

Vitamin D-Rezeptor-vermittelte Wirkungen auf den Phänotyp und die Funktionalität von B- und T- Zellen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Gennadiy Drozdenko

aus Luhansk

Oktober 2013

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum zwischen 2007-2013 unter Leitung

von Frau Prof. Dr. med. M. Worm

an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie,

Charité Berlin, angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Worm

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Kolodziej

Disputation am 15.01.2014

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Frau Prof. Margitta Worm bedanken, für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe an der Charité anzufertigen und die kontinuierliche Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Carsten Niemitz für die Bereitschaft meine Arbeit zu betreuen.

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Herbert Kolodziej für die Betreuung in den letzten Phasen meiner Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Guido Heine für die Einführung in die spannende Welt von Vitamin D, zahlreiche wissenschaftliche Diskussionen, die Unterstützung bei Datenanalyse und Anfertigung der Publikationen.

Ein ganz besonderer Dank an Frau Dr. Magda Babina für Ihre zahlreichen Anregungen und Diskussionsbereitschaft.

Ich bedanke mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Ria Baumgrass, im speziellen Tobias Scheel und Timo Lischke, für die technische Unterstützung und wissenschaftliche Diskussionen.

Ein herzlicher Dank geht an Dennis Ernst, sowohl für seine technische Unterstützung als für seine humorvolle Art den Arbeitsalltag zu gestalten.

Besonderer Dank gilt den Mitgliedern der AG. Worm und meinen Arbeitskollegen, vor allem Dr. Christin Weise, Juliane Lindner, Maria Nassiri, Friederike Thiele, Kiran Kumar, Vandana Kumari, Milena Milovanovic, Sven Guhl, Mandana Abdollahnia die mich durch die Höhen und Tiefen des Laboralltags begleitet haben.

Schließlich, möchte ich mich bei meinen Eltern für die Geduld und Unterstützung während dieser langen Zeit bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1. Vitamin D ₃ Physiologie	4
1.2. Vitamin D-Rezeptor Aufbau und Funktion.....	5
1.3. Vitamin D ₃ Funktion in Lymphozyten	7
1.4. T-Zell-abhängige B-Zell-Aktivierung im Kontext allergischer Reaktionen	10
1.5. B-Zell-abhängige T-Zell-Aktivierung.....	12
1.6. Bedeutung von Vitamin D ₃ bei atopischen Erkrankungen.....	15
1.7. Vitamin D ₃ und Autoimmunerkrankungen	17
2. Ziele der Arbeit	20
3. Material und Methoden.....	21
3.1. Material.....	21
3.1.1. Antikörper	21
3.1.2. Chemikalien	22
3.1.3. Puffer und Lösungen	24
3.1.4. Labormaterialien	26
3.1.5. Laborgeräte.....	26
3.1.6. Software	27
3.2. Methoden	28
3.2.1. Probanden Kohorten.....	28
3.2.1.1. Vitamin D ₃ -Dosis-Eskalationsstudie	28
3.2.1.2. Vitamin D ₃ und Tetanus-Immunsierung.....	28
3.2.1.3. Vitamin D ₃ und Gräserpollen-spezifische Immuntherapie	29
3.2.2. Prinzip der Durchflusszytometrie	29
3.2.3. Lymphozyten Oberflächenfärbung.....	30
3.2.4. Vollblutproben zur Charakterisierung B- und T-Zellen ex vivo	30
3.2.5. Intrazelluläre Färbung und Analyse der Zytokin-Produktion in T-Lymphozyten	31
3.2.6. Etablierung einer FACS™-Färbung zum Nachweis von Gräserpollen-spezifischen T-Zellen	31
3.2.7. Etablierung einer FACS™-Färbung zum Nachweis von Gräserpollen-spezifischen B-Zellen	33
3.2.8. Transkriptionsfaktoren-Zytokin Färbung	35

3.2.9. Prinzip des Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA).....	35
3.2.10. Human-Immunglobulin-ELISA	35
3.2.11. T- und B-Lymphozyten Separation	36
3.2.12. B-Zell-Aktivierung	37
3.2.13. Bestimmung der Vitamin D-Rezeptor-abhängigen CD38-Expression auf B-Zellen.....	37
3.2.14. Blockierung der Vitamin D-Rezeptor-abhängigen CD38-Expression mit dem Antagonisten ZK159222	37
3.2.15. 5 (6)-Carboxyfluoresceindiacetat N-Succinimidylester (CFSE) Färbung	38
3.2.16. T-Zell – B-Zell Kokultur	38
3.2.17. Restimulation der T-Zell – B-Zell Kokultur.....	40
3.2.18. RNA-Isolierung aus kultivierten B-Zellen	40
3.2.19. cDNA-Synthese.....	40
3.2.20. Quantitative RT-PCR (qPCR)	41
3.2.21. Statistische Auswertung	42
4. Ergebnisse	44
4.1. Schwellenwert für die Modulation der B- und T-Lymphozyten.....	44
4.1.1. Anstieg der Serum 25(OH) Vitamin D ₃ -Spiegel nach der oralen Vitamin D ₃ -Einnahme	44
4.1.2. Anstieg in Frequenzen der CD38 ⁺ peripheren B-Lymphozyten während oraler Vitamin D ₃ -Einnahme	45
4.1.3. 25(OH) Vitamin D ₃ -abhängige Induktion der CD38-Expression auf peripheren B-Zellen <i>in vitro</i>	47
4.1.4. <i>In vitro</i> -Hemmung der Vitamin D ₃ -abhängigen CD38-Expression auf B-Zellen mit dem VDR-Antagonisten ZK159222	48
4.1.5. Analyse der humoralen Immunantwort nach Vitamin D ₃ -Supplementierung	50
4.1.6. Bestimmung eines Serum 25(OH) Vitamin D ₃ -Schwellenwertes für die B-Lymphozyten Modulation	51
4.1.7. Verminderte Frequenzen der zirkulierenden IFN- γ ⁺ - und IL-17 ⁺ T- Helfer-Zellen nach Vitamin D ₃ -Einnahme.....	53
4.1.8. Serum 25(OH) Vitamin D ₃ -Konzentrationen für die Modulation von T-Zellen	55
4.2. Vitamin D₃ im klinischen Einsatz	57
4.2.1 Vitamin D ₃ -Einnahme erhöht die Effizienz der Antigen-spezifischen Vakzinierung	57
4.2.2. Effekte der Vitamin D ₃ -Einnahme auf Lymphozyten während der Allergen-spezifischen Immuntherapie	59
4.3. Verminderte T-Zell-Aktivierung in Gegenwart von Calcitriol-behandelten B-Zellen	63
4.3.1. Verminderte Proliferation der naiven T-Zellen in Gegenwart von Calcitriol-behandelten naiven B-Zellen.....	63
4.3.2. Zytokin-Produktion von T-Zellen nach Kokultur mit Calcitriol-behandelten B-Zellen.....	65
4.3.3. Calcitriol moduliert die kostimulatorische Kapazität der B-Zellen	69
4.3.4. Zugabe von anti-CD28 Antikörper zu der T-B-Zell Kokultur hebt die verminderte T-Zell-Aktivierung auf.....	71

5. Diskussion	74
5.1. Serum 25(OH) Vitamin D ₃ Schwellenwert-Konzentration für die Modulation der B- und T-Lymphozyten	74
5.2. Vitamin D ₃ im klinischen Einsatz	78
5.3. Verminderte T-Zell-Aktivierung in Gegenwart von Calcitriol-behandelten B-Zellen	81
6. Zusammenfassung	86
Abstract	88
7. Literaturverzeichnis.....	90
8. Publikationsliste	109
9. Liste der Abkürzungen.....	110

1. Einleitung

1.1. Vitamin D₃ Physiologie

Vitamin D₃ kann sowohl mit der Nahrung aufgenommen, als auch in der Haut durch UVB-Strahlung (UV-B) synthetisiert werden [1]. Im ersten Schritt wird das Cholesterin-Abbauprodukt 7-Dehydrocholesterol (7-DHC), in den tiefen Schichten der Epidermis, Stratum spinosum und basale, durch Sonnenlicht (UV-B 290-320 nm) durch eine photolytische Reaktion zur Prä-Vitamin D₃ konvertiert (Abbildung 1) [2]. Dieses Zwischenprodukt isomerisiert dann spontan in einem nicht-enzymatischen Prozess zum secosteroid Vitamin D₃ (Cholecalciferol). Die Synthese von Vitamin D₃ in der Haut ist weitgehend von der Wellenlänge und Dosis der UVB-Strahlung abhängig [3]. Neben der Dauer der UV-Belichtung, der Fläche der exponierten Haut und der Hautpigmentierung können auch die Konzentration von 7-DHC oder das Alter des Menschen zur Vitamin D₃-Synthese in der Haut beitragen [4-7].

In der Haut synthetisiertes oder mit der Nahrung aufgenommenes Vitamin D₃ ist inaktiv. Es wird im Plasma an das Vitamin D-bindende-Protein (DBP) gebunden [8] und über die Blutbahn zur Leber transportiert. Dort erfolgt erstmals eine Hydroxylierung in der C-25-Position durch 25-Hydroxylasen (CYP27A1, CYP2R1) (Abbildung 1) [9]. 25-Hydroxyvitamin D₃ (25(OH) Vitamin D₃) ist der wichtigste zirkulierende Metabolit von Vitamin D₃ im Blutplasma [10]. 25(OH) Vitamin D₃-Serumspiegel zwischen 30 ng/ml (75 nmol/L) und 60 ng/ml (150 nmol/L) [11-13] werden als normwertig angesehen, wohingegen Serumkonzentration von weniger als 20 ng/ml (50 nmol/L) als Vitamin D₃-Mangel betrachtet [11, 12]. Ab einer 25(OH) Vitamin D₃ Serumkonzentration von 160 ng/ml (400 nmol/L) können Hyperkalzämie, Hypercalciurie sowie Hyperphosphatämie auftreten [14, 15]. In einem weiteren Schritt wird 25(OH) Vitamin D₃ in den proximalen Nierentubuli über eine zweite Hydroxylierung in der C-1-Position durch die 1 α -Hydroxylase (CYP27B1) in den biologisch-aktiven Metaboliten 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol) umgewandelt (Abbildung 1) [16]. Die Konzentration des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ im Blut wird durch einen Rückkopplungsmechanismus geregelt: Calcitriol induziert das Enzym 24-Hydroxylase (CYP24A1), das sowohl 25(OH) Vitamin D₃ als auch Calcitriol katabolisiert [17, 18]. Die Synthese der bioaktiven Form 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ aus 25(OH) Vitamin D₃ ist nicht ausschließlich auf die Zellen der Nierentubuli beschränkt. Auch die aktivierten Zellen des

1. Einleitung

Immunsystems, wie B- [19, 20] und T-Zellen [21], exprimieren das Enzym CYP27B1, was sie ebenfalls zu einer autokrinen Calcitriol-Produktion befähigt.

Eine Anzahl von Zellen, einschließlich Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und epidermalen Keratinozyten exprimieren sowohl CYP27A1 als auch CYP27B1 und können somit Calcitriol direkt aus Vitamin D₃ produzieren [22-24].

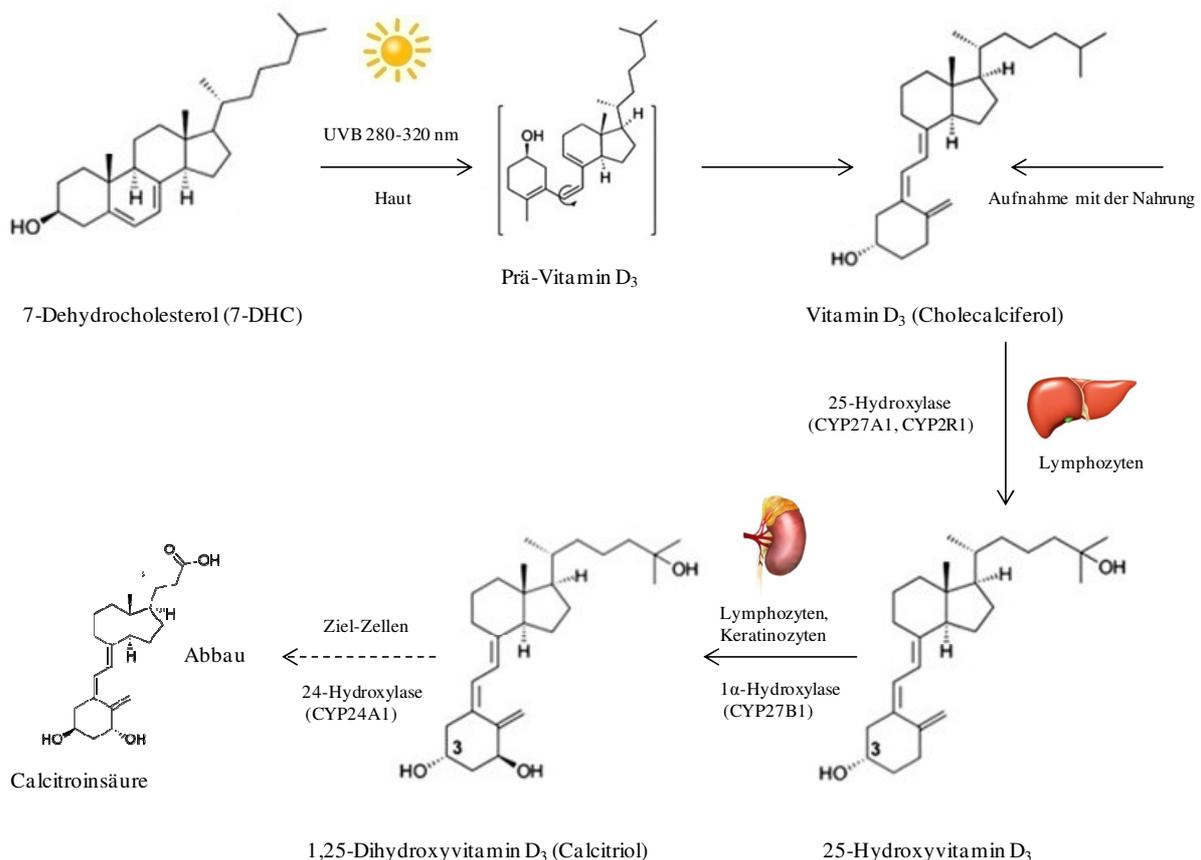


Abbildung 1. Vitamin D₃ Stoffwechsel. Vitamin D₃ wird in der Haut durch die photolytische Spaltung von 7-Dehydrocholesterol (7-DHC) nach der Absorption der UVB-Strahlung synthetisiert. Vitamin D₃, gebunden an das Vitamin D-bindende-Protein (DBP), wird zur Leber transportiert, wo es zur Hauptspeicherform 25-Hydroxyvitamin D₃ (25(OH) Vitamin D₃) durch 25-Hydroxylasen (CYP27A1, CYP2R1) umgewandelt wird. Der letzte Aktivierungsschritt findet, in erster Linie, aber nicht ausschließlich, in der Niere durch die 1α-Hydroxylierung zur biologisch aktiven Form 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol) statt. Die Inaktivierung erfolgt über eine Reihe von Oxidationsstufen, katalysiert durch das Enzym 24-Hydroxylase (CYP24A1). Adaptiert nach Rosen et al. [25] und Dusso et al [26].

1.2. Vitamin D-Rezeptor Aufbau und Funktion

Die Wirkungen der biologisch-aktiven Form von Vitamin D₃, Calcitriol, werden über die Bindung an den Vitamin D-Rezeptor (VDR) vermittelt. Der VDR gehört zur Familie der

1. Einleitung

nukleären Hormon Rezeptor-Proteine und fungiert als Ligand-aktivierter Transkriptionsfaktor [16]. Ein Überblick über die Struktur des humanen VDRs ist in Abbildung 2 dargestellt. VDR besteht aus 427 Aminosäuren und ist in zwei große funktionelle Einheiten unterteilt: eine N-terminale Zinkfinger-DNA-Bindungsdomäne (DBD) und die C-terminale Ligandenbindungsdomäne (LBD). Die DBD besteht aus zwei Zinkfinger-DNA Bindungsmotiven, welche für die hochaffine Bindung an die spezifischen DNA-Sequenzen in Promotorregionen der Vitamin D-responsiven-Elemente (VDREs) verantwortlich sind [27, 28]. Das proximale (N-terminale) Zinkfinger-Bindungsmotiv verleiht Spezifität für die DNA-Bindung an VDREs, wohingegen das zweite Zinkfinger-Bindungsmotiv und die Region daneben, die sogenannte T-Box, eine Schnittstelle für die Dimerisierung von VDR und Retinoid-X-Rezeptor (RXR) darstellen. Calcitriol stabilisiert die VDR-RXR-Heterodimere und fördert ihre Bindung an die Vitamin D-responsiven-Elemente [29, 30].

Die Ligandenbindungsdomäne (LBD) besteht aus 12 α -Helixes und befindet sich in dem COOH-terminalen Abschnitt des VDR-Moleküls. Die LBD ist für die hochaffine Bindung von Calcitriol verantwortlich und vermittelt die Homo- und Heterodimerisierung [31]. Am C-terminalen Ende befindet sich die Aktivierungsdomäne AF-2, die die Rekrutierung von VDR-interagierenden Proteinen, einschließlich Komponenten der Transkriptionsstart-Komplexes, RNA-Polymerase II, und nukleären Transkriptionskoaktivatoren ermöglicht. AF-2 ist außerdem für die Förderung von Chromatin-Remodeling und Gen-Transkription verantwortlich [31].

Für die transkriptionelle Aktivität des VDRs ist die Bindung von transkriptionellen Kofaktoren essentiell. Die positiven VDREs fördern die Bindung von Koaktivator-Komplexen wie der Steroid-Rezeptor-Koaktivator (SRC-1) oder dem Nucleären-Koaktivator (NcoA-62) an VDR-RXR-Heterodimere [32, 33]. SRC-1 besitzt Histonacetyltransferaseaktivität, so dass die Rekrutierung von Koaktivatoren in einer Histonacetylierung und darauf folgender DNA Transkription resultiert [25, 31]. Im Gegensatz dazu, binden die negativen VDREs (nVDREs) an VDR-RXR-Heterodimere oder VDR-Homodimere und vermitteln die Repression der Transkription durch die Rekrutierung vom Nucleär-Rezeptor-Korepressor (NCoR), Silencing-Mediator-for-Retinoid-and-Thyroid-hormone-receptors (SMRT) und Histondeacetylasen (HDAC) [34].

Neben der Vermittlung der transkriptionellen Regulation über die VDR-Aktivierung, gibt es aber auch nicht-genomische Calcitriol Effekte. Zu diesen Effekten, gehören beispielsweise Änderungen im Phospholipidmetabolismus, im zytosolischen Kalziumspiegel, dem cyclisches Guanosinmonophosphat- (cGMP) Spiegel oder MAP-Kinasen. Als ein potentieller Membran-

1. Einleitung

Rezeptor für Calcitriol-Membran-assoziierte schnelle Reaktionen wird das Steroid-bindende-Protein (1,25 D-MARRSBP) vermutet [25]. Die Entdeckung von Vitamin D-Rezeptoren in vielen Subpopulationen der Immunzellen einschließlich Monozyten, Makrophagen [35], dendritischen Zellen [36], natürlichen Killerzellen [37] und aktivierten T- und B-Lymphozyten [19, 38-40] erklärt die mehrfachen immunmodulatorischen Effekte auf die angeborenen und erworbenen Immunantworten.

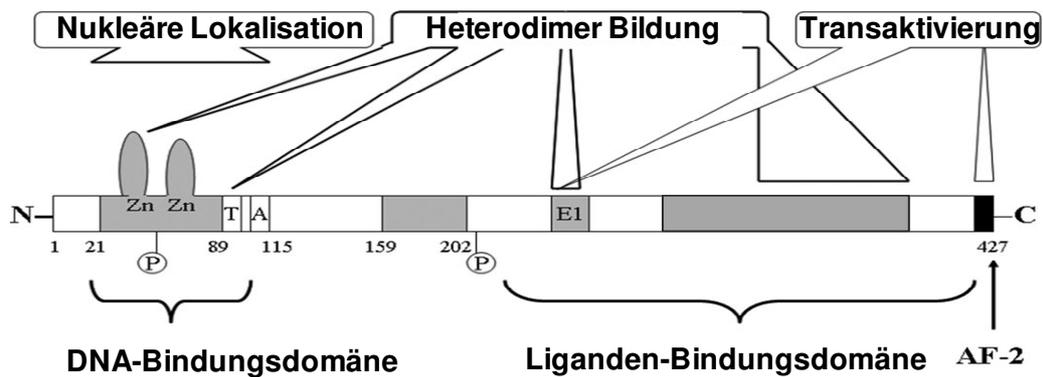


Abbildung 2. Struktur und funktionelle Domänen des menschlichen Vitamin D-Rezeptors (VDR). Adaptiert nach Dusso et al. [26].

1.3. Vitamin D₃ Funktion in Lymphozyten

Neben der klassischen Rolle des Vitamin D₃-endokrinen Systems als eine wesentliche Komponente des Nieren-, Nebenschilddrüsen-, Darm- Kalzium-, Knochen- und Mineralstoffwechsels, werden auch nicht-klassische Funktionen von Vitamin D₃ diskutiert. So wird ein Zusammenhang zwischen Vitamin D₃-Mangel und einer erhöhten Prävalenz von immunologischen Störungen ferner malignen sowie Stoffwechsel- und Herz-Kreislauf-Erkrankungen diskutiert [25, 41, 42].

Die VDR-Aktivierung durch seinen natürlichen Liganden Calcitriol induziert bei Monozyten und Makrophagen antimikrobielle Proteine, wie Cathelicidin (LL-37) [43] oder β -Defensin (DEFB4) [44] (Abbildung 3). Die Induktion des β -Defensins ist NF- κ B und IL-1 β abhängig

1. Einleitung

[45]. Calcitriol hemmt die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-6 und IL-12 in Monozyten [46, 47] (Abbildung 3).

Dendritische Zellen induzieren T-Zell-vermittelte Immunantworten. Je nach Reifungs- und Aktivierungszustand befinden sich zahlreiche MHC-Klasse-II sowie T-Zell kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 auf ihrer Oberfläche [48]. Calcitriol induziert dendritische Zellen mit einem tolerogenen Phänotyp. Sie sind charakterisiert durch eine verminderte Expression von MHC-Klasse-II, T-Zell kostimulatorischen Molekülen CD40, CD80, CD86, geringerer IL-12- aber verstärkter IL-10-Sekretion [49-51] (Abbildung 3). Darüber hinaus moduliert bioaktives Vitamin D₃ die Funktion des adaptiven Immunsystems. Calcitriol beeinflusst die TCR-abhängige Aktivierung [52] und Differenzierung [53, 54] naiver T-Zellen, hemmt die T-Zell-Proliferation [55], vermittelt eine negative Regulation der *IFN* [56], *IL2* [57, 58] und *IL17* [59] Promotoraktivität und fördert, sowohl direkt als auch indirekt, die Entstehung von regulatorischen CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen [60-63]. Die T-Zell-Aktivierung, Differenzierung und Zytokin-Produktion sind von mehreren Transkriptionsfaktoren, einschließlich Calcineurin-abhängigen Kernfaktor der aktivierten T-Zellen (NFAT) abhängig [64]. Transkriptionsfaktoren aus der NFAT-Familie sind unter anderem an der Regulation von CD154- (CD40L) [65] sowie der IL-2- [66], IL-4- [67, 68] und IL-17- [69] Expression in T-Zellen beteiligt. Es wurde gezeigt, dass die VDR-RXR-Heterodimere durch die Bindung an die Promotorelemente, die Transkription der NFAT-abhängigen IL-2- und IL-17-Gene hemmen kann [58, 59]. Widersprüchliche Aussagen gibt es bezüglich der Auswirkungen der VDR-Aktivierung auf IL-4-, IL-5- produzierenden T-Helfer-Typ 2 (Th2) Zellen. Während einige Studien eine Induktion der Th2-spezifischen Zytokine sowie des Transkriptionsfaktors GATA3 [53, 70] beschreiben, berichten andere über eine Hemmung der Differenzierung zu IL-4-produzierenden T-Zellen [54, 71, 72]. Neben inhibitorischen Effekten auf T-Zellen hat Calcitriol verschiedene Wirkungen auf B-Zellen: Es verringert sowohl die B-Zell-Proliferation als auch die Plasmazelldifferenzierung [19] (Abbildung 3). Zusätzlich hemmt Calcitriol die IgE-Immunglobulinklassen-Rekombination und -Sekretion [73, 74], wobei die Wirkung, zumindest teilweise, durch eine verminderte Nuclear-Factor-kappaB (NF- κ B)-Aktivierung [40] und Hemmung der epsilon-Keimbahntranskripte (ϵ GLT) vermittelt wird [75]. Neben den inhibitorischen Wirkungen, resultiert die Aktivierung des VDRs in einer Verstärkung der IL-10-Produktion, CCR10-Expression und CD38-Expression in B- und T-Lymphozyten [19-21, 76-79]. CD38 ist ein multifunktionelles Protein, welches sowohl enzymatische- als auch Rezeptor-Funktionen haben kann [80]. Als Enzym katalysiert CD38 die Umwandlung von

1. Einleitung

Nikotinamidadenindinukleotid (NAD) und Nikotinamidadenindinukleotid-2`-phosphat (NADP) zu mehreren Metaboliten einschließlich der zyklischen Adenosindiphosphatribose (cADPR) und Nikotinsäureadenindinukleotid-2`-phosphat (NAADP). Die obengenannten Metaboliten mobilisieren Kalziumionen aus intrazellulären Speichern [81, 82]. Als Rezeptor interagiert CD38 mit seinem Ligand CD31. CD38/CD31 Wechselwirkungen können sowohl im Rahmen der Lymphozyten-Adhäsion eine Rolle spielen, als auch bei der Aktivierung. Es wird vermutet, dass die CD38/CD31 Ligation zu Zellkern-Translokation von NF-kB führt [83].

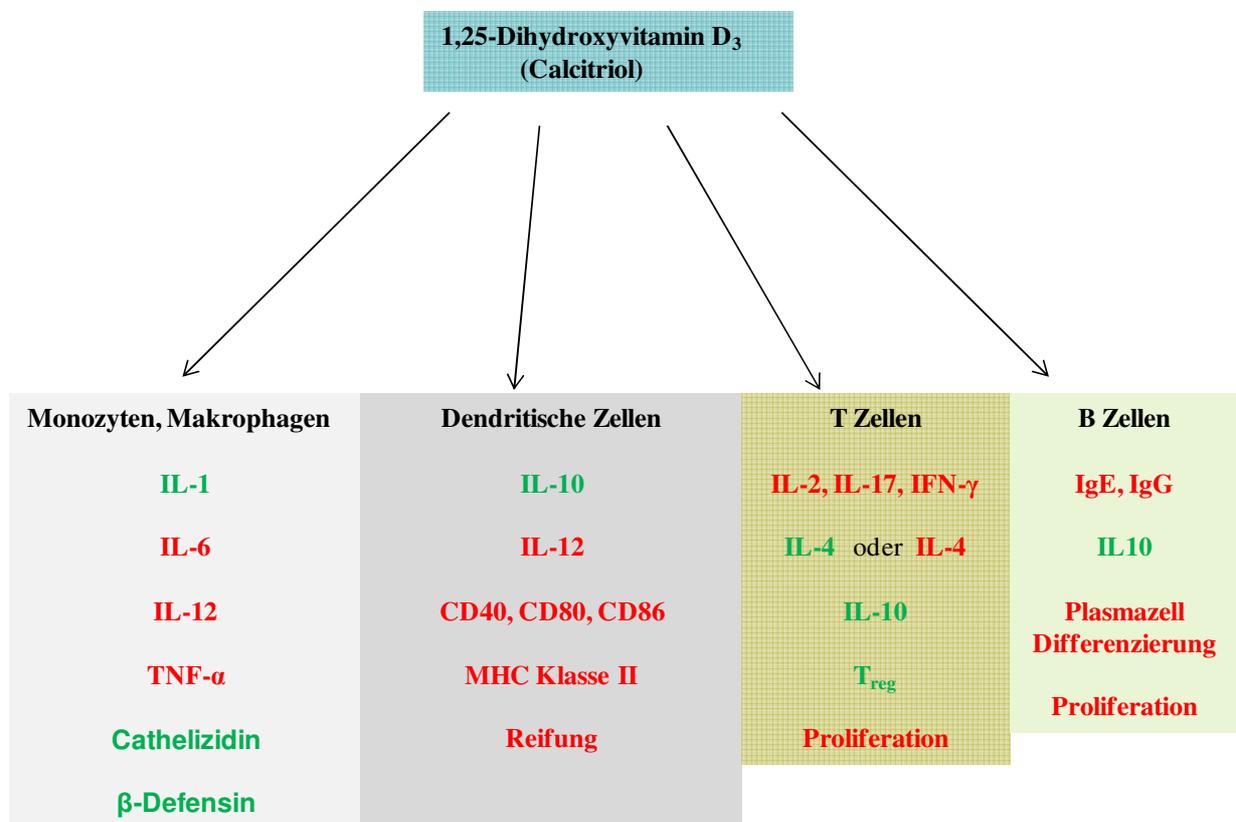


Abbildung 3. Calcitriol Wirkung auf die Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems.

Adaptiert nach *Mora et al.* [84] und *Adorini et al.* [85]. Rot – Hemmung; Grün – Induktion.

1. Einleitung

1.4. T-Zell-abhängige B-Zell-Aktivierung im Kontext allergischer Reaktionen

Der Begriff Allergie wurde erstmals 1906 vom Wiener Kinderarzt Clemens von Pirquet eingeführt und bezeichnet, aus heutiger Sicht, eine spezifische Reaktion des Immunsystems auf eigentlich harmlose Stoffe aus unserer Umwelt, die dann Allergene genannt werden [86, 87]. Allergische- oder Überempfindlichkeitsreaktionen wurden nach ihren pathophysiologischen Mechanismen in vier unterschiedliche Typen eingeteilt. Dabei wird zwischen den IgE-assoziierten Überempfindlichkeitsreaktionen (Typ I), den IgG- und IgM-vermittelten zytotoxischen Reaktionen (Typ II), den Immunkomplexreaktionen (Typ III), sowie der T-Zell-vermittelten Spättypreaktion (Typ IV) unterschieden, Coombs und Gell [88].

Zur IgE-assoziierten Typ I-Überempfindlichkeitsreaktion gehören die Erkrankungen des atopischen Formenkreises, wie Heuschnupfen (allergische Rhinitis, Rhinokojunktivitis), atopische Dermatitis, atopisches Ekzem oder allergisches Asthma bronchiale [89, 90].

Die allergische Immunantwort ist ein komplexer Prozess beginnend mit einer Polarisierung der T-Lymphozytenantwort. Antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen, Langerhanszellen (LC), dendritische Zellen und Basophile internalisieren die Allergenmoleküle und wandern in die Lymphknoten, wo sie die Differenzierung und die klonale Expansion der Th2- aus naiven CD4⁺- (Th0) Zellen unter dem Einfluss der verschiedenen Zytokine, wie Thymusstroma Lymphopoietin (TSLP), IL-4, IL-25 und IL-13 induzieren [91]. Das immunpathologische Markenzeichen der allergischen Erkrankungen ist die Infiltration des betroffenen Gewebes durch die Zellen mit einem T-Helfer- Typ 2- (Th2) Zytokinprofil (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13). Typ 2-Zytokine sind nicht nur an der Entwicklung allergischer Reaktionen beteiligt, sondern spielen auch eine entscheidende Rolle bei der Abwehr gegen große extrazelluläre Pathogene wie beispielsweise Helminthen [91].

Die wichtigsten Mediatoren der IgE-Produktion in B-Zellen sind IL-4 und IL-13. Diese Zytokine führen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription 6). Die STAT6-Homodimere binden nach einer erfolgten Kern-Translokation an die spezifischen DNA-Sequenzen in der epsilon-Keimbahntranskript-Promotorregion. Das zweite notwendige Signal zum IgE-Klassenwechsel erhalten die B-Zellen nach der CD40-abhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (Abbildung 4). Beide Faktoren wirken synergistisch bei der Induktion der epsilon-Keimbahntranskripte und vermitteln die Induktion der IgE-Synthese [92]. CD40 auf B-Zell-Oberfläche interagiert mit CD40L (CD154) auf

1. Einleitung

aktivierten T-Zellen. CD40-CD40L Interaktion ist ein wesentliches Signal für die B-Zell-Proliferation, Expression der Aktivierungsmarker wie CD80 und CD86, Immunglobulinproduktion sowie Bildung von Keimzentren in den lymphatischen Organen [93].

Das von Plasmazellen gebildete IgE (Serum Spiegel 30 I.U./ml-700 I.U./ml) bindet an FcεRI (hochaffiner Rezeptor für IgE, Affinität für IgE 10^{10} mol/L⁻¹) auf der Zelloberfläche von Mastzellen, die in unterschiedlichen Zahlen in praktisch allen Organen und Geweben vorkommen. Der FcεRI wird außerdem auf der Oberfläche von basophilen- und aktivierten eosinophilen Blutzellen exprimiert [94, 95].

Die Reaktion vom Soforttyp oder eine Typ I-Hypersensitivitätsreaktion wird immer dann ausgelöst, wenn Allergene die rezeptorgebundenen IgE-Rezeptor-Antikörper Komplexe vernetzen, was die Freisetzung von gespeicherten Entzündungsmediatoren, einschließlich Zytokinen, Chemokinen, Histamin und zahlreichen Proteasen zur Folge hat. Eine solche Reaktion kann lokal auftreten (zum Beispiel als Urtikaria, Rhinokonjunktivitis oder allergisches Asthma bronchiale) oder systemisch (Anaphylaxie) innerhalb weniger Minuten nach Allergen-Exposition. Die Freisetzung der Botenstoffe führt zu Vasodilatation, erhöhter Gefäßwand-Permeabilität und akuter funktionaler Veränderungen in den betroffenen Organen. Diese Ereignisse fördern die lokale Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten, ein Merkmal für die Spätphasenreaktion, welche sich normalerweise mehrere Stunden nach der Allergen-Exposition entwickelt. Allergische Erkrankungen sind multifaktoriell und bestehen aus einem komplexen Zusammenspiel von zahlreichen genetischen, epigenetischen und umweltbedingten Einflüssen [96].

Die Allergen-spezifische Immuntherapie, auch als Hyposensibilisierung oder "Allergie-Impfung" bezeichnet, stellt zurzeit die einzige kausale Behandlungsmethode der IgE-vermittelten Hypersensibilitätsreaktionen dar. Die genauen Wirkmechanismen der spezifischen Immuntherapie sind bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Entstehung der allergischen Erkrankungen ist mit der Produktion von IgE und Th2-Zytokinen verbunden. Vitamin D₃ kann sowohl die IgE- als auch die Th2-Zytokin-Produktion hemmen [54, 74]. Zusätzlich kann Vitamin D₃ die Entstehung der regulatorischen T-Helfer-Zellen fördern [61] und dadurch die Wirkung der SIT möglicherweise unterstützen.

1. Einleitung

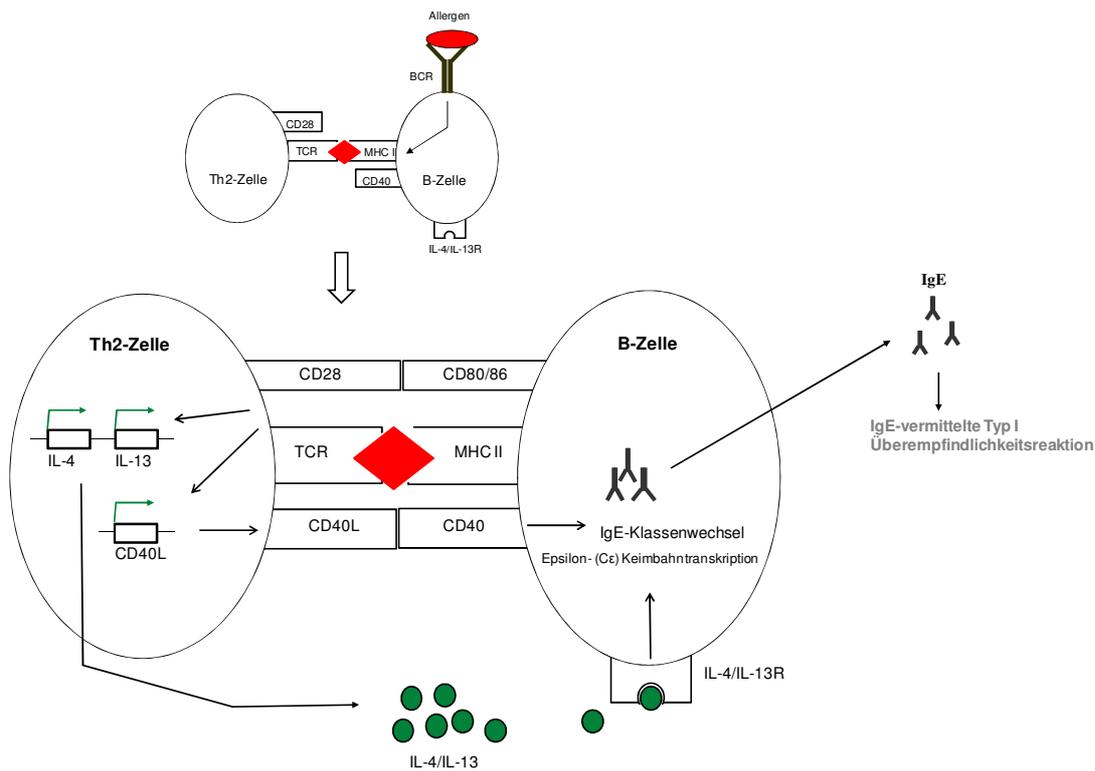


Abbildung 4. Induktion der IgE-Produktion in B-Zellen.

Allergen-spezifische B-Zellen, aktiviert durch die Bindung eines Allergens an den B-Zell-Rezeptor (BCR), präsentieren MHC Klasse II (MHC II)-gebundene Allergen-Peptide zu spezifischen T-Helfer-Typ 2 (Th2) Zellen. Das von den Th2-Zellen freigesetzte IL-4 und IL-13 bewirken die STAT6-abhängige epsilon-Keimbahntranskript (Cε)- Promotor-Transaktivierung. Die Ligation von CD40 auf B-Zellen mit CD40L auf T-Zellen stellt das zweite notwendige Signal für den IgE-Klassenwechsel bereit. Die B-Zellen differenzieren nach dem Klassenwechsel anschließend weiter zu IgE-sezernierenden Plasmazellen. Adaptiert nach *Yanagihara et al.* [97].

1.5. B-Zell-abhängige T-Zell-Aktivierung

B-Lymphozyten spielen eine wichtige Rolle nicht nur bei der Aufrechterhaltung der humoralen Gedächtnis-Funktion oder als Vorläufer der Antikörper-produzierenden Plasmazellen, sondern sind als Antigen-präsentierende Zellen an der T-Zell-Aktivierung, Differenzierung, und der Expansion beteiligt [98, 99]. Naive B-Lymphozyten zirkulieren durch die Blutbahn und wandern in die Lymphknoten ein, wo sie auf ihr B-Zell-Rezeptor-spezifisches Antigen treffen. Am Rande des lymphatischen Follikels und der parakortikalen T-Zell-Zone können sie mit T-Lymphozyten, welche die gleiche T-Zell-Rezeptor-Spezifität aufweisen, in Kontakt treten [100, 101].

Der B-Zell-Rezeptor-Komplex besteht aus einem membran-ständigen Immunglobulin (Ig), welches aus jeweils zwei, über Disulfidbrücken-verbundenen, schweren und zwei leichten

1. Einleitung

Ketten zusammengesetzt ist und einem Heterodimer von Ig α - und Ig β -Proteinen, welche für die Signaltransduktion verantwortlich sind [102].

B Zellen können die extrazellulären Antigene entweder über einen Rezeptor-abhängigen Mechanismus, wie der B-Zell-Rezeptor-vermittelte Endozytose oder einem Rezeptor-unabhängigen Mechanismus, wie der Flüssigphase-Endozytose (Pinozytose) aufnehmen [103]. Die internalisierten Proteine werden prozessiert und als Peptide, gebunden an MHC-Klasse-II Moleküle, auf der Oberfläche der B-Lymphozyten präsentiert. Obwohl die beiden Mechanismen die ausreichende Anzahl der Peptid-MHC-Klasse-II-Komplexe für die T-Zell-Aktivierung generieren können [103], ist die BCR-vermittelte Präsentation von Antigen wesentlich effizienter (ca. 10^3 - 10^4 -fach) als die Präsentation nach einer Rezeptor-unspezifischen Antigen-Aufnahme [104] [105]. In einem Mausmodell wurde gezeigt, dass die Antigen-spezifischen B-Zellen bereits zu einem frühen Zeitpunkt nach der Immunisierung Antigene empfangen und diese dann T-Zellen in den Lymphknoten präsentieren können [106]. Die Antigen-Bindung an den BCR induziert nicht nur die Aufnahme und Prozessierung des Antigens, sondern führt auch zur Aktivierung und Proliferation der B-Zelle. Die aktivierten B-Zellen regulieren die Expression der CD86 (B7-2) hoch und liefern die kostimulatorischen Signale, die notwendig sind für die Aktivierung der T-Zellen [107]. Außerdem können die stimulierten B-Zellen sowohl die pro-inflammatorischen Zytokine wie IFN- γ , TNF- α und IL-12 [108] als auch die anti-inflammatorischen, inklusive TGF- β und IL-10 sezernieren und dadurch die T-Zell-Funktion entscheidend beeinflussen [109].

Die kostimulatorischen Moleküle lassen sich auf der Basis ihrer Struktur-Homologien bzw. ihrer Zugehörigkeit zu den Gen-Familien in zwei Gruppen unterteilen. Die am besten untersuchten Mitglieder der Ig-Familie umfassen die CD28/B7 und die zytotoxisch T-Lymphozyten-Antigen-4- (CTLA-4) Moleküle. Die CD28- und CTLA-4-Moleküle auf der T-Zell-Oberfläche binden an ihre Liganden CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) auf der Oberfläche der Antigen-präsentierenden Zellen [110] (Abbildung 5). Die Interaktion zwischen CD28 und B7-1/-2 fördert die Aktivierung, Differenzierung und Zytokin-Produktion und die Effektor-Funktionen der T-Zellen, wohingegen die CTLA-4/B7-Bindung eine hemmende Wirkung auf die T-Zell-Funktionen ausübt [111]. Zu der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptor (TNFR)-Familie, gehören CD40L (CD154) sowie die Mitglieder der TNFR-Superfamilie wie TNFR-Superfamilie-Mitglied-4 (OX40) und CD40. Die Interaktionen zwischen CD40 und CD40L sowie OX40 und OX40L vermitteln eine positive kostimulatorische Funktion, welche sich unter anderem in der Förderung der Zytokin-Produktion, Zellteilung, Überleben und der klonalen Expansion von Effektor- und Gedächtnis-Populationen äußert [111, 112]. Zu den

1. Einleitung

beiden obengenannten Familien gehören eine Reihe weiterer kostimulatorischen Moleküle wie ICOS (inducible costimulator), PD-1 (programmed death 1) oder GITR (glucocorticoid-induced-tumor necrosis factor receptor) und CD137 (4-1BB), die eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantworten spielen [113].

Die Antigen-präsentierende Funktion der B-Zellen ist nicht nur vom BCR-Signal abhängig. Auch die Interaktion zwischen CD40 und CD40L auf den aktivierten T-Zellen spielt dabei eine entscheidende Rolle. Das CD40-CD40L- (CD154) Signal verstärkt die MHC-Klasse-II-Expression, stabilisiert CD86- und induziert die CD80-Expression auf aktivierten B-Zellen [100]. Die selektive Blockierung der CD40-CD40L-Interaktion bzw. die funktionalen Defekte in diesen Molekülen resultieren in einem Verlust der Antigen-präsentierenden Funktion der B-Zellen sowie fehlenden Keimzentren in den sekundären lymphatischen Organen und Defekten in den sekundären humoralen Antworten. Das gezielte Ausschalten der CD40L-CD40 Interaktion kann die Autoimmun- und Allo-Transplantat-Abstoßungsreaktionen vermindern [114, 115].

In vielen Publikationen wurde gezeigt, dass die B-Zellen die Antigene mit der gleichen Effizienz wie die ausgereiften dendritischen Zellen (DC) nach einer Antigen-unabhängigen *in vitro*-Stimulation mit CD40L den T-Zellen präsentieren können [116, 117]. B-Zellen exprimieren nach der CD40L-Aktivierung die Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren wie CXCR-4 und CCR-7 für die Migration in die sekundären lymphatischen Organe [118] und sind schließlich in der Lage die autologen T-Zellen Antigen-spezifisch zu aktivieren [119, 120].

Die Rolle der B-Zellen als Antigen-präsentierende Zellen bei der T-Zell-Aktivierung und Regulation wurde in zahlreichen Modellen der Autoimmunerkrankungen untersucht. In einem Mausmodell des T1DM wurde gezeigt, dass die Antigen-Präsentation durch die autoreaktiven B-Zellen entscheidend für die Pathogenese der Autoimmun-Diabetes ist [105].

Auch die Daten aus Studien in den anderen Erkrankungsmodellen inklusive der SLE [121], RA [122] oder MS [108] unterstützten die wichtige Rolle der Antigen-Präsentation durch B-Zellen. Klinische Studien mit Rituximab, einem anti-CD20 monoklonalen Antikörper speziell zur Depletion der B-Zellen, bei Patienten mit RA und MS zeigten, dass das Fehlen der B-Zellen in einer verminderten T-Zell-Antwort nach Antigen-Stimulation resultiert [108, 122].

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass in vielen Fällen die B-Zellen als APCs in der Induktion von T-Zell-Aktivierung oder Toleranz involviert sind [100]. Jedoch wird die Rolle der B-Zellen bei der Initiierung der Immunantworten noch kontrovers diskutiert, vor allem,

1. Einleitung

weil es als erwiesen gilt, dass die anderen professionellen APCs wie die dendritischen Zellen und Makrophagen für eine robuste Immunantwort wichtig sind.

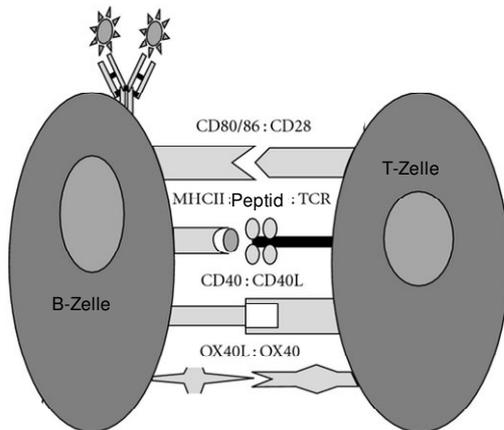


Abbildung 5. Die kostimulatorischen Moleküle in der Interaktion zwischen B- und T-Zellen.

Wechselwirkung zwischen B7-1/B7-2 (CD80/CD86) auf Oberfläche der B-Zellen und ihren Liganden CD28 auf der Oberfläche der T-Zellen vermittelt ein aktivierendes kostimulatorisches Signal. CTLA-4-Bindung an CD80/CD86 dagegen hemmt die T-Zell-Aktivierung. Wechselwirkung zwischen MHC-II-Peptid und T-Zell-Rezeptor (TCR) führt zur Aktivierung der T-Zellen. Interaktion zwischen CD40 auf B-Zellen und CD40L auf T-Zellen fördert die B-Zell-Proliferation, APC-Funktionen und T-Zell-Aktivierung. OX40-OX40L-Interaktion reguliert die Proliferation, Differenzierung und Zytokin-Produktion in T-Zellen. Adaptiert nach *Ireland et al* [108].

1.6. Bedeutung von Vitamin D₃ bei atopischen Erkrankungen

Unter den verschiedenen allergischen Erkrankungen wurde das allergische Asthma am intensivsten in Zusammenhang mit Vitamin D₃ untersucht. Vitamin D₃ fördert immunologische Toleranz in den meisten Immunzellen, die mit Asthma in Verbindung stehen. So hemmt das Vitamin D₃ die Produktion von IgE in B-Zellen [74] sowie die Reifung und Differenzierung von Mastzellen [123]. Bei dendritischen Zellen induziert es einen tolerogenen Phänotyp [124] und generiert CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften [62, 125-127]. In einem Mausmodell des allergischen Asthma reduziert Vitamin D₃-Applikation die Infiltrierung von Eosinophilen und die Menge der Th2-Zytokine in bronchoalveolärer Lavagenflüssigkeit (BALF) in Ovalbumin-sensibilisierten Mäusen [128, 129]. *Brehm et al.* zeigte, dass der Serum 25(OH) Vitamin D₃-Spiegel mit dem Gesamt-IgE,

1. Einleitung

aber auch mit der Frequenz von Eosinophilen im peripheren Blut invers korrelierte. Eine Erhöhung von 10 ng/ml (25 nmol/L) Serum 25(OH) Vitamin D₃ war mit einem Rückgang von 25 I.U./ml im Gesamt-IgE und von 29/mm³ in Eosinophilen im peripheren Blut assoziiert [130]. Ferner wurden höhere Serum 25(OH) Vitamin D₃-Spiegel bei australischen Kindern mit einem reduzierten Risiko für Atopie (6 Jahre alt) und Asthma (14 Jahre alt) beobachtet. Darüber hinaus wurde berichtet, dass der Vitamin D₃-Status negativ mit Gesamt-IgE, sowie den Frequenzen von zirkulierenden Eosinophilen, Basophilen und Neutrophilen assoziiert war, sich aber eine positive Korrelation zu IL-10- und IFN- γ -produzierenden T-Zellen zeigte [131].

Es gibt zahlreiche Evidenzen die die Verbindung zwischen dem Vitamin D₃-Status und der Funktion der Lunge darlegen. Untersuchungen bei Asthma-Patienten [132, 133] und auch Studien aus präklinischen Modellen [134], demonstrieren, dass ein Vitamin D₃-Mangel einen Einfluss auf die Lungenstruktur- und Funktion hat. *Bossé et al.* zeigen eine direkte Modulation der Gen-Expressionsprofile in bronchialen glatten Muskelzellen durch Calcitriol [135]. Mehrere Studien berichteten, dass die Vitamin D₃-Aufnahme bei Asthma-Patienten mit Glukokortikoid- Resistenz zu einem verbesserten Ansprechen auf Dexamethason sowie einer Induktion von IL-10 in CD4⁺ regulatorischen T-Zellen führt [136-138]. Auch andere Autoren konnten eine Verstärkung der Glukokortikoid-Wirkung durch Vitamin D₃ bei allergischem Asthma beobachten [137, 139]. Einige vor kurzem veröffentlichte Studien stellen fest, dass eine Vitamin D₃-Supplementierung bei Kindern mit Asthma das Risiko für wiederkehrende Infektionen der Atemwege und die Häufigkeit von Asthmaanfällen reduzieren kann [140, 141]. Im Gegensatz dazu, haben weitere Studien gezeigt, dass die Häufigkeit von Asthma und atopischen Erkrankungen nach der Vitamin D₃-Supplementierung ansteigt [142, 143]. Einen weiteren Zusammenhang zwischen Vitamin D₃-Stoffwechsel und der Entstehung von Asthma liefern die Berichte darüber, dass die einzelnen VDR-Polymorphismen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von allergischem Asthma assoziiert sind [144, 145].

In vielen Publikationen wurde über die Rolle und die möglichen positiven Auswirkungen des Vitamin D₃ Stoffwechsels auf die atopische Dermatitis (AD), einer häufigen chronisch-entzündlichen Erkrankung diskutiert. AD ist klinisch charakterisiert durch Juckreiz, Ekzembildung und zahlreiche Defekte in der epidermalen Barriere. Die Prävalenz der atopischen Dermatitis wird auf 20% bei Kindern und 4% bei Erwachsenen geschätzt [146, 147]. Die Pathogenese der atopischen Dermatitis ist komplex und beinhaltet Störungen sowohl in der epidermalen Barriere als auch in der kutanen Immunität [148]. Es wurde gezeigt, dass die biologisch aktive Form von Vitamin D₃, Calcitriol, die Differenzierung der

1. Einleitung

Keratinocyten fördert, sowie eine stimulierende oder auch inhibitorische Wirkung auf das Keratinocytenwachstum in Abhängigkeit von den Calcitriol-Konzentrationen hat [149]. Calcitriol induziert die Synthese von Wachstumsfaktoren aus der PDGF-Familie (Platelet-derived growth factor) und fördert dadurch die Wundheilung [150]. Außerdem, erhöht Calcitriol die TNF- α -abhängige Keratinocyten-Differenzierung [151], vermindert die Synthese von IL-1 α , IL-6, CCL5 Chemokin (RANTES) und verringert die Entzündung in epidermalen Keratinocyten [152, 153].

Die beiden Enzyme CYP27A1 und CYP27B1, die notwendig sind um Calcitriol aus Vitamin D₃ zu synthetisieren, werden von Keratinocyten exprimiert [154]. Biologisch aktives Vitamin D₃ induziert antimikrobielle Peptide (AMP), wie Cathelicidin und β -Defensin [155], erhöht antimikrobielle Peptid-Aktivität [155] und fördert die Integrität der Haut-Permeabilitätsbarriere [156]. *In vitro*-Behandlungen von dendritischen Zellen mit Calcitriol führen zu einer verminderten IL-12- aber erhöhten IL-10-Produktion [50]. Auch die regulatorischen T-Zellen können durch die Calcitriol-Behandlung der dermalen und epidermalen dendritischen Zellen induziert werden [157].

Beobachtungsstudien zeigten, dass Häufigkeit und Schweregrad von AD bei Erwachsenen [158] und Kindern [159] mit sinkenden Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen signifikant zunehmen [160]. Vitamin D₃-Supplementierungsstudien-, sowie UV-Therapiestudien, bestätigten eine positive Korrelation zwischen der Verbesserung des AD-Schweregrades und steigenden Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen [161-163].

1.7. Vitamin D₃ und Autoimmunerkrankungen

Epidemiologische Daten weisen auf eine Assoziation zwischen einem niedrigen Serum 25(OH) Vitamin D₃ Status und einem höheren Risiko für chronisch-entzündliche Erkrankungen verschiedener Genese hin. Zu diesen zählen Autoimmunerkrankungen wie In-sulin-abhängiger Diabetes mellitus (IDDM, T1DM) [164], multiple Sklerose (MS) [165, 166], systemischer Lupus erythematodes (SLE) [167, 168] und die rheumatoide Arthritis (RA) [169-171].

T1DM ist eine Autoimmunerkrankung, die mit der Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen im Pankreas einhergeht [172]. T-Zellen, insbesondere Th1 und T_{reg}, spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Typ-1 Diabetes [173, 174]. Vitamin D₃ kann die Entwicklung des T1DM inhibieren, in dem es die Produktion pro-inflammatorischer Interleukine, wie IL-12, IL-2 und IFN- γ hemmt [84, 85] und die Induktion regulatorischer T-

1. Einleitung

Zellen fördert [175]. Es wurde außerdem bestätigt, dass β -Zellen im Pankreas den Vitamin D-Rezeptor exprimieren [176]. Zahlreiche Studien zeigten eine signifikante Assoziation zwischen einem niedrigen Serum 25(OH) Vitamin D₃-Status und dem Auftreten von T1DM [177-179]. Vitamin D₃-Supplementierung während der Schwangerschaft aber auch in der frühen Kindheit verringert das Risiko für das Auftreten von T1DM [180-182]. Allerdings, zeigten Vitamin D₃-Supplementierungsstudien bei Patienten mit etablierten T1DM widersprüchliche Ergebnisse [183]. Basierend auf Studien in einem Mausmodell des T1DM, wurde nachgewiesen, dass die Krankheitsentwicklung durch Calcitriol und seine Analoga verhindert werden kann [184-186]. Die Behandlung der Tiere mit Calcitriol [187] oder seinem Analoga [175] induzierte dendritische Zellen mit regulatorischen Eigenschaften, verhinderte die Insulitis-Progression, die Th1-Zell-Infiltration und hemmte die Entwicklung von T1DM bei nicht hyperkalzämischen Dosen.

Es wird angenommen, dass eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems, multiple Sklerose (MS), durch die Aktivierung der Myelin-spezifischen Th1- und Th17-Zellen vermittelt wird [188]. Darüber hinaus wird MS mit verminderten Frequenzen und Funktionalität der regulatorischen T-Zellen in Verbindung gebracht [189, 190]. Wie bereits erwähnt, kann die pro-inflammatorische Zytokin-Produktion durch VDR-Aktivierung gehemmt und die Funktion der regulatorischen T-Zellen induziert werden [50, 85]. Die Häufigkeit für des Auftretens von MS zeigt eine geografische Verteilung; Während die MS-Prävalenz niedriger in äquatorialen Regionen ist, steigt sie mit zunehmendem Breitengrad. Dies kann auf einen Zusammenhang zwischen MS-Entstehung und Sonnenscheinintensität, bzw. Vitamin D₃-Bildung hinweisen [191]. Mehrere Studien haben eine starke negative Korrelation zwischen Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen und dem MS-Risiko gezeigt [165, 192], Zudem waren die meisten bisher untersuchten MS-Patienten Vitamin D₃-defizient [193]. Eine Supplementierung der MS-Patienten mit hochdosiertem Vitamin D₃ resultierte in einer Erhöhung der Frequenzen von IL-10⁺, sowie einer Minderung der Ratio von IFN⁺/IL-4⁺ T-Zellen [194]. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die T-Zell-Reaktivität und Proliferation von *ex vivo* restimulierten CD4⁺ T-Zellen nach 28-wöchiger Vitamin D₃-Supplementierung deutlich zurückgingen [195]. Obwohl die endgültigen Beweise für die Hypothese, dass Vitamin D₃ in der Lage ist den MS-Krankheitsverlauf zu modulieren, bislang fehlen, unterstützen viele präklinische und klinische Beobachtungen eine positive Rolle der Vitamin D₃-Therapie bei MS-Erkrankung [196].

Der systemische Lupus erythematodes (SLE) ist eine systemische Autoimmunerkrankung, die durch akute und chronische Entzündungsreaktionen in zahlreichen Organen, darunter der

1. Einleitung

Haut, Herz, Lunge, Nieren, Gelenke und dem Nervensystem gekennzeichnet ist [197]. SLE ist eine T- und B-Zell-abhängige Erkrankung, die durch eine Erhöhung von IL-17-produzierenden T-Zellen (Th17) [198] charakterisiert ist. Darüber hinaus findet man im Serum von SLE-Patienten eine Reihe von Autoantikörpern, insbesondere gegen Histone und doppelsträngige DNA (dsDNA) [199]. Mehrere Studien haben gezeigt, dass SLE-Patienten häufig Vitamin D₃-defizient sind [167, 200, 201]. Dagegen liegen über die Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität und den Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen widersprüchliche Ergebnisse vor [200-202]. Vitamin D₃-Supplementierung resultierte in einer signifikanten Reduktion der pro-inflammatorischen Zytokine, inklusive IL-17 und IFN- γ , sowie des antinukleären Antikörpertiters [202, 203]. Weiterhin wurde ein Rückgang der Krankheitsaktivität beobachtet [202]. Andere Autoren konnten keine signifikante Verbesserung nach Vitamin D₃-Supplementierung feststellen [204].

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine entzündliche Systemerkrankung des Bindegewebes, die vorwiegend Gelenke, aber auch andere Organe wie z.B. die Haut oder das Herz-Kreislauf System betreffen kann [205]. Bei der Entstehung der RA spielen aktivierte Effektor Th1- und Th17-Zellen eine Schlüsselrolle. Mehrere Studien haben eine negative Korrelation zwischen den Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen und der Krankheitsaktivität bei Patienten mit RA beobachtet [171, 206-208]. In einem Mausmodell der Kollagen-induzierten Arthritis, verhinderte die Calcitriol-Supplementierung die Arthritis-Entwicklung und es trat keine Arthritis-Progression auf [209]. Eine weitere Studie mit einer Calcitriol-Supplementierung bei RA-Patienten berichtete über weniger Schmerzen und einer deutlichen Reduktion in den Serum-Konzentrationen des C-reaktiven Proteins sowie pro-inflammatorischer Zytokine [210], wohingegen eine andere Studie keinen Zusammenhang zwischen der Vitamin D₃-Einnahme bei jugendlichen und dem Risiko für RA bei Erwachsenen fand [211]. Dies konnte in einer weiteren Studie mit 500 RA-Patienten bestätigt werden, die ebenfalls keine Korrelation zwischen dem Serum 25(OH) Vitamin D₃-Werten und dem Krankheitsverlauf oder dem Ansprechen auf die Therapie feststellen konnte [212].

2. Ziele der Arbeit

Immunologische Wirkungen von Vitamin D₃ werden im Zusammenhang mit chronischen Erkrankungen diskutiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Vitamin D-Rezeptor-vermittelten Effekte auf den Phänotyp von B- und T-Zellen sowie deren funktionelle Eigenschaften untersucht.

Unter der Annahme, dass die endogene Calcitriol-Synthese in Lymphozyten nach einem Anstieg der Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen die humorale und zelluläre Immunantworten beeinflussen kann, sollten die Veränderungen in B-Zell-Oberflächenmarker- und Zytokin-Expression sowie T-Zell-Zytokin-Produktion nach Vitamin D₃-Supplementierung mittels Durchflusszytometrie und ELISA bestimmt werden.

Es wurde sowohl die Vitamin D-Rezeptor-abhängige Modulation der Antigen-unspezifischen als auch Antigen-spezifischen B- und T-Zellantworten nach Immunisierung in einem klinisch-relevanten Kontext betrachtet. Darüber hinaus wurden die 25(OH) Vitamin D₃-Serumkonzentrationen nach Vitamin D₃-Zufuhr gemessen und mittels statistischer Methoden mit den immunologischen Parametern in Beziehung gesetzt. So konnten die notwendigen Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen für die Modulation der B- und T-Lymphozyten näher charakterisiert werden, da in der Literatur die Referenzwerte für Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen sich primär auf den Knochenstoffwechsel beziehen.

Schliesslich wurde der funktionelle Einfluss der Vitamin D-Rezeptor-Aktivierung in B-Zellen auf die T-Zell-Aktivierung, Proliferation und Zytokin-Produktion mittels einer T-Zell-B-Zell Kokultur mit anti-CD40+IL-4, stimulierten und mit Calcitriol-behandelten B-Zellen untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Antikörper

Antikörper	Klon	Titration	Hersteller
Anti-human CD3	HIT3a	1:1000	BD Pharmingen
Anti-human CD4 FITC	L120	1:50	BD Pharmingen
Anti-human CD4 PerCP	RPA-T4	1:25	BD Pharmingen
Anti-human CD14	MicroBeads	Zellzahl abh.	Miltenyi Biotec
Anti-human CD14 FITC	MφP9	1:50	BD Pharmingen
Anti-human CD14 PE	MφP9	1:50	BD Pharmingen
Anti-human CD19 FITC	4G7	1:50	BD Pharmingen
Anti-human CD19 PE	LT19	1:50	Miltenyi Biotec
Anti-human CD19 PerCP	4G7	1:25	BD Pharmingen
Anti-human CD19	MicroBeads	Zellzahl abh.	Miltenyi Biotec
Anti-human CD19	MultiSort Kit	Zellzahl abh.	Miltenyi Biotec
Anti-human CD23 FITC	M-L233	1:40	eBioscience
Anti-human CD23 APC	EBVCS-5	1:25	BD Pharmingen
Anti-human CD27 FITC	O323	1:20	Biologend
Anti-human CD27 FITC	LG.7F9	1:30	eBioscience
Anti-human CD27 PE	LG.7F9	1:50	eBioscience
Anti-human CD27 APC	M-T271	1:50	Miltenyi Biotec
Anti-human CD27	MicroBeads	Zellzahl abh.	Miltenyi Biotec
Anti-human CD28	CD28.2	1:1000	BD Pharmingen
Anti-human CD38 FITC	T16	1:30	Beckman Coulter
Anti-human CD38 APC	IB6	1:40	Miltenyi Biotec
Anti-human CD38 PE-Cy 7	HIT2	1:40	Biologend
Anti-human CD40	626	1:2000	Santa Cruz Biotechnology

3. Material und Methoden

Anti-human CD40	G28.5	1:10000	DRFZ
CD45RA FITC	L48	1:25	BD Pharmingen
CD45RA PE-Cy7	L48	1:60	BD Pharmingen
CD45RO PE	UCHL1	1:40	BD Pharmingen
Anti-human CD69 PerCP	FN50	1:20	BD Pharmingen
Anti-human CD80 PE	L307.4	1:20	BD Pharmingen
Anti-human CD86 APC	FM95	1:20	Miltenyi Biotec
Anti-human CD154 FITC	TRAP1	1:25	BD Pharmingen
Anti-human CD154 PE	TRAP1	1:25	BD Pharmingen
Anti-human CD154 APC-Cy7	TRAP1	1:30	BD Pharmingen
Anti-human IFN- γ APC	45-15	1:10	Miltenyi Biotec
Anti-human IL-2 APC	MQ1-17H12	1:10	BD Pharmingen
Anti-human IL-4 APC	MP4-25D2	1:10	BD Pharmingen
Anti-human IL-10 PE	JES3-19F1	1:10	BD Pharmingen
Anti-human IL-17A PE	SCPL1362	1:15	BD Pharmingen
Anti-human IgA	G20-359	1:500	BD Pharmingen
Anti-human IgA, IgG, IgM	Passende Antikörper-Paare	1:500	Jackson ImmunoResearch
Anti-human IgE	HP6061, HP6029, HP6029b	1:100-1:1000	Southern Biotec
Anti-human IgG	G18-145	1:1000	BD Pharmingen
Anti-human NFATc2 FITC	1	1:15	DRFZ
Anti-human NF- κ B p65	F6	1:20	Santa Cruz Biotechnology

3.1.2. Chemikalien

Chemikalien	Spezifikation	Hersteller
1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 (Calcitriol)	4 x 10 ⁻³ M in Ethanol	Sigma-Aldrich
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)		Sigma-Aldrich
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)		Roth
7-Aminoactinomycin (7-AAD)		eBioscience

3. Material und Methoden

Agarose LE Agarose		Biozym Scientific GmbH
Aktivkohle aufgereinigtes FCS (CCS)	S3113, hitzeinaktiviert	Biochrom AG
Beriglobin		Aventis Behring
Bovine serum albumin (BSA)	Fraktion V, pH 7,0	Serva
Brefeldin A		Sigma-Aldrich
5 (6)-Carboxyfluoresceindiacetat		Sigma-Aldrich
N-Succinimidylester (CFSE)		
Citronensäure, C ₆ H ₈ O ₇	≥ 99%	Merck
Diethanolamin, (HOCH ₂ CH ₂) ₂ NH	≥ 98%	Sigma-Aldrich
Dinatriumcarbonat, Na ₂ CO ₃		Merck
Dinatriumhydrogenphosphat, Na ₂ HPO		Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Hybri-Max™	Sigma-Aldrich
DNase		Macherey-Nagel
Dulbecco phosphatgepufferte physiologische Salzlösung (PBS)	ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	PAA
Essigsäure, CH ₃ COOH	≥ 99,7%	Sigma-Aldrich
Ethanol, CH ₃ CH ₂ OH	reinst	Merck
Ethidiumbromid Lösung	10 mg/ml	Gibco/Invitrogen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	≥ 99%, wasserfrei	Sigma-Aldrich
Extra Avidin-Peroxidase		Sigma-Aldrich
FACS™ Laufpuffer		BD Pharmingen
FastStart DNA Master SYBR® Green		Roche
Fötale Kälberserum (FCS)	0314G	Biochrom AG
Ficoll	steril, d = 1,077 g/mL	PAA
Ionomycin		Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid, KCl		Merck
Kaliumbiphosphat, KH ₂ PO ₄		Merck
L-Glutamin	200 mM	Biochrom
Meerrettichperoxidase (HRP)		R&D Systems®
Magnesiumchlorid, MgCl ₂ *6H ₂ O		Merck
Natriumacetat, CH ₃ COONa		Merck
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO ₃		Merck
Natriumchlorid, NaCl		Merck

3. Material und Methoden

NucleoSpin [®] RNA II Kit		Macherey-Nagel
para-Nitrophenylphosphat (pNPP)		Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	10000 U/ml, µg/ml	Biochrom AG
Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA)		Sigma-Aldrich
Quick-Load [®] 100 bp DNA Ladder		New England BioLabs [®]
Rekombinant Human Interleukin (IL)-4		Miltenyi Biotec
Salzsäure, HCl	≥ 37%	Merck
Schwefelsäure, H ₂ SO ₄	≥ 96%	Merck
Streptavidin-alkalische Phosphatase (AP)		ZYMED
TaqMan [®] Reverse Transkription Reagenzen		Applied Biosystems
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TrisBase)		Sigma-Aldrich
Tween20		Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid, H ₂ O ₂	≥ 30%	Merck
ZK159222	10 ⁻² M in Ethanol	Bayer Schering Pharma
β-Mercaptoethanol	14,3 M, ≥ 98%	Sigma-Aldrich

3.1.3. Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung	Hersteller
50x Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer		Gibco, Invitrogen
1x Tris-EDTA (TE), pH 8.0	10 mM Tris 1 mM EDTA	
AEC-DMF Puffer (pH 5.0)	64 mM CH ₃ COONa 45 mM CH ₃ COOH	
Blockpuffer	3% BSA/1x PBS 2% BSA/1x TBS 3% MP/1x PBS	
Coating-Puffer, pH 9.6	34,8 mM NaHCO ₃ 154 mM NaCl 15,1 mM Na ₂ CO ₃	

3. Material und Methoden

FACS™-Puffer	1% BSA oder FCS/1x PBS	
Laufpuffer, pH 8.0	1x TE	
	40% Glycin	Sigma-Aldrich
	0,25% Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
MACS™-Puffer	0,2% BSA/1x PBS	
	20 mM EDTA	
Zellkulturmedium	500 ml Advanced RPMI 1640	Gibco, Invitrogen
	25 ml FCS oder CCS	Biochrom AG
	4 mM L-Glutamin	Biochrom AG
	100 U/ml Penicillin	Biochrom AG
	100 µg/ml Streptomycin	Biochrom AG
PBS, pH 7.4	137 mM NaCl	
	2,7 mM KCl	
	10 mM Na ₂ HPO ₄	
	1,8 mM KH ₂ PO ₄	
Natriumcarbonat Puffer, pH 9.6	28,6 mM NaHCO ₃	
	15,1 mM Na ₂ CO ₃	
Substratpuffer, pH 9.8	1 M Diethanolamin	
	0,5 mM MgCl ₂	
TBS, pH 7.4	100 mM Tris-Base	
	154 mM NaCl	
TMB-Puffer, pH 5.0	0,05 M Na ₂ HPO ₄	
	0,02 M Citronensäure	
Fixierung/Permeabilisierung-Puffer		eBioscience
Perm II Puffer		BD Pharmingen
Lysepuffer (Lysing Solution)		BD Pharmingen

3. Material und Methoden

3.1.4. Labormaterialien

Labormaterialien	Spezifikation	Hersteller
12-, 24-, 48-, 96-Loch Platten	Multiwell-Kultur	Greiner Bio-One
ELISA Platten	Immuno 96 MicroWell™ Solid Plates, MaxiSorp™	Nunc
LightCycler® Kapillaren	20 µl	Roche
LS/LD Säulen		Miltenyi Biotec
Pre-Separation Filter	30 µm	Miltenyi Biotec
Reaktionsgefäße	5 ml, 50 ml	Eppendorf, Sarstedt, BD

3.1.5. Laborgeräte

Laborgeräte	Spezifikation	Hersteller
Analysenwaagen		Sartorius AG
CASY® Technology Cell Counter	Casy 1, Modell TT	Roche Innovatis AG
Zentrifugen	Varifuge RF Megafuge 1.0R	Heraeus Holding Heraeus Holding
Sicherheitswerkbank (Clean bench)	HeraSafe	Heraeus Holding
Durchflusszytometer/FACS	FACSCalibur™ LSR II® MACSQuant® Analyzer	BD Biosciences BD Biosciences Miltenyi Biotec
Gefrierschrank (-20°C)/Kühlschrank (4°C)	TKF380	EUREKA
Gefrierschrank (-80°C)	HeraFreeze	Heraeus Holding
Gel Kammer		Bio-Rad Laboratories
Heizung-Block	Thermomixer 5436	Eppendorf
Heizung-Platte	nuova II	Thermolyne
Inkubator	Heracell®	Heraeus Holding

3. Material und Methoden

Magnetrührer	Magnetmix 2070	Hecht-Assistent
pH Elektrode		neoLab GmbH
pH Meter	MV 870 Digital	Präcitronic
Pipetten	10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Brandt, Sarstedt, BD Falcon
ELISA Platten Reader	MRX Microplate Reader	Dynex Technologies GmbH
Stromversorgung	Power Pac300	Bio-Rad Laboratories
Schüttler	IKA-Vibrax-VXR	IKA® Werke GmbH & Co. KG
Spektrophotometer	NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific
Tischzentrifuge	5417 C, 5417 R	Eppendorf
Thermocycler	LightCycler® 1.5 Px2	Roche Thermo Electron Corporation
Ultraschallbad	Sonorex TK52	Bandelin
Vortex-Mixer	Reax 2000	Heidolph
Wasserbad	U3	Julabo

3.1.6. Software

Software	Version	Entwickler
AxioVision	4.6.3	Carl Zeiss AG
CASY® measure	1.5	Schärfe System
Excel 2003, 2007		Microsoft Corporation
FlowJo	7.6.1, 7.6.5	Tree Star, Inc.
LightCycler® Software	Version 3	Roche
Prism	5.00	GraphPad
Revelation	G3.2	Dynex Technologies GmbH

3.2. Methoden

3.2.1. Probanden Kohorten

3.2.1.1. Vitamin D₃-Dosis-Eskalationsstudie

Alle Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit erfolgten nach Genehmigung durch die lokale Ethikkommission der Charité Campus Mitte. Nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung wurden 43 gesunde oder allergische Probanden zwischen 18-60 Jahren eingeschlossen. Die Ausschlusskriterien waren eine fehlende Einverständniserklärung, gleichzeitige anderweitige Studienteilnahme, Incompliance, geplante Besonnung oder UV-Exposition, positive Anamnese für Sarkoidose, Hyperkalzämie, Kreatinin-Serumkonzentration > 1 mg/dl, Nephrolithiasis, Schwangerschaft und Stillzeit, Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems, maligne Erkrankungen, Malabsorption oder chronische Infektion. Individuen (Vitamin D-Gruppe, n = 25) erhielten monatlich steigende Dosen von bis zu 8.000 IU Cholecalciferol pro Tag. Gesunde Personen ohne Vitamin D₃-Aufnahme dienten als Kontrollgruppe (n = 18). Blutproben zur Serum- und peripheren Blut-Zellanalyse wurden zu Beginn der Studie und nach 12 Wochen gesammelt. Serum 25(OH) Vitamin D₃-Spiegel wurden unter Verwendung des Serum 25(OH) Vitamin D₃ direkt ELISA Kits (IDS Hamburg, Deutschland) bestimmt.

3.2.1.2. Vitamin D₃ und Tetanus-Immunsisierung

Das Einschlusskriterium war eine vorliegende Tetanus/Diphtherie-Immunsisierung, die mindestens 5 Jahre zurücklag. Die Ausschlusskriterien waren identisch mit den bereits für die Dosis-Wirkungsstudie beschriebenen Kriterien. Die teilnehmenden Personen wurden nach dem Zufallsprinzip, doppelblind in die Vitamin D-Gruppe, die 2000 I.U. oral Vitamin D₃-Öl pro Tag erhielt (50 µg, n = 20) oder die Placebo-Gruppe (gleiches Volumen neutrales Öl, n = 12) zugeteilt. Die tägliche Kalziumzufuhr von 1200 mg wurde für jede Teilnehmer durch Supplementierung gewährleistet. Blutproben zur Serum- und peripheren Blut-Zellanalyse wurden zu Beginn der Studie und nach 10 Wochen gesammelt. Eine intramuskuläre Auffrischungs-Impfung mit einem kombinierten Tetanus/Diphtherie-Impfstoff (Td-Merieux, Sanofi Pasteur MSD, Strasbourg, Frankreich) wurde 9 Wochen nach Studienbeginn durchgeführt. Serum 25(OH) Vitamin D₃-Spiegel wurden unter Verwendung des Serum Vitamin D EIA Kits (Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland) gemessen. Die TT-

3. Material und Methoden

spezifischen IgG- und IgA-Antikörpertiter wurden unter Verwendung von seriell verdünntem Serum mittels Enzym-Immunoassays (DRG Diagnostics, Marburg, Deutschland) bestimmt.

3.2.1.3. Vitamin D₃ und Gräserpollen-spezifische Immuntherapie

Personen zwischen 18-60 Jahren (n = 33) mit einer diagnostizierten allergischen Vorerkrankung wurden nach dem Zufallsprinzip, doppelblind in die Vitamin D-Gruppe, die 5300 I.U. oral Vitamin D₃-Öl pro Tag (130 µg) erhielt oder die Placebo-Gruppe (gleiches Volumen neutrales Öl) zugeteilt. Vor Beginn der Pollenflugsaison (präseasonal) wurden über 16 Wochen in festgelegten Abständen steigende Allergendosen (Allergopharma GmbH & Co, Reinbeck, Deutschland) mittels subkutaner Injektionen verabreicht, mit der entsprechenden Wiederholung der Therapie in den zwei darauf folgenden Jahren. Die Untersuchung startete im November 2011. Blutproben zur Serum- und peripheren Blut-Zellanalyse wurden zu Beginn der Studie und nach 16 Wochen gesammelt.

Als Einschlusskriterien dienten, zusätzlich zu den unter Punkt 3.2.1.1 bereits beschriebenen, eine klinisch relevante Gräserpollen-Allergie und der positive Intrakutantest mit Gräserpollen. Ausschlusskriterien waren instabiles allergisches Asthma und eine Behandlung mit Immunmodulatoren oder Immunsuppressiva.

3.2.2. Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine erweiterte Methode für die gleichzeitige Charakterisierung verschiedener einzelner Zellpopulationen im Hinblick auf ihre physikalischen Eigenschaften. Unter Verwendung dieser Technik können Zellgröße, Granularität sowie die Expression von membrangebundenen und intrazellulären Molekülen bestimmt werden. Leukozyten-Subpopulationen können basierend auf der Oberflächenexpression von CD (Cluster of Differentiation)-Antigenen sowie intrazellulären Molekülen mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper charakterisiert werden. Mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Lymphozyten werden durch Laserlicht angeregt während sie als Einzelzellen nacheinander durch eine Durchfluss-Messkammer geführt werden. Dabei wird Licht eines bestimmten Spektrums emittiert, welches von speziellen Filtern absorbiert werden kann. Aufgrund der unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften wie z.B. Größe und Granularität der Zellen wird das Licht anders verteilt. Der Vorwärtsstreuungskanal (FSC) gibt Auskunft über die Zellgröße, während der Seitwärtsstreuungskanal (SSC) über den granulären Inhalt innerhalb einer Zelle aufklärt. Die Analyse von Zellen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern, die spezifisch an bestimmte intrazelluläre und Oberflächenantigene binden, liefert zusätzliche Informationen über die Häufigkeit der einzelnen Zellpopulationen innerhalb einer

3. Material und Methoden

Zellsuspension. Für diese Arbeit wurden die Daten mit den Geräten FACSCalibur[®], MACSQuant[®] Analyzer und LSR II[®] gesammelt. Die gewonnenen Daten wurden mittels FlowJo Software analysiert.

3.2.3. Lymphozyten Oberflächenfärbung

Für die weitere Klassifizierung der Zellpopulationen, wie z.B. B- und T-Lymphozyten aus isolierten peripheren mononukleären Blutzellen oder lysiertem Vollblut, diente eine Zelloberflächenfärbung. Die Immunphänotypisierung einzelner Zellpopulationen wird durch die Bindung von monoklonalen Antikörpern an spezifische CD-Antigene, die charakteristisch für die besonderen Zellpopulationen sind, erreicht. Es wurden dafür bis zu 3×10^6 Zellen mit kalter, phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen (340 g, 4° C, 10 min.) und anschließend mit Beriglobin[®] und Antikörperlösung, je nach Experiment, in 1% BSA/1x PBS-Puffer (BSA/PBS-Puffer) bei 4° C im Dunkeln nach den Anweisungen des Herstellers inkubiert. Beriglobin[®] blockiert die Fc-Rezeptoren der Zellen und verhindert so eine unspezifische Bindung und damit eine Isolation oder Analyse von falsch-positiven Lymphozyten. Die Inkubation mit Beriglobin[®] erfolgte entweder während der MACS[™] Aufreinigungsprozedur oder der Lymphozytenfärbung mit darauffolgender durchflusszytometrischer Analyse. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in BSA/PBS-Puffer resuspendiert. Zum Ausschluss der toten Zellen wurde 7-Aminoactinomycin (7-AAD) unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Analyse hinzugegeben. 7-AAD diffundiert nur in tote, nekrotische Zellen durch die beschädigte Zellmembran und interkaliert dort mit der DNA, wodurch abgestorbene Zellen von der Analyse ausgeschlossen werden können.

3.2.4. Vollblutproben zur Charakterisierung B- und T-Zellen *ex vivo*

Die Analyse von T- und B-Lymphozyten Populationen wurde anhand der Expression ihrer spezifischen Oberflächenantigene aus heparinisiertem Vollblut mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Für jede Färbung wurden jeweils 500 µl Vollblut in FACS[™]-Röhrchen pipettiert. CD19⁺ B-Zellen wurden aus Vollblut unter Verwendung Fluorochrom-konjugierter monoklonaler Antikörper und gemäß der Oberflächenexpression von CD19, CD23, CD27 und CD38 charakterisiert. CD4⁺ T-Helfer-Zellen wurden entsprechend mit Antikörpern gegen CD45RA-, CD45RO- und CD4- Antigene markiert. Antikörper für die Oberflächenfärbung wurden in Titrationsstufen zwischen 1:20 und 1:100 eingesetzt. Nach Zugabe der entsprechenden Antikörper-Ansätze wurden die Proben 15 Minuten bei 4° C gefärbt. Erythrozyten wurden durch Zugabe von 2 ml hypotonem Lysepuffer (BD Lysing solution)

3. Material und Methoden

und einer nachfolgenden 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln entfernt. Nach der Zentrifugation (340 g, 4° C, 10 min.) wurden die Zellen mit 2 ml BSA/PBS-Puffer gewaschen und im gleichen Puffer anschließend bis zur Messung bei 4° C gelagert.

3.2.5. Intrazelluläre Färbung und Analyse der Zytokin-Produktion in T-Lymphozyten

Die intrazelluläre T-Zell-Zytokin-Produktion wurde nach dem etablierten Protokoll von *Frentsch et al.* [213] analysiert. 1 ml Vollblut jedes Probanden wurde 6 Stunden mit 1 µg/ml Staphylococcus Enterotoxin-B (SEB) in Anwesenheit von 1 µg/ml anti-CD28 stimuliert um die Zytokin-Produktion bei T-Zellen zu induzieren. Als interne Kontrolle diente die gleiche Menge Vollblut ohne Stimulation. Nach 2 Stunden Inkubationszeit wurden die Vollblut Proben mit 2 µg/ml Brefeldin A behandelt, um die extrazelluläre Zytokin-Sekretion zu vermeiden. Brefeldin A bewirkt eine Hemmung des Golgi-apparat-abhängigen Transports. Anschließend wurden die Proben für weitere 4 Stunden inkubiert. Nach 6-stündiger Inkubation wurden die Erythrozyten mit 5 ml hypotonem Lysepuffer (BD Lysing solution) für 10 Minuten bei Raumtemperatur entfernt. Um das Eindringen der Antikörper in die Zelle zu ermöglichen, wurde die Lymphozyten-Membran mit 500 µl Perm II Puffer (gemäß den Anweisungen des Herstellers (BD) 1:10 mit destilliertem H₂O vorverdünnt) für 10 min. bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach dem Waschschriff mit 2 ml PBS (340 g, 4° C, 10 min.) wurden die pelletierten Zellen mit einem Antikörper-Mix gegen CD154, CD4, IL-4, IFN-γ, IL-10, IL-17 (bzw. Antikörper-Cocktail zur Zytokinbestimmung in T-Zellen aus Kokultur mit B-Zellen) und Beriglobin[®] in BSA/PBS-Puffer für 30 min. bei 4° C im Dunkeln gefärbt. Alle Antikörper wurden 1:10 verdünnt eingesetzt. Nach der Inkubation wurden ungebundene Antikörper durch Waschen mit PBS (340 g, 4° C, 10 min.) entfernt und die Zellen im BSA/PBS-Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.6. Etablierung einer FACS[™]-Färbung zum Nachweis von Gräserpollen-spezifischen T-Zellen

Der Nachweis erfolgte anhand der Expression des Aktivierungsmarkers CD40L (CD154) sowie der Produktion der Zytokine IL-4 und INF-γ in T-Zellen nach deren Stimulation mit Gräserpollen-Extrakten. Der lyophilisierte Gräserpollen-Extrakt (Sigma-Aldrich oder Allergopharma GmbH & Co, Reinbeck, Deutschland) wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in sterilem PBS aufgelöst und bis zur Anwendung bei 4° C gelagert. Wie unter Punkt 3.2.5. bereits beschrieben, wurde 1 ml Vollblut mit SEB (1 µg/ml) + anti-CD28 (1 µg/ml) als Positivkontrolle oder 1 ml Vollblut ohne Stimulation als Negativkontrolle für die Etablierung

3. Material und Methoden

benutzt. Gräserpollen-Extrakt in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,1 µg/ml und 50 µg/ml + anti-CD28 monoklonaler Antikörper wurde zu jeweils 1 ml Vollblut eines Donors mit diagnostizierter allergischer Überempfindlichkeit gegenüber Grasspollen hinzugefügt. Zur Kontrolle der unspezifischen T-Zell-Aktivierung wurde 1 ml Vollblut mit 50 µg/ml Rinderserumalbumins (BSA) unter Zugabe eines anti-CD28 (1 µg/ml) Antikörpers stimuliert. Nach 6-stündiger Stimulation, Erythrozyten-Lyse und Permeabilisierung wie unter Punkt 2.3.5. beschrieben, erfolgte die Färbung mit einem Antikörper-Mix gegen CD154, CD4, IL-4 und IFN-γ. Anschließend wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Eine Beispiel-Färbung ist in Abbildung 6 dargestellt.

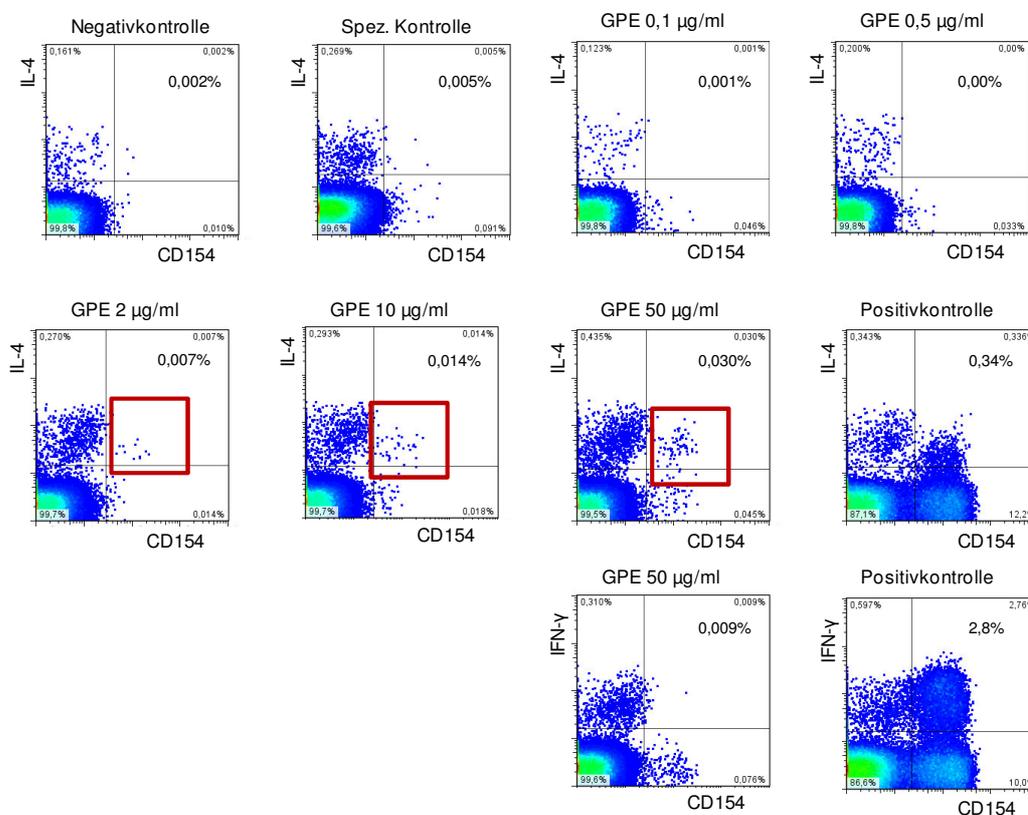


Abbildung 6. FACS™-Färbung zum Nachweis von zirkulierenden Gräserpollen-spezifischen T-Zellen. Jeweils 1 ml Vollblut stimuliert für 6 Stunden mit steigenden Konzentrationen von Gräserpollen-Extrakt (GPE, Sigma-Aldrich), SEB (1 µg/ml) + anti-CD28 (1µg/ml) als Positivkontrolle, Vollblut ohne Stimulation als Negativkontrolle und BSA (50 µg/ml) als Spezifitätskontrolle. Nach Zugabe von 2 µg/ml Brefeldin A für die letzten 4 Stunden der Stimulation erfolgten die Erythrozyten-Lyse (BD Lysing solution), Permeabilisierung (BD Perm II-Solution) und Färbung mit einem Antikörper-Mix gegen CD154, CD4, IL-4 und IFN-γ. Anschließend wurden die Prozte der aktivierten- (CD154⁺) und Zytokin-produzierenden T-Zellen mittels durchflußzytometrischer Analyse bestimmt. Gräserpollen-spezifische T-Zellen weisen ein Th2-Zytokin-Muster auf. Stimulation mit BSA-Konzentrationen von > 50 µg/ml zeigten eine unspezifische T-Zell-Aktivierung. Es sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments gezeigt.

3. Material und Methoden

3.2.7. Etablierung einer FACS™-Färbung zum Nachweis von Gräserpollen-spezifischen B-Zellen

Der Nachweis von Gräserpollen-spezifischen B-Zellen erfolgte mittels Detektion der positiven B-Zellen nach deren Markierung mit dem Fluorochrom-konjugierten Gräserpollen-Extrakt. Der in sterilem PBS aufgelöste Gräserpollen-Extrakt wurde im DRFZ durch die Lab-Manager an FITC- bzw. Alexa 647-Fluorochrome gekoppelt. Die Endkonzentration des Fluorochrom-konjugierten Gräserpollen-Extraktes betrug ca. 100 µg/ml. Wie unter Punkt 3.2.6. beschrieben, wurden Erythrozyten durch die Zugabe von 2,5 ml hypotonem Lysepuffer Lysing solution, BD) zu 500 µl Vollblut eines Probanden mit diagnostizierter Gräserpollen-Allergie für 10 Minuten bei Raumtemperatur durch die Lyse entfernt. Alternativ erfolgte zunächst die Aufreinigung der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) aus Vollblut, wie unter Punkt 2.3.11 beschrieben, mit der darauffolgenden Resuspendierung in BSA/PBS-Puffer entsprechend dem ursprünglichen Vollblut-Volumen. Nach einem Zentrifugationsschritt (340 g, 4° C, 10 min.) wurden bis zu 8×10^6 Lymphozyten durch die Zugabe von 250 µl Permeabilisierung-Puffer (Perm II, BD) für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln fixiert und permeabilisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Beriglobin® und einen Antikörper-Mix gegen IgD, IgE, CD19, CD27, CD38 und dem Fluorochrom-konjugierten Gräserpollen-Extrakt in einer Konzentration von 2 µg/ml bzw. den Verdünnungen 1:10-1:100.

Um die Spezifität der Färbung zu kontrollieren wurde ein Teil der Probe vor der Färbung für 10 Minuten mit dem unkonjugierten Gräserpollen-Extrakt in 100-fach höherer Konzentration (verglichen mit dem konjugierten Extrakt) präinkubiert. Für die Detektion der Gräserpollen-spezifischen-IgE⁺ B-Zellen wurden die Lymphozyten vor der Permeabilisierung mit dem unkonjugierten anti-IgE Antikörper (HP6029) der gleichen klonalen Abstammung wie der bei der Färbung eingesetzte Antikörper für 15 Minuten präinkubiert und anschließend mit PBS (340 g, 4° C, 10 min.) gewaschen. Alle Proben wurden nach Zugabe des Farb-Mixes für 30 min. bei 4° C inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS (340 g, 4° C, 10 min.) wurden die Zellen im BSA/PBS-Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert. Eine Beispiel-Färbung der IgE⁺-Gräserpollen-spezifischen B-Zellen ist in Abbildung 7 dargestellt.

3. Material und Methoden

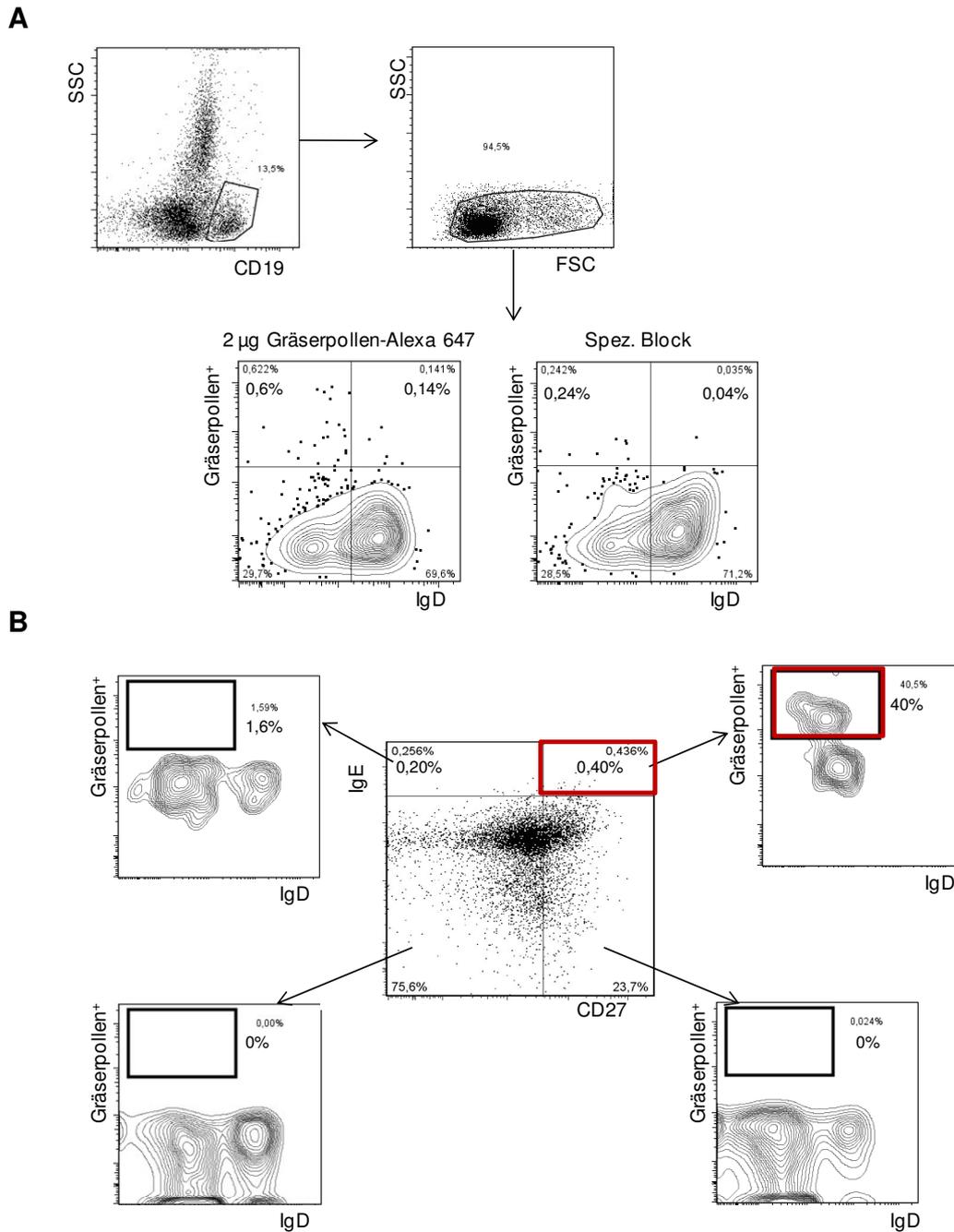


Abbildung 7. FACS™-Färbung zum Nachweis von zirkulierenden Gräserpollen-spezifischen B-Zellen. A) Permeabilisierte periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) wurden mit Antikörper gegen CD19, IgD, CD27 und Fluorochrom- (Alexa-647) konjugiertem Gräserpollen-Extrakt gefärbt. Zur Kontrolle der Spezifität der Färbung wurde der unkonjugierte Gräserpollen-Extrakt im 100-fachen Überschuß vor der Zugabe des Farb-Mixes für 5 min. präinkubiert (der spezifische Block). B) Permeabilisierte PBMCs wurden mit Antikörper gegen CD19, CD27, IgE, IgD und Fluorochrom- (Alexa-647) konjugiertem Gräserpollen-Extrakt gefärbt. Vor der Permeabilisierung wurde die Lymphozyten-Oberfläche mit 10-fachen Überschuß der anti-IgE Antikörper (HP6029) abgesättigt. Die Prozenste der CD19⁺, CD27⁺ (Gedächtnis) und IgE⁺-Gräserpollen-spezifischen B-Zellen wurde mittels durchflußzytometrischer Analyse bestimmt. Es sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments gezeigt.

3. Material und Methoden

3.2.8. Transkriptionsfaktoren-Zytokin Färbung

Die Färbungen wurden nach dem Protokoll und mit Reagenzien aus einem kommerziellen Foxp3 Staining Kit (eBioscience) durchgeführt. Die Zellen der B-Zell-T-Zell Kokultur wurden mit 1 ml BSA/PBS-Puffer versetzt und bei 340 g für 10 min. abzentrifugiert. Nach 20 min. Oberflächenfärbung (zur Diskriminierung von naiven- und Gedächtnis-T-Zellen) wurde erneut mit BSA/PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 30 min. mit Fix/Perm Lösung (FoxP3 Staining Kit) bei 4° C fixiert und permeabilisiert. Danach folgte ein Waschschrift in Perm-Puffer (FoxP3 Staining Kit) bei 400 x g für 10 min. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper-Cocktail (NFAT, NF-κBp65, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-10) bei 4° C für 30 min. Danach folgte der letzte Waschschrift in Perm-Puffer (400 g, 4° C, 10 min.). Abschließend wurden die Zellen in BSA/PBS-Puffer resuspendiert und bei 4° C bis zur Analyse gelagert.

3.2.9. Prinzip des Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)

Der ELISA ist eine indirekte quantitative Methode zur Bestimmung von verschiedenen Produkten in Flüssigkeiten mittels einer Enzymreaktion. Im ersten Schritt wird ein Protein-spezifischer Fänger-Antikörper in ELISA-Beschichtungspuffer verdünnt und an die Matrix der ELISA-Platte gebunden. Anschließend werden nicht-spezifische Protein-Bindungsstellen mit einem Protein-enthaltenden Blockierungspuffer gesättigt. Nach der Blockierung werden die zu untersuchenden Proben auf der ELISA-Platte inkubiert. Im nächsten Schritt wird ein weiterer, für das Protein spezifischer, biotinylierter Detektionsantikörper dazugegeben. Biotinylierte Antikörper werden durch enzymkonjugiertes Streptavidin nachgewiesen. Im letzten Schritt konvertieren die konjugierten Enzyme Meerrettich-Peroxidase (HRP) oder alkalische Phosphatase (AP) die chromogenen Substrate. Die daraus resultierenden Farbänderungen werden mit einem Spektrophotometer erfasst. Berechnungen der Proteinkonzentrationen in der Probe werden gemäß den Mittelwerten der Standardkurve durchgeführt.

3.2.10. Human-Immunglobulin-ELISA

Die Immunglobulin-Konzentrationen wurden mittels ELISA in den zellfreien Überständen der B-Zell-T-Zell Kokultur oder Patienten-Serum bestimmt. Zuerst wurde eine 96-well MaxiSorb Platte mit einem Fänger-Antikörper beschichtet. Die IgE-Detektion erfolgte mit anti-Human IgE (HP6061) und für den IgM-, IgA- und IgG-Nachweis mit den entsprechenden anti-Human-Isotyp-spezifischen Antikörpern, verdünnt in Natriumhydrogencarbonat-Puffer (pH-Wert 9,6) über Nacht bei 4° C. Nach dem Blockieren mit 2% Rinderserumalbumin (BSA) in

3. Material und Methoden

Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) wurden die Proben und Verdünnungsreihen des Standards 2 Stunden bei RT inkubiert. Danach wurden die Vertiefungen der 96-well Platte gewaschen und anschließend biotinyliertes anti-IgE (HP6029) oder AP-konjugiertem anti-IgM, IgA, IgG, vorverdünnt in 0,2% BSA/TBS, als Detektionsantikörper hinzugegeben und für 1,5 Stunden bei RT inkubiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das eingefangene IgE durch die enzymatische Aktivität von Streptavidin-AP oder wie für IgM, IgA und IgG mit der kolorimetrischen Analyse des gespaltenen para-Nitrophenylphosphat (pNPP) in Substratpuffer bei 405 nm in einem ELISA-Lesegerät detektiert. Als Standard diente humanes Serum eines atopischen Individuums, dessen IgE-, IgM-, IgA- und IgG-Konzentrationen vom Institut für Laboratoriumsmedizin der Charité bestimmt wurden.

3.2.11. T- und B-Lymphozyten Separation

Die Untersuchung der isolierten Lymphozyten erfolgte nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Charité, Campus Mitte. Nach Aufklärung und dem schriftlichen Einverständnis wurden die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) aus buffy coats gesunder Spender durch Dichtegradientenzentrifugation (Lymphozyten Separationsmedium, $d = 1,077$ g/ml, bei 900 g, für 30 min., bei Raumtemperatur) gewonnen. Die CD19⁺ B-Zellen wurden durch magnetische Zellsortierung (MACS™) unter Verwendung von anti-CD19-gekoppelten MicroBeads aufgereinigt. $1-2 \times 10^8$ PBMCs wurden mit 300 µl MACS™-Puffer, 40 µl Beriglobin® und 80 µl CD19-MicroBeads für 15 min. bei 4° C inkubiert. Nach dem Waschen mit 25 ml MACS™-Puffer (340g, 10 min., 4° C) wurde die CD19⁺ B-Zell-Fraktion mit der MACS™-Säulen Technologie nach den Anweisungen des Herstellers isoliert. CD19⁺ CD27⁻ B-Zellen wurden mittels eines CD19 Multisort Kits durch Depletierung von CD27⁺- und CD14⁺-Zellen mit CD27- und CD14-MicroBeads nach Herstellerangaben aufgereinigt. Nach Eluation der depletierten Fraktion wurden CD19⁺ CD27⁺ (Gedächtnis) B-Zellen isoliert. Die sortierten B-Zellpopulationen wurden mit einer Reinheit zwischen 70 und 95% angereichert. CD4⁺ CD45RA⁺ (naive) und CD45RO⁺ CD4⁺ (Antigen-erfahrene, Gedächtnis) T-Zellen wurden aus der CD19⁻ Fraktion isoliert. Naive T-Zellen wurden unter Verwendung eines naiven CD4⁺-Isolation Kits gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Die T-Zellen wurden durch Depletion von CD45RA⁻, CD14⁺-Zellen unter Verwendung von CD45RA- und CD14-Microbeads, gefolgt von einer positiven Selektion mit anti-CD4-gekoppelten magnetischen Partikeln nach den Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Die angereicherten Populationen enthielten mehr als 97% T-Zellen. Die Zellzahl der einzelnen Zellsuspensionen wurde mittels CASY®-Technologie bestimmt.

3. Material und Methoden

3.2.12. B-Zell-Aktivierung

CD19⁺ CD27⁻- und CD19⁺ CD27⁺-B-Zellen wurden im Zellkulturmedium (Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 Medium mit 4 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 pg/ml Streptomycin und 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS)) in 24-well Platten kultiviert. Die B-Zellen wurden für 48 Stunden mit anti-CD40 (1 µg/ml, Klon 626) und rhIL-4 (10 ng/ml) in Gegenwart oder Abwesenheit von Calcitriol in einem Konzentrationsbereich zwischen 100 nmol/L bis 1 µmol/L stimuliert (geprimt). Nach 48 Stunden wurden die B-Zellen 3× mit 50 ml PBS gewaschen und in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml im Zellkulturmedium resuspendiert. Alle Zellkulturen wurden bei konstanten 37° C und 5% CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre durchgeführt. Calcitriol wurde in 100% sterilfiltriertem Ethanol gelöst und bei -20° C gelagert.

3.2.13. Bestimmung der Vitamin D-Rezeptor-abhängigen CD38-Expression auf B-Zellen

Isolierte CD19⁺ B-Zellen (1×10^6 /ml) wurden im Zellkulturmedium für 5 Tage mit anti-CD40 (1 pg/ml), rhIL-4 (10 ng/ml), CpG2006 (3 pg/ml) und Ziege-anti-Human-Ig-F (ab ') 2-Fragmente (2 pg/ml) mit oder ohne 25(OH) Vitamin D₃ (50-100 nmol/L) oder Calcitriol in einem Konzentrationsbereich zwischen 100 nmol/L und 1 nmol/L in 24-well Zellkulturplatten kultiviert. B-Zellen ohne Behandlung dienten als Kontrollen. Am Tag 5 wurden die B-Zellen mit BSA/PBS-Puffer gewaschen (340 g, 4° C, 10 min.) und mit einem Antikörper-Mix gegen die Antigene CD38, CD27, CD14 und CD19, wie unter dem Punkt 3.2.3. bereits beschrieben, gefärbt. 7-AAD wurde zum Ausschluss toter Zellen direkt vor der Messung zur Zellsuspension hinzugefügt.

3.2.14. Blockierung der Vitamin D-Rezeptor-abhängigen CD38-Expression mit dem Antagonisten ZK159222

Der Vitamin D-Rezeptor-Antagonist 25-Carbonsäureester ZK159222 (ZK) [214] wurde während der Kultur mit stimulierten B-Zellen in Gegenwart von Vitamin D₃-Metaboliten eingesetzt. Die B-Zellen wurden, wie unter Punkt 3.2.12. bereits beschrieben stimuliert. ZK wurde in den Konzentrationen 1 µmol/L und 10 µmol/L zu jeweils stimulierten und/oder 25(OH) Vitamin D₃, bzw. Calcitriol-behandelten B-Zellen hinzugegeben und die dosisabhängigen Effekte anhand der CD38-Oberflächenexpression mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt.

3. Material und Methoden

3.2.15. 5 (6)-Carboxyfluoresceindiacetat N-Succinimidylester (CFSE) Färbung

Eine CFSE-Färbung erlaubt die Analyse von proliferierenden Zellen, da die den Zellen zugegebene Farbstoffmenge pro Zellteilung nur zur Hälfte an die Tochterzellen weitergegeben wird. Zur Schätzung der Proliferation wurden die isolierten T-Zellen mit 5,6-Carboxyfluoresceindiacetat Succinimidylester (CFSE) gefärbt und die CFSE-Ausverdünnung nach 7 Tagen Kokultur mit B-Zellen bestimmt. Isolierte T-Zellen wurden dazu gewaschen (340 g, 4° C, 10 min.) und in einer Endkonzentration von 10^7 Zellen/ml in PBS resuspendiert. Anschließend wurden 2,5 $\mu\text{mol/L}$ CFSE, gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO), für 2 min. bei RT dazugegeben und die Reaktion durch Auffüllen des Zellreaktionsgefäßes mit 40 ml Zellkulturmedium gestoppt. Nach dem anschließenden Zentrifugationsschritt (340 g, 4° C, 10 min.) wurden die T-Zellen in einer Endkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml im Zellkulturmedium resuspendiert.

3.2.16. T-Zell – B-Zell Kokultur

Um den Einfluss von Calcitriol-behandelten B-Zellen auf die T-Zell-Aktivierung zu untersuchen, wurden die isolierten, mit anti-CD40 und rhIL-4 stimulierten B-Zellen mit oder ohne Calcitriol-Zugabe mit autologen, CFSE markierten T-Zellen kokultiviert. Zur Etablierung der T-Zell-B-Zell Kokultur wurden die anti-CD40 und rhIL-4-aktivierten CD19^+ B-Zellen zunächst in unterschiedlichen Verhältnissen (Ratio) mit aufgereinigten, CFSE-markierten naiven T-Zellen in Anwesenheit steigender Konzentrationen des Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1) bzw. plattengebundenen anti-CD3 monoklonalen Antikörpers für 7 Tage kokultiviert. Anschließend wurden die Aktivierung der T-Zellen anhand der CD25-Expression und die Proliferation anhand der CFSE-Ausverdünnung bestimmt. Basierend auf den Ergebnissen der Etablierungsexperimente wurden anschließend die naiven- oder Gedächtnis- B-Zellen in einer Konzentration von 5×10^4 /well mit 2×10^5 /well naiven oder Gedächtnis CD4^+ T-Zellen in einem Endvolumen von 200 μl /well für 7 Tage kokultiviert. Für die T-Zell-Aktivierung wurde eine 96-well Zellkulturplatte mit 1 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3 (Klon HIT3a) in PBS bei 4° C über Nacht beschichtet oder alternativ 50 pg/ml des Antigens TSST-1 direkt in jede Vertiefung mit T-B-Zellen zugegeben (Abbildung 9). Um die Wirkung von anti-CD28 auf die Interaktion zwischen Calcitriol-behandelten B-Zellen und T-Zellen in der Kokultur zu untersuchen, wurde zusätzlich 1 $\mu\text{g/ml}$ des anti-CD28 monoklonalen Antikörpers in die Zellkulturplatten-Vertiefung mit T-B-Zellen hinzugefügt.

3. Material und Methoden

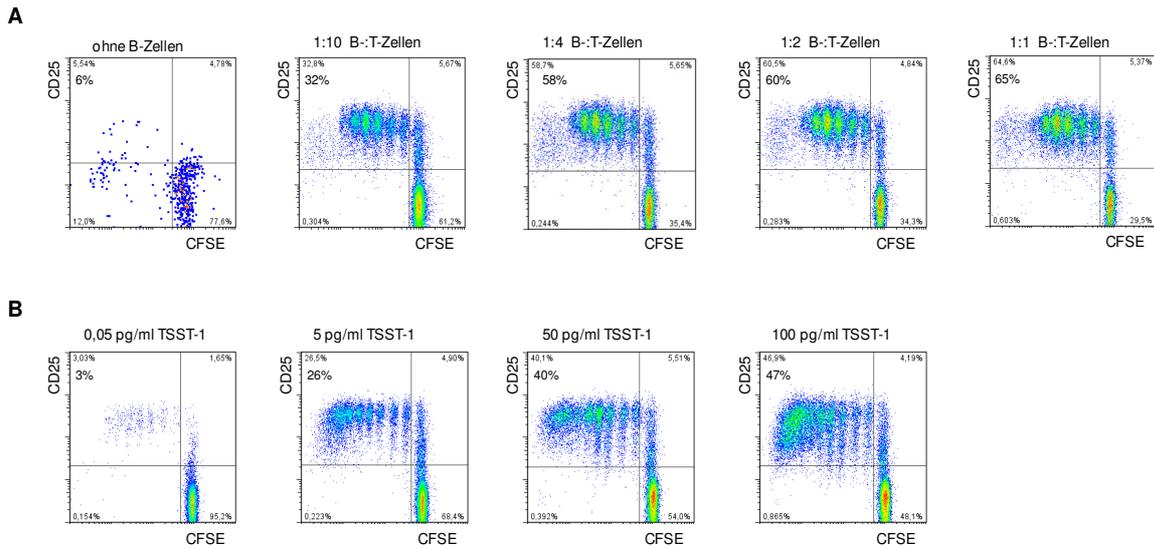
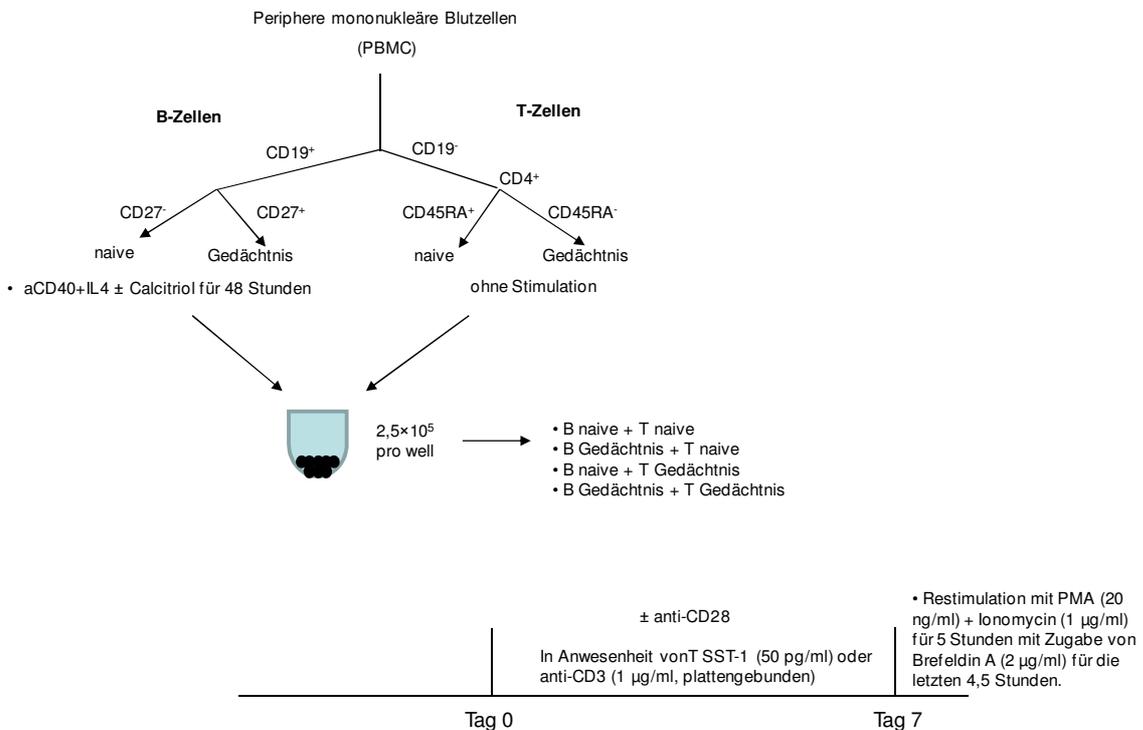


Abbildung 8. Experimente zur Etablierung der T-Zell-B-Zell Kokultur.

Isolierte CD19⁺ B-Zellen wurden mit naiven CFSE-markierten T-Zellen in A) Unterschiedlichen Ratios, oder B) mit steigenden Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1)- Konzentrationen für 7 Tage inkubiert. Die Aktivierung wurde anhand der CD25-Expression und die Proliferation anhand der CFSE-Ausverdünnung bestimmt. Die Dot-Plots sind auf lebende (7-AAD⁻) CD4⁺ T-Zellen fokussiert. Es wurde ein Experiment von 3 gezeigt.



3. Material und Methoden

Abbildung 9. Experimenteller Aufbau der B-Zell-T-Zell Kokultur-Versuche. Isolierung der naiven und Gedächtnis T- und B-Zellen. Stimulierung, Kokultur und Analyse.

3.2.17. Restimulation der T-Zell – B-Zell Kokultur

Zur quantitativen Bestimmung des Zytokinprofils der Effektor-T-Zellen, generiert in Gegenwart von B-Zellen, wurde die T-B-Zellsuspension nach 7 Tagen der Kokultur mit PBS gewaschen (340 g, 4° C, 10 min.), in Zellkulturmedium resuspendiert und anschließend polyklonal mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA, 20 ng/ml) und Ionomycin (1 µg/ml) für 5 Stunden stimuliert. Für die letzten 4,5 Stunden der Stimulation wurde 2 µg/ml Brefeldin A hinzugefügt. Brefeldin A führt zur Unterbrechung des Golgi-vermittelten intrazellulären Transports und zur Akkumulation der Zytokine in der Zelle. Anschließend wurden die Zellen wie im Abschnitt 3.2.5. dargestellt behandelt.

3.2.18. RNA-Isolierung aus kultivierten B-Zellen

Nach 48-stündiger B-Zell-Aktivierung, wie im Abschnitt 3.2.12. beschrieben, wurden die B-Zellen aus den Zellkultur-Platten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 1×10^6 in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen. Nach einem Zentrifugationsschritt (340 g, 4° C, 10 min.) wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 350 µl Lysepuffer (RA1, NucleoSpin[®] RNA II) mit 3,5 µl β-ME aufgenommen. Die lysierten Zellen wurden bei -20° C gelagert. Die nukleäre RNA wurde mithilfe des RNA-Isolierung Kits (NucleoSpin[®] RNA II) nach Herstellerprotokoll isoliert. Anschließend wurde die RNA in zwei Schritten mit 30 µl RNase-freiem Aq dest. eluiert und der RNA Gehalt mittels Nanodrop[®] bestimmt.

3.2.19. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mittels reverser Transkriptase-PCR mit dem TaqMan[®] Transkription Reagenzien Kit (Invitrogen), wie vom Hersteller beschrieben, durchgeführt. 1 µg RNA wurde in einem Gesamtvolumen von 7,7 µl Aq dest. vorverdünnt und in 12,3 µl Reaktionsansatz (Tabelle 1) in cDNA umgeschrieben. Die reverse Transkriptionsreaktion wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgte bei 25° C für 10 min. die initiale RNA-Primer Bindung, im zweiten Schritt bei 48° C für 40 min. die Umschreibung zur cDNA und anschließend bei 95° C die Inaktivierung der reversen Transkriptase. Die so gewonnenen cDNA-Proben wurden bis zur Verwendung bei -20° C gelagert.

3. Material und Methoden

Tabelle 1. Versuchsansatz für die reverse Transkriptionsreaktion

Komponente	Volumen pro Probe	Endkonzentration
10x TaqMan RT Puffer	2.0 µl	1x
25 mmol/L MgCl ₂	4.4 µl	4 mmol/L
2 mmol/L dNTPs Gemisch (jeweils)	4.0 µl	500 µmol/L (jeweils)
50 µmol/L Random Hexameren	0.5 µl	1.25 µmol/L
50 pmol/L Oligo d (T) 16	0.5 µl	1.25 µmol/L
20 U/µl RNase Inhibitor	0.4 µl	0.4 U/µl
50 U/µl MultiScribe Reverse Transkriptase	0.5 µl	1.25 U/µl

3.2.20. Quantitative RT-PCR (qPCR)

Die Fluoreszenz-basierte Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (real-time PCR/qPCR) ist die am weitesten verbreitete Methode zur Quantifizierung und Charakterisierung der Genexpression. Für die hier beschriebenen Versuche wurde die qPCR in einem LightCycler[®] mit FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) durchgeführt. Der SYBR Green Fluoreszenzfarbstoff bindet hochspezifisch an doppelsträngige (ds)DNA und emittiert nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm, Licht bei einer Wellenlänge von 522 nm. Der Nachweis der PCR-Produktbildung erfolgt durch die Messung der Fluoreszenz-Zunahme, welche proportional zur Menge des gebildeten PCR-Produktes ist. Die Quantifizierung der PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes (CT-Wert). Der CT-Wert ist der PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Die Primer-Sequenzen für humane Zielgen-Analysen sind in Tabelle 3 dargestellt. Für die qPCR Reaktion wurden 2 µl vorverdünnte cDNA (1:4) in Aq dest. zu 3 µl Reaktionsgemisch (Tabelle 2) in eine LightCycler[®] Kapillare pipettiert. Alle Proben wurden doppelt angesetzt. Die Zielgen-Expression, basierend auf dem CT-Wert, wurde auf ein weiteres, nicht reguliertes „Housekeeping-Gen“ normalisiert. In den durchgeführten Versuchen wurde dafür *Hypoxanthin-Guanin-phosphoribosyltransferase (hprt)* verwendet. Die Berechnung der relativen Expression erfolgte über das Effizienz-korrigierte Modell bzw. Korrekturverfahren [215].

3. Material und Methoden

Tabelle 2. Reaktionsgemisch für die Real Time PCR

Komponente	Volumen pro Probe	Endkonzentration
10x FastStart DNA Master SYBR Green I	0.50 µl	1x
25 mmol/L MgCl ₂	0.80 µl	4 mmol/L
10 µmol/L Primer, vorwärts	0.25 µl	100 nmol/L
10 µmol/L Primer, rückwärts	0.25 µl	100 nmol/L
Aq dest.	1.20 µl	

Tabelle 3. Primer für qRT-PCR Analyse. E: Effizienz.

Gen	Sequenz im 5' – 3' -Format	Anlagerung bei	E
HPRT for HPRT rev	TggCTTATATCCAACACTTCgTg ATCAgACTgAAgAgCTATTgTAATgACCA	65°C	1,7
CD80 for CD80 rev	CCATgggCCACACACggAgg gTgCCCTCgTCAgATgggCg	63°C	1,86
CD86 for CD86 rev	ggAggTACggggAgCTCgCAAA TTggCATggCAggTCTgCAgTC	62°C	1,9

3.2.21. Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen wurden mittels GraphPad Prism™ 5 durchgeführt. Die Normalverteilung der gewonnenen Daten wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov- und dem D'Agostino & Pearson Omnibus Normalitäts Test überprüft. Die Analyse der Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen sowie der Frequenzen von CD38⁺- und CD23⁺ B-Zellen in der Vitamin D- und der Kontrollgruppe wurde mittels des zweifaktoriellen ANOVA und Bonferroni multiplen Vergleichstests durchgeführt. Die statistische Analyse der übrigen Lymphozyten-Parameter, einschließlich der Zytokin-Produktion der T-Zellen, wurde mittels Student's T-Test durchgeführt. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Die kategorialen Variablen wurden als die Anzahl oder der Prozentsatz der gemachten Beobachtungen beschrieben und die Daten entweder als Box-Plots mit Interquartilenabstand und dem Median, angedeutet als eine horizontale Linie, oder als Balkendiagramme mit Standardabweichungen graphisch dargestellt.

Die Assoziation zwischen CD38⁺ B-Zell Frequenzen und Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen wurde mittels der nichtlinearen Regression (Dosis-Wirkungs-Kurve), Receiver Operating Characteristic (ROC) und der Fläche unter der Kurve (AUC) bestimmt. Die Korrelation zwischen IFN-γ⁺-, IL-17⁺- T-Helfer-Zellen und Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen wurde mittels Dosis-Wirkungs-Kurve, ROC und AUC mit SPSS17.0 analysiert. Die ROC-Kurven beschreiben die Beziehung zwischen der richtig-positiv-

3. Material und Methoden

(Sensitivität) und der falsch-positiv- (1 - Spezifität) Rate für die verschiedenen Schwellenwerte (cut-off-Werte). Der cut-off-Wert mit der besten diskriminativen Leistung zeigt die höchste richtig-positiv-Rate und niedrigste falsch-positiv-Rate bzw. entspricht der Formel: Spezifität + Sensitivität - 1 = optimaler cut-off-Wert [216]. In dieser Arbeit wurde mittels der ROC-Kurven die Testleistung über einer Reihe von Serum 25(OH) Vitamin D₃ cut-off-Werten betrachtet. Dabei wurden die Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen als stetige Variablen und die Prozentsätze von CD38⁺-, CD23⁺- B- und IFN- γ ⁺-, IL-17⁺- T-Lymphozyten als binäre Variablen eingesetzt. Dafür wurden die Frequenzen der CD38⁺- und CD23⁺-B-Zellen auf die individuellen maximalen Werte normalisiert und in die binären Variablen umgewandelt. Als ein positives Ereignis = 1 (CD38-Induktion) wurden die Werte von $\geq 80\%$ der maximalen Expression und als ein negatives Ereignis = 0 (keine CD38-Induktion) die Werte $< 80\%$ der maximalen CD38-Expression definiert. Zusätzlich wurden die Procente der CD38⁺ B- Lymphozyten auf die individuelle Basisfrequenz normalisiert und als binäre Variablen für ein positives Ereignis = 1 (CD38-Induktion; $\geq 40\%$ über der Basisfrequenz) und ein negatives Ereignis = 0 (keine CD38-Induktion; $< 40\%$ über der Basisfrequenz) definiert. Zur Bestimmung des Serum 25(OH) Vitamin D₃-Schwellenwertes für die Modulation der T-Lymphozyten wurden die Procente von IFN- γ ⁺- und IL-17⁺ T-Zellen, wie auch für die CD38⁺ B-Zellen, auf die individuellen maximalen Werte normalisiert und als binäre Variablen für ein positives Ereignis = 1 (IFN- γ ⁺ T-Zell-Reduktion; $\leq 80\%$ der maximalen Frequenz), (IL-17⁺ T-Zell Reduktion $\leq 55\%$ der maximalen Frequenz) und ein negatives Ereignis = 0 (keine IFN- γ ⁺ T-Zell-Reduktion $> 80\%$ der maximalen Frequenz), (keine IL-17⁺ T-Zell-Reduktion $> 55\%$ der maximalen Frequenz) in der Analyse verwendet. Anschließend wurden die Sensitivität und die 1-Spezifität für jeden Serum 25(OH) Vitamin D₃ cut-off-Wert mittels der ROC-Kurve berechnet. Die *Area Under the Curve* (AUC) gab ein Maß für die Qualität des Tests an. Die Fläche kann Werte zwischen 0,5 und 1 annehmen. Je größer der AUC-Wert, desto besser ist die Test-Qualität.

4. Ergebnisse

4.1. Schwellenwert für die Modulation der B- und T-Lymphozyten

4.1.1. Anstieg der Serum 25(OH) Vitamin D₃-Spiegel nach der oralen Vitamin D₃-Einnahme

Dauer und Intensität der UV-Strahlung sind während der Wintermonate (Dezember bis März) unzureichend, um körpereigenes Vitamin D₃ zu produzieren [217]. Daher sind diese Monate geeignet, um den Einfluss von Vitamin D₃ u. a. auf immunologische Reaktionen mit Hilfe von exogenem zugeführtem Vitamin D₃ zu untersuchen. Vitamin D₃-defiziente Individuen (Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen ≤ 50 nmol/L) erhielten dazu monatlich steigende orale Dosen von Vitamin D₃ (Cholecalciferol) von bis zu 8000 Internationalen Einheiten (I.U.) (= 200 μ g) über 12 Wochen. Probanden ohne Vitamin D₃-Zufuhr dienten als Kontrollgruppe. Beide Studiengruppen waren vergleichbar hinsichtlich Alter, Geschlecht und basalen Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen.

Nach einer täglichen Einnahme von 2000 I.U. (= 50 μ g) Cholecalciferol über 4 Wochen stiegen die Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen auf $83,4 \pm 14,5$ nmol/L (Abbildung 10). Die Fortsetzung der täglichen Einnahme mit 4000 I.U. Vitamin D₃ (= 100 μ g) resultierte in einer weiteren Erhöhung des Serum 25(OH) Vitamin D₃-Spiegels bei 15 Individuen über den Wert von 110 nmol/L auf $148,3 \pm 33,9$ nmol/L. Die Vitamin D₃-Zufuhr wurde in dieser Gruppe aus Sicherheitsgründen gestoppt. Dies führte innerhalb der nächsten 4 Wochen zu abnehmenden 25(OH) Vitamin D₃-Serumkonzentrationen bis $96,1 \pm 20,1$ nmol/L ($P < 0,001$; Abbildung 10). Personen mit 25(OH) Vitamin D₃-Serumkonzentrationen unterhalb von 110 nmol/L ($97 \pm 16,9$; $n = 10$) erhielten täglich 8000 I.U. Vitamin D₃ (= 200 μ g) für weitere 4 Wochen, wodurch der Serum 25(OH) Vitamin D₃-Spiegel weiter auf $159,7 \pm 28,7$ nmol/L stieg ($P = 0,004$; Abbildung 10). In der Kontrollgruppe ohne exogene Vitamin D₃-Zufuhr sank dagegen der Serum 25(OH) Vitamin D₃-Spiegel kontinuierlich von $49,1 \pm 17,3$ nmol/L bis unter $30,0 \pm 12,5$ nmol/L ($P = 0,002$; Abbildung 10). Unerwünschten Nebenwirkungen traten im Zusammenhang mit der Vitamin D₃-Zufuhr nicht auf. Des Weiteren waren keine Veränderungen der Kalzium- und Phosphat-Serumkonzentrationen detektierbar (Daten nicht gezeigt).

4. Ergebnisse

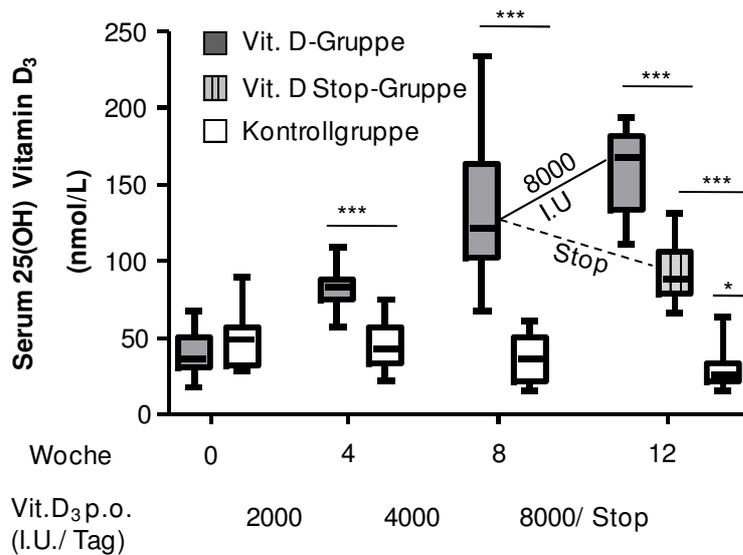


Abbildung 10. Einfluss der Cholecalciferol-Zufuhr auf den Serum 25(OH) Vitamin D₃-Spiegel.

Vitamin D₃-defiziente Personen (n = 25) erhielten steigende Dosen Cholecalciferol über ein Zeitraum von 12 Wochen. Die Einnahme resultierte in einer signifikanten Erhöhung der Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen nach Wochen 4 und 8. Nach Pausierung der Einnahme in einer Untergruppe von Personen (n = 15, siehe Text) sank der Serum 25(OH) Vitamin D₃-Spiegel. Personen mit Cholecalciferol-Einnahme (n = 25, graue Boxen). Individuen mit Unterbrechung der Cholecalciferol-Einnahme (n = 15, gestrichelte graue Boxen) und Kontrollgruppe (n = 18, offene Boxen). ANOVA-Test, * = P < 0,05, *** = P < 0.001, bezogen auf den Zeitpunkt 0.

4.1.2. Anstieg in Frequenzen der CD38⁺ peripheren B-Lymphozyten während oraler Vitamin D₃-Einnahme

Es sollte untersucht werden, ob der Phänotyp der B-Lymphozyten durch die exogene Vitamin D₃-Zufuhr beeinflusst wurde. Dafür wurden die Frequenzen der peripheren Blutzellpopulationen mittels Durchflusszytometrie während der oralen Vitamin D₃-Einnahme bestimmt. B-Zell-Subpopulationen wurden basierend auf ihrer Größe (FSC), Granularität (SSC) sowie der Expression von CD27 in CD27⁺-Gedächtnis-B-Zellen, CD27-naive B-Zellen [218] und CD38⁺⁺ CD27⁺⁺ Antikörper-sezernierende Zellen [219] unterschieden (Abbildung 11A, B). Da CD38 nach Aktivierung des Vitamin-D-Rezeptors (VDR) *in vitro* hochreguliert wird [20, 73], diente die CD38-Oberflächenexpression als Ersatzmarker, um die Vitamin D₃-responsiven B-Zellen zu identifizieren. Parallel dazu wurde die Oberflächenexpression von CD23 (niedrig-affiner IgE (Fc-epsilon) Rezeptor II) auf B-Zellen als ein Vitamin D₃-unabhängiger Marker berücksichtigt [19, 220]. Die Daten zeigen, dass die CD38⁺ B-Zell-Frequenzen in der Vitamin D-Gruppe nach 4-wöchiger Einnahme einer

4. Ergebnisse

Tagesdosis von 2000 I.U. Cholecalciferol anstiegen (von $3,7\% \pm 1,3$ auf $4,7\% \pm 1,7$; $P < 0,05$; Abbildung 11C). Ein stärkerer Anstieg wurde nach weiteren 4 Wochen oraler Vitamin D₃-Zufuhr mit 4000 I.U. beobachtet ($4,8\% \pm 2,0$; $P < 0,01$; Abbildung 11C). In den darauf folgenden 4 Wochen blieben die CD38⁺ B-Zell-Frequenzen bis zur Woche 12 stabil ($P > 0,05$). Im Gegensatz dazu waren die Frequenzen der CD38⁺ B-Zellen in der Kontrollgruppe unverändert ($4,0\% \pm 1,5$ unter $3,6\% \pm 1,1$; $P > 0,05$; Abbildung 11C). Die Frequenzen der Plasmazellen (CD38⁺⁺ CD27⁺⁺) zeigten keinen signifikanten Anstieg nach Cholecalciferol-Einnahme (Daten nicht gezeigt). Die Frequenzen der CD23⁺ B-Zellen blieben unabhängig von der Vitamin D₃-Zufuhr im Verlauf der Untersuchung stabil (im Mittel $6,4\% \pm 3,4$ bis $6,3 \pm 3,9\%$; $P > 0,05$; Abbildung 11D). Es wurden keine Änderungen in den Frequenzen der zirkulierenden naiven- und Gedächtnis-B-Zellen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

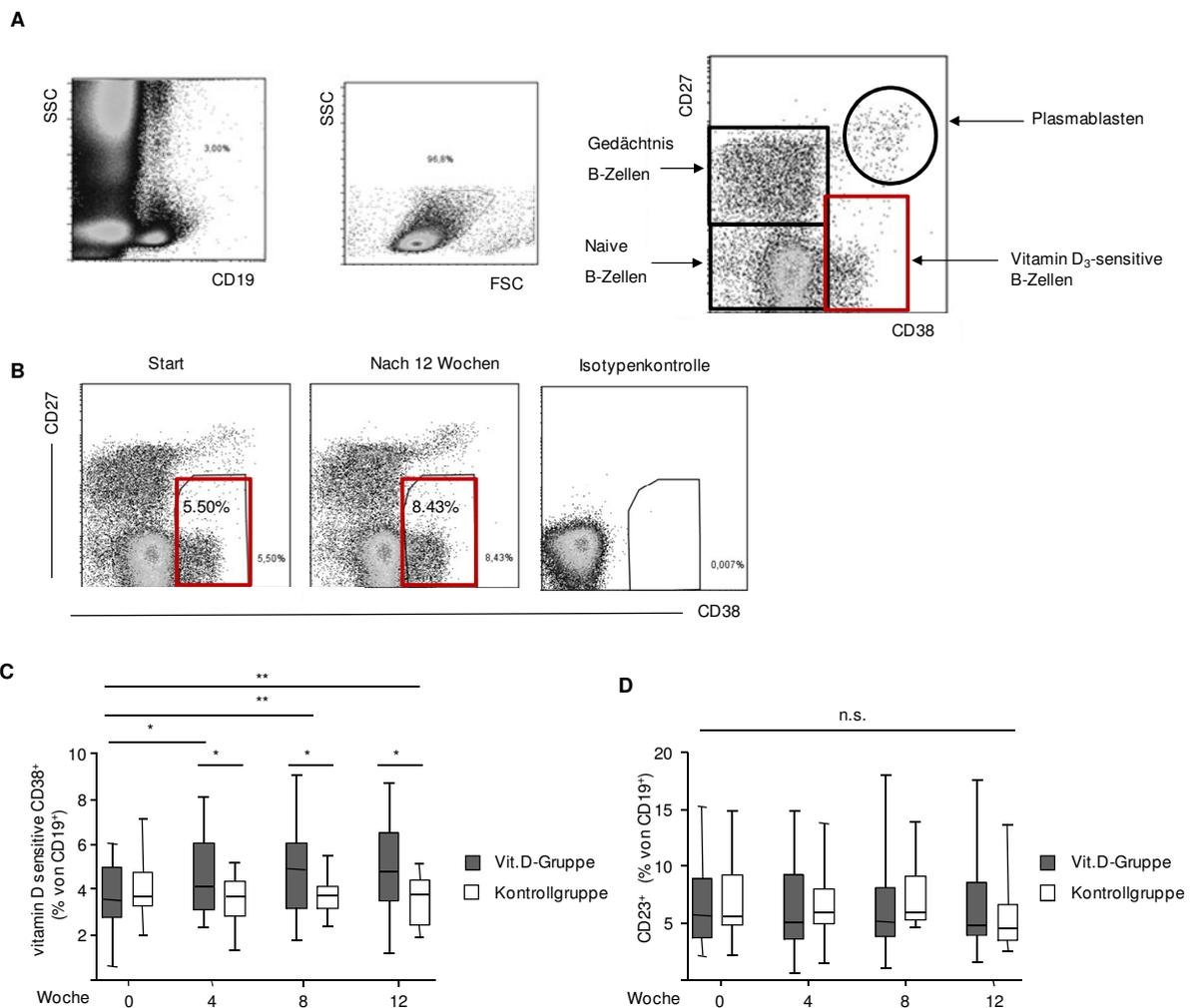


Abbildung 11. Steigende Frequenzen der CD38⁺ B-Zellen nach oraler Vitamin D₃-Einnahme. Die Frequenzen der CD38⁺, CD23⁺ B-Zellen und CD38⁺⁺ CD27⁺⁺ Plasmazellen wurden in beiden Untersuchungsgruppen gemessen. A) Die Gating-Strategie zur Identifikation naiver-, Gedächtnis-, Vitamin D₃-

4. Ergebnisse

sensitiver (rot umrandet) CD19⁺ B-Zellen sowie Plasmazellen. B) Die *ex vivo* CD38-Expression vor und nach 12-wöchiger Vitamin D₃-Einnahme. Abbildung (B) zeigt Dot-Plots fokussiert (gated) auf CD19⁺ B-Zellen eines repräsentativen Spenders und die Kontrolle mit einem unspezifisch-bindenden Antikörper gleichen Isotyps (Isotypenkontrolle). C) Die Frequenzen der CD38⁺ B-Zellen im zeitlichen Verlauf. Vitamin D-Gruppe (n = 25, graue Boxen), Kontrollgruppe (n = 18, offene Boxen). D) Wie unter Punkt (C), aber die Frequenzen CD19⁺, CD23⁺ B-Zellen. n.s. = nicht signifikant, * = P < 0,05, ** = P < 0,01.

4.1.3. 25(OH) Vitamin D₃-abhängige Induktion der CD38-Expression auf peripheren B-Zellen *in vitro*

Obwohl bekannt ist, dass die biologisch aktive Form von Vitamin D₃ (Calcitriol) die CD38-Expression auf Lymphozyten *in vitro* induzieren kann [76], ist es unklar, ob in der Anwesenheit von 25(OH) Vitamin D₃ die CD38-Expression hochreguliert wird und welche 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen für Induktion von CD38 auf B-Lymphozyten ausreichend sind. Um zu bestimmen, ob zunehmende Konzentrationen von 25(OH) Vitamin D₃ infolge einer direkten Wirkung auf die B-Zellen die CD38-Oberflächenexpression *in vitro* induziert, wurden periphere CD19⁺ B-Zellen isoliert und anschließend über den Antigen-Rezeptor (BCR), CD40, den IL-4-Rezeptor und den Toll-like Rezeptor-9 (TLR-9) in Anwesenheit von 25(OH) Vitamin D₃ (50 nmol/L, 100 nmol/L) oder Calcitriol (1 µmol/L) stimuliert. Die gewählte Aktivierung der B-Zellen induziert die Expression von CYP27B1 und ermöglicht somit die Synthese von Calcitriol direkt aus der Vorstufe 25(OH) Vitamin D₃ [20]. Nach 5 Tagen Inkubation wurde die CD38-Oberflächenexpression auf vitalen (7-AAD^{neg}, Abbildung 12A) B-Zellen mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Die Daten zeigen eine 1,7-fach höhere mittlere Fluoreszenzintensität (MFI; ein Maß für die Menge des gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes pro Zelle) nach Aktivierung (von basal 5,5% positiv, MFI 11 zu 7% positiv, MFI 19; Abbildung 12B). Obwohl die zusätzlichen 50 nmol/L 25(OH) Vitamin D₃ keinen signifikanten Einfluss auf die CD38-Expression hatten (8% positiv, MFI 19,5), wurde eine starke Induktion bei höheren Konzentrationen von mehr als 100 nmol/L 25(OH) Vitamin D₃ (40% positiv, MFI 36) bzw. 1 µmol/L Calcitriol (50% positiv, MFI 47) ermittelt. Die detaillierte Analyse nach Zugabe von 25(OH) Vitamin D₃ im Konzentrationsbereich zwischen 75 nmol/L und 100 nmol/L zeigte starke interindividuelle Schwankungen hinsichtlich der CD38-Expression. Sowohl 25(OH) Vitamin D₃ als auch Calcitriol hatten keinen Einfluss auf die B-Zellvitalität (Daten nicht gezeigt).

4. Ergebnisse

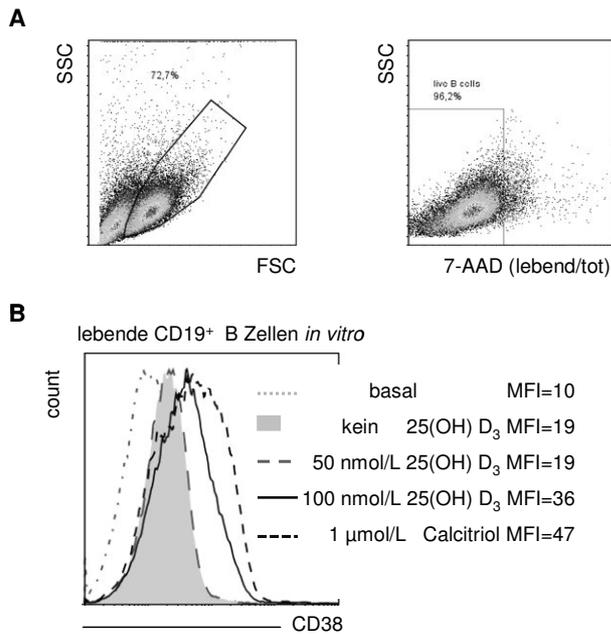


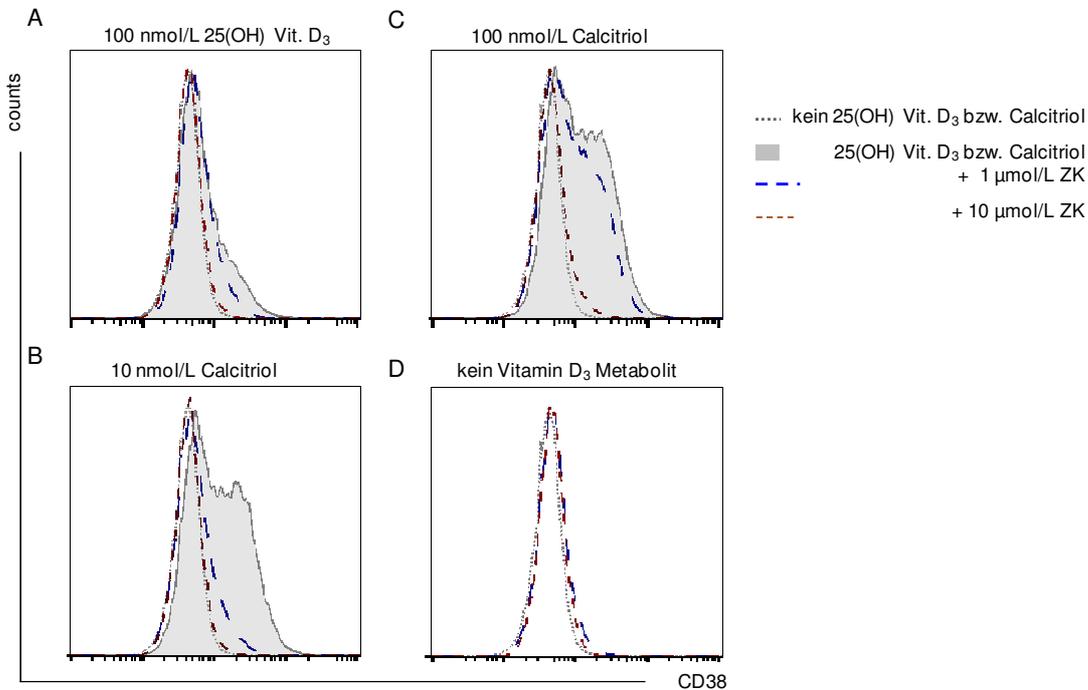
Abbildung 12. 25(OH) Vitamin D₃-abhängige Induktion der CD38-Expression auf B-Zellen *in vitro*. Die CD38-Expression auf mit (anti-CD40 (1 µg/ml), rhIL-4 (10 ng/ml), anti-BCR (2 µg/ml) CpG2006 (3 µg/ml) aktivierten B-Zellen. A) Die Gating-Strategie beinhaltet den Einschluss von Lymphoblasten gefolgt von dem Ausschluss 7-AAD-positiver (nekrotischen) B-Zellen. B) CD19⁺ B-Zellen in Gegenwart von steigenden 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen oder Calcitriol (Positivkontrolle) für 5 Tage. Overlays sind auf lebende B-Zellen selektiert. 1 von 4 unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

4.1.4. *In vitro*-Hemmung der Vitamin D₃-abhängigen CD38-Expression auf B-Zellen mit dem VDR-Antagonisten ZK159222

Um zu untersuchen, ob die CD38-Expression auf B-Zellen VDR abhängig ist, wurde der VDR-Antagonist ZK159222 (ZK) [214] in Konzentrationen von 10 µmol/L und 1 µmol/L zu den mit anti-BCR, anti-CD40, IL-4, TLR9 stimulierten B-Zellen in Gegenwart von 25(OH) Vitamin D₃ (100 nmo/L) oder Calcitriol (10 nmol/L und 100 nmo/L) hinzugegeben. Nach 5 Tagen Inkubation wurden die B-Zellen mit einem fluoreszierenden Antikörper gegen CD38 gefärbt und die Oberflächenexpression auf 7-AAD^{neg} B-Zellen mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Die Daten zeigen, dass die Zugabe des VDR-Anatogisten sowohl die 25(OH) Vitamin D₃- (Abbildung 13A) als auch die Calcitriol- (Abbildung 13B, C) induzierte CD38-Oberflächenexpression in dosisabhängiger Weise reduzierte. Der VDR-Antagonist allein bewirkt keine Modulation der CD38-Expression auf stimulierten B-Zellen (Abbildung 13D). Die MFI-Werte für die CD38-Oberflächenexpression

4. Ergebnisse

sind in Abbildung 13E zusammengefasst. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die endogene Calcitriol-Synthese und die darauf folgende VDR-Aktivierung bei B-Zellen die CD38-Oberflächenexpression induziert.



E

Stim., Verdünnung	MFI		
	kein Antagonist	Antagonist 1 µmol/L	Antagonist 10 µmol/L
Vitamin D ₃ kein	41	47	46
25(OH) Vit. D ₃ 100 nmol/L	56	53	43
Calcitriol 10 nmol/L	101	49	43
Calcitriol 100 nmol/L	105	80	44

Abbildung 13. Der VDR-Antagonist ZK159222 (ZK) hemmt die Vitamin D₃-Metaboliten-abhängige CD38-Expression auf aktivierten CD19⁺ B-Zellen. CD19⁺ B-Zellen wurden mit anti-CD40, rhIL-4, CpG2006 und anti-BCR aktiviert (grau gestrichelt). Es wurden folgende Vitamin D₃-Metaboliten zusätzlich hinzugegeben (graue Fläche) A) 25(OH) Vitamin D₃ 100 nmol/L. B) Calcitriol 10 nmol/L oder C) Calcitriol 100 nmol/L. D) Kein Vitamin D₃-Metabolit. Histogramme sind fokussiert auf vitale (7-AAD^{neg}) B-Zellen. Die VDR-Aktivität wurde mit einem Antagonisten (ZK 159222) entgegengewirkt (1 µmol/L dünn blau gestrichelt, 10 µmol/L dick orange). E) Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der CD38-Oberflächenexpression auf B-Zellen. Die Daten zeigen 1 repräsentatives von 4 durchgeführten Experimenten.

4. Ergebnisse

4.1.5. Analyse der humoralen Immunantwort nach Vitamin D₃-Supplementierung

Es wurde berichtet dass, die biologisch aktive Form von Vitamin D₃ (Calcitriol) direkte Auswirkungen auf B-Zell-Antworten inklusive Plasmazelldifferenzierung und Immunglobulin-Produktion hat [19]. Unter anderem hemmt Calcitriol die IgE-Produktion in anti-CD40 + IL-4-stimulierten B-Zellen *in vitro* [74]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der Serum 25(OH) Vitamin D₃-Status negativ mit dem Gesamt-IgE assoziiert ist [130, 131]. Deshalb wurden die Serum-Konzentrationen der Immunglobuline A (IgA), G (IgG), E (IgE) und M (IgM) vor und nach der Vitamin D₃-Supplementierung mittels ELISA bestimmt und mit der Kontrollgruppe verglichen. In der Tabelle sind die Serum-Immunglobulin-Konzentrationen als Mittelwert \pm Standardabweichung (SA) zusammengefasst. Die IgA-, IgG- und IgM-Serum-Konzentrationen blieben sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Vitamin D-Gruppe über den gesamten Zeitraum von 12 Wochen unverändert. Die Serum IgE-Konzentrationen von Probanden mit allergischen Erkrankungen wurden separat von denen gesunder Individuen betrachtet, da bei Allergikern höhere Gesamt-IgE-Werte nachweisbar sind [221, 222]. Wie aus Tabelle 4 entnommen werden kann, kam es zu einem geringen, nicht-signifikanten Abfall der Serum-IgE-Konzentrationen in der Kontroll- und der Vitamin D-Gruppe nach 12 Wochen.

Tabelle 4. Serum Immunglobulin-Konzentrationen in Vitamin D- und Kontrollgruppe.

Die Daten sind als Mittelwert \pm SA dargestellt.

Immunglobuline	Gruppe	Zeit in Wochen	
		0	12
IgA (mg/dl)	(n=25) Vitamin D	410 \pm 135	413 \pm 136; P=0,7
	(n=17) Kontrolle	404 \pm 93	409 \pm 103; P=0,8
IgE (Allergiker) (U/ml)	(n=15) Vitamin D	305 \pm 203	245 \pm 171; P=0,1
	(n=8) Kontrolle	270 \pm 143	241 \pm 130; P=0,3
IgE (Gesunde) (U/ml)	(n=10) Vitamin D	47 \pm 23	36 \pm 19; P=0,09
	(n=7) Kontrolle	40 \pm 21	37 \pm 18; P=0,1
IgG (mg/dl)	(n=25) Vitamin D	535 \pm 191	533 \pm 199; P=0,9
	(n=17) Kontrolle	559 \pm 89	563 \pm 108; P=0,8
IgM (mg/dl)	(n=25) Vitamin D	249 \pm 103	265 \pm 105; P=0,1
	(n=17) Kontrolle	241 \pm 101	253 \pm 99; P=0,1

4.1.6. Bestimmung eines Serum 25(OH) Vitamin D₃-Schwellenwertes für die B-Lymphozyten Modulation

Basierend auf den bisherigen *ex vivo* und *in vitro* Untersuchungen in dieser Arbeit, sind 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen zwischen 50 nmol/L und 100 nmol/L für eine Erhöhung der VDR-abhängigen CD38-Expression auf B-Zellen notwendig. Um ausreichende Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen für die CD38-Induktion *in vivo* zu bestimmen, wurden zunächst die Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen mit den Frequenzen von CD38⁺ B-Zellen unter Verwendung der nicht-linearen Regressionsanalyse korreliert. In Abbildung 14 sind die Serum 25(OH)Vitamin D₃-Konzentrationen auf der X-Achse und auf der Y-Achse die korrespondierenden Frequenzen der CD38⁺ B-Zellen (normalisiert auf die individuelle maximale Frequenz) aufgetragen. Die Kurve weist eine sigmoidale Verlaufsform auf gekennzeichnet durch einen steilen Anstieg beginnend bei 61 nmol/L Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentration. Das Plateau bzw. die maximale Wirkung bezüglich der CD38-Oberflächenexpression wird bei 68 nmol/L Serum 25(OH) Vitamin D₃ erreicht (Abbildung 14A). Um die oben beschriebenen Ergebnisse noch einmal mit einer anderen Analysemethoden zu überprüfen, wurde die ROC-Kurven-Analyse angewendet. In einem ROC-Kurven-Diagramm wird die richtig-positiv-Rate (Sensitivität) gegen die falsch-positiv-Rate (1-Spezifität) für unterschiedliche cut-off-Werte des Serum 25(OH) Vitamin D₃ aufgetragen. Der Punkt auf dem Graphen mit der höchsten Summe von richtig-positiv-Raten und 1- falsch-positiv-Raten repräsentiert den optimalen cut-off-Wert für die Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentration-abhängige CD38-Induktion auf B-Zellen. Die Ergebnisse der ROC-Kurven Analyse zeigten 68 nmol/L Serum 25(OH) Serum Vitamin D₃ als cut-off-Wert für die Assoziation mit einer Erhöhung der CD38-Expression (AUC = 0,73; Sensitivität = 0,85; 1-Spezifität = 0,38; Youden Index = 0,46; Abbildung 14B). Eine weitere ROC-Kurven Analyse mit Prozenten der CD38⁺ B-Zellen, normalisiert auf die individuelle Basisfrequenz, bestätigte 68 nmol/L Serum 25(OH) Vitamin D₃ als Schwellenwert für die CD38-Induktion (AUC = 0,71; Sensitivität = 0,97; 1-Spezifität = 0,5; Youden Index = 0,46; Daten nicht gezeigt). Mit einem ähnlichen Ansatz durchgeführt, ergab die ROC-Kurven-Analyse nur eine zufällige Assoziation der CD23-Expression mit den Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen (AUC = 0,55; Abbildung 14C), da die AUC von 0,5 keinen diskriminativen Wert angibt. Zusammenfassend deuten die Daten auf Serum 25(OH) Vitamin D₃-

4. Ergebnisse

Konzentrationen von über 68 nmol/L als ausreichend, um eine Erhöhung der CD38-Expression auf B-Lymphozyten zu bewirken.

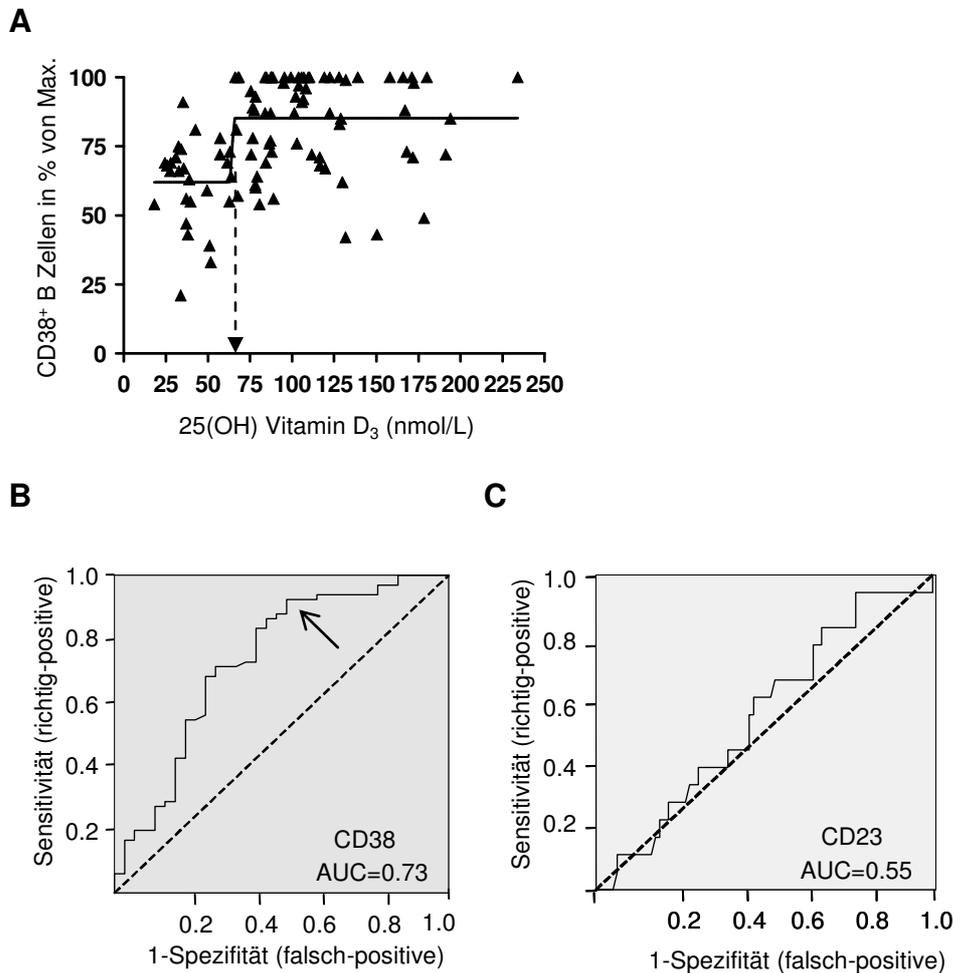


Abbildung 14. Berechnung der 25(OH) Vitamin D₃-Konzentration für die B-Lymphozyten

Modulation *in vivo*. A) Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen wurden gegen korrespondierende Frequenzen von CD38⁺ B-Zellen (normalisiert auf individuelle maximale Frequenz) aufgetragen. Der Pfeil zeigt den Schwellenwert an. B) ROC-Kurven-Analyse zur Bestimmung der 25(OH) Vitamin D₃ cut-off-Werte, assoziiert mit steigenden Frequenzen von CD38⁺ B-Zellen als binäre Variable ($1 \geq 80\%$, siehe Text). C) Wie unter (B), aber CD23⁺ als binäre Variable. Der schwarze Pfeil gibt die cut-off-Werte für Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentration assoziiert mit der B-Lymphozyten Modulation an. Die gestrichelte Linie bei 45° zeigt keine Trennschärfe (AUC = 0,5).

4.1.7. Verminderte Frequenzen der zirkulierenden IFN- γ ⁺- und IL-17⁺ T-Helfer-Zellen nach Vitamin D₃-Einnahme

Um zu untersuchen, ob das Zytokinprofil der peripheren T-Zellen durch die Vitamin D₃-Supplementierung moduliert werden kann, wurde jeweils 1 ml Vollblut polyklonal mit dem Superantigen SEB und anti-CD28 monoklonalen Antikörpern (siehe 3.2.5) stimuliert. Anschließend wurden die Erythrozyten mittels Lyse entfernt, die Lymphozyten permeabilisiert und mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern intrazellulär markiert. Die Frequenzen der aktivierten CD154⁺ und IFN- γ ⁻, IL-4⁻, IL-17⁻ und IL-10-produzierenden Zellen wurden in der Vitamin D-Gruppe mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt und mit der Kontrollgruppe verglichen. Abgeleitet aus dem Lymphozytengate (Abbildung 15A), waren die Frequenzen der CD45RA⁺ naiven und CD45RA⁻ Gedächtnis-T-Zellen sowie die durch SEB-Restimulation induzierten CD154⁺ T-Zellen in beiden Gruppen vergleichbar und blieben zwischen Woche 0 und Woche 12 unverändert (Tabelle 5). Die Auswertung der intrazellulären Zytokinexpression in CD154⁺CD4⁺ T-Helfer-Zellen zeigte nach 12 Wochen eine deutlich verminderte Frequenz der IFN- γ (von 20,1% \pm 7 zu 16,8% \pm 5,2; P < 0,001) sowie IL-17 (von 1,64% \pm 0,64 zu 1,01% \pm 0,57; P < 0,001) produzierenden T-Zellen in der Vitamin D-Gruppe (Abbildung 15B-D), jedoch nicht in der Kontrollgruppe (Abbildung 15C, D). Die Frequenzen der IL-4⁺ T-Helfer-Zellen zeigten einen leichten, aber nicht-signifikanten Rückgang (Tabelle 5, Abbildung 15) sowohl bei Allergikern als auch bei gesunden Probanden in der Vitamin D- und der Kontrollgruppe (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu blieben die Frequenzen der IL-10-sezernierenden T-Zellen in beiden Gruppen stabil (Tabelle 5, Abbildung 15F).

4. Ergebnisse

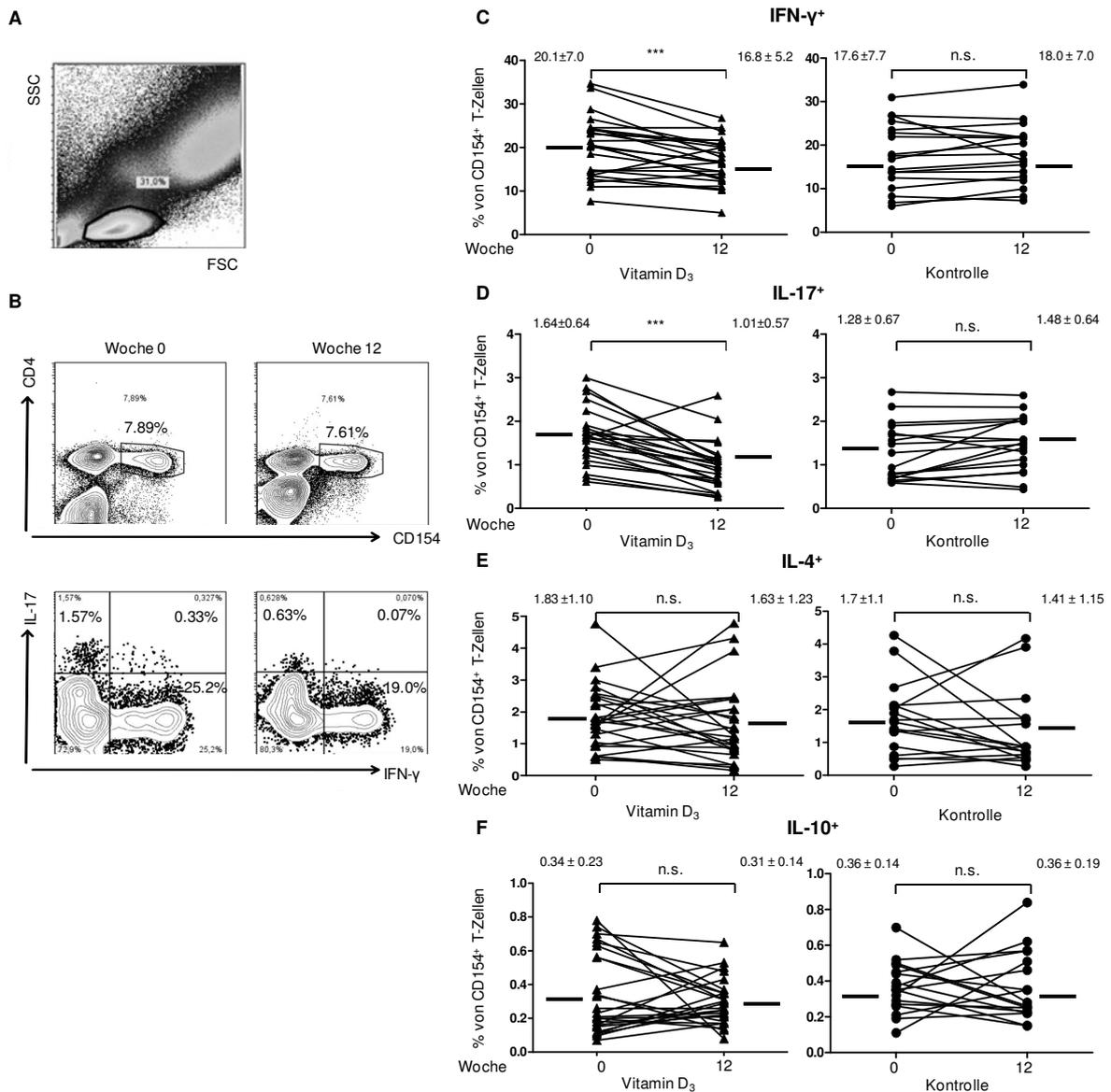


Abbildung 15. Verminderte Frequenzen der IFN- γ - und IL-17 produzierenden T-Zellen nach Vitamin D₃-Zufuhr. Intrazelluläre Zytokin Expression in *ex vivo* stimulierten peripheren CD4⁺ T-Zellen vor und nach 12 Wochen der Studie. A) Lymphozyten-Gate. B) CD4⁺ CD154⁺, IFN- γ ⁺- und IL-17⁺ T-Zell Frequenzen. Eine repräsentative Färbung eines einzelnen Individuums aus der Vitamin D-Gruppe. C) Die Häufigkeit von IFN- γ ⁺ T-Zellen innerhalb der Vitamin D- (n = 25) oder Kontrollgruppe (n = 18). D), E), F) gemäß (C), aber die Frequenzen der IL-17⁺-, IL-4⁺- und IL-10⁺ T-Helfer-Zellen. Alle Daten repräsentieren die Frequenzen der Zytokin-produzierenden T-Zellen in Prozent der CD4⁺ CD154⁺ T-Zellen, *** = P < 0,001.

4. Ergebnisse

Tabelle 5. Subpopulationen, Aktivierung und Zytokinprofil der T-Helfer-Zellen.

Zusammenfassung der Frequenzen von naiven ($CD4^+ CD45RA^+$), Gedächtnis- ($CD4^+ CD45RA^+$), nach Stimulation aktivierten ($CD4^+ CD154^+$) sowie Zytokin-produzierenden T-Helfer-Zellen,

* Frequenzen in Prozent der $CD4^+ CD154^+$ T-Zellen, ^{###} $P < 0,001$.

Oberflächenmarker/ Zytokin	Gruppe	Zeit (Wochen)			
		0	4	8	12
$CD4^+ CD45RA^+$	Vitamin D	23,6 ± 8,9	23,1 ± 10	23,2 ± 8,9	23,3 ± 9,4
	Kontrolle	22,3 ± 9,7	22,7 ± 9,3	22,8 ± 8,1	22,7 ± 9,8
$CD4^+ CD45 RA^-$	Vitamin D	22,7 ± 5	22,5 ± 4,6	22,3 ± 4,2	21,2 ± 5
	Kontrolle	20,5 ± 4,2	20 ± 3,1	21,4 ± 4,5	20 ± 4,2
$CD4^+ CD154^+$	Vitamin D	4,9 ± 3,1	5,0 ± 3,1	5,4 ± 2,9	5,2 ± 2,8
	Kontrolle	4,5 ± 2,4	4,5 ± 2,5	4,5 ± 2,7	4,5 ± 2,6
*IFN- γ^+	Vitamin D	20,1 ± 7,0	17,1 ± 5,6	17,3 ± 6,4	16,8 ± 5,2 ^{###}
	Kontrolle	17,6 ± 7,7	17,8 ± 7,6	17,9 ± 7,8	18 ± 7
*IL-4 ⁺	Vitamin D	1,83 ± 1,1	1,51 ± 1,05	1,36 ± 0,62	1,63 ± 1,23
	Kontrolle	1,7 ± 1,1	1,60 ± 1	1,58 ± 0,96	1,41 ± 1,15
*IL-10 ⁺	Vitamin D	0,34 ± 0,23	0,26 ± 0,15	0,30 ± 0,14	0,31 ± 0,14
	Kontrolle	0,36 ± 0,14	0,30 ± 0,11	0,36 ± 0,06	0,36 ± 0,19
*IL-17 ⁺	Vitamin D	1,64 ± 0,64	1,12 ± 0,53	1,13 ± 0,41	1,01 ± 0,57 ^{###}
	Kontrolle	1,28 ± 0,67	1,38 ± 0,51	1,32 ± 0,52	1,48 ± 0,64

4.1.8. Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen für die Modulation von T-Zellen

Zur Bestimmung der Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen steigenden Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen und der Reduktion der Frequenzen von Th1- und Th17-Zellen wurden die Prozentsätze von IFN- γ - und IL-17-produzierenden T-Helfer-Zellen auf die individuellen maximalen Frequenzen normalisiert und mittels Dosis-Wirkungskurve analysiert. Wie in

4. Ergebnisse

Abbildung 16A dargestellt, zeigt der Kurven-Verlauf eine Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentration von 77 nmol/L für IFN- γ - und in Abbildung 16B eine Konzentration von 68 nmol/L für IL-17 als ausreichend, um die Frequenzen der zirkulierenden IFN- γ ⁺-und IL-17⁺ T-Helfer-Lymphozyten zu reduzieren. Die ROC-Kurven-Analyse mit den Prozenten der IFN- γ ⁺ und IL-17⁺ T-Helfer-Lymphozyten (normalisiert auf die individuellen maximalen Frequenzen) identifizierte 66 nmol/L 25(OH) Vitamin D₃ im Serum als cut-off-Wert für die Assoziation einer Reduktion der IFN- γ ⁺ T-Zellen (AUC = 0,68; Sensitivität = 0,95; 1-Spezifität = 0,53; Youden Index = 0,42; Abbildung 16C) sowie für die Assoziation mit einer Reduktion der IL-17⁺ T-Zellen (AUC = 0,73; Sensitivität = 0,98; 1-Spezifität = 0,54; Youden Index = 0,46; Abbildung 16D).

Zusammenfassend zeigen die Analysen der Veränderungen in den Frequenzen von CD38⁺ B- und der Zytokin-produzierenden T-Zellen, dass Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen von über 70 nmol/L für die Modulation der B- und T-Lymphozyten ausreichend sind.

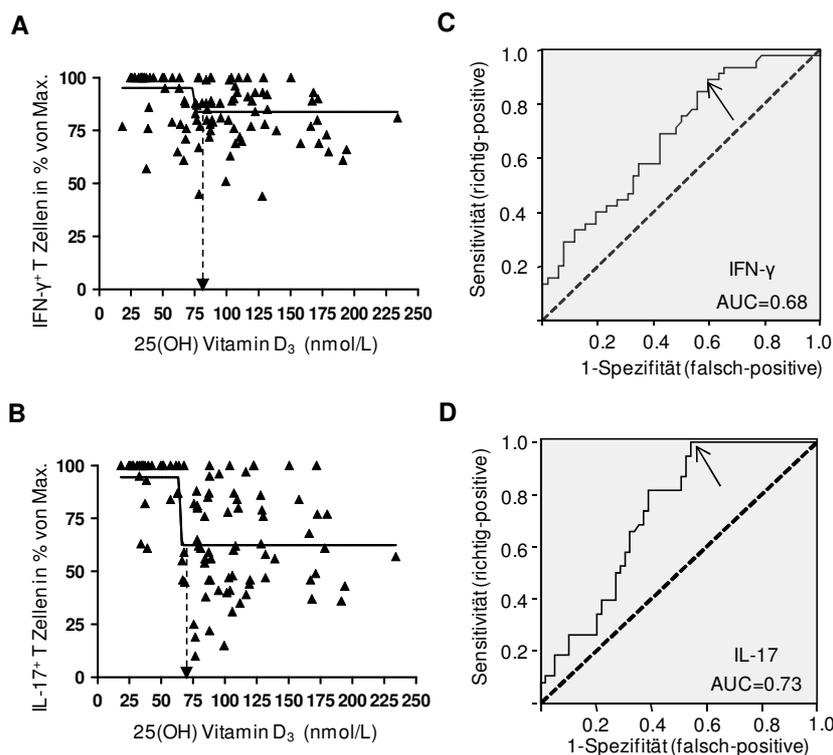


Abbildung 16. Berechnung der 25(OH) Vitamin D₃-Konzentration für die T-Lymphozyten Modulation *in vivo*. A) Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen wurden gegen die korrespondierenden Frequenzen der IFN- γ ⁺ T-Zellen (normalisiert auf die individuelle maximale Frequenz) aufgetragen. Der Pfeil zeigt auf den 25(OH) Vitamin D₃-Spiegel, welcher mit einer verminderten Frequenz von IFN- γ ⁺ T-Zellen assoziiert ist. B) Wie unter (A), aber die Analyse der IL-17⁺ T-Zellen. C) ROC-Kurven Analyse zur Bestimmung der 25(OH) Vitamin D₃-Konzentration als cut-off-Wert, assoziiert mit den verminderten

4. Ergebnisse

Frequenzen der IFN- γ^+ T-Zellen als binäre Variable ($1 \leq 80\%$, siehe Text). D) Wie unter (C), aber die Frequenzen von IL-17 $^+$ T-Zellen. Der schwarze Pfeil gibt die 25(OH) Vitamin D₃ cut-off-Konzentration, assoziiert mit der T-Lymphozyten Modulation. Die gestrichelte Linie bei 45° zeigt keine Trennschärfe (AUC = 0,5).

4.2. Vitamin D₃ im klinischen Einsatz

4.2.1 Vitamin D₃-Einnahme erhöht die Effizienz der Antigen-spezifischen Vakzinierung

Das immunologische Gedächtnis sowie die zelluläre und humorale Immunantwort werden durch Lymphozyten mit einem definierten Antigen-spezifischen Rezeptor vermittelt. In dem vorangegangenen Kapitel wurde die Antigen-unspezifische Immunmodulation der B- und T-Lymphozyten durch Vitamin D₃ gezeigt. Um die Wirkung von Vitamin D₃ auf die Antigen-spezifischen Immunantworten in einem klinisch-relevanten Kontext zu zeigen und darüber hinaus zu bestimmen, ob die sekundäre Immunantwort gegen ein definiertes Antigen durch Vitamin D₃ beeinflusst werden kann, wurde während der Vitamin D₃-Supplementierung eine Tetanustoxoid-Impfung im Rahmen einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie verabreicht. Die Grundimmunisierung mit Tetanustoxoid (TT) induziert eine stabile humorale Immunität mit einer errechneten Halbwertszeit der Serum-anti-Tetanus-Antikörpertiter von 11 Jahren [223]. Nach einer Auffrischung der TT-Impfung können die bereits vorhandenen TT-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen nach Antigenkontakt in den sekundären lymphatischen Organen proliferieren und zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen differenzieren. Anschließend kann die sekundäre Immunantwort anhand der Frequenzen von zirkulierenden TT-spezifischen Plasmablasten im peripheren Blut und anhand des anti-Tetanus-Antikörpertiters im Serum bestimmt werden [224].

Gesunde Probanden bekamen täglich 2000 I.U. Vitamin D₃ über einen Zeitraum von 10 Wochen. Als Vergleichsgruppe dienten Individuen mit Placebo-Kontrolle. Nach 9 Wochen der Studie erhielten alle Teilnehmer eine sekundäre Immunisierung mit einem kombinierten Tetanus/Diphtherie-Impfstoff (Td-Merieux, Sanofi Pasteur). 4 Wochen nach Immunisierung wurden die TT-spezifischen IgG-, IgA- und IgE-Antikörpertiter im Serum der Probanden bestimmt.

Es wurde ein signifikanter Anstieg der Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen nach 10 Wochen Vitamin D₃-Einnahme beobachtet. In der Placebogruppe dagegen konnte ein Rückgang der Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen festgestellt werden (Abbildung

4. Ergebnisse

17A). Infolge der sekundären TT-Immunsierung war die TT-spezifische Serum-IgG-Konzentration sowohl in der Vitamin D-Gruppe ($29,8 \pm 14,8$ I.U.; $P < 0,001$) als auch in der Placebogruppe ($21,0 \pm 13,3$ I.U.; $P < 0,001$) deutlich erhöht. Im Vergleich zur Placebogruppe waren die TT-spezifischen Serum-IgG-Konzentrationen in der Vitamin-D-Gruppe geringfügig höher (Abbildung 17B; $P < 0,05$). Darüber hinaus konnte eine positive Korrelation zwischen den steigenden 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen und den TT-spezifischen IgG-Konzentrationen im Serum beobachtet werden ($P < 0,05$; Abbildung 17C). Nach der Immunsierung waren TT-spezifisches IgA und IgE, die Frequenzen der zirkulierenden Tetanus-spezifischen Plasmablasten sowie naive und Gedächtnis-B-Zellen vergleichbar in beiden Gruppen ($P > 0,05$; Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann man die Vitamin D₃-Einnahme als gut verträglich beschreiben, ohne Auftreten von toxischen Nebenwirkungen (z.B. Hyperkalzämie) oder anderen unerwünschten Ereignissen. Es konnte eine höhere Effizienz der TT-Immunsierung mit steigenden Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen beobachtet werden.

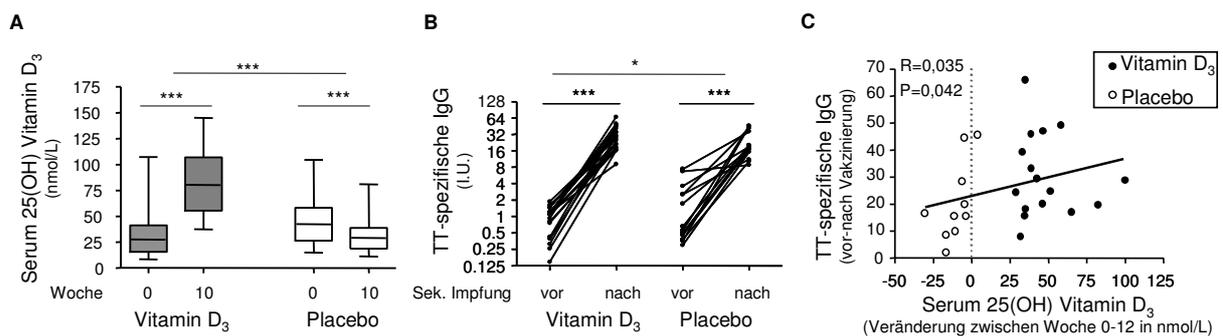


Abbildung 17. Effiziente Induktion der TT-spezifischen IgG-Antikörpertiter nach Immunisierung und Vitamin D₃-Zufuhr. A) 2000 I.U. Vitamin D₃ oder Placebo wurde für 10 Wochen während der Wintersaison supplementiert. Die Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen wurden vor und nach der Supplementierung mittels ELISA bestimmt. B) TT-spezifische Serum IgG-Konzentrationen vor und nach der sekundären TT-Immunsierung in der Vitamin D- und Placebogruppe. C) Positive Korrelation zwischen TT-spezifischen IgG-Antikörpertiter (Konzentrationen vor- und nach der Immunisierung) und Veränderungen der Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen während der Studie (vor- und nach der Supplementierung), * = $P < 0,05$; *** = $P < 0,001$, [225].

4. Ergebnisse

4.2.2. Effekte der Vitamin D₃-Einnahme auf Lymphozyten während der Allergen-spezifischen Immuntherapie

Eine weitere Möglichkeit die Effekte von Vitamin D₃ auf die Antigen-spezifischen Immunantworten in einem klinisch-relevanten Setting zu untersuchen, stellt die kontrollierte Vitamin D₃-Supplementierung während der spezifischen Immuntherapie (SIT) dar.

Im Rahmen einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie wurden 5300 I.U./Tag Vitamin D₃ oder Placebo zusammen mit schrittweise steigender Dosierung des Gräserpollen-Allergens während der Wintermonate über einen Zeitraum von 16 Wochen an Probanden mit diagnostizierter allergischer Erkrankung verabreicht. Vor und nach der Supplementierung wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) aus dem Vollblut isoliert und B- sowie T-Lymphozyten näher analysiert. Die Studie ist auf 3 Behandlungsjahre ausgelegt und startete 2011. Im ersten Studienjahr wurden T-Helfer-Zellen und die Zytokin-Produktion der Gräserpollen-spezifischen T-Zellen untersucht. Darüber hinaus wurde die Frequenzen der CD38⁺ B-Zellen als ein VDR-abhängiger Marker bestimmt. Im zweiten Studienjahr wurden die Frequenzen der IL-10-produzierenden B-Zellen untersucht.

Da die vorliegende Studie zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit noch verblindet ist, sind die Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen nicht bekannt. Deshalb müssen die Ergebnisse als vorläufig betrachtet werden.

Um das Zytokinprofil der Gräserpollen-spezifischen T-Zellen zu untersuchen wurden bis zu periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) mit Gräserpollen-Extrakt + anti-CD28 monoklonalen Antikörper oder SEB + anti-CD28 als die Positivkontrolle stimuliert. Nach 6-stündiger Stimulation wurden die Zellen permeabilisiert und mit einem Antikörper-Mix gegen CD154, CD4, CD14, IFN- γ und IL-4 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. In Abbildung 18A sind exemplarisch die Frequenzen der aktivierten (CD154⁺) IFN- γ ⁺ und IL-4⁺- Gräserpollen-spezifischen T-Helfer-Zellen dargestellt. In Abbildung 18B sind die Frequenzen der Gräserpollen-spezifischen IFN- γ ⁺ und in Abbildung 18C die Frequenzen der IL-4⁺ T-Zellen zusammengefasst. Bei der Betrachtung der Ergebnisse kann man zwei Muster erkennen. Das erste Muster zeigt steigende Frequenzen der IFN- γ ⁺ und IL-4⁺ T-Zellen. Das zweite Muster deutet auf stabile bzw. abnehmende Frequenzen der Zytokin-produzierenden T-Zellen nach 16 Wochen der Studie hin (Abbildung 18B, C). Auch die Frequenzen der CD38⁺ B-Zellen weist eine ähnliche Verteilung auf (Abbildung 18D). Bezogen auf die Gesamtgruppe aller Probanden wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen vor und nach 16 Wochen der SIT hinsichtlich der Gräserpollen-spezifischen IL-4⁺ T-Zellen ($P < 0,05$) sowie zirkulierenden CD38⁺ B-Zellen ($P < 0,01$) festgestellt. Zusätzlich wurde ein

4. Ergebnisse

Frequenzanstieg der Gräserpollen-spezifischen B-Zellen nach 16 Wochen der Studie beobachtet ($P < 0,05$; Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Verblindung der klinischen Untersuchung, die insgesamt 3 Jahre durchgeführt wird, kann es zurzeit jedoch keine Aussage darüber gemacht werden, ob diese Muster mit Vitamin D₃-Einnahme im Zusammenhang stehen.

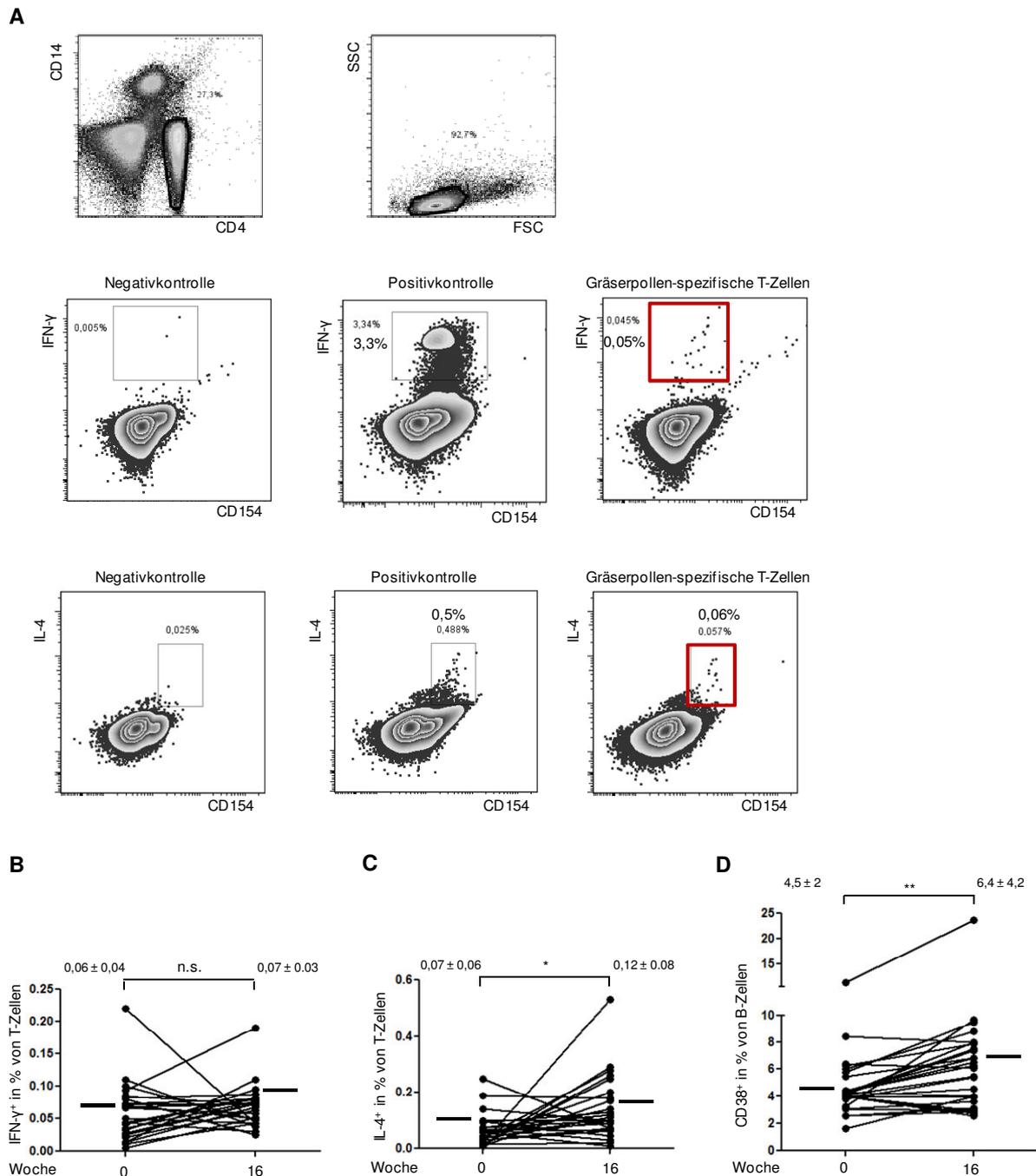


Abbildung 18. Zytokin- und CD38-Expression nach 16 Wochen der Allergen-spezifischen Immuntherapie.

Probanden mit diagnostizierter Gräserpollen-Allergie wurden während der 16-wöchigen SIT-Behandlung mit 5300 I.U./Tag Vitamin D₃ oder Placebo supplementiert. Vor Beginn der Studie und nach 16 Wochen der

4. Ergebnisse

Behandlung wurde das Zytokinprofil der Gräserpollen-spezifischen T-Zellen nach 6-stündiger Restimulation mit Gräserpollen-Extrakt (40 µg/ml) + anti-CD28 (1µg/ml) bestimmt. SEB (1 µg/ml) + anti-CD28 (1 µg/ml)-Restimulation diente als Positivkontrolle. Lymphozyten des gleichen Probanden ohne Restimulation dienten als Negativkontrolle. A) Gating-Strategie zur Identifizierung der CD4⁺ T-Zellen und eine Beispiel-Färbung der Gräserpollen-spezifischen CD154⁺ IFN-γ⁺/CD154⁺ IL-4⁺ T-Zellen (rot umrandet) B) Zusammenfassung (n=25) der Frequenzen der CD154⁺ IFN-γ⁺ T-Zellen. C) Analog (B), hier jedoch die Analyse der CD154⁺ IL-4⁺ T-Zellen. D) Frequenzen der Vitamin D₃-sensitiven (CD38⁺ CD27⁻) B-Zellen vor und nach 16 Wochen nach Untersuchungsbeginn (n = 25). n.s. = nicht signifikant; * = P < 0,05; ** = P < 0,01

Im zweiten Studienjahr wurden die Frequenzen der Gräserpollen-spezifischen mit PMA/Ionomycin-restimulierten B-Zellen sowie deren IL-10-Produktion vor- und nach 16 Wochen der Behandlung bestimmt. Dazu wurden die PBMC nach Permeabilisierung mit Fluorochrom-konjugiertem Gräserpollen-Extrakt inkubiert und die Frequenzen der Gräserpollen-spezifischen- IgD niedrig-exprimierenden B-Zellen durchflusszytometrisch analysiert Abbildung 19A. In Abbildung 19B ist zu erkennen, dass die Frequenzen der Gräserpollen-spezifischen B-Zellen nach 16 Wochen der SIT-Behandlung bei fast allen Probanden ansteigen (P < 0,01). Um die Frequenzen der IL-10⁺ B-Zellen analysieren zu können, wurden die isolierten PBMC vor- und nach 16 Wochen der Studie für 5 Stunden mit PMA (20 ng/ml) + Ionomycin (1 µg/ml) stimuliert. Nach der Zugabe von Brefeldin A für die letzten 4,5 Stunden wurden die Zellen permeabilisiert und mit einem Antikörper-Mix gegen CD19, CD20, CD69, IL-10 und zusätzlich mit Fluorochrom-konjugiertem Gräserpollen-Extrakt gefärbt. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Frequenzen der aktivierten- (CD69⁺) und IL-10-produzierenden B-Zellen Abbildung 19C. Wie bereits bei der Analyse der Gräserpollen-spezifischen T-Zellen beschrieben, kann man eine Gruppe mit steigenden und eine andere mit stabilen Frequenzen der IL-10⁺ B-Zellen nach der PMA/Ionomycin-Restimulierung identifizieren. Bezogen auf die Gesamtgruppe wurde jedoch ein signifikanter Anstieg der IL-10-produzierenden B-Zellen beobachtet (P < 0,05; Abbildung 19D). Der Anteil der Gräserpollen-spezifischen B-Zellen unter den IL-10⁺ B-Lymphozyten blieb dagegen stabil (P > 0,05; Abbildung 19E). Die Frequenzen der naiven- und Gedächtnis-B-Zellen waren im Verlauf der Studie unverändert (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der technischen Schwierigkeiten, besonders am Anfang der Untersuchung, sind die Daten der insgesamt 18 Probanden dargestellt.

4. Ergebnisse

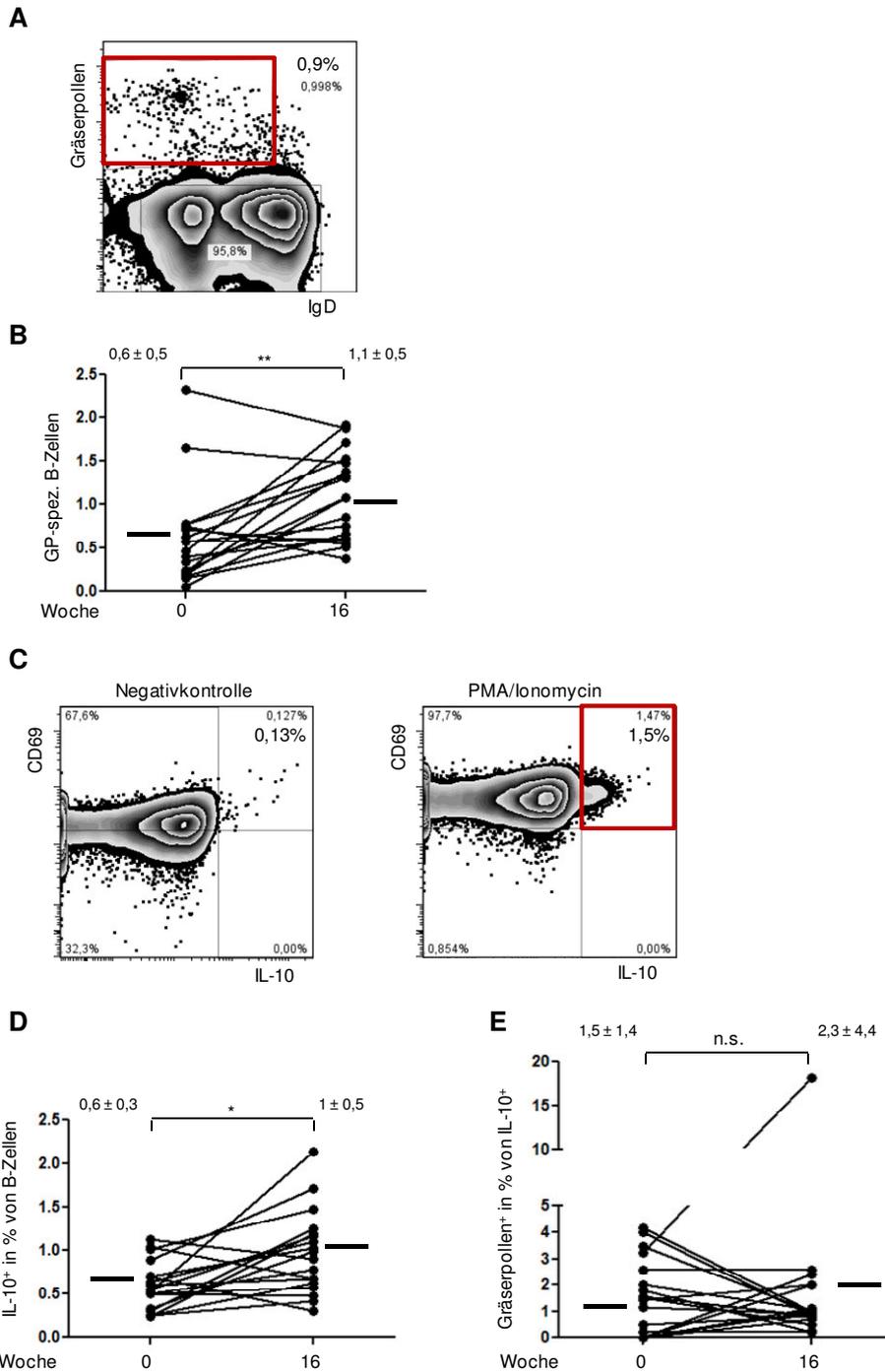


Abbildung 19. Frequenzen der Gräserpollen-spezifischen- und IL-10 produzierenden B-Zellen vor- und nach SIT-Behandlung mit 5300 I.U./Tag Vitamin D₃- oder Placebo-Supplementierung.

A) Eine Beispiel-Färbung der Gräserpollen-spezifischen (GP) B-Zellen (rot umrandet). Der dargestellte Dot-Plot ist auf die CD19⁺, CD14⁻ B-Zellen fokussiert. B) Frequenzen der Gräserpollen-spezifischen (GP) B-Zellen vor- und nach 16 Wochen der SIT-Behandlung (n = 18). C) Eine Beispiel-Färbung der IL-10⁺ B-Zellen nach 5-stündiger Restimulation mit PMA (20 ng/ml) + Ionomycin (1 µg/ml). Der repräsentative Dot-Plot ist auf die CD19⁺, CD20⁺ B-Zellen fokussiert (rot umrandet). D) Frequenzen der IL-10⁺ B-Zellen vor- und nach 16 Wochen der Behandlung (n = 18). E) Prozente der Gräserpollen-spezifischen B-Lymphozyten unter den IL-10⁺-produzierenden B-Zellen, n.s. = nicht signifikant; * = P < 0,05; ** = P < 0,01.

4.3. Verminderte T-Zell-Aktivierung in Gegenwart von Calcitriol-behandelten B-Zellen

4.3.1. Verminderte Proliferation der naiven T-Zellen in Gegenwart von Calcitriol-behandelten naiven B-Zellen

Funktionelle Eigenschaften der B-Zellen umfassen nicht nur die Immunglobulin-Synthese sondern auch die Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen [98, 99]. Aktivierte B-Zellen exprimieren den Vitamin D-Rezeptor (VDR) sowie alle notwendigen Moleküle für effiziente T-Zell-Aktivierung [74, 117, 226]. T-Zellen, aktiviert in Gegenwart von Calcitriol-behandelten Antigenpräsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen, zeigen einen regulatorischen Phänotyp [50]. Die immunologischen Effekte der Calcitriol-B-Zell-Behandlung auf die T-Zell-Funktionen wurden bisher nicht ausreichend untersucht. Deshalb sollten die funktionellen Konsequenzen der VDR-Aktivierung in B-Zellen auf T-Zell-Funktionen mittels *in vitro*-Kokultur bestimmt werden.

Aufgereinigte CD27⁻ naive und CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen wurden mit anti-CD40 und rhIL-4 für 48 Stunden in An oder Abwesenheit von 1 µmol/L Calcitriol aktiviert. Die B-Zellen wurden nach der 48-stündigen Stimulationsphase (Priming) mit CFSE-markierten CD45RA⁺ naiven- oder CD45RO⁺ Gedächtnis-T-Zellen in Gegenwart des Superantigen TSST-1 kokultiviert. TSST-1 bindet dabei den Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (MHC-II) auf der Oberfläche der B-Zellen und Vβ2⁺ Kette des T-Zell Rezeptors [227]. Nach sieben Tagen der Kokultur wurden die T-Zellen mit einem fluoreszierenden anti-CD4 Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Versuchsaufbau siehe Abbildung 9). In der Abbildung 20A ist die Gating-Strategie zur Identifizierung von 7-AAD⁻ (lebenden) CD4⁺ T-Zellen dargestellt. Die CFSE-Fluoreszenzintensität der T-Zellen der Kokultur mit Calcitriol-behandelten bzw. unbehandelten aktivierten B-Zellen ist als Overlay-Diagramm dargestellt und gegen die Zellzahl der Lymphozyten aufgetragen (Abbildung 20B). Naive T-Zellen zeigten eine verminderte proliferative Antwort nach sieben Tagen Kokultur mit Calcitriol-behandelten (geprimten) naiven B-Zellen. Im Gegensatz dazu war die Proliferation der Gedächtnis-T-Zellen in Gegenwart von Calcitriol-behandelten naiven oder Gedächtnis-B-Zellen nicht beeinflusst (Abbildung 20B). Eine geringe Proliferationshemmung der naiven T-Zellen wurde allerdings auch in der Kokultur mit Calcitriol-behandelten Gedächtnis-B-Zellen festgestellt. Aus den Balken-Diagrammen in Abbildung 20B kann man entnehmen, dass die stärkste Hemmung der Proliferation in der Kokultur auftrat, in der naive T-Zellen mit

4. Ergebnisse

Calcitriol-geprägten naiven B-Zellen kultiviert wurden. Basierend auf dieser Beobachtung wurden die CFSE-markierten naiven T-Zellen und die Calcitriol-behandelten naiven B-Zellen in Anwesenheit von immobilisiertem anti-CD3 monoklonalen Antikörpern (polyklonale Stimulation des T-Zell-Rezeptors) sieben Tage kokultiviert. Die Ergebnisse zeigen ebenfalls eine Reduktion der T-Zell-Proliferation in der Kokultur mit Calcitriol-geprägten naiven B-Zellen. Der Effekt auf die T-Zell-Proliferation war nach TSST-1-Stimulation (37%; Abbildung 21A, C) stärker als nach anti-CD3-vermittelter T-Zell-Aktivierung (25%; Abbildung 21B, C). Als 100% wurde dabei die T-Zell-Proliferationsrate in der Kokultur mit anti-CD40/IL-4-aktivierten B-Zellen gesetzt.

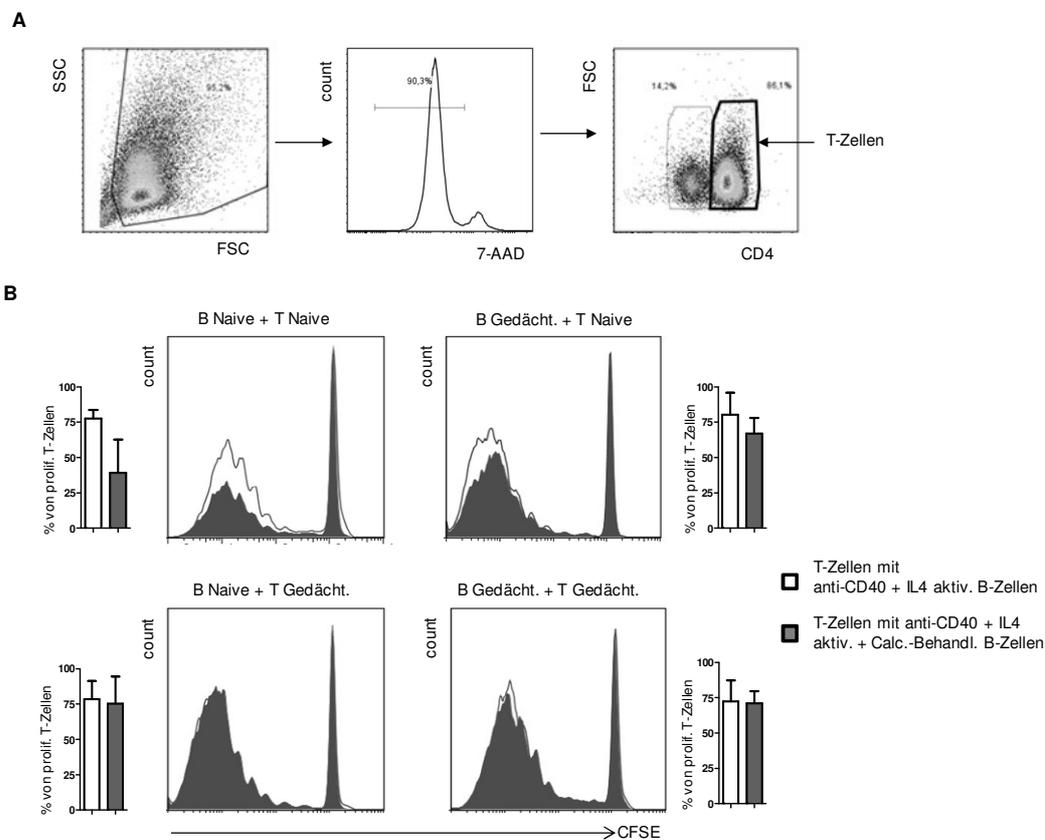


Abbildung 20. Proliferationsreduktion der naiven, nicht jedoch der Gedächtnis-CD4⁺ T-Zellen in Gegenwart von Calcitriol-geprägten naiven B-Zellen. A) Gating-Strategie zur Identifizierung der 7-AAD⁻ (lebenden) CD4⁺ T-Zellen hinsichtlich der TSST-1-induzierten Proliferation naiver und Gedächtnis-T-Zellen in Gegenwart von naiven oder Gedächtnis-B-Zellen, aktiviert mit anti-CD40 (1 µg/ml), IL-4 (10 ng/ml) (weiße Balken, durchgängige Linie) Calcitriol-behandelte B-Zellen (farbige Fläche, farbige Balken). Die CFSE-Verdünnung wurde nach 7 Tagen T-Zell-B-Zell-Kokultur gemessen. Dot-Plots sind fokussiert auf die lebenden T-Lymphozyten eines repräsentativen Spenders. Balken-Diagramme fassen die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Versuchen zusammen und stellen die Differenz in % der proliferierenden T-Zellen in der Anwesenheit von aktivierten B-Zellen dar.

4. Ergebnisse

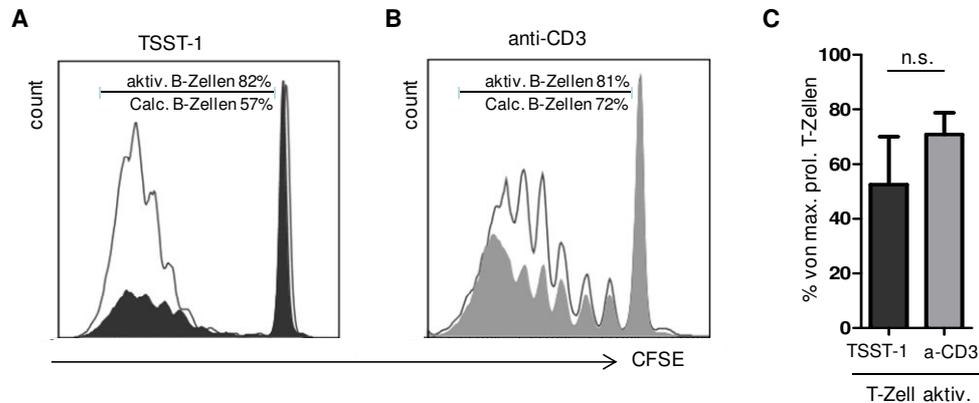


Abbildung 21. TSST-1- und anti-CD3-induzierte T-Zell-Proliferation in Gegenwart von Calcitriol-geprägten naiven B-Zellen. CFSE-markierte naive T-Zellen wurden mit anti-CD40 (1 $\mu\text{g/ml}$), IL-4 (10 ng/ml) (durchgängige Linie) aktivierten- sowie Calcitriol-behandelten naiven B-Zellen (Farbfläche) kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde nach 7 Tagen Kokultur bei gleichzeitiger T-Zell-Rezeptor-spezifischer Stimulation mit A) Toxic-Schock-Syndrom-Toxin-1 (TSST-1) B) immobilisierten anti-CD3 durchflusszytometrisch gemessen. Dot-Plots sind fokussiert auf die lebenden T-Lymphozyten eines repräsentativen Donors. C) Die Summe der Proliferationshemmung durch zusätzliche Calcitriol-Vorbehandlung der aktivierten B-Zellen (Index wurde aus 3 unabhängigen Experimenten berechnet). Die Daten sind als Mittelwert \pm SA dargestellt.

4.3.2. Zytokin-Produktion von T-Zellen nach Kokultur mit Calcitriol-behandelten B-Zellen

Zu den zellulären Ereignissen, die die T-Lymphozyten-Antwort auf mitogene und Antigen-spezifische Stimuli charakterisieren, zählen neben der Proliferation auch die Expression von Oberflächen-Aktivierungsmarkern und die Zytokin-Produktion. Naive T-Zellen differenzieren nach einer Antigen-induzierten T-Zell-Rezeptor-Aktivierung zu Gedächtnis-T-Zellen mit einem charakteristischen Zytokin-Expressionsmuster [228]. Nach 7 Tagen in Kokultur wurden die T-Zellen mit PMA und Ionomycin in Anwesenheit von Brefeldin A für 5 Stunden restimuliert. Dies erlaubt die Akkumulation und intrazelluläre Detektion von Zytokinen und somit die Untersuchung von deren Expressionsmuster in den neu-generierten CD4^+ , CD45RO^+ Gedächtnis-T-Zellen (Abbildung 22A). Nach Restimulierung und Permeabilisierung wurden die T-Zellen intrazellulär mit den Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen den Aktivierungsmarker CD154 (CD40L), der kurz nach der T-Zell-

4. Ergebnisse

Aktivierung exprimiert wird [213], sowie gegen IFN- γ , IL-2 und IL-4 gefärbt. Zusätzlich wurde die Expression von NFAT1 (NFATc2), einer der wesentlichen Isoformen der NFAT Transkriptionsfaktoren-Familie in peripheren T-Lymphozyten durchflusszytometrisch bestimmt [64]. Die Analyse der NFATc2-Expression auf Protein-Ebene zeigt eine signifikante Verminderung der MFI-Werte (von 1598 bis unter 1259, $P = 0,02$; Abbildung 22B) in der Kokultur mit Calcitriol- (1 $\mu\text{mol/L}$) geprimten naiven B-Zellen. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Analyse der Frequenzen von CD40L⁺ (von 57% bis unter 33%, $P = 0,03$; Abbildung 22B), IL-4⁺ (von 3,8% bis unter 1,5%, $P = 0,03$; Abbildung 22D), IL-2⁺ (von 70% bis unter 55%; $P = 0,048$; Abbildung 22C) und tendenziell auch IFN- γ ⁺ (von 16,1% unter 11,7%, $P = 0,22$; Abbildung 22D) T-Zellen nach Kontakt mit Calcitriol-behandelten B-Zellen gemacht. Die FACS-Analyse der Gesamtproteinmenge von p65, einer Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- κB , ergab keinen Unterschied zwischen den Proben. Auch die Frequenzen der IL-10⁺ T-Zellen blieben unbeeinflusst durch die Calcitriol-Behandlung der B-Zellen. Das gleiche gilt für alle gemessenen Transkriptionsfaktoren und Zytokine in naiven (CD45RA⁺) T-Zellen an Tag 7 der Kokultur (Daten nicht gezeigt).

4. Ergebnisse

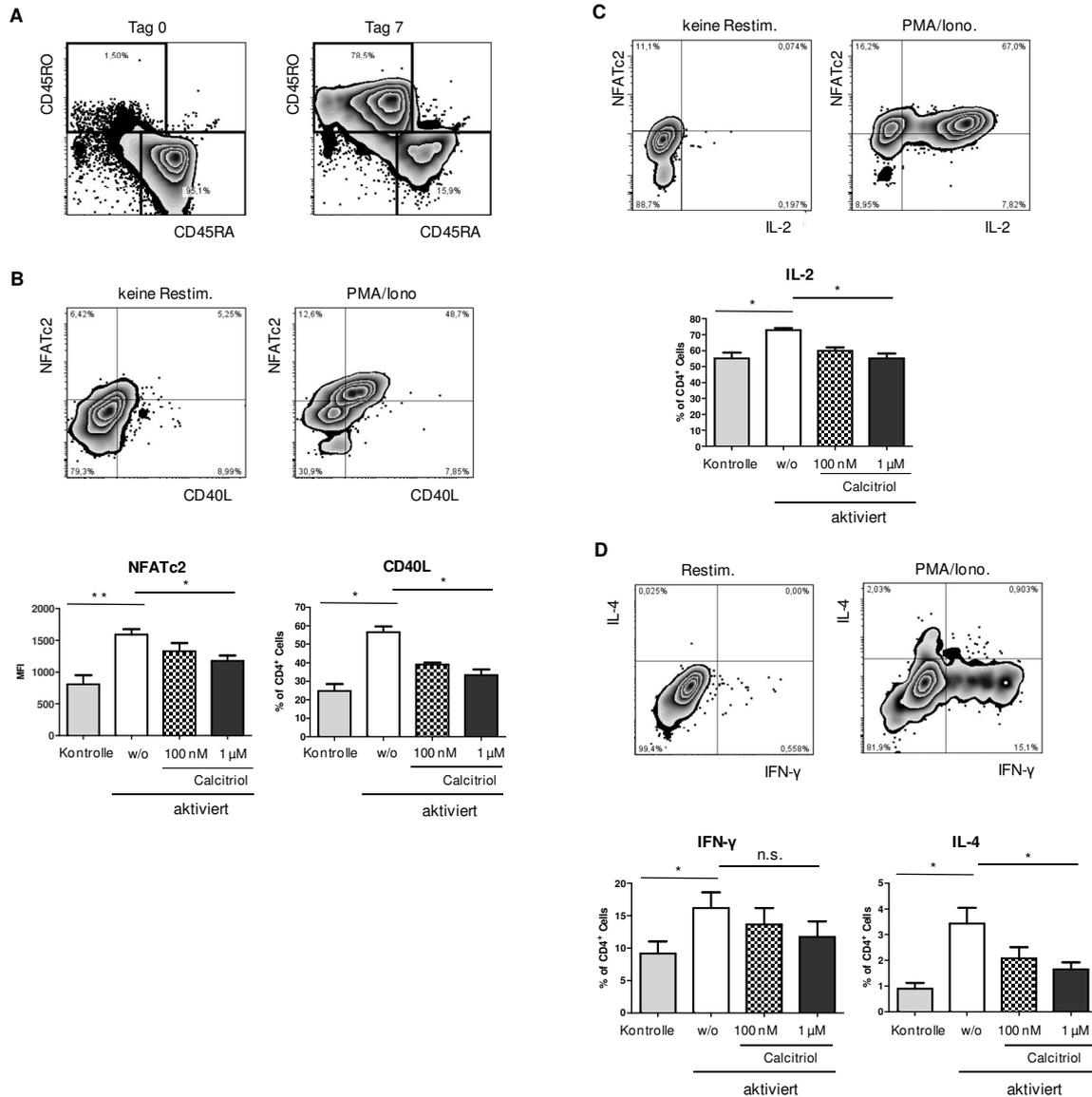


Abbildung 22. Verminderte Expression von NFATc2, CD40L und den Frequenzen von IL-2-, IFN- γ - und IL-4-produzierender T-Zellen nach Kokultur mit Calcitriol-behandelten B-Zellen. Naive T-Zellen, kokultiviert mit anti-CD40 (1 μ g/ml), IL-4 (10 ng/ml) voraktivierten naiven B-Zellen (weiße Balken) und Calcitriol-(100 nmol/L -1 μ mol/L) behandelten B-Zellen (karierte, schwarze Balken). T-Zellen ohne B-Zellen wurden als Kontrolle (graue Balken) eingesetzt. An Tag 7 wurden die Zellen der Kokultur mit PMA (20 ng/ml) und Ionomycin (1 μ g/ml) für 5 Stunden restimuliert. A) Prozente der naiven- (CD45RA⁺) und Gedächtnis- (CD45RA⁺) T-Zellen am Tag 0 und Tag 7 der Kokultur. Dot-Plots zeigen einen repräsentativen Spender. B) Expression von NFATc2 und CD40L. Die Dot-Plots zeigen die Expression der Marker vor und nach der PMA/Ionomycin-Restimulation und sind auf lebende CD4⁺ T-Zellen bezogen. C) Analog (B) für IL-2-produzierende T-Zellen. D) Analog (B) für IFN- γ - und IL-4-produzierende T-Zellen. Balken-Diagramme fassen 4 unabhängige Experimente zusammen. Die Daten sind als Mittelwert \pm SA dargestellt, n.s. = nicht signifikant; * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$.

4. Ergebnisse

Vitamin D₃-Metabolite binden an Albumin-ähnliche Proteine, wie das extrazelluläre Vitamin D-bindende-Protein (DBP) [8] und verschiedene intrazelluläre Vitamin-D-bindende Proteine (IDBP) sowie an VDR [229, 230]. Da Calcitriol als ein lipophiles Molekül durch Zellmembranen diffundieren kann, könnte es nach der B-Zellbehandlung trotz zahlreicher Waschschrte in die T-Zell-Kokultur übertragen werden und in der Folge die T-Zell-Funktion direkt beeinflussen. Um dies genauer zu prüfen, wurden die entsprechenden Überstände a) in einem zellbiologischen Test und b) biochemisch auf die verbleibende bzw. freigesetzte Calcitriol-Menge untersucht.

Die B-Zellen wurden für 48 Stunden mit anti-CD40, rhIL-4 und Calcitriol aktiviert. Um das restliche Calcitriol zu entfernen, wurden die Zellen abschließend 4-mal mit Zellkulturmedium, einschließlich einer 1-stündigen Inkubation bei 37° C, gewaschen. Anschließend wurden die B-Zellen für weitere 24-72 Stunden ohne Stimulation oder Calcitriol-Zugabe kultiviert und die zellfreien Überstände abgenommen. Für die zellbiologische Untersuchung wurden die gewonnenen Überstände 3 Tage mit der Calcitriol-sensitiven Promyelozytenleukämie-Zelllinie HL-60 inkubiert. Als Positivkontrolle wurde eine Calcitriol-Verdünnungsreihe verwendet. Anschließend wurde die CD38-Oberflächenexpression durchflusszytometrisch bestimmt. Wie in Abbildung 23 dargestellt, konnten keine relevanten Calcitriol-Konzentrationen (< 1 nmol/L; Abbildung 23A) in den B-Zellüberständen gemessen werden. Zusätzlich wurden die verbleibenden Calcitriol-Mengen mittels ELISA am Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie der Charité bestimmt. Auch die ELISA-Ergebnisse bestätigten diese Beobachtung (Abbildung 23B). Zudem, wurde nach Zugabe der gleichen Calcitriol-Menge (100 pmol/L-1 nmol/L) zu T-Zell-B-Zell Kokultur, keine Veränderung bezüglich der Proliferation und der Frequenzen der Zytokin-produzierenden T-Zellen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

4. Ergebnisse

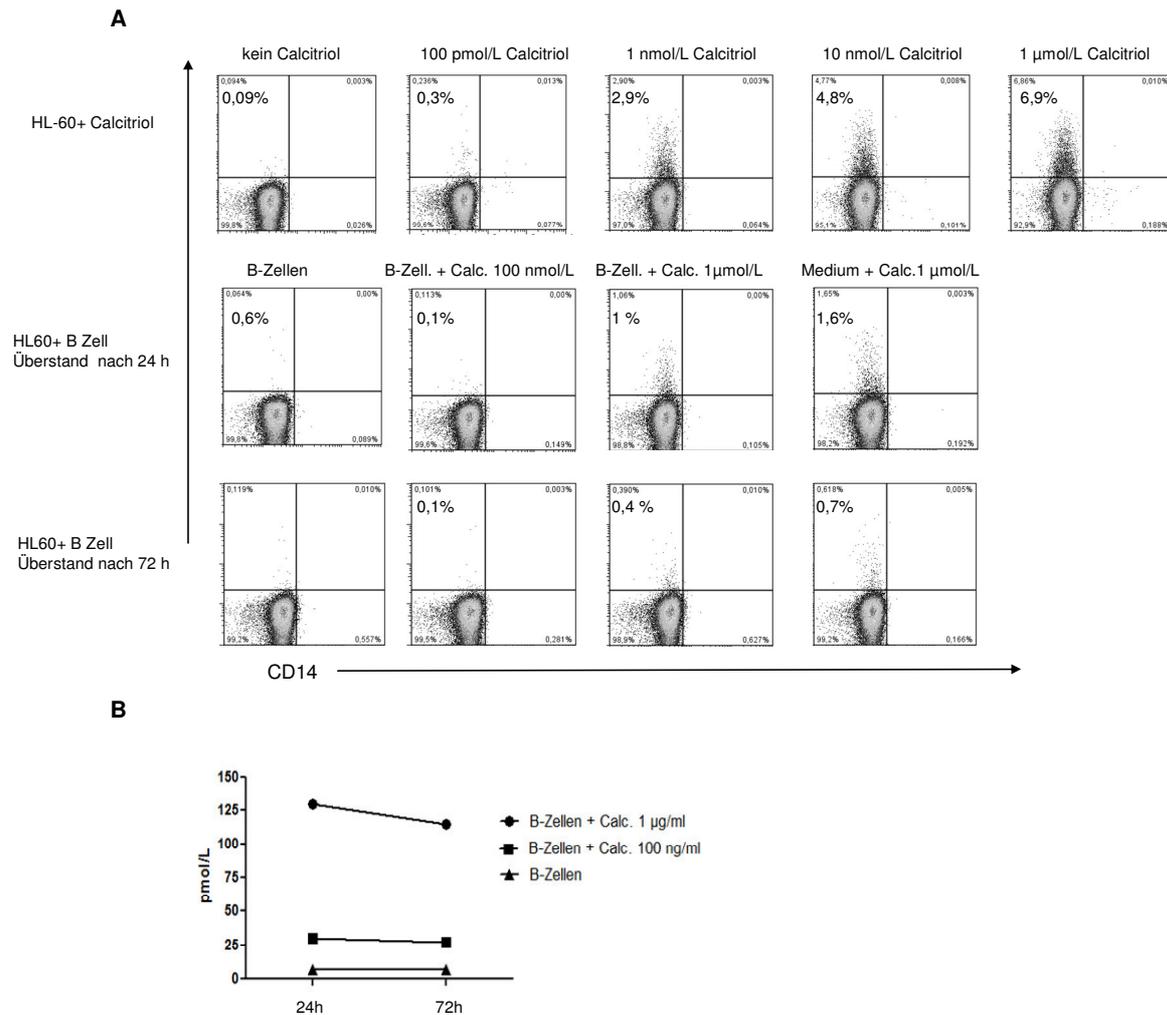


Abbildung 23. Keine relevanten Calcitriol-Mengen in der T-Zell-B-Zell-Kokultur nachweisbar. A) Menschliche Promyelozytenleukämie-Zelllinie HL-60 inkubiert mit Calcitriol 1 µmol/l -100 pmol/l (obere Plots) oder zellfreien Überständen von anti-CD40 (1 µg/ml), IL-4 (10 ng/ml) voraktivierten und Calcitriol-behandelten (wie in der Abbildung angegeben) B-Zellen. Medium mit Zugabe der 1 µmol/L Calcitriol wurde als Zell-unabhängige Kontrolle mitgeführt. Nach 48-stündiger Voraktivierung, Waschen und einer zusätzlichen Inkubation im Zellkulturmedium für weitere 24-72 Stunden wurden die Überstände auf die verbleibende Calcitriol-Menge in der Zellkultur der CD38, CD14-exprimierenden HL-60-Zelllinie getestet. 1 Experiment von 3 gezeigt. B) Überstände von B-Zellen, behandelt wie unter (A), wurden auf verbleibenden Calcitriol mittels ELISA am Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie der Charité getestet.

4.3.3. Calcitriol moduliert die kostimulatorische Kapazität der B-Zellen

Die T-Zellen, kokultiviert mit Calcitriol-behandelten B-Zellen, zeigten einen reduzierten Aktivierungsstatus, was zu einer verminderten T-Zell Effektor-Entwicklung führt. Für eine vollständige T-Zell-Aktivierung bedarf es neben dem ersten Signal über den T-Zell-Rezeptor ein weiteres Signal durch kostimulatorische Moleküle, wie beispielsweise CD28, auf der T-

4. Ergebnisse

Zell-Oberfläche [231]. Die natürlichen Liganden von CD28 sind CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) [110, 232]. In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob die kostimulatorische Funktion von B-Zellen durch die Calcitriol-Behandlung beeinflusst wird, was für dendritische Zellen bereits gezeigt werden konnte [50]. Naive B-Zellen wurden für 2 Tage mit anti-CD40 und IL-4 mit oder ohne Calcitriol-Behandlung aktiviert. Darauffolgend wurde die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) und dem Vitamin D₃-responsiven Marker CD38 auf der B-Zell-Oberfläche mittels durchflusszytometrischer Analyse und auf mRNA Ebene mittels qPCR bestimmt. Die Daten der durchflusszytometrischen Analyse sind als „Overlay“-Diagramme der MFI-Werte und als Balken-Diagramme bezüglich der CD80- und CD86-Expression auf B-Zellen dargestellt (ausgedrückt in Prozent). Die qPCR-Daten sind als Balken-Diagramme normalisiert auf das Referenzgen *hprt* abgebildet. Auf aktivierten naiven B-Zellen war eine höhere CD80-Zelloberflächenexpression (von $7\% \pm 1$ auf $20\% \pm 2$; $P < 0,01$; Abbildung 24A, B) und ein geringer Anstieg der CD80-mRNA nachweisbar (von $0,015 \pm 0,01$ auf $0,034 \pm 0,029$; $P = 0,1$; Abbildung 24C). Ähnliche Ergebnisse wurden für die Protein-Expression von CD86 (von $8,7\% \pm 2,3$ auf $35,2\% \pm 12,4$; $P < 0,01$; Abbildung 24D, E) und die CD86-mRNA-Expression (von $0,29 \pm 0,12$ auf $0,58\% \pm 0,26$; $P < 0,05$; Abbildung 24F) beobachtet.

Zusammenfassend resultierte die Calcitriol-Behandlung der B-Zellen in einer konzentrationsabhängigen Verminderung der mRNA-Expression und der Zelloberflächenexpression von CD80 (um 20%; $P = 0,32$) bzw. CD86 (um 57%; $P = 0,059$) im Vergleich zu aktivierten B-Zellen (als 100% gesetzt) (Abbildung 24B-F). Die Calcitriol-Effekte auf die Expression der oben beschriebenen Marker der Gedächtnis-B-Zell-Subpopulation zeigte eine größere Variabilität, wahrscheinlich auch bedingt durch die geringere Reinheit (< 80%) der Gedächtnis-B-Lymphozyten (Daten nicht gezeigt).

4. Ergebnisse

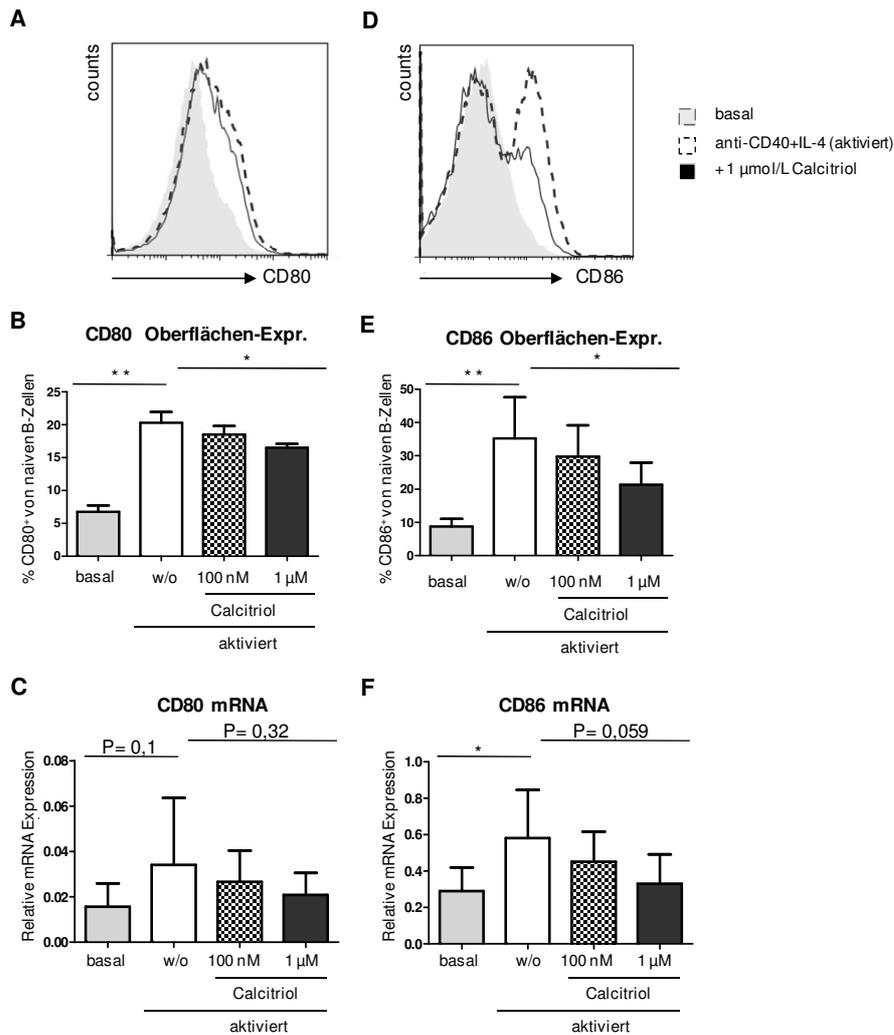


Abbildung 24. VDR-Aktivierung reduziert die Expression der B-Zell kostimulatorischen Moleküle. Naive B-Zellen stimuliert mit anti-CD40 (1 µg/ml), IL-4 (10 ng/ml) (gestrichelte Linie) nach Calcitriol-Behandlung (durchgezogene Linie). Reduzierte Expression der kostimulatorischen Moleküle nach 48 h Inkubation. Durchflusszytometrische Analyse von CD80-(A), (B) und CD86-(D), (E) Zelloberflächenexpression. Quantitative mRNA-Analyse mittels qPCR von CD80-(C) und CD86-(F) Expression. Overlays zeigen lebende B-Lymphozyten eines repräsentativen Spenders. (B, C, E, F) fassen Ergebnisse von 4 unabhängigen Experimenten zusammen. Daten sind als Mittelwert ± SA dargestellt, * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$.

4.3.4. Zugabe von anti-CD28 Antikörper zu der T-B-Zell Kokultur hebt die verminderte T-Zell-Aktivierung auf

In diesem Experiment sollte die funktionelle Relevanz der verminderten Expression der kostimulatorischen Moleküle auf B-Zellen untersucht werden. Naive B-Zellen wurden mit anti-CD40 und rhIL-4 in An- oder Abwesenheit von Calcitriol für 48 Stunden stimuliert.

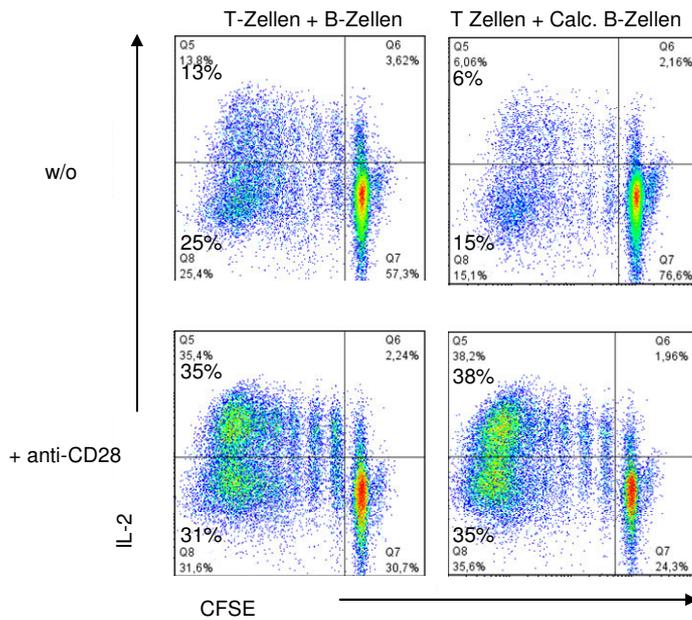
4. Ergebnisse

Anschließend wurden die B-Zellen zusammen mit CFSE-markierten naiven T-Zellen unter Zugabe (oder ohne Zugabe) von 1 µg/ml anti-CD28 Antikörper für sieben Tage kultiviert. Anschließend erfolgte die Restimulation mit PMA/Ionomycin für 5 Stunden unter Zugabe von Brefeldin A für 4,5 Stunden. Die Zytokin-Produktion wurde in permeabilisierten, fixierten T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. In den „Dot-Plots“ sind die Frequenzen und in den Balken-Diagrammen die Frequenzen, normalisiert auf die T-Zellfrequenzen in Gegenwart der aktivierten B-Zellen, dargestellt.

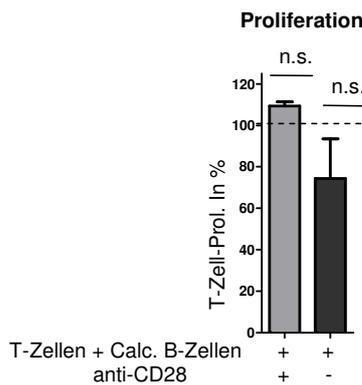
Die Daten zeigen, dass die Calcitriol-Vorbehandlung der B-Zellen zu einer Verringerung der T-Zell-Proliferation führte und die Frequenzen der IL-2-produzierenden T-Zellen um jeweils 50% vermindert waren (Abbildung 25A). Durch die Zugabe der agonistischen anti-CD28 Antikörper wurde die T-Zell-Proliferation 2-fach verstärkt, unabhängig davon, ob die B-Zellen mit Calcitriol vorbehandelt wurden. Ein Vergleich zwischen der Kokultur mit Calcitriol-, bzw. ohne Calcitriol-Vorbehandlung der B-Zellen zeigte, dass die anti-CD28 Antikörper-Zugabe eine Erhöhung in der Prozentzahl der proliferierenden T-Zellen (von durchschnittlich 74% bis auf 100%) und der Frequenzen der IL-2-produzierenden T-Zellen (von 61 % bis auf 100%) bewirkt. Die Frequenzen der proliferierenden- und IL-2-produzierenden T-Zellen kokultiviert mit aktivierten B-Zellen ohne Calcitriol-Vorbehandlung \pm anti-CD28 wurden dabei als 100% festgesetzt (Abbildung 25B, C). Somit war in Anwesenheit von anti-CD28 Antikörper kein hemmender Einfluss der B-Zell-Calcitriol-Vorbehandlung auf die T-Zell-Aktivierung mehr nachweisbar. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die verminderte T-Zell-Aktivierung in Gegenwart der Calcitriol-vorbehandelten B-Zellen auf verminderte Expression kostimulatorischer Moleküle zurückzuführen ist.

4. Ergebnisse

A



B



C

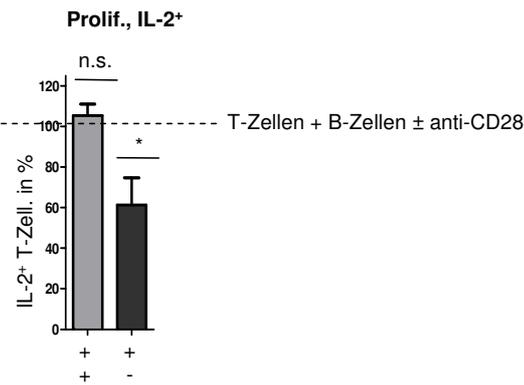


Abbildung 25. Rekonstituierte Zytokin-Produktion in T-Zellen nach Zugabe des anti-CD28 Antikörpers. CFSE markierte naive T-Zellen wurden mit naiven, anti-CD40 (1 µg/ml) und IL-4 (10 ng/ml) voraktivierten ± Calcitriol-vorbehandelten B-Zellen für 7 Tage kokultiviert. Die Zugabe von anti-CD28 (1 µg/ml) in die Kokultur mit Calcitriol-behandelten naiven B-Zellen führt zur Wiederherstellung der IL-2-Produktion in restimulierten T-Zellen. A) Die Dot-Plots beziehen sich auf die lebenden T-Lymphozyten eines repräsentativen Spenders. B) T-Zell-Proliferation in Kokultur mit Calcitriol-behandelten B-Zellen mit oder ohne anti-CD28-Zugabe, ausgedrückt in Prozent. T-Zell-Proliferation in der Kokultur mit voraktivierten B-Zellen ± anti-CD28 als 100% gesetzt (gestrichelte Linie). C) Analog (B) für die Frequenzen IL-2-produzierender T-Zellen. (B), (C) Zusammenfassung von 3 unabhängigen Experimenten, n.s. (nicht signifikant), * = P < 0,05

5. Diskussion

5.1. Serum 25(OH) Vitamin D₃ Schwellenwert-Konzentration für die Modulation der B- und T-Lymphozyten

Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass Vitamin D₃ die Funktionalität und Aktivierung der Lymphozyten beeinflusst. Aktivierte T- und B-Lymphozyten exprimieren den Vitamin D-Rezeptor (VDR) [40, 74] sowie das Enzym CYP27B1, das für die Synthese der aktiven Form von Vitamin D₃ (Calcitriol) aus dessen Vorläufer 25(OH) Vitamin D₃ verantwortlich ist [20, 21]. Daher kann eine endogene Calcitriol-Synthese nach Aktivierung und in Gegenwart von ausreichenden 25(OH) Vitamin D₃-Mengen stattfinden.

Vitamin D₃-Mangel ist durch 25(OH) Vitamin D₃ Serumkonzentrationen unter 50 nmol/L charakterisiert [233] und entsteht primär infolge einer unzureichende UV-Exposition, bzw. seltener durch mangelnde Vitamin D₃-Zufuhr über die Nahrung. Zahlreiche Studien zeigen eine hohe Prävalenz von Vitamin D₃-Mangel weltweit [234], einschließlich Deutschland [235, 236]. Die immunologisch-relevanten Funktionen von Vitamin D₃ wurden durch Daten deutlich die zeigen, dass Vitamin D₃-Mangel mit einem gehäuften Auftreten von verschiedenen chronischen Störungen des Immunsystems wie beispielweise Erkrankungen des atopischen Formenkreises, inklusive des allergischen Asthma bronchiale [130, 237, 238] oder Autoimmunerkrankungen [239] assoziiert sein kann.

Für Effekte auf Lymphozyten, die durch VDR-Aktivierung vermittelt werden ist Calcitriol und nicht seine Vorläufer verantwortlich [240]. Die systemische Anwendung von Calcitriol ist jedoch durch seine kurze biologische Halbwertszeit (1-2 Tage) [241] und das mögliche Auftreten von hyperkalzämischen Nebenwirkungen begrenzt [242, 243]. Des Weiteren induziert Calcitriol die Expression des Enzyms CYP24A1, welches sowohl Calcitriol als auch die hauptzirkulierende Form 25(OH) Vitamin D₃ inaktivieren kann [18, 244], was zu einer Reduktion der 25(OH) Vitamin D₃- Serumkonzentrationen führt [245]. Da sowohl allergischen- als auch Autoimmunerkrankungen chronisch verlaufen, wäre eine sichere Langzeit-Behandlung erforderlich. Dies könnte durch eine orale Cholecalciferol-Zufuhr gewährleistet werden, die auch im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen sehr gut toleriert wurde.

Um die immunmodulatorischen Effekte von 25(OH) Vitamin D₃ auf B- und T-Zellen zu untersuchen, erhielten Vitamin D₃-defiziente Personen im Rahmen der klinischen Untersuchung steigende Dosen von Cholecalciferol während der Wintermonate.

5. Diskussion

Die Supplementation mit einem oral-verabreichten Cholecalciferol-Präparat resultierte in einem signifikanten Anstieg der 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen im Serum von durchschnittlich bis zu 83 nmol/L bei einer täglichen Dosis von 2000 I.U. (= 50 µg) Cholecalciferol. Die Unterbrechung der Vitamin D₃-Zufuhr nach 8 Wochen Vitamin D₃-Einnahme von 4000 I.U. (= 100 µg) pro Tag in einer Gruppe von 15 Individuen mit mittleren 25(OH) Vitamin D₃-Serumkonzentrationen von 148 nmol/L, führte zu einem Rückgang der 25(OH) Vitamin D₃-Spiegel um 1,7 nmol/L pro Tag. Die 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen blieben jedoch vier Wochen nach der Unterbrechung der Cholecalciferol-Einnahme in einem Bereich von über 75 nmol/L ($96,1 \pm 20,1$ nmol/L). Dieser Bereich ist in der Literatur mit einer adäquaten Vitamin D₃-Versorgung assoziiert [15, 246]. Die verbleibenden 10 Personen erhielten 8000 I.U. (= 200 µg) für vier weitere Wochen und die 25(OH) Vitamin D₃-Werte erreichten einen Mittelwert von 158 nmol/L. Die Probanden der Kontrollgruppe blieben dagegen defizient (< 50 nmol/L). Ein Vergleich mit publizierten Daten zeigt, dass die Einnahme von 2000 I.U./Tag Cholecalciferol zu vergleichbaren 25(OH) Vitamin D₃-Werten führt [247, 248]. Auch bei einer Cholecalciferol-Zufuhr von 4000 I.U./Tag über zwei Monate sind 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen > 110 nmol/L beschrieben [249]. In einer Studie mit 140 Probanden wurde dagegen beobachtet, dass eine tägliche Dosis von etwa 100 µg (4000 I.U.) Vitamin D₃ erforderlich ist, um einen 25(OH) Vitamin D₃-Wert > 75 nmol/L zu erreichen, wenn die Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen anfangs durchschnittlich 30 nmol/L betragen [250]. Auf der Basis von Daten zahlreicher Studien wurde ausgerechnet, dass eine Vitamin D₃-Menge von 1 µg/Tag (40 I.U.) den Serum 25(OH) Vitamin D₃-Spiegel um ca. 1 nmol/L (0,4 ng/ml) erhöhen kann [251]. Zum Vergleich, führt eine ausreichende UVB-Exposition der Haut täglich zu einer Vitamin D₃-Synthese in einer Menge, die einer oralen Vitamin D₃-Aufnahme von 250 µg (10000 I.U.) entspricht [251]. In Rahmen dieser Untersuchung wurden 8000 I.U./Tag Cholecalciferol als höchste Dosis verabreicht. Diese liegt im physiologischen Bereich und wurde sehr gut toleriert.

Die Analyse der CD19⁺ B-Zellen zeigte signifikant höhere Frequenzen der CD38⁺ CD27⁻ B-Lymphozyten nach der Vitamin D₃-Einnahme. Die CD38-Expression kann VDR-abhängig *in vitro* induziert werden [19, 252], was durch die Experimente mit dem VDR-Antagonist ZK159222 im Rahmen dieser Arbeit bestätigt wurde. Zusätzlich fungiert CD38 als ein Aktivierungsmarker und wird auf der Zelloberfläche von B-Zellen [253], T-Zellen [254] und Plasmazellen [219] exprimiert. Es wird über eine mögliche Rolle von CD38 als membranständiger Rezeptor [255] und als funktionell-wirksames Protein bei der Apoptose-

5. Diskussion

Resistenz diskutiert [256]. Als ein Kontroll-Oberflächenantigen und zum Ausschluss unspezifischer Wirkungen wurde zusätzlich die Expression von CD23 (FcεRII) auf B-Zellen analysiert. Zuvor wurde gezeigt, dass die CD23-Oberflächenexpression unabhängig von der VDR-Aktivität in B-Zellen ist [220]. Die Daten dieser Untersuchung zeigten keine signifikanten Veränderungen vor und nach Vitamin D₃-Einnahme hinsichtlich der CD23-Expression. Diese Ergebnisse verstärken die Vermutung, dass die beobachtete Erhöhung der Frequenzen von CD38⁺ B-Zellen mit einer spezifischen VDR-Aktivierung assoziiert ist. In der Studie von *Knipperberg et al.* wurde die Wirkung einer hochdosierten Vitamin D₃-Supplementierung (20000 I.U. Cholecalciferol pro Tag für 12 Wochen) auf periphere B-Zellen bei Patienten mit multipler Sklerose untersucht. Dabei wurden keine signifikanten Anstiege der Frequenzen der CD19⁺CD38⁺ B-Zellen beobachtet. Die Untersuchung ist durch die Anzahl der Patienten (n = 15) sowie die teilweise sehr hohen basalen 25(OH) Vitamin D₃-Werte (> 90 nmol/L) limitiert aussagekräftig [257]. In einer anderen Vitamin D₃-Supplementierungsstudie mit 20 SLE Patienten wurde nach 6-monatiger Vitamin D₃-Zufuhr (insgesamt 900000 I.U. Cholecalciferol) eine signifikante Reduktion in der Prozentzahl von CD19⁺ Gedächtnis-B-Zellen detektiert [203]. In der vorliegenden Studie, mit einer gesamt-Cholecalciferol-Zufuhr von 400000 I.U., blieben die Prozentzahlen von CD19⁺ B-Zellen, einschließlich der naiven- und Gedächtnis-B-Zellen, in beiden Gruppen stabil. Es konnte lediglich eine Differenz der Frequenzen von CD27⁺⁺ CD38⁺⁺-Plasmazellen zwischen der Vitamin D- und der Kontrollgruppe nach vier Wochen festgestellt werden. Die transiente Erhöhung zirkulierender Plasmazellen könnte möglicherweise durch eine VDR-abhängige CCR10-Induktion und der darauffolgenden vermehrten Rekrutierung von Plasmazellen erklärt werden [77].

Die Korrelationsanalyse der 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen mit CD38⁺ B-Zellen (%) zeigt einen Wert von > 68 nmol/L für den Anstieg der Frequenzen von CD38⁺ B-Zellen während der Vitamin D₃-Supplementierung. Die ROC-Kurven-Analyse konnte diesen Wert bestätigen. Zusätzlich konnten *in vitro* Experimente zeigen, dass die Zugabe von 25(OH) Vitamin D₃ in einem Konzentrationsbereich zwischen 50 nmo/L und 100 nmol/L zu aktivierten CD19⁺ B-Zellen zu einer Erhöhung der CD38-Expression führt. Dabei traten im Konzentrationsbereich unter 100 nmol/L 25(OH) Vitamin D₃ starke interindividuelle Unterschiede bezüglich der CD38-Expression auf. Diese Unterschiede könnten als Konsequenz einer experimentellen oder auch der individuellen Varianz auftreten. Gen-Polymorphismen wie die Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNP) im Vitamin D₃-Stoffwechsel können dabei eine Rolle spielen. SNP der CYP27B1 oder CYP24A1 Gene

5. Diskussion

könnten beispielweise deutliche Veränderungen in deren enzymatischer Aktivität bewirken und somit den D₃-Metabolismus beeinflussen [258-260]. Auch bestimmte Mutationen im Genlocus des Vitamin-D-Rezeptors können die VDR-Aktivität und den Vitamin D₃-Status beeinträchtigen oder die Entstehung von Erkrankungen begünstigen [145, 261, 262].

Die protektive humorale Immunität wird durch die Antikörper-Produktion von B- bzw. Plasmazellen sichergestellt. Nach Aktivierung differenzieren die B-Zellen zu Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen [263]. Um einen möglichen Einfluss der Vitamin D₃-Einnahme auf die Immunglobulin-Produktion zu untersuchen wurden die Serum IgE-, IgA-, IgG- und IgM-Werte vor und am Ende der Untersuchung bestimmt. Epidemiologische Daten weisen darauf hin, dass Vitamin D₃-Insuffizienz mit erhöhten Gesamt-IgE-Werten korreliert ist [130, 264]. Experimentelle *in vitro* Daten zeigen, dass eine VDR-Aktivierung die IgE-Synthese signifikant hemmen kann [74, 75]. In der vorliegenden Studie kam es tendenziell zu einer Verminderung der Serum IgE-Werte nach 12 Wochen sowohl in der Vitamin D- als auch in der Kontrollgruppe, wobei in der Vitamin D-Gruppe die Reduktion etwas ausgeprägter ausfiel. Es ist beschrieben, dass die Serum IgE-Spiegel bei Patienten mit einer Pollen-Allergie außerhalb der Haupt-Pollensaison sinken [265, 266]. Die Frage, ob die Reduktion der Serum IgE-Konzentrationen saisonal bedingt oder Vitamin D₃-abhängig gesunken war, kann in diesem Zusammenhang aber nicht vollständig geklärt werden. Die Serum-Werte von IgA, IgG und IgM blieben vor und nach 12 Wochen in beiden Gruppen unverändert.

Vitamin D₃ moduliert neben den B-Zellen auch die Differenzierung der humanen und murinen naiven T-Zellen zu IFN- γ - (Th1), IL-4- (Th2), IL-17- (Th17) und IL-10-produzierenden Gedächtnis-T-Helfer-Zellen *in vitro* [54, 59, 136, 267, 268]. Die Analyse des T-Zell-Zytokinprofils zeigte nach 12 Wochen eine signifikante Reduktion von zirkulierenden IFN- γ ⁺- und IL-17⁺- pro-inflammatorischen T-Helfer-Zellen in der Vitamin D₃-Supplementierungsgruppe. Die Frequenzen der IL-4-sezernierenden T-Zellen zeigten eine absteigende Tendenz, die jedoch nicht signifikant war. Die Frequenzen der IL-10-produzierenden T-Zellen, die mit anti-inflammatorischen Funktionen assoziiert werden [269], blieben dagegen unverändert. In einer Studie mit SLE Patienten wurde eine Reduktion von sowohl IL-17⁺- als auch IFN- γ ⁺- T-Zellen beobachtet [203]. Allen und Mitarbeiter supplementierten gesunde Freiwillige mit bis zu 10000 I.U. Cholecalciferol pro Tag über einen Zeitraum von 15 Wochen. Sie beobachteten eine Reduktion der IL-17- aber Induktion von IL-10-produzierenden T-Zellen. Auch die Ergebnisse weiterer Vitamin D₃-Supplementierungsstudien zeigen eine Verminderung von zirkulierenden pro-inflammatorischen T-Helfer-Zellen [194, 270]. Die beobachtete Abnahme der Frequenzen

5. Diskussion

von zirkulierenden pro-inflammatorischen $\text{IFN-}\gamma^+$ - und IL-17^+ -T-Helfer-Zellen nach Vitamin D_3 -Supplementierung zeigt das mögliche therapeutische Potenzial von Vitamin D_3 bei Erkrankungen, welche mit entzündlichen Th17- oder Th1/Th17-Immunantworten assoziiert sind wie beispielweise atopische Dermatitis [271], rheumatoide Arthritis [272] oder der systemische Lupus erythematosus [198, 273]. Ob eine VDR-Bindung an die *IFN* - [56] oder *IL17*- [59] Promotoren in T-Zellen direkt eine negative Regulation vermittelt oder eine indirekte Modulation der T-Zellen über dendritische Zellen [274] als zugrunde liegender Mechanismus stattfindet, muss in zukünftigen Studien gezeigt werden. Die Analyse der $\text{IFN-}\gamma^+$ - und IL-17^+ - T-Helfer-Zellen unter Verwendung einer Dosis-Wirkungskurve sowie die ROC-Analyse zeigte, dass eine 25(OH) Vitamin D_3 -Konzentration ≥ 70 nmol/L wirksam ist, um T-Zellen zu modulieren. Vergleichbare 25(OH) Vitamin D_3 -Konzentrationen (86,5; 78,0 und 75 nmol/L) wurden zuvor in der Literatur für eine optimale Funktion des VDRs sowie für die Kalziumresorption aus dem Darm [275], die Parathormon-Regulation [276] und die Knochenmineralisierung [277] vorgeschlagen. In dieser Studie wurde jedoch keine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der 25(OH) Vitamin D_3 -Konzentration und der Modulation der B- und T-Zellmarker festgestellt. Die Daten deuten eher auf eine definierte 25(OH) Vitamin D_3 -Konzentration, die erforderlich ist, um die biologischen Wirkungen zu vermitteln. Ein ähnliches Konzept für die Wirkung von Vitamin D_3 wurde bereits zuvor durch andere Gruppen [19, 21, 276, 278] vorgeschlagen. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass die Frequenzen von CD38^+ B-Zellen und Zytokin-produzierender T-Helfer-Zellen bei ≥ 75 nmol/L Serum 25(OH) Vitamin D_3 , auch nach Absetzen der Cholecalciferol-Zufuhr für 4 Wochen, stabil blieben. Zusammenfassend zeigen die Daten eine Assoziation zwischen erhöhten Frequenzen von CD38^+ B-Zellen und verminderten Frequenzen von $\text{IFN-}\gamma$ - und IL-17 - produzierenden T-Zellen bei einer 25(OH) Vitamin D_3 -Konzentration ≥ 70 nmol/L. Die Daten bilden eine molekulare Grundlage für zukünftige Studien bezüglich immunologischer Vitamin D_3 -Funktionen bei Gesunden sowie Patienten mit einer Fehlsteuerung der Immunantwort.

5.2. Vitamin D_3 im klinischen Einsatz

Die Ergebnisse der Placebo-kontrollierten doppelblind Studie bestätigten die Beobachtung, dass eine tägliche Einnahme von 2000 I.U. Vitamin D_3 ausreichend ist um die Serum 25(OH) Vitamin D_3 -Konzentrationen signifikant zu erhöhen. Die TT-Auffrischimpfung resultierte in steigenden TT-spezifischen IgG-Antikörpertitern sowohl in der Vitamin D- als auch der

5. Diskussion

Placebogruppe. Jedoch war die Effizienz der TT-Immunisierung mit steigenden Serum 25(OH) Vitamin D₃-Spiegel signifikant höher, bezogen auf die anti-Tetanus-IgG-Konzentrationen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bereits publizierten Daten [225]. In einer weiteren Studie wurden dagegen keine nachweisbaren Effekte auf die spezifischen-Antikörper-Konzentrationen bei 175 gesunden Probanden nach der Gabe von Calcitriol mit gleichzeitiger Influenza-Impfung beobachtet [279]. *In vitro*-Studien belegen, dass die biologisch aktive Form von Vitamin D₃ (Calcitriol) einen inhibitorischen Effekt auf die B-Zell-Proliferation und Differenzierung zu Plasmazellen hat [19]. Diese Ergebnisse lassen deshalb vermuten, dass ein hoher Serum 25(OH) Vitamin D₃-Spiegel mit einer verminderten humoralen Immunantwort assoziiert ist. Die Daten dieser Studie aber auch andere bereits publizierte Daten zeigen dagegen, dass die steigenden Serum 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen eine protektive Immunantwort nach einer Infektion oder Impfung nicht beeinträchtigen, sondern sogar fördern können [225, 280]. Es wurde berichtet, dass Calcitriol die Produktion von IL-10 bei aktivierten B-Zellen induziert. Dieses anti-inflammatorische Zytokin fördert die Plasmazelldifferenzierung und den Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgG⁺ und IgA⁺ bei B-Lymphozyten [20]. Darüber hinaus übt IL-10 einen direkten regulatorischen Effekt auf T-Zellen aus. Im Rahmen dieser Studie wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der Vitamin D- und der Placebogruppe bezüglich der TT-spezifischen IgG-Antikörper-Konzentrationen nach Immunisierung beobachtet. Zusätzlich konnte eine positive Korrelation zwischen den steigenden 25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen und den TT-spezifischen IgG-Serumkonzentrationen festgestellt werden. Die TT-spezifischen IgA- und IgE-Antikörpertiter sowie die zirkulierenden Plasmablasten waren dagegen von der Vitamin D₃-Einnahme unbeeinflusst. Diese Beobachtung kann zumindest teilweise dadurch erklärt werden, dass IgG1 als spezifische Immunglobulin-Subklasse nach Immunisierung präferenziell induziert wird [225].

Die Daten aus der vorliegenden Studie zeigen, dass Vitamin D₃ keine suppressiven Effekte auf sekundäre Immunantworten ausübt. Diese Erkenntnis macht den Einsatz von Vitamin D₃ zur Erhöhung der Effizienz der Immunisierung interessant. Jedoch hat die Studie ihre Einschränkungen vor allem durch die begrenzte Gruppengröße. Deshalb sollten weitere Untersuchungen mit einer größeren Teilnehmerzahl folgen.

In einer weiteren Placebo-kontrollierten Studie während der Wintermonate wurden die Effekte einer Vitamin D₃-Supplementierung in Kombination mit einer Allergen-spezifischer Immuntherapie auf die Lymphozyten-Funktionen untersucht. Die spezifische Immuntherapie (SIT) ist zurzeit die einzige kausale Behandlungsmethode, die selektiv die Allergen-

5. Diskussion

spezifische Immunantwort modulieren kann. Die genauen Wirkmechanismen der spezifischen Immuntherapie sind bisher noch nicht vollständig aufgedeckt. Es wird aber vermutet, dass die SIT-Behandlung zu einer Reduktion der Th2- (IL-4, IL-5) Zytokin-Produktion sowie einer Verminderung der zirkulierenden Frequenzen und der Aktivität der Effektorzellen wie Mastzellen und Eosinophilen bewirkt. Gleichzeitig werden Th1- (INF- γ) und immunregulatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- β induziert. Zusätzlich findet eine Verschiebung des Allergen-spezifischen Immunglobulinmusters statt. Die IgE-Serumkonzentrationen bleiben entweder stabil oder nehmen, bei gleichzeitigem Anstieg der Allergen-spezifischen IgA- und IgG4-Serumkonzentrationen, ab [281]. Nach Kontakt mit dem Allergen werden die Allergen-spezifischen Lymphozyten aktiviert. Antigen-präsentierende Zellen sowie aktivierte T- und B-Lymphozyten exprimieren den Vitamin D-Rezeptor (VDR) [19, 38-40]. VDR-abhängige immunmodulatorische Effekte auf T- und B-Zell-Aktivierung, Proliferation und Differenzierung wurden bereits mehrfach beschrieben [84]. So hemmt Calcitriol z. B. bei B-Zellen die IgE-Produktion und induziert die IL-10-Sekretion. Dadurch könnte es die Effizienz der SIT erhöhen, was unter anderem in einem präklinischen Asthma-Modell bereits gezeigt wurde [282].

Um die immunologischen Veränderungen im Laufe des ersten Studienjahres nachzuverfolgen, wurde das Zytokinprofil der Gräserpollen-spezifischen T-Zellen bestimmt. Nach 16 Wochen der SIT-Behandlung kam es bei einigen Probanden zu einem Anstieg in den Frequenzen der Allergen-spezifischen IFN- γ^+ und IL-4 $^+$ T-Zellen, während bei anderen diese Frequenzen stabil blieben bzw. eine abnehmende Tendenz zeigten. Es wurde berichtet, dass es nach dem Beginn der Allergen-SIT zu einem vorübergehenden Anstieg in den Frequenzen der Effektor-Zellen kommen kann [283]. Darüber hinaus könnte die SIT nicht für alle Probanden gleich effektiv sein. Aus diesen Gründen wird die SIT als eine langfristig krankheitsmodifizierende Behandlung eingesetzt. Die Frequenzen der CD38 $^+$ B-Zellen als ein VDR-abhängiger Marker zeigten eine ähnliche Verteilung wie die der Zytokin-produzierenden T-Zellen. Zurzeit kann keine sichere Aussage über einen Zusammenhang zwischen den verminderten Frequenzen der Zytokin-produzierenden T-Zellen und den CD38-exprimierenden B-Zellen gemacht werden, da die vorliegende Studie noch bis Mitte 2014 verblindet ist.

Im zweiten Studienjahr standen die B-Zellen im Fokus der Untersuchung. Die Frequenzen der zirkulierenden Gräserpollen-spezifischen B-Zellen zeigten einen Anstieg nach 16 Wochen der Behandlung bei fast allen Probanden. Im Rahmen der wiederholten Allergengabe während der SIT kommt es zur Aktivierung und Proliferation der Gräserpollen-spezifischen B-Zellen

5. Diskussion

in den sekundären lymphatischen Organen. Anschließend wandern diese B-Zellen erneut in den Blutkreislauf, wo sie vermutlich über mehrere Wochen rezirkulieren und nachweisbar sind. Die Analyse der IL-10-Produktion in zirkulierenden B-Zellen zeigte eine ähnliche Verteilung wie es bereits für die Zytokin-produzierenden T-Zellen beschrieben wurde. Die Prozentzahlen der Gräserpollen-spezifischen B-Zellen unter allen IL-10-produzierenden B-Zellen blieben stabil. Dies bedeutet, dass die IL10-Produktion von B-Zellen während der SIT-Behandlung nicht nur auf die Gräserpollen-spezifischen B-Zellen begrenzt ist, sondern möglicherweise durch zusätzliche Faktoren wie die Vitamin D₃-Einnahme beeinflusst werden könnte. Die finale Interpretation der Ergebnisse kann aber erst nach der Entblindung der Studie erfolgen.

Die Ergebnisse zeigen, dass während der Allergen-spezifischen Immuntherapie Veränderungen im Phänotyp der Gräserpollen-spezifischen T- und B-Zellen auftreten. Es wurde sowohl die Induktion von pro-inflammatorischen als auch anti-inflammatorischen Zytokinen beobachtet. Andere Parameter wie die Serum-Immunglobulin-Konzentrationen müssen noch nachbestimmt werden. Aufgrund der langen Behandlungsdauer kann der Therapieerfolg erst nach Ende der Studie beurteilt werden. Darüber hinaus kann bisher keine Aussage über die Wirkung einer Vitamin D₃-Einnahme auf die immunologischen Parameter gemacht werden, da die Studie noch nicht entblindet wurde.

5.3. Verminderte T-Zell-Aktivierung in Gegenwart von Calcitriol-behandelten B-Zellen

Die biologisch aktive Form von Vitamin D₃ (Calcitriol) kann die Differenzierung und die Funktion der T-Zellen direkt [38, 52, 284] sowie indirekt über die Beeinflussung von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) modulieren [274].

B-Zellen sind neben ihrer zentralen Funktion in der Entstehung der humoralen Immunantwort als Antigen-präsentierende Zellen auch an der T-Zell-Aktivierung beteiligt [98, 99]. Anti-CD40, IL-4-stimulierte B-Zellen exprimieren den Vitamin D-Rezeptor [74, 75] sowie die T-Zell-kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 (B7) [226]. Darüber hinaus präsentieren B-Zellen Antigene gegenüber T-Zellen mit der gleichen Effizienz wie ausgereifte dendritische Zellen (DC) [117]. Es wird angenommen, dass die B-Zellen in ihrer Funktion als APC eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen einschließlich der multiplen Sklerose [108, 120], der rheumatoiden Arthritis [122] sowie des systemischen

5. Diskussion

Lupus erythematoses [121, 285] und Diabetes mellitus vom Typ I [105] spielen. Interessanterweise sind diese Erkrankungen auch mit Vitamin D₃-Mangel assoziiert [239]. Trotz der umfangreichen Literatur hinsichtlich des Einflusses von Calcitriol auf DC, T- und B-Zellen wurden die immunologischen Effekte einer B-Zell-Calcitriol-Behandlung auf die T-Zell-Funktionen bis heute nicht ausreichend untersucht.

In dieser Arbeit wurden die aufgereinigten naiven- (CD27⁻) und Gedächtnis (CD27⁺)- B-Zellen mit anti-CD40 und rhIL-4 in Gegenwart oder Abwesenheit von Calcitriol aktiviert. Diese wurden dann mit CFSE-markierten naiven- (CD45RA⁺) oder Gedächtnis (CD45RO⁺)- T-Zellen in Gegenwart des Superantigens TSST-1 bzw. Zellkulturplatten-gebundenen anti-CD3 kokultiviert und die Proliferation gemessen. Dabei war eine Reduktion der Proliferation der naiven, aber nicht der Gedächtnis-T-Zellen in Anwesenheit der aktivierten und Calcitriol-behandelten naiven B-Zellen zu beobachten. Die Proliferationsreduktion war allerdings weniger ausgeprägt im Rahmen einer anti-CD3- als einer TSST-1-abhängigen T-Zell-Aktivierung. TSST-1 bindet an die variable Kette des T-Zell-Rezeptors (Vβ2⁺), die in etwa 8% der peripheren T-Lymphozyten exprimiert wird [227]. Die polyklonale T-Zell-Rezeptor-Stimulation mit einem anti-CD3 monoklonalen Antikörper aktiviert dagegen alle T-Zellen, unabhängig von der Spezifität der variablen Kette. Daraus folgend sind die Effekte der Calcitriol-Behandlung von B-Zellen auf die T-Zell-Aktivierung zumindest teilweise von der Größe der spezifischen B-Zell-Population abhängig. Auch andere Faktoren, wie z.B. die Stärke des T-Zell-Rezeptor-Stimulus könnten eine Rolle spielen, wobei aufgrund der nicht äquivalenten Konzentrationsbedingungen kein direkter Vergleich zwischen der TSST-1- und der anti-CD3-induzierten Aktivierung durchgeführt wurde.

Der Vergleich zwischen naiven und Gedächtnis-T-Zellen zeigt, dass die Gedächtnis-T-Zellen auf die Antigen-Stimulation qualitativ anders reagieren als die naiven T-Zellen. Gedächtnis-T-Zellen zeigen im Gegensatz zu naiven T-Zellen eine höhere Antigen-Sensitivität, d.h. sie reagieren bereits bei niedrigeren Antigen-Konzentrationen als naive T-Zellen [286]. Sie sind auch weniger abhängig von kostimulatorischen Signalen und benötigen eine kürzere Phase der Antigenstimulation als naive T-Zellen, um eine Immunantwort zu generieren [287, 288]. Dementsprechend proliferieren *in vivo* Gedächtnis-T-Zellen schneller und stärker nach der Antigen-Stimulation als naive T-Zellen [286, 289]. Diese Eigenschaften der Gedächtnis-T-Zellen ermöglichen die Induktion einer schnellen protektiven Immunantwort.

Mehrere Gruppen haben gezeigt, dass aktivierte B-Zellen viel effektiver bei der Induktion der T-Zell-Aktivierung sind als ruhende- oder naive B-Zellen [290, 291]. Dementsprechend weisen Gedächtnis-B-Zellen eine höhere Expression von T-Zell kostimulatorischen

5. Diskussion

Molekülen auf [292]. Andererseits induzieren und fördern die naiven- und ruhenden B-Zellen die Expansion der regulatorischen T-Zellen [293, 294]. Interessanterweise wurde eine höhere VDR-Expression bei naiven als bei Gedächtnis-B-Zellen beschrieben [40].

Es besteht die Annahme, dass die Calcitriol-Behandlung der naiven- und/oder Gedächtnis-B-Zellen die Proliferation der T-Zellen modulieren kann, wie es für dendritische Zellen berichtet wurde [50]. Die Daten in dieser Arbeit zeigen, dass die Calcitriol-behandelten Gedächtnis-B-Zellen die T-Zell-Proliferation nicht wesentlich beeinflussen. Deshalb wurde in den folgenden Experimenten primär die Rolle der Calcitriol-Behandlung bezüglich der naiven B-Zellen näher betrachtet.

Naive B-Zellen wurden in Anwesenheit steigender Calcitriol-Konzentrationen aktiviert und anschließend mit naiven T-Zellen kokultiviert. Nach sieben Tagen Kokultur und einer zusätzlichen Restimulation mit PMA/Ionomycin zeigten die T-Zellen konzentrationsabhängig eine Reduktion in der Expression des Aktivierungsmarkers CD154 (CD40L) und der Allergen-induzierten IL-4-, IL-2- und IFN- γ -Zytokin-Produktion. Besonders wichtig ist diese Beobachtung in Hinblick auf die Entstehung von IgE-vermittelten Hypersensitivitätsreaktionen, da die Kombination von anti-CD40- und IL-4-Signalen die molekularen Vorgänge, die zum IgE-Klassenwechsel in B-Zellen führen, induziert [295]. Die Gedächtnis-T-Zellen, die in Anwesenheit von Calcitriol-behandelten B-Zellen generiert wurden, zeigen vermutlich eine verminderte Kapazität zur Induktion der IgE-Synthese in naiven B-Lymphozyten.

T-Zell-Aktivierung, Differenzierung zu Effektor-Zellen und Zytokin-Expression sind von der Aktivierung mehrerer Transkriptionsfaktoren, einschließlich NFAT, abhängig [64]. Es wurde gezeigt, dass die Kostimulation über CD28 zu einer Verstärkung der TCR-abhängigen NFAT-Aktivierung führt. Dies erfolgt hauptsächlich durch eine vermehrte Translokation von NFAT in den Nukleus [231] und bewirkt eine Verkürzung der mittleren Zeit bis zur ersten T-Zell-Teilung [296]. Nach der Kokultur mit Calcitriol-behandelten naiven B-Zellen war die Expression der wesentlichen NFATc2-Isoform bei den T-Zellen signifikant reduziert. Darüber hinaus waren der Verlauf von NFATc2- sowie die CD40L-Expression und die Zytokin-Produktion nach PMA/Ionomycin-Restimulation vergleichbar. Diese Beobachtungen legen nahe, dass der Kontakt mit Calcitriol-geprägten B-Zellen für die beobachtete Reduktion der T-Zell-Aktivierung ursächlich ist.

Die Induktion der T-Zell-Proliferation und Zytokin-Produktion erfordert neben dem Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR)-Signal auch gleichzeitig die Aktivierung über kostimulatorische Moleküle, wie CD28 auf der T-Zell-Oberfläche [297]. Das TCR-Signal

5. Diskussion

allein induziert die funktionelle Inaktivierung der T-Lymphozyten und führt somit zur Anergie [298]. Deshalb wurde die Expression der natürlichen CD28-Liganden- CD80/CD86 (B7) nach 48 Stunden B-Zell-Aktivierung und Calcitriol-Behandlung analysiert. Die Ergebnisse zeigten eine Reduktion der CD80/CD86-Expression infolge der Calcitriol-Behandlung auf Protein- und tendenziell auch auf mRNA-Ebene. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Daten aus Kokultorexperimenten mit humanen dendritischen Zellen, die aus Monozyten generiert wurden. Diese zeigen eine Herunterregulation der CD80/CD86-Expression sowie eine Reduktion der T-Zell-Aktivierung nach Calcitriol-Behandlung [50]. Da die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 NF- κ B-abhängig ist [299-301] und VDR die NF- κ B-Aktivierung hemmt [40, 74], könnte dies als ein möglicher Mechanismus der B-Zell-Calcitriol-Priming-abhängigen Modulation der T-Zell-Funktionen/Antworten angenommen werden. CD80/CD86-Moleküle binden an CD28 und liefern wichtige kostimulatorische Signale im Rahmen der Antigen-spezifischen T-Zell-Aktivierung und Zytokin-Produktion [302]. In vitro-Experimente belegen, dass die Blockade der B7/28-Ligation zu einer veränderten Morphologie der immunologischen Synapse und einer reduzierten T-Zell-Proliferation führt [303]. In einem Mausmodell der rheumatoiden Arthritis wurde gezeigt, dass eine spezifische Depletion von CD80/86 auf B-Zellen zu einer Hemmung der autoreaktiven T-Zell-Aktivierung führte und mit einer klinisch verbesserten Arthritis assoziiert war [304]. Der B7/CD28-kostimulatorische Signalweg spielt eine kritische Rolle für die T-Zell-Aktivierung und Differenzierung zu Th1- und Th2-Zellen. Der Vergleich von Th1- und Th2-Zellen bezüglich der Anforderungen an die B7-Kostimulation während der Differenzierung und der Induktion der Zytokin-Produktion zeigt, dass die Induktion der IL-4-Produktion und Th2-Differenzierung in naiven T-Zellen stark von B7-Molekülen abhängig ist, während die IL-4-Produktion in zuvor aktivierten T-Zellen B7 unabhängig ist. Im Gegensatz dazu hat der überwiegende Anteil der B7-vermittelten Signale auf die Th1-Zytokin-Produktion, sowohl in naiven T-Zellen als auch in differenzierten Th1-Zellen einen primären Einfluss auf die IL-2- und nicht wie erwartet auf die IFN- γ Produktion [305]. In einem Mausmodell des allergischen Asthmas resultierte die Applikation des CD86-neutralisierenden, monoklonalen Antikörpers in der Hemmung der Eosinophileninfiltration, der IgE-Produktion und der Th2-Zytokin-Sekretion [306]. Im Rahmen dieser Arbeit war die Wirkung Calcitriol-behandelter B-Zellen sowohl auf IL-2-als auch auf IL-4-produzierende T-Zellen feststellbar.

Die VDR-Aktivierung von T-Zellen hat direkte Auswirkungen auf deren Proliferation [55] und die transkriptionelle Regulation Zytokin-produzierender T-Zellen [59]. Allerdings

5. Diskussion

erfolgte in Rahmen dieser Untersuchungen keine direkte Calcitriol-Zugabe in die T-B-Zell-Kokultur. Um direkte Übertragungseffekte von Calcitriol auf T-Zellen auszuschließen, wurden nach intensiver Waschprozedur die Überstände von Calcitriol-behandelten B-Zellen bezüglich Calcitriol quantifiziert. Es konnten keine relevanten Calcitriol-Konzentrationen (< 1 nmol/L) detektiert werden. Darüber hinaus wurde Calcitriol direkt in die Kokultur titriert, wobei eine Konzentration von 1 nmol/L keine nennenswerten Effekte auslöste. Somit sind die Effekte auf die T-Zellen auf eine VDR-Aktivierung der B-Zellen zurückzuführen.

Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die T-Zell-Aktivierung von naiven aber nicht Gedächtnis-T-Lymphozyten durch eine B-Zell-Calcitriol-Behandlung beeinflusst wurde. Dies äußerte sich in einer reduzierten Proliferation sowie Zytokin- und Transkriptionsfaktor-Expression. Die Calcitriol-Behandlung vermittelt eine verminderte Expression der kostimulatorischen Moleküle in aktivierten B-Zellen. Schließlich konnte auch experimentell bestätigt werden, dass die Verringerung der T-Zell-Aktivierung auf die Calcitriol-vermittelte Herunterregulierung von CD80/CD86 zurückzuführen ist. Die Zugabe der anti-CD28 Antikörper zur B-T-Zell-Kokultur führte zur Wiederherstellung der T-Zell-Zytokin-Produktion und Proliferation in Gegenwart von Calcitriol-behandelten B-Zellen. Die erzielten Ergebnisse stehen im Einklang mit experimentellen Daten von *Evans et al.* [115]. In seiner Arbeit untersuchte er den Mechanismus der Aktivierung von naiven T-Zellen durch anti-CD40 stimulierte B-Zellen und konnte zeigen, dass die T-Zell-Aktivierung von der Expression der kostimulatorischen CD80/CD86 Moleküle auf der B-Zell-Oberfläche abhängig war, wobei die CD86-Expression grössere Rolle spielte.

Zusammenfassend gibt diese Arbeit nicht nur einen Einblick in die Mechanismen der VDR-abhängiger Modulation der T-B-Zell-Interaktion, sondern auch einen Ausblick auf mögliche neue therapeutische Ansätze zur Behandlung von Th2- abhängigen allergischen-sowie Th1-abhängigen Autoimmunerkrankungen.

6. Zusammenfassung

Die aktive Form von Vitamin D₃ zeigt immunmodulatorische Effekte auf Zellen des angeborenen- und des adaptiven Immunsystems. Vitamin D₃-Insuffizienz (25(OH) Vitamin D₃-Konzentrationen < 50 nmol/L) ist weit verbreitet und tritt zunächst als Folge einer unzureichenden physiologischen Vitamin D₃-Bildung in der Haut in Kombination mit einer mangelnden Vitamin D₃-Zufuhr durch die Nahrung auf. Epidemiologische Daten zeigen eine direkte Verbindung zwischen einem niedrigen 25(OH) Vitamin D₃-Status und immunvermittelten Erkrankungen einschließlich allergischem Asthma, atopischer Dermatitis, Insulin-abhängigem Diabetes mellitus, multipler Sklerose, systemischer Lupus erythematodes und rheumatoider Arthritis.

Aktivierete T- und B-Lymphozyten exprimieren das Enzym CYP27B1, das die Synthese der aktiven Form von Vitamin D₃, Calcitriol, aus seiner Vorläufer-Form, 25(OH) Vitamin D₃, katalysiert. Daher kann nach Aktivierung und in Gegenwart von ausreichend 25(OH) Vitamin D₃ die endogene Calcitriol-Synthese ablaufen und Vitamin D-Rezeptor (VDR)-abhängige Effekte können autokrin stattfinden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die orale Vitamin D₃- (Cholecalciferol) Zufuhr zu einer systemischen Modulation von Phänotyp und Funktionalität zirkulierender Lymphozytenpopulationen führt. Darüber hinaus wurde aufbauend auf den Daten die 25(OH) Vitamin D₃-Konzentration kalkuliert, welche erforderlich ist, um T- und B-Lymphozyten *in vivo* zu modulieren. Ferner wurden die Wechselwirkungen der Calcitriol-voraktivierten B-Zellen in Bezug auf T-Zell-Aktivierung und Funktionalität untersucht.

Die Daten aus der Untersuchung mit oralen Vitamin D₃-Supplementierungen zeigen, dass sowohl die peripheren B-, als auch T-Zellen durch die biologisch aktive Form von Vitamin D₃ *in vivo* gezielt beeinflusst werden. Es wurde eine erhöhte Expression von CD38, einem VDR-induzierbaren B-Zell-Oberflächenantigen, sowie eine Frequenzreduktion von IFN- γ - und IL-17-produzierenden T-Helfer-Zellen nach Vitamin D₃-Supplementierung beobachtet. Darüber hinaus konnte eine 25(OH) Vitamin D₃-Konzentration von ≥ 70 nmol/L berechnet werden, die erforderlich ist um die immunologischen Veränderungen bei peripheren B- und T-Lymphozyten zu induzieren. Diese Berechnungen, einschließlich der Anwendung von zwei unabhängigen Kalkulationsansätzen, wurden von *in vitro* Daten aus Experimenten mit peripheren B-Zellen unterstützt. Es konnte gezeigt werden, dass die Effizienz der humoralen Immunantwort nach Immunisierung durch die Vitamin D₃-Einnahme erhöht wird und der

Zusammenfassung

klinische Einsatz von Vitamin D₃ sicher ist. Die finale Interpretation der Ergebnisse aus der Studie mit Vitamin D₃-Einnahme während der SIT kann erst nach der Entblindung der Studie erfolgen. Die Ergebnisse aus dem zweiten Teil dieser Arbeit zeigen, dass die T-Zell-Aktivierung von naiven T-Zellen, aber nicht die der Gedächtnis-Subpopulation, in der Anwesenheit von Calcitriol-geprägten naiven B-Zellen beeinträchtigt wurde. Dies führte zu einer reduzierten Proliferation sowie einer verminderten Zytokin- und Transkriptionsfaktor-Expression. Als Mechanismus wurde die verminderte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 auf aktivierten B-Zellen identifiziert.

Die Daten unterstreichen die Bedeutung einer ausreichenden Vitamin D₃-Versorgung für die Funktion des Immunsystems. Schließlich liefern die Daten eine molekulare Grundlage für zukünftige Untersuchungen zu Vitamin D₃-Funktionen beim Menschen und insbesondere Patienten mit krankhaften Veränderungen des Immunsystems.

Abstract

The secosteroid hormone vitamin D regulates calcium homeostasis but is also immunomodulatory on cells of the innate and adaptive immune system. Vitamin D₃ deficiency (serum 25(OH) vitamin D₃ concentrations <50 nmol/L) is common and often occurs as a result of inadequate physiological vitamin D₃ synthesis in the skin in combination with an insufficient vitamin D₃ dietary intake. Epidemiological data indicate a direct association between a low serum 25(OH) Vitamin D₃ status and immune-mediated diseases, including allergic asthma, atopic dermatitis, insulin-dependent diabetes mellitus, multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis.

Activated T - and B lymphocytes express the enzyme CYP27B1. This enzyme catalyzes the synthesis of the active form of vitamin D₃ calcitriol from its precursor 25(OH) vitamin D₃. Therefore, upon activation and in the presence of sufficient amounts of 25(OH) vitamin D₃ *in vitro* endogenous calcitriol synthesis and vitamin D receptor (VDR) dependent effects on lymphocytes can occur.

In the thesis it was investigated whether oral vitamin D₃ (cholecalciferol) intake alone or in a therapeutic setting leads to a systemic modulation of phenotype and function of circulating lymphocyte populations. With the data a 25(OH) vitamin D₃ concentration was calculated which is required to target T-and B- lymphocytes *in vivo*. Finally the consequences of B cell calcitriol treatment on T-cell activation were investigated.

The data from an oral vitamin D₃ supplementation study shown that both the peripheral B-, and T cells can be targeted *in vivo* by the bioactive form of vitamin D₃. Higher surface expression of a VDR-inducible antigen CD38 was observed on B cells, as well as a reduction in frequency of IFN- γ and IL-17 producing T memory cells upon vitamin D₃ supplementation. A serum 25(OH) vitamin D₃ concentration of ≥ 70 nmol/L was calculated, which is associated with immunological changes in peripheral B and T lymphocytes. These calculations, including the use of two independent approaches were supported by *in vitro* experiments from peripheral B cells. It has been demonstrated that the efficiency of the humoral immune response after immunization can be increased by administration of oral vitamin D₃ and the clinical use of vitamin D₃ is safe. The final interpretation of the results from the study with vitamin D₃ intake during the SIT can be given only after unblinding of the study. The results from the second part of the thesis show that T-cell activation of naive but not memory T cells reflected

Zusammenfassung

by reduced proliferation, cytokine and transcription factor expression was impaired in the presence of calcitriol-primed naive B cells. As an underlying mechanism the reduced expression of CD80/CD86 costimulatory molecules on activated B cells was identified.

Consequently, the data emphasize the importance of an adequate supply of vitamin D₃ in terms of function of the immune system. The data also provide a molecular basis for future studies on vitamin D₃ functions in humans and patients with immunological disorders.

7. Literaturverzeichnis

- 1 **Holick, M. F.**, Vitamin D: A millenium perspective. *J Cell Biochem* 2003. **88**: 296-307.
- 2 **Holick, M. F.**, The cutaneous photosynthesis of previtamin D3: a unique photoendocrine system. *J Invest Dermatol* 1981. **77**: 51-58.
- 3 **Lehmann, B.**, Role of the vitamin D3 pathway in healthy and diseased skin--facts, contradictions and hypotheses. *Exp Dermatol* 2009. **18**: 97-108.
- 4 **Chen, T. C., Chimeh, F., Lu, Z., Mathieu, J., Person, K. S., Zhang, A., Kohn, N., Martinello, S., Berkowitz, R. and Holick, M. F.**, Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. *Arch Biochem Biophys* 2007. **460**: 213-217.
- 5 **MacLaughlin, J. A., Anderson, R. R. and Holick, M. F.**, Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D3 and its photoisomers in human skin. *Science* 1982. **216**: 1001-1003.
- 6 **Clemens, T. L., Adams, J. S., Henderson, S. L. and Holick, M. F.**, Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D3. *Lancet* 1982. **1**: 74-76.
- 7 **MacLaughlin, J. and Holick, M. F.**, Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. *J Clin Invest* 1985. **76**: 1536-1538.
- 8 **Haddad, J. G.**, Plasma vitamin D-binding protein (Gc-globulin): multiple tasks. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995. **53**: 579-582.
- 9 **Ohyama, Y. and Yamasaki, T.**, Eight cytochrome P450s catalyze vitamin D metabolism. *Front Biosci* 2004. **9**: 3007-3018.
- 10 **Hart, G. R., Furniss, J. L., Laurie, D. and Durham, S. K.**, Measurement of vitamin D status: background, clinical use, and methodologies. *Clin Lab* 2006. **52**: 335-343.
- 11 **Dawson-Hughes, B., Heaney, R. P., Holick, M. F., Lips, P., Meunier, P. J. and Vieth, R.**, Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int* 2005. **16**: 713-716.
- 12 **Hollis, B. W.**, Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J Nutr* 2005. **135**: 317-322.
- 13 **Bischoff-Ferrari, H. A., Giovannucci, E., Willett, W. C., Dietrich, T. and Dawson-Hughes, B.**, Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr* 2006. **84**: 18-28.
- 14 **Heaney, R. P.**, Vitamin D in health and disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008. **3**: 1535-1541.
- 15 **Holick, M. F.**, Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol* 2009. **19**: 73-78.
- 16 **Jones, G., Strugnell, S. A. and DeLuca, H. F.**, Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* 1998. **78**: 1193-1231.
- 17 **Prosser, D. E. and Jones, G.**, Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sci* 2004. **29**: 664-673.
- 18 **DeLuca, H. F.**, Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004. **80**: 1689S-1696S.
- 19 **Chen, S., Sims, G. P., Chen, X. X., Gu, Y. Y., Chen, S. and Lipsky, P. E.**, Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin d3 on human B cell differentiation. *J Immunol* 2007. **179**: 1634-1647.
- 20 **Heine, G., Niesner, U., Chang, H. D., Steinmeyer, A., Zugel, U., Zuberbier, T., Radbruch, A. and Worm, M.**, 1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells. *Eur J Immunol* 2008. **38**: 2210-2218.

7. Literaturverzeichnis

- 21 **Sigmundsdottir, H., Pan, J., Debes, G. F., Alt, C., Habtezion, A., Soler, D. and Butcher, E. C.**, DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat Immunol* 2007. **8**: 285-293.
- 22 **Fritsche, J., Mondal, K., Ehrnsperger, A., Andreesen, R. and Kreutz, M.**, Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-1 alpha-hydroxylase and production of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 by human dendritic cells. *Blood* 2003. **102**: 3314-3316.
- 23 **Gottfried, E., Rehli, M., Hahn, J., Holler, E., Andreesen, R. and Kreutz, M.**, Monocyte-derived cells express CYP27A1 and convert vitamin D3 into its active metabolite. *Biochem Biophys Res Commun* 2006. **349**: 209-213.
- 24 **Lehmann, B., Knuschke, P. and Meurer, M.**, UVB-induced conversion of 7-dehydrocholesterol to 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol) in the human keratinocyte line HaCaT. *Photochem Photobiol* 2000. **72**: 803-809.
- 25 **Rosen, C. J., Adams, J. S., Bikle, D. D., Black, D. M., Demay, M. B., Manson, J. E., Murad, M. H. and Kovacs, C. S.**, The nonskeletal effects of vitamin D: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* 2012. **33**: 456-492.
- 26 **Dusso, A. S., Brown, A. J. and Slatopolsky, E.**, Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005. **289**: F8-28.
- 27 **Aranda, A. and Pascual, A.**, Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 2001. **81**: 1269-1304.
- 28 **Issa, L. L., Leong, G. M. and Eisman, J. A.**, Molecular mechanism of vitamin D receptor action. *Inflamm Res* 1998. **47**: 451-475.
- 29 **Blumberg, B. and Evans, R. M.**, Orphan nuclear receptors--new ligands and new possibilities. *Genes Dev* 1998. **12**: 3149-3155.
- 30 **Prufer, K., Racz, A., Lin, G. C. and Barsony, J.**, Dimerization with retinoid X receptors promotes nuclear localization and subnuclear targeting of vitamin D receptors. *J Biol Chem* 2000. **275**: 41114-41123.
- 31 **Haussler, M. R., Haussler, C. A., Bartik, L., Whitfield, G. K., Hsieh, J. C., Slater, S. and Jurutka, P. W.**, Vitamin D receptor: molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease prevention. *Nutr Rev* 2008. **66**: S98-112.
- 32 **Baudino, T. A., Kraichely, D. M., Jefcoat, S. C., Jr., Winchester, S. K., Partridge, N. C. and MacDonald, P. N.**, Isolation and characterization of a novel coactivator protein, NCoA-62, involved in vitamin D-mediated transcription. *J Biol Chem* 1998. **273**: 16434-16441.
- 33 **Liu, Z., Wong, J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W.**, Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) enhances ligand-dependent and receptor-dependent cell-free transcription of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999. **96**: 9485-9490.
- 34 **Sanchez-Martinez, R., Zambrano, A., Castillo, A. I. and Aranda, A.**, Vitamin D-dependent recruitment of corepressors to vitamin D/retinoid X receptor heterodimers. *Mol Cell Biol* 2008. **28**: 3817-3829.
- 35 **Kreutz, M., Andreesen, R., Krause, S. W., Szabo, A., Ritz, E. and Reichel, H.**, 1,25-dihydroxyvitamin D3 production and vitamin D3 receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages. *Blood* 1993. **82**: 1300-1307.
- 36 **Brennan, A., Katz, D. R., Nunn, J. D., Barker, S., Hewison, M., Fraher, L. J. and O'Riordan, J. L.**, Dendritic cells from human tissues express receptors for the immunoregulatory vitamin D3 metabolite, dihydroxycholecalciferol. *Immunology* 1987. **61**: 457-461.
- 37 **Moran-Auth, Y., Penna-Martinez, M., Shoghi, F., Ramos-Lopez, E. and Badenhoop, K.**, Vitamin D status and gene transcription in immune cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013.

7. Literaturverzeichnis

- 38 **Baeke, F., Korf, H., Overbergh, L., van Etten, E., Verstuyf, A., Gysemans, C. and Mathieu, C.,** Human T lymphocytes are direct targets of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the immune system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010. **121:** 221-227.
- 39 **Veldman, C. M., Cantorna, M. T. and DeLuca, H. F.,** Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys* 2000. **374:** 334-338.
- 40 **Geldmeyer-Hilt, K., Heine, G., Hartmann, B., Baumgrass, R., Radbruch, A. and Worm, M.,** 1,25-dihydroxyvitamin D3 impairs NF-kappaB activation in human naive B cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011. **407:** 699-702.
- 41 **Holick, M. F.,** Vitamin D and bone health. *J Nutr* 1996. **126:** 1159S-1164S.
- 42 **Hewison, M.,** An update on vitamin D and human immunity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012. **76:** 315-325.
- 43 **Liu, P. T., Stenger, S., Tang, D. H. and Modlin, R. L.,** Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis is dependent on the induction of cathelicidin. *J Immunol* 2007. **179:** 2060-2063.
- 44 **White, J. H.,** Vitamin D signaling, infectious diseases, and regulation of innate immunity. *Infect Immun* 2008. **76:** 3837-3843.
- 45 **Doss, M., White, M. R., Tecle, T. and Hartshorn, K. L.,** Human defensins and LL-37 in mucosal immunity. *J Leukoc Biol* 2010. **87:** 79-92.
- 46 **Zhang, Y., Leung, D. Y., Richers, B. N., Liu, Y., Remigio, L. K., Riches, D. W. and Goleva, E.,** Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *J Immunol* 2012. **188:** 2127-2135.
- 47 **D'Ambrosio, D., Cippitelli, M., Cocciolo, M. G., Mazzeo, D., Di Lucia, P., Lang, R., Sinigaglia, F. and Panina-Bordignon, P.,** Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *J Clin Invest* 1998. **101:** 252-262.
- 48 **Wallet, M. A., Sen, P. and Tisch, R.,** Immunoregulation of dendritic cells. *Clin Med Res* 2005. **3:** 166-175.
- 49 **Bartels, L. E., Hvas, C. L., Agnholt, J., Dahlerup, J. F. and Agger, R.,** Human dendritic cell antigen presentation and chemotaxis are inhibited by intrinsic 25-hydroxy vitamin D activation. *Int Immunopharmacol* 2010. **10:** 922-928.
- 50 **Penna, G. and Adorini, L.,** 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* 2000. **164:** 2405-2411.
- 51 **Pedersen, A. W., Holmstrom, K., Jensen, S. S., Fuchs, D., Rasmussen, S., Kvistborg, P., Claesson, M. H. and Zocca, M. B.,** Phenotypic and functional markers for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3)-modified regulatory dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 2009. **157:** 48-59.
- 52 **von Essen, M. R., Kongsbak, M., Schjerling, P., Olgaard, K., Odum, N. and Geisler, C.,** Vitamin D controls T cell antigen receptor signaling and activation of human T cells. *Nat Immunol* 2010. **11:** 344-349.
- 53 **Boonstra, A., Barrat, F. J., Crain, C., Heath, V. L., Savelkoul, H. F. and O'Garra, A.,** 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 2001. **167:** 4974-4980.
- 54 **Staeva-Vieira, T. P. and Freedman, L. P.,** 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits IFN-gamma and IL-4 levels during in vitro polarization of primary murine CD4+ T cells. *J Immunol* 2002. **168:** 1181-1189.
- 55 **Rigby, W. F., Stacy, T. and Fanger, M. W.,** Inhibition of T lymphocyte mitogenesis by 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol). *J Clin Invest* 1984. **74:** 1451-1455.
- 56 **Cippitelli, M. and Santoni, A.,** Vitamin D3: a transcriptional modulator of the interferon-gamma gene. *Eur J Immunol* 1998. **28:** 3017-3030.

7. Literaturverzeichnis

- 57 **Alroy, I., Towers, T. L. and Freedman, L. P.,** Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Mol Cell Biol* 1995. **15**: 5789-5799.
- 58 **Takeuchi, A., Reddy, G. S., Kobayashi, T., Okano, T., Park, J. and Sharma, S.,** Nuclear factor of activated T cells (NFAT) as a molecular target for 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3-mediated effects. *J Immunol* 1998. **160**: 209-218.
- 59 **Joshi, S., Pantalena, L. C., Liu, X. K., Gaffen, S. L., Liu, H., Rohowsky-Kochan, C., Ichiyama, K., Yoshimura, A., Steinman, L., Christakos, S. and Youssef, S.,** 1,25-dihydroxyvitamin D(3) ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. *Mol Cell Biol* 2011. **31**: 3653-3669.
- 60 **Kang, S. W., Kim, S. H., Lee, N., Lee, W. W., Hwang, K. A., Shin, M. S., Lee, S. H., Kim, W. U. and Kang, I.,** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 promotes FOXP3 expression via binding to vitamin D response elements in its conserved noncoding sequence region. *J Immunol* 2012. **188**: 5276-5282.
- 61 **Chambers, E. S. and Hawrylowicz, C. M.,** The impact of vitamin D on regulatory T cells. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011. **11**: 29-36.
- 62 **Gorman, S., Kuritzky, L. A., Judge, M. A., Dixon, K. M., McGlade, J. P., Mason, R. S., Finlay-Jones, J. J. and Hart, P. H.,** Topically applied 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhances the suppressive activity of CD4+CD25+ cells in the draining lymph nodes. *J Immunol* 2007. **179**: 6273-6283.
- 63 **Urry, Z., Chambers, E. S., Xystrakis, E., Dimeloe, S., Richards, D. F., Gabrysova, L., Christensen, J., Gupta, A., Saglani, S., Bush, A., O'Garra, A., Brown, Z. and Hawrylowicz, C. M.,** The role of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and cytokines in the promotion of distinct Foxp3+ and IL-10+ CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 2012. **42**: 2697-2708.
- 64 **Macian, F.,** NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 2005. **5**: 472-484.
- 65 **Tsytzykova, A. V., Tsitsikov, E. N. and Geha, R. S.,** The CD40L promoter contains nuclear factor of activated T cells-binding motifs which require AP-1 binding for activation of transcription. *J Biol Chem* 1996. **271**: 3763-3770.
- 66 **Dienz, O., Eaton, S. M., Krahl, T. J., Diehl, S., Charland, C., Dodge, J., Swain, S. L., Budd, R. C., Haynes, L. and Rincon, M.,** Accumulation of NFAT mediates IL-2 expression in memory, but not naive, CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007. **104**: 7175-7180.
- 67 **Szabo, S. J., Gold, J. S., Murphy, T. L. and Murphy, K. M.,** Identification of cis-acting regulatory elements controlling interleukin-4 gene expression in T cells: roles for NF-Y and NF-ATc. *Mol Cell Biol* 1993. **13**: 4793-4805.
- 68 **Chuvpilo, S., Schomberg, C., Gerwig, R., Heinfling, A., Reeves, R., Grummt, F. and Serfling, E.,** Multiple closely-linked NFAT/octamer and HMG I(Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter. *Nucleic Acids Res* 1993. **21**: 5694-5704.
- 69 **Hermann-Kleiter, N. and Baier, G.,** NFAT pulls the strings during CD4+ T helper cell effector functions. *Blood* 2010. **115**: 2989-2997.
- 70 **Sloka, S., Silva, C., Wang, J. and Yong, V. W.,** Predominance of Th2 polarization by vitamin D through a STAT6-dependent mechanism. *J Neuroinflammation* 2011. **8**: 56.
- 71 **Kreindler, J. L., Steele, C., Nguyen, N., Chan, Y. R., Pilewski, J. M., Alcorn, J. F., Vyas, Y. M., Aujla, S. J., Finelli, P., Blanchard, M., Zeigler, S. F., Logar, A., Hartigan, E., Kurs-Lasky, M., Rockette, H., Ray, A. and Kolls, J. K.,** Vitamin D3 attenuates Th2 responses to *Aspergillus fumigatus* mounted by CD4+ T cells from cystic fibrosis patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Clin Invest* 2010. **120**: 3242-3254.

7. Literaturverzeichnis

- 72 **Pichler, J., Gerstmayr, M., Szepefalusi, Z., Urbanek, R., Peterlik, M. and Willheim, M.,** 1 alpha,25(OH)2D3 inhibits not only Th1 but also Th2 differentiation in human cord blood T cells. *Pediatr Res* 2002. **52**: 12-18.
- 73 **Hartmann, B., Heine, G., Babina, M., Steinmeyer, A., Zugel, U., Radbruch, A. and Worm, M.,** Targeting the vitamin D receptor inhibits the B cell-dependent allergic immune response. *Allergy* 2011. **66**: 540-548.
- 74 **Heine, G., Anton, K., Henz, B. M. and Worm, M.,** 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits anti-CD40 plus IL-4-mediated IgE production in vitro. *Eur J Immunol* 2002. **32**: 3395-3404.
- 75 **Milovanovic, M., Heine, G., Hallatschek, W., Opitz, B., Radbruch, A. and Worm, M.,** Vitamin D receptor binds to the epsilon germline gene promoter and exhibits transrepressive activity. *J Allergy Clin Immunol* 2010. **126**: 1016-1023, 1023 e1011-1014.
- 76 **Stoekler, J. D., Stoekler, H. A., Kouttab, N. and Maizel, A. L.,** 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates CD38 expression on human lymphocytes. *J Immunol* 1996. **157**: 4908-4917.
- 77 **Shirakawa, A. K., Nagakubo, D., Hieshima, K., Nakayama, T., Jin, Z. and Yoshie, O.,** 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces CCR10 expression in terminally differentiating human B cells. *J Immunol* 2008. **180**: 2786-2795.
- 78 **O'Garra, A. and Barrat, F. J.,** In vitro generation of IL-10-producing regulatory CD4+ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by Th1- and Th2-inducing cytokines. *Immunol Lett* 2003. **85**: 135-139.
- 79 **Bartels, L. E., Jorgensen, S. P., Agnholt, J., Kelsen, J., Hvas, C. L. and Dahlerup, J. F.,** 1,25-dihydroxyvitamin D3 and dexamethasone increase interleukin-10 production in CD4+ T cells from patients with Crohn's disease. *Int Immunopharmacol* 2007. **7**: 1755-1764.
- 80 **Malavasi, F., Deaglio, S., Funaro, A., Ferrero, E., Horenstein, A. L., Ortolan, E., Vaisitti, T. and Aydin, S.,** Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev* 2008. **88**: 841-886.
- 81 **Liu, Q., Kriksunov, I. A., Graeff, R., Munshi, C., Lee, H. C. and Hao, Q.,** Crystal structure of human CD38 extracellular domain. *Structure* 2005. **13**: 1331-1339.
- 82 **Lee, H. C.,** Structure and enzymatic functions of human CD38. *Mol Med* 2006. **12**: 317-323.
- 83 **Deaglio, S., Mallone, R., Baj, G., Arnulfo, A., Surico, N., Dianzani, U., Mehta, K. and Malavasi, F.,** CD38/CD31, a receptor/ligand system ruling adhesion and signaling in human leukocytes. *Chem Immunol* 2000. **75**: 99-120.
- 84 **Mora, J. R., Iwata, M. and von Andrian, U. H.,** Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol* 2008. **8**: 685-698.
- 85 **Adorini, L.,** Intervention in autoimmunity: the potential of vitamin D receptor agonists. *Cell Immunol* 2005. **233**: 115-124.
- 86 **Huber, B.,** [100 years of allergy: Clemens von Pirquet--his concept of allergy and his basic understanding of the disease: 2: The Pirquet concept of allergy]. *Wien Klin Wochenschr* 2006. **118**: 718-727.
- 87 **Galli, S. J., Tsai, M. and Piliponsky, A. M.,** The development of allergic inflammation. *Nature* 2008. **454**: 445-454.
- 88 **Rajan, T. V.,** The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol* 2003. **24**: 376-379.
- 89 **Arshad, S. H. and Holgate, S.,** The role of IgE in allergen-induced inflammation and the potential for intervention with a humanized monoclonal anti-IgE antibody. *Clin Exp Allergy* 2001. **31**: 1344-1351.

7. Literaturverzeichnis

- 90 **Akdis, C. A., Akdis, M., Bieber, T., Bindslev-Jensen, C., Boguniewicz, M., Eigenmann, P., Hamid, Q., Kapp, A., Leung, D. Y., Lipozencic, J., Luger, T. A., Muraro, A., Novak, N., Platts-Mills, T. A., Rosenwasser, L., Scheynius, A., Simons, F. E., Spergel, J., Turjanmaa, K., Wahn, U., Weidinger, S., Werfel, T. and Zuberbier, T.**, Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. *J Allergy Clin Immunol* 2006. **118**: 152-169.
- 91 **Kool, M., Hammad, H. and Lambrecht, B. N.**, Cellular networks controlling Th2 polarization in allergy and immunity. *F1000 Biol Rep* 2012. **4**: 6.
- 92 **Corry, D. B. and Kheradmand, F.**, Induction and regulation of the IgE response. *Nature* 1999. **402**: B18-23.
- 93 **Laman, J. D., Claassen, E. and Noelle, R. J.**, Functions of CD40 and its ligand, gp39 (CD40L). *Crit Rev Immunol* 1996. **16**: 59-108.
- 94 **Winter, W. E., Hardt, N. S. and Fuhrman, S.**, Immunoglobulin E: importance in parasitic infections and hypersensitivity responses. *Arch Pathol Lab Med* 2000. **124**: 1382-1385.
- 95 **Demirjian, M., Rumbyrt, J. S., Gowda, V. C. and Klaustermeier, W. B.**, Serum IgE and eosinophil count in allergic rhinitis--analysis using a modified Bayes' theorem. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2012. **40**: 281-287.
- 96 **Blumenthal, M. N.**, Genetic, epigenetic, and environmental factors in asthma and allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2012. **108**: 69-73.
- 97 **Yanagihara, Y.**, Regulatory mechanisms of human IgE synthesis. *Allergology International* 2003. **52**: 1-12.
- 98 **Morris, S. C., Lees, A. and Finkelman, F. D.**, In vivo activation of naive T cells by antigen-presenting B cells. *J Immunol* 1994. **152**: 3777-3785.
- 99 **Constant, S. L.**, B lymphocytes as antigen-presenting cells for CD4+ T cell priming in vivo. *J Immunol* 1999. **162**: 5695-5703.
- 100 **Rodriguez-Pinto, D.**, B cells as antigen presenting cells. *Cell Immunol* 2005. **238**: 67-75.
- 101 **Garside, P., Ingulli, E., Merica, R. R., Johnson, J. G., Noelle, R. J. and Jenkins, M. K.**, Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* 1998. **281**: 96-99.
- 102 **Pleiman, C. M., D'Ambrosio, D. and Cambier, J. C.**, The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction. *Immunol Today* 1994. **15**: 393-399.
- 103 **Chen, X. and Jensen, P. E.**, The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2008. **56**: 77-83.
- 104 **Lanzavecchia, A.**, Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1990. **8**: 773-793.
- 105 **Serreze, D. V., Fleming, S. A., Chapman, H. D., Richard, S. D., Leiter, E. H. and Tisch, R. M.**, B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 1998. **161**: 3912-3918.
- 106 **Byersdorfer, C. A., Dipaolo, R. J., Petzold, S. J. and Unanue, E. R.**, Following immunization antigen becomes concentrated in a limited number of APCs including B cells. *J Immunol* 2004. **173**: 6627-6634.
- 107 **Lenchow, D. J., Sperling, A. I., Cooke, M. P., Freeman, G., Rhee, L., Decker, D. C., Gray, G., Nadler, L. M., Goodnow, C. C. and Bluestone, J. A.**, Differential up-regulation of the B7-1 and B7-2 costimulatory molecules after Ig receptor engagement by antigen. *J Immunol* 1994. **153**: 1990-1997.

7. Literaturverzeichnis

- 108 **Ireland, S. and Monson, N.**, Potential impact of B cells on T cell function in multiple sclerosis. *Mult Scler Int* 2011. **2011**: 423971.
- 109 **Anderton, S. M. and Fillatreau, S.**, Activated B cells in autoimmune diseases: the case for a regulatory role. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008. **4**: 657-666.
- 110 **Lenschow, D. J., Walunas, T. L. and Bluestone, J. A.**, CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996. **14**: 233-258.
- 111 **Elgueta, R., Benson, M. J., de Vries, V. C., Wasiuk, A., Guo, Y. and Noelle, R. J.**, Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* 2009. **229**: 152-172.
- 112 **Croft, M., So, T., Duan, W. and Soroosh, P.**, The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunol Rev* 2009. **229**: 173-191.
- 113 **Flies, D. B., Sandler, B. J., Sznol, M. and Chen, L.**, Blockade of the B7-H1/PD-1 pathway for cancer immunotherapy. *Yale J Biol Med* 2011. **84**: 409-421.
- 114 **Buhlmann, J. E., Foy, T. M., Aruffo, A., Crassi, K. M., Ledbetter, J. A., Green, W. R., Xu, J. C., Shultz, L. D., Roopesian, D., Flavell, R. A. and et al.**, In the absence of a CD40 signal, B cells are tolerogenic. *Immunity* 1995. **2**: 645-653.
- 115 **Evans, D. E., Munks, M. W., Purkerson, J. M. and Parker, D. C.**, Resting B lymphocytes as APC for naive T lymphocytes: dependence on CD40 ligand/CD40. *J Immunol* 2000. **164**: 688-697.
- 116 **Schultze, J. L., Michalak, S., Seamon, M. J., Dranoff, G., Jung, K., Daley, J., Delgado, J. C., Gribben, J. G. and Nadler, L. M.**, CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Clin Invest* 1997. **100**: 2757-2765.
- 117 **Ahmadi, T., Flies, A., Efebera, Y. and Sherr, D. H.**, CD40 Ligand-activated, antigen-specific B cells are comparable to mature dendritic cells in presenting protein antigens and major histocompatibility complex class I- and class II-binding peptides. *Immunology* 2008. **124**: 129-140.
- 118 **von Bergwelt-Baildon, M., Shimabukuro-Vornhagen, A., Popov, A., Klein-Gonzalez, N., Fiore, F., Debey, S., Draube, A., Maecker, B., Menezes, I., Nadler, L. M. and Schultze, J. L.**, CD40-activated B cells express full lymph node homing triad and induce T-cell chemotaxis: potential as cellular adjuvants. *Blood* 2006. **107**: 2786-2789.
- 119 **Lapointe, R., Bellemare-Pelletier, A., Housseau, F., Thibodeau, J. and Hwu, P.**, CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res* 2003. **63**: 2836-2843.
- 120 **Harp, C. T., Lovett-Racke, A. E., Racke, M. K., Frohman, E. M. and Monson, N. L.**, Impact of myelin-specific antigen presenting B cells on T cell activation in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2008. **128**: 382-391.
- 121 **Mamula, M. J., Fatenejad, S. and Craft, J.**, B cells process and present lupus autoantigens that initiate autoimmune T cell responses. *J Immunol* 1994. **152**: 1453-1461.
- 122 **Dorner, T.**, Crossroads of B cell activation in autoimmunity: rationale of targeting B cells. *J Rheumatol Suppl* 2006. **77**: 3-11.
- 123 **Baroni, E., Biffi, M., Benigni, F., Monno, A., Carlucci, D., Carmeliet, G., Bouillon, R. and D'Ambrosio, D.**, VDR-dependent regulation of mast cell maturation mediated by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Leukoc Biol* 2007. **81**: 250-262.
- 124 **Adorini, L., Penna, G., Giarratana, N., Roncari, A., Amuchastegui, S., Daniel, K. C. and Uskokovic, M.**, Dendritic cells as key targets for immunomodulation by Vitamin D receptor ligands. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004. **89-90**: 437-441.

7. Literaturverzeichnis

- 125 **Urry, Z., Xystrakis, E., Richards, D. F., McDonald, J., Sattar, Z., Cousins, D. J., Corrigan, C. J., Hickman, E., Brown, Z. and Hawrylowicz, C. M.,** Ligation of TLR9 induced on human IL-10-secreting Tregs by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 abrogates regulatory function. *J Clin Invest* 2009. **119**: 387-398.
- 126 **Ghoreishi, M., Bach, P., Obst, J., Komba, M., Fleet, J. C. and Dutz, J. P.,** Expansion of antigen-specific regulatory T cells with the topical vitamin d analog calcipotriol. *J Immunol* 2009. **182**: 6071-6078.
- 127 **McGlade, J. P., Gorman, S., Zosky, G. R., Larcombe, A. N., Sly, P. D., Finlay-Jones, J. J., Turner, D. J. and Hart, P. H.,** Suppression of the asthmatic phenotype by ultraviolet B-induced, antigen-specific regulatory cells. *Clin Exp Allergy* 2007. **37**: 1267-1276.
- 128 **Matheu, V., Back, O., Mondoc, E. and Issazadeh-Navikas, S.,** Dual effects of vitamin D-induced alteration of TH1/TH2 cytokine expression: enhancing IgE production and decreasing airway eosinophilia in murine allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 2003. **112**: 585-592.
- 129 **Topilski, I., Flaishon, L., Naveh, Y., Harmelin, A., Levo, Y. and Shachar, I.,** The anti-inflammatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on Th2 cells in vivo are due in part to the control of integrin-mediated T lymphocyte homing. *Eur J Immunol* 2004. **34**: 1068-1076.
- 130 **Brehm, J. M., Celedon, J. C., Soto-Quiros, M. E., Avila, L., Hunninghake, G. M., Forno, E., Laskey, D., Sylvia, J. S., Hollis, B. W., Weiss, S. T. and Litonjua, A. A.,** Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica. *Am J Respir Crit Care Med* 2009. **179**: 765-771.
- 131 **Hollams, E. M., Hart, P. H., Holt, B. J., Serralha, M., Parsons, F., de Klerk, N. H., Zhang, G., Sly, P. D. and Holt, P. G.,** Vitamin D and atopy and asthma phenotypes in children: a longitudinal cohort study. *Eur Respir J* 2011. **38**: 1320-1327.
- 132 **Black, P. N. and Scragg, R.,** Relationship between serum 25-hydroxyvitamin d and pulmonary function in the third national health and nutrition examination survey. *Chest* 2005. **128**: 3792-3798.
- 133 **Li, F., Peng, M., Jiang, L., Sun, Q., Zhang, K., Lian, F., Litonjua, A. A., Gao, J. and Gao, X.,** Vitamin D deficiency is associated with decreased lung function in Chinese adults with asthma. *Respiration* 2011. **81**: 469-475.
- 134 **Zosky, G. R., Berry, L. J., Elliot, J. G., James, A. L., Gorman, S. and Hart, P. H.,** Vitamin D deficiency causes deficits in lung function and alters lung structure. *Am J Respir Crit Care Med* 2011. **183**: 1336-1343.
- 135 **Bosse, Y., Maghni, K. and Hudson, T. J.,** 1 α ,25-dihydroxy-vitamin D3 stimulation of bronchial smooth muscle cells induces autocrine, contractility, and remodeling processes. *Physiol Genomics* 2007. **29**: 161-168.
- 136 **Xystrakis, E., Kusumakar, S., Boswell, S., Peek, E., Urry, Z., Richards, D. F., Adikibi, T., Pridgeon, C., Dallman, M., Loke, T. K., Robinson, D. S., Barrat, F. J., O'Garra, A., Lavender, P., Lee, T. H., Corrigan, C. and Hawrylowicz, C. M.,** Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest* 2006. **116**: 146-155.
- 137 **Searing, D. A., Zhang, Y., Murphy, J. R., Hauk, P. J., Goleva, E. and Leung, D. Y.,** Decreased serum vitamin D levels in children with asthma are associated with increased corticosteroid use. *J Allergy Clin Immunol* 2010. **125**: 995-1000.
- 138 **Sutherland, E. R., Goleva, E., Jackson, L. P., Stevens, A. D. and Leung, D. Y.,** Vitamin D levels, lung function, and steroid response in adult asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2010. **181**: 699-704.

7. Literaturverzeichnis

- 139 **Wang, W., Li, J. J., Foster, P. S., Hansbro, P. M. and Yang, M.,** Potential therapeutic targets for steroid-resistant asthma. *Curr Drug Targets* 2010. **11**: 957-970.
- 140 **Urashima, M., Segawa, T., Okazaki, M., Kurihara, M., Wada, Y. and Ida, H.,** Randomized trial of vitamin D supplementation to prevent seasonal influenza A in schoolchildren. *Am J Clin Nutr* 2010. **91**: 1255-1260.
- 141 **Majak, P., Olszowiec-Chlebna, M., Smejda, K. and Stelmach, I.,** Vitamin D supplementation in children may prevent asthma exacerbation triggered by acute respiratory infection. *J Allergy Clin Immunol* 2011. **127**: 1294-1296.
- 142 **Hypponen, E., Sovio, U., Wjst, M., Patel, S., Pekkanen, J., Hartikainen, A. L. and Jarvelinb, M. R.,** Infant vitamin d supplementation and allergic conditions in adulthood: northern Finland birth cohort 1966. *Ann N Y Acad Sci* 2004. **1037**: 84-95.
- 143 **Back, O., Blomquist, H. K., Hernell, O. and Stenberg, B.,** Does vitamin D intake during infancy promote the development of atopic allergy? *Acta Derm Venereol* 2009. **89**: 28-32.
- 144 **Raby, B. A., Lazarus, R., Silverman, E. K., Lake, S., Lange, C., Wjst, M. and Weiss, S. T.,** Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with childhood and adult asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004. **170**: 1057-1065.
- 145 **Poon, A. H., Laprise, C., Lemire, M., Montpetit, A., Sinnett, D., Schurr, E. and Hudson, T. J.,** Association of vitamin D receptor genetic variants with susceptibility to asthma and atopy. *Am J Respir Crit Care Med* 2004. **170**: 967-973.
- 146 **Bieber, T.,** Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2008. **358**: 1483-1494.
- 147 **Bieber, T.,** Atopic dermatitis. *Ann Dermatol* 2010. **22**: 125-137.
- 148 **Elias, P. M., Hatano, Y. and Williams, M. L.,** Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: outside-inside-outside pathogenic mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 2008. **121**: 1337-1343.
- 149 **Gurlek, A., Pittelkow, M. R. and Kumar, R.,** Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3): implications in cell growth and differentiation. *Endocr Rev* 2002. **23**: 763-786.
- 150 **Zhang, J. Z., Maruyama, K., Ono, I. and Kaneko, F.,** Production and secretion of platelet-derived growth factor AB by cultured human keratinocytes: regulatory effects of phorbol 12-myristate 13-acetate, tretinoin, 1,25-dihydroxyvitamin D3, and several cytokines. *J Dermatol* 1995. **22**: 305-309.
- 151 **Geilen, C. C., Bektas, M., Wieder, T., Kodelja, V., Goerdt, S. and Orfanos, C. E.,** 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 induces sphingomyelin hydrolysis in HaCaT cells via tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* 1997. **272**: 8997-9001.
- 152 **Zhang, J. Z., Maruyama, K., Ono, I., Iwatsuki, K. and Kaneko, F.,** Regulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and a novel vitamin D3 analogue MC903 on secretion of interleukin-1 alpha (IL-1 alpha) and IL-8 by normal human keratinocytes and a human squamous cell carcinoma cell line (HSC-1). *J Dermatol Sci* 1994. **7**: 24-31.
- 153 **Fukuoka, M., Ogino, Y., Sato, H., Ohta, T., Komoriya, K., Nishioka, K. and Katayama, I.,** RANTES expression in psoriatic skin, and regulation of RANTES and IL-8 production in cultured epidermal keratinocytes by active vitamin D3 (tacalcitol). *Br J Dermatol* 1998. **138**: 63-70.
- 154 **Bikle, D. D., Chang, S., Crumrine, D., Elalieh, H., Man, M. Q., Choi, E. H., Dardenne, O., Xie, Z., Arnaud, R. S., Feingold, K. and Elias, P. M.,** 25 Hydroxyvitamin D 1 alpha-hydroxylase is required for optimal epidermal differentiation and permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* 2004. **122**: 984-992.
- 155 **Schauber, J. and Gallo, R. L.,** The vitamin D pathway: a new target for control of the skin's immune response? *Exp Dermatol* 2008. **17**: 633-639.

7. Literaturverzeichnis

- 156 **Zhang, Y.-g., Wu, S. and Sun, J.**, Vitamin D, vitamin D receptor and tissue barriers. *Tissue Barriers* 2013. **1**: e23118.
- 157 **van der Aar, A. M., Sibiryak, D. S., Bakdash, G., van Capel, T. M., van der Kleij, H. P., Opstelten, D. J., Teunissen, M. B., Kapsenberg, M. L. and de Jong, E. C.**, Vitamin D3 targets epidermal and dermal dendritic cells for induction of distinct regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2011. **127**: 1532-1540 e1537.
- 158 **Oren, E., Banerji, A. and Camargo, C. A., Jr.**, Vitamin D and atopic disorders in an obese population screened for vitamin D deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2008. **121**: 533-534.
- 159 **Peroni, D. G., Piacentini, G. L., Cametti, E., Chinellato, I. and Boner, A. L.**, Correlation between serum 25-hydroxyvitamin D levels and severity of atopic dermatitis in children. *Br J Dermatol* 2011. **164**: 1078-1082.
- 160 **Heimbeck, L., Wjst, M. and Apfelbacher, C. J.**, Low vitamin D serum level is inversely associated with eczema in children and adolescents in Germany. *Allergy* 2013.
- 161 **Sidbury, R., Sullivan, A. F., Thadhani, R. I. and Camargo, C. A., Jr.**, Randomized controlled trial of vitamin D supplementation for winter-related atopic dermatitis in Boston: a pilot study. *Br J Dermatol* 2008. **159**: 245-247.
- 162 **Amestejani, M., Salehi, B. S., Vasigh, M., Sobhkhiz, A., Karami, M., Alinia, H., Kamrava, S. K., Shampour, N., Ghalehbaghi, B. and Behzadi, A. H.**, Vitamin D supplementation in the treatment of atopic dermatitis: a clinical trial study. *J Drugs Dermatol* 2012. **11**: 327-330.
- 163 **Vahavihu, K., Ala-Houhala, M., Peric, M., Karisola, P., Kautiainen, H., Hasan, T., Snellman, E., Alenius, H., Schaubert, J. and Reunala, T.**, Narrowband ultraviolet B treatment improves vitamin D balance and alters antimicrobial peptide expression in skin lesions of psoriasis and atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2010. **163**: 321-328.
- 164 **Danescu, L. G., Levy, S. and Levy, J.**, Vitamin D and diabetes mellitus. *Endocrine* 2009. **35**: 11-17.
- 165 **Munger, K. L., Levin, L. I., Hollis, B. W., Howard, N. S. and Ascherio, A.**, Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 2006. **296**: 2832-2838.
- 166 **Cantorna, M. T.**, Vitamin D and multiple sclerosis: an update. *Nutr Rev* 2008. **66**: S135-138.
- 167 **Kamen, D. L., Cooper, G. S., Bouali, H., Shaftman, S. R., Hollis, B. W. and Gilkeson, G. S.**, Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2006. **5**: 114-117.
- 168 **Thudi, A., Yin, S., Wandstrat, A. E., Li, Q. Z. and Olsen, N. J.**, Vitamin D levels and disease status in Texas patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med Sci* 2008. **335**: 99-104.
- 169 **Haga, H. J., Schmedes, A., Naderi, Y., Moreno, A. M. and Peen, E.**, Severe deficiency of 25-hydroxyvitamin D(3) (25-OH-D (3)) is associated with high disease activity of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2013.
- 170 **Higgins, M. J., Mackie, S. L., Thalayasingam, N., Bingham, S. J., Hamilton, J. and Kelly, C. A.**, The effect of vitamin D levels on the assessment of disease activity in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2013.
- 171 **Rossini, M., Maddali Bongi, S., La Montagna, G., Minisola, G., Malavolta, N., Bernini, L., Cacace, E., Sinigaglia, L., Di Munno, O. and Adami, S.**, Vitamin D deficiency in rheumatoid arthritis: prevalence, determinants and associations with disease activity and disability. *Arthritis Res Ther* 2010. **12**: R216.

7. Literaturverzeichnis

- 172 **Notkins, A. L. and Lernmark, A.**, Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *Journal of Clinical Investigation* 2001. **108**: 1247-1252.
- 173 **Hung, J. T., Liao, J. H., Lin, Y. C., Chang, H. Y., Wu, S. F., Chang, T. H., Kung, J. T., Hsieh, S. L., McDevitt, H. and Sytwu, H. K.**, Immunopathogenic role of TH1 cells in autoimmune diabetes: evidence from a T1 and T2 doubly transgenic non-obese diabetic mouse model. *J Autoimmun* 2005. **25**: 181-192.
- 174 **Homann, D. and von Herrath, M.**, Regulatory T cells and type 1 diabetes. *Clin Immunol* 2004. **112**: 202-209.
- 175 **Adorini, L.**, Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting autoimmune diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2003. **987**: 258-261.
- 176 **Lee, S., Clark, S. A., Gill, R. K. and Christakos, S.**, 1,25-Dihydroxyvitamin-D(3) and Pancreatic Beta-Cell Function - Vitamin-D Receptors, Gene-Expression, and Insulin-Secretion. *Endocrinology* 1994. **134**: 1602-1610.
- 177 **Bener, A., Alsaied, A., Al-Ali, M., Al-Kubaisi, A., Basha, B., Abraham, A., Guiter, G. and Mian, M.**, High prevalence of vitamin D deficiency in type 1 diabetes mellitus and healthy children. *Acta Diabetologica* 2009. **46**: 183-189.
- 178 **Svoren, B. M., Volkening, L. K., Wood, J. R. and Laffel, L. M. B.**, Significant Vitamin D Deficiency in Youth with Type 1 Diabetes Mellitus. *Journal of Pediatrics* 2009. **154**: 132-134.
- 179 **Pozzilli, P., Manfrini, S., Crino, A., Picardi, A., Leomanni, C., Cherubini, V., Valente, L., Khazrai, M., Visalli, N. and Grp, I.**, Low levels of 25-hydroxyvitamin D-3 and 1,25-dihydroxyvitamin D-3 in patients with newly diagnosed type 1 diabetes. *Hormone and Metabolic Research* 2005. **37**: 680-683.
- 180 **Hypponen, E., Laara, E., Reunanene, A., Jarvelin, M. R. and Virtanen, S. M.**, Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 2001. **358**: 1500-1503.
- 181 **Marjamaki, L., Niinisto, S., Kenward, M. G., Uusitalo, L., Uusitalo, U., Ovaskainen, M. L., Kronberg-Kippila, C., Simell, O., Veijola, R., Ilonen, J., Knip, M. and Virtanen, S. M.**, Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of advanced beta cell autoimmunity and type 1 diabetes in offspring. *Diabetologia* 2010. **53**: 1599-1607.
- 182 **Zipitis, C. S. and Akobeng, A. K.**, Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Archives of Disease in Childhood* 2008. **93**: 512-517.
- 183 **Bizzarri, C., Pitocco, D., Napoli, N., Di Stasio, E., Maggi, D., Manfrini, S., Suraci, C., Cavallo, M. G., Cappa, M., Ghirlanda, G. and Pozzilli, P.**, No protective effect of calcitriol on beta-cell function in recent-onset type 1 diabetes: the IMDIAB XIII trial. *Diabetes Care* 2010. **33**: 1962-1963.
- 184 **Mathieu, C., Waer, M., Casteels, K., Laureys, J. and Bouillon, R.**, Prevention of Type-I Diabetes in Nod Mice by Nonhypercalcemic Doses of a New Structural Analog of 1,25-Dihydroxyvitamin D-3, Kh1060. *Endocrinology* 1995. **136**: 866-872.
- 185 **Mathieu, C., Waer, M., Laureys, J., Rutgeerts, O. and Bouillon, R.**, Prevention of Autoimmune Diabetes in Nod Mice by 1,25-Dihydroxyvitamin-D-3. *Diabetologia* 1994. **37**: 552-558.
- 186 **Mathieu, C., Laureys, J., Sobis, H., Vandeputte, M., Waer, M. and Bouillon, R.**, 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 Prevents Insulinitis in Nod Mice. *Diabetes* 1992. **41**: 1491-1495.
- 187 **Overbergh, L., Decallonne, B., Waer, M., Rutgeerts, O., Valckx, D., Casteels, K. M., Laureys, J., Bouillon, R. and Mathieu, C.**, 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3

7. Literaturverzeichnis

- induces an autoantigen-specific T-helper 1/T-helper 2 immune shift in NOD mice immunized with GAD65 (p524-543). *Diabetes* 2000. **49**: 1301-1307.
- 188 **Stromnes, I. M., Cerretti, L. M., Liggitt, D., Harris, R. A. and Goverman, J. M.,** Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat Med* 2008. **14**: 337-342.
- 189 **Huan, J., Culbertson, N., Spencer, L., Bartholomew, R., Burrows, G. G., Chou, Y. K., Bourdette, D., Ziegler, S. F., Offner, H. and Vandenbark, A. A.,** Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res* 2005. **81**: 45-52.
- 190 **Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H. L. and Hafler, D. A.,** Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004. **199**: 971-979.
- 191 **Mehta, B. K.,** New hypotheses on sunlight and the geographic variability of multiple sclerosis prevalence. *J Neurol Sci* 2010. **292**: 5-10.
- 192 **Kragt, J., van Amerongen, B., Killestein, J., Dijkstra, C., Uitdehaag, B., Polman, C. and Lips, P.,** Higher levels of 25-hydroxyvitamin D are associated with a lower incidence of multiple sclerosis only in women. *Mult Scler* 2009. **15**: 9-15.
- 193 **Soilu-Hanninen, M., Airas, L., Mononen, I., Heikkila, A., Viljanen, M. and Hanninen, A.,** 25-Hydroxyvitamin D levels in serum at the onset of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005. **11**: 266-271.
- 194 **Smolders, J., Peelen, E., Thewissen, M., Cohen Tervaert, J. W., Menheere, P., Hupperts, R. and Damoiseaux, J.,** Safety and T cell modulating effects of high dose vitamin D3 supplementation in multiple sclerosis. *PLoS One* 2010. **5**: e15235.
- 195 **Burton, J. M., Kimball, S., Vieth, R., Bar-Or, A., Dosch, H. M., Cheung, R., Gagne, D., D'Souza, C., Ursell, M. and O'Connor, P.,** A phase I/II dose-escalation trial of vitamin D3 and calcium in multiple sclerosis. *Neurology* 2010. **74**: 1852-1859.
- 196 **Smolders, J., Damoiseaux, J., Menheere, P. and Hupperts, R.,** Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review. *J Neuroimmunol* 2008. **194**: 7-17.
- 197 **Tsokos, G. C.,** Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2011. **365**: 2110-2121.
- 198 **Shin, M. S., Lee, N. and Kang, I.,** Effector T-cell subsets in systemic lupus erythematosus: update focusing on Th17 cells. *Curr Opin Rheumatol* 2011. **23**: 444-448.
- 199 **Ching, K. H., Burbelo, P. D., Tipton, C., Wei, C., Petri, M., Sanz, I. and Iadarola, M. J.,** Two Major Autoantibody Clusters in Systemic Lupus Erythematosus. *PLoS One* 2012. **7**: e32001.
- 200 **Ruiz-Irastorza, G., Egurbide, M. V., Olivares, N., Martinez-Berriotxo, A. and Aguirre, C.,** Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus: prevalence, predictors and clinical consequences. *Rheumatology (Oxford)* 2008. **47**: 920-923.
- 201 **Borba, V. Z., Vieira, J. G., Kasamatsu, T., Radominski, S. C., Sato, E. I. and Lazaretti-Castro, M.,** Vitamin D deficiency in patients with active systemic lupus erythematosus. *Osteoporos Int* 2009. **20**: 427-433.
- 202 **Abou-Raya, A., Abou-Raya, S. and Helmii, M.,** The effect of vitamin D supplementation on inflammatory and hemostatic markers and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus: a randomized placebo-controlled trial. *J Rheumatol* 2013. **40**: 265-272.
- 203 **Terrier, B., Derian, N., Schoindre, Y., Chaara, W., Geri, G., Zahr, N., Mariampillai, K., Rosenzweig, M., Carpentier, W., Musset, L., Piette, J. C., Six, A., Klatzmann, D., Saadoun, D., Patrice, C. and Costedoat-Chalumeau, N.,** Restoration of regulatory and effector T cell balance and B cell homeostasis in systemic lupus erythematosus patients through vitamin D supplementation. *Arthritis Res Ther* 2012. **14**: R221.

7. Literaturverzeichnis

- 204 **Ruiz-Irastorza, G., Gordo, S., Olivares, N., Egurbide, M. V. and Aguirre, C.,** Changes in vitamin D levels in patients with systemic lupus erythematosus: Effects on fatigue, disease activity, and damage. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2010. **62**: 1160-1165.
- 205 **Scott, D. L., Wolfe, F. and Huizinga, T. W.,** Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010. **376**: 1094-1108.
- 206 **Patel, S., Farragher, T., Berry, J., Bunn, D., Silman, A. and Symmons, D.,** Association between serum vitamin D metabolite levels and disease activity in patients with early inflammatory polyarthritis. *Arthritis Rheum* 2007. **56**: 2143-2149.
- 207 **Haque, U. J., Bathon, J. M. and Giles, J. T.,** Association of vitamin D with cardiometabolic risk factors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012. **64**: 1497-1504.
- 208 **Kostoglou-Athanassiou, I., Athanassiou, P., Lyraki, A., Raftakis, I. and Antoniadis, C.,** Vitamin D and rheumatoid arthritis. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2012. **3**: 181-187.
- 209 **Cantorna, M. T., Hayes, C. E. and DeLuca, H. F.,** 1,25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis. *J Nutr* 1998. **128**: 68-72.
- 210 **Hein, G. and Oelzner, P.,** [Vitamin D metabolites in rheumatoid arthritis: findings--hypotheses--consequences]. *Z Rheumatol* 2000. **59 Suppl 1**: 28-32.
- 211 **Hiraki, L. T., Munger, K. L., Costenbader, K. H. and Karlson, E. W.,** Dietary intake of vitamin D during adolescence and risk of adult-onset systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012. **64**: 1829-1836.
- 212 **Baker, J. F., Baker, D. G., Toedter, G., Shults, J., Von Feldt, J. M. and Leonard, M. B.,** Associations between vitamin D, disease activity, and clinical response to therapy in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2012. **30**: 658-664.
- 213 **Frentsch, M., Arbach, O., Kirchhoff, D., Moewes, B., Worm, M., Rothe, M., Scheffold, A. and Thiel, A.,** Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat Med* 2005. **11**: 1118-1124.
- 214 **Toell, A., Gonzalez, M. M., Ruf, D., Steinmeyer, A., Ishizuka, S. and Carlberg, C.,** Different molecular mechanisms of vitamin D(3) receptor antagonists. *Mol Pharmacol* 2001. **59**: 1478-1485.
- 215 **Schmittgen, T. D. and Livak, K. J.,** Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008. **3**: 1101-1108.
- 216 **Youden, W. J.,** Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 1950. **3**: 32-35.
- 217 **Lagunova, Z., Porojnicu, A. C., Aksnes, L., Holick, M. F., Iani, V., Bruland, O. S. and Moan, J.,** Effect of vitamin D supplementation and ultraviolet B exposure on serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in healthy volunteers: a randomized, crossover clinical trial. *Br J Dermatol* 2013.
- 218 **Klein, U., Rajewsky, K. and Kuppers, R.,** Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 1998. **188**: 1679-1689.
- 219 **Mei, H. E., Yoshida, T., Sime, W., Hiepe, F., Thiele, K., Manz, R. A., Radbruch, A. and Dorner, T.,** Blood-borne human plasma cells in steady-state are derived from mucosal immune responses. *Blood* 2008.
- 220 **Fargeas, C., Wu, C. Y., Luo, H. Y., Sarfati, M., Delespesse, G. and Wu, J. P.,** 1,25(OH)₂ vitamin D₃ inhibits the CD23 gene expression by human peripheral blood monocytes. *J Immunol* 1990. **145**: 4053-4058.

7. Literaturverzeichnis

- 221 **Carosso, A., Bugiani, M., Migliore, E., Anto, J. M. and DeMarco, R.,** Reference values of total serum IgE and their significance in the diagnosis of allergy in young European adults. *Int Arch Allergy Immunol* 2007. **142**: 230-238.
- 222 **Havnen, J., Amlie, P. A., Hvatum, M., Oseid, S., Veggan, T. and Aas, K.,** IgE concentrations in allergic asthma in children. *Arch Dis Child* 1973. **48**: 850-855.
- 223 **Amanna, I. J., Carlson, N. E. and Slifka, M. K.,** Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *N Engl J Med* 2007. **357**: 1903-1915.
- 224 **Frolich, D., Giesecke, C., Mei, H. E., Reiter, K., Daridon, C., Lipsky, P. E. and Dorner, T.,** Secondary immunization generates clonally related antigen-specific plasma cells and memory B cells. *J Immunol* 2010. **185**: 3103-3110.
- 225 **Heine, G., Drozdenko, G., Lahl, A., Unterwalder, N., Mei, H., Volk, H. D., Dorner, T., Radbruch, A. and Worm, M.,** Efficient tetanus toxoid immunization on vitamin D supplementation. *Eur J Clin Nutr* 2011. **65**: 329-334.
- 226 **Jeannin, P., Delneste, Y., Lecoanet-Henchoz, S., Gauchat, J. F., Ellis, J. and Bonnefoy, J. Y.,** CD86 (B7-2) on human B cells. A functional role in proliferation and selective differentiation into IgE- and IgG4-producing cells. *J Biol Chem* 1997. **272**: 15613-15619.
- 227 **Brandt, K., van der Bosch, J., Fliegert, R. and Gehring, S.,** TSST-1 induces Th1 or Th2 differentiation in naive CD4+ T cells in a dose- and APC-dependent manner. *Scand J Immunol* 2002. **56**: 572-579.
- 228 **Zhu, J., Yamane, H. and Paul, W. E.,** Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol* 2010. **28**: 445-489.
- 229 **Bouillon, R., Carmeliet, G., Verlinden, L., van Etten, E., Verstuyf, A., Luderer, H. F., Lieben, L., Mathieu, C. and Demay, M.,** Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 2008. **29**: 726-776.
- 230 **Adams, J. S., Chen, H., Chun, R., Gacad, M. A., Encinas, C., Ren, S., Nguyen, L., Wu, S., Hewison, M. and Barsony, J.,** Response element binding proteins and intracellular vitamin D binding proteins: novel regulators of vitamin D trafficking, action and metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004. **89-90**: 461-465.
- 231 **Diehn, M., Alizadeh, A. A., Rando, O. J., Liu, C. L., Stankunas, K., Botstein, D., Crabtree, G. R. and Brown, P. O.,** Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002. **99**: 11796-11801.
- 232 **Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Azuma, M., Okumura, K., Lanier, L. L. and Banchereau, J.,** B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 1994. **180**: 1841-1847.
- 233 **Holick, M. F.,** Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007. **357**: 266-281.
- 234 **Lips, P.,** Worldwide status of vitamin D nutrition. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010. **121**: 297-300.
- 235 **Hintzpeter, B., Mensink, G. B., Thierfelder, W., Muller, M. J. and Scheidt-Nave, C.,** Vitamin D status and health correlates among German adults. *Eur J Clin Nutr* 2008. **62**: 1079-1089.
- 236 **Brown, J., Ignatius, A., Amling, M. and Barvencik, F.,** New perspectives on vitamin D sources in Germany based on a novel mathematical bottom-up model of 25(OH)D serum concentrations. *Eur J Nutr* 2012.
- 237 **Bozzetto, S., Carraro, S., Giordano, G., Boner, A. and Baraldi, E.,** Asthma, allergy and respiratory infections: the vitamin D hypothesis. *Allergy* 2012. **67**: 10-17.
- 238 **Reinholz, M., Ruzicka, T. and Schaubert, J.,** Vitamin D and its role in allergic disease. *Clin Exp Allergy* 2012. **42**: 817-826.

7. Literaturverzeichnis

- 239 **Agmon-Levin, N., Theodor, E., Segal, R. and Shoenfeld, Y.**, Vitamin D in Systemic and Organ-Specific Autoimmune Diseases. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 2012: 1-11.
- 240 **Lou, Y. R., Molnar, F., Perakyla, M., Qiao, S., Kalueff, A. V., St-Arnaud, R., Carlberg, C. and Tuohimaa, P.**, 25-Hydroxyvitamin D(3) is an agonistic vitamin D receptor ligand. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010. **118**: 162-170.
- 241 **Brandi, M. L.**, Indications on the use of vitamin D and vitamin D metabolites in clinical phenotypes. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2010. **7**: 243-250.
- 242 **Smith, D. C., Johnson, C. S., Freeman, C. C., Muindi, J., Wilson, J. W. and Trump, D. L.**, A Phase I trial of calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) in patients with advanced malignancy. *Clin Cancer Res* 1999. **5**: 1339-1345.
- 243 **van Etten, E. and Mathieu, C.**, Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005. **97**: 93-101.
- 244 **Jones, G.**, Extrarenal Vitamin D Activation and Interactions Between Vitamin D, Vitamin D, and Vitamin D Analogs. *Annu Rev Nutr* 2013.
- 245 **Clements, M. R., Davies, M., Hayes, M. E., Hickey, C. D., Lumb, G. A., Mawer, E. B. and Adams, P. H.**, The role of 1,25-dihydroxyvitamin D in the mechanism of acquired vitamin D deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1992. **37**: 17-27.
- 246 **Zittermann, A. and Gummert, J. F.**, Nonclassical vitamin D action. *Nutrients* 2010. **2**: 408-425.
- 247 **Himmelstein, S., Clemens, T. L., Rubin, A. and Lindsay, R.**, Vitamin D supplementation in elderly nursing home residents increases 25(OH)D but not 1,25(OH)2D. *Am J Clin Nutr* 1990. **52**: 701-706.
- 248 **MacLennan, W. J. and Hamilton, J. C.**, Vitamin D supplements and 25-hydroxy vitamin D concentrations in the elderly. *Br Med J* 1977. **2**: 859-861.
- 249 **Tjellesen, L., Hummer, L., Christiansen, C. and Rodbro, P.**, Serum concentration of vitamin D metabolites during treatment with vitamin D2 and D3 in normal premenopausal women. *Bone Miner* 1986. **1**: 407-413.
- 250 **Aloia, J. F., Patel, M., Dimaano, R., Li-Ng, M., Talwar, S. A., Mikhail, M., Pollack, S. and Yeh, J. K.**, Vitamin D intake to attain a desired serum 25-hydroxyvitamin D concentration. *Am J Clin Nutr* 2008. **87**: 1952-1958.
- 251 **Vieth, R.**, Vitamin D toxicity, policy, and science. *J Bone Miner Res* 2007. **22 Suppl 2**: V64-68.
- 252 **Deterre, P., Berthelie, V., Bauvois, B., Dalloul, A., Schuber, F. and Lund, F.**, CD38 in T- and B-cell functions. *Chem Immunol* 2000. **75**: 146-168.
- 253 **Liu, Y. J. and Arpin, C.**, Germinal center development. *Immunol Rev* 1997. **156**: 111-126.
- 254 **Morra, M., Zubiaur, M., Terhorst, C., Sancho, J. and Malavasi, F.**, CD38 is functionally dependent on the TCR/CD3 complex in human T cells. *FASEB J* 1998. **12**: 581-592.
- 255 **Lund, F. E., Yu, N., Kim, K. M., Reth, M. and Howard, M. C.**, Signaling through CD38 augments B cell antigen receptor (BCR) responses and is dependent on BCR expression. *J Immunol* 1996. **157**: 1455-1467.
- 256 **Bofill, M. and Borthwick, N. J.**, CD38 in health and disease. *Chem Immunol* 2000. **75**: 218-234.
- 257 **Knippenberg, S., Smolders, J., Thewissen, M., Peelen, E., Tervaert, J. W., Hupperts, R. and Damoiseaux, J.**, Effect of vitamin D(3) supplementation on peripheral B cell differentiation and isotype switching in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2011. **17**: 1418-1423.

7. Literaturverzeichnis

- 258 **Berry, D. J., Vimalaswaran, K. S., Whittaker, J. C., Hingorani, A. D. and Hypponen, E.**, Evaluation of genetic markers as instruments for Mendelian randomization studies on vitamin D. *PLoS One* 2012. **7**: e37465.
- 259 **Jacobs, E. T., Van Pelt, C., Forster, R. E., Zaidi, W., Hibler, E. A., Galligan, M. A., Haussler, M. R. and Jurutka, P. W.**, CYP24A1 and CYP27B1 polymorphisms modulate vitamin D metabolism in colon cancer cells. *Cancer Res* 2013. **73**: 2563-2573.
- 260 **Signorello, L. B., Shi, J., Cai, Q., Zheng, W., Williams, S. M., Long, J., Cohen, S. S., Li, G., Hollis, B. W., Smith, J. R. and Blot, W. J.**, Common variation in vitamin D pathway genes predicts circulating 25-hydroxyvitamin D Levels among African Americans. *PLoS One* 2011. **6**: e28623.
- 261 **Holick, C. N., Stanford, J. L., Kwon, E. M., Ostrander, E. A., Nejentsev, S. and Peters, U.**, Comprehensive association analysis of the vitamin D pathway genes, VDR, CYP27B1, and CYP24A1, in prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007. **16**: 1990-1999.
- 262 **McGrath, J. J., Saha, S., Burne, T. H. and Eyles, D. W.**, A systematic review of the association between common single nucleotide polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010. **121**: 471-477.
- 263 **Arpin, C., Dechanet, J., Van Kooten, C., Merville, P., Grouard, G., Briere, F., Banchereau, J. and Liu, Y. J.**, Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* 1995. **268**: 720-722.
- 264 **Keet, C. A., McCormack, M. C., Peng, R. D. and Matsui, E. C.**, Age- and atopy-dependent effects of vitamin D on wheeze and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2011. **128**: 414-416 e415.
- 265 **Beeh, K. M., Beier, J. and Buhl, R.**, [Seasonal variations of serum-IgE and potential impact on dose-calculation of omalizumab (rhuMab-E25, anti-IgE)]. *Pneumologie* 2004. **58**: 546-551.
- 266 **Ohashi, Y., Nakai, Y., Tanaka, A. and et al.**, Seasonal rise in interleukin-4 during pollen season is related to seasonal rise in specific IgE for pollens but not for mites. *Acta Otolaryngol* 1998. **118**: 243-247.
- 267 **Chang, J. H., Cha, H. R., Lee, D. S., Seo, K. Y. and Kweon, M. N.**, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the differentiation and migration of T(H)17 cells to protect against experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One* 2010. **5**: e12925.
- 268 **Chang, S. H., Chung, Y. and Dong, C.**, Vitamin D suppresses Th17 cytokine production by inducing C/EBP homologous protein (CHOP) expression. *J Biol Chem* 2010. **285**: 38751-38755.
- 269 **Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N. K., Valdez, P. A. and Hymowitz, S. G.**, Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol* 2011. **29**: 71-109.
- 270 **Abou-Raya, A., Abou-Raya, S. and Helmii, M.**, The Effect of Vitamin D Supplementation on Inflammatory and Hemostatic Markers and Disease Activity in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Randomized Placebo-controlled Trial. *J Rheumatol* 2012.
- 271 **Koga, C., Kabashima, K., Shiraishi, N., Kobayashi, M. and Tokura, Y.**, Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2008. **128**: 2625-2630.
- 272 **Shahrara, S., Huang, Q., Mandelin, A. M., 2nd and Pope, R. M.**, TH-17 cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008. **10**: R93.
- 273 **Harigai, M., Kawamoto, M., Hara, M., Kubota, T., Kamatani, N. and Miyasaka, N.**, Excessive production of IFN-gamma in patients with systemic lupus

7. Literaturverzeichnis

- erythematosus and its contribution to induction of B lymphocyte stimulator/B cell-activating factor/TNF ligand superfamily-13B. *J Immunol* 2008. **181**: 2211-2219.
- 274 **Penna, G., Amuchastegui, S., Giarratana, N., Daniel, K. C., Vulcano, M., Sozzani, S. and Adorini, L.**, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2007. **178**: 145-153.
- 275 **Heaney, R. P., Davies, K. M., Chen, T. C., Holick, M. F. and Barger-Lux, M. J.**, Human serum 25-hydroxycholecalciferol response to extended oral dosing with cholecalciferol. *Am J Clin Nutr* 2003. **77**: 204-210.
- 276 **Chapuy, M. C., Preziosi, P., Maamer, M., Arnaud, S., Galan, P., Hercberg, S. and Meunier, P. J.**, Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int* 1997. **7**: 439-443.
- 277 **Priemel, M., von Domarus, C., Klatte, T. O., Kessler, S., Schlie, J., Meier, S., Proksch, N., Pastor, F., Netter, C., Streichert, T., Puschel, K. and Amling, M.**, Bone mineralization defects and vitamin D deficiency: histomorphometric analysis of iliac crest bone biopsies and circulating 25-hydroxyvitamin D in 675 patients. *J Bone Miner Res* 2010. **25**: 305-312.
- 278 **Heaney, R. P., Dowell, M. S., Hale, C. A. and Bendich, A.**, Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr* 2003. **22**: 142-146.
- 279 **Kriesel, J. D. and Spruance, J.**, Calcitriol (1,25-dihydroxy-vitamin D3) coadministered with influenza vaccine does not enhance humoral immunity in human volunteers. *Vaccine* 1999. **17**: 1883-1888.
- 280 **Peelen, E., Rijkers, G., Meerveld-Eggink, A., Meijvis, S., Vogt, M., Cohen Tervaert, J. W., Hupperts, R. and Damoiseaux, J.**, Relatively high serum vitamin D levels do not impair the antibody response to encapsulated bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013. **32**: 61-69.
- 281 **Alvaro, M., Sancha, J., Larramona, H., Lucas, J. M., Mesa, M., Tabar, A. I. and Martinez-Canavate, A.**, Allergen-specific immunotherapy: Update on immunological mechanisms. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2013. **41**: 265-272.
- 282 **Taher, Y. A., van Esch, B. C., Hofman, G. A., Henricks, P. A. and van Oosterhout, A. J.**, 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 potentiates the beneficial effects of allergen immunotherapy in a mouse model of allergic asthma: role for IL-10 and TGF-beta. *J Immunol* 2008. **180**: 5211-5221.
- 283 **Akdis, M. and Akdis, C. A.**, Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2007. **119**: 780-791.
- 284 **Mahon, B. D., Wittke, A., Weaver, V. and Cantorna, M. T.**, The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. *J Cell Biochem* 2003. **89**: 922-932.
- 285 **Chan, O. T., Hannum, L. G., Haberman, A. M., Madaio, M. P. and Shlomchik, M. J.**, A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med* 1999. **189**: 1639-1648.
- 286 **Rogers, P. R., Dubey, C. and Swain, S. L.**, Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen. *J Immunol* 2000. **164**: 2338-2346.
- 287 **Croft, M., Bradley, L. M. and Swain, S. L.**, Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J Immunol* 1994. **152**: 2675-2685.
- 288 **Iezzi, G., Karjalainen, K. and Lanzavecchia, A.**, The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 1998. **8**: 89-95.

7. Literaturverzeichnis

- 289 **Berard, M. and Tough, D. F.**, Qualitative differences between naive and memory T cells. *Immunology* 2002. **106**: 127-138.
- 290 **Krieger, J. I., Grammer, S. F., Grey, H. M. and Chesnut, R. W.**, Antigen presentation by splenic B cells: resting B cells are ineffective, whereas activated B cells are effective accessory cells for T cell responses. *J Immunol* 1985. **135**: 2937-2945.
- 291 **Jiang, W., Lederman, M. M., Harding, C. V., Rodriguez, B., Mohner, R. J. and Sieg, S. F.**, TLR9 stimulation drives naive B cells to proliferate and to attain enhanced antigen presenting function. *Eur J Immunol* 2007. **37**: 2205-2213.
- 292 **Good, K. L., Avery, D. T. and Tangye, S. G.**, Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naive B cells. *J Immunol* 2009. **182**: 890-901.
- 293 **Eynon, E. E. and Parker, D. C.**, Small B cells as antigen-presenting cells in the induction of tolerance to soluble protein antigens. *J Exp Med* 1992. **175**: 131-138.
- 294 **Reichardt, P., Dornbach, B., Rong, S., Beissert, S., Gueler, F., Loser, K. and Gunzer, M.**, Naive B cells generate regulatory T cells in the presence of a mature immunologic synapse. *Blood* 2007. **110**: 1519-1529.
- 295 **Shapira, S. K., Vercelli, D., Jabara, H. H., Fu, S. M. and Geha, R. S.**, Molecular analysis of the induction of immunoglobulin E synthesis in human B cells by interleukin 4 and engagement of CD40 antigen. *J Exp Med* 1992. **175**: 289-292.
- 296 **Gett, A. V. and Hodgkin, P. D.**, A cellular calculus for signal integration by T cells. *Nat Immunol* 2000. **1**: 239-244.
- 297 **Appleman, L. J., Berezovskaya, A., Grass, I. and Boussiotis, V. A.**, CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. *J Immunol* 2000. **164**: 144-151.
- 298 **Schwartz, R. H.**, T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 2003. **21**: 305-334.
- 299 **Li, J., Liu, Z., Jiang, S., Cortesini, R., Lederman, S. and Suci-Foca, N.**, T suppressor lymphocytes inhibit NF-kappa B-mediated transcription of CD86 gene in APC. *J Immunol* 1999. **163**: 6386-6392.
- 300 **Zou, G. M. and Hu, W. Y.**, LIGHT regulates CD86 expression on dendritic cells through NF-kappaB, but not JNK/AP-1 signal transduction pathway. *J Cell Physiol* 2005. **205**: 437-443.
- 301 **Giannoukakis, N., Bonham, C. A., Qian, S., Chen, Z., Peng, L., Harnaha, J., Li, W., Thomson, A. W., Fung, J. J., Robbins, P. D. and Lu, L.**, Prolongation of cardiac allograft survival using dendritic cells treated with NF-kB decoy oligodeoxyribonucleotides. *Mol Ther* 2000. **1**: 430-437.
- 302 **Garcia-Cozar, F. J., Molina, I. J., Cuadrado, M. J., Marubayashi, M., Pena, J. and Santamaria, M.**, Defective B7 expression on antigen-presenting cells underlying T cell activation abnormalities in systemic lupus erythematosus (SLE) patients. *Clin Exp Immunol* 1996. **104**: 72-79.
- 303 **Wetzel, S. A., McKeithan, T. W. and Parker, D. C.**, Live-cell dynamics and the role of costimulation in immunological synapse formation. *J Immunol* 2002. **169**: 6092-6101.
- 304 **O'Neill, S. K., Cao, Y., Hamel, K. M., Doodles, P. D., Hutas, G. and Finnegan, A.**, Expression of CD80/86 on B cells is essential for autoreactive T cell activation and the development of arthritis. *J Immunol* 2007. **179**: 5109-5116.
- 305 **Schweitzer, A. N. and Sharpe, A. H.**, Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production. *J Immunol* 1998. **161**: 2762-2771.

7. Literaturverzeichnis

- 306 **Tsuyuki, S., Tsuyuki, J., Einsle, K., Kopf, M. and Coyle, A. J.,** Costimulation through B7-2 (CD86) is required for the induction of a lung mucosal T helper cell 2 (TH2) immune response and altered airway responsiveness. *J Exp Med* 1997. **185**: 1671-1679.

8. Publikationsliste

Milovanovic, M., Drozdenko, G., Weise, C., Babina, M. and Worm, M., Interleukin-17A promotes IgE production in human B cells. *J Invest Dermatol* 2010. **130**: 2621-2628.

Heine, G., Drozdenko, G., Lahl, A., Unterwalder, N., Mei, H., Volk, H.-D., Dörner, T., Radbruch, A. and Worm, M., Efficient tetanus toxoid immunization on vitamin D supplementation. *Eur J Clin Nutr* 2011. **65**: 329-334.

Danilowicz-Luebert, E., Steinfeldt, S., Kuhl, A. A., Drozdenko, G., Lucius, R., Worm, M., Hamelmann, E. and Hartmann, S., A nematode immunomodulator suppresses grass pollen-specific allergic responses by controlling excessive Th2 inflammation. *Int J Parasitol* 2013. **43**: 201-210.

Drozdenko, G., Heine, G., Worm, M., Oral vitamin D increases frequencies of CD38⁺ human B cells and ameliorates IL-17 producing T cells. *J Exp Dermatol* (in press)

9. Liste der Abkürzungen

7-DHC	7-Dehydrocholesterol
7-AAD	7-Aminoactinomycin
aa	Aminosäure (amino acid)
AD	Atopische Dermatitis
ADHR	Autosomal dominant hypophosphatemic rickets
AID	Activation-induced Cytidine Deaminase
AMP	Antimikrobielles Peptid
AP	Alkalische Phosphatase
AP	Alternative Bindungstasche (alternative pocket) (bezüglich VDR)
AP-1	Aktivator Protein 1
APC	Allophycocyanin oder Antigen-präsentierende Zelle
BCL6	B Zell Lymphoma 6
BCR	B Zell Rezeptor (B cell receptor)
bio	Biotinyliert
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
cADPR	Zyklische Adenosindiphosphatribose
CBP/p300	CREB-Bindungsprotein
CCS	Aktivkohle aufgereinigtes FCS (charcoal stripped FCS)
CD	Differenzierungscluster (cluster of differentiation)
CD40L	CD40 Ligand
cDNA	Komplementäre DNS
CDK	Zyclin abhängige Kinase (cyclin-dependent kinase)
CFSE	5 (6)-Carboxyfluoresceindiacetat N-Succinimidylester
CH	Konstante schwere Kette (constant heavy chain)
CSR	Klassenwechsel Rekombination (class switch recombination)
CT/CP	Schwellenwert-Zyklus (crossing point)
C- Terminus	Carboxyl-Terminus oder COOH- Terminus
CYP24A1	25-Hydroxyvitamin D ₃ -24-Hydroxylase
CYP27A1	Vitamin D ₃ -25-Hydroxylase
CYP27B1	25-Hydroxyvitamin D ₃ -1 α -Hydroxylase

9. Liste der Abkürzungen

Sε	Genomische Epsilon Keimbahn Transkript (genomic epsilon switch region)
d	Tag; Deoxy; Distilert (wie in dH ₂ O)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBD	DNA-Bindingsdomäne
DBP	Vitamin D-bindendes Protein
DC	Dendritische Zelle (dendritic cell)
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DRFZ	Deutsches Rheumaforschungszentrum
ds	Doppelsträngig (wie dsDNA)
DSB	Doppelstrangbrüche (double-strand DNA breaks)
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated Cell Sorting)
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FcεR	Rezeptor für IgE (FcεRI hoch-affine/ FcεRII (CD23) niedrig-affine)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	Vorwärtsstreulicht Kanal (forward scatter channel)
g	Schwerebeschleunigung
GP	Genomische Tasche (genomic pocket)
H	Helix
h	Stunde
HBD	Human β-Defensin
HDAC	Histon Deacetylase
HIGM2	Hyper-IgM Syndrom, Typ 2
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IFN	Interferon (z.B., IFN-γ)
Ig	Immunoglobulin (auch IgA, IgD, IgE, IgG, IgM)

9. Liste der Abkürzungen

IL-	Interleukin (z.B., IL-4)
IRF4	Interferon-regulatory Factor 4
ISC	Immunoglobulin-sekretierende Zelle (immunoglobulin secreting cell)
I.U.	Internationale Einheiten (International Units)
Iono	Ionomycin
kb	Kilobase
Kd	Verteilungskoeffizient (distribution coefficient)
LBD	Liganden Bindungsdomäne
LBP	Liganden Bindungstasche (ligand-binding pocket)
LC	Langerhans Zelle
M	Molar
mAk	Monoklonale Antikörper
MACS	Magnetic-activated Cell Sorting
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MARRS	Membrane associated, rapid Response, Steroid-Binding
mDC	Myeloide dendritische Zelle
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Mikromolar
mRNA	Messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
MZ	Marginal Zone
NAADP	Nikotinsäureadenin dinukleotid-2`-phosphat
NAD	Nikotinamidadenin dinukleotid
NADP	Nikotinamidadenin dinukleotid-2`-phosphat
n	Nummer in der Studie or Gruppe
n.s.	Nicht signifikant
NCoA	Kern Rezeptor Coaktivator (nuclear receptor coactivator)
NCoR	Kern Rezeptor Corepressor (nuclear receptor corepressor)
NF	Kern Faktor (nuclear factor)
NFAT	Kernfaktor der aktivierten T-Zellen (nuclear factor of activated T cells)

9. Liste der Abkürzungen

NF- κ B	Kernfaktor für das κ -Gen in B-Zellen (nuclear factor κ B)
NK Zelle	Natürliche Killer-Zelle
NKT Zelle	Natürliche Killer T-Zelle
NLS	Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal)
NR	Kern Rezeptor (nuclear receptor)
N-Terminus	Amino Terminus oder NH ₂ -Terminus
NTP	Nukleosidtriphosphate
nVDRE	Negative VDRE
P	Wahrscheinlichkeit (probability)
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cell)
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Salzlösung (phosphate-buffered saline)
PBS-T	PBS mit Tween 20
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll Protein
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMTs	Photoelektronenvervielfacher (photomultiplier tubes)
pNPP	Para-Nitrophenylphosphat
pSTAT	Phosphorylierte Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
PTH	Parathormon
qPCR	Quantitative PCR
R	Rezeptor (z.B., IL-4R)
r	Rekombinant, (z.B., rIL4)
RA	Rheumatoide Arthritis
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROC-Kurve	Grenzwertoptimierungskurve
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raum Temperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit nachfolgender Polymerase Kettenreaktion
RXR	Retinoid X Rezeptor
SA	Standart Abweichung

9. Liste der Abkürzungen

SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SMRT	Silent Mediator for tetinoid and thyroid hormone Receptor
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphism (single nucleotide polymorphism)
Src	Tyrosin Kinase
SRC-1	Steroid Rezeptor Coaktivator 1
SSC	Seitwärtsstreulicht Kanal (side scatter channel)
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (tris-buffered saline)
TBS-T	TBS with Tween 20
TCR	T Zell Rezeptor (T cell receptor)
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (transforming growth factor)
TH	T-Helfer
TLR	Toll-ähnliche Rezeptor (Toll-like receptor)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor (tumor necrosis factor)
TNP	Trinitrophenyl
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziierter Faktor
Treg	Regulatorische T Zelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSLP	Thymusstroma Lymphopoietin
TSST-1	Toxisches-Schock-Syndrom-Toxin 1
UV	Ultraviolett
VDR	Vitamin D Rezeptor
VDRE	1 α ,25-hydroxyvitamin D ₃ responsive Elemente, (vitamin D response element)
ZK159222	(5Z,7E,22E)-(1S,3R,24R)-1,3,24-trihydroxy-26,27-cyclo-9,10-secocholesta-5,7,10(19),22-tetraene-25-carboxylic acid butyl ester
β -ME	β -Mercaptoethanol
ϵ GLT	Epsilon Keimbahn Transkript (epsilon germline transcript)
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
