

Aus dem  
CharitéCentrum 12 für Innere Medizin und Dermatologie  
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. T. Zuberbier

## **Habilitationsschrift**

# Regulation von Typ I-allergischen Immunantworten durch Vitamin D

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Dermatologie und Venerologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Arndt Guido Heine**

geboren am 12. Mai 1975 in Solingen

Eingereicht: Dezember 2013  
Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich  
Gutachter/in: Prof. Dr. med. Thomas Werfel  
Gutachter/in: Prof. Dr. med. Hans-F. Merk

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
1.1	<b>Funktionen von B-Lymphozyten bei der Typ I-Allergie</b>	<b>4</b>
1.1.1	Typ I-allergische Sensibilisierung aus Sicht der B-Zelle	4
1.1.2	Die klinische Typ I-allergische Reaktion und Funktionen von B-Zellen	6
1.1.3	Anti-inflammatorische Funktionen von B-Zellen	7
1.2	<b>Physiologische und pathophysiologische Wirkungen von Vitamin D</b>	<b>8</b>
1.2.4	Vitamin D Stoffwechsel und Wirkmechanismus	8
1.2.5	Wirkungen von Calcitriol auf Immunzellen	9
1.2.6	Endogene Calcitriol-Synthese verändert die Immunantwort	11
1.2.7	Wirkungen von Vitamin D bei immunologischen Erkrankungen	11
1.3	<b>Zielsetzung</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>EIGENE ARBEITEN</b>	<b>17</b>
2.1	<b>Calcitriol fördert die IL-10 Expression in humanen B-Zellen</b>	<b>17</b>
2.2	<b>Vitamin D-Rezeptor-vermittelte Hemmung der B-Zell-abhängigen Typ I-allergischen Immunantwort</b>	<b>28</b>
2.3	<b>Liver-X-Rezeptoren vermittelte Kontrolle der IgE-Expression in B-Zellen</b>	<b>39</b>
2.4	<b>Assoziation des TLR2 Promotor Polymorphismus A-16934-T mit schwerer atopischer Dermatitis</b>	<b>48</b>
2.5	<b>Zusammenhang zwischen Vitamin D-Rezeptor-Punktmutationen und schwerer atopischer Dermatitis bei Erwachsenen</b>	<b>58</b>
<b>3</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>63</b>
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>71</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>73</b>
5.1	Literaturverzeichnis der eigenen Publikationen	73
5.2	Literaturverzeichnis aller Autoren	75
<b>6</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>86</b>

## Abkürzungsverzeichnis

25(OH)D	25-Hydroxyvitamin D, Speichermetabolit, Calcitriol-Vorstufe
AD	atopische Dermatitis
AID	<i>activation induced cytidin deaminase</i>
APC	Antigen-präsentierende Zelle
Calcitriol	1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D, aktiver Metabolit
CYP24A1	Vitamin D-24-Hydroxylase
CYP27B1	25-Hydroxyvitamin-D-1 $\alpha$ -Hydroxylase
HWZ	Halbwertszeit
IFN	Interferon
I $\epsilon$	IgE-Switchtranskriptpromotor
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KO	<i>knockout</i>
LXR	<i>Liver-X-receptor</i>
MS	Multiple Sklerose
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor-kappa B</i>
SCORAD	<u>SCOR</u> ing <u>A</u> topic <u>D</u> ermatitis
STAT6	<i>signal transducer and activator of transcription-6</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TLR	<i>toll-like-receptor</i>
TT	Tetanus Toxoid
UV	ultraviolettes Licht (200-380 nm)
VDR	Vitamin D-Rezeptor
Vitamin D	Cholecalciferol, unhydroxyliertes Seco-Steroid, aus Nahrung oder UV-Biosynthese stammend, 25(OH)D-Vorstufe

# 1 Einleitung

Typ I-Allergien zählen zu den häufigsten Erkrankungen<sup>1-3</sup>. Sie manifestieren sich meist in allergischer Rhinokonjunktivitis, allergischem Asthma bronchiale oder Nahrungsmittelallergie<sup>2,4</sup>. Auch bei der atopischen Dermatitis, einer der häufigsten chronischen Hauterkrankungen, können Typ I-Allergien eine wichtige Rolle spielen<sup>4,5</sup>. In den letzten Jahren wurden zahlreiche pathogenetische Mechanismen charakterisiert und die Effektivität symptomatischer Therapie verbessert<sup>6</sup>. Doch bis heute sind die kausalen, kurativen Therapieoptionen limitiert<sup>7</sup>.

Vitamin D vermittelt neben den bekannten Funktionen im Calciumstoffwechsel zahlreiche immunologische Wirkungen<sup>8,9</sup>. Diese beinhalten die Beeinflussung der Aktivierung und Differenzierung von Immunzellen, die bei Typ I-Allergien relevant sind. Eigene Daten zeigen, dass Schlüsselprozesse von Typ I-Allergien durch Vitamin D-vermittelte Mechanismen beeinflusst werden können. Ein besseres Verständnis dieser Mechanismen könnte dazu beitragen neue therapeutische Konzepte zur Behandlung von Typ I-Allergien zu entwickeln.

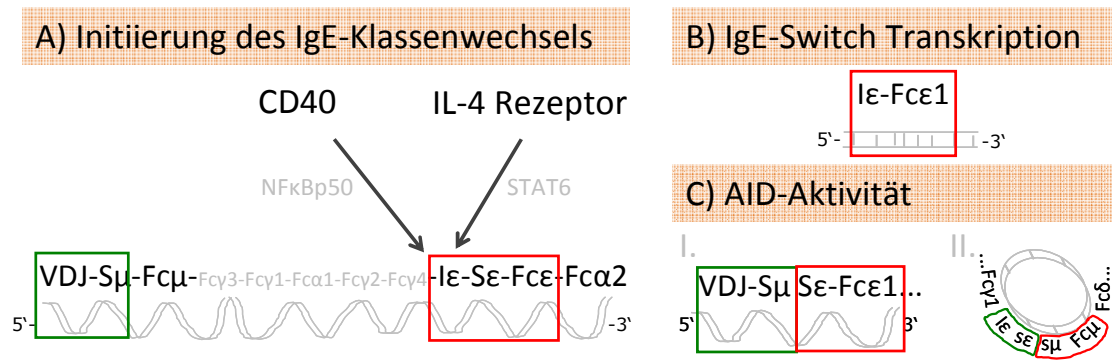
## 1.1 Funktionen von B-Lymphozyten bei der Typ I-Allergie

Typ I-allergische Reaktionen nach Coombs und Gell<sup>10</sup> sind IgE vermittelt. Sie sind durch hohe Intensität nach Kontakt mit geringen Antigen-Mengen gekennzeichnet, dem sogenannten Allergen. B-Zellen sind in der Pathogenese dieser Reaktionen auf unterschiedlichen Ebenen bedeutsam: nach Isotypenklassenwechsel und Differenzierung zu Plasmazellen durch Sekretion von IgE, als potente Antigen-präsentierende Zellen, sowie durch die Freisetzung von Zytokinen<sup>11</sup>.

### 1.1.1 Typ I-allergische Sensibilisierung aus Sicht der B-Zelle

Der initiale Prozess bei Typ I-Allergien ist die Allergen-spezifische Sensibilisierung<sup>4,12</sup>. Diese verläuft klinisch inapparent. B-Lymphozyten spielen als Effektorzellen durch zwei unabhängige Prozesse dabei eine zentrale Rolle: durch den Isotypenklassenwechsel zum Immunglobulin der Klasse-E (IgE) gefolgt von der Differenzierung zu Plasmazellen die Allergen-spezifisches IgE sezernieren.

Durch Isotypenklassenwechsel (engl. *isotype class switch recombination*) wird die humorale Immunantwort funktionell der spezifischen Situation angepasst. Reife, naive B-Zellen exprimieren Antigen-spezifische IgD/IgM auf der Oberfläche und zeigen keine molekularen Anzeichen des Isotypenklassenwechsels<sup>13,14</sup>. Die Antigenbindung und definierte Signale kostimulatorischer Moleküle initiieren eine komplexen Sequenz, in deren Folge die genetische Information von Antigen-spezifischen VDJ-Segmenten der schweren Immunglobulinkette mit einem Isotyp-spezifischen Fc-Teil rekombiniert wird<sup>14-16</sup>. Für die Induktion des IgE-Klassenwechsels ist der B-Zellkontakt mit T-Helferzellen vom Typ-2 (Th2-Zellen) die IL-4 sezernieren essentiell<sup>12,17,18</sup> (Abbildung 1A).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des IgE-Isotypenklassenwechsels.** A) Durch CD40/IL-4-Rezeptor-abhängige Signale wird der IgE-Isotypenklassenwechsel nach Bindung der Signaltransduktionsmoleküle *nuclear factor κ-B p50* (NFκBp50) *transducer and activator of transcription-6* (STAT6) an die IgE-Promotorregion Iε initiiert. B) Die Transkription des IgE-Switchtranskriptes ist für den Isotypenklassenwechsel essentiell. C) Durch Aktivität des Enzyms AID wird durch Einfügen von DNA-Doppelstrangbrüchen und Verbindung der freien Enden I.) die unveränderte variable Region VDJ mit dem Gen der schweren IgE-Kette verbunden und II.) das exzidierte Kreistranskript hergestellt. Darstellung modifiziert nach<sup>12,16</sup>.

Die Ligandenbindung des CD40-Antigens und des IL-4-Rezeptors induziert das essentielle IgE-Switch Transkript (synonym ε-Keimbahntranskript) über Bindung der Transkriptionsfaktoren *nuclear factor κ-B p50* (NFκBp50) und *signal transducer and activator of transcription-6* (STAT6) in der Promotorregion Iε<sup>19</sup> (Abbildung 1B). Die Bedeutung dieses Transkripts wird deutlich, da Deletion des *switch promoters* in Isotyp-spezifischer Aglobulinämie resultiert<sup>20</sup>. Für die Rekombination der Antigen-spezifischen VDJ-Gensequenz mit dem Fcε-Gen ist das Enzym *activation induced cytidin deaminase* (AID) entscheidend<sup>21-23</sup> (Abbildung 1C). AID bewirkt gezielte DNA-Doppelstrangbrüche beider Chromosomen und die Rekrutierung ligierender Enzyme. Nach weiterem *splicing* entstehen funktionelle IgE-Antikörper mit erhaltener Spezifität (VDJ-Genen). Die Geninformation der Isotypen, die zwischen Fcμ und Fcε (IgM, IgG-Subklassen und IgA1) kodiert sind, werden herausgeschnitten und bilden das *circle transcript* (Abbildung 1C).

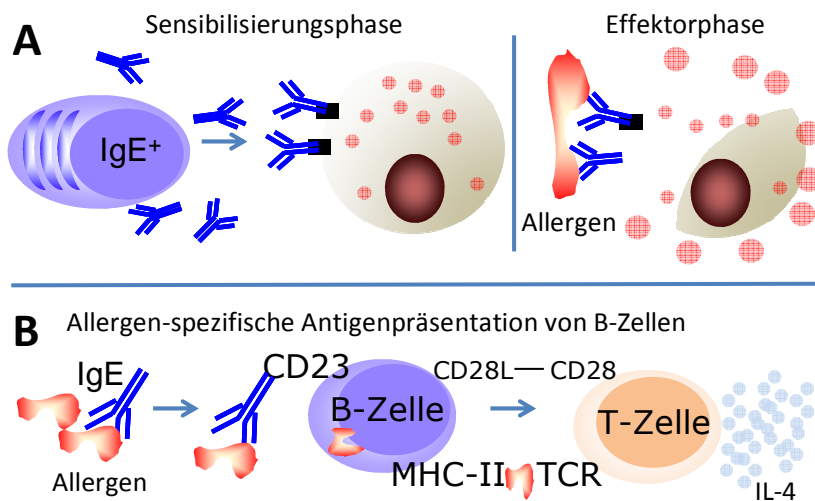
Für die Sekretion von IgE ist die Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Zellen notwendig. Diese wird durch Antigen, Zytokine wie IL-10 und IL-21 und Zell-Zell-Kontakt-abhängige Signale vermittelt<sup>24,25</sup>. Im Mausmodell differenzieren die meisten IgE<sup>+</sup> B-Gedächtniszellen zu kurzlebigen IgE-sezernierenden Plasmablasten<sup>26</sup>. Entsprechend sind bei Patienten mit saisonaler allergischer Rhinitis die spezifische IgE-Serumkonzentration nur kurzfristig während der Pollenflug-saison erhöht<sup>27</sup>. Einige wenige Plasmazellen können jedoch lebenslang überwiegend im Knochenmark überleben<sup>25,28</sup>. Diese wurden vom IgE-Isotyp erstmals 1983 in subletal-bestrahlten Ratten nachgewie-sen<sup>29</sup>. Langlebige Plasmazellen sind gegen konservative Therapie resistent<sup>25</sup>, da sie kein CD20 (anti-CD20, Rituximab) exprimieren und nicht proliferieren (Cyclophosphamid, Glukokortikoide). Entspre-chend fallen beispielsweise nach Behandlung mit anti-CD20 (Rituximab) die spezifischen und/oder

gesamt-IgE-Serumkonzentrationen nur gering und kurzfristig ab (<50%)<sup>30-33</sup> und kehren auch nach anti-IgE-Therapie (Omalizumab) binnen weniger Wochen zum Ausgangswert zurück<sup>34</sup>. Somit sind die Allergen-spezifischen B-Gedächtniszellen nach Differenzierung zu langlebigen IgE-sezernierenden Plasmazellen ein zelluläres Korrelat der Chronizität von Typ I-Allergien.

### 1.1.2 Die klinische Typ I-allergische Reaktion und Funktionen von B-Zellen

Die klinische Typ I-allergische Reaktion wird nach Sofort- und Spättyp unterschieden (Abbildung 2). Die Sofortreaktion tritt Minuten nach Allergenkontakt auf. Die Bindung des Allergens führt zur Kreuzvernetzung mehrerer spezifischer IgE-Moleküle, die an den hochaffinen IgE-Rezeptor auf Effektorzellen (Mastzellen/Basophile) gebunden sind und anschließend zur Freisetzung präformierter Mediatoren führen<sup>4</sup> (Abbildung 2A). Zu diesen Mediatoren zählen u.a. Histamin, Tryptase, Leukotriene und unterschiedliche Zytokine<sup>12</sup>. Diese bewirken Vasodilatation, Juckreiz und Spasmen der glatten Muskulatur und führen zu den typischen klinischen Symptomen: Quaddelbildung (Urtikaria und Angioödem), Augenrötung, Niesen, Nasensekretion (allergischer Rhinokonjunktivitis, „Heuschnupfen“), Husten und Bronchokonstriktion (allergisches Asthma bronchiale), Diarrhoe/Emesis (Nahrungsmittelallergien) und Herz-Kreislauf-Reaktionen bis zum anaphylaktischem Schock<sup>4</sup>. Somit sind B-Lymphozyten für die Typ I-allergische Sofortreaktion bedeutsam, da sie nach IgE-Isotypenklassenwechsel und Differenzierung zu Plasmazellen spezifisches IgE sezernieren<sup>11,12</sup>.

Die Typ I-allergische Spätreaktion, ausgelöst mehrere Stunden nach Allergenkontakt durch anhaltende Sekretion der o.g. Mediatoren, ist durch Gewebeeinfiltration von Immunzellen einschließlich T-Helferzellen, myeloiden Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) und B-Zellen charakterisiert<sup>4</sup>. B-Zellen können als APCs fungieren in dem sie an Ig-gebundenes Antigen über spezifische Rezeptoren internalisieren, prozessieren und die Antigen-Peptide über MHC-II präsentieren können, wie Rock et al. in einer eleganten Pionierarbeit im Jahr 1984 gezeigt haben<sup>35</sup>. Relevant für Typ I-Allergien ist die „*facilitated antigen presentation*“: an IgE-gebundenes Allergen wird über den niedrig-affinen IgE-Rezeptor CD23 in B-Zellen aufgenommen und dessen Peptide über MHC-II-assoziiert T-Zellen präsentiert<sup>4,36</sup> (Abbildung 2B). In der Folge differenzieren Allergen-spezifische Th2-Zellen, die sowohl durch Sekretion von IL-4 auf das Gewebe sowie andere Immunzellen wirken.



**Abbildung 2: B-Zellen in der Typ I-allergischen Reaktion.** A) In der Sensibilisierungsphase bindet sezerniertes IgE an hochaffinen Rezeptoren auf Effektorzellen (Mastzellen, Basophile Granulozyten). Während der Effektorphase der Reaktion vom Soforttyp werden durch Allergen-Bindung und Kreuzvernetzung mehrerer IgE-Moleküle Effektorzellen aktiviert, die präformierte Entzündungsmediatoren (rote Kreise) freisetzen. B) Allergen-IgE-Komplexe werden über CD23 von B-Zellen internalisiert und über MHC-II T-Zellen präsentiert. Aktivierung des Antigen-spezifischen T-Zellrezeptors (TCR) und gleichzeitiger Kostimulation von CD28 durch CD80/CD86 (CD28-L) auf B-Zellen führt zur T-Helferzellaktivierung und zur Zytokinfreisetzung mit Präferenz des Th2-Leitzytokins IL-4 (blaue Kreise).

Entsprechend treten bei Kindern mit Tetanus Toxoid (TT)-spezifischen IgE-Antikörpern nach TT-Vakzinierung ausgeprägte Lokalreaktionen auf, die mit spezifischen Th2-Zellen assoziiert sind<sup>37,38</sup>. Die B-Zell-Depletion mit Rituximab (anti-CD20) führt bei Patienten mit Churg-Strauss-Syndrom zur Rückbildung der Bluteosinophilie sowie der IL-5 Serumkonzentrationen, das weitestgehend von Th2-Zellen stammt<sup>39</sup>. Somit tragen B-Zellen zum Erhalt der Typ I-allergischen Spätreaktion bei<sup>4</sup>.

### 1.1.3 Anti-inflammatorische Funktionen von B-Zellen

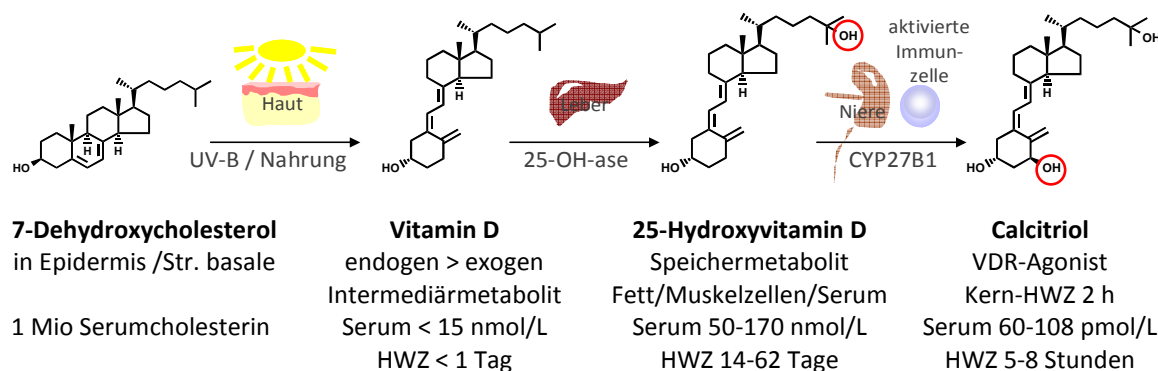
In den letzten Jahren wurden Antikörper-unabhängige, anti-inflammatorische Funktionen von B-Zellen entdeckt, die sich u.a. durch die Fähigkeit, das Zytokin IL-10 zu sezernieren, auszeichnen. Beispielsweise trat bei einem Patient mit Therapie-refraktärer Colitis ulcerosa nach B-Zell-Depletion eine Verstärkung der enteralen Entzündung auf bei gleichzeitig verminderter *ex vivo* IL-10-Sekretion regionaler Immunzellen<sup>40</sup>. Die anti-entzündliche, direkte Wirkung von IL-10 wird deutlich, da bei Patienten sowie bei Mäusen mit genetisch bedingtem Funktionsverlust eine schwere inflammatorische Darmerkrankung auftritt<sup>41, Kuhn, 1993 #749</sup>. Bei einem Patienten mit rheumatoider Arthritis trat nach B-Zell-Depletion erstmalig Psoriasis auf<sup>42</sup>; eine entzündliche Hauterkrankung, die durch IL-10 unterdrückt wird<sup>43</sup>. In Mäusen mit B-Zell-spezifischem Defekt des *IL10* Gens ist die Rückbildung experimenteller autoimmuner Enzephalitis (murines Modell der Multiplen Sklerose) aufgehoben<sup>44</sup>. Entsprechend unterdrücken IL-10 produzierende B-Zellen, nach *ex vivo* Expansion und therapeutischer Reinfusion, die zerebrale Entzündung in diesem Modell<sup>45</sup>. Weitere anti-entzündliche Funktionen von B-Zellen beinhalten die Differenzierung von IL-10<sup>+</sup>-Tr1 sowie Foxp3<sup>+</sup> Treg-Zellen, Sekretion des tolerogenen Zytokins TGFβ sowie Fas-induzierte Apoptose von T-Effektorzellen<sup>46</sup>. Untersuchungen der

direkten zellulären Interaktion zeigen *in vitro*, dass von humanen B-Zellen sezerniertes IL-10 die Proliferation von T-Zellen<sup>47</sup> sowie die Aktivierung von Monozyten<sup>48</sup> hemmt. Die Bedeutung dieser B-Zell-Funktionen für die Pathogenese der Typ I-Allergien ist bisher nicht bekannt.

## 1.2 Stoffwechsel und immunologische Wirkungen von Vitamin D

### 1.2.1 Vitamin D Stoffwechsel und Wirkmechanismus

Vitamin D ist eher ein Steroidhormon als ein klassisches Vitamin. Abgeleitet von Vita (Leben) und Amin (organische Verbindung), sind Vitamine Substanzen, die essentiell dem Organismus zugeführt werden müssen, um den Stoffwechsel aufrecht zu erhalten. Die Hauptquelle von Vitamin D ist die endogene Photobiosynthese („Sonnenvitamin“)<sup>49</sup>. Es wirkt nach enzymatischer Aktivierung (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Der Vitamin D Stoffwechsel.** Aus 7-Dehydroxycholesterin wird Vitamin D durch UV-Absorption in der Haut gebildet. Das Vitamin D, das somit weitgehend aus endogener Photobiosynthese und nur zu geringem Anteil exogen aus der Nahrung stammt, besitzt eine kurze Halbwertszeit (HWZ), da es rasch durch enzymatische Hydroxylierung zum Speichermetabolit 25-Hydroxyvitamin D konvertiert wird. Die biologische Aktivierung zum physiologischen Vitamin D-Rezeptor Agonisten Calcitriol findet durch die essentielle 1 $\alpha$ -Hydroxylase CYP27B1 überwiegend in der Niere sowie extrarenal u.a. in aktivierten Immunzellen statt und unterliegt strengen Kontrollmechanismen. Abbildung ist modifiziert nach<sup>50</sup>.

**Vitamin D** (chem. Cholecalciferol) entsteht in der Haut aus 7-Dehydroxycholesterin durch Absorption von ultraviolett (UV) B-Licht der Wellenlängen 280-315 nm<sup>51</sup>. Die bei höherer Vitamin D-Konzentration einsetzenden photokatalytischen Prozesse verhindern das Erreichen toxischer Vitamin D Konzentrationen<sup>52</sup>. Vitamin D kann auch mit der Nahrung aufgenommen werden und ist insb. in Fischöl enthalten<sup>53</sup>. Um biologische Wirksamkeit zu erlangen, sind zwei weitere Schritte notwendig. Mit einer Plasmahalbwertszeit von wenigen Stunden<sup>54</sup> wird es rasch von den konstitutiv in der Leber (auch in Niere, Lunge, Monozyten) exprimierten 25-Hydroxylasen CYP2R1 und CYP27A1 metabolisiert.

Das Produkt dieser Reaktion ist **25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>** (25-(OH)D), das mit dem Vitamin D-bindenden Protein assoziiert und in Serum, Muskeln und Fettgewebe gespeichert wird<sup>55</sup>. Die Serumkonzentration ist proportional zur gespeicherten 25(OH)D-Menge<sup>56,57</sup>. In physiologischen Konzentrationen (50 – 250 nmol/L; 2,5 nmol/L = 1 ng/ml<sup>53</sup>) ist 25(OH)D inert. Die biologische Aktivität wurde



im Mausmodell in Serumkonzentrationen >400 nmol/L nachgewiesen<sup>58,59</sup>. Beim Menschen sind Vitamin D-Intoxikationen in Einzelfällen >380 nmol/L Serum-25(OH)D beschrieben<sup>60</sup>, eine Metaanalyse ergab durchschnittliche Werte von >535 nmol/L<sup>61</sup>. Die Serumhalbwertszeit beträgt 2 Wochen bis 2 Monate<sup>55,62</sup>.

Der biologisch wirksame Metabolit **Calcitriol** (chem.  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D)<sup>63</sup> wird durch das essentielle Enzym CYP27B1 (25-Hydroxyvitamin D- $1\alpha$ -Hydroxylase) aus 25(OH)D synthetisiert. Das entsprechende *CYP27B1*-Gen wurde erst im Jahr 1997 kloniert und ist auf Chromosom 12 lokalisiert<sup>64-66</sup>. CYP27B1 ist primär in Nierentubuluszellen exprimiert und unterliegt strenger transkriptioneller Kontrolle durch Calcium- sowie Calcitriol-abhängige Signalwege<sup>67</sup>. Die extrarenale Calcitriol-Synthese wird u.a. mit immunologischen Wirkungen in Zusammenhang gebracht und im Folgenden ab Seite 11ff. erläutert. Die physiologische Calcitriol Serumkonzentration hat eine geringe Toleranzbreite (60 – 108 pmol/L)<sup>68</sup>. Die Halbwertszeit beträgt ungebunden im Serum 5 Minuten und aufgrund von Proteininteraktion funktionell 12 Stunden<sup>69</sup>.

Der **Vitamin D-Rezeptor** (VDR) wurde im Jahr 1988 kloniert und gehört zur nukleären Rezeptorfamilie<sup>70</sup>. Die Ligand-Bindung (physiologisch Calcitriol) bewirkt eine Konformationsänderung und Dimerisierung, zumeist mit *Retinoid-X-Receptor- $\alpha$*  (RXR $\alpha$ ). Dieser VDR-Dimer-Komplex assoziiert mit spezifischen Erkennungssequenzen in Promotoren von Zielgenen und reguliert deren Transkription<sup>70,71</sup>. Die nukleäre Halbwertszeit aktivierter VDR beträgt ca. 2 Stunden<sup>70,72</sup>.

Durch das Enzym CYP24A1 (Vitamin D-24-Hydroxylase) wird Calcitriol und 25(OH)D inaktiviert und als wasserlösliche **Calcitroinsäure** ausgeschieden<sup>53</sup>.

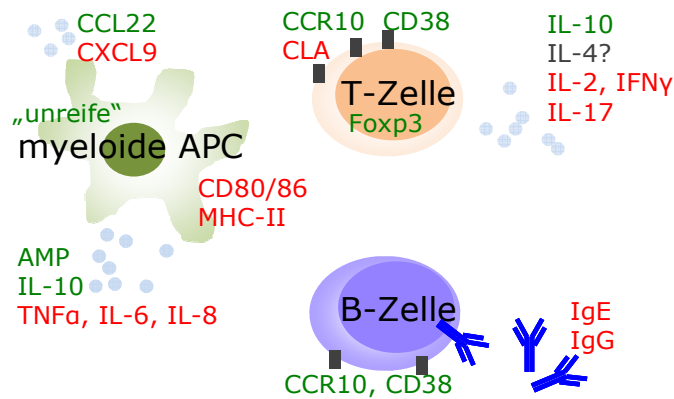
Neben den klassischen genomischen Wirkungen des VDR, sind auch schnellwirksame, non-genomische Mechanismen beschrieben, deren Bedeutung an anderer Stelle diskutiert wird<sup>73,74</sup>.

### 1.2.2 Wirkungen von Calcitriol auf Immunzellen

Die Expression von VDR wurde erstmals im Jahr 1983 in humanen Immunzellen nachgewiesen<sup>75</sup>. Zahlreiche Vitamin D-abhängige Funktionen wurden in den letzten drei Jahrzehnten in B- und T-Lymphozyten sowie myeloiden APC charakterisiert<sup>8,76</sup>. Zellspezifische Unterschiede deuten auf definierte Funktionen von Vitamin D hin (Abbildung 4).

In Zellen des angeborenen Immunsystems werden nach VDR-Aktivierung antimikrobielle Peptide (z.B. Cathelicidin, Defensine) induziert<sup>77</sup>, die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Makrophagen gefördert<sup>78,79</sup> oder die pro-inflammatorische Zytokinexpression vermindert<sup>80,81</sup>. In dendritischen Zellen beinhalten die Vitamin D-abhängigen Wirkungen die Erhaltung eines „unreifen“ Differenzierungsgrades<sup>82,83</sup>, die Sekretion von IL-10, des Treg-anziehenden Chemokins CCL22<sup>82,84</sup> und die verminderte Expression kostimulatorischer Moleküle<sup>82</sup>. Es werden adaptive Immunzellen durch VDR direkt sowie indirekt über VDR-abhängige Effekte auf dendritische Zellen kontrolliert. So differenzieren naive T-Zellen in Gegenwart von Calcitriol nicht zu inflammatorischen T-Effektorzellen<sup>85-87</sup>, sondern IL-10-sezernierenden Tr1-Zellen<sup>86,88-90</sup> und tolerogenen Foxp3<sup>+</sup> Treg Zellen<sup>87,90</sup>. Die Regulation von dem

Th2-Leitzytokin IL-4 durch Calcitriol ist uneinheitlich und erscheint von bislang nicht identifizierten Kofaktoren abzuhängen<sup>86,91</sup>.



**Abbildung 4: VDR-vermittelte Wirkungen auf Immunzellen.** Zell-spezifische Regulation von löslichen Faktoren (Zytokinen, Chemokinen; blaue Kreise) und Oberflächenmolekülen (graues Viereck) durch aktivierte VDR (grün=Verstärkung, rot=Verminderung).

Die Vitamin D-vermittelten Wirkungen auf humane B-Zellen sind komplex und verändern spezifisch unterschiedliche Ebenen der Aktivierung und Differenzierung. Beispielsweise zeigen Arbeiten der 1980er Jahre, dass durch die unspezifische bakterielle (*Staphylococcus aureus* Cowan-I) oder pflanzliche Bestandteile (Pokeweed-mitogen) induzierte IgG-Produktion durch Calcitriol vermindert wird<sup>92,93</sup>. Als wesentlicher Mechanismus wurde eine verminderte DNA-Synthese und IL-2-Rezeptorexpression identifiziert. Hingegen wird die T-Zell-induzierte terminale Differenzierung zu IgG-produzierenden Zellen, nicht aber die Proliferation oder Viabilität, durch Vitamin D blockiert<sup>94</sup>. Im Kontext mit Typ I-Allergien zeigen eigene Arbeiten, dass humane B-Lymphozyten, die mit dem für den IgE-Isotypenklassenwechsel essentiellen Zytokin IL-4 aktiviert wurden, nach Calcitriol-Zugabe spezifisch weniger IgE produzieren<sup>95</sup>. Ein unspezifischer Einfluss auf die Zellproliferation oder andere Isotypen wurde in diesem Modell nicht nachgewiesen. Eine Folgearbeit zeigte die direkte Hemmung des IgE-Isotypenklassenwechsels durch Rekrutierung eines trans-repressiven VDR-DNA-Komplexes<sup>96</sup>.

Neben den Wirkungen auf die Differenzierung der Immunzellen wird auch das Migrationsverhalten von T- und B-Lymphozyten durch VDR verändert. Dies führt zu einer Abnahme der Infiltration in entzündetes Gewebe/Haut (Herunterregulation von CXCL9<sup>+</sup>, *cutaneous lymphocyte antigen*, CLA) und statt dessen in Schleimhäute und lymphatisches Gewebe (Induktion von CCR10, CD38)<sup>97-100</sup>.

Diese zumeist anti-inflammatorischen Wirkungen von Vitamin D deuten auf einen therapeutischen Nutzen von Calcitriol bei Typ I-allergischen Erkrankungen hin. Jedoch ist Calcitriol für die therapeutische Anwendung nicht geeignet, bedingt durch die kurze Halbwertszeit, eine geringe therapeutische Breite und die Gefahr der Hyperkalzämie-bedingten Toxizität. Synthetische Calcitriol-Analoga mit ausgeprägten immunologischen Wirkungen ohne Calciummobilisation<sup>76</sup> haben den klinischen Alltag bislang nicht erreicht. Allerdings zeigen aktuelle Untersuchungen, dass aktivierte Immunzellen endo-

gen Calcitriol aus 25(OH)D synthetisieren können. Dies erlaubt den Einblick in dessen physiologische Wirkung auf Immunreaktionen und Abschätzung des therapeutischen Potenzials.

### 1.2.3 Endogene Calcitriol-Synthese verändert die Immunantwort

Bis Ende der 1970er Jahre wurde angenommen, dass Calcitriol ausschließlich in den Nieren synthetisiert wird. Extrarenale Calcitriolsynthese wurde erstmalig bei nephrektomierten Patienten mit Sarkoidose und Hyperkalzämie beschrieben<sup>101,102</sup>. Als Quellpopulation wurden die Alveolarmakrophagen von diesen Patienten identifiziert<sup>103</sup>. Bis heute sind über 20 verschiedene infektiöse, granulomatöse sowie maligne Erkrankungen beschrieben, in denen eine pathologische Calcitriolsynthese in Immunzellen auftritt<sup>104</sup>. Es ist auffällig, dass die Sarkoidose häufig mit peripherer immunologischer Anergie assoziiert ist, die als Resultat der massiven Infiltration der Lunge mit regulatorischen T-Zellen, sowie deren Frequenzerhöhung im Blut diskutiert wird<sup>105</sup>. Die Calcitriol-vermittelte Differenzierung von regulatorischen T-Zellen aus naiven T-Helferzellen ist gut belegt<sup>88,90,106</sup>. Somit liegt die Vermutung nahe, dass spezifisch aktivierte Immunzellen relevante Mengen Calcitriol endogen synthetisieren und somit Immunreaktionen beeinflussen können<sup>104</sup>. Weiterführende Untersuchungen zeigen die molekulare Grundvoraussetzung dafür: die Expression des essentiellen Enzyms CYP27B1 in Immunzellen (Tabelle 1). Diese aktivierten Immunzellen, die gleichzeitig VDR exprimieren, sind somit von exogenem Calcitriol unabhängig.

**Tabelle 1: CYP27B1 Expression und Wirkung in Immunzellen**

Zelltyp	Trigger (Rezeptor)	Wirkung
<b>Monozyten</b>	LPS (TLR4), IFN $\gamma$ (IFN $\gamma$ R) <sup>78</sup>	Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen <sup>78</sup>
<b>Dendritische Zellen</b>	<i>M.tuberculosis</i> -Lipopeptid (TLR1/2) <sup>77</sup> , LPS (TLR4) <sup>107</sup> , MPL (TLR2) <sup>108</sup>	Induktion antimikrobieller Peptide <sup>77</sup> , Migration zu nicht-drainierenden Lymphknoten und Förderung der humoralen und mukosalen Ig-Antwort <sup>108,109</sup>
<b>CD19<sup>+</sup> B-Zellen</b>	anti-CD40/IL-21 <sup>94</sup>	Regulation der Plasmablastendifferenzierung <sup>94</sup>
<b>CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen</b>	Antigen-Rezeptor + anti-CD28 <sup>97,110</sup>	Migration von T-Zellen in die Haut <sup>97</sup>

Die Wirkungen von 25(OH)D auf CYP27B1<sup>+</sup> Immunzellen ähneln denen von Calcitriol (Tabelle 1). Dies deutet darauf hin, dass 25(OH)D, nach endogener Aktivierung zu Calcitriol, immunologische Wirkungen entfaltet.

### 1.2.4 Wirkungen von Vitamin D bei immunologischen Erkrankungen

Der Einfluss von Vitamin D auf Immunreaktionen, die auch bei Typ I-Allergien relevant sind, wird durch experimentelle und epidemiologische Daten offensichtlich. Diese stammen aus Untersuchungen von genetisch veränderten Mäusen (*VDR*-KO, *CYP27B1*-KO), durch Beobachtungen nach Gabe niedrig-kalzämischer Calcitriol-Analoga in Mausmodellen, der Assoziation von 25(OH)D Mangel mit immunologischen Erkrankungen des Menschen oder der Gabe von Vitamin D bei dessen Defizienz.

#### **1.2.4.1. Genetische Evidenz**

Vitamin D ist für den Knochenstoffwechsel essentiell. Punktmutationen mit Funktionsverlust im *CYP2R1*-, *VDR*- oder *CYP27B1*-Gen manifestieren sich in Vitamin D-abhängiger Rachitis vom Typ1B, Typ2A oder Typ1A (Quelle *online mendelian inheritance in men*, [www.omim.org](http://www.omim.org) und<sup>111</sup>). Über immunologische Dysfunktionen bei diesen Punktmutationen, z.B. im Rahmen von Typ I-Allergien, liegen keine Daten vor. Dies deutet auf redundante Mechanismen hin.

Mäuse in denen das *VDR* Gen entfernt wurde (*VDR*-KO) zeigen, im Gegensatz zum defekten Knochenstoffwechsel, keinen basalen Verlust immunologischer Funktionen. Beispielsweise sind alle lymphatischen Zelltypen vorhanden<sup>112,113</sup>. Jedoch sind funktionelle Veränderungen in der Manifestation der Typ I-allergischen Immunantwort feststellbar. Nach Sensibilisierung mit Ovalbumin (OVA) sind die spezifischen und polyklonalen IgE-Serumkonzentrationen gegenüber Wildtyp erhöht bei vergleichbarer Th2-Induktion<sup>114</sup>. Interessanterweise ist die allergische Atemwegsentzündung und pulmonale Eosinophilie stark reduziert, was auf verminderte Zahlen von *invariant natural killer T cells* (iNKT) in *VDR*-KO-Tieren zurückgeführt wurde. Dieser Prozess ist sogar durch maternale 25(OH)D-Defizienz über epigenetisches Imprinting bei Wildtyp-Tieren vererbbar<sup>115-117</sup>.

Ein Zusammenhang zwischen Vitamin D-Signaling und IL-10 hinsichtlich anti-inflammatorischer Wirkungen wurde für die Experimentelle Autoimmune Enzephalitis (EAE; murines Modell der Multiplen Sklerose) durch selektive Entfernung beider Gene in T-Zellen beschrieben. Dabei schützt intaktes Vitamin D-Signaling vor Krankheitsentstehung, wobei die protektive Wirkung von IL-10 benötigt wird<sup>118,119</sup>.

Basierend auf dieser genetischen Evidenz wird offensichtlich, dass Vitamin D in die Kontrolle von Immunreaktionen, einschließlich Typ I-Allergien, in murinen Krankheitsmodellen eingreift.

#### **1.2.4.2. Epidemiologische Evidenz**

In den letzten 10 Jahren wurden zahlreiche Berichte zu Assoziationen von immunologischen Erkrankungen und 25(OH)D-Mangel publiziert<sup>9,53</sup>. Jedoch stellt sich hier die Frage, wie genau Vitamin D Mangel definiert werden sollte?

Der Vitamin D Status wird durch die Serumkonzentration von 25-Hydroxyvitamin D (25(OH)D) bestimmt. Diese spiegelt die verfügbare 25(OH)D-Menge wider<sup>56,57</sup>. Aktuell besteht kein Konsens über den Schwellenwert des 25(OH)D-Mangels<sup>53,120,121</sup>. In Serumkonzentrationen <50 nmol/L 25(OH)D sind typische suboptimale Wirkungen auf den Knochenstoffwechsel dokumentiert („Defizienz“). In Konzentrationen von >75 nmol/L 25(OH)D finden sich eine maximale enterale<sup>122</sup> und renale<sup>123</sup> Calciumresorption. Gleichzeitig sind bei diesen Konzentrationen Phänomene einer Vitamin D-Defizienz wie kompensatorische Parathormonerhöhung (iPTH)<sup>124</sup> und Knochendemineralisierung<sup>125</sup> abwesend („Suffizienz“). Der Konzentrationsbereich zwischen 50-75 nmol/L 25(OH)VD wird häufig als „relative Vitamin D-Insuffizienz“ bezeichnet<sup>53</sup> (Abbildung 5).

	25(OH)D [nmol/L im Serum]	„Klassische“ Wirkungen	Immunologische Wirkungen
Toxizität	535	Metastudie: Toxizität	
	400 350	Direkte VDR-Aktivierung Fallbericht Hyperkalziämie	verminderte MS-Aktivität?
Suffizienz		Max. Calciumresorption intakte Knochenstruktur	IgE-Erhöhung?  keine Krankheits- Assoziation
Insuffizienz	75		
	50	Osteopenie iPTH-Anstieg	heterogene Datenlage
Defizienz		Rachitis Osteomalazie iPTH ↑	Multiple Sklerose? Lupus erythematoses? Allergisches Asthma?

**Abbildung 5: 25(OH)D Serumkonzentrationen und biologische Wirkung.** Dargestellt ist der Vergleich der „klassischen Wirkungen“ von Vitamin D im Calcium- und Knochenstoffwechsel mit Berichten zu immunologischer Wirkungen.

Aufgrund epidemiologischer Untersuchungen von Patienten mit Typ I-Allergien (Allergisches Asthma bronchiale, Atopische Dermatitis) wird vermutet, dass bei 25(OH)D-Defizienz die Erkrankungswahrscheinlichkeit und/oder der Schweregrad erhöht ist. Beispielsweise ist bei Kindern und Jugendlichen mit allergischem Asthma:

- 25(OH)D-Insuffizienz (25%) und Defizienz (10%) häufig und Insuffizienz assoziiert mit geringerem Ansprechen auf inhalierte Glukokortikoide und häufigerer notärztlicher Vorstellung oder Hospitalisierung (n=1024, 4 Jahre Beobachtungszeit)<sup>126,127</sup>.
- 25(OH)D-Insuffizienz (28%) mit IgE-Erhöhung im Serum, Eosinophilie, bronchialer Hyperreagibilität assoziiert (n=616, 1 Jahr Beobachtungszeit)<sup>128</sup>.
- 25(OH)D-Defizienz (44-47%) assoziiert mit >1 schwerer Exazerbation, Atopie, Geringere FEV1/FVC-Ratio (n=560, 1 Jahr Beobachtungszeit)<sup>129</sup>.
- 25(OH)D-Insuffizienz (47%) und Defizienz (17%) häufig und das Serum-25(OH)D korreliert invers mit der FEV1 (*forced expiratory volume in 1 sec*) sowie der benötigten Menge an inhaliertem oder oralem Glukokortikoid (n=100)<sup>130</sup>.

Darüber hinaus scheinen weitere unbekannt Kofaktoren und regionale Unterschiede relevant zu sein. So korrelierte 25(OH)D im Nabelschnurblut negativ mit der Häufigkeit von Atemwegsinfekten sowie nicht allergischem Asthma (n=922, 5 Jahre Beobachtungszeit)<sup>131</sup>. Bei Erwachsenen in Norwegen war die Serumkonzentration von 25(OH)D nicht mit Asthma korreliert (n=25616, davon 584 Asthmatiker, 1958 Alters- und Geschlechts-angepasste Nicht-Asthmatiker)<sup>132</sup>.

Bei Kindern mit atopischer Dermatitis (AD) wurden folgende Beobachtungen berichtet:

- die Nabelschnur-25(OH)D-Defizienz korreliert mit der AD-Prävalenz, nicht aber mit IgE und Nahrungsmittelallergien (n=231 Hochrisiko-Kinder einer Geburtskohorte)<sup>133</sup>.

- 25(OH)D-Defizienz ist assoziiert mit häufigeren Sensibilisierungen, nicht jedoch bei Erwachsenen (n=6590 davon 3136 Kinder/Jugendliche, 3454 Erwachsene; Pricktest)<sup>134</sup>.
- die Serum-25(OH)D korreliert invers mit Schweregrad gemessen am SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis, n=37 Kinder)<sup>135</sup>.

Interessanterweise wurde die Einnahme von Vitamin D mit der AD-Häufigkeit, dem Auftreten von Typ I-Sensibilisierungen und IgE-Erhöhungen assoziiert (n=123 davon 23 AD, anamnestische Angaben zu Vitamin D Einnahme und AD Diagnose, keine 25(OH)D-Spiegel)<sup>136</sup>. Die Verifizierung dieser Daten durch umfangreichere Multicenterstudien ist gegenwärtig noch nicht erfolgt.

Ein linearer Zusammenhang zwischen Serum-25(OH)D-Konzentrationen und Typ I-Allergien ist unwahrscheinlich. In einer repräsentativen Studie sind im Serum die Gesamt-IgE-Werte mit stark erniedrigten (<25 nmol/L, n=573) sowie hohen (> 125 nmol/L, n=58) 25(OH)D-Konzentrationen festgestellt worden; folgend einer U-förmigen Dosis-Wirkungsbeziehung (n=7288, alle 45 Jahre)<sup>137</sup>. Entsprechend korrelierten 25(OH)D-Defizienz sowie Konzentrationen >100 nmol/L im Nabelschnurblut mit erhöhtem Serum-IgE und positivem Prick-Tests, nicht aber allergischem Asthma oder Rhinokonjunktivitis bis zum 5. Lebensjahr (n=219)<sup>138</sup>.

Insgesamt ist jedoch die Datenlage zu Allergien, verglichen mit den Studien zu Autoimmunität, durch kleine Kohortengrößen und uneinheitliche Messgrößen limitiert. Beispielsweise wurde bei hellhäutigen Patienten mit Multipler Sklerose (MS) eine inverse Korrelation von Inzidenz der Erkrankung mit 25(OH)D Serumkonzentrationen unterhalb 100 nmol/L festgestellt, nicht jedoch oberhalb (n=7 Mio. erwachsene US-Militärangestellte; pro MS-Patient Vergleich mit gesunden Alters- und Geschlechtsangepassten Kontrollen)<sup>139</sup>.

#### **1.2.4.3. Experimentelle Evidenz**

Einzelne Studien mit kontrollierten 25(OH)D-Gaben, auch in hohen Dosierungen, bei immunologischen Erkrankungen ermöglichen Einblicke zu Wirkmechanismen von Vitamin D und dessen therapeutischen Nutzen. Beispielsweise wurde durch langfristige Vitamin D-Einnahme eine geringere Erkrankungswahrscheinlichkeit an MS festgestellt (400 I.U. Vitamin D, n=190.536 Frauen über 4 Jahre)<sup>140</sup>. In einer folgenden Studie erhielten 12 Patienten mit chronisch-rezidivierender MS im Rahmen einer Dosis-Eskalation in 6-wöchigen Intervallen bis 40.000 I.U. Vitamin D täglich. In der Folge waren weniger Gadolinium-anreichernde Läsionen, die Störungen der Blut-Hirn-Schranke, z.B. durch Inflammation anzeigen, bei den Patienten nachweisbar wobei die Frequenz der Exazerbationen unverändert blieb<sup>141</sup>. Bei 15 Patienten mit MS war nach Einnahme von 20.000 I.U. Vitamin D tgl. über 12 Wochen im Vorher-Nachher-Vergleich die Frequenz von IL-10<sup>+</sup> T-Zellen erhöht sowie Ratio aus IFN $\gamma$ /IL-4-sezernierenden T-Zellen vermindert<sup>142</sup>.

Zur therapeutischen Bedeutung von Vitamin D bei allergischen Erkrankungen liegen nur wenige Daten vor. Ein möglicher Nutzen von einer Vitamin D Einnahme bei Kindern mit winterlich betonter AD

wird durch statistisch signifikante Verbesserung von tgl. 1000 I.U. Vitamin D im Vergleich zu Placebo angedeutet (n=11)<sup>143</sup>. Im Mausmodell der AD vermindert ein niedri-calcämischer, synthetischer VDR-Agonist die Typ-I allergische Inflammation der Haut<sup>144</sup>. Diese Daten legen therapeutisch nutzbare immunologische Funktionen von Vitamin D nahe. Letztendlich ist jedoch der Beweis durch kontrollierte klinische Studien bislang ausstehend.

### **1.3 Zielsetzung**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Vitamin D-abhängige Mechanismen im Kontext von Typ I-allergischen Immunreaktionen untersucht. Hierbei lag der Schwerpunkt auf den molekularen Mechanismen in B-Lymphozyten, Überprüfung der Konsequenz im murinen Krankheitsmodell sowie genetischen Einflussfaktoren auf die Funktionalität des Vitamin D-Signalweges. Ziel ist es herauszufinden, ob durch Vitamin D-abhängige Signalwege Wirkungen vermittelt werden, die sich zur Entwicklung neuer Protokolle in der Therapie von Typ I-Allergien eignen.



## 2 Eigene Arbeiten

### 2.1 Calcitriol fördert die IL-10 Expression in humanen B-Zellen

**Heine G**, Niesner U, Chang HD, Steinmeyer A, Zügel U, Zuberbier T, Radbruch A, Worm M. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells. *Eur J Immunol.* 2008;38:2210-8.<sup>145</sup>

Originalartikel unter DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200838216>

Biologisch aktives Vitamin D (Calcitriol) moduliert Immunantworten einschließlich der Hemmung des IgE-Isotypenklassenwechsels in B-Zellen und Förderung der IL-10 Sekretion in T-Zellen und dendritischen Zellen. Ziel dieser Arbeit ist die Bestimmung des Einflusses von Calcitriol auf die IL-10 Expression humaner B-Zellen.

Die Daten zeigen die Induktion des Enzyms 25-Hydroxyvitamin-D-1 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP27B1, Synonym CYP1 $\alpha$ ) in humanen B-Zellen, die über den Antigen-Rezeptor, CD40 und IL-4 aktiviert wurden. Somit können diese B-Zellen aus der Vorstufe 25-Hydroxyvitamin D (25(OH)D) endogen Calcitriol synthetisieren. Der Vitamin D-Rezeptor (VDR) ist in aktivierten B-Zellen exprimiert und Calcitriol induziert dessen klassisches Zielgen *CYP24A1*, kodierend für die Vitamin D-24-Hydroxylase, sowie *TRPV6*, kodierend für ein Calciumkanalprotein. Die IL-10 Sekretion wird durch Calcitriol ca. 3-fach verstärkt; nach VDR-Bindung in der IL-10 Promotorregion und zu geringerem Anteil durch Modulation Calcium-abhängiger Signalwege.

Somit deuten die molekularen Prozesse in aktivierten humanen B-Zellen, einschließlich der Hemmung der IgE- und der Förderung der IL-10-Sekretion sowie der endogenen Calcitriolsynthese aus 25(OH)D, eine Funktion von 25(OH)D in der Modulation allergischer Erkrankungen an.

## **2.2 Vitamin D-Rezeptor-vermittelte Hemmung der B-Zell-abhängigen Typ I-allergischen Immunantwort**

Hartmann, B., **Heine, G.**, Babina, M., Steinmeyer, A., Zugel, U., Radbruch, A., and Worm, M. Targeting the vitamin D receptor inhibits the B cell-dependent allergic immune response. *Allergy*. 2011.66:540-548.<sup>146</sup>

Originalartikel unter DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02513.x>

Der biologisch aktive Vitamin D-Rezeptoragonist Calcitriol ist durch hyper-kalzämische Wirkungen in der therapeutischen Anwendung limitiert. In dieser Untersuchung wurden die immunologischen Eigenschaften des synthetischen niedrig-kalzämischen Vitamin D-Rezeptor-Agonisten ZK203278 auf IgE-abhängige Immunantworten *in vitro* und *in vivo* untersucht.

Die Daten zeigen, dass durch den natürlichen - wie auch einen synthetischen - VDR-Agonisten die *ex vivo*-induzierte IgE Synthese peripherer humaner B-Zellen gehemmt wird. Als mögliche Mechanismen wurden eine Verminderung der *activation-induced deaminase* (AID)-Expression sowie Differenzierung zu IgE-sezernierenden Zellen identifiziert. Im Typ I-Allergiemodel in Ovalbumin (OVA) sensibilisierten BALB/c Mäusen vermindert die therapeutische Gabe des synthetischen VDR-Agonisten ZK203278 die humorale IgE-Serumkonzentration.

Diese Daten zeigen, dass VDR-Aktivierung die humorale Typ I-allergische Immunantwort einschließlich der Expression von IgE hemmt. Der therapeutische Nutzen dieser Daten erfordert geeignete klinische Studien.

Neben VDR sind ebenfalls weitere nukleäre Rezeptoren an der Regulation der IgE Produktion humaner B-Zellen, bzw. die humorale IgE-Immunantwort beteiligt, u.a. *Retinoic acid receptors* (RARs) und *Peroxisome-proliferator activated receptor- $\gamma$*  (PPAR $\gamma$ )<sup>147,148</sup>. Diese Rezeptoren und zusätzlich auch die *Liver-X-Receptors* (LXRs) teilen die molekulare Gemeinsamkeit, dass sie mit RXR $\alpha$  dimerisieren und folgend sogar ohne Ligand als „*silent partner*“ wirken können<sup>149-151</sup>. Interessanterweise sind LXRs indirekt mit VDR verbunden: So ist LXR-induzierte *CYP24* Transkription (VDR-Zielgen, katalysiert Calcitriol-Abbau) und VDR-verminderte *ABCA1* Transkription (LXR-Zielgen, reguliert Cholesterin Transport) beschrieben, ohne dass der jeweilige Ligand den anderen Rezeptor aktiviert<sup>151,152</sup>. In der folgenden Arbeit wurde der Einfluss der LXR auf die IgE-Antwort untersucht.

### 2.3 Liver-X-Rezeptoren vermittelte Kontrolle der IgE-Expression in B-Zellen

**Heine G\***, Dahten A\*, Hilt K, Ernst D, Milovanovic M, Hartmann B, Worm M. Liver X receptors control IgE expression in B cells. *J Immunol.* 2009;182:5276-82.<sup>153</sup> \*=gleiche Mitarbeit.

Originalartikel unter DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0801804>

B-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Entstehung von Typ I-Allergien. Nach Th2-vermittelter Aktivierung findet der IgE Isotypenklassenwechsel statt, gefolgt von terminaler Differenzierung zu IgE-sezernierenden Zellen. Dieser Prozess wird durch unterschiedliche nukleäre Rezeptoren moduliert, einschließlich der von Vitamin D, Vitamin A und *peroxisome-proliferator-activated-receptor- $\gamma$*  Liganden. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von *liver-X-receptors* (LXR) auf die Typ I-allergische Immunantwort untersucht.

Die Daten zeigen die konstitutive Expression nukleärer LXR- $\alpha$  und - $\beta$  in peripheren B-Zellen. Durch die Zugabe des synthetischen Pan-LXR-Agonisten T0901317 wird das typische Zielgen *ABCA1* induziert. Die IgE Produktion von anti-CD40/IL-4-aktivierten B-Zellen wird durch LXR-Aktivierung um ca 68%  $\pm$  11 vermindert. Die übrigen Isotypen sowie homöostatische Parameter von B-Zellen werden durch LXRs nicht signifikant verändert. Als Mechanismus finden sich verminderte Phosphorylierung der c-JUN N-terminalen-Kinase (JNK) und verstärkte CD23 Oberflächenexpression auf B-Zellen. Die biologische Signifikanz dieser Beobachtungen wird dadurch nahe gelegt, dass in Typ I-sensibilisierten BALB/c-Mäusen die Serumkonzentrationen von spezifischem IgE dosisabhängig durch systemische Gabe eines LXR-Agonisten vermindert wird (max. bis zu -52%  $\pm$  14).

Diese Daten deuten an, dass LXR an der Kontrolle der IgE-Produktion in aktivierten B-Zellen beteiligt sind. Ferner unterstützen diese Daten die Hypothese, dass LXR und VDR jeweils spezifisch auf die IgE Expression in B-Zellen wirken. Da sie über unterschiedliche Mechanismen IgE hemmen, ist eine unspezifische Funktion als „*silent partner*“ des gemeinsamen Dimerisierungspartners RXR $\alpha$  unwahrscheinlich.

## **2.4 Assoziation des TLR2 Promotor Polymorphismus A-16934-T mit schwerer atopischer Dermatitis**

Oh DY, Schumann RR, Hamann L, Neumann K, Worm M, **Heine G**. Association of the toll-like receptor 2 A-16934T promoter polymorphism with severe atopic dermatitis. *Allergy*. 2009;64:1608-15.<sup>154</sup>

Originalartikel unter DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02066.x>

Die atopische Dermatitis ist eine chronische, entzündliche Hauterkrankung, die durch eine multifaktorieller Genese sowie ansteigende Inzidenz in westlichen Industrienationen gekennzeichnet ist. Eine genetisch-bedingt verminderte Funktion von Muster-erkennenden Rezeptoren, wie den *toll-like receptors* (TLRs) wird als möglicher Pathomechanismus diskutiert.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde der Einfluss der genetischen Prädisposition unterschiedlicher Moleküle Muster-erkennender Rezeptorsignalwege bestimmt.

Dazu wurden die Frequenzen von 9 unterschiedlichen Genpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) in den Genen von TLR1, -2, 4-, -9 und des Adaptermoleküls TIRAP mittels PCR untersucht. Die Daten von 136 erwachsenen AD-Patienten wurden mit denen von 129 gesunden Probanden verglichen, die bezüglich Alter und Geschlecht übereinstimmten. Die TLR2-Expression und – Funktion wurde von genotypisierten Spendern untersucht.

Die SNP-Frequenzen sind zwischen beiden Untersuchungsgruppen vergleichbar. In der Subgruppe der Patienten mit schwerer AD (SCORAD >50), tritt das *TLR2-A-16934* Allel signifikant häufiger auf als in der Kontrollgruppe. Die basale *TLR2*-Genexpression in peripheren Monozyten ist unabhängig vom Genotyp. Nach TLR2-Stimulation sind tendenziell bei homozygoten Trägern des *TLR2-A-16934* Allels erhöhte IL-6, nicht aber TNF $\alpha$  Konzentrationen, messbar.

Die gewonnenen Daten lassen erkennen, dass TLR2 für die Ausprägung eines schweren AD-Phänotyps relevant sein könnte.

## **2.5 Zusammenhang zwischen Vitamin D-Rezeptor-Punktmutationen und schwerer atopischer Dermatitis bei Erwachsenen**

**Heine G\***, Hoefler N\*, Franke A, Nöthling U, Schumann RR, Hamann L, Worm M. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with severe atopic dermatitis in adults. *Br J Dermatol.* 2013;168:855-8.<sup>155</sup> \*=gleiche Mitarbeit.

Originalartikel unter DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bjd.12077>

Vitamin D vermittelt immunologische Wirkungen, die bei allergischen Erkrankungen nützlich sein könnten. Im Gen des Vitamin D-Rezeptors (*VDR*) sind Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNP) bekannt, die allerdings bislang nicht bei Patienten mit atopischer Dermatitis (AD) untersucht wurden.

Zur Bestimmung der Frequenz von 4 häufigen *VDR*-SNPs bei Patienten mit AD wurden 265 Patienten mit AD und 265 gesunden Kontrollprobanden mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus Analyse untersucht.

Die untersuchten *VDR*-SNP-Frequenzen beider Untersuchungsgruppen sind insgesamt miteinander vergleichbar. In der Subgruppe der Patienten mit schwerer AD tritt das *VDR*-BsmI (rs1544410) G-Allel, *VDR*-ApaI (rs7975232) C-Allel und *VDR*-TaqI (rs731236) T-Allel häufiger auf als in Kontrollgruppe. Diese SNPs sind hochgradig miteinander genetisch verbunden. Der *VDR*-Haplotyp *GCT* korreliert mit schwerer AD und komplementär *AAC* mit Schutz vor AD. Die *VDR-GCT* Haplotypregion ist evolutionär zwischen Menschen und Mäusen konserviert. Die Frequenzen des *VDR*-FokI (rs2228570) SNP sind in beiden Gruppen vergleichbar. Die konstitutive *VDR* Expression in Monozyten homozygoter Spender mit dem *VDR* Genotyp *GCT* oder *AAC* sowie deren unmittelbare Funktion ist zwischen beiden Gruppen vergleichbar.

Die Daten weisen auf einen spezifischen *VDR*-Haplotyp hin, der gehäuft bei Patienten mit schwerer AD auftritt. Somit könnte *VDR* an der Ausprägung der AD partizipieren, beispielsweise durch Regulation der epidermalen Barrierefunktion und/oder immunologischer Wirkungen.

### 3 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Erkenntnisse auf zellulärer, molekularer und genetischer Ebene gewonnen, die zum Verständnis Vitamin D-vermittelter immunologischer Kontrollmechanismen beitragen. Dabei standen Typ I-allergische Reaktionen im Allgemeinen und humane B-Zellen im Speziellen im Fokus der Untersuchungen. Die Wirkungen aktivierter VDR werden durch direkte Veränderung der Transkription von VDR-Zielgenen (IgE-Regulation, IL-10) vermittelt sowie indirekt über Moleküle, die ihrerseits die Typ I-allergische Reaktion beeinflussen, beispielsweise durch Veränderungen im Calcium-Stoffwechsel. Dies weist auf pleiotrope VDR-Wirkungen während allergischer Reaktionen hin.

Die Daten dieser Arbeit zeigen zwei unabhängige, immun-regulatorische Wirkungen von Vitamin D in B-Zellen im Kontext von Typ I-Allergien: verstärkte IL-10- und verminderte IgE-Produktion. Diese Wirkungen sind Vitamin D-Rezeptor-vermittelt (VDR) und resultieren aus direkter VDR-DNA-Interaktion sowie über die transkriptionelle Regulation assoziierter Gene. Die molekulare Basis dafür bildet die Induktion funktioneller VDR in humanen B-Zellen. Der VDR wird nicht basal von humanen B-Zellen exprimiert, sondern durch Th2-abhängige Signale induziert<sup>94,156</sup>. Dies legt eine physiologische Funktion von VDR bei der Aktivierung und Differenzierung von humanen B-Zellen nahe. Im Rahmen dieser Untersuchung erfolgte die VDR-Induktion und B-Zellaktivierung durch Mimikry aktivierter Th2-Zellen durch Zugabe des Zytokins IL-4 und aktivierender anti-CD40 Antikörper zur Zellkultur<sup>145,146</sup>. Die VDR-Aktivierung wird durch transkriptionelle Aktivität nach Stimulation mit dem physiologischen Agonisten Calcitriol durch Induktion des bekannten VDR-Zielgens *CYP24A1*<sup>145,146</sup> und einer verstärkten Oberflächenexpression von CD38<sup>145,146</sup> offensichtlich. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Literatur<sup>94,99,156,157</sup>.

Das *IL10* Gen wurde mittels biomathematischer Methoden sowohl im Rahmen in der vorliegenden Arbeit als auch von anderen Arbeitsgruppen als primäres VDR-Zielgen identifiziert<sup>145,158</sup>. Entsprechend wird *IL10* von unterschiedlichen Zelltypen in Mensch und Maus durch Calcitriol induziert<sup>82,88,89,106</sup>. Ein VDR-abhängiger Mechanismus ist anzunehmen, da bei Patienten mit *loss-of-function* Mutation des *VDR*-Gens, im Gegensatz zu Gesunden, IL-10 nicht in T-Zellen induziert wird<sup>159</sup>. Interessanterweise kann eine VDR-Aktivierung die IL-10 Produktion auch primär hemmen, z.B. in Monozytenzelllinien<sup>160</sup>. Diese Unterschiede könnten durch zellspezifische Kofaktoren und/oder andere sekundäre Mechanismen erklärt werden, z.B. die Induktion des Calciumkanals TRPV6, wie in dieser Arbeit bei primären humanen B-Zellen gezeigt wurde<sup>145</sup>.

IL-10, das von B-Zellen sezerniert wurde, vermittelt anti-entzündliche Funktionen in anderen Immunzellen<sup>46,161</sup>, die auch für die Typ I-Allergie relevant sind. Zu diesen parakrinen Funktionen von IL-10 zählt insbesondere die verminderte Sekretion inflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-1, IL-2, IL-5,

IL-6, TNF $\alpha$  sowie IFN $\gamma$ <sup>162</sup>. Dies resultiert aus direkten Wirkungen von IL-10 auf myeloide APCs, deren verminderte Antigenpräsentation über MHC-II und/oder Expression kostimulatorischer Moleküle beides zu verminderter Aktivierung von T-Helferzellen führt<sup>24,163-167</sup>. In der Folge differenzieren weniger inflammatorische T-Helferzellen (u.a. Th17-Zellen), während anti-inflammatorische IL-10-sezernierende Tr1-T-Zellen sowie Foxp3<sup>+</sup> Treg Zellen verstärkt auftreten<sup>46,161</sup>. Die Allergen-abhängige IL-4-Sekretion von Th2-Zellen wird direkt durch Vitamin D-induzierte IL-10<sup>+</sup> Treg-Zellen verhindert<sup>168</sup>. Da B-Zellen für den Erhalt von Th2-Zellen eine wichtige Rolle spielen, wie durch B-Zell Depletion gezeigt wurde<sup>39</sup>, könnte Vitamin D-induziertes IL-10 von B-Zellen indirekt über dendritische Zellen, sowie direkt über Wirkungen auf T-Helferzellen die Differenzierung von Th2-Zellen hemmen.

Bezüglich Typ I-allergischer Erkrankungen wird angenommen, dass IL-10 bei allergischem Asthma protektiv wirkt<sup>169</sup>. So sind in den Lungen von Patienten mit allergischem Asthma bronchiale die IL-10 Konzentrationen niedriger als bei nicht-asthmatischen Kontrollen<sup>170</sup>. Dabei ist eine Verbindung zwischen Vitamin D und IL-10 bei Allergien wahrscheinlich. Bei Patienten mit Glukokortikoid-resistentem Asthma bronchiale ist die Dexamethason-induzierbare IL-10-Expression in T-Zellen vermindert, sie kann jedoch durch eine kurzfristige Calcitriol-Behandlung (*in vitro* und systemisch) wieder hergestellt werden<sup>168</sup>. Entsprechend wird im Mausmodell durch gleichzeitige Gabe von Calcitriol mit Allergen die bronchiale Hyperreagibilität sowie spezifische IgE-Induktion vermindert<sup>171</sup>. Diese Wirkung wird durch IL-10- bzw. *Transforming growth factor- $\beta$*  (TGF $\beta$ )-spezifische Antikörper partiell, und bei Kombination beider Antikörper vollständig, aufgehoben. Bislang ist nicht bekannt, von welchem Zelltyp das Vitamin D-induzierte IL-10 stammt und wie genau beide Moleküle anti-entzündlich wirken. Synergistische, unabhängige anti-inflammatorische Wirkungen werden durch Untersuchungen bei Mäusen verdeutlicht, in denen das *VDR* sowie das *IL10* Gen entfernt wurde<sup>172</sup>. Diese Wirkungen werden über Milzzellen vermittelt, nicht durch Calcium-vermittelte Signalwege<sup>172</sup>. Über die Wirkungen von IL-10 bei anderen Typ I-allergischen Manifestationsformen wie der atopischen Dermatitis und der allergischen Rhinokonjunktivitis liegen aktuell nur unzureichende Erkenntnisse vor. Erste Hinweise auf die genauen Mechanismen könnten durch Untersuchungen von zellspezifischem *VDR*  $\pm$  *IL10*-Doppelknockout in B-Zellen, T-Zellen und myeloiden Zellen in einem entsprechenden Allergiemodell geklärt werden. Durch gezieltes Verstärken dieser Mechanismen, beispielsweise durch spezifische *small molecules* könnte perspektivisch die anti-inflammatorische Wirkung von Vitamin D bei Typ I-allergischen Immunreaktionen verstärkt werden.

Durch *VDR*-Aktivierung wird die IgE-Synthese *in vitro* um 80% gehemmt, nicht oder nur geringfügig auch die Produktion anderer Isotypen<sup>95</sup>. Dies legt einen Isotyp-spezifischen Mechanismus nahe. Die IL-4 Rezeptoraktivierung ist für den IgE-Isotypenklassenwechsel von B-Zellen essentiell. Mäuse mit B-Zell-spezifischem KO der IL-4 Rezeptor- $\alpha$ -Kette produzieren kein IgE<sup>173</sup>. Da der IL-4/STAT6-Signalweg durch *VDR*-Aktivierung in B-Zellen nicht verändert wird<sup>95</sup>, sind direkte Wirkungen auf die



IgE-Switchregion, die Interferenz mit CD40/NF- $\kappa$ B-Aktivierung sowie weitere sekundäre Prozesse wahrscheinlich. Eigene Vorarbeiten deuten eine Interferenz des VDR mit dem IgE-Switchprozess an<sup>95</sup>.

Naive B-Zellen sind primäre Zielzellen von Calcitriol. Nach Stimulation mit IL-4 und anti-CD40 wird VDR sowie in Gegenwart von Calcitriol das Zielgen *CYP24A1* in naiven B-Zellen stärker exprimiert als in B-Gedächtniszellen<sup>174</sup>. Dies resultiert am ehesten aus der erhöhten Expression und Funktion des IL-4 Rezeptors auf naiven B-Zellen<sup>175</sup>, dessen Signaling allein ausreicht, um VDR zu induzieren<sup>176</sup>. Entsprechend eignet sich das IL-4/STAT6-induzierte Oberflächenantigen CD23<sup>177</sup> auf naiven B-Zellen als Surrogatmarker für die VDR-Expression<sup>96</sup>. Die gezielte Isolation dieser CD23<sup>+</sup> naiven B-Zellen unmittelbar vor molekularen Untersuchungen erhöht die Sensitivität der VDR-Analysen und zwar durch Verminderung der Hintergrundsignale von Zellen, die nicht auf Calcitriol reagieren. Dieser kritische Schritt ermöglichte die molekularbiologische Untersuchung von I $\epsilon$ , einer Schlüsselregion des Isotypenklassenwechsels zu IgE. In einer Arbeit der Forschungsgruppe von Prof. Margitta Worm konnten wir erstmals einen VDR-DNA-Komplex in I $\epsilon$  nachweisen, der die Transkription des IgE-Switch Transkriptes vermindert<sup>96</sup>. Die Hemmung der IgE-Switch Transkription ist assoziiert mit einer Verminderung der IgE Produktion. Entsprechend resultiert die Deletion des Switch Promotors in Isotypen-spezifischer Aglobulinämie<sup>20</sup>. Dieser VDR/RXR $\alpha$ -DNA-Komplex wird durch Bindung von Calcitriol an VDR initiiert und ist dadurch Vitamin D-spezifisch. Entsprechend ist ohne Ligandenbindung VDR nicht als „*silent partner*“<sup>70</sup> mit RXR in I $\epsilon$  lokalisiert. In der Summe weisen diese Daten darauf hin, dass die IgE-Produktion durch direkte Wirkungen des VDR auf die Einleitung des IgE-Isotypenklassenwechsels in B-Zellen gehemmt wird.

Da die Vitamin D-vermittelte Hemmung der IgE-Expression jedoch nicht vollständig durch die direkte Interferenz mit dem IgE-Klassenwechsel erklärt wird, wurden zusätzlich weitere indirekte Mechanismen untersucht. Diese Mechanismen sind *per se* sehr effektiv. Beispielsweise wird das IgE-Switch-Transkript nach Stimulation mit IL-4 zu annähernd 100% von den IgM<sup>+</sup> B-Zellen exprimiert, die allerdings in nur zu 30% in IgE-sezernierende Zellen differenzieren<sup>178,179</sup>. Neben IL-4 ist die Stimulation des CD40-Antigens für den IgE-Klassenwechsel essentiell. Bei Mäusen, in denen das CD40-Antigen selektiv auf B-Zellen oder der CD40-Ligand (CD154) entfernt wurde, ist kein spezifisches IgE oder IgG1 nachweisbar<sup>34,180</sup>. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ Bp50 ist ein wichtiges Signaltransduktionsmolekül von CD40 und für den Isotypenklassenwechsel bedeutsam. Beispielsweise ist in p50-KO-Mäusen die IgE-Serumkonzentration stark vermindert (40-fach, Vergleich: IgG1-10-fach, IgA-5-fach; IgM gering erhöht)<sup>181</sup>. Vitamin D hemmt die Aktivierung von NF- $\kappa$ B-Untereinheiten in unterschiedlichen Immunzellen<sup>76</sup>. Eigene Arbeiten zeigen die verminderte NF- $\kappa$ Bp50-Kerntranslokation in B-Zellen durch Vitamin D<sup>95</sup>. In weiterführenden Arbeiten der Forschungsgruppe von Frau Prof. Worm wurde der zugrundeliegende Mechanismus näher beschrieben<sup>174</sup>. Dessen transkriptionelle Hemmung resultiert aus einer verminderten Bindung des CD40-aktivierten Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ Bp65 in der Promotorregion des p50-Vorläufermoleküls p105<sup>174</sup>. Bekannte Mechanismen, einschließlich eines

direkten VDR-p65 Komplexes wie in murinen Fibroblasten<sup>182</sup> oder die Induktion des *Inhibitor of NFκB-α* (IκBα) wie für Makrophagen<sup>183</sup> beschrieben, konnten bei B-Zellen nicht bestätigt werden. Untersuchungen mittels Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) von Fluoreszenz-markierten Fusionsproteinen (VDR, NFκB-Untereinheiten) oder mittels *proximity ligation assay* (PLA), bei dem gekoppelte Oligonukleotid-gekoppelte Antikörper eine Polymerasekettenreaktion und folgende Bildung erlauben, könnten dazu dienen, die Sensitivität und Spezifität des Proteinkomplexnachweises zu erhöhen.

Ein Zielgen von NF-κB und essentielles Molekül des Isotypenklassenwechsels ist das Enzym *Activation-induced cytidine deaminase* (AID)<sup>12,22</sup>. Die dargestellten Ergebnisse zeigen eine verminderte Expression von AID nach Stimulation mit dem synthetischen VDR-Agonisten ZK203278 sowie in geringerem Ausmaß mit natürlichem Calcitriol<sup>146</sup>. Diese könnte zu der beobachteten IgE-Hemmung funktionell beitragen. Die biomathematische Prädiktion mittels rVISTA der University of California und Matinspector von Genomatix (unpubliziert) gibt jedoch keine Hinweise darauf, dass die AID-Promotorregion Ziel des VDR ist. Ob AID dennoch durch die 4 isolierten VDR-DR3-Typ-Sequenzen in der Promotorregion (bei -2472, -1903) sowie Intron I (+2861 und +3440 ab Transkriptionsstart) signifikant reguliert wird, oder ob nicht eher die beobachtete NF-κB-Verminderung dazu beiträgt, ist gegenwärtig unbekannt. Letztere Hypothese wird durch die beobachtete stabile AID Expression in Gegenwart aktivierter nukleärer LXR-RXR-Dimere unterstützt, die keinen Einfluss auf NF-κB-Aktivierung in B-Zellen bewirken<sup>153</sup>.

Neben der Induktion des IgE-Switchtranskriptes und der AID-Expression ist die Proliferation von B-Zellen eine Grundvoraussetzung für den IgE-Isotypenklassenwechsel<sup>184,185</sup>. Die B-Zell-Proliferation wird nur gering durch anti-CD40/IL-4 induziert und durch VDR nicht signifikant reguliert<sup>95,146</sup>. Unter diesen Bedingungen ist somit die IgE-Hemmung Proliferations-unabhängigen Mechanismen auf den Isotypenklassenwechsel zuzuordnen. Zu diesen zählen die identifizierte transrepressive VDR-DNA-Interaktion in *Iε*<sup>96</sup>, die verminderte NF-κB-Aktivierung<sup>174</sup> sowie die verminderte AID-Expression<sup>146</sup>. Untersuchungen unter Bedingungen einer hohen Zellteilungsrate, z.B. durch zusätzliche Stimulation mit IL-21, zeigen eine ausgeprägte B-Zellproliferation und verstärkte Differenzierung von Plasmablasten<sup>146</sup>. Beide Prozesse werden durch VDR signifikant gehemmt<sup>146</sup>. Dies bestätigt Daten von Chen *et al.* mit anti-CD40/IL-21 stimulierten B-Zellen<sup>94</sup>. Als Mechanismus werden Veränderungen im Zellzyklus angenommen, einschließlich der Induktion des *cyclin D kinase-inhibitors p27*<sup>94</sup>. Auch wenn der genaue Mechanismus nicht geklärt ist, könnte eine Hemmung des Zellzyklus' durch VDR, zumindest unter Bedingungen mit einer hohen Proliferationsrate, die IgE-Synthese zusätzlich vermindern<sup>146</sup>.

Die funktionelle Bedeutung der VDR-Wirkungen auf die IgE-Produktion *in vivo* wurde durch die Effekte einer systemischen Gabe des niedrig-kalzämische VDR-Agonisten ZK203278 nachgewiesen<sup>146</sup>. Dieser VDR-Agonist vermittelt potente immunologische Wirkungen *in vitro* sowie *in vivo*<sup>186</sup>. Die verwendete Dosis lag 60-fach über der maximal verträglichen Calcitriol-Dosis, und es waren keine Anzeichen für eine Hyperkalzämie feststellbar<sup>146</sup>, wie bereits zuvor beschrieben<sup>186</sup>. In der Folge wa-

ren bei Typ I-sensibilisierten BALB/c Mäusen durch die therapeutische VDR-Agonist-Gabe signifikant geringere spezifische IgE und IgG1 Antikörperkonzentrationen im Serum nachweisbar<sup>146</sup>. Diese Daten stehen in Einklang mit Ergebnissen aus VDR-KO-Mäusen, bei denen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren das spezifische und Gesamt-IgE im Serum erhöht war und ergänzen diese<sup>114</sup>. Bemerkenswert ist, dass in VDR-KO Mäusen die Gesamt und spezifischen IgE Serumkonzentrationen trotz verminderter Expression des Th2-Zytokins IL-4 erhöht sind, was auf einen B-Zell-intrinsischen Effekt hindeutet.

Neben den anti-inflammatorischen Wirkungen fördert IL-10 bei B-Zellen die Differenzierung zu Plasmablasten, die IgG oder IgM, oder bei gleichzeitiger Stimulation mit TGF $\beta$ , IgA sezernieren<sup>187</sup>. Die IgE-Regulation durch IL-10 ist komplex und erscheint abhängig von der B-Zell-Differenzierung. Die IL-4-induzierte IgE-Switchtranskription wird von IL-10 gehemmt, wohingegen die Plasmablasten-Differenzierung von IgE<sup>+</sup> B-Zellen durch IL-10 gefördert wird<sup>188</sup>. Ob die Vitamin D-induzierte IL-10-Produktion von B-Zellen an der Kontrolle von IgE partizipiert, ist nicht endgültig gesichert. Eigene Daten unterstützen diese Hypothese und zeigen, dass von B-Gedächtniszellen stammendes IL-10 die *ex vivo*-induzierte IgE Synthese hemmt<sup>189</sup>. Somit weisen diese Daten darauf hin, dass Calcitriol durch die Induktion von IL-10 bei aktivierten B-Zellen indirekt die allergische Reaktion beeinflussen könnte. Es resultiert eine verminderte lokale Expression inflammatorischer Zytokine sowie eine geringere primäre IgE-Induktion.

Die Untersuchungen der LXR-vermittelten Wirkungen im Typ-I Allergiemodell unterstützen die Spezifität der VDR-Wirkungen in B-Zellen. Die LXR teilen mit VDR zahlreiche Gemeinsamkeiten: beide sind nukleäre Hormonzrezeptoren, heterodimerisieren mit RXR $\alpha$ , und können in Abwesenheit des Liganden als *silent partner* des RXR $\alpha$  transkriptionell wirken<sup>70,190</sup>. Jedoch wird durch LXR, im Gegensatz zu VDR, die NF $\kappa$ B-Aktivierung IgE-Switch Transkription und AID durch aktivierte nukleäre LXR-RXR-Dimere nicht reguliert<sup>153</sup>. Auch wird durch VDR die CD23-Oberflächenexpression, im Gegensatz zu LXR, nicht verändert<sup>95</sup>. In der Summe deuten diese Daten an, dass sich auf molekularer Ebene die Mechanismen von LXR und VDR deutlich unterscheiden und belegen dadurch die jeweilig spezifische Wirkung. Im Bezug auf Typ-I Allergien vermitteln beide Rezeptoren einen hemmenden Einfluss auf die humorale IgE-Antwort im Mausmodell<sup>146,153</sup>. Ob durch gleichzeitige Gabe der Liganden von LXR und VDR möglicherweise synergistische Wirkungen erzielen lassen ist aktuell noch nicht bekannt.

Zusammenfassend existieren unterschiedliche direkte und indirekte Vitamin D-vermittelte Mechanismen in B-Zellen, die den Isotypenklassenwechsel und die Produktion von IgE hemmen. Diese Kontrollfunktionen therapeutisch zu nutzen, wäre von Vorteil, weil nicht nur (non-IgE<sup>+</sup>) Effektorzellen, sondern auch (IgE<sup>neg</sup>) Gedächtniszellen gebildet werden könnten. Ein neuer therapeutischer Antikörper (anti-human-IgE-M1'), der eine membrannahe Region des IgE erkennt, die in sezernierter Form nicht vorkommt, depletiert *in vitro* und in humanisierten Mäusen IgE<sup>+</sup>-Gedächtnis B-Zellen und Plas-

mablasten und vermindert funktionell die allergische Atemwegsentzündung<sup>191</sup>. Eine kombinierte Behandlung mit Depletion unerwünschter IgE<sup>+</sup>-Zellen und gleichzeitiger mit Beeinflussung des Immunsystems mit Vitamin D, die in einer Blockade des IgE-Isotypenklassenwechsels resultiert, könnte die therapeutische Effektivität nachhaltig steigern.

Eine Schlüsselbeobachtung dieser Arbeit ist, dass aktivierte humane B-Zellen in Folge der Expression von CYP27B1 endogen aus 25(OH)D biologisch aktives Calcitriol bilden können<sup>145</sup>.

Somit könnten aktivierte B-Zellen bei ausreichender Verfügbarkeit von 25(OH)D durch Sekretion von Calcitriol wirken. Über den autokrinen Einfluss auf IL-10 und die IgE-Produktion hinaus könnten sie parakrin indirekt Typ I-allergische Reaktionen hemmen<sup>145</sup>. Beispielsweise differenzieren myeloide dendritische Zellen in Gegenwart von Calcitriol zu tolerogenen, IL-10 sezernierenden Zellen, die anti-entzündliche T-Zellen aus naiven Zellen generieren<sup>82</sup>. Auch differenzieren T-Zellen in Gegenwart von Calcitriol zu IL-10 produzierenden Zellen<sup>88,106</sup>, was im Zusammenhang mit einer Kontrollfunktion allergischer Reaktionen diskutiert wird<sup>168,169</sup>.

Grundvoraussetzung für die Entfaltung immunologischer Funktionen von 25(OH)D ist dessen ausreichende Verfügbarkeit. Zwar existiert kein Konsens über die exakten Schwellenwerte<sup>53</sup>, doch werden Serumkonzentrationen <50 nmol/L 25(OH)D als Vitamin D-Defizienz bezeichnet. Dieser Schwellenwert ist wahrscheinlich zu gering. Dies wird durch verminderte Calciumresorption, Erhöhung des kompensatorischen iPTH und Prävalenz von Osteopenie bei Serumkonzentrationen <75 nmol/L nahegelegt<sup>122,124,125</sup>. Interessanterweise sind im Serum die Konzentrationen von IgE bei 25(OH)D <25 nmol/L erhöht und am geringsten bei einer Vitamin D-Suffizienz (105-125 nmol/L)<sup>137</sup>. Dies ist mit den eigenen Beobachtungen, dass VDR-Aktivierung die IgE-Expression hemmt<sup>95,96,146</sup> und dieser Prozess von der Verfügbarkeit von 25(OH)D abhängt<sup>145</sup>, gut vereinbar.

Eigene Daten zeigen, dass Vitamin D-Defizienz bei Gesunden und Allergikern während der Wintermonate gehäuft auftritt<sup>192</sup>. Dies ist im Einklang mit der Literatur und resultiert aus dem geringen Vitamin D-Gehalt der Nahrung, wie in einer repräsentative Untersuchung des Robert-Koch-Instituts gezeigt wird<sup>193</sup>. Dies bestätigend, ermittelte eine elegante biomathematische Arbeit, durch Kalkulation der Vitamin D-Menge in der Nahrung, der UV-Expositionszeit und den tatsächlichen 25(OH)D Serumkonzentrationen, dass letzteres weitestgehend aus der UV-Biosynthese der Haut stammt<sup>194</sup>. Diese These unterstützend, fallen während der UV-armen Wintermonate bei Gesunden und Allergikern ohne Vitamin D-Einnahme die 25(OH)D-Serumkonzentration ab<sup>192</sup>. Insbesondere sind UV-defiziente Patienten mit kutanem Lupus erythematodes, deren Erkrankungsaktivität durch Sonnenexposition verstärkt werden kann, ganzjährig Vitamin D-defizient, wie mit eigenen und Daten von anderen Autoren gezeigt wurde<sup>195,196</sup>. Somit können immunologische Funktionen von Vitamin D in defizienten Probanden untersucht werden, die durch ausreichende Vitamin D-Einnahme immunologisch wirksame 25(OH)D-Serumkonzentrationen erreichen<sup>192</sup>.

Ein weiterer Grund für eine unzureichende Calcitriol-Funktion bei Patienten mit Typ-I Allergien ist dessen verminderte Synthese und Funktion. Um eine genetisch bedingte Prädisposition zu erkennen, wurden in dieser Arbeit bei Patienten mit atopischer Dermatitis (AD) *TLR2*- und *VDR*-Genvarianten untersucht, die zuvor mit (AD), allergischem Asthma oder der Aktivierung von Immunzellen assoziiert wurden<sup>154,155</sup>. Die AD ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung. Hier spielen die genetische Prädisposition und spezifische Umwelteinflüsse für die Ausprägung und Verlauf eine Rolle<sup>5</sup>. In dieser Arbeit wurde ein Genpolymorphismus in der *TLR2*-Promotorregion gehäuft bei erwachsenen Patienten mit schwerer AD identifiziert<sup>154</sup>. Das entsprechende *TLR2*-16934-A-Allel wurde ebenfalls gehäuft in einer unabhängigen Kohorte von Patienten mit schwerer atopischer Dermatitis bestätigt<sup>197</sup>. Reporterassays deuten auf eine gering-gradige *loss-of-function* Mutation hin<sup>197</sup> und unterstützen die eigenen funktionellen Daten<sup>154</sup>. Zuvor identifizierte Häufungen von *TLR4* und *TLR9*-Polymorphismen wurden in dieser Arbeit bei erwachsenen Patienten mit AD nicht reproduziert<sup>198,199</sup>. Dies ist am ehesten durch unterschiedliche Patientenkollektive erklärbar, beispielsweise durch die ausschließliche Untersuchung von erwachsenen Patienten im Rahmen dieser Arbeit mit extrinsischer AD, die durch erhöhte IgE-Serumkonzentrationen gekennzeichnet ist<sup>154</sup>. Passend zur Hypothese, dass das *TLR2*-16934-A-Allel mit verminderter Funktion einhergeht, ist die *TLR2*-induzierte Sekretion inflammatorischer Zytokine von primären Keratinozyten von Patienten mit atopischer Dermatitis im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden verringert<sup>200</sup>. Es wird diskutiert, dass diese verminderte Funktion des angeborenen Immunsystems zur Neigung zu bakterieller Besiedlung und häufigeren Infektionen bei der AD beiträgt<sup>201</sup>. Darüber hinaus könnte die identifizierte Variante *TLR2*-16934-A zu einer verminderten endogenen Calcitriol-Synthese und somit Funktion führen, da das essentielle Enzym für diesen Prozess, CYP27B1, in dendritischen Zellen durch *TLR*-2 abhängige Signalwege induziert wird<sup>77</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine verminderte Calcitriol-Perzeption zum Phänotyp der AD beitragen könnte. Die Daten zeigen eine *VDR* Genvariante („*GCT*“) gehäuft bei Erwachsenen mit schwerer atopischer Dermatitis<sup>155</sup>. Vitamin D wirkt nicht nur auf Immunzellen, sondern auch auf Keratinozyten. Die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Worm zeigte, dass die Ausprägung eines Allergen-induzierten Ekzems im Mausmodell durch einen niedrig-calcämischen synthetischen *VDR*-Agonisten vermindert wird<sup>144</sup>. Als der zugrunde liegende Mechanismus wurde eine Veränderung der epidermalen Barriere identifiziert. Zu den relevanten Molekülen zählte die Induktion der epidermalen Transglutaminase sowie Filaggrin, Loricrin und Involucrin, die für die optimale Struktur des Stratum corneums bedeutsam sind. Die Daten dieser Arbeit weisen auf eine Wirkungsverstärkung der identifizierten *VDR-GCT* Variante bei aufgereinigten, kurzfristig aktivierten Monozyten hin<sup>155</sup>. Während der inflammatorischen Reaktion kann es durch komplexe zelluläre Interaktion und sekundäre Wirkungen zu einem Einfluss der Genvariante auf den klinischen Verlauf kommen. Zu diesen Faktoren könnten eine verminderte Funktion des angeborenen Immunsystems und eine daraus resultierende verstärkte bzw. verlängerte bakterielle Besiedlung der Haut zählen<sup>155</sup>.

In aktuellen, genomweiten Untersuchungen großer Kollektive wurden neue Prädispositionsloci der AD identifiziert<sup>202-204</sup>. Diese beinhalteten nicht die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten SNPs im *TLR2* sowie *VDR* Gen. Dies unterstützt einerseits, dass die multifaktorielle Genese der AD mit einer genetischen Heterogenität verbunden ist. Ferner könnten Unterschiede in den untersuchten Patientenkollektiven zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Beispielsweise wurden in den Untersuchungen dieser Arbeit ausschließlich europäische Erwachsene mit mittelschwerer bis schwerer AD eingeschlossen, die erhöhte Serum-IgE-Konzentrationen aufwiesen. Ein limitierender Faktor der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sind die geringen Gruppengrößen im Vergleich zu o.g. genomweiten Untersuchungen.

Die identifizierten Polymorphismen im *TLR2*-sowie *VDR*-Gen sind für die Entwicklung einer AD nicht pathognomonisch, da sie häufig auch bei klinisch Gesunden vorkommen<sup>154,155</sup>. Da diese Polymorphismen gehäuft bei klinisch schwer Betroffenen und seltener bei Patienten mit geringgradiger Ausprägung gehäuft auftreten, könnten Einflüsse auf die angeborene und erworbene Immunität vorliegen, die den Krankheitsverlauf einer bestehenden AD beeinflussen<sup>154,155</sup>. Auf eine direkte Funktion Vitamin D-abhängiger Signalwege für die Pathogenese der AD weisen aktuelle Arbeiten auf genetischer und epidemiologischer Ebene hin. In einer repräsentativen japanischen Untersuchung wurde u.a. der für das Calcitriol-inaktivierende Enzym CYP24A1 Genlocus bei Patienten mit AD identifiziert<sup>205</sup>. Ferner ist bei Patienten mit AD und bekannter Filaggrin-Mutation ist die 25(OH)D Serumkonzentration im Vergleich zum Wildtyp erhöht<sup>206</sup>. Dies resultiert vermutlich auf der verminderten Expression einer UV-absorbierenden Filaggrin-Komponente<sup>206</sup> und könnte somit die jüngst beschriebene Erhöhung der 25(OH)D-Konzentration in einer repräsentativen Studie des Robert-Koch-Instituts (KiGGs) erklären<sup>207</sup>. Zwar ist die funktionelle Relevanz dieser Ergebnisse aktuell nicht bekannt, doch weisen sie in der Summe auf eine anti-inflammatorische Funktion hin; durch Assoziation der im Rahmen dieser Arbeit identifizierte *VDR* Genvariante mit schwerer AD, der Korrelation von 25(OH)D-Defizienz mit dem Schweregrad der AD<sup>135</sup> sowie der anti-inflammatorischen Wirkung im präklinischen Modell<sup>144</sup>. Um jedoch eine gesicherte Aussage über die Funktion von Vitamin D auf den Verlauf einer AD treffen zu können, ist eine prospektive kontrollierte Studie erforderlich.

Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Arbeit, dass Vitamin D auf molekularer Ebene nützliche Funktionen zur Kontrolle Typ I-allergischer Erkrankungen vermitteln kann. Darüber hinaus weisen die Ergebnisse darauf hin, dass für die Untersuchung der immunologischen Funktionen von Vitamin D bei Typ I-Allergien der Vitamin D-Status, die UV-Exposition sowie der *VDR*-Genotyp berücksichtigt werden sollte. Die Kenntnis dieser Einflussfaktoren kann dazu beitragen, die Konzeption künftiger therapeutischer Studien zu immunologischen Wirkungen von Vitamin D auf Typ I-allergische Reaktionen zu verbessern.

## 4 Zusammenfassung

Typ I-Allergien zählen zu den häufigsten Erkrankungen. Sie manifestieren sich meist in allergischer Rhinokonjunktivitis, allergischem Asthma bronchiale oder Nahrungsmittelallergie. Auch bei der atopischen Dermatitis, einer der häufigsten chronischen Hauterkrankungen, können Typ I-Allergien eine wichtige Rolle spielen. Vitamin D vermittelt, neben den bekannten Wirkungen auf den Calciumstoffwechsel, immunologische Wirkungen, die bislang wenig verstanden sind. Die Expression des Vitamin D-Rezeptors (VDR) in Immunzellen ermöglicht nach Bindung des biologisch aktiven Liganden Calcitriol, chem.  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin  $D_3$ , eine spezifische Genregulation. Diese bewirkt Veränderungen der Aktivierung und Differenzierung von Immunzellen. Humane B-Lymphozyten spielen in der Typ I-Allergie eine wesentliche Rolle. Sie können zu IgE-sezernierenden Zellen differenzieren. Ferner können sie auch durch Zytokinsekretion und Antigenpräsentation die Aktivierung von T-Lymphozyten und somit deren Differenzierung beeinflussen. In dieser Arbeit werden Vitamin D-abhängige Mechanismen im Kontext der Typ I-Allergie untersucht.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass Calcitriol die Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 bei B-Zellen fördert. Darüber hinaus wird durch direkte Interferenz des Vitamin D Rezeptors (VDR) mit dem IgE-Isotypenklassenwechsel diese biologische Funktion im murinen Typ I-Allergiemodell durch Verminderung der spezifischen und Gesamt-IgE-Serumkonzentrationen bestätigt. Diese involvierten Mechanismen in B-Zellen sind VDR-spezifisch, wie durch den Vergleich mit einem anderen nukleären Hormonrezeptor, des *liver-X-receptor*, in der Typ I-Allergie gezeigt. Calcitriol ist aufgrund der kurzen Halbwertszeit, der geringen therapeutischen Breite und der Toxizität für die langfristige Anwendung nicht geeignet. Ein Schlüsselergebnis dieser Arbeit zeigt, dass aktivierte B-Zellen von exogenem Calcitriol durch Expression des Enzyms CYP27B1, das die Aktivierung der Vorstufe 25-Hydroxyvitamin D (25(OH)D) vermittelt, unabhängig werden. Andere Arbeitsgruppen berichten über eine endogene Calcitriol-Synthese auch durch andere Immunzellen. Somit könnte, vorausgesetzt es ist ausreichend 25(OH)D verfügbar, durch eine gezielte Immunaktivierung der Verlauf von Typ I-Allergien beeinflusst werden.

Neben Vitamin D-Defizienz könnte eine genetisch bedingte verminderte VDR-Signaltransduktion immunologische Funktionen beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei erwachsenen Patienten mit schwerer atopischer Dermatitis ein Polymorphismus mit Hinweisen auf Funktionsverlust im *TLR2*-Gen, das zuvor als relevant für die endogene Calcitriolssynthese gezeigt wurde, identifiziert. Darüber hinaus war eine definierte *VDR*-Genvariante gehäuft bei Patienten mit atopischer Dermatitis feststellbar, die schwer erkrankt sind, nicht aber bei leichtem bis mittelschwerem Verlauf. Sind auch die genauen Konsequenzen dieser Genpolymorphismen aktuell nicht vollständig aufgeklärt, so könnten sie durch Veränderung der Vitamin D-Wirkungen zur schweren Ausprägung einer bestehenden

atopischen Dermatitis sowohl durch Wirkungen auf die angeborene als auch auf die erworbene Immunität oder die Keratinozyten selbst beitragen.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass Vitamin D wichtige Kontrollfunktionen vermitteln kann, die für die Entstehung und Erhaltung von Typ I-allergischen Immunreaktionen relevant sind, einschließlich der Förderung von IL-10- und Hemmung der IgE-Produktion. Protokolle zur Untersuchung der Funktion von Vitamin D, das endogen von Immunzellen zu Calcitriol metabolisiert wird, auf Typ I-allergische Reaktionen sollten den Vitamin D-Status gemessen an der 25(OH)D Serumkonzentration, die UV-Exposition sowie den *VDR* Genotyp berücksichtigen. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen dazu bei, die immunologische Funktion von Vitamin D zur Kontrolle Typ I-allergischer Erkrankungen besser zu verstehen, um diese zukünftig gezielt therapeutisch nutzen zu können.



## 5 Literaturverzeichnis

### 5.1 Literaturverzeichnis der eigenen Publikationen

- Heine, G.\***, Hoefler, N.\*, Franke, A., Nöthling, U., Schumann, R.R., Hamann, L., and Worm, M. (2012). *Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with severe atopic dermatitis in adults*. Br J Dermatol. 2013 (168): 855-858. \* = gleiche Mitarbeit
- Frentsch, M., Stark, R., Matzmohr, N., Meier, S., Durlanik, S., Schulz, A.R., Stervbo, U., Jürchott, K., Gebhardt, F., **Heine, G.**, Reuter, M.A., Betts, M.R., Busch, D., Thiel, A. CD40L expression permits CD8+ T cells to execute immunological helper functions. Blood. 2013 (122):405-12.
- Heine, G.**, Worm M. *Die B-Zelle in der Typ-I-Allergie*. 2012. Allergo Journal 2012 (21): 466-467.
- Hitzler, M., Majdic, O., **Heine, G.**, Worm, M., Ebert, G., Luch, A., Peiser, M. *Human langerhans cells control Th cells via programmed death-ligand 1 in response to bacterial stimuli and nickel-induced contact allergy*. PLoS ONE. 2012 (7): e46776.
- Heine, G.**, Drozdenko., G., Lahl, A., Unterwalder, N., Mei, H., Volk, H.-D., Dörner, T., Radbruch, A., and Worm, M. *Efficient tetanus toxoid immunization on vitamin D supplementation*. Eur J Clin Nutr. 2011 (65):329-334.
- Hartmann, B., **Heine, G.**, Babina, M., Steinmeyer, A., Zugel, U., Radbruch, A., and Worm, M. *Targeting the vitamin D receptor inhibits the B cell-dependent allergic immune response*. Allergy. 2011 (66): 540-548.
- Geldmeyer-Hilt, K., **Heine, G.**, Hartmann, B., Baumgrass, R., Radbruch, A., and Worm, M. *1,25-dihydroxyvitamin D impairs NF-kappa B in human naive B cells*. Biochem Biophys Res Commun. 2011 (407):699-702.
- Heine, G.**, Sims, G.P., Worm, M., Lipsky, P.E., Radbruch, A. *Isolation of Human B Cell Populations*. Curr Prot Immunol. 2011. Chapter 7: Unit7.5.
- Muul, L.M., **Heine, G.**, Silvin, C., James, S.P., Candotti, F., Radbruch, A., Worm, M. *Measurement of Proliferative Responses of Cultured Lymphocytes*. Curr Prot Immunol. 2011. Chapter 7: Unit 7.10.
- Worm, M., **Heine, G.**, Radbruch A. *Immunmodulation durch Vitamin D*. Allergologie. 2011 (34):538-542.
- Worm, M., **Heine, G.**, Babina, M., and Weise, C. *Ekzeme*. Formed. 2011 (1):48-52.
- Milovanovic, M., **Heine, G.\***, Hallatschek, W., Opitz, B., Radbruch, A., and Worm, M.\* *Vitamin D receptor binds to the epsilon germline gene promoter and exhibits transrepressive activity*. J Allergy Clin Immunol. 2010 (126):1016-23. \* = gleiche Mitarbeit
- Heine, G.**, Lahl, A., Mueller, C., and Worm, M. *Vitamin D deficiency in patients with cutaneous lupus erythematosus is prevalent throughout the year*. Br J Dermatol. 2010 (163):863-865.
- Oh, D. Y., Schumann, R. R., Hamann, L., Neumann, K., Worm, M., and **Heine, G.** *Association of the toll-like receptor 2 A-16934T promoter polymorphism with severe atopic dermatitis*. Allergy. 2009 (64):1608-1615.
- Heine, G.\***, Dahten, A.\*, Hilt, K., Ernst, D., Milovanovic, M., Hartmann, B., and Worm, M. *Liver X receptors control IgE expression in B cells*. J Immunol. 2009 (182):5276-5282. \* = gleiche Mitarbeit

- Milovanovic, M.\*, **Heine, G.\***, Zuberbier, T., and Worm, M. *Allergen extract-induced interleukin-10 in human memory B cells inhibits immunoglobulin E production*. Clin Exp Allergy. 2009 (39):671-678. \* = gleiche Mitarbeit
- Heine, G.**, Niesner, U., Chang, H. D., Steinmeyer, A., Zugel, U., Zuberbier, T., Radbruch, A., and Worm, M. *1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells*. Eur J Immunol. 2008 (38):2210-2218.
- Heine, G.**, and Worm, M. *Contact dermatitis in children*. G Ital Dermatol Venereol. 2007 (142):669-671.
- Heine, G.**, Schnuch, A., Uter, W., and Worm, M. *Type-IV sensitization profile of individuals with atopic eczema: results from the Information Network of Departments of Dermatology (IVDK) and the German Contact Dermatitis Research Group (DKG)*. Allergy. 2006 (61):611-616.
- Opitz, B., Vinzing, M., van Laak, V., Schmeck, B., **Heine, G.**, Gänther, S., Preissner, R., Slevogt, H., N'Guessan, P. D., Eitel, J., Goldmann, T., Flieger, A., Suttorp, N., and Hippenstiel, S. *Legionella pneumophila Induces IFN $\beta$  in Lung Epithelial Cells via IPS-1 and IRF3, Which Also Control Bacterial Replication*. Journal of Biological Chemistry. 2006 (281):36173-36179.
- Scheffel, F., **Heine, G.**, Henz, B. M., and Worm, M. *Retinoic acid inhibits CD40 plus IL-4 mediated IgE production through alterations of sCD23, sCD54 and IL-6 production*. Inflamm Res. 2005 (54):113-118.
- Heine, G.**, Schnuch, A., Uter, W., and Worm, M. *Frequency of contact allergy in German children and adolescents patch tested between 1995 and 2002: results from the Information Network of Departments of Dermatology and the German Contact Dermatitis Research Group*. Contact Dermatitis. 2004 (51):111-117.
- Roever, A. C., **Heine, G.**, Zuberbier, T., and Worm, M. *Allergen-mediated modulation of CD23 expression is interferon-gamma and interleukin-10 dependent in allergic and non-allergic individuals*. Clin Exp Allergy. 2003 (33):1568-1575.
- Heine, G.**, Sterry, W., and Worm, M. *Topical immunomodulators for treatment of eczema*. Wien Med Wochenschr. 2003 (153):522-525.
- Heine, G.**, Anton, K., Henz, B. M., and Worm, M. *1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits anti-CD40 plus IL-4-mediated IgE production in vitro*. Eur J Immunol. 2002 (32):3395-3404.

## 5.2 Literaturverzeichnis aller Autoren

1. Asher MI, Montefort S, Bjorksten B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, Williams H. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*. 2006;368(9537):733-743.
2. Langen U, Schmitz R, Steppuhn H. [Prevalence of allergic diseases in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2013;56(5-6):698-706.
3. Schmitz R, Atzpodien K, Schlaud M. Prevalence and risk factors of atopic diseases in German children and adolescents. *Pediatr Allergy Immunol*. 2012;23(8):716-723.
4. Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(3):205-217.
5. Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med*. 2008;358(14):1483-1494.
6. Sicherer SH, Leung DY. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2010. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(2):326-335.
7. Larche M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(10):761-771.
8. Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):685-698.
9. Adams JS, Hewison M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008;4(2):80-90.
10. Gell PGH, Coombs RRA. *Clinical Aspects of Immunology* (ed 1st ed.). Oxford: Blackwell Science Ltd.; 1963.
11. Heine G, Worm M. Die B-Zelle in der Typ-I-Allergie. *Allergo J*. 2012;21(8):466-467.
12. Geha RS, Jabara HH, Brodeur SR. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(9):721-732.
13. Klein U, Rajewsky K, Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med*. 1998;188(9):1679-1689.
14. Radbruch A, Burger C, Klein S, Muller W. Control of immunoglobulin class switch recombination. *Immunol Rev*. 1986;89:69-83.
15. Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:261-292.
16. Xu Z, Zan H, Pone EJ, Mai T, Casali P. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(7):517-531.
17. Gascan H, Gauchat JF, Roncarolo MG, Yssel H, Spits H, de Vries JE. Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones. *J Exp Med*. 1991;173(3):747-750.
18. Jabara HH, Fu SM, Geha RS, Vercelli D. CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells. *J Exp Med*. 1990;172(6):1861-1864.
19. Jabara HH, Schneider LC, Shapira SK, Alfieri C, Moody CT, Kieff E, Geha RS, Vercelli D. Induction of germ-line and mature C epsilon transcripts in human B cells stimulated with rIL-4 and EBV. *J Immunol*. 1990;145(10):3468-3473.
20. Jung S, Rajewsky K, Radbruch A. Shutdown of class switch recombination by deletion of a switch region control element. *Science*. 1993;259(5097):984-987.
21. Revy P, Muto T, Levy Y, et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell*. 2000;102(5):565-575.
22. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. 2000;102(5):553-563.
23. Muto T, Muramatsu M, Taniwaki M, Kinoshita K, Honjo T. Isolation, tissue distribution, and chromosomal localization of the human activation-induced cytidine deaminase (AID) gene. *Genomics*. 2000;68(1):85-88.

24. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683-765.
25. Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KG, Dorner T, Hiepe F. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(10):741-750.
26. Yang Z, Sullivan BM, Allen CD. Fluorescent in vivo detection reveals that IgE(+) B cells are restrained by an intrinsic cell fate predisposition. *Immunity.* 2012;36(5):857-872.
27. Francis JN, James LK, Paraskevopoulos G, Wong C, Calderon MA, Durham SR, Till SJ. Grass pollen immunotherapy: IL-10 induction and suppression of late responses precedes IgG4 inhibitory antibody activity. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(5):1120-1125 e1122.
28. Manz RA, Thiel A, Radbruch A. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature.* 1997;388(6638):133-134.
29. Holt PG, Leivers S. Radiation-resistant IgE-secreting cells in the mouse: susceptibility to suppressor T cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1983;71(2):188-190.
30. Vallerskog T, Gunnarsson I, Widhe M, Risselada A, Klareskog L, van Vollenhoven R, Malmstrom V, Trollmo C. Treatment with rituximab affects both the cellular and the humoral arm of the immune system in patients with SLE. *Clin Immunol.* 2007;122(1):62-74.
31. Simon D, Hosli S, Kostylina G, Yawalkar N, Simon HU. Anti-CD20 (rituximab) treatment improves atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(1):122-128.
32. Trendelenburg M, Schifferli JA. Rituximab in a patient with Hyper-IgE syndrome. *Arch Dermatol.* 2007;143(6):807-808.
33. Cartin-Ceba R, Keogh KA, Specks U, Sethi S, Fervenza FC. Rituximab for the treatment of Churg-Strauss syndrome with renal involvement. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(9):2865-2871.
34. Casale TB, Bernstein IL, Busse WW, LaForce CF, Tinkelman DG, Stoltz RR, Dockhorn RJ, Reimann J, Su JQ, Fick RB, Jr., Adelman DC. Use of an anti-IgE humanized monoclonal antibody in ragweed-induced allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;100(1):110-121.
35. Rock KL, Benacerraf B, Abbas AK. Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. I. Role of surface immunoglobulin receptors. *J Exp Med.* 1984;160(4):1102-1113.
36. Getahun A, Hjelm F, Heyman B. IgE Enhances Antibody and T Cell Responses In Vivo via CD23+ B Cells. *J Immunol.* 2005;175:1473-1482.
37. Mark A, Bjorksten B, Granstrom M. Immunoglobulin E responses to diphtheria and tetanus toxoids after booster with aluminium-adsorbed and fluid DT-vaccines. *Vaccine.* 1995;13(7):669-673.
38. Rowe J, Yerkovich ST, Richmond P, Suriyaarachchi D, Fisher E, Feddema L, Loh R, Sly PD, Holt PG. Th2-associated local reactions to the acellular diphtheria-tetanus-pertussis vaccine in 4- to 6-year-old children. *Infect Immun.* 2005;73(12):8130-8135.
39. Vaglio A, Buzio C, Zwerina J. Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (Churg-Strauss): state of the art. *Allergy.* 2013;68(3):261-273.
40. Goetz M, Atreya R, Ghalibafian M, Galle PR, Neurath MF. Exacerbation of ulcerative colitis after rituximab salvage therapy. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13(11):1365-1368.
41. Kotlarz D, Beier R, Murugan D, et al. Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. *Gastroenterology.* 2012;143(2):347-355.
42. Dass S, Vital EM, Emery P. Development of psoriasis after B cell depletion with rituximab. *Arthritis Rheum.* 2007;56(8):2715-2718.
43. Asadullah K, Friedrich M, Hanneken S, Rohrbach C, Audring H, Döcke WD, Vergopoulos A, Ebeling M, Volk HD, Sterry W. Effects of systemic interleukin-10 therapy on psoriatic skin lesions: histological, immunohistological and molecularbiological findings. *J Invest Dermatol.* 2001;116:721-727.
44. Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol.* 2002;3(10):944-950.
45. Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI, Spolski R, Poe JC, Leonard WJ, Tedder TF. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature.* 2012;491(7423):264-268.
46. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:221-241.

47. Bouaziz JD, Calbo S, Maho-Vaillant M, Saussine A, Bagot M, Bensussan A, Musette P. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. *Eur J Immunol*. 2010;40(10):2686-2691.
48. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*. 2011;117(2):530-541.
49. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(6 Suppl):1678S-1688S.
50. Holick MF. Vitamin D: A millenium perspective. *J Cell Biochem*. 2003;88(2):296-307.
51. Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, Holick SA, Potts JT, Jr., Anderson RR, Blank IH, Parrish JA, Elias P. Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. *Science*. 1980;210(4466):203-205.
52. Webb AR, DeCosta BR, Holick MF. Sunlight regulates the cutaneous production of vitamin D3 by causing its photodegradation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989;68(5):882-887.
53. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357(3):266-281.
54. Heaney RP, Armas LA, Shary JR, Bell NH, Binkley N, Hollis BW. 25-Hydroxylation of vitamin D3: relation to circulating vitamin D3 under various input conditions. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(6):1738-1742.
55. Mawer EB, Backhouse J, Holman CA, Lumb GA, Stanbury SW. The distribution and storage of vitamin D and its metabolites in human tissues. *Clin Sci*. 1972;43(3):413-431.
56. Hart GR, Furniss JL, Laurie D, Durham SK. Measurement of vitamin D status: background, clinical use, and methodologies. *Clin Lab*. 2006;52(7-8):335-343.
57. Tsiaras WG, Weinstock MA. Factors influencing vitamin D status. *Acta Derm Venereol*. 2011;91(2):115-124.
58. Rowling MJ, Gliniak C, Welsh J, Fleet JC. High dietary vitamin D prevents hypocalcemia and osteomalacia in CYP27B1 knockout mice. *J Nutr*. 2007;137(12):2608-2615.
59. Lou YR, Molnar F, Perakyla M, Qiao S, Kalueff AV, St-Arnaud R, Carlberg C, Tuohimaa P. 25-Hydroxyvitamin D(3) is an agonistic vitamin D receptor ligand. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;118(3):162-170.
60. Koutkia P, Chen TC, Holick MF. Vitamin D intoxication associated with an over-the-counter supplement. *N Engl J Med*. 2001;345(1):66-67.
61. Vieth R. Vitamin D toxicity, policy, and science. *J Bone Miner Res*. 2007;22 Suppl 2:V64-68.
62. Mawer EB, Lumb GA, Stanbury SW. Long biological half-life of vitamin D3 and its polar metabolites in human serum. *Nature*. 1969;222(5192):482-483.
63. Holick MF, Schnoes HK, DeLuca HF. Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a form of vitamin D3 metabolically active in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68(4):803-804.
64. Fu GK, Portale AA, Miller WL. Complete structure of the human gene for the vitamin D 1alpha-hydroxylase, P450c1alpha. *DNA Cell Biol*. 1997;16(12):1499-1507.
65. St-Arnaud R, Messerlian S, Moir JM, Omdahl JL, Glorieux FH. The 25-hydroxyvitamin D 1-alpha-hydroxylase gene maps to the pseudovitamin D-deficiency rickets (PDDR) disease locus. *J Bone Miner Res*. 1997;12(10):1552-1559.
66. Takeyama K, Kitanaka S, Sato T, Kobori M, Yanagisawa J, Kato S. 25-Hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science*. 1997;277(5333):1827-1830.
67. Kim MS, Fujiki R, Kitagawa H, Kato S. 1alpha,25(OH)2D3-induced DNA methylation suppresses the human CYP27B1 gene. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;265-266:168-173.
68. Kratz A, Ferraro M, Sluss PM, Lewandrowski KB. Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Laboratory reference values. *N Engl J Med*. 2004;351(15):1548-1563.
69. Kumar R. Metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Physiol Rev*. 1984;64(2):478-504.
70. Issa LL, Leong GM, Eisman JA. Molecular mechanism of vitamin D receptor action. *Inflamm Res*. 1998;47(12):451-475.
71. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Haussler CA, Hsieh D, Hsieh JC, Jurutka PW. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcif Tissue Int*. 2013;92(2):77-98.
72. Ebert R, Schutze N, Adamski J, Jakob F. Vitamin D signaling is modulated on multiple levels in health and disease. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;248(1-2):149-159.
73. Norman AW, Mizwicki MT, Norman DP. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(1):27-41.

74. Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D<sub>3</sub>: genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(4):543-559.
75. Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors in human leukocytes. *Science.* 1983;221(4616):1181-1183.
76. May E, Asadullah K, Zugel U. Immunoregulation through 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its analogs. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2004;3(4):377-393.
77. Liu PT, Stenger S, Li H, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science.* 2006;311(5768):1770-1773.
78. Kreutz M, Andreesen R. Induction of human monocyte to macrophage maturation in vitro by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Blood.* 1990;76(12):2457-2461.
79. Kreutz M, Andreesen R, Krause SW, Szabo A, Ritz E, Reichel H. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> production and vitamin D<sub>3</sub> receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages. *Blood.* 1993;82(4):1300-1307.
80. Korf H, Wenes M, Stijlemans B, Takiishi T, Robert S, Miani M, Eizirik DL, Gysemans C, Mathieu C. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> curtails the inflammatory and T cell stimulatory capacity of macrophages through an IL-10-dependent mechanism. *Immunobiology.* 2012;217(12):1292-1300.
81. D'Ambrosio D, Cippitelli M, Cocciolo MG, Mazzeo D, Di Lucia P, Lang R, Sinigaglia F, Panina-Bordignon P. Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *J Clin Invest.* 1998;101(1):252-262.
82. Penna G, Adorini L. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol.* 2000;164(5):2405-2411.
83. Griffin MD, Lutz W, Phan VA, Bachman LA, McKean DJ, Kumar R. Dendritic cell modulation by 1 $\alpha$ ,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(12):6800-6805.
84. Penna G, Amuchastegui S, Giarratana N, Daniel KC, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol.* 2007;178(1):145-153.
85. Takeuchi A, Reddy GS, Kobayashi T, Okano T, Park J, Sharma S. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) as a molecular target for 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-mediated effects. *J Immunol.* 1998;160(1):209-218.
86. Baeke F, H. K, Overbergh L, Verstuyf A, Thorrez L, Van Lommel L, Waer M, Schuit F, Gysemans C, Mathieu C. The Vitamin D Analog, TX527, Promotes a Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> Regulatory T Cell Profile and Induces a Migratory Signature Specific for Homing to Sites of Inflammation. *J Immunol.* 2011;186:132-142.
87. Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, Walker LS, Lammas DA, Raza K, Sansom DM. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol.* 2009;183(9):5458-5467.
88. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, de Waal-Malefyt R, Coffman RL, Hawrylowicz CM, O'Garra A. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4<sup>+</sup> T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med.* 2002;195(5):603-616.
89. Urry Z, Xystrakis E, Richards DF, McDonald J, Sattar Z, Cousins DJ, Corrigan CJ, Hickman E, Brown Z, Hawrylowicz CM. Ligation of TLR9 induced on human IL-10-secreting Tregs by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> abrogates regulatory function. *J Clin Invest.* 2009;119(2):387-398.
90. Urry Z, Chambers ES, Xystrakis E, et al. The role of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and cytokines in the promotion of distinct Foxp3<sup>+</sup> and IL-10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol.* 2012;42(10):2697-2708.
91. Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J.* 2001;15(14):2579-2585.
92. Iho S, Takahashi T, Kura F, Sugiyama H, Hoshino T. The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on in vitro immunoglobulin production in human B cells. *J Immunol.* 1986;136(12):4427-4431.

93. Chen WC, Vayuvegula B, Gupta S. 1,25-Dihydroxyvitamin D3-mediated inhibition of human B cell differentiation. *Clin Exp Immunol.* 1987;69(3):639-646.
94. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin d3 on human B cell differentiation. *J Immunol.* 2007;179(3):1634-1647.
95. Heine G, Anton K, Henz BM, Worm M. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits anti-CD40 plus IL-4-mediated IgE production in vitro. *Eur J Immunol.* 2002;32(12):3395-3404.
96. Milovanovic M, Heine G, Hallatschek W, Opitz B, Radbruch A, Worm M. Vitamin D receptor binds to the epsilon germline gene promoter and exhibits transrepressive activity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(5):1016-1023, 1023 e1011-1014.
97. Sigmundsdottir H, Pan J, Debes GF, Alt C, Habtezion A, Soler D, Butcher EC. DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat Immunol.* 2007;8(3):285-293.
98. Shirakawa AK, Nagakubo D, Hieshima K, Nakayama T, Jin Z, Yoshie O. 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces CCR10 expression in terminally differentiating human B cells. *J Immunol.* 2008;180(5):2786-2795.
99. Stoeckler JD, Stoeckler HA, Kouttab N, Maizel AL. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates CD38 expression on human lymphocytes. *J Immunol.* 1996;157(11):4908-4917.
100. Yamanaka K, Dimitroff CJ, Fuhlbrigge RC, Kakeda M, Kurokawa I, Mizutani H, Kupper TS. Vitamins A and D are potent inhibitors of cutaneous lymphocyte-associated antigen expression. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121(1):148-157 e143.
101. Papapoulos SE, Clemens TL, Fraher LJ, Lewin IG, Sandler LM, O'Riordan JL. 1, 25-dihydroxycholecalciferol in the pathogenesis of the hypercalcaemia of sarcoidosis. *Lancet.* 1979;1(8117):627-630.
102. Barbour GL, Coburn JW, Slatopolsky E, Norman AW, Horst RL. Hypercalcemia in an anephric patient with sarcoidosis: evidence for extrarenal generation of 1,25-dihydroxyvitamin D. *N Engl J Med.* 1981;305(8):440-443.
103. Adams JS, Sharma OP, Gacad MA, Singer FR. Metabolism of 25-hydroxyvitamin D3 by cultured pulmonary alveolar macrophages in sarcoidosis. *J Clin Invest.* 1983;72(5):1856-1860.
104. Adams JS, Hewison M. Extrarenal expression of the 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase. *Arch Biochem Biophys.* 2012;523(1):95-102.
105. Miyara M, Amoura Z, Parizot C, et al. The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells. *J Exp Med.* 2006;203(2):359-370.
106. Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S, et al. Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest.* 2006;116(1):146-155.
107. Fritsche J, Mondal K, Ehrnsperger A, Andreesen R, Kreutz M. Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-1 alpha-hydroxylase and production of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 by human dendritic cells. *Blood.* 2003;102(9):3314-3316.
108. Enioutina EY, Bareyan D, Daynes RA. TLR-induced local metabolism of vitamin D3 plays an important role in the diversification of adaptive immune responses. *J Immunol.* 2009;182(7):4296-4305.
109. Enioutina EY, Bareyan D, Daynes RA. TLR ligands that stimulate the metabolism of vitamin D3 in activated murine dendritic cells can function as effective mucosal adjuvants to subcutaneously administered vaccines. *Vaccine.* 2008;26(5):601-613.
110. Smolders J, Thewissen M, Theunissen R, Peelen E, Knippenberg S, Menheere P, Cohen Tervaert JW, Hupperts R, Damoiseaux J. Vitamin D-related gene expression profiles in immune cells of patients with relapsing remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2011;235(1-2):91-97.
111. Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest.* 2006;116(8):2062-2072.
112. Erben RG, Soegiarto DW, Weber K, Zeitz U, Lieberherr M, Gniadecki R, Moller G, Adamski J, Balling R. Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D. *Mol Endocrinol.* 2002;16(7):1524-1537.
113. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, Demay M. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev.* 2008;29(6):726-776.

114. Wittke A, Weaver V, Mahon BD, August A, Cantorna MT. Vitamin D receptor-deficient mice fail to develop experimental allergic asthma. *J Immunol.* 2004;173(5):3432-3436.
115. Yu S, Cantorna MT. The vitamin D receptor is required for iNKT cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(13):5207-5212.
116. Yu S, Cantorna MT. Epigenetic reduction in invariant NKT cells following in utero vitamin D deficiency in mice. *J Immunol.* 2011;186(3):1384-1390.
117. Yu S, Zhao J, Cantorna MT. Invariant NKT cell defects in vitamin D receptor knockout mice prevents experimental lung inflammation. *J Immunol.* 2011;187(9):4907-4912.
118. Mayne CG, Spanier JA, Relland LM, Williams CB, Hayes CE. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 acts directly on the T lymphocyte vitamin D receptor to inhibit experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 2011;41(3):822-832.
119. Spach KM, Nashold FE, Dittel BN, Hayes CE. IL-10 signaling is essential for 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2006;177(9):6030-6037.
120. Vieth R. What is the optimal vitamin D status for health? *Prog Biophys Mol Biol.* 2006;92(1):26-32.
121. Kimball S, Fuleihan Gel H, Vieth R. Vitamin D: a growing perspective. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2008;45(4):339-414.
122. Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, Bendich A. Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr.* 2003;22(2):142-146.
123. Kimball SM, Burton JM, O'Connor PG, Vieth R. Urinary calcium response to high dose vitamin D3 with calcium supplementation in patients with multiple sclerosis. *Clin Biochem.* 2011;44(10-11):930-932.
124. Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, Arnaud S, Galan P, Hercberg S, Meunier PJ. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int.* 1997;7(5):439-443.
125. Priemel M, von Demarus C, Klatter TO, et al. Bone mineralization defects and vitamin D deficiency: histomorphometric analysis of iliac crest bone biopsies and circulating 25-hydroxyvitamin D in 675 patients. *J Bone Miner Res.* 2010;25(2):305-312.
126. Wu AC, Tantisira K, Li L, Fuhlbrigge AL, Weiss ST, Litonjua A, Childhood Asthma Management Program Research G. Effect of vitamin D and inhaled corticosteroid treatment on lung function in children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186(6):508-513.
127. Brehm JM, Schuemann B, Fuhlbrigge AL, Hollis BW, Strunk RC, Zeiger RS, Weiss ST, Litonjua AA. Serum vitamin D levels and severe asthma exacerbations in the Childhood Asthma Management Program study. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(1):52-58 e55.
128. Brehm JM, Celedon JC, Soto-Quiros ME, Avila L, Hunninghake GM, Forno E, Laskey D, Sylvia JS, Hollis BW, Weiss ST, Litonjua AA. Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179(9):765-771.
129. Brehm JM, Acosta-Perez E, Klei L, et al. Vitamin D insufficiency and severe asthma exacerbations in Puerto Rican children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186(2):140-146.
130. Searing DA, Zhang Y, Murphy JR, Hauk PJ, Goleva E, Leung DY. Decreased serum vitamin D levels in children with asthma are associated with increased corticosteroid use. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(5):995-1000.
131. Camargo CA, Jr., Ingham T, Wickens K, et al. Cord-blood 25-hydroxyvitamin D levels and risk of respiratory infection, wheezing, and asthma. *Pediatrics.* 2011;127(1):e180-187.
132. Mai XM, Langhammer A, Camargo CA, Jr., Chen Y. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and incident asthma in adults: the HUNT Study. *Am J Epidemiol.* 2012;176(12):1169-1176.
133. Jones AP, Palmer D, Zhang G, Prescott SL. Cord blood 25-hydroxyvitamin D3 and allergic disease during infancy. *Pediatrics.* 2012;130(5):e1128-1135.
134. Sharief S, Jariwala S, Kumar J, Muntner P, Melamed ML. Vitamin D levels and food and environmental allergies in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(5):1195-1202.
135. Peroni DG, Piacentini GL, Cametti E, Chinellato I, Boner AL. Correlation between serum 25-hydroxyvitamin D levels and severity of atopic dermatitis in children. *Br J Dermatol.* 2011;164(5):1078-1082.
136. Back O, Blomquist HK, Hernell O, Stenberg B. Does vitamin D intake during infancy promote the development of atopic allergy? *Acta Derm Venereol.* 2009;89(1):28-32.



137. Hypponen E, Berry DJ, Wjst M, Power C. Serum 25-hydroxyvitamin D and IgE - a significant but nonlinear relationship. *Allergy*. 2009;64(4):613-620.
138. Rothers J, Wright AL, Stern DA, Halonen M, Camargo CA, Jr. Cord blood 25-hydroxyvitamin D levels are associated with aeroallergen sensitization in children from Tucson, Arizona. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;128(5):1093-1099 e1091-1095.
139. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *Jama*. 2006;296(23):2832-2838.
140. Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, Hernan MA, Olek MJ, Willett WC, Ascherio A. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology*. 2004;62(1):60-65.
141. Kimball SM, Ursell MR, O'Connor P, Vieth R. Safety of vitamin D3 in adults with multiple sclerosis. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(3):645-651.
142. Smolders J, Peelen E, Thewissen M, Cohen Tervaert JW, Menheere P, Hupperts R, Damoiseaux J. Safety and T cell modulating effects of high dose vitamin D3 supplementation in multiple sclerosis. *PLoS One*. 2010;5(12):e15235.
143. Sidbury R, Sullivan AF, Thadhani RI, Camargo CA, Jr. Randomized controlled trial of vitamin D supplementation for winter-related atopic dermatitis in Boston: a pilot study. *Br J Dermatol*. 2008;159(1):245-247.
144. Hartmann B, Riedel R, Jorss K, Loddenkemper C, Steinmeyer A, Zugel U, Babina M, Radbruch A, Worm M. Vitamin D Receptor Activation Improves Allergen-Trigged Eczema in Mice. *J Invest Dermatol*. 2012;132(2):330-336.
145. Heine G, Niesner U, Chang HD, Steinmeyer A, Zugel U, Zuberbier T, Radbruch A, Worm M. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells. *Eur J Immunol*. 2008;38(8):2210-2218.
146. Hartmann B, Heine G, Babina M, Steinmeyer A, Zugel U, Radbruch A, Worm M. Targeting the vitamin D receptor inhibits the B cell-dependent allergic immune response. *Allergy*. 2011;66(4):540-548.
147. Worm M, Krah JM, Manz RA, Henz BM. Retinoic acid inhibits CD40 + interleukin-4-mediated IgE production in vitro. *Blood*. 1998;92(5):1713-1720.
148. Ruhl R, Dahten A, Schweigert FJ, Herz U, Worm M. Inhibition of IgE-production by peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Invest Dermatol*. 2003;121(4):757-764.
149. Willy PJ, Mangelsdorf DJ. Unique requirements for retinoid-dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR. *Genes Dev*. 1997;11(3):289-298.
150. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature*. 1996;383(6602):728-731.
151. Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev*. 1995;9(9):1033-1045.
152. Wang JH, Tuohimaa P. Calcitriol and TO-901317 interact in human prostate cancer LNCaP cells. *Gene Regul Syst Bio*. 2008;2:97-105.
153. Heine G, Dahten A, Hilt K, Ernst D, Milovanovic M, Hartmann B, Worm M. Liver X receptors control IgE expression in B cells. *J Immunol*. 2009;182(9):5276-5282.
154. Oh DY, Schumann RR, Hamann L, Neumann K, Worm M, Heine G. Association of the toll-like receptor 2 A-16934T promoter polymorphism with severe atopic dermatitis. *Allergy*. 2009;64(11):1608-1615.
155. Heine G, Hoefler N, Franke A, Nothling U, Schumann RR, Hamann L, Worm M. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with severe atopic dermatitis in adults. *Br J Dermatol*. 2013;168(4):855-858.
156. Morgan JW, Morgan DM, Lasky SR, Ford D, Kouttab N, Maizel AL. Requirements for induction of vitamin D-mediated gene regulation in normal human B lymphocytes. *J Immunol*. 1996;157(7):2900-2908.
157. Morgan JW, Sliney DJ, Morgan DM, Maizel AL. Differential regulation of gene transcription in subpopulations of human B lymphocytes by vitamin D3. *Endocrinology*. 1999;140(1):381-391.
158. Matilainen JM, Rasanen A, Gynther P, Vaisanen S. The genes encoding cytokines IL-2, IL-10 and IL-12B are primary 1alpha,25(OH)2D3 target genes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;121(1-2):142-145.

159. Tiosano D, Wildbaum G, Gepstein V, Verbitsky O, Weisman Y, Karin N, Eztioni A. The role of vitamin D receptor in innate and adaptive immunity: a study in hereditary vitamin D-resistant rickets patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(4):1685-1693.
160. Matilainen JM, Husso T, Toropainen S, Seuter S, Turunen MP, Gynther P, Yla-Herttuala S, Carlberg C, Vaisanen S. Primary effect of 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on IL-10 expression in monocytes is short-term down-regulation. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1803(11):1276-1286.
161. Fillatreau S, Gray D, Anderton SM. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(5):391-397.
162. Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(4):271-283.
163. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol.* 1991;146(10):3444-3451.
164. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* 1991;147(11):3815-3822.
165. Faith A, Singh N, Farooque S, Dimeloe S, Richards DF, Lu H, Roberts D, Chevretton E, Lee TH, Corrigan CJ, Hawrylowicz CM. T cells producing the anti-inflammatory cytokine IL-10 regulate allergen-specific Th2 responses in human airways. *Allergy.* 2012;67(8):1007-1013.
166. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med.* 1991;174(4):915-924.
167. Ding L, Linsley PS, Huang LY, Germain RN, Shevach EM. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol.* 1993;151(3):1224-1234.
168. Xystrakis E, Boswell SE, Hawrylowicz CM. T regulatory cells and the control of allergic disease. *Expert Opin Biol Ther.* 2006;6(2):121-133.
169. O'Garra A, Barrat FJ, Castro AG, Vicari A, Hawrylowicz C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunol Rev.* 2008;223:114-131.
170. Borish L, Aarons A, Rumblyrt J, Cvietusa P, Negri J, Wenzel S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;97(6):1288-1296.
171. Taher YA, van Esch BC, Hofman GA, Henricks PA, van Oosterhout AJ. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> potentiates the beneficial effects of allergen immunotherapy in a mouse model of allergic asthma: role for IL-10 and TGF- $\beta$ . *J Immunol.* 2008;180(8):5211-5221.
172. 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(12):2386-2392.
173. Hoving JC, Kirstein F, Nieuwenhuizen NE, Fick LC, Hobeika E, Reth M, Brombacher F. B cells that produce immunoglobulin E mediate colitis in BALB/c mice. *Gastroenterology.* 2012;142(1):96-108.
174. Geldmeyer-Hilt K, Heine G, Hartmann B, Baumgrass R, Radbruch A, Worm M. 1,25-dihydroxyvitamin D impairs NF- $\kappa$ B in human naive B cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;407:669-702.
175. Wagner EF, Hanna N, Fast LD, Kouttab N, Shank PR, Vazquez A, Sharma S. Novel diversity in IL-4-mediated responses in resting human naive B cells versus germinal center/memory B cells. *J Immunol.* 2000;165(10):5573-5579.
176. Morgan JW, Reddy GS, Uskokovic MR, May BK, Omdahl JL, Maizel AL, Sharma S. Functional block for 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-mediated gene regulation in human B lymphocytes. *J Biol Chem.* 1994;269(18):13437-13443.
177. Defrance T, Aubry JP, Rousset F, Vanbervliet B, Bonnefoy JY, Arai N, Takebe Y, Yokota T, Lee F, Arai K, et al. Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal human B lymphocytes. *J Exp Med.* 1987;165(6):1459-1467.
178. Gauchat JF, Aversa G, Gascan H, de Vries JE. Modulation of IL-4 induced germline epsilon RNA synthesis in human B cells by tumor necrosis factor- $\alpha$ , anti-CD40 monoclonal antibodies or

- transforming growth factor-beta correlates with levels of IgE production. *Int Immunol*. 1992;4(3):397-406.
179. Gauchat JF, Lebman DA, Coffman RL, Gascan H, de Vries JE. Structure and expression of germline epsilon transcripts in human B cells induced by interleukin 4 to switch to IgE production. *J Exp Med*. 1990;172(2):463-473.
180. Lumsden JM, Williams JA, Hodes RJ. Differential requirements for expression of CD80/86 and CD40 on B cells for T-dependent antibody responses in vivo. *J Immunol*. 2003;170(2):781-787.
181. Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI, Baltimore D. Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell*. 1995;80(2):321-330.
182. Szeto FL, Sun J, Kong J, Duan Y, Liao A, Madara JL, Li YC. Involvement of the vitamin D receptor in the regulation of NF-kappaB activity in fibroblasts. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007;103(3-5):563-566.
183. Cohen-Lahav M, Shany S, Tobvin D, Chaimovitz C, Douvdevani A. Vitamin D decreases NFkappaB activity by increasing IkappaBalpha levels. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(4):889-897.
184. Tangye SG, Ferguson A, Avery DT, Ma CS, Hodgkin PD. Isotype switching by human B cells is division-associated and regulated by cytokines. *J Immunol*. 2002;169(8):4298-4306.
185. Avery DT, Ma CS, Bryant VL, Santner-Nanan B, Nanan R, Wong M, Fulcher DA, Cook MC, Tangye SG. STAT3 is required for IL-21-induced secretion of IgE from human naive B cells. *Blood*. 2008;112(5):1784-1793.
186. Zugel U, Steinmeyer A, Giesen C, Asadullah K. A novel immunosuppressive 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 analog with reduced hypercalcemic activity. *J Invest Dermatol*. 2002;119(6):1434-1442.
187. Defrance T, Vanbervliet B, Briere F, Durand I, Rousset F, Banchereau J. Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J Exp Med*. 1992;175(3):671-682.
188. Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF, Bonnefoy JY. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol*. 1998;160(7):3555-3561.
189. Milovanovic M, Heine G, Zuberbier T, Worm M. Allergen extract-induced interleukin-10 in human memory B cells inhibits immunoglobulin E production. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(5):671-678.
190. Zelcer N, Tontonoz P. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J Clin Invest*. 2006;116(3):607-614.
191. Brightbill HD, Jeet S, Lin Z, et al. Antibodies specific for a segment of human membrane IgE deplete IgE-producing B cells in humanized mice. *J Clin Invest*. 2010;120(6):2218-2229.
192. Heine G, Drozdenko G, Lahl A, Unterwalder N, Mei H, Volk H-D, Dörner T, Radbruch A, Worm M. Efficient tetanus toxoid immunization on vitamin D supplementation. *Eur J Clin Nutr*. 2011;65(3):329-334.
193. Hintzpeter B, Mensink GB, Thierfelder W, Muller MJ, Scheidt-Nave C. Vitamin D status and health correlates among German adults. *Eur J Clin Nutr*. 2008;62(9):1079-1089.
194. 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.
195. Heine G, Lahl A, Muller C, Worm M. Vitamin D deficiency in patients with cutaneous lupus erythematosus is prevalent throughout the year. *Br J Dermatol*. 2010;163(4):863-865.
196. Renne J, Werfel T, Wittmann M. High frequency of vitamin D deficiency among patients with cutaneous lupus erythematosus. *Br J Dermatol*. 2008;159(2):485-486.
197. Potaczek DP, Kwasny-Krochin B, Nishiyama C, Okumura K, Gluszek P, Undas A. Tissue factor +5466A>G and -1208D>I genetic polymorphisms and severity of rheumatoid arthritis. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48(3):423-425.
198. Ahmad-Nejad P, Mrabet-Dahbi S, Breuer K, Klotz M, Werfel T, Herz U, Heeg K, Neumaier M, Renz H. The toll-like receptor 2 R753Q polymorphism defines a subgroup of patients with atopic dermatitis having severe phenotype. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(3):565-567.
199. Novak N, Yu CF, Bussmann C, et al. Putative association of a TLR9 promoter polymorphism with atopic eczema. *Allergy*. 2007;62(7):766-772.
200. Hasannejad H, Takahashi R, Kimishima M, Hayakawa K, Shiohara T. Selective impairment of Toll-like receptor 2-mediated proinflammatory cytokine production by monocytes from patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(1):69-75.

201. Niebuhr M, Werfel T. Innate immunity, allergy and atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2010;10(5):463-468.
202. Esparza-Gordillo J, Weidinger S, Folster-Holst R, et al. A common variant on chromosome 11q13 is associated with atopic dermatitis. *Nat Genet*. 2009;41(5):596-601.
203. Paternoster L, Standl M, Chen CM, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies three new risk loci for atopic dermatitis. *Nat Genet*. 2012;44(2):187-192.
204. 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(7):808-812.
205. 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(11):1222-1226.
206. 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(5):1204-1207 e1202.
207. 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(7):906-910.

## 6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Margitta Worm für Ihre große Unterstützung, Ihr Vertrauen, die zahllosen konstruktiven Diskussionen und dass sie mein Interesse an der Wissenschaft stets gefördert hat. Ihre Freude klinische Fragestellungen wissenschaftlich zu betrachten, Fragen zu entwickeln und zielstrebig zu verfolgen, hat mich sehr beeinflusst. Ich bin ihr ferner für die Möglichkeit dankbar in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Radbruch als Postdoc gearbeitet zu haben.

Herr Prof. Andreas Radbruch bin ich zu besonderem Dank verpflichtet. Seine Begeisterung für Forschung, diese direkt zu vermitteln, seine kritische Sicht- und Herangehensweise an wissenschaftliche Fragen, Geduld in der Sache und seine herzliche, stets menschliche Art haben mich beeindruckt und geprägt.

Bei Herr Prof. Torsten Zuberbier und Herr Prof. Wolfram Sterry bedanke ich für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern in den Arbeitsgruppen von Frau Prof. Worm und Herr Prof. Radbruch für die gute Zusammenarbeit und konstruktiven Diskussionen, insbesondere bei Dennis Ernst, Christin Weise, Uwe Niesner und Hyun-Dong Chang.

Meinen Kooperationspartnern und Koautoren danke ich für die verlässliche Zusammenarbeit und konstruktiven Diskussionen, die die Publikationen bereichert haben. Besonderer Dank gilt Herr Prof. Bastian Opitz sowie Herr Prof. Ralf Schumann, P.D. Lutz Hamann und ihrem Team.

Meinen Eltern und Brüdern bin ich dankbar für Ihre moralische und seelische Unterstützung auf die ich mich stets verlassen konnte. Meiner Frau Chantip gebührt mein Dank von Herzen für Ihr Verständnis, Ihre Unterstützung und Geduld. Ohne diese entscheidende Grundlage, und die Freude und Begeisterung die sie mir zusammen mit unserem Sohn Max Kim Seng und unserer Tochter Mali Anna Sophie täglich schenken, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

## Eidesstattliche Erklärung

§4 Abs. 3(k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

Datum

.....

Dr. med. Guido Heine