

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

DISSERTATION

**Der Einfluss von Vitamin D auf die
spezifische humorale Immunantwort**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Annika Olivia Regina Lahl

aus Berlin

Gutachter/in: 1. N.N.

2. N.N.

3. N.N.

Datum der Promotion: 30.05.2015

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Hintergrund: Vitamin D wird primär endogen UV-abhängig gebildet, nur ein relativ geringer Anteil wird über die Nahrung zugeführt. Daher wird in den Wintermonaten in der Bevölkerung häufig eine relative Vitamin D-Unterversorgung beobachtet.

Ein Vitamin D-Mangel wird in der Fachliteratur mit einer Reihe chronischer Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Aus diesem Grunde stellt sich die Frage der Notwendigkeit einer prophylaktischen Vitamin D-Supplementation zumindest während der Wintermonate.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, zu prüfen, ob eine zeitlich begrenzte Vitamin D-Supplementation die saisonal auftretende Vitamin D-Defizienz verhindern kann. Gleichzeitig sollte geprüft werden, ob - und wenn ja, wie - die spezifische humorale Immunantwort von einer solchen Supplementation beeinflusst wird.

Da Vitamin D in einem engem metabolischem Zusammenspiel mit dem Immunsystem steht, betrachteten wir in weiterführenden Analysen inwieweit sich auch bei Patienten mit Störungen des Immunsystems (Typ-I-Allergie, kutaner Lupus erythematoses - CLE) bezüglich des Vitamin D-Status jahreszeitliche Schwankungen finden und ob sich diese im Vergleich zur normalen Population unterscheiden. Als Referenzwerte wurden die pseudonymisierten Daten einer Patientenkohorte der Charité – Universitätsmedizin Berlin herangezogen.

Untersuchungsdesign: Während der UV-Licht-armen Jahreszeit von Oktober bis März erhielten 23 gesunde Probanden doppelblind und placebokontrolliert über zehn Wochen täglich oral 2000 IE Vitamin D₃ einschließlich einer Tetanus-Auffrischimmunsierung in der neunten Woche. Die Serumkonzentration des den Vitamin D-Status bestimmenden Metaboliten, 25-Hydroxyvitamin D, und die humorale Tetanustoxoid-spezifische Immunantwort (die Immunglobulin- und Zytokinprofile peripherer Immunzellen) wurden ausgewertet.

Der Vitamin D-Status wurde darüber hinaus – ex vivo – auch bei den 48 Patienten der Referenzgruppe, bei 14 Typ-I-Allergiepateinten und bei 34 CLE-Patienten, in Seren aus Winter- sowie Sommermonaten analysiert.

Resultate: 1. Während der 10-wöchigen Vitamin D-Supplementation (2000 IE/Tag) stieg die durchschnittliche 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration in der Verumgruppe um

43,2 nmol/l an ($p < 0,0001$). 2. Zwischen der Placebo- und der Vitamin D-Gruppe wurden nach der Tetanus-Auffrischimmunisierung keine signifikanten Unterschiede in der Freisetzung spezifischer Immunglobuline und/oder Zytokine festgestellt.

3. Patienten mit Typ-I-Allergie unterschieden sich bezüglich des Vitamin D-Status nicht signifikant von gesunden Probanden. Bei CLE-Patienten wurden dagegen ganzjährig deutlich reduzierte Vitamin D-Serumwerte beobachtet, was vermutlich auf die UV-Abstinenz der Patienten aufgrund der krankheitsbedingten Photosensibilität zurückzuführen ist.

Schlussfolgerungen: Die Resultate der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass eine 10-wöchige Vitamin D-Supplementation (2000 IE/Tag) zur Prophylaxe der winterlichen Vitamin D-Defizienz eingesetzt werden kann. Es zeigten sich keine Hinweise auf einen Einfluss von Vitamin D-Gaben auf die spezifische humorale Immunantwort.

Aufgrund der begrenzten Teilnehmerzahl ist die Validierung in einem größeren Kollektiv, optimalerweise einem Multicenterkollektiv, sinnvoll.

Schlüsselwörter: Vitamin D, Supplementation, Tetanustoxoid, Immunisierung, humorale Immunantwort, kutaner Lupus erythematodes.

Abstract

Objectives: Vitamin D is mainly synthesised by the human body in an ultraviolet (UV)-light dependent manner, only a relatively small proportion is supplied through the diet. Therefore, a clinically relevant vitamin D deficiency is frequently observed during the winter season. Vitamin D deficiency has been suggested to correlate with a number of chronic diseases. Therefore, the potential benefit of prophylactic vitamin D supplementation has been increasingly discussed. The aim of this pilot study was to evaluate whether a temporary vitamin D supplementation is suitable to prevent seasonal vitamin D deficiency. Furthermore we investigated whether (and if so, how) the specific humoral immune response is influenced by such supplementation. As it is known that vitamin D interacts with the immune system, we studied additionally if patients with disorders of the immune system (type I allergy, cutaneous lupus erythematosus - CLE) differ with regard to their vitamin D status and its seasonal variations from the general population. As a reference a large cohort of patients from the Charité Berlin was used.

Subjects and Methods: During the UV-light deprived season (October to March on the northern hemisphere) 23 healthy volunteers received orally 2000 IU vitamin D₃ daily over ten weeks in a double-blinded and placebo-controlled manner. A tetanus booster immunization was envisaged for all volunteers in the ninth week of the study. The vitamin D status was determined by the serum concentration of the metabolite 25-hydroxyvitamin D. Tetanustoxoid-specific humoral immune response (immunoglobulin and cytokine peripheral immune cells) were determined *ex vivo*. Furthermore, the vitamin D status was analysed from 14 patients with type I allergies and 34 patients with CLE.

Results: 1. During ten weeks of vitamin D supplementation (2000 IU / day) the average 25-hydroxyvitamin D concentration increased by 43.2 nmol/l ($p < 0.0001$) in the treated group. 2. No differences were detected in the release of tetanus-specific immunoglobulins and / or cytokines between the placebo and the vitamin D group after the tetanus booster immunization. 3. The vitamin D status of patients with type I allergy does not differ significantly from the general population. In contrast the vitamin D serum levels in patients with CLE were significantly lower than in the general population

throughout the year, which is probably due to the UV-light abstinence which is typically seen in these patients because of their photosensitivity.

Conclusions: The results of our pilot study suggest that a 10-week vitamin D supplementation (2000 IU / day) prevents winter-related vitamin D deficiency. There is no evidence that the vitamin D supplementation affects specific humoral immune responses. Multicenter studies in larger cohorts including patients and healthy volunteers are necessary to confirm our findings.

Keywords: vitamin D, supplementation, tetanus toxoid, immunization, humoral recall response, cutaneous lupus erythematosus.

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ANA	antinukleärer Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovines Serum Albumin
CLE	kutaner Lupus erythematoses
DM1	Diabetes mellitus Typ 1
ds-DNS	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FC	Fold Change
GIT	Gastrointestinaltrakt
HB	Hepatitis B
IE	Internationale Einheiten
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IU	International Units
LE	Lupus erythematoses
MED	Minimale Erythemdosis
MS	Multiple Sklerose
NHR	nukleäre Hormonrezeptoren
NOAEL	No-observed-adverse-effect-level
nil	not in list
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pNPP	p-Nitrophenyl Phosphat
PSA	Prostata spezifisches Antigen
PTH	Parathormon
RCA	Rhinoconjunctivitis allergica
SCLE	subakut kutaner Lupus erythematoses
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
SLE	systemischer Lupus erythematoses
STIKO	Ständige Impfkommission am Robert Koch-Institut
TBS	Tris-Puffer
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TMB	Tetramethylbenzol
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor-alpha
TT	Tetanustoxoid

UVB	Ultraviolette Strahlung Typ B
VDBP	Vitamin D-bindendes Protein
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDRE	Vitamin D-responsives Element
ZP	Zeitpunkt

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	4
ABSTRACT.....	6
1 EINLEITUNG UND THEORETISCHER HINTERGRUND	13
1.1 Vitamin D	13
1.1.1 Metabolismus des Vitamin D	14
1.1.2 Intrazelluläre Interaktionen des Vitamin D	16
1.1.2.1 Vitamin D kontrolliert die Funktion zahlreicher Gene	17
1.1.3 Definition des Vitamin D-Status	17
1.1.4 Einflussfaktoren auf den Vitamin D-Status	18
1.1.5 Vitamin-D-Eigenproduktion	19
1.1.6 Vitamin D-Aufnahme durch die Nahrung	20
1.1.7 Relative Vitamin D-Defizienz	21
1.1.8 Die Bedeutung von Vitamin D in der Medizin	22
1.1.8.1 Auswirkungen auf den Knochen und den Kalziumhaushalt	22
1.1.8.2 Einfluss von Vitamin D auf das Immunsystem	22
1.1.8.2.1 Erste Hinweise aus tierexperimentellen Studien.....	22
1.1.8.2.2 Vitamin D-Rezeptor in Immunzellen.....	23
1.1.8.2.3 Vitamin D und das angeborene Immunsystem	24
1.1.8.2.4 Vitamin D und Allergien.....	24
1.1.8.2.5 Vitamin D und Autoimmunkrankheiten	25
Multiple Sklerose	25
Diabetes mellitus Typ 1	26
Rheumatoide Arthritis.....	26
Morbus Crohn	26
Lupus erythematodes.....	27
1.1.8.2.6 Vitamin D und andere Krankheitsbilder.....	27
Asthma bronchiale	27
Herz-Kreislaufkrankungen	27
Tuberkulose	28
Vitamin D und maligne Erkrankungen	28
1.1.8.3 Vitamin D-Supplementation	29
1.1.8.3.1 Serumspiegel von Vitamin D ₃	29
1.1.8.3.2 Einnahmeempfehlungen	29
1.1.8.3.4 Höchstgrenzen	30
1.1.8.3.3 Intoxikation	31
1.2 In die Untersuchung einbezogene Krankheitsbilder	31
1.2.1 Formen und Symptomatik des Lupus erythematodes	31
1.2.2 Tetanus	32
1.2.2.1 Infektionskrankheit Tetanus.....	32
1.2.2.2 Tetanusimmunisierung	33
2 FRAGESTELLUNG.....	34
3 PROBANDEN UND METHODEN	35
3.1 Supplementationsuntersuchung	35
3.1.1 Auswahlkriterien.....	35
3.1.2 Durchführung	36
3.1.3 Erklärung der Ethikkommission (1)	37

3.2 Kontroll- und Patientenkollektive	38
3.2.1 Erklärung der Ethikkommission (2)	38
3.2.2 Durchführung	38
3.3 Methoden.....	39
3.3.1 25-Hydroxyvitamin D-Serumkonzentration	39
3.3.2 Die Bestimmung von Anti-Tetanustoxoid-Antikörpern	40
3.3.2.1 TT-spezifisches IgG.....	40
3.3.2.2 TT-spezifisches IgA	41
3.3.2.3 TT-spezifisches IgE	41
3.3.3 Gewinnung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC).....	42
3.3.4 TT-induzierte Zytokinfreisetzung.....	42
3.3.5 Immunglobulinbestimmungen	43
3.3.5.1 Gesamt-IgG	43
3.3.5.2 Gesamt-IgA und Gesamt-IgM.....	43
3.3.5.3 Gesamt-IgE.....	44
3.4 Statistische Auswertung	44
4 ERGEBNISSE	46
4.1 Probanden - Basisdaten	46
4.1.1 Vitamin D-Status des Probandenkollektivs	46
4.1.2 Vitamin D-Status nach Supplementation	47
4.3 Vitamin D-Supplementation und Immunantwort.....	49
4.3.1 Gesamt-Immunglobulinkonzentration	50
4.3.2 Tetanustoxoid-spezifische Immunglobuline	50
4.3.2.1 Tetanustoxoid-spezifisches Immunglobulin G (TT-IgG)	51
4.3.2.1.1 IgG: Differenzbestimmung anhand der Delta- und Fold Change-Werte.....	53
4.3.2.2 Tetanustoxoid-spezifisches Immunglobulin A (TT-IgA).....	54
4.3.2.2.1 TT-IgA: Differenzbestimmung anhand der Delta-Werte.....	54
4.3.2.3 Tetanustoxoid-spezifisches Immunglobulin E (TT-IgE).....	55
4.3.3 Tetanustoxoid-spezifische Zytokinfreisetzung	55
4.4 Vitamin D-Status der Kontroll-Kohorte	57
4.4.1 Saisonbedingte Unterschiede	57
4.4.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede	58
4.5 Vitamin D bei Typ-I-Allergie.....	61
4.6 Vitamin D-Status bei CLE-Patienten.....	61
5 DISKUSSION	63
5.1 Vitamin D-Status und Supplementation.....	63
5.1.1 Vitamin D-Status vor und nach Supplementation	63
5.1.2 Sicherheit der Vitamin D₃-Supplementation	64
5.1.3 Vitamin D₃ und Gesamt-Immunglobulinkonzentration.....	65
5.1.4 Vitamin D₃ und TT-spezifische Immunglobuline.....	65
5.1.5 Vitamin D₃ und TT-spezifische Zytokine	67
5.2 Referenzwerte: die Charité-Kohorte	68

5.3 Vitamin D-Status bei Typ-I-Allergiepateinten	69
5.4 Vitamin D-Status bei CLE-Patienten.....	69
5. 6 Ausblick.....	70
6 ZUSAMMENFASSUNG	72
7 ANHANG	74
7.1. Verzeichnis der Tabellen	74
7.3 Materialien.....	76
7.3.1 Verwendete Testsysteme.....	76
7.3.2 Labormaterial und Geräte	77
7.3.3 Chemikalien und Reagenzien	77
7.3.4 Antikörper (AK).....	78
7.3.5 Software	78
7.4 Normwerte im Serum	79
8 LITERATURVERZEICHNIS	81
DANKSAGUNG	91
LEBENS LAUF	92
ERKLÄRUNG AN EIDES STATT	94

1 Einleitung und theoretischer Hintergrund

Vitamin D ist maßgeblich für die Regulation des Kalziumhaushaltes und für die Homöostase des Knochenstoffwechsels. Dies wurde bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts vermutet: Das Vitamin wurde im Rahmen einer gezielten Suche nach dem Auslöser der Rachitis entdeckt (*McCollum et al, 1922*). Die Krankheit selbst, die mit Störungen der Knochenmineralisierung und Skelettdeformationen einhergeht, wurde bereits im 17. Jahrhundert beschrieben (*Holick, 2006*). Seit der Entdeckung des Vitamin-D-Rezeptors und der enzymatischen Aktivierung des Vitamin D (via 1-alpha-Hydroxylase - CYP27B1) ist jedoch offensichtlich, dass das Vitamin D über diese Funktionen hinaus auch pleiotrope Wirkungen auf verschiedene Organsysteme hat, unter anderem insbesondere auf das Immunsystem (*Priehl et al, 2013; Holick, 2007; Battault et al, 2013*).

Daten von definierten Zellpopulationen legen nahe, dass auch aktivierte Immunzellen endogen aus Cholecalciferol und 25-Hydroxyvitamin D das physiologisch aktive 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D produzieren können.

In der vorliegenden Untersuchung wurde zunächst im Rahmen einer placebokontrollierten Untersuchung geprüft, ob ein unzureichender Vitamin D-Spiegel durch eine Supplementation normalisiert werden kann und ob bzw. welche Unterschiede in der spezifischen humoralen Immunantwort sich bei Probanden mit und ohne Vitamin D-Supplementation im Rahmen einer Booster-Immunsierung ergeben. Des Weiteren wurde der Vitamin D-Status (die Konzentration von 25-Dihydroxyvitamin D im Serum) in definierten Probandengruppen untersucht – auch mit Blick auf die häufig berichteten saisonbedingten Unterschiede des Vitamin D-Serumspiegels.

1.1 Vitamin D

Vitamin D wird sowohl im menschlichen Körper produziert als auch über die Nahrung aufgenommen. Somit ist Vitamin D nach heutigem Verständnis ein Hormon (*Vieth, 2004*). Chemisch gesehen haben D-Vitamine eine den Steroidhormonen ähnliche Struktur und werden als Secosteroide bezeichnet (*Deeb et al, 2007*).

Zur Vitamin-D-Gruppe werden gezählt:

Vitamin D₁ – eine Verbindung von Ergocalciferol (D₂) und Lumisterol

Vitamin D₂ – Ergocalciferol (synthetisiert aus Ergosterol)

Vitamin D₃ – Cholecalciferol (kurz auch als Calcidiol bezeichnet)

Vitamin D₄ – 22, 23-Dihydroergocalciferol

Vitamin D₅ – Sitocalciferol

Vitamin D₃ ist die physiologisch bei allen tierischen Eukaryoten, also auch beim Menschen vorkommende Form des Vitamin D. Vitamin D₂ wird durch UV-Strahlung in Hefestämmen gebildet und kommt in Form von Ergosterin und Ergocalciferol in bestimmten Pflanzen und Pilzen vor. Auch Phytoplankton ist in der Lage, unter UV-Bestrahlung Ergosterin in Vitamin D₂ umzuwandeln (*Holick, 2004*).

Vitamin D₂ ist deutlich weniger effektiv als Vitamin D₃ um den 25-Hydroxyvitamin D-Serumspiegel zu steigern (*Armas et al, 2004*).

1.1.1 Metabolismus des Vitamin D

Der Syntheseweg von Vitamin D beginnt in der Haut unter dem Einfluss ultravioletter Strahlung vom Typ B (UVB). Der B-Ring im Steroidgerüst des vor allem im Stratum spinosum und Stratum basale der Epidermis befindlichen 7-Dehydrocholesterols (Provitamin D₃) wird bei Wellenlängen zwischen 290 und 315 nm und mit einer Mindestintensität von 18 mJ/cm² durch eine photochemisch induzierte Reaktion aufgespalten. Das so entstandene Prävitamin D₃ ist thermodynamisch instabil und wird zu ungefähr 65 % innerhalb von acht Stunden zu Vitamin D₃ (Cholecalciferol) isomerisiert (*Holick, 1995*).

Nach ca. 20 Minuten ultravioletter Bestrahlung stellt sich in der Haut ein Gleichgewicht zwischen Vitamin D₃-Produktion und -Abbau ein (*Vieth, 1999*).

Bei anhaltender UV-Bestrahlung werden sowohl das Prävitamin D₃ als auch Vitamin D₃ in die inaktiven Formen Lumisterol und Tachysterol umgewandelt. Auf diese Weise ist der Organismus vor einer übermäßigen Vitamin D₃-Akkumulation und dadurch möglicher Intoxikation kurzfristig und durch die vermehrte Bildung von Melaninpigmenten auch langfristig geschützt (*Holick, 2004*).

Das in der Haut produzierte Vitamin D₃ wird an Vitamin D-bindendes Protein (VDBP) gebunden und über die Blutbahn zur Leber transportiert. Über den Darm aufgenommenes Vitamin D₃ und D₂ gelangt über die Chylomikronen zur Leber.

An den Mitochondrienmembranen der Leber werden Vitamin D₃ und D₂ innerhalb von drei Tagen durch das Enzym 25-Hydroxylase (25-OHase, CYP27A1) hydroxyliert. Das so entstandene 25-Hydroxyvitamin D (Calcidiol) ist der Speichermetabolit von Vitamin D im Körper.

Hauptorgan des finalen Umwandlungsschrittes sind die Nieren. Das an VDBP gebundene 25-Hydroxyvitamin D wird in den proximalen Tubuluszellen mithilfe von Megalin rückresorbiert und entweder unverändert in den Blutkreislauf zurückgegeben oder in den Mitochondrien durch das Enzym CYP27B1 (1 α -Hydroxylase, CYP1 α) am Kohlenstoffatom C1 ein zweites Mal hydroxyliert. Dabei entsteht Calcitriol (1,25 α -Dihydroxyvitamin D) (*Christakos et al, 2003*) – die physiologisch aktive Form des Vitamin D. Dieser Stoffwechselschritt wird durch Parathormon (PTH) sowie den Kalzium- und Phosphatserumwerten eng kontrolliert (*Vieth, 2006*).

Calcitriol ist der Vitamin D-Metabolit mit der höchsten Potenz zur Aktivierung des Vitamin D-Rezeptors (VDR). Die Serum-Calcitriol-Konzentration liegt bei 0,06-0,1 nmol/l und beträgt damit etwa ein Tausendstel der 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration (*Holick, 2004*).

Im Darm und der Niere wird durch Calcitriol die Kalzium- und Phosphataufnahme bzw. -Rückresorption über die Produktion eines kalziumbindenden Proteins geregelt (*Christakos, 2003*). Diese Vorgänge sind streng reguliert. Ein Anstieg von Kalzium- oder Phosphatserumwerten sowie der Calcitriolspiegel selbst unterdrücken die Calcitriolsynthese, während ein Anstieg von 24,25-Dihydroxyvitamin D₃ diese induziert. Bei Vorliegen einer Vitamin D-Defizienz werden lediglich 10 - 15 % des Kalziums und 60 – 70 % des Phosphats aus der Nahrung resorbiert, während bei einer 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration von 75 nmol/l die maximale Kalziumresorption stattfindet (*Holick, 2007*). Ab einer Kalziumserumkonzentration von ca. 80 nmol/l ist ein Plateau erreicht (*Heaney, 2005*).

Das Parathormon (PTH) ist ein Hormon des Kalziumstoffwechsels und wird in den Epithelkörperchen (*Glandulae parathyroideae*) produziert. Sobald die Calcidiol-Konzentration unter 11,3 nmol/l sinkt oder der Calcitriolspiegel zu niedrig ist, erreicht der PTH-Spiegel sein Maximum von 55 pg/ml (*Chapuy et al, 1997*). Dadurch kommt es zu einer vermehrten Transkription von CYP27B1 in der Niere, was zu einer vermehrten Calcitriolsynthese führt (*Holick, 2007*). Das Enzym CYP27B1 befindet sich – außer in der Niere – auch in der Haut sowie in verschiedenen Zellen des Immunsystems.

Eine Hypokalzämie oder ein Vitamin D-Mangel können einen sekundären Hyperparathyreoidismus zur Folge haben. Es kommt zu einer vermehrten Kalziumfreisetzung aus den Knochen und damit zu erhöhter Neigung zu Spontanfrakturen oder Knochenschmerzen (*Chapuy et al, 1997*). 25-Hydroxyvitamin D hemmt die PTH-Sekretion, ab einem Spiegel von 100 nmol/l erreicht der PTH-Spiegel

sein Minimum (Vieth, 1999). Auf diese Weise wird eine Vitamin D-vermittelte Hyperkalzämie vermieden.

Der Abbau von 25-Hydroxyvitamin D und Calcitriol erfolgt enzymatisch durch das Enzym 24-Hydroxylase zu 24-Hydroxycalcidiol bzw. 24,25-Dihydroxyvitamin D (Calcitroinsäure). Diese Metaboliten sind wasserlöslich und werden über den Urin ausgeschieden.

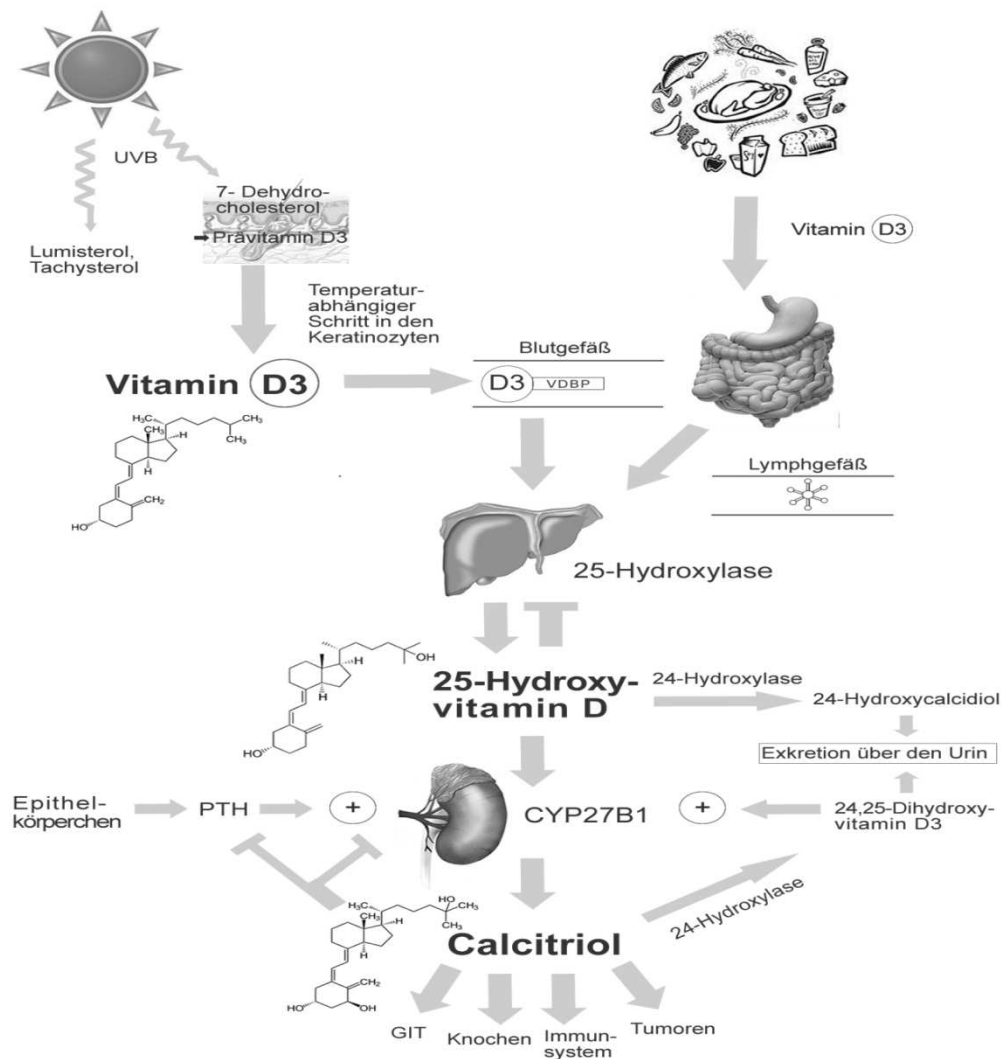


Abbildung 1: Übersicht zum Vitamin D-Stoffwechsel (adaptiert nach Holick, 1995; Holick, 2006 und Holick, 2007).

1.1.2 Intrazelluläre Interaktionen des Vitamin D

Wie bereits erwähnt gelangt Calcitriol, an VDBP gebunden, über die Blutbahn zu den Zellen der Zielorgane. Das lipophile Calcitriol kann die Zellmembran sowohl als freie

Form als auch an das Vitamin D bindende Protein (VDBP) gebunden passieren, um mit dem sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleolus befindlichen Vitamin D-Rezeptor (VDR) zu binden. Dieser für Calcitriol hochaffine Rezeptor besteht aus 427 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von ungefähr 50 Kilodalton und gehört zur Familie der nukleären Hormonrezeptoren (*Issa et al, 1998*). Der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) wurde in den meisten menschlichen Geweben nachgewiesen.

1.1.2.1 Vitamin D kontrolliert die Funktion zahlreicher Gene

Der Calcitriol-VDR-Komplex bindet seinerseits an den Retinsäure-Rezeptor-alpha (RXR α) und bildet somit ein Heterodimer. Dieses interagiert mit Vitamin D-responsiven Elementen (VDRE) in verschiedenen Genpromotoren und führt somit zur Induktion oder Hemmung von Zielgenen, den sogenannten Vitamin D-responsiven Genen (*Issa et al, 1998*), von denen es im menschlichen Genom nach verschiedenen Schätzungen zwischen 200 (*Hypponen et al, 2001*) und 900 (*Wang et al, 2005*) gibt. Dazu zählen Gene, die u. a. für das Kalzium-Bindungsprotein, den epithelialen Kalziumkanal, die 24-Hydroxylase, die alkalische Phosphatase, das Prostata spezifische Antigen (PSA), den Rezeptor-Aktivator NF κ B, das Cathelicidin (*Adams and Hewison, 2008*) und das Parathormon kodieren (*Holick, 2004*).

Die bekannteste Wirkung von Vitamin D ist die Regulation des Kalzium- und somit des Knochenmetabolismus. Bilder von durch Vitamin-D- Mangel erkrankten, rachitischen Kindern beherrschen, insbesondere in Laienkreisen, nach wie vor die Vorstellungen von der Bedeutung des Vitamin D für die Gesundheit. Doch vor dem Hintergrund der gegenwärtigen Erkenntnisse ist Vitamin D ein pluripotenter Regulator einer Reihe biologischer Funktionen – insbesondere auch in Bezug auf das Immunsystem (*Hayes et al, 2003; Holick, 2007; Adams et Hewison, 2008; Chun et al, 2008*).

1.1.3 Definition des Vitamin D-Status

Eine Reihe von Studien legt nahe, dass ein mehr oder weniger ausgeprägter Mangel von Vitamin D Ursache zahlreicher Störungen der Normalfunktion verschiedener Organe sein kann. Vor diesem Hintergrund gewinnt auch die Bestimmung und die Kontrolle der Konzentration des Vitamin D in den Zellen und Geweben – der Vitamin-D-Status des individuellen Menschen – an Bedeutung; insbesondere auch im Rahmen der Gesundheitsvorsorge.

Als Marker des individuellen Vitamin-D-Status, also der aktuellen Versorgung des Körpers mit Vitamin D, wird die 25-Hydroxyvitamin D-(Calcidiol)-Serumkonzentration angewendet (*Vieth, 2006; Zittermann et al, 2004*).

25-Hydroxyvitamin D dient als Speicherform für Vitamin D und spiegelt die verfügbare 25(OH)D-Menge wider (*Deeb et al, 2007; Hypponen et Power, 2007*). Die Halbwertszeit im Blutkreislauf beträgt zwei Wochen bis zwei Monate, wo der Metabolit, gebunden an das VDBP, in den Gefäßen zirkuliert (*Dlugos et al, 1995; Vieth, 1999*), oder sich im Fettgewebe ablagert (siehe unten). Die durchschnittliche 25-Hydroxyvitamin D-Serumkonzentration eines erwachsenen Menschen liegt zwischen 20 und 170 nmol/l (*Holick, 2004*).

Eine direkte Bestimmung des 1,25 α -Hydroxyvitamin D-(Calcitriol) als Indikator für den Vitamin D-Status eines Menschen hat sich dagegen als nicht verlässlich erwiesen. Die Halbwertszeit dieser Form beträgt weniger als vier Stunden (*Holick, 2007*). Im Vitamin D-Mangelzustand wäre eine zuverlässige Aussage über die tatsächliche Versorgung des Organismus mit Vitamin D nicht möglich, da in dieser Situation die PTH-Sekretion und infolge dessen auch die Calcitriol-Produktion gesteigert ist (*Holick, 2007*).

Es liegen keine eindeutig definierten Grenzwerte für die Serumkonzentration von 25(OH)-Vitamin D vor. Vieth definiert Werte <20 – 25 nmol/l als schwere Vitamin D-Defizienz; Werte zwischen 25 und 40 nmol/l werden demnach als grenzwertige Vitamin D-Defizienz bezeichnet (*Vieth, 1999*). Von toxischen Werten wird ab Konzentrationen über 450 nmol/L ausgegangen (*Vieth, 2007; Grant et Holick, 2005*).

1.1.4 Einflussfaktoren auf den Vitamin D-Status

Für die 25-Hydroxyvitamin D-(Calcidiol)-Serumwerte sind – neben der Eigenproduktion des Vitamins bzw. seiner Aufnahme durch die Nahrung – weitere Faktoren relevant.

Hierzu zählt der Body Mass Index (BMI), da Vitamin D ein lipophiles Molekül ist und das Fettgewebe somit den größten Speicher für 25-Hydroxyvitamin D im Körper darstellt (*Holick, 2004*). Da sich 25-Hydroxyvitamin D im Fettgewebe anreichern kann, haben adipöse Personen häufiger niedrigere 25-Hydroxyvitamin D-Werte als Normalgewichtige (*Hypponen et Power, 2007*). Allerdings haben adipöse Menschen auch einen Vorteil: Das im Fettgewebe gelagerte 25-Hydroxyvitamin D kann dem Körper, zumindest für begrenzte Zeit, auch ohne UV-Licht zur Verfügung gestellt werden (*Looker et a, 2008; Vieth, 2007*).

Auch das Geschlecht scheint eine Rolle beim Vitamin D-Status zu spielen. So haben Frauen häufiger einen niedrigeren 25-Hydroxyvitamin D-Serumspiegel als Männer. In einer Studie von Hill et al. zeigte sich bei Jugendlichen ein Vitamin D-Mangel in den Wintermonaten; dabei waren Mädchen signifikant häufiger betroffen als Jungen (Hill et al, 2008). Rockell et al. stellten die Hypothese auf, dass Jungen sich häufiger sportlich im Freien betätigen als Mädchen und somit vermehrt der Vitamin D-fördernden UV-Strahlung ausgesetzt sind (Rockell et al, 2005). Allerdings liegt der Körperfettanteil bei Frauen häufig höher als bei Männern.

Eine wichtige Rolle für den Vitamin-D-Status spielt auch das Alter des Menschen. Bei älteren Personen sinkt der Vitamin D-Spiegel, da die Haut mit der Zeit dünner und somit ärmer an 7-Dehydrocholesterol (Provitamin D₃) wird (Bell, 1995). Die Eigenproduktion von Vitamin D₃ beträgt bei einem 70-jährigen Menschen nur noch ein Viertel der Eigenproduktion eines 20-Jährigen (Holick, 2004). Dagegen sind die 25-Hydroxyvitamin D-Werte bei Kindern zwischen dem ersten und dem fünften Lebensjahr am höchsten und nehmen in den höheren Altersgruppen signifikant ab (Looker et al, 2008).

1.1.5 Vitamin-D-Eigenproduktion

90% des Vitamin D₃ kann der Körper über Eigenproduktion herstellen. Für die Aufrechterhaltung des Vitamin D-Spiegels im Körper ist daher die Eigenproduktion des Vitamins in der Haut der entscheidende Faktor (Heaney et al, 2003; Vieth, 2007). Allerdings hängt die Vitamin-D-Eigenproduktion – neben dem bereits erwähnten individuellen Alter des Menschen – zusätzlich von einer Reihe weiterer Faktoren ab. Hierzu zählen etwa die Breitengrade und die Höhe über dem Meeresspiegel des Wohn- bzw. Aufenthaltsortes, die Jahreszeit, der Bewölkungsgrad, der Ozongehalt der Luft, die Luftfeuchtigkeit, die Verwendung von Sonnenschutzmitteln (Lee et Worm, 2009) oder die Aufenthaltsdauer im Freien. Auch Mode- bzw. religiöse Aspekte spielen eine Rolle für den individuellen Vitamin-D-Status: Menschen, die regelmäßig den Großteil ihres Körpers bedecken, sind einer deutlich geringeren UV-Bestrahlung ausgesetzt.

Einen weiteren, individuellen Faktor, der den Vitamin-D-Status beeinflusst, stellt die so genannte individuelle minimale Erythemdosis (MED) dar (Holick 1995; Holick 2004; Diamond, 2005). Die MED wird definiert als diejenige UV-Dosis, die zur Auslösung eines gerade sichtbaren, bis an die Ränder des bestrahlten Feldes reichenden, flächigen Erythems an der Haut notwendig ist (Sterry et al, 2010). Sie hängt von der Wellenlänge des Lichtes und dem Hauttyp nach Fitzpatrick (Fitzpatrick, 1988) ab.

Da UV-Strahlung ein Karzinogen mit direkter Relation zum weißen Hautkrebs wie dem Plattenepithelkarzinom ist, ist eine Bestrahlung über die MED hinaus nicht sinnvoll (*Vieth et al, 2007; Vitasa et al, 1990*).

Eine einmalige MED durch Bestrahlung des ganzen Körpers kann zwischen 6000 und 20.000 IE 25-Hydroxyvitamin D erzeugen (*Vieth, 1999; Holick, 2001*). Bei Individuen mit dunkler Hautfarbe (Hauttyp V und VI) ist eine 6-fach höhere Exposition mit UV-Licht nötig, um eine vergleichbare Vitamin D-Produktion in der Haut zu bewirken als bei Individuen mit Hauttyp I und II, da die Melaninpigmente in der Haut den Großteil der UV-Wellen, die zur Vitamin D₃-Produktion benötigt werden, absorbieren (*Clemens et al, 1982*) Daher ist bei Menschen mit einem stärker pigmentierten Hauttyp häufiger ein Vitamin D-Mangel zu beobachten als bei hellhäutigen Menschen, insbesondere, wenn sie in höheren Breitengraden leben (*Gordon et al, 2004*).

Durch den sich über ein Jahr verändernden Neigungswinkel der Erde zur Sonne ist die Sonneneinstrahlung bei > 40° nördlicher (bzw. > 40° südlicher) Breite zwischen den Monaten Oktober bis März (bzw. April bis September) zu schwach, um eine ausreichende Vitamin D₃-Produktion in der Haut zu gewährleisten (Berlin: 50°N) (*Holick 1995; Hayes, 2000; Vahavihu et al, 2008*).

Dem entsprechend ist bei vielen Völkern, die in höheren Breitengraden leben – beispielsweise in Nordeuropa – ein Vitamin D-Mangel häufig nachweisbar (*Hypponen et Power, 2007*). Ursache ist die bereits erwähnte Tatsache, dass UV-Strahlen mit steigendem Breitengrad sowie steigender Höhe über dem Meeresspiegel stärker von der Atmosphäre absorbiert werden (*Diamond, 2005*).

1.1.6 Vitamin D-Aufnahme durch die Nahrung

Die Aufnahme von Vitamin D₂ bzw. D₃ über die Nahrung ist abhängig von individuellen Ernährungsgewohnheiten; sie spielt insgesamt jedoch eine eher untergeordnete Rolle: Nur etwa 10% des Vitamin-D-Bedarfs des Menschen werden über die Nahrung aufgenommen (*Devereux, 2009*).

Die überwiegend verzehrten Lebensmittel enthalten nur relativ geringe Mengen von Vitamin D. Am ehesten findet sich Vitamin D₃ in tierischen Produkten wie Lebertran, fettigen Fischen wie z. B. Lachs und Makrele, sowie in Eigelb und in begrenztem Maße in Milchprodukten. Seit einiger Zeit werden bestimmte Nahrungsmittel wie Margarine oder Säuglingsmilch von der Industrie bewusst mit Vitamin D₃ angereichert (*Holick, 2007*), außerdem ist Vitamin D in synthetischen Multivitaminpräparaten enthalten.

Der Vitamin D-Gehalt in Nahrungsmitteln wird in Internationalen Einheiten (IE) angegeben. Eine IE ist definiert als die durch 0,025 µg Vitamin D₃ produzierte Aktivität in Bioassays von Ratten (WHO, 1950). 50 µg Vitamin D₃ entsprechen 2000IE.

In der nachfolgenden Tabelle werden einige Nahrungsmittel und deren ungefähre Vitamin-D-Gehalt aufgelistet.

Tabelle 1: Vitamin D-Gehalt in verschiedenen Nahrungsmitteln (*Holick 2004; Holick 2006; Holick 2007; Heaney, 2003*).

Vorkommen	Ungefährer Vitamin D-Gehalt
100 g frischer Wildlachs	600 – 1000 IE Vitamin D ₃
1 Teelöffel Lebertran	400 – 1000 IE Vitamin D ₃
1 Hühnereigelb	20 - 50 IE Vitamin D ₃ oder D ₂
100 g getrocknete Shiitakepilze	1600 IE Vitamin D ₂
200 ml industriell angereicherte Milch	100 IE Vitamin D ₃
Vitamin D-Präparate	500 - 20000 IE Vitamin D ₃

1.1.7 Relative Vitamin D-Defizienz

Eine in den 90er Jahren von Hintzpeter et al. durchgeführte Untersuchung ergab einen deutlich erkennbaren Vitamin D-Mangel in der Bevölkerung Deutschlands. Demnach lag der erreichte Serumwert bei 56,8 % der Männer und 57,8 % der Frauen < 50 nmol/l unabhängig von der Jahreszeit (*Hintzpeter et al, 2008*).

Eine 2007 in Großbritannien durchgeführte Studie zeigte, dass im Winter und im Frühling 46,6 % aller Studienteilnehmer einen 25-Hydroxyvitamin D-Spiegel von unter 40 nmol/l aufwiesen (*Hypponen et Power, 2007*).

Eine Untersuchung aus Frankreich ergab bei 14 % der Probanden einen 25-Hydroxyvitamin D-Spiegel von unter 30 nmol/l für die Monate November - April. Dabei wurden in den nördlichen Breitengraden Frankreichs signifikant niedrigere Werte beobachtet als in den südlichen Breitengraden (*Chapuy et al, 1997*).

In einer US-amerikanischen Studie wurde der Vitamin D-Status von 20.289 Probanden aus den Jahren 2000 bis 2004 mit den Daten von 18.158 Probanden aus den Jahren 1988 bis 1994 verglichen. Es stellte sich heraus, dass in diesem Zeitraum der 25-Hydroxyvitamin D-Spiegel signifikant – um 10 nmol/l – gesunken war (*Looker et al, 2008*).

In einer Querschnittsstudie, die den Vitamin D-Status bei 1015 irischen Jugendlichen untersuchte, zeigte sich eine Vitamin D-Insuffizienz bei 3 % und ein Vitamin D-Mangel bei 36 % aller untersuchten Individuen. Im Winter fand sich darüber hinaus der bereits erwähnte signifikante geschlechtsspezifische Unterschied – die Mädchen hatten signifikant niedrigere Vitamin D-Spiegel als ihre männlichen Altersgenossen (*Hill et al, 2008*).

1.1.8 Die Bedeutung von Vitamin D in der Medizin

Mittlerweile liegen eine Reihe von Studienresultaten vor, die einen teils ursächlichen Zusammenhang zwischen bestimmten Krankheiten und chronischem Vitamin D-Mangel nahe legen.

1.1.8.1 Auswirkungen auf den Knochen und den Kalziumhaushalt

Die klassischen Erscheinungsbilder des Vitamin D-Mangels, Rachitis im Kindesalter bzw. Osteomalazie im Erwachsenenalter, treten heutzutage aufgrund der Supplementation mit Vitamin D in den westlichen Industrienationen nur noch selten auf. Rachitis ist eine Erkrankung, bei der Knochendeformitäten wie vermindertes Längenwachstum, Auftreibung der Epiphysen der langen Röhrenknochen, Verkrümmung der Wirbelsäule und ein schwacher Muskeltonus auftreten (*Holick, 2006*). Der Erkrankung liegt eine durch Vitamin D-Mangel ausgelöste Störung des Kalzium- und Phosphathaushalts sowie des Knochenstoffwechsels zugrunde: Vitamin D (Calcitriol) steuert über den Vitamin-D-Rezeptor (VDR) im Knochengewebe die Aktivierung von Osteoklasten sowie die Differenzierung der Osteoblasten zu Osteozyten (*St-Arnaud, 2008*).

1.1.8.2 Einfluss von Vitamin D auf das Immunsystem

1.1.8.2.1 Erste Hinweise aus tierexperimentellen Studien

Es waren insbesondere nach der Jahrtausendwende veröffentlichte tierexperimentelle Untersuchungen, die Hinweise auf eine mögliche Stimulation der T-Lymphozytendifferenzierung durch Calcitriol und somit auf eine verbesserte humorale Immunität erbrachten. So wurde gezeigt, dass Calcitriol als Adjuvans in Kombination mit Immunisierungen bei älteren Mäusen die Effektivität der Immunantworten steigerte (*Enioutina, 2000*). Mäuse, die mit einem kombinierten Impfstoff von *Hämophilus*

influenza Typ B, Diphtherietoxoid und Calcitriol immunisiert wurden, zeigten hohe antigenspezifische IgA- und IgG-Titer in Serum und Mukosasekreten (*Enioutina, 1999*). Bei der Immunisierung von Mäusen mit inaktiviertem Poliovirus wurden in der Verumgruppe signifikante Anstiege der antigenspezifischen Antikörper nachgewiesen (AK) (*Ivanov et al, 2006*).

In einer weiteren Studie, wo Schweine eine intramuskuläre Immunisierung mit humanem Serumalbumin erhielten, zeigten sich in der Gruppe, in der das Serumalbumin mit Calcitriol angereichert war, ein signifikant höherer Serumwert von antigenspezifischem IgA und IgM sowie ein Anstieg der antigenspezifischen IgA- und IgG-Antikörper-sezernierenden Zellen in den ableitenden Lymphknoten (*Van der Stede et al, 2001*).

Die Zugabe von Calcitriol bewirkte auch eine Veränderung des Zytokinprofils: Nach der ersten Immunisierung wurden höhere Werte von IL-10 und signifikant niedrigere Werte von IL-2 gemessen; nach der zweiten Immunisierung waren die IL-2-Werte signifikant erhöht und die IFN- γ Werte reduziert (*Van der Stede et al, 2004*).

In einer placebokontrollierten Studie wurde Rindern ein Impfstoff gegen *Escherichia coli* J5 verabreicht, der bei fünf von zehn Tieren mit Calcitriol als Adjuvans angereichert wurde. In der Verumgruppe zeigten sich auf *Escherichia coli* J5 spezifische signifikant erhöhte IgA-, IgG- und IgM-Antikörper in der Milch sowie signifikant erhöhte antigenspezifische IgG-Titer im Serum (*Reinhardt et al, 1999*).

1.1.8.2.2 Vitamin D-Rezeptor in Immunzellen

Im gleichen Zeitraum erschien eine Reihe von Veröffentlichungen, die über eine Expression des Vitamin D-Rezeptors (VDR) bei Zellen des adaptiven Immunsystems berichten - etwa T-Helferzellen (*Provvedini et al, 1983; Veldman et al, 2000*) oder aktivierte B-Lymphozyten (*Heine et al, 2002; Heine et al, 2008*).

Nach Bindung von Calcitriol an den VDR wird die Proliferation und Funktion der T-Lymphozyten, vor allem der T-Helferzellen (T_H), beeinflusst (*Adams et Hewison, 2008*). Es gibt verschiedene Studien zur Modulation von T-Helferzellen durch Vitamin D₃-Supplementation bei Mäusen und Menschen (*Hayes et al, 2003*).

Eine Hemmung der T_H1-Zytokine (IL-2, IFN- γ , TNF- α) und eine Förderung der T_H2-Zytokinproduktion (IL-4, IL-5, IL-10) konnte mehrfach beobachtet werden (*Issa et al, 1998; Cantorna et al, 2004; Overbergh et al, 2000*). Neben unveränderten

Immunantworten (Schleithoff et al, 2006; Heine et al, 2011; Adorini et al, 2008) zeigten sich teilweise veränderte T_H1- und IFN- γ - (Daniel et al, 2005), sowie T_H2- und IL-4-Antworten (Hayes et al, 2003).

Die Hemmung der T_H1-Zellen wird noch verstärkt durch den Einfluss des Calcitriol auf dendritische Zellen, durch Hemmung ihrer Reifung und Verstärkung der IL-10-Produktion (Adams et Hewison, 2008; Fritsche et al, 2003).

Calcitriol kann darüber hinaus die Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen und B-Gedächtniszellen hemmen, woraus sich ein möglicher Zusammenhang zu B-Lymphozyten-bezogenen Krankheiten (etwa dem systemischen Lupus erythematoses) ergibt (Chen et al, 2007).

Relativ neu ist die Beobachtung von Chen et al., wonach Calcitriol nicht nur die Proliferation von B-Zellen hemmt, sondern auch deren Apoptose induziert (Chen et al, 2007).

Die besondere Bedeutung von Vitamin D insbesondere für das adaptive Immunsystem ergibt sich auch aus der Beobachtung, dass das Enzym CYP27B1 – welches in den Niereneithelien 25-Hydroxyvitamin D zu Calcitriol umwandelt – auch in aktivierten Makrophagen, dendritischen Zellen (Arnson et al, 2007; Fritsche et al, 2003), T-Zellen (Sigmundsdottir et al, 2007) sowie in aktivierten humanen B-Lymphozyten (Chen et al, 2007) gefunden wurde. Im Gegensatz zu den Tubuluszellen der Niere wird das Enzym hier nicht durch PTH und Calcitriol gehemmt, sondern durch viele Faktoren – wie zum Beispiel IFN- γ – induziert (Arnson et al, 2007).

1.1.8.2.3 Vitamin D und das angeborene Immunsystem

Die Wirkung des Vitamin D beschränkt sich jedoch nicht allein auf die adaptive Immunität. Im Jahre 2008 wurde über die direkte Bindung des Vitamin-D-Rezeptors an Cathelicidin berichtet. Cathelicidin zählt zu den antimikrobiellen Defensinen, welche Bakterien abtöten können (Adams et Hewison, 2008).

Die Bedeutung des Vitamin D für die adaptive Immunität könnte ein Grund dafür sein, weshalb eine Reihe chronischer Immunstörungen (zum Beispiel Autoimmunkrankheiten) in Zusammenhang mit einem Vitamin-D-Mangel gesehen wird.

1.1.8.2.4 Vitamin D und Allergien

In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Worm konnte gezeigt werden, dass bei der Aktivierung des 25-Hydroxyvitamin D zum biologisch aktiven Metaboliten in B-

Lymphozyten – neben einer verstärkten Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 (*Heine et al, 2008*) – auch eine Hemmung der IgE-Expression von IgE (*Heine et al, 2002*) stattfindet.

In anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass in VDR-Knockout-Mäusen die IgE-Spiegel erhöht sind (*Wittke et al, 2004*).

Zittermann et al berichteten bereits 2004, dass bei Neugeborenen, die im Sommer zur Welt kommen, neben einer höheren 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration auch ein höherer IL-10/IgE-Quotient im Vergleich zu den im Winter geborenen Kindern zu finden ist (*Zittermann et al, 2004*).

Diese Erkenntnisse lassen die Annahme zu, dass bei Vitamin D-Mangel die Expression der für Allergien verantwortlichen IgE-Antikörper verstärkt ist. Vitamin D-Mangel könnte, diesen Erkenntnissen zufolge, das Entstehen von Allergien begünstigen. Diese Annahme wird auch durch eine Studie von Hyppönen untermauert, in welcher die Vermutung eines Zusammenhangs von sehr niedrigen sowie sehr hohen Vitamin D-Spiegeln und erhöhten IgE-Spiegeln und damit verstärkten Allergiesymptomen nahegelegt wird (*Hyppönen et al, 2009*).

1.1.8.2.5 Vitamin D und Autoimmunkrankheiten

Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine Autoimmunkrankheit des Zentralnervensystems, die mit einer Demyelinisierung der Nervenscheiden einhergeht. Mehrere Studien beschreiben einen statistischen Zusammenhang zwischen MS und einem reduzierten Vitamin D-Status.

Hayes et al. zeigen eine geographische Häufung der MS mit positiver Assoziation zwischen steigender Entfernung zum Äquator und der Prävalenz der MS. Ebenso konnte bei 77 % aller MS-Patienten, die an einer Knochenstoffwechselstudie teilnahmen, ein 25-Hydroxyvitamin D-Spiegel von unter 50 nmol/l nachgewiesen werden (*Hayes, 2000*).

Munger et al. konnten zeigen, dass bei Individuen mit Hauttyp I bis IV das Risiko, an einer MS zu erkranken, mit steigendem 25-Hydroxyvitamin D-Spiegel signifikant abnahm (*Munger et al, 2006*). Ebenso wurde in Kohorten von insgesamt knapp 300.000 Frauen das Risiko an einer MS zu erkranken durch Supplementation mit Vitamin D₃ um 40 % gesenkt (*Munger et al, 2004*). In einer Eskalationsstudie von Kimball und Vieth

erhielten zwölf MS-Patienten Vitamin D₃ in steigender Dosierung, angefangen bei 28.000 IE/Woche in Woche 1 bis 280.000 IE/Woche in Woche 28. Es zeigten sich keine negativen Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf der Patienten (*Hintzpeter et al, 2008*). In einer aktuelleren Studie von Burton und Kimball erhielten 25 MS-Patienten über 52 Wochen Vitamin D₃, angefangen mit 40.000 IE in absteigender Dosierung. Neben dem Ausbleiben unerwünschter negativer Ereignisse zeigten sich Hinweise auf eine positive Wirkung auf den Krankheitsverlauf (*Burton et al, 2010*).

Diabetes mellitus Typ 1

Bei dem durch eine Autoimmunstörung bedingten Diabetes mellitus Typ I (DM1) zeigte eine epidemiologische Studie von Hypponen et al. eine signifikante Reduktion des Auftretens dieser Krankheit bei Personen, die im Kindesalter eine tägliche Vitamin D₃ Supplementation von 50 µg erhalten hatten (*Hypponen et al, 2001*). Somit könnte ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Einnahme von Vitamin D₃ in den letzten Jahrzehnten und dem Rückgang des DM1 bestehen (*Hypponen, 2010*). Bei Kindern, die während ihres ersten Lebensjahres an Rachitis erkrankten, war die Inzidenz für DM1 gegenüber gesunden Kindern um das Dreifache erhöht (*EURODIAB, 1999*).

Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis wird ebenfalls zu den Autoimmunkrankheiten gezählt. Bei den Betroffenen stellt sich ein Verlust der Knochensubstanz ein, der mit dem Schweregrad der Erkrankung zunimmt. In Querschnittsstudien zeigte sich, dass 60% der Patienten mit rheumatoider Arthritis einen 25-Hydroxyvitamin D-Spiegel von unter 50 nmol/l aufwiesen (*Chen et al, 2007*). Auch wurde eine negative Rückkopplung zwischen dem Calcitriolspiegel bzw. dem PTH-Spiegel und dem Krankheitsgrad beobachtet (*Issa et al, 1998*).

Morbus Crohn

In einer 2009 erschienenen Studie stellten die Autoren fest, dass Patienten mit der Autoimmunkrankheit Morbus Crohn signifikant ($p < 0,05$) niedrigere Serum-Vitamin-D – Werte hatten als Patienten mit Reizdarmsyndrom. Bei Crohn-Patienten mit gesteigerter Krankheitsaktivität waren die Vitamin-D-Spiegel niedriger als bei Patienten ohne akuten Schub (*Joseph et al, 2009*).

Lupus erythematoses

Lupus erythematoses (LE) ist eine chronisch-remittierende Autoimmunkrankheit aus der Gruppe der Kollagenosen (*Lin et al, 2007; Heine et al, 2010*). Die Exposition gegenüber UV-Licht, vor allem das für die Eigenproduktion des Vitamin D so wichtigen UVB, kann LE-Krankheitsschübe und Hauterscheinungen auslösen (*Lin et al, 2007; Lee et Worm, 2009*). Daher sind diese Patienten angehalten, UV-Strahlung konsequent zu meiden, u.a. durch intensivierete Anwendung von Sonnenschutzmitteln mit hohen Lichtschutzfaktoren. Dies erhöht jedoch wiederum das Risiko eines Vitamin D-Mangels (*Lee et Worm, 2009; Sakthiswary et Raymond, 2013*), welcher bei LE-Patienten nachweisbar ist (*Chen et al, 2007; Renne et al, 2008*). Bei dunkelhäutigen Patienten ist die LE-Prävalenz höher, je größer der Abstand zum Äquator ist, was einerseits auf die reduzierte Penetration des UV-Lichtes durch die Haut als auch auf die verminderte Strahlenintensität in hohen Breitengraden zurückzuführen ist (*Arnson et al, 2007*).

1.1.8.2.6 Vitamin D und andere Krankheitsbilder

Asthma bronchiale

Bezüglich der Korrelation des Vitamin D-Status und Asthma bronchiale gibt es Studien mit widersprüchlichen Ergebnissen. Die Hypothese, dass die Prävalenz von Asthma positiv mit der Prävalenz der Vitamin D-Insuffizienz verknüpft ist (*Litonjua et Weiss, 2007*) steht der Hypothese gegenüber, dass die Prävalenz von Asthma gestiegen ist, seitdem Rachitisprophylaxe mit Vitamin D-Supplementation betrieben wird (*Wjst and Dold, 1999*).

Welcher Mechanismus einem sich abzeichnenden Zusammenhang mit Vitamin-D-Mangel und einigen weiteren, offenbar nicht immunologisch bedingten Erkrankungen zu Grunde liegt, ist noch nicht geklärt. Angesichts der zahlreichen „Vitamin-D-Gene“ ist ein solcher Zusammenhang jedoch nicht überraschend.

Zu den vom Vitamin-D-Status abhängigen bzw. beeinflussbaren Erkrankungen, bei denen kein direkter Bezug zu Störungen des Immunsystems im Vordergrund steht, zählen Infektionskrankheiten, Herz-Kreislaufkrankungen sowie onkologische Erkrankungen.

Herz-Kreislaufkrankungen

Aus den USA kommt eine Studie, wonach die Vitamin-D-Defizienz mit einem höheren Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen einhergeht, unter anderem mit Hypertonie,

Herzinsuffizienz und Koronarer Herzkrankheit. Der zu Grunde liegende Mechanismus ist ungeklärt. Eine der Hypothesen geht davon aus, dass Vitamin D das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System herunterreguliert. Auch die glykämische Kontrolle könnte unter Vitamin D besser sein (*Judd et Tangpricha, 2009*).

In einer Studie von Schleithoff et al. bezüglich kongestiver Herzinsuffizienz zeigten sich unter Supplementation mit Vitamin D₃ erhöhte Werte des antiinflammatorischen Zytokins IL-10, während in der Placebo-Gruppe signifikant höhere Konzentrationen des proinflammatorischen Zytokins TNF- α beobachtet wurden (*Heine et al, 2008*).

Tuberkulose

Neuere Studien zeigen eine Induktion der Autophagie durch Vitamin D bei der Abwehr von Tuberkuloseerregern auf. Vitamin D-induzierte antimikrobielle Peptide aus Makrophagen scheinen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Mykobakterium tuberculosis zu spielen (*Liu et al, 2006; Liu et Modlin, 2008*).

Vitamin D und maligne Erkrankungen

Es liegen mehrere Studien vor, die einen Zusammenhang zwischen Vitamin D und malignen Krankheiten nahelegen.

So wird ein 25-Hydroxyvitamin D-Serumspiegel unter 50 nmol/l mit einem 30 - 50 % höheren Risiko assoziiert an Colon-, Prostata- und Mammacarcinomen zu erkranken. Auch nehmen die Krankheitsverläufe häufiger einen letalen Verlauf (*Holick, 2007*).

Ein Anstieg um 25 nmol/l des 25-Hydroxyvitamin D-Serumspiegels ist mit einer Reduktion des Auftretens von malignen Tumorerkrankungen um 17 % und einer Reduktion der Gesamtmortalität von 29 % assoziiert, bei Tumoren des Gastrointestinaltraktes (GIT) sogar bis zu 45 % (*Giovannuci et al, 2006*).

Vor allem bei Frauen über 60 Jahren scheint ein höherer 25-Hydroxyvitamin D-Serumspiegel das Risiko für die Prävalenz von Tumoren im distalen Colon sowie im Rektum zu senken (*Feskanich et al, 2004*).

Als mögliche Mechanismen einer protektiven Wirkung des Vitamin D gegen Krebs werden die Hemmung der Proliferation und/oder der Angiogenese oder die Induktion der Differenzierung diskutiert (*Deeb et al, 2007*).

Da Vitamin D über den Vitamin-D-Rezeptor unter anderem auch an das NF κ B-Gen bindet, ergeben sich mögliche krebshemmende Wirkungen auch auf dieser Ebene: Der NF κ B-Signalweg spielt eine zentrale Rolle sowohl bei der Krebsentstehung, als auch bei der Apoptose, dem programmierten Zelltod. Eine gestörte Apoptose ist für die

meisten Tumorzellen charakteristisch; sie ist die Ursache der „Unsterblichkeit“ der Krebszellen.

1.1.8.3 Vitamin D-Supplementation

Angesichts der besonderen Bedeutung einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung für die normale Funktion einer Reihe von physiologischen Abläufen stellt sich in der Medizin bereits seit langem die Frage einer präventiven bzw. therapeutischen Vitamin-D-Supplementation.

1.1.8.3.1 Serumspiegel von Vitamin D₃

Ein 25-Hydroxyvitamin D-Serumspiegel von < 25 nmol/l wird als Vitamin D-Insuffizienz angesehen. Bei Vorliegen eines schweren Mangels können wie bereits erwähnt Knochenschäden wie Rachitis bei Kindern bzw. Osteoporose und Osteomalazie bei Erwachsenen die Folge sein (*Holick, 2007*). Bei einem Spiegel zwischen 25 – 50 nmol/l liegt ein relativer Mangel vor, man spricht von einer Vitamin D-Defizienz. Optimal für Knochendichte, Frakturrisiko, Kalziumresorption, Vermeidung eines sekundären Hyperparathyreoidismus und Zahngesundheit ist ein Vitamin D-Status zwischen 50 und 75 nmol/l (*Vieth et al, 2007; Bischoff-Ferrari et al, 2006; Boonen et al, 2006*). Aus immunologischer Sicht existiert bislang keine einheitliche Meinung über einen optimalen Status (*Arnson et al, 2007*), ein Spiegel > 100 nmol/l wird jedoch als günstig diskutiert (*Litonjua et Gold, 2008*).

1.1.8.3.2 Einnahmeempfehlungen

Die aktuelle Empfehlung zur Vitamin D₃-Einnahme für Kinder im ersten sowie für Personen ab dem 65. Lebensjahr liegt laut D-A-CH-Referenzwerten (Deutsche, Österreichische und Schweizerische Gesellschaft für Ernährung und Schweizerische Vereinigung für Ernährung) zurzeit bei 400 IE (10 µg) pro Tag. Für Personen zwischen dem 1. und 65. Lebensjahr einschließlich Schwangeren und stillenden Müttern gilt die Empfehlung von 200 IE pro Tag.

Es wurde darüber hinaus die Empfehlung gegeben, standardmäßig den Vitamin D-Status aus der Nabelschnur Neugeborener zu kontrollieren und bei Nachweis einer Insuffizienz 1000 IE Vitamin D₃/Tag über die erste Lebenswoche bzw. alternativ eine einmalige Dosis von 200.000 IE zu supplementieren (*Holick, 2006*).

Zur Supplementation eignet sich 25-Hydroxyvitamin D aufgrund der längeren Halbwertszeit und der vielfach größeren therapeutischen Breite besser als Calcitriol.

Diese beträgt für das 25-Hydroxyvitamin D 75 - 450 nmol/l, für Calcitriol jedoch nur 39 – 193 pmol/l (*Vieth, 2007*).

Es konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von 700 – 1000 IE Vitamin D₃ pro Tag über vier Wochen lediglich bei 50 % der Erwachsenen eine Erhöhung der Serumkonzentration auf 90 – 100 nmol/l bewirkt (*Bischoff-Ferrari et al, 2006*).

Um bei ≥ 50 % der Bevölkerung ohne adäquate Sonnenexposition eine 25-Hydroxyvitamin D-Serumkonzentration von über 75 nmol/l zu erreichen, wäre demnach eine Vitamin D-Supplementation von ≥ 1000 IE/Tag für alle ethnischen Gruppen nicht nur sicher, sondern auch empfehlenswert (*Bischoff-Ferrari et al, 2006; Litonjua et Gold, 2008; Tangpricha et al, 2003*) Um sicher zu stellen, dass die 25-Hydroxyvitamin D-Serumkonzentration 100 nmol/l übersteigt, ist eine Supplementation von 4000 IE/Tag notwendig (*Vieth, 1999*). Die Gabe von 1 μ g Vitamin D₃, entsprechend 40 IE, bewirkt einen Anstieg der 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration um 0,7 nmol/l (*Hayes, 2000*).

In einer Untersuchung bei US-amerikanischen Soldaten, die sich zwei Monate in einem Unterseeboot aufhielten, zeigte sich ein Abfall der 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration um 30 nmol/l, obwohl die Soldaten eine spezielle Kost mit Vitamin D₃-angereicherter Nahrung erhielten. Diese Beobachtung bestätigt die unzureichende Versorgung des Körpers mit Vitamin D durch Nahrung und weist auf eine Halbwertszeit des 25-Hydroxyvitamin D von ca. zwei Monaten hin (*Dlugos et al, 1995*).

1.1.8.3.4 Höchstgrenzen

Eskalationsstudien bei Patienten mit chronisch-intermittierender Multipler Sklerose zeigten, dass eine orale Supplementation in steigender Dosierung bis zu 280.000 IE/Woche über sechs Wochen (*Kimball et al, 2007*) sowie 40.000 IE/Tag über 28 Wochen keine schwerwiegenden unerwünschten Ereignisse oder Änderungen im Kalziumspiegel von Urin oder Serum auslösten (*Burton et al, 2010*). Vergleichbare Beobachtungen wurden bei Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz nach Supplementation mit 2000 IE Vitamin D₃/Tag (*Schleithoff et al, 2006*) und bei Säuglingen nach zweimonatlichen Gaben von 50.000 IE als Bolus (*Shakiba et al, 2010*) über 9 Monate bestätigt. In keinem Fall kam es zu einem Anstieg der 25-Hydroxyvitamin D-Serumkonzentration über 65 nmol/l.

Um die Menge der erforderlichen Substitution festzustellen, die nötig ist, um bei gesunden Männern eine festgelegte 25-Hydroxyvitamin D-Serumkonzentration herzustellen, wurde gesunden Männern für 20 Wochen placebokontrolliert 1000 IE, 5000

IE oder 10.000 IE Vitamin D₃/Tag oral verabreicht. Um > 80 % des im Sommer gemessenen Spiegels zu erreichen, waren 3000 - 5000 IE/Tag erforderlich. Auch hier traten weder Änderungen des Serumkalziums noch unerwünschte Ereignisse auf (*Heaney et al, 2003*). Vor diesem Hintergrund schlugen Hathcock et al. als no-observed-adverse-effect-level (NOAEL) – die „Schwelle, bis zu der kein schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis beobachtet werden kann“ – für Vitamin D₃ 250 µg (10.000 IE) pro Tag vor (*Hathcock et al, 2007*).

Gegenwärtig werden als sicher geltende zulässige Höchstmengen nach Vorgaben der europäischen Kommission für Verbraucherschutz und der US-amerikanischen Kommission für wissenschaftliche Ernährungsrichtlinien 50 µg (2000 IE) pro Tag angesehen (*Hathcock et al, 2007*).

1.1.8.3.3 Intoxikation

Eine Intoxikation mit Vitamin D äußert sich als Hyperkalzämie bzw. als die noch sensitivere Hyperkalziurie. Eine Hyperkalziurie wird definiert als das Verhältnis von Kalzium zu Kreatinin im 24 Stunden-Sammelurin von > 1. Von einer Hyperkalzämie spricht man ab einem Serumkalziumwert von $\geq 2,7$ mmol/l (*Hathcock et al, 2007*). Hyperkalzämie macht sich durch Symptome wie Erbrechen, Diarrhoe, Schmerzen, Fieber und Müdigkeit sowie Herzrhythmusstörungen bemerkbar. Bei anhaltend stark erhöhtem Kalzium im Serum besteht die Gefahr der Osteoklastenaktivierung, Nephrolithiasis (*Hathcock et al, 2007*) sowie Koma und Herzstillstand (*Deeb et al, 2007*).

1.2 In die Untersuchung einbezogene Krankheitsbilder

1.2.1 Formen und Symptomatik des Lupus erythematoses

Neben dem systemischen Lupus erythematoses (SLE), der sämtliche Organe einschließlich der Haut befallen kann, gibt es weitere Untergruppen mit unterschiedlichen Ausprägungen und Manifestationen, unter anderem den auf die Haut beschränkten chronisch diskoiden Lupus erythematoses (CDLE) sowie den subakut kutanen Lupus erythematoses (SCLE) mit typischen Hautveränderungen und milden systemischen Symptomen (*Sterry et al, 2010*).

Häufige Symptome des SLE sind neben Abgeschlagenheit, Gelenkbeschwerden, ZNS- und Nierenbeteiligung unter anderem das Schmetterlingserythem der Wangen und die

wolfsbissartigen Hautläsionen (lat. lupus „Wolf“, griech. ἐρύθημα [erýt^hēma|tos] „Röte“ + -ώδης [-ódēs] „ähnlich wie“). Bei 60 % der Patienten mit CDLE und SCLE zeigt sich in der direkten Immunofluoreszenz eine bandförmige Ablagerung von IgG, IgM und Komplementfaktor 3 an der Basalmembran der läsionalen Haut, das sogenannte Lupusband. Spezifische Autoantikörper, wie gegen Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure (ds-DNS) und antinukleäre Antikörper (ANA) beim SLE und SCLE sowie anti-Ro (SS-A) und anti-La (SS-B) beim SCLE, sind in bis zu 80 % der Fälle im Serum nachweisbar (*Sterry et al, 2010; Heine et al, 2010*). Die Patienten mit LE leiden an einer erhöhten Photosensibilität.

1.2 2 Tetanus

1.2.2.1 Infektionskrankheit Tetanus

Die Infektionskrankheit Tetanus, der sogenannte Wundstarrkrampf, wird durch das anaerobe Bakterium *Clostridium tetani* verursacht. Dieses Stäbchenbakterium, dessen Sporen nahezu ubiquitär vor allem im Erdreich vorkommen, ist sehr widerstandsfähig. Die Infektion erfolgt durch das Eindringen der Sporen in eine Wunde, wobei auch eine kaum sichtbare Bagatellverletzung ausreicht. Die Inkubationszeit beträgt in der Regel drei Tage bis drei Wochen.

Die vegetative Form von *C. tetani* kann sich im sauerstoffarmen Wundgewebe vermehren und zwei Exotoxine, Tetanolysin und Tetanospasmin, bilden, wobei Letzteres die typischen klinischen Symptome hervorruft.

Tetanospasmin gelangt über periphere Nervenbahnen in das Zentralnervensystem und blockiert dort die Neurotransmitter-Freisetzung. Es kommt zur unkontrollierten Aktivierung der α -Motoneuronen und somit zu tonisch-klonischen Krämpfen der quergestreiften (Willkür-)Muskulatur.

Diese Krämpfe können unter anderem in Kehlkopf und Diaphragma auftreten. Unbehandelt folgt der Tod durch Ersticken.

In Deutschland treten durchschnittlich 15 Fälle pro Jahr auf, von denen ungefähr ein Viertel einen tödlichen Verlauf nimmt.

1.2.2.2 Tetanusimmunisierung

Die Immunisierung gegen Tetanus ist seit den 1940er Jahren die weltweit am häufigsten empfohlene und durchgeführte Immunisierung (Amanna et al, 2007; Van Damme et Burgess, 2004).

Eine Impfdosis enthält als wirksame Bestandteile 40 IE des nichtreplikationsfähigen Proteinantigens Tetanustoxoid (TT), das an 1,25 mg des Adjuvans Aluminiumhydroxid gebunden ist. Gemäß der Empfehlungen der Ständigen Impfkommision am Robert Koch-Institut (STIKO) sollte die Grundimmunisierung im Säuglingsalter stattfinden, mit einer geplanten Auffrischung im 5. und 6. Lebensjahr (RKI, 2010). Es ist bekannt, dass die Antikörperwerte über die Zeit sinken. Tetanus-Antikörper haben eine geschätzte Halbwertszeit von elf Jahren (Amanna et al, 2007; Reinhardt et al, 1999).

Daher ist der vollständige Impfschutz für ca. zehn, jedoch mindestens fünf Jahre, gewährleistet, bevor eine erneute aktive Immunisierung erforderlich wird (RKI, 2010).

Die Impfung ist sehr effizient. Ein Impfversagen kommt nur selten vor.

Im Rahmen der Immunantwort wird bei der intramuskulären Injektion von Tetanustoxoid (TT) das AG, in diesem Fall das TT, von einer APZ aufgenommen, prozessiert und über MHC-II-Moleküle immunkompetenten Zellen präsentiert. Die Immunisierung wird als erfolgreich angesehen, wenn bei den geimpften Personen ein Anstieg von TT-spezifischem IgG im Serum ungefähr 30 Tage nach Verabreichung der Impfdosis verzeichnet werden kann (Van Damme et Burgess, 2004; Hansen et al, 1989). Eine ausreichende Immunität wird angenommen, wenn der Titer $\geq 1,0$ IE/ml beträgt. (Van Damme et Burgess, 2004). Auch die TT-spezifischen Immunglobuline IgA und IgM im Serum steigen im Serum 30 Tage nach Immunisierung nachweislich an (Hansen et al, 1989; Ershler et al, 1982).

2 Fragestellung

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob die spezifische humorale Immunantwort unter Vitamin D-Supplementation beeinflusst wird. Darüber hinaus wollten wir im Rahmen dieser Untersuchung die Frage beantworten, ob bezüglich des Vitamin D-Status (und seiner jahreszeitabhängigen Veränderungen) Patienten mit Störungen der Immunfunktion (Typ-I-Allergie und kutaner Lupus erythematodes – CLE) im Vergleich zur gesunden Population Unterschiede aufweisen.

3 Probanden und Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Daten beziehen sich auf zwei Kollektive. Erstens die klinische Supplementationsuntersuchung und zweitens die Auswertung von Patientendaten, die im Rahmen der Routinediagnostik erhoben wurden.

3.1 Supplementationsuntersuchung

Die Planung, Durchführung und Auswertung der Untersuchung erfolgte in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin. Die Ethikkommission der Charité Berlin hat der Durchführung der Untersuchung zugestimmt und von allen Probanden lag eine schriftliche Einwilligung vor.

Im Rahmen dieser zwischen Dezember 2007 und März 2008 durchgeführten Untersuchung wurden 38 gesunde Probanden randomisiert und doppelblind in eine Verumgruppe (n=23) und eine Placebogruppe (n=15) eingeschlossen: Randomisierung mittels einer Randomisierungsliste durch eine studienunabhängige Person. Dabei erfolgte die Vergabe der Studiennummer zufällig zu den im Vorfeld zu Nummern zugeordneten Gefäßen mit Vitamin D₃ Öl bzw. Oleum neutrale. Vor, während und nach der Supplementation mit Vitamin D₃ bzw. einem Placebo wurden alle Teilnehmer untersucht. Von denen zu Beginn ursprünglich 38 eingeschlossenen Probanden sind im Verlauf 6 Probanden aus verschiedenen Gründen aus der Untersuchung ausgeschieden (siehe Abbildung Nr. 2), so dass sämtliche Berechnungen mit den verbliebenen 32 Probanden (20 in der Verum- und 12 in der Placebogruppe) durchgeführt wurden (Ausnahme bei Tetanustoxoid-spezifischen Immunglobulinen, siehe 4.3.2).

3.1.1 Auswahlkriterien

Die Einschlusskriterien waren der Nachweis einer mindestens fünf Jahre zurückliegenden Tetanusimmunisierung sowie eine negative Anamnese auf eine Tetanusinfektion (*Van Damme et Burgess, 2004*). Die Probanden wurden von der Untersuchung ausgeschlossen, wenn eines der folgenden Kriterien zutreffend war:

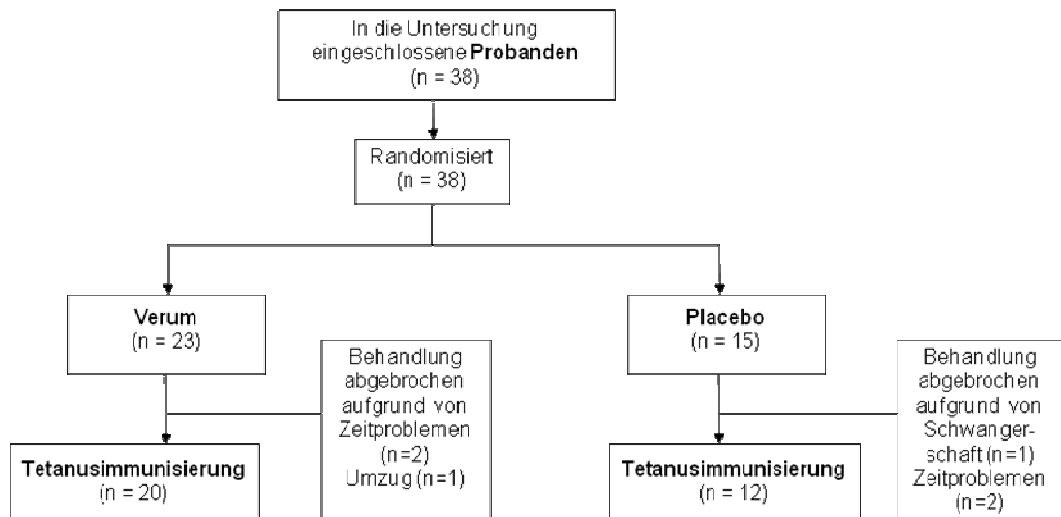
- Positive Anamnese bezüglich Sarkoidose oder Hyperkalzämie
- Serumkreatinin von > 1 mg/dl
- bekannte Nephrolithiasis

- Schwangerschaft oder Stillzeit
- chronische oder maligne Erkrankungen
- geplante Exposition gegenüber UV-Licht während des Untersuchungszeitraumes wie der Besuch eines Bräunungstudios oder Reisen in Gegenden mit einem Breitengrad unter 40° bzw. mit einer Höhenlage über 1000 m.

3.1.2 Durchführung

Die Probanden der Verumgruppe erhielten in den Wintermonaten (Oktober bis März) über zehn Wochen lang täglich die aktuell zulässige Höchstmenge 2000 IE (50 µg) Vitamin D₃ Öl (Vieth, 2007; Kimball et al, 2007). Die Placebogruppe erhielt im gleichen Zeitraum das äquivalente Volumen Neutralöl (Oleum Neutrale).

Alle Probanden wurden zu Beginn der Supplementationsphase sowie nach 4, 9, 10 und 14 Wochen zur Untersuchung einbestellt. Zu jedem Termin wurde den Probanden jeweils 30 ml Blut entnommen und eine aktuelle Anamnese erhoben. Bei allen Probanden wurde bei Untersuchungsbeginn die durchschnittliche tägliche Kalziumaufnahme über die Nahrung anhand eines Fragebogens ermittelt und durch die Gabe von 250 – 1000 mg Kalzium (Calcium-Sandoz® Fortissimum, 1000 mg, Brausetabletten der Fa. Sandoz, Holzkirchen) eine tägliche Kalziumzufuhr von 1000-1200 mg sichergestellt. Eine Woche vor Beendigung der Supplementationsphase wurde allen Probanden intramuskulär der Tetanus/Diphtherie-Impfstoff (Td-Merieux®, Sanofi Pasteur MSD, Strasbourg, Frankreich). verabreicht. Zur Sicherung der Compliance wurden nach Abschluss der Supplementationsphase die Gefäße mit dem verbliebenen Vitamin D₃ Öl beziehungsweise Oleum neutrale von den Probanden eingesammelt und die Restmenge bestimmt.



ZP1: Zeitpunkt 1= Basiswerte, Beginn der Untersuchung, Dezember

ZP2: 4 Wochen nach Untersuchungsbeginn; Kontrolle ausgewählter Laborwerte

ZP3: 9 Wochen nach Untersuchungsbeginn, Tetanus-Auffrischimmunisierung (alle Probanden). Vor der Immunisierung wurde den Probanden Blut für die Immunglobulin- und Zytokinbestimmung entnommen.

ZP4: 10 Wochen nach Untersuchungsbeginn, Beendigung der Supplementation; erneute Blutentnahme für die Immunglobulin- und Zytokinbestimmung.

ZP5: 14 Wochen nach Untersuchungsbeginn (Mitte März)

Abbildung 2: Schematische Darstellung des Untersuchungsablaufs und Erläuterung der Zeitpunkte im Rahmen der Supplementationstudie.

3.1.3 Erklärung der Ethikkommission (1)

Für die klinische Supplementationstudie lag ein Ethikvotum der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin vor.

3.2 Kontroll- und Patientenkollektive

3.2.1 Erklärung der Ethikkommission (2)

Die Ethikkommission (Ethikausschuss 1 am Campus Charité- Mitte, Vorsitzender Prof. Dr. R. Uebelhack) bestätigte, dass gegen die retrospektive Auswertung der im Rahmen der klinischen Routine erhobenen Daten zur Untersuchung „Der Einfluss von Vitamin D auf die spezifische humorale Immunantwort“ (Promotionsvorhaben von Frau Annika Lahl, Antragsnummer EA1170/13) keine ethischen und rechtlichen Bedenken erhoben werden.

Bei den Daten der Patienten handelt es sich um pseudonymisierte Daten, anhand deren Kennzeichnung Außenstehende nicht auf die Personen zurückschließen können.

Auch bei den Seren der CLE- und Typ-I-Allergie-Patienten handelt es sich um Werte, die im Rahmen von Routineuntersuchungen bestimmt wurden.

3.2.2 Durchführung

Der Vitamin D-Status wurde bei verschiedenen Kohorten ermittelt. Hierzu wurden die Daten unserer gesunden Probanden (n=32) und die Daten einer Patientenkohorte der Charité – Universitätsmedizin Berlin analysiert, wobei die jahreszeitliche Abhängigkeit berücksichtigt wurde. Zum Vergleich wurden die Daten von Patienten mit kutanem Lupus erythematodes (CLE) (n=34) und Patienten mit Typ-I-Allergie (n=14) untersucht. Die 25-Hydroxyvitamin D-Serumkonzentrationen aus den Monaten Februar und März wurden mit denen aus den Monaten Juli und August des gleichen Jahres zwischen den Gruppen und gruppenintern verglichen.

Daten von Patienten mit der Diagnose CDLE und SCLE wurden in die Untersuchung aufgenommen. Die Diagnosestellung eines CLE erfolgte durch die positive direkte Immunfluoreszenzhistologie bei allen Patienten. Alle Patienten mit SCLE wiesen die typischen klinischen Merkmale sowie Ro/SS-A Autoantikörper auf, Patienten mit CDLE zeigten keine ds-DNS Autoantikörper.

Typ-I-Allergiker wurden wie folgt charakterisiert:

- erhöhter Gesamt-IgE Spiegel (>150 IE/ml)
- >1 positive Reaktion in Pricktestung der Standardreihe
- allergisches Asthma und/oder atopische Dermatitis (Diagnose gesichert im Rahmen einer klinischen Untersuchung durch einen Facharzt).

Die Daten der Patienten der Charité wurden uns freundlicherweise von Dr. rer. nat. C. Müller aus dem Zentrallabor der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum, anonymisiert zur Verfügung gestellt. Wegen der bekannten Veränderungen des Vitamin-D-Status in Abhängigkeit vom Alter wurden aus der Stichprobe die Daten von 338 Patienten der Alterskategorie 19 bis 35 Jahre gewählt. Patienten mit nephrologischen Erkrankungen wurden von der Untersuchung ausgenommen, da bei einigen nephrogenen Erkrankungen Fehlmessungen nicht ausgeschlossen werden können (Wittke et al, 2004).

Die 25-Hydroxyvitamin D-Serumkonzentration der Charité-Patienten wurde mit einem Chemilumineszenzimmunoassay der Fa. Diasorin an einem Immunoassay-Vollautomaten (Liaison) bestimmt; die 25-Hydroxyvitamin D-Werte der restlichen Patienten wurden anhand der weiter unten beschriebenen Methode gemessen.

3.3 Methoden

Zur Bestimmung der Serumparameter wurde Serum aus Serumblutröhrchen à 10 ml durch fünfminütige Zentrifugation bei 4°C und 3000 g gewonnen, in 2 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und bei - 80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Sicherheitsparameter einschließlich Differentialblutbild, Kalzium und Phosphat wurden durch das Zentrallabor der Charité – Universitätsmedizin Berlin mit Routinemethoden aus heparinisiertem bzw. EDTA-Blut bestimmt.

Eine Auflistung aller verwendeten Materialien befindet sich im Anhang.

Sofern bei der Beschreibung der jeweils angewendeten Verfahren nicht ausgewiesen, wurden die Bestimmungen von der Autorin der vorgelegten Dissertation selbstständig durchgeführt.

3.3.1 25-Hydroxyvitamin D-Serumkonzentration

Die 25-Hydroxyvitamin D-Serumspiegel bestimmten wir mittels eines 25-Hydroxyvitamin D-Enzymimmunoassays (Immunodiagnostic Systems Ltd, Frankfurt/Main, BRD) nach Anweisung des Herstellers. Dieser kompetitive ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ermöglicht die quantitative Bestimmung der Serumkonzentration von 25-Hydroxyvitamin D und anderen hydroxylierten Metaboliten. Die Kreuzreaktivität zu Vitamin D₃ beträgt < 0.01 %.

Zunächst wurden die Serum-, Standard- und zwei Kontrollserumproben mit bekannter 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration mit biotinyliertem 25-Hydroxyvitamin D auf 1:400

verdünnt. Anschließend erfolgte die kompetitive Bindung von 25-Hydroxyvitamin D an die ELISA-Platte, die mit hochspezifischen 25-Hydroxyvitamin D-Antikörpern vom Schaf beschichtet ist. Nach zweistündiger Inkubationszeit wurde nach dreimaligem Waschen mit einem PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,4)/Tween-haltigen Puffer Meerrettich-Peroxidase markiertes Avidin für 30 Minuten hinzugegeben. Somit erfolgte die Kopplung von dem an die Platte gebundenen 25-Hydroxyvitamin D mit dem Enzym. Nach einem weiteren Waschschrift und Zugabe des chromogenen Substrates Tetramethylbenzol (TMB) kam es zu einer Farbentwicklung. Diese wurde nach 30 Minuten mittels 0.5 M Salzsäure gestoppt und die Absorption in einem Mikrotiterplatten-Messgerät bei 450 nm abzüglich der Referenzwellenlänge (690 nm) gemessen.

Die 25-Hydroxyvitamin D-Serumkonzentration ist umgekehrt proportional zur Farbintensität des ELISA und wurde über eine 4-Punkt-Gerade berechnet, in der auf der Abszisse logarithmisch die 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration und auf der Ordinate linear die optische Dichte (OD) _(450-690 nm) aufgetragen wurden.

Die Nachweisgrenze des Enzymimmunoassays liegt bei 5 nmol/l, die größtmögliche messbare Konzentration beträgt > 380 nmol/l.

3.3.2 Die Bestimmung von Anti-Tetanustoxoid-Antikörpern

3.3.2.1 TT-spezifisches IgG

Die Serumkonzentrationen von anti-TT-Antikörpern der Klasse IgG bestimmten wir mit Hilfe des Festphasen-Enzymimmunoassays von DRG Tetanus Toxin IgG ELISA (DRG Diagnostics, Marburg, BRD) vor sowie 30 Tage nach erfolgter Immunisierung (*Van Damme et Burgess, 2004*). Die Durchführung erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Zunächst wurden auf die TT-beschichtete 96-Well-Mikrotiterplatte 1:200 verdünnte Serumproben sowie gebrauchsfertige Standard- und Kontrollserumproben pipettiert. Während der anschließenden Inkubation für 60 Minuten bei 37°C binden die TT-spezifischen Antikörper der Proben an die immobilisierten Antigene. Nach fünfmaligem Waschen mit einem ProClin 300-haltigen Waschpuffer wurde anti-human-IgG-Meerrettichperoxidase-Konjugat zugegeben, das innerhalb von 30 Minuten bei Raumtemperatur zur Bildung enzymmarkierter, an die Platte gebundener Immunkomplexe führte. Nach einem weiteren Waschschrift und Zugabe von TMB trat eine Farbentwicklung auf. Diese wurde nach 30 Minuten mit 0.5 M Schwefelsäure gestoppt und die Absorption in einem Mikrotiterplatten-Messgerät bei 450 nm abzüglich

der Referenzwellenlänge (690 nm) gemessen. Die Konzentration anti-TT-spezifischer IgG-Antikörper ist direkt proportional zur Farbintensität des ELISA und wurde über eine Standardkurve mittels Punkt-für-Punkt -Analyse berechnet.

Eine Langzeitimmunität von 5-10 Jahren für Tetanus wird für eine Konzentration von > 1,0 IE/ml TT-IgG angenommen.

3.3.2.2 TT-spezifisches IgA

Die Bestimmung der Serumkonzentrationen der anti-TT-Antikörper der Klasse IgA erfolgte ebenfalls mittels Festphasen-Enzymimmunoassays von DRG Tetanus Toxin IgG ELISA (DRG Diagnostics, Marburg, BRD).

Zunächst wurden die auf 1:100 verdünnten Serumproben sowie gebrauchsfertige Standard- und Kontrollserumproben auf die TT-beschichtete 96-Well-Mikrotiterplatte aufgetragen. Während der anschließenden Inkubation für 60 Minuten bei 37°C binden die TT-spezifischen Antikörper der Proben an die immobilisierten Antigene. Nach fünfmaligem Waschen wurde die Platte anschließend mit 1:5000 verdünntem anti-human-IgA-AP (Alkalische Phosphatase) für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Auftragung des pNPP-Substrates (p-Nitrophenyl Phosphate) und die Kalkulation bei 405 nm abzüglich der Referenzwellenlänge (690 nm) analog zu IgG.

Die Spezifität des anti-TT-IgA-Signals wurde durch drei Kontrollen gesichert, indem die Titrierbarkeit des Signals parallel zur Serumverdünnung, durch Verstärkungen des Signals in Seren 30 Tage nach der Impfung sowie durch ein fehlendes Signal in Referenzproben, zu denen anti-TT-spezifische IgG, in denen kein TT-IgA enthalten war, zugegeben wurde.

3.3.2.3 TT-spezifisches IgE

Die Bestimmung des spezifischen IgE für TT erfolgte mittels des ImmunoCAP® Specific IgE Conjugate 100 and 400 (Phadia, Uppsala, Schweden) durch ein Routinelabor. Das Testprinzip beruht auf einem Fluoreszenz-Enzym-Immuno-Assay (FEIA), bei dem das kovalent an das Immuno-CAP gebundene anti-TT-IgE mit dem TT-IgE aus der Serumprobe des Probanden reagiert. Die spezifischen TT-IgE-Antikörper aus dem Probandenserum binden an die gebundenen Antigene der festen Phase. Die Antigenmenge am ImmunoCAP ist so hoch, dass trotz hoher TT-IgG-Titer der zuverlässige TT-IgE-Antikörpernachweis gelingt.

Die Durchführung erfolgte nach Anweisung des Herstellers.

3.3.3 Gewinnung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Die PBMCs wurden mithilfe der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut in Zusammenarbeit mit dem Allergie-Centrum der Charité (Dr. Guido Heine) separiert.

In einem 15 ml Falcon-Röhrchen wurden je 4 ml Ficoll mit 8-9 ml Vollblut überschichtet und 20 Minuten bei 900 g und 20°C ohne Zentrifugenbremsung zentrifugiert. Die Interphasenschicht wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und dreimal mit 15 ml PBS gewaschen (einmal 15 Minuten bei 540 g, zweimal zehn Minuten bei 345 g). Die PBMCs wurden mittels Casy®1-Zellsystem gezählt. Je nach Proband ergaben sich zwischen $1 - 4 \times 10^7$ PBMC.

3.3.4 TT-induzierte Zytokinfreisetzung

Diese Untersuchungen erfolgten durch Dr. med. N. Unterwalder in den Laboren von Herrn Prof. HD Volk, Klinik für Medizinische Immunologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte.

Die TT-spezifischen T-Zell Zytokinprofile wurden unmittelbar vor und sieben Tage nach Gabe der Tetanusimmunisierung, am Maximalpunkt der TT-spezifischen T-Zell Zirkulation (*DeRosa et al, 2004*), bestimmt.

2×10^6 PBMCs wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten mit RPMI 1640 Medium, dem 10 %iges fetales bovines Serum, 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin hinzugefügt wurden, kultiviert (Heine et al, 2002). Für jeden Probanden wurden Triplikate à 200 µl pro Stimulation angelegt: unstimuliert, stimuliert mit 0,5 µg/ml Staphylococcus Enterotoxin B (SEB; Sigma, Dreieich, BRD) und stimuliert mit 1:100 verdünntem TT (Tetanus-Merieux®, Sanofi Pasteur MSD, Strasbourg, Frankreich).

Nach einer Inkubationszeit (24 Stunden) im Brutschrank bei 5 % CO₂-Atmosphäre und 37°C wurden die Kulturplatten bei 2165 g für fünf Minuten zentrifugiert, die Überstände gepoolt und bei -80°C gelagert.

Die Überstände wurden mittels T_H1/T_H2 Cytokine Bead Array Kit (Firma BD, Biosciences) bezüglich der Zytokine TNF-α, IL-2, IL-10, IL-4 und IL-5 (Sensitivitätsschwelle < 3 pg/ml) sowie IFN-γ (Sensitivitätsschwelle < 8 pg/ml) analysiert. Der Assay wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.3.5 Immunglobulinbestimmungen

3.3.5.1 Gesamt-IgG

Die Durchführung erfolgte durch das Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin.

Die Serumkonzentration des Gesamt-IgG wurde mittels IGG-2 Tina-quant Kit (Roche/Hitachi cobas c Systeme) bestimmt. Das Testprinzip beruht auf einem immunologischen Trübungstest. Hierbei verbinden sich anti-IgG-Antikörper mit dem Antigen aus dem Serum. Die entstandenen AG/AK-Komplexe werden turbidimetrisch gemessen. Die Versuchsdurchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

3.3.5.2 Gesamt-IgA und Gesamt-IgM

Die Immunglobulinkonzentrationen des Gesamt-IgA und Gesamt-IgM im Serum wurden mittels ELISA bestimmt.

Coating

Es wurden 96-Well-Mikrotiterplatten mit dem entsprechenden Coating-Antikörper in Coating-Puffer in der Verdünnung 1:5000 und 100 µl/Well für 18 Stunden bei 4°C gecoated. Die weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Blocken

Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurde nach Dekantieren der Platte jedes Well mit je 200 µl Blockingpuffer (2 % Bovines Serum Albumin in Tris-Puffer (TBS)) geblockt und die Platte eine Stunde lang inkubiert.

Zwischen allen weiteren Schritten wurde die Platte jeweils dreimal im ELISA-Washer mit je 200 µl/Well TBS gewaschen.

Auftragen der Proben

Eine aus 7 Verdünnungsstufen bestehende Standardreihe und alle Proben in der Verdünnung 1: 50.000 wurden jeweils in Doppelbestimmung mit je 50 µl/Well auf die Platte aufgetragen.

Die Verdünnungen wurden vor der Plattenauftragung in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durch die entsprechende Zugabe von RPMI 1640 Medium, dem 10 % fetales bovines Serum

(FBS), 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin hinzugefügt wurden, angefertigt. Für den Standard wurde ein Serum mit bekannten IgA- bzw. IgM-Konzentrationen verwendet, die Leerwertkontrolle erfolgte mit Medium ohne Zusätze.

Die Standardreihe des IgA bestand aus den Konzentrationen 30; 15; 7,5; 3,75; 1,875; 0,937; 0,46 U/l, die des IgM aus 60; 30; 15; 7,5; 3,75; 1,875; 0,937 U/l.

Detektion

Nach einer zweistündigen Inkubation wurden zur Detektion des IgA und IgM im nächsten Schritt die entsprechenden Detektionsantikörper mit Detektionspuffer (0,2 % BSA in TBS) auf 1: 5000 verdünnt und mit 100 µl/Well auf die Platte zur erneuten zweistündigen Inkubation aufgetragen.

Substratreaktion

Frisch angesetztes Substrat wurde mit 100µl/well (1 Tablette (15 µg) p-Nitrophenyl-Phosphat auf 15 ml Substratpuffer) auf die Platte gebracht.

Die Messung der Extinktion erfolgte nach zehnminütiger Inkubationszeit im ELISA-Reader bei 405 nm.

Die Immunglobulinkonzentration ist direkt proportional zur Farbintensität des ELISA und wird über eine Standardkurve mittels Punkt-für-Punkt -Analyse berechnet.

Zur Überprüfung der von uns gemessenen Werte erfolgte eine Kontrollmessung des IgA und IgM einiger Stichproben mittels IgA-2 bzw. IgM-2 Tina-quant Kit (Roche/Hitachi cobas c Systeme) durch das Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité - Universitätsmedizin Berlin.

3.3.5.3 Gesamt-IgE

Die Bestimmung des Gesamt-IgE wurde analog zu der des anti-TT-IgE mit dem ImmunoCAP® Total IgE Conjugate (Phadia, Uppsala, Schweden) im IgE-Labor des Allergie-Centrum-Charité durchgeführt. Das Testprinzip ist identisch, nur ist an das ImmunoCAP das für die entsprechenden Antikörper spezifische Antigen kovalent gebunden. Auch dieser Versuch wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.4 Statistische Auswertung

Die Auswertung und Visualisierung der Ergebnisse erfolgte mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., Ca, USA) und SPSS15.0 (SPSS, Inc. Chicago, IL, USA). Die

Prüfung der Gaußschen Normalverteilung erfolgte mit dem Kolmogorov-Smirnov Test und dem D'Agostino & Pearson Omnibus Normalitätstest. Zur Erhebung des statistischen Signifikanzniveaus wurde bei normalverteilten Stichproben der Student t-Test für verbundene bzw. unverbundene Stichproben, bei nicht normalverteilten Stichproben der Wilcoxon Test für verbundene bzw. der Mann-Whitney-U Test für nichtverbundene Stichproben verwendet. Normalverteilte Werte wurden meist als Mittelwerte und Standardabweichungen, nicht normalverteilte Werte meist durch Mediane und Interquartilenranges angegeben. Zur Darstellung dienten Tabellen oder Boxplots.

Die mathematischen Berechnungen erfolgten mit Excel 2007 aus dem Microsoft Office Paket 2007.

p-Werte wurden wie folgt als statistisch signifikant bewertet:

$p \leq 0,05$: *, $p \leq 0,01$: **, $p \leq 0,001$: ***

4 Ergebnisse

4.1 Probanden - Basisdaten

Zu Beginn der Untersuchung bestand bezüglich der Verteilung von Geschlecht, Lebensalter, Body Mass Index (BMI) und zeitlichem Abstand zur letzten Tetanusimmunisierung kein signifikanter Unterschied zwischen den Probanden der Verum- und der Placebogruppe (Tabelle Nr. 2). Keiner der Probanden hatte einen dunkleren Hauttyp als III nach Fitzpatrick (*Fitzpatrick, 1988*).

Bei den Probanden bestanden zu Beginn der Untersuchung bezüglich der nachfolgenden Parameter keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle Nr.2: Basisdaten des Probandenkollektivs.

Probandendaten	Verumgruppe	Placebogruppe	p-Wert ²
n = 32	n = 20	n = 12	
Weibliche Probanden n	13 (65%)	9 (75%)	
Alter (a)			0,60
Mittelwert\pmSEM¹	30,0 \pm 1,2	29,1 \pm 1,2	
Median	30 (26;34,5)	28,5 (26;32,7)	
Range (min-max)	23 - 40	23 - 36	
Größe (m)	1,7 (0,1)	1,7 (0,1)	0,98
Gewicht (kg)	67,7 (11,6)	71,8 (12,3)	0,35
BMI (kg/m²)	23,4 (3,1)	24,8 (2,7)	0,27

4.1.1 Vitamin D-Status des Probandenkollektivs

Zu Beginn der Untersuchung vor Beginn der Supplementation im Dezember 2008 (Zeitpunkt 1 (ZP1)) wurden bei allen 32 Teilnehmern die 25-Hydroxyvitamin D-Serumspiegel bestimmt. Bei 24 Probanden (75%) lagen die Serumwerte unter 50 nmol/l; davon waren 16 Probanden der Verumgruppe (80 %) und 8 Probanden der Placebogruppe (60 %) betroffen. Der durchschnittliche Wert lag in der Placebogruppe zu Beginn der Untersuchung bei 40,2 \pm 20,0; in der Verumgruppe betrug die durchschnittliche 25-Hydroxyvitamin D-Serumkonzentration 39,6 \pm 38,2 nmol/l. Der

Unterschied zwischen den beiden Gruppen war zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant ($p = 0,14$), siehe Abbildung Nr. 3.

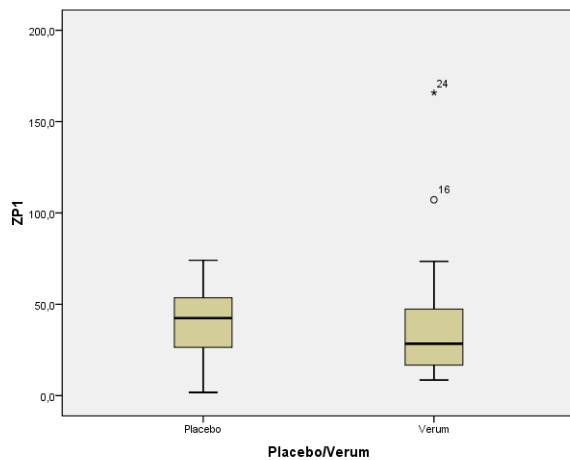


Abb. Nr. 3: Placebo und Verum: Vitamin-D-Serumwerte zu Beginn der Untersuchung (ZP1).

4.1.2 Vitamin D-Status nach Supplementation

Nach zehnwöchiger Supplementation (Februar, ZP4) mit 2000 IE Vitamin D₃ pro Tag stieg die durchschnittliche 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration in der Verumgruppe signifikant um 43,2 nmol/l auf $82,8 \pm 31,1$ nmol/l an ($p < 0,0001$). Nur noch 15,0 % der Probanden hatten einen Serum-Vitamin D-Spiegel von unter 50 nmol/l. In der Placebogruppe wurde ein durchschnittlicher 25-Hydroxyvitamin D-Serumwert von $28,8 \pm 11,7$ nmol/l gemessen, der somit um 11,4 nmol/l niedriger war als im Dezember ($p = 0,0007$). Die 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration lag nunmehr bei allen Probanden der Placebogruppe unter 50 nmol/l.

Der Unterschied zwischen den 25-Hydroxyvitamin D-Spiegeln der Placebo- und der Verumgruppe war nach Abschluss Suppletionsphase signifikant ($p \leq 0,0001$). Diese Messwerte werden in Abbildung Nr. 4 dargestellt.

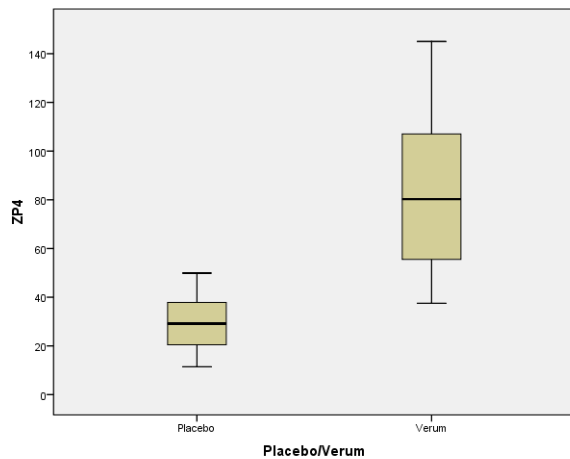


Abb. Nr. 4: Placebo und Verum: Vitamin-D-Serumwerte nach Abschluss der Supplementation (ZP4).

4.2 Sicherheitsparameter der Vitamin D₃-Supplementation

Es wurden bei den Probanden Kalzium und Phosphat sowie ein Differentialblutbild zur Prüfung der Sicherheit der Vitamin D-Supplementation bestimmt. Die Resultate sind in Tabelle Nr. 3 übersichtlich zusammengefasst. Für diese Daten standen sämtliche Probanden unseres Kollektivs zur Verfügung (Verumgruppe n = 20; Placebogruppe n = 12).

Zu Beginn der Untersuchung bestanden zwischen den beiden Gruppen (Verum-, Placebogruppe) keine signifikanten Unterschiede. Nach Abschluss der Untersuchung fand sich im Gruppenvergleich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0433$) in der Monozytenanzahl.

Im gesamten Untersuchungszeitraum trat kein auf die Supplementation zurückzuführendes schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis auf. In vergleichbarer Häufigkeit konnten in beiden Gruppen kleinere Ereignisse, wie etwa Erkältungsinfekte, beobachtet werden (Verumgruppe 30 %, n=6; Placebogruppe 33 %, n=4).

Tabelle Nr. 3: Differentialblutbild, Kalzium- und Phosphatserumwerte.

Variable	Beginn		Änderung zum Ausgangswert (Differenz nachher-vorher)		p-Wert ²
	Verumgruppe (n=20)	Placebo- gruppe (n=12)	Verum- gruppe (n=20)	Placebo- gruppe (n=12)	
Kalzium (mmol/l)	2,32 (2,28; 2,37)	2,3 (2,26; 2,42)	0,05 (-0,02; 0,13)	0,01 (-0,05; 0,07)	0,3709
Phosphat (mmol/l)	0,96 (0,9; 1,17)	1,02 (1,01; 1,16)	0,04 (-0,98; 0,23)	-0,07 (-0,23; 0,06)	0,0876
Hämatokrit (l/l)	0,41 (0,37; 0,46)	0,41 (0,37; 0,43)	-0,01 (-0,02; 0,0)	0,0 (-0,02; 0,01)	0,6291
Erythrozyten (/pl)	4,53 (4,23;5,31)	4,5 (4,34; 4,73)	0,01 (-0,19; 0,18)	-0,02 (-0,16; 0,17)	0,8714
Thrombo- zyten (/nl)	222 (202; 239)	251 (188; 288)	14,5 (-9,25; 9,75) ^{3*}	-6,0 (-17,0; 36,0)	0,2856
Leukozyten (/nl)	5,4 (4,46; 6,02)	6,06 (4,21; 7,94)	-0,17 (-0,87; 1,61)	-2,00 (0,05; 0,55) ^w	0,0825
Lymphozyten (/nl)	1,66 (1,4; 1,88)	1,79 (1,44; 2,16)	-0,16 (-0,45; 0,21)	0,05 (-0,3; 0,25) ^w	0,3426
Neutrophile (/nl)	3,04 (2,5; 3,34)	4,19 (1,6; 5,01)	-0,24 (-0,58; 1,1)	-0,2 (-2,46; 0,52)	0,3236 ^M
Eosinophile (/nl)	0,1 (0,05; 0,21)	0,08 (0,05; 0,14)	0,03 (-0,02; 0,08)	0,01 (-0,01; 0,11) ^w	0,9715
Basophile (/nl)	0,02 (0,01; 0,02)	0,02 (0,02; 0,03)	0,01 (0,0; 0,02)	0,0 (0,0; 0,01)	0,2696 ^M
Monozyten (/nl)	0,41 (0,33; 0,46)	0,43 (0,33; 0,62)	-0,02 (-0,08; 0,16)	-0,04 (-0,14; -0,01) ^{3*}	0,0433*

Werte sind als Mediane angegeben; Interquartilenrange in Klammern.

4.3 Vitamin D-Supplementation und Immunantwort

Die Zahl der verwertbaren Proben weicht bei den nachfolgend dargebotenen Parametern leicht von den Fallzahlen der bisherigen Untersuchungsergebnisse ab, da von den zum Zeitpunkt 3 (ZP3) 32 eingeschlossenen Probanden (Verumgruppe n = 20; Placebogruppe n = 12) eine Probe aus der Placebogruppe versehentlich verschüttet und somit nicht ausgewertet werden konnte. Daher umfasste die Placebogruppe bei der Bestimmung der Immunglobuline nur elf Probanden; n = 11. Eine Probe aus der Verumgruppe wurde ebenfalls versehentlich verschüttet und konnte daher bei der

Bestimmung des TT-IgA nicht ausgewertet werden, daher umfasst die Verumgruppe bei dieser Auswertung nur 19 statt 20 Probanden.

4.3.1 Gesamt-Immunglobulinkonzentration

Die Serumkonzentrationen der Immunglobuline IgA, IgE, IgG und IgM wurden unmittelbar vor sowie sieben Tage nach der Immunisierung mit Tetanus bestimmt und änderten sich während der Supplementationsphase bei keinem der Probanden signifikant.

Tabelle Nr. 4: Isotypenspezifische Immunglobulinwerte in den Gruppen vor und nach Supplementation.

Variablen,	Beginn		Änderung zum Ausgangswert (Differenz nachher - vorher)		p-Wert ²
	Verumgruppe (n)	Placebogruppe (n)	Verumgruppe	Placebogruppe	
Gesamt-IgA (mg/dl)	228 (19)	250 (11)	5	36	0,125
Gesamt-IgG (mg/dl)	898 (20)	949 (11)	-13	-11	0,5070
Gesamt-IgM (mg/dl)	108 (20)	124 (11)	3	16	0,267
Gesamt-IgE (kU/l)	6,2 (20)	0,3 (11)	0	0	

Alle Werte sind als Median angegeben; Interquartilenrange in Klammern.

Signifikanzmessung der Änderung zum Ausgangswert zwischen den Gruppen.

4.3.2 Tetanustoxoid-spezifische Immunglobuline

Die Tetanustoxoid-spezifischen Immunglobuline A, E und G wurden unmittelbar vor (Zeitpunkt 3) sowie 30 Tage nach der Tetanus-Auffrischimmunisierung (Zeitpunkt 5) bestimmt.

Im Nachfolgenden sollen die Veränderungen der einzelnen Tetanus-Immunglobuline nach der Tetanus-Immunisierung unter Berücksichtigung der Vitamin D-Supplementation beurteilt werden (getrennte Auswertung der einzelnen Immunglobuline in der Verum- und der Placebogruppe mit anschließendem Vergleich).

4.3.2.1 Tetanustoxoid-spezifisches Immunglobulin G (TT-IgG)

In Tabelle Nr. 5 werden der Mittelwert, die Standardabweichung und weitere statistische Daten zu den TT-IgG-Werten vor und nach der Immunisierung im gesamten Probandenkollektiv wiedergegeben.

Die Differenz zwischen den Prä- und Postwerten ist erwartungsgemäß sowohl im gesamten Probandenkollektiv, als auch in der Verum- und der Placebogruppe, hoch signifikant (paired samples test: $p < 0,0001$). Nur bei der Placebogruppe ist das Signifikanzniveau nach der Immunisierung mit $p < 0,001$ etwas niedriger.

Tabelle Nr. 5: TT-IgG: statistische Parameter vor und nach der Immunisierung .

		Mean	n	Std. Deviation	Std. Error Mean
Gesamtes Kollektiv	vor	1,500	31	1,6769	0,3012
	nach	28,503	31	14,8072	2,6595
Verumgruppe	vor	0,980	20	0,4797	0,1073
	nach	30,755	20	14,82226	3,3144
Placebo-gruppe	vor	2,445	11	2,5445	0,7672
	nach	24,409	11	14,5511	4,3873

Im Gruppenvergleich waren die Werte vor der Immunisierung in den beiden Gruppen niedrig (Verumgruppe: 0,98 IE \pm 0,45; Placebogruppe: 2,4 IE \pm 2,5); 30 Tage nach der Immunisierung kam es in beiden Gruppen zu signifikanten Anstiegen der TT-spezifischen IgG-Konzentration. In der Verumgruppe stieg das TT-IgG auf 30,8 IE \pm 14,8 ($p < 0,0001$) an, in der Placebo-Gruppe auf 24,4 IE \pm 14,6 ($p < 0,001$).

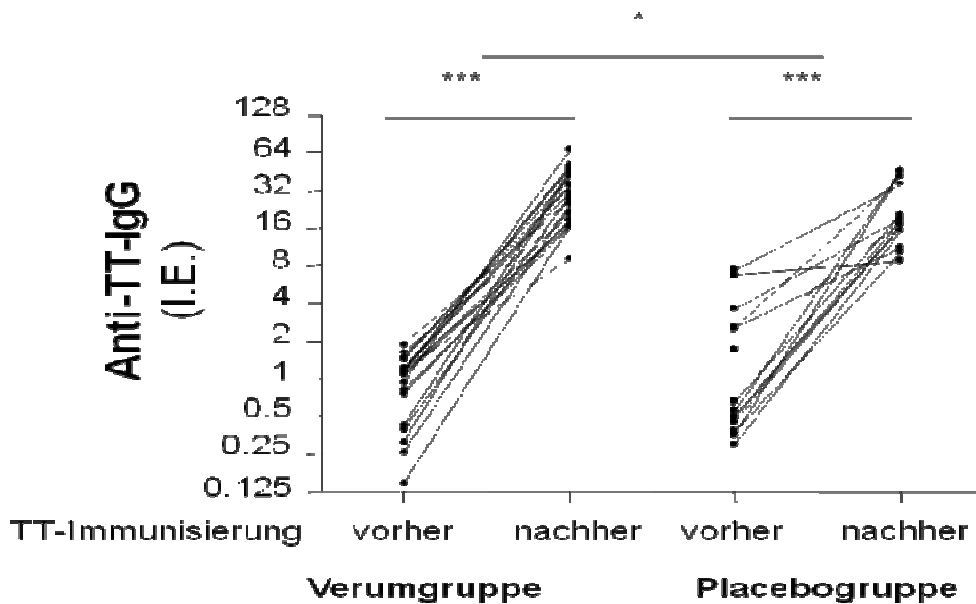


Abbildung Nr. 5: Anti-Tetanustoxoid-IgG im gruppeninternen Vergleich unmittelbar vor und einen Monat nach der Immunisierung mit TT.

Die Kovarianzanalyse ergab eine signifikante Korrelation zwischen der intervallskalierten Kovariante der Veränderung des 25-Hydroxyvitamin D-Spiegels und der intervallskalierten abhängigen Variablen der anti-TT-IgG-Differenz ($p = 0,042$). Eine direkte Korrelation der nominalskalierten unabhängigen Variablen der Gruppe auf die anti-TT-IgG konnte jedoch nicht verifiziert werden (Abbildung Nr. 6).

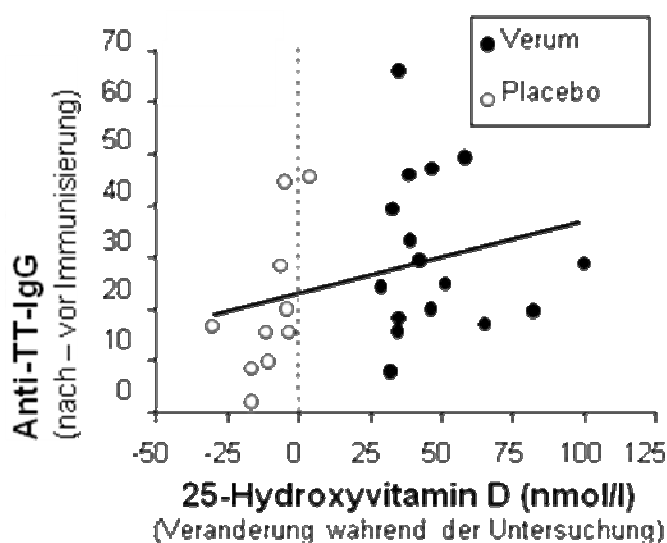


Abbildung Nr. 6: Korrelation zwischen anti-TT-IgG (Differenz der Konzentration nach - vor Immunisierung) und Änderung der 25-Hydroxyvitamin D-Serumkonzentration

während der Untersuchung (nach - vor Supplementation). Der Regressionskoeffizient betrug 0,351, P = 0,042.

4.3.2.1.1 IgG: Differenzbestimmung anhand der Delta- und Fold Change-Werte

Nachfolgend wurden die Delta- und die Fold Change-Werte in den beiden Gruppen (Verum und Placebo) verglichen und die Unterschiede einer statistischen Bewertung unterzogen.

Tabelle Nr. 6: TT-IgG – Delta-Werte; Testung der Signifikanz zwischen Verum und Placebo.

	p/v	n	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
	Placebo	11	21,955	150221	4,5293
IgG delta	Verum	20	29,755	14,8267	3,3154

Der Unterschied zwischen den Delta-Werten in der Placebo- und der Verumgruppe ist bei TT-IgG nicht signifikant ($p = 0,174$).

Tabelle Nr. 7: TT-IgG – Fold Change (FC)-Werte; Testung der Signifikanz zwischen Verum- und Placebo.

IgG FC	p/v	n	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
	Placebo	11	29,527	35,0197	10,5588
	Verum	20	48,794	45,7733	10,2352

Der Unterschied zwischen den Fold Change-Werten der Verum- und Placebogruppe ist bei den TT-IgG nicht signifikant ($p = 0,236$). Sowohl bezüglich der Delta-, als auch bezüglich der Fold Change-Werte waren die durch die Immunisierung ausgelösten Steigerungen der TT-IgG-Konzentrationen in der Verum- und in der Placebogruppe vergleichbar. Die Vitamin-D-Supplementation hat demnach keine signifikanten Veränderungen in der TT-IgG-Freisetzung nach der Immunstimulation durch Tetanustoxoid bewirkt.

4.3.2.2 Tetanustoxoid-spezifisches Immunglobulin A (TT-IgA)

Die Ausgangswerte des anti-TT-IgA Serumspiegels waren zwischen den Gruppen vergleichbar. Eine Induktion durch die TT-Immunisierung fand statt, war jedoch unabhängig von erfolgter oder nicht erfolgter Supplementation.

In der Verumgruppe stieg der TT-IgA-Wert von 13,87 IE/ml \pm 13,22 auf 39,07 \pm 20.495 ($p < 0,01$), in der Placebogruppe von 16,9 IE/ml \pm 16,8 auf 65,7 \pm 69,2 ($p < 0,01$). Bezüglich der Steigerung der anti-TT-IgA-Spiegel in der Verum- und der Placebogruppe war kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen.

Tabelle Nr. 8: TT-IgA-Konzentrationen vor und nach Immunisierung.

		Mean	n	Std. Deviation	Std. Error Mean
Alle Probanden	vor	14,967	30	14,4168	2,6321
	nach	48,820	30	45,6531	8,3351
Verumgruppe	vor	13,868	19	13,2195	3,0328
	nach	39,068	19	20,4957	4,7020
Placebogruppe	vor	16,864	11	16,7910	5,0627
	nach	65,664	11	69,2481	20,8791

4.3.2.2.1 TT-IgA: Differenzbestimmung anhand der Delta-Werte

Delta-Werte (individuelle Differenz zwischen den TT-IgA-Spiegeln) vor und nach der Immunisierung:

Tabelle Nr. 9: TT-IgA – Delta-Werte: statistische Parameter.

	p/v	n	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
TT-IgA delta	Placebo	11	48,800	63,8524	19,2522
	Verum	19	25,200	14,7115	3,3751

Die Auswertung der Delta-Werte in der Placebo- und in der Verumgruppe hat auch bei den TT-IgA-Werten bestätigt, dass keine signifikanten Unterschiede vorliegen ($p = 0,130$).

Tabelle Nr. 10: TT-IgA: Fold Change-Werte – statistische Parameter.

	p/v	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
TT-IgA - FC	Placebo	11	5,636	6,2877	1,8958
	Verum	19	5,026	6,4087	1,4703

Die Unterschiede zwischen den Fold Change-Werten in der Verum- und Placebogruppe sind auch bei den TT-IgA-Werten nicht signifikant ($p = 0,802$).

4.3.2.3 Tetanustoxoid-spezifisches Immunglobulin E (TT-IgE)

TT-spezifische IgE-Konzentrationen waren bei insgesamt neun Probanden nachweisbar. In der Verumgruppe stieg das TT-IgE bei drei Probanden an, bei drei Probanden sank es über den Untersuchungszeitraum ab. In der Placebogruppe konnte bei zwei Probanden ein Anstieg, bei einem Probanden ein Abfall vermerkt werden. Die Unterschiede zwischen den Delta-Werten in der Verum- und Placebogruppe sind auch bei den TT-IgE-Werten nicht signifikant ($p = 0,642$).

Tabelle Nr. 11: TT-IgE: Delta-Werte – statistische Parameter.

	p/v	n	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
TT-IgE delta	Placebo	11	,0045	,03142	,00947
	Verum	20	,0260	,21274	,04757

4.3.3 Tetanustoxoid-spezifische Zytokinfreisetzung

In einem weiteren Schritt wurden Veränderungen der TT-spezifischen Zytokine nach der Auffrisch-Immunsierung in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Status untersucht.

Es wurden folgende Zytokine bestimmt: IFN- γ ; TNF- α ; IL-10; IL-2, L-4 und IL-5.

Um falsch positive bzw. falsch negative Resultate identifizieren zu können, wurden gleichzeitig sowohl Negativkontrollen (unstimulierte PBCM) als auch Positivkontrollen (mit SEB stimulierte PBCM) ausgewertet.

Bei der Auswertung der Negativkontrolle fiel auf, dass bei insgesamt sieben Probanden (vier aus der Placebogruppe und drei aus der Verumgruppe) die TNF- α /IFN- γ -Werte erhöht waren, was auf einen aktuellen bakteriellen Infekt bei den betroffenen Probanden hinweist. Diese Probanden wurden für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt. Ferner war bei einem Probanden der Verumgruppe keine Zytokinmessung möglich. Somit standen für die statistische Auswertung in der Placebogruppe acht und in der Verumgruppe 15 Probanden zur Verfügung.

Sowohl in der Verum-, als auch in der Placebogruppe wurde unter SEB ein Anstieg aller untersuchten Zytokine beobachtet. Die Stimulation mit Tetanustoxoid induzierte zu beiden Zeitpunkten die Sekretion von TNF- α , IFN- γ , IL-2 und IL-10. Der Gruppenvergleich ergab p-Werte zwischen 0,76 und 0,11, somit wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Verum- und der Placebogruppe festgestellt. Die TT-induzierte IL-4 und IL-5 Sekretion war bei allen Proben unter der Nachweisgrenze.

In Tabelle Nr. 12 wurden die statistischen Werte der einzelnen Zytokine, getrennt für die Placebo- und für die Verumgruppe, zusammengefasst.

Tabelle Nr. 12: Tetanustoxoid-spezifisches Zytokinprofil nach Vitamin D-Supplementation.

Zyto-kin	Verumgruppe (n=15)			Placebogruppe (n=8)			SEB Δp	ΔTT Δp
	nil	TT	SEB	nil	TT	SEB		
IFN-γ	7 (7;7)	512 (45;2786)	44943 (16914;55717)	7 (7;21)	2212 (38;3058)	45968 (17426;63819)	0,56	0,76
TNF-α	3 (3;5)	132 (54;232)	1269 (720;3316)	3 (3;4)	191 (23;472)	1342 (674;1895)	0,49	0,23
IL-10	6 (4;9)	25 (11;184)	1714 (985;2376)	6 (3;10)	20 (8;55)	1858 (724;2939)	0,84	0,11
IL-2	6 (3;10)	116 (26;167)	4957 (3761;7135)	3 (3;8)	137 (4;215)	5267 (2742;6060)	0,45	0,26
IL-4	< 5	< 5	92 (3;144)	< 5	< 5	3 (3;121)	0,11	k.A.
IL-5	< 5	< 5	58 (3;124)	< 5	< 5	3 (3;120)	0,41	k.A.

4.4 Vitamin D-Status der Kontroll-Kohorte

Im Nachfolgenden wurden der Vitamin-D-Status, der geschlechtsspezifische Unterschied und die saisonbedingten Schwankungen des Vitamin-D-Gehalts an einer aus 338 Patienten bestehenden, aus Berlin stammenden, bezüglich des Alters gematchten Kohorte (zwischen 19 und 35 Jahren) untersucht. Die individuellen Werte der Serum-25-Hydroxyvitamin D-Spiegel werden aus Platzgründen in dieser Arbeit nicht dargelegt.

Die Fallzahlen in den einzelnen Monaten bzw. Jahreszeiten sind verschieden, da es sich um die 25-Hydroxyvitamin D-Werte von einzelnen Patienten zum Zeitpunkt ihrer Erstuntersuchung und somit um eine Querschnittstudie mit unterschiedlichen Stichproben handelt.

Tabelle Nr. 13: Aufteilung der Patienten der Charité-Kohorte nach Geschlecht und Jahreszeit.

Patienten (n = 338) (Alter: 19 – 35 Jahre)	Frauen	Männer	Insgesamt
Winter	64	43	107
Sommer	129	102	231
Insgesamt	193	145	338

4.4.1 Saisonbedingte Unterschiede

Zunächst wurde der Anteil jener Patienten berechnet, die einen zu niedrigen Vitamin-D-Status (<50 nmol/l) aufweisen.

Von den 43 männlichen Patienten, deren Vitamin-D-Status in den Wintermonaten ermittelt wurde, lag bei 34 (79,07%) ein Vitamin-D-Serumspiegel <50 nmol/l vor; von den Frauen (64 Patientinnen) waren 48 (75,00%) betroffen. Insgesamt lagen die Serum-Vitamin-D-Werte bei 82 von 107 Patienten (76,64%) im Winter unterhalb der 50nmol-Grenze.

Im Sommer wurden Vitamin-D-Serumwerte unterhalb von 50 nmol/l bei 46 von insgesamt 102 Patienten (45,10%) und bei 49 von insgesamt 129 Patientinnen

(37,98%) gemessen. Ohne Berücksichtigung des Geschlechts wurden von den 231 Patienten der Charité-Kohorte, bei denen der Vitamin-D-Status in den Sommermonaten bestimmt wurde, in 95 Fällen (41,12%) Vitamin-D-Werte unter 50 nmol/l gemessen. (Die Individualwerte wurden aus Platzgründen nicht dargelegt).

Die Mittelwerte des 25-Hydroxyvitamin D-Serumgehalts und die Standardabweichung werden in der Tabelle Nr. 14 und in Abb. Nr. 7 wiedergegeben. Der Unterschied zwischen den Sommer- und den Winterwerten ist – bei beinahe identischer Streuung – mit $p < 0,0001$ signifikant.

Tabelle Nr.14: Saisonbedingte Unterschiede in der Serum-25-Hydroxyvitamin D-Konzentration in der Kontroll-Kohorte (n = 338).

Gesamte Kohorte (n = 338)	n	Mittelwert	Standardabweichung	Signifikanz
Sommer	231	56,12	27,34	p < 0,0001
Winter	107	33,19	27,56	

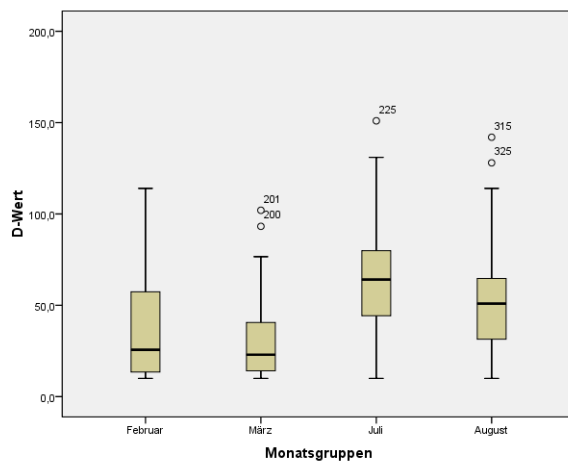


Abb. Nr. 7: Die Kontroll-Kohorte (Frauen und Männer; 19-35 Jahre) – Vitamin-D-Werte in den Sommer- und Wintermonaten.

4.4.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Im Nachfolgenden untersuchten wir die saisonbedingten Unterschiede des Vitaminstatus getrennt bei Männern und Frauen der Charité-Kohorte. Die

entsprechenden Resultate finden sich für Frauen in der Tabelle Nr. 15 und Abbildung Nr. 8; für Männer in der Tabelle Nr. 16 und in Abbildung Nr. 9.

Tabelle Nr. 15: Vitamin-D-Werte bei den Frauen (n = 193).

Monatsgruppen	n	Mittelwert	Standardabweichung	p
Sommer (Juli, August)	129	58,71	27,04	< 0,0001
Winter (Februar, März)	64	33,72	23,37	

Wie in Tabelle Nr. 15 ersichtlich, liegt bei den Frauen der Mittelwert der Vitamin-D-Spiegel in den Sommermonaten (Juli und August, zusammengefasst) bei $58,71 \pm 27,04$ nmol/l; in den Wintermonaten bei $33,71 \pm 23,37$ nmol/l. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant. Die Durchschnittswerte liegen im Sommer über dem Grenzwert 50 nmol/l; im Winter deutlich darunter.

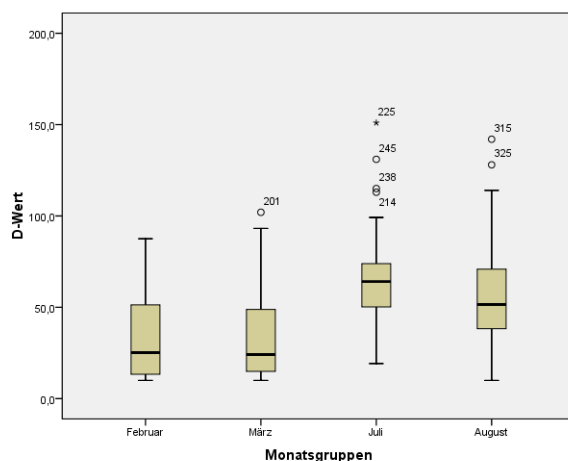


Abb. Nr. 8: Saisonale Abhängigkeit der Vitamin-D-Werte bei den Frauen (Februar, März und den Sommermonaten Juli, August).

Tabelle Nr. 16: Vitamin-D-Werte bei den Männern (n = 145).

Monatsgruppen	n	Mittelwert	Standardabweichung	p
Sommer	102	52,86	27,49	< 0,0001
Winter	43	32,40	26,50	

Wie in Tabelle Nr. 16 dargestellt, liegt bei den Männern der Mittelwert der Vitamin-D-Spiegel in den Sommermonaten (Juli und August, zusammengefasst) bei $52,86 \pm 27,04$ nmol/l; in den Wintermonaten bei $32,40 \pm 26,51$ nmol/l. Dieser Unterschied ist

statistisch hoch signifikant ($p < 0,0001$). Wie bei den Frauen liegen auch hier die Durchschnittswerte im Sommer über 50nmol/l und im Winter deutlich darunter.

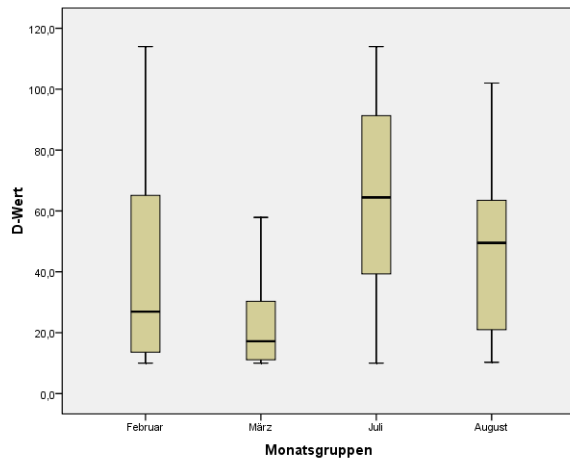


Abb. Nr. 9: Saisonale Abhängigkeit der Vitamin-D-Werte bei den Männern (Februar, März und den Sommermonaten Juli, August).

Nachfolgend prüften wir, ob zwischen den Sommer- und den Winterwerten der Vitamin-D-Spiegel signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede bestehen.

Tabelle Nr. 17: Vergleich der Vitamin-D-Werte zwischen Männern und Frauen (Wintermonate) (n = 107)

Geschlecht	n	Mittelwert	Standardabweichung	p
Männer	43	32,40	26,50	p = 0,79
Frauen	64	33,72	23,37	

Tabelle Nr. 18: Vergleich der Vitamin-D-Werte zwischen Männern und Frauen (Sommermonate) (n = 231)

Geschlecht	n	Mittelwert	Standardabweichung	p
Männer	102	52,86	27,49	p = 0,11
Frauen	129	58,71	27,04	

Die Berechnung der Signifikanz anhand des t-Tests ergab keinen signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschied bezüglich der jahreszeitlichen Schwankungen des Vitamin-D-Status in der Charité-Kohorte ($p = 0,79$ im Winter und $p = 0,11$ im Sommer).

4.5 Vitamin D bei Typ-I-Allergie

Im weiteren Verlauf wurde der Vitamin D-Status bei 14 Patienten (12 weiblich, 2 männlich) mit Typ-I-Allergie geprüft.

Im Winter zeigte sich bei 6 Patienten (42,9%) eine 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration von < 50 nmol/l; im Sommer waren fünf Patienten (35,7%) betroffen.

Tabelle Nr. 19: Saisonabhängige Unterschiede in den 25-Hydroxyvitamin D-Werten bei Typ-I-Allergiepateinten – statistische Parameter.

	25VitD Winter (nmol/l) n = 14	25VitD Sommer (nmol/l) n = 14
Mittelwert	49,5	69,7
Standard- abweichung	19,5	33,2
<50 nmol/l	6 (42,9%)	5 (35,7%)

Die mittlere 25-Hydroxyvitamin D-Serumkonzentration liegt bei den Typ-I-Allergiepateinten im Winter bei $49,5 \pm 19,5$; im Sommer bei $69,7 \pm 33,2$ (siehe Tabelle Nr. 19). Der Unterschied zwischen den Winter- und den Sommerwerten ist – im Unterschied zu den bisher getesteten Kollektiven (unsere Probanden, Charité-Kohorte) – bei Patienten mit Typ-I-Allergie nicht signifikant ($p = 0,119$).

Tabelle Nr. 20: Allergiepateinten – Berechnung der Signifikanz des saisonbedingten Unterschieds der 25-Hydroxyvitamin D-Serumkonzentration (paired t-test).

		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		t	df	Sig. (2-tailed)
					Lower	Upper			
Pair 1	V2 - V3	-20,19	45,24	12,09	-46,31	5,94	-1,67	13	,119

4.6 Vitamin D-Status bei CLE-Pateinten

In einem weiteren Schritt wurden der Vitamin D-Status und die saisonbedingten Schwankungen der 25-Hydroxyvitamin D-Serumkonzentration bei 34 Pateinten (n= 34; weiblich n=28; männlich n=6) mit Autoimmunkrankheiten – hier mit kutanem Lupus erythematodes (CLE) – untersucht.

Die mediane 25-Hydroxyvitamin D-Serumkonzentration beträgt bei den CLE-Patienten im Winter 15,05 nmol/dl; im Sommer 33,20 (weitere statistische Daten bringt Tabelle Nr. 21).

Tabelle Nr. 21: 25-Hydroxyvitamin D-Serumkonzentration bei CLE-Patienten – statistische Parameter.

n = 34		Wert
Winter (nmol/l)	Median	15,1
	Minimum	5,0
	Maximum	42,0
	Interquartile Range	24,1
Sommer (nmol/l)	Median	33,2
	Minimum	5,0
	Maximum	56,7
	Interquartile Range	15,6

Im Kollektiv der CLE-Patienten hatten im Winter alle Patienten (100,0%) Vitamin D-Werte unter 50 nmol/l; auch im Sommer erreichte der überwiegende Anteil der CLE-Patienten diese Grenze nicht (32 Patienten; 94,1%). Nur bei einem Patienten (2,9%) wurden im Winter Werte über 40 nmol/l gemessen – im Sommer immerhin bei sechs Patienten (17,6%). Noch niedrigere Werte (unter 25 nmol/l) wurden im Winter bei 23 Patienten (67,6%) und im Sommer bei sieben Patienten (20,6%) bestätigt (siehe Tabelle Nr. 22).

Tabelle Nr. 22: Anteil der CLE-Patienten mit Vitamin D-Mangel.

	Vitamin D (nmol/l) im Winter Patienten n (%)	Vitamin D (nmol/l) im Sommer Patienten n (%)
< 50 nM	34 (100)	32 (94,1)
>40 nM	1 (2,9)	6 (17,6)
< 25 nM	23 (67,6)	7 (20,6)

5 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit basieren vorrangig auf den Resultaten der Untersuchungen an einem 32 Probanden umfassenden Kollektiv freiwilliger erwachsener Teilnehmer, wohnhaft in Berlin.

Im ersten Arbeitsschritt wurde der Vitamin-D-Status der Probanden untersucht. Der Literatur ist zu entnehmen, dass trotz Aufklärungskampagnen und der industriellen Anreicherung von Nahrungsmitteln die Prävalenz von Vitamin-D-Mangel in Deutschland weiterhin hoch ist (*Hypponen et Power, 2007; Looker et al, 2008; Hill et al, 2008; Hintzpeter et al, 2008; Heine et al, 2011; Chapuy et al, 1997*).

In einem weiteren Arbeitsschritt wurden die Labordaten von Patienten ausgewertet, die entweder aus Labordaten der Charité insgesamt bzw. aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie generiert wurden.

5.1 Vitamin D-Status und Supplementation

5.1.1 Vitamin D-Status vor und nach Supplementation

In unserem Probandenkollektiv wurde bei der Erstuntersuchung im Dezember bei 75% der Probanden ein Vitamin-D-Wert unterhalb von 50 nmol/l bestimmt, wonach diese Personen für einen Vitamin-D-Mangel gefährdet einzustufen sind.

Entsprechend unserem Protokoll wurden die Teilnehmer verblindet in zwei Gruppen randomisiert. Die Verumgruppe (20 Teilnehmer) wurde in den nachfolgenden 10 Wochen mit Vitamin-D supplementiert (2.000 IE täglich), während die Teilnehmer der Placebogruppe (n = 12) Neutral-Öl einnahmen. Zwischen den Teilnehmern der Verum- und Placebogruppe bestand zu diesem Zeitpunkt bezüglich des Vitamin-D-Status kein signifikanter Unterschied.

Im Februar wurde bei der Kontrolluntersuchung festgestellt, dass die Vitamin D-Supplementation den Abfall des Vitamin-D-Spiegels verhindern konnte; die Probanden der Verumgruppe erreichten zum großen Teil optimale oder nahezu optimale Vitamin-D-Werte, während bei den Teilnehmern der Placebogruppe der Vitamin-D-Wert zusätzlich abnahm. Der Unterschied zwischen der Verum- und der Placebogruppe war nun mit $p \leq 0,0001$ signifikant.

Diese Beobachtung bestätigt die aus der Literatur bekannten saisonbedingten Unterschiede des Vitamin D-Status (*Hintzpeter et al, 2008*).

5.1.2 Sicherheit der Vitamin D₃-Supplementation

In unserem Probandenkollektiv konnten wir zeigen, dass eine Vitamin D-Supplementation über die Dauer von 10 Wochen in der UV-armen Jahreszeit den saisonbedingten Abfall der Vitamin D-Konzentration verhindert und die Vitamin D-Versorgung normalisieren kann. Die von uns eingesetzte Dosis von 2000 IE pro Tag wurde von allen Probanden gut toleriert und war effektiv. In der Verumgruppe wurde eine signifikante Anhebung der Vitamin D-Werte beobachtet, welche durchschnittlich um nur 2% von der Berechnung von Heaney et al abwich (*Heaney et al, 2003*). In der Placebogruppe sank die 25-Hydroxyvitamin D-Konzentration über den Untersuchungszeitraum weiter ab, so dass am Ende der Suppletionsphase ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand ($p < 0,0001$).

Die Kalzium- und Phosphatserumwerte wurden nicht beeinflusst und lagen während des gesamten Untersuchungszeitraums bei jedem der eingeschlossenen Probanden im Normbereich. Auch diese Ergebnisse unterstreichen die Sicherheit der Supplementation mit 2000 IE/Tag Vitamin D₃.

Das Differentialblutbild blieb im Wesentlichen ebenfalls unverändert. Eine Ausnahme stellte die Monozytenzahl dar: Während die Zahl der Monozyten in der Verumgruppe nahezu konstant blieb, sank sie in der Placebogruppe über die Dauer des Untersuchungszeitraumes signifikant ab. Der VDR wird in zahlreichen Zellen des Immunsystems exprimiert, unter anderem von Monozyten. Es konnte beobachtet werden, dass Monozyten, die zu Makrophagen differenzieren, zwar ihre Calcitriolproduktion erhöhen, ihre VDR-Expression jedoch sinkt (*Kreutz et al, 1993*). Calcitriol wiederum hemmt die Differenzierung von Monozyten in dendritische Zellen und fördert andererseits die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen (*Arnson et al, 2007*).

Somit könnte ein Gleichgewicht geschaffen worden sein, das die konstante Monozytenzahl in der Verumgruppe erklären könnte. Das Absinken in der Placebogruppe ist hierdurch jedoch nicht geklärt. Ebenso bleibt vorläufig unklar, ob die Monozyten mit dem verstärkten TT-spezifischen IgG und der effektiveren Immunisierung in Beziehung stehen, z. B. durch eine veränderte Antigenpräsentation oder IgG-fördernde Kostimulation auf T- und B-Lymphozyten.

Die Aufschlüsselung weiterer Veränderungen unter den Zellen des Immunsystems wäre für zukünftige Studien von Interesse.

5.1.3 Vitamin D₃ und Gesamt-Immunglobulinkonzentration

In der vorliegenden Untersuchung blieben die Gesamt-Immunglobuline IgA, IgM und IgG bei allen Probanden im Verlauf konstant. Dies könnte auf langlebige, antikörperproduzierende Plasmazellen zurückzuführen sein, die sich im Knochenmark befinden (*Radbruch et al, 2006*) und Immunglobuline produzieren.

In einer Studie von Chen et al. zeigte sich eine Hemmung der Proliferation sowie eine Induktion der Apoptose aktivierter B-Zellen, eine Hemmung der Plasmazelldifferenzierung sowie ein erniedrigter Gesamt-Ig-Spiegel durch Calcitriol in vitro. Insbesondere IgG, aber auch IgM waren in den Zellkulturen, die Calcitriol enthielten, signifikant erniedrigt (*Chen et al, 2007*). Durch verschiedene Zeitpunkte der Calcitriolzusatzung konnte jedoch eine direkte Wirkung des Calcitriol auf die Immunglobuline ausgeschlossen werden (*Fritsche et al, 2003*).

Im Tiermodell wurde vor allem eine Änderung der mukosalen, lokalen Immunglobulinwerte (Nasenschleimhaut, Lungen- und Vaginallavage bzw. Speichelflüssigkeit) unter mit Calcitriol angereicherten Immunisierungen beobachtet. Im Serum ergaben sich keine Veränderungen (*Enioutina et al, 1999; Ivanov et al, 2006*). In mukosalen Sekreten waren während einer Vitamin D-Supplementation neben den normalerweise vorhandenen IgA-Antikörpern auch IgG-Antikörper nachweisbar (*Enioutina et al, 1999*). Es wäre daher sinnvoll, in zukünftigen Studien neben Serum auch mukosale Sekrete einzubeziehen. Aufgrund der Praktikabilität würde sich hier beispielsweise Nasen- oder Rachensekret eignen.

5.1.4 Vitamin D₃ und TT-spezifische Immunglobuline

In der vorliegenden Arbeit werden erstmalig Daten zur Effektivität der Tetanusimmunisierung bei gleichzeitiger Vitamin D-Supplementation bzw. in einem Vitamin D-defizienten Status präsentiert.

30 Tage nach Immunisierung kommt es normalerweise zu einem signifikanten Anstieg der TT-spezifischen IgG-Konzentration im Serum, das heißt einem TT-IgG-Titer $\geq 1,0$ IE/ml, was als ausreichende Immunität angenommen wird (*Van Damme et Burgess, 2004; Hansen et al, 1989*). Dies war bei allen Probanden unseres Kollektivs der Fall. Daher kann die Immunisierung als effizient bewertet werden.

In der Verumgruppe zeigte sich kein suppressiver Einfluss von Vitamin D auf die Immunantwort der Auffrischimmunisierung. Eine Kovarianzanalyse ergab einen signifikanten Zusammenhang der Veränderung des 25-Hydroxyvitamin D-Spiegels und der anti-TT-IgG-Differenz ($p = 0,042$). Eine direkte Korrelation zwischen den Gruppen und dem anti-TT-IgG Serumspiegel konnte jedoch nicht verifiziert werden.

Unsere Beobachtungen sind mit den Ergebnissen aus anderen Studien (*Enioutina et al, 1999; Ivanov et al, 2006; Van der Stede et al, 2001*) vergleichbar und sind wahrscheinlich auf die Induktion der spezifischen IgG1-Subklasse zurückzuführen, die die dominante, von der Immunisierung induzierte Subklasse ist und von 92 % der zirkulierenden spezifischen Plasmablasten produziert wird (*Frolich et al, 2010*). In der vorliegenden Arbeit wurden die Immunglobulin-Subklassen nicht bestimmt. Eine Aufschlüsselung wäre jedoch in zukünftigen Untersuchungen sinnvoll.

Die gruppenunabhängigen Veränderungen der TT-spezifischen IgA- und -IgE-Werte lassen zwar die Vermutung zu, dass wahrscheinlich auch die verschiedenen spezifischen IgG-Subklassen sich nicht wesentlich verändert haben. Vor allem jedoch der TT-IgG4-Spiegel wäre ein wichtiges Indiz, um eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit einer allergiefördernden Immunantwort durch Vitamin D treffen zu können.

Für das TT-IgA konnte ein – allerdings von der Vitamin D-Supplementation unabhängiger – Anstieg nach der Immunisierung nachgewiesen werden. Das TT-IgE folgte in der vorliegenden Untersuchung keinem erkennbaren Muster. In der Literatur ist ein Anstieg der TT-spezifischen Immunglobuline IgA und IgM im Serum 30 Tage nach der Immunisierung beschrieben worden (*Hansen et al, 1989; Ershler et al, 1982*).

Die Anwendung von Calcitriol als Adjuvans bei Immunisierungen ist vor allem aus tierexperimentellen Studien bekannt. In verschiedenen Tiermodellen zeigten sich in verschiedenen Modellen erhöhte Antikörperwerte. Bei Mäusen, die gegen Hämophilus influenza B und Diphtherie (*Enioutina et al, 1999*) bzw. Polio (*Ivanov et al, 2006*) immunisiert wurden, wurden in den Gruppen, die den mit Calcitriol angereicherten Impfstoff erhielten, signifikant höhere antigenspezifische Antikörperantworten bestätigt. Bei Studien mit Schweinen und Rindern, die mit Serumalbumin bzw. Escherichia coli J5 sowie jeweils Calcitriol immunisiert wurden, zeigten sich in den Verumgruppen vergleichbare Resultate (*Van der Stede et al, 2001; Reinhardt et al, 1999*).

In der Humanforschung gibt es bislang nur wenige Studien, bei denen Vitamin D als Adjuvans bei Immunisierungen eingesetzt wird. In einer retrospektiven Studie von Zitt et

al. mit chronisch nierenerkrankten Patienten, die eine Hepatitis B-Immunisierung erhalten hatten, zeigte sich bei Patienten mit einer niedrigeren 25-Hydroxyvitamin D-Serumkonzentration auch geringere anti-HB-Ak (*Zitt et al, 2012*). Bei Patienten mit nachgewiesenem Prostatakarzinom wurde eine stärkere serologische Immunantwort auf eine Influenzaimmunisierung nachgewiesen je höher die 25-Hydroxyvitamin D-Serumkonzentration war (*Chadha et al, 2011*).

In einer Untersuchung bei Kleinkindern in England zeigte sich drei und zwölf Monate nach der Immunisierung mit BCG eine signifikant höhere 25-Hydroxyvitamin D-Serumkonzentration im Vergleich zu einer nicht-immunisierten, altersgematchten Kontrollgruppe. Es wird ein direkter Zusammenhang zwischen dem mykobakteriellen Antigen und dem Anstieg der 25-Hydroxylase vermutet (*Lalor et al, 2011*).

Die durch eine Immunisierung aktivierten B-Lymphozyten differenzieren zu Plasmazellen, die spezifische Immunglobuline produzieren, aber auch B-Gedächtniszellen, die bei einem sekundären Antigenkontakt für eine schnelle und wirksame sekundäre Immunantwort sorgen. Eine Studie von Nanan et al. zeigte, dass multiple Tetanusimmunisierungen zwar einen Anstieg der B-Gedächtniszellen, jedoch keinen begleitenden weiteren Anstieg der Tetanusantikörper zur Folge haben (*Nanan et al, 2001*). Diese Beobachtung wurde von Amanna et al. bestätigt und lässt Rückschlüsse auf eine unabhängige Regulierung von B-Gedächtniszellen einerseits und der Antikörperproduktion andererseits zu (*Amanna et al, 2007*).

5.1.5 Vitamin D₃ und TT-spezifische Zytokine

Um den möglichen Einfluss von Vitamin D₃ auf die Zytokinantwort zu untersuchen, wurden unmittelbar vor sowie sieben Tage nach der Immunisierung Blutproben von den Probanden untersucht. Nach sieben Tagen war die größte Anzahl zirkulierender antigenspezifischer T-Zellen im Blut nachweisbar (*DeRosa et al, 2004*). Die sowohl durch TT als auch durch SEB getriggerte polyklonale T-Helferzell-Antwort war unter Vitamin D stabil. Die Produktion von TT-spezifischen und polyklonalen IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ und TNF- α war stabil und im Vergleich zur Placebogruppe ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede. Diese Beobachtungen stimmen mit den Untersuchungen von Mahon et al. überein, in denen bei MS-Patienten unter Vitamin D₃-Supplementation ebenfalls keine Veränderung bezüglich der IFN- γ - und TNF- α -Produktion von peripheren T-Zellen gemessen wurde (*Mahon et al, 2003*).

Der VDR wird von zahlreichen Zellen des Immunsystems, unter anderem von T-Helferzellen, exprimiert (*Provvedini et al, 1983; Veldman et al, 2000*). Damit ist Calcitriol in der Lage, direkt in die Proliferation und Funktion der T-Lymphozyten einzugreifen (*Adams et Hewison, 2008*). Einige Daten bezüglich der Vitamin D-Zufuhr und dem Einfluss auf T-Zell-Zytokinantworten sind jedoch widersprüchlich. So zeigte sich sowohl eine Hemmung als auch eine Förderung von TNF- α und IL-1; die in vitro-Ergebnisse für IL-12 und IFN- γ waren in vivo nicht reproduzierbar (*Hayes et al, 2003*). In einigen Studien wurde eine Hemmung der T_H1-Zytokine (IL-2, IFN- γ , TNF- α) und eine Förderung der T_H2-Zytokinproduktion (IL-4, IL-5, IL-10) beobachtet (*Issa et al, 1998; Cantorna et al, 2003; Overbergh et al, 2000*). Schleithoff et al. konnten durch eine Supplementation mit 25-Hydroxyvitamin D einen Anstieg von IL-10 im Serum nachweisen (*Schleithoff et al, 2006*).

In der vorliegenden Untersuchung konnten keine signifikanten Veränderungen der Zytokinantworten bei dem Vergleich vor gegen nach Immunisierung beobachtet werden. Ob dies durch die geringe Fallzahl bedingt ist, bleibt vorerst ungeklärt. Eine Überprüfung der Frage an einer ausreichend großen Population wäre daher sinnvoll.

5.2 Referenzwerte: die Charité-Kohorte

Um geeignete Referenzwerte für den Vitamin D-Status zu finden, nutzten wir die Möglichkeit, die Vitamin-D-Serumkonzentrationen eines ausreichend großen Kollektivs auszuwerten (338 altersentsprechende Patienten einer Kohorte der Charité, die an keiner Vitamin-D relevanten Erkrankung litten). Wir stellten fest, dass die saisonbedingten Schwankungen in dieser großen Patientengruppe einem vergleichbaren Muster folgen, wie wir es in unserer eigenen Probandengruppe beobachten konnten.

Die große Zahl der Daten ermöglichte uns, der bisher nicht eindeutig geklärten Frage geschlechtsspezifischer Unterschiede beim Vitamin D-Status nachzugehen. Die Resultate der Berliner Charité-Kohorte weisen keinen solchen Unterschied auf. Basierend auf dieser Erkenntnis haben wir in unseren nachfolgenden Untersuchungen auf die Unterteilung der Patientengruppen nach Geschlecht verzichtet – eine Beobachtung, die sich angesichts unseres zahlenmäßig kleinen Probandenkollektivs als günstig erwiesen hat.

Da Vitamin D eine entscheidende Rolle für die Funktion des Immunsystems innehat, die jedoch noch nicht zufriedenstellend geklärt ist, haben wir in zwei kleinen Stichproben untersucht, ob bei Patienten mit gestörter Funktion bzw. einer Erkrankung des Immunsystems Unterschiede im Vitamin D-Status im Vergleich zu unserem Probandenkollektiv zu beobachten sind.

5.3 Vitamin D-Status bei Typ-I-Allergiepatienten

Dazu haben wir eine 14 Patienten umfassende Gruppe von Typ-I- Allergiepatienten sowie ein Kollektiv von 34 Patienten mit einer Autoimmunkrankheit (CLE) untersucht.

Es zeigte sich, dass bei den Allergiepatienten bezüglich des Vitamin D-Status gleichfalls – wie in den bisher untersuchten Kollektiven – saisonbedingte Schwankungen auftreten. Im Unterschied zu unserem Probandenkollektiv, aber auch zu den Patienten der Charité-Kohorte, waren die Unterschiede zwischen den Winter- und Sommerserumwerten des 25-Hydroxyvitamin D bei Allergie-Typ-I-Patienten nicht signifikant.

5.4 Vitamin D-Status bei CLE-Patienten

Auffallend anders ist die Situation bei den CLE-Patienten, die durchweg alle an einem Vitamin D-Mangel leiden, und zwar – mit nur geringen Ausnahmen – ganzjährig. Dieser Umstand ist vermutlich zum größten Teil nicht auf die Autoimmunkrankheit per se, sondern auf die damit einhergehende UV-Sensibilität zurückzuführen, weshalb die Erkrankten die UV-Exposition meist strikt vermeiden. Dadurch fällt bei CLE-Patienten die Vitamin D-Eigenproduktion, welche für rund 90% des Vitamin D-Status erforderlich ist (*Devereux, 2009; Heaney et al, 2003; Vieth et al, 2007*), praktisch völlig weg.

Dies spiegelt sich nicht nur in erhöhtem Osteoporose- und Frakturrisiko wider. Ein anhaltender Vitamin D-Mangel geht auch mit zahlreichen weiteren Erkrankungsrisiken einher (*Chen et al, 2007*). Eine Multicenterstudie von Ben-Zvi et al, die 2010 mit 165 CLE-Patienten durchgeführt wurde, bestätigte eine signifikant höhere Krankheitsaktivität bei den Vitamin D-defizienten Patienten (*Ben-Zvi et al, 2010*).

Insgesamt konnten wir bei allen von uns untersuchten Kollektiven (eigene Probandengruppe, Charité-Kohorte, Allergie- und CLE-Patienten) in Übereinstimmung mit der Studie von Hintzpeter et al (*Hintzpeter et al, 2008*) belegen, dass auch in der Berliner Population eine Vitamin D-Defizienz zumindest während der Wintermonate in deutlichem Umfang vorliegt.

Die CLE-Patienten wiesen dagegen eine jahreszeitlich unabhängige, ausgeprägte Vitamin D-Defizienz auf, was die Bedeutung einer Vitamin D-Supplementierung speziell bei diesen Patienten besonders unterstreicht.

In Deutschland liegt die als sicher geltende zulässige Supplementationsdosis für Vitamin D₃ aktuell bei 50µg (2000 IE) pro Tag (*Vieth, 2007; Hathcock et al, 2007*). Arbeiten von Hathcock et al zeigen, dass selbst eine Hochdosissupplementation sicher ist. Diese Autoren halten daher eine Empfehlung von 10.000 IE Vitamin D₃ pro Tag für die Allgemeinbevölkerung für gerechtfertigt (*Hathcock et al, 2007*). Die Aufnahme der Vitamin D-Supplementierung für alle CLE-Patienten als Standardtherapie in die Leitlinien wäre vor diesem Hintergrund sinnvoll. Welche Vitamin D-Dosis diese Supplementierung beinhalten sollte, um sowohl eine optimale Knochengesundheit als auch einen Beitrag für das Immunsystem dieser Patienten zu gewährleisten, muss jedoch noch näher untersucht werden.

5. 6 Ausblick

Mithilfe der Daten der vorgelegten Arbeit kann die biologische Konsequenz für die Modulation immunologischer Krankheiten nur eingeschränkt beurteilt werden. Die Untersuchung bietet jedoch ein Modell zur weiteren Untersuchung humoraler und zellulärer Immunmodulation durch Vitamin D. Eine Untersuchung dieser Art wie hier dargestellt ist bislang nicht beschrieben worden.

Zukünftige Studien sollten mit einer größeren Fallzahl angelegt werden. Um den beobachteten Mittelwertsunterschied der Differenz von TT-spezifischem IgG vom Wert nach der Immunisierung zum Ausgangswert zwischen Placebo- und Verumgruppe mit einer Power von 80% nachweisen zu können, wäre eine Fallzahl von jeweils 46 Probanden pro Gruppe erforderlich.

Die Schwankungen der immunologischen Daten sind wahrscheinlich nicht ausschließlich auf die durchgeführte Immunisierung zurückzuführen. TT-unspezifische Stimuli, wie etwa ein im Untersuchungszeitraum aufgetretener grippaler Infekt, sind unvermeidbare Ereignisse und können bei Probanden zu jeder Zeit auftreten.

In Zukunft könnten im Winter durchgeführte placebokontrollierte Studien zur Untersuchung der veränderten immunologischen Funktionen unter Vitamin D-Supplementierung bei verschiedenen Krankheitsbildern wie Allergien und

Autoimmunkrankheiten genutzt werden. In den UV-reduzierten Wintermonaten durchgeführte Untersuchungen können den Vorteil nutzen, dass die Probanden außer der Supplementation nur wenige Quellen haben, aus denen sie Vitamin D beziehen könnten. Schlussfolgernd können im Winter beobachtete Veränderungen auf die Vitamin D-Supplementation zurückgeführt werden.

6 Zusammenfassung

Vitamin D übt vielfältige Wirkungen auf das Immunsystem aus; daher wird der Vitamin D-Status mit vielen Immunkrankheiten assoziiert; die Frage einer gezielten Vitamin D-Supplementation – zumindest einiger Patientengruppen – wird immer häufiger diskutiert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob unter Vitamin D₃ – Supplementation eine Boosterimmunisierung effektiv und sicher ist.

Gesunden Probanden wurde placebokontrolliert oral Vitamin D₃ verabreicht (2000 IE/Tag). Nach Ablauf der Suppletionsphase wurde allen Probanden eine Auffrischimmunisierung mit Tetanustoxoid verabreicht.

Der Vorteil dieses Untersuchungsmodells liegt in der Durchführung während der UV-reduzierten Wintermonate. Da Vitamin D vor allem UV-abhängig vom Körper selbst gebildet wird, ist eine Supplementation im Sommer nicht sinnvoll. Von Vorteil war auch die zu erwartende größer werdende Differenz im Laufe des Winters zwischen den verglichenen Gruppen, da den Probanden der Placebogruppe kaum anderweitige Vitamin D-Quellen zur Verfügung standen.

Ein weiteres Ziel der Untersuchung war die Untersuchung des jahreszeitenabhängigen Vitamin D-Status bei Patienten mit der Autoimmunkrankheit kutaner Lupus erythematodes (CLE) und dessen Vergleich mit dem Vitamin D-Status bei Typ-1-Allergikern sowie bei gesunden Probanden, da bei CLE-Patienten wegen der erhöhten Photosensibilität und der damit verbundenen verstärkten UV-Schutzmaßnahmen ein von den Jahreszeiten unabhängiger Vitamin D-Mangel anzunehmen ist.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die spezifische humorale Immunantwort durch eine Vitamin D-Supplementation, wie sie in dieser Untersuchung vorgenommen wurde, nicht beeinflusst wird. Die Auffrischimmunisierung war bei allen Probanden effektiv, wobei in der Verumgruppe ein signifikant erhöhter TT-IgG-Spiegel messbar war.

Eine Induktion von Sensibilisierungen durch Vitamin D ist nicht zu erwarten, da die gemessenen Veränderungen des TT-IgE variabel waren und nicht auf eine Induktion hindeuten. Schwerwiegende unerwünschte Nebenwirkungen der Vitamin D-Supplementation wurden bei keinem Probanden beobachtet.

Im Rahmen unserer Untersuchungen konnten wir bei allen Probanden und Patienten eine relative Vitamin D-Defizienz bereits zu Beginn des Winters beobachten. Im Gruppenvergleich war unter der Supplementation ein signifikanter Anstieg des Vitamin

D-Serumspiegels sowie ein signifikanter Unterschied zwischen der Verum- und der Placebogruppe feststellbar.

Wurde kein Vitamin D₃ supplementiert, fiel der 25-Hydroxyvitamin D-Spiegel in allen verglichenen Gruppen über den Untersuchungszeitraum weiter ab. In allen untersuchten Patientengruppen wurde im Sommer ein im Vergleich zu den Wintermonaten höherer Vitamin D-Serumspiegel beobachtet. Allerdings lag bei den CLE-Patienten sowohl im Winter als auch im Sommer fast durchgehend eine deutliche Vitamin D-Defizienz vor.

7 Anhang

7.1. Verzeichnis der Tabellen

Tabelle Nr.1: Vitamin D-Gehalt in verschiedenen Nahrungsmitteln	21
Tabelle Nr. 2: Basisdaten des Probandenkollektivs	46
Tabelle Nr. 3: Differentialblutbild, Kalzium- und Phosphatspiegel	49
Tabelle Nr. 4: Isotypenspezifische Immunglobuline vor und nach Suppl.	50
Tabelle Nr. 5: IgG – statistische Parameter Verum vs. Placebo	51
Tabelle Nr. 6: IgG: Delta-Werte; Signifikanz Verum vs. Placebo	53
Tabelle Nr. 7: IgG: FC-Werte; Signifikanz Verum vs. Placebo	53
Tabelle Nr. 8: IgA nach Tetanustoxoid-Immunsisierung: Verum- und Placebo	54
Tabelle Nr. 9: IgA: Delta-Werte – statistische Parameter	54
Tabelle Nr. 10: IgA: FC-Werte – statistische Parameter	55
Tabelle Nr. 11: IgE: Delta-Werte – statistische Parameter	55
Tabelle Nr. 12: TT-spezifisches Zytokinprofil nach Vitamin D-Supplementation	56
Tabelle Nr. 13: Kontroll-Kohorte: Aufteilung nach Geschlecht und Jahreszeit	57
Tabelle Nr. 14: Kontroll-Kohorte: Saisonbedingte Unterschiede des Vit. D-Status	58
Tabelle Nr. 15: Vitamin D-Werte bei den Frauen	59
Tabelle Nr. 16: Vitamin D-Werte bei den Männern	59
Tabelle Nr. 17: Vitamin D: Geschlechtsspezifischer Unterschied Winter	60
Tabelle Nr. 18: Vitamin-D: Geschlechtsspezifischer Unterschied Sommer	60
Tabelle Nr. 19: Vitamin D: Saisonabhängige Unterschiede bei Allergie	61
Tabelle Nr. 20: Allergiepationen – saisonbedingte Schwankungen t-Test	61
Tabelle Nr. 21: Vitamin D-Status bei CLE-Patienten – statistische Parameter	62
Tabelle Nr. 22: Anteil der CLE-Patienten mit Vitamin D-Mangel	62

7.2 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. Nr. 1: Übersicht Vitamin D-Stoffwechsel (adaptiert nach Holick)	16
Abb. Nr. 2: Schematische Darstellung des Untersuchungsablaufs	37
Abb. Nr. 3: Placebo und Verum: Vit-D-Serumwerte zu Beginn der Unters.	47
Abb. Nr. 4: Placebo und Verum: Vitamin-D bei Ende Supplementation	48
Abb. Nr. 5: Anti-Tetanustoxoid-IgG vor und nach Immunisierung	52
Abb. Nr. 6: Anti-TT-IgG und Vitamin- D-Status	52
Abb. Nr. 7: Charité-Kohorte: saisonbedingte Vitamin-D-Werte	58
Abb. Nr. 8: Saisonale Abhängigkeit der Vitamin-D-Werte bei den Frauen	59
Abb. Nr. 9: Saisonale Abhängigkeit der Vitamin-D-Werte bei den Männern	60

7.3 Materialien

7.3.1 Verwendete Testsysteme

Testsystem	ID	Hersteller
Tetanus toxin (antitoxin) IgG ELISA	EIA-3514	DRG Diagnostics, Marburg, BRD
25-hydroxyvitamin D EIA	Code AC-57F1	Immunodiagnostic Systems GmbH, Frankfurt/Main, BRD
ImmunoCAP Total IgE Conjugate 100 and 400	52-5238-99/08	Phadia, Uppsala, Schweden
IgA-2 Tina-quant Gen.2 A	03507246 190	Cobas c Systeme, Roche, Mannheim, BRD
IGG-2 Tina-quant Gen.2	07 6787 5	Cobas c Systeme, Roche, Mannheim, BRD
IgM-2 Tina-quant Gen.2 A	03507041 190	Cobas c Systeme, Roche, Mannheim, BRD
Human Cytokine Cytometric Array T _H 1/T _H 2 Kit – Bead	550749/ 32.53.720.550	BD Biosciences, San Diego, USA

7.3.2 Labormaterial und Geräte

Name	Model	Hersteller
Mikrotiterplatten-Messgerät (ELISA Reader)	MRX Microplate Reader	Dynatech Laboratories
Mikrotiterplattenwaschgerät (ELISA Washer)	Tecan MACHT/2R, type: Columbus plus	Tecan
Casy®1-Zellsystem	TTC	Schärfe System GmbH, Reutlingen, BRD
Zentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf
96-Well Mikrotiterplatte		NUNC™
Reagiergefäße, Pipetten, Pipettenspitzen und weiterer Laborbedarf wurden über Eppendorf, Falcon und Sarstedt bezogen.		

7.3.3 Chemikalien und Reagenzien

Name	Zusammensetzung	pH- Wert	Firma
Coating-Puffer	350 mmol/l NaHCO ₃ , 150 mmol/l NaCl, 15 mmol/l Na ₂ CO ₃ ad 0,5l H ₂ O _{dest}	9,9	
Bovines Serum- albumin	Albumin bovine Fraction V, Lot: 080119, Serva: 11930	7,0	SERVA Electrophoresis
10fach TBS	100 mmol/l Trizma-Base 1,54 mol/l NaCl ad 1l H ₂ O _{dest}	7,4	
Waschpuffer	0,05 % Tween® 20, 100 ml 10fach TBS ad 900 ml H ₂ O _{dest}		
Tween® 20	Cat: 27 434-8 Lot: S30950-315		Aldrich
Substratpuffer	48,5 ml Diethanolamin, 1 mmol/l MgCl ₂ · H ₂ O ad 0,5 l H ₂ O _{dest}	9,9	
Substrat pHpp	p-Nitrophenyl-Phosphat		SIGMA N-2640

7.3.4 Antikörper (AK)

Name	Code	Lot	Konzentra- tion (mg/ml)	Firma
AffiniPure Goat Anti-Human Serum IgA, α -chain specific Coating-AK	109-005-011	66152	2,4	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, UK
Alkaline Phosphatase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human serum IgA, α -chain specific Detektions-AK	109-055-011	31128	0,6	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, UK
Affini-Pure Goat Anti-Human IgM, $F_{C5\mu}$ Fragment spezifisch Coating-AK	109-005-129	65155	1,8	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, UK
Alkaline Phosphatase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgM, $F_{C5\mu}$ Fragment spezifisch Detektions-AK	109-055-043	40328	0,6	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, UK

7.3.5 Software

Software	Firma
Excel 2007	Microsoft
SPSS15.0	SPSS, Inc. Chicago, IL, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc., Ca, USA
EndNote X1(Bld 2566), 2007	Thomson

7.4 Normwerte im Serum

Parameter	Einheiten	Normwerte
Kalzium	(mmol/l)	2,15 – 2,65
Phosphat	(mmol/l)	0,8 – 1,5
Hämatokrit	(l/l)	0,35 – 0,47
Erythrozyten	(/pl)	3,9 – 5,4
Thrombozyten	(/nl)	150 – 400
Leukozyten	(/nl)	4,5 – 11,0
Lymphozyten	(/nl)	1,4 – 3,7
Neutrophile	(/nl)	1,8 – 7,7
Monozyten	(/nl)	0,2 – 1,0
Eosinophile	(/nl)	< 0,7
Basophile	(/nl)	0,01 – 0,09
Gesamt-IgA	(mg/dl)	70 – 400
Gesamt-IgG	(mg/dl)	700 - 1600
Gesamt-IgM	(mg/dl)	40 - 230
Gesamt-IgE	(kU/l)	< 150IE
IFN-γ	(pg/ml)	322 – 10.000
TNF-α	(pg/ml)	40 - 2481
IL-2	(pg/ml)	27 - 940
IL-4	(pg/ml)	2 - 57
IL-5	(pg/ml)	3 - 42
IL-10	(pg/ml)	25 - 585

Normwerte im Serum, herausgegeben durch das Institut für Laboratoriumsmedizin der Charité - Universitätsmedizin Berlin.

Alle Werte gelten für gesunde Probanden zwischen 18 und 60 Jahren. Bei den Zytokinwerten können die Werte zwischen dem männlichen und dem weiblichen Geschlecht leicht variieren.

8 Literaturverzeichnis

1. Adams, J.S. and M. Hewison, Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2008. 4(2): p. 80-90.
2. Adorini, L. and G. Penna, Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2008. 4(8): p. 404-12.
3. Amanna, I.J., N.E. Carlson, and M.K. Slifka, Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *N Engl J Med*, 2007. 357(19): p. 1903-15.
4. Armas, L.A., B.W. Hollis, and R.P. Heaney, Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(11): p. 5387-91.
5. Arnson, Y., H. Amital, and Y. Shoenfeld, Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis*, 2007. 66(9): p. 1137-42.
6. Battault, S; Whiting, S.J., Peltier, S.L., Sadrin S., Gerber, G. Vitamin d metabolism, functions and needs: From science to health claims. *Eur. J. Nutr.* 2013 (52) p. 429 – 441.
7. Bell, N.H., Vitamin D metabolism, aging, and bone loss. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995. 80(4): p. 1051.
8. Ben-Zvi, I., et al., The impact of vitamin D on dendritic cell function in patients with systemic lupus erythematosus. *PLoS One*.2010. 5(2): p. e9193.
9. Bischoff-Ferrari, H.A., et al., Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr*, 2006. 84(1): p. 18-28.
10. Boonen, S., et al., Addressing the musculoskeletal components of fracture risk with calcium and vitamin D: a review of the evidence. *Calcif Tissue Int*, 2006. 78(5): p. 257-70.

11. Burton, J.M., et al., A phase I/II dose-escalation trial of vitamin D3 and calcium in multiple sclerosis. *Neurology*, 2010. 74(23): p. 1852-9.
12. Cantorna, M.T., et al., Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D3, and the immune system. *Am J Clin Nutr*, 2004. 80(6 Suppl): p. 1717S-20S.
13. Chadha, M.K., et al., Effect of 25-hydroxyvitamin D status on serological response to influenza vaccine in prostate cancer patients. *Prostate*. 2011.71(4): p. 368-72.
14. Chapuy, M.C., et al., Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int*, 1997. 7(5): p. 439-43.
15. Chen, S., et al., Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol*, 2007. 179(3): p. 1634-47.
16. Christakos, S., et al., New insights into the mechanisms of vitamin D action. *J Cell Biochem*, 2003. 88(4): p. 695-705.
17. Chun, R.F., J.S. Adams, and M. Hewison, Back to the future: a new look at 'old' vitamin D. *J Endocrinol*, 2008. 198(2): p. 261-9.
18. Clemens, T.L., et al., Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D3. *Lancet*, 1982. 1(8263): p. 74-6.
19. Daniel, C., et al., 22-ene-25-oxa-vitamin D: a new vitamin D analogue with profound immunosuppressive capacities. *Eur J Clin Invest*, 2005. 35(5): p. 343-9.
20. De Rosa, S.C., et al., Vaccination in humans generates broad T cell cytokine responses. *J Immunol*, 2004. 173(9): p. 5372-80.
21. Deeb, K.K., D.L. Trump, and C.S. Johnson, Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*, 2007. 7(9): p. 684-700.
22. Devereux, G., Vitamin D and Asthma; Time for Intervention? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2009. 179: p. 739-742.
23. Diamond, J., Evolutionary biology: geography and skin colour. *Nature*, 2005. 435(7040): p. 283-4.

24. Dlugos, D.J., P.L. Perrotta, and W.G. Horn, Effects of the submarine environment on renal-stone risk factors and vitamin D metabolism. *Undersea Hyperb Med*, 1995. 22(2): p. 145-52
25. Enioutina, E.Y., D. Bareyan, and R.A. Daynes, 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): p. 601-13.
26. Enioutina, E.Y., et al., The induction of systemic and mucosal immune responses following the subcutaneous immunization of mature adult mice: characterization of the antibodies in mucosal secretions of animals immunized with antigen formulations containing a vitamin D3 adjuvant. *Vaccine*, 1999. 17(23-24): p. 3050-64
27. Enioutina, E.Y., V.D. Visic, and R.A. Daynes, Enhancement of common mucosal immunity in aged mice following their supplementation with various antioxidants. *Vaccine*, 2000. 18(22): p. 2381-93.
28. Ershler, W.B., A.L. Moore, and M.P. Hacker, Specific in vi Enioutina, E.Y., et al., The induction of systemic and mucosal immune responses following the subcutaneous immunization of mature adult mice: characterization of the antibodies in mucosal secretions of animals immunized with antigen formulations containing a vitamin D3 adjuvant. *Vaccine*, 1999. 17(23-24): p. 3050-64.
29. Eurodiab: Vitamin D supplement in early childhood and risk for Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. The EURODIAB Substudy 2 Study Group. *Diabetologia*, 1999. 42(1): p. 51-4.
30. Feskanich, D., et al., Plasma vitamin D metabolites and risk of colorectal cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004. 13(9): p. 1502-8.
31. Fitzpatrick, T.B., The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*, 1988. 124(6): p. 869-71.

32. Fritsche, J., et al., Regulation of 25-hydroxyvitamin D₃-1 alpha-hydroxylase and production of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ by human dendritic cells. *Blood*, 2003. 102(9): p. 3314-6.
33. Frolich, D., et al., Secondary immunization generates clonally related antigen-specific plasma cells and memory B cells. *J Immunol*, 2010. 185(5): p. 3103-10.
34. Giovannucci, E., et al., Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *J Natl Cancer Inst*, 2006. 98(7): p. 451-9.
35. Gordon, C.M., et al., Prevalence of vitamin D deficiency among healthy adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 2004. 158(6): p. 531-7.
36. Grant WB, Holick MF, Benefits and Requirements of Vitamin D for Optimal Health: A Review. *Altern Med Rev*, 2005. 10 (2): p. 94–111
37. Hansen, P.G., et al., Appearance of IgG and IgA antibodies in human bile after tetanus toxoid immunization. *Clin Exp Immunol*, 1989. 77(2): p. 215-20.
38. Hathcock, J.N., et al., Risk assessment for vitamin D. *Am J Clin Nutr*, 2007. 85(1): p. 6-18
39. Hayes, C.E., et al., The immunological functions of the vitamin D endocrine system. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2003. 49(2): p. 277-300.
40. Hayes, C.E., Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis. *Proc Nutr Soc*, 2000. 59(4): p. 531-5.
41. Heaney, R.P., et al., Human serum 25-hydroxycholecalciferol response to extended oral dosing with cholecalciferol. *Am J Clin Nutr*, 2003. 77(1): p. 204-10.
42. Heaney, R.P., Long-latency deficiency disease: insights from calcium and vitamin D. *Am J Clin Nutr*, 2003. 78(5): p. 912-9.
43. Heaney, R.P., The Vitamin D requirement in health and disease. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005. 97(1-2): p. 13-9.

44. Heine, G., et al., 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits anti-CD40 plus IL-4-mediated IgE production in vitro. *Eur J Immunol*, 2002. 32(12): p. 3395-404.
45. Heine, G., et al., 1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells. *Eur J Immunol*, 2008. 38(8): p. 2210-8.
46. Heine, G., et al., Vitamin D deficiency in patients with cutaneous lupus erythematosus is prevalent throughout the year. *Br J Dermatol*, 2010. 163(4): p. 863-865.
47. Heine, G., et al., Efficient tetanus toxoid immunization on vitamin D supplementation. *Eur J Clin Nutr*, 2011. 65 (3): p. 329-334
48. Hill, T.R., et al., Vitamin D status and its determinants in adolescents from the Northern Ireland Young Hearts 2000 cohort. *Br J Nutr*, 2008. 99(5): p. 1061-7.
49. Hintzpeter, B., et al., Vitamin D status and health correlates among German adults. *Eur J Clin Nutr*, 2008. 62(9): p. 1079-89.
50. Holick, M.F., Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. *Am J Clin Nutr*, 1995. 61(3 Suppl): p. 638S-645S.
51. Holick, M.F., Sunlight "D"ilemma: risk of skin cancer or bone disease and muscle weakness. *Lancet*, 2001. 357(9249): p. 4-6.
52. Holick, M.F., Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*, 2004. 80(6 Suppl): p. 1678S-88S.
53. Holick, M.F., Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest*, 2006. 116(8): p. 2062-72.
54. Holick, M.F., Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*, 2007. 357(3): p. 266-81.
55. Hypponen, E., et al., Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet*, 2001. 358(9292): p. 1500-3.
56. Hypponen, E. and C. Power, Hypovitaminosis D in British adults at age 45 y: nationwide cohort study of dietary and lifestyle predictors. *Am J Clin Nutr*, 2007. 85(3): p. 860-8.

57. Hypponen, E., et al., Serum 25-hydroxyvitamin D and IgE - a significant but nonlinear relationship. *Allergy*, 2009. 64(4): p. 613-620.
58. Hypponen, E., Vitamin D and increasing incidence of type 1 diabetes- evidence for an association? *Diabetes Obes Metab*. 2010. 12(9): p. 737-43.
59. Issa, L.L., G.M. Leong, and J.A. Eisman, Molecular mechanism of vitamin D receptor action. *Inflamm Res*, 1998. 47(12): p. 451-75.
60. Ivanov, A.P., E.M. Dragunsky, and K.M. Chumakov, 1,25-dihydroxyvitamin d3 enhances systemic and mucosal immune responses to inactivated poliovirus vaccine in mice. *J Infect Dis*, 2006. 193(4): p. 598-600.
61. Joseph AJ, Geore B, Pulimood AB, Seshadri MS. Chacko A; 25 (OH) vitamin D level in Crohn's disease: association with sun exposure & disease activity. *Indian J Med Res*, 2009. 130(2): p. 133-137.
62. Judd SE, Tangpricha V: Vitamin D deficiency and risk for cardiovascular diseases. *Am J Med Sci*, 2009. 338 (1): p. 40-44.
63. Kimball, S.M., et al., Safety of vitamin D3 in adults with multiple sclerosis. *Am J Clin Nutr*, 2007. 86(3): p. 645-51.
64. Kreutz, M., et al., 1,25-dihydroxyvitamin D3 production and vitamin D3 receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages. *Blood*, 1993. 82(4): p. 1300-7.
65. Lalor, M.K., et al., BCG vaccination: a role for vitamin D? *PLoS One*. 2011, 6(1): p. e16709.
66. Lee, H.I. and M. Worm, Advances in the management of UVR-associated skin cancers: autoimmune diseases and UV protection. *Br J Dermatol*, 2009. 161 Suppl 3: p. 96-8.
67. Lin JH, Dutz JP, spontheimer RD Werth VP: Pathophysiology of cutaneous lupus erythematosus. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007 33 (1-2), p. 85-106.
68. Litonjua, A.A. and S.T. Weiss, Is vitamin D deficiency to blame for the asthma epidemic? *J Allergy Clin Immunol*, 2007. 120(5): p. 1031-5.

69. Litonjua, A.A. and D.R. Gold, Asthma and obesity: common early-life influences in the inception of disease. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. 121(5): p. 1075-84; quiz 1085-6.
70. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT et al., Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006, 311(5768): 1770-1773.
71. Liu, P.T. and R.L. Modlin, Human macrophage host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Immunol*, 2008. 20(4): p. 371-6.
72. Looker, A.C., et al., Serum 25-hydroxyvitamin D status of the US population: 1988-1994 compared with 2000-2004. *Am J Clin Nutr*, 2008. 88(6): p. 1519-27.
73. Mahon, B.D., et al., Cytokine profile in patients with multiple sclerosis following vitamin D supplementation. *J Neuroimmunol*, 2003. 134(1-2): p. 128-32.
74. McCollum, E.V., Simmonds, N., Becker, J.E., Shipley, P.G.: Studies on experimental rickets: XXI. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. *J Biol Chem*, 1922, 53; p. 293-312
75. Munger, K.L., et al., Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology*, 2004. 62(1): p. 60-5.
76. Munger, K.L., et al., Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*, 2006. 296(23): p. 2832-8.
77. Nanan, R., et al., Acute and long-term effects of booster immunisation on frequencies of antigen-specific memory B-lymphocytes. *Vaccine*, 2001. 20(3-4): p. 498-504.
78. Overbergh, L., et al., 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 induces an autoantigen-specific T-helper 1/T-helper 2 immune shift in NOD mice immunized with GAD65 (p524-543). *Diabetes*, 2000. 49(8): p. 1301-7.
79. Prietl, B., Treiber, G., Pieber, T.R., Amrein, K: Vitamin D and immune function. *Nutrients* 2013 (5), p. 2502 – 2521.

80. Provvedini, D.M., et al., 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. *Science*, 1983. 221(4616): p. 1181-3.
81. Radbruch, A., et al., Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(10): p. 741-50.
82. Reinhardt, T.A., J.R. Stabel, and J.P. Goff, 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhances milk antibody titers to *Escherichia coli* J5 vaccine. *J Dairy Sci*, 1999. 82(9): p. 1904-9.
83. Renne, J., T. Werfel, and M. Wittmann, High frequency of vitamin D deficiency among patients with cutaneous lupus erythematosus [corrected]. *Br J Dermatol*, 2008. 159(2): p. 485-6.
84. Robert Koch-Institut/Stand: Juli 2010. Robert Koch-Institut, *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 30, 2010: p. 279-298.
85. Rockell, J.E., et al., Season and ethnicity are determinants of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in New Zealand children aged 5-14 y. *J Nutr*, 2005. 135(11): p. 2602-8.
86. Sakthiswary R, Raymond A.A., The clinical significance of vitamin D in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *PLoS One*. 2013 8(1): e55275. doi:10.1371/journal.pone.0055275.
87. Schleithoff, S.S., et al., Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr*, 2006. 83(4): p. 754-9.
88. Shakiba, M., et al., Combination of bolus dose vitamin D with routine vaccination in infants: a randomised trial. *Singapore Med J*.2010; 51(5): p. 440-5.
89. Sidbury, R., et al., Randomized controlled trial of vitamin D supplementation for winter-related atopic dermatitis in Boston: a pilot study. *Br J Dermatol*, 2008. 159(1): p. 245-7.
90. Sigmundsdottir, H., et al., DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat Immunol*, 2007. 8(3): p. 285-93.

91. St-Arnaud, R., The direct role of vitamin D on bone homeostasis. *Arch Biochem Biophys*, 2008. 473(2): p. 225-30.
92. Sterry, W., Burgdorf, W., Paus, R., ed. *Checkliste Dermatologie*. 6. Auflage ed., ed. G.T.V. Stuttgart. 2010.
93. Tangpricha, V., et al., Fortification of orange juice with vitamin D: a novel approach for enhancing vitamin D nutritional health. *Am J Clin Nutr*, 2003. 77(6): p. 1478-83.
94. Vahavihu, K., et al., Heliotherapy improves vitamin D balance and atopic dermatitis. *Br J Dermatol*, 2008. 158(6): p. 1323-8.
95. Van Damme, P. and M. Burgess, Immunogenicity of a combined diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine in adults. *Vaccine*, 2004. 22(3-4): p. 305-8.
96. Van der Stede, Y., et al., Enhanced induction of the IgA response in pigs by calcitriol after intramuscular immunization. *Vaccine*, 2001. 19(15-16): p. 1870-8.
97. Van Der Stede, Y., et al., 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ increases IgA serum antibody responses and IgA antibody-secreting cell numbers in the Peyer's patches of pigs after intramuscular immunization. *Clin Exp Immunol*, 2004. 135(3): p. 380-90.
98. Veldman, C.M., M.T. Cantorna, and H.F. DeLuca, Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys*, 2000. 374(2): p. 334-8.
99. Vieth, R., Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. *Am J Clin Nutr*, 1999. 69(5): p. 842-56.
100. Vieth, R., Why "Vitamin D" is not a hormone, and not a synonym for 1,25-dihydroxy-vitamin D, its analogs or deltanoids. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004. 89-90(1-5): p. 571-3.
101. Vieth, R., What is the optimal vitamin D status for health? *Prog Biophys Mol Biol*, 2006. 92(1): p. 26-32.

102. Vieth, R., Vitamin D toxicity, policy, and science. *J Bone Miner Res*, 2007. 22 Suppl 2: p. V64-8.
103. Vieth, R., et al., The urgent need to recommend an intake of vitamin D that is effective. *Am J Clin Nutr*, 2007. 85(3): p. 649-50.
104. Vitasa, B.C., et al., Association of nonmelanoma skin cancer and actinic keratosis with cumulative solar ultraviolet exposure in Maryland watermen. *Cancer*, 1990. 65(12): p. 2811-7.
105. Wang, T.T., et al., Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D₃ target genes. *Mol Endocrinol*, 2005. 19(11): p. 2685-95.
106. WHO, W.H.O., International standard for vitamin D. 1950 (WHO, Technical Report Series, Geneva Switzerland)
107. Wittke, A., et al., Vitamin D receptor-deficient mice fail to develop experimental allergic asthma. *J Immunol*, 2004. 173(5): p. 3432-6.
108. Wjst, M. and S. Dold, Genes, factor X, and allergens: what causes allergic diseases? *Allergy*, 1999. 54(7): p. 757-9.
109. Zitt, E., et al., Vitamin D deficiency is associated with poor response to active hepatitis B immunisation in patients with chronic kidney disease. *Vaccine*. 2012. 30(5): p. 931-5.
110. Zittermann, A., J. Dembinski, and P. Stehle, Low vitamin D status is associated with low cord blood levels of the immunosuppressive cytokine interleukin-10. *Pediatr Allergy Immunol*, 2004. 15(3): p. 242-6.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Margitta Worm für die Ermöglichung dieser Promotion unter besten Bedingungen, der Überlassung des interessanten Themas, ihre konstruktive Kritik und ihre Geduld.

Meinem Betreuer Dr. med. Guido Heine möchte ich meinen herzlichsten Dank für die unermüdliche Unterstützung von Beginn an und die stets spannende fachliche Auseinandersetzung aussprechen. Ich habe die freundschaftliche und angenehme Atmosphäre unserer Zusammenarbeit sehr genossen.

Der ganzen AG Worm danke ich für ihre Unterstützung sowie für die vielen vergnüglichen gemeinsamen Stunden im Labor.

Der Charité - Universitätsmedizin Berlin danke ich für die Förderung meines Forschungsvorhabens durch die Gewährung des Promotionsstipendiums.

Bei Dr. Helmut Orawa und Ramona Scheufele aus dem Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie, Charité Campus Mitte, bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Datenauswertung.

Nadine Unterwalder, Institut für Medizinische Immunologie, Charité Campus Virchow-Klinikum, danke ich für die Durchführung der Zytokinuntersuchungen.

Dr. rer. nat. Christian Müller, Zentrallabor, Charité Campus Virchow Klinikum, danke ich für das Überlassen der Vitamin D-Daten der Klinikpatienten.

Den Mitarbeitern des Zentralinstituts für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Charité Campus Benjamin Franklin, danke ich für die Durchführung der IgG-Untersuchungen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich natürlich auch bei allen Probanden und Patienten, ohne deren Mithilfe diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Meinen lieben Freunden B.M., W.K., M.N., D.G., H.S. und A.L. danke ich für den unermüdlichen Ansporn und die kritischen Korrekturen.

Mein größter Dank gilt meiner ganzen Familie, insbesondere meinen Eltern, die immer an mich geglaubt und mich unterstützt haben.

Lebenslauf

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

Publikationsliste

- 1) Heine, G., Lahl, A., Muller, C., Worm, M. (2010). Vitamin D deficiency in patients with cutaneous lupus erythematosus is prevalent throughout the year. *Br J Dermatol*, 2010. 163(4): p. 863-865.
- 2) Heine, G., Drozdenko, G., Lahl, A., Unterwalder, N., Mei, H., Volk, H-D., Dörner, T., Radbruch, A., Worm, M. (2011). Efficient tetanus toxoid immunization on vitamin D supplementation. *Eur J Clin Nutr*, 2011. 65 (3): p. 329-334.

Erklärung an Eides Statt

Erklärung

„Ich, Annika Olivia Regina Lahl, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss des Vitamin D auf die spezifische humorale Immunantwort“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift