\uparrow$<br>IL-12 $\downarrow$                       | TSLP $\uparrow$<br>TNF- $\alpha$ $\uparrow$  |
| <b>adaptives Immunsystem</b>   | tolerogene DCs<br>regulatorische T-Zellen<br>IL-4, INF- $\gamma$ $\downarrow$<br>Th <sub>1</sub> -Zellen $\downarrow$ | IL-4, IL-5, IL-13 $\uparrow$<br>inflammatorische<br>Th <sub>2</sub> -Zellen $\uparrow$ |

## 2. Aufgaben- und Zielstellung der Arbeit

Vitamin D vermittelt Effekte auf das Immunsystem und die Gewebszellen der Haut. Eine verminderte VD-Wirkung durch 25(OH)D-Mangel oder genetische Ursachen wie VDR-Polymorphismen werden im Zusammenhang mit zahlreichen Erkrankungen wie auch der AD diskutiert. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob Polymorphismen in den Genen, die für die Aktivierung (*Cyp27b1*) und die Inaktivierung (*Cyp24a1*) von biologisch aktivem  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  essentiell sind, gehäuft bei Patienten mit AD vorkommen und sich daraus ein Einfluss auf die 25(OH)D-Serumkonzentration ergibt.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Versuchsgruppe

Nach Genehmigung der Untersuchungen durch die Ethikkommission der Charité Campus Mitte wurden 281 Probanden/innen mit atopischer Dermatitis an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité über die Atopiesprechstunde rekrutiert. Nach mündlicher Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung wurde Blut zur Bestimmung des Genotyps entnommen. Der Schweregrad der Erkrankung wurde mit Hilfe des SCORADs (SCORing Atopic Dermatitis) durch einen Facharzt für Dermatologie bestimmt. Der SCORAD wurde von der European Task Force on Atopic Dermatitis<sup>82</sup> entwickelt und erfasst objektiv die Ausbreitung der Hauterscheinungen (Erythem, Ödem/Papeln, Krustenbildung, Exkoration, Lichenifikation und Trockenheit) und deren Intensität. Die subjektiven Symptome Schlaflosigkeit und Pruritus ergänzen den Index. Ein objektiver SCORAD kleiner 15 Punkte wird als leichte AD, ein objektiver SCORAD von 15 bis 40 Punkten als mittelschwere und ein SCORAD größer 40 Punkte als schwere AD gewertet<sup>83</sup>.

### 3.2. Kontrollgruppe

Als Vergleichskollektiv dienten zum einen vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene bereitgestellte Kontroll-DNAs von gesunden Individuen. Ferner wurden gesunde Freiwillige für die Probenentnahme rekrutiert. Die Kontrollgruppe wies in der Eigenanamnese keine atopischen Erkrankungen wie AD, AR und kein AA auf.

Bei allen Probanden der Studie handelt es sich um Kaukasier, um Störfaktoren durch die ethnische Angehörigkeit zu reduzieren. Die Alters- und Geschlechtsverteilung der Kontrollgruppe wurde auf die Versuchsgruppe abgestimmt.

### 3.3. Chemikalien und Reagenzien

| Chemikalie                      | Zusammensetzung | Hersteller          |
|---------------------------------|-----------------|---------------------|
| 10x Reaktionspuffer             |                 | Solis Biodyne       |
| 1x TBE-Puffer:                  | Trizma Base     | Sigma               |
|                                 | Borsäure        | Roth                |
|                                 | EDTA            | Sigma               |
| 50 bp Ladder                    |                 | Fermentas           |
| Agarose Broad Range             |                 | Roth                |
| Bovines Serum Albumin (BSA)     |                 | New England Biolabs |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)         |                 | Roth                |
| dNTP-Set                        |                 | Solis Biodyne       |
| GelRed Nucleic Acid (Farbstoff) |                 | Biotium             |
| MgCl <sub>2</sub>               |                 | Solis Biodyne       |
| Taq-Polymerase                  |                 | Solis Biodyne       |

### 3.4. Primer und Sonden

Die Primer und Sonden wurden kommerziell von TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH und BioTeZ Berlin-Buch GmbH (beide Berlin, Deutschland) bezogen. Stammlösungen in 100 pmol/μl Aqua dest. wurden bei -20 °C im Dunkeln gelagert. Für die PCR wurden Gebrauchskonzentrationen von 4 pmol/μl (Sonden) und 10 pmol/μl (Primer) verwendet (Tab. 3). Die Oligonukleotide sind im 5'-3'-Format angegeben. Die Sensorsonden (wt/mut//C) sind am 3'-Ende mit Fluorescein (FL = FITC) markiert. Die Anchorsonden (Anc) sind am 5'-Ende mit dem Farbstoff LC640 = Cy5 und am 3'-Ende mit Phosphat (P) bzw. einer Aminogruppe gekoppelt.

Tab. 3: Primer und Sonden für die PCR

| <i>Cyp27b1</i> | rs703842                       |                | rs10877012                  |
|----------------|--------------------------------|----------------|-----------------------------|
| rs703842 F     | CCgAAgAATACAAgATCCGg           | rs10877012 F   | gACCTTCAATTCCAgAACTTCAg     |
| rs703842 S     | CAGCCTgCCTggTCACT              | rs10877012 S   | ACTggCACAgAgCCTgATAg        |
| rs703842 A     | TCTCAgCTCCAgCAgTCTCA           | rs10877012 A   | TgTACCACTgCACTCCAgC         |
| rs703842 R     | CCCACCTTCTTTAAgAgAgTACTgT      | rs10877012 R   | CgTATgCCTgTAgTgCCTTg        |
| rs703842 wt    | TgCTCTTTTCTCTAATCCCTggg        | rs10877012 mut | AAAATAAAATAATCTCCACAgTTTACC |
| Anc rs703842   | gACgAggTCCAgCTAAggTAgAgTAAgCAg | Anc rs10877012 | CTCTgCTCCTTACTCCCTCATTCCCC  |
|                | rs3782130                      |                | rs4646536                   |

|                |                                |               |                                   |
|----------------|--------------------------------|---------------|-----------------------------------|
| rs3782130 F    | AgAgAggTAAACTgTgggAgATTCTT     | rs4646536 F   | gAgAAAAATggCCCTCTACTCT            |
| rs3782130 S    | ggCCCTCTCTCTgTTgCCTAg          | rs4646536 S   | gggTTTggAAgTTggAAACAAT            |
| rs3782130 A    | CAACACTTTgggAggCTAAgg          | rs4646536 A   | ATgTCTTTgTCTgggACACgAg            |
| rs3782130 R    | gCATgAggCCAaggAggTT            | rs4646536 R   | AgTAgAAAaggTgCATAggCTTTAC         |
| rs3782130 C    | TTTTTTgTAGAgACAgTTCCACTATgT    | rs4646536 C   | gCCTCATCTTgCTgTCTCCA              |
| Anc rs3782130  | gCCCAGgCTggTCTCAgACTC          | Anc rs4646536 | TTTgTgCTTTgCAACCTAgACTgTACCC      |
| <b>Cyp24a1</b> | <b>rs2248359</b>               |               | <b>rs2248137</b>                  |
| rs2248359 F    | gATTCgAgCCACTTTAAAACAATCAA     | rs2248137 F   | TCTCAAgAAACAgCACgACAC             |
| rs2248359 S    | CCAAC TTCCgTTCCgAATTAgC        | rs2248137 S   | TggTAAACCCCTTTTCgC                |
| rs2248359 A    | CTCCCCAAggTgCgTC               | rs2248137 A   | CATACTTCTTgTggTACTCCACCT          |
| rs2248359 R    | ACCACCgCCCCAgTAC               | rs2248137 R   | CAACTTCATgCggAAAATCT              |
| rs2248359 mut  | gCCAgCCgCgATAACTCT             | rs2248137 C   | CgTCTgggCagCgAggg                 |
| Anc rs2248359  | AAATTgTgTATgTTTgTCACTggACCTgCC | Anc rs2248137 | CCCCggTCCCCTAggAggAAggA           |
|                | <b>rs2296241</b>               |               | <b>rs751089</b>                   |
| rs2296241 F    | CAAgACgTgAAgTTAgCTCAgTg        | rs751089 F    | TAgCTTAAAgCTACATTggCT             |
| rs2296241 S    | gTTTTCTTCAACggCTTTAA           | rs751089 S    | TTCCACCAATATTTTTCTCTAg            |
| rs2296241 A    | AACgTggCCTCTTTCATCA            | rs751089 A    | CACTACCTACACTgAgggTTAC            |
| rs2296241 R    | TgTTCAgTTCgCTgTACAAgTC         | rs751089 R    | CCACACCCTAAAAAgTCAC               |
| rs2296241 mut  | CCCATAAAATCAgCCAAgACC          | rs751089 mut  | ACAgTTTCTgACAAATgCCCAC            |
| Anc rs2296241  | TCAAAGAAAAACAACCgCAAAgACAC     | Anc rs751089  | CCCTTTTAAgTggCATCTTTTATTTCTC<br>T |

### 3.5. Kommerzielle ELISA-Kits

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 25-Hydroxy Vitamin D EIA                       | Immunodiagnostic Systems GmbH |
| MicroVue Osteocalcin Enzyme<br>Immunoassay Kit | MDSS GmbH                     |
| QIAamp DNA Blood Mini Kit                      | Qiagen GmbH                   |

### 3.6. Geräte

|   |                          |
|---|--------------------------|
| Zentrifuge 5415 C                       | Eppendorf                |
| Geldokumentationsanlage                 | SynGene Bio Imaging Sys. |
| Gelelektrophorese                       | Febikon                  |
| LightCycler 480                         | Roche Diagnostics GmbH   |
| LightCycler Centrifuge Adapters 1909312 | Roche Diagnostics GmbH   |
| Thermocycler                            | Biometra                 |
| Thermomixer 5436 (Heizblock)            | Eppendorf                |
| Vortexer REAX 2000                      | Heidolph                 |
| Zentrifuge 5403                         | Eppendorf                |

### 3.7. Verbrauchsmaterial/Einwegmaterial

|   |          |
|---|----------|
| 1,5 ml Reaktionsgefäße                            | Sarstedt |
| Frame Star 480 (96 well-Lightcycler-Platte-weiß)  | 4titude  |
| LightCycler Kapillaren                            | Roche    |
| Safeseal-Tips Professional 10 µl, 200 µl, 1000 µl | Biozym   |

### 3.8. Verwendete Software

| Software   | Entwickler                 |
|--|----------------------------|
| GraphPad Prism Version 5.0                       | Graph Pad Software         |
| Haploview 4.2                                    | Broad Institut             |
| LightCycler Software Version 3.5                 | Roche Diagnostics GmbH     |
| Microsoft Office (inkl. Word, Excel, Powerpoint) | Microsoft Deutschland GmbH |
| Odds-Ratio                                       | MedCalc Software           |
| Revelation G 3.2                                 | Dynex Technologies GmbH    |
| XLSTAT   | Addinsoftware              |

### 3.9. Versuchsmethoden

#### 3.9.1. DNA-Extraktion aus Vollblut

Die DNA-Isolation erfolgte mittels QIAamp Mini Blood Kits (Qiagen, Hilden) entsprechend des Herstellerprotokolls aus EDTA-Vollblut.

#### 3.9.2. Gelelektrophorese von PCR-Produkten zur Primerpaaretablierung

Die von Tib MOLBIOL Syntheselabor GmbH (Berlin, Deutschland) konzipierten Genotypisierungsassays enthielten jeweils zwei Sense- und Antisense-Primer. Die Bestimmung der effizientesten Primerpaarkombination (F/A, F/R, S/A, S/R) für die jeweilige PCR (Polymerasekettenreaktion, engl. *Polymerase Chain Reaction*) erfolgte

mittels Gelelektrophorese. Die konventionelle PCR wurde in 20 µl Gesamtvolumen durchgeführt und enthielt die zu untersuchende DNA-Probe, zwei Oligonukleotide mit definierter Sequenz (Primerpaar), Nukleotide, Puffer und eine thermostabilen Polymerase (Tab. 4).

Tab. 4: Standardprotokoll für den PCR-Mix

| Reagenz                    | Menge in µl |
|----------------------------|-------------|
| H <sub>2</sub> O           | 12,3        |
| 10x Puffer                 | 2,0         |
| MgCl <sub>2</sub> (1,5 nM) | 1,2         |
| dNTPs (2,5 nM)             | 1,0         |
| Forward-Primer S/F (10 mM) | 1,0         |
| Reverse-Primer A/R (10 mM) | 1,0         |
| Taq-Polymerase             | 0,5         |
| DNA                        | 1,0         |

Die PCR erfolgte am Thermocycler in 35 Zyklen (Programm siehe Tab. 5). Es wurden für jede Primerkombination drei verschiedene DNA-Proben und eine Negativkontrolle, die anstatt DNA Aqua dest. enthielt, verwendet. Die Amplifizierung einer spezifischen DNA-Region mittels PCR beruht auf einem mehrfach wiederholten Zyklus aus drei Einzelschritten: Denaturierung, Anlagerung (Annealing) und Verlängerung (Elongation). Unter optimalen Bedingungen verdoppelt sich die Anzahl an DNA-Molekülen pro Zyklus.

Tab. 5: Thermocycler PCR-Programm

| Reaktionsschritt       | Temperatur in °C  | Zeit in s |
|------------------------|-------------------|-----------|
| Initiale Denaturierung | 95                | 240       |
| Amplifikation          | <i>35 Zyklen:</i> |           |
| Denaturierung          | 95                | 5         |
| Primerhybridisierung   | 51-58             | 20        |
| Elongation             | 72                | 11-24     |
| Terminale Elongation   | 72                | 300       |

Die Temperatur (T) der Primerhybridisierung ist abhängig von deren Schmelztemperatur. Die Elongationszeit der PCR richtet sich nach der Fragmentlänge, dabei entsprechen 1000 Basenpaare (bp) 60 Sekunden (s) (Tab. 6).

Tab. 6: Primerhybridisierungstemperatur und Elongationszeit

|                              | <b>rs703842</b>  | <b>rs10877012</b> | <b>rs3782130</b> | <b>rs4646536</b> |
|------------------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| T Primerhybridisierung in °C | 55               | 56                | 58               | 56               |
| Elongationszeit in s         | 13               | 16                | 24               | 15               |
|                              | <b>rs2248359</b> | <b>rs2248137</b>  | <b>rs2296241</b> | <b>rs751089</b>  |
| T Primerhybridisierung in °C | 58               | 54                | 54               | 51               |
| Elongationszeit in s         | 11               | 18                | 11               | 16               |

Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente in Abhängigkeit von ihrer Größe aufgetrennt. Ein 50 bp Standard wurde mitgeführt (Fermentas). 1,5% Agarose in TBE-Puffer (Rezeptur in Liste der Chemikalien) wurden mit 3 µl Farbstoff zum Färben von Nukleinsäuren (Biotium, GelRed™) in eine Horizontalkammer mit Analysekeim gegeben. Nach Elektrophorese über eine Stunde bei 120 Volt wurde das Gel nach UV-Exposition, die den Farbstoff „Gelred™“ zur Fluoreszenz angeregt, fotografiert. Das Primerpaar, wo sich die stärksten Banden zeigten, wurde ausgewählt.

Für die Detektion der Polymorphismen wurden folgende Kombinationen aus Forward (S)- und Reverseprimern (R/A) für die zu analysierende DNA-Region ausgewählt, wie in Tabelle 7 dargestellt. Für den *Cyp24a1* SNP rs2248137 ergaben sich nach mehrmaliger Wiederholung des Versuches die Kombinationen F/A, S/A.

Tab. 7: Primerpaarkombination mit ihrer Fragmentlänge

| <b>Gen</b>     | <b>Primerkombination</b> | <b>Fragmentlänge</b> |
|----------------|--------------------------|----------------------|
| <i>Cyp27b1</i> | rs703842 S/R             | 320 bp               |
|                | rs10877012 S/R           | 240 bp               |
|                | rs3782130 S/A            | 232 bp               |
|                | rs4646536 S/R            | 191 bp               |
| <i>Cyp24a1</i> | rs2248359 S/R            | 118 bp               |
|                | rs2296241 S/A            | 90 bp                |
|                | rs751089 S/R             | 207 bp               |

Die ausgewählten Primerpaare wurden anschließend für die Genotypisierung mittels quantitativer PCR genutzt. Der *Cyp24a1* Polymorphismus rs2248137 liegt in einem sehr G/C-haltigen Bereich, in dem sich mehrere stark bindende Sekundärstrukturen bilden können. Die Etablierung PCR des SNPs am LC war unter Betrachtung aller Möglichkeiten nicht möglich. Die Ergebnisse des *Cyp24a1* Polymorphismus rs751089 werden in dieser Arbeit nicht dargestellt, da sie nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) waren.

### 3.9.3. Real-time-PCR zur Genotypisierung der SNPs mittels LightCycler®

Die Genotypisierung der SNPs erfolgte durch eine RT-PCR am LightCycler 480 mit anschließender Schmelzpunktanalyse. Der LightCycler (LC) ist ein Thermocycler mit Fluoreszenz-Detektion mittels spezieller Hybridisierungssonden, die der Quantifizierung einer bestimmten Zielsequenz dienen. Durch seine hohen Heiz-Kühlraten sind bis zu 30 Zyklen in 40 min möglich.

Bei den Sonden handelt es sich um Oligonukleotide, die jeweils mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert sind. Die sogenannte Sensorsonde ist am 3'-Ende mit Fluorescein (TIB MOLBIOL)/FITC (BioTez) gekoppelt und die Anchorsonde mit LC Red640 (TIB MOLBIOL)/Cy5 (BioTez) am 5'-Ende, wobei die freie Hydroxylgruppe am 3'-Ende mit Phosphat bzw. einer Aminogruppe blockiert wird, um eine Verlängerung des Stranges durch die Polymerase zu verhindern. Die Hybridisierungssonden binden benachbart an ihre komplementäre Zielsequenz innerhalb des PCR-Produktes (Abb. 6A). Die Sensorsonde wird auch als Donor-Fluorophor bezeichnet, da sie durch eine LED-Lichtquelle im Lightcycler angeregt wird und Energie auf die Anchorsonde (Akzeptor-Fluorophor) überträgt. Dieser Vorgang nennt sich „*Fluorescence Resonance Energy Transfer*“ (FRET). Der Akzeptor emittiert das Licht mit längerer Wellenlänge, welches durch den Lightcycler detektiert wird. Dabei ist das Signal proportional zur Menge der akkumulierten Amplikons. Die Sonden müssen sich dazu in unmittelbarer Nachbarschaft befinden. Nimmt der Abstand zwischen beiden zu, nimmt das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab (Abb. 6B).

Im Anschluss wird eine Schmelzkurve zur Mutationsanalyse ermittelt. Die Sensorsonde überdeckt die variable Sequenz, die genotypisiert werden soll. Die benachbarte Ankersonde ist deutlich bindungsstärker. In der Schmelzpunktanalyse wird jedoch nur die Sensorsonde erfasst. Die hybridisierten Produkte werden langsam, unter stetiger Messung der Fluoreszenz erhitzt. Jede Änderung der Zielsequenz unter der Sensorsonde durch einen Polymorphismus und der damit verbundenen Abnahme der Bindungsstärke führt zur Erniedrigung des Schmelzpunktes, d.h. wenn die Sensorsonde für die die Bindung an die Wildtypvariante hergestellt ist, ist die Schmelztemperatur hier höher, als wenn eine mutierte Probe vorliegt (Abb. 6C). Eine homozygote Probe ergibt einen definierten Schmelzpunkt und eine heterozygote zeigt zwei Maximalpunkte in der Schmelzkurve (Abb. 6D)<sup>84,85</sup>.

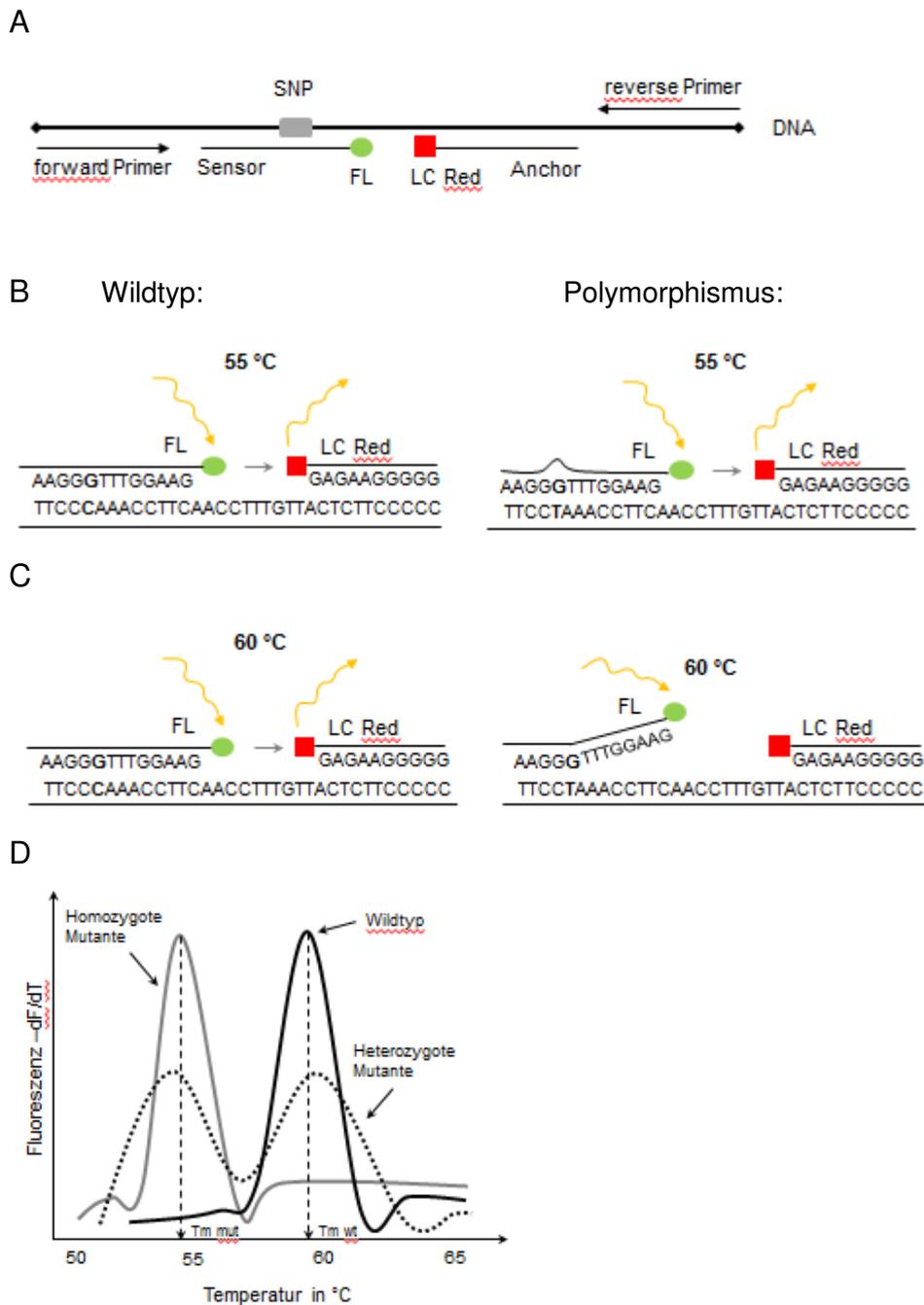


Abb. 6: Prinzip der RT-PCR am LightCycler zur Genotypisierung

A: Hybridisierung der Sonden: Die am 3'-Ende mit Fluoreszin-markierte Sensorsonde (Donor-Fluorophor) bindet im zu detektierenden DNA-Bereich. In räumlicher Nähe hybridisiert die Anchorsonde, die mit LC Red markiert ist (Akzeptor-Fluorophor).

B: Fluorescence Resonance Energy Transfer: Der Donor-Fluorophor wird durch einen Lichtimpuls zur Fluoreszenz angeregt und überträgt diese Energie auf den Akzeptor-Fluorophor. Dieser emittiert das Licht, welches vom LC detektiert wird. Dies geschieht bei niedrigen Temperaturen sowohl bei Wt-Variante (linke Abb.) als auch bei der Mutante (rechte Abb.).

C: Steigt die Temperatur löst sich die für die Wt-Sequenz spezifische Sonde sich zuerst bei Vorliegen der der Mutation (linke Abb.), während sie noch an die Wt-Sequenz bindet (rechte Abb.).

D: Aus der detektierten Fluoreszenz ergeben sich die spezifischen Schmelzkurven. Die Schmelztemperatur für den Wt ist höher als die der homozygoten Mutante. Für die heterozygote Variante ergibt sich eine zweigipflige Schmelzkurve.

Die DNA-Proben, zwei Negativkontrollen (Aqua dest.) und der PCR-Mix wurden auf eine Frame Star 480 (96 well-Lightcycler-Platte) aufgetragen. Die gewählten Primer, das jeweilige Protokoll für den PCR-Mix und das Programm für die RT-PCR am LC sind in der folgenden Tabelle 8 beschrieben. Das Detektionsformat „Mono Color Hybprobe“ wurde für LC-Läufe mit Sonden von Tib MOLBIOL gewählt und „Multi Color Hybprobe“ PCR-Gemische mit BioTeZ-Sonden, da die Sonden der beiden Firmen, wie bereits beschrieben, mit unterschiedlichen fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt sind.

Tab. 8: Bedingungen der PCR zur Genotypisierung

|                   | <b>Primer forward</b>   | <b>reverse</b>      | <b>Sensorsonden</b>   | <b>Ankersonde</b>     |
|-------------------|---|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>rs703842</b>   | rs703842 S (18 µM)  | rs703842 R (2 µM)   | rs703842 wt (4 µM)    | Anc rs703842 (4 µM)   |
| PCR-Mix           | 2 µl 10x Puffer, 1,5 nM MgCl <sub>2</sub> , 3 µl BSA, 2,5 nM dNTPs, 0,5 µl Polymerase, 6,3 µl H <sub>2</sub> O, 2 µl DNA            |                     |                       |                       |
| PCR-Programm      | 4 min 95 °C - 40 Zyklen (5 s 95 °C - 20 s 55 °C, 1,5 °C/s - 13 s 72 °C) 2 s 95 °C, 30 s 40 °C, 95 °C – 40 °C                        |                     |                       |                       |
| <b>rs10877012</b> | rs10877012 S (16 µM)  | rs10877012 R (4 µM) | rs10877012 mut (4 µM) | Anc rs10877012 (4 µM) |
| PCR-Mix           | 2 µl 10x Puffer, 1,5 nM MgCl <sub>2</sub> , 3 µl BSA, 2,5 nM dNTPs, 0,5 µl Polymerase, 6,3 µl H <sub>2</sub> O, 2 µl DNA            |                     |                       |                       |
| PCR-Programm      | 4 min 95 °C - 40 Zyklen (5 s 95 °C - 20 s 56 °C, 1,5 °C/s - 16 s 72 °C) 2 s 95 °C, 30 s 40 °C, 95 °C – 40 °C                        |                     |                       |                       |
| <b>rs3782130</b>  | rs3782130 S (2 µM)  | rs3782130 A (18 µM) | rs3782130 C (4 µM)    | Anc rs3782130 (4 µM)  |
| PCR-Mix           | 2 µl 10x Puffer, 1,5 nM MgCl <sub>2</sub> , 3 µl BSA, 2,5 nM dNTPs, 0,5 µl Polymerase, 5,3 µl H <sub>2</sub> O, 2 µl DNA, 1 µl DMSO |                     |                       |                       |
| PCR-Programm      | 4 min 95 °C - 50 Zyklen (5 s 95 °C - 20 s 58 °C, 1,5 °C/s - 24 s 72 °C) 2 s 95 °C, 30 s 40 °C, 95 °C – 40 °C                        |                     |                       |                       |
| <b>rs4646536</b>  | rs4646536 S (2 µM)  | rs4646536 R (18 µM) | rs4646536 C (4 µM)    | Anc rs4646536 (4 µM)  |
| PCR-Mix           | 2 µl 10x Puffer, 1,5 nM MgCl <sub>2</sub> , 3 µl BSA, 2,5 nM dNTPs, 0,5 µl Polymerase, 6,3 µl H <sub>2</sub> O, 2 µl DNA            |                     |                       |                       |
| PCR-Programm      | 4 min 95 °C - 40 Zyklen (5 s 95 °C - 20 s 56 °C, 1,5 °C/s - 15 s 72 °C) 2 s 95 °C, 30 s 40 °C, 95 °C – 40 °C                        |                     |                       |                       |
| <b>rs2248359</b>  | rs2248359 S (4 µM)  | rs2248359 R (16 µM) | rs2248359 mut (4 µM)  | Anc rs2248359 (4 µM)  |
| PCR-Mix           | 2 µl 10x Puffer, 1,5 nM MgCl <sub>2</sub> , 3 µl BSA, 2,5 nM dNTPs, 0,5 µl Polymerase, 6,3 µl H <sub>2</sub> O, 2 µl DNA            |                     |                       |                       |
| PCR-Programm      | 4 min 95 °C - 50 Zyklen (5 s 95 °C - 20 s 58 °C, 1,5 °C/s - 11 s 72 °C) 2 s 95 °C, 30 s 40 °C, 95 °C – 40 °C                        |                     |                       |                       |
| <b>rs2296241</b>  | rs2296241 S (10 µM)   | rs2296241 A (10 µM) | rs2296241 mut (4 µM)  | Anc rs2296241(4 µM)   |
| PCR-Mix           | 2 µl 10x Puffer, 1,5 nM MgCl <sub>2</sub> , 3 µl BSA, 2,5 nM dNTPs, 0,5 µl Polymerase, 5,3 µl H <sub>2</sub> O, 2 µl DNA, 1 µl DMSO |                     |                       |                       |
| PCR-Programm      | 4 min 95 °C - 50 Zyklen (5 s 95 °C - 20 s 54 °C, 1,5 °C/s - 11 s 72 °C) 2 s 95 °C, 30 s 40 °C, 95 °C – 40 °C                        |                     |                       |                       |
| <b>rs751089</b>   | rs751089 S (10 µM)  | rs751089 R (10 µM)  | rs751089 mut (4 µM)   | Anc rs751089 (4 µM)   |
| PCR-Mix           | 2 µl 10x Puffer, 1,5 nM MgCl <sub>2</sub> , 3 µl BSA, 2,5 nM dNTPs, 0,5 µl Polymerase, 6,3 µl H <sub>2</sub> O, 2 µl DNA            |                     |                       |                       |
| PCR-Programm      | 4 min 95 °C - 40 Zyklen (5 s 95 °C - 20 s 54 °C, 1,5 °C/s - 16 s 72 °C) 2 s 95 °C, 30 s 40 °C, 95 °C – 40 °C                        |                     |                       |                       |

Durch die Analyse der Schmelzkurve, wie zuvor beschrieben, wurde der Genotyp der Proben bestimmt. Die für die jeweiligen Allele gemessenen Schmelztemperaturen werden in Tabelle 9 aufgeführt.

Tab. 9: Schmelzpunkte der Sonden

| Gen            | SNP        | Major Allel | Minor Allel |
|----------------|------------|-------------|-------------|
| <i>Cyp27b1</i> | rs703842   | 54 °C       | 63 °C       |
|                | rs10877012 | 54 °C       | 59 °C       |
|                | rs3782130  | 51 °C       | 60 °C       |
|                | rs4646536  | 53 °C       | 63 °C       |
| <i>Cyp24a1</i> | rs2248359  | 52 °C       | 59 °C       |
|                | rs2296241  | 50 °C       | 57 °C       |

### 3.9.4. Serumgewinnung

Für die Bestimmung der Konzentration von 25-Hydroxyvitamin D und Osteocalcin wurde 98 Probanden mit atopischer Dermatitis und 45 Kontrollpersonen 10 ml Blut in einem Serumröhrchen ohne Zusatz abgenommen. Nach Ablauf der Gerinnungskaskade wurden die Röhrchen für 10 min bei 1300 g zentrifugiert. Der entstandene Überstand (Serum) wurde bei -20 °C bis zur Messung gelagert.

### 3.9.5. ELISA – Enzyme linked immuno sorbent assay

Der ELISA ist ein Antikörper-basiertes Verfahren zum Nachweis bestimmter Substanzen, hier 25(OH)D und Osteocalcin. Die Quantifizierung erfolgt anhand einer enzymatischen Farbreaktion. Es gibt verschiedene ELISA-Techniken.

Die Enzymimmunoassays für 25(OH)D und Osteocalcin entsprechen dem Prinzip eines kompetitiven ELISAs. Auf einer Trägerplatte befindet sich ein immobilisierter Antikörper (feste Phase), um den das im Serum enthaltene Substrat und ein enzymmarkiertes Antigen, das dem zu analysierendem Substrat strukturell ähnlich ist, konkurrieren, d.h. je höher die Substratkonzentration im Serum ist, desto schwächer fällt die Farbreaktion aus<sup>18</sup>.

Die Extinktion des Farbumschlages wird bei einer bestimmten Wellenlänge gemessen. Die Quantifizierung erfolgte anschließend mittels Berechnung, 4-Parameter, Standards und Kontrollen. Alle Kontrollen waren im Referenzbereich.

### 3.9.5.1. 25-Hydroxyvitamin D-Enzymimmunoassay

Die 25(OH)D-Serumkonzentration wurde mittels IDS 25-Hydroxy-Vitamin D EIA-Kit nach dem Herstellerprotokoll bestimmt. Das Volumen der Proben und der 25(OH)D-Biotinlösung wurde um 50 % reduziert. Diese Modifizierung erfolgte nach Protokoll der AG Worm.

### 3.9.5.2. Osteocalcin-Enzymimmunoassay

Osteocalcin wurde entsprechend des Herstellerprotokolles mit dem MicroVue Osteocalcin EIA quantitativ im Serum bestimmt.

### 3.9.6. Haplotypenanalyse mittels Haploview 4.2

Die Haplotypen- und Kopplungsanalyse erfolgte mit dem Programm Haploview 4.2. Grafisch wird das Ergebnis der Analyse als LD-Plot dargestellt (Abb. 7). Die Zahl in jedem Kästchen gibt den Korrelationskoeffizienten ( $r^2$ ) zwischen den einzelnen Paaren an. Die Farbe weist auf die Kopplungsstärke hin (min.  $r^2 = 0 =$  weiß, max.  $r^2 = 1.0 =$  schwarz) <sup>86</sup>. Auf einem Gen eng gekoppelte Allele stellen einen Haplotypen dar, die in konstanten Blöcken vererbt werden, da sie selten durch Rekombination getrennt werden <sup>87</sup>.

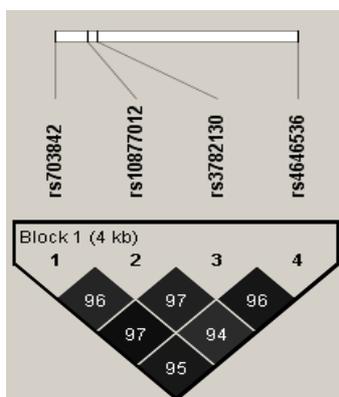


Abb. 7: LD-Muster der Kopplungsanalyse, am Beispiel *Cyp27b1*

Die Abbildung zeigt die Lage der untersuchten SNPs auf dem Gen. Die Zahlen in den Kästchen entsprechen dem Korrelationskoeffizienten ( $r^2$ ) des LDs zwischen den einzelnen Paaren. Die Farbintensität gibt die Kopplungsstärke wieder (min. = weiß, max. = schwarz). Die Polymorphismen sind eng gekoppelt ( $r^2 = 0.94$  bis  $0.97$ ). Die Kombination der Allele ist also nicht zufällig und weist ein hohes Kopplungsungleichgewicht zugunsten eines bestimmten Haplotypen auf.

### 3.9.7. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Hardy und Weinberg stellten fest, dass dominante Allele nicht auf Kosten rezessiver Allele zunehmen, sondern dass sich beide Merkmale in einer idealen Population im Gleichgewicht befinden und so homozygote und heterozygote Genotypen von Generation zu Generation konstant bleiben (Hardy-Weinberg-Gesetz). Eine ideale Population ist durch eine große Individuenzahl und Panmixie gekennzeichnet. Es findet keine Selektion, Mutation oder Migration statt. Das Gesetz formuliert die Beziehung zwischen den Allelhäufigkeiten:  $(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$ . Die Häufigkeit des dominanten Allels (A) wird mit p bezeichnet und die des rezessiven (a) mit q <sup>49</sup>.

### 3.9.8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen Excel (inklusive Add In XLSTAT) und Haploview 4.2. Der 2 x 2 Chi-Quadrat-Test und der 3 x 2 Cochran-Armitage-Trend-Test wurden für nominal skalierte Merkmale zweier Stichproben und der Pearson Korrelationskoeffizient für bivariate, metrisch skalierte Daten verwendet. Die Ergebnisse der Allelverteilung wurden statistisch mit dem 2 x 2 Chi-Quadrat-Test auf Signifikanz geprüft und die Genotypenverteilung mit dem 3 x 2 Cochran-Armitage-Trend-Test <sup>88</sup>. Zur Korrektur multiplen Testens wurde der Permutationstest eingesetzt und nicht die konservative Bonferroni Methode. Bonferroni eignet sich, wenn die Tests voneinander unabhängig sind <sup>89</sup>. Da die SNP jedoch eng gekoppelt vorliegen, trifft dies nicht zu. Die Haplotypen-, Kopplungs- und Einzel-SNP-Analyse, Permutationsanalyse ( $p_{\text{kor}}$ ; 100000 Permutationen) wie auch das HWE wurde mittels Haploview 4.2 berechnet.

Als nonparametrischer Test wurde für ordinal skalierte bzw. nicht-normalverteilte Daten zweier unabhängiger Stichproben der Whitney-Mann-U-Test, bei mehr als zwei Stichproben der Kruskal-Wallis-Test eingesetzt <sup>88</sup>. P-Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

## 4. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich Neurodermitiker in Genpolymorphismen des Vitamin D-Signalweges von einer gesunden Kontrollgruppe unterscheiden. Abbildung 8 gibt eine Übersicht über die vier hier analysierten *Cyp27b1*-Genpolymorphismen und die vier geplanten *Cyp24a1*-Genpolymorphismen.

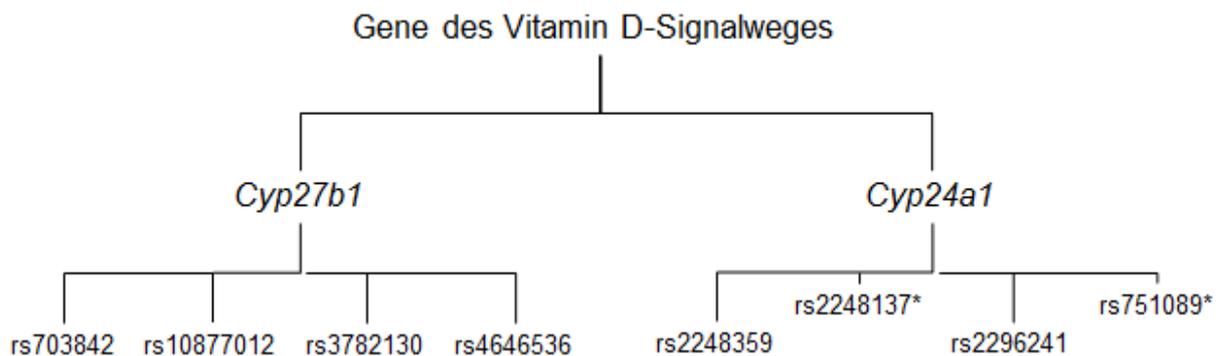


Abb. 8: Darstellung der untersuchten Polymorphismen

Es wurden vier Polymorphismen auf dem Gen *Cyp27b1* untersucht und zwei auf dem *Cyp24a1*-Gen. \*Die PCR zu rs2248137 konnte nicht etabliert werden. Rs751089 entsprach in seiner Allelverteilung nicht dem HWE.

### 4.1. Darstellung von Fall- und Kontrollkollektiv

Es wurden insgesamt Proben von 278 Kontrollen und 281 Neurodermitikern gewonnen. Die Anzahl sowie Alters- und Geschlechtsverteilung der Proben wird in Tabelle 10 dargestellt. Das Fallkollektiv wurde nach leichter/mittelschwerer und schwerer Ausprägung der AD aufgeschlüsselt. Die Altersverteilung des Kontrollkollektives entsprach im Wesentlichen der Fallkohorte. Die Geschlechtsverteilung wurde mittels Chi-Quadrat-Test statistisch auf einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gesamtheit der Fallgruppe untersucht. Beide Gruppen wichen in ihrer Verteilung nicht signifikant voneinander ab ( $p > 0,05$ ).

Tab. 10: Population der AD-Patienten und gesunden Kontrollen

|                            | Kontrollen | Patienten mit atopischer Dermatitis |                                |                         |
|----------------------------|------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------|
|                            |            | alle                                | leicht/mittel<br>(SCORAD 9-40) | schwer<br>(SCORAD > 40) |
|                            | n=278      | n=281                               | n=126                          | n=155                   |
| <b>männlich</b> (%)        | 98 (35,3)  | 121 (43,1)                          | 45 (35,7)                      | 76 (49,0)               |
| <b>weiblich</b> (%)        | 180 (64,7) | 160 (56,9)                          | 81 (64,3)                      | 79 (51,0)               |
| <b>Alter</b> (Median, IQR) | 35 (31-41) | 37 (27-48)                          | 33 (26-43)                     | 41 (29-53)              |
| <b>SCORAD</b> (MW, SD)     |            | 46,8 (± 18,4)                       | 27,6 (± 8,1)                   | 58,8 (± 11,5)           |

IQR=Interquartilabstand; MW=Mittelwert mit Standardabweichung (SD); n=Anzahl

#### 4.2. Evolutionäre Konservierung des *Cyp27b1*-Genes

Im Rahmen dieser Arbeit wurde initial die evolutionäre Konservierung des *Cyp27b1*-Gens zwischen Mensch und Maus untersucht. Die menschliche *Cyp27b1*-Gensequenz und die der Maus im Bereich von 5´-5000 Basenpaare (bp) aufwärts und 3´-1000 Basenpaare abwärts des jeweiligen Gentranskriptionsstarts wurde durch den Genome Browser von UCSC Genome Bioinformatics ermittelt <sup>90</sup>.

Die konservierten Regionen enthalten überproportional häufig funktionell relevante Transkriptionsfaktorbindungsstellen <sup>91</sup>. Die analysierte Gensequenz enthielt die hier untersuchten Polymorphismen. Die Analyse erfolgte mittels rVISTA <sup>92</sup>. Vista basiert auf Datenbanken zur vergleichenden Analyse von Genomsequenzen unterschiedlicher Spezies. Das Ergebnis der Analyse ist für *Cyp27b1* in Abb. 9 dargestellt.

Der analysierte Bereich des Genes *Cyp27b1*, in dem sich die vier untersuchten Polymorphismen befinden, weist einen hohen konservierten Anteil zwischen Mensch und Maus auf, d.h. die Gensequenz ist abgesehen von geringen Veränderungen im Laufe der Evolution erhalten geblieben. Dies deutet auf eine funktionelle Relevanz hin. Die untersuchten Polymorphismen rs703842, rs10877012 und rs3782130 liegen in der Promoterregion des Genes und sind evolutionär nicht konserviert. Hingegen liegt rs4646536 in einem Bereich, der evolutionär erhalten geblieben ist.

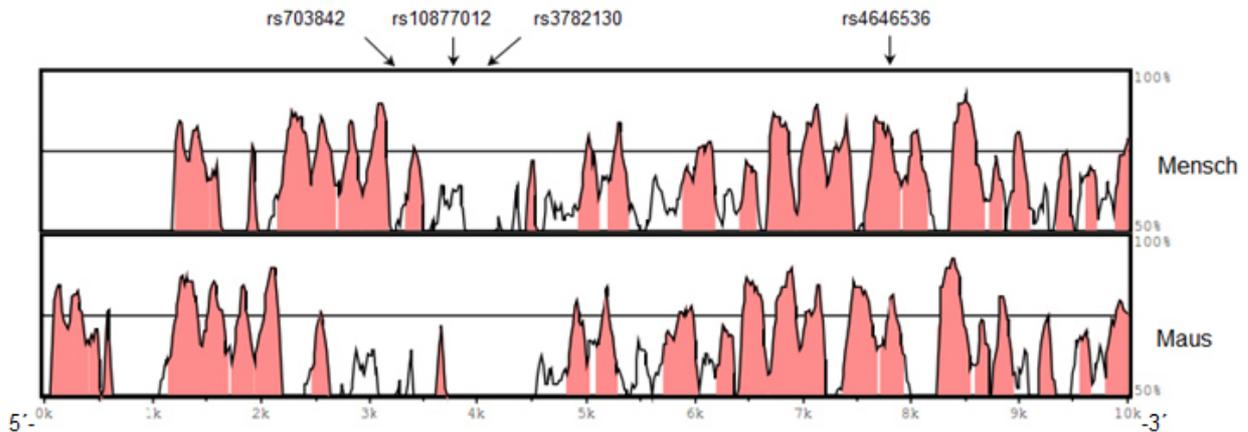


Abb. 9: Evolutionäre Konservierung der *Cyp27b1*-Gensequenz

Die menschliche *Cyp27b1*-Gensequenz (5'-5000 bp upstream und 3'-1000 bp downstream) des Menschen im Vergleich mit der der Maus. Die Pfeile markieren die Lage der Polymorphismen rs703842 (3211 bp), rs10877012 (3865 bp), rs3782130 (4052 bp) und rs4646536 (7962 bp). Homologien zwischen Mensch und Maus von über 75 % sind zusätzlich an der roten Färbung zu erkennen. Daraus wird erkenntlich, dass ein Großteil dieses Genabschnittes evolutionär konserviert ist. Die Abbildungen zeigen die Gensequenz von Mensch im Vergleich mit der Maus, in der sich die untersuchten Polymorphismen befinden, in 5'-3'-Richtung.

#### 4.3. Identische Verteilung der *Cyp27b1*-SNPs bei Fall- und Kontrollgruppe

Es wurden insgesamt 278 Proben gesunder Personen und 281 von Neurodermitikern mittels quantitativer PCR genotypisiert. Trotz mehrfacher PCR-Durchläufe war der Genotyp einiger Proben für einzelne SNPs nicht zu ermitteln. Für die hier untersuchten *Cyp27b1*-Polymorphismen konnten 277 Kontrollen und 279 Proben von Patienten mit AD bestimmt werden. Anschließend wurde Verteilung von Major Allel und Minor Allel sowie der Genotypen homozygote Wildtypen (wt), heterozygote (het) und homozygote Mutanten (mut) zwischen Kontrollgruppe und AD-Patienten gleich welchem Schweregrad bzw. ausschließlich denen mit milder und schwerer Ausprägung der Erkrankung analysiert (Tab. 11 und Tab. 12). Alle Allelfrequenzen der SNPs befinden sich im Hardy-Weinberg-Equilibrium ( $p + q = 1$  und  $p^2 + 2 \times pq + q^2 = 1$ , dabei  $p = \text{Wt-Allel}$  und  $q = \text{Mut-Allel}$ ).

Die Verteilung der Genotypen ist bei allen vier *Cyp27b1*-Polymorphismen zwischen AD-Patienten und gesunden Kontrollen nahezu identisch (Tab. 11).

Tab. 11: Genotypenverteilung der *Cyp27b1*-Polymorphismen

|                   | <b>n</b> | <b>Wt,</b> | <b>n (%)</b> | <b>Het</b> | <b>n (%)</b> | <b>Mut</b> | <b>n (%)</b> | <b>HWE</b> | <b>p*</b> |
|-------------------|----------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|-----------|
| <b>rs703842</b>   |          | CC         |              | CT         |              | TT         |              |            |           |
| Kontrollen        | 277      | 125        | (45,1)       | 119        | (43,0)       | 33         | (11,9)       | 0,85       |           |
| AD gesamt         | 279      | 127        | (45,5)       | 122        | (43,7)       | 30         | (10,8)       | 1,00       | 0,840     |
| mittlere AD       | 125      | 60         | (48,0)       | 49         | (39,2)       | 16         | (12,8)       | 0,50       | 0,814     |
| schwere AD        | 154      | 67         | (43,5)       | 73         | (47,4)       | 14         | (9,1)        | 0,65       | 0,873     |
| <b>rs10877012</b> |          | CC         |              | CA         |              | AA         |              |            |           |
| Kontrollen        | 277      | 139        | (50,2)       | 108        | (39,0)       | 30         | (10,8)       | 0,44       |           |
| AD gesamt         | 279      | 132        | (47,3)       | 118        | (42,3)       | 29         | (10,4)       | 0,94       | 0,728     |
| mittlere AD       | 125      | 62         | (49,6)       | 47         | (37,6)       | 16         | (12,8)       | 0,35       | 0,670     |
| schwere AD        | 154      | 70         | (45,5)       | 71         | (46,1)       | 13         | (8,4)        | 0,70       | 0,700     |
| <b>rs3782130</b>  |          | CC         |              | CG         |              | GG         |              |            |           |
| Kontrollen        | 277      | 125        | (45,1)       | 119        | (43,0)       | 33         | (11,9)       | 0,85       |           |
| AD gesamt         | 279      | 127        | (45,5)       | 122        | (43,7)       | 30         | (10,8)       | 1,00       | 0,840     |
| Mittlere AD       | 125      | 60         | (48,0)       | 49         | (39,2)       | 16         | (12,8)       | 0,50       | 0,814     |
| schwere AD        | 154      | 67         | (43,5)       | 73         | (47,4)       | 14         | (9,1)        | 0,65       | 0,873     |
| <b>rs4646536</b>  |          | TT         |              | CT         |              | CC         |              |            |           |
| Kontrollen        | 277      | 123        | (44,4)       | 126        | (45,5)       | 28         | (10,1)       | 0,88       |           |
| AD gesamt         | 279      | 128        | (45,9)       | 121        | (43,4)       | 30         | (10,8)       | 0,98       | 0,908     |
| mittlere AD       | 125      | 60         | (48,0)       | 49         | (39,2)       | 16         | (12,8)       | 0,50       | 0,929     |
| schwere AD        | 154      | 68         | (44,2)       | 72         | (46,8)       | 14         | (9,1)        | 0,71       | 0,954     |

\*p-Wert = 3 x 2 Cochran-Armitage-Trend-Test; Wt=Wildtyp, Het=heterozygot, Mut=Mutante

Die Allel-Verteilung aller untersuchten *Cyp27b1*-Polymorphismen zeigt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen gesunden Kontrollen und AD-Patienten gleich welchem Schweregrad der Erkrankung. Es kann daraus geschlossen werden, dass die *Cyp27b1*-Polymorphismen nicht mit dem Auftreten der AD assoziiert sind (Tab. 12).

Tab. 12: Verteilung der Allele der *Cyp27b1*-Polymorphismen

|                   | n   | Major Allel<br>n, (%) | Minor Allel<br>n, (%) | p*    | OR (95% KI)      | p <sub>korr</sub> ** |
|-------------------|-----|-----------------------|-----------------------|-------|------------------|----------------------|
| <b>rs703842</b>   |     | C                     | T                     |       |                  |                      |
| Kontrollen        | 277 | 369 (66,6)            | 185 (33,4)            |       |                  |                      |
| AD gesamt         | 279 | 376 (67,4)            | 182 (32,6)            | 0,783 | 1,04 (0,81-1,33) | 1                    |
| mittlere AD       | 125 | 169 (67,6)            | 81 (32,4)             | 0,782 | 1,05 (0,76-1,44) |                      |
| schwere AD        | 154 | 207 (67,2)            | 101 (32,8)            | 0,857 | 1,03 (0,76-1,38) | 1                    |
| <b>rs10877012</b> |     | C                     | A                     |       |                  |                      |
| Kontrollen        | 277 | 386 (69,7)            | 168 (30,3)            |       |                  |                      |
| AD gesamt         | 279 | 382 (68,5)            | 176 (31,5)            | 0,661 | 0,94 (0,73-1,22) | 1                    |
| mittlere AD       | 125 | 171 (68,4)            | 79 (31,6)             | 0,717 | 0,94 (0,68-1,30) |                      |
| schwere AD        | 154 | 211 (68,5)            | 97 (31,5)             | 0,722 | 0,95 (0,71-1,28) | 1                    |
| <b>rs3782130</b>  |     | C                     | G                     |       |                  |                      |
| Kontrollen        | 277 | 369 (66,6)            | 185 (33,4)            |       |                  |                      |
| AD gesamt         | 279 | 376 (67,4)            | 182 (32,6)            | 0,783 | 1,04 (0,81-1,33) | 1                    |
| mittlere AD       | 125 | 169 (67,6)            | 81 (32,4)             | 0,782 | 1,05 (0,76-1,44) |                      |
| schwere AD        | 154 | 207 (67,2)            | 101 (32,8)            | 0,857 | 1,03 (0,76-1,38) | 1                    |
| <b>rs4646536</b>  |     | T                     | C                     |       |                  |                      |
| Kontrollen        | 277 | 372 (67,1)            | 182 (32,9)            |       |                  |                      |
| AD gesamt         | 279 | 377 (67,6)            | 181 (32,4)            | 0,883 | 1,01 (0,79-1,31) | 1                    |
| mittlere AD       | 125 | 169 (67,6)            | 81 (32,4)             | 0,899 | 1,02 (0,74-1,40) |                      |
| schwere AD        | 154 | 208 (67,5)            | 100 (32,5)            | 0,908 | 1,02 (0,76-1,37) | 1                    |

\*p-Wert = Chi-Quadrat-Test; \*\*p<sub>korr</sub> = Permutationstest; OR (95% KI) = Odds Ratio mit 95% Konfidenzintervall

#### 4.4. Starke Kopplung der *Cyp27b1*-Polymorphismen

Die Haplotypenanalyse erfolgte mittels Haploview für vier *Cyp27b1*-SNPs. Es sollte untersucht werden, ob die Polymorphismen miteinander gekoppelt sind (siehe auch 3.9.6).

Die Kopplungsanalyse zeigte LD-Werte von 94 bis 97, d.h. dass alle vier *Cyp27b1*-SNPs stark miteinander korrespondieren ( $r^2 = 0,94-0,97$ ; max. 1 = stark gekoppelt) sind.

Die Allele werden demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit in einer bestimmten Kombination vererbt (Abb. 10).

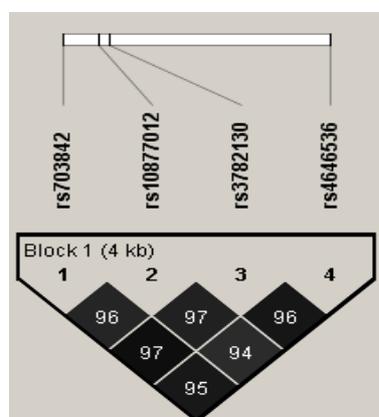


Abb. 10: LD-Muster des *Cyp27b1*-Genes

Die Abbildung zeigt die Lage der vier SNPs auf dem Gen *Cyp27b1*. Die Zahlen in den Kästchen entsprechen dem Korrelationskoeffizienten  $r^2$  des LDs zwischen den einzelnen Paaren. Die Farbintensität gibt ebenfalls die Kopplungsstärke wieder (min. = weiß, max. = schwarz). Die Polymorphismen befinden sich in engem Kopplungsungleichgewicht (schwarz).

Neben der Kopplungsanalyse wurde verglichen, ob die beobachteten Haplotypen bei gesunden Kontrollen und Neurodermitikern und AD-Patienten mit schwerer Ausprägung mit der gleichen Häufigkeit auftreten (Tab.13). Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse auf Signifikanz wurde der Chi-Quadrat-Test verwandt und zur Korrektur der Permutationstest.

Hierbei haben sich vier Haplotypen für die untersuchten Polymorphismen ergeben. Dies bedeutet, dass die Allele der vier SNPs mit hoher Wahrscheinlichkeit in einer dieser Kombinationen vererbt werden. Durch die Kopplung der Allele besteht die Möglichkeit, dass bestimmte Haplotypen häufiger in einer Population vorkommen. Dabei ist der Haplotyp CCCT vorherrschend bei beiden Gruppen. In kleinerem Anteil der Population (3,4 % zu 0,9 %) ist die Kombination TCGC nachzuweisen, wobei diese im Vergleich beider Gruppen bei den Kontrollen überrepräsentiert ist ( $p < 0,05$ ). Damit stellt Haplotyp TCGC in dieser Subpopulation tendenziell einen protektiven Faktor dar.

Tab. 13: *Cyp27b1*-Haplotypenanalyse bei AD-Patienten und Gesunden

| rs703842 | rs10877012 | rs3782130 | rs4646536 | Kontrollen, % |                  |              |              | schwere AD, % |              |              |
|----------|------------|-----------|-----------|---------------|------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
|          |            |           |           | (n=277)       | AD, %<br>(n=279) | p*           | pkorr        | (n=154)       | p*           | pkorr        |
| C        | C          | C         | T         | 63,7          | 67,2             | 0,222        | 0,567        | 66,9          | 0,438        | 0,965        |
| T        | A          | G         | C         | 27,1          | 31,3             | 0,116        | 0,465        | 31,1          | 0,201        | 0,546        |
| T        | C          | G         | C         | 3,4           | 0,9              | <b>0,004</b> | <b>0,009</b> | 1,0           | <b>0,029</b> | <b>0,098</b> |
| T        | A          | G         | T         | 1,6           |                  |              |              | 0,3           | 0,087        | 0,380        |

\*p-Wert = Chi-Quadrat-Test;  $p_{\text{korr}}$  = Permutationstest

#### 4.5. Evolutionäre Konservierung des *Cyp24a1*-Genes

Erneut wurde initial evolutionäre Konservierung des *Cyp24a1*-Gens zwischen Mensch und Maus untersucht. Auch hier enthielten die untersuchten Regionen die beiden Polymorphismen. Die Analyse erfolgte wie bereits für *Cyp27b1* beschrieben. Das Ergebnis der Analyse ist für *Cyp24a1* in Abb. 11 dargestellt.

Der analysierte Bereich des *Cyp24a1*-Gens, in dem sich die beiden untersuchten Polymorphismen befinden, ist insgesamt gering zwischen Mensch und Maus konserviert. Allerdings ist die unmittelbare Sequenz vor dem Transkriptionsstart (5 kB in Abb. 11) stark konserviert. Ebenso liegen beide Polymorphismen in evolutionär konservierten Bereichen des *Cyp24a1* Gens, d.h. die Gensequenz hat sich während Evolution nur geringfügig verändert. Dies lässt darauf schließen, dass auch diese Region eine wichtige funktionelle Bedeutung besitzt.

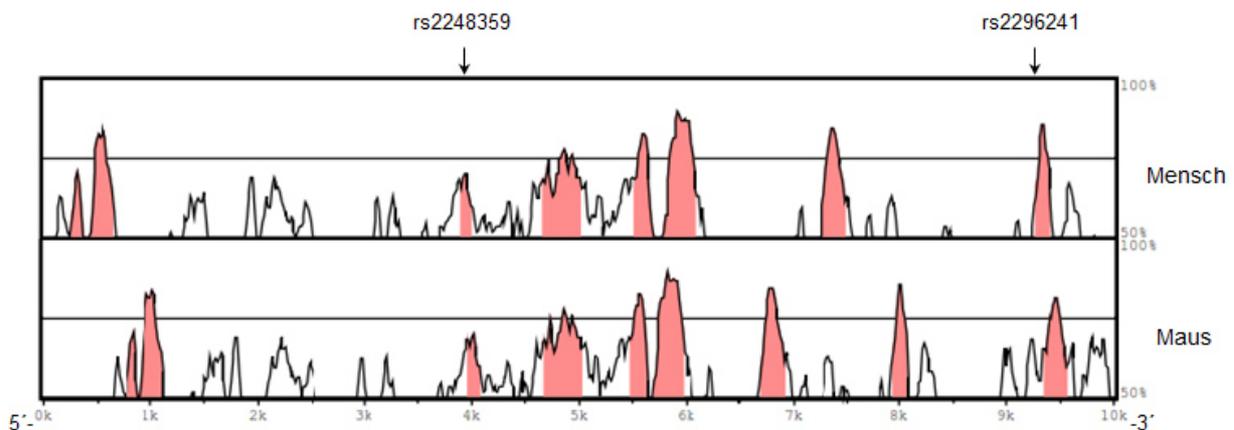


Abb. 11: Evolutionäre Konservierung der *Cyp24a1*-Gensequenz

Die menschliche *Cyp24a1*-Gensequenz (5'-5000 bp upstream und 3'-1000 bp downstream) des Menschen im Vergleich mit der der Maus. Die Pfeile markieren die Lage der Polymorphismen rs2248359 (3972 bp) und rs2296241 (9271 bp). Homologien zwischen Mensch und Maus von über 75 % sind zusätzlich an der roten Färbung zu erkennen. Daraus wird erkenntlich, dass ein Großteil dieses Genabschnittes evolutionär konserviert ist.

#### 4.6. Assoziation eines *Cyp24a1*-Polymorphismus mit der atopischen Dermatitis

Es wurden 278 Proben gesunder Personen und 281 von Neurodermitikern mittels quantitativer PCR genotypisiert. Trotz mehrfacher PCR-Durchläufe war der Genotyp

einiger Proben für einzelne SNPs nicht zu ermitteln. Für die *Cyp24a1*-Genpolymorphismen rs2248359 und rs2296241 wurden alle 278 Kontrollproben genotypisiert und 269 Proben von Neurodermitikern. Anschließend wurde Verteilung von Major Allel und Minor Allel sowie der Genotypen homozygote Wildtypen, heterozygote und homozygote Mutanten zwischen Kontrollgruppe und AD-Patienten gleich welchem Schweregrad bzw. ausschließlich denen mit milder und schwerer Ausprägung der Erkrankung analysiert (Tab. 14 und Tab. 15). Alle Allelfrequenzen der SNPs befinden sich im Hardy-Weinberg-Equilibrium ( $p + q = 1$  und  $p^2 + 2 \times pq + q^2 = 1$ , dabei  $p = \text{Wt-Allel}$  und  $q = \text{Mut-Allel}$ ).

Der SNP rs2248359 unterscheidet sich, wie in den Tabellen 14 und 15 ersichtlich, signifikant in der Genotypen- und Allelverteilung zwischen Kontrollgruppe und AD-Patienten mit schwerer Ausprägung ( $p < 0,05$ ). Bei Neurodermitikern mit schwerer AD ist das C-Allel im Vergleich zur Kontrollgruppe (75,9 % zu 67,5 %, OR 1,5 mit 95 % KI 1,09-2,07) signifikant häufiger vertreten. Es stellt somit einen möglichen prädisponierenden Faktor für die Erkrankung dar. Der p-Wert des Permutationstests liegt mit 0,051 über der Grenze für Signifikanz.

In Studien wird das rs2248359 C-Allel als Risikoallel für Asthma beschrieben<sup>64,65</sup>. AD und AA zählen zum Formenkreis der Atopien und treten somit gehäuft zusammen auf. Um Asthma als möglichen Störfaktor auszuschließen, wurden zusätzlich eine Gruppe AD-Patienten mit schwerer Ausprägung (AD ohne AA), die laut Eigenanamnese nicht an Asthma leiden, mit gesunden Kontrollen verglichen. Hier wurde der Unterschied in der Allelverteilung noch deutlicher (83,8 % zu 67,5 %, OR 2,47 mit 95 % KI 1,33-4,59). Auch nach Korrektur mittels Permutationstest sind der p-Wert 0,016 und das Ergebnis knapp signifikant. Bei Patienten mit milder AD im Vergleich zur Kontrollgruppe tritt das Major Allel hingegen minimal seltener auf (66,8 % zu 67,6 %).

Für rs2296241 ist die Allel- und Genotypenverteilung nahezu identisch bei Kontrollgruppe und der Gesamtheit der Neurodermitiker ( $p = 0,43$ ). Auch im Vergleich mit dem Schweregrad zeigt sich kein Trend. Somit ist keine Assoziation mit AD erkennbar (Tab. 14 und 15).

Tab. 14: Verteilung der Genotypen der *Cyp24a1*-Polymorphismen

|                  | n   | Wt, n (%)  | Het n (%)  | Mut n (%) | HWE  | p*           |
|------------------|-----|------------|------------|-----------|------|--------------|
| <b>rs2248359</b> |     | CC         | CT         | TT        |      |              |
| Kontrollen       | 278 | 132 (47,5) | 112 (40,3) | 34 (12,2) | 0,41 |              |
| AD gesamt        | 269 | 133 (49,4) | 120 (44,6) | 16 (5,9)  | 0,26 | 0,121        |
| mittlere AD      | 122 | 51 (41,8)  | 61 (50,0)  | 10 (8,2)  | 0,37 | 0,796        |
| schwere AD       | 147 | 82 (55,8)  | 59 (40,1)  | 6 (4,1)   | 0,51 | <b>0,009</b> |
| AD ohne AA       | 40  | 28 (70,0)  | 11 (27,5)  | 1 (2,5)   | 1,00 | <b>0,003</b> |
| <b>rs2296241</b> |     | GG         | AG         | AA        |      |              |
| Kontrollen       | 278 | 78 (28,1)  | 123 (44,2) | 77 (27,7) | 0,16 |              |
| AD gesamt        | 269 | 58 (21,6)  | 141 (52,4) | 70 (26,0) | 0,71 | 0,394        |
| mittlere AD      | 122 | 23 (18,9)  | 64 (52,5)  | 35 (28,7) | 0,81 | 0,221        |
| schwere AD       | 147 | 35 (23,8)  | 77 (52,4)  | 35 (23,8) | 0,85 | 0,915        |

\*p-Wert = 3 x 2 Cochran-Armitage-Trend-Test; Wt=Wildtyp, Het=heterozygot, Mut=Mutante

Tab. 15: Verteilung der Allele der *Cyp24a1*-Polymorphismen

|                  | n   | Major Allel n, (%) | Minor Allel n, (%) | p*           | OR (95% KI)      | p <sub>korr</sub> ** |
|------------------|-----|--------------------|--------------------|--------------|------------------|----------------------|
| <b>rs2248359</b> |     | C                  | T                  |              |                  |                      |
| Kontrollen       | 278 | 376 (67,6)         | 180 (32,4)         |              |                  |                      |
| AD gesamt        | 269 | 386 (71,7)         | 152 (28,3)         | 0,138        | 1,22 (0,94-1,57) | 0,400                |
| Mittlere AD      | 122 | 163 (66,8)         | 81 (33,2)          | 0,819        | 0,96 (0,70-1,33) |                      |
| schwere AD       | 147 | 223 (75,9)         | 71 (24,1)          | <b>0,012</b> | 1,50 (1,09-2,07) | <b>0,051</b>         |
| AD ohne AA       | 40  | 67 (83,8)          | 13 (16,3)          | <b>0,003</b> | 2,47 (1,33-4,59) | <b>0,016</b>         |
| <b>rs2296241</b> |     | G                  | A                  |              |                  |                      |
| Kontrollen       | 278 | 277 (49,8)         | 279 (50,2)         |              |                  |                      |
| ∑ AD             | 269 | 281 (52,2)         | 257 (47,8)         | 0,425        | 1,10 (0,87-1,40) | 0,830                |
| milde AD         | 122 | 134 (54,9)         | 110 (45,1)         | 0,184        | 1,23 (0,91-1,66) |                      |
| schwere AD       | 147 | 147 (50,0)         | 147 (50,0)         | 0,960        | 1,01 (0,76-1,34) | 1                    |

\*p-Wert = Chi-Quadrat-Test; \*\*p<sub>korr</sub> = Permutationstest; OR (95% KI) = Odds Ratio mit 95% Konfidenzintervall

#### 4.7. Kopplung der *Cyp24a1*-Polymorphismen

Um zu überprüfen, ob die beiden *Cyp24a1*-Polymorphismen genetisch miteinander gekoppelt sind, erfolgte die Haplotypenanalyse mittels Haploview (siehe auch 3.9.6). Die Kopplungsanalyse ergab einen LD-Werte von 70, d.h. dass die beiden *Cyp24a1*-SNPs miteinander korrespondieren ( $r^2 = 0,70$ ; max. 1 = stark gekoppelt und 0 = nicht gekoppelt) sind. Die Allele werden demnach mit höherer Wahrscheinlichkeit in einer bestimmten Kombination vererbt, als dass sie unabhängig voneinander weitergegeben werden (Abb. 12). Im Vergleich von Abbildung 12 zu Abbildung 10 wird deutlich, dass die beiden Polymorphismen auf dem Gen *Cyp24a1* weniger stark gekoppelt sind als die *Cyp27b1*-SNPs ( $r^2 = 0,70$  zu  $r^2 = 0,94-0,97$ ).

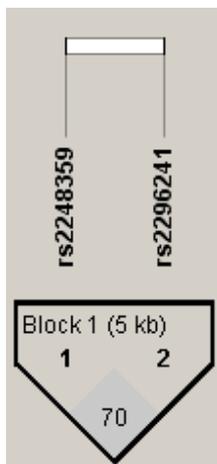


Abb. 12: LD-Muster des *Cyp24a1*-Genes

In der Abbildung sind die beiden SNPs auf dem Gen *Cyp24a1* dargestellt. Die Zahl 70 im Kästchen entspricht dem Korrelationskoeffizienten ( $r^2 = 0,70$ ) des LDs zwischen den SNPs. Die Kopplungsstärke lässt sich auch an der Farbe erkennen, hier grau (min. 0 = weiß, max. 1 = schwarz). Die Polymorphismen zeigen wenn auch weniger stark (grau) dieses Merkmal.

Tabelle 16 ist zu entnehmen, dass die Allele der beiden Polymorphismen bei beiden Gruppen in allen vier möglichen Kombinationen vorliegen. Dabei ist CG sowohl bei Kontrollen als auch bei AD-Patienten die dominierende Variante. TG hingegen war am wenigsten vertreten (46,4 % bzw. 42,8 % zu 3,8 % bzw. 5,0 %). Die Allelkombinationen TA und CA unterscheiden sich jedoch signifikant in der Verteilung. CA ist mit schwerer AD assoziiert ( $p = 0,003$  und  $p_{\text{korr}} = 0,015$ ), wohingegen TA häufiger in der Kontrollkohorte vertreten ist ( $p = 0,005$  und  $p_{\text{korr}} = 0,021$ ).

Tab. 16: *Cyp24a1*-Haplotypenanalyse bei AD-Patienten und Gesunden

| rs2248359 | rs2296241 | Kontrollen, %<br>(n=278) | AD, %   |              | schwere AD, % |         |              |              |
|-----------|-----------|--------------------------|---------|--------------|---------------|---------|--------------|--------------|
|           |           |                          | (n=269) | p*           | pkorr         | (n=147) | p*           | pkorr        |
| C         | G         | 46,4                     | 42,8    | 0,229        | 0,576         | 45,7    | 0,822        | 0,995        |
| T         | A         | 28,6                     | 23,3    | <b>0,044</b> | 0,143         | 19,9    | <b>0,005</b> | <b>0,021</b> |
| C         | A         | 21,2                     | 29,0    | <b>0,003</b> | <b>0,012</b>  | 30,1    | <b>0,003</b> | <b>0,015</b> |
| T         | G         | 3,8                      | 5,0     | 0,328        | 0,725         | 4,3     | 0,649        | 0,964        |

\*p-Wert Chi-Quadrat-Test; p<sub>korr</sub> = Permutationstest

#### 4.8. Identische Serumparameter bei Fall- und Kontrollgruppe

Im Serum wurden von 143 Proben, davon 98 von AD-Patienten und 45 von Kontrollpersonen, 25(OH)D- und Osteocalcinkonzentrationen mittels ELISA, wie in 3.9.5 beschrieben, bestimmt. Alle Serumproben wurden im Winter entnommen, wobei zu beachten ist, dass die Konzentration von 25(OH)D hauptsächlich durch UV-Exposition beeinflusst wird. Zur Winterzeit reicht die UV-Strahlung in unseren Breitengraden nicht zur genügenden 25(OH)D-Synthese aus<sup>93</sup>, somit hat das Verhalten der Probanden sich im Freien aufzuhalten weniger Einfluss auf die 25(OH)D-Serumkonzentrationen. Die 25(OH)D- und Osteocalcinerumkonzentrationen waren nicht normalverteilt und wurden daher mittels Whitney-Mann-U-Test auf Signifikanz überprüft. Sowohl für 25(OH)D als Osteocalcin ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ) zwischen Fall- und Kontrollgruppe (Abb. 13 und Abb. 14).

Sowohl der Mittelwert als auch der Median ist bei den AD-Patienten minimal höher (38,05 nmol/l und 35,0 nmol/l) als bei den Kontrollen (36,42 nmol/l und 34,77 nmol/l). Werte im Bereich unter 50 nmol/l, d.h. es besteht ein Vitamin D-Defizit, wurden bei 75,5 % der Neurodermitiker und 84,4 % der gesunden Kontrollen beobachtet. Bei den AD-Patienten fanden sich in 5,1 % der Fälle Serumkonzentrationen, die oberhalb der Suffizienzgrenze von 75 nmol/l lagen. Lediglich eine gesunde Kontrolle wies einen suffizienten Wert auf. Maximal- und Minimalwerte von Fall- und Kontrollgruppe variieren nicht stark (94,1 nmol/l zu 96,66 nmol/l und 8,91 nmol/l zu 6,63 nmol/l), wobei die Maximalwerte eher Ausreißer darstellen. Die 25(OH)D-Serumkonzentrationen der AD-Patienten streuen stärker als die der Kontrollgruppe (Abb. 13).

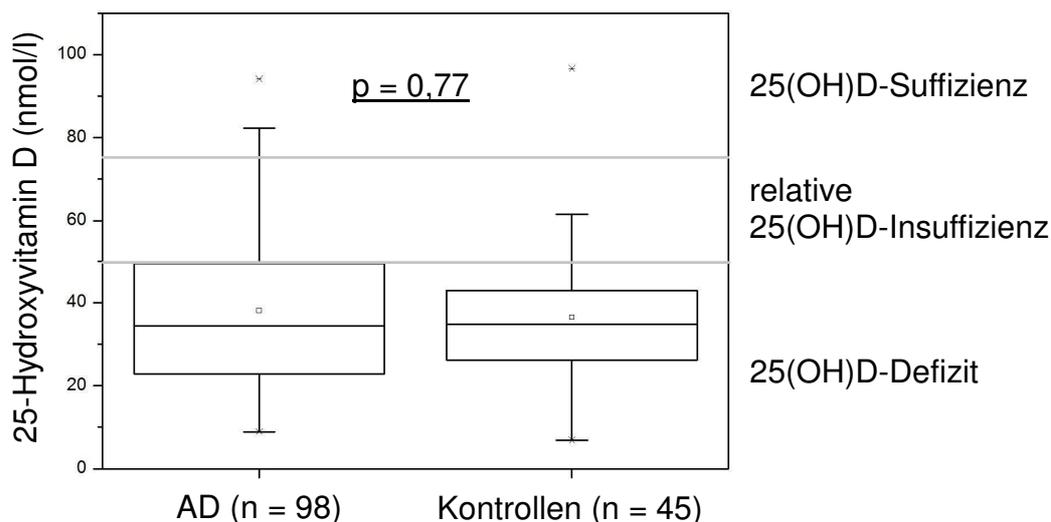


Abb. 13: Vergleich der 25(OH)D-Konzentrationen von AD-Patienten und Kontrollen

Die Serumproben wurden in den UV-armen Wintermonaten entnommen. Die grauen Linien grenzen den Bereich zwischen 50 nmol/l und 75 nmol/l ein. Es gibt keinen Konsensus zur Definition von Vitamin D-Suffizienz. Häufig werden Serumkonzentrationen über 75 nmol/l als 25(OH)D-Suffizienz, Konzentrationen im Bereich von 50 nmol/l - 75 nmol/l als relative 25(OH)D-Insuffizienz und Werte unter 50 nmol/l als 25(OH)D-Defizit bezeichnet<sup>15</sup>. Die Signifikanz wurde mittel Whitney-Mann-U-Test ermittelt.

Auch bezüglich der Osteocalcinserkonzentrationen im Vergleich zwischen AD-Patienten und gesunden Kontrollen besteht kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,14$ ). Sowohl der Mittelwert als auch der Median ist bei den AD-Patienten minimal kleiner (4,73 ng/ml zu 5,27 ng/ml; 4,44 ng/ml zu 4,83 ng/ml). Maximal- und Minimalwerte von Fall- und Kontrollgruppe variieren kaum (8,21 ng/ml zu 9,8 ng/ml; 2,23 ng/ml zu 2,09 ng/ml) (Abb. 14).

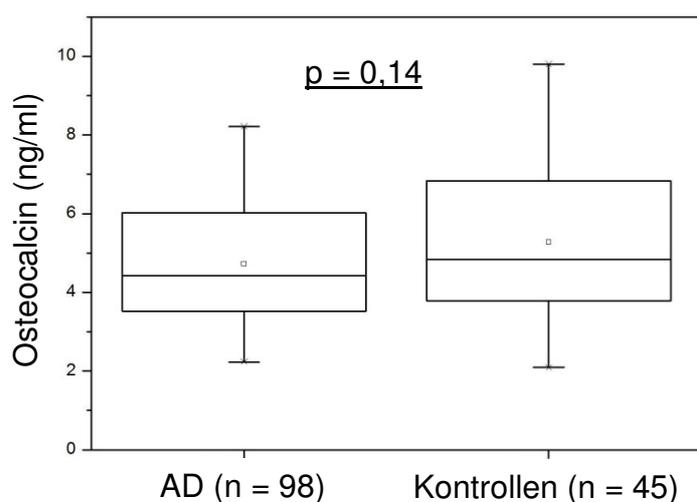


Abb. 14: Osteocalcinkonzentrationen bei AD-Patienten und gesunden Kontrollen

Die Serumkonzentrationen weisen keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen auf. Die Signifikanz wurde mittel Whitney-Mann-U-Test ermittelt.

#### 4.9. Schwache Korrelation von 25(OH)D- und Osteocalcinsерumkonzentration

BGLAP ist ein  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Zielgen. Das für Osteocalcin kodierende Gen enthält in der Promoterregion VDREs, durch die es von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in Osteoblasten stimuliert wird<sup>94</sup>. Es wurde untersucht, ob sich statistisch eine Korrelation zwischen der Osteocalcin- und 25(OH)D-Serumkonzentration nachweisen lässt.

Ein Maß zur Quantifizierung des Zusammenhanges ist der Korrelationskoeffizient nach Pearson. Dieser beträgt hier 0,204. Die Korrelation ist schwach, da  $r$  größer 0, aber auch deutlich kleiner als 1 ist. Das bedeutet die Osteocalcinkonzentration wird durch die 25(OH)D-Konzentration beeinflusst, aber ist wahrscheinlich von weiteren Faktoren abhängig und wird durch diese stärker reguliert. Für diese Untersuchung wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Es konnte eine positive Steigung der Regressionsgeraden nachgewiesen werden. Damit besteht ein gleichsinniger Zusammenhang zwischen den oben genannten Faktoren. Das bedeutet, dass mit steigender 25(OH)D-Konzentration auch die Osteocalcinkonzentration zunimmt. Das Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ ) gibt den erklärten Anteil der Varianz der abhängigen Variable  $y$ , hier Osteocalcin, an. Es lassen sich also 4,1% der Variation in der Osteocalcinkonzentration durch eine Änderung der 25(OH)D-Konzentration erklären (Abb. 15).

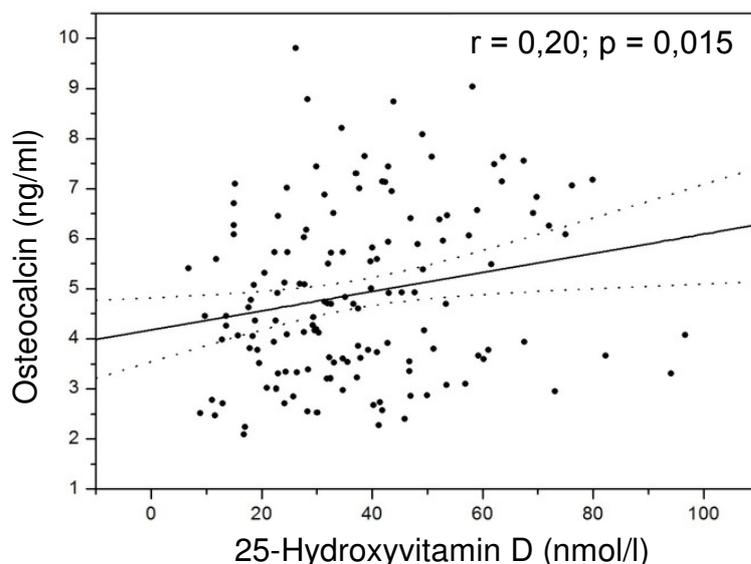


Abb. 15: Schwache Korrelation von Osteocalcin- und 25(OH)D-Serumkonzentration

Das Diagramm zeigt den Zusammenhang zwischen beiden Parametern. Ein Anstieg der 25(OH)D-Serumkonzentration führt zu einer minimalen Erhöhung der Osteocalcinkonzentration.

#### 4.10. Die 25(OH)D-Serumkonzentration ist SNP unabhängig

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich die Genotypen- und Allelverteilung bei Individuen mit 25(OH)D-Defizit ( $25(\text{OH})\text{D} < 50 \text{ nmol/l}$ ) von denen mit Konzentrationen über  $50 \text{ nmol/l}$  unterscheiden. Für *Cyp27b1* war bei 142 Individuen sowohl der Genotyp als auch die 25(OH)D-Serumkonzentration bekannt und für *Cyp24a1* waren diese Daten bei 133 Personen vorhanden. Bei den restlichen 25(OH)D-Proben wurde der Genotyp nicht ermittelt. Die Genotypenverteilung wurde statistisch mittels  $3 \times 2$  Cochran-Armitage-Trend-Test auf Signifikanz überprüft und die Allelverteilung mit dem  $2 \times 2$  chi-Quadrat-Test. AD-Patienten und Kontrollen wurden nicht separat betrachtet, da sich beide Gruppen kaum in der Verteilung ihrer 25(OH)D-Konzentrationen unterschieden (Abb. 13).

111 (78,2 %) der für *Cyp27b1* untersuchten Seren wiesen eine 25(OH)D-Serumkonzentration unter  $50 \text{ nmol/l}$  auf, lediglich bei 31 (21,8 %) Individuen ließen sich Werte über  $50 \text{ nmol/l}$  feststellen. Bei allen vier *Cyp27b1*-Polymorphismen konnte in beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied in der Verteilung von Major- und Minor-Allel und der Genotypen ermittelt werden. Die homozygote mutierte Variante, die bei jeweils 6 Proben der Fall- und Kontrollgruppe vorlag, ist bei allen *Cyp27b1*-Polymorphismen bei Individuen mit 25(OH)D-Serumkonzentrationen unter  $50 \text{ nmol/l}$  im Vergleich zu suffizienten Individuen tendenziell unterrepräsentiert (5,4 % zu 19,4 %). Der Unterschied zu Individuen mit Konzentrationen über  $50 \text{ nmol/l}$  ist jedoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Dies spiegelt sich ebenfalls in der statistische Auswertung der Mittelwerte der 25(OH)D-Konzentration für die drei Genotypen (wt, het, mut) mittels Kruskal-Wallis-Test wieder (Tab. 17). Die homozygot vorliegenden Minor-Allele aller vier *Cyp27b1*-SNPs weisen tendenziell höhere 25(OH)D-Serumkonzentrationen auf. Die Mittelwerte der 25(OH)D-Konzentration betragen für alle vier Polymorphismen bei homozygot vorliegendem Minor-Allel  $45,8 \text{ nmol/l}$ . Bei homozygoten Wildtypen liegt der MW zwischen  $36,7 \text{ nmol/l}$  und  $37,2 \text{ nmol/l}$ . Die Werte sind jedoch nicht signifikant unterschiedlich ( $p > 0,05$ ).

Um herauszufinden, ob ein bestimmter Haplotyp mit der Höhe der 25(OH)D-Konzentration assoziiert ist, wurde der Einzel-SNP-Analyse noch eine Haplotypenanalyse angeschlossen. Es fand sich keine Assoziation. Der überwiegende Teil der Individuen wies die beiden dominierenden Haplotypen (CCCT und TAGC) für die vier gekoppelten Polymorphismen auf.

Entsprechend wurden die zwei *Cyp24a1*-Polymorphismen analysiert. Bei 104 (78,2 %) Individuen lag die 25(OH)D-Serumkonzentration unter 50 nmol/l und bei 29 (21,8 %) oberhalb dieser Konzentration. Für den *Cyp24a1*-Polymorphismus rs2248359 ist die Allelverteilung in beiden Gruppen identisch ( $p = 0,38$ ). Im Vergleich der Genotypen tritt das homozygot vorliegende Minor-Allel bei Individuen mit 25(OH)D-Konzentrationen über 50 nmol/l häufiger auf (24,1 % zu 14,4 %). Das entspricht der Beobachtung, dass für das Minor-Allel homozygote Individuen im MW eine 25(OH)D-Konzentration von 41,4 nmol/l im Serum, heterozygote 38,5 nmol/l und die homozygote Wt-Variante 35,9 nmol/l aufweisen (Tab. 17). Es lässt sich also der Trend erkennen, dass das C-Allel mit niedrigeren 25(OH)D-Serumkonzentrationen assoziiert ist. Die Werte unterscheiden sich jedoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Für den SNP rs2296241 variieren die MW der 25(OH)D-Konzentration zwischen den Genotypen kaum. Auch die Verteilung der Allele und Genotypen ist nahezu identisch (Tab. 17). Die anschließende Haplotypenanalyse zeigte, dass die 25(OH)D-Konzentration nicht mit einer bestimmten Allelkombination assoziiert ist (Daten nicht gezeigt).

Tab. 17: Vergleich der 25(OH)D-Mittelwerte der verschiedenen Genotypen

| Gene           | SNP        | Genotyp |         |         | MW (SD) Serum 25(OH)D in nmol/l |              |              | p*    |
|----------------|------------|---------|---------|---------|---------------------------------|--------------|--------------|-------|
|                |            | Wt (n)  | Het (n) | Mut (n) | Wt                              | Het          | Mut          |       |
| <i>Cyp27b1</i> | rs703842   | CC (62) | CT (68) | TT (12) | 36,7 (±19,2)                    | 37,0 (±16,8) | 45,8 (±20,1) | 0,697 |
|                | rs10877012 | CC (64) | CA (66) | AA (12) | 37,2 (±14,1)                    | 36,5 (±18,5) | 45,8 (±19,9) | 0,863 |
|                | rs3782130  | CC (64) | CG (66) | GG (12) | 37,2 (±19,5)                    | 36,5 (±16,4) | 45,8 (±20,1) | 0,862 |
|                | rs4646536  | TT (64) | CT (66) | CC (12) | 37,1 (±19,2)                    | 36,6 (±16,7) | 45,8 (±20,1) | 0,896 |
| <i>Cyp24a1</i> | rs2248359  | CC (68) | CT (43) | TT (22) | 35,9 (±16,8)                    | 38,5 (±18,3) | 41,4 (±20,6) | 0,382 |
|                | rs2296241  | GG (30) | GA (68) | AA (35) | 36,8 (±19,5)                    | 37,7 (±16,4) | 38,3 (±20,1) | 0,977 |

p\* = Kruskal-Wallis-Test; MW=Mittelwerte mit Standardabweichung (SD)

#### 4.11. Die Osteocalcinkonzentration ist SNP unabhängig

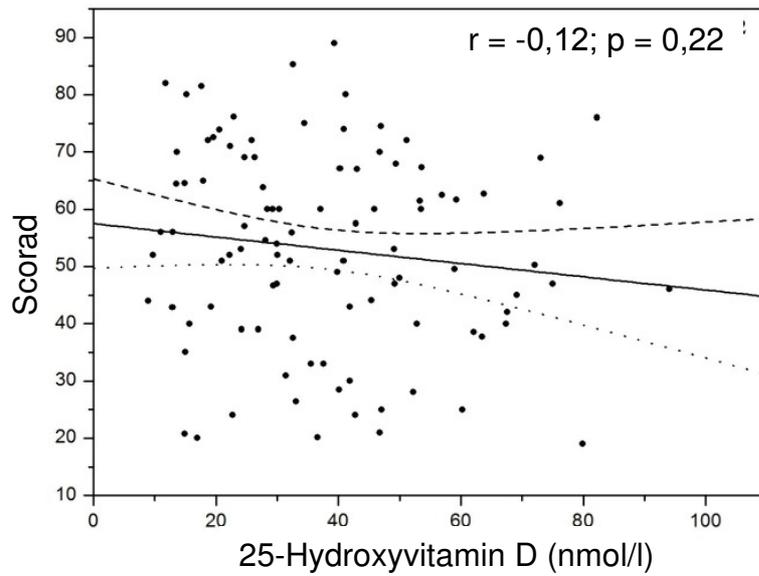
Um zu ermitteln, in wie weit sich die Osteocalcinserkonzentrationen für die einzelnen Genotypen (wt, het, mut) unterscheiden, wurde von 143 Serumproben die Osteocalcinkonzentration (ng/ml) bestimmt (MW ± SD:  $4,9 \pm 1,7$ ). Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test überprüft. AD-Patienten und gesunde Kontrollen wurden nicht separat betrachtet, da sich beide Gruppen in den Konzentrationen nicht signifikant unterscheiden ( $p = 0,14$ ).

Die Osteocalcinsерumkonzentrationen weisen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen der vier *Cyp27b1*-Polymorphismen auf ( $p > 0,05$ ). Es lässt sich jedoch der Trend erkennen, dass die homozygote Variante des Minor-Allels mit höheren Osteocalcinsерumkonzentrationen assoziiert ist. Die Mittelwerte der Osteocalcinkonzentration bei Individuen mit der homozygoten Mutation betragen 5,2 ng/ml (SD  $\pm$  1,8). Wildtyp und heterozygote Individuen haben im MW etwas niedrigere Konzentrationen, die zwischen 4,8 ng/ml und 4,9 ng/ml (SD  $\pm$  1,6-1,8) liegen. Träger des homozygoten Minor-Allels weisen also sowohl gering gradig höhere Osteocalcinkonzentrationen, als auch 25(OH)D-Konzentrationen im Serum auf. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der Regressionsanalyse von 25(OH)D - und Osteocalcinkonzentration (Abb. 15), in der ein Anstieg der 25(OH)D-Konzentration mit einer geringen Zunahme der Osteocalcinkonzentration verbunden war.

Für *Cyp24a1* ergab sich bei beiden Polymorphismen ebenfalls kein Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen in Abhängigkeit der Osteocalcinkonzentration ( $p > 0,05$ ). Bei rs2296241 ist jedoch eine Tendenz dahingehend zu erkennen, dass homozygote Träger der Wt-Variante im Mittel (5,2 ng/ml) höhere Osteocalcinsерumkonzentrationen besitzen als die homozygote Mutante (4,7 ng/ml).

#### **4.12. Keine Korrelation von 25(OH)D-Sерumkonzentrationen und SCORAD**

In der Fachliteratur werden positive als auch negative Einflüsse von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf die AD diskutiert. Ob eine lineare Korrelation zwischen dem Schweregrad der AD, als klinischer Parameter hierfür dient der SCORAD, und der 25(OH)D-Konzentration im Serum besteht, wurde hier mittels Regressionsanalyse statistisch überprüft. Im Ergebnis konnte jedoch die vorab dargestellte Annahme nicht bestätigt werden ( $p > 0,05$ ). Der ermittelte Pearson's Korrelationskoeffizient ( $r$ ) beträgt -0,124. Damit besteht der Trend zu einer inversen Korrelation. Ein Anstieg der 25(OH)D-Konzentration ist tendenziell mit einem geringeren SCORADs assoziiert (Abb. 16).



**Abb. 16: Keine Korrelation zwischen 25(OH)D-Konzentration und SCORAD**

Es besteht kein linearer Zusammenhang zwischen 25(OH)D-Serumkonzentration und dem SCORAD ( $p = 0,22$ ). Der ermittelte Pearson's Korrelationskoeffizient ( $r$ ) beträgt  $-0,124$ .

## 5. Diskussion

In dieser Untersuchung wurde die *Cyp24a1*-Genvariante rs2248359C sowie der *Cyp24a1*-Haplotyp rs2248359C/rs2296241A gehäuft bei Patienten mit schwerer AD identifiziert. Die übrigen *Cyp24a1*- und *Cyp27b1*-Genpolymorphismen waren bei AD-Patienten und gesunden Kontrollen gleich verteilt. Weiterhin zeigen die Daten, dass die *Cyp27b1*- und die *Cyp24a1*-Genpolymorphismen genetisch gekoppelt vorliegen. In einer Subpopulation von Nicht-Atopikern wurde beobachtet, dass der *Cyp27b1*-Genotyp TCGC signifikant häufiger auftrat.

Es ließen sich keine signifikanten Assoziationen zwischen den vier *Cyp27b1*- sowie den zwei *Cyp24a1*-Genpolymorphismen und der 25(OH)D-Serumkonzentration nachweisen. Ebenfalls zeigte sich keine statistische Assoziation zwischen den 25(OH)D-Serumkonzentrationen und dem Schweregrad der atopischen Dermatitis.

### 5.1. Die atopische Dermatitis und die 25(OH)D-Serumkonzentration sind unabhängig von den *Cyp27b1*-Genpolymorphismen

Polymorphismen des *Cyp27b1*-Gens wurden mit Autoimmunerkrankungen wie Diabetes Typ I und MS assoziiert<sup>43,47</sup>. Diese Erkrankungen werden im Zusammenhang mit einem VD-Mangel diskutiert<sup>47</sup>. Zur Assoziation von Polymorphismen des *Cyp27b1*-Gens und der AD liegen keine Daten vor.

Die Allele der hier untersuchten Polymorphismen waren bei AD-Patienten und gesunden Kontrollen gleich häufig verteilt. Dies weist daraufhin, dass diese SNPs für die AD wahrscheinlich keine Rolle spielen.

Die Haplotypenanalyse ergab, dass die vier *Cyp27b1*-Polymorphismen mit hoher Wahrscheinlichkeit in einer bestimmten Kombination vererbt werden. Dies bestätigt die Beobachtungen von Bailey et al.<sup>43</sup>, wo rs3782130, rs10877012 und rs4646536, und Sundqvist et al.<sup>47</sup>, wo rs703842, rs4646536 und rs10877012 ein starkes Kopplungsungleichgewicht aufweisen. Es ergaben sich vier Haplotypen. Die Allelkombination TCGC war in einer Subpopulation der gesunden Kontrollen im Vergleich zur Gruppe der AD-Patienten signifikant häufiger. Dieser Haplotyp ist somit möglicherweise ein protektiver Faktor in Bezug auf die AD. Wenn dieser Haplotyp zu einer funktionellen Veränderung der Gentranskription führt und kann so die

Enzymaktivität beeinflusst werden. Die unterschiedliche Aktivität des Schlüsselenzyms für die Bereitstellung von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aus  $25(\text{OH})\text{D}$  würde somit die systemische und lokale Verfügbarkeit von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  beeinflussen und hätte Auswirkungen auf verschiedenste Zellen einschließlich Immunzellen und Keratinozyten. Tatsächlich sind Mutationen des *Cyp27b1*-Gens bekannt, die zu einem Funktionsverlust der  $1\alpha$ -Hydroxylase führen können und damit verbunden zu niedrigen  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Serumkonzentrationen <sup>43</sup>. In dieser Untersuchung wurden die  $25(\text{OH})\text{D}$ -Konzentrationen bestimmt.  $25(\text{OH})\text{D}$  ist zwar allgemein als Parameter zur Einschätzung des Vitamin D-Status anerkannt <sup>46</sup>, da die HWZ des  $25(\text{OH})\text{D}$  mit 2 bis 3 Wochen deutlich länger ist als die von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , dessen Konzentration sich in kürzester Zeit ändert <sup>2,20</sup>. Einschränkend ist jedoch zu sagen, dass man anhand der  $25(\text{OH})\text{D}$ -Konzentration nicht zwingend auf die  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration schließen kann, da die  $1\alpha$ -Hydroxylase-Aktivität in Abhängigkeit vom Genotyp variieren kann <sup>46</sup>. Die  $1\alpha$ -Hydroxylase, die durch das Gen *Cyp27b1* kodiert wird, katalysiert aber die Hydroxylierung von  $25(\text{OH})\text{D}$  zu  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  <sup>23</sup>. Es kann hypothetisch davon ausgegangen werden, dass niedrige  $25(\text{OH})\text{D}$ -Konzentrationen eine geringe  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration zur Folge haben. Genauso kann aber diskutiert werden, dass Polymorphismen des *Cyp27b1*-Gens, die eine mangelhafte Effizienz des Enzyms verursachen, zu einer Situation führen, bei der die  $25(\text{OH})\text{D}$ -Serumkonzentration normal bis erhöht erscheint, die  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Serumkonzentration jedoch niedrig ist <sup>46</sup>. Damit ist die Frage, wie sich die Polymorphismen auf die  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration auswirken bzw. inwiefern die Aktivität des Enzyms dadurch beeinflusst ist, anhand der  $25(\text{OH})\text{D}$ -Serumkonzentration nicht zu beantworten.

Anhand der hier ermittelten Daten lässt sich jedoch nicht auf einen Zusammenhang zwischen den Haplotypen und der  $25(\text{OH})\text{D}$ -Serumkonzentration schließen. Zudem korrelierte keiner der *Cyp27b1*-Genotypen mit der  $25(\text{OH})\text{D}$ -Serumkonzentration. Es deutete sich lediglich ein geringer Trend für das homozygot vorliegende Minor Allel aller vier Polymorphismen zu höheren Serumkonzentrationen im Vergleich zur heterozygoten Variante und zum Wildtyp an. Der Unterschied war jedoch nicht relevant ( $p > 0,05$ ).

Um Rückschlüsse auf einen möglichen Funktionsverlust bzw. -gewinn durch den Haplotypen TCGC ziehen zu können, wurden die Ergebnisse anderer Studien herangezogen, da anhand der Ergebnisse dieser Arbeit sich keine funktionelle Auswirkung der Polymorphismen auf die  $25(\text{OH})\text{D}$ -Serumkonzentration darstellen lässt.

Orton et al.<sup>24</sup> identifizierten rs703842 und rs4646536 als signifikante Prädiktoren für die 25(OH)D-Serumkonzentration bei kanadischen Zwillingen mit MS. Die mittleren Konzentrationen beider Polymorphismen waren bei homozygoten Trägern des weniger vorkommenden Allels C niedriger.

Zu rs3782130 ist im Zusammenhang mit der 25(OH)D-Serumkonzentration nichts bekannt. Die drei analysierten *Cyp27b1*-Polymorphismen sind bisher nicht funktionell untersucht worden.

Lediglich die Allele von rs10877012 wurden in zwei Studien mit der 25(OH)D-Serumkonzentration in Verbindung gebracht<sup>46</sup>. Die mit 25(OH)D-Konzentration assoziierten Allele stimmen in beiden Studien jedoch nicht überein. In einer britischen Geburtenkohorte mit einer enormen Größe von 9377 Probanden wurden bei Trägern des homozygoten C-Allels signifikant höhere 25(OH)D-Serumkonzentrationen im Sommer und Herbst festgestellt als bei Trägern der AA-Variante. Im Winter und Frühling konnte diese Assoziation jedoch nicht mehr nachgewiesen werden. Dies führt Hyppönen et al.<sup>56</sup> zu der Annahme, dass die Genexpression saisonabhängig variiert und folglich den 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Spiegel beeinflusst. Dies würde erklären, warum sich in den vorliegenden Daten lediglich der Trend für höhere 25(OH)D-Serumkonzentrationen im Zusammenhang mit den Minor Allelen der vier untersuchten SNPs abzeichnete. Alle Proben wurden im Winter gewonnen. Wie in 4.8 bereits beschrieben wies die Mehrheit der untersuchten Individuen 25(OH)D-Defizit auf (Werte < 50 nmol/l)<sup>19</sup>. So wäre es möglich, dass ein Funktionsunterschied bei so geringen 25(OH)D-Serumkonzentrationen nicht erkennbar ist. Jedoch war in dieser Arbeit für das Major Allel C die Tendenz zu niedrigeren 25(OH)D-Serumkonzentrationen erkennbar. Dies deckt sich mit den Beobachtungen einer Studie zu Gestationsdiabetes und Vitamin D-Defizit (< 20 ng/ml). In dieser wird eine höhere Frequenz des C-Allels bei Vitamin D-Defizit bzw. Insuffizienz beschrieben<sup>57</sup>. In einer vorhergehenden Studie mit Diabetes mellitus Typ I-Patienten wurde festgestellt, dass diese, wenn sie Träger des homozygoten C-Allels waren, signifikant niedrigere *Cyp27b1* mRNA-Konzentrationen und relativ geringere 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Serumkonzentrationen aufwiesen als die gesunde Kontrollgruppe. Es wurde interessanterweise jedoch keine Korrelation mit der 25(OH)D-Serumkonzentration festgestellt<sup>28</sup>. Clifton-Bligh et al.<sup>52</sup> untersuchten die funktionellen Effekte des *Cyp27b1*-Polymorphismus rs10877012. Das Reportergen, das das A-Allel enthielt, wurde signifikant stärker exprimiert, als wenn es das C-Allel beinhaltete. Zudem ist beschrieben, dass das -1260C Allel eine Konsensus CDX2

Transkriptionsfaktorbindungsseite im *Cyp27b1*-Promoter verändert<sup>54</sup>. Zusammenfassend scheint die funktionelle Konsequenz des *Cyp27b1* -1260C-Allels eine Reduktion der  $1\alpha$ -Hydroxylase-Expression zu sein. Damit könnte eine geringere systemische Verfügbarkeit von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  für den Organismus verbunden sein. Da das C-Allel mit Autoimmunerkrankungen wie MS und Diabetes mellitus Typ I sowie einem erhöhten Frakturrisiko assoziiert ist und diese Erkrankungen höchstwahrscheinlich mit einem Vitamin D-Mangel in Zusammenhang stehen<sup>28,47,52</sup>, sind diese Befunde funktionell kohärent.

Die Datenlage zu rs10877012 im Zusammenhang mit der 25(OH)D-Serumkonzentration ist divergierend. Hyppönen et al.<sup>56</sup> assoziieren das C-Allel mit höheren 25(OH)D-Konzentrationen und Ramos-Lopez et al. 2008<sup>57</sup> mit niedrigeren Konzentrationen im Vergleich zum A-Allel. Somit verdeutlichen diese Daten, dass die 25(OH)D-Serumkonzentration nicht zwingend auf die funktionelle Relevanz eines *Cyp27b1*-SNPs hinweist. Dementsprechend zeigen Ramos-Lopez et al. 2007<sup>28</sup> keine Korrelation mit der 25(OH)D-Serumkonzentration, aber die beschriebenen funktionellen Auswirkungen. Auch in einer genomweiten Assoziationsstudie ergibt sich kein Zusammenhang zwischen *Cyp27b1*-Polymorphismen und der 25(OH)D-Konzentration<sup>95</sup>. Diese inkonsistenten Daten sind eventuell darauf zurückzuführen, dass die 25(OH)D-Serumkonzentration stark von der UV-Exposition abhängt<sup>24,25</sup> und weniger von den *Cyp27b1*-Varianten.

Es ist also denkbar, dass die 25(OH)D-Serumkonzentration normal bis erhöht ist, die  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Serumkonzentration jedoch suboptimal ist, da Polymorphismen des *Cyp27b1*-Gens zu einer reduzierten  $1\alpha$ -Hydroxylase-Aktivität und somit weniger  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  führen. Demnach müssen die von Orton et al.<sup>24</sup> ermittelten niedrigeren 25(OH)D-Serumkonzentrationen, die mit dem C-Allel der Polymorphismen rs703842 und 4646536 verbunden sind, nicht auch eine niedrigere  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Serumkonzentration bedeuten. Das T-Allel des *Cyp27b1*-Polymorphismus rs703842 ist mit MS<sup>47,51</sup> und das des SNPs rs4646536 mit einem erhöhten Frakturrisiko, Diabetes mellitus Typ I und Hashimoto Thyreoiditis assoziiert<sup>43,52,55</sup>. Das lässt einen Funktionsverlust des Enzyms bei Vorliegen des T-Allels vermuten. Möglicherweise ist die niedrigere 25(OH)D-Serumkonzentration auf einen Funktionsgewinn der  $1\alpha$ -Hydroxylase zurückzuführen. Folglich wäre die Konversion zu  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Serumkonzentration effektiver und der Verbrauch von 25(OH)D gesteigert. Zusammenfassend weisen die Daten daraufhin, dass der Haplotyp TCC (rs703842,

rs10877012, rs4646536) möglicherweise mit einer verminderten Enzymaktivität einhergeht. Dies würde bedeuten, dass niedrigere  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentrationen vor AD schützen. Im Tiermodell wurde gezeigt, dass topisches  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  das Zytokin TSLP bei murinen Keratinozyten induziert. TSLP begünstigt kutan und systemisch einen der AD ähnlichen Phänotyp der Mäuse, in dem es myeloide dendritische Zellen induziert<sup>96</sup>, die naive T-Helferzellen zur Produktion der Allergie-auslösende Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 und TNF- $\alpha$  fördert. INF- $\gamma$  und IL-10 werden hingegen supprimiert. Durch dieses Zytokinmilieu wird die Differenzierung zu inflammatorischen Th<sub>2</sub>-Zellen gefördert<sup>77</sup>, die die akute Phase der AD dominieren<sup>1,17</sup>.

Die Polymorphismen rs703842, rs10877012 und rs3782130 sind nicht evolutionär konserviert. Holt et al.<sup>58</sup> beschreiben dies bereits für rs3782130. Der Polymorphismus rs4646356, der mit den zuvor genannten Polymorphismen gekoppelt vererbt wird, liegt auf einem Genabschnitt, der einen hohen homologen Anteil zwischen Mensch und Maus aufweist. Diese Gensequenz war also im Laufe der Evolution nur minimalen Veränderungen ausgesetzt, was darauf hindeutet, dass sie funktionell relevant ist<sup>91</sup>. Dies spricht für einen Vorteil der Variante für das Überleben.

## **5.2. Assoziation eines *Cyp24a1*-Genpolymorphismus mit schwerer atopischer Dermatitis unabhängig der 25(OH)D-Serumkonzentration**

Das Gen *Cyp24a1* kodiert für die 24-Hydroxylase. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von 25(OH)D und  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zu inaktiven wasserlöslichen Metaboliten, die ausgeschieden werden<sup>43,53,62</sup>. Mutationen des Gens, die mit einem Funktionsverlust des Enzyms einhergehen, führen bei Kindern zum Krankheitsbild der infantilen Hyperkalzämie<sup>61</sup>. Mäuse mit ausgeschaltetem *Cyp24a1*-Gen zeigen eine verzögerte Elimination von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aus dem Blut und Gewebe<sup>62</sup>.

Polymorphismen von *Cyp24a1* wurden in verschiedenen Studien mit Asthma und Atopie assoziiert, wobei die Daten zu den assoziierten Polymorphismen und ihren Risikoallelen inkonsistent sind<sup>64,65</sup>.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob vier Polymorphismen auf diesem Gen mit dem Auftreten der AD assoziiert sind. Zwei Polymorphismen konnten auf Grund repetitiver Regionen am LightCycler nicht etabliert werden. In vorhergehenden Studien<sup>53,65</sup> sind

die SNPs mit anderen Verfahren (Taqman Assay und Massenspektrometrie) genotypisiert worden.

Der *Cyp24a1*-Polymorphismus rs2248359 ist in der Promoterregion des Genes lokalisiert <sup>64</sup>. Die Daten dieser Arbeit zeigten einen signifikanten Unterschied in der Genotypen- und Allelverteilung zwischen der gesunden Kontrollgruppe und Patienten mit einer schweren Form der AD. Das homozygot vorliegende C-Allel war in der gesunden Kontrollgruppe unterrepräsentiert ( $p = 0,009$ ). Das C-Allel stellt somit einen möglichen prädisponierenden Faktor für die schwere Form der AD dar. In einer Studie mit Asthmafamilien aus Deutschland <sup>65</sup> und in der französisch-kanadische Saguenay-Lac-Saint-Jean Studienpopulation <sup>64</sup> wird das C-Allel bereits als Risikoallel für Asthma identifiziert. Bei drei weiteren Studienpopulationen bestätigt sich diese Assoziation nicht <sup>64</sup>. In der der Canadian Asthma Primary Prevention Studienpopulation findet sich dagegen eine Assoziation mit der Atopie <sup>64</sup>. Multiple Faktoren können zu diesem inhomogenen Ergebnis geführt haben. So unterschied sich die Definition für Asthma und/oder die Einflussfaktoren auf die 25(OH)D-Synthese wurden in den einzelnen Studien unterschiedlich bewertet <sup>64</sup>. Allergisches Asthma bronchiale, die Rhinitis allergica und die atopische Dermatitis stellen zusammen den Formenkreis der Atopie dar <sup>1</sup>. Das heißt etwa die Hälfte der Kinder mit AD entwickeln zusätzlich durchschnittlich um das 5. Lebensjahr ein AA oder eine AR durchschnittlich um das 10. Lebensjahr <sup>4,97</sup>. AA oder AR bei einem Elternteil scheint eine eher untergeordnete Rolle bei der Entstehung der AD beim Kind zu spielen <sup>13</sup>. Um das allergische Asthma als Einflussfaktor ausschließen, wurden Patienten mit schwerer AD ohne AA in der Eigenanamnese mit den gesunden Kontrollen verglichen. Lediglich 40 von 147 Patienten mit schwerer AD hatte kein AA in der Eigenanamnese angegeben. Bei dieser Gruppe war das Major Allel C noch häufiger ( $p = 0,003$ ). Dies deutet daraufhin, dass der *Cyp24a1*-Polymorphismus mit AD und nicht mit AA gekoppelt ist.

Genomweite Untersuchungen, größtenteils mit Familien europäischer Herkunft, ergeben eine Kombination aus spezifischen und geteilten Effekten auf die AD, Asthma und AR. Die meisten dieser Gene kodieren für Proteine, die wichtig für die Hautbarrierefunktion und die Immunantwort sind <sup>14,98</sup>. In einer japanischen Population wird *Cyp24a1-PFDN4* als prädisponierender Locus für die AD beschrieben <sup>7</sup>. Dieser wird in anderen genomweiten Assoziationsstudien mit europäischen Populationen jedoch nicht reproduziert <sup>14,98</sup>. Zu bemerken ist dabei nicht nur die unterschiedliche ethnische Zugehörigkeit der Populationen, sondern auch die Altersverteilung. Die

europäischen Kohorten beinhalten entweder Kinder und Erwachsene<sup>98</sup> oder ausschließlich Kinder<sup>14</sup>. Die japanische Studie bezieht ausschließlich Erwachsene ein<sup>7</sup>. Interessanterweise beträgt die Prävalenz der AD bei Kindern 15-25 %<sup>8</sup>, bei Erwachsenen nur 1-3 %<sup>9</sup>. Dies könnte so gedeutet werden, dass bei Erwachsenen die genetische Komponente eine größere Rolle spielt als bei Kindern, da bei Kindern in bis zu 70 % der Fälle eine spontane Remission bis zum Jugendalter eintritt<sup>11</sup>. Unsere Studienpopulation bestand, wie auch die japanische ausschließlich aus erwachsenen Individuen. Dies deutet darauf hin, dass *Cyp24a1*-Polymorphismen zur AD im Erwachsenenalter, nicht aber in der Kindheit, prädisponieren.

Die Allelverteilung des zweiten untersuchten *Cyp24a1*-Polymorphismus rs2296241 war zwischen Fall- und Kontrollgruppe identisch.

Die Haplotypenanalyse ergab eine Kopplung beider Polymorphismen. Alle vier möglichen Allelkombinationen waren vertreten, wobei die Variante TG nur bei 3,8 % der Kontrollen und 5,0 % der AD-Patienten vorkam. Die Allelkombination TA trat signifikant häufiger bei den gesunden Kontrollen auf, scheint also tendenziell protektiv zu sein ( $p = 0,04$ ). Die Kombination CA war hingegen bei den AD-Patienten signifikant häufiger vertreten ( $p < 0,003$ ), was möglicherweise durch das mit der AD assoziierte C-Allel bedingt ist. Wjst et al.<sup>65</sup> identifizieren einen 5-Punkthaplotypen auf dem *Cyp24a1*-Gen, der mit Asthma, Gesamt IgE, 25(OH)D- und 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Serumkonzentration assoziiert ist. Dieser Haplotyp (rs2296241 : rs17219315 : rs2762942 : rs2248137 : rs2248359; GAACC) beinhaltet unter anderem die hier untersuchten Polymorphismen, wobei sich der Polymorphismus rs2248359 nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befand. Dies deutet daraufhin, dass die Auswahl der Population nicht optimal war und demnach die Allelverteilung nicht repräsentativ ist.

Auch hier wurde untersucht, ob eine Assoziation zwischen den Genotypen und den ermittelten Haplotypen mit der 25(OH)D-Serumkonzentration besteht. Es ergab sich weder für die Allelverteilung der einzelnen Polymorphismen noch für einen der Haplotypen ein Zusammenhang. Penna-Martinez et al.<sup>53</sup> stellten ebenfalls fest, dass die 25(OH)D-Serumkonzentration von den verschiedenen Polymorphismen der Gene *Cyp27b1* und *Cyp24a1* unabhängig ist. Es zeigt sich jedoch ein Zusammenhang mit 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Serumkonzentration. Darunter war der SNP rs2296241. Der Genotyp AA/AG korreliert bei gesunden Kontrollen mit höheren 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Serumkonzentration im Vergleich zu Probanden mit papillärem Schilddrüsenkarzinom. Dies deutet daraufhin, dass das Vorhandensein der rs2296241A-Variante zu einem

Funktionsverlust des Enzyms 24-Hydroxylase führt. Dies würde einen eingeschränkten Abbau von 25(OH)D und 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> nach sich ziehen. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> wäre damit länger verfügbar.

Bei rs2248359 zeichnete sich als Trend ab, dass die homozygote Variante des T-Allels nicht mit signifikant höheren 25(OH)D-Serumkonzentrationen einhergeht. Wenn das Vorhandensein des C-Allels zu einem Funktionsgewinn des Enzyms 24-Hydroxylase führt, hätte dies einen effektiveren Abbau von 25(OH)D und 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> zur Folge. Somit wäre die Verfügbarkeit von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> eingeschränkt. Interessanterweise liegen beide Polymorphismen in Bereichen des Gens, die zahlreiche Homologien zwischen der Spezies Mensch und der Maus zeigen und somit evolutionär konserviert sind. Diese Regionen enthalten überproportional häufig funktionell relevante Transkriptionsfaktorbindungsstellen<sup>91</sup>. Dies könnte bedeuten, dass beide SNPs einen evolutionären Vorteil bedingen, weil sie funktionell wichtig sind.

Zusammengefasst würde der Haplotyp rs2248359T/rs2296241A, der in der Kontrollgruppe signifikant häufiger auftritt, zu einem Funktionsverlust der 24-Hydroxylase bedingen, wodurch dem Organismus das 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> länger zur Verfügung stünde, als wenn der Haplotyp rs2248359C/rs2296241A, der mit der AD assoziiert ist, vorläge. Dies deutet an, dass sich höhere VD-Werte möglicherweise vor der Entstehung einer schweren AD schützen. So wird diskutiert, dass 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> die Störung der Barrierefunktion der Haut der AD positiv beeinflusst<sup>2</sup>, in dem es die epidermale Barriere durch Stimulation der Expression von FLG und Involucrin fördert<sup>70</sup>. Neben der Störung der Hautbarrierefunktion wird für die inadäquate Abwehr der Haut durch einen Mangel an AMPs diskutiert. Die AMP-Induktion ist besonders in den Läsionen der atopischen Haut stark reduziert<sup>78</sup>. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> induziert die AMP-Expression bei einer Verletzung oder einer bakteriellen Infektion der Haut über Bindung an den VDR und die Expression von TLR-2 und seinem Cofaktor CD14. Gleichzeitig kommt es in den Keratinozyten im Bereich der Läsion zu einem Anstieg der 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Konzentration, da die *Cyp27b1*-Expression durch Aktivierung der TLRs 2/6 und Tumor Growth Factor-β<sub>1</sub> (TGF-β<sub>1</sub>) induziert wird<sup>16</sup>. Somit könnte der hier beobachtete *Cyp24a1*-Genotyp TA zu einem Funktionsverlust und damit zu einer stärkeren VDR-Aktivierung durch mehr aktiv zur Verfügung stehendes 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> führen. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> reguliert die Maturation und Differenzierung dendritischer Zellen<sup>43,71</sup> in vitro durch den Anstieg von IL-10 und das Abfall von IL-12. Dieses Zytokinmilieu fördert die tolerogenen Eigenschaften der dendritischen Zellen und induziert T-

Suppressorzellen<sup>79</sup>.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  supprimiert in naiven T-Zellen die Produktion bestimmter Zytokine, wodurch die  $\text{Th}_1$ -Antwort inhibiert wird und regulatorische T-Zellen induziert werden<sup>81</sup>. Neben der gestörten T-Zellantwort findet sich bei AD-Patienten eine gesteigerte IgE-Antwort. 70-80 % der AD-Patienten weisen eine IgE vermittelte Sensibilisierung auf (extrinsische AD)<sup>17</sup>. Vitamin D spielt auch für die IgE-Antwort eine wichtige Rolle. So zeigen Hartmann et al.<sup>99</sup>, dass  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Agonisten durch die Aktivierung des VDRs im Typ I Allergie Mausmodell die IgE-Synthese und die Zahl IgE-sezernierender B-Zellen reduziert. Insgesamt weisen die Daten auf eine antiinflammatorische Wirkung von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf das adaptive Immunsystem bei AD hin.

### **5.3. Bedeutung der 25(OH)D-Konzentration für das Auftreten der atopischen Dermatitis**

In der vorliegenden Arbeit war die 25(OH)D-Serumkonzentration bei der überwiegenden Anzahl der AD-Patienten (75,5 %) und gesunden Probanden (84,4 %) unter 50 nmol/l. Dies wurde in einer früheren Arbeit als funktioneller Mangel definiert<sup>19</sup>. Die 25(OH)D-Serumkonzentration war bei beiden Gruppen identisch. Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer polnischen Studie<sup>100</sup>.

Es gibt unter Experten bisher keinen Konsensus über die optimale 25(OH)D-Serumkonzentration. Häufig werden Werte unter 50 nmol/l als Defizit, Werte im Bereich von 52 bis 72 nmol/l als relative Insuffizienz und Konzentrationen über 75 nmol/l als Suffizienz beschrieben<sup>19,101</sup>. Nach dieser Definition sind etwa eine Milliarde Menschen weltweit 25(OH)D insuffizient oder defizient<sup>19</sup>. Die Sonnenexposition hat den größten Einfluss auf die Variabilität der 25(OH)D-Serumkonzentration<sup>24</sup>. Die UV-Strahlung ist jedoch im Winter in unseren Breitengraden nicht ausreichend, um genügend 25(OH)D in der Haut zu synthetisieren<sup>101</sup>. Daher wurden alle Proben im Winter entnommen, um den Einfluss der Sonnenexposition auf die 25(OH)D-Serumkonzentration möglichst zu minimieren. Webb et al.<sup>93</sup> zeigte, dass die UV-Strahlung im Winter weder in Boston (Breitengrad 53°) noch in Edmonton (Breitengrad 42°) eine suffiziente Vitamin D<sub>3</sub>-Synthese ermöglicht. Deutschland befindet sich im Bereich des 47 und 55° Breitengrades. Folglich ist davon auszugehen, dass ein Großteil der Bevölkerung im Winter an einem 25(OH)D-Defizit leidet<sup>101</sup>, was sich in den Ergebnissen der

Serumanalyse widerspiegelt. Interessanterweise findet im Winter nicht selten eine Exazerbation der AD bei Erwachsenen und Kindern statt, möglicherweise u.a. als Folge der nicht ausreichenden Sonnenexposition<sup>73</sup> neben Trockenheit und Kälte<sup>102</sup>. Die hier gewonnenen Daten zeigten keine Korrelation zwischen SCORAD zur Einschätzung des Schweregrad der AD und der 25(OH)D-Serumkonzentration ( $r = - 0,12$ ). Dies ist im Einklang mit Ergebnissen anderer Studien, dass die 25(OH)D-Serumkonzentration vom SCORAD unabhängig ist<sup>73,75</sup>. Javanbakht et al.<sup>73</sup> verabreichten 12 Neurodermitkern über einen Zeitraum von 60 Tagen täglich 1600 IU Cholecalciferol. 11 Probanden erhielten Placebos. Der SCORAD besserte sich, aber es zeigte sich keine Assoziation von SCORAD mit der 25(OH)D-Serumkonzentration. Limitationen dieser Studie sind die geringe Probandenzahl, die kurze Laufzeit und die einheitliche Cholecalciferoldosis unabhängig der 25(OH)D-Serumkonzentration. Vähäviho et al. 2010<sup>75</sup> beschreiben ebenfalls eine Reduktion des SCORADs, nachdem 18 AD-Patienten dreimal pro Woche insgesamt 15 Mal einer UVB-Behandlung ausgesetzt wurden. Der SCORAD korreliert auch hier nicht mit dem Anstieg der 25(OH)D-Serumkonzentration. Unser Kollektiv zeigte mehrheitlich ein VD-Defizit, da die Proben im Winter gewonnen wurden, wo nicht ausreichend UV-Strahlung vorhanden ist, um ausreichend Vitamin D zu synthetisieren<sup>101</sup>. In den beiden genannten Studien<sup>73,75</sup> zeigte sich zumindest eine Reduktion des SCORADs unter Substitutions- und UVB-Behandlung. Vielleicht war diese jedoch nicht ausreichend, da in einer anderen Studie der Anstieg der 25(OH)D-Serumkonzentration mit einer Verbesserung des SCORADs bei der Gruppe der Patienten positiv korrelierte ( $r = 0,5$ ), die im März behandelt wurden, aber nicht in der Januargruppe ( $r = - 0,48$ ). Eine Gruppe von 23 AD-Patienten war im Januar und eine andere im März zwei Wochen mit Heliotherapie behandelt worden<sup>76</sup>. Nachteil dieser Studie ist, dass die UV-Dosis hier von der individuellen Exposition abhängig war. Peroni et al.<sup>81</sup> fanden eine signifikant inverse Korrelation zwischen SCORAD und 25(OH)D-Serumkonzentration bei 37 Kindern mit AD im Alter von 8 Monaten bis 12 Jahre ( $r = - 0,49$ ), deren Proben im Zeitraum von Januar bis März gewonnen wurden. Wenn auch nicht bewiesen, könnte weniger 25(OH)D durch den *Cyp24a1*-Funktionsgewinn zur Verfügung stehen und so in einer verminderten VDR-Aktivierung resultieren. Die geringere VDR-Aktivierung könnte zu einer Verschlechterung des Hautbildes bei Patienten mit AD führen, wie bereits in 5.2 beschrieben. Im Tiermodell wurde gezeigt, dass über den VDR allergische Reaktionen reduziert werden können<sup>99</sup>.

Auf Grund der epidemiologischen Daten wird eine u-förmige Risikobeziehung zwischen 25(OH)D-Serumkonzentrationen und verschiedenen Erkrankungen diskutiert, d.h. niedrige und hohe Konzentrationen wirken prädisponierend<sup>46,56</sup>. Dies könnte auch erklären, warum es meist keinen linearen Zusammenhang zwischen SCORAD und der 25(OH)D-Konzentration gibt. Bisher gibt es keine ausreichende Studienlage über die definitive Wirkung von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf die AD. Bäck et al.<sup>77</sup> bringen die erhöhte Vitamin D<sub>3</sub>-Einnahme während des ersten Lebensjahres mit der Manifestation der AD im sechsten Lebensjahr in Verbindung. Jedoch weist die Studie einige Schwachstellen auf. Die Daten beziehen sich auf eine Gruppengröße von 37 Kindern, deren Diagnose mittels Fragebogen gestellt wurde. Zudem gibt es keine Kontrollgruppe. Die VD-Einnahme wurde ebenfalls anhand der Daten des Fragebogens berechnet. Eine andere Studie<sup>103</sup> zeigt eine inverse Assoziation von niedrigen 25(OH)D-Serumkonzentration und AD bei deutschen Kindern und auch bei Erwachsenen. Der Autor vermutet, dass Vitamin D-Supplementation zur Rachitis-Prophylaxe zur Unterdrückung der Th<sub>1</sub>-Entwicklung beiträgt<sup>103</sup> und so ein Ungleichgewicht zwischen Th<sub>1</sub>- und Th<sub>2</sub>-Zellen zu Gunsten der Th<sub>2</sub>-Zellen fördert<sup>104</sup>.

Aktuelle Studien haben zudem ergeben, dass eine Assoziation zwischen der 25(OH)D-Serumkonzentration und FLG-Mutationen besteht. Träger einer homozygoten FLG-Mutation weisen signifikant höhere 25(OH)D-Serumkonzentrationen auf<sup>103,105</sup>. FLG-Mutationen, die mit Funktionsverlust verbunden sind, erhöhen das Risiko an der AD zu erkranken um das Dreifache<sup>4</sup>.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die 25(OH)D-Serumkonzentration durch zahlreiche Faktoren beeinflusst wird. Neben der UV-Exposition, der VD-Aufnahme über die Nahrung oder VD-Supplementation spielen genetische Faktoren (FLG, *Cyp24a1*) ebenfalls eine wichtige Rolle. Insbesondere diese bestimmen möglicherweise die inhomogenen Ergebnisse in Bezug auf die 25(OH)D-Konzentrationen, die AD und ihren Schweregrad.

#### **5.4. Korrelation von Osteocalcin- und 25(OH)D-Serumkonzentration bei AD**

Die Untersuchungen zu Osteocalcin, einem durch  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  regulierten<sup>34</sup> spezifischen biochemischen Marker für den Knochenumbau<sup>35</sup>, ergaben eine positive aber schwache Korrelation zur 25(OH)D-Serumkonzentration ( $r = 0,2$ ). Die vorhandene

Korrelation lässt sich durch das VDRE in der Promoterregion des für Osteocalcin kodierenden Genes erklären. Über das VDRE kann ein  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR}$ -Komplex die Genexpression stimulieren<sup>94</sup>.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  bindet im Vergleich zu anderen Liganden mit hoher Affinität und Spezifität an den VDR<sup>30</sup>. Dies erklärt womöglich den schwachen Grad der hier ermittelten Korrelation.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde beobachtet, dass die Osteocalcinkonzentration von den hier untersuchten *Cyp27b1*- und *Cyp24a1*-Polymorphismen unabhängig ist. Dafür wurden die Daten der Genotypisierung für Neurodermitiker und das Kontrollkollektiv zusammengefasst betrachtet, da die Osteocalcin-Serumkonzentration beider Gruppen identisch war ( $p = 0,14$ ).

Interessanterweise sind VDR-SNPs bekannt, die die Osteocalcinkonzentration beeinflussen<sup>34</sup>. Die Polymorphismen BsmI und Apa I sind zudem mit der schweren Form der AD bei Erwachsenen assoziiert<sup>5</sup>.

Eine Studie<sup>106</sup>, die sich mit der Knochendichte von AD-Patienten beschäftigt, zeigt, dass ein Drittel der dort untersuchten Patienten mit moderater bis schwerer AD eine niedrige Knochendichte aufweisen, die jedoch nicht mit der  $25(\text{OH})\text{D}$ -Serumkonzentration assoziiert war. Ein Großteil der Betroffenen waren Männer. Bei 32 % der Patienten wurde eine Vitamin D-Insuffizienz ( $25(\text{OH})\text{D}$ -Serumkonzentrationen unter  $72,5 \text{ nmol/l}$ ) und bei 31,2 % ein Vitamin D-Defizit ( $25(\text{OH})\text{D}$ -Serumkonzentration unter  $50 \text{ nmol/l}$ ) beobachtet. Im Vergleich dazu wiesen in dieser Arbeit sogar ca. 75 % der AD-Patienten ein Vitamin D-Defizit auf.

Denkbar wäre, dass es durch Polymorphismen im VD-Signalweg zur eingeschränkten Aktivierung des VDRs kommt. Dies würde sich folglich negativ auf den Knochenstoffwechsel auswirken und eventuell eine Prädisposition zur AD darstellen.

## 5.5. Limitationen der Studie

Für diese Studie wurden nur Kaukasier rekrutiert, um eine Heterogenität der Population und damit verbunden falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden<sup>14</sup>. Folglich lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit nicht auf andere ethnische Gruppen übertragen. So besitzen hellhäutige Kaukasier im Vergleich zu dunkelhäutigen Indern eine geringere 24-Hydroxylase-Aktivität<sup>65</sup>. Die Hautfarbe korreliert geografisch mit der UV-Exposition und Breitengrad, wobei helle Haut 6-10x schneller Vitamin  $\text{D}_3$  produziert als dunkle<sup>107</sup>.

Das heißt die Populationen sind sowohl durch die Hautfarbe als auch die metabolische Kapazität des Enzyms an die vorherrschenden z.T. suboptimalen Lichtverhältnisse in Bezug auf die  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese angepasst<sup>65,107</sup>.

Die Fallzahl von insgesamt 559 Probanden ist im Vergleich zu den genomweiten Assoziationsstudien eher klein, aber im Vergleich zu den beschriebenen Supplementationsstudien eher groß. Die Gruppe der 281 rekrutierten Neurodermitiker weist in Bezug auf die europäischen genomweiten Assoziationsstudien den Vorteil auf, dass sie sehr homogen ist. Der ethnischen Herkunft nach sind alle Kaukasier. Es handelt sich ausschließlich um Erwachsene, deren Schweregrad der AD durch einen erfahrenen Dermatologen anhand des SCORADs ermittelt wurde. Leider erfolgte die  $25(\text{OH})\text{D}$ -Konzentrationsbestimmung im Serum nicht bei allen genotypisierten Probanden ( $n = 143$ ). Zudem fand lediglich einmalig eine Bestimmung der  $25(\text{OH})\text{D}$ -Serumkonzentration im Winter statt. Eine Aussage über den  $25(\text{OH})\text{D}$ -Langzeitstatus, woraus sich z.B. ableiten ließe, ob bestimmte Individuen unabhängig von der Jahreszeit einen  $25(\text{OH})\text{D}$ -Mangel aufweisen, ist nicht möglich.

Eine Intervention der genotypisierten Kohorte, um ein Ansprechen der  $25(\text{OH})\text{D}$ -Konzentration und eventuell des Hautbildes auf exogen zugeführtes VD zu ermitteln, wurde nicht durchgeführt, wäre aber in zukünftigen Untersuchungen sinnvoll.

Zudem wäre eine Stratifizierung in mögliche Subtypen der AD wie extrinsisch und intrinsisch interessant. Diese Studie beinhaltet sowohl Probanden mit der intrinsischen als auch extrinsischen Form, die nicht separat betrachtet wurden.

Die  $25(\text{OH})\text{D}$ -Serumkonzentration wird multifaktoriell durch UV-Exposition, Gewicht, Ernährung usw. bestimmt. So wären funktionelle Analysen der Polymorphismen interessant, vielleicht auch im Hinblick auf die zellspezifische Expression. Die Studienpopulation sollte alters-, geschlechts- und gewichtsadaptiert und ernährungskontrolliert sein. Aber anhand der hier ermittelten geringen Assoziation ist es wahrscheinlich wenig aussichtsreich.

## 5.6. Ausblick

Klinische Untersuchungen implizieren einen möglichen therapeutischen Nutzen einer Vitamin D-Supplementation bei AD-Patienten. Die Ergebnisse der vorgelegten Dissertation weisen darauf hin, dass die hier untersuchten *Cyp27b1*-Polymorphismen

nicht mit der Erkrankung assoziiert sind. Dagegen wurde der *Cyp24a1*-Polymorphismus rs2248359 mit der schweren Verlaufsform der AD assoziiert.

In weiterführenden kontrollierten Studien könnte der Einfluss von VD bei AD-Patienten mit einem VD-Defizit bzw. einer VD-Suffizienz untersucht werden, deren Genotypen für den VD-Metabolismus relevante Gene wie *VDR*, *Cyp27b1* oder *Cyp24a1* und deren 25VD-Status bekannt sind. Funktionelle Untersuchungen zu den Polymorphismen sollten angeschlossen werden, um die komplexen genetischen Mechanismen des Vitamin D Metabolismus besser zu verstehen und eine Vorhersage über den Einfluss der genetischen Komponente auf die Vitamin D-Konzentration zu treffen. Durch ein besseres Verständnis der genetisch beeinflussten Interaktionen im Vitamin D-Metabolismus könnte die Therapie individuell angepasst werden.

## Literaturverzeichnis

- 1 Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2008; 358: 1483-94.
- 2 Searing DA, Leung DY. Vitamin D in atopic dermatitis, asthma and allergic diseases. *Immunol Allergy Clin North Am* 2010; 30: 397-409.
- 3 Gurlek A, Pittelkow MR, Kumar R. Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3): implications in cell growth and differentiation. *Endocr Rev* 2002; 23: 763-86.
- 4 Boguniewicz M, Leung DY. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunol Rev* 2012; 242: 233-46.
- 5 Heine G, Hoefler N, Franke A, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with severe atopic dermatitis in adults. *Br J Dermatol* 2012; 168: 855-8.
- 6 Wang SS, Hon KL, Kong AP, et al. Eczema phenotypes are associated with multiple vitamin D pathway genes in Chinese children. *Allergy* 2014; 69: 118-24.
- 7 Hirota T, Takahashi A, Kubo M, et al. Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nat Genet* 2012; 44: 1222-6.
- 8 Williams H, Flohr C. How epidemiology has challenged 3 prevailing concepts about atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 209-13.
- 9 Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet* 2003; 361: 151-60.
- 10 Illi S, von Mutius E, Lau S, et al. The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 925-31.
- 11 Novak N, Bieber T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 252-62.
- 12 Cookson WO, Moffatt MF. The genetics of atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2002; 2: 383-7.
- 13 Dold S, Wjst M, von Mutius E, Reitmar P, Stiepel E. Genetic risk for asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis. *Arch Dis Child* 1992; 67: 1018-22.
- 14 Weidinger S, Willis-Owen SA, Kamatani Y, et al. A genome-wide association study of atopic dermatitis identifies loci with overlapping effects on asthma and psoriasis. *Hum Mol Genet* 2013; 22: 4841-56.
- 15 Schaubert J, Gallo RL. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: R13-8.
- 16 Schaubert J, Dorschner RA, Coda AB, et al. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2007; 117: 803-11.
- 17 Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 651-7.

- 18 Königshoff M, Brandenburger T. Kurzlehrbuch Biochemie, 2. Auflage Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 2007: 178-9, 225-7, 350-1, 398.
- 19 Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357: 266-81.
- 20 Lange NE, Litonjua A, Hawrylowicz CM, Weiss S. Vitamin D, the immune system and asthma. *Expert Rev Clin Immunol* 2009; 5: 693-702.
- 21 Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, et al. Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. *Science* 1980; 210: 203-5.
- 22 Holick MF, MacLaughlin JA, Doppelt SH. Regulation of cutaneous previtamin D3 photosynthesis in man: skin pigment is not an essential regulator. *Science* 1981; 211: 590-3.
- 23 Bikle DD. Vitamin D: newly discovered actions require reconsideration of physiologic requirements. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21: 375-84.
- 24 Orton SM, Morris AP, Herrera BM, et al. Evidence for genetic regulation of vitamin D status in twins with multiple sclerosis. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 441-7.
- 25 Signorello LB, Shi J, Cai Q, et al. Common variation in vitamin D pathway genes predicts circulating 25-hydroxyvitamin D Levels among African Americans. *PLoS One* 2011; 6: e28623.
- 26 Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics* 2008; 122: 398-417.
- 27 Makin G, Lohnes D, Byford V, Ray R, Jones G. Target cell metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 to calcitroic acid. Evidence for a pathway in kidney and bone involving 24-oxidation. *Biochem J* 1989; 262: 173-80.
- 28 Ramos-Lopez E, Brück P, Jansen T, Pfeilschifter JM, Radeke HH, Badenkoop K. CYP2R1-, CYP27B1- and CYP24-mRNA expression in German type 1 diabetes patients. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103: 807-10.
- 29 Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, et al. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 2685-95.
- 30 Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, et al. Molecular Mechanisms of Vitamin D Action. *Calcif Tissue Int* 2012; 92: 77-98.
- 31 Jung C, Ou YC, Yeung F, Frierson HF Jr, Kao C. Osteocalcin is incompletely spliced in non-osseous tissues. *Gene* 2001; 271: 143-50.
- 32 Movahed A, Larijani B, Nabipour I, et al. Reduced serum osteocalcin concentrations are associated with type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome components in postmenopausal women: the crosstalk between bone and energy metabolism. *J Bone Miner Metab* 2012; 30: 683-91.
- 33 Raymond MH, Schutte BC, Torner JC, Burns TL, Willing MC. Osteocalcin: genetic and physical mapping of the human gene BGLAP and its potential role in postmenopausal osteoporosis. *Genomics* 1999; 60: 210-7.

- 34 Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 6665-9.
- 35 Rodrigues AM, Caetano-Lopes J, Vale AC, et al. Low osteocalcin/collagen type I bone gene expression ratio is associated with hip fragility fractures. *Bone* 2012; 51: 981-9.
- 36 Chen L, Li Q, Yang Z, et al. Osteocalcin, glucose metabolism, lipid profile and chronic low-grade inflammation in middle-aged and elderly Chinese. *Diabet Med* 2012; 30: 309-17.
- 37 Shinki T, Shimada H, Wakino S, et al. Cloning and expression of rat 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 12920-5.
- 38 Kolek OI, Hines ER, Jones MD, et al. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 upregulates FGF23 gene expression in bone: the final link in a renal-gastrointestinal-skeletal axis that controls phosphate transport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G1036-42.
- 39 Murayama A, Takeyama K, Kitanaka S, et al. Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1alpha,25(OH)2D3 in intact animals. *Endocrinology* 1999; 140: 2224-31.
- 40 Ohyama Y, Ozono K, Uchida M, et al. Identification of a vitamin D-responsive element in the 5'-flanking region of the rat 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase gene. *J Biol Chem* 1994; 269: 10545-50.
- 41 Kim MS, Fujiki R, Kitagawa H, Kato S. 1alpha,25(OH)2D3-induced DNA methylation suppresses the human CYP27B1 gene. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 265-266: 168-73.
- 42 Murayama A, Kim MS, Yanagisawa J, Takeyama K, Kato S. Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *The EMBO journal* 2004; 23: 1598-608.
- 43 Bailey R, Cooper JD, Zeitels L, et al. Association of the vitamin D metabolism gene CYP27B1 with type 1 diabetes. *Diabetes* 2007; 56: 2616-21.
- 44 Kitanaka S, Takeyama K, Murayama A, et al. Inactivating mutations in the 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene in patients with pseudovitamin D-deficiency rickets. *N Engl J Med* 1998; 338: 653-61.
- 45 Panda DK, Miao D, Tremblay ML, et al. Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1alpha -hydroxylase enzyme: evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 7498-503.
- 46 McGrath JJ, Saha S, Burne TH, Eyles DW. A systematic review of the association between common single nucleotide polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121: 471-7.
- 47 Sundqvist E, Bäärnhielm M, Alfredsson L, Hillert J, Olsson T, Kockum I. Confirmation of association between multiple sclerosis and CYP27B1. *Eur J Hum Genet* 2010; 18: 1349-52.

- 48 Köstner K, Denzer N, Muller CS, Klein R, Tilgen W, Reichrath J. The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature. *Anticancer Res* 2009; 29: 3511-36.
- 49 Buselmeier W. *Biologie für Mediziner*, 12. Auflage Heidelberg: Springer Verlag, 2012: 117, 236-9.
- 50 Australian and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium (ANZgene). Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. *Nat Genet* 2009; 41: 824-8.
- 51 Simon KC, Munger KL, Kraft P, Hunter DJ, De Jager PL, Ascherio A. Genetic predictors of 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *J Neurol* 2011; 258: 1676-82.
- 52 Clifton-Bligh RJ, Nguyen TV, Au A, et al. Contribution of a common variant in the promoter of the 1-alpha-hydroxylase gene (CYP27B1) to fracture risk in the elderly. *Calcif Tissue Int* 2011; 88: 109-16.
- 53 Penna-Martinez M, Ramos-Lopez E, Stern J, et al. Impaired vitamin D activation and association with CYP24A1 haplotypes in differentiated thyroid carcinoma. *Thyroid* 2012; 22: 709-16.
- 54 Jennings CE, Owen CJ, Wilson V, Pearce SHS. A haplotype of the CYP27B1 promoter is associated with autoimmune Addison's disease but not with Graves' disease in a UK population. *J Mol Endocrinol* 2005; 34: 859-63.
- 55 Ramos Lopez E, Zwermann O, Segni M, et al. A promoter polymorphism of the CYP27B1 gene is associated with Addison's disease, Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease and type 1 diabetes mellitus in Germans. *Eur J Endocrinol* 2004; 151: 193-7.
- 56 Hyppönen E, Berry DJ, Wjst M, Power C. Serum 25-hydroxyvitamin D and IgE - a significant but nonlinear relationship. *Allergy* 2009; 64: 613-20.
- 57 Ramos-Lopez E, Kahles H, Weber S, Kukic M, Penna-Martinez M, Badenkoop K. Gestational diabetes mellitus and vitamin D deficiency: genetic contribution of CYP27B1 and CYP2R1 polymorphisms. *Diabetes Obes Metab* 2008; 10: 683-5.
- 58 Holt SK, Kwon EM, Koopmeiners JS, et al. Vitamin D pathway gene variants and prostate cancer prognosis. *Prostate* 2010; 70: 1448-60.
- 59 Hsu JY, Feldman D, McNeal JE, Peehl DM. Reduced 1alpha-hydroxylase activity in human prostate cancer cells correlates with decreased susceptibility to 25-hydroxyvitamin D3-induced growth inhibition. *Cancer Res* 2001; 61: 2852-6.
- 60 Chen KS, DeLuca HF. Cloning of the human 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1263: 1-9.
- 61 Schlingmann KP, Kaufmann M, Weber S, et al. Mutations in CYP24A1 and idiopathic infantile hypercalcemia. *N Engl J Med* 2011; 365: 410-21.

- 62 Masuda S, Byford V, Arabian A, et al. Altered pharmacokinetics of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in the blood and tissues of the 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (Cyp24a1) null mouse. *Endocrinology* 2005; 146: 825-34.
- 63 Ren S, Nguyen L, Wu S, Encinas C, Adams JS, Hewison M. Alternative splicing of vitamin D-24-hydroxylase: a novel mechanism for the regulation of extrarenal 1,25-dihydroxyvitamin D synthesis. *J Biol Chem* 2005; 280: 20604-11.
- 64 Bosse Y, Lemire M, Poon AH, et al. Asthma and genes encoding components of the vitamin D pathway. *Respir Res* 2009; 10: 98.
- 65 Wjst M, Altmüller J, Faus-Kessler T, Braig C, Bahnweg M, André E. Asthma families show transmission disequilibrium of gene variants in the vitamin D metabolism and signalling pathway. *Respir Res* 2006; 7: 60.
- 66 Anderson MG, Nakane M, Ruan X, Kroeger PE, Wu-Wong JR. Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 57: 234-40.
- 67 National Center for Biotechnology Information (Accessed 16.01.2013 15:33, unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).
- 68 Schuessler M, Astecker N, Herzig G, Vorisek G, Schuster I. Skin is an autonomous organ in synthesis, two-step activation and degradation of vitamin D(3): CYP27 in epidermis completes the set of essential vitamin D(3)-hydroxylases. *Steroids* 2001; 66: 399-408.
- 69 van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97: 93-101.
- 70 Bikle DD, Chang S, Crumrine D, et al. Mice lacking 25OHD 1alpha-hydroxylase demonstrate decreased epidermal differentiation and barrier function. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89-90: 347-53.
- 71 Schaubert J, Gallo RL. The vitamin D pathway: a new target for control of the skin's immune response? *Exp Dermatol* 2008; 17: 633-9.
- 72 Mutgi K, Koo J. Update on the Role of Systemic Vitamin D in Atopic Dermatitis. *Pediatr Dermatol* 2013; 30: 303-7.
- 73 Javanbakht MH, Keshavarz SA, Djalali M, et al. Randomized controlled trial using vitamins E and D supplementation in atopic dermatitis. *J Dermatolog Treat* 2011; 22: 144-50.
- 74 Sidbury R, Sullivan AF, Thadhani RI, Camargo CA. Randomized controlled trial of vitamin D supplementation for winter-related atopic dermatitis in Boston: a pilot study. *Br J Dermatol* 2008; 159: 245-7.
- 75 Vähävihi K, Ala-Houhala M, Peric M, et al. Narrowband ultraviolet B treatment improves vitamin D balance and alters antimicrobial peptide expression in skin lesions of psoriasis and atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2010; 163: 321-8.
- 76 Vähävihi K, Ylianttila L, Salmelin R, et al. Heliotherapy improves vitamin D balance and atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2008; 158: 1323-8.

- 77 Bäck O, Blomquist HK, Hernell O, Stenberg B. Does vitamin D intake during infancy promote the development of atopic allergy? *Acta dermato-venereologica* 2009; 89: 28-32.
- 78 Ong PY, Ohtake T, Brandt C, et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2002; 347: 1151-60.
- 79 Adorini L, Penna G, Giarratana N, et al. Dendritic cells as key targets for immunomodulation by Vitamin D receptor ligands. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89-90: 437-41.
- 80 Froicu M, Weaver V, Wynn TA, McDowell MA, Welsh JE, Cantorna MT. A crucial role for the vitamin D receptor in experimental inflammatory bowel diseases. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 2386-92.
- 81 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: 1078-82.
- 82 Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology* 1993; 186: 23-31.
- 83 Darsow U, Wollenberg A, Simon D, et al. ETFAD/EADV eczema task force 2009 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010; 24: 317-28.
- 84 Roche. The LightCycler - the Smartest Innovation for More Efficient PCR. *Biochemica* 1998; 2: 4-7.
- 85 TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, 2009. (Accessed 15.04.2013 10:45, unter <http://www.tib-molbiol.de/de/lightcycler/principle/realtime.html>)
- 86 User Manual Haploview, 2013. (Accessed 30.08.2013 10:23, unter <http://www.broadinstitute.org/science/programs/medical-and-population-genetics/haploview/output-file-formats>)
- 87 Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M, Schweiger MR. *Biologie und molekulare Medizin für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 7. Auflage Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2009: 84-8, 146.
- 88 Weiß C. *Basiswissen medizinische Statistik*. 5. Auflage Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2010: 80-7, 208-27.
- 89 Bland JM, Altman DG. Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ* 1995; 310: 170.
- 90 UCSC Genome Browser. (Accessed 17.07.2013 18:36, unter <http://genome.ucsc.edu/>)
- 91 Nardone J, Lee DU, Ansel KM, Rao A. Bioinformatics for the 'bench biologist': how to find regulatory regions in genomic DNA. *Nat Immunol* 2004; 5: 768-74.
- 92 VISTA, 1997-2013. (Accessed 18.07.2013 14:12, unter <http://genome.lbl.gov/vista/rvista/submit.shtml>)

- 93 Webb AR, Kline L, Holick MF. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D<sub>3</sub>: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D<sub>3</sub> synthesis in human skin. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 373-8.
- 94 Staal A, van Wijnen AJ, Birkenhager JC, et al. Distinct conformations of vitamin D receptor/retinoid X receptor- $\alpha$  heterodimers are specified by dinucleotide differences in the vitamin D-responsive elements of the osteocalcin and osteopontin genes. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 1444-56.
- 95 Wang TJ, Zhang F, Richards JB, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet* 2010; 376: 180-8.
- 96 Li M, Hener P, Zhang Z, Kato S, Metzger D, Chambon P. Topical vitamin D<sub>3</sub> and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 11736-41.
- 97 Moll I, Augustin M, Bahmer F, et al. *Atopische Dermatitis. Duale Reihe Dermatologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2005: 158-65.
- 98 Ellinghaus D, Baurecht H, Esparza-Gordillo J, et al. High-density genotyping study identifies four new susceptibility loci for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2013; 45: 808-12.
- 99 Hartmann B, Heine G, Babina M, et al. Targeting the vitamin D receptor inhibits the B cell-dependent allergic immune response. *Allergy* 2011; 66: 540-8.
- 100 Samochocki Z, Bogaczewicz J, Jeziorkowska R, et al. Vitamin D effects in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2013; 69: 238-44.
- 101 Brown J, Ignatius A, Amling M, Barvencik F. New perspectives on vitamin D sources in Germany based on a novel mathematical bottom-up model of 25(OH)D serum concentrations. *Eur J Nutr* 2012.
- 102 Byremo G, Rod G, Carlsen KH. Effect of climatic change in children with atopic eczema. *Allergy* 2006; 61: 1403-10.
- 103 Heimbeck I, Wjst M, Apfelbacher CJ. Low vitamin D serum level is inversely associated with eczema in children and adolescents in Germany. *Allergy* 2013; 68: 906-10.
- 104 Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin d<sub>3</sub> has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th<sub>2</sub> cells. *J Immunol* 2001; 167: 4974-80.
- 105 Thyssen JP, Thuesen B, Huth C, et al. Skin barrier abnormality caused by filaggrin (FLG) mutations is associated with increased serum 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130: 1204-7 e2.
- 106 Haeck I, van Velsen S, de Bruin-Weller M, Buijnzeel-Koomen C. Bone mineral density in patients with atopic dermatitis. *Chem Immunol Allergy* 2012; 96: 96-9.
- 107 Gillie O. Sunlight robbery: a critique of public health policy on vitamin D in the UK. *Mol Nutr Food Res* 2012; 54: 1148-63.

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abb. 1: Pathogenese der atopischen Dermatitis.....   | 9  |
| Abb. 2: Die Physiologie des Vitamin D-Stoffwechsels .....  | 11 |
| Abb. 3: Regulation der renalen 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> -Synthese über <i>Cyp27b1</i> und <i>Cyp24a1</i> ... | 14 |
| Abb. 4: Position der untersuchten SNPs auf dem Gen <i>Cyp27b1</i> .....  | 15 |
| Abb. 5: Position der untersuchten SNPs auf dem Gen <i>Cyp24a1</i> .....  | 18 |
| Abb. 6: Prinzip der RT-PCR am LightCycler zur Genotypisierung.....   | 31 |
| Abb. 7: LD-Muster der Kopplungsanalyse, am Beispiel <i>Cyp27b1</i> .....   | 34 |
| Abb. 8: Darstellung der untersuchten Polymorphismen.....   | 36 |
| Abb. 9: Evolutionäre Konservierung der <i>Cyp27b1</i> -Gensequenz .....  | 38 |
| Abb. 10: LD-Muster des <i>Cyp27b1</i> -Genes.....  | 41 |
| Abb. 11: Evolutionäre Konservierung der <i>Cyp24a1</i> -Gensequenz .....   | 42 |
| Abb. 12: LD-Muster des <i>Cyp24a1</i> -Genes.....  | 45 |
| Abb. 13: Vergleich der 25(OH)D-Konzentrationen von AD-Patienten und Kontrollen....                                       | 47 |
| Abb. 14: Osteocalcinkonzentrationen bei AD-Patienten und gesunden Kontrollen .....                                       | 47 |
| Abb. 15: Schwache Korrelation von Osteocalcin- und 25(OH)D-Serumkonzentration ..   | 48 |
| Abb. 16: Keine Korrelation zwischen 25(OH)D-Konzentration und SCORAD .....   | 52 |

## Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tab. 1: AD-assoziierte Gene (Auswahl) .....                                    | 7  |
| Tab. 2: Der Einfluss von Vitamin D auf die atopische Dermatitis.....           | 22 |
| Tab. 3: Primer und Sonden für die PCR .....                                    | 25 |
| Tab. 4: Standardprotokoll für den PCR-Mix.....                                 | 28 |
| Tab. 5: Thermocycler PCR-Programm .....  | 28 |
| Tab. 6: Primerhybridisierungstemperatur und Elongationszeit .....              | 29 |
| Tab. 7: Primerpaarkombination mit ihrer Fragmentlänge .....                    | 29 |
| Tab. 8: Bedingungen der PCR zur Genotypisierung.....                           | 32 |
| Tab. 9: Schmelzpunkte der Sonden .....   | 33 |
| Tab. 10: Population der AD-Patienten und gesunden Kontrollen .....             | 37 |
| Tab. 11: Genotypenverteilung der <i>Cyp27b1</i> -Polymorphismen .....          | 39 |
| Tab. 12: Verteilung der Allele der <i>Cyp27b1</i> -Polymorphismen .....        | 40 |
| Tab. 13: <i>Cyp27b1</i> -Haplotypenanalyse bei AD-Patienten und Gesunden ..... | 41 |
| Tab. 14: Verteilung der Genotypen der <i>Cyp24a1</i> -Polymorphismen .....     | 44 |
| Tab. 15: Verteilung der Allele der <i>Cyp24a1</i> -Polymorphismen .....        | 44 |
| Tab. 16: <i>Cyp24a1</i> -Haplotypenanalyse bei AD-Patienten und Gesunden ..... | 46 |
| Tab. 17: Vergleich der 25(OH)D-Mittelwerte der verschiedenen Genotypen.....    | 50 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| °C                                   | Grad Celsius   |
| µl                                   | Mikroliter   |
| µM                                   | Mikromol   |
| 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> | 1,25-Dihydroxycholecalciferol  |
| 25(OH)D                              | 25-Hydroxycholecalciferol  |
| 7-DHC                                | 7-Dehydrocholesterol   |
| A                                    | Antisense Primer   |
| A                                    | Adenin   |
| AA                                   | allergisches Asthma bronchiale   |
| Abb.                                 | Abbildung  |
| AD                                   | atopische Dermatitis   |
| AMPs                                 | antimikrobielle Peptide  |
| AP-2                                 | Aktivierungsprotein 2 (engl. activating protein 2)   |
| APC                                  | antigen-präsentierende Zellen  |
| Aqua dest.                           | einfach destilliertes Wasser (lat. aqua destilata)   |
| AR                                   | Rhinitis allergica   |
| <i>BGLAP</i>                         | Knochen-γ-Karboxylglutaminsäure enthaltendes Protein (engl. bone γ-carboxylglutamic acid-containing protein) |
| Bp                                   | Basenpaar  |
| BSA                                  | bovines Serumalbumin   |
| C                                    | Cytosin  |
| Ca                                   | Kalzium  |
| CD                                   | Oberflächenrezeptor auf Immunzellen (engl. cluster of differentiation)                                       |
| cOC                                  | karboxyliertes Osteocalcin   |
| Cy5                                  | Cyanin – 5   |
| <i>Cyp24a1</i>                       | Gen, dass für die 24-Hydroxylase (CYP24A1) kodiert   |
| <i>Cyp27a1</i>                       | mitochondriales 25-Hydroxylase-Gen   |
| <i>Cyp27b1</i>                       | Gen, dass für die 1α-Hydroxylase (CYP27B1) kodiert   |
| <i>Cyp2r1</i>                        | mikrosomales 25-Hydroxylase-Gen  |
| DBP                                  | Vitamin D-bindendes-Protein  |
| DCs                                  | dendritische Zellen  |
| DMSO                                 | Dimethylsulfoxid   |
| DNA                                  | Desoxynukleinsäure   |
| dNTP                                 | Desoxynukleotidtriphosphat   |
| EDTA                                 | Ethylendiamintetraacetat   |
| EIA                                  | Enzymimmunoassay   |
| ELISA                                | Enzymgekoppelter Immuno-Absorbtiions-Assay   |
| et al.                               | und andere (lat. et alii)  |
| F                                    | Foward Primer  |
| FGF23                                | Fibroblast-Growth-Factor23   |

|                   |   |
|-------------------|---|
| FITC              | Fluoresceinisothiocyanat  |
| FL                | Fluorescein   |
| FLG               | Filaggrin   |
| FRET              | Fluorescence Resonance Energy Transfer  |
| g                 | Erdbeschleunigung   |
| G                 | Guanin  |
| GM-CSF            | Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (engl. granulocyte macrophage colony-stimulating factor) |
| H <sub>2</sub> O  | Wasser  |
| HBD               | humanes $\beta$ -Defensin   |
| het               | heterozygot   |
| HWE               | Hardy-Weinberg-Equilibrium  |
| HWZ               | Halbwertszeit   |
| IDECs             | Inflammatorische dendritische epidermale Zellen (engl. inflammatory dendritic epidermal cells)                  |
| IgE               | Immunglobulin E   |
| IL                | Interleukin   |
| INF- $\gamma$     | Interferon gamma  |
| IQR               | Interquartilabstand (engl. interquartile range)   |
| IU                | internationale Einheiten  |
| kb                | Kilobase  |
| KI                | Konfidenzintervall  |
| l                 | Liter   |
| LC                | Light Cycler  |
| LC640             | Fluorophor, dessen Emissionsfluoreszenz bei 640nm gemessen wird   |
| LCs               | Langerhanszellen  |
| LD                | Kopplungsungleichgewicht (engl. linkage disequilibrium)   |
| LED               | Leuchtdiode (engl. Light-emitting diode)  |
| LL-37             | Cathelicidin in einer Peptidform  |
| MCP-1             | Monozyten chemotaktisches Protein 1   |
| MgCl <sub>2</sub> | Magnesiumchlorid  |
| min               | Minuten   |
| ml                | Milliliter  |
| mM                | Millimol  |
| mRNA              | Boten- (engl. Messenger) Ribonukleinsäure   |
| MS                | Multiple Sklerose   |
| mut               | Mutante   |
| MW                | Mittelwert  |
| n                 | Anzahl  |
| ng                | Nanogramm   |
| nm                | Nanometer   |
| nM                | Nanomol   |

|                    |  |
|--------------------|--|
| OR                 | Odds Ratio   |
| P                  | Phosphat   |
| PBMCs              | Periphere mononukleäre Blutzellen (engl. peripheral blood mononuclear cells) |
| PCR                | Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)                  |
| $p_{\text{korr}}$  | p-Wert des Permutationstests   |
| pmol               | Picomol  |
| PTH                | Parathormon  |
| R                  | Reverse Primer   |
| r                  | Korrelationskoeffizient nach Pearson   |
| $r^2$              | Korrelationskoeffizient bzw. Bestimmtheitsmaß                                |
| RNA                | Ribonukleinsäure   |
| RT-PCR             | Real-time PCR  |
| RXR                | Retinoid-X-Rezeptor  |
| S                  | Sense Primer   |
| s                  | Sekunde  |
| SCORAD             | SCORing Atopic Dermatitis  |
| SD                 | Standardabweichung   |
| SNP                | Einzelnukleotidpolymorphismus (engl. single nucleotide polymorphism)         |
| T                  | Temperatur   |
| T                  | Thymin   |
| Tab.               | Tabelle  |
| TGF- $\beta$ 1     | Tumor-Wachstumsfaktor $\beta_1$ (engl. tumor growth factor- $\beta$ 1)       |
| Th-Zellen          | T-Helferzellen   |
| TLR                | Toll-like-Rezeptor   |
| TMB                | TRIS-Borat-EDTA-Puffer   |
| TNF $\alpha/\beta$ | Tumornekrosefaktor alpha/beta  |
| TSLP               | Interleukin-7-like thymic stromal lymphopoetin                               |
| UTR                | Nicht-translatierte Region (engl. untranslated region)                       |
| UV                 | Ultraviolett   |
| VD                 | Vitamin D  |
| VD3                | Vitamin D3 (Cholecalciferol)   |
| VDDR1              | Vitamin D-abhängigen Rachitis Typ I  |
| VDIR               | Vitamin D-interagierender Repressor  |
| VDR                | Vitamin D-Rezeptor   |
| VDRE               | Vitamin D-Antwortelement (engl. vitamin D reponse element)                   |
| wt                 | Wildtyp  |
| x                  | mal (Vielfaches)   |

## Lebenslauf

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



## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jana Hallau, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Häufigkeit von Genpolymorphismen im Vitamin D-Signalweg bei Patienten mit atopischer Dermatitis 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.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, 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.“

Datum

Unterschrift

## Danksagung

Frau Prof. Dr. M. Worm danke ich herzlichst für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie die gute und anregende Unterstützung als Doktormutter bei der Ausgestaltung dieser Arbeit.

Ich möchte mich bei meinem direkten Betreuer Dr. G. Heine für die gute Zusammenarbeit bedanken. Er hat wesentlich durch die exzellente wissenschaftliche Beratung zu inhaltlichen Punkten, Auswertungen, Interpretationen und statistischen Analysen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Der AG Schumann, insbesondere Fränzi und Diana, bin ich für die geduldige Einarbeitung in die Versuchsmethoden, die fachliche Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre dankbar.

Ein großes Dankeschön gilt all denjenigen, die sich für die sorgfältige und kritische Durchsicht meiner Promotionsschrift Zeit genommen haben.

Einen ganz besonderen Dank schulde ich meiner Familie, die mich auf jedem meiner Wege unterstützen und ohne die vieles nicht möglich gewesen wäre.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Freunden, insbesondere Loreen und Markus, meinen Dank aussprechen, die mich immer wieder motiviert und mir geholfen haben.