

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für experimentelle Genetik  
und  
II. Medizinische Klinik und Poliklinik  
am Klinikum rechts der Isar

***Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub> auf die zellvermittelte Immunantwort  
bei der Pathogenese des Typ-1-Diabetes***

Johannes Andreas FörSch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur  
Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Hans-Rudolf Fries  
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. Peter Achenbach  
2. Univ.-Prof. Dr. Martin Hrabé de Angelis

Die Dissertation wurde am 25.11.2014 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 17.07.2015 angenommen.



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VII</b>	
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>X</b>	
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>XII</b>	
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	Typ-1-Diabetes: eine Autoimmunerkrankung .....	1
1.1.1	Genetische Einflussfaktoren in der Pathogenese des T1D.....	2
1.1.2	Umweltfaktoren in der Pathogenese des T1D .....	3
1.1.3	Die Rolle von Autoantikörpern in der Pathogenese des T1D.....	5
1.1.4	Die Rolle von Immunzellen in der Pathogenese des T1D.....	7
1.1.4.1	CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen in der Pathogenese des T1D.....	7
1.1.4.2	Regulatorische T-Zellen in der Pathogenese des T1D .....	9
1.1.4.3	Dendritische Zellen in der Pathogenese des T1D.....	9
1.1.4.3.1	Myeloide dendritische Zellen in der Pathogenese des T1D .....	10
1.1.4.3.2	Plasmazytoide dendritische Zellen in der Pathogenese des T1D .....	10
1.1.5	Die Rolle von Zytokinen in der Pathogenese des T1D .....	12
1.2	Vitamin D <sub>3</sub> : Physiologie und Wirkung .....	14
1.2.1	Metabolismus und Wirkmechanismus von Vitamin D <sub>3</sub> .....	14
1.2.2	Wirkung von Vitamin D <sub>3</sub> auf das angeborene Immunsystem .....	17
1.2.3	Wirkung von Vitamin D <sub>3</sub> auf das adaptive Immunsystem .....	18
1.3	Vitamin D <sub>3</sub> und Typ-1-Diabetes .....	22
1.3.1	Vitamin D <sub>3</sub> -assoziierte Einzelnukleotidpolymorphismen beim T1D.....	22
1.3.2	Immunmodulierende Wirkung von Vitamin D <sub>3</sub> beim T1D.....	24
1.4	Fragestellungen der vorliegenden Arbeit .....	26
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>27</b>
2.1	Charakteristika der Studienpopulationen .....	27
2.1.1	Studienpopulation der offenen und doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie.....	27
2.1.2	Studienpopulation der Neurocrine-Studie .....	29
2.1.3	Patientenproben .....	29
2.2	Material .....	33
2.2.1	Laborgeräte .....	33
2.2.2	Chemikalien und Reagenzien .....	34
2.2.3	Verbrauchsmaterialien .....	36
2.2.4	Antikörper .....	37
2.2.5	Kits.....	37

2.2.6	Puffer und Lösungen .....	37
2.3	Methoden.....	39
2.3.1	Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes .....	39
2.3.2	Quantitative Bestimmung der Anzahl der dendritischen Zellsubpopulationen in PBMCs .....	39
2.3.3	Bestimmung der Calcidiol- und Calcitriolspiegel im Elektrochemilumineszenz-Immunoassay bzw. Radioimmunassay.....	42
2.3.4	Bestimmung der Zytokinspiegel im BioPlex-Assay (Luminex®) .....	43
2.3.5	Bestimmung von Tetanus-Antikörper-Isotypen (IgG1, IgG2 und IgG4) im Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	45
2.3.6	Bestimmung der C-Peptid-Ausschüttung nüchtern und nach Stimulation mit einer Mischmahlzeit.....	48
2.3.7	Bestimmung von Vitamin D <sub>3</sub> -assoziierten Einzelnukleotidpolymorphismen..	48
2.4	Statistik .....	49
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>50</b>
3.1	Immunmodulierende Wirkung von Vitamin D <sub>3</sub> .....	50
3.1.1	Anzahl der dendritischen Zellpopulationen in den Behandlungsgruppen der Calcitriol-Studie.....	50
3.1.2	Vitamin D <sub>3</sub> -Spiegel in den Behandlungsgruppen der Calcitriol-Studie.....	54
3.1.3	Einfluss von Vitamin D <sub>3</sub> -Spiegeln auf dendritische Zellpopulationen .....	54
3.1.4	Wirkung von Vitamin D <sub>3</sub> auf die residuale Betazellfunktion .....	57
3.1.5	Einfluss von Genen auf den Vitamin D <sub>3</sub> - Metabolismus.....	60
3.1.5.1	Einfluss von Genen auf Calcidiolspiegel.....	60
3.1.5.2	Einfluss von Genen auf Calcitriolspiegel.....	62
3.2	Einfluss von Vitamin D <sub>3</sub> auf die zelluläre und humorale Immunantwort nach Vakzinierung mit dem Modellantigen Tetanus Toxoid .....	64
3.2.1	Einfluss von Vitamin D <sub>3</sub> auf Zytokinspiegel im Serum .....	64
3.2.2	Einfluss von Vitamin D <sub>3</sub> auf die TT-Antikörpersubklassenverteilung.....	68
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>73</b>
4.1	Immunmodulierende Wirkung von Vitamin D <sub>3</sub> auf dendritische Zellen .....	74
4.1.1	Anzahl der dendritischen Zellpopulationen in den Behandlungsgruppen der Calcitriol-Studie.....	74
4.1.2	Einfluss von Vitamin D <sub>3</sub> -Spiegeln auf dendritische Zellsubpopulationen .....	79
4.1.3	Wirkung von Vitamin D <sub>3</sub> auf die residuale Betazellfunktion .....	82
4.1.4	Einfluss von Genen auf den Vitamin D <sub>3</sub> - Metabolismus.....	83

4.2	Einfluss von Vitamin D <sub>3</sub> auf die zelluläre und humorale Immunantwort nach Vakzinierung mit dem Modellantigen Tetanus Toxoid .....	86
4.2.1	Einfluss von Vitamin D <sub>3</sub> auf die Zytokinspiegel im Serum.....	86
4.2.2	Einfluss von Vitamin D <sub>3</sub> auf die TT-Antikörpersubklassenverteilung.....	87
4.3	Zusammenfassung und Ausblick .....	89
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG/ ABSTRAKT .....</b>	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>117</b>
	Studienzeitplan für die mit Calcitriol behandelte Gruppe .....	117
	Studienzeitplan für die Kontrollgruppe .....	118
	Vorveröffentlichungen.....	119
	Danksagung.....	120

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle (Antigen-presenting cell)
AUC	Fläche unter der Kurve (Area under the curve)
bzw.	Beziehungsweise
CD	Unterscheidungsgruppen (Cluster of differentiation)
d	Tag (Day)
DBP	Vitamin-D-bindendes Protein
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOB	Geburtsdatum (Date of birth)
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
evtl.	Eventuell
GAD(A)	(Antikörper gegen) Glutamatdecarboxylase
GAD65	Glutamatdecarboxylase (Atommasse von 65kD)
h	Stunde (hour)
HbA <sub>1C</sub>	Glycosyliertes Hämoglobin der Subklasse A <sub>1C</sub>
HLA	Histokompatibilitätskomplex (Human leucocyte antigen)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (Horseradish-peroxidase)
I(A)A	Insulin(auto)antikörper
IA-2(A)	(Antikörper gegen) Protein-Tyrosinphosphatase IA-2
ICA	Inselzell-Antikörper
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IE	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
mDC	Myeloide dendritische Zelle

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
min.	Minute
Mo	Monat
MS	Multiple Sklerose
NaCl	Natriumchlorid
NOD	Non-Obese diabetic
OD	Optische Dichte
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (Pathogen-associated molecular patterns)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween (Phosphate buffered saline with Tween)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
Pen	Penicillin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRR	Mustererkennungsrezeptoren (Pattern-Recognition Receptors)
RBA	Radioliganden-Bindungsassay
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rounds per minute)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive oxygen species)
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SD	Standardabweichung (Standard deviation)
SE	Standardfehler (Standard error)
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (Single nucleotide polymorphism)
Strep	Streptomycin
T1D	Typ-1-Diabetes
Tab.	Tabelle

T <sub>H</sub> 1-*, T <sub>H</sub> 2-*, T <sub>H</sub> 17-*	T-Helfer 1-*, T-Helfer 2-*, T-Helfer 17-*
TLR	Toll-ähnliche Rezeptoren (Toll-like receptors)
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zelle
TT	Tetanus-Toxoid
u.a.	Unter anderem
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDRE	Vitamin D response element
vs.	Versus
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1: Diabetesrisiko nach Familienanamnese und HLA-Genotypisierung (Achenbach et al., Diabetologe, 2008)
- Abb.2: Auftreten von Autoantikörpern beim T1D (modifiziert nach Ziegler et al., Diabetologia, 2012)
- Abb. 3: Differenzierung naiver T-Zellen in Umgebung bestimmter Zytokine und Transkriptionsfaktoren in T-Helfer- (Th-) Zellen bzw. regulatorische T-Zellen (Treg) (Anthony et al., Nature Reviews Immunology, 2007)
- Abb. 4: Metabolismus von Vitamin D<sub>3</sub> (Doorenbos et al., Nature Reviews. Nephrology, 2009).
- Abb. 5: Synthese von 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (Plum LA& DeLuca HF, Nature Reviews Drug Discovery, 2010).
- Abb. 6: Mechanismus der Vitamin D-induzierten Cathelicidin-Expression (Hewison, Nature Reviews Endocrinology, 2011)
- Abb. 7a/b: Regulation der Immunantwort durch Calcitriol in (a) sekundären Lymphorganen und (b) Zielgeweben (Mathieu & Adorini, Trends in Molecular Medicine, 2002)
- Abb. 8: Verlauf der Calcitriolstudie
- Abb. 9: Beispiel einer Patientenprobe
- Abb. 10: Setzen der Gates zur Identifikation der pDC, mDC1 und mDC2
- Abb. 11: Darstellung des Subklassen-ELISA
- Abb. 12: Anteil der DCs an PBMCs im Monat 0, zum Ende der Intervention (Monat 9) und im Verlauf des Follow-up (Monat 12 und 18)
- Abb. 13: Individueller Verlauf der pDC-Subpopulationen an PBMCs von Monat 0 bis zum Ende der Intervention (Monat 9) bei Calcitriol-behandelten Patienten und Placebo-behandelten Patienten
- Abb. 14: Calcidiol- bzw. Calcitriolspiegel vs. Veränderung des Anteils der pDCs von Monat 0 zu Monat 9
- Abb. 15: Calcitriolspiegel in Abhängigkeit der DC-Subpopulationen bezogen auf die mononukleären Zellen
- Abb. 16: Calcitriolspiegel in Abhängigkeit der DC-Subpopulationen bezogen auf die Gesamtpopulation der DCs
- Abb. 17: Nüchtern-C-Peptid-Spiegel in Abhängigkeit der Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel
- Abb. 18: Nüchtern-C-Peptid-Spiegel in Abhängigkeit von initialen Calcitriolspiegeln
- Abb. 19: Nüchtern-C-Peptid zum Monat 0 bzw. zum Monat 9 vs. Anteil [%] der pDCs von Monat 0 zu Monat 9
- Abb. 20: Initiale Calcidiolspiegel in Abhängigkeit der getesteten Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs)
- Abb. 21: Weitere Analyse der SNPs FokI (VDR rs2228570) und CYP27B1 rs10877012)

- Abb. 22: Initiale Calcitriolspiegel in Abhängigkeit der getesteten Einzelnukleotid-polymorphismen (SNPs)
- Abb. 23: Weitere Analyse des SNP CYP27B1 rs10877012 mit Probanden der Neurocrine-Studie
- Abb. 24: Verteilung des *CYP27B1* Genotyps (SNP rs10877012) in Calcitriol- und Placebo-behandelten Patienten
- Abb. 25: Calcidiolspiegel in Abhängigkeit der getesteten Zytokine im Monat 0 bzw. Monat 9
- Abb. 26: Calcitriolspiegel in Abhängigkeit der getesteten Zytokine im Monat 0 bzw. Monat 9
- Abb. 27a: Antikörperspiegel der Subklasse IgG1 [mU] gegen Tetanus Toxoid vor bzw. nach Impfung mit TT
- Abb. 27b:  $\Delta$  IgG1-Subklasse bei Placebo-behandelten bzw. Calcitriol-behandelten Patienten
- Abb. 28a: Antikörperspiegel der Subklasse IgG2 [mU] gegen Tetanus Toxoid vor bzw. nach Impfung mit TT
- Abb. 28b:  $\Delta$  IgG2-Subklasse bei Placebo-behandelten bzw. Calcitriol-behandelten Patienten
- Abb. 29a: Antikörperspiegel der Subklasse IgG4 [mU] gegen Tetanus Toxoid vor bzw. nach Impfung mit TT
- Abb. 29b:  $\Delta$  IgG4-Subklasse bei Placebo-behandelten bzw. Calcitriol-behandelten Patienten.
- Abb. 30a-c: Calcidiolspiegel im Monat 9 vs. Veränderung der TT-Subklassen [mU]
- Abb. 31a-c: Calcitriolspiegel im Monat 9 vs. Veränderung der TT-Subklassen [mU]

## TABELLENVERZEICHNIS

- Tab. 1: Patientencharakteristika der doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie bei Studieneinschluss
- Tab. 2a: Anzahl der getesteten Patientenproben der doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie
- Tab. 2b: Anzahl der getesteten Patientenproben der offenen placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie
- Tab. 2c: Anzahl der getesteten Patientenproben der Neurocrine-Studie
- Tab. 3: Anzahl der bestimmten Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) bei Patienten der offenen und doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie
- Tab. 4: Anzahl der Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs), der Patienten der offenen Calcitriol-Studie und der Neurocrine-Studie
- Tab. 5: Anzahl der getesteten Patientenproben der doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie
- Tab. 6: Übersicht der zugewiesenen mU der IgG-Subklassen
- Tab. 7: Prozentualer Anteil der DC-Subpopulationen an PBMCs im Monat 0, zum Ende der Intervention (Monat 9) und im Verlauf des Follow-up (Monat 12 und 18)
- Tab. 8: Verteilung der pDC-Subpopulation von PBMCs in Monat 0 und Monat 9; absteigend nach prozentualem Anteil der pDCs dargestellt
- Tab. 9: Calcidiol- bzw. Calcitriolspiegel der doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie
- Tab. 10: Nüchtern-C-Peptid-Spiegel [nmol/L] der doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie
- Tab. 11: Zytokinspiegel der doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Typ-1-Diabetes: eine Autoimmunerkrankung

Typ-1-Diabetes (T1D) ist eine chronische Autoimmunerkrankung, die durch eine organ-spezifische Entzündungsreaktion (Insulinitis) gekennzeichnet ist. Hierbei werden die pankreatischen Betazellen zerstört. Dieses Stadium wird als so genannter Prädiabetes bezeichnet (Devendra, Liu et al. 2004). Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einem absoluten Insulinmangel, so dass eine lebenslange exogene Gabe von Insulin nötig ist, um den Blutzuckerspiegel im Normbereich zu halten. T1D ist bisher nicht heilbar. Weltweit kommt es zu einer Zunahme der Erkrankung. Allein in Europa nimmt die jährliche Inzidenz im Mittel um 3,9% zu. Wenn dieser Trend anhält wird sich von 2005 bis 2020 die Anzahl an Neuerkrankungen in Europa bei Kindern unter fünf Jahren verdoppeln (Patterson, Dahlquist et al. 2009).

Zu einer Manifestation des T1D kommt es, wenn 80-90% der Betazellen zerstört sind. Diese Phase wird von folgenden akut auftretenden Symptomen begleitet. Die Betroffenen leiden u.a. unter häufigem Wasserlassen (Polyurie), ständigem Durstgefühl (Polydipsie) und Gewichtsverlust innerhalb von Tagen bis wenigen Wochen. Auch ein allgemeines Krankheitsgefühl verbunden mit Übelkeit und Erbrechen wurde bei der Manifestation von T1D beschrieben (American Diabetes 2013). Durch das Fehlen von Insulin kann die Glukose von den Zellen nicht mehr aufgenommen werden und reichert sich im Blut an. Es kommt zur Hyperglykämie. Zudem werden freie Fettsäuren vermehrt in das Blut abgegeben. Bei Verstoffwechslung der Fettsäuren entstehen Ketonkörper, die zu einer Übersäuerung des Blutes (Ketoazidose) führen. Bei zu spät eingeleiteten Maßnahmen kann dies zu einem ketoazidotischen Koma führen, das lebensbedrohlich sein kann (Stojanovic and Ihle 2011).

Welche Ursachen T1D auslösen ist noch nicht abschließend geklärt. Man weiß, dass mehrere Faktoren zum Ausbruch der Erkrankung führen und bezeichnet den T1D daher auch als multifaktorielle Erkrankung. Neben Umweltfaktoren scheint hier die genetische Prädisposition eine wichtige Rolle zu spielen, auf die in den folgenden Kapiteln näher eingegangen werden soll. Zudem wird die Rolle von Autoantikörpern, Immunzellen und Zytokinen bei der Entstehung des T1D diskutiert.



nerhalb der HLA-Klasse II Region zurück (Davies, Kawaguchi et al. 1994; van der Auwera, Schuit et al. 1995; Atkinson and Eisenbarth 2001; Gianani and Eisenbarth 2005; Lempainen and Ilonen 2012). Neben Hochrisikogenotypen wie z.B. HLA DR3-DQ2/DR4-DQ8 und HLA DR4-DQ8/DR4-DQ8 (Achenbach, Bonifacio et al. 2005; Baschal and Eisenbarth 2008) existieren auch HLA-Allele, die mit einem Schutz vor T1D assoziiert sind. Hier sind z.B. die Allele DQB1\*0602 und DQA1\*0102 (Pociot and McDermott 2002; Kawasaki and Eguchi 2006) zu nennen. Weiter konnte eine Assoziation zwischen T1D und dem Auftreten des Genlocus IDDM2 beobachtet werden (Lucassen, Julier et al. 1993; Davies, Kawaguchi et al. 1994; Kantarova and Buc 2007). Auf die Aufzählung weiterer Gene, die mit T1D assoziiert sind, wird hier verzichtet, da der Einfluss dieser Gene auf die Prädikation der Erkrankung relativ gering erscheint. In einer kürzlich publizierten Studie wurden mehrere solcher Risikoallele aufsummiert und anhand eines Risikoscores auf ein erhöhtes Typ-1-Diabetesrisiko analysiert. Die sicherste Vorhersage bezüglich eines Risikos an T1D zu erkranken gelang mit der Risikoallel-Summierung von acht Risikogenen. Diese Ergebnisse helfen nun, das Diabetesrisiko von Neugeborenen besser stratifizieren zu können (Winkler, Krumsiek et al. 2012). In einer aktuellen Untersuchung konnte zudem gezeigt werden, dass Patienten mit einer Kombination aus bestimmten Genvarianten, die mit T1D assoziiert sind (IL-2, CD25, INS VNTR, IL18RAP, IL-10, IFIH1 und PTPN22), die Erkrankung schneller entwickelten als jene, die nicht diese Genkombination trugen (Achenbach, Hummel et al. 2013). Zudem wurden Einzelnukleotidpolymorphismen, so genannte SNPs, des Vitamin D-Rezeptorgens identifiziert, die mit dem Auftreten von T1D in Verbindung stehen (Chang, Lei et al. 2000; Fassbender, Goertz et al. 2002; Shimada, Kanazawa et al. 2008). Diese und weitere Vitamin D<sub>3</sub>-assoziierte Einzelnukleotidpolymorphismen werden in Kapitel 1.3.1 näher beschrieben.

### **1.1.2 Umweltfaktoren in der Pathogenese des T1D**

Zwillingsstudien konnten belegen, dass die Konkordanzrate beim T1D nur zwischen 30-50% liegt. Man schreibt daher auch Umweltfaktoren eine entscheidende Rolle für die Entstehung des T1D mellitus zu. Stress (Sepa, Wahlberg et al. 2005; Sepa and Ludvigsson 2006) und sozioökonomische Unterschiede (Baz, Muller et al. 2012; Leone, Coast et al. 2012) zählen hier zu den psychosozialen Faktoren, die zur Entstehung des T1D beitragen können. Auch virale Infektionen werden als Auslöser der Erkrankung beschrieben. Vor allem Infektionen mit dem Coxsackie-, Rubella- und Mumpsvirus wer-

den als Trigger für den T1D diskutiert (Lindberg, Ahlfors et al. 1999; Richer and Horwitz 2009). Es wird vermutet, dass aufgrund der Ähnlichkeit des Coxsackie-Virus-Antigens P2-C mit dem in den Betazellen vorhandenen GAD65 eine Kreuzreaktivität stattfindet und so auch körpereigene Strukturen angegriffen werden. Man spricht hier von molekularem Mimikry (Kaufman, Erlander et al. 1992; Hou, Said et al. 1994; Tian, Lehmann et al. 1994). Auf der anderen Seite wird in einer aktuellen Studie vermutet, dass Viren für die Entstehung des T1D zu vernachlässigen sind. Es konnte nachgewiesen werden, dass zum Zeitpunkt der Entwicklung der Autoimmunität keine viralen Auslöser vorhanden waren (Lee, Briese et al. 2013). Neueste Forschungsergebnisse deuten zudem darauf hin, dass möglicherweise eine veränderte Darmflora mit dem Ausbruch von T1D zusammenhängt (Atkinson and Chervonsky 2012). Im Gegensatz dazu postuliert die so genannte Hygiene-Hypothese, die gerade Infektionen im frühen Kindesalter dafür verantwortlich macht, dass das Immunsystem sich mit Keimen „auseinandersetzt“ und sich daher weiter entwickeln kann. Da Kinder heute meist in einer keimfreien Umgebung aufwachsen, hat die Konfrontation mit Bakterien und Viren stark abgenommen. Diesen Zusammenhang untermauert eine Studie von Wen et al. (Wen, Ley et al. 2008). Hier wurde gezeigt, dass NOD-Mäuse, denen das Protein MyD88, ein Bestandteil der angeborenen Immunabwehr, fehlt, nicht an T1D erkranken. Wurden die Mäuse dann in einer streng keimfreien Umgebung gehalten, erkrankten sie wieder sehr häufig an T1D. Ein Cocktail von Bakterien, mit dem sie anschließend gefüttert wurden, und der Bestandteil der normalen Darmflora des Menschen ist, verhinderte wiederum die Erkrankung der Tiere, auch in keimfreier Umgebung (Wen, Ley et al. 2008). Neueste Forschungsergebnisse zeigen zudem, dass wohl auch der Testosteronspiegel, der abhängig von einer intakten Darmflora zu sein scheint, mit dem Risiko an T1D zu erkranken, korreliert. Bei männlichen NOD-Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine normale Darmflora den Hormonspiegel steigen ließ und die Wahrscheinlichkeit, an T1D zu erkranken, sank. Bei Weibchen dagegen sank der Hormonspiegel bei normaler Darmflora mit der Folge, dass das Risiko, an T1D zu erkranken, anstieg. Den Weibchen wurde in einem weiteren Versuch verdünnter Darminhalt erwachsener Männchen verabreicht. Das Zuführen des Bakteriengemisches führte zu einer veränderten Darmflora der Weibchen mit der Folge, dass auch ihr Testosteronspiegel anstieg und das Risiko an T1D zu erkranken vermindert war (Markle, Frank et al. 2013). Auch Impfungen wurden als möglicher Trigger für die Entstehung von T1D genannt. Allerdings konnte diese Hypothese bisher nicht bestätigt werden (Hummel, Fuchtenbusch et al. 2000). Ein weiterer Umweltfaktor, der im

Zusammenhang mit T1D genannt wird, ist die Ernährung. So gibt es Studien, die eine Assoziation zwischen frühkindlicher Ernährung und dem Risiko an T1D zu erkranken, aufzeigen. Im Rahmen der BABYDIAB-Studie konnte herausgefunden werden, dass bei Kindern, die glutenhaltige Nahrung vor dem dritten Lebensmonat erhalten haben, ein signifikant höheres Risiko für die Entstehung von Inselautoantikörpern, im Vergleich zu Kindern die in dieser Zeit gestillt wurden, vorlag (Ziegler, Schmid et al. 2003). Die Einführung von Kuhmilch und die somit verkürzte Stilldauer werden hingegen als mögliche Faktoren der T1D-Entstehung kontrovers diskutiert. Einige Studien zeigen hier einen Zusammenhang (Gerstein 1994; Gerstein and VanderMeulen 1996), andere können dies nicht bestätigen (Meloni, Marinaro et al. 1997; Couper, Steele et al. 1999; Hypponen, Kenward et al. 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass das relative Risiko an T1D zu erkranken von der geographischen Lage abhängt und von Süden nach Norden deutlich zunimmt. In Schweden wurde beispielsweise in den Jahren 2004-2008 mit 36,6/100000 Einwohner die höchste T1D-Inzidenz registriert, in Spanien waren es nur 12,1/100000 Einwohner (Patterson, Gyurus et al. 2012).

### 1.1.3 Die Rolle von Autoantikörpern in der Pathogenese des T1D

Im Stadium des Prädiabetes, an den sich der manifeste T1D anschließt, lassen sich humorale Marker, die Inselautoantikörper, nachweisen. Diese Marker können viele Jahre vor Manifestation des T1D auftreten und spielen daher in der Prädiktion und Differentialdiagnostik dieser Autoimmunerkrankung eine wesentliche Rolle. Aktuell werden im

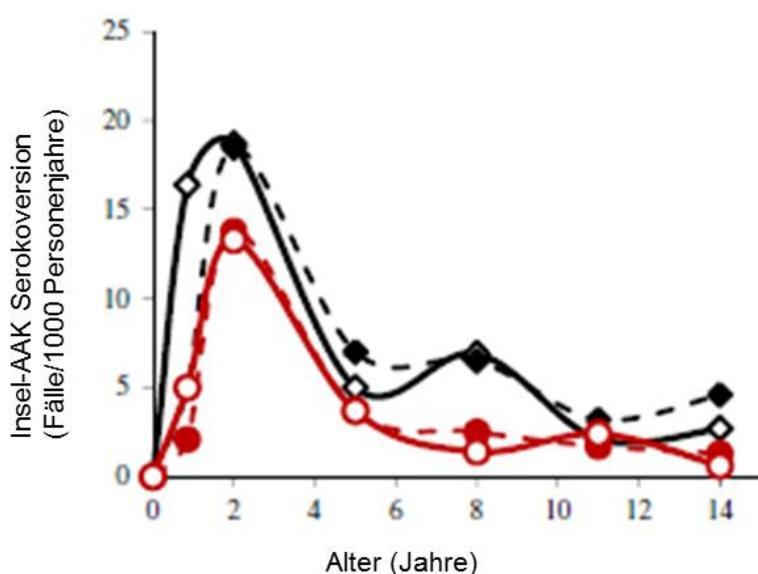


Abb.2: Auftreten von Autoantikörpern beim T1D (schwarze Linie: IAA, schwarz-gestrichelt: GADA, rot: IA-2A, rot-gestrichelt: ZnT8-A; modifiziert nach Ziegler et al., 2012).

Rahmen eines Screenings folgende vier Autoantikörper zum Nachweis einer bestehenden Inselautoimmunität gemessen: Insulinoantikörper (IAA), GAD65-Autoantikörper (GADA), IA-2-Autoantikörper (IA-2A) und Zink-Transporter 8-Autoantikörper (ZnT8-A). IAA sind bei Kindern meist als erster Parameter im Rahmen

eines Autoantikörper-Screenings nachweisbar (Ziegler, Hummel et al. 1999; Yu, Robles et al. 2000; Ziegler, Bonifacio et al. 2012). Es konnte festgestellt werden, dass bei Kindern mit Risikogenen die höchste Inzidenz an Inselautoantikörpern in einem Zeitfenster von 9 Monaten bis zum zweiten Lebensjahr auftrat (Abb. 2). Hierbei handelt es sich vor allem um Insulin- und GAD-Autoantikörper (Ziegler, Bonifacio et al. 2012). Es besteht eine hohe Prävalenz von IAA bei Kindern, die unter 5 Jahren einen manifesten T1D entwickeln (Vardi, Ziegler et al. 1988).

Mit steigendem Alter sinkt die Wahrscheinlichkeit für den Nachweis von IAA und stellt für junge Erwachsene daher keinen verlässlichen Parameter in der Diabetesdiagnostik dar (Vardi, Ziegler et al. 1988; Ziegler, Hummel et al. 1999). Hier scheint es sinnvoller GADA bzw. IA-2A zu messen, da diese Autoantikörper unabhängig vom Alter des Patienten detektiert werden können (Achenbach and Ziegler 2005). Antikörper gegen die Glutamatdecarboxylase (GADA) werden bei fast 90% der Patienten mit Prädiabetes nachgewiesen (Bonifacio, Genovese et al. 1995). Allerdings sind diese Antikörper nicht so spezifisch wie IAA und treten auch bei anderen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. dem Stiff-Person-Syndrom (Rakocevic and Floeter 2012), aber auch bei einer bestimmten Form der limbischen Enzephalitis, auf (Graus, Saiz et al. 2010). Im Rahmen der BABYDIAB-Studie konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der Antikörperaffinität, also dem Reifegrad der einzelnen Antikörper-Antigen-Bindung, eine Aussage über den Krankheitsverlauf getroffen werden kann. Es konnte herausgefunden werden, dass Kinder mit multiplen Autoantikörpern bzw. mit einem positiven HLA DR3-Befund eine höhere Antikörperaffinität für GADA aufwiesen. Zudem war die Affinität bei allen Kindern, die in der Studie Diabetes entwickelten, für GADA sehr hoch (Mayr, Schlosser et al. 2007). Der Nachweis von Antikörpern gegen die Tyrosinphosphatase IA-2 (IA-2A) und gegen den Zinktransporter 8 (ZnT8-A) gehen mit einem hohen Risiko einer schnellen Entwicklung von T1D einher (Gorus, Balti et al. 2013). Eine kürzlich publizierte Studie konnte zeigen, dass das Auftreten von IA-2A zu Beginn des Autoimmunprozesses mit einer raschen Manifestation des T1D, innerhalb von 3 Jahren nach dem Auftreten von Autoantikörpern, korreliert (Achenbach, Hummel et al. 2013). Für das Fortschreiten der Erkrankung von einer Insulitis zum manifesten T1D konnte herausgefunden werden, dass neben dem Auftreten eines einzelnen Autoantikörpers (meist IAA) eine Ausweitung der Immunantwort, die als Spreading bezeichnet wird, notwendig scheint. Personen mit multiplen Autoantikörpern erkrankten letztlich an T1D (Naserke, Ziegler et al. 1998; Ziegler, Hummel et al. 1999; Ziegler, Rewers et al. 2013). Je früher Autoantikörper auf-

traten, desto schneller war die Progression der Erkrankung (Hummel, Bonifacio et al. 2004). Wie beobachtet werden konnte, entwickelten fast 50% der Verwandten von Typ-1-Diabetikern mit drei Autoantikörpern innerhalb von fünf Jahren einen manifesten Diabetes (Achenbach, Warncke et al. 2004). Aber auch ohne familiären Hintergrund ist das Risiko, an T1D zu erkranken, bei Nachweis multipler Antikörper, erhöht (Strebelow, Schlosser et al. 1999). In neuesten Untersuchungen konnte zudem gezeigt werden, dass auch Stoffwechselmetaboliten bei dem Auftreten von Autoantikörpern eine Rolle spielen. Es wurden verschiedene Aminosäuren und Metaboliten des Fettsäurestoffwechsels analysiert. Man kam zu der Erkenntnis, dass Kinder, die bis zu ihrem zweiten Lebensjahr Autoantikörper bildeten eine zweifach niedrigere Konzentration der Aminosäure Methionin im Blut hatten, verglichen mit den Kindern, die erst später bzw. überhaupt keine Autoantikörper entwickelten. So könnte der Methioninspiegel als Biomarker bei der Diagnostik des T1D eine Rolle spielen (Pflueger, Seppanen-Laakso et al. 2011). Die vier für die Diagnostik des T1D relevanten Inselautoantikörper werden am Institut für Diabetesforschung am Helmholtz Zentrum in München mittels sensitiven, international standardisierten Methoden bestimmt.

#### **1.1.4 Die Rolle von Immunzellen in der Pathogenese des T1D**

##### **1.1.4.1 CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Pathogenese des T1D**

In der Pathogenese des T1D spielen Immunzellen eine entscheidende Rolle. Hier zu nennen sind vor allem autoreaktive CD4<sup>+</sup>- und zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die den Autoimmunprozess durch Zerstörung der Betazellen im Rahmen einer Insulinitis fortschreiten lassen (Roep 2003; Mallone and van Endert 2008; Skowera, Ellis et al. 2008; Willcox, Richardson et al. 2009). Als Beweis hierfür konnte gezeigt werden, dass CD8<sup>+</sup>-T-Zell-defiziente NOD-Mäuse, keine Autoimmunität entwickelten (Sumida, Furukawa et al. 1994). Auch die Behandlung von NOD-Mäusen mit anti-CD8 monoklonalen Antikörpern führte zu keiner Entwicklung von Insulinitis (Wang, Gonzalez et al. 1996). Aber auch mononukleäre Zellen, wie z.B. Makrophagen oder B-Zellen konnten in Pankreatagewebe von Typ-1-Diabetikern identifiziert werden. Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen werden aufgrund der Ausschüttung unterschiedlicher Zytokine in T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2-, T<sub>H</sub>17- und T-regulatorische (T<sub>reg</sub>) Zellen unterteilt, wie Abb. 3 zeigt.

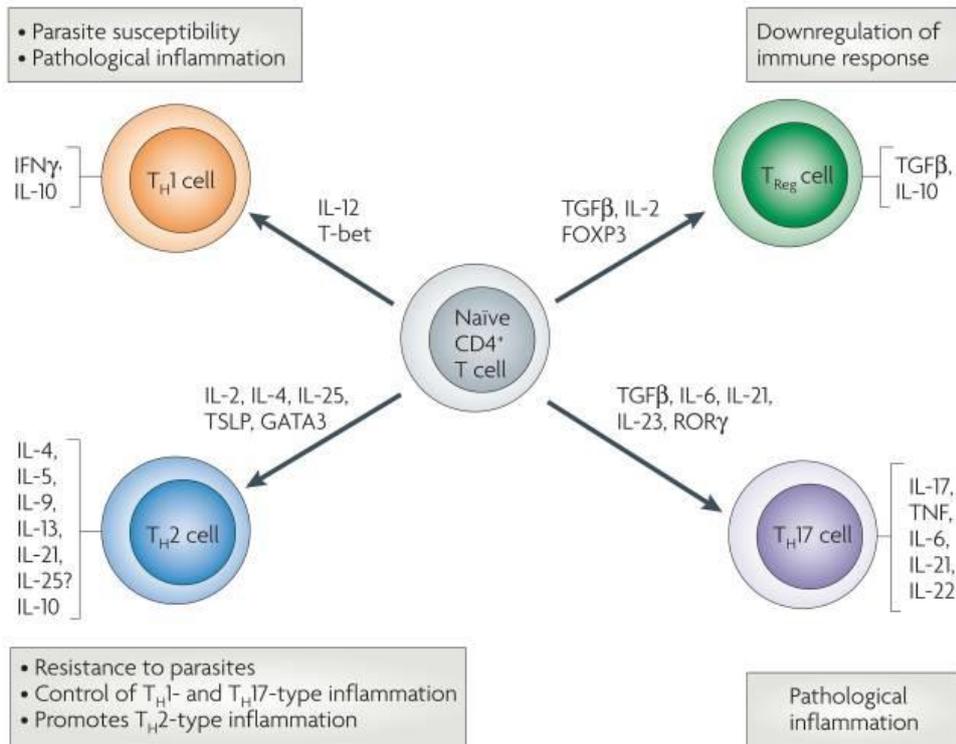


Abb. 3: Differenzierung naiver T-Zellen in Umgebung bestimmter Zytokine und Transkriptionsfaktoren in T-Helfer- ( $T_H$ ) Zellen bzw. regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ). Kontakt mit IL-12, produziert von DCs, induziert eine Expression des Transkriptionsfaktors T-bet, die zu einer  $T_H1$ -Zelldifferenzierung führt.  $T_H1$ -Zellen produzieren u.a. IFN $\gamma$ . Einige Zytokine, wie z.B. IL-2 und IL-25 scheinen bei der  $T_H2$ -Differenzierung eine Rolle zu spielen.  $T_H2$ -Zellen produzieren wiederum eine große Anzahl an Zytokinen, die u.a. die von  $T_H1$ - und  $T_H17$ -Zellen vermittelte Entzündung kontrolliert. Immunantworten können durch  $T_{reg}$ -Zellen inhibiert werden. Diese Zellen entstehen durch die Expression von FOXP3, TGF $\beta$  und IL-2. Für die  $T_H17$ -Differenzierung sind u.a. IL-6, IL-21 und IL-23 verantwortlich.  $T_H17$ -Zellen vermitteln Entzündung. (Anthony RM et al., Nature Reviews Immunology, 2007).

Es ist bekannt, dass  $T_H1$ -Zellen den Krankheitsverlauf des T1D begünstigen (Trembleau, Penna et al. 2003),  $T_H2$ -Zellen wirken hingegen protektiv (Gallichan, Balasa et al. 1999).  $T_H17$ -Zellen wird eine inflammationsfördernde Rolle in der Pathogenese des T1D zugeschrieben, die zudem das Gleichgewicht von Effektorzellen und T-Regulatorzellen stören können (Shao, He et al. 2012; Ryba-Stanislawowska, Skrzypkowska et al. 2013). Es wird vermutet, dass dadurch die Selbsttoleranz des Immunsystems nicht mehr stark genug reguliert werden kann, mit der Folge der Entstehung einer Autoimmunerkrankung wie dem T1D (Weigmann and Daniel 2012). Es konnte gezeigt werden, dass es im frühen Stadium einer Insulitis vor allem zu einer Infiltration der Inselzellen durch zytotoxische  $CD8^+$ -T-Zellen kommt. Mit zunehmender Infiltration dieser Zellen konnte gleichzeitig eine Abnahme der  $\beta$ -Zellmasse beobachtet werden (Willcox, Richardson et al. 2009). Es wird vermutet, dass  $CD8^+$ -T-Zellen durch zytotoxische Granula, wie Perforine und Granzyme, die Betazellen direkt zerstören. Perforine verursachen Löcher in der Plasmamembran der Inselzellen, die es zytotoxi-

schen Serinproteasen, den Granzymen, ermöglichen über bestimmte Signalwege den Zelltod der  $\beta$ -Zelle zu induzieren (Podack, Lowrey et al. 1988). Zudem wurde beschrieben, dass zytotoxische T-Zellen durch Hochregulation des Fas-Rezeptorliganden (FasL) und direkten Kontakt mit der Betazelle die Apoptose dieser induzieren können (Savinov, Tcherepanov et al. 2003). Man weiß, dass  $CD4^+$ -T-Zellen, im Gegensatz zu  $CD8^+$ -T-Zellen, sowohl im frühen als auch im späten Stadium der Pathogenese des T1D eine Rolle spielen (Shizuru, Taylor-Edwards et al. 1988). Die Zerstörung geschieht hier aber nicht durch direkten Zell-Zellkontakt oder den Fas/FasL-Signalweg, sondern durch die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen (Varanasi, Avanesyan et al. 2012), auf die im Kapitel 1.1.5 eingegangen werden soll.

#### **1.1.4.2 Regulatorische T-Zellen in der Pathogenese des T1D**

Neben  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -T-Zellen, die an der Zerstörung der Betazellen beteiligt sind, gibt es auch regulatorische T-Zellen ( $T_{regs}$ ), denen eine protektive Rolle in der Pathogenese des T1D zugesprochen wird. Es wurde angenommen, dass die Anzahl an  $Foxp3^+$ -regulatorischer T-Zellen bei Patienten mit T1D vermindert seien. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden (Zhang, Bandala-Sanchez et al. 2012). Dennoch sind T-regulatorische Zellen Bestand aktueller Diabetesforschung, da die Verminderung dieser Zellen mit einer Verschlimmerung und Beschleunigung der Erkrankung korreliert (Salomon, Lenschow et al. 2000). So war es möglich, naive Insulin-spezifische T-Zellen mit einer Insulin-Impfung in regulatorische Insulin-spezifische T-Zellen umzuwandeln und somit die Diabetesentstehung in Mäusen zu verhindern (Weigmann and Daniel 2012). Wie bereits oben beschrieben, ist das Ziel die Selbsttoleranz des Organismus mit T-regulatorischen Zellen zu regulieren.

#### **1.1.4.3 Dendritische Zellen in der Pathogenese des T1D**

Auch dendritische Zellen (DCs) spielen beim Krankheitsverlauf des T1D eine wesentliche Rolle (Feili-Hariri, Flores et al. 2006). Als professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APCs) nehmen sie Antigen auf und präsentieren es auf der Oberfläche mit MHC-Komplexen naiven T-Zellen. Sie sind so in der Lage naive T-Zellen antigenspezifisch zu aktivieren und induzieren somit die Differenzierung dieser Zellen in  $T_H1$ -,  $T_H2$ -,  $T_H17$ - bzw. in regulatorische T-Zellen. Man geht davon aus, dass DCs somit auch an der Aktivierung autoreaktiver T-Zellen beteiligt sind.

Da DCs Antigene sowohl mit MHC-Klasse-I-Molekülen, die von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, als auch Antigene mit MHC-Klasse-II-Molekülen, die von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erkannt werden, präsentieren können, ist es ihnen möglich beide Zelltypen zu aktivieren und so eine T-Zell vermittelte Immunantwort zu induzieren. DCs lassen sich in zwei Subpopulationen, die myeloiden dendritischen Zellen (mDC1s und mDC2s) und plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs), unterteilen, für die komplementäre Eigenschaften beschrieben wurden. mDCs und pDCs exprimieren verschiedene Pattern-Recognition Receptors (PRRs) und reagieren daher auf verschiedene mikrobielle Antigene (Jarrossay, Napolitani et al. 2001; Kadowaki, Ho et al. 2001). Von Dzionek et al. wurden Oberflächenmarker zur einfachen Differenzierung von humanen DC-Subpopulationen beschrieben: CD303 (BDCA-2) und CD304 (BDCA-4) für pDCs, CD1c (BDCA-1) für mDC1s und CD141 (BDCA-3) für mDC2s. Auch in dieser Arbeit werden anhand dieser Marker die DC-Subpopulationen analysiert (Dzionek, Fuchs et al. 2000).

#### **1.1.4.3.1 Myeloide dendritische Zellen in der Pathogenese des T1D**

mDCs exprimieren verschiedene Zytokinrezeptoren und Zytokine, vermehrt das Zytokin IL-12 (Ito, Amakawa et al. 2001; Liu 2005) und die Oberflächenmarker CD13 und CD33. Außerdem ist für diesen Zelltyp die Expression von CD11c, ILT1 und CD123 charakteristisch. mDCs repräsentieren keine homogene Population, sondern werden wiederum in mDC1 und mDC2 unterteilt. mDC1 exprimieren CD2, sowie die Fc-Rezeptoren CD32, CD64 und FcεRI. mDC1-Zellen können zudem in Langerhans'sche Zellen (LCs) differenzieren, wenn sie in Gegenwart von GM-CSF, IL-4 und TGF-β1 kultiviert werden, mDC2 dagegen nicht (Ito, Inaba et al. 1999). mDC2 exprimieren im Gegensatz zu pDCs und mDC1 hohe Spiegel von CD26 und CD275. Der Oberflächenmarker CD85a ist auf mDC1 im Vergleich zu pDCs und mDC2 stark exprimiert (Schutz and Hackstein 2014). Als APCs sind mDCs in der Lage Antigen aufzunehmen und so naive T-Zellen zu aktivieren. Es werden ihnen, je nach Reifegrad, immunogene aber auch tolerogene Eigenschaften zugeschrieben (Steinman, Hawiger et al. 2003; Penna, Amuchastegui et al. 2007; Schmidt, Nino-Castro et al. 2012).

#### **1.1.4.3.2 Plasmazytoide dendritische Zellen in der Pathogenese des T1D**

pDCs dagegen ähneln morphologisch Plasmazellen und exprimieren CD4, CD62L und CD123 (Shortman and Liu 2002; Colonna, Trinchieri et al. 2004; Liu 2005). pDCs exprimieren beispielsweise die TLRs 7 und 9, mit denen sie Antigene erkennen können (Lund, Sato et al. 2003; Allen, Pang et al. 2009; Di Domizio, Blum et al. 2009; Swiecki

and Colonna 2010). Nach Aktivierung sezernieren pDCs vermehrt, bis zu 1000 mal höhere Spiegel als andere Zelltypen, IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  und werden daher auch als IFN- $\alpha/\beta$ -produzierende Zellen (IPCs) beschrieben (Fitzgerald-Bocarsly 1993; Cella, Jarrossay et al. 1999; Siegal, Kadowaki et al. 1999; Allen, Pang et al. 2009). Bei Kindern mit neu manifestiertem T1D wurden erhöhte Spiegel von IFN- $\alpha$  gefunden (Allen, Pang et al. 2009). Daher könnten pDCs als IFN- $\alpha/\beta$ -produzierende Zellen eine entscheidende Rolle spielen, die Pathogenese des T1D weiter aufzuklären.

pDCs spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz und werden auch als natürlich vorkommende tolerogene DCs beschrieben, die Entzündungsreaktionen mildern können (Steinman and Idoyaga 2010; Swiecki and Colonna 2010). Im unreifen Stadium exprimieren sie wenig MHC II- oder andere kostimulierende Moleküle. Daher ist ihre Fähigkeit der Antigenpräsentation im Vergleich zu anderen APCs geringer (Schmidt, Nino-Castro et al. 2012). Dennoch ist die Rolle der pDCs in der Pathogenese des T1D noch nicht abschließend geklärt. Einige Studien zeigten, dass die Anzahl der pDCs bei T1D-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen vermindert war (Vuckovic, Withers et al. 2007; Chen, Makala et al. 2008; Hinkmann, Knerr et al. 2008). Eine andere Studie konnte feststellen, dass neu manifestierte Typ-1-Diabetiker eine erhöhte Anzahl an pDCs aufwiesen, die im Laufe der Erkrankung wieder abfiel. Zudem konnten *In-vitro*-Studien zeigen, dass die Prozessierung und Präsentation von Inselautoantigenen durch pDCs signifikant erhöht war, was die T-Zellaktivierung von autoreaktiven T-Zellen erhöhen könnte. Dies könnte auf eine schädliche Rolle der pDCs im Krankheitsverlauf des T1D hindeuten (Allen, Pang et al. 2009). In Tiermodellen wurden, bezüglich der Rolle von pDCs in der Pathogenese des T1D, ebenfalls gegensätzliche Schlussfolgerungen gezogen. Eine Studie zeigte, dass pDCs im Pankreas von transgenen Mäusen eine Insulitis verhindern konnten (Saxena, Ondr et al. 2007), wohingegen eine andere Studie erhöhte IFN Typ 1-Expressionen durch pDCs in pankreatischen Lymphknoten zeigen konnte. Diese Interferone wurden als wichtiger Faktor zu Beginn einer auftretenden Autoimmunität beschrieben (Li, Xu et al. 2008). Diese unterschiedlichen Erkenntnisse könnten allerdings auch auf eine Doppelfunktion der pDCs hinweisen, wenn man das Stadium der pDCs hinsichtlich Reifung und Aktivierung mit in Betracht zieht (Nikolic, Welzen-Coppens et al. 2009).

### 1.1.5 Die Rolle von Zytokinen in der Pathogenese des T1D

Die von autoreaktiven T-Zellen ausgeschütteten Zytokine triggern die Zerstörung der Betazellen und wirken so auf die Progression des autoimmunen Diabetes ein. Bei Menschen mit T1D scheint das Gleichgewicht der  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen auf der einen Seite, und von  $T_H17$ - und regulatorischen T-Zellen auf der anderen Seite, gestört. In welche Subklasse die T-Helferzellen differenzieren, hängt von dem Milieu der Zytokine ab, die vorwiegend von den DCs produziert werden (Fu, Gilbert et al. 2013). So triggert das Zytokin IL-12 beispielsweise eine  $T_H1$ -Polarisierung (s. Abb. 3). Jede  $T_H$ -Subklasse schüttet unterschiedliche Zytokine aus. Die proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$  werden von  $T_H1$ -Zellen produziert und als pathogen beschrieben, während IL-4, IL-5 und IL-10 als antiinflammatorische Zytokine von  $T_H2$ -Zellen synthetisiert werden und vor T1D schützen sollen (Moss, Moll et al. 2004; Wraith, Nicolson et al. 2004; Csorba, Lyon et al. 2010). Proinflammatorische  $T_H17$ -Zellen produzieren IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 (Ouyang, Kolls et al. 2008) und regulatorische T-Zellen vor allem TGF- $\beta$  und IL-10 (von Boehmer 2005).

Man konnte eine Veränderung des Zytokinprofils bei Typ-1-Diabetikern feststellen. So konnte man höhere Spiegel des Interleukin 6 (IL-6) in Typ-1-Diabetikern, im Vergleich zu gesunden Personen, nachweisen (Galassetti, Iwanaga et al. 2006; Shelbaya, Amer et al. 2012). Die höheren IL-6-Spiegel korrelierten zudem mit niedrigerer Foxp3-Expression auf  $T_{reg}$ s. Im Gegensatz dazu konnte man eine positive Assoziation der Spiegel von IL-6 mit denen von IL-17A nachweisen. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese einer Störung der  $T_{reg}/T_H17$ -Balance in Richtung der inflammatorischen wirkenden  $T_H17$ -Zellen (Ryba-Stanislawowska, Skrzypkowska et al. 2013). Zudem konnte man feststellen, dass auch TNF- $\alpha$ , das ebenfalls inflammatorische Eigenschaften besitzt, bei Patienten mit T1D erhöht war (Lee, Xu et al. 2005). Dieses Zytokin verminderte auch die Anzahl an Foxp3<sup>+</sup>-regulatorischen T-Zellen (Ryba, Marek et al. 2011). Neben TNF- $\alpha$  konnte in Experimenten auch IL-1 die Betazellen zerstören und wurde in Inselzellen von Patienten mit T1D gefunden (Thomas, Graham et al. 2012). In einer Studie mit NOD-Mäusen, bei denen Rezeptoren solcher Zytokine fehlten, konnte Diabetes verhindert bzw. der Ausbruch der Krankheit verzögert werden. Kürzlich veröffentlichte Placebo-kontrollierte Studien, die mit einem humanen monoklonalen anti-Interleukin-1-Antikörper bzw. Rezeptorantagonisten das Ziel hatten, die  $\beta$ -Zellfunktion bei Patienten mit neu manifestiertem T1D zu verbessern, zeigten, bezogen auf den Outcomeparameter AUC

C-Peptid, bei Placebo- bzw. Verumpatienten keinen Unterschied (Moran, Bundy et al. 2013). Dennoch werden aktuell weitere Therapien gegen den T1D, bei denen selektiv verschiedene Zytokine blockiert werden sollen, z.B. IL-12, IL-6 bzw. IL-23, diskutiert (Nepom, Ehlers et al. 2013).

Es wird vermutet, dass, wie oben beschrieben, die proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , die von autoreaktiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ausgeschüttet werden, maßgeblich an der Zerstörung der  $\beta$ -Zellen beteiligt sind (Fu, Gilbert et al. 2013). CD8<sup>+</sup>-T-Zellen hingegen sezernieren IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , welche die Autoantigenpräsentation auf DCs hochregulieren und die Fas- und MHC Klasse I-Expression auf Betazellen verstärken, was letztlich ebenfalls in der Zerstörung der Betazelle mündet (Santamaria 2003). Auch so genannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind an der Synthese proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , beteiligt (Janeway and Medzhitov 2002; Naik and Dixit 2011). Diese wiederum spielen eine Rolle bei der Aktivierung von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Wie Studien gezeigt haben, reichen die Signale der Antigenpräsentation und kostimulierenden Moleküle für eine vollständige Aktivierung der T-Zellen nicht aus. Proinflammatorische Zytokine stellen somit das dritte Signal für eine T-Zellaktivierung dar (Curtsinger and Mescher 2010), die im Fall des T1D zu einer Zerstörung der Betazellen führt.

## 1.2 Vitamin D<sub>3</sub>: Physiologie und Wirkung

Neben der Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub> auf den Knochenstoffwechsel konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass Vitamin D<sub>3</sub> auch immunmodulierende und antiinflammatorische Wirkungen besitzt (Marques, Dantas et al. 2010; Takiishi, Gysemans et al. 2010; Vanoirbeek, Krishnan et al. 2011). Dies ist vor allem in Verbindung mit Autoimmunerkrankungen wie dem T1D von relevanter Bedeutung.

Im folgenden Kapitel soll nun die Physiologie und der Metabolismus von Vitamin D<sub>3</sub> näher beschrieben werden. Anschließend wird näher auf die Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub> auf das angeborene bzw. das adaptive Immunsystem eingegangen. Ein weiteres Kapitel soll dann die Relevanz von Vitamin D<sub>3</sub> bei der Autoimmunerkrankung T1D aufzeigen.

### 1.2.1 Metabolismus und Wirkmechanismus von Vitamin D<sub>3</sub>

Vitamin D<sub>3</sub> kann aus der Nahrung aufgenommen werden und ist hier vor allem in Fettsäuren, Eigelb und einigen Speisepilzen enthalten (Mathieu, Gysemans et al. 2005). Es sei hier auch kurz Vitamin D<sub>2</sub>, auch Ergocalciferol genannt, erwähnt. Dieses Vitamin wird ausschließlich aus der Nahrung aufgenommen und dann wie Vitamin D<sub>3</sub> metabolisiert, scheint aber in seiner Wirkung weniger effektiv als Vitamin D<sub>3</sub> zu sein (Armas, Hollis et al. 2004; Heaney, Recker et al. 2011). Vorwiegend wird Vitamin D<sub>3</sub> allerdings endogen in der Haut synthetisiert (Abb. 4).

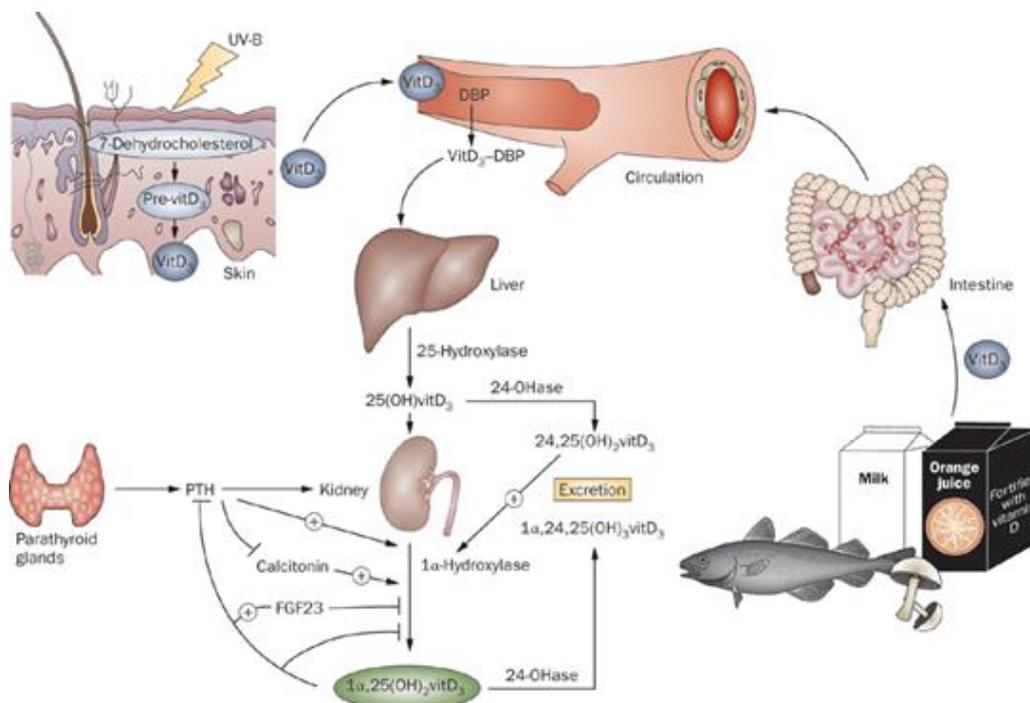


Abb. 4: Metabolismus von Vitamin D<sub>3</sub>: Vitamin D<sub>3</sub> kann aus der Nahrung aufgenommen werden, wird aber meist endogen in der Haut synthetisiert. 7-Dehydrocholesterol (7-DHC) wird unter Einwirkung von

Sonnenlicht in das Prävitamin D<sub>3</sub> umgewandelt. Das Prävitamin D<sub>3</sub> isomerisiert zu Cholecalciferol, dem Vitamin D<sub>3</sub>. Vitamin D<sub>3</sub> wird über das Vitamin-D-bindende Protein (DBP) in den Blutkreislauf transportiert. Dort wird das Cholecalciferol, aber auch das Ergocalciferol in der Leber in einem ersten Hydroxylierungsschritt über das Enzym CYP2R1 zu 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (Calcidiol) umgewandelt. Die biologisch aktive Form von Vitamin D<sub>3</sub>, das 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol, 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin D<sub>3</sub>) entsteht in einem zweiten Hydroxylierungsschritt durch die 1 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP27B1), vorwiegend im proximalen Tubulus der Niere. Die enzymatische Bildung dieses aktiven Metaboliten wird durch ein erhöhtes Parathormon und niedrige Calcium- und Phosphatspiegel gefördert. Calcitriol selbst hingegen hemmt in einem Rückkopplungsmechanismus die 1 $\alpha$ -Hydroxylase und aktiviert die 24-Hydroxylase, wodurch Calcitriol zu 24R,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> inaktiviert wird. (Doorenbos CR et al., Nature Reviews. Nephrology, 2009).

Das dort vorkommende 7-Dehydrocholesterol (7-DHC) wird unter Einwirkung von Sonnenlicht (UV-B-Strahlung von 290-315nm) in das Prävitamin D<sub>3</sub> umgewandelt (Mathieu, Gysemans et al. 2005). Der Maximalwert des Aktionsspektrums der Umwandlung von 7-DHC in das Prävitamin D<sub>3</sub> liegt bei etwa 297nm, bei 315nm findet hingegen kaum noch eine Umwandlung statt (Norval, Bjorn et al. 2010). Das Prävitamin D<sub>3</sub> ist thermodynamisch instabil und isomerisiert daher zu Cholecalciferol, dem Vitamin D<sub>3</sub> (Holick 1995). Ein Teil wird in Fettgewebe mit einer Halbwertszeit von ca. zwei Monaten gespeichert, um in Mangelzuständen wieder zu Verfügung zu stehen (Norman 2001). Generell aber wird Vitamin D<sub>3</sub> über das Vitamin-D-bindende Protein (DBP) in den Blutkreislauf transportiert (Doorenbos, van den Born et al. 2009). Dort wird das Cholecalciferol, aber auch das Ergocalciferol in der Leber in einem ersten Hydroxylierungsschritt über das Enzym CYP2R1 zu 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (Calcidiol) umgewandelt (Norman 2008). Diese Speicherform von Vitamin D<sub>3</sub>, mit einer Halbwertszeit von ca. 10 Tagen, wird überwiegend als Messparameter für die Vitamin D-Bestimmung im Serum verwendet (Vicchio, Yergey et al. 1993). Das Ergocalciferol weist eine schwächere Bindungsaffinität zum DBP als das Cholecalciferol auf, woraus die im Vergleich zum Cholecalciferol kürzere HWZ und geringere Aktivität resultiert (Heaney, Recker et al. 2011). Von einer Calcidiolinsuffizienz spricht man bei Werten von 21-29 ng/ml. Werte unter 20 ng/ml definieren einen Calcidiolmangel (Jones 2007; Holick 2009). Die empfohlene Tagesdosis wird von dem Institute of Medicine (IOM) bei 600 IE angegeben. Hierbei entsprechen 40 IE 1  $\mu$ g Calcidiol (Bendik, Friedel et al. 2014). Die biologisch aktive Form von Vitamin D<sub>3</sub>, das 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol, 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin D<sub>3</sub>) entsteht in einem zweiten Hydroxylierungsschritt durch die 1 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP27B1) vorwiegend im proximalen Tubulus der Niere, wurde aber auch beispielsweise in Makrophagen beobachtet (Overbergh, Decallonne et al. 2000; Liu, Stenger et al. 2006; Cavalier, Delanaye et al. 2009). Die Aufnahme in die Nierenzellen erfolgt mithilfe der Proteine Cubilin und Megalin durch Endozytose. Peptidasen sind für die Spaltung des

Calcidiol-DBP-Komplexes verantwortlich. Die enzymatische Bildung dieses aktiven Metaboliten wird durch ein erhöhtes Parathormon und niedrige Calcium- und Phosphat-spiegel gefördert (Kaseda, Hosojima et al. 2011). Calcitriol selbst hingegen hemmt in einem Rückkopplungsmechanismus die  $1\alpha$ -Hydroxylase und aktiviert die 24-Hydroxylase, wodurch Calcitriol zu  $24R,25(OH)_2$  Vitamin  $D_3$  inaktiviert wird (Dusso, Brown et al. 2005). Abb. 5 veranschaulicht die Schritte der Synthese von 7-Dehydrocholesterol zu Calcitriol.

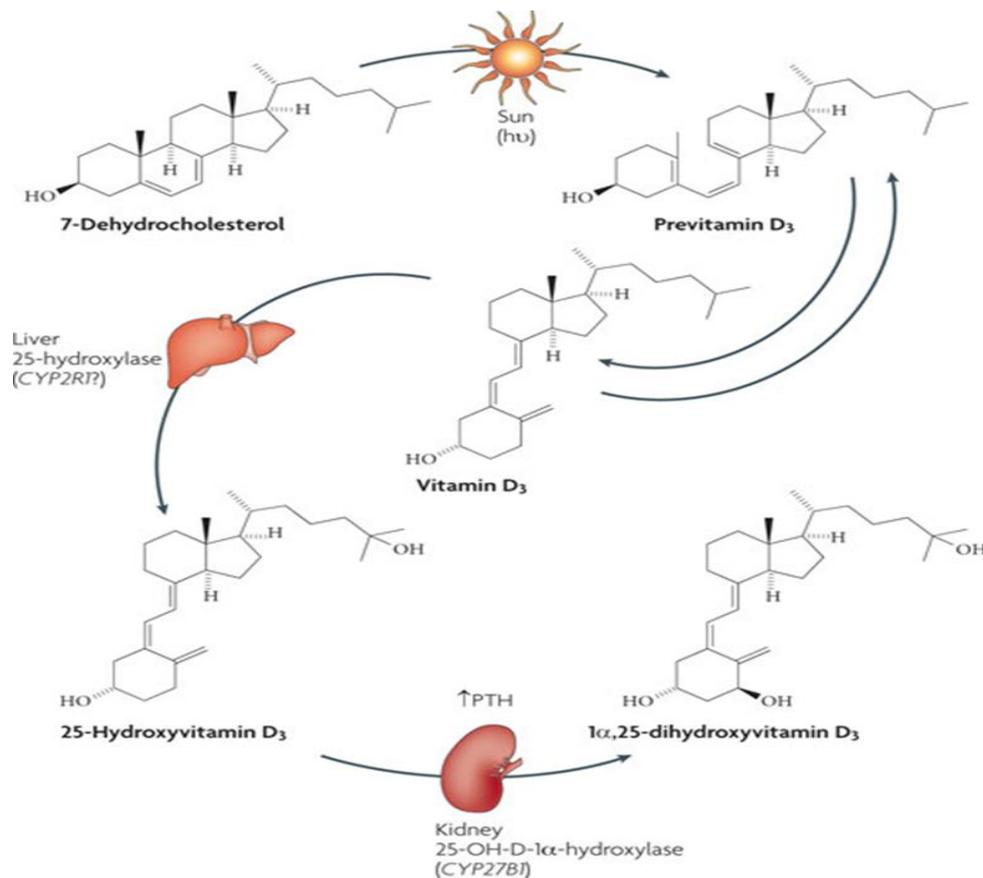


Abb. 5: Synthese von  $1,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$ : 7-Dehydrocholesterol wird durch UV-Licht in das Prävitamin  $D_3$  umgewandelt. In der Leber wandelt die 25-Hydroxylase Vitamin  $D_3$  in das 25-Hydroxyvitamin  $D_3$  (Calcidiol) um.  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$  (Calcitriol) entsteht durch die 25-OH-D- $1\alpha$ -Hydroxylase in der Niere. Calcitriol wird stark durch PTH, Kalzium und Phosphat-Spiegel im Blut reguliert. (Plum LA& DeLuca HF, Nature Reviews Drug Discovery, 2010).

Calcitriol wird über das DBP zu den Zielzellen transportiert. Dort wird die Wirkung von Calcitriol über einen nukleären Rezeptor, den Vitamin D-Rezeptor (VDR) vermittelt. Die Halbwertszeit von Calcitriol beträgt 4-6 h (Baeke, Takiishi et al. 2010).

VDRs kommen nahezu in allen Geweben vor und konnten auch auf den pankreatischen Betazellen sowie Immunzellen, wie z.B. T-Zellen, B-Zellen und APCs, wie Makrophagen und dendritischen Zellen, nachgewiesen werden (Provvedini, Tsoukas et al. 1983). Da-

her wird eine immunmodulierende Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub> auf das Immunsystem und eine Beeinflussung der Regulation der Insulinsekretion durch Vitamin D<sub>3</sub> diskutiert. Auch nicht renale Zellen, wie z.B. Makrophagen, B- und T-Zellen und dendritische Zellen besitzen eine CYP27B1-Aktivität und können daher Calcidiol in Calcitriol umwandeln (Baeke, Takiishi et al. 2010). Durch folgenden Wirkmechanismus kann Calcitriol auf die Genexpression einwirken: es bindet an den VDR an der C-terminalen ligandenbindenden Domäne und heterodimerisiert mit dem so genannten Retinoid-X-Rezeptor (RXR). Das Heterodimer VDR-RXR bindet an spezifische DNA-Sequenzen, so genannte vitamin D responsive elements (VDRE) in der Promotorregion von Zielgenen und beeinflusst so die Genexpression. Je nach Zielgen wird so die Gentranskription induziert bzw. unterdrückt (Mathieu, Gysemans et al. 2005).

### 1.2.2 Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub> auf das angeborene Immunsystem

Die antimikrobiellen Eigenschaften von Immunzellen, wie Makrophagen und Monozyten, die Teil des angeborenen Immunsystems sind, können durch Calcitriol verstärkt werden (Wang, Nestel et al. 2004; Gombart 2009). Dies konnte anhand des Bakteriums *Mycobacterium tuberculosis* erforscht werden (Selvaraj 2011). So genannte Pattern Recognition Receptors (PRRs), wie z.B. Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR, engl. *toll-like receptor*) auf Immunzellen erkennen Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs, engl. *Pathogen-associated molecular patterns*) (Davicino, Elicabe et al. 2011). Die TLR-Aktivierung auf Monozyten bzw. Makrophagen hat eine Hochregulation des VDR-Gens bzw. anderer VDR-Zielgene zur Folge. Es konnte beobachtet werden, dass Cathelicidin, Autophagosome

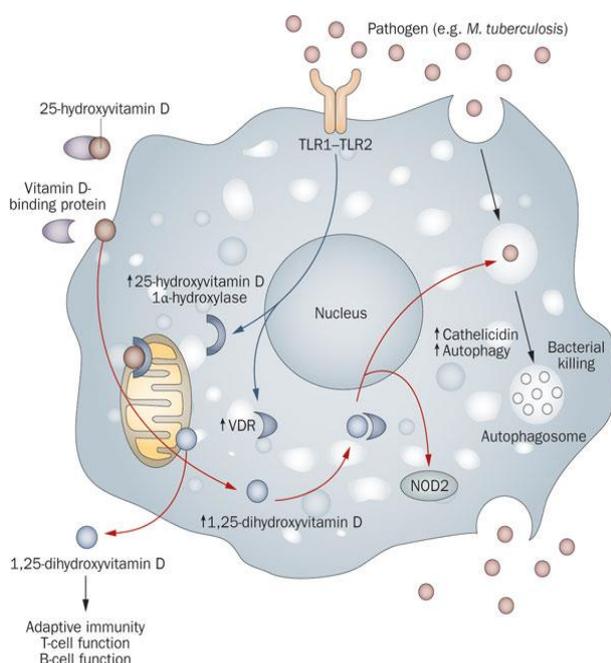


Abb. 6: Mechanismus der Vitamin D-induzierten Cathelicidin- Expression: Aktivierung von TLR1-TLR2 durch Pathogene, wie z.B. *M. tuberculosis*, induzieren die Expression des VDR und der 25-Hydroxyvitamin D-1 $\alpha$ -Hydroxylase (blaue Pfeile). Zirkulierendes 25-Hydroxyvitamin D, an VDBP gebunden, dringt in den Monozyten in freier Form ein, wird in aktives 1,25-dihydroxyvitamin D (Calcitriol) umgewandelt und bindet an VDR (rote Pfeile). So wirkt es als Transkriptionsfaktor und kann die Cathelicidin-Expression und Autophagie induzieren (schwarze Pfeile). Calcitriol kann auch die Expression des intrazellulären PRR NOD2 induzieren oder auf das adaptive Immunsystem (T- und B-Zellen) wirken. (Hewison M, Nature Reviews Endocrinology, 2011).

ein antimikrobielles Peptid, vermehrt gebildet wird und das in den Organismus eingedrungene Pathogen, z.B. das *Mycobacterium tuberculosis*, abtöten konnte (Liu, Stenger et al. 2006), wie auch Abb. 6 zeigt (Hewison M, Nature Reviews Endocrinology, 2011). Calcitriol vermag auch die Genexpression eines weiteren antimikrobiellen Peptids, des Defensin  $\beta$ 2, hochzuregulieren. Dadurch konnten die antimikrobiellen Eigenschaften von myeloiden Zellen, Neutrophilen und Bronchialepithelzellen verstärkt werden (Wang, Nestel et al. 2004; Gombart, O'Kelly et al. 2007; Yim, Dhawan et al. 2007). Am Beispiel des pathogenen Bakteriums *Mycobacterium tuberculosis* wurde beobachtet, dass dieses Pathogen einen weiteren PRR aktivieren kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Gene, die für den PRR NOD2/CARD15/IBD1 codieren, ebenfalls durch Calcitriol exprimiert werden. Dieser PRR erkennt Muramyl-dipeptid (MDP), ein Bruchstück des Peptidoglykans, das eine wichtige Komponente der bakteriellen Zellwand darstellt. Als NOD2-spezifischer Agonist induziert MDP die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, der wiederum die Genexpression von Defensin  $\beta$ 2 induziert (Wang, Dabbas et al. 2010). Es wurde beschrieben, dass das Enzym Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) ebenfalls die antimikrobiellen Eigenschaften von Calcitriol regulieren kann, indem es bestimmte ROS in Monozyten bzw. Makrophagen erhöht (Sly, Lopez et al. 2001). Zudem konnte Calcitriol Autophagie des Bakteriums *Mycobacterium tuberculosis* induzieren, mit der Folge deren Zerstörung (Yuk, Shin et al. 2009). Weiter konnte herausgefunden werden, dass Calcitriol späte Entzündungsreaktionen bei einer Infektion durch die Inhibition der TLR-2- und TLR-4-Expression auf Monozyten verhindern konnte (Sadeghi, Wessner et al. 2006).

### **1.2.3 Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub> auf das adaptive Immunsystem**

DCs spielen bei der Antigenpräsentation eine zentrale Rolle. 1,25(OH)D<sub>3</sub>, hier als Calcitriol bezeichnet, wirkt auf die Differenzierung, Reifung und Funktionen von dendritischen Zellen, die eine maßgebende Rolle bei der Pathogenese des T1D spielen (Guillot, Semerano et al. 2010). Diese Wirkungen sollen im Folgenden diskutiert werden. So konnte gezeigt werden, dass Calcitriol den VDR-Signalweg aktivieren konnte. In der Folge wurde die Reifung der DCs durch geringere Expression von DC-Markern, MHC-Klasse II- und kostimulierenden Molekülen, wie CD40, CD80 und CD86, inhibiert (Berer, Stockl et al. 2000; Penna and Adorini 2000; van Halteren, van Etten et al. 2002; Gauzzi, Purificato et al. 2005; Pedersen, Holmstrom et al. 2009). Es konnte auch beobachtet werden, dass der Oberflächenmarker CD83, der die Reifung der DCs induziert, herun-

terreguliert war (Pedersen, Holmstrom et al. 2009). Calcitriol veränderte zudem das Zytokinprofil der DCs. So konnten die Zytokine IL-12 und IL-23, die hauptsächlich für die  $T_H1$ - bzw.  $T_H17$ -Differenzierung zuständig sind, inhibiert werden und die Sekretion des antiinflammatorischen Zytokin IL-10 gleichzeitig erhöht werden (Penna and Adorini 2000; van Halteren, van Etten et al. 2002; Gauzzi, Purificato et al. 2005; Penna, Amuchastegui et al. 2007; Pedersen, Holmstrom et al. 2009). Das Chemokin MIP-3 $\alpha$  (CCL22), verantwortlich für die Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen, wurde durch Calcitriol vermehrt freigesetzt (Iellem, Mariani et al. 2001; Penna, Amuchastegui et al. 2007).

Auf Monozyten und Makrophagen, weiteren APCs, konnte durch Calcitriol ebenfalls eine verminderte Oberflächenexpression von MHC-II und den kostimulierenden Molekülen CD40, CD80 und CD86 gezeigt werden.

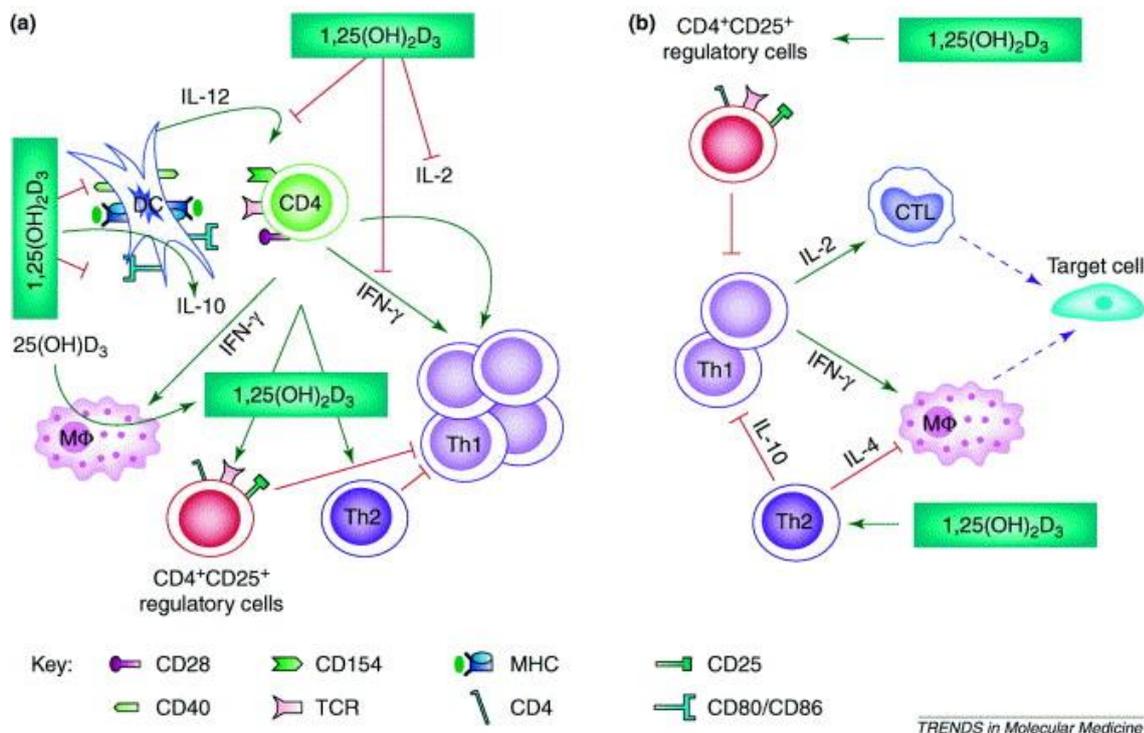


Abb. 7 a/b: Regulation der Immunantwort durch Calcitriol in (a) sekundären Lymphorganen und (b) Zielgeweben: a, in sekundären Lymphorganen inhibiert Calcitriol IL-12 und stimuliert die IL-10-Produktion. CD40, CD80 und CD86, von DCs exprimiert, werden inhibiert. So wird die Entwicklung von  $T_H1$ -Zellen inhibiert und die Induktion von  $CD4^+CD25^+$ -regulatorischen T-Zellen begünstigt. Calcitriol wirkt auch direkt auf T-Zellen, indem es die IL-2- und IFN $\gamma$ -Produktion inhibiert. b, im Zielgewebe sind  $T_H1$ -Zellen, die die Zielzellen durch die Induktion von cytotoxischen T-Zellen (CTL) schädigen können, durch Calcitriol inhibiert. Dies wird durch  $T_{reg}$ -Zellen und  $T_H2$ -Zellen verstärkt. (Mathieu C, Adorini L, Trends in Molecular Medicine, 2002).

In Monozyten konnte eine verringerte Expression der inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 und IL-12 festgestellt werden (D'Ambrosio, Cippitelli et al. 1998; Giulietti, van Etten et al. 2007; Almerighi, Sinistro et al. 2009). Die Proliferationsfähigkeit

von T-Zellen war bei DCs, die mit Calcitriol behandelt wurden, reduziert (Penna and Adorini 2000; van Halteren, Tysma et al. 2004). Es konnte beobachtet werden, dass das auf T-Zellebene gestörte Gleichgewicht, von dominierenden  $T_H1$ - und  $T_H17$ -Antworten, wie es bei Autoimmunerkrankungen der Fall ist, durch Calcitriol zu einem  $T_H2$ -Phänotyp verschoben werden konnte (Penna and Adorini 2000; van Halteren, van Etten et al. 2002; Tang, Zhou et al. 2009). Die daraus folgende vermehrte Ausschüttung von IL-10 und die verminderte Expression von kostimulierenden Molekülen förderten zudem die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen und deren suppressiv wirkende Eigenschaft (Penna, Roncari et al. 2005; Penna, Amuchastegui et al. 2007). Wie gezeigt werden konnte, wirken diese durch Calcitriol Toleranz-induzierten, auch tolerogen genannten DCs immunmodulierend und spielen möglicherweise bei der Verhinderung des T1D eine zentrale Rolle (Penna, Amuchastegui et al. 2007). Daher soll die Wirkung von Calcitriol auf die Subpopulationen der DCs in dieser Arbeit untersucht werden.

Wie gezeigt werden konnte, ist die VDR-Expression bei aktivierten T-Zellen stark erhöht und daher sind auch T-Zellen in diesem Stadium ein möglicher Angriffspunkt für die immunmodulierende Wirkung von Calcitriol (Hayes, Nashold et al. 2003). In Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 oder PMA/Ionomycin die VDR-Expression erhöhen konnte (Baeke, Korf et al. 2010). Allerdings scheint die Stärke der Expression je nach Stimulans unterschiedlich, was die inkonsistenten Ergebnisse bezüglich der Effekte von Calcitriol auf die T-Zellproliferation erklären könnte (Rigby, Stacy et al. 1984; Lacey, Axelrod et al. 1987; Correale, Ysraelit et al. 2009; Jeffery, Burke et al. 2009). Weiter konnte in *In-vitro*-Studien beobachtet werden, dass die von den  $T_H1$ - bzw.  $T_H17$ -Zellen produzierten proinflammatorischen Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  bzw. IL-17 und IL-21 durch Calcitriol direkt inhibiert werden konnten (Boonstra, Barrat et al. 2001; Mahon, Wittke et al. 2003; Jeffery, Burke et al. 2009; Tang, Zhou et al. 2009). Diese Beobachtungen ließen den Schluss zu, dass Calcitriol durch die Suppression von  $T_H1$ -Zellen therapeutisch wirksam ist (Adorini 2005). In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von Calcitriol, wie in CYP27B1-Knockout-Mäusen der Fall, zu erhöhten IL-17-Spiegeln führte (Liu, Nguyen et al. 2008). Hinsichtlich einer entsprechenden Verminderung der  $T_H2$ -Zytokine gibt es unterschiedliche Ergebnisse. Eine Studie konnte feststellen, dass Calcitriol eine Hochregulation der  $T_H2$ -spezifischen Transkriptionsfaktoren GATA-3 und c-maf und somit direkt eine vermehrte  $T_H2$ -Zellproduktion bewirken konnte (Boonstra, Barrat et al. 2001).

Eine andere Studie zeigte hingegen, dass durch Calcitriol das T<sub>H</sub>2-abhängige Zytokin IL-4 inhibiert wurde (Staeva-Vieira and Freedman 2002).

Calcitriol konnte in Experimenten auch die Entwicklung regulatorischer T-Zellen beeinflussen (Gorman, Kuritzky et al. 2007). So konnten Jeffery et al. herausfinden, dass Calcitriol, neben einer Inhibition der proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-21 und IL-17, auch regulatorische T-Zellen mit erhöhten Spiegeln von CTLA-4, einem Protein verantwortlich für die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz und FoxP3, induzieren kann. Daraufhin argumentierten die Autoren, dass durch die Expression von CTLA-4 und FoxP3 die regulatorischen T-Zellen möglicherweise *de novo* entstehen konnten (Jeffery, Burke et al. 2009). Eine andere Studie konnte zeigen, dass CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> regulatorische T-Zellen durch das Vitamin D-Analogon TX527 mit erhöhten Spiegeln von IL-10, CTLA-4 und OX40 induzierbar sind (Baeke, Korf et al. 2011).

In neusten Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass Calcitriol die Anzahl von IL-10- und FoxP3- regulatorischen T-Zellen erhöhte (Urry, Chambers et al. 2012). Calcitriol hat auch auf B-Zellen eine direkte Wirkung. So konnte festgestellt werden, dass Calcitriol die Proliferation, Differenzierung und Immunglobulinsekretion von B-Zellen inhibieren kann (Chen, Sims et al. 2007). Heine et al. konnten zudem feststellen, dass Calcitriol auch die Produktion von IL-10 durch B-Zellen fördert (Heine, Niesner et al. 2008).

### 1.3 Vitamin D<sub>3</sub> und Typ-1-Diabetes

Die Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub> bei Autoimmunerkrankungen wird schon viele Jahre lang erforscht. Wie soeben beschrieben, hat Vitamin D<sub>3</sub> neben dem klassischen Effekt auf den Knochenstoffwechsel auch immunmodulierende Eigenschaften. Dies ist vor allem in Verbindung mit Autoimmunkrankheiten wie dem T1D von relevanter Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass T1D mit niedrigen Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegeln assoziiert ist (Brock, Huang et al. 2011). Eine Studie aus Finnland konnte zeigen, dass die tägliche Gabe von 2000 IE Vitamin D<sub>3</sub> das Risiko an T1D zu erkranken im Alter von 31 Jahren um 80% verringert (Hypponen, Laara et al. 2001).

In den folgenden Kapiteln sollen zum einen relevante Einzelnukleotidpolymorphismen des Vitamin-D-Metabolismus, die im Zusammenhang mit einer möglichen Erkrankung des T1D stehen, zum anderen die immunmodulierende Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub> speziell beim T1D näher beleuchtet werden.

#### 1.3.1 Vitamin D<sub>3</sub>-assoziierte Einzelnukleotidpolymorphismen beim T1D

Im Folgenden soll der aktuelle Stand der Forschung von Einzelnukleotidpolymorphismen des Vitamin D-Rezeptors (VDR) bzw. des Vitamin D-Metabolismus näher beschrieben werden. Ein Einzelnukleotidpolymorphismus (engl. single nucleotide polymorphism, SNP) ist eine Variation einzelner Basenpaare in einem DNA-Strang. SNPs können den Phänotyp und die Funktion von Proteinen des Immunsystems verändern, woraus Krankheiten entstehen können (Chinnadurai, Waller et al. 2013). T1D ist eine durch T-Zellen vermittelte Autoimmunerkrankung und es konnte gezeigt werden, dass die T-Zellproliferation schädlicher autoreaktiver T-Zellen durch Vitamin D-Verbindungen unterdrückt werden konnte (Christakos, Raval-Pandya et al. 1996). Daher spielen Genpolymorphismen, die den Vitamin D-Metabolismus beeinflussen, in der Ätiologie des T1D vermutlich eine entscheidende Rolle. Todd et al. untersuchten knapp 8000 Typ-1-Diabetiker hinsichtlich vier verschiedener Varianten des CYP27B1-Gens. CYP27B1 spielt im Metabolismus von Vitamin D eine tragende Rolle und wandelt hier Calcidiol in die aktive Form des Vitamin D<sub>3</sub>, das Calcitriol, um (Mathieu, Gysemans et al. 2005). Es konnte festgestellt werden, dass der CC-Genotyp des SNP CYP27B1 rs10877012 mit einem erhöhten T1D-Risiko ( $p=9,6 \times 10^{-4}$ ) assoziiert war (Bailey, Cooper et al. 2007). Daneben konnte auch eine Assoziation von DHCR7, der 7-Dehydrocholesterol-Reduktase und CYP2R1, der Vitamin-D-25-Hydroxylase beobachtet werden (Cooper, Smyth et al.

2011). DHCR7 spielt bei der Cholesterinbiosynthese eine Rolle und ist zudem stark mit zirkulierenden Calcidiolspiegeln assoziiert (Chinnadurai, Waller et al. 2013). CYP2R1 hydroxyliert neben CYP27A1 Vitamin D<sub>3</sub> zu Calcidiol (Ferreira, Overbergh et al. 2013). Bestimmte Varianten des CYP2R1-Gens sind mit T1D und niedrigen Calcidiolspiegeln assoziiert (Ramos-Lopez, Bruck et al. 2007). Verschiedene SNPs des Vitamin-D bindenden Proteins (GC) waren ebenfalls mit Calcidiolkonzentrationen assoziiert (Chinnadurai, Waller et al. 2013). Dieses Protein bindet 85-90% der Vitamin D-Metabolite mit hoher Affinität (Bikle, Siiteri et al. 1985; Chun, Peercy et al. 2013). Es hat vor allem eine Pufferfunktion und verhindert so zu große Schwankungen des Vitamin D-Spiegels (Dusso, Brown et al. 2005). Auch die 24-Hydroxylase, ein Enzym das vom CYP24A1-Gen codiert wird, und für den Abbau von Calcidiol und Calcitriol verantwortlich ist, ist ebenfalls Bestandteil von Assoziationsstudien mit Vitamin D<sub>3</sub> (Eftekharian, Zarnani et al. 2010). Die bisher publizierten Studien zu VDR-Genpolymorphismen und T1D sind inkonsistent. Bis dato sind vor allem vier SNPs – die Restriktionsenzyme Apal, BsmI, FokI und TaqI - in dem VDR-Gen untersucht (Panierakis, Goulielmos et al. 2009). So zeigten manche Studien eine Assoziation des BsmI-Polymorphismus mit einem erhöhten T1D-Risiko (McDermott, Ramachandran et al. 1997; Garcia, Angel et al. 2007; Panierakis, Goulielmos et al. 2009; Wang, Xi et al. 2012), manche widerlegten dies (Turpeinen, Hermann et al. 2003; Angel, Santos et al. 2004). Auch für die Polymorphismen Apal, TakI, FokI waren die Ergebnisse widersprüchlich (Chang, Lei et al. 2000; Turpeinen, Hermann et al. 2003). Eine aktuelle Metaanalyse konnte allerdings zeigen, dass der BsmI-Genpolymorphismus mit einem erhöhten T1D-Risiko einhergeht (Zhang, Li et al. 2012). Eine genomweite Assoziationsstudie konnte beweisen, dass eine Variation in den Genen GC, CYP2R1, CYP24A1 und DHCR7 die Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel beeinflusst (Wang, Zhang et al. 2010). Diese genetische Variabilität könnte den bestehenden Vitamin D<sub>3</sub>-Mangel trotz Supplementierung von Vitamin D<sub>3</sub> bei Patienten erklären (Badenhoop, Kahles et al. 2012). Zudem konnte beobachtet werden, dass 3 dieser 4 Gene signifikante Assoziationen mit T1D in verschiedenen Studien zeigen konnten (Cooper, Smyth et al. 2011).

Auch in dieser Arbeit wird im Rahmen der Calcitriol-Studie, auf die später näher eingegangen wird, untersucht, inwieweit diese Einzelnukleotidpolymorphismen mit den gemessenen Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegeln korrelieren und so ein mögliches Risiko für bzw. einen Schutz vor T1D darstellen. Insgesamt sollen 16 SNPs im Hinblick auf den Vitamin D<sub>3</sub>-Status analysiert werden.

### 1.3.2 Immunmodulierende Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub> beim T1D

Neben der Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub> auf den Knochenstoffwechsel wurde in den letzten Dekaden vermehrt auch die immunmodulierende Eigenschaft von Calcitriol, der aktiven Form des Vitamin D<sub>3</sub>, erforscht. Der VDR wurde zuerst auf Monozyten und dann auch auf dendritischen Zellen und aktivierten T-Zellen gefunden (Provvedini, Tsoukas et al. 1983; Zella, McCary et al. 2003). Somit war klar, dass die Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub> auch für das Immunsystem eine Rolle spielt.

Bei der Pathogenese der Autoimmunerkrankung T1D spielt die Antigenpräsentation von Autoantigenen durch DCs eine zentrale Rolle. Daher ist es sinnvoll, Therapien gegen diese Autoimmunerkrankung zu erforschen, die sich auf die Antigenpräsentation von DCs fokussieren. Calcitriol wirkt mit seinen immunmodulierenden Eigenschaften auf unterschiedliche Weise auf DCs, aber auch auf andere Zelltypen und könnte so die Entstehung des T1D verhindern bzw. zumindest verzögern.

So konnte herausgefunden werden, dass Calcitriol DCs mit einem tolerogenen Phänotyp induziert. Diese DCs weisen eine verminderte Expression von den kostimulierenden Molekülen CD40, CD80 und CD86 auf. Zudem waren die IL-12-Spiegel der DCs niedriger und die IL-10-Sekretion erhöht (Adorini 2003). Es konnte somit bewiesen werden, dass die Differenzierung und Reifung der DCs in potente APCs durch Calcitriol inhibiert werden kann (Piemonti, Monti et al. 2000; Griffin, Lutz et al. 2001). Der immunmodulierende Effekt von Calcitriol konnte auch in einem anderen Experiment mit NOD-Mäusen bestätigt werden. Hier konnte gezeigt werden, dass Calcitriol die inflammatorische und T-Zell-stimulierende Eigenschaft von Zytokinen in Makrophagen unterdrücken konnte. So konnten die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-12 und das Enzym iNOS durch Calcitriol inhibiert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die IFN $\gamma$ -induzierenden Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 durch Calcitriol signifikant inhibiert werden konnten (Korf, Wenes et al. 2012). Es konnte nachgewiesen werden, dass bei NOD-Mäusen, die mit einem Calcitriolanalogen behandelt worden sind, die Zahl der T<sub>regs</sub> in den Lymphknoten erhöht werden konnte. Es wird angenommen, dass dieser Zelltyp Effektor-T-Zellen unterdrücken kann und so die bei T1D voranschreitende Betazellzerstörung stoppen kann. Zudem wurde eine verminderte T<sub>H</sub>1-Zellinfiltration im Pankreas der Tiere festgestellt (Gregori, Giarratana et al. 2002).

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Calcitriol auf mRNA-Ebene die Spiegel von den entzündlich wirkenden Zytokinen IL-1 $\beta$  und IL-15, sowie dem Chemo-

kin IP-10 inhibieren konnte (Gysemans, Cardozo et al. 2005). Zudem wurde beobachtet, dass Calcitriol-behandelte Mäuse eine deutliche Änderung ihres Zytokinsekretionsprofils aufwiesen. IL-4 stieg an, wohingegen die IFN $\gamma$ -Spiegel abfielen (Overbergh, Decallonne et al. 2000).

Schon lange ist bekannt, dass Calcitriol einen Anstieg von intrazellulärem freiem Kalzium durch nicht selektive Kalziumkanäle bewirkt und so direkt die Insulinsekretion in der Betazelle beeinflusst (Wollheim, Blondel et al. 1975; Sergeev and Rhoten 1995). Weiter konnte beobachtet werden, dass Calcitriol die Insulinsekretion durch eine Aktivierung der Proteinkinase A und der Proteinkinase C beeinflussen kann (Billaudel, Bourlon et al. 1995; Bourlon, Faure-Dussert et al. 1997). Zudem konnte herausgefunden werden, dass Calcitriol eine transkriptionelle Aktivität des humanen Insulinrezeptorgens in humanen promonozytischen U-937-Zellen bewirkt (Maestro, Molero et al. 2002). Eine 24-stündige Behandlung mit Calcitriol erhöhte die Spiegel der mRNA der zwei Insulinrezeptoren dieser Zellen dosisabhängig (Maestro, Campion et al. 2000).

Wie epidemiologische Studien zeigen konnten, ist die Inzidenz für T1D in Regionen mit niedrigerer UV-Strahlung und folglich einer verminderten Vitamin-D<sub>3</sub>-Produktion höher als in südlichen Breitengraden (Kaden, A et al. 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz für einen Vitamin D<sub>3</sub>-Mangel bei Typ-1-Diabetikern höher war als bei gesunden Kontrollen (Gregorian, Nakashima et al. 2009). Die Intervention mit Calcitriol und dessen Wirkung auf verschiedene Komponenten des Immunsystems bei der Pathogenese des T1D ist das Hauptthema dieser Arbeit. Die Calcitriol-Studie, die von 2000 bis 2006 in München durchgeführt wurde und in 2.1.1 beschrieben wird, bildet die Grundlage für diese Arbeit.

## 1.4 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

Neben der klassischen Wirkung auf den Kohlenstoffwechsel, werden dem Calcitriol auch immunmodulierende Eigenschaften zugeschrieben (Basit 2013). So haben zahlreiche Untersuchungen in der NOD-Maus gezeigt, dass Calcitriol bzw. deren Analoga T1D verhindern bzw. dessen Ausbruch zumindest verzögern konnte (Van Etten, Decallonne et al. 2003; Gysemans, Cardozo et al. 2005; Jayasimhan, Mansour et al. 2014). In dieser Arbeit wurden mononukleäre Zellen und Serumproben von Patienten mit T1D im Rahmen der Calcitriol-Studien, sowie der Neurocrine-Studie, auf die später noch im Detail eingegangen wird, analysiert, um verschiedene Zellparameter und Antikörper vor und nach Intervention mit Vitamin D<sub>3</sub> auf immunologische Veränderungen zu untersuchen. DNA-Proben der Patienten dienten zur Bestimmung von Einzelnukleotidpolymorphismen, die beim T1D eine Rolle spielen könnten. Es soll untersucht werden, ob Calcitriol in den beschriebenen Kohorten auf zellulärer und humoraler Ebene immunmodulierend einwirken kann. Speziell sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

1. Haben Patienten mit neu manifestiertem T1D, die eine Behandlung mit Calcitriol bekamen, eine veränderte Verteilung der dendritischen Zellsubpopulationen? Inwieweit beeinflussen die Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel diese dendritischen Zellsubpopulationen?
2. Hat eine Behandlung mit Calcitriol Einfluss auf die residuale Betazellfunktion bei neu manifestierten Typ-1-Diabetikern?
3. Welchen Einfluss haben bestimmte Einzelnukleotidpolymorphismen auf die Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel?
4. Ist die Zytokinsekretion bei Patienten mit neu manifestiertem T1D, die mit Calcitriol behandelt wurden gegenüber den Placebo-behandelten Patienten verändert? Inwieweit beeinflussen Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel die Zytokinspiegel?
5. Ist bei Patienten, die mit Calcitriol behandelt wurden, die Immunantwort gegenüber den Placebo-behandelten Patienten generell verändert?

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Charakteristika der Studienpopulationen**

#### **2.1.1 Studienpopulation der offenen und doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie**

Von November 2000 bis 2006 wurde die Calcitriol-Studie am Institut für Diabetesforschung in München durchgeführt. Ziel war es zu untersuchen, ob die tägliche Dosis von 0,25 µg Calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) die Betazellfunktion bei Patienten mit neu manifestiertem Typ-1-Diabetes verbessert. Die Studie hatte zwei Phasen. Die erste Studienphase, eine offene placebo-kontrollierte Pilotstudie, prüfte die Sicherheit von Calcitriol, wie von Walter et al. beschrieben (Walter, Kaupper et al. 2010). In die Studie wurden insgesamt 25 mit Calcitriol behandelte und 10 mit Placebo behandelte Probanden eingeschlossen. Die Behandlung bestand aus einer täglichen oralen Einnahme von 0,25 µg Calcitriol (Rocaltrol, Hoffmann-La Roche AG) über einen Zeitraum von 9 Monaten, an die sich eine Nachbeobachtungszeit von weiteren 9 Monaten anschloss. Die Patienten wurden 6 Monate nach Studieneinschluss mit einer Tetanus-Auffrischung (Tetanol pur, 40 IE Tetanus-Toxoid/0,5 ml, Chiron Behring GmbH & Co) geimpft. In der zweiten Phase der Studie, einer doppelblinden placebo-kontrollierten Phase II-Studie, sollte die Wirksamkeit von Calcitriol auf die residuale Betazellfunktion bestimmt werden. Hierfür wurden 41 Patienten nach den Einschlusskriterien der Studie gescreent, von denen 40 Patienten in die Studie eingeschlossen wurden. 22 Patienten erhielten täglich morgens 0,25 µg  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und 18 Patienten erhielten entsprechend ein Placebo. Das Alter der Patienten, sowie die Calcitriolspiegel waren bei Calcitriol-behandelten und Placebo-behandelten Patienten zu Beginn der Studie vergleichbar, wie die Patientencharakteristik der Tab. 1 veranschaulicht. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt.

Tab. 1: Patientencharakteristika der doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie bei Studieneinschluss (median, IQR).

	<b>Verum</b>	<b>Placebo</b>	<b>p</b>
<b>n</b>	22	18	
<b>Geschlecht (m/w)</b>	16/6	13/5	
<b>Zeit nach Manifestation [Tage]</b>	35.0 (24.0-44.5)	40.0 (33.5-46.0)	0.2
<b>Alter [Jahre]</b>	31.5 (22.6-35.3)	24.0 (21.8-32.1)	0.2
<b>Gewicht [kg]</b>	73.2 (62.0-76.1)	73.2 (58.0-81.5)	0.6
<b>BMI [kg/m<sup>2</sup>]</b>	22.2 (20.7-24.3)	21.9 (19.9-24.6)	0.9
<b>HbA<sub>1c</sub> [%]</b>	8.2 (7.2-9.3)	8.4 (7.2-9.4)	1.0
<b>Insulintagesdosis [IU]</b>	0.33 (0.21-0.47)	0.35 (0.29-0.45)	0.9
<b>Calcitriol [ng/l]</b>	47.0 (38.0-59.0)	44.5 (38.0-49.0)	0.1

Als erster Erfolgsparameter der Studie diente das AUC-C-Peptid (AUC 0-120 min.) eines Mixed-Meal-Toleranztests (MMTT) nach 18 Monaten. Zudem wurde der tägliche Insulinbedarf pro kg Körpergewicht (KG), und die HbA<sub>1c</sub>-Werte, die die Diabeteseinstellung repräsentieren, registriert. Alle Probanden wurden 6 Monate nach Studieneinschluss mit einer Tetanus-Auffrischung (Tetanol pur, 40 IE Tetanus-Toxoid/0,5 ml, Chiron Behring GmbH&Co) geimpft (Abb. 8). Die Betazellfunktion konnte durch die Gabe von Calcitriol nicht erhalten oder verbessert werden (Walter, Kaupper et al. 2010).

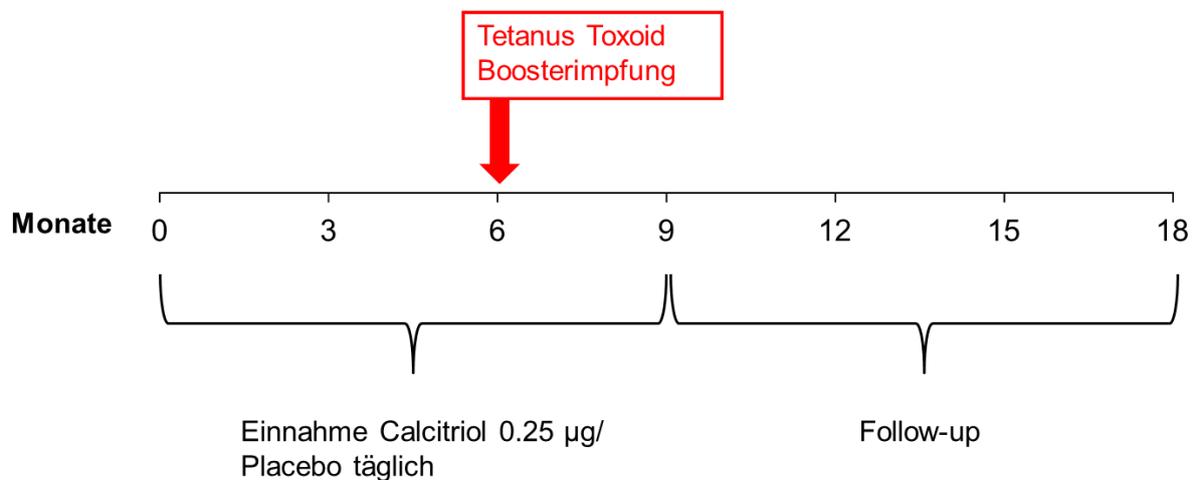


Abb. 8: Verlauf der Calcitriol-Studie: Intervention der Studienarznei von Monat 0 bis Monat 9. Ab Monat 9 bis einschließlich Monat 18 wurden die Probanden nachbeobachtet („Follow-up“).

### 2.1.2 Studienpopulation der Neurocrine-Studie

Diese Phase II, multizentrische, randomisierte, doppelblinde, placebo-kontrollierte Dosisfindungsstudie wurde von 2001 bis 2006 durchgeführt. Insgesamt beteiligten sich 22 Studienzentren an der Studie, davon 2 Studienzentren in Deutschland. Die Kohorte, die in dieser Arbeit untersucht wurde, bezog sich auf die Patienten, die am Studienzentrum in München rekrutiert worden sind. Dies waren 22 Patienten, von denen 16 Patienten die Studienarznei in unterschiedlichen Dosen verabreicht bekamen und 6 Patienten, die ein Placebo einnahmen (Walter, Philotheou et al. 2009). Auch hier wurden die gesammelten PBMCs zur Analyse von DC-Subpopulationen verwendet. Zudem wurden anhand der Seren der Patienten deren Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel bestimmt und von der DNA auch die SNPs, wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, genotypisiert. Für die Genotypisierung der 16 SNPs stand DNA von jeweils 14 Patienten zur Verfügung.

Bei Analyse der SNPs CYP2R1 rs12794714 und CYP24A1 rs6013897 waren 12 Patientenproben verfügbar.

### 2.1.3 Patientenproben

In dieser Arbeit soll nun Augenmerk auf den Nachweis eines immunologischen Effektes von Calcitriol gelegt werden. Dieser soll auf zellulärer und humoraler Ebene, durch Bestimmung von Subklassen der dendritischen Zellen, Bestimmung der Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel, Messungen der Zytokinprofile und Antikörpersubklassen als Antwort auf die Tetanus-Boosterimpfung nachgewiesen werden. Zur Bestimmung der Calcidiol- bzw. der Calcitriolspiegel standen die in Tab. 2a-c genannten Patientenproben zur Verfügung. Die DC-Subklassen wurden mit den in Tab. 2a-c verfügbaren PBMCs analysiert.

Tab. 2a: Anzahl der getesteten Patientenproben der doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie.

	Verum				Placebo			
	Mo 0	Mo 9	Mo 12	Mo 18	Mo 0	Mo 9	Mo 12	Mo 18
<b>Serumproben (Calcitriolbestimmung)</b>	22	21	-	-	18	18	-	-
<b>Serumproben (Calcidiolbestimmung)</b>	22	21	-	-	18	18	-	-
<b>PBMCs (DC-Subklassen)</b>	21	21	20	18	17	18	17	16

Tab. 2b: Anzahl der getesteten Patientenproben der offenen placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie.

	Verum				Placebo			
	Mo 0	Mo 9	Mo 12	Mo 18	Mo 0	Mo 9	Mo 12	Mo 18
<b>Serumproben (Calcidiolbestimmung)</b>	18	-	-	-	9	-	-	-
<b>PBMCs (DC-Subklassen)</b>	19	21	18	19	9	9	9	9

Tab. 2c: Anzahl der getesteten Patientenproben der Neurocrine-Studie.

	Verum			Placebo		
	Mo 0	Mo 3	Mo 12	Mo 0	Mo 3	Mo 12
<b>Serumproben (Calcitriolbestimmung)</b>	15	4	14	6	-	4
<b>Serumproben (Calcidiolbestimmung)</b>	11	4	14	5	-	4
<b>PBMCs (DC-Subklassen)</b>	11	4	15	5	-	4

Die Bestimmung so genannter Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) erfolgte, um die genetischen Marker mit immunologischen Parametern in Beziehung zu setzen.

In Tab. 3 sind die getesteten SNPs aufgelistet.

Tab. 3: Anzahl der bestimmten Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) bei Patienten der doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie.

	<b>Verum</b>	<b>Placebo</b>
<b>DHCR7 rs4945008</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
<b>DHCR7 rs7944926</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
<b>CYP2R1 rs12794714</b>	<b>15</b>	<b>16</b>
<b>CYP2R1 rs1993116</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
<b>CYP2R1 rs6486205</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
<b>CYP27A1 rs17470271</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
<b>CYP24A1 rs2296241</b>	<b>16</b>	<b>15</b>
<b>CYP27B1 rs10877012</b>	<b>18</b>	<b>18</b>
<b>CYP24A1 rs6013897</b>	<b>15</b>	<b>16</b>
<b>GC rs12512631</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
<b>GC rs222040</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
<b>GC rs2282679</b>	<b>15</b>	<b>14</b>
<b>GC rs3755967</b>	<b>16</b>	<b>12</b>
<b>Apal VDR rs7975232</b>	<b>15</b>	<b>16</b>
<b>FokI VDR rs2228570</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
<b>BmsI VDR rs1544410</b>	<b>16</b>	<b>16</b>

Um die Ergebnisse bei den SNPs CYP27B1 rs10877012 und FokI (VDR rs2228570) zu bestätigen und die Fallzahl zu erhöhen, wurden die verfügbaren Proben der offenen Calcitriol-Studie und der Neurocrine-Studie mit in der Auswertung berücksichtigt. Tab. 4 zeigt diese SNPs.

Tab. 4: Anzahl der Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs), der Patienten der offenen Calcitriol-Studie und der Neurocrine-Studie.

	<b>Verum</b>	<b>Placebo</b>
<b>CYP27B1 rs10877012</b>	<b>26</b>	<b>12</b>
<b>FokI VDR rs2228570</b>	<b>26</b>	<b>12</b>

Die Bestimmung der Zytokinmessung und der Antikörpersubklassen erfolgte mit Seren der Probanden der doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie (Tab 5.).

Tab. 5: Anzahl der getesteten Patientenproben der doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie; Zytokinbestimmung vor Impfung: Monat 0, nach Impfung: Monat 9; TT-Antikörper vor Impfung: Monat 6, nach Impfung: Monat 9.

	<b>Calcitriol-behandelt</b>		<b>Placebo-behandelt</b>	
	<b>vor TT-Impfung</b>	<b>nach TT-Impfung</b>	<b>vor TT-Impfung</b>	<b>nach TT-Impfung</b>
<b>Serumproben (Zytokinbestimmung)</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>18</b>	<b>18</b>
<b>Serumproben (TT-Antikörper)</b>	<b>21</b>	<b>19</b>	<b>18</b>	<b>17</b>

## 2.2 Material

### 2.2.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Durchflusszytometer (FACS) Calibur	Becton Dickinson
Durchflusszytometer (FACS) LSR II	Becton Dickinson
Gefrierschrank –20°C	Porkka
Gefrierschrank –80°C, Herafreeze Basic	Thermo Scientific
Brucheisautomat	Thermo Scientific
Kühlschrank 4°C, FKEX 1800 MediLine	Liebherr
Kühlschrank 4°C, Santo	AEG
Lichtmikroskop CKX41	Olympus
Magnetrührer RET	IKA
pH-Meter EcoScan pH 5	Eutech Instruments Europe
Pipettierhilfe Accu-Jet	Brand
Sterilbank Hera-Safe	Thermo
Stoppuhr	Hanhart
Präzisionswaage Acculab	Sartorius
Wasserbad GFL 1063	Bachofer
Zählkammer Neubauer, improved	Heinz Herenz Medizinalbedarf
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 4012	Thermo Scientific
Vakuumpumpe UNO 004 B	Pfeiffer
Radioaktivitätsmessgerät ( $\gamma$ -counter Cobra II)	Canberra Packard
Ultraschallbad	Cole Parmer

Vortex Mixer	neoLab
Schüttler	Heidolph
Duran® Laborglasflaschen 100, 1000, 2000ml	Schott
Brutschrank BP 16 CU	Heraeus
Reagenzschüttler "Lab Dancer"	IKA
Pipetten, Eppendorf Reference	Eppendorf
Pipetten, Eppendorf Research	Eppendorf
Pipetten, Eppendorf Research plus	Eppendorf
Transferpipette 20-200µl	Brand
Messzylinder 250ml, 500ml, 1000ml	Duran
Handdispenser	Eppendorf
BioPlex Suspension Array System	Bio-Rad
MiniMACS™ Separator	Miltenyi Biotech
MACS® MultiStand	Miltenyi Biotech

### 2.2.2 Chemikalien und Reagenzien

<b>Chemikalien/ Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
Penizillin/ Streptomycin-haltiges RPMI-Medium	Gibco BRL Life Technologies
Ficoll–Paque™ Plus	Amersham Pharmacia
DMEM-Medium (4.5g/L Glucose o. L-Glutamin)	Lonza
Trypanblau	MP Biomedicals
Trizma Base	Sigma-Aldrich Chemie
FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotech
Tetanus Toxoid (TT), Tetanol pur	Novartis
WHO-Standardserum TE-3	NIBSC
PBS, pH 7.2	Gibco

PBS, pH 7.4	Gibco
Tween20	Sigma-Aldrich Chemie
Streptavidin-HRP-Konjugat	BD Pharmingen
TMB Peroxidase EIA Substrate Kit	Bio-Rad
deionisiertes Wasser	
H <sub>2</sub> O, bidest.	
FACS Rinse Solution	BD Biosciences
FACS Clean Solution	BD Biosciences
FACS Flow Sheath Fluid	BD Biosciences
RPMI 1640 m. GlutaMAX™	Invitrogen
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich Chemie
Gelatine	Sigma Aldrich Chemie
Zitronensäure-Monohydrat	Sigma Aldrich Chemie
di-Natriumhydrogenphosphat ≥99%	Roth
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Schwefelsäure 2N	n.b.
Natronlauge 1,5M	n.b.
humanes Serum AB	PAA Laboratories
EDTA, UltraPure™ 0.5M, pH 8.0	Invitrogen™
Cell Viability Solution	BD Biosciences
Fungizone®, Amphotericin B	Gibco
Penicillin-Streptomycin	Gibco
nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco
Leukocyte Activation Cocktail, mit BD GolgiPlug	BD Pharmingen

### 2.2.3 Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Deckgläser	Marienfeld
Einwegpipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	BD
Reagenzröhrchen Falcon (15ml, 50ml)	BD
Probenröhrchen für FACS, steril	BD
Pipettenspitzen 0,1-10 µl, 1-200 µl, 100-1000 µl	Peske
96-well-Mikrotiterplatten, Plate Maxisorb F96	Nunc
96-well-Mikrotiterplatten, Cellstar	Greiner bio-one
Kreuzprobenröhrchen 75/12 mm	Peske
Parafilm M	Brand
Aluminiumfolie	neoLab
Leukosilk	BSNmedical
Nitrilhandschuhe	UltraCruz
Latexhandschuhe	UltraCruz
Dispenser Tips, unsteril, 2,5ml	Peske
Multiguard 100-1000µl Barrier Tip	Sorenson Bioscience, Inc.
Zellstoff Kleenex	Kimberly-Clark
Reaktionsgefäße 500µl, 1ml, 2ml	Eppendorf
MS-Säule (MACS™)	Miltenyi Biotech
Spritzenvorsatzfilter, Minisart®, 0.2µm	Sartorius Stedim Biotech
Einmalspritze, Omnifix, 20ml	B. Braun Melsungen AG

### 2.2.4 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Biotin Mouse anti-human IgG1 (Klon G17-1)	BD Pharmingen
Biotin Mouse anti-human IgG2 (Klon G18-21)	BD Pharmingen
Biotin Mouse anti-human IgG4 (Klon JDC-14)	BD Pharmingen

### 2.2.5 Kits

Kit	Hersteller
Blood Dendritic Cell Enumeration Kit, human	Miltenyi Biotech
High Sensitivity Human Cytokine Kit	Millipore
1,25-Dihydroxyvitamin D Kit	Diasorin
25-Hydroxyvitamin D Kit	Diasorin

### 2.2.6 Puffer und Lösungen

FACS-Puffer:

PBS, pH 7.2,  
0,5% BSA steril filtriert,  
0,01% Sodiumazid.

PBS (für Subklassen-ELISA):

Aqua bidest.,  
147mM NaCl,  
1,5mM KCl,  
2,7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  
8,1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, auf pH 7,4 einstellen.

Waschpuffer (PBST)

(für Subklassen-ELISA):

Aqua bidest.,  
147mM NaCl,  
1,5mM KCl,  
2,7mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  
8,1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, auf pH 7,4 einstellen  
Zugabe von 0,05% Tween20.

Blocking-Puffer:

Aqua bidest.,  
147mM NaCl,  
1,5mM KCl,  
2,7mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  
8,1mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , auf pH 7,4 einstellen  
Zugabe von 0,05% Tween20  
Zugabe von 0,1% Gelatine.

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes**

Aus den Blutproben der Probanden der Calcitriol-Studie wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs), wie folgend beschrieben, isoliert. Das Blut wurde zunächst bei 1400 rpm zentrifugiert. Der gelbliche Überstand (Plasma) wurde für die Antikörperbestimmung bei -20°C aufbewahrt. Das Blut wurde mit Penizillin- und Streptomycin-haltigem RPMI-Medium (Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, USA) im Verhältnis 1:1 verdünnt und vorsichtig über das Ficoll–Paque™ Plus (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) geschichtet. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 1800 rpm für 25 min. ohne Bremse bei Raumtemperatur (RT). Es bildeten sich aufgrund der unterschiedlichen Dichten der Blutbestandteile vier Schichten: Plasma bzw. Medium, PBMC-Ring, Ficoll–Paque™ Plus sowie ein Blutkuchen. Die PBMC wurden nun mittels einer Pasteurpipette abgeerntet und in mit 18ml RPMI gefüllte Falcons überführt. Es folgte ein Waschschrift bei 1400 rpm für 7 min. bei RT und schwach eingestellter Bremse. Der Überstand wurde weggekippt und das Pellet in 40 ml RPMI gelöst. Zum Zählen der PBMC in einer Neubauer Zählkammer wurden 20 µl der Zellen im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt. Die restlichen PBMC wurden nochmals wie beim Waschschrift zentrifugiert und dann eingefroren. Dabei wurden jeweils maximal  $1 \times 10^6$  Zellen in jeweils 1 ml Einfriermedium (0,5 ml FCS, 0,5 ml RPMI/DMSO) aufgenommen. Hierbei wurde das RPMI/DMSO tröpfchenweise zu dem FCS und aufgelöstem Zellpellet gegeben. Bis zum Gebrauch wurde es zuerst bei -80°C und nach 48h in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **2.3.2 Quantitative Bestimmung der Anzahl der dendritischen Zellsubpopulationen in PBMCs**

Die Zellen wurden direkt aus flüssigem Stickstoff in ein 37°C warmes Wasserbad gehalten und rasch aufgetaut. 1 ml warmes DMEM-Medium wurde in 15 ml-Greiner-Röhrchen vorgelegt. Die aufgetauten Zellen wurden wiederum mit 1 ml DMEM-Medium aufgenommen und zu den entsprechenden Röhrchen gegeben. Es wurde auf 10 ml aufgefüllt und bei 300g, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml DMEM-Medium resuspendiert und auf 10 ml aufgefüllt. Ein 20 µl Aliquot der isolierten PBMC wurde im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt. Trypanblau wird aufgrund seiner Membrandurchlässigkeit nur von toten Zellen aufgenommen. Die Zellen

wurden in die Zählkammer überführt und gezählt. Für die Bestimmung der Anzahl an PBMCs wurden alle vier großen Eckquadrate, die wiederum in 16 kleinere Quadrate aufgeteilt sind ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl geschah wie folgt:

$$\frac{\text{Zellzahl} \times \text{Verdünnung (mit Trypanblau = 2)} \times \text{Volumen RPMI Verdünnung} \times 10^6}{100}$$

100

$$= x,x \text{ Zellen} \times 10^6$$

Für die quantitative Bestimmung der dendritischen Zellsubpopulationen wurde ein Kit (Blood Dendritic Cell Enumeration Kit, Milteny Biotech GmbH, Bergisch Gladbach) verwendet. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen nochmals bei 300g, 4°C, 10 min. zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde mit DMEM-Medium so aufgefüllt, dass sich eine Konzentration von  $1,0 \times 10^6$  Zellen/ml ergab. Für dieses Experiment wurden pro Röhrchen  $1,5 \times 10^6$  Zellen verwendet, nicht wie im Protokoll angegeben,  $1,0 \times 10^6$  Zellen. Entsprechend wurden jeweils 1,5 ml der Zellen in je zwei FACS-Röhrchen, eine Negativ- und eine Positivkontrolle, überführt und bei 300g, 4°C 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Röhrchen mit 240 µl FACS-Puffer versetzt. Da PBMCs verwendet wurden, wurden die Zellen entweder mit je 4 ml 10%-igem autologem Serum oder mit 60 µl FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotech) blockiert.

Die Färbung der Zellen erfolgte wie im Protokoll angegeben. In die Negativprobe wurden jeweils 20 µl des „Cocktail Control“ gegeben. Dieser enthielt folgende Fluorochromkonjugierte monoklonale Antikörper als Isotypkontrolle: Mouse IgG2a-PE, Mouse IgG1-FITC, Mouse IgG1-APC. Der „Cocktail Control“ enthielt zudem monoklonale Antikörper zur Diskriminierung und zum Ausschluss der B-Zellen (CD19-PE-Cy5) und Monozyten (CD14-PE-Cy5). Das Antikörpermischung wurde in einer Lösung mit 0,1% Gelatine und 0,05% Natrium Azid bereitgestellt. Abb. 9 zeigt ein Beispiel einer Patientenprobe zum Ausschluss bestimmter Zelltypen nach Erstellung eines FSC/SSC Dot Plots.

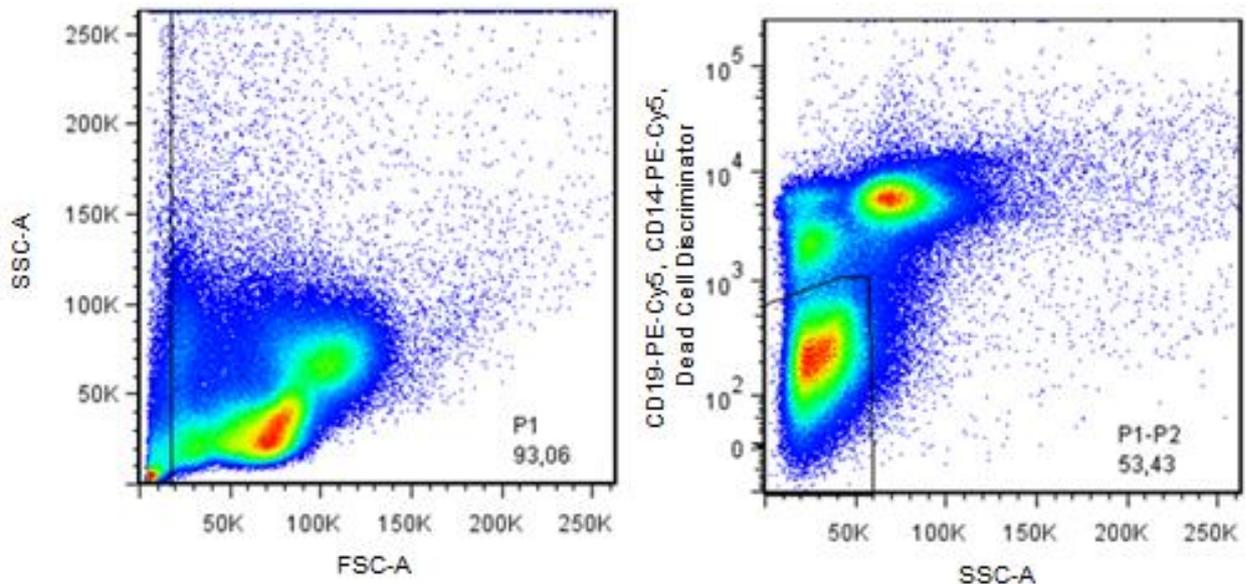


Abb. 9: Beispiel einer Patientenprobe: Ausschluss von Zelltrümmern und Thrombozyten (links) nach Erstellung eines FSC/SSC Dot Plots; Ausschluss von B-Zellen, Monozyten, Granulozyten und toten Zellen (rechts): es wird ein SSC/PE-Cy5/DCD Dot Plot erstellt und auf P1 gegatet. P2 stellt die Population an B-Zellen, Monozyten und Granulozyten dar, die ausgeschlossen werden sollen. Kontrolle nicht gezeigt.

In die Positivprobe wurden jeweils 20  $\mu$ l des „Anti-BDCA Cocktail“ gegeben. Dieser enthielt alle Antikörper, die für die Detektion der mDC1s (CD1c (Anti-BDCA-1)-PE), mDC2s (Anti-BDCA-3-APC) und pDCs (Anti-BDCA2-FITC) notwendig waren, zudem auch CD19-PE-Cy5 und CD14-PE-Cy5 zum Ausschluss der B-Zellen bzw. der Monozyten. Diese Zellen exprimieren ebenso CD1c (BDCA-1) bzw. BDCA-3 und mussten daher ausgeschlossen werden. Anschließend wurde zu jeder Probe 10  $\mu$ l des „Dead Cell Discriminator“ gegeben, um tote Zellen in der Analyse ausschließen zu können. Der in diesem Gemisch enthaltene Farbstoff gelangt in tote Zellen und bindet nach Bestrahlung mit Licht kovalent und irreversibel an die Nukleinsäuren der Zellen. Die Proben wurden daher vorsichtig gemischt und dann auf Eis horizontal für 10 min. mit einer 60 Watt-Lampe bestrahlt. Es wurden 4 ml FACS-Puffer zugegeben, um die Zellen dann bei 300g, 4°C für 5 min. zu zentrifugieren. Um eine höhere Zellkonzentration zu erhalten, wurden die Zellen vor Fixierung in 250  $\mu$ l Puffer, statt in 300  $\mu$ l Puffer resuspendiert. Nach Fixierung der Zellen mit je 150  $\mu$ l „Fix Solution“ und 5  $\mu$ l „Discriminator Stop Reagent“, erfolgte die Messung der Proben mit dem FACS-Gerät (FACSCalibur bzw. LSR II, BD). Die Messung der Proben der Probanden der doppelblinden sowie offenen placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie erfolgte mit dem Zytometer LSR II, BD. Die Proben der Probanden der Neurocrine-Studie erfolgte mit dem Zytometer FACSCalibur, BD. Pro Probe wurde jeweils auch eine Negativkontrolle gemessen. Die Gates wurden wie

im Protokoll beschrieben gesetzt (Abb. 10) und die Messung bei einer Zellzahl von  $5 \times 10^5$  gestoppt.

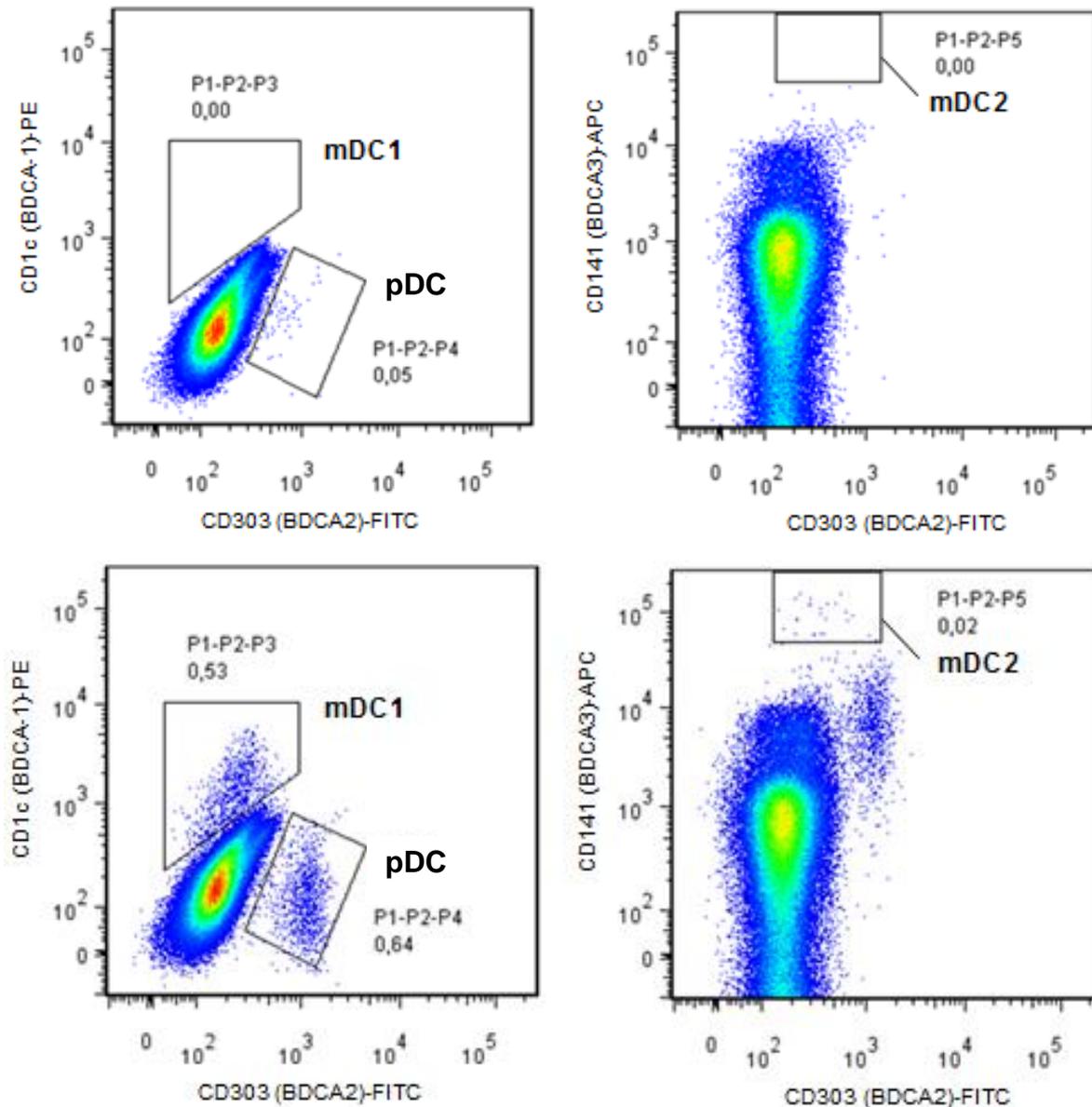


Abb. 10: Setzen der Gates zur Identifikation der pDCs, mDC1 und mDC2 einer Kontrolle (oben) und einer Patientenprobe (unten): zur Identifikation der mDC1 und pDCs wird ein FITC/PE Dot Plot erstellt und auf P1/P2 gegatet. P3 stellt die mDC1-Population dar, P4 die pDC-Population. Zur Identifikation der mDC2 wird ein FITC/APC Dot Plot erstellt und auf P1/P2 gegatet. P5 stellt die mDC2-Population dar.

### 2.3.3 Bestimmung der Calcidiol- und Calcitriolspiegel im Elektrochemilumineszenz-Immunoassay bzw. Radioimmunoassay

Die Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel (Calcidiol bzw. Calcitriol) der Patienten der doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie und die Calcitriolspiegel der Neurocrine-Studie wurden von einem autorisierten Labor (Labor Limbach, Heidelberg) mittels eines automatisierten Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA; Modular Analytics E170, Ro-

che Diagnostics, Deutschland) bzw. mittels eines Radioimmunoassays (DIAsource ImmunoAssays S.A., Nivelles, Belgien) bestimmt.

Die Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel der offenen placebo-kontrollierten Studie wurden von einem autorisierten Labor (Prof. Seelig, Karlsruhe) und Prof. Badenhoop, Frankfurt am Main, bestimmt.

#### **2.3.4 Bestimmung der Zytokinspiegel im BioPlex-Assay (Luminex®)**

Die Messung erfolgte mit den Serumproben der Probanden mittels eines Kits der Firma Millipore (High Sensitivity Human Cytokine Kit). Es wurden folgende Zytokine im Monat 0 und Monat 9 gemessen: IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 und TNF- $\alpha$ . Zu Beginn wurden die Komponenten und Reagenzien, die für den Test erforderlich sind, hergestellt. Zur Vorbereitung der Antikörper-immobilisierten Beads wurde jedes Tube mit den zu testenden Antikörper-Beads für 30 Sekunden in ein Ultraschallbad gehalten, um die Beads voneinander zu trennen. Anschließend wurden die Tubes für 1 min. gevortext. In eine bereitgestellte „Mixing Bottle“ wurden jeweils 150  $\mu$ l jedes Antikörper-Beads gegeben. Es wurde auf 3 ml mit Assay-Puffer aufgefüllt. Die Beads wurden auf dem Vortexer gut geschüttelt. Zur Herstellung der Qualitätskontrollen wurden die Qualitätskontrollen 1 und 2, die im Kit enthalten sind, jeweils mit 250  $\mu$ l deionisiertem Wasser versetzt. Die Tubes wurden mehrmals geschüttelt und anschließend für 5 bis 10 min. stehen gelassen. Danach wurden die Kontrollen in beschriftete Eppendorf-Tubes überführt. Der 10x Waschpuffer wurde auf Raumtemperatur gebracht und geschüttelt, um alle im Puffer befindlichen Salze in Lösung zu bringen. 30 ml des 10x Waschpuffers wurden dann mit 270 ml deionisiertem Wasser versetzt. Zur Herstellung der Serum Matrix wurden 5 ml deionisiertes Wasser zu der im Kit bereitgestellten lyophilisierten Serum Matrix gegeben und durch Schütteln in Lösung gebracht. Der bereitgestellte Zytokin-Standard wurde mit 250  $\mu$ l deionisiertem Wasser versetzt und so auf eine Konzentration von 2000 pg/ml für alle Analyten gebracht. Der Standard wurde erst per Hand und dann für 10 Sekunden auf dem Vortexer geschüttelt. Nach 5 bis 10 min. wurde der Standard in ein beschriftetes Eppendorf-Tube überführt. Dieser wurde als 2000 pg/ml-Standard verwendet im Verhältnis 1:5 verdünnt. Vor Beginn des Assays mussten alle Reagenzien auf Raumtemperatur (RT) gebracht werden. Die Filterplatte musste während des gesamten Assays auf einem Plattenhalter liegen, so dass die Unterseite der Platte keine Oberfläche berührt. Zunächst wurden je 200  $\mu$ l des Waschpuffers in jedes Well der Mikrotiterplatte mit einer Multipipette gegeben. Die Platte wurde verschlossen und einem Plattenschütt-

ler für 10 min. bei RT geschüttelt. Der Waschpuffer wurde durch eine Vakuumpumpe entfernt und überschüssiger Puffer an der Plattenunterseite mit einem Tuch entfernt. Vor Zugabe der Beads wurden diese für 30 Sekunden im Ultraschallbad behandelt und für 1 min. auf dem Vortexer geschüttelt. 25 µl der gemischten Beads wurden in jedes Well gegeben. Um ein Absetzen der Beads zu verhindern, wurde darauf geachtet, dass das Tube ständig geschüttelt wurde. Die Flüssigkeit wurde wieder durch die Vakuumpumpe abgesaugt und mit einem Tuch entfernt. 50 µl des entsprechenden Standards bzw. der Qualitätskontrolle wurden in die entsprechenden Wells gegeben. 50 µl des Assaypuffers wurden in die entsprechenden Wells der Proben pipettiert. 50 µl der Matrix Solution wurden zu den Wells des Standards und der Qualitätskontrollen gegeben. Jeweils 50 µl Serum der zu messenden Proben wurden als Duplikate nach Zentrifugation (3000 rpm, 1 min.) in die entsprechenden Wells gegeben. Die Platte wurde dann verschlossen und über Nacht bei 4°C, 500-800rpm geschüttelt. Mit der Vakuumpumpe wurde die Flüssigkeit vorsichtig abgesaugt und die Platte anschließend zweimal mit je 200 µl Waschpuffer/Well gewaschen. Auch hier wurde die Flüssigkeit jedes Mal mit der Vakuumpumpe abgesaugt und überschüssige Flüssigkeit mit Papiertüchern entfernt. 50 µl der Detektionsantikörper wurden in jedes Well pipettiert, die Platte verschlossen und für 1 h bei RT auf dem Plattenschüttler (500-800 rpm) inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Streptavidin-Phycoerythrin in jedes Well gegeben, die Platte wieder verschlossen und für eine 1/2 h bei RT auf dem Plattenschüttler (500-800rpm) inkubiert. Die gesamte Flüssigkeit wurde mit der Vakuumpumpe vorsichtig entfernt und die Waschschrte, wie zuvor beschrieben, zweimal wiederholt. 100 µl des „Sheath Fluids“ wurden in alle Wells pipettiert. Die Platte wurde vor der Analyse 5 min. geschüttelt (500-800 rpm). Die Proben wurden mit dem BioPlex Suspension Array System (Bio-Rad) gemessen und die Auswertung erfolgte mit der BioPlex Manager 5.0 Software. Bei Unterschreiten der Assaysensitivität (minimale detektierbare Konzentration) wurden extrapolierte Werte, die von der BioPlex Manager 5.0 Software errechnet wurden, in der Auswertung berücksichtigt.

Für Messwerte, die unter dem messbaren Bereich des Assays lagen, wurde der jeweils kleinste gemessene Wert des jeweiligen Zytokins angenommen und in der Auswertung berücksichtigt.

### **2.3.5 Bestimmung von Tetanus-Antikörper-Isotypen (IgG1, IgG2 und IgG4) im Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Zu Beginn des Experimentes wurde zunächst die richtige Konzentration des Coating-Antigens Tetanus Toxoid (TT) bestimmt. Hierbei dienten Positiv- und Negativproben als Referenz. Es wurden folgende Verdünnungen des TT (Tetanol pur, Novartis) eingesetzt: 1:140, 1:700, 1:1400, 1:7000 und 1:35000.

Per Reagenzgefäß wurden 125 µl TT in den entsprechenden Konzentrationen 0.0022 IE/ml, 0.011 IE/ml, 0.057 IE/ml, 0.11 IE/ml und 0.57 IE/ml in PBS (147 mM NaCl, 1.5 mM KCl, 2.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4) auf eine ELISA-Platte (Plate Maxisorb F96, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) in Duplikaten (jeweils +/- TT) aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Standard der Tetanus-Isotypen Antikörper diente ein WHO-Standardserum (NIBSC: code SSI-TE-3; Sesardic, 1993), das in folgenden Verdünnungen gemessen wurde: 1:1600, 1:6400, 1:25600 und 1:102400.

Es wurden 125 µl TT per Reagenzgefäß (Tetanol pur, Novartis) in der ermittelten Konzentration von 0.057 IE/ml (= Verhältnis 1:1400) in PBS (147 mM NaCl, 1.5 mM KCl, 2.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4) auf eine ELISA-Platte (Plate Maxisorb F96, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei jedem Inkubationsschritt wurde die Platte mit einer Plastikfolie abgedeckt und in Aluminiumfolie eingepackt. Die Platte wurde gewaschen (3x, PBS + 0,05% Tween), nach jedem Waschschrift auf dem Schüttler einige Sekunden geschüttelt, mit Zellstoff trocken geklopft und anschließend mit PBST + 0.1% Gelatine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) für 1 h bei Raumtemperatur blockiert (200 µl/Reagenzgefäß). Nach erneutem Waschen (3x mit PBST) wurde 100 µl der Testseren in einer Verdünnung von 1:800 (für IgG1) und 1:400 (für IgG2 und IgG4) in PBST bzw. 100µl der WHO-Standardseren in den entsprechenden Verdünnungen (in PBST) in die Reagenzgefäße gegeben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen der Platte (3x mit PBST) wurden 100 µl/Reagenzgefäß der monoklonalen Anti-Isotypen-Antikörper IgG1, IgG2 und IgG4 (Mat.No. 555869, 555874 und 555879, BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) in einer Verdünnung (in PBST) von 1:1000 dazugegeben und für 2 h inkubiert. Danach wurden die Platten wieder 3x mit PBST gewaschen. Es wurde 100 µl/Reagenzgefäß Streptavidin-HRP-Konjugat (Mat.No. 554066, BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:1000 hinzugefügt, 1 h inkubiert, und 5x mit PBST gewaschen. 100 µl Substrat (TMB Peroxidase EIA Substrate Kit, Bio-Rad)

wurde addiert. Nach 8 min. wurde die Reaktion durch Zugabe von 100µl/ Reagenzgefäß mit 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und innerhalb von 30 min. mit einem ELISA-Reader (Safire<sup>2</sup>, Tecan) bei E450 gelesen. Die Auswertung erfolgte mit der Software Magellan 5.0. Die optische Dichte (OD) der Probe in nicht mit Antigen beschichteten Reagenzgefäßen wurde von der OD der Probe in mit Antigen beschichteten Reagenzgefäßen subtrahiert. Die Ergebnisse der Antikörperspiegel der Subklasse IgG1 wurden mit 2 multipliziert, da das Serum anfangs für diese Bestimmung im Vergleich zu den anderen Subklassen zweifach höher verdünnt worden war. Bei jedem Test wurde eine Standardkurve, sowie jeweils eine Positiv- und Negativkontrolle mitgemessen. Der Standardkurve wurde für die Verdünnung 1:1600 400 Units, für die Verdünnung 1:6400 100 Units, für die Verdünnung 1:25600 25 Units und für die Verdünnung 1:102400 6.25 Units zugewiesen. Die berechneten Units der jeweiligen Standardkurve wurden dann mit den OD-Messwerten der Serumproben ins Verhältnis gesetzt, um so Units für die OD-Messwerte zu berechnen. Aus den Positivkontrollen wurde ein Variationskoeffizient berechnet. Die TT-Spiegel aller 18 Patienten der Placebogruppe wurden vor der Impfung gemessen. Da ein Patient nicht geimpft wurde, wurden die Daten von nur 17 Patienten nach Impfung ausgewertet. In der Calcitriolgruppe standen vor der Impfung Daten von 21 Patienten zur Verfügung und nach der Impfung Daten von 19 Patienten. Die TT-Spiegel wurden mittels ELISA gemessen, ausgedrückt in optischer Dichte [OD]. Die verschiedenen Schritte sind in Abb. 11 veranschaulicht. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden diese Werte wie folgt in Milliunits [mU] umgerechnet: Ausgehend von der Stocklösung, die in 1ml PBST-Puffer 120 IE TT beinhaltetete, wurde für die Standardkurve die erste Verdünnung 1:1600 hergestellt. Hier wurden 1 µl der Stocklösung in 1599 µl PBST-Puffer gelöst. Folglich befanden sich 120 mU TT in 1600 µl Puffer bzw. 0.075 mU TT in 1 µl Puffer. Da pro Reaktionsgefäß 100 µl zum Einsatz kamen, entsprach das 7.5 mU TT pro Reagenzgefäß.

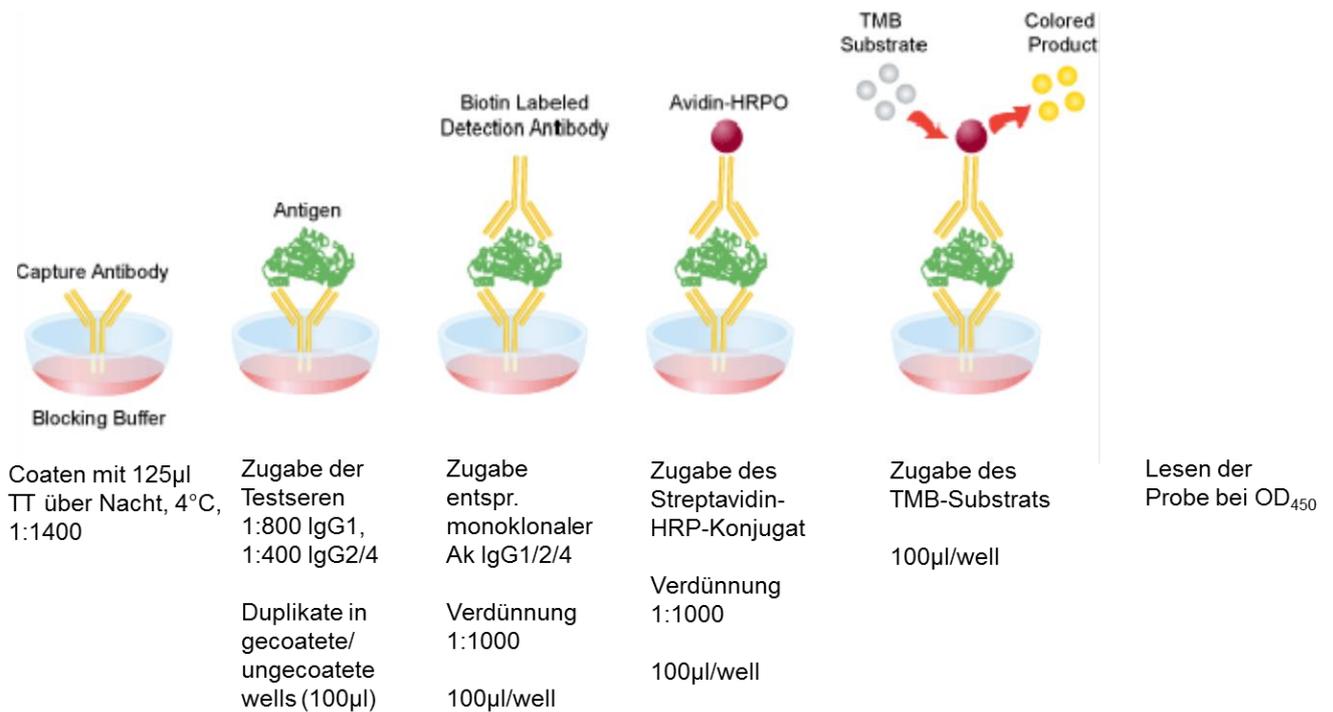


Abb. 11: Darstellung des Subklassen-ELISA.

Unter der Annahme der IgG-Subklassenverteilung von 80% für IgG1 wurden dann für den IgG1-Standard 1:1600 6 mU festgelegt. Für den Standard 1:6400 1.5 mU, für den Standard 1:25600 0.38 mU und für den Standard 1:1024000 0.09 mU. Die zugewiesenen mU für die Subklassen IgG2 und IgG4 wurden wie folgt berechnet: aus den insgesamt acht gemessenen Standardkurven wurde ein Mittelwert gebildet. Die Mittelwerte der Subklassen IgG2 und IgG4 wurden jeweils mit dem Mittelwert der Subklasse IgG1, der 100% entsprach, in Beziehung gesetzt. So erhielt man den Anteil an den Subklassen IgG2 und IgG4 in %. Dieser wurde mit dem zugewiesenen mU der IgG1-Subklasse multipliziert. So ergab sich für die Subklasse IgG2, die 32.49% der IgG1-Subklasse entsprach ein Wert von 1.95 mU für die Verdünnung 1:1600. Für die Subklasse IgG4, deren Anteil 74.73% war, erhielt man 4.48% für die Verdünnung 1:1600. Tab. 6 zeigt eine Übersicht der zugewiesenen mU für die IgG-Subklassen IgG1, IgG2 und IgG4.

Verdünnung Standard	Zugewiesene mU der Subklassen		
	IgG1	IgG2	IgG4
1:1600	6.00	1.95	4.48
1:6400	1.50	0.49	1.12
1:25600	0.38	0.12	0.28
1:1024000	0.09	0.03	0.07

Tab. 6: Übersicht der zugewiesenen mU der IgG-Subklassen.

Die Berechnung in mU erfolgte, indem die dem Standard zugewiesenen mU mit den Messwerten [OD] in Beziehung gesetzt wurden. Mittels Potenzfunktion erfolgte dann die Berechnung in mU.

### 2.3.6 Bestimmung der C-Peptid-Ausschüttung nüchtern und nach Stimulation mit einer Mischmahlzeit

Bei den Probanden der Calcitriol-Studie wurden nach 1, 9 und 18 Monaten nach Studieneinschluss im Krankenhaus München-Schwabing die C-Peptidwerte gemessen. Im Rahmen eines Mixed-Meal-Toleranztests (MMTT) wurde den Patienten nach 30, 60, 90 und 120 min. venöses Blut abgenommen. Für die Messung der C-Peptidspiegel wurde ein käuflich erworbener RBA (C-Peptide Double Antibody, 259 kBq, DPC-Biermann), der mit  $^{125}\text{I}$ -markiertem C-Peptid arbeitet, nach den Herstellerangaben angewandt (Walter, Kaupper et al. 2010). Die gemessenen C-Peptidspiegel waren für die Datenanalyse in dieser Arbeit verfügbar.

### 2.3.7 Bestimmung von Vitamin D<sub>3</sub>-assoziierten Einzelnukleotidpolymorphismen

Verschiedene Gene, die an unterschiedlichen Stellen des Vitamin-D-Metabolismus eine Rolle spielen wurden auf Einzelnukleotidpolymorphismen (engl. Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) analysiert. Insgesamt wurden 16 relevante SNPs im Labor von Prof. Badenhop der Goethe-Universität Frankfurt, wie bereits beschrieben (Walter et al. 2010), und am Helmholtz Zentrum München bestimmt. Für die Messung wurde die DNA der Patienten der doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie (Monat 0) zur Verfügung gestellt. Um mögliche Ergebnisse zu bestätigen, wurden die SNPs der

Probanden der offenen Calcitriol-Studie und der Neurocrine-Studie analysiert. Folgende SNPs wurden genotypisiert:

- VDR-Genpolymorphismen Apal (VDR rs7975232), FokI (VDR rs2228570) und BsmI (VDR rs1544410)
- 1 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP27B1 rs10877012)
- Vitamin-D-25-Hydroxylase (CYP2R1 rs12794714, CYP2R1 rs1993116, CYP2R1 rs6486205)
- Sterol-26-Hydroxylase (CYP27A1 rs17470271)
- 24-Hydroxylase (CYP24A1 rs6013897, CYP24A1 rs2296241)
- 7-Dehydrocholesterol-Reduktase (DHCR7 rs4945008, DHCR7 rs7944926)
- Vitamin-D-bindendes Protein (GC rs12512631, GC rs222040, GC rs2282679 und GC rs3755967)

## 2.4 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das Softwareprogramm Prism 4 (GraphPad Software, Inc.) verwendet. Unterschiede wurden bei einem p-Wert <0,05 als signifikant eingestuft.

Sämtliche Vergleiche zweier Verteilungen der Calcitriol-Studie wurden mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U Tests durchgeführt.

Für den Vergleich der C-Peptidwerte und der Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel zwischen den Behandlungsgruppen wurde ebenfalls der nicht-parametrische Mann-Whitney-U Test angewandt.

Die Korrelationen der C-Peptidwerte, der TT-Subklassen und Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel erfolgte mit Hilfe des Spearman's Test.

Der exakte Test nach Fischer wurde für die Berechnung der Verteilung der Genpolymorphismen zwischen den Behandlungsgruppen der Calcitriol-Studie durchgeführt.

Auch die Unterschiede der Genpolymorphismen zwischen den Behandlungsgruppen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U Test berechnet.

Die Unterschiede der Zytokinspiegel und die der IgG-Subklassen zwischen den Behandlungsgruppen erfolgte ebenfalls mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U Test. Bei Auswertung der Zytokinspiegel und der TT-Antikörpersubklassen wurde die Korrektur für multiples Testen (Bonferroni-Methode) angewandt.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Immunmodulierende Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub>

##### 3.1.1 Anzahl der dendritischen Zellpopulationen in den Behandlungsgruppen der Calcitriol-Studie

Aus den in 2.1.1 beschriebenen verfügbaren PBMCs der Patienten der doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie wurden die dendritischen Zellsubpopulationen im Monat 0, 9, 12 und 18 quantitativ bestimmt. Die Ausgangswerte im Monat 0 lagen bei beiden Behandlungsgruppen um 1.0 % (Median, IQR 0.70-1.50 bzw. 0.65-1.21), bezogen auf die Gesamtpopulation der PBMCs. Es konnte eine Abnahme der Anzahl der dendritischen Zellpopulation innerhalb der Calcitriol-behandelten Gruppe von Monat 0 auf Monat 9 beobachtet werden ( $p=0.03$ , Abb. 12), innerhalb der Placebogruppe konnte dies nicht beobachtet werden.

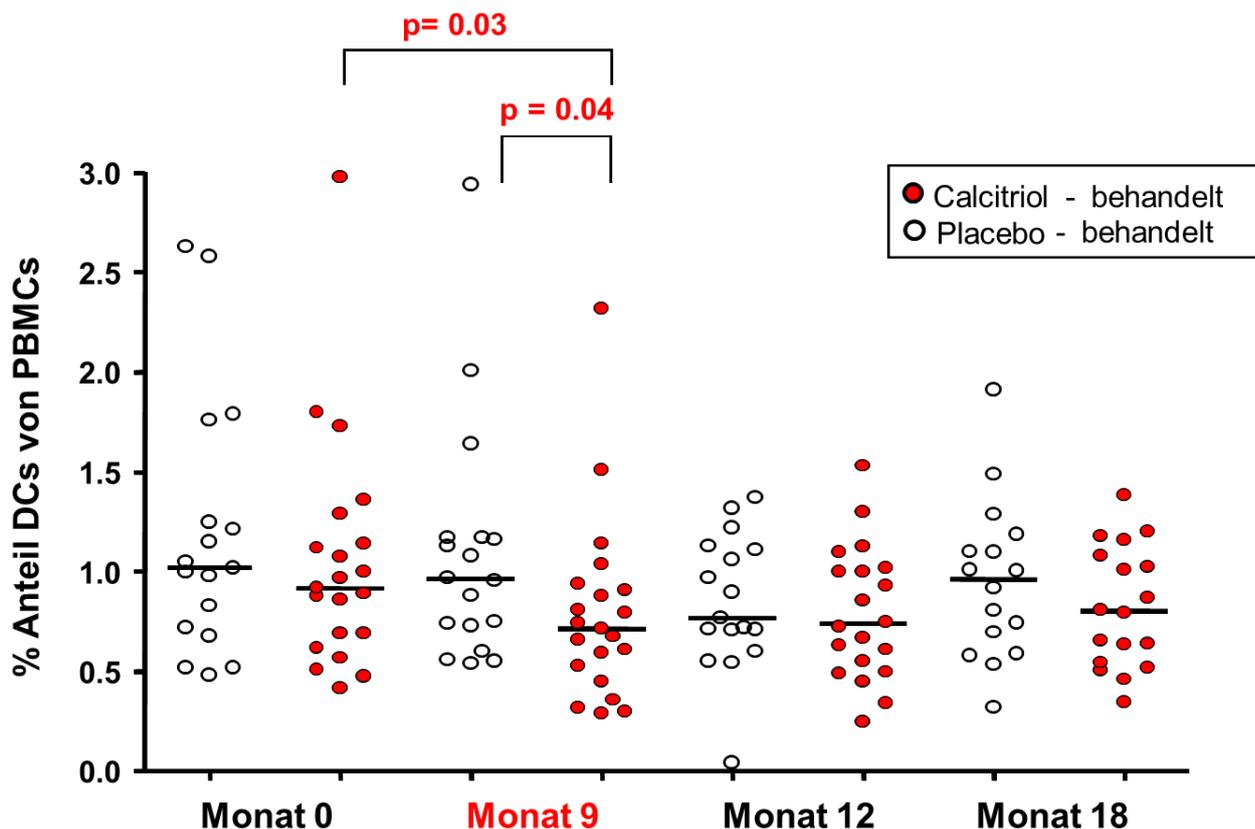


Abb. 12: Anteil der DCs von PBMCs im Monat 0 (Median), zum Ende der Intervention (Monat 9, Median) und im Verlauf des Follow-up (Monat 12 und 18, Median).

Im Monat 9 war der Anteil an der Gesamtzellzahl der dendritischen Zellpopulation innerhalb der Behandlungsgruppe mit 0.71 % (IQR 0.49-0.93) signifikant geringer als der DC-Anteil der Placebo-behandelten Patienten (0.96 % (0.67-1.17)); ( $p=0.04$ ). Im weite-

ren Verlauf der Studie, nach Beenden der Gabe der Studienmedikation, im Monat 12 und 18 konnte in beiden Gruppen bezüglich des Anteils an DCs kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

Hinsichtlich der dendritischen Zellsubpopulationen konnte bei den pDCs ein signifikant geringerer Anteil dieser Zellen innerhalb der Verumgruppe im Vergleich zur Placebogruppe im Monat 9, bezogen auf die Gesamtpopulation der PBMCs, festgestellt werden ( $p = 0.03$ ). 6 Patienten in der Interventionsgruppe zeigten hier eine besonders deutliche Abnahme der pDCs auf  $< 50\%$  der Ausgangswerte (potentielle „pDC-Responder“). Nach Abschluss der Behandlung konnte im Monat 12 und 18 bei der pDC-Subpopulation kein signifikanter Unterschied in der Zellzahl zwischen den Behandlungsgruppen mehr nachgewiesen werden. Die anderen Subpopulationen, die myeloiden dendritischen Zellen (mDC1 und mDC2), zeigten im gesamten Studienverlauf keine signifikanten immunologischen Veränderungen (Tab. 7).

Tab.7: prozentualer Anteil der DC-Subpopulationen an PBMCs im Monat 0, zum Ende der Intervention (Monat 9) und im Verlauf des Follow-up (Monat 12 und 18).

	mDC-1			mDC-2			pDC		
	Verum Median (IQR)	Placebo Median (IQR)	p	Verum Median (IQR)	Placebo Median (IQR)	p	Verum Median (IQR)	Placebo Median (IQR)	p
Monat 0	0.33 (0.23- 0.58)	0.35 (0.25- 0.65)	0.7	0.03 (0.02- 0.05)	0.02 (0.02- 0.03)	0.2	0.52 (0.26- 0.88)	0.59 (0.33- 0.90)	0.5
Monat 9	0.34 (0.20- 0.44)	0.36 (0.23- 0.49)	0.5	0.02 (0.01- 0.04)	0.02 (0.01- 0.04)	0.8	0.34 (0.22- 0.48)	0.49 (0.34- 0.82)	<b>0.03</b>
Monat 12	0.28 (0.18- 0.47)	0.32 (0.20- 0.42)	0.9	0.02 (0.01- 0.04)	0.02 (0.01- 0.03)	0.3	0.42 (0.26- 0.56)	0.44 (0.33- 0.70)	0.5
Monat 18	0.37 (0.24- 0.49)	0.38 (0.31- 0.66)	0.3	0.03 (0.01- 0.04)	0.02 (0.02- 0.04)	0.8	0.40 (0.26- 0.62)	0.36 (0.31- 0.63)	1.0

Bei drei Placebo-behandelten Patienten konnte ebenfalls eine Verminderung der pDCs von Monat 0 zu Monat 9 auf  $< 50\%$  der Ausgangswerte festgestellt werden, allerdings war dieser Effekt bei den 6 Patienten der Verumgruppe stärker ausgeprägt (Tab. 8).

Bei der restlichen Kohorte variierte der prozentuale Anteil der plasmazytoiden dendritischen Zellen von Patient zu Patient im Verlauf von Monat 0 bis Monat 9, d.h. er konnte fallen, steigen oder relativ gleich bleiben (Abb. 13).

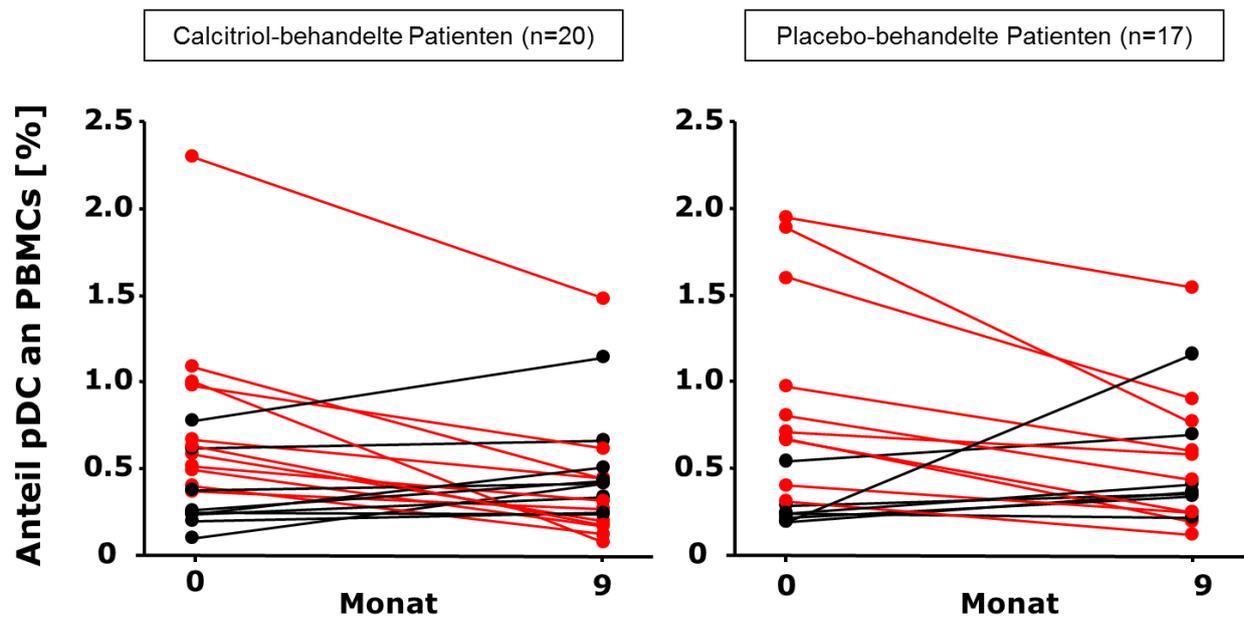


Abb. 13: individueller Verlauf der pDC-Subpopulationen an PBMCs von Monat 0 bis zum Ende der Intervention (Monat 9) bei Calcitriol-behandelten Patienten und Placebo-behandelten Patienten; schwarze Linie zeigt Anstieg, rote Linie zeigt Abfall im Verlauf zu Monat 9.

Tab. 8: Verteilung der pDC-Subpopulation von PBMCs in Monat 0 und Monat 9; absteigend nach prozentualem Anteil der pDCs dargestellt (Patient 4: drop-out in Monat 18, Patient 40: drop-out in Monat 9, Patient 34/ 39: keine Probe in Monat 0 verfügbar).

Verum (n=21)				Placebo (n=18)			
Patient #	Anteil pDC [%] von PBMCs		Anteil pDCs [%] im Monat 9 in Relation zu Monat 0	Patient #	Anteil pDC [%] von PBMCs		Anteil pDCs [%] im Monat 9 in Relation zu Monat 0
	Monat 0	Monat 9			Monat 0	Monat 9	
1	0,1	0,42	420	36	0,29	1,13	389,7
25	0,24	0,51	212,5	15	0,29	0,44	151,7
28	0,26	0,43	165,4	30	0,33	0,48	145,5
32	0,78	1,14	146,2	8	0,31	0,42	135,5
22	0,24	0,34	141,7	10	0,59	0,73	123,7
24	0,2	0,25	125	3	0,37	0,43	116,2
21	0,38	0,42	110,5	12	0,33	0,31	93,9
16	0,62	0,66	106,4	31	0,74	0,63	85,1
26	0,25	0,24	96	2	1,94	1,51	77,8
19	0,37	0,27	73	27	0,47	0,34	72,3
4	0,67	0,45	67,2	33	0,97	0,65	67
38	2,3	1,48	64,3	7	1,55	0,96	61,9
29	0,98	0,62	63,3	35	0,82	0,5	61
23	0,52	0,32	61,5	20	0,39	0,22	56,4
6	1,09	0,44	40,4	18	0,7	0,34	48,6
13	0,49	0,17	34,7	11	1,88	0,82	43,6
9	0,59	0,2	33,9	5	0,71	0,29	40,8
14	0,4	0,12	30	39	-	0,82	-
37	0,63	0,18	28,6				
17	1	0,08	8				
34	-	0,29	-				
40	1,01	-	-				

### 3.1.2 Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel in den Behandlungsgruppen der Calcitriol-Studie

Aufgrund der gezeigten Veränderungen der DC-Subpopulationen im Verlauf der doppelblinden placebo-kontrollierten Studie wurden diese Subpopulationen näher untersucht. Es sollte herausgefunden werden, ob Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel die dendritischen Zellen beeinflussen. Hierzu wurden Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel der Patienten, wie in Tab. 9 abgebildet, bestimmt. Die gemessenen Spiegel wurden mit der anteiligen Veränderung der pDCs von Monat 0 zu Monat 9 in Beziehung gesetzt. Die Calcitriolspiegel der Verumgruppe stiegen von Monat 0 auf Monat 9 leicht, aber nicht signifikant, an. Die Calcitriolspiegel der Placebogruppe blieben dagegen ungefähr auf dem Ausgangsniveau (44.5 ng/L vs. 45 ng/L). Alle Calcitriolspiegel lagen im Referenzbereich, der vom Labor Limbach mit 35-90 ng/L angegeben wurde. Die Calcidiolspiegel der Verumgruppe stiegen ebenfalls leicht an, in der Placebogruppe blieben sie dagegen auf Ausgangsniveau (18.6 µg/L vs. 19.1 µg/L). Wie Tab. 9 zeigt, lagen die Werte (Median) unter dem Referenzbereich von 20 ng/ml ( $\cong$  20 µg/L), was einen Calcidiolmangel definiert (Jones 2007; Holick 2009).

Tab. 9: Calcidiol- bzw. Calcitriolspiegel der doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie.

Calcidiol [µg/L]				Calcitriol [ng/L]			
	Verum Median (IQR)	Placebo Median (IQR)	p		Verum Median (IQR)	Placebo Median (IQR)	p
Monat 0	20.8 (15.0- 30.5) n=22	18.6 (16.1- 25.8) n=18	0.3	Monat 0	47.0 (38.0- 59.0) n=22	44.5 (38.0- 49.0) n=18	0.1
Monat 9	23.4 (16.1- 28.0) n=21	19.1 (14.5- 25.1) n=18	0.3	Monat 9	50.0 (40.5- 55.0) n=21	45.0 (38.5- 49.5) n=18	0.1

### 3.1.3 Einfluss von Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegeln auf dendritische Zellpopulationen

Es konnte gezeigt werden, dass die Calcidiol-Spiegel der Patienten im Monat 9 mit der prozentualen Veränderung der pDCs von Monat 0 zu Monat 9 korrelierten, d.h. je mehr die pDCs der Probanden im Verlauf zu Monat 9 abnahmen, desto höher war deren Calcidiolspiegel ( $p=0.04$ ; Abb. 14). Die Calcitriolspiegel im Monat 9 zeigten keine signifikante Korrelation. Die initialen Calcidiol- bzw. Calcitriolspiegel korrelierten ebenfalls nicht mit der prozentualen Veränderung der pDCs von Monat 0 zu Monat 9 (Abb. 14).

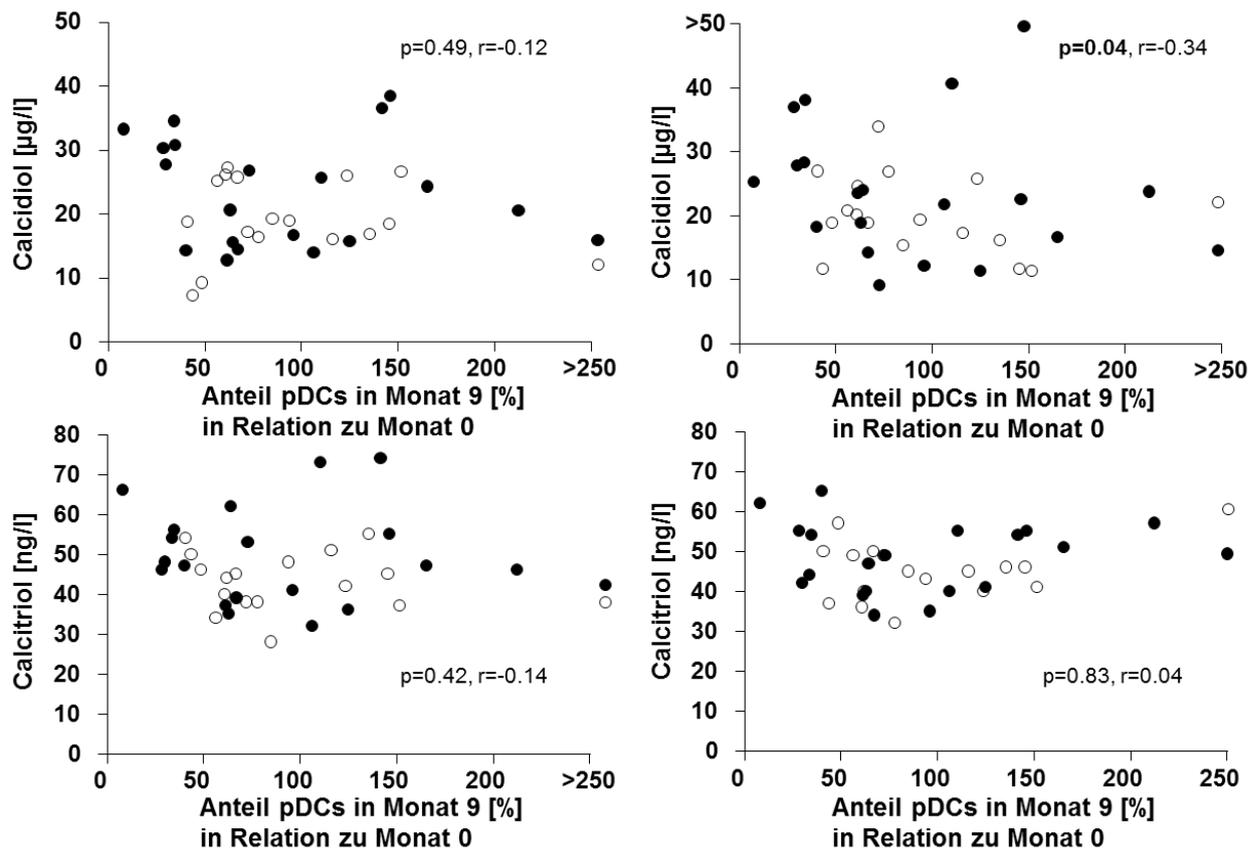


Abb. 14: Calcidiol- bzw. Calcitriolspiegel vs. Veränderung des Anteils der pDCs von Monat 0 zu Monat 9. oben: Calcidiolspiegel Monat 0 (links), Calcidiolspiegel Monat 9 (rechts); unten: Calcitriolspiegel Monat 0 (links), Calcitriolspiegel Monat 9 (rechts). Schwarze Punkte: Calcitriol-behandelt, weiße Punkte: Placebo-behandelt.

Um die Fallzahl zu erhöhen, wurden aus den verfügbaren PBMCs der Patienten der Neurocrine-Studie ebenfalls die dendritischen Zellsubpopulationen in Monat 0, 3 und 12 bestimmt. Für die Auswertung wurden diese mit den Proben aus Monat 0 und 9 der Patienten der Calcitriol-Studie zusammengefasst. So ergab sich eine Fallzahl von  $n=115$ . Es konnte eine Abhängigkeit der pDC-Subpopulation mit den Calcitriolspiegeln gezeigt werden. Der prozentuale Anteil der pDCs an PBMCs korrelierte negativ mit den Calcitriolspiegeln ( $p=0.007$ ;  $r=-0.25$ ). Somit konnte beobachtet werden, dass ein prozentual niedriger Anteil von pDCs an PBMCs mit hohen Calcitriolspiegeln assoziiert war (Abb. 15). Die anderen beiden Subpopulationen mDC1 und mDC2 zeigten keine Abhängigkeit zu den Calcitriolspiegeln (Abb. 15).

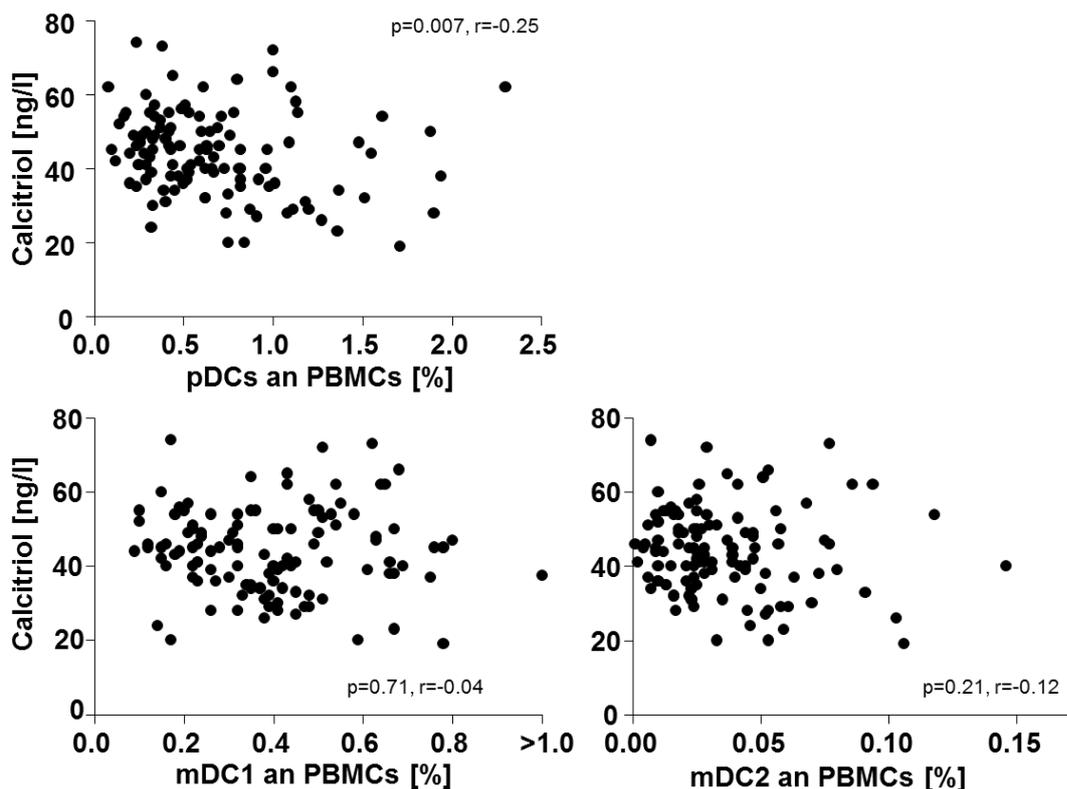


Abb. 15: Calcitriolspiegel (n=115) in Abhängigkeit der DC-Subpopulationen bezogen auf die mononukleären Zellen: Proben der placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie (Monat 0: n=38; Monat 9: n=39) und der Neurocrine-Studie (Monat 0: n=16; Monat 3: n=4; Monat 12: n=18).

In einer weiteren Auswertung wurden auch die dendritischen Zellsubpopulationen bezogen auf die Gesamtpopulation der DCs untersucht. Hier zeigte die pDC-Subpopulation eine Tendenz einer negativen Korrelation mit den Calcitriolspiegeln der Patienten ( $p=0.07, r=-0.17$ ). Die mDC1-Subpopulation zeigte, bezogen auf die Gesamtpopulation der DCs, eine positive Korrelation mit den Calcitriolspiegeln der Patienten, d.h., dass ein hoher prozentualer Anteil von mDC1 an DCs mit hohen Calcitriolspiegeln assoziiert war ( $p=0.05, r=0.18$ ). Die mDC2-Subpopulation korrelierte nicht mit den Calcitriolspiegeln (Abb. 16).

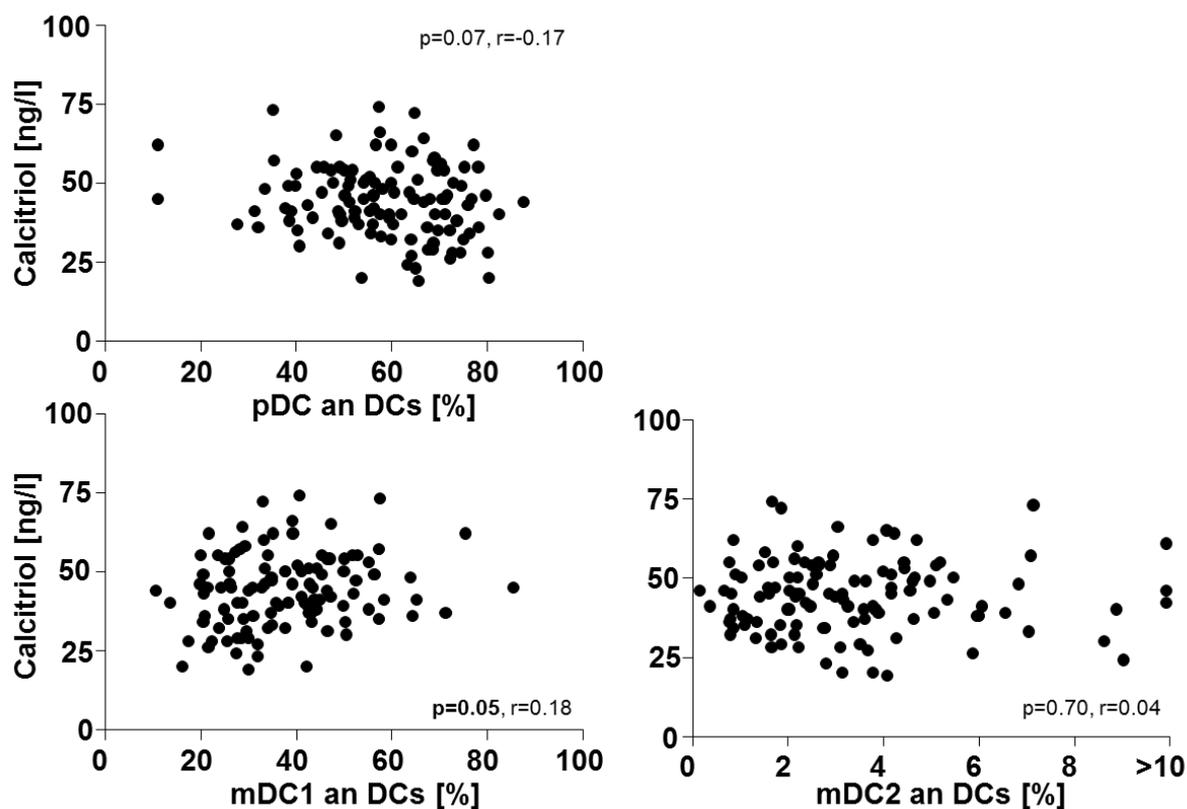


Abb. 16: Calcitriolspiegel (n=115) in Abhängigkeit der DC-Subpopulationen bezogen auf die Gesamtpopulation der DCs: Proben der placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie (Monat 0: n=38; Monat 9: n=39) und der Neurocrine-Studie (Monat 0: n=16; Monat 3: n=4; Monat 12: n=18).

### 3.1.4 Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub> auf die residuale Betazellfunktion

In einem weiteren Schritt wurde die Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub> auf den Erhalt der Betazellfunktion analysiert. Hierzu wurden zunächst die Nüchtern-C-Peptid-Werte der Patienten der doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie bestimmt (Tab. 10).

Tab. 10: Nüchtern-C-Peptid-Spiegel [nmol/L] der doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie.

	<b>Verum</b> Median [IQR]	<b>Placebo</b> Median [IQR]	<b>p</b>
Monat 0	0.30 (0.23- 0.45)	0.35 (0.26- 0.45)	0.8
Monat 9	0.20 (0.17- 0.38)	0.35 (0.26- 0.63)	0.8

Die Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel wurden mit den Nüchtern-C-Peptidwerten jeweils zu Beginn der Studie und nach Intervention (Monat 9) korreliert. Es konnten keine Abhängigkeiten der Nüchtern-C-Peptid-Spiegel mit den Calcidiol- bzw. den Calcitriolspiegeln weder zu Beginn der Studie, noch nach der Intervention im Monat 9 beobachtet werden (Abb. 17).

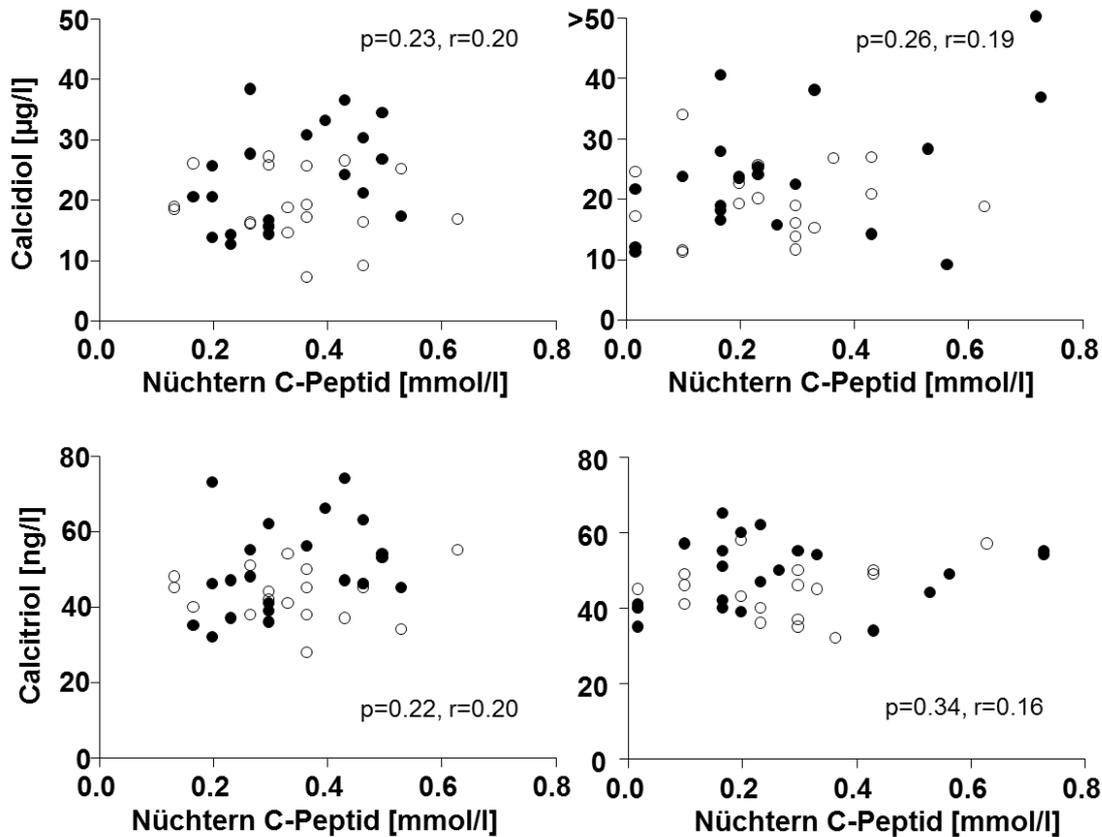


Abb.17: Nüchtern-C-Peptid-Spiegel in Abhängigkeit der Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel (Calcidiol bzw. Calcitriol) im Monat 0 (links) und Monat 9 (rechts). Schwarze Punkte: Calcitriol-behandelt, weiße Punkte: Placebo-behandelt.

Daraufhin wurden die Patienten in einer Subgruppenanalyse nach Calcitriolspiegeln (niedrig  $\hat{=}$  < 50 ng/L bzw. hoch  $\hat{=}$  > 50 ng/L) stratifiziert. Hier konnte gezeigt werden, dass die Nüchtern-C-Peptidwerte im Verlauf von Monat 0 auf Monat 9 bei Patienten mit hohen Calcitriolspiegeln und Intervention mit Calcitriol nahezu konstant blieben, während die Placebo-behandelten Patienten in dieser Gruppe hinsichtlich des Nüchtern-C-Peptids stark abfielen. Auch in der Gruppe der Patienten mit initial niedrigen Calcitriolspiegeln wurde ein Abfall des C-Peptids im Monat 9 festgestellt. Dies war unabhängig davon, ob die Patienten mit Calcitriol oder dem Placebo behandelt wurden. Zudem konnte in dieser Analyse gezeigt werden, dass die Patienten mit Calcitriolwerten > 50 ng/L tendenziell auch initial höhere Nüchtern-C-Peptidspiegel aufwiesen als die Patienten mit niedrigen Calcitriolwerten (Abb. 18).

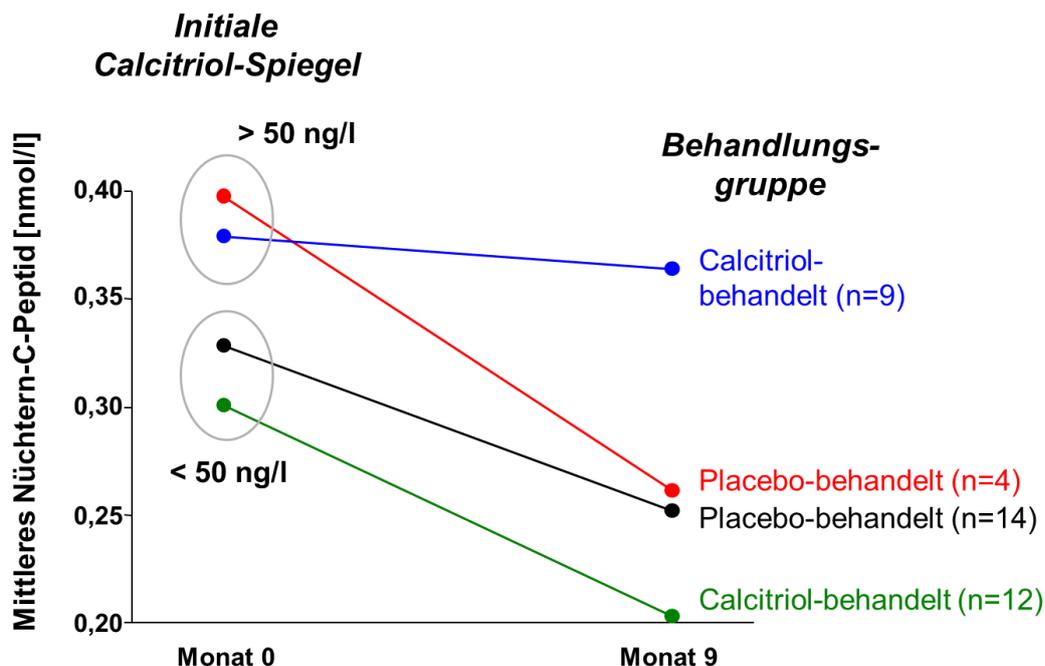


Abb. 18: Nüchtern-C-Peptid-Spiegel in Abhängigkeit von initialen Calcitriolspiegeln, die nach Konzentration (niedrig  $\triangleq$  <50ng/L bzw. hoch  $\triangleq$  >50ng/L) stratifiziert wurden.

In einem weiteren Schritt sollte untersucht werden, ob die Nüchtern-C-Peptidwerte der Patienten mit dem Anteil bestimmter Immunzellen in Abhängigkeit stehen.

Hierzu wurde der prozentuale Anteil der pDCs im Monat 9 in Relation zu Monat 0 mit dem Nüchtern-C-Peptid korreliert. Das C-Peptid in Monat 0 zeigte keine Abhängigkeit zu dem Anteil der Immunzellen (Abb. 19). Allerdings konnte beobachtet werden, dass die Nüchtern-C-Peptid-Spiegel der Patienten im Monat 9 mit der prozentualen Veränderung der pDCs von Monat 0 zu Monat 9, korrelierten ( $p=0.03$ , Abb. 19). Je größer die Verminderung des Anteils der pDCs im Verlauf von Monat 0 zu Monat 9 war, desto höher war das Nüchtern-C-Peptid der Patienten.

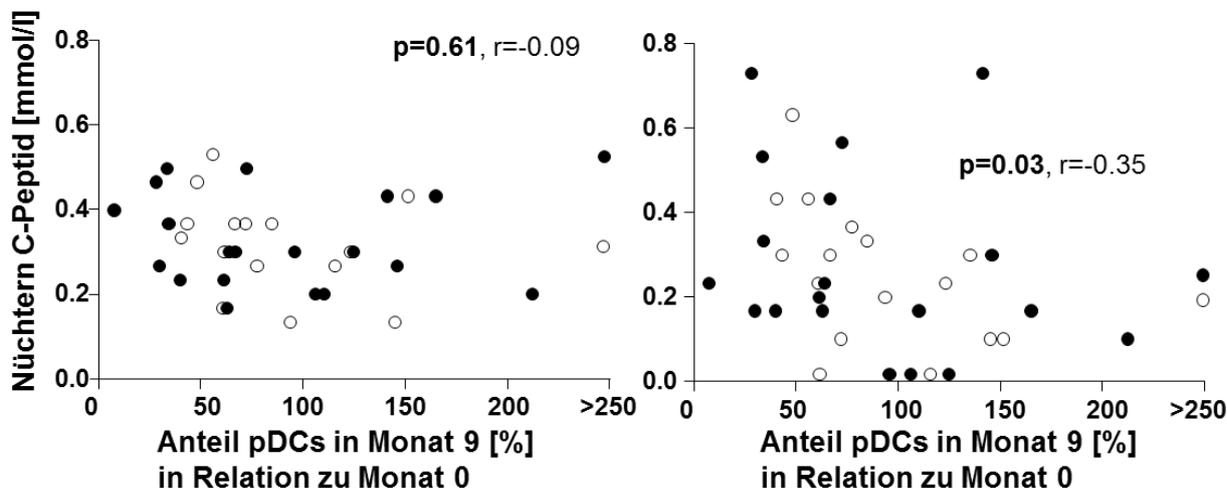


Abb. 19: Nüchtern-C-Peptid zum Monat 0 (links) bzw. zum Monat 9 (rechts) vs. Anteil [%] der pDCs von Monat 0 zu Monat 9. Schwarze Punkte: Calcitriol-behandelt, weiße Punkte: Placebo-behandelt.

### 3.1.5 Einfluss von Genen auf den Vitamin D<sub>3</sub>- Metabolismus

In einem weiteren Schritt dieser Arbeit sollte herausgefunden werden, in wieweit auch Gene, die in Zusammenhang mit dem Vitamin-D-Metabolismus stehen, die Vitamin D<sub>3</sub>- Spiegel der Patienten beeinflussen. Es wurden 16 Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) des Vitamin-D-Metabolismus, wie in 1.3.1 und 2.3.7 beschrieben, genotypisiert. Die SNPs wurden mit den initialen Calcidiol- bzw. den Calcitriolspiegeln der Patienten der Calcitriol-Studie korreliert.

#### 3.1.5.1 Einfluss von Genen auf Calcidiolspiegel

Patienten mit dem *CC*-Genotyp des Vitamin-D-Rezeptorgenpolymorphismus FokI (SNP rs2228570) wiesen niedrigere Calcidiolspiegel auf als die Genotypen *CT* ( $p=0.01$ ) und *TT*. Hinsichtlich des *CYP27B1*-Gens (SNP rs10877012) konnte gezeigt werden, dass Patienten, die den *CC*-Genotyp trugen, der mit einem höheren T1D-Risiko (Bailey, Cooper et al. 2007) assoziiert ist, niedrigere initiale Calcidiolspiegel aufwiesen als Patienten mit dem *AA/AC*-Genotyp ( $p=0.03$ ). Die anderen Genpolymorphismen zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abb. 20).

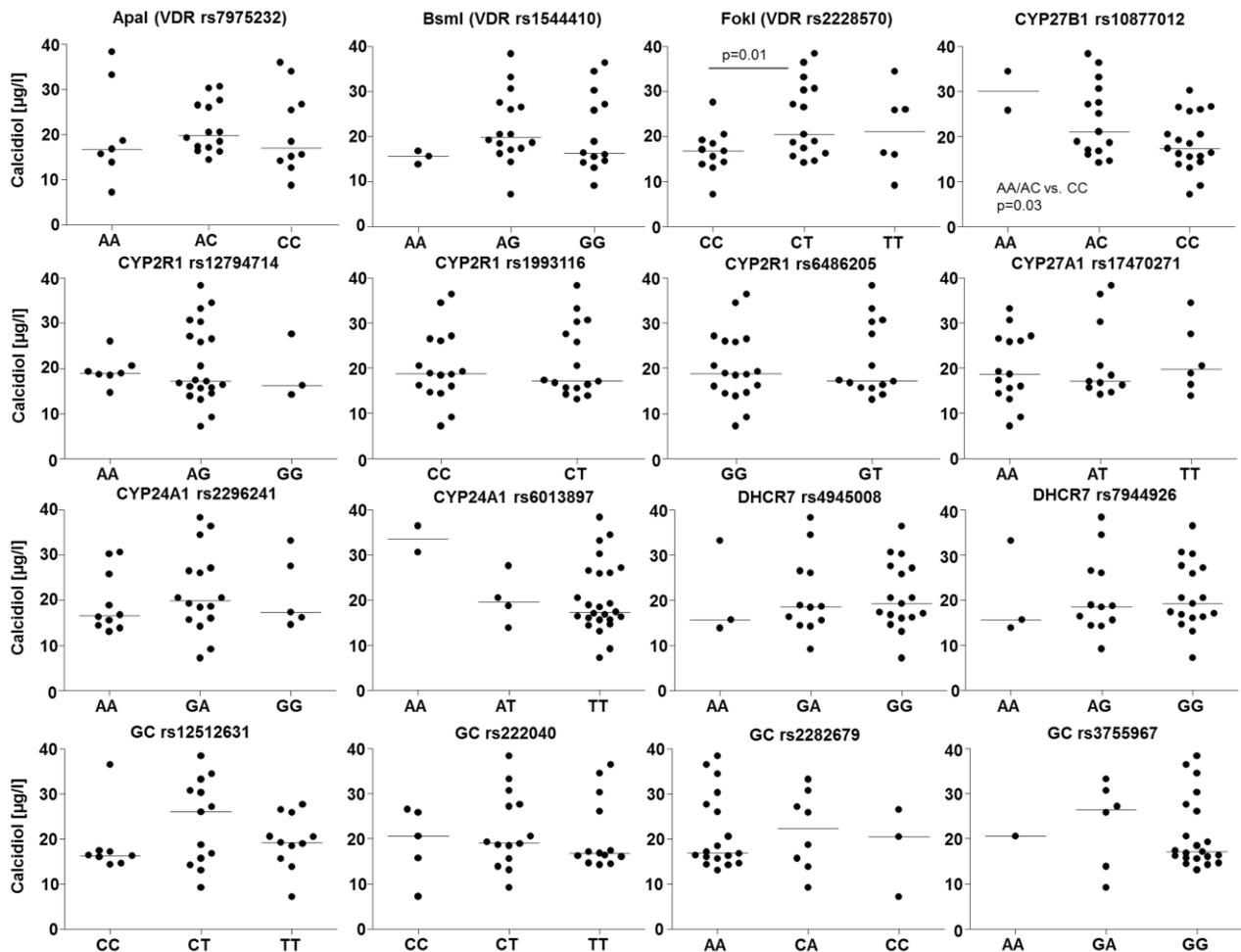


Abb. 20: initiale Calcidiolspiegel in Abhängigkeit der getesteten Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs). Die Assoziation des SNP FokI (VDR rs2228570) konnte durch eine weitere Analyse der SNPs der offenen Calcitriol-Studie und der Neurocrine-Studie, die den bereits gemessenen SNPs in der Auswertung hinzugefügt wurden, nicht bestätigt werden ( $p=0.37$ , Abb. 21).

Der SNP CYP27B1 rs10877012 wurde ebenfalls bei den Probanden der offenen Calcitriol-Studie und der Neurocrine-Studie analysiert, um das Ergebnis zu bestätigen. Patienten, die den CC-Genotyp trugen hatten ebenfalls niedrigere Calcidiolspiegel, allerdings war dies nicht mehr signifikant ( $p=0.07$ , Abb. 21).

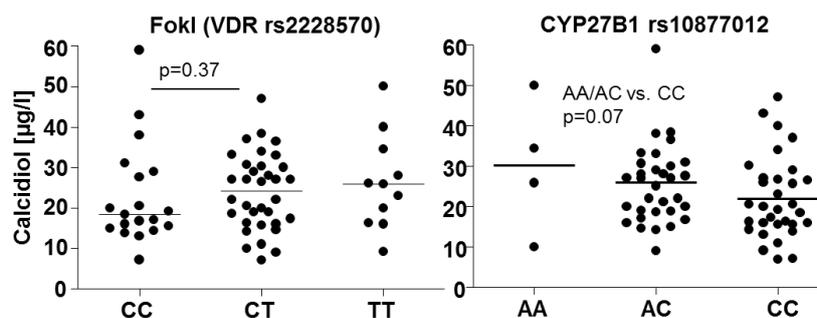


Abb. 21: weitere Analyse der SNPs FokI (VDR rs2228570;  $n=64$ ) und CYP27B1 rs10877012; ( $n=68$ ) der Probanden der Calcitriol-Studie. Zusätzlich wurden die SNPs der Probanden der offenen placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie und der Neurocrine-Studie hinzugefügt.

### 3.1.5.2 Einfluss von Genen auf Calcitriolspiegel

Hinsichtlich der Calcitriolspiegel konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der CC-Genotyp, der Patienten des CYP27B1-Gens (SNP rs10877012), der mit einem höheren T1D-Risiko (Bailey, Cooper et al. 2007) assoziiert ist, mit niedrigeren initialen Calcitriolspiegeln korrelierte als bei Patienten, die den AA/AC-Genotyp trugen ( $p=0.007$ ). Die anderen Genpolymorphismen zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abb. 22).

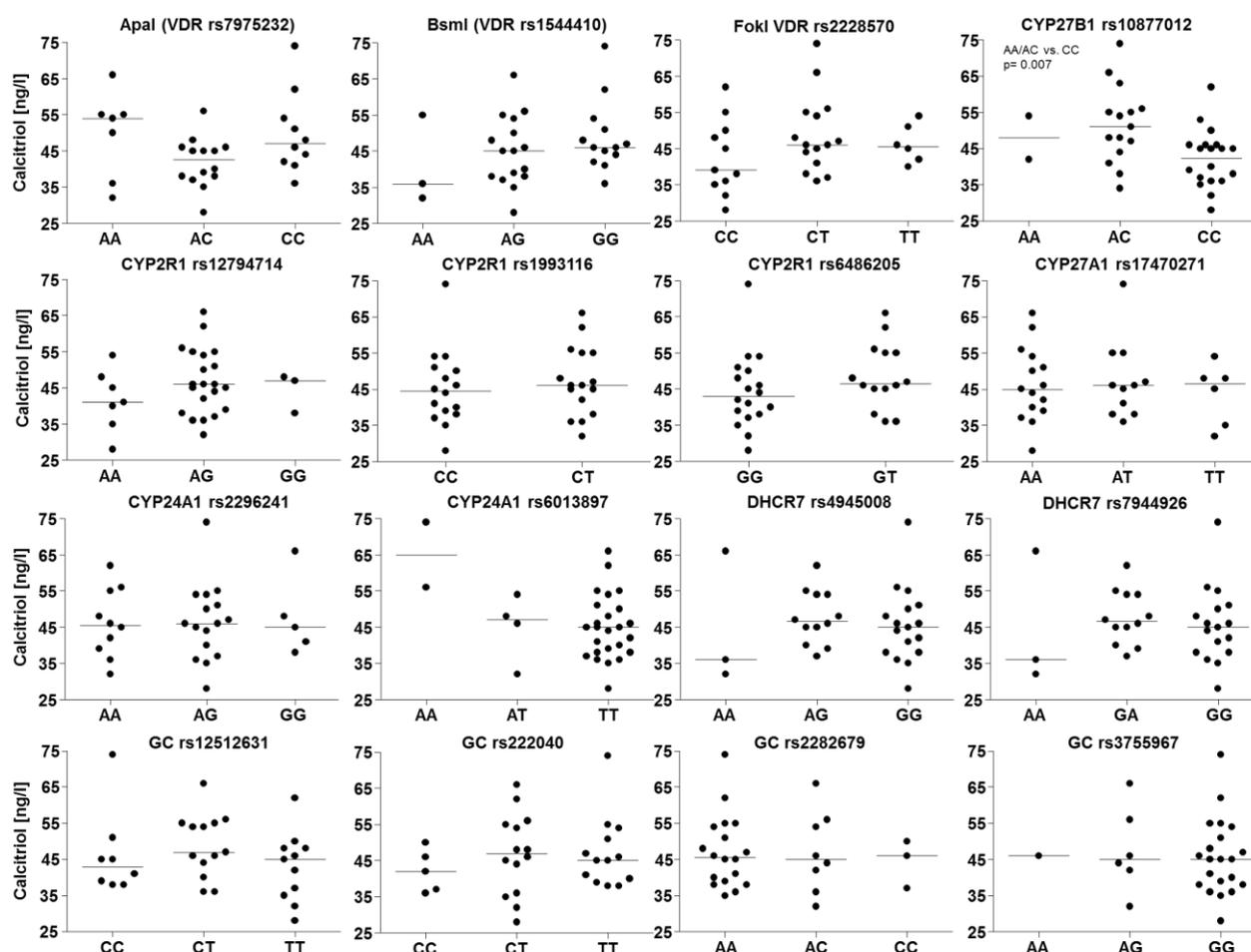


Abb. 22: initiale Calcitriolspiegel in Abhängigkeit der getesteten Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs).

Der SNP des CYP27B1-Gens (SNP rs10877012) wurde ebenfalls bei den Probanden der Neurocrine-Studie analysiert, um auch hier die Assoziation zu bestätigen. Bei der offenen Calcitriol-Studie wurden keine Calcitriolspiegel bestimmt und daher konnten diese auch bei der Analyse nicht mitberücksichtigt werden. Patienten, die den CC-Genotyp trugen, hatten ebenfalls noch niedrigere Calcitriolspiegel, allerdings war dies nicht mehr signifikant ( $p=0.07$ , Abb. 23).

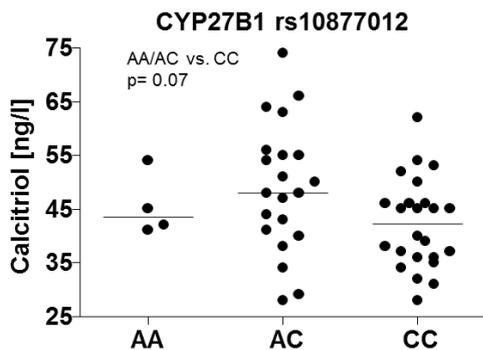


Abb. 23: weitere Analyse des SNP CYP27B1 rs10877012 (n=50) mit Probanden Calcitriol-Studie und der Neurocrine-Studie.

Weiter konnte beobachtet werden, dass der AA/AC-Genotyp des CYP27B1-Gens (SNP rs10877012) innerhalb der Calcitriol-behandelten Patienten bei solchen Patienten häufiger auftrat, deren Abnahme an pDCs von Monat 0 zu Monat 9 am größten war (Abb. 24). Der Nichtrisikogenotyp AA/AC ging also mit einer Verminderung der pDCs von  $\geq 50\%$  im Monat 9 gegenüber dem Ausgangswert im Monat 0 einher. Patienten, bei denen die pDCs im Monat 9 dagegen  $< 50\%$  vom Ausgangswert abnahmen, trugen vermehrt den Risikogenotyp, der mit einem erhöhten T1D-Risiko assoziiert ist ( $p=0.03$ ).

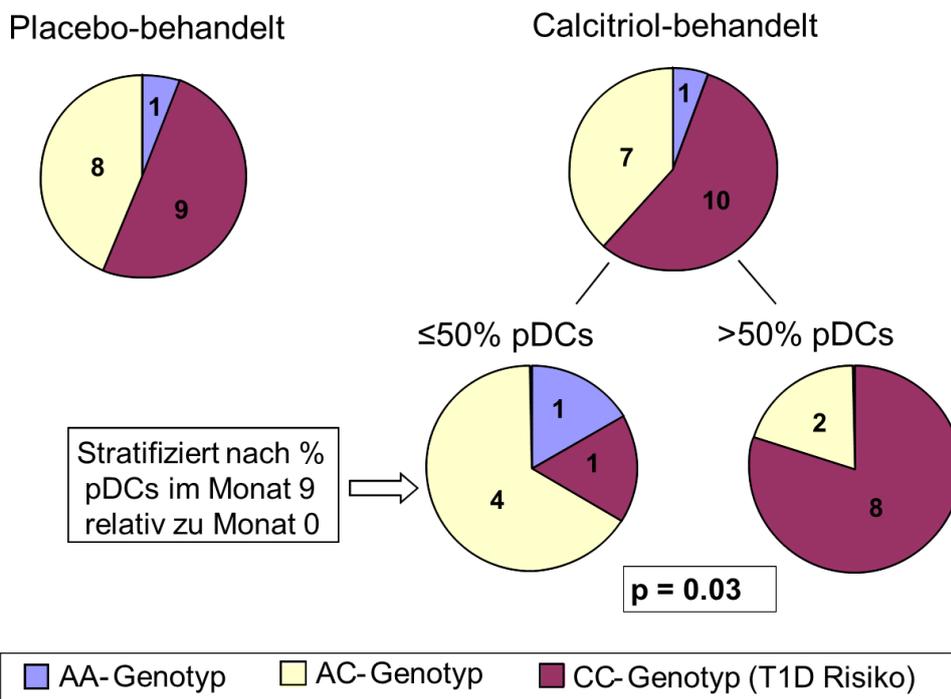


Abb. 24: Verteilung des CYP27B1-Genotyps (SNP rs10877012) in Calcitriol- und Placebo-behandelten Patienten. Innerhalb der Calcitriolbehandlungsgruppe: Patienten, mit  $\leq 50\%$  pDCs im Monat 9 in Relation zum Ausgangswert im Monat 0 trugen häufiger den AA- bzw. AC-Genotyp, und entsprechend seltener den T1D-assoziierten CC-Genotyp ( $p=0.03$ ).

### **3.2 Einfluss von Vitamin D<sub>3</sub> auf die zelluläre und humorale Immunantwort nach Vakzinierung mit dem Modellantigen Tetanus Toxoid**

Den Patienten der Calcitriol-Studie wurde im Monat 6 eine Tetanus Toxoid (TT) Boosterimpfung verabreicht.

So war es möglich den Einfluss von Calcitriol auf zelluläre und humorale Parameter zu untersuchen und vor und nach der Revakzination miteinander zu vergleichen. Im nachfolgenden Kapitel soll gezeigt werden, inwieweit die Boosterimpfung die Zytokinsekretion der Patienten der doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie beeinflusst und welche Rolle Calcitriol dabei spielt. Außerdem soll auf humoraler Ebene gezeigt werden, ob die Immunantwort der Patienten bei Gabe von Calcitriol sich generell verändert. Hierzu dient TT als Modellantigen.

#### **3.2.1 Einfluss von Vitamin D<sub>3</sub> auf Zytokinspiegel im Serum**

Es wurden die proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 und IL-6 und die antiinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-8 und IL-10 gemessen (Placebo: n=18; Verum: n=20). Es konnte weder bei den getesteten proinflammatorischen Zytokinen IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , noch bei den antiinflammatorischen Zytokinen IL-4, IL-8 und IL-10 eine signifikante Veränderung vor bzw. nach Revakzinierung in den jeweiligen Zytokinspiegeln gezeigt werden. Beim Vergleich der Placebo-behandelten Patienten vs. der Calcitriol-behandelten Patienten konnte ebenfalls keine Signifikanz beobachtet werden. Lediglich beim Zytokin IL-2 konnte hier eine Signifikanz ( $p=0.03$ ) festgestellt werden, die aber kein Effekt der Impfung war, da sie in Monat 0 beobachtet wurde und nach Korrektur für multiples Testen (Bonferroni-Methode) wieder verschwand. Tab. 11 zeigt die getesteten Zytokine, die in der Auswertung berücksichtigt wurden (Median, IQR).

Tab. 11: Zytokinspiegel der doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie (Median, IQR).

	<b>Placebo (Monat 0)</b>	<b>Verum (Monat 0)</b>	<b>p</b>	<b>Placebo (Monat 9)</b>	<b>Verum (Monat 9)</b>	<b>p</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math> [pg/ml]</b>	0.97 (0.35- 2.89)	0.68 (0.39- 1.05)	0.21	0.72 (0.14-1.21)	0.78 (0.25- 1.06)	0.86
<b>TNF-<math>\alpha</math> [pg/ml]</b>	5.53 (3.66- 8.30)	5.14 (3.89- 6.35)	0.71	5.49 (3.67- 7.03)	4.73 (3.85- 6.68)	0.67
<b>IL-2 [pg/ml]</b>	0.55 (0.22- 1.28)	0.27 (0.07- 0.46)	0.03	0.40 (0.12- 1.14)	0.33 (0.10- 0.47)	0.24
<b>IL-6 [pg/ml]</b>	1.02 (0.60- 2.79)	1.21 (0.54- 1.48)	0.84	0.88 (0.53- 1.87)	0.81 (0.70- 0.99)	0.65
<b>IL-4 [pg/ml]</b>	1.16 (0.15- 2.27)	1.56 (0.51- 4.88)	0.38	1.20 (0.51- 3.16)	2.02 (0.63- 4.93)	0.62
<b>IL-8 [pg/ml]</b>	2.81 (2.00- 4.85)	3.50 (2.57- 4.84)	0.49	3.33 (1.94- 4.15)	4.02 (3.34- 4.72)	0.10
<b>IL-10 [pg/ml]</b>	7.73 (3.97- 10.12)	5.30 (3.74- 12.97)	0.99	5.29 (3.35- 8.77)	6.33 (3.51- 8.99)	0.78

Um einen möglichen Einfluss von Vitamin D<sub>3</sub> auf die Zytokinspiegel zu untersuchen, wurden die getesteten Zytokinspiegel im Monat 0 und Monat 9 mit den entsprechenden Calcidiol- bzw. den Calcitriolspiegeln in Beziehung gesetzt. Bei den Placebo-behandelten Patienten konnte in Monat 9 eine negative Korrelation der TNF- $\alpha$ -Spiegel mit den Calcidiolspiegeln beobachtet werden, d.h. je höher die Konzentration der Calcidiolspiegel war, desto niedriger waren die TNF- $\alpha$ -Spiegel der Patienten ( $p=0.04$ ,  $r=-0.49$ ). Nach Korrektur für multiples Testen nach der Bonferroni-Methode verschwand dieser Effekt allerdings. Bei den anderen getesteten Zytokinen konnten keine weiteren Abhängigkeiten zu den Calcidiolspiegeln festgestellt werden (Abb. 25).

Bei den Calcitriolspiegeln konnte eine Abhängigkeit beobachtet werden. Hier korrelierten innerhalb der Placebogruppe im Monat 9 die IL-2-Spiegel mit den Calcitriolspiegeln ( $p=0.04$ ,  $r=-0.48$ ). Dieser Effekt verschwand aber nach Bonferroni-Korrektur. Bei den anderen getesteten Zytokinen konnten keine weiteren Abhängigkeiten zu den Calcitriolspiegeln gezeigt werden (Abb. 26).

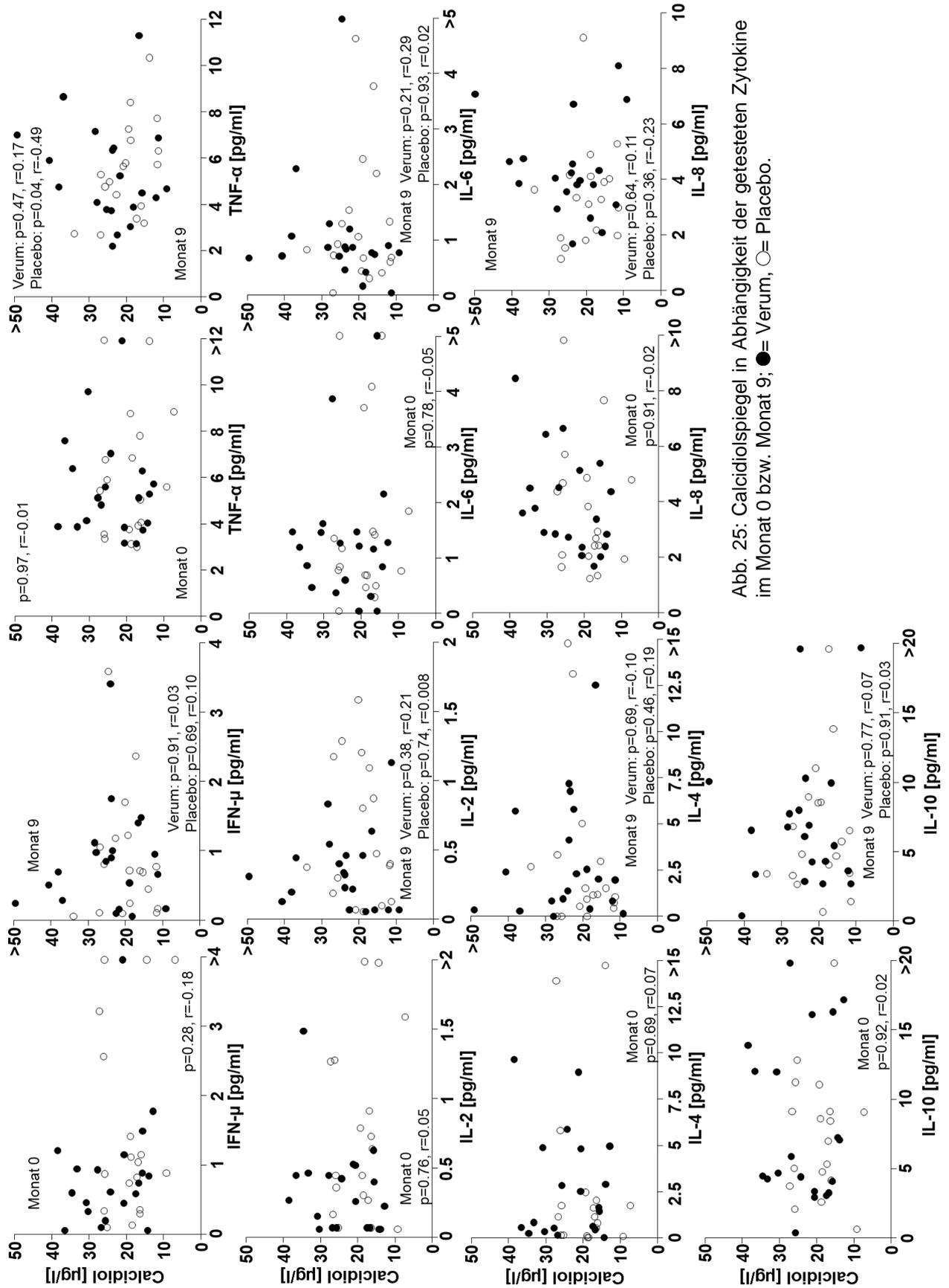


Abb. 25: Calcitriolspiegel in Abhängigkeit der getesteten Zytokine im Monat 0 bzw. Monat 9; ●= Verum, ○= Placebo.

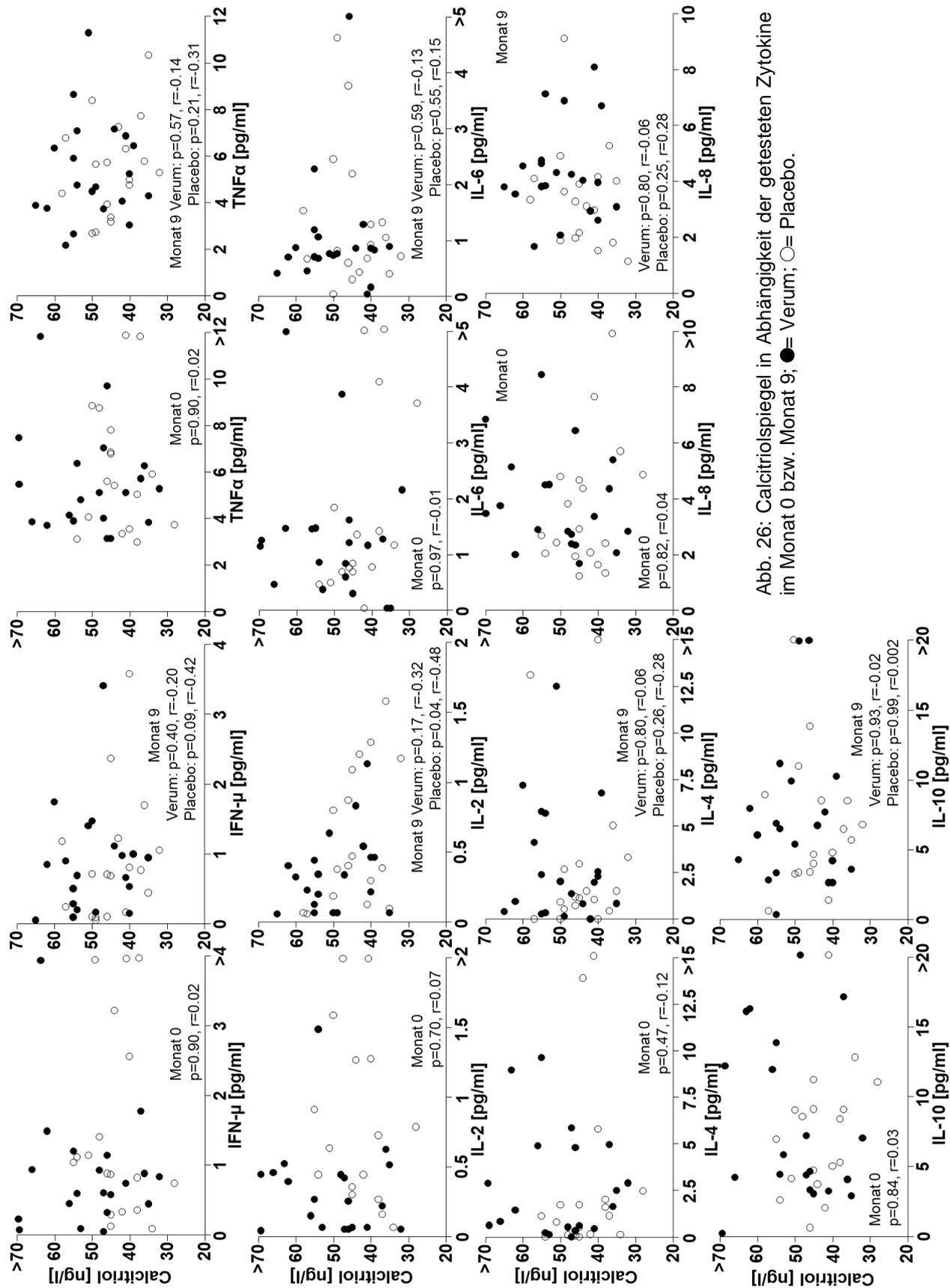


Abb. 26: Calcitriolspiegel in Abhängigkeit der getesteten Zytokine im Monat 0 bzw. Monat 9; ●= Verum; ○= Placebo.

### 3.2.2 Einfluss von Vitamin D<sub>3</sub> auf die TT-Antikörpersubklassenverteilung

Durch die Boosterimpfung mit Tetanus Toxoid (TT) bei den Patienten der doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie sollte weiter untersucht werden, ob die humorale Immunantwort der Calcitriol-behandelten Patienten gegenüber den Placebo-behandelten Patienten generell verändert ist. TT diente hierbei als Modellantigen. Bei der Subklasse IgG1 konnte eine Signifikanz ( $p=0.004$ ) bei den Placebo-behandelten Patienten vor und nach Impfung (0.40 mU (IQR 0.18-1.39) vs. 1.66mU (IQR 0.99- 3.61)) gezeigt werden (Abb. 27a). Auch bei den Calcitriol-behandelten Patienten war der TT-Spiegel nach Impfung mit 2.48 mU (IQR 2.05-3.84) signifikant höher als vor der Impfung (0.77 mU, IQR 0.29-2.11;  $p=0.002$ ; Abb. 27a). Die absoluten Veränderungen der einzelnen Messwerte ( $\Delta$  Messwert nach Impfung minus Messwert vor Impfung) sind in der Abb. 27b dargestellt. Hier konnte kein signifikanter Unterschied in der Immunantwort gegen TT zwischen Placebo-behandelten (0.74 mU (IQR 0.43-1.72)) und Calcitriol-behandelten Patienten (1.53 mU (IQR 1.11-2.23)) in der Subklasse IgG1 gezeigt werden ( $p=0.11$ ).

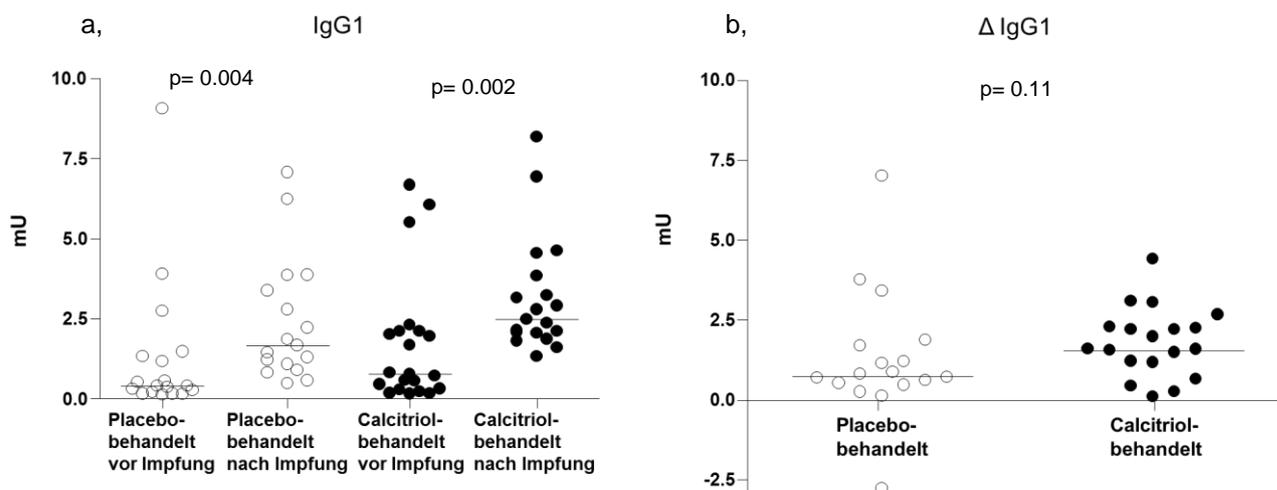


Abb. 27a: Antikörperspiegel der Subklasse IgG1 [mU] gegen Tetanus Toxoid (TT) vor bzw. nach Impfung mit TT bei Placebo-behandelten ( $n=18$  bzw.  $n=17$ ) und Calcitriol-behandelten Patienten ( $n=21$  bzw.  $n=19$ )  
Abb. 27b:  $\Delta$  IgG1-Subklasse bei Placebo-behandelten bzw. Calcitriol-behandelten Patienten.

Bei der IgG2-Subklasse lagen die Antikörperspiegel deutlich unter denen der Subklasse IgG1, da deren Vorkommen am Gesamt-IgG deutlich geringer ist als bei IgG1. Auch hier konnte sowohl bei den Placebo-behandelten Patienten, als auch bei den Calcitriol-behandelten Patienten eine Immunreaktion auf die Boosterimpfung mit TT beobachtet werden ( $p=0.006$  bzw.  $p=0.05$ , Abb. 28a). Bei der Placebogruppe stiegen die Antikör-

pertiter von 0,09 mU (IQR 0.04-0.17) auf 0,18 mU (IQR 0.09-0.36), bei der Verumgruppe von 0.09 mU (IQR 0.04-0.25) auf 0.20 mU (IQR 0.11-0.32). Die Differenz der absoluten Messwerte ( $\Delta$  IgG2) war zwischen den Gruppen ähnlich ( $p=0.95$ ). Sie lag bei den Placebo-behandelten Patienten bei 0.05 mU (IQR 0.007-0.23) bzw. bei den Calcitriol-behandelten Patienten bei 0.07 mU (IQR 0.03-0.11; Abb. 28b).

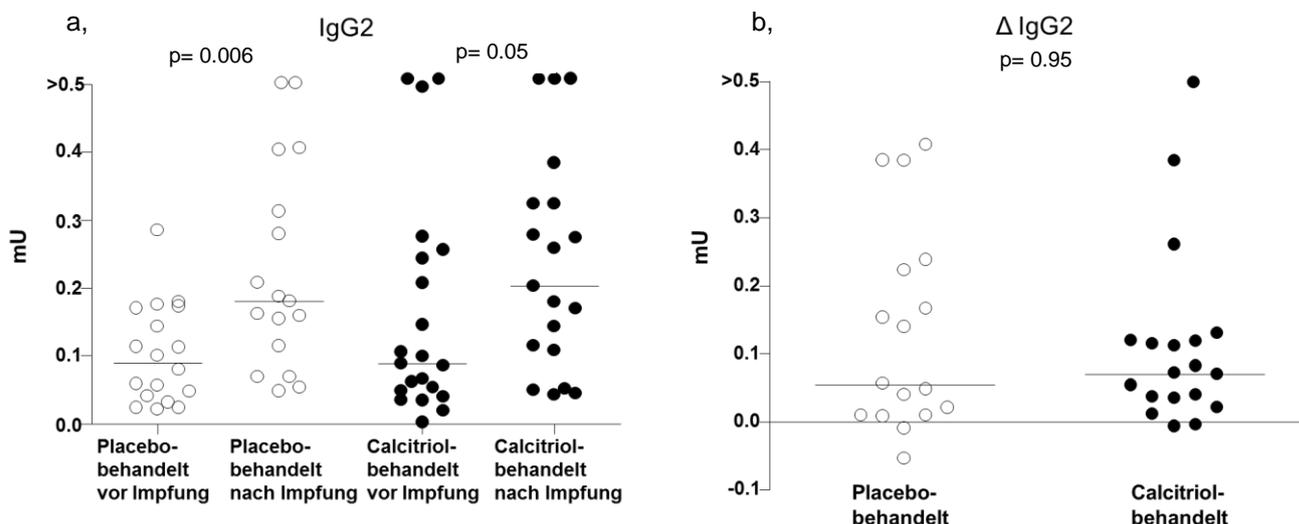


Abb. 28a: Antikörperspiegel der Subklasse IgG2 [mU] gegen Tetanus Toxoid vor bzw. nach Impfung mit TT bei Placebo-behandelten (n=18 bzw. n=17) und Calcitriol-behandelten Patienten (n=21 bzw. n=19)  
 Abb. 28b:  $\Delta$  IgG2-Subklasse bei Placebo-behandelten bzw. Calcitriol-behandelten Patienten.

Da die Subklasse IgG4 durchschnittlich nur bis zu 5% des Gesamt-IgG ausmacht, waren die Titer bei dieser Subklasse entsprechend gering. Dennoch konnten bei beiden Gruppen vor bzw. nach Impfung ein signifikanter Unterschied der Antikörpertiter nachgewiesen werden ( $p=0.01$  bei beiden Gruppen; Abb. 29a).

Der TT-Spiegel stieg von 0.04 mU (IQR 0.007-0.49) auf 0.29 mU (IQR 0.04-2.27) bei der Placebo behandelten Gruppe bzw. von 0.04 mU (IQR 0.01-0.49) auf 0.24 mU (IQR 0.02-1.24). Das  $\Delta$  der absoluten Messwerte der IgG4-Subklasse gegen TT war in der Placebogruppe etwas höher (0.22 mU; IQR 0.003-1.74) als in der Verumgruppe (0.16 mU; IQR 0.006-1.10), aber nicht signifikant ( $p=0.78$ ; Abb. 29b).

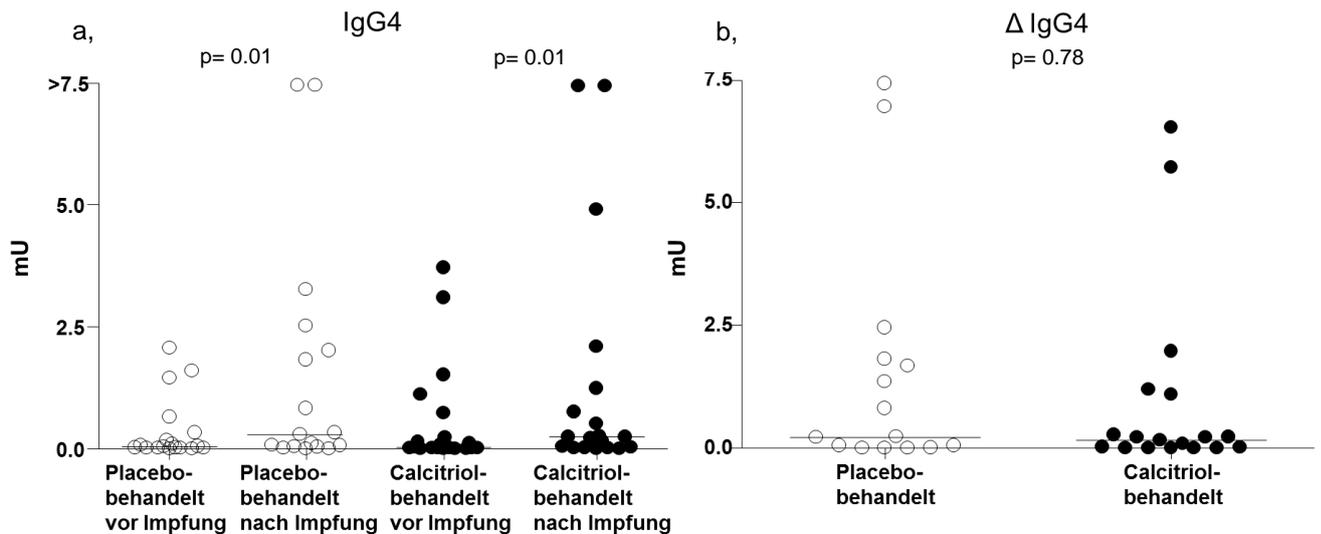


Abb. 29a: Antikörperspiegel der Subklasse IgG4 [mU] gegen Tetanus Toxoid vor bzw. nach Impfung mit TT bei Placebo-behandelten (n=18 bzw. n=17) und Calcitriol-behandelten Patienten (n=21 bzw. n=19)  
 Abb. 29b:  $\Delta$  IgG4-Subklasse bei Placebo-behandelten bzw. Calcitriol-behandelten Patienten.

Zur Bestimmung der Messgenauigkeit lief pro Assay immer eine Positiv- und Negativkontrolle mit. Der Intra-Assay-Variationskoeffizient wurde mit einer Siebenfachbestimmung einer positiven Kontrolle bestimmt. Er lag für die Subklasse IgG1 bei 8,46%, für die Subklasse IgG2 bei 13,19% und für die Subklasse IgG4 bei 12,75%.

Um einen möglichen Effekt von Vitamin D<sub>3</sub> auf die TT-Subklassen zu untersuchen, wurden die Calcidiol- und Calcitriolspiegel im Monat 9 mit der Veränderung der Subklassen ( $\Delta$  Messwert nach Impfung minus Messwert vor Impfung) in Beziehung gesetzt. Die Calcidiolspiegel korrelierten mit keinen TT-Subklassen, weder in der Verum- noch in der Placebogruppe (Abb. 30a-c).

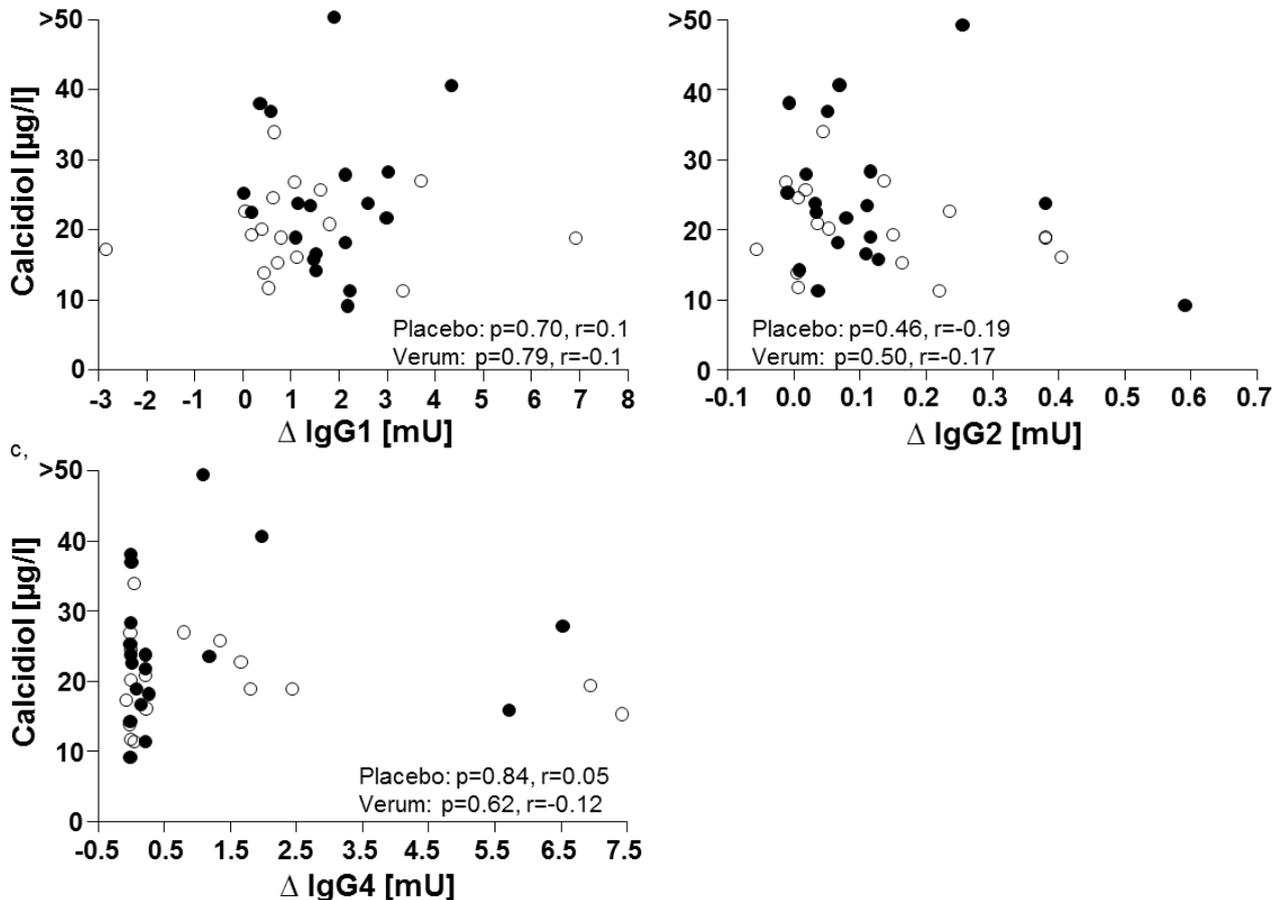


Abb. 30a-c: Calcidiolspiegel im Monat 9 vs. Veränderung der TT-Subklassen [mU] (vor Impfung – nach Impfung). Schwarze Punkte: Calcitriol-behandelt, weiße Punkte: Placebo-behandelt.

Die Calcitriolspiegel korrelierten ebenfalls nicht mit der Subklasse IgG1, dies konnte bei beiden Behandlungsgruppen festgestellt werden (Placebo:  $p=0.32$ ,  $r=0.26$ ; Verum:  $p=0.37$ ,  $r=-0.22$ ; Abb. 31a). Bei der Subklasse IgG2 korrelierten die Werte der Placebo-behandelten Patienten mit den Calcitriolspiegeln ( $p=0.004$ ,  $r=0.66$ ), dieser Effekt verschwand aber nach Anwendung der Bonferroni-Methode für multiples Testen (Abb. 31b). Die Subklasse IgG2 der Verum-behandelten korrelierte nicht mit den Calcitriolspiegeln ( $p=0.58$ ,  $r=-0.14$ ; Abb. 31b). Die Subklasse IgG4 korrelierte ebenfalls nur mit den Calcitriolspiegeln der Placebo-Gruppe, nicht mit der der Verum-Gruppe ( $p=0.01$ ,  $r=0.61$  bzw.  $p=0.53$ ,  $r=-0.15$ ). Auch diese Signifikanz verschwand nach Anwendung der Bonferroni-Methode (Abb. 31c).

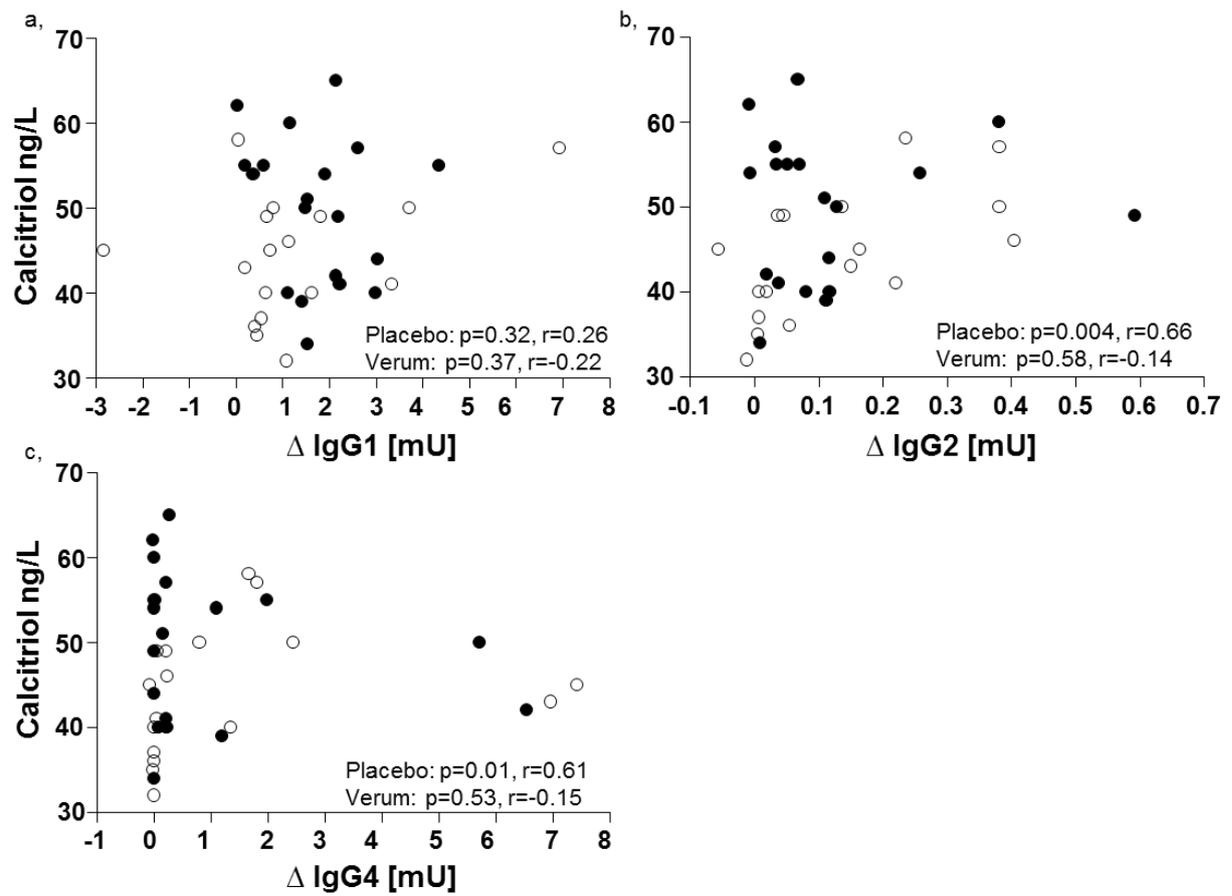


Abb. 31a-c: Calcitriolspiegel im Monat 9 vs. Veränderung der TT-Subklassen [mU] (vor Impfung – nach Impfung). Schwarze Punkte: Calcitriol-behandelt, weiße Punkte: Placebo-behandelt.

## 4 DISKUSSION

Der T1D ist eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen im Kindes- und Jugendalter und bisher nicht heilbar. Neben Genetik und Umweltfaktoren spielen bei der Krankheitsentstehung auch Immunzellen eine wichtige Rolle. Diese Zellen sind Ziel von Immunpräventionen, mit denen versucht wird, T1D zu heilen bzw. dessen Ausbruch zu verzögern. Die Präventionsstrategien gegen den T1D werden in drei Arten unterteilt.

Die Primärprävention hat das Ziel, die Entwicklung von Inselautoimmunität bei Kindern und Jugendlichen mit genetischem oder familiärem Risiko zu verhindern.

Eine weitere Ausdehnung der Betazellzerstörung bei bereits Antikörper-positiven Patienten zu begrenzen bzw. aufzuhalten, beschreibt die Sekundärprävention.

Ist ein T1D manifest, wird versucht durch so genannte Immuninterventionen die autoreaktive Immunantwort zu lindern und die noch vorhandene Betazellmasse zu erhalten. Man spricht hier von Tertiärpräventionen. Je nach Angriffsort der Therapie unterscheidet man unterschiedliche tertiäre Immunpräventionen. Die in dieser Arbeit untersuchte Calcitriol-Studie, versuchte durch die Gabe von Calcitriol auf die Immunregulation einzuwirken und so die residuale Betazellfunktion bei neu manifestierten Typ-1-Diabetikern zu erhalten. Bei den Probanden, die mit 0.25µg Calcitriol oder einem Placebo über neun Wochen behandelt wurden, konnte allerdings keine Wirkung auf metabolische Parameter wie dem C-Peptid gezeigt werden (Walter, Kaupper et al. 2010). Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob Calcitriol dennoch einen Effekt auf Immunparameter zeigen kann. So wurden dendritische Zellen und deren Subpopulationen auf Veränderung nach Intervention mit Calcitriol bzw. einem Placebo untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss von Vitamin D<sub>3</sub> auf das Nüchtern-C-Peptid untersucht. Auch Einzelnukleotidpolymorphismen und deren Einfluss auf den Vitamin D<sub>3</sub>-Metabolismus wurden analysiert. Abschließend sollte die Frage geklärt werden, welchen Einfluss Calcitriol auf die zelluläre und humorale Immunantwort hat.

Weitere Therapien, die auf die Immunregulation abzielen, wie z.B. mit dem monoklonalen Antikörper CD3 oder dem Peptidliganden NBI-6024 zeigten ebenfalls keine langfristigen Effekte auf den Erhalt der Betazellfunktion (Walter, Philotheou et al. 2009; Keymeulen, Walter et al. 2010). Kurz sei hier auch noch die so genannte Antigenbasierte Therapie zu nennen. Hier wurde versucht, durch eine Impfung mit Aluminiumgebundenem GAD65 eine Toleranz des Immunsystems gegenüber dem Antigen zu bewirken und so die Zerstörung der Betazellen aufzuhalten. Gemessen wurde dies an-

hand des C-Peptids im Monat 0 und am Ende der Studie im Monat 15. Allerdings konnte eine Erhaltung des C-Peptids weder in der Placebo- noch in der Verumgruppe gezeigt werden (Ludvigsson, Krisky et al. 2012). Bessere Effekte konnte eine Immunsuppression mit einem monoklonalen Anti-CD20-Antikörper erzielen. Hier wurde das C-Peptid ein Jahr nach Beginn der Studie gemessen und war bei den mit dem Antikörper behandelten Probanden höher als bei der Kontrollgruppe (Pescovitz, Greenbaum et al. 2009). Auch der monoklonale Antikörper CTLA4-Ig hatte ähnliche Erfolge (Orban, Bundy et al. 2011). Dagegen zeigten die antiinflammatorischen Therapien mit IL-1-Antagonisten keine Wirkung auf den Erhalt des C-Peptids (Moran, Bundy et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit sollen nun Patientenproben der Calcitriol-Studie auf immunologische Veränderungen analysiert werden, mit dem Ziel herauszufinden, ob Calcitriol auf immunologischer Ebene einen regulierenden Effekt auf die überschießende Immunantwort bei der Pathogenese des T1D zeigen kann.

#### **4.1 Immunmodulierende Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub> auf dendritische Zellen**

##### **4.1.1 Anzahl der dendritischen Zellpopulationen in den Behandlungsgruppen der Calcitriol-Studie**

Die immunmodulierende Wirkung von Calcitriol wurde in vielen Studien anhand von *In-vitro*- und Tiermodellen gezeigt (Zella, McCary et al. 2003; Eftekharian, Zarnani et al. 2010; Hewison 2012; Ferreira, Overbergh et al. 2013). Es konnte beobachtet werden, dass Calcitriol die Entwicklung von T1D positiv beeinflussen kann. Die Antigenpräsentation von autoreaktiven T-Zellen spielt bei der frühen Krankheitsentstehung des T1D vermutlich eine wichtige Rolle (Guillot, Semerano et al. 2010) und ist daher in der derzeitigen Forschung ein wichtiger Angriffspunkt zur Verhinderung des T1D. DCs sind an der Antigenpräsentation beteiligt. Calcitriol wirkt hier, indem es die Differenzierung und Reifung von DCs moduliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Reifung der DCs durch geringere Expression von DC-Markern, MHC-Klasse II- und kostimulierenden Molekülen, wie CD40, CD80 und CD86, inhibiert werden kann (Berer, Stockl et al. 2000; Penna and Adorini 2000; van Halteren, van Etten et al. 2002; Gauzzi, Purificato et al. 2005; Pedersen, Holmstrom et al. 2009). Calcitriol induziert so DCs mit tolerogenen Eigenschaften und könnte auf diese Weise die Entstehung von T1D verhindern. Dennoch wird die Rolle der DCs und deren Subpopulationen kontrovers diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass Kinder mit neu manifestiertem T1D erhöhte Spiegel von IFN- $\alpha$  aufwiesen

(Allen, Pang et al. 2009). IFN- $\alpha$  wird in großem Maße von einer dendritischen Zellsubpopulation, den pDCs produziert. Eine erhöhte Anzahl dieser dendritischen Zellsubpopulation konnte bei neu manifestierten Typ-1-Diabetikern nachgewiesen werden (Allen, Pang et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden neu manifestierte Typ-1-Diabetiker täglich mit entweder 0.25  $\mu$ g Calcitriol oder einem Placebo behandelt. Bezüglich des Outcomeparameters, der residualen Betazellfunktion, konnte kein Effekt von Calcitriol nachgewiesen werden (Walter, Kaupper et al. 2010). Ein Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob Calcitriol die dendritischen Zellen und ihre Subpopulationen beeinflusst und somit ein Hinweis auf die immunmodulierende Wirkung von Calcitriol bestätigt werden kann (Baeke, Takiishi et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil der dendritischen Gesamtzellpopulation zu Beginn der Calcitriol-Studie bei der Placebogruppe und Verumgruppe ähnlich war. Die Ausgangswerte lagen bei beiden Gruppen um 1.0% (Median, IQR 0.70-1.50 bzw. 0.65-1.21). Innerhalb der DCs waren die pDCs mit 0.52% (Verum) bzw. 0.59% (Placebo) zu Beginn der Studie (Monat 0) die am meisten vorkommende Subpopulation. Einzelne Probanden wiesen mit bis zu 2.3% aber auch einen deutlich höheren Anteil an pDCs auf. Diese Ergebnisse sind konsistent mit den oben beschriebenen Daten, die ebenfalls eine erhöhte Anzahl der pDCs bei neu manifestierten Typ-1-Diabetikern nachgewiesen haben. Als mögliche Hypothese, die eine Erhöhung der pDCs bei Manifestation des T1D erklären könnte, beschreiben Allen et al. eine Virusinfektion am Ende des Zerstörungsprozesses von Inselzellen (Allen, Pang et al. 2009). In Tiermodellen wurde nachgewiesen, dass eine Virusinfektion die Manifestation der Erkrankung beschleunigt (Tracy and Drescher 2007). Dies könnte das Verhältnis der DC-Subpopulationen verändern (Allen, Pang et al. 2009). Im Vergleich dazu, wird der Anteil an pDCs bei Gesunden zwischen 0.01% und 0.5% in Bezug auf PBMCs beschrieben (Jegalian, Facchetti et al. 2009; Reizis, Bunin et al. 2011). So ist anzunehmen, dass die Erhöhung dieser DC-Subpopulation mit dem beim T1D auftretenden Autoimmunprozess in Verbindung steht. Die Studie von Allen et al. zeigte auch, dass die Präsentation von Inselautoantigenen durch pDCs signifikant erhöht war. So wäre es möglich, dass auch die T-Zellaktivierung von schädlichen autoreaktiven T-Zellen bei erhöhter pDC-Anzahl vermehrt stattfinden könnte. Wie beschrieben, konnte diese Arbeit zeigen, dass die pDC-Subpopulation zu Studienanfang, also bei Manifestation der Erkrankung, deutlich erhöht war. Hier wäre es möglich, dass der Prozess der T-Zellaktivierung von schädlichen autoreaktiven T-Zellen vermehrt stattfinden konnte. Im Verlauf der Studie von Monat 0 zu Monat 9 konnte eine Verminderung der DCs in der

Verumgruppe beobachtet werden. In der Placebogruppe dagegen blieb der Anteil an DCs von PBMCs relativ stabil. Im Monat 9, zum Ende der Intervention mit Calcitriol bzw. einem Placebo, war der Anteil an DCs in der Verumgruppe im Vergleich zu der Placebogruppe deutlich vermindert. Bei näherer Betrachtung der DC-Subpopulationen konnte festgestellt werden, dass diese Verminderung im Monat 9 vor allem aufgrund einer Verminderung der pDC-Subpopulation erfolgt ist (0.52% auf 0.34%). Die anderen Subpopulationen mDC1 (0.33% auf 0.34%) und mDC2 (0.03% auf 0.02%) waren nahezu unverändert. Zudem konnte bei den DCs ein verminderter Anteil an pDCs in der Verumgruppe im Vergleich zu der Placebogruppe gezeigt werden. Dies lässt auf einen immunmodulierenden Effekt von Calcitriol schließen, der durch weitere funktionelle und mechanistische Untersuchungen näher beleuchtet werden sollte.

Dennoch ist, wie auch bei anderen Autoimmunerkrankungen, bei denen den pDCs eine zentrale Rolle in der Pathogenese zugeschrieben wird, deren Funktion im Autoimmunprozess noch nicht geklärt. Bisher wurde festgestellt, dass dieser Zelltyp bei der Autoimmunerkrankung des systemischen Lupus erythematoses (SLE) eine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit anderen Immunzellen spielt (Theofilopoulos, Baccala et al. 2005). Die IFN- $\alpha$ -Spiegel korrelierten bei dieser Erkrankung am besten mit der Krankheitsaktivität (Bengtsson, Sturfelt et al. 2000) und dem Schweregrad der Erkrankung (Tang, Du et al. 2010). Bei Psoriasispatienten infiltrierten pDCs die Haut und sezernierten IFN- $\alpha$  zu Beginn der Erkrankung. In einem Xenograftmodell verhinderte die Blockierung von IFN- $\alpha$ , das von pDCs sezerniert wird, die Entwicklung von Psoriasis und konnte damit eine schädliche Rolle der pDCs im Krankheitsgeschehen der Hauterkrankung bestätigen (Nestle, Conrad et al. 2005). Bei beiden Autoimmunerkrankungen konnte zudem eine verminderte Anzahl an zirkulierenden pDCs im Blut und eine Anhäufung dieser Zellen in den betroffenen Geweben festgestellt werden (Farkas, Beiske et al. 2001; Nestle, Conrad et al. 2005). Diese Arbeit zeigt ebenfalls einen verminderten Anteil an pDCs im Monat 9 der Studie. Im Rahmen der bei T1D auftretenden Insulinitis könnte eine Verminderung der pDCs auch durch deren Einwanderung in pankreatischen Lymphknoten begründet sein. Bei Patienten einer anderen Autoimmunerkrankung, der multiplen Sklerose (MS), war die Anzahl an pDCs allerdings mit denen von Gesunden vergleichbar (Pashenkov, Teleshova et al. 2002; Lopez, Comabella et al. 2006; Stasiolek, Bayas et al. 2006). Es wurde beschrieben, dass TLRs an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beteiligt sind (Blanco, Palucka et al. 2008; Galicia and Gommerman 2014). Diese erkennen eigene DNA-Fragmente als fremd und aktivie-

ren so pDCs, die vermehrt Typ-I-Interferone sezernieren (Nestle, Conrad et al. 2005; Gilliet, Cao et al. 2008). Die chronische Aktivierung und Sezernierung von diesen Interferonen ohne das Vorhandensein von Infektionen begünstigt Autoimmunerkrankungen (Ronnblohm and Alm 2001). Hier könnte Calcitriol mit seinen immunmodulierenden Eigenschaften wirken, indem es die TLR-Expression auf pDCs vermindert. Studien schreiben IFN- $\alpha$ -produzierenden pDCs eine pathogene Rolle in verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. bei Psoriasis und SLE, zu (Lande and Gilliet 2010). Für T1D sind unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Rolle von IFN- $\alpha$  und pDCs im Krankheitsgeschehen berichtet worden. Wie beschrieben, wurden bei T1D-Patienten bei Diagnose erhöhte Spiegel an IFN- $\alpha$ -produzierenden pDCs gefunden (Allen, Pang et al. 2009). Zudem induzierte eine Behandlung mit diesen Interferonen bei Patienten mit einer Hepatitisinfektion bzw. bei Leukämiepatienten einen Diabetes (Guerci, Guerci et al. 1994; Fabris, Betterle et al. 1998). Im Mausmodell wurden hohe IFN- $\alpha$ -Spiegel in den pankreatischen Lymphknoten vor Beginn der Diabetesmanifestation gefunden (Li, Xu et al. 2008). Eine andere Studie kam zu dem Schluss, dass eine Depletion von pDCs eine Diabetesentstehung im Mausmodell verhindern konnte (Li and McDevitt 2011). Im Gegensatz dazu, wurde in älteren Studien allerdings gezeigt, dass IFN- $\alpha$  die Diabetesinzidenz in der NOD Maus reduzieren kann (Brod, Malone et al. 1998; Sobel and Ahvazi 1998). Dennoch wurde die inflammatorische Rolle von Typ-I-Interferonen umfassend beschrieben. Diese Interferone wirken auch direkt auf pankreatische Betazellen, indem sie neben Zytokin- und Chemokinsekretion auch die MHC-I-Expression induzieren und so die Zerstörung der Betazellen durch autoreaktive T-Zellen erhöhen (Lang, Recher et al. 2005). Dies könnte den erhöhten Anteil an pDCs zu Beginn der Studie, bei Manifestation der Erkrankung, erklären. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass MyD88-defiziente Mäuse nicht an Diabetes erkranken. Dies deutet darauf hin, dass TLRs und andere MyD88-abhängige Moleküle bei der Entstehung von Diabetes in der NOD-Maus beteiligt sind (Wen, Ley et al. 2008). Es konnte festgestellt werden, dass TLR9 bei der Diabetesentwicklung eine maßgebliche Rolle spielt (Diana, Simoni et al. 2013) und dieser Rezeptor auch von pDCs exprimiert wird (von Glehn, Santos et al. 2012).

Neben einer möglichen schädlichen Rolle der pDCs, wird dieser Zellpopulation aber auch eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz zugeschrieben (Saxena, Ondr et al. 2007; Allen, Pang et al. 2009; Nikolic, Welzen-Coppens et al. 2009). pDCs werden als natürlich vorkommende DCs beschrieben, die Entzündungsreaktionen mildern können (Steinman and Idoyaga 2010; Swiecki and Colonna 2010).

Zudem wird den pDCs eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen in den pankreatischen Inselzellen und die Verhinderung eines weiteren Krankheitsverlaufs des T1D zugeschrieben (Beaudoin, Diana et al. 2014). Es wird beschrieben, dass IFN- $\alpha$ , das auch von pDCs sezerniert wird, protektiv wirken könnte, indem es die Aktivität von regulatorischen T-Zellen verstärkt (Gonzalez-Navajas, Lee et al. 2012). Eine Verminderung dieser Zellen, wie bei einigen Studien bei Typ-1-Diabetikern nachgewiesen (Chen, Makala et al. 2008; Hinkmann, Knerr et al. 2008) werden konnte, könnte so das Entstehen der Autoimmunerkrankung T1D erklären. In Experimenten konnte zudem gezeigt werden, dass pDCs, die mit den inhibitorischen Liganden CTLA4-Ig bzw. OX2(CD200)-Ig behandelt wurden, die Produktion der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) induziert werden konnte. IDO hat einen starken inhibitorischen Effekt auf die T-Zellproliferation und könnte so für die tolerogenen Eigenschaften der pDCs mit verantwortlich sein (Liu, Kanzler et al. 2001; Fallarino, Asselin-Paturel et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal die Verteilung dendritischer Zellen und deren Subpopulationen im Verlauf von 18 Monaten mit neunmonatiger Calcitriol- bzw. Placebointervention bei Patienten mit neu manifestiertem T1D untersucht.

Bis dahin wurden nur wenige Studien, die über die Verteilung der dendritischen Zellen und deren Subpopulationen berichten, veröffentlicht. Hier ist zu erwähnen, dass diese Studien unterschiedliche Methoden zur Analyse der DC-Subpopulationen verwendeten und daher ein Vergleich der Ergebnisse mit dieser Arbeit nicht sinnvoll erscheint. Lediglich bei drei Studien wurden dieselben Methoden zur Analyse der dendritischen Zellen verwendet wie in dieser Arbeit. Die Studie von Hinkmann et al. verglich Subpopulationen dendritischer Zellen von Patienten mit neu manifestiertem T1D ( $n=15$ ) und Patienten, die über fünf Jahre an T1D erkrankt waren ( $n=15$ ), jeweils mit einer gleichaltrigen Kontrollgruppe (jeweils  $n=15$ ) (Hinkmann, Knerr et al. 2008). Chen et al. verglichen die Subpopulationen der DCs in einer Querschnittsstudie von 72 Typ-1-Diabetikern, die über 5 Jahre erkrankt waren mit 75 Kontrollpersonen (Chen, Makala et al. 2008). Die dritte Studie verglich die DC-Subpopulationen von 40 Patienten mit neu manifestiertem T1D und Patienten ( $n=18$ ), die über 19.5 Jahre (Median) an T1D erkrankt waren, jeweils mit gleichaltrigen Kontrollen (Allen, Pang et al. 2009). Bei den zwei Studien, die die DC-Subpopulationen bei neu manifestierten T1D-Patienten untersuchten, war der Anteil an DCs zu Beginn, bezogen auf PBMCs, sehr unterschiedlich (0.13% vs.  $\sim$ 0.8%). In der vorliegenden Arbeit lag er im Monat 0 bei knapp 1%.

Im Verlauf der untersuchten Studie verminderte sich bei den Verum-behandelten Probanden der Anteil der DCs und der pDCs signifikant im Vergleich zu der Placebogruppe. Diese Veränderung, sowohl der DCs als auch der pDCs, deutet auf einen möglichen immunmodulierenden Effekt von Calcitriol hin. Möglicherweise bewirkt Calcitriol, dass pDCs, die vermehrt IFN- $\alpha$  produzieren und T<sub>H</sub>1-Antworten induzieren können (Cella, Facchetti et al. 2000; Kadowaki, Antonenko et al. 2000; Allen, Pang et al. 2009), ihre Antigenpräsentation verringern und so eine T-Zellaktivierung von autoreaktiven T-Zellen ebenfalls vermindert wird. Die durch Calcitriol verursachte Inhibition der Reifung von pDCs und die daraus resultierende Toleranz könnte ein Mechanismus darstellen T1D zu verhindern. Trotz einer Verminderung der DCs und der pDCs im Monat 9 in der vorliegenden Arbeit, ist anzumerken, dass der Anteil dieser Immunzellen immer noch höher war als der Ausgangswert in den Vergleichsstudien. Hier sind weitere Studien mit größeren Fallzahlen nötig, um diese Beobachtung bestätigen zu können.

#### **4.1.2 Einfluss von Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegeln auf dendritische Zellsubpopulationen**

Im weiteren Teil der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die plazmazytoide dendritische Zellsubpopulation von Patienten der Calcitriol-Studie näher untersucht. Es wurde analysiert, ob die quantitative Veränderung der pDCs im Verlauf der Studie von Monat 0 auf Monat 9 in Abhängigkeit mit den Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegeln der Patienten stand. Es konnte gezeigt werden, dass in Monat 9 hohe Calcidiolspiegel vor allem dann auftraten, wenn die pDCs der Probanden im Verlauf von Monat 0 zu Monat 9 abnahmen. Diese Korrelation würde darauf hindeuten, dass hohe Calcidiolspiegel einen negativen Effekt auf die Anzahl der pDCs haben könnte. Die hohen Calcidiolspiegel könnten auch auf die Jahreszeit und damit unterschiedliche Sonnenscheindauer zurückzuführen sein. Im Sommer sind die Calcidiolspiegel generell höher als im Winter (Langer, Penna-Martinez et al. 2013). Diese Korrelation der Abnahme der pDCs und hohen Calcidiolspiegeln, konnte, bezogen auf die Calcitriolspiegel, nicht bestätigt werden. Hier konnte weder in Monat 0 noch in Monat 9 eine Abhängigkeit der Calcitriolspiegel mit dem Anteil der pDCs im Verlauf von Monat 0 zu Monat 9 gezeigt werden.

Um die Fallzahl der Probanden zu vergrößern, wurden die Calcitriolspiegel der Patienten Calcitriol-Studie (Monat 0 und 9) und der Neurocrine-Studie (Monat 0, 3 und 12) nochmals auf eine mögliche Abhängigkeit mit den dendritischen Zellsubpopulationen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der pDCs, bezogen auf die PBMCs, negativ mit den Calcitriolspiegeln der Patienten korrelierte. Das heißt, dass die

höchsten Calcitriolspiegel vor allem bei Patienten mit einem geringen Anteil an pDCs auftraten. Dieser Effekt konnte auch bei den pDCs, bezogen auf die Gesamtpopulation der DCs, festgestellt werden, allerdings nicht mehr signifikant. Im Gegensatz dazu, konnte für die mDC1-Subpopulation eine positive Korrelation mit den Calcitriolspiegeln, bezogen auf die Gesamtpopulation der DCs, festgestellt werden. Dies ist konsistent mit einer Studie, die den tolerogenen Effekt von Calcitriol auf mDCs beschreibt. Bei mit Calcitriol behandelten mDCs verminderte sich die Eigenschaft eine T<sub>H</sub>1-Zellentwicklung zu induzieren (Penna, Amuchastegui et al. 2007). In dieser Arbeit korrelierten hohe Calcitriolspiegel mit einem hohen Anteil an mDC1. Dies weist auf eine verminderte T-Zellpolarisierung in Richtung T<sub>H</sub>1-Entwicklung durch den immunmodulierenden Effekt von Calcitriol hin.

Die Funktion der pDCs beim T1D ist, wie schon in 4.1.1 beschrieben, bis heute nicht geklärt. Diesem Subtyp wird für den Autoimmunprozess sowohl eine günstige als auch eine schädliche Rolle zugesprochen (Nikolic, Welzen-Coppens et al. 2009). Auf der einen Seite konnte im Mausmodell herausgefunden werden, dass pDCs die bei der Insulinitis auftretende Entzündung mildern konnten. Zudem konnte beobachtet werden, dass pDCs regulatorische T-Zellen induzieren und Effektor-T-Zellen inhibieren konnten (Saxena, Ondr et al. 2007). Allerdings ist der Mechanismus dieser Toleranz-Induktion durch pDCs bis heute noch nicht vollständig geklärt (Nikolic, Welzen-Coppens et al. 2009).

Auf der anderen Seite haben in vitro-Studien bewiesen, dass die Prozessierung und Präsentation von Inselautoantigenen durch pDCs signifikant erhöht war (Allen, Pang et al. 2009). Folglich könnte auch die T-Zellaktivierung von autoreaktiven T-Zellen erhöht sein und dies könnte auf eine schädliche Rolle der pDCs im Krankheitsverlauf des T1D hindeuten. Tatsächlich konnte herausgefunden werden, dass pDCs als APCs fungieren und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch Kreuzpräsentation aktivieren können (Ahonen, Doxsee et al. 2004). Diese Hypothese von einer proinflammatorischen Rolle der pDCs im Krankheitsverlauf des T1D wurde von Autoren beschrieben, die herausfinden konnten, dass neu manifestierte Typ-1-Diabetiker eine erhöhte Anzahl an pDCs aufwiesen, die im Laufe der Erkrankung wieder abfiel (Allen, Pang et al. 2009). Auch wurden erhöhte Spiegel von IFN- $\alpha$ , die von pDCs ausgeschüttet werden, bei Kindern mit neu diagnostiziertem T1D beobachtet (Chehadeh, Weill et al. 2000). Eine andere Studie konnte eine erhöhte IFN- $\alpha$ -Expression der pDCs in pankreatischen Lymphknoten zeigen. Diese Interferone wurden als wichtiger Faktor zu Beginn einer auftretenden Autoimmunität beschrieben

(Li, Xu et al. 2008). Im Gegensatz zu der Studie, die zeigen konnte, dass neu manifestierte Typ-1-Diabetiker eine erhöhte Anzahl an pDCs aufwiesen, bewiesen andere Humanstudien, dass die Anzahl der pDCs bei T1D-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen vermindert war (Vuckovic, Withers et al. 2007; Chen, Makala et al. 2008; Hinkmann, Knerr et al. 2008). Diese Autoren interpretierten aufgrund ihrer Ergebnisse aber nicht die spezifische Funktion der pDC bei der Entwicklung des T1D.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Ergebnisse könnten auf eine proinflammatorische Rolle der pDCs im Autoimmunprozess des T1D hindeuten. Hohe Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel korrelierten in zwei Untersuchungen mit einem geringen Anteil an pDCs ( $p=0.04$  bzw.  $p=0.007$ ). Wenn Calcidiol bzw. Calcitriol mit einer niedrigen Anzahl an pDCs in Beziehung stehen, könnte das auch die IFN- $\alpha$ -Sekretion beeinflussen, da pDCs diese Interferone vermehrt ausschütten. Eine Verminderung der pDCs würde eine verminderte IFN- $\alpha$ -Sekretion bedeuten und könnte so wiederum den Autoimmunprozess hinauszögern, da diese Interferone als wichtiger Faktor zu Beginn einer auftretenden Autoimmunität beschrieben worden sind (Li, Xu et al. 2008). Zudem könnte durch die immunmodulierenden Eigenschaften von Calcitriol auch die bei T1D vermehrte T-Zellaktivierung von autoreaktiven T-Zellen vermindert werden. Die verminderte Anzahl an pDCs, könnte dazu führen, dass auch weniger dieser autoreaktiven T-Zellen durch pDCs stimuliert würden. Zudem vermittelt Calcitriol vermutlich eine Abnahme der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen durch pDCs, was die Entstehung von T<sub>H1</sub>- und T<sub>H17</sub>-Zellen reduzieren würde. Der Krankheitsentstehung des T1D könnte so entgegen gewirkt werden.

Da aber für pDCs, wie auch für Calcitriol, Toleranz-induzierende Eigenschaften beschrieben worden sind, könnte man auch annehmen, dass eine Intervention mit Calcitriol diesen Zelltyp fördern könnte. Wie bereits beschrieben sollte man zudem das Stadium der pDCs hinsichtlich Reifung, Aktivierung und Konzentration des Antigens mit in Betracht ziehen. Es könnte sein, dass pDCs hier eine Doppelfunktion erfüllen (Nikolic, Welzen-Coppens et al. 2009). So konnte gezeigt werden, dass reife pDCs eine T<sub>H1</sub>-Polarisierung induzieren konnte, die abhängig von Typ-I-IFN und IL-12 war (Cella, Facchetti et al. 2000). Auf der anderen Seite konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass IL-3- und CD40L-aktivierte pDCs eine mäßige T<sub>H2</sub>-Antwort in T-Zellen induzierten (Rissoan, Soumelis et al. 1999). Die auf der einen Seite beschriebenen tolerogenen Eigenschaften, auf der anderen Seite immunogenen Eigenschaften von pDCs zeigen deren Komplexität und Plasizität.

Abschließend ist zu sagen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keine eindeutige Schlussfolgerung zulassen, welchen Einfluss Calcitriol auf dendritische Subpopulationen im Krankheitsverlauf des T1D hat. Hier sind weitere funktionelle und mechanistische Untersuchungen mit einer größeren Patientenkohorte nötig.

#### **4.1.3 Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub> auf die residuale Betazellfunktion**

T1D entsteht aufgrund einer Zerstörung der pankreatischen Betazellen. In Folge der Zerstörung nimmt die Insulinsekretion mit der Progression der Erkrankung immer mehr ab, bis letztlich kein endogenes Insulin mehr produziert werden kann. Als Erfassung der  $\beta$ -Zellfunktion, kann als Marker das C-Peptid, das Teil des Proinsulins ist, bestimmt werden. In diversen Studien wurde untersucht, ob Vitamin D<sub>3</sub> den Betazellverlust bei neu manifestierten T1D-Patienten reduzieren kann und so den Ausbruch des T1D verzögern oder sogar verhindern könnte. Hier wurden unterschiedliche Erkenntnisse gewonnen. Einige Studien kamen zu dem Schluss, dass Vitamin D<sub>3</sub> einen betazellerhaltenden Effekt habe, andere konnten dies nicht bestätigen (Hypponen, Laara et al. 2001; Bock, Prietl et al. 2011). Zudem waren die Studien oft nicht vergleichbar, da die Vitamin D<sub>3</sub>-Dosis und die Dauer der Studien voneinander abwichen. Die Gabe von entweder Calcidiol oder Calcitriol dürfte sich ebenfalls auf die unterschiedlichen Ergebnisse ausgewirkt haben. Die Interventionsstudie mit Calcitriol, die am Institut für Diabetesforschung durchgeführt wurde, zeigte ebenfalls keinerlei Evidenz, die für eine erhaltende Wirkung des körpereigenen C-Peptids durch Calcitriol sprechen könnte. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte allerdings gezeigt werden, dass Vitamin D<sub>3</sub> die T-Zellproliferation und -aktivierung sowie die Sekretion des T<sub>H</sub>1-Zytokins IFN- $\gamma$  inhibieren konnte (Karthaus, van Spriel et al. 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Patientenproben der Calcitriol-Studie verwendet, um immunologische Veränderungen im Verlauf der Studie zu untersuchen und diese mit metabolischen Parametern, wie dem C-Peptid zu stratifizieren.

Es konnte herausgefunden werden, dass das Nüchtern-C-Peptid der Patienten im Monat 9 mit dem prozentualen Anteil der Veränderung der pDCs von Monat 0 auf Monat 9 negativ korreliert ( $p=0.03$ ). Je höher das Nüchtern-C-Peptid war, desto stärker war die Abnahme der Immunzellen. Dies wurde jedoch unabhängig von der Interventionsgruppe beobachtet. Dennoch könnte es darauf hindeuten, dass ein geringerer Anteil an pDCs die körpereigene  $\beta$ -Zellreserve erhalten könnte. Die Abhängigkeit von Vitamin D<sub>3</sub> und dem Nüchtern-C-Peptid wurde in einer weiteren Auswertung untersucht.

Es konnte keine Korrelation festgestellt werden. Weder die Calcidiolspiegel (Monat 0:  $p=0.23$ ,  $r=0.20$ ; Monat 9:  $p=0.26$ ,  $r=0.19$ ) noch die Calcitriolspiegel (Monat 0:  $p=0.22$ ,  $r=0.20$ ; Monat 9:  $p=0.34$ ,  $r=0.16$ ) ließen eine Abhängigkeit auf die Nüchtern-C-Peptid-Spiegel erkennen. Bei einer weiteren Subgruppenanalyse konnte man allerdings einen Effekt von Calcitriol auf das C-Peptid erkennen. Die Calcitriolspiegel wurden in hohe ( $> 50$  ng/L) und niedrige ( $\leq 50$  ng/L) Spiegel stratifiziert und dann mit den C-Peptidwerten der Patienten korreliert. In dieser Subanalyse konnte eine Beziehung zwischen dem Nüchtern-C-Peptid und den Calcitriolspiegeln beobachtet werden, die für einen betazellerhaltenden Effekt von Calcitriol sprechen könnten. Patienten, mit einem niedrigen Calcitriolspiegel verloren ihr C-Peptid im Verlauf der Studie von Monat 0 zu Monat 9. Dieser Abfall des C-Peptids war nahezu linear. Auch bei Placebo-behandelten Patienten mit initial hohen Calcitriolspiegeln nahm die Betazellfunktion im Verlauf der Studie stark ab, wohingegen bei Patienten mit initial hohen Calcitriolspiegeln und neunmonatiger Behandlung mit  $0.25$   $\mu\text{g/d}$  Calcitriol das C-Peptid fast nahezu vollständig, bezogen auf den Ausgangswert im Monat 0, erhalten werden konnte. Diese Patienten hatten zu Beginn der Behandlung allerdings eine bessere Betazellfunktion, was darauf hindeutet, dass Patienten, die bei Beginn der Behandlung mit Calcitriol schon initial hohe Calcitriolspiegel besitzen und eine relativ gute Betazellfunktion aufweisen, womöglich am besten von einer Intervention mit Calcitriol profitieren könnten. Neben dem initialen Calcitriolstatus ist also auch der Zeitpunkt der Behandlung mit Calcitriol, bei dem der Patient ein noch möglichst großes Nüchtern-C-Peptid aufweist, für einen möglichen Erfolg der Therapie von entscheidender Bedeutung. Weitere Studien mit einer größeren Patientenzahl sind nötig, um diese Erkenntnisse zu bestätigen.

#### **4.1.4 Einfluss von Genen auf den Vitamin D<sub>3</sub>- Metabolismus**

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden verschiedene Einzelnukleotidpolymorphismen des Vitamin D<sub>3</sub>-Metabolismus näher untersucht, um den Wirkmechanismus von Vitamin D<sub>3</sub> weiter aufklären zu können.

Die initialen Calcidiol- bzw. Calcitriol-Spiegel wurden mit den analysierten SNPs in Beziehung gesetzt. Untersuchungen zu dem SNP (rs 10877012) des CYP27B1-Gens in dieser Arbeit zeigten, dass Patienten, die den CC-Genotyp trugen, der mit einem erhöhtem T1D-Risiko assoziiert ist, niedrigere initiale Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel aufwiesen als Patienten, die den Genotyp AA bzw. AC trugen. Dies konnte sowohl für Calcidiol als auch für Calcitriol herausgefunden werden ( $p=0.03$  bzw.  $p=0.007$ ). CYP27B1, auch  $1\alpha$ -

Hydroxylase genannt, ist für die Umwandlung von Calcidiol in Calcitriol verantwortlich, indem es das Calcidiol hydroxyliert (Mathieu, Gysemans et al. 2005). Diese Ergebnisse sind konsistent mit zuvor beschriebenen Untersuchungen (Bailey, Cooper et al. 2007). Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde die bestehende Kohorte erweitert. Bei der Assoziation des SNP rs10877012 des CYP27B1-Gens mit den Calcidiolspiegeln wurden die SNPs der offenen Calcitriol-Studie und der Neurocrine-Studie mit analysiert (n=68). Der CC-Genotyp war weiterhin mit niedrigeren Calcidiolspiegeln assoziiert, dies war aber nicht mehr signifikant (p=0.07). Auch für die Auswertung dieses SNP mit den Calcitriolspiegeln wurde die Kohorte erweitert. Da bei der offenen Calcitriol-Studie aber keine Calcitriol-Spiegel gemessen wurden, wurden hier nur die Proben der Neurocrine-Studie mit analysiert (n=50). Auch hier war der CC-Genotyp weiterhin mit niedrigen Calcitriol-Spiegeln assoziiert, aber nicht mehr signifikant (p=0.07). Dennoch zeigen diese Ergebnisse, dass niedrige Calcidiol- bzw. Calcitriolspiegel mit dem Genotyp CC (erhöhtes T1D-Risiko) des SNP CYP27B1 rs10877012 assoziiert sind. Die Verhinderung niedriger Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel scheint also das T1D-Risiko zu minimieren.

Es wurde daraufhin ein möglicher Zusammenhang der dendritischen Zellsubpopulationen mit diesem SNP (rs10877012) untersucht. Die Genotypen der Placebo- und Verumgruppe waren gleichmäßig verteilt. Innerhalb der Calcitriol-behandelten Patienten, wurde der Nichttrisikogenotyp AA/AC vermehrt bei den sechs Patienten gefunden, bei denen die pDCs mehr als 50% im Verlauf der Studie von Monat 0 auf Monat 9 abgenommen haben. Dies könnte darauf hindeuten, dass dieser Genotyp, der mit höheren Calcitriolspiegeln assoziiert ist, mit einer Verminderung der pDCs einhergeht und so den Autoimmunprozess des T1D beeinflussen könnte. Auch hier müssten Studien, mit einer höheren Patientenzahl durchgeführt werden, um diese Hypothese zu bestätigen.

In der weiteren Analyse zeigte der Genotyp CC des SNP FokI im Vitamin-D-Rezeptorgen (VDR rs2228570) signifikant niedrigere Calcidiol-Spiegel als der Genotyp CT (p=0.01). Dies konnte aber nach erneuter Auswertung mit den Proben der offenen Calcitriol-Studie und der Neurocrine-Studie (n=64) nicht mehr gezeigt werden (p=0.37). Das in dieser Arbeit gefundene Ergebnis ist konsistent mit bereits veröffentlichten Daten. Auch hier konnte in einer größeren Kohorte mit 720 Typ-1-Diabetikern keine Abhängigkeit des SNPs mit den Calcidiolspiegeln gefunden werden (Cooper, Smyth et al. 2011). Die anderen getesteten SNPs zeigten keine signifikante Abhängigkeit mit den Calcidiol- bzw. den Calcitriolspiegeln.

Zur Abhängigkeit dieser SNPs mit den Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegeln gibt es bisher nur vereinzelt Untersuchungen, so dass eine Interpretation mit anderen Daten kaum möglich ist.

Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit hinsichtlich des SNP der Vitamin-D-25-Hydroxylase (CYP2R1 rs12794714), das keine Signifikanz zwischen den einzelnen Genotypen und den Calcidiolspiegeln beobachten konnte ist konsistent mit einer Studie von Ramos-Lopez et al. Auch hier konnte ebenfalls keine Abhängigkeit festgestellt werden (Ramos-Lopez, Bruck et al. 2007). Das Enzym CYP2R1 spielt eine Rolle bei der Umwandlung von Vitamin D zu Calcidiol.

Für die meisten Einzelnukleotidpolymorphismen konnte in dieser Arbeit keine Assoziation mit den Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegeln gefunden werden. Dies lag vermutlich auch an der geringen Fallzahl, die untersucht wurde. Eine erneute Analyse mit einer größeren Kohorte wäre sinnvoll, um validere Aussagen treffen zu können. Der SNP rs10877012 des CYP27B1-Gens, dessen Genotyp CC (erhöhtes T1D-Risiko) mit niedrigen Calcidiol- und auch Calcitriolspiegeln assoziiert ist, konnte in dieser Arbeit aber dennoch zeigen, dass durchaus ein Zusammenhang von Genetik, dem Vitamin D-Metabolismus und dem T1D besteht, und es sinnvoll erscheint, diese Untersuchungen in größeren Kohorten fortzusetzen.

## **4.2 Einfluss von Vitamin D<sub>3</sub> auf die zelluläre und humorale Immunantwort nach Vakzinierung mit dem Modellantigen Tetanus Toxoid (TT)**

### **4.2.1 Einfluss von Vitamin D<sub>3</sub> auf die Zytokinspiegel im Serum**

Nach Behandlung mit Calcitriol bzw. einem Placebo wurde den Patienten der Calcitriol-Studie im Monat 6 eine Boosterimpfung mit TT verabreicht, um mögliche Veränderungen in der Immunantwort der Patienten durch die Calcitriolgabe zu untersuchen. Bei Patienten der doppelblinden placebo-kontrollierten Calcitriol-Studie wurden pro- und antiinflammatorische Zytokine mittels der BioPlex-Methode vor und nach Impfung gemessen. Anhand dieser Zytokine konnte untersucht werden, ob die zelluläre Immunantwort durch Calcitriol generell verändert wird. Zudem sollte untersucht werden, ob eine Interventionstherapie mit Calcitriol Einfluss auf die Zytokinmuster der Patienten hat.

Für die proinflammatorischen Zytokine konnte keine signifikante Veränderung nach Revakzinierung (Monat 9) mit TT bei der Placebogruppe festgestellt werden. Auch die Behandlung mit Calcitriol zeigte nach der Boosterimpfung keinen signifikanten Effekt auf die Zytokinspiegel.

Bei den antiinflammatorischen Zytokinen war, unabhängig der Behandlungsgruppen, nach der Revakzinierung auch keine Signifikanz hinsichtlich der Veränderung der Zytokinspiegel im Monat 9 zu beobachten.

Im weiteren Verlauf der Auswertung wurden die Zytokinmuster der Verum-behandelten Patienten mit denen der Placebo-behandelten Patienten verglichen. Auch hier konnten keine signifikanten Veränderungen nach Calcitrioltherapie beobachtet werden.

Auch konnte kein Einfluss der Calcidiol- bzw. Calcitriolspiegel auf die Zytokinspiegel bewiesen werden. Die zwei beobachteten Signifikanzen der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-2 waren ein Effekt, der durch multiples Testen entstanden ist und wurden entsprechend korrigiert (Bonferroni-Korrektur).

Einige Messwerte der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2 und IL-4 unterschritten die Assaysensitivität (minimale detektierbare Konzentration) bzw. bei den Zytokinen IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6 und IL-10 lagen einige Messwerte unter dem messbaren Bereich des Assays. Der Grund für diese niedrigen Spiegel könnte ein mehrmaliges Auftauen der Serumproben sein. Die Berücksichtigung dieser niedrigen Spiegel als extrapolierte Werte bzw. die Annahme des kleinsten gemessenen Wertes für das entsprechende Zytokin in der Auswertung, könnte das Ergebnis beeinträchtigt haben. Ein weiterer Grund, der die Va-

lidityt der Ergebnisse beeinflusst haben k3nnte, waren die gemessenen Patientenproben. Die Patienten wurden in Monat 6 geimpft, die Zytokinmessung wurde aber aufgrund nicht vorhandener Proben in Monat 6, mit Proben von Monat 9 durchgef3hrt. M3glichlicherweise waren daher die Zytokine teilweise nicht mehr nachweisbar, was die Ergebnisse beeinflusst haben k3nnte.

#### 4.2.2 Einfluss von Vitamin D<sub>3</sub> auf die TT-Antik3rpersubklassenverteilung

Im weiteren Teil der Arbeit wurden die IgG-Antik3rpersubklassen von TT vor und nach der Impfung mittels der ELISA-Methode bei Patienten der doppelblinden Placebokontrollierten Calcitriol-Studie gemessen. Hier sollte analysiert werden, ob auch die humorale Immunantwort durch Gabe von Calcitriol generell ver3ndert ist.

Hierzu wurden die IgG-Subklassen 1, IgG2 und IgG4 der Patienten vor und nach der Impfung gemessen. Bei der Subklasse IgG1 war in der Verum- und auch in der Placebogruppe jeweils ein signifikanter Anstieg der Antik3rper nach Impfung zu beobachten. Die individuellen Ver3nderungen durch die Impfung wurden f3r alle Patienten durch Subtraktion der Werte nach Impfung minus der Werte vor Impfung dargestellt. Dies wurde f3r alle Subklassen durchgef3hrt.  $\Delta$  IgG1 gab somit die Ver3nderung des Antik3rperstatus der Patienten an und es konnte die Placebogruppe mit der Verumgruppe verglichen werden. Hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen beobachtet werden, auch wenn die Calcitriol-behandelten Patienten einen leicht erh3hten IgG1-Spiegel aufwiesen. Die IgG2-Antik3rper reagierten ebenfalls signifikant auf die Boosterimpfung. Dies war unabh3ngig von der Behandlungsgruppe. Es konnte keine ver3nderte IgG2-Immunantwort bei den Calcitriol-behandelten Patienten festgestellt werden. Die Antik3rper titer lagen nahezu auf selbem Niveau. Bei Analyse der IgG4-Subklasse kam man auf dieselben Ergebnisse. Auch hier stiegen die Titer in beiden Behandlungsgruppen nach Impfung signifikant an, aber  $\Delta$  IgG4 war bei den Calcitriol-behandelten Patienten im Vergleich zu der Placebogruppe nicht ver3ndert. Es konnte somit kein Effekt von Calcitriol auf die humorale Immunantwort nachgewiesen werden.

Tetanus Toxoid (TT) diente in dieser Arbeit als Modellantigen, um m3gliche Ver3nderungen in der humoralen Immunantwort unter Calcitrioltherapie bei Patienten feststellen zu k3nnen. In der Maus lassen sich die Antik3rpersubklassen mit bestimmten T<sub>H</sub>-Ph3notypen zuordnen. So konnte festgestellt werden, dass der T<sub>H</sub>2-Ph3notyp mit einer vermehrten Produktion von IgG1-Antik3rpern assoziiert ist (Snapper and Paul 1987; Tian, Lehmann et al. 1997). Die Zuordnung beim Menschen erscheint hier komplexer

und nicht so eindeutig. Man geht davon aus, dass die Antikörpersubklasse IgG4 und IgE mit einer T<sub>H</sub>2-Immunität einhergeht, da diese Subklassen mit IL-4 stimulierbar sind (King and Nutman 1993). Das vermehrte Auftreten von IgG1 scheint T<sub>H</sub>1-dominiert (Widhe, Ekerfelt et al. 1998). Da festgestellt wurde, dass Calcitriol die Immunantworten zu einem T<sub>H</sub>2-Phänotyp verschieben kann (Guillot, Semerano et al. 2010), würde man davon ausgehen, dass nach Calcitriolintervention die IgG4-Subklasse erhöht sein müsste, was nicht gezeigt werden konnte. Bei den Calcitriol-behandelten Patienten nach Revakzinierung mit TT konnte vielmehr eine Tendenz von erhöhten IgG1-Spiegeln beobachtet werden, was eine T<sub>H</sub>1-dominierende Immunantwort zeigen würde und zu den bisherigen Erkenntnissen widersprüchlich wäre. Hier müssten auch andere Faktoren, die Einfluss auf die Immunantwort haben mit in Betracht gezogen werden.

Die Korrelationen der verschiedenen IgG-Subklassen mit den Calcidolspiegeln waren nicht signifikant. Beim Vergleich mit den Calcitriolspiegeln konnte, nach Bonferroni-Korrektur, ebenfalls keine Signifikanz gezeigt werden. Diese Ergebnisse würden darauf hindeuten, dass zwischen den IgG-Subklassen keine Abhängigkeit zu den Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegeln besteht. Die humorale Immunantwort würde somit nicht durch Vitamin D<sub>3</sub> verändert. Dieses Ergebnis mag aber auch an der kleinen Fallzahl gelegen haben. Zudem waren für die Bestimmung der IgG-Subklassentiter nach Impfung nur Proben im Monat 9 verfügbar, was die Ergebnisse ebenfalls verfälscht haben könnte, da die Titer nicht direkt nach der Impfung gemessen wurden.

### 4.3 Zusammenfassung und Ausblick

Auf zellulärer Ebene kam es nach Calcitriolintervention zu einer Verminderung des Anteils an dendritischen Zellen im Vergleich zur Placebogruppe. Der Anteil der dendritische Zellsubpopulation pDC war innerhalb der Verumgruppe im Monat 9 im Vergleich zur Placebogruppe ebenfalls vermindert. Die Calcidiol-Spiegel der Patienten im Monat 9 korrelierten mit der prozentualen Veränderung der pDCs von Monat 0 zu Monat 9.

Zudem konnte eine Abhängigkeit der pDC-Subpopulation, bezogen auf die PBMCs, mit den Calcitriolspiegeln gezeigt werden. Die mDC1-Subpopulation zeigte, bezogen auf die Gesamtpopulation der DCs, eine Korrelation mit den Calcitriolspiegeln der Patienten. Patienten mit initial hohen Calcitriolspiegeln, die mit Calcitriol behandelt wurden, wiesen nach Intervention eine bessere Betazellfunktion auf als Patienten in der Kontrollgruppe. Die Genotypen CC der Einzelnukleotidpolymorphismen *FokI* (SNP *rs2228570*) und *CYP27B1* (SNP *rs10877012*) waren mit niedrigen Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegeln assoziiert. Die Zytokinmuster waren bei den Calcitriol-behandelten Patienten im Vergleich zu den Placebo-behandelten Patienten nicht signifikant verändert. Dies konnte auch bei der Analyse der Antikörpersubklassen IgG1, IgG2 und IgG4 gegen TT festgestellt werden.

Ein weiterer Forschungsansatz, der die immunmodulierende Eigenschaft von Calcitriol möglicherweise bestätigen könnte, ist die Untersuchung der Wirkung von Calcitriol auf T-Zellebene. Ein Experiment, das in dieser Arbeit aufgrund von unzureichenden Ergebnissen leider nicht mehr beschrieben werden konnte, war ein T-Zellproliferationsassay. Hier sollte herausgefunden werden, ob Calcitriol eine veränderte Reaktivität von CD4<sup>+</sup>-Gedächtnis-T-Zellen bewirken kann und ob die T-zellvermittelte Produktion von Zytokinen bei Calcitriol-behandelten Patienten gegenüber Placebo behandelten Patienten verändert ist. Dazu wurden die CD45RO<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mittels MACS-Technologie isoliert und mit CFSE gefärbt und mit TT bzw. einer Positiv- und Negativkontrolle stimuliert. Zudem sollte eine intrazelluläre Zytokinbestimmung der CD45RO<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erfolgen. Die erwarteten Ergebnisse werden Einblick in die Wirkung von Calcitriol auf T-Zellebene bringen.

Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse könnte zudem eine Studie mit neu manifestierten T1D-Patienten, die nach dem CYP27B1-Genotyp und den Calcitriolspiegeln stratifiziert werden, einen möglichen immunmodulatorischen Effekt auf dendritische Zellsubpopulationen, der mit dem Erhalt des C-Peptids einhergeht, bestätigen. Für den

---

Erfolg einer solchen Immuntherapie spielen sicherlich auch der Zeitpunkt der Intervention und die Dosis des Therapeutikums eine Rolle. Möglicherweise würde eine Therapie mit Calcitriol bei Hochrisikopatienten noch vor Manifestation der Erkrankung und damit besserer Betazellfunktion den Krankheitsverlauf verzögern oder sogar stoppen können. Auch könnte versucht werden mit einer höheren Dosis von Calcitriol (bis zu 1 µg/d) oder einer Kombinationstherapie mit immunregulatorischem und antiinflammatorischem Ansatz, z.B. mit Calcitriol und einem Zytokinrezeptor-Antagonisten, die Betazellfunktion zu erhalten und so den Krankheitsverlauf des T1D zu verzögern bzw. zu verhindern. Experimente mit so genannten Calcitriolanaloga, die eine höhere Immunsuppression aufweisen, metabolischer stabiler sind und weniger Hyperkalzämien hervorrufen als Calcitriol, brachten bisher vielversprechende Ergebnisse und spielen bei der Erforschung eines Wirkstoffs zum Einsatz bei der Behandlung des T1D in der Zukunft womöglich eine größere Rolle (Zella and DeLuca 2003).

## 5 ZUSAMMENFASSUNG/ ABSTRAKT

Typ-1-Diabetes (T1D) ist eine Autoimmunerkrankung, bei der die pankreatischen Inselzellen von autoreaktiven T-Zellen zerstört werden. Die Ätiologie des T1D ist noch nicht vollständig geklärt. Fest steht, dass die Erkrankung mit einer gestörten Selbsttoleranz des Organismus einhergeht. Nachweisbar ist dies durch so genannte Autoantikörper, die sich schon vor Manifestation der Erkrankung nachweisen lassen.

**Kohorte:** Grundlage für diese Arbeit bildete die Calcitriol-Studie, die am Institut für Diabetesforschung in München im November 2000 bis 2006 durchgeführt wurde. 40 neu manifestierte Typ-1-Diabetiker wurden in die Studie eingeschlossen, von denen 22 Patienten täglich über 9 Monate 0.25 µg Calcitriol bekamen bzw. 18 Patienten ein Placebo. Die Intervention war sicher, es konnte aber keine Verbesserung der Betazellfunktion beobachtet werden.

**Zielstellung:** In der vorliegenden Arbeit sollte herausgefunden werden, ob die Gabe von Calcitriol dennoch einen immunologischen Effekt zeigt und es so möglich ist, evtl. Responder für eine weitere Intervention zu identifizieren.

**Methoden:** Für die Analyse stand Probenmaterial der Studienteilnehmer zur Verfügung. Es wurden dendritische Zellsubpopulationen aus PBMCs isoliert und quantitativ bestimmt. Zudem wurden die Calcidiol- und Calcitriolspiegel, sowie 16 Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) des Vitamin-D-Metabolismus der Patienten bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit metabolischen Daten, wie dem C-Peptid in Beziehung gesetzt, um mögliche Abhängigkeiten analysieren zu können. Um den Einfluss von Calcitriol auf die zelluläre und humorale Immunantwort beantworten zu können, wurde den Patienten im Verlauf der Studie im Monat 6 eine Boosterimpfung mit dem Modellantigen Tetanus Toxoid (TT) verabreicht. Es wurden die Zytokinspiegel IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 und IL-10 im Serum, sowie die Antikörpersubklassen IgG1, IgG2 und IgG4 bestimmt und deren Spiegel vor und nach der Impfung zwischen der Placebo- und der Verumgruppe verglichen.

### **Ergebnisse:**

**Wirkung auf dendritische Zellpopulationen:** Im Verlauf der Intervention kam es zu einer signifikanten Abnahme der dendritischen Zellen (DC) bei den Calcitriol-behandelten Patienten ( $p=0.03$ ). Für die Placebogruppe wurde dies nicht beobachtet. Nach 9 Monaten Behandlung bestand zwischen beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied im Anteil der DC an der Gesamtzahl mononukleärer Zellen (Median 0.71%,

IQR 0.49-0.93, bei Calcitriol-Behandlung; vs. 0.96%, IQR 0.67-1.17, bei Placebo-Behandlung;  $p=0.04$ ). Hinsichtlich der DC-Subpopulationen wurde ein signifikant niedrigerer Anteil an plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) bei den Calcitriol-behandelten Patienten beobachtet (Median 0.34%, IQR 0.22-0.48; vs. 0.49%, IQR 0.34-0.82;  $p=0.03$ ); die myeloiden dendritischen Zellen (mDC1 und mDC2) unterschieden sich dagegen nicht. Weiter sollte herausgefunden werden, ob die Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel die dendritischen Zellsubpopulationen beeinflussen. Hier konnte gezeigt werden, dass die Calcidiol-Spiegel der Patienten im Monat 9 mit der prozentualen Veränderung der pDCs von Monat 0 auf Monat 9 korrelierten, d.h. je stärker die pDCs abnahmen, desto höher waren die Calcidiol-Spiegel ( $p=0.04$ ,  $r=-0.34$ ). Zudem konnte eine Abhängigkeit der pDC-Subpopulation, bezogen auf die PBMCs, mit den Calcitriolspiegeln gezeigt werden ( $p=0.007$ ,  $r=-0.25$ ). Die mDC1-Subpopulation zeigte, bezogen auf die Gesamtpopulation der DCs eine Korrelation mit den Calcitriolspiegeln der Patienten ( $p=0.05$ ,  $r=0.18$ ).

**Wirkung auf Betazellfunktion:** Eine Abhängigkeit des Nüchtern-C-Peptids mit den Calcidiol- bzw. den Calcitriolspiegeln konnte nicht beobachtet werden. In einer Subanalyse konnte jedoch gezeigt werden, dass die residuale Betazellfunktion bei Patienten der Verumgruppe mit initial hohen Calcitriolspiegeln über 9 Monate nahezu erhalten werden konnte. Bei Patienten der Placebogruppe bzw. bei Patienten mit initialen niedrigen Calcitriolspiegeln konnte dies nicht beobachtet werden. Zudem korrelierte das Nüchtern-C-Peptid der Patienten mit der prozentualen Veränderung der pDCs von Monat 0 zu Monat 9 ( $p=0.03$ ).

**Wirkung von Genetik:** Bezüglich der Einzelnukleotidpolymorphismen waren niedrige Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel (Calcidiol bzw. Calcitriol) mit dem CC-Genotyp des CYP27B1-Gens, der mit einem erhöhten T1D-Risiko assoziiert ist, verbunden. Zudem wies der CC-Genotyp des Vitamin-D-Rezeptorgenpolymorphismus FokI (SNP rs2228570) niedrigere Calcidiolspiegel als die Genotypen CT ( $p=0.01$ ) und TT auf.

**Wirkung auf Zytokinspiegel:** In einem weiteren Schritt sollte der Einfluss auf die zelluläre und humorale Immunantwort gegen das Modellantigen TT nach Boosterimpfung untersucht werden. Es konnte kein Unterschied im Zytokinmuster, weder vor vs. nach Revakzinierung, noch zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt werden. Um einen möglichen Einfluss von Vitamin D<sub>3</sub> auf die Zytokinspiegel zu untersuchen, wurden die getesteten Zytokinspiegel im Monat 0 und Monat 9 mit den entsprechenden Calcidi-

ol- bzw. den Calcitriolspiegeln in Beziehung gesetzt. Hier ergaben sich nach Korrektur für multiples Testen (Bonferroni-Methode) ebenfalls keine Signifikanzen.

**Wirkung auf TT-Antikörpersubklassen:** Bei allen Antikörpersubklassen (IgG1, IgG2 und IgG4) konnte innerhalb der Behandlungsgruppen vor Impfung im Vergleich zu nach Impfung ein signifikanter Anstieg der entsprechenden IgG-Subklassen beobachtet werden. Die Spiegel der einzelnen Subklassen waren nach Revakzination bei Vergleich der Verumgruppe mit der Placebogruppe allerdings nicht mehr signifikant verändert. Die IgG-Subklassen zeigten zudem keine Abhängigkeit zu den Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegeln.

**Diskussion:** Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass eine adjuvante Behandlung mit täglich 0,25 µg Calcitriol bei neu manifestierten T1D-Patienten die zelluläre Immunantwort verändert. So gab es Hinweise darauf, dass in Abhängigkeit von Calcitriol immunologische Veränderungen zu sehen sind, die auch von Genen beeinflusst werden. In einer Subpopulation wirkten sich hohe Calcitriolspiegel zudem positiv auf die Betazellfunktion der Probanden aus. Dies lässt auf eine immunmodulierende Wirkung von Calcitriol schließen, wobei Interventionsstudien mit größeren Fallzahlen nötig scheinen, um die Ergebnisse bestätigen zu können. Hierbei scheint es generell sinnvoll, vor Interventionen auf eine gute Aufsättigung der Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel zu achten.

## SUMMARY/ ABSTRACT

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease where the pancreatic islets are destroyed by autoreactive T-cells. The origin of T1D is not fully understood. The disease is characterized by the loss of self-tolerance to the insulin-producing  $\beta$ -cells in the pancreas. Autoantibodies are detectable already before onset of the disease.

**Cohort:** This thesis is based on the Calcitriol study which was conducted at the Institute of Diabetes research in Munich between November 2000 until 2006. 40 new-onset type 1 diabetes (T1D) patients were enrolled in the study. 22 patients were administered to 0.25  $\mu$ g calcitriol daily and 18 patients to a placebo for nine months. The intervention was safe, but there was no effect on beta-cell residual function.

**Objective:** The aim of this thesis was to find out, whether an intervention with calcitriol shows an immunological effect and thus responders can be identified for further interventions.

**Methods:** For the analysis sample material from the patients was provided.

Dendritic cell (DC) subsets were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and quantitatively analysed. Moreover calcidiol and calcitriol levels, as well as 16 different single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the vitamin D metabolism were measured. The results were correlated with the metabolic data to analyze possible significances.

To measure the influence of calcitriol to the cellular and humoral immune response, the patients were administered to a booster vaccination of tetanus toxoid (TT) in month 6 of the study. The cytokines IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 und IL-10 and antibody subclasses IgG1, IgG2 and IgG4 were determined before and after vaccination and finally compared between the two treatment groups.

### Results:

**Effect on dendritic cell populations:** In the course of the intervention a significant decrease of the DCs could be observed in the treatment group ( $p=0.03$ ), but not in the placebo group. After 9 months of intervention a significant difference between the ratio of DC, relatively to the PBMCs, could be observed (median 0.71%, IQR 0.49-0.93, on calcitriol-treatment; vs. 0.96%, IQR 0.67-1.17, on placebo treatment;  $p=0.04$ ). Regarding the DC subsets a significant lower ratio of plasmacytoid dendritic cells (pDCs) within the calcitriol treated patients was observed (median 0.34%, IQR 0.22-0.48; vs. 0.49%, IQR 0.34-0.82;  $p=0.03$ ). Within the myeloid dendritic cells type 1 (mDC1) and type 2

(mDC2) no differences were found. It was also in question whether the vitamin D<sub>3</sub> levels affect the dendritic cell subpopulations. It was shown, that the calcidiol levels of the patients in month 9 correlated with the percentage change of the pDC from month 0 to month 9, i.e. the more the pDCs decreased, the higher the calcidiol levels have been ( $p=0.04$ ,  $r=-0.34$ ). Moreover a correlation between the pDC subpopulation, based on the PBMCs, and the calcitriol levels could be shown ( $p=0.007$ ,  $r=-0.25$ ). The mDC1 subpopulation showed, based on the DCs, a correlation with the calcitriol levels ( $p=0.05$ ,  $r=0.18$ ).

**Effect on betacell function:** A correlation of the fasting C-peptide with the calcidiol and calcitriol levels, respectively, could not be observed. In a subanalysis it was found out, that the residual  $\beta$ -cell function for calcitriol treated patients with high initial calcitriol levels could almost be maintained for 9 months. This finding was not observed with placebo treated patients or patients with initial low calcitriol levels. Moreover the fasting C-peptide correlated with the percentage change of the pDC from month 0 to month 9 ( $p=0.03$ ).

**Effect from genetics:** Concerning the SNPs low vitamin D<sub>3</sub> levels (Calcidiol and Calcitriol, respectively) correlated with the CC genotype of the CYP27B1 gene, which is associated with a higher T1D risk. Furthermore the CC genotype of the vitamin D receptor gene polymorphism FokI (SNP rs 2228570) showed lower calcidiol levels than the genotype CT ( $p=0.01$ ) and TT.

**Effect on cytokine levels:** No difference has been observed within the cytokine levels neither before and after booster vaccination nor between the calcitriol treated patients compared to the placebo treated patients. The tested cytokine levels were compared to the calcidiol and calcitriol levels, respectively to analyse a possible effect of vitamin D<sub>3</sub>. After correction regarding multiple testing (Bonferroni method) no significances were shown.

**Effect on TT antibody subclasses:** The antibody subclasses IgG1, IgG2 and IgG4 were significantly changed after booster vaccination between the two groups. The titers of the different subclasses however, were not significantly changed after booster immunization, when comparing placebo group to the verum group.

**Discussion:** In conclusion, an adjuvant treatment with 0.25  $\mu$ g calcitriol on new-onset type 1 diabetic patients modulates the cellular immune response. It has been shown that calcitriol induced immunological changes, which were also influenced by genetics. A subpopulation showed, that high calcitriol levels were positively related to the beta cell

function. This suggests an immune modulating effect of calcitriol, however, bigger prospective cohort studies seem necessary to prove these results. Overall, it appears to be useful to make sure that the vitamin D<sub>3</sub> levels are well saturated before intervention studies.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Achenbach, P. et al. (2008). „Frühdiagnostik bei Typ1-Diabetes.“ Diabetologe 4:47-58
- Achenbach, P., E. Bonifacio, et al. (2005). "Natural history of type 1 diabetes." Diabetes **54 Suppl 2**: S25-31.
- Achenbach, P., M. Hummel, et al. (2013). "Characteristics of rapid vs slow progression to type 1 diabetes in multiple islet autoantibody-positive children." Diabetologia **56(7)**: 1615-1622.
- Achenbach, P., K. Warncke, et al. (2004). "Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics." Diabetes **53(2)**: 384-392.
- Achenbach, P. and A. G. Ziegler (2005). "Diabetes-related antibodies in euglycemic subjects." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **19(1)**: 101-117.
- Adorini, L. (2003). "Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting autoimmune diabetes." Ann N Y Acad Sci **987**: 258-261.
- Adorini, L. (2005). "Intervention in autoimmunity: the potential of vitamin D receptor agonists." Cell Immunol **233(2)**: 115-124.
- Ahonen, C. L., C. L. Doxsee, et al. (2004). "Combined TLR and CD40 triggering induces potent CD8+ T cell expansion with variable dependence on type I IFN." J Exp Med **199(6)**: 775-784.
- Allen, J. S., K. Pang, et al. (2009). "Plasmacytoid dendritic cells are proportionally expanded at diagnosis of type 1 diabetes and enhance islet autoantigen presentation to T-cells through immune complex capture." Diabetes **58(1)**: 138-145.
- Almerighi, C., A. Sinistro, et al. (2009). "1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits CD40L-induced pro-inflammatory and immunomodulatory activity in human monocytes." Cytokine **45(3)**: 190-197.
- American Diabetes, A. (2013). "Diagnosis and classification of diabetes mellitus." Diabetes Care **36 Suppl 1**: S67-74.
- Angel, B., J. L. Santos, et al. (2004). "Vitamin D receptor polymorphism and susceptibility to type 1 diabetes in Chilean subjects: a case-parent study." Eur J Epidemiol **19(12)**: 1085-1087.
- Armas, L. A., B. W. Hollis, et al. (2004). "Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans." J Clin Endocrinol Metab **89(11)**: 5387-5391.
- Atkinson, M. A. and A. Chervonsky (2012). "Does the gut microbiota have a role in type 1 diabetes? Early evidence from humans and animal models of the disease." Diabetologia **55(11)**: 2868-2877.

- Atkinson, M. A. and G. S. Eisenbarth (2001). "Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment." Lancet **358**(9277): 221-229.
- Badenhoop, K., H. Kahles, et al. (2012). "Vitamin D, immune tolerance, and prevention of type 1 diabetes." Curr Diab Rep **12**(6): 635-642.
- Baeke, F., H. Korf, et al. (2010). "Human T lymphocytes are direct targets of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the immune system." J Steroid Biochem Mol Biol **121**(1-2): 221-227.
- Baeke, F., H. Korf, et al. (2011). "The vitamin D analog, TX527, promotes a human CD4+CD25highCD127low regulatory T cell profile and induces a migratory signature specific for homing to sites of inflammation." J Immunol **186**(1): 132-142.
- Baeke, F., T. Takiishi, et al. (2010). "Vitamin D: modulator of the immune system." Curr Opin Pharmacol **10**(4): 482-496.
- Bailey, R., J. D. Cooper, et al. (2007). "Association of the vitamin D metabolism gene CYP27B1 with type 1 diabetes." Diabetes **56**(10): 2616-2621.
- Baschal, E. E. and G. S. Eisenbarth (2008). "Extreme genetic risk for type 1A diabetes in the post-genome era." J Autoimmun **31**(1): 1-6.
- Basit, S. (2013). "Vitamin D in health and disease: a literature review." Br J Biomed Sci **70**(4): 161-172.
- Baz, L., N. Muller, et al. (2012). "Differences in the quality of diabetes care caused by social inequalities disappear after treatment and education in a tertiary care centre." Diabet Med **29**(5): 640-645.
- Beaudoin, L., J. Diana, et al. (2014). "Plasmacytoid dendritic cells license regulatory T cells, upon iNKT-cell stimulation, to prevent autoimmune diabetes." Eur J Immunol.
- Bendik, I., A. Friedel, et al. (2014). "Vitamin D: a critical and essential micronutrient for human health." Front Physiol **5**: 248.
- Bengtsson, A. A., G. Sturfelt, et al. (2000). "Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies." Lupus **9**(9): 664-671.
- Berer, A., J. Stockl, et al. (2000). "1,25-Dihydroxyvitamin D(3) inhibits dendritic cell differentiation and maturation in vitro." Exp Hematol **28**(5): 575-583.
- Bikle, D. D., P. K. Siiteri, et al. (1985). "Serum protein binding of 1,25-dihydroxyvitamin D: a reevaluation by direct measurement of free metabolite levels." J Clin Endocrinol Metab **61**(5): 969-975.

- Billaudel, B. J., P. M. Boursol, et al. (1995). "Regulatory effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on insulin release and calcium handling via the phospholipid pathway in islets from vitamin D-deficient rats." J Endocrinol Invest **18**(9): 673-682.
- Blanco, P., A. K. Palucka, et al. (2008). "Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases." Cytokine Growth Factor Rev **19**(1): 41-52.
- Bock, G., B. Prietl, et al. (2011). "The effect of vitamin D supplementation on peripheral regulatory T cells and beta cell function in healthy humans: a randomized controlled trial." Diabetes Metab Res Rev **27**(8): 942-945.
- Bonifacio, E., S. Genovese, et al. (1995). "Islet autoantibody markers in IDDM: risk assessment strategies yielding high sensitivity." Diabetologia **38**(7): 816-822.
- Boonstra, A., F. J. Barrat, et al. (2001). "1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells." J Immunol **167**(9): 4974-4980.
- Boursol, P. M., A. Faure-Dussert, et al. (1997). "Modulatory role of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on pancreatic islet insulin release via the cyclic AMP pathway in the rat." Br J Pharmacol **121**(4): 751-758.
- Brock, K. E., W. Y. Huang, et al. (2011). "Diabetes prevalence is associated with serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D in US middle-aged Caucasian men and women: a cross-sectional analysis within the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial." Br J Nutr **106**(3): 339-344.
- Brod, S. A., M. Malone, et al. (1998). "Ingested interferon alpha suppresses type I diabetes in non-obese diabetic mice." Diabetologia **41**(10): 1227-1232.
- Cavalier, E., P. Delanaye, et al. (2009). "Vitamin D: current status and perspectives." Clin Chem Lab Med **47**(2): 120-127.
- Cella, M., F. Facchetti, et al. (2000). "Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization." Nat Immunol **1**(4): 305-310.
- Cella, M., D. Jarrossay, et al. (1999). "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." Nat Med **5**(8): 919-923.
- Chang, T. J., H. H. Lei, et al. (2000). "Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population." Clin Endocrinol (Oxf) **52**(5): 575-580.
- Chao, C. C., H. K. Sytwu, et al. (1999). "The role of MHC class II molecules in susceptibility to type I diabetes: identification of peptide epitopes and characterization of the T cell repertoire." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9299-9304.

- Chehadeh, W., J. Weill, et al. (2000). "Increased level of interferon-alpha in blood of patients with insulin-dependent diabetes mellitus: relationship with coxsackievirus B infection." J Infect Dis **181**(6): 1929-1939.
- Chen, S., G. P. Sims, et al. (2007). "Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation." J Immunol **179**(3): 1634-1647.
- Chen, X., L. H. Makala, et al. (2008). "Type 1 diabetes patients have significantly lower frequency of plasmacytoid dendritic cells in the peripheral blood." Clin Immunol **129**(3): 413-418.
- Chinnadurai, R., E. K. Waller, et al. (2013). "From Single Nucleotide Polymorphisms to Constant Immunosuppression: Mesenchymal Stem Cell Therapy for Autoimmune Diseases." Biomed Res Int **2013**: 929842.
- Christakos, S., M. Raval-Pandya, et al. (1996). "Genomic mechanisms involved in the pleiotropic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3." Biochem J **316** ( Pt 2): 361-371.
- Chun, R. F., B. E. Peercy, et al. (2013). "Vitamin D and DBP: The free hormone hypothesis revisited." J Steroid Biochem Mol Biol.
- Colonna, M., G. Trinchieri, et al. (2004). "Plasmacytoid dendritic cells in immunity." Nat Immunol **5**(12): 1219-1226.
- Cooper, J. D., D. J. Smyth, et al. (2011). "Inherited variation in vitamin D genes is associated with predisposition to autoimmune disease type 1 diabetes." Diabetes **60**(5): 1624-1631.
- Correale, J., M. C. Ysraelit, et al. (2009). "Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis." Brain **132**(Pt 5): 1146-1160.
- Couper, J. J., C. Steele, et al. (1999). "Lack of association between duration of breast-feeding or introduction of cow's milk and development of islet autoimmunity." Diabetes **48**(11): 2145-2149.
- Csorba, T. R., A. W. Lyon, et al. (2010). "Autoimmunity and the pathogenesis of type 1 diabetes." Crit Rev Clin Lab Sci **47**(2): 51-71.
- Curtsinger, J. M. and M. F. Mescher (2010). "Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation." Curr Opin Immunol **22**(3): 333-340.
- D'Ambrosio, D., M. Cippitelli, et al. (1998). "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 **101**(1): 252-262.
- Davicino, R. C., R. J. Elicabe, et al. (2011). "Coupling pathogen recognition to innate immunity through glycan-dependent mechanisms." Int Immunopharmacol **11**(10): 1457-1463.

- Davies, J. L., Y. Kawaguchi, et al. (1994). "A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes." Nature **371**(6493): 130-136.
- Devendra, D., E. Liu, et al. (2004). "Type 1 diabetes: recent developments." BMJ **328**(7442): 750-754.
- Di Domizio, J., A. Blum, et al. (2009). "TLR7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type I IFN." Blood **114**(9): 1794-1802.
- Diana, J., Y. Simoni, et al. (2013). "Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes." Nat Med **19**(1): 65-73.
- Doorenbos, C. R., J. van den Born, et al. (2009). "Possible renoprotection by vitamin D in chronic renal disease: beyond mineral metabolism." Nat Rev Nephrol **5**(12): 691-700.
- Dusso, A. S., A. J. Brown, et al. (2005). "Vitamin D." Am J Physiol Renal Physiol **289**(1): F8-28.
- Dzionic, A., A. Fuchs, et al. (2000). "BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood." J Immunol **165**(11): 6037-6046.
- Eftekharian, M. M., A. H. Zarnani, et al. (2010). "In vivo effects of calcitriol on phenotypic and functional properties of dendritic cells." Iran J Immunol **7**(2): 74-82.
- Fabris, P., C. Betterle, et al. (1998). "Insulin-dependent diabetes mellitus during alpha-interferon therapy for chronic viral hepatitis." J Hepatol **28**(3): 514-517.
- Fallarino, F., C. Asselin-Paturel, et al. (2004). "Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement." J Immunol **173**(6): 3748-3754.
- Farkas, L., K. Beiske, et al. (2001). "Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon-alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions." Am J Pathol **159**(1): 237-243.
- Fassbender, W. J., B. Goertz, et al. (2002). "VDR gene polymorphisms are overrepresented in german patients with type 1 diabetes compared to healthy controls without effect on biochemical parameters of bone metabolism." Horm Metab Res **34**(6): 330-337.
- Feili-Hariri, M., R. R. Flores, et al. (2006). "Dendritic cell immunotherapy for autoimmune diabetes." Immunol Res **36**(1-3): 167-173.

- Ferreira, G. B., L. Overbergh, et al. (2013). "1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 and its analogs as modulators of human dendritic cells: a comparison dose-titration study." J Steroid Biochem Mol Biol **136**: 160-165.
- Fitzgerald-Bocarsly, P. (1993). "Human natural interferon-alpha producing cells." Pharmacol Ther **60**(1): 39-62.
- Fu, Z., E. R. Gilbert, et al. (2013). "Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes." Curr Diabetes Rev **9**(1): 25-53.
- Galassetti, P. R., K. Iwanaga, et al. (2006). "Effect of prior hyperglycemia on IL-6 responses to exercise in children with type 1 diabetes." Am J Physiol Endocrinol Metab **290**(5): E833-839.
- Galicia, G. and J. L. Gommerman (2014). "Plasmacytoid dendritic cells and autoimmune inflammation." Biol Chem **395**(3): 335-346.
- Gallichan, W. S., B. Balasa, et al. (1999). "Pancreatic IL-4 expression results in islet-reactive Th2 cells that inhibit diabetogenic lymphocytes in the nonobese diabetic mouse." J Immunol **163**(3): 1696-1703.
- Garcia, D., B. Angel, et al. (2007). "VDR polymorphisms influence the immune response in type 1 diabetic children from Santiago, Chile." Diabetes Res Clin Pract **77**(1): 134-140.
- Gauzzi, M. C., C. Purificato, et al. (2005). "Suppressive effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on type I IFN-mediated monocyte differentiation into dendritic cells: impairment of functional activities and chemotaxis." J Immunol **174**(1): 270-276.
- Gerstein, H. C. (1994). "Cow's milk exposure and type I diabetes mellitus. A critical overview of the clinical literature." Diabetes Care **17**(1): 13-19.
- Gerstein, H. C. and J. VanderMeulen (1996). "The relationship between cow's milk exposure and type 1 diabetes." Diabet Med **13**(1): 23-29.
- Gianani, R. and G. S. Eisenbarth (2005). "The stages of type 1A diabetes: 2005." Immunol Rev **204**: 232-249.
- Gilliet, M., W. Cao, et al. (2008). "Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases." Nat Rev Immunol **8**(8): 594-606.
- Giulietti, A., E. van Etten, et al. (2007). "Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) works as anti-inflammatory." Diabetes Res Clin Pract **77**(1): 47-57.
- Gombart, A. F. (2009). "The vitamin D-antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection." Future Microbiol **4**(9): 1151-1165.

- Gombart, A. F., J. O'Kelly, et al. (2007). "Regulation of the CAMP gene by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in various tissues." J Steroid Biochem Mol Biol **103**(3-5): 552-557.
- Gonzalez-Navajas, J. M., J. Lee, et al. (2012). "Immunomodulatory functions of type I interferons." Nat Rev Immunol **12**(2): 125-135.
- Gorman, S., L. A. Kuritzky, et al. (2007). "Topically applied 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> enhances the suppressive activity of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells in the draining lymph nodes." J Immunol **179**(9): 6273-6283.
- Gorus, F. K., E. V. Balti, et al. (2013). "Screening for insulinoma antigen 2 and zinc transporter 8 autoantibodies: a cost-effective and age-independent strategy to identify rapid progressors to clinical onset among relatives of type 1 diabetic patients." Clin Exp Immunol **171**(1): 82-90.
- Graus, F., A. Saiz, et al. (2010). "Antibodies and neuronal autoimmune disorders of the CNS." J Neuro **257**(4): 509-517.
- Gregori, S., N. Giarratana, et al. (2002). "A 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice." Diabetes **51**(5): 1367-1374.
- Gregorian, C., J. Nakashima, et al. (2009). "Pten deletion in adult neural stem/progenitor cells enhances constitutive neurogenesis." J Neurosci **29**(6): 1874-1886.
- Griffin, M. D., W. Lutz, et al. (2001). "Dendritic cell modulation by 1 $\alpha$ ,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6800-6805.
- Guerci, A. P., B. Guerci, et al. (1994). "Onset of insulin-dependent diabetes mellitus after interferon- $\alpha$  therapy for hairy cell leukaemia." Lancet **343**(8906): 1167-1168.
- Guillot, X., L. Semerano, et al. (2010). "Vitamin D and inflammation." Joint Bone Spine **77**(6): 552-557.
- Gysemans, C. A., A. K. Cardozo, et al. (2005). "1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> modulates expression of chemokines and cytokines in pancreatic islets: implications for prevention of diabetes in nonobese diabetic mice." Endocrinology **146**(4): 1956-1964.
- Hayes, C. E., F. E. Nashold, et al. (2003). "The immunological functions of the vitamin D endocrine system." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **49**(2): 277-300.
- Heaney, R. P., R. R. Recker, et al. (2011). "Vitamin D(3) is more potent than vitamin D(2) in humans." J Clin Endocrinol Metab **96**(3): E447-452.

- Heine, G., U. Niesner, et al. (2008). "1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells." Eur J Immunol **38**(8): 2210-2218.
- Hewison, M. (2012). "An update on vitamin D and human immunity." Clin Endocrinol (Oxf) **76**(3): 315-325.
- Hinkmann, C., I. Knerr, et al. (2008). "Reduced frequency of peripheral plasmacytoid dendritic cells in type 1 diabetes." Horm Metab Res **40**(11): 767-771.
- Holick, M. F. (1995). "Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D." Am J Clin Nutr **61**(3 Suppl): 638S-645S.
- Holick, M. F. (2009). "Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application." Ann Epidemiol **19**(2): 73-78.
- Hou, J., C. Said, et al. (1994). "Antibodies to glutamic acid decarboxylase and P2-C peptides in sera from coxsackie virus B4-infected mice and IDDM patients." Diabetes **43**(10): 1260-1266.
- Hummel, M., E. Bonifacio, et al. (2004). "Brief communication: early appearance of islet autoantibodies predicts childhood type 1 diabetes in offspring of diabetic parents." Ann Intern Med **140**(11): 882-886.
- Hummel, M., M. Fuchtenbusch, et al. (2000). "No major association of breast-feeding, vaccinations, and childhood viral diseases with early islet autoimmunity in the German BABYDIAB Study." Diabetes Care **23**(7): 969-974.
- Hyponen, E., M. G. Kenward, et al. (1999). "Infant feeding, early weight gain, and risk of type 1 diabetes. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group." Diabetes Care **22**(12): 1961-1965.
- Hyponen, E., E. Laara, et al. (2001). "Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study." Lancet **358**(9292): 1500-1503.
- Iellem, A., M. Mariani, et al. (2001). "Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells." J Exp Med **194**(6): 847-853.
- Ito, T., R. Amakawa, et al. (2001). "Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs." J Immunol **166**(5): 2961-2969.
- Ito, T., M. Inaba, et al. (1999). "A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells." J Immunol **163**(3): 1409-1419.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.
- Jarrossay, D., G. Napolitani, et al. (2001). "Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol **31**(11): 3388-3393.

- Jayasimhan, A., K. P. Mansour, et al. (2014). "Advances in our understanding of the pathophysiology of Type 1 diabetes: lessons from the NOD mouse." Clin Sci (Lond) **126**(1): 1-18.
- Jeffery, L. E., F. Burke, et al. (2009). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3." J Immunol **183**(9): 5458-5467.
- Jegalian, A. G., F. Facchetti, et al. (2009). "Plasmacytoid dendritic cells: physiologic roles and pathologic states." Adv Anat Pathol **16**(6): 392-404.
- Jones, G. (2007). "Expanding role for vitamin D in chronic kidney disease: importance of blood 25-OH-D levels and extra-renal 1alpha-hydroxylase in the classical and nonclassical actions of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3)." Semin Dial **20**(4): 316-324.
- Kaden, J., S. G. A, et al. (2002). "Cysteine-mediated electron transfer in syntrophic acetate oxidation by cocultures of *Geobacter sulfurreducens* and *Wolinella succinogenes*." Arch Microbiol **178**(1): 53-58.
- Kadowaki, N., S. Antonenko, et al. (2000). "Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity." J Exp Med **192**(2): 219-226.
- Kadowaki, N., S. Ho, et al. (2001). "Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens." J Exp Med **194**(6): 863-869.
- Kantarova, D. and M. Buc (2007). "Genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in humans." Physiol Res **56**(3): 255-266.
- Karthaus, N., A. B. van Spriel, et al. (2013). "Vitamin D Controls Murine and Human Plasmacytoid Dendritic Cell Function." J Invest Dermatol.
- Kaseda, R., M. Hosojima, et al. (2011). "Role of megalin and cubilin in the metabolism of vitamin D(3)." Ther Apher Dial **15 Suppl 1**: 14-17.
- Kaufman, D. L., M. G. Erlander, et al. (1992). "Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus." J Clin Invest **89**(1): 283-292.
- Kawasaki, E. and K. Eguchi (2006). "Genetics of fulminant type 1 diabetes." Ann N Y Acad Sci **1079**: 24-30.
- Keymeulen, B., M. Walter, et al. (2010). "Four-year metabolic outcome of a randomised controlled CD3-antibody trial in recent-onset type 1 diabetic patients depends on their age and baseline residual beta cell mass." Diabetologia **53**(4): 614-623.
- King, C. L. and T. B. Nutman (1993). "IgE and IgG subclass regulation by IL-4 and IFN-gamma in human helminth infections. Assessment by B cell precursor frequencies." J Immunol **151**(1): 458-465.

- Korf, H., M. Wenes, et al. (2012). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 curtails the inflammatory and T cell stimulatory capacity of macrophages through an IL-10-dependent mechanism." Immunobiology **217**(12): 1292-1300.
- Lacey, D. L., J. Axelrod, et al. (1987). "Vitamin D affects proliferation of a murine T helper cell clone." J Immunol **138**(6): 1680-1686.
- Lande, R. and M. Gilliet (2010). "Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses." Ann N Y Acad Sci **1183**: 89-103.
- Lang, K. S., M. Recher, et al. (2005). "Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease." Nat Med **11**(2): 138-145.
- Langer, J., M. Penna-Martinez, et al. (2013). "Time trend of UVB irradiation and the vitamin D concentration in German type 1 diabetes patients." J Steroid Biochem Mol Biol **136**: 218-220.
- Lee, H. S., T. Briese, et al. (2013). "Next-generation sequencing for viruses in children with rapid-onset type 1 diabetes." Diabetologia **56**(8): 1705-1711.
- Lee, L. F., B. Xu, et al. (2005). "The role of TNF-alpha in the pathogenesis of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse: analysis of dendritic cell maturation." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(44): 15995-16000.
- Lempainen, J. and J. Ilonen (2012). "Influence of type 1 diabetes genes on disease progression: similarities and differences between countries." Curr Diab Rep **12**(5): 447-455.
- Leone, T., E. Coast, et al. (2012). "Diabetes and depression comorbidity and socio-economic status in low and middle income countries (LMICs): a mapping of the evidence." Global Health **8**: 39.
- Li, Q. and H. O. McDevitt (2011). "The role of interferon alpha in initiation of type 1 diabetes in the NOD mouse." Clin Immunol **140**(1): 3-7.
- Li, Q., B. Xu, et al. (2008). "Interferon-alpha initiates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(34): 12439-12444.
- Lindberg, B., K. Ahlfors, et al. (1999). "Previous exposure to measles, mumps, and rubella--but not vaccination during adolescence--correlates to the prevalence of pancreatic and thyroid autoantibodies." Pediatrics **104**(1): e12.
- Liu, N., L. Nguyen, et al. (2008). "Altered endocrine and autocrine metabolism of vitamin D in a mouse model of gastrointestinal inflammation." Endocrinology **149**(10): 4799-4808.
- Liu, P. T., S. Stenger, et al. (2006). "Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response." Science **311**(5768): 1770-1773.

- Liu, Y. J. (2005). "IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors." Annu Rev Immunol **23**: 275-306.
- Liu, Y. J., H. Kanzler, et al. (2001). "Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation." Nat Immunol **2**(7): 585-589.
- Lopez, C., M. Comabella, et al. (2006). "Altered maturation of circulating dendritic cells in primary progressive MS patients." J Neuroimmunol **175**(1-2): 183-191.
- Lucassen, A. M., C. Julier, et al. (1993). "Susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus maps to a 4.1 kb segment of DNA spanning the insulin gene and associated VNTR." Nat Genet **4**(3): 305-310.
- Ludvigsson, J., D. Krisky, et al. (2012). "GAD65 antigen therapy in recently diagnosed type 1 diabetes mellitus." N Engl J Med **366**(5): 433-442.
- Lund, J., A. Sato, et al. (2003). "Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med **198**(3): 513-520.
- Maestro, B., J. Campion, et al. (2000). "Stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of insulin receptor expression and insulin responsiveness for glucose transport in U-937 human promonocytic cells." Endocr J **47**(4): 383-391.
- Maestro, B., S. Molero, et al. (2002). "Transcriptional activation of the human insulin receptor gene by 1,25-dihydroxyvitamin D(3)." Cell Biochem Funct **20**(3): 227-232.
- Mahon, B. D., A. Wittke, et al. (2003). "The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells." J Cell Biochem **89**(5): 922-932.
- Mallone, R. and P. van Endert (2008). "T cells in the pathogenesis of type 1 diabetes." Curr Diab Rep **8**(2): 101-106.
- Markle, J. G., D. N. Frank, et al. (2013). "Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity." Science **339**(6123): 1084-1088.
- Marques, C. D., A. T. Dantas, et al. (2010). "The importance of vitamin D levels in autoimmune diseases." Rev Bras Reumatol **50**(1): 67-80.
- Mathieu, C., C. Gysemans, et al. (2005). "Vitamin D and diabetes." Diabetologia **48**(7): 1247-1257.
- Mayr, A., M. Schlosser, et al. (2007). "GAD autoantibody affinity and epitope specificity identify distinct immunization profiles in children at risk for type 1 diabetes." Diabetes **56**(6): 1527-1533.
- McDermott, M. F., A. Ramachandran, et al. (1997). "Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indian Asians." Diabetologia **40**(8): 971-975.

- McDevitt, H. O. (1980). "Regulation of the immune response by the major histocompatibility system." N Engl J Med **303**(26): 1514-1517.
- Meloni, T., A. M. Marinaro, et al. (1997). "IDDM and early infant feeding. Sardinian case-control study." Diabetes Care **20**(3): 340-342.
- Moran, A., B. Bundy, et al. (2013). "Interleukin-1 antagonism in type 1 diabetes of recent onset: two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trials." Lancet **381**(9881): 1905-1915.
- Moss, R. B., T. Moll, et al. (2004). "Th1/Th2 cells in inflammatory disease states: therapeutic implications." Expert Opin Biol Ther **4**(12): 1887-1896.
- Naik, E. and V. M. Dixit (2011). "Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production." J Exp Med **208**(3): 417-420.
- Naserke, H. E., A. G. Ziegler, et al. (1998). "Early development and spreading of autoantibodies to epitopes of IA-2 and their association with progression to type 1 diabetes." J Immunol **161**(12): 6963-6969.
- Nepom, G. T., M. Ehlers, et al. (2013). "Anti-cytokine therapies in T1D: Concepts and strategies." Clin Immunol.
- Nestle, F. O., C. Conrad, et al. (2005). "Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production." J Exp Med **202**(1): 135-143.
- Nikolic, T., J. M. Welzen-Coppens, et al. (2009). "Plasmacytoid dendritic cells in autoimmune diabetes - potential tools for immunotherapy." Immunobiology **214**(9-10): 791-799.
- Norman, A. W. (2008). "From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health." Am J Clin Nutr **88**(2): 491S-499S.
- Norval, M., L. O. Bjorn, et al. (2010). "Is the action spectrum for the UV-induced production of previtamin D3 in human skin correct?" Photochem Photobiol Sci **9**(1): 11-17.
- Orban, T., B. Bundy, et al. (2011). "Co-stimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial." Lancet **378**(9789): 412-419.
- Ouyang, W., J. K. Kolls, et al. (2008). "The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation." Immunity **28**(4): 454-467.
- Overbergh, L., B. Decallonne, et al. (2000). "Identification and immune regulation of 25-hydroxyvitamin D-1-alpha-hydroxylase in murine macrophages." Clin Exp Immunol **120**(1): 139-146.

- Overbergh, L., B. Decallonne, et al. (2000). "1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 induces an autoantigen-specific T-helper 1/T-helper 2 immune shift in NOD mice immunized with GAD65 (p524-543)." Diabetes **49**(8): 1301-1307.
- Panierakis, C., G. Goulielmos, et al. (2009). "Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Crete, Greece." Clin Immunol **133**(2): 276-281.
- Pashenkov, M., N. Teleshova, et al. (2002). "Elevated expression of CCR5 by myeloid (CD11c+) blood dendritic cells in multiple sclerosis and acute optic neuritis." Clin Exp Immunol **127**(3): 519-526.
- Patterson, C. C., G. G. Dahlquist, et al. (2009). "Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study." Lancet **373**(9680): 2027-2033.
- Patterson, C. C., E. Gyurus, et al. (2012). "Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989-2008: evidence of non-uniformity over time in rates of increase." Diabetologia **55**(8): 2142-2147.
- Pedersen, A. W., K. Holmstrom, et al. (2009). "Phenotypic and functional markers for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3)-modified regulatory dendritic cells." Clin Exp Immunol **157**(1): 48-59.
- Penna, G. and L. Adorini (2000). "1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation." J Immunol **164**(5): 2405-2411.
- Penna, G., S. Amuchastegui, et al. (2007). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **178**(1): 145-153.
- Penna, G., A. Roncari, et al. (2005). "Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4+Foxp3+ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3." Blood **106**(10): 3490-3497.
- Pescovitz, M. D., C. J. Greenbaum, et al. (2009). "Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function." N Engl J Med **361**(22): 2143-2152.
- Pflueger, M., T. Seppanen-Laakso, et al. (2011). "Age- and islet autoimmunity-associated differences in amino acid and lipid metabolites in children at risk for type 1 diabetes." Diabetes **60**(11): 2740-2747.
- Piemonti, L., P. Monti, et al. (2000). "Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells." J Immunol **164**(9): 4443-4451.
- Pociot, F. and M. F. McDermott (2002). "Genetics of type 1 diabetes mellitus." Genes Immun **3**(5): 235-249.

- Podack, E. R., D. M. Lowrey, et al. (1988). "Function of granule perforin and esterases in T cell-mediated reactions. Components required for delivery of molecules to target cells." Ann N Y Acad Sci **532**: 292-302.
- Provvedini, D. M., C. D. Tsoukas, et al. (1983). "1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes." Science **221**(4616): 1181-1183.
- Rakocevic, G. and M. K. Floeter (2012). "Autoimmune stiff person syndrome and related myelopathies: understanding of electrophysiological and immunological processes." Muscle Nerve **45**(5): 623-634.
- Ramos-Lopez, E., P. Bruck, et al. (2007). "CYP2R1 (vitamin D 25-hydroxylase) gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes and vitamin D levels in Germans." Diabetes Metab Res Rev **23**(8): 631-636.
- Raum, D., C. A. Alper, et al. (1979). "Genetic marker for insulin-dependent diabetes mellitus." Lancet **1**(8128): 1208-1210.
- Reizis, B., A. Bunin, et al. (2011). "Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions." Annu Rev Immunol **29**: 163-183.
- Richer, M. J. and M. S. Horwitz (2009). "Coxsackievirus infection as an environmental factor in the etiology of type 1 diabetes." Autoimmun Rev **8**(7): 611-615.
- Rigby, W. F., T. Stacy, et al. (1984). "Inhibition of T lymphocyte mitogenesis by 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol)." J Clin Invest **74**(4): 1451-1455.
- Rissoan, M. C., V. Soumelis, et al. (1999). "Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation." Science **283**(5405): 1183-1186.
- Roep, B. O. (2003). "The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure." Diabetologia **46**(3): 305-321.
- Ronnblom, L. and G. V. Alm (2001). "A pivotal role for the natural interferon alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in the pathogenesis of lupus." J Exp Med **194**(12): F59-63.
- Ryba-Stanislawowska, M., M. Skrzypkowska, et al. (2013). "Loss of the balance between CD4Foxp3 regulatory T cells and CD4IL17A Th17 cells in patients with type 1 diabetes." Hum Immunol.
- Ryba-Stanislawowska, M., M. Skrzypkowska, et al. (2013). "The serum IL-6 profile and treg/th17 peripheral cell populations in patients with type 1 diabetes." Mediators Inflamm **2013**: 205284.
- Ryba, M., N. Marek, et al. (2011). "Anti-TNF rescue CD4+Foxp3+ regulatory T cells in patients with type 1 diabetes from effects mediated by TNF." Cytokine **55**(3): 353-361.

- Sadeghi, K., B. Wessner, et al. (2006). "Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns." Eur J Immunol **36**(2): 361-370.
- Salomon, B., D. J. Lenschow, et al. (2000). "B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes." Immunity **12**(4): 431-440.
- Santamaria, P. (2003). "Effector lymphocytes in islet cell autoimmunity." Rev Endocr Metab Disord **4**(3): 271-280.
- Savinov, A. Y., A. Tcherepanov, et al. (2003). "Contribution of Fas to diabetes development." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(2): 628-632.
- Saxena, V., J. K. Ondr, et al. (2007). "The countervailing actions of myeloid and plasmacytoid dendritic cells control autoimmune diabetes in the nonobese diabetic mouse." J Immunol **179**(8): 5041-5053.
- Schmidt, S. V., A. C. Nino-Castro, et al. (2012). "Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation." Front Immunol **3**: 274.
- Schutz, F. and H. Hackstein (2014). "Identification of novel dendritic cell subset markers in human blood." Biochem Biophys Res Commun **443**(2): 453-457.
- Selvaraj, P. (2011). "Vitamin D, vitamin D receptor, and cathelicidin in the treatment of tuberculosis." Vitam Horm **86**: 307-325.
- Sepa, A. and J. Ludvigsson (2006). "Psychological stress and the risk of diabetes-related autoimmunity: a review article." Neuroimmunomodulation **13**(5-6): 301-308.
- Sepa, A., J. Wahlberg, et al. (2005). "Psychological stress may induce diabetes-related autoimmunity in infancy." Diabetes Care **28**(2): 290-295.
- Sergeev, I. N. and W. B. Rhoten (1995). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 evokes oscillations of intracellular calcium in a pancreatic beta-cell line." Endocrinology **136**(7): 2852-2861.
- Shackelford, D. A., J. F. Kaufman, et al. (1982). "HLA-DR antigens: structure, separation of subpopulations, gene cloning and function." Immunol Rev **66**: 133-187.
- Shao, S., F. He, et al. (2012). "Th17 cells in type 1 diabetes." Cell Immunol **280**(1): 16-21.
- Shelbaya, S., H. Amer, et al. (2012). "Study of the role of interleukin-6 and highly sensitive C-reactive protein in diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients." Eur Rev Med Pharmacol Sci **16**(2): 176-182.

- Shimada, A., Y. Kanazawa, et al. (2008). "Evidence for association between vitamin D receptor Bsm1 polymorphism and type 1 diabetes in Japanese." J Autoimmun **30**(4): 207-211.
- Shizuru, J. A., C. Taylor-Edwards, et al. (1988). "Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T-helper lymphocytes." Science **240**(4852): 659-662.
- Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol **2**(3): 151-161.
- Siegal, F. P., N. Kadowaki, et al. (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." Science **284**(5421): 1835-1837.
- Skowera, A., R. J. Ellis, et al. (2008). "CTLs are targeted to kill beta cells in patients with type 1 diabetes through recognition of a glucose-regulated preproinsulin epitope." J Clin Invest **118**(10): 3390-3402.
- Sly, L. M., M. Lopez, et al. (2001). "1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced monocyte antimycobacterial activity is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and mediated by the NADPH-dependent phagocyte oxidase." J Biol Chem **276**(38): 35482-35493.
- Snapper, C. M. and W. E. Paul (1987). "Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production." Science **236**(4804): 944-947.
- Sobel, D. O. and B. Ahvazi (1998). "Alpha-interferon inhibits the development of diabetes in NOD mice." Diabetes **47**(12): 1867-1872.
- Staeva-Vieira, T. P. and L. P. Freedman (2002). "1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits IFN-gamma and IL-4 levels during in vitro polarization of primary murine CD4<sup>+</sup> T cells." J Immunol **168**(3): 1181-1189.
- Stasiolek, M., A. Bayas, et al. (2006). "Impaired maturation and altered regulatory function of plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis." Brain **129**(Pt 5): 1293-1305.
- Steinman, R. M., D. Hawiger, et al. (2003). "Tolerogenic dendritic cells." Annu Rev Immunol **21**: 685-711.
- Steinman, R. M. and J. Idoyaga (2010). "Features of the dendritic cell lineage." Immunol Rev **234**(1): 5-17.
- Stojanovic, V. and S. Ihle (2011). "Role of beta-hydroxybutyric acid in diabetic ketoacidosis: a review." Can Vet J **52**(4): 426-430.
- Strebelow, M., M. Schlosser, et al. (1999). "Karlsburg Type I diabetes risk study of a general population: frequencies and interactions of the four major Type I diabetes-associated autoantibodies studied in 9419 schoolchildren." Diabetologia **42**(6): 661-670.

- Sumida, T., M. Furukawa, et al. (1994). "Prevention of insulinitis and diabetes in beta 2-microglobulin-deficient non-obese diabetic mice." Int Immunol **6**(9): 1445-1449.
- Swiecki, M. and M. Colonna (2010). "Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance." Immunol Rev **234**(1): 142-162.
- Takiishi, T., C. Gysemans, et al. (2010). "Vitamin D and diabetes." Endocrinol Metab Clin North Am **39**(2): 419-446, table of contents.
- Tang, F., Q. Du, et al. (2010). "Plasmacytoid dendritic cells in antiviral immunity and autoimmunity." Sci China Life Sci **53**(2): 172-182.
- Tang, J., R. Zhou, et al. (2009). "Calcitriol suppresses antiretinal autoimmunity through inhibitory effects on the Th17 effector response." J Immunol **182**(8): 4624-4632.
- Theofilopoulos, A. N., R. Baccala, et al. (2005). "Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity." Annu Rev Immunol **23**: 307-336.
- Thomas, H. E., K. L. Graham, et al. (2012). "Proinflammatory cytokines contribute to development and function of regulatory T cells in type 1 diabetes." Ann N Y Acad Sci.
- Tian, J., P. V. Lehmann, et al. (1994). "T cell cross-reactivity between coxsackievirus and glutamate decarboxylase is associated with a murine diabetes susceptibility allele." J Exp Med **180**(5): 1979-1984.
- Tian, J., P. V. Lehmann, et al. (1997). "Determinant spreading of T helper cell 2 (Th2) responses to pancreatic islet autoantigens." J Exp Med **186**(12): 2039-2043.
- Todd, J. A. (1994). "Lawrence Lecture. The Emperor's new genes: 1993 RD Lawrence Lecture." Diabet Med **11**(1): 6-16.
- Tracy, S. and K. M. Drescher (2007). "Coxsackievirus infections and NOD mice: relevant models of protection from, and induction of, type 1 diabetes." Ann N Y Acad Sci **1103**: 143-151.
- Trembleau, S., G. Penna, et al. (2003). "IL-12 administration accelerates autoimmune diabetes in both wild-type and IFN-gamma-deficient nonobese diabetic mice, revealing pathogenic and protective effects of IL-12-induced IFN-gamma." J Immunol **170**(11): 5491-5501.
- Turpeinen, H., R. Hermann, et al. (2003). "Vitamin D receptor polymorphisms: no association with type 1 diabetes in the Finnish population." Eur J Endocrinol **149**(6): 591-596.
- Urry, Z., E. S. Chambers, et al. (2012). "The role of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and cytokines in the promotion of distinct Foxp3+ and IL-10+ CD4+ T cells." Eur J Immunol **42**(10): 2697-2708.

- van der Auwera, B., F. Schuit, et al. (1995). "Genetic susceptibility for insulin-dependent diabetes mellitus in Caucasians revisited: the importance of diabetes registries in disclosing interactions between HLA-DQ- and insulin gene-linked risk. Belgian Diabetes Registry." J Clin Endocrinol Metab **80**(9): 2567-2573.
- Van Etten, E., B. Decallonne, et al. (2003). "Analogues of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 as pluripotent immunomodulators." J Cell Biochem **88**(2): 223-226.
- van Halteren, A. G., O. M. Tysma, et al. (2004). "1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 or analogue treated dendritic cells modulate human autoreactive T cells via the selective induction of apoptosis." J Autoimmun **23**(3): 233-239.
- van Halteren, A. G., E. van Etten, et al. (2002). "Redirection of human autoreactive T-cells Upon interaction with dendritic cells modulated by TX527, an analog of 1,25 dihydroxyvitamin D(3)." Diabetes **51**(7): 2119-2125.
- Vanoirbeek, E., A. Krishnan, et al. (2011). "The anti-cancer and anti-inflammatory actions of 1,25(OH)(2)D(3)." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **25**(4): 593-604.
- Varanasi, V., L. Avanesyan, et al. (2012). "Cytotoxic mechanisms employed by mouse T cells to destroy pancreatic beta-cells." Diabetes **61**(11): 2862-2870.
- Vardi, P., A. G. Ziegler, et al. (1988). "Concentration of insulin autoantibodies at onset of type I diabetes. Inverse log-linear correlation with age." Diabetes Care **11**(9): 736-739.
- Vicchio, D., A. Yergey, et al. (1993). "Quantification and kinetics of 25-hydroxyvitamin D3 by isotope dilution liquid chromatography/thermospray mass spectrometry." Biol Mass Spectrom **22**(1): 53-58.
- von Boehmer, H. (2005). "Mechanisms of suppression by suppressor T cells." Nat Immunol **6**(4): 338-344.
- von Glehn, F., L. M. Santos, et al. (2012). "Plasmacytoid dendritic cells and immunotherapy in multiple sclerosis." Immunotherapy **4**(10): 1053-1061.
- Vuckovic, S., G. Withers, et al. (2007). "Decreased blood dendritic cell counts in type 1 diabetic children." Clin Immunol **123**(3): 281-288.
- Walter, M., T. Kaupper, et al. (2010). "No effect of the 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on beta-cell residual function and insulin requirement in adults with new-onset type 1 diabetes." Diabetes Care **33**(7): 1443-1448.
- Walter, M., A. Philotheou, et al. (2009). "No effect of the altered peptide ligand NBI-6024 on beta-cell residual function and insulin needs in new-onset type 1 diabetes." Diabetes Care **32**(11): 2036-2040.
- Wang, B., A. Gonzalez, et al. (1996). "The role of CD8+ T cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus." Eur J Immunol **26**(8): 1762-1769.

- Wang, Q., B. Xi, et al. (2012). "Quantitative assessment of the associations between four polymorphisms (FokI, Apal, BsmI, TaqI) of vitamin D receptor gene and risk of diabetes mellitus." Mol Biol Rep **39**(10): 9405-9414.
- Wang, T. J., F. Zhang, et al. (2010). "Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study." Lancet **376**(9736): 180-188.
- Wang, T. T., B. Dabbas, et al. (2010). "Direct and indirect induction by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease." J Biol Chem **285**(4): 2227-2231.
- Wang, T. T., F. P. Nestel, et al. (2004). "Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression." J Immunol **173**(5): 2909-2912.
- Weigmann, B. and C. Daniel (2012). "Treg vaccination with a strong-agonistic insulin mimetope." Curr Diab Rep **12**(5): 463-470.
- Wen, L., R. E. Ley, et al. (2008). "Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes." Nature **455**(7216): 1109-1113.
- Widhe, M., C. Ekerfelt, et al. (1998). "IgG subclasses in Lyme borreliosis: a study of specific IgG subclass distribution in an interferon-gamma-predominated disease." Scand J Immunol **47**(6): 575-581.
- Willcox, A., S. J. Richardson, et al. (2009). "Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes." Clin Exp Immunol **155**(2): 173-181.
- Winkler, C., J. Krumsiek, et al. (2012). "A strategy for combining minor genetic susceptibility genes to improve prediction of disease in type 1 diabetes." Genes Immun **13**(7): 549-555.
- Wollheim, C. B., B. Blondel, et al. (1975). "Calcium-induced insulin release in monolayer culture of the endocrine pancreas. Studies with ionophore A23187." J Biol Chem **250**(4): 1354-1360.
- Wraith, D. C., K. S. Nicolson, et al. (2004). "Regulatory CD4<sup>+</sup> T cells and the control of autoimmune disease." Curr Opin Immunol **16**(6): 695-701.
- Yim, S., P. Dhawan, et al. (2007). "Induction of cathelicidin in normal and CF bronchial epithelial cells by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>." J Cyst Fibros **6**(6): 403-410.
- Yu, L., D. T. Robles, et al. (2000). "Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: evidence for early determination of subsequent diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1701-1706.
- Yuk, J. M., D. M. Shin, et al. (2009). "Vitamin D<sub>3</sub> induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin." Cell Host Microbe **6**(3): 231-243.

- Zella, J. B. and H. F. DeLuca (2003). "Vitamin D and autoimmune diabetes." J Cell Biochem **88**(2): 216-222.
- Zella, J. B., L. C. McCary, et al. (2003). "Oral administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 completely protects NOD mice from insulin-dependent diabetes mellitus." Arch Biochem Biophys **417**(1): 77-80.
- Zhang, J., W. Li, et al. (2012). "Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and type 1 diabetes mellitus risk: an update by meta-analysis." Mol Cell Endocrinol **355**(1): 135-142.
- Zhang, Y., E. Bandala-Sanchez, et al. (2012). "Revisiting regulatory T cells in type 1 diabetes." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **19**(4): 271-278.
- Ziegler, A. G., E. Bonifacio, et al. (2012). "Age-related islet autoantibody incidence in offspring of patients with type 1 diabetes." Diabetologia **55**(7): 1937-1943.
- Ziegler, A. G., M. Hummel, et al. (1999). "Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study." Diabetes **48**(3): 460-468.
- Ziegler, A. G., M. Rewers, et al. (2013). "Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children." JAMA **309**(23): 2473-2479.
- Ziegler, A. G., S. Schmid, et al. (2003). "Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies." JAMA **290**(13): 1721-1728.

## 7 ANHANG

### Studienzeitplan für die mit Calcitriol behandelte Gruppe

Untersuchungszeitpunkt	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
nach X Studienmonaten	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	12	18
Diabetes-assoziierte Antikörper (Serum)	x			x			x			x	x	x
1,25(OH)2D3 (Serum)	x			x			x			x		x
Osteocalcin (Serum)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Calcium (Plasma)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Alkalische Phosphatase (Plasma)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Phosphat (Plasma)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Creatinin (Plasma)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Parathormon (Plasma)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
C-Peptid (0, 30, 60, 90 und 120 Min.) (Serum)		x								x		x
ELISPOT (Heparinblut)	x			x			x			x	x	x
DNA (EDTA-Blut)	x											
HbA <sub>1c</sub> (EDTA-Blut)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Calcium (Urin)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Nierensonographie	x									x		x
Kontrolle der Blutzucker-Einstellung	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Calcitriol (Rocactrol®)/ Placebogabe 1Kps.Tag (oral)	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
Tetanusauffrischung (Tetanol pur®) (i. m.)							x					

## Studienzeitplan für die Kontrollgruppe

Untersuchungszeitpunkt	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
nach X Studienmonaten	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	12	18
Diabetes-assoziierte Antikörper (Serum)	×			×			×			×	×	×
1,25(OH)2D3 (Serum)	×			×			×			×		×
C-Peptid (0, 30, 60, 90 und 120 Min.) (Serum)		×								×		×
ELISPOT (Heparinblut)	×			×			×			×	×	×
DNA (EDTA-Blut)	×											
HbA <sub>1c</sub> (EDTA-Blut)	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Kontrolle der Blutzucker-Einstellung	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Tetanusauffrischung (Tetanol pur®) (i. m.)							×					

## Vorveröffentlichungen

### Originalarbeiten:

Walter, M., ... **Foersch, J.**, et al., No effect of the 1alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on beta-cell residual function and insulin requirement in adults with new-onset type 1 diabetes. Diabetes care, 2010.33(7):p.1443-8.

### Abstrakts:

**Foersch, J.**, et al., Immunmodulierende Wirkung einer adjuvanten Behandlung mit 1α,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin D<sub>3</sub> auf dendritische Zellen bei Patienten mit neu manifestiertem Typ 1-Diabetes (Supplement DDG 2010)

Raab, J., ... **Foersch, J.**, et al., Effects of vitamin D<sub>3</sub> on beta cell function and insulin resistance in children at increased risk for type 1 diabetes (Supplement EASD 2011)

## **Danksagung**

Ich möchte denen Dank sagen, ohne die diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht hätte realisiert werden können.

Als Erstes danke ich Frau Professor Anette-Gabriele Ziegler für die Vergabe meines Promotionsthemas und für die Möglichkeit diese Dissertation am Institut für Diabetesforschung durchführen zu können. Auch für die Teilnahme an Kongressen und Workshops im In- und Ausland bin ich ihr dankbar.

Weiterer Dank gilt Privatdozent Dr. Peter Achenbach, der meine Arbeit betreut hat.

Zudem danke ich Herrn Professor Martin Hrabé de Angelis und Herrn Professor Hans-Rudolf Fries für die Bereitschaft als 2. Prüfer bzw. als Vorsitzender der Prüfungskommission mitgewirkt zu haben.

Der größte Dank gilt meiner Familie - Papa, Markus, Simon, Katharina und Frank - sowie meinen Freunden, die mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen: Dr. Bettina Brackertz, Cedric Essi, Dr. Stefanie Fülöp, Sabrina Häußermann, Dr. Dmitrij Ljaschenko.

Ganz besonders danken will ich meiner verstorbenen Mutter, die mir mit ihrer Stärke und Lebenslust die unerschütterliche Energie gegeben hat, die ich zur Vervollständigung dieser Arbeit benötigt habe. Dafür bin ich unendlich dankbar.

Ich werde Dich nie vergessen.