

Aus dem Zentrum der Inneren Medizin des Klinikums
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Medizinische Klinik I
Schwerpunkt für Endokrinologie und Stoffwechsel
(Direktor: Prof. Dr. med. Klaus-Henning Usadel)

**Genetische Polymorphismen
des nukleären Vitamin D Rezeptors und des Vitamin D bindenden
Proteins bei Typ 1 Diabetes mellitus**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von

Michael Aleksander Pani

aus

Langen (Hessen)

Frankfurt am Main, 2000

Dekan: Prof. Dr. G. von Jagow
Referent: Prof. Dr. K. Badenhoop
Koreferent: Prof. Dr. U. Langenbeck

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Januar 2001

DANKSAGUNG

Der erfolgreiche Abschluß einer Dissertation hängt von weit mehr ab als von Fleiß, Geschick und Glück des Doktoranden. Ich möchte denen Dank sagen, ohne die diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht hätte realisiert werden können.

Herr Professor Dr. Klaus-Henning Usadel, Direktor der Medizinischen Klinik I des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität, legte durch das in seiner Klinik herrschende wissenschaftlich-fruchtbare Klima und seine strukturelle Unterstützung den Grundstein für diese Arbeit.

Herr Privatdozent Dr. Michael Knapp vom Institut für Medizinische Biometrie, Statistik und Epidemiologie der Universität Bonn stand mir mit Rat und Tat sowie mit viel Geduld bei den komplexen ETDT-, ETDDT- und TRANSMIT-Analysen zur Seite.

Frau Silvia Wolfenstädter danke ich für ihre kreative und umfassende Unterstützung beim Erstellen der Abbildungen dieser Arbeit.

Die entspannte Atmosphäre sowie die große Hilfsbereitschaft im Team der Molekularendokrinologie halfen mir über manche „Rückschläge“ hinweg und machten das Arbeiten auch zu „Unzeiten“ möglich.

Herrn Professor Dr. Klaus Badenhoop als Betreuer dieser Arbeit gilt mein besonderer Dank für die exzellente fachliche und persönliche Unterstützung, mit der er der Aufgabe des „Doktorvaters“ weit mehr als gerecht geworden ist.

Von Anbeginn zeigte er reges Interesse am Fortgang der Experimente, förderte und forderte er die kritische Auseinandersetzung mit der Thematik und hatte immer ein offenes Ohr für meine Anliegen. Trotz der Möglichkeit und Notwendigkeit selbständigen und eigenverantwortlichen Arbeitens bot er mir eine „Rund um die Uhr-Betreuung“, die ich als einzigartig empfinde.

Besonders hoch rechne ich ihm an, daß er mich auch bei allen anderen Vorhaben unterstützt hat – auch wenn sie eigentlich „in Konkurrenz“ zu einer zügigen Fortführung der Dissertation standen. Weder transatlantische Entfernung noch Zeitverschiebung während eines Praktikums in Harvard noch die Ableistung von zwei Tertialen meines PJ im europäischen Ausland standen einer effektiven und stets herzlichen Kommunikation per Email, Fax, und Telefon entgegen, so daß ein Großteil dieser Arbeit in Boston, Paris und Manchester entstand.

INHALTSVERZEICHNIS

Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungen und Tabellen	VII
Abkürzungen	IX
1. Einleitung	1
1.1 Typ 1 Diabetes mellitus	1
1.1.1 Klinik und Epidemiologie.	1
Klinik und Diagnose.	1
Epidemiologie.	2
1.1.2 Immunsystem und Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus.	2
Immunsystem.....	2
Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus.....	4
1.1.3 Genetische Risikomarker.....	7
HLA.....	7
Andere Gene.....	7
1.1.4 Gemeinsamkeiten von Autoimmunerkrankungen.....	9
1.2 Endokrine Regulation des Vitamin D Systems	9
1.2.1 Metabolismus und Physiologie des Steroidhormons Vitamin D.....	9
1.2.2 Enzyme der Vitamin D Synthese.	13
25-Hydroxylase	13
25-Hydroxyvitamin D-1 α -Hydroxylase.....	14
25-Hydroxyvitamin D-24-Hydroxylase.....	14
1.2.3 Der nukleäre Vitamin D Rezeptor	15

1.2.4	Genomische Varianten des nukleären Vitamin D Rezeptors.....	18
1.2.5	Der membranäre Vitamin D Rezeptor.....	19
1.2.6	Das Vitamin D bindende Protein.....	19
1.2.7	Pathophysiologie des Vitamin D Systems und Krankheitsassoziationen.....	22
	Pathophysiologie des Calcium-Stoffwechsels	22
	Vitamin D bei Malignität und Autoimmunität.....	23
1.3	Fragestellungen	25
1.3.1	Inhaltliche Überlegungen.....	25
1.3.2	Methodische Überlegungen.....	25
2.	Individuen, Materialien und Methoden	27
2.1	Familien und Patienten	27
2.2	Materialien	27
2.2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	27
2.2.2	Chemikalien	28
2.2.3	Puffer und Lösungen.....	30
2.2.4	Enzyme.....	31
2.2.5	Oligonukleotide.....	32
2.2.6	Software.....	33
2.3	Methoden	33
2.3.1	DNA-Extraktion.....	33
2.3.2	Gelelektrophoretische DNA-Konzentrationsbestimmung	34
2.3.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	34
2.3.4	Restriktionsverdau	38
2.3.5	SSCP-Analyse	42
2.3.6	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	42

2.3.7	Detektion des (TAAA) _n -Repeat-Polymorphismus im Intron 8 des Vitamin D bindenden Proteins	44
2.3.8	Indirekte Haplotypisierung	44
2.3.9	Konditionierung und Subgruppenbildung	45
2.3.10	Statistische Auswertung	46
	Linkage Disequilibrium	46
	Chi ² -Vierfeldertest	47
	Transmission Disequilibrium Test (TDT)	48
	Extended Transmission Disequilibrium Test (ETDT)	49
	TRANSMIT Analyse	50
3.	Ergebnisse	51
3.1	Polymorphismen des nukleären Vitamin D Rezeptors	51
3.1.1	Mutationsscreening in Exon 2 und Exon 3	51
3.1.2	Linkage Disequilibrium und Allelverteilung	51
3.1.3	Vererbung an Patienten	52
3.1.4	Vererbung an gesunde Geschwister	56
3.1.5	Konditionierungen	57
	Geschlecht	60
	Alter bei Erkrankungsbeginn	64
	väterliche und mütterliche Transmission	68
	HLA-DR/DQ-Haplotypen	72
	CTLA4 Exon 1-Genotyp	76
3.2	Polymorphismen des Vitamin D bindenden Proteins	77
3.2.1	Linkage Disequilibrium und Allelverteilung	77
3.2.2	Vererbung an Patienten	78

3.2.3	Vererbung an gesunde Geschwister.....	79
3.2.4	Konditionierungen.....	79
	Geschlecht.....	80
	Alter bei Erkrankungsbeginn.....	81
	väterliche und mütterliche Transmission.....	82
	HLA-DR/DQ-Haplotypen.....	83
	CTLA4 Exon 1-Genotyp.....	84
4.	Diskussion.....	85
4.1	Der nukleäre Vitamin D Rezeptor.....	85
4.1.1	Mutationsscreening in Exon 2 und Exon 3.....	85
4.1.2	Linkage Disequilibrium und Allelverteilung.....	85
4.1.3	Vererbung an Patienten und gesunde Geschwister.....	86
	Patienten.....	86
	Gesunde Geschwister.....	87
4.1.4	Konditionierungen.....	88
	Geschlecht.....	88
	Alter bei Erkrankungsbeginn.....	89
	väterliche und mütterliche Transmission.....	89
	HLA-DR/DQ-Haplotypen.....	90
	CTLA4 Exon 1-Genotyp.....	91
4.1.5	Der nukleäre Vitamin D Rezeptor und Diabetes.....	91
4.2	Das Vitamin D bindende Protein.....	95
4.2.1	Linkage Disequilibrium und Allelverteilung.....	95
4.2.2	Vererbung an Patienten und gesunde Geschwister.....	96
	Patienten.....	96

Gesunde Geschwister.....	96
4.2.3 Konditionierungen.....	96
4.2.4 Das Vitamin D bindende Protein und Diabetes.....	96
4.3 Vitamin D Stoffwechsel bei Diabetes und Autoimmunität.....	98
5. Zusammenfassung.....	100
6. Literatur.....	102
Tabellarischer Lebenslauf.....	142
Ehrenwörtliche Erklärung.....	143

ABBILDUNGEN UND TABELLEN

Tabelle 1:	Faktoren, die an der Differenzierung von naiven $CD4^+$ T- zu T_{H1}^- bzw. T_{H2}^- -Zellen beteiligt sind	3
Tabelle 2:	Eigenschaften von T_{H1}^- und T_{H2}^- -Zellen.	4
Tabelle 3:	Bisher diskutierte Risiko-Genorte für Typ 1 Diabetes mellitus.	8
Abbildung 1:	Differentielle Wirkung von $1,25(OH)_2 D_3$ auf T-Lymphozyten und Zytokine	11
Tabelle 4:	Effekte von $1,25(OH)_2 D_3$ auf das Immunsystem	12
Tabelle 5:	Effekte von $1,25(OH)_2 D_3$ auf Pankreas und Metabolismus.	13
Tabelle 6:	Vitamin D-Zielgewebe (definiert durch die Expression von VDR).	16
Abbildung 2:	Struktur von VDR-Gen, -mRNA und -Proteindomänen.	17
Abbildung 3:	Interaktion von VDR und RXR bei der Transkriptionskontrolle.	18
Abbildung 4:	Struktur des Vitamin D bindenden Proteins.	20
Abbildung 5:	PAGE des <i>FokI</i> -Verdau.	39
Abbildung 6:	PAGE des <i>BsmI</i> -Verdau.	39
Abbildung 7:	Schema der PAGE des <i>MwoI</i> -Verdau.	40
Abbildung 8:	PAGE des <i>ApaI</i> -Verdau.	40
Abbildung 9:	PAGE des <i>TaqI</i> -Verdau.	40
Abbildung 10:	PAGE des <i>HaeIII</i> -Verdau.	41
Abbildung 11:	PAGE des <i>StyI</i> -Verdau.	41
Tabelle 7:	Haplotypzuordnung des Exon 11-Polymorphismus des Vitamin D bindenden Proteins	41
Tabelle 8:	Genotypzuordnung des Exon 11-Polymorphismus des Vitamin D bindenden Proteins	42
Abbildung 12:	Gel des $(TAAA)_n$ -Polymorphismus in Intron 8 des DBP-Gens.	44
Abbildung 13:	Indirekte Haplotypisierung.	45
Tabelle 9:	Konditionierungsparameter – Subgruppeneinteilung.	46

Tabelle 10:	VDR – Verteilung der Haplotypen in der untersuchten.....	51
	Population	
Tabelle 11:	Transmission von VDR – Patienten und gesunde Geschwister.....	53
	(Teile A-D)	
Tabelle 12:	Transmission von VDR – Konditionierung für das Geschlecht.....	57
	der Patienten (Teile A-D)	
Tabelle 13:	Transmission von VDR – Konditionierung für das.....	61
	Erkrankungsalter (Teile A-D)	
Tabelle 14:	Transmission von VDR –Konditionierung für mütterliche.....	65
	und väterliche Transmission (Teile A-D)	
Tabelle 15:	Transmission von VDR –Konditionierung für.....	69
	HLA-DR/DQ-Haplotypen (Teile A-D)	
Tabelle 16:	Transmission von VDR –Konditionierung für.....	73
	CTLA4 Exon 1-Genotypen (Teile A-D)	
Tabelle 17:	DBP – Verteilung der Haplotypen in der untersuchten.....	77
	Population	
Tabelle 18:	Transmission von DBP – Patienten und gesunde Geschwister.....	78
Tabelle 19:	Transmission von DBP – Konditionierung für das Geschlecht.....	79
	der Patienten	
Tabelle 20:	Transmission von DBP – Konditionierung für das.....	80
	Erkrankungsalter	
Tabelle 21:	Transmission von DBP –Konditionierung für mütterliche.....	81
	und väterliche Transmission	
Tabelle 22:	Transmission von DBP –Konditionierung für.....	82
	HLA-DR/DQ-Haplotypen	
Tabelle 23:	Transmission von DBP –Konditionierung für.....	83
	CTLA4 Exon 1-Genotypen	
Tabelle 24:	Transmission von VDR an indische Typ 1 Diabetes-Patienten.....	87
Abbildung 14:	Verteilung der <i>BsmI</i> -3'-UTR-Haplotypen des VDR-Gens in.....	93
	verschiedenen Populationen	

ABKÜRZUNGEN

Da es sich bei den Abkürzungen meist um aus dem Englischen übernommene Begriffe handelt, werden hier in den meisten Fällen sowohl die englische als auch die deutsche Langform aufgeführt:

1,25(OH)₂ D₃:

1,25-dihydroxycholecalciferol; aktives Vitamin D₃

25(OH) D₃:

25-hydroxycholecalciferol; Vorstufe des aktiven Vitamin D₃

9 cis RA:

9-cis retinoic acid; Retinoidsäure

A:

adenine; Adenin

Abb.:

Abbildung

APC:

antigen presenting cell; Antigen präsentierende Zelle

APS:

Ammoniumpersulfat

Asp:

aspartate; Asparaginsäure

ASP:

affected sibpair; erkranktes Geschwisterpaar

BB rat:

BioBreeding rat; Rattenmodell des Typ 1 Diabetes

bp:

base-pairs; Basenpaare

BSA:

bovine serum albumine; Rinderserum-Albumin

C:

cytosine; Cytosin

C5a:

activated complement factor 5; aktivierter Komplementfaktor 5

CD:

cluster of differentiation; Immunzellenoberflächenmarker

cDNA:

complementary DNA; durch reverse Transkription aus RNA entstandene DNA

CTLA4:

cytotoxic T-lymphocyte antigen 4; Antigen 4 zytotoxischer T-Lymphozyten

CR3b:

complement receptor 3b; Komplement-Rezeptor der T-Zellen

CYP:

Cytochrom P450

D:

Linkage Disequilibrium; Kopplungsungleichgewicht

D₂:

Ergocalciferol; aus Ergosterol synthetisiertes Vitamin D

D₃:

Cholecalciferol; aus Cholesterol synthetisiertes Vitamin D

DBP:

vitamin D binding protein; Vitamin D bindendes Protein

DNA:

deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure (DNS)

dNTP:

deoxyribonucleic-5'-triphosphate; Desoxyribonukleotid-Trisphosphat

EDTA:

ethylenediaminetetraacetate acid; Ethylenediamin-Tetraessigsäure

ETDT:

extended transmission distortion test; erweiterter TDT

F_c:

Ig-Rezeptor

g:
gravitation (9,84 N/kg²); Erdbeschleunigung

G:
guanine; Guanin

GAD:
glutamic acid dehydrogenase; Glutamatdehydrogenase

GM-CSF:
granulocyte-macrophage colony stimulating factor; Granulozyten- und Makrophagen-stimulierender Faktor

Gc:
group-specific component; Synonym für DBP

Glu:
glutamic acid; Glutamat

GR:
glucocorticoid receptor; Glukokortikoid Rezeptor

Hb-A_{1c}:
glykosyliertes Hämoglobin A₁

HERV:
human endogenous retrovirus; humanes endogenes Retrovirus

HLA:
human leucocyte antigen

HPV:
humanes Papillomavirus

HRR:
haplotype relative risk; relatives Haplotypenrisiko

IA-2:
membranäre Tyrosinphosphatase

ICA:
islet cell antibody; Inselzell-Antikörper

IDDM:
insulin-dependant diabetes mellitus; Synonym für Typ 1 Diabetes

IFN:
Interferon

Ig:
immunoglobulin; Antikörper

IL:
Interleukin

K_a:
affinity; Affinität

kb:
kilobases; 1000 Basenpaare

kDa:
kilodalton; 1000 Dalton

Lys
Lysin

MHC:
major histocompatibility complex; Haupt-histokompatibilitätskomplex

mRNA:
messenger ribonucleic acid; transkribierte für ein Protein kodierende RNA

MODY:
maturity-onset diabetes of the young; Jugendformen des Typ 2 Diabetes mit unterschiedlichen Erbgängen und Pathogenesen

NIDDM:
non-insulin-dependent diabetes mellitus; Synonym für Typ 2 Diabetes

NOD mouse:
non-obese diabetes mouse; Mausmodell des Typ 1 Diabetes

NRAMP:
natural resistance associated macrophage protein

oGTT:
oral glucose tolerance test ; oraler Glukosetoleranztest

PAG(E):
Polyacrylamid Gel (elektrophorese)

PCR:
polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion

PKC:
Proteinkinase C

PTH:
parathyroid hormone; Parathormon

RFLP:
restriction fragment length polymorphism; Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus

RNA:

ribonucleic acid; Ribonukleinsäure (RNS)

rpm:

rounds per minute; Umdrehungen pro Minute

RXR:

retinoic acid X receptor; Retinoid X Rezeptor

RXRE:

retinoic acid X receptor responsive element; RXR-Erkennungssequenz

SDS:

sodium dodecylsulfate; Natriumdodekylsulfat

SE:

standard error; Standardabweichung

SSCP:

single stranded conformation polymorphism; Einzelstrangkonformationspolymorphismus

STAT:

signal transducer and activator of transcription

STH:

somatotropic hormone; Wachstumshormon/ Somatotropin

T:

thymine; Thymin

T₃/T₄:

triiodtyrosine/thyroxine; Triiodtyrosin/Tyroxin

T_{C/H/S}:

cytotoxic/helper/suppressor T cell; zytotoxische/Helfer/Suppressor T Zelle

Tab.:

Tabelle

TCR:

T cell receptor ; T Zellrezeptor

Thr:

threonine; Threonin

TNF:

tumor necrosis factor; Tumornekrosefaktor

TDT:

transmission disequilibrium test; Test auf Vererbungsungleichgewicht

TEMED:

N-,N-,N-,N-tetramethylethylendiamine

TRM:

TRANSMIT-Analyse

UTR:

untranslated region; untranslatierte Region

UV:

ultraviolett

Var:

statistische Varianz

VDR:

vitamin D receptor; nukleärer Vitamin D Rezeptor

VDRE:

vitamin D responsive element; VDR Erkennungssequenz

VNTR:

variable number of tandem repeats; variable Anzahl von Dinukleotidwiederholungen

WHO:

World Health Organization; Weltgesundheitsorganisation

1. EINLEITUNG

1.1 Typ 1 Diabetes mellitus

1.1.1 Klinik und Epidemiologie

Klinik und Diagnose

Beim Diabetes mellitus Typ 1 (IDDM) handelt es sich um eine durch Insulinmangel bedingte Störung der Glukoseverwertung⁽¹⁾. Ursächlich hierfür ist eine autoimmunologisch bedingte Zerstörung der β -Zellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas^(2;3) (siehe auch Kapitel 1.1.2). Durch den Mangel an Insulin ist die zelluläre Aufnahme von Glukose, dem wichtigsten Energielieferanten, stark vermindert. Bei Überschreiten einer Blutglukose-Konzentration von 180 mg/dL (der sogenannten Nierenschwelle) kommt es zur Glukosurie (lat. *mellitus*, Honig) durch Sättigung der renalen Glukose-Rückresorptionsmechanismen. Die erhöhte Urin-Osmolalität führt zu einer Polyurie (gr. *diabetes*, Flut), Nykturie, Polydipsie und eventuell zu einer Dehydratation.

Zum Ausgleich des intrazellulären Energiemangels setzt eine verstärkte Lipolyse ein. Die dadurch vermehrt im Blut zirkulierenden freien Fettsäuren werden zu Ketonkörpern metabolisiert, deren Kumulation zur metabolischen (Keto-) Azidose bis hin zum Koma führen kann. Die langfristig bestehende Hyperglykämie eines unbehandelten Diabetes mellitus führt durch nicht-enzymatische Glykosylierung von Strukturproteinen zu vielfältigen Gewebeveränderungen. Diese Gewebeveränderungen sind die eigentliche Ursache des Großteils diabetischer Komplikationen (Nephropathie, Retinopathie, Polyneuropathie, Mikro- und Makroangiopathie), die letztendlich die Prognose des Patienten bestimmen.

Zu den charakteristischen klinischen Symptomen der Erstdiagnose eines Diabetes mellitus zählen:

- Polydipsie
- Polyurie, eventuell mit sekundärer Enuresis bei Kindern bzw. Nykturie
- Gewichtsverlust
- Müdigkeit, Leistungsknick
- Erbrechen, Diarrhoe
- Bewußtseinstrübung, Koma

Die Diagnose eines klinisch manifesten Diabetes mellitus erfolgt bei einem Nüchtern-Blutzuckerwert über 7,0 mmol/L (125mg%) bzw. 2 Stunden nach oralem Glukosetoleranztest (oGTT) bei einem venösen Wert über 10 mmol/L (180mg%) oder kapillär über 11,1 mmol/L (200mg%). Bei Typ 1 Diabetes-Manifestation ist die produzierte Insulinmenge auf deutlich unter 15% der Norm (gemessen anhand eines C-Peptid-Radioimmunoassays) abgesunken⁽⁴⁾. Zu diesem Zeitpunkt finden sich bei bis zu 90% der Patienten Inselzell-Antikörper (ICA)⁽⁵⁻⁷⁾. Die Dramatik der Symptome ist invers mit dem Alter bei Manifestation korreliert^(3;8). Oftmals kommt es kurze Zeit nach Krankheitsbeginn zu einem Wiederanstieg der Insulinproduktion bevor die Synthese endgültig sistiert⁽¹⁾. Diese sogenannte „Honeymoon“-Periode ist jedoch meist nur von kurzer Dauer.

In dieser Arbeit wird nur auf den Diabetes mellitus Typ 1⁽⁹⁾ und nicht auf andere Diabetesformen (wie z.B. Diabetes mellitus Typ 2, MODY und sekundäre Diabetesformen) eingegangen.

Epidemiologie

Typ 1 Diabetes mellitus ist die häufigste Autoimmunerkrankung bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen und repräsentiert etwa 10% aller Diabetesformen. Aber auch im Erwachsenenalter kann es zum Auftreten von IDDM kommen. Die Inzidenzraten zwischen einzelnen Ländern und auch zwischen ethnischen Gruppen unterscheiden sich teilweise erheblich voneinander, was eine Beteiligung sowohl von genetischen als von Umweltfaktoren⁽¹⁰⁻¹²⁾ bei der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 nahelegt (siehe auch Kapitel 1.1.2). International liegt Skandinavien –und hier insbesondere Finnland– an der Spitze mit einer Inzidenz von jährlich bis zu 30 pro 100.000^(10;13;14). Das Bestehen eines eindeutigen Nord-Süd-Gefälles wird jedoch durch die Beobachtungen in Sardinien⁽¹⁵⁾, Israel⁽¹⁶⁾ und anderen südlicher gelegenen Regionen⁽¹⁷⁾ in Frage gestellt, in denen die Diabetes-Inzidenz beinahe ebenso hoch wie in Finnland ist. Untersuchungen in Staaten mit gut etablierten Diabetes-Registern zeigen, daß die IDDM-Inzidenz in den letzten 10 Jahren um jährlich 2% zugenommen hat⁽¹⁸⁻²⁰⁾. Auch das Erkrankungsalter sinkt stetig: Das Auftreten vor dem 10. Lebensjahr ist inzwischen recht häufig⁽²¹⁾ und in Finnland treten 50% aller Diabetes mellitus Typ 1-Fälle im Alter von unter 20 Jahren auf^(22;23). Die Zunahme der Typ 1 Diabetes-Inzidenz sowie das immer frühere Auftreten dieser Erkrankung können bisher noch nicht ausreichend erklärt werden.

In Deutschland liegt die Prävalenz des Typ 1 Diabetes mellitus bei etwa 0,4%⁽²⁴⁾. Etwa 10% der Patienten haben eine positive Familienanamnese bezüglich IDDM⁽²⁵⁾. Das Typ 1 Diabetes-Risiko für Geschwister der Patienten liegt 7-8mal über dem der Normalbevölkerung; Kinder von Patienten mit Diabetes mellitus erkranken 10mal häufiger als Kinder von Nicht-Diabetikern⁽²⁶⁾,⁽²⁷⁾ und die Konkordanz bei eineiigen Zwillingen beträgt 30%⁽²⁸⁾.

1.1.2 Immunsystem und Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus

Immunsystem

Aufgabe des Immunsystems ist der Schutz des Körpers vor eingedrungenen Mikroorganismen sowie das Erkennen und Eliminieren veränderter und bösartiger körpereigener Zellen. Dabei stehen dem Organismus verschiedene „Waffen“ zur Verfügung:

Einen zentralen Pfeiler des Immunsystems bilden die Makrophagen, die sowohl im Rahmen der angeborenen, unspezifischen als auch im Rahmen der erworbenen Immunität zytotoxisch aktiv sind. Ziel von Makrophagen sind vor allem Bakterien, die phagozytiert und durch Sauerstoffradikal abhängige Reaktionen zerstört werden. Die Phagozytose von Antikörper- oder Komplement-„markierten“ Bakterien wird durch spezielle Rezeptoren (F_C, CR3b) auf der Oberfläche von Makrophagen erleichtert. Zusammen mit dendritischen Zellen sind Makrophagen zur Antigen-Prozessierung befähigt und fungieren als Antigen präsentierende Zellen (APC). Das prozessierte Antigen wird von T-Lymphozyten erkannt, wenn es zusammen mit einem HLA-Molekül präsentiert wird. HLA Klasse I-Moleküle werden dabei von zytotoxischen (CD8⁺) T-Zellen erkannt. T-Helferzellen (CD4⁺) erkennen HLA Klasse II-gekoppelte Antigene (siehe unten + Kapitel 1.2.1). Auch eine direkte Interaktion von APC und B-Lymphozyten ist möglich, erfordert jedoch ebenfalls die Kopplung des Antigens an ein HLA-Molekül. Während HLA Klasse I-Moleküle auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, ist die Expression der HLA Klasse II-Moleküle normalerweise auf Lymphozyten und Antigen präsentierenden Zellen beschränkt, kann aber durch IFN- γ auf anderen Zellen induziert werden⁽²⁹⁾.

Auch den „Zytokine“ genannten Botenstoffen des Immunsystems kommt eine wichtige Aufgabe bei der Regulation spezifischer Interaktionen zu. Interleukin 1 (IL-1) ist für die Stimulation ruhender T-Lymphozyten essentiell. Als Reaktion auf ihre Aktivierung bilden T-Zellen IL-2, das wiederum für die klonale T-Zell-Expansion und die Freisetzung weiterer Zytokine (IL-4, IL-10) wichtig ist.

Natürliche Killerzellen sind Leukozyten, die im Rahmen der angeborenen Immunität gegen Virus infizierte Zellen vorgehen und durch IFN- γ stimuliert werden, das von letzteren sowie von T-Lymphozyten freigesetzt wird. Die Bekämpfung von Mikroorganismen (wie Protozoen und Würmer), die zu groß sind, um phagozytiert zu werden, übernehmen eosinophile Granulozyten. Sie entsprechen im wesentlichen phagozytierenden Zellen, allerdings geben sie ihre zytotoxischen Produkte an die Umgebung ab. Für detaillierte Informationen über die vielfältigen Komponenten und Mechanismen des Immunsystems sei auf eine exzellente Darstellung verwiesen⁽²⁹⁾.

Die meisten mikrobiellen Antigene werden von APCs prozessiert und zusammen mit HLA Klasse II-Molekülen an der Zelloberfläche CD4⁺, naiven T-Helferzellen (T_{H0}) präsentiert. Die aktivierte CD4⁺ T-Zelle kann nun einerseits mit B-Lymphozyten interagieren und so eine Antikörper vermittelte humorale Immunantwort induzieren. Andererseits führt eine Interaktion der aktivierten CD4⁺ T-Zelle mit Makrophagen mit nachfolgender Ausschüttung von TNF- α sowie Sauerstoff- und Stickstoffradikalen zu einer zellulären Immunantwort. In den meisten Fällen verlaufen humorale und zelluläre Immunantwort Hand in Hand, in einigen Situationen findet jedoch exklusiv eine der beiden Reaktionen statt. Die Grundlage der funktionellen Dichotomie der T-Zellaktivierung wurde 1986 entdeckt⁽³⁰⁾: Die Differenzierung von naiven T_{H0}-Zellen zu T_{H1}-Zellen, die mit Makrophagen die zelluläre Immunantwort einleiten, oder zu T_{H2}-Zellen, die zusammen mit den B-Lymphozyten die humorale Immunantwort induzieren, wird durch eine Reihe exogener⁽³⁰⁾ und genetischer^(31:32) Faktoren (siehe Tabelle 1) beeinflusst. T_{H1}- und T_{H2}-Zellen unterscheiden sich auch hinsichtlich des von ihnen produzierten Zytokin-Repertoires und ihrer Interaktionen⁽³³⁾ (siehe Tabelle 2). Bei Gesunden liegen T_{H0}-, T_{H1}- und T_{H2}-Zellen im Verhältnis von etwa 4:2:1 vor⁽³⁴⁾.

Faktor	Effekt auf T _{H1} -Differenzierung	Effekt auf T _{H2} -Differenzierung
<i>Zytokine</i>		
IFN- α /IFN- γ	+++	
IL-12	+++	
TNF- β	+	
IL-4		+++
IL-1 + IL-10		+
<i>Hormone</i>		
Glukokortikoide		+
Androgene	+	
25(OH) D ₃		+
Progesteron		+
APCs	+	+

Tab. 1: Faktoren, die an der Differenzierung von naiven CD4⁺ T- zu T_{H1}- bzw. T_{H2}-Zellen beteiligt sind

Ein gestörtes Gleichgewicht zwischen T_{H1}- und T_{H2}-Zellen wird für eine Reihe von Autoimmunerkrankungen verantwortlich gemacht⁽³⁵⁾. Man geht von einer Beteiligung der T_{H1}-Zellen⁽³⁶⁾ und der von ihnen freigesetzten Zytokine⁽³⁷⁾ an der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 aus^(38:39) während T_{H2}-Zellen eine eher protektive Rolle zugesprochen wird⁽³⁹⁾.

Eigenschaft	T _{H1} -Zellen	T _{H2} -Zellen
<i>Zytokinfreisetzung</i>		
IFN- γ , TNF- β	+++	-
IL-2	+++	+
TNF- α	+++	+
GM-CSF, IL-3, IL-6	+	++
IL-10, IL-13	+	+++
IL-4, IL-5	-	+++
<i>Zytolytisches Potential</i>	+++	-
<i>Beteiligung an der Ig-Synthese</i>	-/+	+++
<i>Monozyten-Aktivierung</i>	+++	-

Tab. 2: **Eigenschaften von T_{H1}- und T_{H2}-Zellen**

Charakteristika der erworbenen Immunität sind die Epitop (Peptidfragment)-Spezifität und die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses, das beim nächsten Antigenkontakt eine schnellere und effizientere Immunantwort erlaubt. Um der Vielfalt der Antigene gerecht zu werden, bildet der menschliche Organismus zunächst gegen alle denkbaren –auch körpereigenen– Peptide Lymphozyten. Die lebensnotwendige Unterscheidung zwischen „fremden“ und körpereigenen Antigenen wird durch folgende Mechanismen erreicht:

- Den neu entstehenden T- und B-Lymphozyten werden im lymphatischen System zahlreiche körpereigene Epitope präsentiert. Ein Erkennen dieser Epitope zu diesem Zeitpunkt führt zum Absterben des jeweiligen Lymphozytenklons. Diese sogenannte klonale Deletion wird auch als zentrale Toleranz bezeichnet⁽⁴⁰⁾.
- Bei der peripheren Toleranz erkennen gereifte Lymphozyten körpereigene Epitope. Durch das Fehlen kostimulatorischer Signale kommt es jedoch zu keiner Immunantwort^(41;42).
- T-Suppressor-Zellen unterbinden eine überschießende Immunantwort gegen autologe Antigene^(43;44).

Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus

Beim Typ 1 Diabetes mellitus kommt es zur selektiven und vollständigen Zerstörung der pankreatischen β -Zellen, während die übrigen, direkt benachbarten, endokrinen Inselzellen intakt bleiben. Dies legt die Vermutung nahe, daß es sich bei der β -Zellzerstörung um eine erworbene, spezifische Immunreaktion handelt. Die Mehrzahl der Typ 1 Diabetiker weist bei Erkrankungsbeginn in die Langerhans'schen Inseln eingewanderte mononukleäre Zellen auf⁽⁴⁵⁾. Auch T- und B-Lymphozyten sind Bestandteil der Infiltrate⁽³⁶⁾, wobei ihre Präsenz für eine β -Zellzerstörung nicht unbedingt notwendig erscheint^(3;46;47). Neben zerstörten finden sich viele morphologisch intakte β -Zellen, deren Insulinsekretion jedoch stark eingeschränkt ist. Eine direkte Beteiligung von Zytokinen vor Ort ist wahrscheinlich, da Interferon α (IFN- α) im Pankreas von IDDM-Patienten verstärkt exprimiert wird⁽⁴⁸⁾ und experimentell Autoimmunität durch die Applikation von rekombinantem IFN- α erzeugt werden konnte. Ektope Expression von HLA Klasse II-Molekülen und IFN- γ im Pankreas induziert bei Mäusen die Entstehung von Diabetes⁽⁴⁹⁾.

Ob die Infiltration der Langerhans'schen Inseln sekundär aufgrund einer viralen Infektion der β -Zellen mit nachfolgender T-Zellaktivierung erfolgt⁽⁵⁰⁾ oder ob die Einwanderung der Immunzellen primär auf eine Zerstörung der β -Zellen zielt⁽⁵¹⁾, weiß man bisher nicht sicher.

Ein weiteres Indiz für die autoimmune Genese des Diabetes mellitus Typ 1 stellte die Entdeckung von Antikörpern gegen β -Zell assoziierte Proteine dar. Etwa die Hälfte aller neu erkrankten Typ 1 Diabetiker hat Autoantikörper gegen Insulin^(7:52). Weitere Autoantigene bilden die in β -Zellen exprimierte Glutamat-Dehydrogenase (GAD65)⁽⁵³⁾, gegen die bei über 75% der Neuerkrankten Antikörper nachgewiesen werden können⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾, sowie eine membranassoziierte Protein-Tyrosin-Phosphatase (IA-2)^(57:58). Gegen IA-2 sind in etwa 50% der Fälle Antikörper nachweisbar^(59:60). Nahezu 100% der Typ 1 Diabetiker haben Antikörper gegen eines der oben genannten Autoantigene, und ein Screening auf diese Antikörper hat einen sehr hohen positiven Vorhersagewert für das Erkrankungsrisiko von Verwandten eines Typ 1 Diabetiker-Patienten⁽⁶⁰⁾.

Die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 1 wird zu 50-60% von genetischen und zu 40-50% von Umweltfaktoren bestimmt. Folgende Umweltfaktoren erscheinen dabei heute von Bedeutung:

- Virale Infektionen^(2:61)

Hier gibt es vor allem für Coxsackie B, Rubella, Mumps⁽⁶²⁾ und neonatale Infektionen^(63:64) sowie für die exogen getriggerte Reaktivierung endogener Retroviren (HERV)^(65:66) entsprechende Hinweise. Bis zu 20% der Kinder mit kongenitaler Rubella-Infektion erkranken in ihrem späteren Leben an Diabetes mellitus Typ 1, in der Subgruppe mit den HLA-Allelen *DR3-DQ2* und *DR4-DQ8* (siehe unten) sind es gar bis zu 70%⁽⁶⁷⁾. Desweiteren erhöhen Enterovirus-Infektionen der Mutter während der Gravidität das IDDM-Risiko des Kindes deutlich^(68:69).

- Alter der Mutter⁽¹⁹⁾

- Ernährung⁽¹⁹⁾

Assoziationen mit dem Auftreten von IDDM wurden sowohl von der Dauer des Stillens als auch vom Zeitpunkt der Erstexposition gegenüber bestimmten Nahrungsbestandteilen berichtet. Zwar konnte eine Beteiligung des Kuhmilchproteins BSA (Rinderserum-Albumin) in experimentellen Situationen nachgewiesen werden⁽⁷⁰⁾, die klinische Bedeutung von BSA-Antikörpern sowie die Rolle der Stilldauer⁽⁶³⁾ und des Zeitpunkts der Exposition gegenüber Kuhmilch bleiben jedoch weiter unklar⁽⁷¹⁻⁷⁵⁾. Auch eine frühe Gewichtszunahme im Kleinkindalter wird als möglicher Risikofaktor diskutiert⁽⁷⁴⁾.

Für die Immunpathogenese des Diabetes werden folgende exogen getriggerte und genetisch modulierte Pathomechanismen diskutiert:

- β -zellspezifische Infektion

Für Varianten des Coxsackie B-Virus ist ein β -Zell-Tropismus beschrieben worden⁽⁷⁶⁾. Trotz intakter Morphologie der infizierten Zellen war die Insulinsynthese und -sekretion beeinträchtigt^(77:78). Von Kindern, die nach grippeähnlichen Symptomen einen Diabetes entwickelten, konnten Coxsackie-Viren im Pankreasgewebe nachgewiesen werden⁽⁷⁹⁾. Diese Viren waren in der Lage, kultivierte Maus-Inselzellen zu infizieren⁽⁸⁰⁾. Die im Zuge einer viralen Infektion gebildeten Zytokine IFN- γ und TNF- α können die Expression von HLA, kostimulatorischen und Adhäsions-Molekülen verstärken^(81:82) und so der Präsentation von Autoantigenen Vorschub leisten. Ein analoger Mechanismus wäre für reaktivierte HERVs denkbar.

- Molekulares Mimikri

Aufgrund der zum Teil weitgehenden Übereinstimmung zwischen körperfremden und körpereigenen Proteinen könnte es z.B. nach einer Infektion und klonaler T-Zellproliferation zu einer „Verwechslung“ von viralem und körpereigenem Epitop entweder durch Antikörper oder durch T-Zellen kommen. Dieses molekulare Mimikri kann sowohl auf einer Konformations- als auch auf einer Peptidsequenz-Homologie der Epitope beruhen. Das beste Beispiel für eine solche Sequenzhomologie stellt das Coxsackie-Virus-Antigen P2-C dar⁽⁸³⁾. Es verfügt über ein mit GAD65 identisches Hexapeptid. Polyklonale Antikörper gegen P2-C kreuzreagieren mit GAD65⁽⁸⁴⁾ *in vitro* und die Existenz von gegen dieses Epitop gerichteten humanen T-Helferzellen ist sehr wahrscheinlich^(56;85). Die bei Typ 1 Diabetes-Patienten vorkommenden Autoantikörper gegen GAD65 kreuzreagieren allerdings nach bisherigen Erkenntnissen nicht mit dem viralen Peptid⁽⁸⁶⁾.

- Wirkung als Superantigen

Superantigene sind immunogene Proteine, die eine Vielzahl von T-Zellklonen aktivieren, indem sie HLA Klasse II-abhängig an das V β -Segment des T-Zellrezeptors (TCR) binden⁽⁸⁷⁾. Durch die Bindung der HLA Klasse II-Moleküle der Antigen-präsentierenden Zelle mit der relativ wenig polymorphen variablen β -Kette (V β) werden bis zu 10⁵mal mehr T-Zellen aktiviert als durch ein konventionelles Antigen. Die in der Regel 20 bis 30 kDa großen Superantigene vermögen sowohl CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen als auch B-Zellen ohne vorherige intrazelluläre Prozessierung zu aktivieren. Anders als beim Mechanismus des molekularen Mimikri beinhalten Superantigene keine kreuzreagierenden Epitope. Vielmehr kommt es im Zuge der breiten Immunzell-Aktivierung auch zur Induktion von Zellen, die gegen potentielle Autoepitope gerichtet sind⁽⁸⁸⁾. Der oligoklonale Ursprung der in einigen Autoimmunerkrankungen exprimierten T-Zellrezeptoren impliziert die Beteiligung von Superantigenen an der Pathogenese dieser Erkrankungen⁽⁸⁹⁾.

- Immunmodulation

Eine alternative Hypothese besagt, daß mehr oder weniger spezifische Umweltfaktoren das Immunsystem hinsichtlich eines eher hyperergen (erhöhtes) oder eher anergen (vermindertes Risiko für eine Selbstreaktivität) Zustandes beeinflussen. Tierexperimentell wirkten die BCG-Impfung und die Applikation von Freund'schem Adjuvanz protektiv gegenüber einer späteren Diabetesentstehung^(2;90). Möglicherweise wird diese Immunmodulation über eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen T_{H1}- (IFN- γ -Produktion) und T_{H2}- (IL-4- und IL-10-Produktion) Zellen erreicht (siehe oben).

- HLA-Restriktion

Wie oben bereits dargelegt, wird eine CD4⁺ T-Zell vermittelte Immunantwort gegen ein Antigen nur eingeleitet, wenn es zusammen mit HLA Klasse II-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert wird. HLA Klasse II-Moleküle werden nur auf Antigen präsentierenden Zellen (APC) exprimiert, so daß Oberflächenproteine anderer, gesunder Körperzellen diese Immunreaktion normalerweise nicht induzieren können. Vor allem eine Reihe endokriner Zellen bildet hiervon eine Ausnahme, da sie unter bestimmten Bedingungen HLA Klasse II-Moleküle exprimieren und so zu einer CD4⁺ vermittelten Immunantwort gegen autologe Proteine führen können. IFN- γ und TNF, wie sie im Rahmen einer viralen Infektion des Pankreas gebildet werden, verstärken die HLA Klasse II-Expression auf pankreatischen β -Zellen⁽⁹¹⁾.

1.1.3 Genetische Risikomarker

HLA

Etwa 60% des genetischen Diabetesrisikos ist der HLA-Region (*IDDM1*) zuzuschreiben⁽⁹²⁾, dem ersten Locus, von dem eine Assoziation mit Typ 1 Diabetes beschrieben wurde^(93;94). Die HLA-Region ist Teil des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC), der sich über 4 Megabasenpaare auf Chromosom 6q21 erstreckt⁽⁹⁵⁾. Die HLA Klasse I liegt telomerwärts und kodiert für die hochpolymorphen Moleküle HLA-A, -B und -C. Die Gene der HLA Klasse II-Region –HLA-DR, -DQ und -DP– kodieren jeweils für eine α - und eine β -Kette, die zusammen als α - β -Heterodimere das intakte Klasse II-Molekül konstituieren. Die HLA-DR-Moleküle bestehen aus einer -DRA kodierten α -Kette und einer β -Kette, die durch einen der Loci HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 oder -DRB5 kodiert wird. Da meist nur zwei der vier β -Gene pro Allel gleichzeitig exprimiert werden, kodiert ein Haplotyp für zwei und ein heterozygoter Genotyp für vier DR-Moleküle. Die Komplexe HLA-DQ und -DP bestehen jeweils nur aus einem einzelnen α - und β -Gen. Von HLA-DRB1 sind über 100 Allele beschrieben, von -DQB1 und -DPB1 jeweils etwa 50 Allele, die sich oft nur in einer einzigen, manchmal auch in 20-30 Aminosäuren voneinander unterscheiden. Nähere Angaben über die komplexe Nomenklatur der HLA-Allele und -Haplotypen finden sich an anderer Stelle⁽⁹⁶⁾. Auf die Funktion des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) im Rahmen der Immunantwort wurde bereits in Kapitel 1.1.2 eingegangen.

Bei der Entdeckung der Assoziation der HLA-Region mit Typ 1 Diabetes mellitus ging man zunächst davon aus, daß die Klasse I-Allele *B8* und *B15* für die Erkrankung disponieren^(93;94). Später konnten die für die Diabetes-Assoziation verantwortlichen Loci den Klasse II-Genen -DR⁽⁹⁷⁾ und schließlich -DQ^(98;99) zugeordnet werden. Die mit IDDM assoziierten HLA-Haplotypen unterscheiden sich in verschiedenen Populationen teilweise erheblich voneinander. Durch die starke Kopplung der Klasse II-Gene miteinander konstituieren jedoch überall relativ wenige Allele einen Großteil der jeweiligen Haplotypen.

In kaukasischen Populationen⁽¹⁰⁰⁾ sind die Allele *DQ8* (*DQA1*0301-DQB1*0302*) und *DQ2* (*DQA1*0501-DQB1*0201*) am stärksten prädiktiv für Typ 1 Diabetes^(101;102). Über 40% der Patienten haben den Genotyp *DQ8/DQ2*^(103;104). Unter den DR-Allelen sind *DR3* und *DR4* am stärksten mit Typ 1 Diabetes assoziiert. Als zusätzlicher, unabhängiger Risikofaktor erwies sich jüngst die Anwesenheit einer LTR (long terminal repeat)-Sequenz eines endogenen Retrovirus (HERV) in der HLA-DQ-Region⁽¹⁰⁵⁾ (genannt *DQ-LTR3*). Die mögliche Bedeutung (endogener) viraler Sequenzen wurde bereits angesprochen.

Von besonderer Bedeutung war die Entdeckung, daß sich *DQ7* –ein für IDDM bei Kaukasiern protektives Allel– in nur 4 Aminosäuren von *DQ8* unterscheidet. Dies legt die Vermutung nahe, daß die durch einen Aminosäureaustausch bedingte Ladungsänderung die Konformation des DQ-Moleküls modifiziert und so die Peptid^(85;106;107) und die T-Zellrezeptorbindung⁽¹⁰⁸⁾ beeinflusst (siehe Kapitel 1.1.2). Das veränderte Bindungsverhalten könnte dann sowohl nach dem Modell des molekularen Mimikri als auch nach der Vorstellung der HLA-Restriktion die Entstehung autoimmunogener T-Zellklone begünstigen⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾.

Andere Gene

Auf der Suche nach den Faktoren, die für die restlichen 40% des genetischen Diabetesrisikos verantwortlich sind, können zwei Ansätze unterschieden werden:

Zum einen werden Kandidatengene auf ihre mögliche Assoziation und ihr Linkage mit IDDM untersucht. Auf diese Weise fand man eine Assoziation des VNTR (variable nucleotide tandem repeat)-Polymorphismus am 5'-Ende des Insulingens (*IDDM2*) mit Diabetes mellitus Typ 1, die später durch Linkage-Studien bestätigt werden konnte^(112;113). Das zuschreibbare genetische Risiko für diesen Locus wird auf 2-3% geschätzt, wobei es in Subpopulationen mit höherem Erkrankungsalter darüber liegen dürfte⁽¹¹⁴⁾.

Mit der Verfügbarkeit einer physikalischen Karte des menschlichen Erbgutes wird es möglich, in einem sogenannten „Genomscan“, das gesamte Genom mit Hilfe eines dichten Netzes von Mikrosatellitenmarkern auf Assoziationen mit Typ 1 Diabetes mellitus zu untersuchen. Inzwischen sind auf diese Weise mehr als 20 Loci als potentielle Kandidatengenorte identifiziert worden. Eine Übersicht gibt Tabelle 3. Einige dieser Assoziationen konnten in weiteren Studien bisher nicht bestätigt werden. Dies mag zum Teil an der Heterogenität der untersuchten Populationen liegen. Einzelne Kandidatengenorte dürften nur in Subpopulationen mit Diabetes mellitus Typ 1 assoziiert sein (siehe hierzu auch Kapitel 2.3.9). Bestätigt werden konnte das Linkage von *IDDM7* auf Chromosom 2q31⁽¹¹⁵⁾ in mehreren Populationen und von *IDDM8* auf Chromosom 6q25-q27⁽¹¹⁶⁾; ebenso scheint die Beteiligung von CTLA4 (*IDDM12*) am genetischen Risiko für IDDM gesichert⁽¹¹⁷⁾. Dieses Gen kodiert für ein T-Zell spezifisches Membranprotein, das an der klonalen Deletion aktivierter T-Lymphozyten beteiligt ist. Andere Kandidatengenorte –wie *IDDM10*– zeigten bisher nur in einzelnen Studien Assoziationen. Für eine ausführliche Diskussion der Linkage- und Assoziationsstudien sei auf die entsprechenden Referenzen verwiesen⁽¹¹⁸⁾.

Genort	Chromosom	Nächstgelegener Marker	Bestätigt durch weitere Studien	Referenz
<i>IDDM1</i>	6p21	HLA-DQB1, -DRB1	ja	(93;94;119)
<i>IDDM2</i>	11p15	Insulin VNTR	ja	(112;113;120)
<i>IDDM3</i>	15p26	D15S107	nein	(121)
<i>IDDM4</i>	11q13	FGF3, D11S1337	ja	(113;122;123)
<i>IDDM5</i>	6p25	D6S476, ESR, D6S448	ja	(113;123)
<i>IDDM6</i>	18q	D18S64	ja	(124)
<i>IDDM7</i>	2q31	D2S152	ja	(115;125)
<i>IDDM8</i>	6q27	D6S281	ja	(113;116;123;126)
<i>IDDM9</i>	3q21-q25	D3S1303	nein	(127;128)
<i>IDDM10</i>	10q11.2	D10S193	ja	(129)
<i>IDDM11</i>	14q24.3-q31	D14S67	nein	(130)
<i>IDDM12</i>	2q33	CTLA4	ja	(117)
<i>IDDM13</i>	2q34	IGFBP-2,-5	nein	(131)
<i>IDDM15</i>	6q21	D6S283	nein	(132)
<i>HOXD8</i>	2q31	HOXD8	nein	(133)
<i>GCK-3</i>	7q	Glukokinase	nein	(127)
DXs1068	Xp	—	nein	(134)
D18S64	18	<i>Kidd</i> Blutgruppe	nein	(135)

Tab. 3: Bisher diskutierte Risiko-Genorte für Typ 1 Diabetes mellitus

Für Chromosom 12q12-q14 (nukleärer Vitamin D Rezeptor, VDR) und für Chromosom 4q11-q13 (Vitamin D bindendes Protein, DBP) wurden in den bisherigen Genomscans keine Assoziationen mit Diabetes mellitus Typ 1 berichtet^(113;115;121-123;126;133).

1.1.4 Gemeinsamkeiten von Autoimmunerkrankungen

Der Begriff „Autoimmunität“ impliziert ein Vorgehen des Immunsystems gegen körpereigene Strukturen. Sowohl das klinische als auch das molekulare Bild der heute bekannten Autoimmunerkrankungen erscheint äußerst heterogen. Dennoch gibt es eine auffallende Anzahl von Parallelen zwischen den einzelnen Manifestationen von Autoimmunität:

Stets ist ein Autoantigen vorhanden, dessen Lokalisation im Organismus die Symptome der jeweiligen Erkrankung bestimmt. Obligates Charakteristikum von Autoimmunität ist ferner die Existenz von Autoantikörpern und/oder autoreaktiven Zellen⁽¹³⁶⁾. Durch den Transfer dieser autoreaktiven Zellen kann Autoimmunität auf ein zuvor gesundes Individuum übertragen werden⁽²⁾. Sowohl genetische als auch Umweltfaktoren sind für alle bisher untersuchten Autoimmunerkrankungen kausal. Das Bestehen einer Assoziation mit dem HLA Klasse II-Locus⁽¹³⁷⁾ für sämtliche dieser Krankheiten⁽¹³⁸⁾ macht eine große Ähnlichkeit der ihnen zugrunde liegenden Pathomechanismen wahrscheinlich. Eine Verschiebung des in Kapitel 1.1.2 angesprochenen Verhältnisses von T_{H1} - zu T_{H2} -Zellen zugunsten von T_{H1} findet sich bei vielen –wenn auch nicht allen– Autoimmunerkrankungen^(36;139-141).

Das Risiko für das Auftreten einer weiteren Autoimmunerkrankung ist bei Autoimmunpatienten gegenüber der Allgemeinbevölkerung deutlich erhöht. Bei vielen Autoimmunerkrankungen sind ferner Antikörper gegen weitere, nicht vom betroffenen Organ exprimierte, Autoantigene vorhanden. So finden sich z.B. bei über 20% der weiblichen und bei über 10% der männlichen Typ 1 Diabetiker auch Schilddrüsenantikörper⁽¹⁴²⁾ und morphologische Veränderungen derselben^(143;144), wie sie normalerweise im Rahmen eines Morbus Basedow auftreten. Anti-nukleäre⁽¹⁴⁴⁾ und anti-Parietalzell-⁽¹⁴⁵⁾ Antikörper finden sich bei Typ 1 Diabetikern ebenfalls gehäuft. Die Prävalenz der Hashimoto Thyreoiditis liegt in dieser Gruppe deutlich höher als in der allgemeinen Bevölkerung⁽¹⁴⁴⁾. Schließlich ist Autoimmunerkrankungen das Ansprechen auf eine immunsuppressive Therapie gemeinsam.

1.2 Endokrine Regulation des Vitamin D Systems

1.2.1 Metabolismus und Physiologie des Steroidhormons Vitamin D

Bereits im Jahr 1919 erkannte man, daß die Entstehung von Rachitis durch den Zusatz eines fettlöslichen Stoffes zur Nahrung verhindert werden kann⁽¹⁴⁶⁾. Diese Entdeckung führte zur Identifizierung einer –vom erst kurz zuvor entdeckten Vitamin A verschiedenen– Substanz, die als Vitamin D bezeichnet wurde⁽¹⁴⁷⁾ und eine wichtige Rolle im Calcium- und Phosphat-Stoffwechsel zu spielen schien. Die Heilbarkeit von Rachitis durch UV-Exposition des Patienten oder durch die von ihm aufgenommenen Nahrungsmittel bewies die Existenz eines Vorläufermoleküls, das durch UV-Licht in Vitamin D umgewandelt wird. Daraus ergab sich zugleich, daß Vitamin D kein Vitamin im Sinne eines essentiellen Nahrungsbestandteils darstellt. Weiterführende Studien führten zur Entdeckung von Vitamin D₂ (Ergocalciferol) und Vitamin D₃ (Cholecalciferol), die durch UV und Wärme induzierte Spaltung von Ergosterol bzw. 7-Dehydrocholesterol in der Haut entstehen. Bisher gibt es wenig Grund zu der Annahme, daß sich Vitamin D₂ und D₃ in ihrer Wirkung voneinander unterscheiden, aber das heutige Wissen stammt fast ausschließlich aus Studien an Vitamin D₃. Daher beschränkt sich auch die vorliegende Arbeit auf Vitamin D₃, für das als Synonym auch „Vitamin D“ verwendet wird.

Erst in den 60er Jahren erkannte man, daß die in der Leber oxidierte Form $25(\text{OH})\text{D}_3$ metabolisch aktiver als die Muttersubstanz ist und zudem in deutlich höheren Konzentrationen im Körper vorkommt^(148;149). Wiederum einige Jahre später wurde das in der Niere produzierte und heute als biologisch aktivster natürlicher Metabolit bekannte $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ beschrieben⁽¹⁵⁰⁻¹⁵²⁾.

Der Transport von der Epidermis zur Leber, wo Vitamin D_3 zu $25(\text{OH})\text{D}_3$ hydroxyliert wird, erfolgt größtenteils durch das Vitamin D bindende Protein (DBP). $25(\text{OH})\text{D}_3$ zirkuliert in einer Konzentration von 10-55 ng/mL an DBP und Albumin gebunden im Blut⁽¹⁵³⁾. Der zweite Hydroxylierungsschritt zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, das in einer Konzentration von 25-70 pg/mL im Blut vorliegt⁽¹⁵⁴⁾, findet vor allem in der Niere statt. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hat eine Plasmahalbwertszeit von 6 bis 8½ Stunden und wird vor allem durch seine 24-Hydroxylierung katabolisiert. Es folgt eine mehrschrittige Degradation zu Calcitroidsäure, die biliär eliminiert wird⁽¹⁵⁵⁾.

Die Wirkung von Vitamin D wird größtenteils durch seinen nukleären Rezeptor (VDR; siehe Kapitel 1.2.3) vermittelt. Neuere Erkenntnisse weisen jedoch auch auf nicht-genomische Effekte von Vitamin D hin (siehe Kapitel 1.2.4). Vitamin D erfüllt im Körper eine Vielzahl wichtiger, zum Teil erst kürzlich entdeckter Funktionen:

- Calcium-Stoffwechsel

Calcium stellt eines der wichtigsten Spurenelemente aller höheren Lebensformen dar und ist an neuraler Erregungsleitung, Muskelkontraktion und -relaxation, exokriner Sekretion, Blutgerinnung, Zell-Zell-Adhäsion sowie am Aufbau des Skeletts essentiell beteiligt. Die Calcium-Konzentration unterliegt daher einer sehr exakten Regulation innerhalb eines schmalen Normbereichs, die maßgeblich durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, Parathormon (PTH) und Calcitonin bestimmt wird. Vitamin D fördert die Calciumabsorption im Intestinum⁽¹⁵⁶⁾ und bewirkt zusammen mit PTH die Calcium-Mobilisation aus dem Knochen⁽¹⁵⁷⁾. Beide –Vitamin D und PTH– erhöhen somit die Calcium-Plasmakonzentration. Calcitonin hingegen wirkt einer Hypercalcämie entgegen, indem es dessen Einbau in das Skelett fördert⁽¹⁵⁸⁾. Vitamin D ist auch am eng mit der Calcium-Homeostase gekoppelten Phosphat-Metabolismus maßgeblich beteiligt⁽¹⁵⁹⁾. Eine Zusammenfassung des heutigen Kenntnisstandes über die Bedeutung von Vitamin D für den Calcium- und Phosphat-Stoffwechsel findet sich an anderer Stelle⁽¹⁶⁰⁾.

- Anti-proliferative und pro-differenzierende Wirkung

Der anti-proliferative und pro-differenzierende Effekt von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ konnte an einer Reihe von Zellen bereits demonstriert werden und wird kurz in Kapitel 1.2.6 anhand einiger pathologischer Situationen illustriert.

- Immunsystem

Bereits Anfang der 80er Jahre konnte die Expression von VDR in hämatopoetischen Zellen nachgewiesen werden. Eine Beteiligung von Vitamin D an der Regulation des Immunsystems lag damit nahe⁽¹⁶¹⁻¹⁶³⁾. Heute stellen sich seine Wirkungen auf die Immunantwort als äußerst komplex und differenziert dar:

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verstärkt die chemotaktische Aktivität von Makrophagen⁽¹⁶⁴⁾ sowie deren Bakterizidität⁽¹⁶⁵⁾. Diese Effekte werden zum einen über eine gesteigerte Produktion von H_2O_2 ⁽¹⁶⁶⁾ und zum anderen über eine vermehrte F_c -Rezeptor-Expression vermittelt⁽¹⁶⁷⁾. Letztere erleichtert die Erkennung von mit Antikörpern bedeckten Mikroorganismen. Neben ihrer direkten zytotoxischen Wirkung fungieren Makrophagen auch als Antigen präsentierende Zellen (APC). T-Helferzellen erkennen die zusammen mit HLA Klasse II-Molekülen präsentierten Antigene. Im Verlauf dieser Reaktion kommt es (wie bereits in Kapitel 1.1.2 dargestellt) zur T-Zellproliferation mit Bildung von T-Gedächtniszellen und zytotoxischen T-Zel-

len sowie durch Interaktion mit B-Lymphozyten zur Antikörpersynthese. Vitamin D reduziert die Expression von HLA Klasse II-Molekülen auf APCs⁽¹⁶⁸⁻¹⁷¹⁾ und damit die Antigen vermittelte T-Zellproliferation⁽¹⁷⁰⁾. Desweiteren sind Makrophagen zur Bildung von $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ aus $25(\text{OH}) \text{D}_3$ befähigt, die unter anderem durch $\text{IFN-}\gamma$ induziert wird⁽¹⁷²⁾. Eine auto- und parakrine Wirkung des von Makrophagen gebildeten $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ ist wahrscheinlich.

Auf Monozyten, die Vorläuferzellen von Makrophagen, wirkt $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ antiproliferativ und induziert ihre Differenzierung zu Makrophagen^(173;174). Dabei erwies sich der VDR-Gehalt der Monozyten als entscheidend für ihr Ansprechen auf Vitamin D^(175;176). Retinoidsäure (9-cis RA) und $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ bewirken (via eines VDR-RXR-Heterodimers; siehe unten) je nach Konzentration der beiden Liganden die Differenzierung von myeloischen Stammzellen entweder zu Monozyten oder zu neutrophilen Granulozyten⁽¹⁷⁷⁾.

T- und B-Lymphozyten exprimieren während ihrer Reifung im Thymus VDR⁽¹⁷⁸⁾ und Glukokortikoid Rezeptoren (GR)⁽¹⁷⁹⁾. Glukokortikoide regulieren die Apoptose heranreifender Lymphozyten und scheinen damit an deren bereits angesprochener klonaler Deletion beteiligt zu sein⁽¹⁷⁹⁾. Die Expression von VDR in diesen Zellen lädt zu Spekulationen über die Rolle von $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ und seines nukleären Rezeptors an der Entstehung zentraler Toleranz ein. Wenn T- und B-Lymphozyten den Thymus nach Abschluß ihrer Reifung als „ruhende“ Zellen verlassen, exprimieren sie kein VDR mehr. Die Expression von VDR wird erst wieder im Rahmen der T-Zellaktivierung induziert^(161;162). $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ erwies sich dabei als potenter Inhibitor der T-Zellproliferation⁽¹⁸⁰⁾ und blockiert den Übergang der T-Lymphozyten von der frühen (G_{1a}) in die späte (G_{1b}) G_1 -Phase, während der Übergang von G_0 nach G_{1a} sowie von G_{1b} nach S unbeeinträchtigt bleibt⁽¹⁸¹⁾. Eine Interaktion mit $\text{TGF-}\beta$ ist wahrscheinlich⁽¹⁸²⁾.

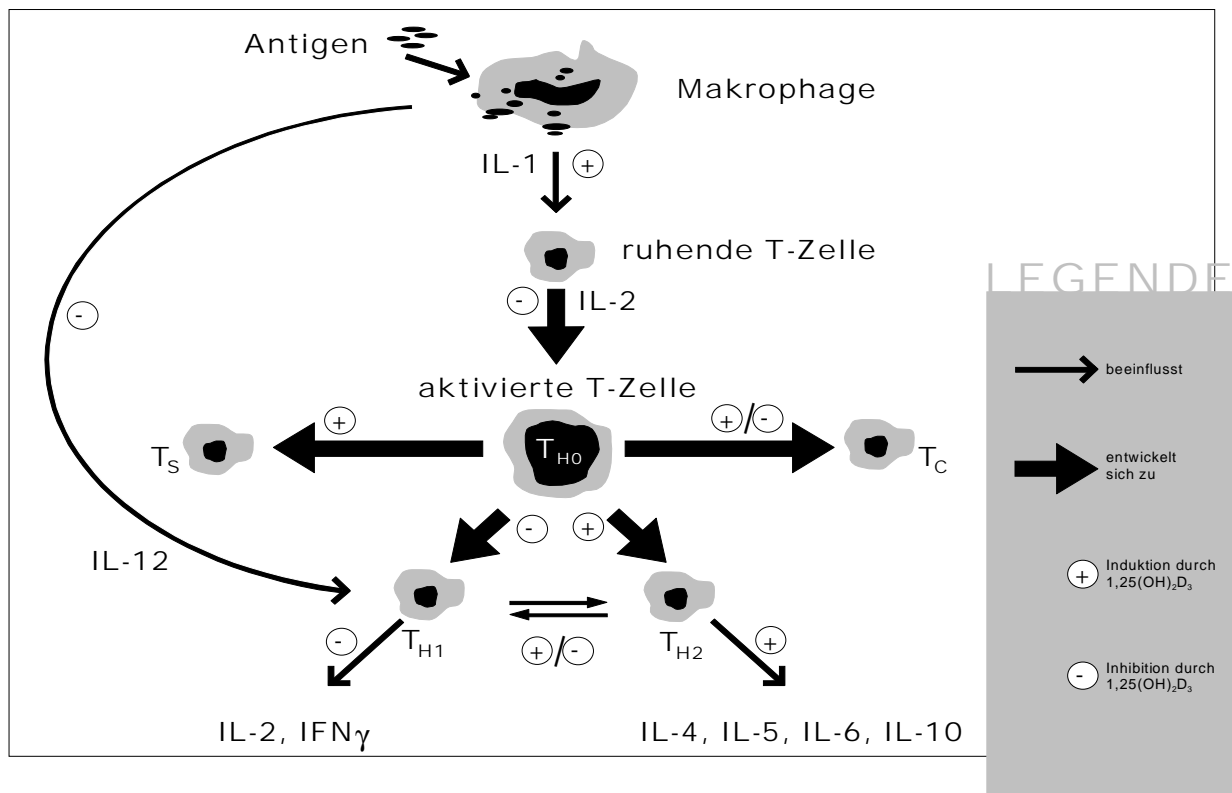


Abb. 1: Differentielle Wirkung von $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ auf T-Lymphozyten und Zytokine

Wie Eingangs erwähnt, bilden T-Lymphozyten eine heterogene Gruppe von Immunzellen mit sehr variablen Charakteristika. Auch die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ auf die einzelnen T-Zell-Subgruppen ist sehr unterschiedlich (siehe Abbildung 1).

Während zytotoxische T-Lymphozyten (T_C) durch Interaktion mit HLA Klasse I virale infizierte Zellen zerstören, werden T-Helferzellen (T_H) durch HLA Klasse II aktiviert. Letztere sind für die T_C -Reifung und die Antikörpersynthese durch B-Lymphozyten notwendig. T-Suppressorzellen (T_S) wird eine Bedeutung für die Immuntoleranz zugesprochen. Vitamin D induziert die Proliferation von T_S -Zellen⁽¹⁸³⁾, die die höchste VDR-Konzentration aller Lymphozyten aufweisen^(184:185). Den wichtigsten Angriffspunkt für $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ stellen jedoch die T_H -Lymphozyten dar⁽¹⁸⁶⁾. Die Subgruppe der T_{HI} -Zellen produziert IL-2 und IFN- γ und vermittelt die zelluläre Immunantwort durch Makrophagen und natürliche Killerzellen. Allerdings scheinen T_{HI} -Lymphozyten auch für zentrale Reaktionen im Rahmen von Autoimmunität und Transplantatabstoßung verantwortlich. T_{H2} -Zellen sezernieren IL-4, IL-5, IL-6 sowie IL-10 und tragen zur Aktivierung von B-Lymphozyten und zur Antikörperproduktion durch letztere bei. T_{HI} - und T_{H2} -Zellen hemmen sich gegenseitig und ermöglichen dem Immunsystem auf diese Weise offensichtlich die Auswahl der angemessenen Immunantwort auf die jeweilige Infektion. Wie Abbildung 1 und Tabelle 4 verdeutlichen, wirkt $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ der Synthese von IL-2, IFN- γ und IL-12 entgegen⁽¹⁸⁷⁻¹⁸⁹⁾. Vitamin D scheint somit das Gleichgewicht der T_H -Subgruppen zugunsten der T_{H2} -Lymphozyten zu verschieben, indem es die T_{HI} -Aktivität herunterreguliert^(190:191).

System	Effekt	Referenz
<i>Aktivierte Lymphozyten</i>		
Antikörperproduktion	↓	(192)
IL-2 induzierte zytotoxische Zytokine	↓	(194)
IL-2- und IFN- γ -Synthese	↓	(195)
IL-2-Rezeptoren	↑	(196)
Cyclosporin-Sensitivität	↑	(195)
<i>Monozyten</i>		
HLA Klasse II-Expression	↓	(168)
CD4-Expression	↓	(197)
IL-1-Synthese	↓	(192)
Phagozytose	↑	(192)
Hitzeschock-Antwort	↑	(198)
<i>Makrophagen</i>		
Tumorzell-Zytotoxizität	↑	(167)
F_C -Rezeptoren	↑	(167)
Saure Phosphatase	–	(199)
H_2O_2 -Produktion	↑	(166)
bakterizide Aktivität	↑	(165)

Tab. 4: Effekte von $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ auf das Immunsystem

- Pankreas

Die Entdeckung von VDR im Pankreas^(200;201) führte zu zahlreichen Untersuchungen über die Beteiligung von Vitamin D an der Insulinsekretion und damit der Regulation der Glukose-Homeostase. Mittlerweile wurde klar, daß Vitamin D das Pankreas auf vielfältige Weise reguliert und möglicherweise sogar Rückkopplungsmechanismen existieren. Vitamin D beeinflusst die Funktion der pankreatischen β -Zellen hauptsächlich direkt⁽²⁰²⁾. Seiner Wirkung auf den Calcium-Metabolismus kommt dabei wohl eher eine untergeordnete Bedeutung zu. Ratten, die an Vitamin D-Mangel leiden, weisen eine verminderte Insulinsekretion auf. $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ steigert die Transkription des Insulingens⁽²⁰³⁾, fördert die Insulinsekretion⁽¹⁹³⁾ und verbessert die Glukosesensitivität⁽²⁰⁴⁾ der β -Zellen. Neueste Untersuchungen zeigten einen Einfluß von $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ auf eine Vielzahl weiterer β -Zellproteine⁽²⁰⁵⁾. Im Gegenzug kann Insulin möglicherweise auch den Vitamin D-Metabolismus beeinflussen: In diabetischen Individuen sind die Plasmaspiegel von $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ und DBP reduziert⁽²⁰⁶⁾. Auch in Tiermodellen des Typ 1 Diabetes ist die Knochendichte ebenso vermindert⁽²⁰⁶⁾ wie die VDR-Expression diverser Gewebe⁽²⁰⁷⁻²⁰⁹⁾.

Für zahlreiche endokrine Zellen konnte man inzwischen eine Wirkung von Vitamin D auf die Expression von Oberflächenmarkern nachweisen. Die wohl wichtigste Beobachtung stellt die $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ induzierte Verminderung der HLA Klasse II-Expression auf endokrinen Zellen dar^(210;211). Die Bedeutung der HLA Klasse II-Moleküle für die Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus und anderer Autoimmunerkrankungen wurde bereits in den Kapiteln 1.1.2 und 1.1.3 angesprochen.

System	Effekt	Referenz
<i>Pankreas</i>		
Insulin-Sekretion	↑	(212)
Glukagon-Sekretion	–	(193;212)
Somatostatin-Sekretion	–	(193;212)
IFN- γ induzierte HLA Klasse II Expression	↓	(210)
IFN- γ induzierte HLA Klasse I Expression	–	(210)
<i>Testis</i>		
IFN- γ induzierte HLA Klasse II Expression	↓	(211)
IFN- γ induzierte HLA Klasse I Expression	–	(211)
<i>Schilddrüse</i>		
IFN- γ induzierte HLA Klasse II Expression	↓	(211)
IFN- γ induzierte HLA Klasse I Expression	–	(211)

Tab. 5: Effekte von $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ auf Pankreas und Metabolismus

1.2.2 Enzyme der Vitamin D-Synthese

25-Hydroxylase

Die 25-Hydroxylierung von Vitamin D stellt den initialen Schritt seiner Aktivierung dar. Obwohl auch andere Gewebe zur 25-Hydroxylierung von Vitamin D in der Lage sind⁽²¹³⁾, findet diese Reaktion überwiegend in der Leber statt⁽²¹⁴⁾. Es gibt Hinweise für eine sowohl mikrosomale (*CYP2C11*)⁽²¹⁵⁾ als auch mitochondriale (*CYP27*)⁽²¹⁶⁾ 25-Hydroxylierung von Vitamin D, wobei der

letzteren inzwischen die größere Bedeutung beigemessen wird, da *CYP2C11* nur in männlichen Individuen exprimiert wird⁽²¹⁷⁾. *CYP27* ist ein Cytochrom P450, dessen Aktivität keiner ausgeprägten Regulation unterliegt. Die 25-Hydroxylierung ist damit fast ausschließlich vom Substratangebot abhängig⁽²¹⁸⁾.

Nach bisheriger Erkenntnis ist *CYP27* ein monomorphes Enzym, von dem eine klinisch relevante Mutationshäufung bisher nicht beschrieben wurde.

25-Hydroxyvitamin D-1 α -Hydroxylase

Die 25-Hydroxyvitamin D-1 α -Hydroxylase hydroxyliert 25(OH) D₃ an C₁ zum aktivsten natürlichen Vitamin D-Metaboliten, dem 1,25(OH)₂ D₃. Die Beobachtung, daß nephrektomierte Ratten kein 1,25(OH)₂ D₃ mehr bilden können⁽²¹⁹⁾, führte zur Entdeckung der renalen 25-Hydroxyvitamin D-1 α -Hydroxylase (*CYP1 α*). Dieses an der inneren Mitochondrienmembran der proximalen Tubuluszellen gelegene Cytochrom P450 hydroxyliert 25(OH) D₃⁽²²⁰⁾. Im Gegensatz zur 25-Hydroxylase *CYP27* unterliegt *CYP1 α* einer ausgeprägten Regulation durch Parathormon⁽²²¹⁾, Calcitonin⁽²²²⁾ und diverse Vitamin D-Metabolite⁽²²³⁾. Eine extrarenale Synthese von 1,25(OH)₂ D₃ wurde für Knochen, Leber, Plazenta, Haut und Makrophagen beschrieben^(224;225). Ihr wird jedoch lediglich eine auto- bzw. parakrine Funktion beigemessen⁽²²⁶⁾.

Auch *CYP1 α* ist ein monomorphes Enzym, dessen Gen sich auf Chromosom 12q in direkter Nachbarschaft des VDR-Gens befindet^(227;228). Auf klinisch relevante Mutationen der 25-Hydroxyvitamin D-1 α -Hydroxylase wird in Kapitel 1.2.6 kurz eingegangen.

25-Hydroxyvitamin D-24-Hydroxylase

Die 24-Hydroxylierung von 1,25(OH)₂ D₃ bildet den Anfang einer Reihe von Oxidationsreaktionen, deren Endprodukt die Calcitroidsäure ist. Sie ist ein biologisch inaktives, wasserlösliches Molekül, das biliär eliminiert wird⁽¹⁵⁵⁾. Die 24-Hydroxylierung erfolgt durch die 25-Hydroxyvitamin D-24-Hydroxylase (*CYP24*) –ebenfalls ein mitochondriales Cytochrom P450.

Auch 25(OH) D₃ und andere an C₂₅ hydroxylierte Vitamin D-Metabolite sind Substrat für *CYP24*⁽²²⁹⁾. Obwohl *CYP24* eine wesentlich höhere Affinität zu 1,25(OH)₂ D₃ als zu 25(OH) D₃ besitzt, wird in vivo mehr 24,25(OH)₂ D₃ als 1,24,25(OH)₃ D₃ gebildet^(230;231). Grund hierfür ist zum einen die physiologisch etwa 1000fach höhere Konzentration von 25(OH) D₃ im Vergleich zu 1,25(OH)₂ D₃ und zum anderen die höhere Geschwindigkeit der Reaktion 25(OH) D₃ → 24,25(OH)₂ D₃⁽²³²⁾. Dies erklärt auch, daß 24,25(OH)₂ D₃ der Vitamin D-Metabolit mit der höchsten Serumkonzentration ist, wirft aber zugleich die Frage nach seinen eventuellen biologischen Funktionen auf. Nach neueren Erkenntnissen scheint 24,25(OH)₂ D₃ nicht nur Vitamin D-Abbauprodukt, sondern selbst auch an der Regulation von Knochen und Knorpel beteiligt zu sein⁽²³³⁻²³⁵⁾. 24,25(OH)₂ D₃ bindet an einen –möglicherweise mit mVDR identischen– membranären Rezeptor und interagiert via PKC und Zyklooxygenase (COX)⁽²³⁶⁾ mit Leukotrienen und Prostaglandinen^(237;238). Untersuchungen über die physiologische Relevanz der Vernetzung von Vitamin D- und Arachidonsäure-Stoffwechsel⁽²³⁹⁾ in Chondrozyten (und möglicherweise auch in anderen Zellen) stehen noch aus.

CYP24 wird in nahezu allen Vitamin D-Zielgeweben zusammen mit *CYP1 α* exprimiert⁽²⁴⁰⁾. Dabei unterliegen beide einer zueinander inversen Regulation durch verschiedene Faktoren: 1,25(OH)₂ D₃, 24,25(OH)₂ D₃ sowie VDR induzieren^(241;242) und Östrogen, Testosteron^(243;244) sowie Calcitonin⁽²⁴⁵⁾ inhibieren die Expression von *CYP24*. Parathormon hat –je nach Gewebe– eine differentielle Wirkung auf die jeweilige *CYP24*-mRNA-Menge^(246;247). Die genannten Substanzen haben den jeweils gegenteiligen Effekt auf die *CYP1 α* -Expression.

Bemerkenswert ist, daß diabetische Individuen erhöhte 24,25(OH)₂ D₃-Spiegel aufweisen⁽²⁴⁸⁾, die durch Insulin normalisiert werden⁽²⁴⁹⁾. Ob Insulin die Expression von *CYP24* unmit-

telbar induziert oder ob es sich hierbei um einen indirekten Effekt durch die veränderte Konzentration anderer Vitamin D-Metabolite (siehe Kapitel 1.2.1 + 1.2.7) handelt, ist bisher unbekannt.

Die invers zueinander regulierte 24- und 1 α - Hydroxylierung „vor Ort“ ermöglichen eine Feinsteuerung der jeweiligen lokalen Wirkung von 25(OH) D₃ und 1,25(OH)₂ D₃⁽²⁵⁰⁾ im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus. Eine hohe 1,25(OH)₂ D₃-Konzentration hat einen beschleunigten Abbau (durch *CYP24*) und eine verminderte Neusynthese (durch *CYP1 α*) von 1,25(OH)₂ D₃ zur Folge. Entsprechende Feedback- bzw. „Feedforward“-Mechanismen finden bei der Feinregulation zahlreicher Steroidhormonwirkungen Anwendung (z.B. 11- β -Hydroxysteroiddehydrogenase: Cortisol \rightarrow Cortison; 5- α -Reduktase: Testosteron \rightarrow Dehydrotestosteron bzw. Östradiol).

CYP1 α und *CYP24* sind –durch ihre Expression in Niere und Intestinum– an der Regulation des systemischen Calcium-Haushalts beteiligt. Auto- bzw. parakrin haben sie die in diesem Kapitel erläuterten Wirkungen auf das jeweilige Vitamin D-Zielgewebe.

1.2.3 Der nukleäre Vitamin D Rezeptor

Die genomischen Effekte von Vitamin D werden über seinen nukleären Rezeptor (VDR) vermittelt. VDR gehört zur Superfamilie der Steroid-/Schilddrüsenhormon-Rezeptoren⁽²⁵¹⁾ und reguliert die Transkription der Zielgene sowohl positiv als auch negativ durch Bindung an eine spezifische DNA-Erkennungssequenz (VDRE, vitamin D responsive element).

Bereits Anfang der 60er Jahre zeigten Untersuchungen, daß Östrogen und andere Hormone ähnlicher Struktur ihre Wirkung im Zellkern ihrer Zielzellen durch Beeinflussung der Genexpression nach Bindung an einen spezifischen Rezeptor vermitteln⁽²⁵²⁾. Einige Jahre später ergaben sich analoge Hinweise für die Wirkung von Vitamin D^(253;254) und bis Mitte der 70er Jahre konnte die Existenz des VDR-Proteins zweifelsfrei nachgewiesen werden⁽²⁵⁵⁾. Die Verfügbarkeit von Antikörpern gegen VDR führte zur Entdeckung seiner Expression in einer Vielzahl von Geweben (siehe Tabelle 6), die offensichtlich nicht an der Calcium-Homeostase beteiligt sind, und bereitete so den Boden für die Identifizierung zahlreicher weiterer Funktionen von Vitamin D (siehe Kapitel 1.2.1). Die nukleäre Lokalisation von mit 1,25(OH)₂ D₃ besetztem VDR ist eindeutig belegt, wohingegen auch ein zytosolisches Vorkommen des „freien“, unbesetzten VDR diskutiert wird⁽²⁵⁵⁻²⁵⁷⁾.

VDR liegt in den Vitamin D-Zielgeweben in einer Konzentration von etwa 10-100 fmol/mg Protein (\approx 500 bis 25000 Kopien VDR pro Zelle) vor. Das etwa 50 kDa große, serinphosphorylierte Protein⁽²⁵⁸⁾ bindet seinen Liganden, 1,25(OH)₂ D₃, mit hoher Selektivität und einer Affinität (K_a) von $1 \times 10^{10} M^{-1}$. Die Affinität zu anderen Vitamin D-Metaboliten ist deutlich geringer ($K_a \leq 5 \times 10^7 M^{-1}$)^(259;260).

Die VDR cDNA umfaßt ein einziges Transkript von 4,8 kb Länge. 1281 Nukleotide –eingerahmt von 315 bp 5'- und 3,2 kb 3'-untranslatierten Regionen (UTR)– kodieren für 427 Aminosäuren⁽²⁶¹⁾. Das menschliche VDR-Gen ist auf Chromosom 12q13-14^(262;263) lokalisiert und umfaßt 11 Exons, die auf mehr als 75 kb verteilt sind^(264;265). Die 5'-nicht kodierende Region enthält 3 Exons (1A, 1B und 1C), während die restlichen 8 Exons translatiert werden⁽²⁶¹⁾. Durch differentielles Splicing entstehen drei verschiedene mRNA-Isoformen, über deren Gewebeverteilungsmuster und mögliche Stabilitätsunterschiede jedoch noch nichts bekannt ist⁽²⁶⁴⁾.

Die Homologie zwischen humanem VDR und Maus- bzw. Ratten-VDR beträgt 86% bzw. 79% für das Gesamtprotein und etwa 95% für die DNA-Bindungsdomäne⁽²⁶⁶⁾. Die Struktur des VDR entspricht dem Grundbauplan aller bekannten Steroidhormon-Rezeptoren und gliedert sich in die Domänen A, B, C, D, E und F⁽²⁶⁷⁾. Die Domäne A und B dienen der Transaktivierung von VDR und sind im Vergleich zu anderen nukleären Rezeptoren stark verkürzt. C bildet die DNA-Bindungsdomäne und besteht aus zwei sogenannten „Zinkfingern“, in denen jeweils ein Zinkatom eine koordinative Bindung mit vier Cysteinresten eingeht und die dreidimensionale

Struktur des Proteins fixiert. Während der aminoterminalen Zinkfinger der DNA-Bindung dient, ist sein carboxyterminales Pendant für die Dimerisation (siehe unten) von VDR verantwortlich⁽²⁶⁸⁾. Die D-Domäne stellt den Übergang zur Liganden-Bindungsdomäne E/F dar⁽²⁶⁹⁾.

Gewebe/ Organsystem	Referenz
<i>klassische Vitamin D-Zielgewebe (Calcium-Homeostase)</i>	
Knochen	(270)
Nebenschilddrüse	(201)
Niere	(271)
Intestinum	(255)
<i>hämatopoetische + lymphatische Zellen</i>	
aktivierte T- und B-Lymphozyten	(161;162)
Makrophagen	(163)
Monozyten	(161;162)
Milz	(272)
Thymus	(273)
<i>Muskel</i>	
Herz	(272)
gestreifte Muskulatur	(274)
glatte Muskulatur	(274)
<i>Endokrinium</i>	
Pankreas	(200)
-pankreatische β -Zellen	(201)
Schilddrüse	(201)
Brustdrüse	(272)
Ovar	(201)
Testis	(275)
Hypophyse	(201)
Nebennierenmark	(201)
Nebennierenrinde	(276)
<i>sonstige Gewebe</i>	
Haut	(272)
-Fibroblasten	(277)
-Keratinocyten	(277)
-Melanozyten	(278)
Lunge	(272)
Leber	(272)
Gehirn	(279)

Tab. 6: Vitamin D-Zielgewebe (definiert durch die Expression von VDR)

Die Bindung von $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ an VDR führt zu Konformationsänderungen der E/F-Region, stabilisiert die DNA-Bindung von VDR und ermöglicht so erst seine Dimerisation. Der E/F-Domäne kommt zudem eine transkriptionsaktivierende Funktion (AF-2) zu⁽²⁸⁰⁾. Die Bindung eines Liganden an VDR verlangsamt zudem die proteolytische Degradation des Rezeptors^(281;282). Eine

Übersicht über die Struktur des VDR-Gen, der -mRNA und der -Proteindomänen gibt Abbildung 2.

Viele nukleäre Rezeptoren (einschließlich VDR) binden entweder als Homodimer oder als Heterodimer an eine für sie jeweils spezifische DNA-Erkennungssequenz (responsive element)⁽²⁸³⁾. Die Dimerisation erleichtert dabei ihre kooperative, hochaffine Interaktion mit der DNA. Im Falle von VDR erkennt ein Rezeptor jeweils eine Hälfte eines Response-Elements. Der Partner von VDR bei der Heterodimerisation ist der Retinoid X Rezeptor (RXR)⁽²⁸⁴⁾.

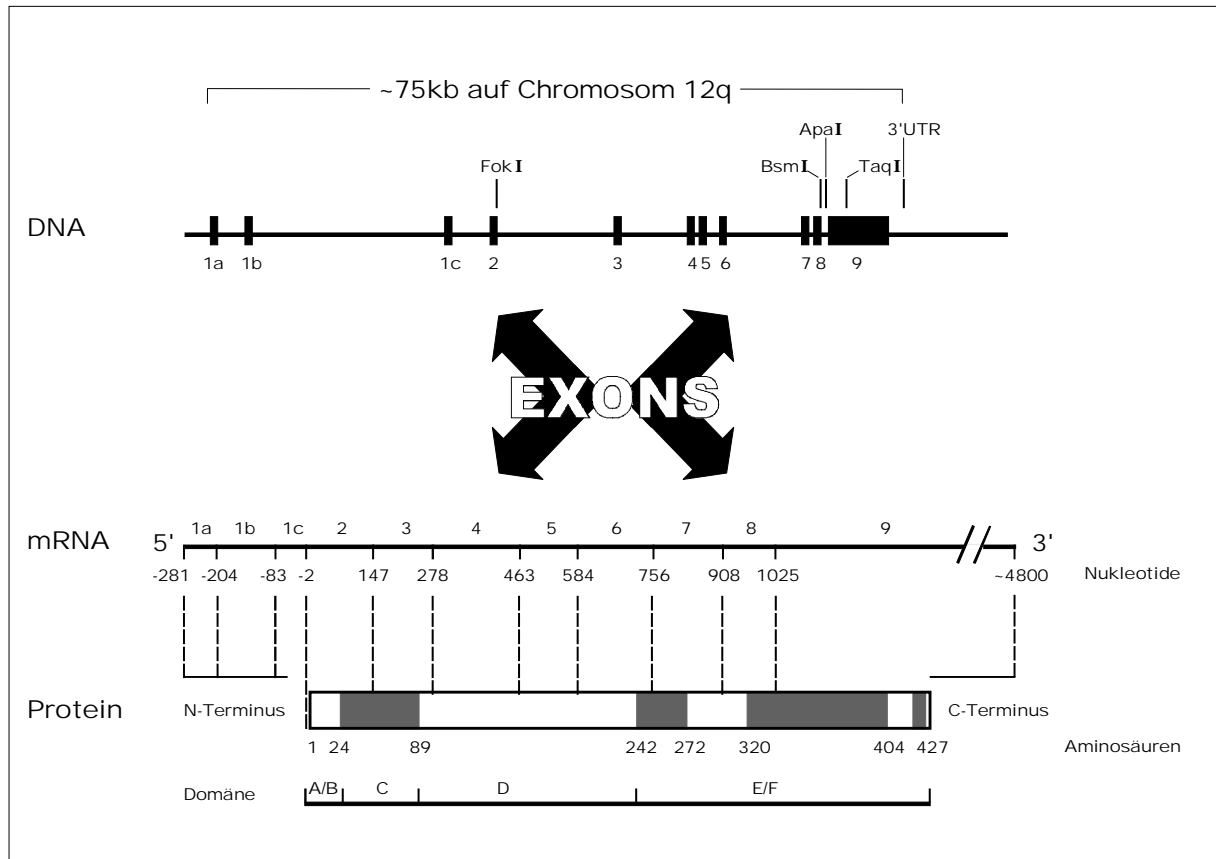


Abb. 2: Struktur von VDR-Gen, -mRNA und -Proteindomänen

An einem Beispiel (siehe Abbildung 3) soll kurz auf die VDR-RXR-Interaktion eingegangen werden: In Abwesenheit von $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ liegt VDR als Homodimer an ein VDRE gebunden vor. Dabei ist es entweder inaktiv oder hemmt die Transkription des entsprechenden Gens [1]. $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ destabilisiert das VDR-VDR-Homodimer, und in Anwesenheit von RXR kommt es zu Bildung eines VDR-RXR-Heterodimers am VDRE. Der VDR-RXR-Komplex bewirkt eine verstärkte Transkription des zugehörigen Gens [2]. 9-cis RA (Retinoidsäure) vermindert die Affinität von VDR und RXR zueinander sowie zum VDRE. Stattdessen fördert es die Bindung eines RXR-RXR-Homodimers an einer RXRE (retinoid X responsive element) genannten DNA-Sequenz mit nachfolgender Transkription des dortigen Gens [3]⁽²⁸⁵⁻²⁸⁸⁾.

Die Homo- und Heterodimerbildung von VDR/RXR ermöglicht somit die differenzierte Transkriptionskontrolle einer Vielzahl unterschiedlicher Gene durch nur wenige Liganden. Sowohl die absolute Menge von VDR, RXR, $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ und 9-cis RA als auch deren Konzentrationsverhältnisse zueinander bestimmen, welche Gene transkribiert werden. Ferner würden demnach Faktoren, die die Affinität der einzelnen Determinanten zueinander veränderten⁽²⁸⁹⁾, die Trans-

kription einzelner Gene beeinflussen. Weitere Details dieses komplexen Systems sind an anderer Stelle beschrieben⁽²⁹⁰⁾.

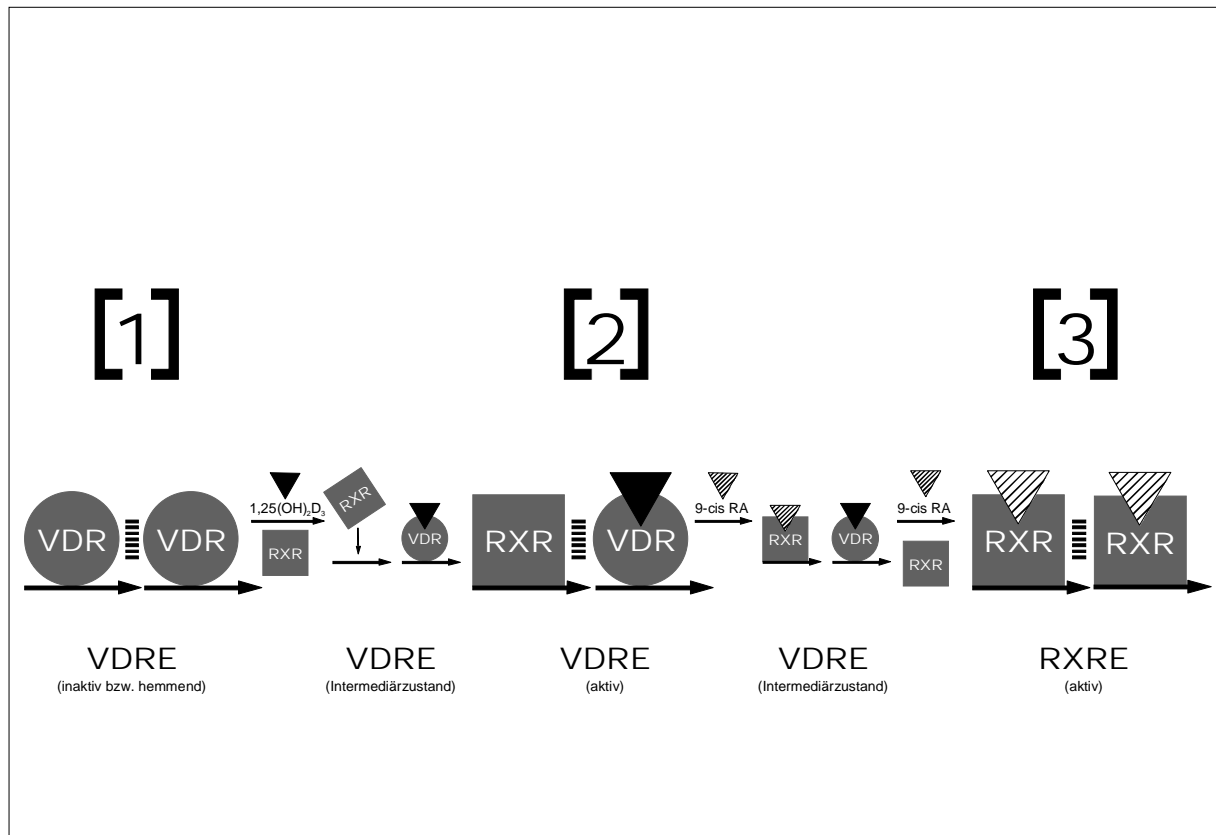


Abb. 3: Interaktion von VDR und RXR bei der Transkriptionskontrolle

1.2.4 Genomische Varianten des nukleären Vitamin D Rezeptors

Im VDR-Gen sind mehrere Polymorphismen bekannt: Ein T→C Basenaustausch im ersten Kodon des Exons 2 führt zu einem um 3 Aminosäuren kürzeren Protein⁽²⁹¹⁾. Dieser Polymorphismus kann durch die Restriktionsendonuklease *FokI* mit einem RFLP nachgewiesen werden (siehe Kapitel 2.3.4)⁽²⁹²⁾. Im letzten Intron des VDR-Gens sind zwei Polymorphismen mit den Restriktionsenzymen *BsmI* und *ApaI* detektierbar. Im Exon 9 existiert ein „stiller“ T→C Basenaustausch (nachweisbar mit der Restriktionsendonuklease *TaqI*), der zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz führt⁽²⁹³⁾. Die 3'-untranslatierte Region (UTR) enthält einen variablen Poly(A)-Abschnitt⁽²⁹³⁾. Von der Existenz weiterer, bisher unbekannter Polymorphismen in dem mit 75 kb sehr großen VDR-Gen kann ausgegangen werden.

Über die funktionelle Relevanz der bekannten Polymorphismen gibt es widersprüchliche Daten: Intronische Bereiche können an der Regulation der Transkription beteiligt sein⁽²⁹⁴⁾. Entsprechende Hinweise für den *BsmI*- und den *ApaI*-Polymorphismus fehlen jedoch bisher^(295;296). Der *FokI*-Polymorphismus reduziert die Länge der für die Transaktivierung wichtigen A-Domäne von 20 auf 17 Aminosäuren. Berichten über eine dadurch (*in vivo*) veränderte Funktionalität^(297;298) von VDR –verursacht durch Unterschiede in Affinität, Transaktivierungsfunktion⁽²⁹⁹⁾ oder mRNA-Menge⁽³⁰⁰⁾– stehen negative (*in vitro*) Daten gegenüber⁽³⁰¹⁾. Die 3'-UTR eines Gens kann Einfluß auf die Stabilität seines Transkripts haben⁽³⁰²⁾. Die diesbezüglichen Auswirkungen des 3'-UTR-VDR-Polymorphismus werden unterschiedlich bewertet^(293;303). Da –wie oben erwähnt– verschiedene mRNA-Isoformen des VDR existieren, deren Gewebeverteilung und potentielle

Stabilitätsunterschiede bisher nicht genau charakterisiert sind⁽²⁶⁴⁾, müssen die *in vitro* Daten über die funktionelle Relevanz der VDR-Polymorphismen mit großer Zurückhaltung bewertet werden.

1.2.5 Der membranäre Vitamin D Rezeptor

Eine Reihe von Studien der letzten Jahre zeigte, daß nicht alle $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ vermittelten Effekte durch eine Interaktion zwischen VDR-Hormon-Komplex und Genom erklärt werden können⁽³⁰⁴⁾. $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ beeinflußt innerhalb von 1-2 Minuten⁽³⁰⁵⁾ den Calcium-Haushalt in Intestinum⁽³⁰⁵⁾, Leber⁽³⁰⁶⁾, Muskel⁽³⁰⁷⁾ und Nebenschilddrüse⁽³⁰⁸⁾ –viel zu schnell, um über eine Regulation der Transkription der Vitamin D-Zielgene zu wirken. Zudem gibt es Hinweise für eine Interaktion von $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ mit Proteinkinase C (PKC)⁽³⁰⁹⁾. PKC ist normalerweise an G-Protein gekoppelten, membranären Signalkaskaden beteiligt. Die Kinetik dieser Interaktion von $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ und PKC unterscheidet sich von der Kinetik des bereits bekannten nukleären Rezeptors. Daher geht man von der Existenz eines membranären Vitamin D Rezeptors aus, dessen physiologische Bedeutung noch weitgehend offen ist. Ein Kandidatenprotein (60 kDa; $K_a \approx 5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$; 50-500 Kopien pro Zelle) ist inzwischen identifiziert worden⁽³¹⁰⁾. Die Bestätigung dieser Befunde⁽³¹¹⁾ und die Klonierung des entsprechenden Gens stehen allerdings noch aus.

1.2.6 Das Vitamin D bindende Protein

Das Vitamin D bindende Protein (DBP) bindet und transportiert Vitamin D sowie dessen Metabolite im Blut⁽³¹²⁾. Seine Funktion wurde im Rahmen der „freien Hormon“-Hypothese erklärt⁽³¹³⁾. Diese Hypothese besagt, daß nur freies, nicht gebundenes Steroid-/Peptidhormon biologisch aktiv ist, während das an Hormon bindendes Protein gekoppelte Hormon als schnell verfügbares – aber inaktives– Reservoir dem Körper zur Verfügung steht⁽³¹⁴⁾. Vergleichbare Transportproteine existieren für die Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 , für Kortisol und für die Sexualhormone. Bis vor kurzem hielt man die Bindung und den Transport von Vitamin D für die Hauptaufgabe von DBP. Inzwischen sind eine Reihe weiterer Funktionen bekannt, auf die später eingegangen wird.

Ursprünglich wurde DBP bereits 1959 als polymorphes Protein im Rahmen der Serumelektrophorese identifiziert und als Gc (Group-specific component)-Globulin bezeichnet⁽³¹⁵⁾. Zu diesem Zeitpunkt war die biologische Funktion von DBP unklar, aber man machte sich seinen ausgeprägten Polymorphismus bei populationsgenetischen und forensischen Untersuchungen zunutze. Später hielt man DBP für ein Akute Phase-Protein⁽³¹²⁾.

DBP ist ein hochpolymorphes, monomeres Serumprotein von etwa 58 kDa⁽³¹⁶⁾. Seine exakte Größe hängt vom Glykosylierungsgrad ab. Das DBP-Gen liegt auf Chromosom 4q11-q13^(317:318) und umfaßt 13 Exons auf 42 kb⁽³¹⁹⁾. Die mRNA enthält 1690 Nukleotide, die für das 458 Aminosäuren umfassende, sezernierte Protein kodieren. Die Sequenzhomologie zum DBP der Ratte und der Maus beträgt jeweils 77% bzw. 78%⁽³¹⁹⁾. Zudem weist DBP eine große Verwandtschaft mit dem chromosomal benachbarten Albumin und α -Fetoprotein auf, mit denen es zu einer Genfamilie gehört⁽³²⁰⁾, die aus einem gemeinsamen Vorläufergen vor etwa 500-600 Millionen Jahren entstand⁽³²¹⁾.

Das im Blut zirkulierende DBP wird beinahe ausschließlich von der Leber synthetisiert^(320:322). Eine Reihe weiterer Gewebe exprimiert DBP (jedoch in weit geringerer Menge): Niere⁽³²⁰⁾, Testis und Fettgewebe. DBP ist bereits ab der 10. bis 13. Gestationswoche nachweisbar⁽³²³⁾. Die exakten an der Regulation der DBP-Transkription beteiligten Mechanismen sind bisher unbekannt. Seine Transkription scheint an Albumin gekoppelt zu sein und durch Östrogen⁽³²⁴⁾, STH ⁽³²⁵⁾, IL-6 und $\text{TGF-}\beta$ ⁽³²⁶⁾ reguliert zu werden.

Das DBP-Gen enthält drei verbreitete Polymorphismen. Im Exon 11 führt ein T/G-Polymorphismus im Kodon 416 zu einem Allel („1s“ oder „D416E“; detektierbar mit *StyI*), das *Glu*

anstelle von *Asp* enthält. Im Allel „2“ (oder „T420K“; detektierbar mit *HaeIII*) ersetzt *Lys* im Kodon 420 *Thr* durch einen C/A-Polymorphismus⁽³²⁷⁾. Während Threonin glykosyliert werden kann, ist die Bindung von N-Acetylneuraminsäure an das Allel „2“ an Position 420 nicht möglich⁽³²⁸⁾. Mit dem Nachweis der beiden Exon 11-Polymorphismen und deren Nomenklatur beschäftigt sich Kapitel 2.3.4 eingehender (siehe auch Abbildung 4). Der in Intron 8 befindliche (TAAA)_n-Repeat-Polymorphismus wird in Kapitel 2.3.7 näher erläutert⁽³²⁹⁾. Desweiteren sind mehr als 120 sehr seltene Varianten von DBP durch isoelektrische Fokussierung beschrieben worden⁽³³⁰⁾, deren Existenz bisher jedoch eher von anthropologischem Interesse ist.

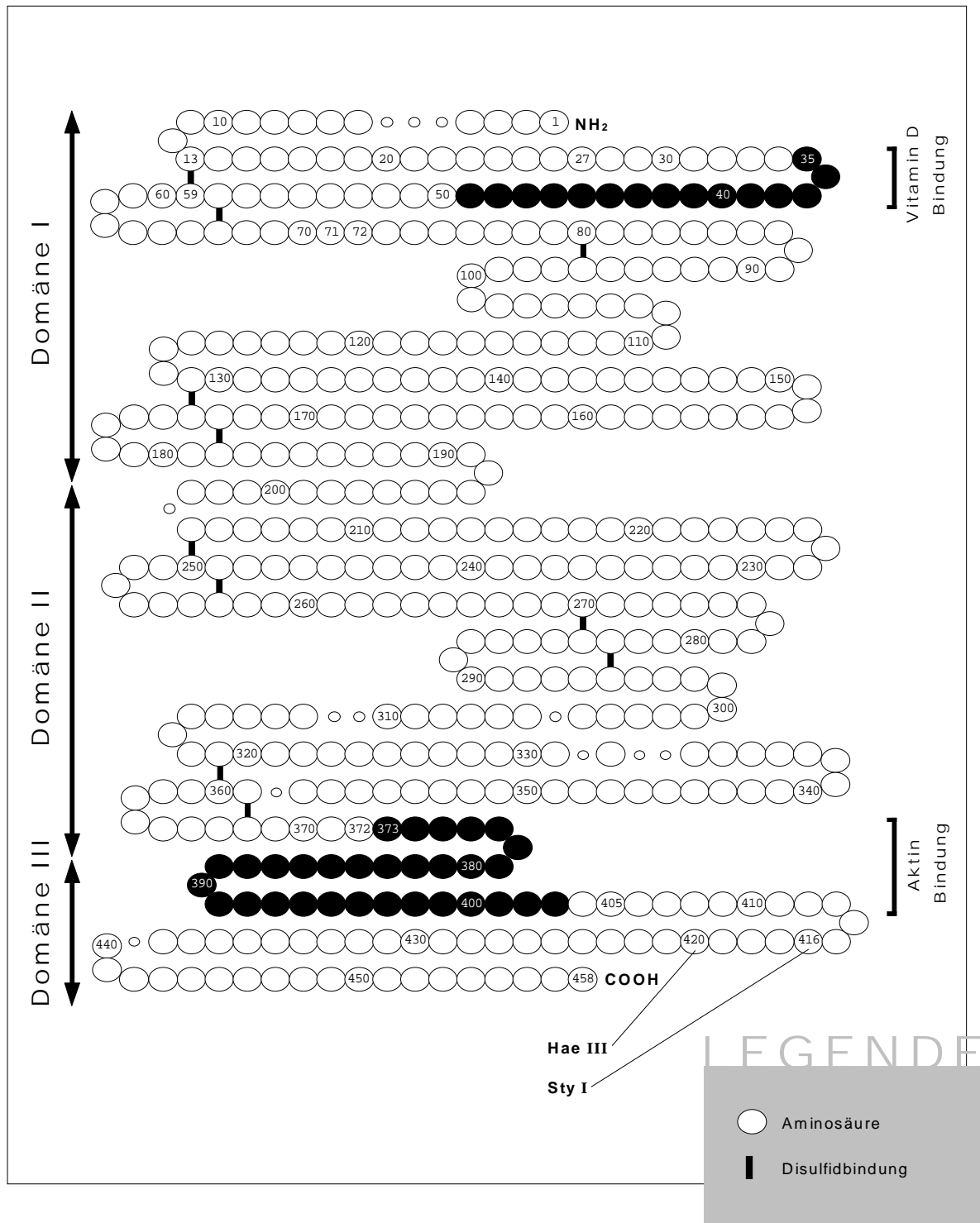


Abb. 4: Struktur des Vitamin D bindenden Proteins

Ursprünglich ging man davon aus, daß sich das Vitamin D-Bindungsverhalten der einzelnen DBP-Isoformen nicht voneinander unterscheidet⁽³²⁷⁾. Neuere Studien legen jedoch nahe, daß sehr wohl Affinitätsunterschiede für 25(OH) und 1,25(OH)₂ Vitamin D zwischen den einzelnen Allelen bestehen⁽³³¹⁾ und daß auch ungesättigte Fettsäuren, die ihrerseits an DBP binden, die Affinität von DBP zu Vitamin D beeinträchtigen⁽³³²⁾. DBP zirkuliert in einer Konzentration von 4-8 µM im Plasma⁽³³³⁾ und hat dort eine Halbwertszeit von 2½-3 Tagen⁽³³⁴⁾. Damit werden etwa 10 mg DBP pro kg Körpergewicht und Tag synthetisiert. Neben dem oben bereits erwähnten hormonellen Einfluß senken eine chronische Leberinsuffizienz und eine massive Proteinurie die DBP-Serumkonzentration⁽³³³⁾.

Folgende Funktionen des DBP sind inzwischen beschrieben worden:

- Vitamin D-Bindung

DBP verfügt über eine hohe Affinität (K_a) zu Vitamin D ($5 \times 10^8 M^{-1}$ für 25(OH) D₃ und $4 \times 10^7 M^{-1}$ für 1,25(OH)₂ D₃) und bindet jeweils ein Steroid-Molekül pro Molekül DBP⁽³³⁵⁾. Lediglich 2% des zirkulierenden DBP sind durch Vitamin D besetzt^(333;336). Nur 0,04% des 25(OH) D₃ bzw. 0,40% des 1,25(OH)₂ D₃ kommen frei im Plasma vor. Der Rest liegt zu 12 bzw. 15% an Albumin und zu 88 bzw. 85% an DBP gebunden vor⁽³³⁷⁾. Während endogen synthetisiertes Cholecalciferol hauptsächlich an DBP gebunden wird^(338;339), übernehmen Chylomikronen den Transport von intestinal aufgenommenem Vitamin D⁽³³⁶⁾. DBP scheint damit an der Regulation der hepatischen und renalen Vitamin D-Hydroxylierung beteiligt zu sein. Ferner sind die Serumkonzentrationen von 25(OH) D₃ und 1,25(OH)₂ D₃ eng mit der Serumkonzentration von DBP korreliert⁽³⁴⁰⁾.

- Aktin-Bindung

DBP bindet monomeres, globuläres (G-) Aktin mit einer Affinität (K_a) von $2 \times 10^7 M^{-1}$ nicht kovalent und unabhängig von einer Vitamin D-Bindung an DBP^(341;342). Die Bedeutung der Interaktion des extrazellulären DBP und des intrazellulären G-Aktins gibt bis heute Rätsel auf. DBP hemmt die Polymerisation von G- zu filamentärem (F-) Aktin⁽³⁴³⁾, und eine intrazelluläre Injektion von DBP bewirkt eine reversible Depolymerisation des Zytoskeletts⁽³⁴⁴⁾. Zudem fand man im Plasma von Patienten mit ausgedehnter Gewebeerstörung und Entzündungsreaktion –wie Lebernekrose und Lungenembolie– hohe Konzentrationen von DBP-Aktin-Komplexen⁽³⁴⁵⁾. Die plausibel klingende These des DBP vermittelten Schutzmechanismus gegen unkontrollierte Aktin-Polymerisation im Rahmen von Verletzungen und Entzündungen bedarf allerdings noch der Bestätigung durch *in vivo* Experimente. Die bisherigen Daten sind keineswegs eindeutig.

- Aktivierung von Makrophagen, Stimulation von Osteoklasten

Neuere Untersuchungen legen nahe, daß DBP die F_c-Rezeptor-Aktivität auf Makrophagen sowie deren Peroxid-Produktion erhöht. Die Aktivierung von Makrophagen durch T- und B-Lymphozyten erfordert einen Serumfaktor, bei dem man mittlerweile davon ausgeht, daß es sich um modifiziertes DBP handelt^(346;347). Dieser sogenannte Makrophagen aktivierende Faktor (MAF) entsteht durch sequentielle Glykosylierung von DBP durch Exoenzyme der B- und T-Lymphozyten, Galaktosidase und Sialidase, wie sich inzwischen auch *in vitro* nachweisen ließ⁽³⁴⁶⁻³⁴⁸⁾.

Ein ähnlicher, aktivierender Effekt von MAF konnte für Osteoklasten nachgewiesen werden, deren Vorläuferzellen von Makrophagen bzw. Monozyten abstammen⁽³⁴⁸⁾. DBP-Knockout-Mäuse erwiesen sich kürzlich als lebens- und reproduktionsfähig, litten jedoch un-

ter den Zeichen eines schweren Vitamin D-Mangels⁽³⁴⁹⁾. Untersuchungen über eine Beeinträchtigung der Makrophagenfunktion an diesen Tieren stehen noch aus.

- Wirkung als C5a Ko-Chemotaxin

Ein Serumprotein, das die C5a vermittelte Chemotaxis von Leukozyten verstärkt, stellte sich als DBP heraus^(335;350). Zunächst schien es, als würde DBP C5a vor enzymatischer Proteolyse schützen oder eine Interaktion zwischen Komplement und neutrophilen Granulozyten vermitteln⁽³⁵¹⁾. Inzwischen wurde klar, daß eine Bindung an C5a für die Wirkung von DBP als Ko-Chemotaxin nicht notwendig ist^(352;353). Dagegen erscheint eine Internalisierung von DBP durch neutrophile Granulozyten wahrscheinlich⁽³⁵⁴⁾.

1.2.7 Pathophysiologie des Vitamin D Systems und seine Krankheitsassoziationen

Aus den zahlreichen Funktionen von Vitamin D im menschlichen Körper und aus der Komplexität seines Metabolismus ergibt sich eine Fülle von Erkrankungen, die mit $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ im Zusammenhang stehen. Die folgende kurze Übersicht geht nur auf pathologische Zustände ein, die entweder genetische oder (auto)-immunologische Aspekte des Vitamin D-Systems und somit einen Bezug zur Thematik dieser Arbeit haben.

Pathophysiologie des Calcium-Stoffwechsel

- Vererbte Vitamin D-abhängige Rachitis

Bereits im Kindesalter kommt es bei der vererbten Vitamin D-abhängigen Rachitis (HVDDR, hereditary vitamin D dependent rickets) zu schweren Vitamin D-Mangelerscheinungen, besonders des Skeletts⁽³⁵⁵⁾. Trotz ausreichender Aufnahme der Vitamin D-Vorstufen mit der Nahrung sowie genügender UV-Exposition finden sich bei den Patienten deutlich reduzierte $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ -Spiegel während die $25(\text{OH}) \text{D}_3$ -Werte im Normalbereich liegen⁽³⁵⁶⁾. Ursache der HVDDR ist ein Defekt der renalen 25-Hydroxyvitamin D-1 α -Hydroxylase, deren Aktivität stark vermindert ist⁽³⁵⁷⁾. Die Erkrankung wird autosomal rezessiv vererbt⁽³⁵⁵⁾, ihre genetische Grundlage bleibt jedoch unklar, da die Lokalisation des für die CYP27-spezifische Untereinheit des Cytochrom P450-Komplexes kodierenden Gens noch nicht bekannt ist.

- Vererbte Vitamin D-resistente Rachitis

Das klinische Bild der Patienten mit vererbter Vitamin D-resistenter Rachitis (HVDRR, hereditary vitamin D resistant rickets) ähnelt stark den Symptomen der HVDDR-Patienten. Allerdings weisen HVDRR-Patienten eine erhöhte $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ -Plasmakonzentration⁽³⁵⁸⁾ und damit Zeichen einer Endorganresistenz gegenüber Vitamin D auf⁽³⁵⁹⁾. Ursache der Vitamin D-resistenten Rachitis stellen Mutationen des Vitamin D Rezeptors dar. Über ein Dutzend verschiedener –vor allem die DNA-Bindungsdomäne betreffende– Mutationen sind bisher beschrieben worden⁽³⁶⁰⁾. Der Vererbungsmodus der HVDRR ist ebenfalls autosomal rezessiv.

- VDR-Polymorphismen und Osteoporose

Osteoporose ist charakterisiert durch eine Abnahme der Knochendichte um mehr als 2,5 Standardabweichungen von der Altersnorm. Die verringerte Stabilität der Knochen führt zu Frakturen durch minimale Traumen⁽³⁶¹⁾. Die durch familiäre Häufung der Osteoporose implizierte genetische Komponente dieser Erkrankung⁽³⁶²⁾ und die Bedeutung von Vitamin D für

den Calcium-Haushalt bildeten den Ausgangspunkt für Assoziationsstudien zwischen Polymorphismen des VDR (siehe Kapitel 1.2.3) und Osteoporose. Diese Untersuchungen waren die ersten, in denen mögliche funktionelle Unterschiede der VDR-Allele als Grundlage einer Erkrankung beleuchtet wurden. Einer Fülle von Studien, die eine Assoziation von VDR-Allelen mit Osteoporose berichten^(292;293;300;363), steht eine ebenso große Anzahl negativer Befunde gegenüber⁽³⁶⁴⁻³⁶⁶⁾. Genetische Heterogenität sowohl der untersuchten Populationen als auch der Erkrankung sind eine mögliche Erklärung für die uneinheitlichen Ergebnisse^(365;367).

Vitamin D bei Malignität und Autoimmunität

- Vitamin D, VDR-Polymorphismen und Malignität

Seit 1980 gibt es zunehmend Hinweise für eine Beziehung zwischen Vitamin D-Metabolismus und Malignität. Dem eher indirekten Hinweis einer Assoziation des geographischen Breitengrades und der Sonnenintensität mit der Kolonkarzinom bedingten Mortalität⁽³⁶⁸⁾ folgten Studien, die eine inverse Korrelation der 25(OH) D₃-Serumkonzentration und der Inzidenz von Kolonkarzinomen^(369;370) zeigten. Ähnliches wurde später auch für Mamma-⁽³⁷¹⁾ und Prostatakarzinom beobachtet⁽³⁷²⁻³⁷⁴⁾. Eine ebenfalls inverse Korrelation der 1,25(OH)₂ D₃-Spiegel mit dem Stadium eines Kolonkarzinoms wurde jüngst berichtet⁽³⁷⁵⁾. 1,25(OH)₂ D₃ inhibiert die Angiogenese⁽³⁷⁶⁾ und die Metastasierung⁽³⁷⁷⁻³⁷⁹⁾ von malignen Tumoren. Als Mechanismen hierfür werden –neben einem Eingreifen in den Zellzyklus⁽³⁸⁰⁾– auch die Induktion von Apoptose⁽³⁸¹⁻³⁸³⁾ und die verminderte Expression von Onkogenen⁽³⁸⁴⁾ und Wachstumsfaktoren⁽³⁸⁵⁾ bzw. deren Rezeptoren⁽³⁸⁶⁾ durch Vitamin D diskutiert, die offensichtlich exklusiv über den nukleären Vitamin D Rezeptor vermittelt werden⁽³⁸⁷⁾. Einige Onkogene scheinen die maligne Transformation von Zellen zu induzieren, indem sie die VDR-RXR-Heterodimerisation inhibieren⁽³⁸⁸⁾. *In vitro* wirkt Vitamin D auf leukämische Zellen⁽¹⁷³⁾ und Mammakarzinomzellen⁽³⁸⁹⁾ anti-proliferativ und pro-differenzierend. Die Progression von kleinzelligen Bronchialkarzinomen wird durch Vitamin D und seine Analoga ebenso verlangsamt⁽³⁹⁰⁾. Entsprechende Berichte für Schilddrüsenkarzinome liegen bisher nur für *in vitro* Experimente⁽³⁹¹⁾ vor und konnten *in vivo* bisher noch nicht bestätigt werden⁽³⁹²⁾. Eine Reihe klinischer Studien zum Einsatz von 1,25(OH)₂ D₃ und seiner Analoga in der Therapie diverser Malignome sind noch nicht abgeschlossen⁽³⁹³⁾. Erste, noch nicht hinreichend aussagekräftige Resultate liegen vor⁽³⁹⁴⁻³⁹⁶⁾.

Für Prostatakarzinom⁽³⁹⁷⁾,⁽³⁹⁸⁻⁴⁰⁰⁾ Mammakarzinom⁽⁴⁰¹⁻⁴⁰⁴⁾ und malignes Melanom⁽⁴⁰⁵⁾ wurden Assoziationen mit Polymorphismen des VDR-Gens berichtet. Diese Befunde implizieren funktionelle Unterschiede der VDR-Allele bei der Vermittlung der 1,25(OH)₂ D₃-Wirkung im Rahmen maligner Prozesse. Eine um 50% verringerte VDR-Expression führt zu einer Verdoppelung von Proliferationsrate und *c-myc* Expression der entsprechenden Zelle⁽⁴⁰⁶⁾. Die Prognose von Kolonkarzinomen scheint ferner mit dem Ausmaß ihrer VDR-Expression korreliert zu sein⁽⁴⁰⁷⁾.

- Vitamin D und Typ 1 Diabetes mellitus

Typ 1 Diabetes-Patienten weisen reduzierte 1,25(OH)₂ D₃-Werte auf⁽⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰⁾. Wie bereits dargelegt, könnten die niedrigen 1,25(OH)₂ D₃-Serumkonzentrationen durch die verminderte Insulinsekretion der Typ 1 Diabetiker verursacht sein (siehe Kapitel 1.2.1). Andererseits wäre auch ein durch verminderte Vitamin D-Spiegel „hyperaktives“ oder dysreguliertes Immunsystem⁽⁴¹¹⁾ als Ursache eines Typ 1 Diabetes mellitus denkbar. Die Beobachtung normaler 1,25(OH)₂ D₃-Konzentrationen bei optimaler Diabeteseinstellung in einigen Studien^(410;412) sowie die inverse Korrelation von Diabetesdauer und 1,25(OH)₂ D₃-Spiegeln⁽⁴¹³⁾ untermauern die erste Hypothese. Befunde verringerter 1,25(OH)₂ D₃-Serumspiegel bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes⁽⁴¹⁴⁾ und Morbus Basedow^(415;416) sprechen dagegen eher

für eine Beteiligung von Vitamin D an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie Typ 1 Diabetes.

Die verringerte $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ -Konzentration ist möglicherweise auch auf den beobachteten Abfall der DBP-Spiegel zurückzuführen^(417;418). Die freie Hormon-Konzentration ist bei Typ 1 Diabetes-Patienten normal oder sogar leicht erhöht⁽⁴¹⁸⁾. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ergibt sich aus der Feststellung, daß die Bindung von Vitamin D an VDR durch Phospholipide und Fettsäuren nicht-kompetitiv gehemmt wird⁽⁴¹⁹⁾. Schiff'sche Basen, zu denen unter anderem Aldehyde und Ketone gehören, inhibieren die DNA-Bindung des Rezeptors^(420;421). Wie erläutert, zirkulieren diese Substanzen bei diabetischer Stoffwechsellage vermehrt im Blut.

Die NOD (non obese diabetic) Maus ist ein Tiermodell für den Typ 1 Diabetes, das durch autoimmune Zerstörung der pankreatischen β -Zellen charakterisiert ist⁽⁴²²⁻⁴²⁴⁾. Etwa 60% der weiblichen NOD Mäuse entwickeln bis zum Alter von 200 Tagen spontan Autoimmun-Diabetes. Durch eine Behandlung der Tiere mit $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ kann die Diabetesinzidenz auf unter 10% gesenkt werden⁽¹⁸⁵⁾. Der protektive Effekt von Vitamin D auf die dem klinischen Diabetes vorausgehende Insulinitis (mikropathologisch faßbare β -Zellentzündung) ist dabei noch deutlicher⁽⁴²⁵⁾. $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ und seine Analoga wirken dabei synergistisch zu Cyclosporin A⁽⁴²⁶⁾. Auch das Entstehen von autoimmuner Enzephalitis (Tiermodell der multiplen Sklerose)^(191;427-430) und autoimmuner Thyreoiditis⁽⁴³¹⁾ kann durch Vitamin D verhindert werden.

Eine epidemiologische Studie in mehreren europäischen Staaten zeigte, daß eine erhöhte Vitamin D-Zufuhr in früher Kindheit mit einer verringerten Typ 1 Diabetes-Inzidenz korreliert scheint⁽⁴³²⁾. Im Widerspruch hierzu steht allerdings die Tatsache, daß Vitamin D in den skandinavischen Ländern (eine Region mit sehr hoher Typ 1 Diabetes-Inzidenz) bereits früh substituiert wird.

1.3 Fragestellungen

1.3.1 Inhaltliche Überlegungen

Neben seiner „klassischen“ Rolle im Rahmen des Calcium- und Phosphat-Stoffwechsels wirkt Vitamin D auch antiproliferativ und immunmodulierend. Auf molekularer Ebene beeinflusst es dabei genau diejenigen Vorgänge, die für das Entstehen von Typ 1 Diabetes mitverantwortlich sind. Tierexperimentell verhindert $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ das Entstehen von Typ 1 Diabetes. Die Wirkung von Vitamin D wird unter anderem durch die an seiner Synthese und seinem Abbau beteiligten Enzyme, durch das Vitamin D bindende Protein und durch den nukleären Vitamin D Rezeptor vermittelt. Während die Vitamin D-Hydroxylasen –nach bisherigem Kenntnisstand– monomorph sind, existieren von VDR und DBP genetische Polymorphismen, die –je nach Haplotyp– möglicherweise funktionelle Unterschiede des Vitamin D Stoffwechsels bedingen. Eine Assoziation mit Polymorphismen des Vitamin D Rezeptors wurde bereits von verschiedenen Krankheiten berichtet. Unter Berücksichtigung der funktionellen Daten über die Rolle von Vitamin D bei Autoimmunität sind die Gene sowohl des nukleären Vitamin D Rezeptors als auch des Vitamin D bindenden Proteins potentielle Kandidaten für eine Assoziation mit Typ 1 Diabetes mellitus.

Zwar wurden für die Genorte des nukleären Vitamin D Rezeptors (VDR, Chromosom 12q12-q14) und des Vitamin D bindenden Proteins (DBP, Chromosom 4q11-q13) in den bisherigen Genomscans keine Assoziationen mit Typ 1 Diabetes mellitus berichtet^(113;115;121-123;126;133), Berechnungen haben jedoch gezeigt, daß Genomscans an mindestens 1000 betroffenen Geschwisterpaaren (ASPs) nötig sind, um die Existenz weiterer Suszeptibilitäts-Loci mit einem $\lambda_s \geq 1,25$ (λ_s : Verhältnis des Geschwisterrisikos zum allgemeinem Populationsrisiko) sicher auszuschließen –ein Effekt, der mit dem von *IDDM2* vergleichbar ist^(120;433;434). Die bisher publizierten Studien haben ausnahmslos kleinere Kollektive untersucht. Ein signifikanter Beitrag des nukleären Vitamin D Rezeptors oder des Vitamin D bindenden Proteins zum genetischen Typ 1 Diabetes-Risiko kann somit bisher in keiner Population ausgeschlossen werden.

Vor dem Hintergrund der engen Verflechtung von Typ 1 Diabetes-Pathogenese und Vitamin D Stoffwechsel untersucht die vorliegende Arbeit daher genetische Polymorphismen des nukleären Vitamin D Rezeptors und des Vitamin D bindenden Proteins auf eine Assoziation mit Typ 1 Diabetes mellitus.

1.3.2 Methodische Überlegungen

Für die Untersuchung einer möglichen Krankheitsassoziation eines polymorphen Kandidatengens bestehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten: Fall-Kontroll-Studie und Familienanalyse. Während bei Fall-Kontroll-Studien die Genotyp- oder Haplotypfrequenzen der Patientengruppe mit denen einer gesunden Kontrollgruppe verglichen werden, dienen bei der Familienanalyse die elterlichen nicht an den Patienten transmittierten Allele als interne Kontrollgruppe. Vorteil der Fall-Kontroll-Studie ist der geringe Aufwand hinsichtlich der Probandenrekrutierung, während das Risiko eines systematischen Fehlers durch den Vergleich mit einer nicht adäquaten Kontrollgruppe und die Unmöglichkeit einer indirekten Haplotypisierung (siehe Kapitel 2.3.8) zu ihren entscheidenden Nachteilen zählen. Die höhere Sensitivität und Spezifität der Familienanalyse zusammen mit der Möglichkeit der indirekten Haplotypisierung gaben den Ausschlag, die Hypothese einer Assoziation von VDR und DBP mit Typ 1 Diabetes mellitus in dieser Arbeit mit Hilfe einer Familienanalyse zu testen.

Die bei Familienanalysen verwendeten statistischen Tests (siehe Kapitel 2.3.10) berücksichtigen nur Eltern, die für das zu untersuchende Merkmal heterozygot sind. Zwar verringert

sich die statistische Aussagekraft durch die Typisierung mehrerer in starkem Linkage Disequilibrium zueinander stehender Polymorphismen[¶]. Durch die Typisierung möglichst vieler Polymorphismen erhöht sich jedoch gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit, den Familienmitgliedern eindeutige Haplotypen zuzuordnen zu können, wodurch eine statistische Analyse überhaupt erst möglich wird. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Polymorphismen typisiert: *FokI*, *ApaI*, *BsmI* und *TaqI* innerhalb des VDR-Gens sowie (TAAA)_n-Repeat, *StyI* und *HaeIII* innerhalb des DBP-Gens.

Es gibt zahlreiche Beispiele für scheinbar klar definierte Krankheiten, bei denen gewisse Risikofaktoren in verschiedenen Subpopulationen eine unterschiedlich große Bedeutung haben. Man spricht in diesem Fall von einer Heterogenität der betreffenden Erkrankung. Streng genommen handelt es sich um ggf. verschiedene Pathomechanismen und daher voneinander distinkte Erkrankungen mit einem identischen klinischen Erscheinungsbild. Analoge Überlegungen gelten für genetische Risikofaktoren vor allem dann, wenn z.B. das Erkrankungsalter weit streut oder Jungen und Mädchen unterschiedlich häufig erkranken. Um genetische Effekte, die nur in Subpopulationen wirksam sind, nicht zu übersehen, führt man entsprechende Subgruppenanalysen oder sogenannte Konditionierungen durch (siehe Kapitel 2.3.9).

Einige der oben angesprochenen Punkte werden in späteren Kapiteln (2.3.9 + 2.3.10) noch eingehender diskutiert.

[¶] Im Extremfall eines maximalen, positiven Linkage Disequilibriums zwischen zwei Markern *XhoI* (*X/x*) und *NstI* (*N/n*) existieren nur zwei der theoretisch vier möglichen Haplotypen: *XN* und *xn*. Durch die Typisierung von *NstI* kennt man folglich automatisch den Genotyp für *XhoI*. Die ETDT-Analyse des *XhoI/NstI*-Haplotyps wird denselben Chi²-Wert wie die TDT-Analyse von *NstI* oder *XhoI* ergeben. Der Freiheitsgrad (df=3) des 2-Locus-Haplotyps ist jedoch größer als der Freiheitsgrad des einzelnen Polymorphismus (df=1), und dadurch ist seine statistische Aussagekraft beeinträchtigt.

2. INDIVIDUEN, MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Familien und Patienten

Untersucht wurden 152 Familien kaukasoiden Ursprungs mit mindestens einem an Diabetes mellitus Typ 1 erkrankten Abkömmling. Gesammelt wurde die DNA des Patienten, seiner beiden Eltern und möglichst vieler Geschwister. Insgesamt stand DNA von 553 Individuen (davon 94 gesunde Geschwister) zur Verfügung.

In 4 Familien war neben dem Patienten auch ein Elternteil an Diabetes mellitus Typ 1 erkrankt, in 9 Familien waren jeweils 2 Geschwister von der Erkrankung betroffen. In 6 weiteren Familien stand lediglich die DNA eines Elternteils, jedoch zusätzlich die DNA mindestens eines Geschwisters des Patienten, zur Verfügung. *A priori* war in diesen Fällen also eine Rekonstruktion der fehlenden elterlichen Haplotypen möglich (indirekte Haplotypisierung: siehe Kapitel 2.3.8). Diese 6 Familien wurden deshalb in die Studie eingeschlossen.

Die Familien wurden in der endokrinologischen Ambulanz, dem Diabetes-Schulungszentrum der Medizinischen Klinik I sowie am Zentrum der Kinderheilkunde des Universitätsklinikums Frankfurt am Main rekrutiert. Alle Personen gaben ihr Einverständnis zur Erhebung und Verarbeitung ihrer klinischen und genetischen Daten zu wissenschaftlichen Zwecken. Die Diagnosestellung „Diabetes mellitus Typ 1“ erfolgte nach WHO-Kriterien⁽⁹⁾.

Von den 161 Patienten waren 87 männlich und 74 weiblich (m/w-Verhältnis von 1,18). Das Erkrankungsalter war bei 124 Patienten bekannt und lag im Durchschnitt bei 8,52 Jahren mit einer Standardabweichung von 5,60 Jahren (männlich: $8,54 \pm 5,84$ Jahre; weiblich: $8,50 \pm 5,36$ Jahre). Von 110 Patienten war der CTLA4 Exon 1-Genotyp bekannt; 144 Patienten waren zuvor für HLA-DR/DQ haplotypisiert worden. Daten über Autoantikörper oder klinische Befunde (Hb-A_{1c}, Komplikationen) lagen nur vereinzelt vor und konnten daher bei der Auswertung der Daten nicht berücksichtigt werden.

2.2 Materialien

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte, Chemikalien, Puffer, Lösungen, Enzyme, Nukleotide und Software sind in den folgenden Tabellen alphabetisch aufgeführt. Die jeweiligen Bezugsquellen und Referenzen sind genannt.

2.2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

<u>Artikel</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Autoklav	Tuttnauer, Breda (NL)
Agarose-Elektrophorese-Apparatur	Renner, Dannstadt (D)
Agarose-Gelkammer	Renner, Dannstadt (D)
Celloshaker Variospeed	Renner, Dannstadt (D)
Elektrophorese-Apparatur (Agarose)	Renner, Dannstadt (D)
Polyacrylamid-Elektrophorese-Apparatur	Pharmacia LKB, Uppsala (S)

Artikel	Bezugsquelle
Elektrophorese Power Supply (PAGE)	Pharmacia Biotech, Uppsala (S)
Falcon-Tubes	Greiner, Frickenhausen (D)
Gefrierschränke (-20°C)	Bosch, Stuttgart (D)
	AEG, Nürnberg (D)
Gefrierschränke (-80°C)	Heraeus Sepatech, Hanau (D)
Gelbond PAG Film	FMC, Rockland (ME, USA)
GPR-Zentrifuge	Beckmann, Fullerton (CA, USA)
Kühlschränke (+4°C)	Liebherr, Biberach an der Riß (D)
	Bosch, Stuttgart (D)
	AEG, Nürnberg (D)
Mikrowelle	Beckman, Fullerton (CA, USA)
Mikrofuge E-Tischzentrifuge	Pharmacia LKB, Uppsala (S)
Multiphor-Gerät	Pharmacia LKB, Uppsala (S)
Multitemp-Gerät	IKA Labortechnik, Staufen (D)
pH-Meter	Eppendorf, Hamburg (D)
Pipetten	Sarstedt, Nürnberg (D)
Pipettenspitzen	Polaroid, Cambridge (MA, USA)
Polaroid-Filme 667	Polaroid, Cambridge (MA, USA)
Polaroid-Sofortbildkamara	Sartorius, Göttingen (D)
Präzisionswaage LC 620 S	Biozym, Hessisch Oldendorf (D)
PCR-Reaktionsgefäße	Renner, Dannstadt (D)
UV-Transilluminator	Sarstedt, Nürnberg (D)
Reaktionsgefäße mit Schraubverschluß	MJ Research, Las Vegas (NV, USA)
Thermocycler PTC-200	Heidolph, Kelheim (D)
Vortex-Gerät DSG 302	Julabo, Allentown (PA, USA)
Wasserbad SW-21C	

2.2.2 Chemikalien

Artikel	Bezugsquelle
Acrylamid	AppliChem, Darmstadt (D)
Agarose high EEO	Serva, Heidelberg (D)
Agarose low EEO	AppliChem, Darmstadt (D)
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt (D)
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen (D)

Artikel	Bezugsquelle
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen (D)
Bisacylamid	BioRad, München (D)
Borsäure	Merck, Darmstadt (D)
Bromphenolblau	USB, Cleveland (OH, USA)
BSA	PharmaciaBiotech, Uppsala (S)
dNTPs	Boehringer, Mannheim (D)
DMSO	Roth, Karlsruhe (D)
EDTA	Roth, Karlsruhe (D)
Essigsäure	Merck, Darmstadt (D)
Ethanol	Riedel de Haen, Seelze (D)
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim (D)
Formaldehyd	Merck, Darmstadt (D)
Formamid	Merck, Darmstadt (D)
Glycerin	AppliChem, Darmstadt (D)
Isopropanol	Riedel-de Haen, Seelze (D)
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt (D)
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt (D)
LMP-Agarose	Gibco BRL, Eggenstein (D)
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt (D)
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt (D)
DNA-Molekulargewichtsmarker I-VIII	Boehringer, Mannheim (D)
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt (D)
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe (D)
Natriumperchlorat	Merck, Darmstadt (D)
Repel-Silane	Pharmacia LKB, Uppsala (S)
Saccharose	Merck, Darmstadt (D)
Salpetersäure	Merck, Darmstadt (D)
Salzsäure	Merck, Darmstadt (D)
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe (D)
SDS	Boehringer, Mannheim (D)
Silbernitrat	Riedel de Haen, Seelze (D)
SYBR Green [®] Nucleic Acid Gel Stain	FMC, Rockland (ME, USA)
TEMED	Sigma, Deisenhofen (D)

Artikel	Bezugsquelle
Triethylammoniumacetat	Merck, Darmstadt (D)
Tris	Boehringer, Mannheim (D)
Tris-Borat	Boehringer, Mannheim (D)
Tris-Sulfat	Boehringer, Mannheim (D)
Tris-HCl	Boehringer, Mannheim (D)

2.2.3 Puffer und Lösungen

dNTP-Mix (10×)	2 mM dATP 2 mM dCTP 2 mM dGTP 2 mM dTTP
Ery-Lysis-Puffer (1×)	0,15 M Ammoniumchlorid 0,01 M Kaliumhydrogencarbonat 0,1 mM EDTA
Agarosestreifen 5%	20 g high EEO Agarose in 400 mL Tris-Borat-Puffer aufkochen, in vorgewärmte Wanne gießen und abkühlen lassen. 1-1,5 cm breite Streifen schneiden und diese in Tris-Borat-Puffer mit etwas Bromphenolblau aufbewahren.
Ladepuffer (5×)	50 mM Tris-HCl (pH 7,6) 50 mM EDTA 0,5% SDS 0,1% Bromphenolblau 40% Saccharose
Lyse-I-Puffer (1×)	300 mM Saccharose 10 mM Tris, pH 7,5 5 mM MgCl ₂ 1% Triton X-100
Lyse-II-Puffer (1×)	75 mM NaCl 24 mM EDTA
PCR-Puffer (10×)	100 mM Tris HCl 15 mM MgCl ₂ 500 mM KCl pH 8,3 einstellen

Polyacrylamidgel-Ansatz (10%)	10 mL Acrylamid/Bisacrylamid 1:29 6 mL Tris-Sulfat-Puffer (1×) 14 mL Aqua bidest. 215 µL 10% APS 12 µL TEMED
Polyacrylamidgel-Ansatz (8%)	8 mL Acrylamid/Bisacrylamid 1:29 6 mL Tris-Sulfat-Puffer (1×) 16 mL Aqua bidest. 215 µL 10% APS 12 µL TEMED
TAE-Puffer (1×)	200 mL 50× TAE-Puffer 0,1 M EDTA pH 8,0 ad 10 L Aqua bidest
TAE-Puffer (50×)	2 M Trisbase 114 mL 1 M Eisessig pH 8,5 einstellen
Tris-Borat-Puffer (1×)	62,88 g Tris 8,76 g Borsäure ad 1 L mit Aqua bidest
Tris-Sulfat-Puffer (1×)	2,15 mL H ₂ SO ₄ (96%) 45,38 g Tris ad 1 L mit Aqua bidest

2.2.4 Enzyme

Artikel	Erkennungssequenz	Bezugsquelle
Taq Polymerase	∅	Promega, Madison (WI, USA)
Taq-Gold [®] Polymerasemix	∅	Perkin-Elmer, Norwalk (CT, USA)
Restriktions- endonuklease <i>ApaI</i>	5'-GGG <u>CC</u> /C-3'	NewEngland Biolabs, Beverly (MA, USA) AGS, Heidelberg (D)
Restriktions- endonuklease <i>BsmI</i>	5'-CTTAC/GN-3'	NewEngland Biolabs, Beverly (MA, USA) AGS, Heidelberg (D) Boehringer, Mannheim (D)
Restriktions- endonuklease <i>FokI</i>	5'-GGATG(N) ₉ /(N) ₄ -3'	NewEngland Biolabs, Beverly (MA, USA)
Restriktions- endonuklease <i>HaeIII</i>	5'- <u>GG</u> /CC-3'	NewEngland Biolabs, Beverly (MA, USA) AGS, Heidelberg (D)

Artikel	Erkennungssequenz	Bezugsquelle
Restriktions- endonuklease <i>MwoI</i>	5'-GCNNNNN/NNGC-3'	Boehringer, Mannheim (D)
Restriktions- endonuklease <i>StyI</i>	5'-C/CWWGG-3'	NewEngland Biolabs, Beverly (MA, USA)
Restriktions- endonuklease <i>TaqI</i>	5'-T/CGA-3'	NewEngland Biolabs, Beverly (MA, USA) AGS, Heidelberg (D)

2.2.5 Oligonukleotide

Einfach entsalzte Oligonukleotide wurden bei MWG Biotech, Ebersberg (D), und Gibco BRL, Eggenstein (D), bezogen.

Bezeichnung/ Sequenz	Länge	Referenz
VDR-Exon2 forward <i>5-AGC TGG CCC TGG CAC TGA CTC TGC TCT-3</i>	27 bp	(292;300)
VDR-Exon2 reverse <i>5-ATG GAA ACA CCT TGC TTC TTC TCC CTC-3</i>	27 bp	(292;300)
VDR-Bsm forward <i>5-CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA-3</i>	30 bp	(293;295;365;435;436)
VDR-Bsm reverse <i>5-AAC CAG CGG GAA GAG GTC AAG GG-3</i>	23 bp	(293;295;435;436)
VDR-Apa/Taq forward <i>5-CAG AGC ATG GAC AGG GAG CAA-3</i>	21 bp	(435-437)
VDR-Apa/Taq reverse <i>5-GCA ACT CCT CAT GGC TGA GGT CTC-3</i>	24 bp	(365;435-437)
VDR-Exon3 forward <i>5-CTG GCT TTC ACT TCA AT-3</i>	17 bp	(291)
VDR-Exon3 reverse <i>5-CAG TGG CGT CGG TGG TC-3</i>	17 bp	(291)
DBP-Intron8 forward <i>5-CAG CGA GCC AAG ATG GCA-3</i>	18 bp	(329)
DBP-Intron8 reverse <i>5-GCA TGA GGG AGA AAA GGA G-3</i>	19 bp	(329)

Bezeichnung/ Sequenz	Länge	Referenz
DBP-Exon11 forward <i>5-GAT CTC GAA GAG GCA TGT TTC-3</i>	21 bp	(327)
DBP-Exon11 reverse <i>5-GTT GCC TGT GTT CAC AGA CTC-3</i>	21 bp	(327)

2.2.6 Software

Die generierten Daten wurden mit handelsüblichen Personal Computern unter *Windows NT 4.0*[®] oder *Windows 95*[®] (Microsoft, Redmond, WA, USA) verarbeitet. Zur Speicherung der Daten sowie zur Subgruppen-Bildung wurden *DBaseIV*[®] (DBase, Santa Cruz, CA, USA) und *Access97*[®] (Microsoft, Redmond, WA, USA) verwendet. Die TDT-Berechnungen erfolgten mit Hilfe von *Epistat* (Gustafson TL, Round Rock, TX, USA), das Linkage Disequilibrium wurde mit *Excel97*[®] (Microsoft, Redmond, WA, USA) ermittelt. Die ETDT-Analyse wurde sowohl mittels *PROC LOGISTIC*[®] (SAS Institute, Cary, NC, USA) als auch mittels des Programms *ETDT*⁽⁴³⁸⁾ (Freeware) vorgenommen; die TRANSMIT-Daten wurden mit gleichnamigem Programm⁽⁴³⁹⁾ (Freeware) ermittelt.

2.3 Methoden

2.3.1 DNA-Extraktion

Zur Gewinnung genomischer DNA dienen die in 8-10 mL peripheren Venenblutes vorhandenen kernhaltigen Zellen (vorwiegend Lymphozyten und Granulozyten). Das in einer Kalium-EDTA-Monovette abgenommene und damit ungerinnbar gemachte Blut ist bei -20°C etwa 3 Monate lagerfähig, ohne daß Qualitätseinbußen der später extrahierten DNA zu befürchten sind. Auch eine Lagerung bei -80°C verlängert die Haltbarkeit des Blutes zur DNA-Extraktion nicht entscheidend. Die nachstehend beschriebene Methode beruht auf der sequentiellen Lyse aller zellulären Blutbestandteile. Die dabei frei werdenden „Zellinhalte“ (=Proteine + Nukleinsäuren) werden aufkonzentriert und die Proteine präzipitiert. Aus dem Überstand kann im letzten Schritt DNA hohen Reinheitsgrades gewonnen werden. Die vollständige Trennung von Protein- und Nukleinsäurefraktion ist für das spätere Gelingen von PCR und RFLP entscheidend, da Proteine diese enzymatischen Vorgänge massiv inhibieren.

Das gefrorene Blut wird im Wasserbad bei 50°C zügig aufgetaut, zu gleichen Volumina in zwei 50 mL-Falcontubes gegeben, mit Lyse-I-Puffer (siehe auch Kapitel 2.2.3) auf je 20 mL Gesamtvolumen aufgefüllt und gut durchmischt. Anschließend wird bei 3000 rpm ($\approx 1500\times g$) und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wird das zurückgebliebene Pellet in 30 mL Ery-Lysis-Puffer resuspendiert und abermals zentrifugiert: 15 Minuten bei 3700 rpm ($\approx 2300\times g$) und 4°C. Nach erneutem Dekantieren des Überstandes werden die zu einer Blutprobe gehörenden Pellets in 4,5 mL Lyse-II-Puffer gepoolt und vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 125 µl 10% SDS, 1,1 mL 5 M Natriumperchlorat und 15 sekündigem Vortexen werden die Falcon-Tubes für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Cell-Shaker inkubiert. Nach Zusatz von 2 mL gesättigter NaCl-Lösung und kräftigem Schütteln folgt eine 15minütige Zentrifugation bei 4°C und 2500 rpm ($\approx 1050\times g$), bei der die Zentrifugenbremse ausgeschaltet wird, um ein Durchmischen von Überstand und Pellet zu verhindern. Nach vorsichti-

gem Abpipettieren des Überstandes erfolgt das Ausfällen der DNA durch Zugabe von einem Volumenanteil 100%igen eiskalten Isopropanols und von 100 µL 4 M NaCl. Die ausgefallene DNA wird mit Hilfe einer umgebogenen Glas-Pasteurpipette entnommen, kurz in 70% Ethanol gewaschen und anschließend in 300 µL Aqua inieciabilia für 24 Stunden bei 4°C in einem mit Parafilm versiegelten Gefäß gelöst. Die endgültige Lösung findet dann während weiterer 24 bis 72 Stunden bei 37°C statt. Bei -20°C ist die extrahierte DNA mehrere Jahre haltbar.

2.3.2 Gelelektrophoretische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die gelelektrophoretische DNA-Konzentrationsbestimmung beruht auf dem Vergleich der Bandenintensität eines Markers bekannter Konzentration mit der Bandenintensität der Proben unbekannter Konzentration gleicher Fragmentgröße nach dem Auftrennen mit Hilfe eines Agarosegels. 1 µL Probe bzw. Marker werden –versetzt mit 5 µL Ladepuffer und 10 µL Aqua inieciabilia– auf ein mit 0,01% SYBR Green® gefärbtes 0,7%iges Agarosegel aufgetragen. Die Proben werden in 1× TAE-Puffer bei 80 bis 100 Volt für etwa 2,5 Stunden aufgetrennt. Die Auswertung erfolgt unter UV-Transillumination (254 nm) und wird photographisch dokumentiert. Der DNA-Molekulargewichtsmarker II wird unverdünnt sowie in den Verdünnungsstufen 1:2, 1:5 und 1:10 eingesetzt.

2.3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Prinzip

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)⁽⁴⁴⁰⁾ können DNA-Abschnitte spezifisch in einer Größenordnung von 10^{15} - 10^{20} *in vitro* amplifiziert werden. Ausgehend von zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primer) synthetisiert eine thermostabile DNA-Polymerase –in Anwesenheit von Desoxyribonukleotidtriphosphat (dNTP)-Bausteinen– innerhalb kürzester Zeit eine identische Kopie der DNA-Matrize. Die PCR gliedert sich dabei in drei Schritte, die in einem programmierbaren Heiz-/Kühlblock (Thermocycler) durchgeführt werden: Zunächst wird der DNA-Doppelstrang (Matrize) bei einer Temperatur von 93-95°C in zwei Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Eine zu hohe Temperatur führt zu Beschädigungen an der Matrize, eine zu niedrige Temperatur verhindert das vollständige Auftrennen der Matrize und damit den weiteren Verlauf der PCR.

Im zweiten Schritt wird die spezifische Anlagerung der Primer an die Einzelstränge der Matrize durch Absenken der Reaktionstemperatur auf etwa 2°C unterhalb des jeweiligen Primerschmelzpunktes (Annealing) erreicht. Als Schmelzpunkt eines DNA-Abschnittes wird die Temperatur bezeichnet, bei der sich der Doppelstrang in die beiden Einzelstränge auftrennt. Diese Temperatur hängt sowohl von der Länge als auch von der Basenzusammensetzung des DNA-Abschnittes, letztendlich also von der Anzahl der zu überwindenden Wasserstoffbrücken-Bindungen ab. Eine zu hohe Annealing-Temperatur verhindert, daß sich die Primer vollständig an die Matrize anlagern, während eine zu niedrige Annealing-Temperatur auch Anlagerungen der Primer an nicht-komplementäre DNA-Abschnitte ermöglicht und damit die Spezifität der PCR zunichte macht.

Im letzten Schritt schließlich wird die Taq-Polymerase (benannt nach dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*)⁽⁴⁴¹⁾ aktiviert und synthetisiert –ausgehend von den angelagerten Primern– einen zur Matrize komplementären Strang. Das Temperaturoptimum für die Taq-Polymerase liegt bei 72°C, bei der sie bis zu 100 Nukleotide pro Sekunde in die DNA einbaut. Die Anzahl der Amplifikate wächst im Verlauf der PCR exponentiell (2^n), da die in vorangegangenen Zyklen synthetisierten DNA-Abschnitte als zusätzliche Matrizen im jeweils darauffolgenden Durch-

gang fungieren. Eine Anzahl von 25–30 Zyklen hat sich als optimal erwiesen, da sich die Ausbeute im weiteren Verlauf der PCR aufgrund der konzentrationsabhängigen Endproduktthemmung der Taq-Polymerase nicht weiter steigern ließe.

Während im ersten PCR-Zyklus nur Amplifikate nicht definierter Länge entstehen, werden ab dem zweiten Zyklus auch Amplifikate (durch die Positionen der beiden Primer) definierter Länge synthetisiert. Die Anzahl der Produkte definierter Länge wächst im Laufe der PCR exponentiell, während die Anzahl der Produkte nicht definierter Länge nur linear wächst und damit bereits nach dem fünften Zyklus mit nur 0,01% aller Produkte verschwindend gering ist⁽⁴⁴²⁾.

Durchführung

Die einzelnen PCR-Ansätze wurden jeweils hinsichtlich der Annealingtemperatur, der Zyklusdauer sowie der Mg²⁺-Konzentration im Reaktionsansatz optimiert. Die verwendeten Primer sind in Kapitel 2.2.5 aufgeführt. Jeder PCR-Ansatz wurde durch eine Negativkontrolle hinsichtlich seiner Spezifität überprüft. Dabei enthielt die Negativkontrolle zum Ausschluß eventueller Kontaminationen alle Bestandteile außer der Template-DNA.

PCR VDR-Exon2: Amplifikation eines 265 bp-Fragments

2,00	μL	DNA (Konzentration 100 ng/μL)
2,50	μL	10× PCR-Puffer
2,50	μL	10× dNTPs
1,20	μL	Primer VDR-Exon2 forward (Konzentration: 25 pmol/μL)
1,20	μL	Primer VDR-Exon2 reverse (Konzentration: 25 pmol/μL)
0,25	μL	Taq-Polymerase
15,35	μL	<u>Aqua iniectionis</u>
25,00	μl	Gesamtvolumen

Thermocyclereinstellungen

Initiale Denaturierung	94°C	4'00	} 30 Wiederholungen
Denaturierung	94°C	1'00	
Annealing	58°C	1'00	
Extension	72°C	0'45	
Finale Extension	72°C	5'00	
Abschluß	4°C	∞	

PCR VDR-Bsm: Amplifikation eines 825 bp-Fragments

2,00	μL	DNA (Konzentration 100 ng/μL)
2,50	μL	10× PCR-Puffer
2,50	μL	10× dNTPs
1,20	μL	Primer VDR-Bsm forward (Konzentration: 25 pmol/μL)
1,20	μL	Primer VDR-Bsm reverse (Konzentration: 25 pmol/μL)
0,25	μL	Taq-Polymerase
15,35	μL	<u>Aqua iniectionis</u>
25,00	μl	Gesamtvolumen

Thermocyclereinstellungen

Initiale Denaturierung	94°C	4'00	} 30 Wiederholungen
Denaturierung	94°C	1'00	
Annealing	60°C	1'00	
Extension	72°C	1'00	
Finale Extension	72°C	5'00	
Abschluß	4°C	∞	

PCR VDR-Apa/Taq: Amplifikation eines 740 bp-Fragments

2,00	µL	DNA (Konzentration 100 ng/µL)
2,50	µL	10× PCR-Puffer
2,50	µL	10× dNTPs
1,20	µL	Primer VDR-Apa/Taq forward (Konzentration: 25 pmol/µL)
1,20	µL	Primer VDR-Apa/Taq reverse (Konzentration: 25 pmol/µL)
0,25	µL	Taq-Polymerase
15,35	µL	<u>Aqua iniectionis</u>
25,00	µl	Gesamtvolumen

Thermocyclereinstellungen

Initiale Denaturierung	94°C	4'00	} 30 Wiederholungen
Denaturierung	94°C	1'00	
Annealing	60°C	1'00	
Extension	72°C	1'00	
Finale Extension	72°C	5'00	
Abschluß	4°C	∞	

PCR VDR-Exon3: Amplifikation eines etwa 200 bp großen Fragments

2,00	µL	DNA (Konzentration 100 ng/µL)
2,50	µL	10× PCR-Puffer
2,50	µL	10× dNTPs
1,20	µL	Primer VDR-Exon3 forward (Konzentration: 25 pmol/µL)
1,20	µL	Primer VDR-Exon3 reverse (Konzentration: 25 pmol/µL)
0,25	µL	Taq-Polymerase
15,35	µL	<u>Aqua iniectionis</u>
25,00	µl	Gesamtvolumen

Thermocyclereinstellungen

Initiale Denaturierung	94°C	4'00	}	30 Wiederholungen
Denaturierung	94°C	1'00		
Annealing	60°C	1'00		
Extension	72°C	1'00		
Finale Extension	72°C	5'00		
Abschluß	4°C	∞		

PCR DBP-Intron 8: Amplifikation eines etwa 200 bp großen Fragments

2,00	µL	DNA (Konzentration 100 ng/µL)
2,50	µL	10× PCR-Puffer
2,50	µL	10× dNTPs
1,20	µL	Primer DBP-Intron8 forward (Konzentration: 25 pmol/µL)
1,20	µL	Primer DBP-Intron8 reverse (Konzentration: 25 pmol/µL)
0,25	µL	Taq-Polymerase
15,35	µL	<u>Aqua iniectionis</u>
25,00	µl	Gesamtvolumen

Thermocyclereinstellungen

Initiale Denaturierung	94°C	4'00	}	30 Wiederholungen
Denaturierung	94°C	1'00		
Annealing	60°C	1'00		
Extension	72°C	1'00		
Finale Extension	72°C	5'00		
Abschluß	4°C	∞		

PCR DBP-Exon 11: Amplifikation eines 606 bp-Fragments

2,00	µL	DNA (Konzentration 100 ng/µL)
2,50	µL	10× PCR-Puffer
2,50	µL	10× dNTPs
1,20	µL	Primer DBP-Exon11 forward (Konzentration: 25 pmol/µL)
1,20	µL	Primer DBP-Exon11 reverse (Konzentration: 25 pmol/µL)
0,25	µL	Taq-Polymerase
15,35	µL	<u>Aqua iniectionis</u>
25,00	µl	Gesamtvolumen

Thermocyclereinstellungen

Initiale Denaturierung	94°C	4'00	} 30 Wiederholungen
Denaturierung	94°C	1'00	
Annealing	60°C	1'00	
Extension	72°C	1'00	
Finale Extension	72°C	5'00	
Abschluß	4°C	∞	

Amplifikation von Proben unzureichender Qualität

Wie im Abschnitt „DNA-Extraktion“ (Kapitel 2.3.1) ausgeführt, kann die Amplifikation von Proben, die eine hohe Proteinkonzentration aufweisen, erhebliche Probleme bereiten. Der Taq-Gold® Polymerasemix ermöglicht in vielen dieser Fälle dennoch eine Amplifikation der Probe. Die Bedingungen für eine PCR mit dem Taq-Gold® Polymerasemix unterscheiden sich von den oben angegebenen:

2,00	µL	DNA (Konzentration 100 ng/µL)
2,50	µL	10× Taq-Gold® PCR-Puffer
1,50	µL	1,5 mM MgCl ₂
2,00	µL	dNTP-Mix
2,30	µL	Forward Primer (Konzentration: 25 pmol/µL)
2,30	µL	Reverse Primer (Konzentration: 25 pmol/µL)
0,30	µL	Taq-Gold® Polymerasemix
<u>14,10</u>	<u>µL</u>	<u>Aqua iniectionis</u>
25,00	µl	Gesamtvolumen

Thermocyclereinstellungen

Initiale Denaturierung	95°C	11'00	} 30 Wiederholungen
Denaturierung	94°C	1'00	
Annealing/Extension	62°C	1'00	
Finale Extension	60°C	45'00	
Abschluß	4°C	∞	

Nur bei einigen wenigen Proben mußte die PCR mit Hilfe des Taq-Gold® Polymerasemixes durchgeführt werden.

2.3.4 Restriktionsverdaue

Prinzip

Restriktionsendonukleasen sind sequenz-spezifische DNasen. Diese Enzyme erkennen meist punktsymmetrische Sequenzen –Palindrome genannt– von 6-8 Basenpaaren und spalten beide DNA-Stränge. Heute stehen –teilweise rekombinant hergestellte– Restriktionsendonukleasen für nahezu alle theoretisch möglichen Sequenzen zur Verfügung.

Ursprung der Restriktionsendonukleasen sind Bakterien, die sich mit Hilfe dieser Enzyme vor Bakteriophagen schützen: Die DNA jedes Bakterienstammes ist in einer für ihn charakteristi-

schen Weise methyliert. Methylierte DNA kann von Restriktionsendonukleasen nicht geschnitten werden. Bakterien synthetisieren eine für die –im eigenen Genom methylierte– Sequenz spezifische Restriktionsendonuklease. Eindringende Bakteriophagen-DNA ist mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht im gleichen Muster methyliert und wird deshalb in kleine Stücke zerlegt, bevor der Phage sich in das Bakteriengenom integrieren kann.

Die Allele der in dieser Studie untersuchten Polymorphismen unterscheiden sich durch den Austausch einer einzelnen Base voneinander. Da es sich bei den Polymorphismen um bi-allele Polymorphismen handelt, kann mit einer für eines der beiden Allele spezifischen Restriktionsnuklease die Abwesenheit bzw. heterozygote oder homozygote Anwesenheit dieses Allels nachgewiesen werden. Die An- oder Abwesenheit des anderen Allels ergibt sich hieraus zwangsläufig. Die Allele wurden nach dem Anfangsbuchstaben der jeweiligen Restriktionsendonuklease (*XhoI*) benannt. Ein Großbuchstabe bezeichnet das Allel, das die Schnittstelle nicht enthält (**X**); bei Vorhandensein derselben wird ein Kleinbuchstabe verwendet (**x**). Im diploiden Genotyp ergeben sich die unten aufgeführten Bandenmuster für den jeweiligen Polymorphismus.

Die Restriktionsverdau wurden in 20 µL-Ansätzen durchgeführt: 5 µL des PCR-Amplifikats, 2 µL des vom jeweiligen Hersteller gelieferten Puffers, 5 U des Restriktionsenzym sowie Aqua inieciabilia ad 20 µL. Die Inkubation erfolgte zu den unten aufgeführten Bedingungen, in deren Anschluß die Proben bei -20°C eingefroren und bis zur Durchführung der PAGE aufbewahrt wurden.

Restriktionsverdau des VDR-Fok-Fragments mit *FokI*

Die PCR VDR-Exons 2 liefert ein 265 bp-Fragment.

Polymorphismus: T → C
 Enzym: *FokI*
 Inkubation: 3 Stunden bei 37°C

Genotyp *FF*: 265 bp
 Genotyp *Ff*: 265, 196, 69 bp
 Genotyp *ff*: 196, 69 bp

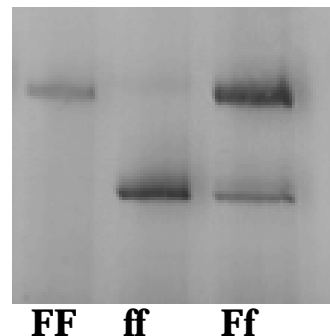


Abb. 5: Restriktionsverdau von Exon 2 des VDR-Gens mit *FokI*

Restriktionsverdau des VDR-Bsm-Fragments

Die PCR VDR-Introns 8 liefert ein 825 bp-Fragment.

Polymorphismus: C → T
 Enzym: *BsmI*
 Inkubation: 3 Stunden bei 65°C

Genotyp *BB*: 825 bp
 Genotyp *Bb*: 825, 650, 175 bp
 Genotyp *bb*: 650, 175 bp

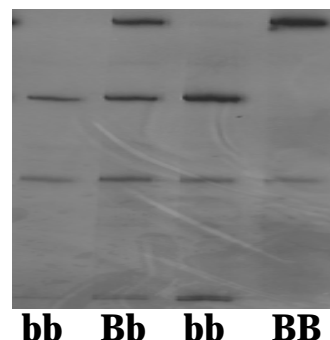


Abb. 6: Restriktionsverdau von Intron 8 des VDR-Gens mit *BsmI*
Restriktionsverdau des VDR-Fok-Fragments mit *MwoI*

Die PCR VDR-Exons 2 liefert ein 265 bp-Fragment.

Mutation: G → A
 Enzym: *MwoI*
 Inkubation: 3 Stunden bei 60°C

Genotyp *MM*: 191, 74 bp
 Genotyp *Mm*: 191, 121, 74, 70 bp
 Genotyp *mm*: 121, 74, 70 bp

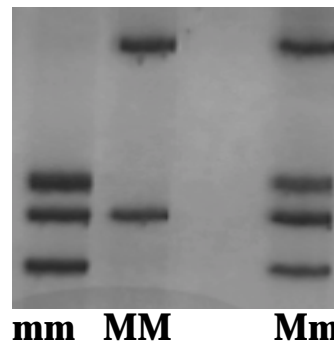


Abb. 7: Restriktionsverdau von Exon 2 des VDR-Gens mit *MwoI*

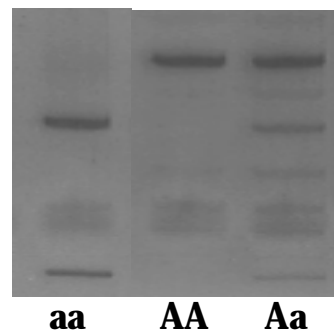
Alle 200 Personen, die für die *MwoI*-Mutation untersucht wurden, wiesen den Genotyp „*mm*“ auf.

Restriktionsverdau des VDR-Apa/Taq-Fragments

Die PCR VDR-Introns 8/-Exons 9 liefert ein 740 bp-Fragment.

Polymorphismus: G → A
 Enzym: *ApaI*
 Inkubation: 3 Stunden bei 37°C

Genotyp *AA*: 740 bp
 Genotyp *Aa*: 740, 530, 210 bp
 Genotyp *aa*: 530, 210 bp



Polymorphismus: T → C
 Enzym: *TaqI*
 Inkubation: 3 Stunden bei 65°C

Zusätzlich zu der polymorphen *TaqI*-Schnittstelle befindet sich eine monomorphe *TaqI*-Schnittstelle im Fragment. Das Bandenmuster unterscheidet sich dem entsprechend von den anderen Restriktionsverdauen.

Genotyp *TT*: 495, 245 bp
 Genotyp *Tt*: 495, 290, 245, 205 bp
 Genotyp *tt*: 290, 245, 205 bp

Abb. 8: Restriktionsverdau von Intron 8 des VDR-Gens mit *ApaI*

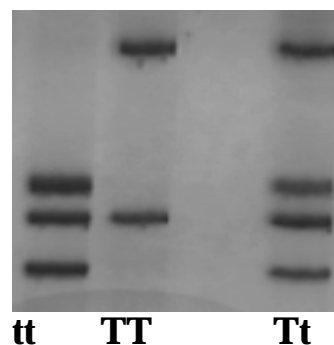


Abb. 9: Restriktionsverdau von Exon 9 des VDR-Gens mit *TaqI*

Restriktionsverdau des DBP-Exon11-Fragments

Die PCR VDR-Introns 8 liefert ein 606 bp-Fragment.

Polymorphismus: T → G
 Enzym: *HaeIII*
 Inkubation: 3 Stunden bei 37°C

Genotyp *HH*: 606 bp
 Genotyp *Hh*: 606, 375, 231 bp
 Genotyp *hh*: 375, 231 bp

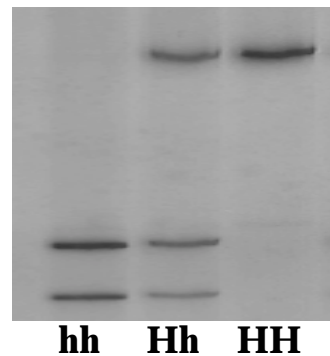


Abb. 10: Restriktionsverdau von Exon 11 des DBP-Gens mit *HaeIII*

Polymorphismus: C → A
 Enzym: *StyI*
 Inkubation: 3 Stunden bei 37°C

Genotyp *SS*: 606 bp
 Genotyp *Ss*: 606, 366, 240 bp
 Genotyp *ss*: 366, 240 bp

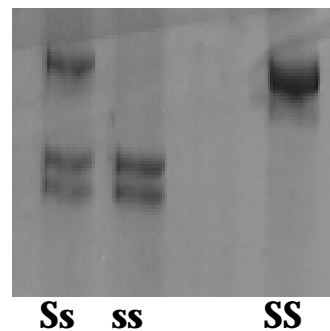


Abb. 11: Restriktionsverdau von Exon 11 des DBP-Gens mit *StyI*

Der *HaeIII*- und der *StyI*-Polymorphismus liegen nur 12 Basenpaare voneinander entfernt und befinden sich erwartungsgemäß in einem ausgesprochen starken Linkage Disequilibrium (siehe hierzu auch Kapitel 3.2.1). Es existieren nur 3 Haplotypen des Exons 11, die wie folgt benannt werden (siehe auch Kapitel 1.2.6 und Abbildung 4):

<i>HaeIII</i> -Haplotyp	<i>StyI</i> -Haplotyp	bisherige Bezeichnung	neue Bezeichnung
<i>H</i>	<i>S</i>	<i>If</i>	<i>WT</i>
<i>h</i>	<i>S</i>	<i>Is</i>	<i>D416E</i>
<i>H</i>	<i>s</i>	<i>2</i>	<i>T420K</i>
<i>h</i>	<i>s</i>	bisher nicht beschrieben	

Tab. 7: Nomenklatur der Haplotypen der Exon 11-Polymorphismen des Vitamin D bindenden Proteins

In dieser Arbeit wird die bisherige Nomenklatur verwendet. Analog zu den Haplotypen lassen sich die Genotypen ableiten:

<i>HaeIII</i> -Genotyp	<i>StyI</i> -Genotyp	bisherige Exon 11-Nomenklatur	neue Exon 11-Nomenklatur
<i>HH</i>	<i>SS</i>	<i>1f/1f</i>	<i>WT/WT</i>
<i>HH</i>	<i>Ss</i>	<i>1f/2</i>	<i>WT/T420K</i>
<i>HH</i>	<i>ss</i>	<i>2/2</i>	<i>T420K/T420K</i>
<i>Hh</i>	<i>SS</i>	<i>1f/1s</i>	<i>WT/D416E</i>
<i>Hh</i>	<i>Ss</i>	<i>1s/2</i>	<i>D416E/T420K</i>
<i>Hh</i>	<i>ss</i>	nicht beschrieben	nicht beschrieben
<i>hh</i>	<i>SS</i>	<i>1s/1s</i>	<i>D416E/D416E</i>
<i>hh</i>	<i>Ss</i>	nicht beschrieben	nicht beschrieben
<i>hh</i>	<i>ss</i>	nicht beschrieben	nicht beschrieben

Tab. 8: Ableitung der Genotypen aus den Exon 11-Polymorphismen des Vitamin D bindenden Proteins

2.3.5 SSCP-Analyse

Die Single Stranded Conformational Polymorphism (SSCP)-Analyse ist eine äußerst sensitive Methode zur unspezifischen Detektion eines Polymorphismus in einem bis zu 300-350 bp großen DNA-Fragment. Wie bereits der Name „Einzelstrangkonnformations-Polymorphismus“ besagt, wird die zunächst doppelsträngige DNA mit Formamid in zwei Einzelstränge denaturiert. Hierzu wird 1 µL des PCR-Amplifikats mit 1,5 µL entionisiertem Formamid für 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Die anschließende Auftrennung der Proben erfolgt –wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben– mit einem Polyacrylamidgel. Das Laufverhalten der Einzelstränge wird sowohl durch ihr Molekulargewicht als auch durch ihre intramolekulare Konformation beeinflusst. Der Austausch einer einzelnen Base wird sich auf die Konformation des Einzelstranges so entscheidend auswirken, daß sich das Laufverhalten des Fragments ändert. Auch Deletionen oder Integrationen einzelner Basen können so nachgewiesen werden, zumal sich diese noch stärker auf das Molekulargewicht des Einzelstranges auswirken.

Der DNA-Doppelstrang hingegen liegt unabhängig von seiner Basenzusammensetzung als α -Helix vor. Eine einzelne Basensubstitution wird weder die Konformation noch das Molekulargewicht des DNA-Fragments ändern, da z.B. eine Substitution „Purin → Pyrimidin“ immer eine Substitution „Pyrimidin → Purin“ im komplementären Strang nach sich zieht, die sich in ihrer Wirkung auf das Molekulargewicht gegenseitig aufheben.

Die SSCP-Analyse eignet sich aufgrund ihrer hohen –allerdings begrenzten (etwa 80% der Einzelnukleotidsubstitutionen werden erkannt)– Sensitivität und der vergleichsweise geringen Kosten hervorragend für das Auffinden bisher unbekannter Polymorphismen. Die genaue Charakterisierung des mittels SSCP detektierten Polymorphismus bedarf dann jedoch der Sequenzierung des entsprechenden Fragments.

2.3.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Prinzip

Wie bereits oben erwähnt, erfolgt die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Doppelsträngen entsprechend ihres Molekulargewichts. Die negativ geladene DNA wandert im elektrischen Feld

von der Kathode zur Anode durch die Matrix des Polyacrylamidgels (PAG). Die Migrationsgeschwindigkeit der DNA hängt von der Dichte des Matrix„netzes“ und damit von der Polyacrylamidkonzentration ab. Ein 5%iges PAG hat einen Trennbereich von etwa 80-500 bp, ein 8%iges PAG stellt den Bereich von 60-400 bp und ein 12%iges PAG den Bereich von 40-200 bp mit guter Auflösung dar.

Vorbereitung und Gießen des Gels

Bei der hier verwendeten horizontalen PAGE wird zunächst eine Gelträgerfolie (Gelbond PAG Film) –mittels Adhäsion durch einige zuvor aufgebraute Tropfen Aqua bidest.– auf einer Glasplatte (20 × 26 cm) blasenfrei fixiert. Auf eine zweite Glasplatte, zuvor mit Methanol gereinigt und mit Repel-Silane beschichtet, werden 46 Dynoband-Stücke (Dicke: 0,25 mm; 0,3 × 0,4 cm) in einer Reihe quer zur späteren Laufrichtung aufgeklebt. Die Ränder der Glasplatte werden mit 3 Lagen Tesaflexband (Dicke: 1,5 mm) abgeklebt. Der gut gemischte Gelansatz (siehe Kapitel 2.2.3) wird auf die silanisierte und beklebte Glasplatte gegeben. Die andere Glasplatte wird anschließend an deren Oberrand angesetzt und langsam abgesetzt. Der Gelansatz verteilt sich in dem kapillären Spalt von 4,5 mm zwischen beiden Glasplatten. Nach etwa 45minütigem Auspolymerisieren kann das fertige PAG auf der Trägerfolie entnommen werden.

Die SSCP-Analyse sowie das Auftrennen sämtlicher Restriktionsverdauere erfolgte auf 8%igem PAG. Der Repeat-Polymorphismus im Intron 8 des Vitamin D bindenden Proteins wurde auf 10%igem PAG detektiert (siehe Kapitel 2.3.7).

Probenauftrag und Elektrophorese

Die Trägerfolie mit dem PAG wird nun auf die Kühlplatte der Multiphor-Apparatur gelegt, und die Proben werden in die Taschen pipettiert. Eingesetzt werden 3,5 µL für die Produkte der Restriktionsverdauere und 2,5 µL für die SSCP-Analyse bzw. für die Detektion des Repeat-Polymorphismus im Intron 8 des Vitamin D bindenden Proteins. Die 5%igen Agarosestreifen (Kapitel 2.2.3) dienen als Laufpuffer. Das in ihnen enthaltene Bromphenolblau markiert die Lauffront während der Elektrophorese. Je nach erwarteten Fragmentlängen wird in die Taschen am Rand des Gels ein entsprechender Molekulargewichtsmarker aufgetragen, der für den jeweiligen Polymorphismus in Kapitel 2.3.4 angegeben ist. Die allgemeinen Laufbedingungen der Elektrophoresen sind: 1400 V, 14 mA, 14 W und 2,5 h bei 12°C.

Für die hiervon abweichenden Elektrophoresebedingungen zur Detektion des Repeat-Polymorphismus sei auf den entsprechenden Abschnitt verwiesen.

Sibernitratfärbung

Zunächst wird das Gel in einer Schale mit 300 mL 1%iger Salpetersäure für 3 Minuten inkubiert. Nach 2 kurzen Waschvorgängen (30 Sekunden) mit je 200 mL Aqua bidest. wird das Gel in 200 mL 0,4%iger, wässriger Silbernitratlösung für 20 Minuten unter ständigem Schütteln gefärbt. 3 weiteren Waschvorgängen (200 mL Aqua bidest. für 30 Sekunden) schließt sich das Entwickeln des Gels in 200 mL 271 mM Natriumcarbonat + 0,1% Formaldehyd für 3 bis 6 Minuten an. Dem Fixieren in 300 mL 10%iger Essigsäure (3 Minuten) folgt das Equilibrieren des Gels in 300 mL 10%iger Glycerinlösung für 5-10 Minuten. Die Nachweisempfindlichkeit der Silbernitratfärbung liegt bei etwa 50 pg DNA.

2.3.7 Detektion des (TAAA)_n-Repeat-Polymorphismus im Intron 8 des Vitamin D bindenden Proteins

Im Intron 8 des Vitamin D bindenden Proteins findet sich ein sogenannter Repeat-Polymorphismus. Das Nukleotid-Motiv „TAAA“ liegt dabei entweder in 6, 8, 10 oder 11facher Wiederholung vor, und die Amplifikation dieses DNA-Abschnitts mittels PCR liefert folglich Fragmente von 187, 195, 203 oder 207 Basenpaaren. Die Bezeichnung der Allele richtet sich nach der Anzahl der Wiederholungen des Motivs. Auf einem 10%igen PAG sind diese Größenunterschiede direkt sichtbar:

Die Zuordnung der Allele erfolgt zum einen im Vergleich zu den Banden des Molekulargewichtsmarkers VI, zum anderen im Vergleich zum Laufverhalten der Nachbarbanden.

Laufbedingungen: 1000 V
 12 mA
 12 W
 Dauer: 3,5 h bei 8°C

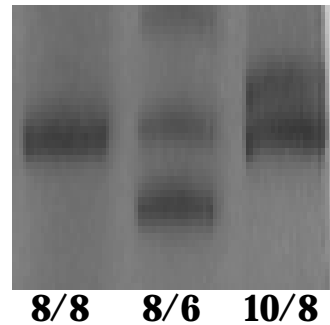


Abb. 12: Gel des (TAAA)_n-Polymorphismus in Intron 8 des DBP-Gens

2.3.8 Indirekte Haplotypisierung

Die Genotypisierung mit Hilfe der RFLP-, SSCP- oder Repeat-Analyse (Kapitel 2.3.4, 2.3.5 und 2.3.7) weist die Anwesenheit von Allelen im diploiden Genom nach. Sie erlaubt jedoch keine Aussage darüber, wie diese Allele auf den beiden homologen Chromosomen eines Individuums verteilt sind, das heterozygot für mindestens 2 Polymorphismen ist. Zur Detektion eines möglichen Vererbungsungleichgewichts ist diese Information jedoch unerlässlich, weshalb bei der sogenannten indirekten Haplotypisierung die genetische Information anderer Familienmitglieder zur Ermittlung des Haplotyps einer „unklaren“ Person herangezogen wird. Diese Methode sei an einem Beispiel (siehe Abbildung 13) verdeutlicht: Bei einem Patienten mit dem Genotyp „FfBbAAt“ sind sowohl „fBAt/FBAf“ als auch „FbAt/fBAf“ als Haplotypenkombination möglich. Wenn die Mutter den Genotyp „FFbbAAt“ aufweist, ergeben sich hieraus ihre Haplotypen „FbAt/FbAt“ eindeutig. Da sie in diesem Fall nur den Haplotyp „FbAt“ vererbt kann, lassen sich mit Hilfe dieser Informationen die Haplotypen des Kindes herleiten.

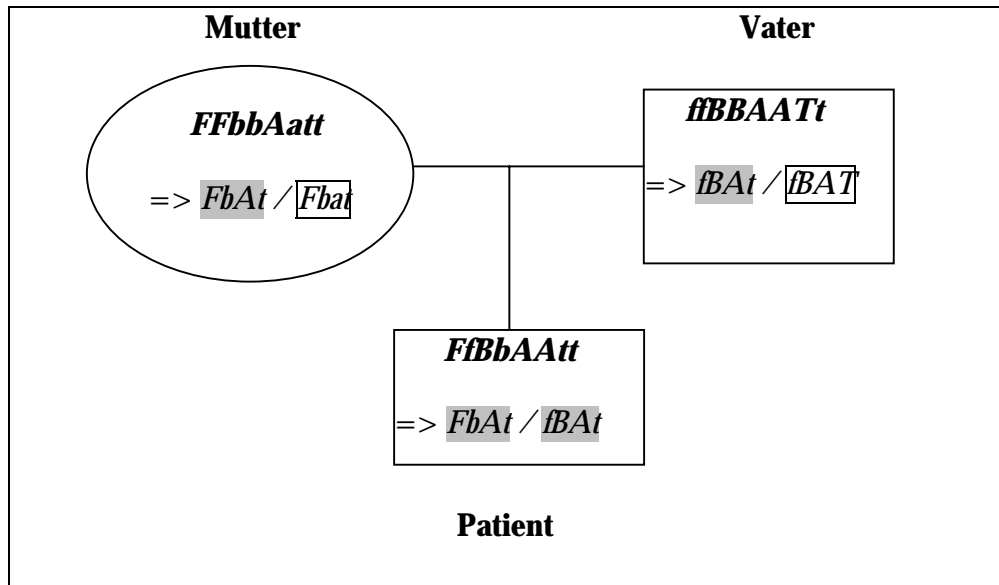


Abb. 13: Indirekte Haplotypisierung
 Die schematische Abbildung verdeutlicht die auf den elterlichen und kindlichen Genotypen basierende Zuordnung der Haplotypen. **Vererbte** Haplotypen sind grau unterlegt, **nicht vererbte** Haplotypen sind eingerahmt dargestellt.

2.3.9 Konditionierung und Subgruppenbildung

Multifaktorielle Erkrankungen wie Typ 1 Diabetes mellitus zeichnen sich durch ihre Heterogenität aus. Dies bedeutet, daß die Auswirkung des an der Pathogenese des Phänotyps „Diabetes“ beteiligten Parameters A in verschiedenen Subpopulationen oder Situationen erheblich variieren kann. Während der zu untersuchende Parameter A in einer Subpopulation eine erhebliche Rolle spielen kann, ist er vielleicht in einer anderen Subpopulation für die Krankheitsentstehung unwesentlich, da hier ein viel stärkerer Risikofaktor B das Geschehen dominiert. Eine Betrachtung der Gesamtpopulation zur Beantwortung der Frage einer möglichen Assoziation des Parameters A mit Diabetes könnte dazu führen, daß die Beteiligung von A in einer Subpopulation übersehen wird. Ebenso könnte ein signifikantes Gesamtergebnis darüber hinwegtäuschen, daß A nur in einem Teil der Population mit dem Auftreten von Diabetes assoziiert ist.

Durch ein Aufschlüsseln (Konditionierung) der Population in Subgruppen kann sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität einer Assoziationsstudie erhöht werden, indem z.B. Interaktionen zwischen einzelnen Parametern aufgedeckt werden. Eine sehr differenzierte Konditionierung geht jedoch zwangsläufig zu Lasten des Stichprobenumfangs und beeinträchtigt damit die statistische Aussagekraft der entsprechenden Beobachtung, so daß der Aufgliederung der zu untersuchten Population *ad infinitum* schnell Grenzen gesetzt sind.

Die in dieser Arbeit vorgenommenen Konditionierungen sind in Tabelle 9 aufgeführt. Auf ihren Hintergrund wird im jeweiligen Kapitel des Ergebnis- bzw. Diskusstils eingegangen.

Konditionierungsparameter	Subgruppeneinteilung
• Geschlecht des Patienten	<ul style="list-style-type: none"> • männlich • weiblich
• Alter bei Erkrankungsbeginn	<ul style="list-style-type: none"> • jünger oder gleich 8 Jahre • älter als 8 Jahre
• Elterliches „Imprinting“	<ul style="list-style-type: none"> • väterliche Vererbung • mütterliche Vererbung
• CTLA4 Exon 1-Genotyp	<ul style="list-style-type: none"> • „AA“ • „AG“ • „GG“
• HLA DR/DQ-Genotyp	<ul style="list-style-type: none"> • hohes (<i>DR3-DQ2/DR4-DQ8, DR4-DQ8/DR4-DQ8</i>) • mittleres (<i>DR4-DQ8/DRx-DQx, DR3-DQ2/DR3-DQ2, DR3-DQ2/DRx-DQx</i>) • niedriges (<i>DRx-DQx/DRx-DQx</i>) <p style="text-align: right;">Risiko</p>

Tab. 9: Konditionierungsparameter – Subgruppeneinteilung

2.3.10 Statistische Auswertung

Linkage Disequilibrium

Bei Genen, die auf unterschiedlichen Chromosomen liegen, kann man im allgemeinen davon ausgehen, daß sie entsprechend der Mendel'schen Regel unabhängig voneinander vererbt werden. Gene hingegen, die auf demselben Chromosom lokalisiert sind, werden aufgrund der physischen Kopplung oft auch zusammen vererbt. Die Wahrscheinlichkeit der gemeinsamen Vererbung sinkt mit zunehmendem Abstand der Loci voneinander. Grund hierfür ist das sogenannte Crossing-Over während der Meiose. Hierbei lagern sich homologe Nichtschwester-Chromatiden aneinander (Chiasmata) und tauschen ihr telomerwärts gelegenes chromosomales Material aus. Daraus wird klar, daß die Wahrscheinlichkeit für einen solchen –die genetische Kopplung durchbrechenden– Chromatinaustausch mit zunehmendem Abstand der beiden Loci voneinander steigt.

Betrachtet man zwei polymorphe Loci (A/a und B/b), müßten sich die Genotypenhäufigkeiten (h_{AB}) aus der Multiplikation der Allelhäufigkeiten ($h_A \times h_B$) ergeben, wenn keine genetische Kopplung vorliegt. Das Abweichen von diesen erwarteten Häufigkeiten beschreibt das Linkage Disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht) und stellt somit ein Maß für die Kopplung oder Unabhängigkeit zweier polymorpher Loci dar⁽⁴⁴³⁾. Seine Berechnung sei an folgendem Beispiel verdeutlicht:

Genotypen (n=1000)	AA	Aa	aa
BB	57	39	3
Bb	140	224	54
bb	101	226	156

Daraus ergeben sich die Allelhäufigkeiten

$$h_A = \frac{(57 + 140 + 101) + 0,5 \times (39 + 224 + 226)}{1000} = 0,5425$$

$$h_a = 1 - h_A = 0,4575$$

$$h_B = \frac{(57 + 39 + 3) + 0,5 \times (140 + 224 + 54)}{1000} = 0,3080$$

$$h_b = 1 - h_B = 0,6920$$

Linkage Disequilibrium [D_{AB}], Varianz [$Var(D_{AB})$] und Standardabweichung [$SE(D_{AB})$] errechnen sich wie folgt:

$$D_{AB} = \frac{N}{N-1} \times \left[\frac{4 \times 57 + 2 \times (140 + 39) + 224}{2 \times N} - 2 \times h_A \times h_B \right] = 0,071$$

$$Var(D_{AB}) = \frac{h_A \times h_a \times h_B \times h_b}{N-1} + \frac{(2 \times h_A - 1) \times (2 \times h_B - 1) \times D_{AB}}{2 \times N} + \frac{D_{AB}^2}{N \times (N-1)} = 0,0000518$$

$$SE(D_{AB}) = \sqrt{Var(D_{AB})} = 0,0072$$

Das im Beispiel gezeigt Linkage Disequilibrium (D_{AB}) weicht um etwa 10 Standardabweichungen von Null ab und kann daher als signifikant betrachtet werden. Zur Beschreibung des Linkage Disequilibriums zwischen multiallelischen Loci sind $(t-1) \times (w-1)$ D-Werte notwendig (t: Anzahl der Allele des Locus 1; w: Anzahl der Allele des Locus 2).

Neben dem Abstand der Loci zueinander beeinflussen weitere Faktoren das Linkage Disequilibrium: natürliche Selektion (durch funktionelle Unterschiede der resultierenden Haplotypen), Gründereffekte, Migration, nicht zufällige Partnerwahl und das evolutionäre Alter eines Locus (bzw. eines Polymorphismus).

Ein ausgeprägtes Linkage Disequilibrium zwischen den Markern A, B und C bedeutet, daß die ETDT-Analyse (siehe unten) von „ABC“ nur einen geringen Informationsgewinn gegenüber der Analyse von „AB“ oder „AC“ verspricht, der durch die Abnahme der Gruppengröße und die Zunahme des Freiheitsgrades der Analyse unter Umständen komplett zunichte gemacht wird. Die Untersuchung möglichst vieler Marker liefert somit nicht unbedingt genauere Ergebnisse als das Betrachten weniger Polymorphismen.

Chi²-Vierfeldertest

Der Chi²-Vierfeldertest untersucht, ob die Verteilung von Merkmalen in zwei Gruppen signifikant voneinander abweicht oder ob beide Gruppen mit „einer gemeinsamen Realität“ vereinbar sind. Am Beispiel des Auftretens der Krankheit K bei Jungen und Mädchen sei das Prinzip erläutert:

beobachtet	krank	gesund	Summe
Jungen	24	12	36
Mädchen	2	34	36
Summe	26	46	72

Geht man davon aus, daß das Geschlecht bei der Erkrankung K keine Rolle spielt, könnte man die Untergruppen (Jungen und Mädchen) als zufällige Stichproben der Gesamtpopulation ansehen und würde daher folgende Verteilung erwarten:

erwartet	krank	gesund	Summe
Jungen	$\frac{26}{72} \times 36 = 13$	$\frac{46}{72} \times 36 = 23$	36
Mädchen	$\frac{46}{72} \times 36 = 23$	$\frac{26}{72} \times 36 = 13$	36
Summe	36	36	72

Beim Chi²-Vierfeldertest werden die beobachteten Werte (B) mit den erwarteten Werten (E) verglichen:

$$Chi^2 = \sum \frac{(B_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}} = 29,1371 \quad (\text{theoretisch})$$

Normalerweise untersucht man im Vergleich zur Gesamtpopulation nur sehr kleine Gruppen, so daß eine Stetigkeitskorrektur der Werte nach Yates⁽⁴⁴⁴⁾ erforderlich wird, auf deren Berechnung hier nicht näher eingegangen wird. Für obiges Beispiel ergibt sich dadurch:

$$Chi^2 = 26,5485 \quad (\text{nach Yates-Korrektur})$$

Die in dieser Arbeit angegebenen Ergebnisse des Chi²-Vierfeldertests wurden nach Yates korrigiert, und eine sich daraus ergebende Wahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ wurde als signifikant akzeptiert. Eine Korrektur der p-Werte nach der Anzahl der Freiheitsgrade erfolgte nicht. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde ein ETDT-Differenztest (siehe unten) durchgeführt, dessen Ergebnis eine Korrektur entsprechend des Freiheitsgrades der jeweiligen Rechnung beinhaltet.

Der Chi²-Vierfeldertest dient dem Vergleich der transmittierten bzw. nicht transmittierten Allele zwischen den Subgruppen im Rahmen der vorgenommenen Konditionierungen.

Transmission Disequilibrium Test (TDT)

Der oben beschriebene Chi²-Vierfeldertest eignet sich für Assoziationsstudien, bei denen das Auftreten eines Polymorphismus zum Beispiel bei kranken und gesunden Individuen miteinander verglichen wird. Die Auswahl einer Kontrollgruppe, die sich lediglich durch die Abwesenheit der Erkrankung von der Patientengruppe unterscheiden soll, bereitet oft Schwierigkeiten und kann bei der Analyse sowohl zu falsch positiven als auch zu falsch negativen Ergebnissen führen.

Die Familienanalyse umgeht das Problem der Auswahl einer repräsentativen Kontrollgruppe und ermöglicht eine sensitivere und spezifischere Untersuchung des fraglichen Polymorphismus in bezug auf seine Krankheitsassoziation. Bei diesem Verfahren werden die Häufigkeiten der an den Patienten transmittierten und nicht transmittierten Allele mit Hilfe eines Chi²-Tests miteinander verglichen und als Haplotype Relative Risk (HRR) bezeichnet⁽⁴⁴⁵⁾. Im Vergleich zur Assoziationsstudie fungieren die Häufigkeiten der nicht transmittierten Allele als interne Kontrollgruppe.

Auch beim Transmission Disequilibrium Test (TDT) vergleicht man die Häufigkeiten von transmittierten (t) und nicht transmittierten (nt) Allelen innerhalb einer Familie miteinander. Zur Erhöhung der Sensitivität der Analyse berücksichtigt der TDT nur Eltern, die für den fraglichen Polymorphismus heterozygot sind und bei denen somit eine echte Alternative zwischen der

Vererbung des einen oder des anderen Allels besteht. Die *a priori*-Wahrscheinlichkeit eines heterozygoten Individuums, ein bestimmtes Allel zu vererben, liegt bei 50%. Der TDT mißt die Wahrscheinlichkeit, daß ein Abweichen der beobachteten Verteilung von der 50:50-Erwartung zufällig ist⁽⁴⁴⁶⁾:

$$Chi^2 = \frac{(t - nt)^2}{t + nt}$$

Eine Wahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ wurde als signifikant angenommen. Eine Korrektur der p-Werte des TDTs nach der Anzahl der Freiheitsgrade erfolgte nicht. Stattdessen wurde zur Bestätigung der jeweiligen Ergebnisse ein erweiterter Transmission Disequilibrium Test (ETDT) durchgeführt, der im folgenden beschrieben wird und der eine Korrektur entsprechend des Freiheitsgrades der Analyse beinhaltet.

Erweiterter Transmission Disequilibrium Test (ETDT)

Der Transmission Disequilibrium Test (TDT) untersucht jeweils nur ein Allel pro Analyse. Für die Betrachtung eines multiallelischen Markers sind demnach mehrere aufeinander folgende Berechnungen nötig, die für die erfolgte Mehrfachtestung –siehe Chi²-Vierfeldertest– korrigiert werden müssen. Da die einzelnen Analysen jedoch nicht unabhängig voneinander sind, wird eine Bonferroni-Korrektur⁽⁴⁴⁷⁾ oder eine Korrektur entsprechend dem Freiheitsgrad zu konservative (=falsch negative) Werte liefern. Der allelische erweiterte Transmission Disequilibrium Test (ETDT)⁽⁴³⁸⁾ untersucht das Vererbungsungleichgewicht eines multiallelischen Markers und liefert eine exaktere Abschätzung der tatsächlichen Wahrscheinlichkeiten. Dabei wird jedem Allel ein Parameter zugeordnet. Dieser Parameter entspricht dem natürlichen Logarithmus des Wahrscheinlichkeitsverhältnisses jedes Allels eines Haplotyps, an den Patienten vererbt zu werden. Für den Haplotyp AB (t: Transmission) errechnet sich das Parameterpaar „a - b“ wie folgt und definiert die allelische Alternativhypothese des ETDT:

$$\ln \frac{p(t_A|AB)}{p(t_B|AB)} = a - b$$

Diese Parameter werden nun mit der Nullhypothese „keine Abweichung von der erwarteten Vererbungs-wahrscheinlichkeit von 50%“ durch logistische Regression verglichen und entsprechend dem Freiheitsgrad korrigiert:

L_0 = natürlicher Logarithmus der Wahrscheinlichkeit unter der Nullhypothese

L_1 = natürlicher Logarithmus der Wahrscheinlichkeit unter der Alternativhypothese

Chi^2 (allelischer ETDT) = $2 \times (L_1 - L_0)$, Freiheitsgrad : $n - 1$

n: Anzahl der Allele

Einzelheiten der Berechnung können der entsprechenden Referenz⁽⁴³⁸⁾ entnommen werden. Eine Wahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ wurde als signifikant akzeptiert.

Die ETDT-Ergebnisse der Subgruppen im Rahmen der Konditionierungen wurden mit folgender Rechnung auf einen signifikanten Unterschied überprüft:

$$\text{Chi}^2 = 2 \times (L1_{(a)} + L1_{(b)} - L1_{(a+b)}), \text{Freiheitsgrad}(df) = df_{(a)} + df_{(b)} - df_{(a+b)}$$

Für die beiden Subgruppen a und b sowie für die Summe $a + b$ wurde dabei jeweils getrennt ein ETDT nach obigem Schema berechnet. Diese Berechnung wird im folgenden zur Abgrenzung gegen ETDT und Chi^2 -Vierfeldertest als ETDT-Differenztest bezeichnet.

TRANSMIT-Analyse

Sowohl der TDT als auch der ETDT berücksichtigen nur Familien, bei denen die Haplotypen aller Individuen vollständig bekannt sind. Ist die DNA eines Elternteils nicht verfügbar oder ist zwar die Genotypisierung, nicht jedoch die eindeutige Zuordnung der Haplotypen möglich, führt dies zum Ausschluß der entsprechenden Familie aus der TDT-/ETDT-Analyse (siehe Kapitel 2.3.8). Obwohl die Anzahl der auszuschließenden Familien im Verhältnis zur Gesamtzahl der Familien in der Regel sehr gering ist und der Ausschluß statistisch alle Haplotypen gleichmäßig betreffen sollte, kann eine Selektion bestimmter Familien (und damit Haplotyp-Kombinationen) nicht völlig ausgeschlossen werden. Die sogenannte TRANSMIT-Analyse⁽⁴³⁹⁾ führt eine ETDT-Berechnung durch, berücksichtigt jedoch auch unvollständige Familien und solche mit nicht eindeutigen Haplotypen. Dazu errechnet sie aus den Haplotypfrequenzen der Gesamtpopulation durch einen Wahrscheinlichkeitsvektor die mutmaßliche Konstellation der fehlenden Haplotypen. Die Haplotypen gesunder Geschwister werden zur weiteren Verfeinerung der Vorhersage verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die TRANSMIT-Analyse (in den Tabellen teilweise als „TRM“ abgekürzt) zur qualitativen Bestätigung signifikanter ETDT-Ergebnisse verwendet und diente somit zum Ausschluß einer relevanten Selektion in der jeweiligen ETDT-Analyse der Gesamtheit der Patienten. Im Zuge der einzelnen Konditionierungen wurde die TRANSMIT-Analyse dann nicht mehr durchgeführt.

3. ERGEBNISSE[†]

3.1 Polymorphismen des nukleären Vitamin D Rezeptors

3.1.1 Mutationsscreening in Exon 2 und Exon 3

200 Eltern aus 100 Familien wurden auf Vorhandensein oder Abwesenheit der polymorphen *MwoI*-Schnittstelle im Exon 2 des VDR-Gens untersucht. Alle Individuen wiesen den Genotyp „*mm*“ auf, gleichbedeutend mit dem homozygoten Vorhandensein der polymorphen Schnittstelle. Auf die Untersuchung weiterer Familien wurde daraufhin verzichtet.

Eine SSCP-Analyse des Exons 3 bei denselben Personen –200 Eltern aus 100 Familien– ergab die Abwesenheit eines Polymorphismus. Auch hier wurden daraufhin keine weiteren Familien auf eine Mutation oder einen Polymorphismus im Exon 3 des VDR-Gens untersucht.

3.1.2 Linkage Disequilibrium und Allelverteilung

5'-3'-Haplotyp	5'-3'-Haplotypen (absolut)	3'-Haplotypen-Code	3'-Haplotypen (%)	5'-3'-Haplotyp	5'-3'-Haplotypen (absolut)	3'-Haplotypen-Code	3'-Haplotypen (%)
<i>F baT</i>	60	} 1	35,3	<i>F bAt</i>	8	} 5	3,6
<i>f baT</i>	57			<i>f bAt</i>	4		
<i>F BAAt</i>	63	} 2	29,5	<i>F Bat</i>	6	} 6	2,4
<i>f BAAt</i>	35			<i>f Bat</i>	2		
<i>F bAT</i>	38	} 3	16,8	<i>F BaT</i>	10	} 7	3,3
<i>f bAT</i>	18			<i>f BaT</i>	1		
<i>F BAT</i>	13	} 4	6,0	<i>F bat</i>	7	} 8	3,0
<i>f BAT</i>	7			<i>f bat</i>	3		

Tab. 10: VDR – Verteilung der Haplotypen (n=332; für *FokI/BsmI/ApaI/TaqI* heterozygote Eltern) in der untersuchten Population

Die am 3'-Ende des VDR-Gens gelegenen Polymorphismen (*BsmI*, *ApaI* und *TaqI*) stehen in einem starken Linkage Disequilibrium zueinander. Dabei bilden „*BAT*“ sowie „*baT*“ die bevorzugten Haplotypen. Diese Beobachtung spiegelt sich im jeweiligen Linkage Disequilibrium ($D \pm$

[†] Die Tabellen der einzelnen Kapitel des Ergebnisteils haben zur besseren Vergleichbarkeit einen einheitlichen Aufbau. Die Darstellung der VDR-Haplotypen beginnt mit den 4-Locus-Haplotypen. Es folgen 3-Locus- und 2-Locus-Haplotypen und schließlich die einzelnen Polymorphismen. Die DBP-Tabellen sind aufgrund der geringeren Allel-Anzahl kürzer. Auch hier werden die 2-Locus-Haplotypen vor den einzelnen Polymorphismen dargestellt. Zwar wird durch die Präsentation aller (auch nicht signifikanter) Ergebnisse die Verständlichkeit der einzelnen Tabelle auf den ersten Blick erschwert. Andererseits ermöglicht einzig diese Art der Darstellung den Vergleich der jeweiligen Konditionierungen untereinander. Der Autor hat sich daher bewußt für diese Form der Präsentation entschieden.

Standardabweichung) entsprechend wider: $D_{BA}=0,1517 \pm 0,0145$; $D_{BT}= -0,1953 \pm 0,0148$ und $D_{AT}= -0,1322 \pm 0,0144$.

Zwischen dem am 5'-Ende des VDR-Gens gelegenen *FokI*-Polymorphismus und den 3'-Polymorphismen *BsmI*, *ApaI* und *TaqI* besteht dagegen kein nennenswertes Linkage Disequilibrium: $D_{FB}= 0,0133 \pm 0,0142$; $D_{FA}= 0,0053 \pm 0,0143$ und $D_{FT}= -0,0116 \pm 0,0141$.

Die 3'-Polymorphismen wurden vor dem *FokI*-Polymorphismen entdeckt und untersucht. Entsprechend der in diesen Studien bei Kaukasiern beobachteten Allelhäufigkeiten^(365;448) erfolgte die Benennung der 3'-Haplotypen.

Wie bereits aus dem Linkage Disequilibrium hervorgeht, konstituieren die Allele „*F baT*“ (18,1%), „*f baT*“ (17,2%), „*F BAf*“ (19,0%), „*f BAf*“ (10,5%) und „*F bAT*“ (11,4%) etwa drei Viertel aller Haplotypen. Die übrigen 12 Allele kommen in Häufigkeiten zwischen 0,6% und 5,4% vor. Alle 16 theoretisch denkbaren Haplotypen sind demnach in der untersuchten Population vertreten. Betrachtet man nur die 3'-Haplotypen, so stellen 3 der 8 Allele 80% der Haplotypen dar (siehe auch Tabelle 10).

3.1.3 Vererbung an Patienten

Die Analyse der 3'-Haplotypen *BsmI/ApaI/TaqI* ergab ein signifikantes Vererbungsungleichgewicht (ETDT: $\chi^2=18,886$; $p=0,0086$ – TRANSMIT: $\chi^2=21,841$; $p=0,0027$). Diese Beobachtung wurde durch die Analyse der 2-Locus-Haplotypen, die Bestandteil von *BsmI/ApaI/TaqI* sind, bestätigt. Für *BsmI/TaqI* (ETDT: $\chi^2=8,373$; $p=0,0389$ – TRANSMIT: $\chi^2=13,009$; $p=0,0046$) und für *ApaI/TaqI* (ETDT: $\chi^2=17,182$; $p=0,0006$ – TRANSMIT: $\chi^2=16,589$; $p=0,0009$) bestand eine signifikante Abweichung von den erwarteten Allelhäufigkeiten. Die Vererbungshäufigkeiten von *BsmI/ApaI* wichen dagegen nicht signifikant von den erwarteten Werten ab (ETDT: $\chi^2=3,692$; $p=0,2967$).

Für das Allel „*baT*“ (3'-Code: 1) [45 von 82mal vererbt ($p=0,3770$)] sowie für die entsprechenden 2-Locus-Haplotypen „*bT*“ [44 von 93mal vererbt ($p=0,6041$)] und „*aT*“ [50 von 88mal vererbt ($p=0,2008$)] konnte kein Vererbungsungleichgewicht festgestellt werden. Das Allel „*BAf*“ (3'-Code: 2) hingegen wurde vornehmlich an Patienten vererbt [52 von 81mal ($p=0,0106$)]. Auch die 2-Locus-Haplotypen „*Bf*“ [54 von 87mal vererbt ($p=0,0244$)] und „*Af*“ [52 von 84mal vererbt ($p=0,0291$)] vermittelten ein erhöhtes Risiko, an Typ 1 Diabetes mellitus zu erkranken. Die TDT-Analyse von „*bAT*“ (3'-Code: 3) war nicht signifikant [23 von 59mal vererbt ($p=0,0906$)], aber der entsprechende 2-Locus-Haplotyp „*AT*“ wurde vorwiegend nicht vererbt [20 von 63mal vererbt ($p=0,0038$)]. Auch das „*af*“ Allel –Bestandteil von „*Baf*“ (3'-Code: 6) und „*baF*“ (3'-Code: 8)– wurde seltener als erwartet transmittiert [4 von 17mal vererbt ($p=0,0290$)].

Die zusätzliche Berücksichtigung von *FokI* verminderte die Aussagekraft der Untersuchung (ETDT: $\chi^2=24,702$; $p=0,0541$ – TRANSMIT: $\chi^2=28,237$; $p=0,0201$) und lieferte ein grenzwertig signifikantes Vererbungsungleichgewicht für die 4-Locus-Haplotypen *FokI/BsmI/ApaI/TaqI*. Die isolierte Betrachtung der einzelnen Polymorphismen ergab keine signifikante Abweichung von den erwarteten Werten: *FokI* ($p=0,3843$), *BsmI* ($p=0,2088$), *ApaI* ($p=0,6892$) und *TaqI* ($p=0,1573$).

Alle signifikanten ETDT-Werte konnten mit Hilfe der TRANSMIT-Analyse bestätigt werden (siehe auch Tabelle 11, Teile A-D).

		Vererbung an Patienten (161)				Vererbung an gesunde Geschwister (94)				Patienten gegenüber Geschwister	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ ETDI-Differenztest	p=
FBAT	22	5	8	0,692	0,4054	6	3	1,000	0,3173	-	-
FBAAt	96	39	24	3,571	0,0588	13	20	1,485	0,2230	3,560	0,0592
fBAT	9	3	4	0,143	0,7055	1	1	0,000	1,0000	-	-
FbAT	59	17	21	0,421	0,5164	10	11	0,048	0,8273	0,004	0,9522
FBaT	14	7	3	1,600	0,2059	1	3	1,000	0,3173	-	-
FbaT	100	37	23	3,267	0,0707	27	13	4,900	0,0269	0,147	0,7019
FBat	12	1	5	2,667	0,1025	2	4	0,667	0,4142	-	-
fBaT	1	0	1	1,000	0,3173	0	0	-	-	-	-
fBAAt	59	18	17	0,029	0,8658	13	11	0,167	0,6831	0,003	0,9535
FbAt	10	3	5	0,500	0,4795	1	1	0,000	1,0000	-	-
fbAT	30	5	13	3,556	0,0593	1	11	8,333	0,0039	-	-
fbAT	97	27	30	0,158	0,6911	21	19	0,100	0,7518	0,085	0,7708
Fbat	11	1	6	3,571	0,0588	2	2	0,000	1,0000	-	-
fBat	3	1	1	0,000	1,0000	1	0	1,000	0,3173	-	-
fbAt	8	0	4	4,000	0,0455	2	2	0,000	1,0000	-	-
fbat	5	2	1	0,333	0,5637	1	1	0,000	1,0000	-	-
ETDT:		df=15 p=0,0541				df=15 p=0,0967				p=0,4180	
TRM:		df=15 p=0,0201								df=15	
BAT	35	7	16	3,522	0,0606	7	5	0,333	0,5637	-	-
bat	18	3	8	2,273	0,1317	3	4	0,143	0,7055	-	-
BAt	135	52	29	6,531	0,0106	26	28	0,074	0,7855	2,795	0,0946
bAT	93	23	36	2,864	0,0906	12	22	2,941	0,0863	0,017	0,8954
bAt	19	6	8	0,286	0,5930	3	2	0,200	0,6547	-	-
Bat	15	2	6	2,000	0,1573	3	4	0,143	0,7055	-	-
baT	146	45	37	0,780	0,3770	39	25	3,063	0,0801	0,321	0,5712
BaT	17	7	5	0,333	0,5637	1	4	1,800	0,1797	-	-
ETDT:		df=7 p=0,0086				df=7 p=0,4397				p=0,1515	
TRM:		df=7 p=0,0027								df=7	

Tab. 11: Transmission von VDR an Patienten und gesunde Geschwister (Teil A)[†]

[†] Das Symbol „-“ in den folgenden Tabellen (11–16 und 18–23) besagt, daß die Fallzahl für die jeweilige Berechnung nicht ausreichend war. Für die Randbedingungen der statistischen Tests sei auf Kapitel 2.3.10 sowie auf die dort angegebenen Referenzen verwiesen. Die eingeklammerten Zahlen in der Kopfzeile der Tabellen geben die jeweilige Gruppengröße an.

Haplotyp		Summe der Allele	Vererbung an Patienten (161)				Vererbung an gesunde Geschwister (94)				Patienten gegenüber Geschwister	
			Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Ch ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Ch ²	TDT p=	Ch ² -Test/ Differenztest	p=
fat	7	3	2	0,200	0,6547	1	1	0,000	1,0000	-	-	
FAT	77	19	27	1,391	0,2382	17	14	0,290	0,5900	0,873	0,3500	
FA t	100	39	27	2,182	0,1396	13	21	1,882	0,1701	3,120	0,0774	
fA T	34	6	15	3,857	0,0495	1	12	9,308	0,0023	-	-	
fA t	67	18	21	0,231	0,6310	15	13	0,143	0,7055	0,123	0,7254	
Fat	26	2	11	6,231	0,0126	5	8	0,692	0,4054	-	-	
faT	97	27	31	0,276	0,5994	21	18	0,231	0,6310	0,248	0,6188	
FaT	118	46	26	5,556	0,0184	30	16	4,261	0,0390	0,003	0,9601	
ETDT :		df=7 p=0,0143				df=7 p=0,0161				p=0,2540		
TRM :		df=7 p=0,0041								df=7		
fbt	12	2	5	1,286	0,2568	2	3	0,200	0,6547	-	-	
FBT	37	12	12	0,000	1,0000	7	6	0,077	0,7815	0,015	0,9035	
FB t	102	41	28	2,449	0,1176	11	22	3,667	0,0555	5,080	0,0242	
fB t	62	19	18	0,027	0,8694	14	11	0,360	0,5485	0,010	0,9199	
fBT	11	3	5	0,500	0,4795	1	2	0,333	0,5637	-	-	
Fbt	23	4	12	4,000	0,0455	4	3	0,143	0,7055	-	-	
fbT	116	32	42	1,351	0,2450	18	24	0,857	0,3545	0,024	0,8771	
FbT	125	44	35	1,025	0,3113	30	16	4,261	0,0390	0,733	0,3921	
ETDT :		df=7 p=0,1593				df=7 p=0,3441				p=0,3964		
										df=7		
fba	101	30	31	0,016	0,8981	21	19	0,100	0,7518	0,015	0,9022	
FBA	110	41	29	2,057	0,1515	17	23	0,900	0,3428	2,032	0,1540	
fB A	69	21	21	0,000	1,0000	14	13	0,037	0,8474	0,009	0,9232	
FbA	70	21	26	0,532	0,4658	12	11	0,043	0,8348	0,112	0,7377	
fbA	34	5	17	6,545	0,0105	1	11	8,333	0,0039	-	-	
fBa	4	1	2	0,333	0,5637	1	0	1,000	0,3173	-	-	
Fba	108	36	29	0,754	0,3853	29	14	5,233	0,0222	1,107	0,2927	
FBa	26	8	8	0,000	1,0000	3	7	1,600	0,2059	-	-	
ETDT :		df=7 p=0,2282				df=7 p=0,0121				p=0,3187		
										df=7		

Tab. 11: Transmission von VDR an Patienten und gesunde Geschwister (Teil B)

		Vererbung an Patienten (161)				Vererbung an gesunde Geschwister (94)				Patienten gegenüber Geschwister	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ ETDT- Differenztest	p=
at	76	4	13	4,765	0,0290	29	30	0,017	0,8964	2,561	0,1095
AT	79	20	43	8,397	0,0038	6	10	1,000	0,3173	0,020	0,8889
aT	157	50	38	1,636	0,2008	41	28	2,449	0,1176	0,027	0,8690
At	130	52	32	4,762	0,0291	19	27	1,391	0,2382	4,292	0,0383
ETDT:		df=3 p=0,0006				df=3 p=0,2775				p=0,0125	
TRM:		df=3 p=0,0009								df=3	
fa	107	32	33	0,015	0,9013	22	20	0,095	0,7576	0,015	0,9042
FA	149	49	44	0,269	0,6041	26	30	0,286	0,5930	0,326	0,5680
fA	95	23	35	2,483	0,1151	14	23	2,189	0,1390	0,002	0,9691
Fa	137	44	36	0,800	0,3711	34	23	2,123	0,1451	0,134	0,7139
ETDT:		df=3 p=0,4104				df=3 p=0,3224				p=0,0217	
										df=3	
ba	155	45	43	0,045	0,8312	40	27	2,522	0,1122	0,808	0,3689
BA	155	53	39	2,130	0,1444	31	32	0,016	0,8997	0,752	0,3859
bA	110	30	44	2,649	0,1036	14	22	1,778	0,1824	0,002	0,9671
Ba	32	9	11	0,200	0,6547	4	8	1,333	0,2482	-	-
ETDT:		df=3 p=0,2987				df=3 p=0,2054				p=0,6268	
										df=3	
fb	121	34	46	1,800	0,1797	17	24	1,195	0,2743	0,007	0,9319
FB	124	49	36	1,988	0,1585	14	25	3,103	0,0782	4,227	0,0398
Fb	144	46	46	0,000	1,0000	34	18	4,923	0,0265	2,592	0,1074
fB	73	22	23	0,022	0,8815	15	13	0,143	0,7055	0,022	0,8821
ETDT:		df=3 p=0,4160				df=3 p=0,0734				p=0,0916	
										df=3	
bt	38	9	17	2,462	0,1167	6	6	0,000	1,0000	0,297	0,5858
BT	53	14	22	1,778	0,1824	8	9	0,059	0,8084	0,070	0,7912
bT	152	44	49	0,269	0,6041	32	27	0,424	0,5151	0,443	0,5056
Bt	141	54	33	5,069	0,0244	25	29	0,296	0,5862	2,755	0,0970
ETDT:		df=3 p=0,0389				df=3 p=0,9316				p=0,3042	
TRM:		df=3 p=0,0046								df=3	

Tab. 11: Transmission von VDR an Patienten und gesunde Geschwister (Teil C)

		Vererbung an Patienten (161)				Vererbung an gesunde Geschwister (94)				Patienten gegenüber Geschwister	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ ETDT-Differenztest	p=
FT	159	53	45	0,653	0,4190	39	22	4,738	0,0295	1,120	0,2899
ft	78	24	23	0,021	0,8840	17	14	0,290	0,5900	0,009	0,9244
Ft	116	40	37	0,117	0,7324	13	26	4,333	0,0374	2,904	0,0884
fT	117	32	44	1,895	0,1687	17	24	1,195	0,2743	0,017	0,8972
ETDT:		df=3 p=0,5904				df=3 p=0,0641				p=0,1425 df=3	
A	181	48	52	0,160	0,6892	37	44	0,605	0,4367	0,026	0,8719
a	181	52	48	0,160	0,6892	44	37	0,605	0,4367	0,026	0,8719
B	169	60	47	1,579	0,2088	28	34	0,581	0,4461	1,462	0,2267
b	169	47	60	1,579	0,2088	34	28	0,581	0,4461	1,462	0,2267
F	166	58	49	0,757	0,3843	32	27	0,424	0,5151	0,025	0,8739
f	166	49	58	0,757	0,3843	27	32	0,424	0,5151	0,025	0,8739
T	160	42	56	2,000	0,1573	34	28	0,581	0,4461	1,732	0,1882
t	160	56	42	2,000	0,1573	28	34	0,581	0,4461	1,732	0,1882

Tab. 11: Transmission von VDR an Patienten und gesunde Geschwister (Teil D)

3.1.4 Vererbung an gesunde Geschwister

Die Vererbung der Polymorphismen *FokI*, *BsmI*, *ApaI* und *TaqI* an die 94 gesunden Geschwister erfolgte in Übereinstimmung mit den erwarteten Häufigkeiten. Das Allel „B“ wurde seltener an gesunde Geschwister [28 von 62mal (TDT: p=0,4461)] als an Patienten [60 von 107mal (TDT: p=0,2088)] vererbt. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Chi²-Test: p=0,2267). Das Allel „T“ wurde hingegen öfter (aber nicht signifikant) an gesunde Geschwister als an Patienten vererbt (Chi²-Test: p=0,1882).

Für die 2-Locus-Haplotypen *FokI/TaqI* (ETDT: p=0,0641) und *FokI/BsmI* (ETDT: p=0,0734) bestand ein knapp nicht-signifikantes Vererbungsungleichgewicht an die gesunden Geschwister. Der Unterschied (ETDT-Differenztest) zur Gruppe der Patienten war ebenfalls nicht signifikant. Für die Haplotypen *ApaI/TaqI* (ETDT-Differenztest: p=0,0125) und *FokI/ApaI* (ETDT-Differenztest: p=0,0217) bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der Vererbung an gesunde Geschwister und Patienten.

Das Allel „FB“ wurde deutlich häufiger an Patienten als an gesunde Geschwister transmittiert (Chi²-Test: p=0,0398). Die Betrachtung der davon abgeleiteten Allele „FBt“ (Chi²-Test: p=0,0242) und „FBAf“ (Chi²-Test: p=0,0592) ergab einen ähnlichen Unterschied in ihrer Vererbung zwischen gesunden Geschwistern und Patienten.

3.1.5 Konditionierungen

		weibliche Patienten (74)				männliche Patienten (87)				weiblich gegenüber männlich	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ ETDT-Differenztest	p=
FBAT	13	2	7	2,778	0,0956	3	1	1,000	0,3173	-	-
FBA t	61	18	10	2,286	0,1306	21	12	2,455	0,1172	0,046	0,8298
fBA t	7	0	2	2,000	0,1573	3	2	0,200	0,6547	-	-
FbAT	38	8	7	0,067	0,7963	9	14	1,087	0,2971	0,278	0,5982
FBaT	10	2	2	0,000	1,0000	5	1	2,667	0,1025	-	-
FbaT	59	19	11	2,133	0,1441	18	11	1,690	0,1936	0,029	0,8659
FBat	6	0	4	4,000	0,0455	1	1	0,000	1,0000	-	-
fBaT	1	0	0	-	-	0	1	1,000	0,3173	-	-
fBA t	33	7	8	0,067	0,7963	9	9	0,000	1,0000	0,025	0,8736
FbAt	8	1	3	1,000	0,3173	2	2	0,000	1,0000	-	-
fbAT	18	4	5	0,111	0,7389	1	8	5,444	0,0196	-	-
fbAT	56	14	14	0,000	1,0000	12	16	0,571	0,4497	0,072	0,7887
Fbat	7	0	1	1,000	0,3173	1	5	2,667	0,1025	-	-
fBat	2	1	0	1,000	0,3173	0	1	1,000	0,3173	-	-
fbAt	4	0	2	2,000	0,1573	0	2	2,000	0,1573	-	-
fbat	3	0	0	-	-	2	1	0,333	0,5637	-	-
ETDT:				-	-			-	-	-	-
BAT	23	2	14	9,000	0,0027	5	2	1,286	0,2568	-	-
bat	11	0	1	1,000	0,3173	3	7	1,600	0,2059	-	-
BAt	77	25	13	3,789	0,0516	25	14	3,103	0,0782	0,007	0,9333
bAT	59	13	14	0,037	0,8474	10	22	4,500	0,0339	1,119	0,2901
bAt	14	3	4	0,143	0,7055	3	4	0,143	0,7055	-	-
Bat	8	1	4	1,800	0,1797	1	2	0,333	0,5637	-	-
baT	78	21	15	1,000	0,3173	22	20	0,095	0,7576	0,089	0,7652
BaT	12	2	2	0,000	1,0000	5	3	0,500	0,4795	-	-
ETDT:		df=7		p=0,0017		df=7		p=0,1804		p=0,1808	df=7

Tab. 12: Transmission von VDR – Konditionierung für das Geschlecht der Patienten (Teil A)

		weibliche Patienten (74)				männliche Patienten (87)				weiblich gegenüber männlich	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ ETD- Differenztest	p=
fat	5	1	0	1,000	0,3173	2	2	0,000	1,0000	-	-
FAT	46	8	13	1,190	0,2752	11	14	0,360	0,5485	0,011	0,9168
FAt	64	17	12	0,862	0,3532	22	13	2,314	0,1282	0,008	0,9296
fAT	21	3	6	1,000	0,3173	3	9	3,000	0,0833	-	-
fAt	38	7	10	0,529	0,4669	10	11	0,048	0,8273	0,005	0,9448
Fat	13	0	5	5,000	0,0253	2	6	2,000	0,1573	-	-
faT	56	14	14	0,000	1,0000	11	17	1,286	0,2568	0,289	0,5909
FaT	71	23	13	2,778	0,0956	23	12	3,457	0,0630	0,008	0,9301
ETDT:		df=7 p=0,0497				df=7 p=0,2001				p=0,8423 df=7	
fbt	7	0	2	2,000	0,1573	2	3	0,200	0,6547	-	-
FBT	24	4	9	1,923	0,1655	8	3	2,273	0,1317	2,685	0,1013
Fbt	68	18	13	0,806	0,3692	23	14	2,189	0,1390	0,009	0,9240
fBt	36	8	8	0,000	1,0000	10	10	0,000	1,0000	0,113	0,7373
fBT	8	0	2	2,000	0,1573	3	3	0,000	1,0000	-	-
Fbt	16	1	4	1,800	0,1797	3	8	2,273	0,1317	-	-
fbT	72	18	18	0,000	1,0000	12	24	4,000	0,0455	1,429	0,2320
FbT	77	20	13	1,485	0,2230	24	20	0,364	0,5465	0,090	0,7648
ETDT:		df=7 p=0,0205				df=7 p=0,3394				p=0,0565 df=7	
fba	60	14	14	0,000	1,0000	15	17	0,125	0,7237	0,000	0,9862
FBA	68	16	13	0,310	0,5775	25	14	3,103	0,0782	0,244	0,6215
fBA	41	7	10	0,529	0,4669	13	11	0,167	0,6831	0,253	0,6152
FbA	47	9	10	0,053	0,8185	12	16	0,571	0,4497	0,000	1,0000
fbA	22	4	7	0,818	0,3657	1	10	7,364	0,0067	-	-
fBa	3	1	0	1,000	0,3173	0	2	2,000	0,1573	-	-
Fba	63	18	12	1,200	0,2733	17	16	0,030	0,8618	0,179	0,6722
FBa	16	2	5	1,286	0,2568	6	3	1,000	0,3173	-	-
ETDT:		df=7 p=0,4950				df=7 p=0,0409				p=0,1584 df=7	

Tab. 12: Transmission von VDR – Konditionierung für das Geschlecht der Patienten (Teil B)

		weibliche Patienten (74)				männliche Patienten (87)				weiblich gegenüber männlich	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ ETDI-Differenztest	p=
at	17	1	5	2,667	0,1025	3	8	2,273	0,1317	-	-
AT	63	9	24	6,818	0,0090	11	19	2,133	0,1441	0,280	0,5968
aT	87	24	16	1,600	0,2059	25	22	0,191	0,6617	0,178	0,6735
At	83	25	14	3,103	0,0782	27	17	2,273	0,1317	0,001	0,9761
ETDT:		df=3 p=0,0050				df=3 p=0,0603				p=0,7349 df=3	
fa	64	16	14	0,133	0,7150	15	19	0,471	0,4927	0,236	0,6273
FA	91	21	21	0,000	1,0000	28	21	1,000	0,3173	0,221	0,6380
fA	57	10	16	1,385	0,2393	12	19	1,581	0,2087	0,065	0,7995
Fa	80	23	19	0,381	0,5371	21	17	0,421	0,5164	0,032	0,8572
ETDT:		df=3 p=0,6473				df=3 p=0,3650				p=0,8315 df=3	
ba	87	22	16	0,947	0,3304	23	26	0,184	0,6682	0,637	0,4249
BA	90	20	21	0,024	0,8759	32	17	4,592	0,0321	1,867	0,1718
bA	73	16	18	0,118	0,7316	13	26	4,333	0,0374	0,913	0,3392
Ba	20	3	6	1,000	0,3173	6	5	0,091	0,7630	-	-
ETDT:		df=3 p=0,6287				df=3 p=0,1173				p=0,3042 df=3	
fb	78	18	20	0,105	0,7456	14	26	3,600	0,0578	0,774	0,3790
FB	84	18	18	0,000	1,0000	31	17	4,083	0,0433	1,250	0,2636
Fb	90	21	18	0,231	0,6310	25	26	0,020	0,8886	0,058	0,8095
fB	44	8	9	0,059	0,8084	13	14	0,037	0,8474	0,057	0,8107
ETDT:		df=3 p=0,9100				df=3 p=0,1141				p=0,4381 df=3	
bt	26	3	5	0,500	0,4795	6	12	2,000	0,1573	-	-
BT	36	4	17	8,048	0,0046	10	5	1,667	0,1967	6,465	0,0110
bT	91	21	16	0,676	0,4111	22	32	1,852	0,1736	1,663	0,1972
Bt	85	25	15	2,500	0,1138	28	17	2,689	0,1011	0,039	0,8431
ETDT:		df=3 p=0,0071				df=3 p=0,1924				p=0,0549 df=3	

Tab. 12: Transmission von VDR – Konditionierung für das Geschlecht der Patienten (Teil C)

		weibliche Patienten (74)				männliche Patienten (87)				weiblich gegenüber männlich	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ ETDT-Differenztest	p=
FT	97	23	21	0,091	0,7630	30	23	0,925	0,3363	0,049	0,8245
ft	45	9	9	0,000	1,0000	14	13	0,037	0,8474	0,033	0,8552
Ft	76	17	17	0,000	1,0000	23	19	0,381	0,5371	0,033	0,8552
fT	74	17	19	0,111	0,7389	13	25	3,789	0,0516	0,815	0,3667
ETDT:		df=3 p=0,9714				df=3 p=0,2624				p=0,7091 df=3	
A	96	20	25	0,556	0,4561	27	24	0,176	0,6744	0,393	0,5310
a	96	25	20	0,556	0,4561	24	27	0,176	0,6744	0,393	0,5310
B	104	21	24	0,200	0,6547	37	22	3,814	0,0508	2,054	0,1518
b	104	24	21	0,200	0,6547	22	37	3,814	0,0508	2,054	0,1518
F	104	25	24	0,020	0,8864	33	22	2,200	0,1380	0,522	0,4699
f	104	24	25	0,020	0,8864	22	33	2,200	0,1380	0,522	0,4699
T	96	17	24	1,195	0,2743	24	31	0,891	0,3452	0,000	1,0000
t	96	24	17	1,195	0,2743	31	24	0,891	0,3452	0,000	1,0000

Tab. 12: Transmission von VDR – Konditionierung für das Geschlecht der Patienten (Teil D)

Geschlecht

Analog zur Untersuchung der Gesamtheit der Patienten wurden die Vererbung an weibliche (74 Fälle) und männliche Patienten (87 Fälle) mit Hilfe von TDT und ETDT analysiert. Chi²-Tests und ETDT-Differenztests dienten dem Vergleich der Gruppen miteinander (siehe Tabelle 12, Teile A-D).

Die Vererbungshäufigkeiten der einzelnen Polymorphismen wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Patienten auf. Die Allele „F“ (Chi²-Test: p=0,4699), „A“ (Chi²-Test: p=0,5310) und „T“ (Chi²-Test: p=1,0000) wurden etwa gleich häufig an Jungen und Mädchen vererbt. Das „B“ Allel wurde in der Gruppe der weiblichen Patienten etwas seltener [21 von 45mal (p=0,6547)] als erwartet vererbt. An männliche Patienten wurde es hingegen deutlich häufiger als erwartet vererbt [37 von 59mal (p=0,0508)]. Der Vergleich beider Gruppen mit Hilfe des Chi²-Tests ergab kein signifikantes Ergebnis (p=0,1518).

Die Betrachtung der *BsmI* beinhaltenden 2-Locus-Haplotypen *BsmI/TaqI* ergab ein signifikantes Vererbungsungleichgewicht für die Gruppe der weiblichen Patienten (ETDT: p=0,0071), während keine signifikante Abweichung von den erwarteten Werten bei männlichen Patienten bestand (ETDT: p=0,1924). Der Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Patienten war zwar deutlich, verfehlte aber knapp das Signifikanzniveau (ETDT-Differenztest: p=0,0549). Dabei wurde das Allel „BT“ signifikant seltener an Mädchen [4 von 21mal (p=0,0046)] als an Jungen [10 von 15mal (p=0,1967)] vererbt (Chi²-Test: p=0,0110).

Die ETDT-Analyse der entsprechenden 3-Locus-Haplotypen *FokI/BsmI/TaqI* ergab ebenfalls ein signifikantes Vererbungsungleichgewicht bei weiblichen Patienten (ETDT:

p=0,0205) und wiederum keine Abweichung von den erwarteten Werten bei männlichen Patienten (ETDT: p=0,3394). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war auch hier deutlich, wenn auch nicht signifikant (ETDT-Differenztest: p=0,0565). Der Unterschied zwischen Mädchen und Jungen war für *BsmI/ ApaI/ TaqI* geringer (ETDT-Differenztest: p=0,1808). Auch für die übrigen Haplotypen, für welche die TDT-/ ETDT-Analyse aller Patienten signifikante Ergebnisse ergeben hatte, bestand kein Unterschied in der Vererbung an Mädchen oder Jungen. Ein ETDT-Vergleich für die 4-Locus-Haplotypen *FokI/ BsmI/ ApaI/ TaqI* war aufgrund der zu geringen Gruppengröße nicht möglich.

		Alter bei Erstdiagnose größer 8 Jahre (61)				Alter bei Erstdiagnose kleinergleich 8 Jahre (63)				höheres gg. niedriges Alter bei Erstdiagnose	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ²	p=
FBAT	10	1	4	1,800	0,1797	3	2	0,200	0,6547	-	-
FBA t	45	12	7	1,316	0,2513	13	13	0,000	1,0000	0,329	0,5662
fBAT	5	2	1	0,333	0,5637	0	2	2,000	0,1573	-	-
FbAT	35	9	9	0,000	1,0000	8	9	0,059	0,8084	0,027	0,8695
FBaT	6	2	2	0,000	1,0000	2	0	2,000	0,1573	-	-
FbaT	51	20	11	2,613	0,1060	14	6	3,200	0,0736	0,010	0,9192
FBat	6	0	4	4,000	0,0455	1	1	0,000	1,0000	-	-
fBaT	1	0	0	-	-	0	1	1,000	0,3173	-	-
fBa t	30	6	8	0,286	0,5930	9	7	0,250	0,6171	0,134	0,7144
FbaT	6	1	1	0,000	1,0000	2	2	0,000	1,0000	-	-
fbAT	15	0	3	3,000	0,0833	5	7	0,333	0,5637	-	-
fbat	39	12	12	0,000	1,0000	6	9	0,600	0,4386	0,078	0,7800
Fbat	6	1	3	1,000	0,3173	0	2	2,000	0,1573	-	-
fBat	1	0	1	1,000	0,3173	0	0	-	-	-	-
fbAt	3	0	2	2,000	0,1573	0	1	1,000	0,3173	-	-
fbat	3	2	0	2,000	0,1573	0	1	1,000	0,3173	-	-
ETDT:		-				-				-	
BAT	19	2	6	2,000	0,1573	3	8	2,273	0,1317	-	-
bat	9	3	3	0,000	1,0000	0	3	3,000	0,0833	-	-
BAt	60	16	11	0,926	0,3359	20	13	1,485	0,2230	0,025	0,8736
bAT	52	10	14	0,667	0,4142	13	15	0,143	0,7055	0,004	0,9483
bAt	11	3	3	0,000	1,0000	3	2	0,200	0,6547	-	-
Bat	7	0	5	5,000	0,0253	1	1	0,000	1,0000	-	-
baT	62	20	12	2,000	0,1573	16	14	0,133	0,7150	0,224	0,6359
BaT	8	2	2	0,000	1,0000	2	2	0,000	1,0000	-	-
ETDT:		df=7 p=0,1046				df=7 p=0,1483				p=0,5247 df=7	

Tab. 13: Transmission von VDR – Konditionierung für das Erkrankungsalter (Teil A)

		Alter bei Erstdiagnose größer 8 Jahre (61)				Alter bei Erstdiagnose kleinergleich 8 Jahre (63)				höheres gg. niedriges Alter bei Erstdiagnose	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ²	p=
fat	4	2	1	0,333	0,5637	0	1	1,000	0,3173	-	-
FAT	40	9	12	0,429	0,5127	9	10	0,053	0,8185	0,001	0,9748
FAt	46	12	7	1,316	0,2513	13	14	0,037	0,8474	0,498	0,4804
fAT	16	1	3	1,000	0,3173	4	8	1,333	0,2482	-	-
fAt	33	6	10	1,000	0,3173	9	8	0,059	0,8084	0,292	0,5888
Fat	12	1	7	4,500	0,0339	1	3	1,000	0,3173	-	-
faT	40	12	12	0,000	1,0000	6	10	1,000	0,3173	0,206	0,6498
FaT	59	22	13	2,314	0,1282	18	6	6,000	0,0143	0,486	0,4858
ETDT:		df=7 p=0,2208				df=7 p=0,0706				p=0,6640 df=7	
fbt	6	2	2	0,000	1,0000	0	2	2,000	0,1573	-	-
FBT	17	3	7	1,600	0,2059	5	2	1,286	0,2568	-	-
FBt	52	13	11	0,167	0,6831	14	14	0,000	1,0000	0,001	0,9822
fBt	31	6	9	0,600	0,4386	9	7	0,250	0,6171	0,297	0,5856
fBT	6	2	1	0,333	0,5637	0	3	3,000	0,0833	-	-
Fbt	13	2	4	0,667	0,4142	2	5	1,286	0,2568	-	-
fbT	53	12	15	0,333	0,5637	11	15	0,615	0,4328	0,015	0,9042
FbT	68	22	13	2,314	0,1282	20	13	1,485	0,2230	0,004	0,9528
ETDT:		df=7 p=0,6257				df=7 p=0,0950				p=0,1971 df=7	
fba	42	14	12	0,154	0,6949	6	10	1,000	0,3173	0,507	0,4765
FBA	52	12	10	0,182	0,6698	15	15	0,000	1,0000	0,002	0,9652
fBA	35	8	9	0,059	0,8084	9	9	0,000	1,0000	0,027	0,8695
FbA	42	10	10	0,000	1,0000	11	11	0,000	1,0000	0,096	0,7573
fbA	18	0	5	5,000	0,0253	5	8	0,692	0,4054	-	-
fBa	2	0	1	1,000	0,3173	0	1	1,000	0,3173	-	-
Fba	55	20	13	1,485	0,2230	14	8	1,636	0,2008	0,003	0,9549
FBa	12	2	6	2,000	0,1573	3	1	1,000	0,3173	-	-
ETDT:		df=7 p=0,1137				df=7 p=0,7215				p=0,7781 df=7	

Tab. 13: Transmission von VDR – Konditionierung für das Erkrankungsalter (Teil B)

		Alter bei Erstdiagnose größer 8 Jahre (61)				Alter bei Erstdiagnose kleinergleich 8 Jahre (63)				höheres gg. niedriges Alter bei Erstdiagnose	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ ETDT- Differenztest	p=
at	14	3	8	2,273	0,1317	0	3	3,000	0,0833	-	-
AT	54	9	17	2,462	0,1167	10	18	2,286	0,1306	0,040	0,8409
aT	68	21	13	1,882	0,1701	19	15	0,471	0,4927	0,061	0,8054
At	62	16	11	0,926	0,3359	21	14	1,400	0,2367	0,041	0,8397
ETDT:		df=3 p=0,0909				df=3 p=0,0659				p=0,6410 df=3	
fa	44	14	13	0,037	0,8474	6	11	1,471	0,2253	0,582	0,4454
FA	68	16	14	0,133	0,7150	18	20	0,105	0,7456	0,060	0,8071
fA	47	7	13	1,800	0,1797	12	15	0,333	0,5637	0,124	0,7251
Fa	65	20	17	0,243	0,6219	19	9	3,571	0,0588	0,756	0,3847
ETDT:		df=3 p=0,5999				df=3 p=0,2454				p=0,4890 df=3	
ba	67	21	13	1,882	0,1701	16	17	0,030	0,8618	0,718	0,3969
BA	70	16	15	0,032	0,8575	20	19	0,026	0,8728	0,046	0,8311
bA	64	13	17	0,533	0,4652	17	17	0,000	1,0000	0,080	0,7777
Ba	15	2	7	2,778	0,0956	3	3	0,000	1,0000	-	-
ETDT:		df=3 p=0,2362				df=3 p=0,9981				p=0,5711 df=3	
fb	57	13	16	0,310	0,5775	11	17	1,286	0,2568	0,024	0,8766
FB	64	14	16	0,133	0,7150	18	16	0,118	0,7316	0,063	0,8023
Fb	78	23	16	1,256	0,2623	22	17	0,641	0,4233	0,000	1,0000
fB	37	8	10	0,222	0,6374	9	10	0,053	0,8185	0,023	0,8795
ETDT:		df=3 p=0,7211				df=3 p=0,6793				p=0,9243 df=3	
bt	21	6	6	0,000	1,0000	3	6	1,000	0,3173	-	-
BT	28	4	9	1,923	0,1655	5	10	1,667	0,1967	-	-
bT	69	19	15	0,471	0,4927	18	17	0,029	0,8658	0,017	0,8969
Bt	66	16	15	0,032	0,8575	21	14	1,400	0,2367	0,191	0,6623
ETDT:		df=3 p=0,5450				df=3 p=0,2116				p=0,7366 df=3	

Tab. 13: Transmission von VDR – Konditionierung für das Erkrankungsalter (Teil C)

		Alter bei Erstmanifestation größer 8 Jahre (61)				Alter bei Erstmanifestation kleinergleich 8 Jahre (63)				höheres gg. niedriges Alter bei Erstmanifestation	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmitiert	Nicht Transmitiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmitiert	Nicht Transmitiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ETDT-Differenztest	p=
		FT	80	23	19	0,381	0,5371	24	14		
ft	39	9	11	0,200	0,6547	10	9	0,053	0,8185	0,024	0,8759
Ft	56	13	13	0,000	1,0000	13	17	0,533	0,4652	0,053	0,8179
fT	55	13	15	0,143	0,7055	10	17	1,815	0,1779	0,187	0,6654
ETDT:		df=3 p=0,9221				df=3 p=0,3514				p=0,7810 df=3	
A	72	16	19	0,257	0,6121	18	19	0,027	0,8694	0,000	0,9887
a	72	19	16	0,257	0,6121	19	18	0,027	0,8694	0,000	0,9887
B	79	16	20	0,444	0,5050	22	21	0,023	0,8788	0,136	0,7120
b	79	20	16	0,444	0,5050	21	22	0,023	0,8788	0,136	0,7120
F	80	22	18	0,400	0,5271	22	18	0,400	0,5271	0,051	0,8222
f	80	18	22	0,400	0,5271	18	22	0,400	0,5271	0,051	0,8222
T	77	17	20	0,243	0,6219	19	21	0,100	0,7518	0,009	0,9265
t	77	20	17	0,243	0,6219	21	19	0,100	0,7518	0,009	0,9265

Tab. 13: Transmission von VDR – Konditionierung für das Erkrankungsalter (Teil D)

Alter bei Erkrankungsbeginn

Das Patientenkollektiv wurde auch für das Erkrankungsalter konditioniert (siehe Tabelle 13, Teile A-D). Die Einteilung erfolgte in zwei Gruppen nach niedrigem (≤ 8 Jahre; 63 Fälle) und höherem (> 8 Jahre; 61 Fälle) Alter bei Erstmanifestation des Typ 1 Diabetes mellitus. Bei 37 Patienten konnte das Erkrankungsalter nicht ermittelt werden. Sie wurden folglich von der obigen Analyse ausgeschlossen.

Keiner der einzelnen Polymorphismen wurde bevorzugt an Patienten mit niedrigem oder höherem Erkrankungsalter vererbt und es bestanden keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen: „F“ (Chi²-Test: p=0,8222) , „B“ (Chi²-Test: p=0,7120) , „A“ (Chi²-Test: p=0,9887) und „T“ (Chi²-Test: p=0,9265). Für keinen der 2- und 3-Locus-Haplotypen fand sich eine signifikante Abweichung zwischen beiden Gruppen. Eine Auswertung der 4-Locus-Haplotypen *FokI/ BsmI/ ApaI/ TaqI* war aufgrund der zu geringen Fallzahlen nicht möglich.

		Maternale Haplotypen				Paternale Haplotypen				Maternale gg. paternale Haplotypen	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ ETDI-Differenztest	p=
FBAT	13	4	3	0,143	0,7055	1	5	2,667	0,1025	-	-
FBA t	61	17	11	1,286	0,2568	22	11	3,667	0,0555	0,046	0,8298
fBAT	7	1	1	0,000	1,0000	2	3	0,200	0,6547	-	-
FbAT	38	9	11	0,200	0,6547	8	10	0,222	0,6374	0,085	0,7701
FBaT	10	2	1	0,333	0,5637	5	2	1,286	0,2568	-	-
FbaT	60	21	13	1,882	0,1701	16	10	1,385	0,2393	0,063	0,8026
FBat	6	0	1	1,000	0,3173	1	4	1,800	0,1797	-	-
fBaT	1	0	1	1,000	0,3173	0	0	-	-	-	-
fBa t	35	11	8	0,474	0,4913	7	9	0,250	0,6171	0,245	0,6208
Fba t	8	0	2	2,000	0,1573	3	3	0,000	1,0000	-	-
fbAT	18	3	6	1,000	0,3173	2	7	2,778	0,0956	-	-
fbaT	55	13	21	1,882	0,1701	12	9	0,429	0,5127	1,187	0,2760
Fbat	7	1	3	1,000	0,3173	0	3	3,000	0,0833	-	-
fBat	2	1	1	0,000	1,0000	0	0	-	-	-	-
fbAt	4	0	1	1,000	0,3173	0	3	3,000	0,0833	-	-
fbat	3	1	0	1,000	0,3173	1	1	0,000	1,0000	-	-
ETDT:				-	-			-	-	-	-
BAT	23	5	6	0,091	0,7630	2	10	5,333	0,0209	-	-
bat	11	2	4	0,667	0,4142	1	4	1,800	0,1797	-	-
BAt	78	30	15	5,000	0,0253	21	12	2,455	0,1172	0,001	0,9702
bAT	59	13	20	1,485	0,2230	10	16	1,385	0,2393	0,038	0,8446
bAt	13	2	3	0,200	0,6547	4	4	0,000	1,0000	-	-
Bat	9	1	3	1,000	0,3173	1	4	1,800	0,1797	-	-
baT	81	26	27	0,019	0,8907	18	10	2,286	0,1306	1,154	0,2828
BaT	12	2	3	0,200	0,6547	5	2	1,286	0,2568	-	-
ETDT:		df=7		p=0,3673		df=7		p=0,0028		p=0,3418	df=7

Tab. 14: Transmission von VDR – Konditionierung für mütterliche und väterliche Transmission (Teil A)

		Maternale Haplotypen				Paternale Haplotypen				Maternale gg. paternale Haplotypen	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ ETDI-Differenztest	p=
fat	5	2	1	0,333	0,5637	1	1	0,000	1,0000	-	-
FAT	46	12	14	0,154	0,6949	7	13	1,800	0,1797	0,211	0,6458
FAt	64	17	13	0,533	0,4652	22	12	2,941	0,0863	0,161	0,6883
fAT	21	4	7	0,818	0,3657	2	8	3,600	0,0578	-	-
fAt	39	11	9	0,200	0,6547	7	12	1,316	0,2513	0,665	0,4147
Fat	13	1	5	2,667	0,1025	1	6	3,571	0,0588	-	-
faT	57	13	22	2,314	0,1282	13	9	0,727	0,3938	1,813	0,1781
FaT	71	25	14	3,103	0,0782	20	12	2,000	0,1573	0,012	0,9139
ETDT:		df=7 p=0,1918				df=7 p=0,0070				p=0,3218 df=7	
fbt	7	1	1	0,000	1,0000	1	4	1,800	0,1797	-	-
FBT	24	6	4	0,400	0,5271	6	8	0,286	0,5930	0,171	0,6789
FBt	68	17	13	0,533	0,4652	24	14	2,632	0,1048	0,086	0,7691
fBt	37	12	9	0,429	0,5127	7	9	0,250	0,6171	0,226	0,6344
fBT	8	1	2	0,333	0,5637	2	3	0,200	0,6547	-	-
Fbt	16	1	5	2,667	0,1025	3	7	1,600	0,2059	-	-
fbT	72	17	27	2,273	0,1317	13	15	0,143	0,7055	0,167	0,6828
FbT	78	24	18	0,857	0,3545	20	16	0,444	0,5050	0,008	0,9296
ETDT:		df=7 p=0,5351				df=7 p=0,3126				p=0,8955 df=7	
fba	60	14	21	1,400	0,2367	15	10	1,000	0,3173	1,604	0,2054
FBA	67	21	13	1,882	0,1701	19	14	0,758	0,3841	0,010	0,9199
fBA	42	12	9	0,429	0,5127	9	12	0,429	0,5127	0,381	0,5371
FbA	47	9	13	0,727	0,3938	12	13	0,040	0,8415	0,038	0,8462
fbA	22	3	7	1,600	0,2059	2	10	5,333	0,0209	-	-
fBa	3	1	2	0,333	0,5637	0	0	-	-	-	-
Fba	65	22	16	0,947	0,3304	14	13	0,037	0,8474	0,053	0,8183
FBa	16	2	3	0,200	0,6547	6	5	0,091	0,7630	-	-
ETDT:		df=7 p=0,5255				df=7 p=0,2158				p=0,5869 df=7	

Tab. 14: Transmission von VDR – Konditionierung für mütterliche und väterliche Transmission (Teil B)

		Maternale Haplotypen				Paternale Haplotypen				Maternale gg. paternale Haplotypen	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ ETTD-Differenztest	p=
at	17	3	7	1,600	0,2059	1	6	3,571	0,0588	-	-
AT	63	14	23	2,189	0,1390	6	20	7,538	0,0060	0,930	0,3349
aT	88	27	28	0,018	0,8927	23	10	5,121	0,0236	2,779	0,0955
At	82	30	16	4,261	0,0390	21	15	1,000	0,3173	0,167	0,6829
ETDT:		df=3 p=0,0744				df=3 p=0,0004				p=0,1625 df=3	
fa	64	15	23	1,684	0,1944	16	10	1,385	0,2393	2,191	0,1388
FA	91	28	24	0,308	0,5791	21	18	0,231	0,6310	0,045	0,8318
fA	58	14	15	0,034	0,8527	9	20	4,172	0,0411	1,153	0,2830
Fa	79	23	18	0,610	0,4349	20	18	0,105	0,7456	0,007	0,9338
ETDT:		df=3 p=0,5815				df=3 p=0,1138				p=0,2042 df=3	
ba	88	26	30	0,286	0,5930	19	13	1,125	0,2888	0,897	0,3436
BA	90	32	17	4,592	0,0321	20	21	0,024	0,8759	1,867	0,1718
bA	74	15	23	1,684	0,1944	15	21	1,000	0,3173	0,002	0,9643
Ba	20	3	6	1,000	0,3173	6	5	0,091	0,7630	-	-
ETDT:		df=3 p=0,1051				df=3 p=0,6524				p=0,3061 df=3	
fb	78	18	28	2,174	0,1404	14	18	0,500	0,4795	0,030	0,8618
FB	84	23	16	1,256	0,2623	26	19	1,089	0,2967	0,012	0,9117
Fb	91	23	23	0,000	1,0000	23	22	0,022	0,8815	0,011	0,9172
fB	45	13	10	0,391	0,5316	9	13	0,727	0,3938	0,561	0,4538
ETDT:		df=3 p=0,4407				df=3 p=0,6379				p=0,8726 df=3	
bt	26	4	7	0,818	0,3657	5	10	1,667	0,1967	-	-
BT	36	7	9	0,250	0,6171	7	13	1,800	0,1797	0,037	0,8485
bT	93	22	30	1,231	0,2673	22	19	0,220	0,6394	0,773	0,3792
Bt	85	31	18	3,449	0,0633	22	14	1,778	0,1824	0,001	0,9805
ETDT:		df=3 p=0,2638				df=3 p=0,0785				p=0,7497 df=3	

Tab. 14: Transmission von VDR – Konditionierung für mütterliche und väterliche Transmission (Teil C)

		Maternale Haplotypen				Paternale Haplotypen				Maternale gg. paternale Haplotypen	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ ETDT-Differenztest	p=
FT	98	29	24	0,472	0,4922	24	21	0,200	0,6547	0,004	0,9471
ft	47	16	10	1,385	0,2393	8	13	1,190	0,2752	1,703	0,1919
Ft	76	17	18	0,029	0,8658	23	18	0,610	0,4349	0,180	0,6712
fT	73	18	28	2,174	0,1404	12	15	0,333	0,5637	0,040	0,8421
ETDT:		df=3 p=0,3162				df=3 p=0,5443				p=0,4007 df=3	
A	97	34	27	0,803	0,3701	14	22	1,778	0,1824	1,941	0,1635
a	97	27	34	0,803	0,3701	22	14	1,778	0,1824	1,941	0,1635
B	105	34	22	2,571	0,1088	25	24	0,020	0,8864	0,643	0,4227
b	105	22	34	2,571	0,1088	24	25	0,020	0,8864	0,643	0,4227
F	105	32	27	0,424	0,5151	26	20	0,783	0,3763	0,001	0,9712
f	105	27	32	0,424	0,5151	20	26	0,783	0,3763	0,001	0,9712
T	97	21	33	2,667	0,1025	20	23	0,209	0,6473	0,300	0,5836
t	97	33	21	2,667	0,1025	23	20	0,209	0,6473	0,300	0,5836

Tab. 14: Transmission von VDR – Konditionierung für mütterliche und väterliche Transmission (Teil D)

Mütterliche und väterliche Transmission

Der Vergleich der maternal vererbten Haplotypen mit den vom Vater transmittierten Haplotypen ergab keine Unterschiede für „F“ (Chi²-Test: p=0,9712), „B“ (Chi²-Test: p=0,4227) und „T“ (Chi²-Test: p=0,5836). Das Allel „A“ wurde von Müttern häufiger als erwartet an die Patienten vererbt (in 34 von 61 Fällen). Von Vätern hingegen wurde es seltener als erwartet (in 14 von 36 Fällen) an die Patienten transmittiert. Das Ergebnis des Chi²-Tests blieb dennoch nicht-signifikant (p=0,1635).

Auch die Analyse der von *ApaI* abgeleiteten 2-Locus-Haplotypen ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen mütterlicher und väterlicher Transmission: *ApaI/TaqI* (ETDT-Differenztest: p=0,1625), *BsmI/ApaI* (ETDT-Differenztest: p=0,3061) und *FokI/ApaI* (ETDT-Differenztest: p=0,2042). Erwartungsgemäß verbesserte auch die Hinzunahme eines dritten Locus die Aussagekraft der Analyse nicht. Die Fallzahlen der 4-Locus-Haplotypen waren –wie auch bei der Konditionierung zuvor– für eine Auswertung zu gering (siehe Tabelle 14, Teile A-D).

		hohes Risiko (56)				mittleres Risiko (69)				niedriges Risiko (19)				hoch zu mittel		hoch zu mittel + niedrig	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ETDT-Differenztest	p=	Chi ² -Test/ETDT-Differenztest	p=
FBAT	12	2	6	2,000	0,1573	2	2	0,000	1,0000	0	0	-	-	-	-	-	-
FBA ^t	58	13	13	0,000	1,0000	21	7	7,000	0,0082	2	2	0,000	1,0000	2,621	0,1055	2,061	0,1512
fBAT	7	1	0	1,000	0,3173	1	3	1,000	0,3173	1	1	0,000	1,0000	-	-	-	-
FbAT	36	8	8	0,000	1,0000	5	8	0,692	0,4054	3	4	0,143	0,7055	0,061	0,8057	0,069	0,7929
FbaT	9	2	1	0,333	0,5637	1	2	0,333	0,5637	3	0	3,000	0,0833	-	-	-	-
Fba ^t	57	14	9	1,087	0,2971	16	9	1,960	0,1615	7	2	2,778	0,0956	0,006	0,9403	0,059	0,8079
FBA ^t	6	0	2	2,000	0,1573	1	2	0,333	0,5637	0	1	1,000	0,3173	-	-	-	-
fBA ^t	1	0	0	-	-	0	1	1,000	0,3173	0	0	-	-	-	-	-	-
fBaT	32	8	5	0,692	0,4054	5	10	1,667	0,1967	2	2	0,000	1,0000	1,238	0,2659	1,029	0,3104
FbA ^t	7	0	1	1,000	0,3173	1	3	1,000	0,3173	2	0	2,000	0,1573	-	-	-	-
fBa ^t	16	2	4	0,667	0,4142	3	6	1,000	0,3173	0	1	1,000	0,3173	-	-	-	-
fbaT	49	9	6	0,600	0,4386	11	13	0,167	0,6831	3	7	1,600	0,2059	0,283	0,5948	0,821	0,3648
Fba ^t	7	0	3	3,000	0,0833	1	2	0,333	0,5637	0	1	1,000	0,3173	-	-	-	-
fBa ^t	2	0	0	-	-	1	1	0,000	1,0000	0	0	-	-	-	-	-	-
fBa ^t	4	0	2	2,000	0,1573	0	0	-	-	0	2	2,000	0,1573	-	-	-	-
fba ^t	3	1	0	1,000	0,3173	1	1	0,000	1,0000	0	0	-	-	-	-	-	-
ETDT:				-	-			-	-			-	-	-	-	-	-
BAT	21	2	8	3,600	0,0578	2	7	2,778	0,0956	1	1	0,000	1,0000	-	-	-	-
ba ^t	11	1	3	1,000	0,3173	2	4	0,667	0,4142	0	1	1,000	0,3173	-	-	-	-
BA ^t	73	18	10	2,286	0,1306	25	12	4,568	0,0326	4	4	0,000	1,0000	0,000	0,9920	0,056	0,8123
bAT	55	11	13	0,167	0,6831	8	15	2,130	0,1444	3	5	0,500	0,4795	0,225	0,6352	0,250	0,6174
bA ^t	13	2	3	0,200	0,6547	3	3	0,000	1,0000	1	1	0,000	1,0000	-	-	-	-
Ba ^t	8	0	3	3,000	0,0833	2	2	0,000	1,0000	0	1	1,000	0,3173	-	-	-	-
ba ^T	74	18	12	1,200	0,2733	16	13	0,310	0,5775	8	7	0,067	0,7963	0,013	0,9110	0,051	0,8212
Ba ^T	11	2	2	0,000	1,0000	1	3	1,000	0,3173	3	0	3,000	0,0833	-	-	-	-
ETDT:		df=7	p=0,0685			df=7	p=0,1238			df=7	p=0,3628			p=0,8069		p=0,7640	
														df=7		df=7	

Tab. 15: Transmission von VDR – Konditionierung für HLA-DR/DQ-Haplotypen (Teil A)

		hohes Risiko (56)				mittleres Risiko (69)				niedriges Risiko (19)				hoch zu mittel		hoch zu mittel + niedrig	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ ETDT-Differenztest	p=	Chi ² -Test/ ETDT-Differenztest	p=
fat	5	1	0	1,000	0,3173	2	2	0,000	1,0000	0	0	-	-	-	-	-	-
FAT	41	7	12	1,316	0,2513	5	10	1,667	0,1967	3	4	0,143	0,7055	0,022	0,8818	0,086	0,7692
FAt	60	13	14	0,037	0,8474	19	8	4,481	0,0343	4	2	0,667	0,4142	1,918	0,1661	1,278	0,2584
fAT	19	3	4	0,143	0,7055	2	7	2,778	0,0956	1	2	0,333	0,5637	-	-	-	-
fAt	38	9	7	0,250	0,6171	6	10	1,000	0,3173	2	4	0,667	0,4142	0,502	0,4786	0,787	0,3752
Fat	13	0	5	5,000	0,0253	2	4	0,667	0,4142	0	2	2,000	0,1573	-	-	-	-
fAT	50	9	6	0,600	0,4386	11	14	0,360	0,5485	3	7	1,600	0,2059	0,427	0,5136	0,982	0,3218
FaT	68	16	10	1,385	0,2393	19	11	2,133	0,1441	10	2	5,333	0,0209	0,019	0,8901	0,139	0,7097
ETDT:		df=7 p=0,0735				df=7 p=0,1374				df=7 p=0,2274				p=0,0621 df=7		p=0,1543 df=7	
fbt	7	1	2	0,333	0,5637	1	1	0,000	1,0000	0	2	2,000	0,1573	-	-	-	-
FbT	22	4	8	1,333	0,2482	3	4	0,143	0,7055	3	0	3,000	0,0833	-	-	-	-
FBt	65	13	16	0,310	0,5775	23	8	7,258	0,0071	2	3	0,200	0,6547	4,230	0,0397	3,058	0,0803
fBT	36	9	5	1,143	0,2850	7	11	0,889	0,3458	2	2	0,000	1,0000	1,143	0,2850	1,052	0,3051
fBT	8	1	0	1,000	0,3173	1	4	1,800	0,1797	1	1	0,000	1,0000	-	-	-	-
Fbt	15	0	5	5,000	0,0253	2	5	1,286	0,2568	2	1	0,333	0,5637	-	-	-	-
fbT	65	12	10	0,182	0,6698	13	19	1,125	0,2888	3	8	2,273	0,1317	0,533	0,4652	1,147	0,2842
FbT	76	21	15	1,000	0,3173	16	14	0,133	0,7150	7	3	1,600	0,2059	0,025	0,8741	0,025	0,8736
ETDT:		df=7 p=0,0600				df=7 p=0,1482				df=7 p=0,2031				p=0,0903 df=7		p=0,0412 df=7	
fba	52	10	6	1,000	0,3173	12	14	0,154	0,6949	3	7	1,600	0,2059	0,507	0,4765	1,182	0,2770
FBA	63	12	16	0,571	0,4497	22	9	5,452	0,0196	2	2	0,000	1,0000	3,679	0,0551	3,216	0,0729
fBA	40	10	5	1,667	0,1967	6	13	2,579	0,1083	3	3	0,000	1,0000	2,854	0,0912	2,413	0,1204
FbA	44	8	9	0,059	0,8084	7	11	0,889	0,3458	5	4	0,111	0,7389	0,021	0,8837	0,020	0,8875
fbA	20	2	6	2,000	0,1573	3	6	1,000	0,3173	0	3	3,000	0,0833	-	-	-	-
fBa	3	0	0	-	-	1	2	0,333	0,5637	0	0	-	-	-	-	-	-
Fba	60	14	12	0,154	0,6949	16	10	1,385	0,2393	6	2	2,000	0,1573	0,079	0,7789	0,342	0,5586
FBA	14	2	4	0,667	0,4142	1	3	1,000	0,3173	3	1	1,000	0,3173	-	-	-	-
ETDT:		df=7 p=0,4902				df=7 p=0,0911				df=7 p=0,2914				p=0,1552 df=7		p=0,1276 df=7	

Tab. 15: Transmission von VDR – Konditionierung für HLA-DR/DQ-Haplotypen (Teil B)

		hohes R isiko (56)				m ittleres R isiko (69)				niedriges R isiko (19)				hoch zu m ittel		hoch zu m ittel + niedrig	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ETDT-Differenztest	p=	Chi ² -Test/ETDT-Differenztest	p=
at	17	1	6	3,571	0,0588	3	5	0,500	0,4795	0	2	2,000	0,1573	-	-	-	-
AT	59	10	18	2,286	0,1306	6	19	6,760	0,0093	2	4	0,667	0,4142	0,394	0,5302	0,294	0,5877
aT	75	20	14	1,059	0,3035	18	15	0,273	0,6015	4	4	0,000	1,0000	0,011	0,9150	0,046	0,8298
At	81	20	13	1,485	0,2230	24	12	4,000	0,0455	8	4	1,333	0,2482	0,074	0,7852	0,105	0,7465
ETDT:		df=3 p=0,0451				df=3 p=0,0161				df=3 p=0,3201				p=0,6234 df=3		p=0,7688 df=3	
fa	56	11	6	1,471	0,2253	13	16	0,310	0,5775	3	7	1,600	0,2059	0,994	0,3188	1,795	0,1803
FA	83	16	21	0,676	0,4111	21	14	1,400	0,2367	6	5	0,091	0,7630	1,407	0,2356	1,391	0,2382
fA	56	11	10	0,048	0,8273	8	18	3,846	0,0499	3	6	1,000	0,3173	1,445	0,2293	1,617	0,2035
Fa	75	15	16	0,032	0,8575	19	13	1,125	0,2888	9	3	3,000	0,0833	0,387	0,5339	1,162	0,2811
ETDT:		df=3 p=0,6425				df=3 p=0,1431				df=3 p=0,2454				p=0,1580 df=3		p=0,0795 df=3	
ba	79	19	15	0,471	0,4927	16	15	0,032	0,8575	7	7	0,000	1,0000	0,009	0,9236	0,037	0,8469
BA	84	15	13	0,143	0,7055	27	19	1,391	0,2382	5	5	0,000	1,0000	0,036	0,8495	0,006	0,9383
bA	68	13	16	0,310	0,5775	11	18	1,690	0,1936	4	6	0,400	0,5271	0,071	0,7897	0,078	0,7807
Ba	19	2	5	1,286	0,2568	3	5	0,500	0,4795	3	1	1,000	0,3173	-	-	-	-
ETDT:		df=3 p=0,5655				df=3 p=0,4173				df=3 p=0,6629				p=0,9662 df=3		p=0,8335 df=3	
fb	70	12	11	0,043	0,8348	14	20	1,059	0,3035	3	10	3,769	0,0522	0,299	0,5845	1,037	0,3085
FB	78	14	21	1,400	0,2367	24	11	4,829	0,0280	5	3	0,500	0,4795	4,663	0,0308	4,817	0,0282
Fb	84	19	18	0,027	0,8694	18	18	0,000	1,0000	8	3	2,273	0,1317	0,014	0,9055	0,020	0,8873
fB	44	10	5	1,667	0,1967	8	15	2,130	0,1444	3	3	0,000	1,0000	2,534	0,1114	2,222	0,1361
ETDT:		df=3 p=0,5566				df=3 p=0,0778				df=3 p=0,1990				p=0,0464 df=3		p=0,0387 df=3	
bt	24	2	7	2,778	0,0956	5	7	0,333	0,5637	1	2	0,333	0,5637	-	-	-	-
BT	34	4	10	2,571	0,1088	4	11	3,267	0,0707	4	1	1,800	0,1797	-	-	-	-
bT	87	18	12	1,200	0,2733	18	24	0,857	0,3545	7	8	0,067	0,7963	1,429	0,2320	1,454	0,2280
Bt	81	17	12	0,862	0,3532	29	14	5,233	0,0222	4	5	0,111	0,7389	0,264	0,6071	0,037	0,8483
ETDT:		df=3 p=0,0290				df=3 p=0,0513				df=3 p=0,4799				p=0,3762 df=3		p=0,2536 df=3	

Tab. 15: Transmission von VDR – Konditionierung für HLA-DR/DQ-Haplotypen (Teil C)

		hohes Risiko (56)				mittleres Risiko (69)				niedriges Risiko (19)				hoch zu mittel		hoch zu mittel + niedrig	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ ETDT-Differenztest	p=	Chi ² -Test/ ETDT-Differenztest	p=
		FT	94	22	20	0,095	0,7576	20	18	0,105	0,7456	10	4	2,571	0,1088	0,041	0,8401
ft	45	10	7	0,529	0,4669	8	12	0,800	0,3711	4	4	0,000	1,0000	0,659	0,4170	0,535	0,4646
Ft	72	12	20	2,000	0,1573	21	10	3,903	0,0482	4	5	0,111	0,7389	4,625	0,0315	3,503	0,0612
fT	67	13	10	0,391	0,5316	11	20	2,613	0,1060	4	9	1,923	0,1655	1,591	0,2071	2,270	0,1319
ETDT:		df=3 p=0,5168				df=3 p=0,1384				df=3 p=0,3857				p=0,0710 df=3		p=0,0903 df=3	
A	87	20	21	0,024	0,8759	18	18	0,000	1,0000	4	6	0,400	0,5271	0,015	0,9032	0,016	0,8997
a	87	21	20	0,024	0,8759	18	18	0,000	1,0000	6	4	0,400	0,5271	0,015	0,9032	0,016	0,8997
B	97	15	17	0,125	0,7237	29	22	0,961	0,3270	8	6	0,286	0,5930	0,438	0,5083	0,513	0,4737
b	97	17	15	0,125	0,7237	22	29	0,961	0,3270	6	8	0,286	0,5930	0,438	0,5083	0,513	0,4737
F	97	15	22	1,324	0,2498	28	15	3,930	0,0474	11	6	1,471	0,2253	3,894	0,0485	4,601	0,0319
f	97	22	15	1,324	0,2498	15	28	3,930	0,0474	6	11	1,471	0,2253	3,894	0,0485	4,601	0,0319
T	91	18	19	0,027	0,8694	15	28	3,930	0,0474	6	5	0,091	0,7630	1,039	0,3081	0,502	0,4787
t	91	19	18	0,027	0,8694	28	15	3,930	0,0474	5	6	0,091	0,7630	1,039	0,3081	0,502	0,4787

Tab. 15: Transmission von VDR – Konditionierung für HLA-DR/DQ-Haplotypen (Teil D)

HLA

Die erweiterten HLA-DR/DQ-Haplotypen waren von 144 Patienten verfügbar. 69 Patienten hatten HLA-DR/DQ-Haplotypen, die ein hohes Typ 1 Diabetes-Risiko vermitteln, 56 Patienten hatten Haplotypen mittleren und 19 Patienten HLA-Haplotypen niedrigen Risikos (zur Einteilung der HLA-DR/DQ-Haplotypen siehe Kapitel 2.3.9). Von 17 Patienten waren keine HLA-DR/DQ-Haplotypen bekannt.

Für die Allele „A“ und „B“ wurde in keiner der drei HLA-Gruppen eine Abweichung von der erwarteten Transmissionshäufigkeit beobachtet. Auch zwischen den Gruppen (hohes Risiko gegenüber mittlerem Risiko sowie hohes gegenüber kombiniertem mittlerem + niedrigem Risiko) bestand kein signifikanter Unterschied. Das „T“ Allel wurde in der Gruppe mittleren HLA-Risikos (15 von 43mal vererbt; p=0,0474) signifikant seltener als erwartet vererbt, während es in der HLA-Hochrisikogruppe gleich oft vererbt und nicht vererbt wurde (18 von 37mal transmittiert; p=0,8694). Obwohl das in der Gesamtpopulation (TDT: p=0,1573) bestehende Vererbungsungleichgewicht damit ausschließlich durch die Abweichung in der Gruppe mittleren Risikos bedingt war, bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Subgruppen (hohes gegenüber mittlerem Risiko; Chi²-Test: p=0,3081).

Das „F“ Allel wurde in der Hochrisiko-Gruppe seltener (15 von 37mal; TDT: p=0,2498) und in der Gruppe mittleren Risikos signifikant häufiger (28 von 43mal; TDT: p=0,0474) als erwartet an Patienten vererbt. Hier war auch der Unterschied zwischen den Gruppen signifikant: hohes gegenüber mittlerem Risiko (Chi²-Test: p=0,0485) und hohes gegenüber mittlerem + niedrigem Risiko (Chi²-Test: p=0,0319).

Dieser Unterschied zwischen den Subgruppen ließ sich auch bei den von *FokI* abgeleiteten 2-Locus-Haplotypen beobachten: *FokI/BsmI* (ETDT-Differenztest– hohes gegenüber mittlerem Risiko: p=0,0464; hohes gegenüber mittlerem + niedrigem Risiko: p=0,0387), *FokI/ApaI* (ETDT-Differenztest– hohes gegenüber mittlerem + niedrigem Risiko: p=0,0795) und

FokI/TaqI (ETDT-Differenztest– hohes gegenüber mittlerem Risiko: $p=0,0710$). Dabei wurde die Allele „*FB*“ (Chi²-Test: $p=0,0282$) bzw. „*Ff*“ (Chi²-Test: $p=0,0315$) signifikant seltener an Patienten der HLA-Hochrisikogruppe als an Patienten mittleren und niedrigen bzw. mittleren HLA-Risikos vererbt.

Die Vererbung der 3-Locus-Haplotypen *FokI/BsmI/TaqI* differierte ebenfalls zwischen den HLA-Subgruppen. Sowohl der Unterschied zwischen den Gruppen hohen und des kombinierten mittleren + niedrigen Risikos (ETDT-Differenztest: $p=0,0412$) als auch die Differenz zwischen der Hoch- und der Niedrigrisikogruppe (ETDT-Differenztest: $p=0,0354$) waren signifikant. „*FBf*“ wurde signifikant seltener an Patienten hohen HLA-Risikos als an Patienten mittleren HLA-Risikos transmittiert (Chi²-Test: $p=0,0397$). Die Analyse der 4-Locus-Haplotypen war nicht möglich (siehe Tabelle 15, Teile A-D).

		CTLA 4 GG (22)				CTLA 4 AG (57)				CTLA 4 AA (31)				GG zu AA		GG zu AG + AA	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ ETDT-Differenztest	p=	Chi ² -Test/ ETDT-Differenztest	p=
FBAT	9	1	2	0,333	0,5637	3	2	0,200	0,6547	0	1	1,000	0,3173	-	-	-	-
FBAf	44	6	3	1,000	0,3173	12	9	0,429	0,5127	6	8	0,286	0,5930	-	-	-	-
fBAT	5	0	0	-	-	0	2	2,000	0,1573	2	1	0,333	0,5637	-	-	-	-
FbAT	30	2	1	0,333	0,5637	6	10	1,000	0,3173	5	6	0,091	0,7630	-	-	-	-
FBaT	5	0	1	1,000	0,3173	2	2	0,000	1,0000	0	0	-	-	-	-	-	-
FbaT	51	4	3	0,143	0,7055	17	10	1,815	0,1779	12	5	2,882	0,0896	-	-	-	-
FBaf	5	0	0	-	-	1	3	1,000	0,3173	0	1	1,000	0,3173	-	-	-	-
fBaT	1	0	1	1,000	0,3173	0	0	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-
fBAf	29	1	3	1,000	0,3173	6	6	0,000	1,0000	8	5	0,692	0,4054	-	-	-	-
Fbaf	6	0	0	-	-	2	2	0,000	1,0000	1	1	0,000	1,0000	-	-	-	-
fBaT	12	0	3	3,000	0,0833	3	2	0,200	0,6547	1	3	1,000	0,3173	-	-	-	-
fbaT	42	4	1	1,800	0,1797	13	10	0,391	0,5316	5	9	1,143	0,2850	-	-	-	-
Fbat	6	0	0	-	-	0	4	4,000	0,0455	1	1	0,000	1,0000	-	-	-	-
fBat	1	0	0	-	-	0	1	1,000	0,3173	0	0	-	-	-	-	-	-
fbaT	3	0	0	-	-	0	2	2,000	0,1573	0	1	1,000	0,3173	-	-	-	-
fbaf	3	0	0	-	-	1	1	0,000	1,0000	1	0	1,000	0,3173	-	-	-	-
ETDT:				-	-			-	-			-	-	-	-	-	-
BAT	18	1	2	0,333	0,5637	3	9	3,000	0,0833	1	2	0,333	0,5637	-	-	-	-
bat	10	0	1	1,000	0,3173	1	5	2,667	0,1025	2	1	0,333	0,5637	-	-	-	-
BAt	62	7	5	0,333	0,5637	20	13	1,485	0,2230	10	7	0,529	0,4669	0,127	0,7216	0,049	0,8243
bAT	41	1	3	1,000	0,3173	10	12	0,182	0,6698	6	9	0,600	0,4386	-	-	-	-
bAt	11	0	0	-	-	6	4	0,400	0,5271	0	1	1,000	0,3173	-	-	-	-
Bat	6	0	0	-	-	1	4	1,800	0,1797	0	1	1,000	0,3173	-	-	-	-
baT	60	6	2	2,000	0,1573	18	12	1,200	0,2733	12	10	0,182	0,6698	-	-	-	-
BaT	8	0	2	2,000	0,1573	2	2	0,000	1,0000	1	1	0,000	1,0000	-	-	-	-
ETDT:				-	-			df= 7	p=0,0489			df= 7	p=0,6545	-	-	-	-

Tab. 16: Transmission von VDR – Konditionierung für CTLA4 Exon 1-Genotypen (Teil A)

		CTLA4 GG (22)				CTLA4 AG (57)				CTLA4 AA (31)				GG zu AA		GG zu AG + AA	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ETDT-Differenztest	p=	Chi ² -Test/ETDT-Differenztest	p=
fat	4	0	0	-	-	1	2	0,333	0,5637	1	0	1,000	0,3173	-	-	-	-
FAT	36	3	3	0,000	1,0000	7	11	0,889	0,3458	5	7	0,333	0,5637	-	-	-	-
FAt	45	6	3	1,000	0,3173	12	10	0,182	0,6698	6	8	0,286	0,5930	-	-	-	-
fAT	13	0	3	3,000	0,0833	2	3	0,200	0,6547	2	3	0,200	0,6547	-	-	-	-
fAt	32	1	3	1,000	0,3173	6	8	0,286	0,5930	8	6	0,286	0,5930	-	-	-	-
Fat	11	0	0	-	-	1	7	4,500	0,0339	1	2	0,333	0,5637	-	-	-	-
fAT	43	4	2	0,667	0,4142	13	10	0,391	0,5316	5	9	1,143	0,2850	-	-	-	-
FaT	58	4	4	0,000	1,0000	21	12	2,455	0,1172	12	5	2,882	0,0896	-	-	-	-
ETDT:		-				df=7 p=0,1416				df=7 p=0,6580				-		-	
fbt	6	0	0	-	-	1	3	1,000	0,3173	1	1	0,000	1,0000	-	-	-	-
FBT	15	1	3	1,000	0,3173	5	4	0,111	0,7389	0	2	2,000	0,1573	-	-	-	-
FBt	50	7	3	1,600	0,2059	13	12	0,040	0,8415	6	9	0,600	0,4386	-	-	-	-
fBT	30	1	3	1,000	0,3173	6	7	0,077	0,7815	8	5	0,692	0,4054	-	-	-	-
fBT	6	0	1	1,000	0,3173	0	2	2,000	0,1573	2	1	0,333	0,5637	-	-	-	-
Fbt	13	0	0	-	-	2	7	2,778	0,0956	2	2	0,000	1,0000	-	-	-	-
fbT	52	5	4	0,111	0,7389	14	11	0,360	0,5485	6	12	2,000	0,1573	-	-	-	-
FbT	66	5	5	0,000	1,0000	20	15	0,714	0,3980	14	7	2,333	0,1266	-	-	-	-
ETDT:		-				df=7 p=0,2659				df=7 p=0,5431				-		-	
fba	45	4	1	1,800	0,1797	14	11	0,360	0,5485	6	9	0,600	0,4386	-	-	-	-
FBA	52	6	4	0,400	0,5271	14	11	0,360	0,5485	7	10	0,529	0,4669	-	-	-	-
fBA	34	1	3	1,000	0,3173	6	8	0,286	0,5930	10	6	1,000	0,3173	-	-	-	-
FbA	37	2	1	0,333	0,5637	9	12	0,429	0,5127	6	7	0,077	0,7815	-	-	-	-
fbA	15	0	3	3,000	0,0833	3	4	0,143	0,7055	1	4	1,800	0,1797	-	-	-	-
fBa	2	0	1	1,000	0,3173	0	1	1,000	0,3173	0	0	-	-	-	-	-	-
Fba	53	4	3	0,143	0,7055	16	13	0,310	0,5775	12	5	2,882	0,0896	-	-	-	-
FBa	10	0	1	1,000	0,3173	3	5	0,500	0,4795	0	1	1,000	0,3173	-	-	-	-
ETDT:		df=7 p=0,2342				df=7 p=0,8269				-				-		-	

Tab. 16: Transmission von VDR – Konditionierung für CTLA4 Exon 1-Genotypen (Teil B)

		CTLA4 GG (22)				CTLA4 AG (57)				CTLA4 AA (31)				GG zu AA		GG zu AG + AA	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ETDT-Differenztest	p=	Chi ² -Test/ETDT-Differenztest	p=
		at	14	0	1	1,000	0,3173	1	8	5,444	0,0196	2	2	0,000	1,0000	-	-
AT	46	1	4	1,800	0,1797	9	18	3,000	0,0833	5	9	1,143	0,2850	-	-	-	-
aT	66	5	3	0,500	0,4795	22	14	1,778	0,1824	12	10	0,182	0,6698	-	-	0,030	0,8616
At	64	7	5	0,333	0,5637	22	14	1,778	0,1824	9	7	0,250	0,6171	0,076	0,7828	0,060	0,8068
ETDT:		df=3 p=0,3115				df=3 p=0,0091				df=3 p=0,7313				p=0,6693 df=3		p=0,8361 df=3	
fa	47	4	2	0,667	0,4142	14	12	0,154	0,6949	6	9	0,600	0,4386	-	-	-	-
FA	63	7	4	0,818	0,3657	15	17	0,125	0,7237	8	12	0,800	0,3711	0,782	0,3765	0,703	0,4017
fA	65	1	6	3,571	0,0588	8	11	0,474	0,4913	10	9	0,053	0,8185	-	-	-	-
Fa	65	4	4	0,000	1,0000	21	18	0,231	0,6310	12	6	2,000	0,1573	-	-	-	-
ETDT:		df=3 p=0,1971				df=3 p=0,8474				df=3 p=0,5204				p=0,1576 df=3		p=0,2427 df=3	
ba	65	6	3	1,000	0,3173	19	16	0,257	0,6121	12	9	0,429	0,5127	-	-	-	-
BA	51	6	5	0,091	0,7630	20	20	0,000	1,0000	11	9	0,200	0,6547	0,125	0,7242	0,023	0,8787
bA	73	1	3	1,000	0,3173	17	16	0,030	0,8618	6	10	1,000	0,3173	-	-	-	-
Ba	13	0	2	2,000	0,1573	3	7	1,600	0,2059	0	1	1,000	0,3173	-	-	-	-
ETDT:		df=3 p=0,2493				df=3 p=0,6253				df=3 p=0,3794				p=0,9615 df=3		p=0,6014 df=3	
fb	56	5	4	0,111	0,7389	14	13	0,037	0,8474	7	13	1,800	0,1797	-	-	-	-
FB	60	7	5	0,333	0,5637	16	15	0,032	0,8575	6	11	1,471	0,2253	0,722	0,3955	0,204	0,6512
Fb	74	5	5	0,000	1,0000	21	20	0,024	0,8759	15	8	2,130	0,1444	-	-	-	-
fB	36	1	4	1,800	0,1797	6	9	0,600	0,4386	10	6	1,000	0,3173	-	-	-	-
ETDT:		df=3 p=0,5478				df=3 p=0,8939				df=3 p=0,3166				p=0,2667 df=3		p=0,4979 df=3	
bt	22	0	1	1,000	0,3173	7	10	0,529	0,4669	2	2	0,000	1,0000	-	-	-	-
BT	26	1	4	1,800	0,1797	5	12	2,882	0,0896	1	3	1,000	0,3173	-	-	-	-
bT	69	6	5	0,091	0,7630	20	14	1,059	0,3035	12	12	0,000	1,0000	0,013	0,9089	0,019	0,8918
Bt	67	8	5	0,692	0,4054	20	16	0,444	0,5050	10	8	0,222	0,6374	0,001	0,9712	0,006	0,9367
ETDT:		df=3 p=0,3458				df=3 p=0,1603				df=3 p=0,7357				p=0,7673 df=3		p=0,8358 df=3	

Tab. 16: Transmission von VDR – Konditionierung für CTLA4 Exon 1-Genotypen (Teil C)

		CTLA4 GG (22)				CTLA4 AG (57)				CTLA4 AA (31)				GG zu AA		GG zu AG + AA	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ ETDT-Differenztest	p=	Chi ² -Test/ ETDT-Differenztest	p=
		FT	78	6	8	0,286	0,5930	24	18	0,857	0,3545	13	9	0,727	0,3938	0,371	0,9462
ft	38	1	3	1,000	0,3173	8	10	0,222	0,6374	10	6	1,000	0,3173	0,619	0,8921	0,279	0,5971
Ft	54	7	3	1,600	0,2059	11	16	0,926	0,3359	7	10	0,529	0,4669	1,100	0,7771	1,727	0,1888
fT	52	5	5	0,000	1,0000	13	12	0,040	0,8415	6	11	1,471	0,2253	-	-	0,007	0,9353
ETDT:		df=3 p=0,4519				df=3 p=0,6732				df=3 p=0,5034				p=0,2635		p=0,2636 df=3	
A	72	4	5	0,111	0,7389	20	21	0,024	0,8759	10	12	0,182	0,6698	0,120	0,7291	0,032	0,8585
a	72	5	4	0,111	0,7389	21	20	0,024	0,8759	12	10	0,182	0,6698	0,120	0,7291	0,032	0,8585
B	77	5	6	0,091	0,7630	20	24	0,364	0,5465	11	11	0,000	1,0000	0,015	0,9019	0,054	0,8157
b	77	6	5	0,091	0,7630	24	20	0,364	0,5465	11	11	0,000	1,0000	0,015	0,9019	0,054	0,8157
F	73	8	5	0,692	0,4054	19	18	0,027	0,8694	12	11	0,043	0,8348	0,038	0,8462	0,116	0,7336
f	73	5	8	0,692	0,4054	18	19	0,027	0,8694	11	12	0,043	0,8348	0,038	0,8462	0,116	0,7336
T	73	5	6	0,091	0,7630	20	21	0,024	0,8759	9	12	0,429	0,5127	-	-	0,061	0,8049
t	73	6	5	0,091	0,7630	21	20	0,024	0,8759	12	9	0,429	0,5127	-	-	0,061	0,8049

Tab. 16: Transmission von VDR – Konditionierung für CTLA4 Exon 1-Genotypen (Teil D)

CTLA4

Von 110 Patienten war der CTLA4 Exon 1-Genotyp bekannt. 22 Patienten waren homozygot „GG“, 57 Patienten waren heterozygot „AG“ und 31 Patienten besaßen den CTLA4 Exon 1-Genotyp „AA“ (siehe Tabelle 16, Teile A-D).

Die Transmission der einzelnen Polymorphismen *FokI*, *BsmI*, *ApaI* und *TaqI* zeigte in keiner der drei Subgruppen eine Abweichung von den erwarteten Werten, und zwischen den CTLA4-Genotypen bestand ebenfalls kein signifikanter Unterschied. Die Analyse der 2-Locus-Haplotypen mit Hilfe des ETDT-Differenztests erbrachte ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse. Im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Subgruppenanalysen waren die Fallzahlen der CTLA4-Konditionierung deutlich geringer. Dies spiegelte sich darin wider, daß eine Auswertung der 3- und 4-Locus-Haplotypen nicht möglich war.

3.2 Polymorphismen des Vitamin D bindenden Proteins

3.2.1 Allelverteilung und Linkage Disequilibrium

Haplotyp	Absolute Häufigkeit	Relative Häufigkeit (%)	Haplotyp	Absolute Häufigkeit	Relative Häufigkeit (%)
11 1f	0	0,0	8 1f	33	6,7
11 1s	0	0,0	8 1s	263	53,0
11 2	0	0,0	8 2	137	27,6
10 1f	41	8,3	6 1f	2	0,4
10 1s	8	1,6	6 1s	11	2,2
10 2	1	0,2	6 2	0	0,0

Tab. 17: DBP – Verteilung der Haplotypen in der untersuchten Population

Innerhalb des DBP-Gens sind 3 Polymorphismen bekannt. Der *HaeIII*- und der *StyI*-Polymorphismus liegen in Exon 11 nur 12 Basenpaare auseinander. Sie konstituieren die Allele „1f“, „1s“ und „2“ (siehe Kapitel 2.3.4; Tabellen 7 + 8). Vom (TAAA)_n-Polymorphismus in Intron 8 existieren die Allele „6“, „8“, „10“ und „11“. In der hier untersuchten Population wurde das Allel „11“ nicht beobachtet. Zwischen den Exon 11- und Intron 8-Allelen bestand ein deutliches Linkage Disequilibrium, das allerdings geringer als das Linkage Disequilibrium zwischen den 3'-VDR-Polymorphismen ausgeprägt war: $D_{10_1f} = 0,0954 \pm 0,0132$; $D_{10_1s} = -0,0564 \pm 0,0109$; $D_{8_1f} = -0,0939 \pm 0,0133$ und $D_{8_1s} = 0,0554 \pm 0,0119$ [†].

87,3% der DBP-Haplotypen der untersuchten Population leiteten sich vom Allel „8“ des Intron 8-Polymorphismus ab, wohingegen die Allele „10“ (10,1%) und „6“ (2,6%) nur sehr selten auftraten. „8 1s“ machte mehr die Hälfte (53,0%) der beobachteten Haplotypen aus; es folgte „8 2“ mit einer Häufigkeit von 27,6%. Die übrigen 7 beobachteten Haplotypen konstituierten damit nur rund ein Viertel der Allele der untersuchten Population (siehe auch Tabelle 17).

[†] Wie in Kapitel 2.3.10 angesprochen ist zur Beschreibung bei multiallelischen Markern mehr als ein Linkage Disequilibrium (D) nötig. Im obigen Fall (zwei tri-allelische Marker) benötigt man vier D-Werte. Die übrigen Werte ergeben sich aus der Auflösung der Gleichungssysteme (in diesem Fall 2 Gleichungssysteme mit je 3 Unbekannten). Neben den 2 angegebenen D-Werten ermöglicht die Tatsache, daß die Summe der Allelhäufigkeiten „1“ ergibt, die Berechnung jedes weiteren Linkage Disequilibriums.

3.2.2 Vererbung an Patienten

		Vererbung an Patienten (161)				Vererbung an gesunde Geschwister (94)				Patienten zu Geschwister	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ ETDT-Differenztest	p=
10 1f	44	11	16	0,926	0,3359	10	7	0,529	0,4669	0,739	0,3901
10 1s	9	2	6	2,000	0,1573	0	1	1,000	0,3173	-	-
10 2	2	0	1	1,000	0,3173	0	1	1,000	0,3173	-	-
8 1f	37	7	15	2,909	0,0881	6	9	0,600	0,4386	0,026	0,8719
8 1s	146	49	44	0,269	0,6041	28	25	0,170	0,6803	0,024	0,8761
8 2	114	45	37	0,780	0,3770	16	16	0,000	1,0000	0,068	0,7947
6 1f	4	2	0	2,000	0,1573	0	2	2,000	0,1573	-	-
6 1s	17	7	4	0,818	0,3657	3	3	0,000	1,0000	-	-
6 2	1	0	0	-	-	1	0	1,000	0,3173	-	-
ETDT:		df=8 p=0,1059				df=8 p=0,4263				p=0,3551 df=8	
10	59	14	22	1,778	0,1824	11	12	0,043	0,8348	0,166	0,6837
8	73	24	21	0,200	0,6547	15	13	0,143	0,7055	0,049	0,8248
6	22	9	4	1,923	0,1655	4	5	0,111	0,7389	-	-
ETDT:		df=2 p=0,1773				df=2 p=0,9150				p=0,4218 df=2	
1f	87	25	29	0,296	0,5862	16	17	0,030	0,8618	0,001	0,9822
1s	164	55	54	0,009	0,9237	28	27	0,018	0,8927	0,012	0,9117
2	121	46	43	0,101	0,7505	16	16	0,000	1,0000	0,002	0,9662
ETDT:		df=2 p=0,8594				df=2 p=0,9846				p=0,9793 df=2	

Tab. 18: Transmission von DBP an Patienten und gesunde Geschwister

Weder für die Allele des Exon 11-Polymorphismus (ETDT: p=0,8594) noch für die Allele des Intron 8-Polymorphismus (ETDT: p=0,1773) bestand ein signifikantes Vererbungsungleichgewicht. Die Betrachtung der kombinierten Intron 8-Exon 11-Haplotypen verbesserte die Aussagekraft der Analyse geringfügig (ETDT: p=0,1059), aber auch hier wichen die Transmissionshäufigkeiten nicht signifikant von den erwarteten Werten ab. Das Allel „8 1f“ wurde in 7 von 22 Fällen seines Auftretens vererbt (TDT: p=0,0881).

3.2.3 Vererbung an gesunde Geschwister

Die Vererbung der DBP-Haplotypen an gesunde Geschwister wich in keinem Fall signifikant von der erwarteten Häufigkeit ab (ETDTs: $p \geq 0,4263$). Es bestand ferner kein Unterschied zur Vererbung an die Typ 1 Diabetes-Patienten (ETDT-Differenztests: $p \geq 0,3551$).

3.2.4 Konditionierungen

		weibliche Patienten (74)				männliche Patienten (87)				weiblich gegenüber männlich	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ ETDT-Differenztest	p=
10 1f	27	6	8	0,286	0,5930	5	8	0,692	0,4054	0,026	0,8731
10 1s	8	2	3	0,200	0,6547	0	3	3,000	0,0833	-	-
10 2	1	0	1	1,000	0,3173	0	0	-	-	-	-
8 1f	22	4	10	2,571	0,1088	3	5	0,500	0,4795	-	-
8 1s	92	22	24	0,087	0,7681	26	20	0,783	0,3763	0,392	0,5312
8 2	81	25	16	1,976	0,1599	20	20	0,000	1,0000	0,593	0,4411
6 1f	2	1	0	1,000	0,3173	1	0	1,000	0,3173	-	-
6 1s	11	3	1	1,000	0,3173	4	3	0,143	0,7055	-	-
6 2	0	0	0	-	-	0	0	-	-	-	-
ETDT:		-				-				-	
10	36	8	11	0,474	0,4913	6	11	1,471	0,2253	0,006	0,9393
8	45	12	12	0,000	1,0000	12	9	0,429	0,5127	0,032	0,8574
6	13	4	1	1,800	0,1797	5	3	0,500	0,4795	-	-
ETDT:		df=2 p=0,3008				df=2 p=0,4681				p=0,5964 df=2	
1f	54	11	16	0,926	0,3359	14	13	0,037	0,8474	0,298	0,5851
1s	109	25	27	0,077	0,7815	30	27	0,158	0,6911	0,080	0,7773
2	89	24	17	1,195	0,2743	22	26	0,333	0,5637	0,966	0,3257
ETDT:		df=2 p=0,4218				df=2 p=0,5907				p=0,2942 df=2	

Tab. 19: Transmission von DBP – Konditionierung für das Geschlecht der Patienten

Geschlecht der Patienten

Wie bereits für den Vitamin D Rezeptor wurde die Transmission der DBP-Haplotypen an Jungen (87 Patienten) und Mädchen (74 Patienten) miteinander verglichen. Für keines der untersuchten Allele bestand in einer der beiden Gruppen ein signifikantes Vererbungsungleichgewicht. Weder die Transmission der Intron 8-Allele (ETDT-Differenztest: $p=0,5964$) noch die Transmission der Exon 11-Allele (ETDT-Differenztest: $p=0,2942$) unterschied sich zwischen weiblichen und männlichen Patienten. Lediglich das Exon 11-Allel „2“ wurde in der Gruppe der Mädchen häufiger (24 von 41mal transmittiert) und in der Gruppe der Jungen seltener (22 von 48mal transmittiert) als erwartet vererbt –der Unterschied war aber auch hier nicht signifikant (Chi²-Test: $p=0,3257$).

Aufgrund der zu geringen Fallzahlen war der ETDT-Vergleich der Subgruppen für die kombinierten Intron 8-Exon 11-Haplotypen nicht möglich.

		Alter bei Erstdiagnose größer 8 Jahre (61)				Alter bei Erstdiagnose kleinergleich 8 Jahre (63)				höheres gg. niedriges Alter bei Erstdiagnose	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ ETDT- Differenztest	p=
10 1f	24	6	7	0,077	0,7815	3	8	2,273	0,1317	-	-
10 1s	7	2	4	0,667	0,4142	0	1	1,000	0,3173	-	-
10 2	1	0	1	1,000	0,3173	0	0	-	-	-	-
8 1f	20	2	9	4,455	0,0348	4	5	0,111	0,7389	-	-
8 1s	80	24	18	0,857	0,3545	22	16	0,947	0,3304	0,025	0,8741
8 2	67	19	16	0,257	0,6121	16	16	0,000	1,0000	0,011	0,9157
6 1f	2	0	0	-	-	2	0	2,000	0,1573	-	-
6 1s	7	2	0	2,000	0,1573	2	3	0,200	0,6547	-	-
6 2	0	0	0	-	-	0	0	-	-	-	-
ETDT:		-				-				-	
10	32	8	11	0,474	0,4913	4	9	1,923	0,1655	0,078	0,7804
8	39	11	10	0,048	0,8273	11	7	0,889	0,3458	0,050	0,8225
6	9	2	0	2,000	0,1573	4	3	0,143	0,7055	-	-
ETDT:		df=2 p=0,1980				df=2 p=0,3626				p=0,3040 df=2	
1f	46	10	15	1,000	0,3173	9	12	0,429	0,5127	0,011	0,9168
1s	89	28	22	0,720	0,3961	21	18	0,231	0,6310	0,000	0,9920
2	71	19	20	0,026	0,8728	16	16	0,000	1,0000	0,017	0,8957
ETDT:		df=2 p=0,5591				df=2 p=0,7930				p=0,9748 df=2	

Tab. 20: Transmission von DBP – Konditionierung für das Erkrankungsalter

Alter bei Erkrankungsbeginn

Die Konditionierung für das Alter der Patienten bei Erkrankungsbeginn erfolgte analog zur entsprechenden Analyse der VDR-Haplotypen. Die Transmission der DBP-Allele an Patienten, die bei Erkrankungsbeginn ≤ 8 Jahre alt waren (63 Individuen), wurde mit der Transmission an Patienten verglichen, die bei Erkrankungsbeginn > 8 Jahre alt waren (61 Individuen).

Weder die Transmission der Intron 8-Allele (ETDT-Differenztest: $p=0,3040$) noch die Transmission der Exon 11-Allele (ETDT-Differenztest: $p=0,9748$) unterschied sich zwischen weiblichen und männlichen Patienten. Die Fallzahlen der kombinierten Intron 8-Exon 11-Haplotypen waren für eine Analyse mit Hilfe des ETDT-Differenztests zu gering.

		Maternale Haplotypen				Paternale Haplotypen				Maternale gg. paternale Haplotypen	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	ETDT-Differenztest	p=
10 1f	27	4	7	0,818	0,3657	7	9	0,250	0,6171	-	-
10 1s	8	1	2	0,333	0,5637	1	4	1,800	0,1797	-	-
10 2	1	0	0	-	-	0	1	1,000	0,3173	-	-
8 1f	22	4	9	1,923	0,1655	3	6	1,000	0,3173	-	-
8 1s	93	20	25	0,556	0,4561	29	19	2,083	0,1489	1,779	0,1822
8 2	82	28	18	2,174	0,1404	17	19	0,111	0,7389	1,018	0,3130
6 1f	2	2	0	2,000	0,1573	0	0	-	-	-	-
6 1s	11	4	2	0,667	0,4142	3	2	0,200	0,6547	-	-
6 2	0	0	0	-	-	0	0	-	-	-	-
ETDT:		-				-				-	
10	36	5	8	0,692	0,4054	9	14	1,087	0,2971	0,100	0,7517
8	45	9	10	0,053	0,8185	15	11	0,615	0,4328	0,147	0,7016
6	13	6	2	2,000	0,1573	3	2	0,200	0,6547	-	-
ETDT:		df=2 p=0,2056				df=2 p=0,4135				p=0,8306 df=2	
1f	54	11	14	0,360	0,5485	14	15	0,034	0,8527	0,002	0,9681
1s	110	27	31	0,276	0,5994	29	23	0,692	0,4054	0,600	0,4387
2	90	29	22	0,961	0,3270	17	22	0,641	0,4233	1,072	0,3004
ETDT:		df=2 p=0,2207				df=2 p=0,4500				p=0,3905 df=2	

Tab. 21: Transmission von DBP – Konditionierung für mütterliche und väterliche Transmission

Mütterliche und väterliche Transmission

Auch die Vererbung mütterlicher und väterlicher DBP-Allele an Patienten wurde separat betrachtet (siehe Tabelle 21, Teile A-D). In keiner der beiden Subgruppen bestand ein signifikantes Vererbungsungleichgewicht für Exon 11-, Intron 8- oder kombinierte Haplotypen.

Weder die Transmission der Intron 8-Allele (ETDT-Differenztest: $p=0,8306$) noch die Transmission der Exon 11-Allele (ETDT-Differenztest: $p=0,3905$) unterschied sich bei mütterlichen und väterlichen Allelen voneinander. Die Fallzahlen der kombinierten Intron 8-Exon 11-Haplotypen waren für eine Analyse mit Hilfe des ETDT-Differenztests zu gering.

Haplotyp	Summe der Allele	hohes Risiko (56)				mittleres Risiko (69)				niedriges Risiko (19)				hoch zu mittel		hoch zu mittel + niedrig	
		Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ ETDT-Differenztest	p=	Chi ² -Test/ ETDT-Differenztest	p=
10 1f	27	4	5	0,111	0,7389	4	9	1,923	0,1655	3	2	0,200	0,6547	-	-	-	-
10 1s	7	1	1	0,000	1,0000	1	4	1,800	0,1797	0	0	-	-	-	-	-	-
10 2	1	0	1	1,000	0,3173	0	0	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-
8 1f	21	2	6	2,000	0,1573	2	7	2,778	0,0956	2	2	0,000	1,0000	-	-	-	-
8 1s	89	18	16	0,118	0,7316	22	17	0,641	0,4233	6	10	1,000	0,3173	0,004	0,9508	0,001	0,9748
8 2	78	20	13	1,485	0,2230	20	17	0,243	0,6219	5	3	0,500	0,4795	0,097	0,7558	0,046	0,8305
6 1f	3	0	1	1,000	0,3173	1	0	0,000	1,0000	1	0	1,000	0,3173	-	-	-	-
6 1s	10	1	3	1,000	0,3173	5	1	2,667	0,1025	0	0	-	-	-	-	-	-
6 2	0	0	0	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-
ETDT:		-				-				-				-		-	
10	33	5	7	0,333	0,5637	4	12	4,000	0,0455	3	2	0,200	0,6547	-	-	-	-
8	41	10	6	1,000	0,3173	11	8	0,474	0,4913	2	4	0,667	0,4142	0,005	0,9448	0,114	0,7352
6	12	1	3	1,000	0,3173	6	1	3,571	0,0588	1	0	1,000	0,3173	-	-	-	-
ETDT:		df=2 p=0,5702				df=2 p=0,0300				df=2 p=0,4525				p=0,0923 df=2		p=0,0922 df=2	
1f	48	5	10	1,667	0,1967	7	16	3,522	0,0606	7	3	1,600	0,2059	-	-	0,078	0,7806
1s	92	15	15	0,000	1,0000	25	19	0,818	0,3657	6	12	2,000	0,1573	0,116	0,7336	0,050	0,8239
2	76	18	13	0,806	0,3692	20	17	0,243	0,6219	5	3	0,500	0,4795	0,008	0,9310	0,000	0,9862
ETDT:		df=2 p=0,5634				df=2 p=0,2070				df=2 p=0,3412				p=0,3904 df=2		p=0,7453 df=2	

Tab. 22: Transmission von DBP – Konditionierung für HLA-DR/DQ-Haplotypen

HLA

Analog zur Auswertung der VDR-Daten, erfolgte auch die TDT-/ETDT-Analyse der DBP-Haplotypen entsprechend der HLA-DR/DQ-Haplotypen. Die erweiterten HLA-DR/DQ-Haplotypen von 144 Patienten waren bekannt. 69 Patienten hatten HLA-DR/DQ-Haplotypen, die ein hohes Typ 1 Diabetes-Risiko vermitteln, 56 Patienten hatten Haplotypen mittleren und 19 Patienten besaßen HLA-Haplotypen niedrigen Risikos (zur Einteilung der HLA-DR/DQ-Haplotypen siehe Kapitel 2.3.9). Von 17 Patienten waren keine HLA-DR/DQ-Haplotypen verfügbar.

Das Exon 11-Allel „1f“ wurde in der HLA-Hochrisikogruppe 5 von 15mal (TDT: p=0,1967) und in der Gruppe mittleren HLA-Risikos 7 von 23mal (TDT: p=0,0606) transmittiert. Für beide Gruppen zusammen ergab sich ein signifikantes Vererbungsungleichgewicht des „1f“ Allels (12 von 38mal transmittiert; TDT: p=0,0231). ETDT und ETDT-Differenztest für die Exon 11-Haplotypen insgesamt waren jedoch nicht signifikant.

Für die Intron 8-Haplotypen bestand in der Gruppe mit mittlerem HLA-Risiko ein signifikantes Vererbungsungleichgewicht (ETDT: p=0,0300), wobei das Allel „10“ seltener (4 von 16mal; TDT: p=0,0455) und das Allel „6“ häufiger (6 von 7mal; TDT: p=0,0588) als erwartet transmittiert wurde. Die ETDT-Differenztests für die Intron 8-Haplotypen waren allerdings nicht signifikant. Für eine Auswertung der kombinierten Intron 8-Exon 11-Haplotypen waren die Fallzahlen zu gering.

		CTLA4 GG (22)				CTLA4 AG (57)				CTLA4 AA (31)				GG zu AA		GG zu AG + AA	
Haplotyp	Summe der Allele	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Transmittiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=	Chi ² -Test/ ETDT-Differenztest	p=	Chi ² -Test/ ETDT-Differenztest	p=
10 1f	17	0	1	1,000	0,3173	4	7	0,818	0,3657	2	3	0,200	0,6547	-	-	-	-
10 1s	6	0	2	2,000	0,1573	0	3	3,000	0,0833	1	0	1,000	0,3173	-	-	-	-
10 2	1	0	0	-	-	0	0	-	-	0	1	1,000	0,3173	-	-	-	-
8 1f	19	1	1	0,000	1,0000	3	9	3,000	0,0833	3	2	0,200	0,6547	-	-	-	-
8 1s	74	9	4	1,923	0,1655	21	20	0,024	0,8759	10	10	0,000	1,0000	0,536	0,4643	0,815	0,3666
8 2	61	5	7	0,333	0,5637	20	14	1,059	0,3035	8	7	0,067	0,7963	0,046	0,8295	0,411	0,5215
6 1f	2	1	0	1,000	0,3173	1	0	1,000	0,3173	0	0	-	-	-	-	-	-
6 1s	9	0	1	1,000	0,3173	6	2	2,000	0,1573	0	1	1,000	0,3173	-	-	-	-
6 2	0	0	0	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-
ETDT:		-				-				-				-		-	
10	24	0	3	3,000	0,0833	4	10	2,571	0,1088	3	4	0,143	0,7055	-	-	-	-
8	32	4	1	1,800	0,1797	10	9	0,053	0,8185	5	3	0,500	0,4795	-	-	-	-
6	12	1	1	0,000	1,0000	7	2	2,778	0,0956	0	1	1,000	0,3173	-	-	-	-
ETDT:		df=2 p=0,1251				df=2 p=0,0897				df=2 p=0,4664				p=0,1573 df=2		p=0,2802 df=2	
1f	38	2	2	0,000	1,0000	8	16	2,667	0,1025	6	4	0,400	0,5271	-	-	-	-
1s	78	7	5	0,333	0,5637	24	21	0,200	0,6547	11	10	0,048	0,8273	0,001	0,9735	0,001	0,9805
2	64	5	7	0,333	0,5637	20	15	0,714	0,3980	7	10	0,529	0,4669	0,127	0,7216	0,103	0,7487
ETDT:		df=2 p=0,8330				df=2 p=0,2302				df=2 p=0,6825				p=0,9216 df=2		p=0,8106 df=2	

Tab. 23: Transmission von DBP – Konditionierung für CTLA4 Exon 1-Genotypen

CTLA4

Die CTLA4 Exon 1-Genotypen von 110 Patienten waren bekannt. 22 Patienten hatten den Genotyp „GG“, 57 Patienten den Genotyp „AG“, und 31 Patienten wiesen den CTLA4 Exon 1-Genotyp „AA“ auf.

Die Transmission der Exon 11-Haplotypen wich in keiner der drei Subpopulationen signifikant von den erwarteten Werten ab und auch zwischen den Gruppen gab es keine relevanten Unterschiede. In der Gruppe mit dem CTLA4-Genotyp „AG“ wurde das Allel „10“ des Intron 8-Polymorphismus seltener (4 von 14mal; TDT: $p=0,1088$) und das Allel „6“ häufiger (7 von 9mal; TDT: $p=0,0956$) als erwartet transmittiert (ETDT für Intron 8-Polymorphismus: $p=0,0897$). Die ETDT-Differenztests für die Intron 8-Haplotypen waren allerdings nicht signifikant. Die Fallzahlen waren für eine Auswertung der kombinierten Intron 8-Exon 11-Haplotypen zu gering.

4. DISKUSSION

4.1 Der nukleäre Vitamin D Rezeptor

4.1.1 Mutationsscreening in Exon 2 und Exon 3

Die Eltern von 100 Typ 1 Diabetes-Patienten (200 Personen) wurden auf Mutationen in Exon 2 und Exon 3 des VDR-Gens untersucht. In Exon 2 wurde mit Hilfe eines *MwoI*-Restriktionsverdau nach dem Vorhandensein eines G→A-Basenaustausches des Nukleotids 252 (*Gly*→*Asp*) gesucht⁽⁴⁴⁹⁾. Das Exon 3 wurde mit einer SSCP-Analyse auf Mutationen gescreent⁽²⁹¹⁾. –Keines der untersuchten Individuen wies eine Mutation in Exon 2 oder Exon 3 des nukleären Vitamin D Rezeptors auf. Daraufhin wurde auf die Untersuchung der restlichen Eltern verzichtet.

Exon 2 und Exon 3 des VDR-Gens kodieren für die beiden Zinkfinger des nukleären Vitamin D Rezeptors, über die seine DNA-Bindung erfolgt⁽²⁶⁸⁾. Zahlreiche Mutationen dieser beiden Exons sind inzwischen beschrieben worden, welche die DNA-Bindung des Rezeptors und damit seine Funktionsfähigkeit mehr oder weniger stark beeinflussen⁽³⁶⁰⁾. Das homozygote Auftreten der meisten Mutationen führt zum Krankheitsbild der vererbten Vitamin D-resistenten Rachitis (HVDRR) mit schweren Vitamin D-Mangelscheinungen vor allem des Skeletts^(358;359) (siehe Kapitel 1.2.7). Ihr Erbgang ist in der Regel autosomal rezessiv. Calcium-Metabolismus und Skelett heterozygoter Träger einer VDR-Mutation erscheinen normal. Eine mögliche Beeinträchtigung der Vitamin D-Wirkung auf das Immunsystem dieser Individuen durch die (homozygote oder heterozygote) VDR-Mutation wurde bisher nicht untersucht.

Grundlage der oben beschriebenen Untersuchung war daher die Überlegung, daß heterozygote Träger einer Mutation in Exon 2 oder 3 zwar bezüglich der „klassischen“ Vitamin D-Effekte klinisch unauffällig sind, die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ auf ihr Immunsystem und andere an der Typ 1 Diabetes-Pathogenese beteiligte Faktoren aber durchaus beeinträchtigt sein könnte. Die Dissoziation von Calcium- und Immun-Effekt einiger Vitamin D-Analoga legt entsprechende Überlegungen nahe⁽⁴⁵⁰⁾. In diesem Fall wäre eine Häufung von VDR-Mutationen in Familien mit Typ 1 Diabetes mellitus und eine überzufällig häufige Vererbung der Mutationen an die Patienten zu erwarten gewesen.

Keines der analysierten Individuen wies eine (mit der hier durchgeführten SSCP) nachweisbare Mutation in Exon 2 oder Exon 3 des VDR-Gens auf. Ein signifikante Beteiligung von heterozygoten VDR-Exon 2/Exon 3-Mutationen am genetischen Risiko, an Typ 1 Diabetes mellitus zu erkranken, erscheint in der untersuchten Population daher sehr unwahrscheinlich.

4.1.2 Linkage Disequilibrium und Allelverteilung

In der hier untersuchten Population bestand ein starkes Linkage Disequilibrium zwischen den am 3'-Ende des VDR-Gens gelegenen RFLPs *BsmI*, *ApaI* und *TaqI*. Das Linkage Disequilibrium zwischen der Restriktionsschnittstelle *FokI* und den 3'-Polymorphismen war hingegen nur schwach ausgeprägt.

Die in dieser Arbeit beobachteten Allelfrequenzen und Linkage Disequilibrium-Daten für *BsmI*, *ApaI* und *TaqI* entsprechen recht genau den bisher für kaukasische Populationen veröffentlichten Daten (± 5 Prozentpunkte)⁽³⁶⁵⁾, und die Rangreihenfolgen der Haplotypfrequenzen sind mit ihnen beinahe identisch⁽⁴⁵¹⁾. Daten über Linkage Disequilibrium und Häufigkeiten für die aus allen vier Restriktionsschnittstellen (einschließlich *FokI*) bestehenden Haplotypen sind bisher nicht publiziert. Die hier beobachteten Genotyphäufigkeiten des *FokI*-Polymorphismus sind jedoch mit den bisher für Kaukasier berichteten Daten kompatibel^(452;453).

Die Lokalisation der RFLPs innerhalb des VDR-Gens, macht die unterschiedlich stark ausgeprägten Linkage Disequilibria verständlich: Während *BsmI*, *ApaI* und *TaqI* innerhalb eines nur etwa 2 kb großen Abschnitts liegen, befindet sich die *FokI*-Restriktionsschnittstelle mehr als 40 kb in Richtung 5'-Ende des VDR-Gens von jenen entfernt⁽²⁶⁴⁾.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Familien erscheinen bezüglich ihrer Linkage Disequilibrium- und Haplotypfrequenzdaten des VDR-Gens auch für andere kaukasische Populationen repräsentativ.

4.1.3 Vererbung an Patienten und gesunde Geschwister

Die Transmission bzw. Nicht-Transmission von VDR-Haplotypen (definiert durch die Restriktionsendonukleasen *FokI*, *BsmI*, *ApaI* und *TaqI*) an 161 Typ 1 Diabetes-Patienten und 94 gesunde Geschwister wurde untersucht.

Vererbung an Patienten

Ein signifikantes Vererbungsungleichgewicht an Typ 1 Diabetes-Patienten bestand für mehrere von der kombinierten Analyse der *BsmI/ApaI/TaqI*-Schnittstellen abgeleitete Haplotypen. Dabei vermittelten die Allele „*BAT*“, „*Af*“ und „*Bf*“ ein signifikant erhöhtes Diabetes-Risiko. Die Allele „*af*“ und „*AT*“ hingegen wurden signifikant seltener als erwartet an Patienten transmittiert und scheinen somit eher protektiv für Typ 1 Diabetes mellitus. Die zusätzliche Analyse von *FokI* erbrachte keinen Informationsgewinn; das Vererbungsungleichgewicht der 4-Locus-Haplotypen war grenzwertig signifikant. Auch die kombinierten *FokI/ApaI/TaqI*-Haplotypen wiesen ein signifikantes Vererbungsungleichgewicht auf, welches jedoch eher durch das von der Erwartung abweichende Transmissionsmuster der *ApaI/TaqI*-Haplotypen zu erklären ist. Die Ermittlung der prädiaktivsten Haplotypen wurde durch das starke Linkage Disequilibrium zwischen *BsmI*, *ApaI* und *TaqI* und die jeweils unterschiedliche Anzahl der für den jeweiligen Polymorphismus heterozygoten Eltern erschwert. In der untersuchten Population besteht eine Assoziation von VDR-Haplotypen mit Typ 1 Diabetes mellitus, wobei die Frage nach dem am stärksten assoziierten Haplotyp (*ApaI/TaqI* oder *BsmI/ApaI/TaqI*) an dieser Stelle nicht abschließend geklärt werden kann.

Auch in asiatischen Populationen wurde inzwischen eine Assoziation zwischen VDR-Haplotypen und Typ 1 Diabetes berichtet. Eine kürzlich publizierte Fall-Kontroll-Studie ergab eine Assoziation bei Han-Chinesen⁽⁴⁵⁴⁾. McDermott *et al.*⁽⁴⁵⁵⁾ untersuchten in 93 südindischen Typ 1 Diabetes-Familien die Transmission der *BsmI*-, *ApaI*- und *TaqI*-RFLPs mit Hilfe von TDT und ETDT (siehe auch Tabelle 24): Während das Allel „*bAT*“ bei der hier untersuchten kaukasischen Population eher protektiv wirkte, vermittelte es in der indischen Population ein signifikant erhöhtes Diabetes-Risiko. Das Allel „*BAT*“ war mit einem verringerten Krankheitsrisiko in beiden Populationen assoziiert. Interessanterweise wurde „*BAT*“, eines der mit einer Frequenz von 30-35% häufigsten Allele bei Kaukasiern, in der indischen Population gar nicht beobachtet.

Auch die Vererbung der *BsmI/TaqI*-Haplotypen unterschied sich zwischen beiden Gruppen. Insgesamt vermittelte das „*b*“ Allel ein signifikant erhöhtes Risiko bei Indern und ein vermindertes Risiko für Typ 1 Diabetes bei Kaukasiern. Während der *BsmI*-RFLP die informativste einzelne Schnittstelle in der asiatischen Population darstellte, hatte *TaqI* bei Kaukasiern den höchsten prädiaktiven Wert.

Diese Befunde machen das Bestehen einer genetischen Heterogenität bezüglich des Vitamin D Rezeptor-Locus zwischen Asiaten und Kaukasiern wahrscheinlich.

Haplotyp	Summe der Allele	Transmitiert	Nicht Transmittiert	TDT Chi ²	TDT p=
B A T	42	13	29	6,095	0,0136
b a t	13	5	8	0,692	0,4054
B A t	0	0	0	-	-
b A T	54	35	19	4,741	0,0295
b A t	3	1	2	0,333	0,5637
B a t	48	23	25	0,083	0,7728
b a T	62	34	28	0,581	0,4461
B a T	4	2	2	0,000	1,0000
ETDT:	df=7		p=0,1191		
b t	3	2	1	0,333	0,5637
BT	38	11	27	6,737	0,0094
bT	59	41	18	8,966	0,0028
Bt	50	21	29	1,280	0,2579
ETDT:	df=3		p=0,0111		
B	84	53	31	5,762	0,0164
b	84	31	53	5,762	0,0164

Tab. 24: Transmission von VDR an indische Typ 1 Diabetes-Patienten
Studie von McDermott *et al.* an 93 südindischen Familien⁽⁴⁵⁵⁾

Vererbung an gesunde Geschwister

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Frage nach einer möglichen Assoziation von genetischen Polymorphismen des nukleären Vitamin D Rezeptors und des Vitamin D bindenden Proteins mit Typ 1 Diabetes mellitus. Mit Hilfe der in Kapitel 2.3.10 beschriebenen statistischen Methoden wird ein Abweichen der beobachteten von den erwarteten Vererbungshäufigkeiten der jeweiligen Allele gemessen und auf dieser Basis eine Aussage hinsichtlich der möglichen Assoziation von VDR bzw. DBP und Diabetes getroffen. Als erwartete Häufigkeit setzt man dabei die Wahrscheinlichkeit eines heterozygoten Elternteils, ein bestimmtes Allel weiterzugeben, auf 50% fest. Falls die echten Transmissionshäufigkeiten (sie werden in der Praxis meist nicht bestimmt) in der untersuchten Population von dem rein stochastisch ermittelten Wert „50%“ abweichen, wären sowohl falsch positive als auch falsch negative Ergebnisse von entsprechenden Assoziationsstudien zu erwarten.

Zudem stellt sich bei allen Familienanalysen die Frage, ob die untersuchten Familien repräsentativ für die Gesamtpopulation sind. Einen Anhaltspunkt liefert hier ein Vergleich der Allelhäufigkeiten und der Linkage Disequilibrium-Daten der Familien mit der Gesamtpopulation (siehe Kapitel 4.1.2). Dennoch kann ein von der Gesamtheit abweichendes Vererbungsmuster in der betrachteten Stichprobe nicht ausgeschlossen werden. Die Untersuchung der Transmission der fraglichen Allele an gesunde Geschwister stellt eine zusätzliche „interne Kontrolle“ auf die Validität der Ergebnisse einer Assoziationsstudie dar. Besteht eine echte Assoziation zwischen genetischem Polymorphismus und Krankheit, müßte auch ein signifikanter Unterschied zwischen der Vererbung dieses Polymorphismus an Patienten und gesunde Geschwister nachweisbar sein.

Aus diesem Grunde wurde die Vererbung der VDR-Haplotypen an 94 gesunde Geschwister untersucht.

Der Unterschied zwischen Patienten und gesunden Geschwistern in der Vererbung der einzelnen Polymorphismen war nicht signifikant. Für die 2-Locus-Haplotypen *ApaI/TaqI* und *FokI/ApaI* bestand ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und gesunden Geschwistern, für *FokI/BsmI* war dieser knapp nicht signifikant und für die 3- und 4-Locus-Haplotypen war die ETDT-Differenz eindeutig nicht signifikant. Immerhin erbrachte der χ^2 -Test für die Allele „*FBf*“ und „*FBAf*“ ein signifikantes Ergebnis.

Für einen Teil der Allele bestehen –wie erwartet– signifikante Unterschiede zwischen der Transmission an Patienten und der Transmission an gesunden Geschwistern. Die Abwesenheit eines signifikanten Unterschieds zwischen beiden Gruppen für eine Reihe von Allelen läßt sich durch mehrere Faktoren erklären: 1) Für diejenigen Allele, für die kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht (ermittelt durch TDT und ETDT) in der Patientengruppe bestand, kann ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Geschwistern nicht erwartet werden. 2) Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs der Geschwistergruppe ist die statistische Aussagekraft des Vergleichs der 3- und 4-Locus-Haplotypen eingeschränkt. Der Stichprobenumfang reicht zur Detektion eines schwach signifikanten Unterschieds nicht aus. 3) Der Großteil der gesunden Geschwister war zum Zeitpunkt der Rekrutierung jünger als 20 Jahre alt. Für all diese Individuen besteht somit die Möglichkeit, irrtümlich als „gesund“ eingestuft und in Wahrheit „Noch-Nicht-Patient“ zu sein. Diese Fälle würden zu falsch negativen (d.h. nicht-signifikanten) Ergebnissen beim Vergleich der Vererbungsmuster führen. Ein Fehler dieser Art ist bei Krankheiten mit variablem Beginn beinahe unvermeidbar und eine Abschätzung des Anteils fälschlicherweise als „gesund“ eingestufte Geschwister frühestens in einem Jahrzehnt möglich. Auf keinen Fall würde dies zu falsch positiven Ergebnissen führen. Da weniger als 20% der gesunden Geschwister eines Typ 1-Diabetikers ebenfalls an Typ 1 Diabetes erkranken, ist der quantitative Effekt zu vernachlässigen.

Die Untersuchung zwischen der Transmission der VDR-Allele an gesunde Geschwister und Patienten läßt die weiter oben diskutierten Patienten-Daten valide erscheinen. Trotz des geringen Stichprobenumfangs der Geschwistergruppe ist damit eine „echte“ Assoziation von VDR-Allelen mit Typ 1 Diabetes mellitus wahrscheinlich. –Im übrigen betreffen die in diesem Abschnitt gemachten kritischen Anmerkungen die Validität des Großteils der international veröffentlichten Assoziationsstudien und stellen kein spezifisches Problem dieser Arbeit dar.

4.1.4 Konditionierungen[¶]

Geschlecht der Patienten

In kaukasischen Populationen erkranken etwas mehr Jungen als Mädchen an Typ 1 Diabetes mellitus. In Ländern mit einer niedrigen Diabetes-Inzidenz (Asien, Afrika) hingegen sind umgekehrt Mädchen häufiger als Jungen betroffen⁽⁴⁵⁶⁾. Besonders in der Gruppe mit dem HLA-Genotyp

[¶] Wie in Kapitel 2.3.10 erläutert, errechnet sich der TDT der Gesamtpopulation (g) als $Chi_g^2 = \frac{(t_g - nt_g)^2}{t_g + nt_g}$. Die

Chi^2 -Werte zweier identischer Subpopulationen (1 und 2) werden dennoch nur halb so groß sein:

$$\text{Es sei } t_1 = t_2 = \frac{t_g}{2} \text{ und } nt_1 = nt_2 = \frac{nt_g}{2}. \text{ Dann ist } Chi^2 = Chi_2^2 = \frac{\left(\frac{t_g}{2} - \frac{nt_g}{2}\right)^2}{\frac{t_g}{2} + \frac{nt_g}{2}} = \frac{(t_g - nt_g)^2}{4} \cdot \frac{2}{t_g + nt_g} = \frac{1}{2} \times Chi_g^2 \text{ und bei}$$

gleichem Freiheitsgrad werden die Wahrscheinlichkeiten p_1 und p_2 entsprechend kleiner als p_g sein. Aus der Abhängigkeit der χ^2 - und p-Werte von der Gruppengröße ergibt sich, daß ein Vergleich dieser absoluten Zahlen zwischen den Gruppen nicht sinnvoll ist. Lediglich die Ergebnisse der in den letzten beiden Spalten der jeweiligen Tabelle aufgeführten χ^2 -Vierfeldertests und ETDT-Differenztests sind diesbezüglich aussagekräftig.

DR3/DRx (siehe auch Kapitel 1.1.3 + 2.3.9) ist der Anteil der männlichen Patienten bei Kaukasieren besonders hoch. Zusammen mit der kürzlichen Beschreibung eines mit Typ 1 Diabetes assoziierten Markers auf Chromosom Xp⁽¹³⁴⁾ machen diese Befunde unterschiedliche genetische Risikofaktoren für Typ 1 Diabetes bei weiblichen und männlichen Individuen plausibel.

Die hier vorgenommene Konditionierung für das Geschlecht der Patienten ergab keinen signifikanten Unterschied in der Vererbung der einzelnen Polymorphismen *FokI*, *BsmI*, *ApaI* und *TaqI* zwischen Mädchen und Jungen. Das Allel „B“ wurde –allerdings nicht signifikant– eher seltener an Mädchen und häufiger an Jungen transmittiert. Die erweiterte Analyse der von *BsmI* abgeleiteten Haplotypen *BsmI/TaqI* und *FokI/BsmI/TaqI* ergab grenzwertig signifikante ($p < 0,06$) Unterschiede ihrer Vererbung an weibliche und männliche Patienten.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann ein signifikanter Unterschied in der Vererbung der VDR-Haplotypen an Mädchen und Jungen weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Zur Beantwortung der entsprechenden Fragestellung sind Untersuchungen eines größeren Kollektivs notwendig. Höhere Fallzahlen ermöglichten dann auch eine kombinierte Konditionierung nach Geschlecht und HLA-Haplotyp, um die Existenz geschlechtsspezifischer, nur in HLA-Subgruppen relevanter Risikofaktoren zu überprüfen.

Alter bei Erkrankungsbeginn

Das Erkrankungsalter für Typ 1 Diabetes mellitus variiert erheblich –in der hier betrachteten Population lag es zwischen 1 und 35 Jahren. Dies veranlaßt zu der Überlegung, ob es sich beim Typ 1 Diabetes mellitus eines Säuglings und eines Erwachsenen wirklich um eine pathogenetische Entität handelt, oder ob nicht vielmehr unterschiedliche Faktoren an der Krankheitsentstehung in den verschiedenen Altersgruppen beteiligt sind. Die Konditionierung für das Erkrankungsalter mißt einen eventuell vorhandenen Unterschied in der Vererbung des fraglichen Markers und erlaubt somit Aussagen über seine Bedeutung in den einzelnen Gruppen.

Für keinen der einzelnen Polymorphismen *FokI*, *BsmI*, *ApaI* oder *TaqI* bestand ein Unterschied in ihrer Transmission zwischen beiden Gruppen (χ^2 -Test: $p > 0,71$). Auch die Vererbung der 2- und 3-Locus-Haplotypen differierte nicht. Ein signifikanter Unterschied in der Vererbung der 4-Locus-Haplotypen, für deren Analyse die Anzahl der Individuen zu gering war, erscheint somit sehr unwahrscheinlich.

Auch bei der Untersuchung von indischen Asiaten⁽⁴⁵⁵⁾ bestand kein Unterschied zwischen der Vererbung der VDR-Haplotypen an Patienten mit frühem oder spätem Erkrankungsbeginn. Allerdings erfolgte die Einteilung in der Studie bei Indern nach dem Erkrankungsalter wie folgt: ≤ 15 Jahre (72 Patienten) und > 15 Jahre (21 Patienten). Der „Cut-Off“ unterschied sich damit deutlich von der in dieser Studie verwendeten Grenze von 8 Jahren (63 Patienten ≤ 8 Jahre und 61 Patienten > 8 Jahre). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse beider Arbeiten ist zudem durch unterschiedlich große Gruppen in der Untersuchung von McDermott *et al.* eingeschränkt.

Alles in allem gibt es keinen Anhaltspunkt für einen differentiellen Effekt von VDR-Allelen auf die Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus bei Patienten mit frühem oder spätem Erkrankungsbeginn.

Mütterliche und väterliche Transmission

Das sogenannte „elterliche Imprinting“ ist an der Entstehung einer Reihe von Krankheiten beteiligt. „Elterliches Imprinting“ beschreibt das Phänomen, daß der Funktionszustand und die physiologische Relevanz eines Gens davon abhängen, ob es von der Mutter oder vom Vater vererbt wird. Die diesem Vorgang zugrunde liegenden Mechanismen sind bis heute unklar. Die Konditionierung für mütterliche und väterliche Transmission diente der Beantwortung der Frage nach der Relevanz elterlichen Imprintings für die Vererbung der VDR-Haplotypen an Typ 1 Diabetes-Patienten.

Weder für einen der einzelnen Polymorphismen *FokI*, *BsmI*, *ApaI* und *TaqI* noch für einen der 2- bzw. 3-Locus-Haplotypen bestand ein signifikanter Unterschied zwischen mütterlicher und väterlicher Transmission. Eine differierende Vererbung der nicht analysierten 4-Locus-Haplotypen erscheint demnach sehr unwahrscheinlich.

Auch bei indischen Typ 1 Diabetes-Familien konnte kein Unterschied zwischen mütterlicher und väterlicher Vererbung der VDR-Haplotypen an Patienten nachgewiesen werden⁽⁴⁵⁵⁾. Elterliches Imprinting scheint somit keine Rolle bei der Vererbung der Vitamin D Rezeptor-Allele in Typ 1 Diabetes-Familien zu spielen.

HLA-DR/DQ-Haplotypen

Der HLA-Komplex (*IDDM1*) vermittelt etwas mehr als die Hälfte des genetischen Risikos, an Typ 1 Diabetes mellitus zu erkranken. Innerhalb dieser Region auf Chromosom 6q besteht für die erweiterten DR/DQ-Haplotypen die stärkste Assoziation mit Diabetes (siehe auch Kapitel 1.1.3). Während einige Haplotypen ein hohes Erkrankungsrisiko vermitteln, scheinen andere keinen bzw. einen protektiven Einfluß auf das pathogenetische Geschehen zu haben. Aufgrund dieser Beobachtungen hat sich die Einteilung der HLA-DR/DQ-Allele in Haplotypen hohen, mittleren und niedrigen Risikos (siehe auch Kapitel 2.3.9) ergeben.

Der Beitrag des HLA-DR/DQ-Haplotyps zum genetischen Diabetesrisiko ist in der HLA-Niedrigrisikogruppe geringer als in der HLA-Hochrisikogruppe. Entsprechend müßte es in der HLA-Niedrigrisikogruppe eine Häufung anderer genetischer Risikofaktoren geben, die in der HLA-Hochrisikogruppe nur eine untergeordnete Rolle spielen. Diese Überlegung war Grundlage für die Konditionierung der VDR-Transmissionsanalyse entsprechend der drei HLA-Risikogruppen. Dabei waren die HLA-DR/DQ-Haplotypen von 144 Patienten bekannt.

Der *TaqI*-Polymorphismus, in der Gesamtanalyse (siehe Tabelle 11) derjenige Marker mit der stärksten Abweichung von den erwarteten Transmissionshäufigkeiten, wies in der Gruppe mittleren HLA-Risikos ein signifikantes Vererbungsungleichgewicht auf. Seine Transmission an die HLA-Hoch- und -Niedrigrisikogruppe entsprach hingegen einer rein zufälligen Transmission bzw. Nicht-Transmission. Das für *TaqI* bestehende Vererbungsungleichgewicht in der Gesamtanalyse scheint damit ausschließlich durch das Transmissionsmuster in der Gruppe mittleren HLA-Risikos bedingt. Aufgrund der geringen Anzahl von Patienten mit einem HLA-Haplotyp niedrigen Risikos sind verlässliche Aussagen über die Transmission in dieser Gruppe jedoch nicht möglich.

Das Allel „f“ wurde seltener an Patienten der HLA-Hochrisikogruppe vererbt. Dagegen erfolgte seine Transmission signifikant häufiger in der Gruppe mittleren (und noch deutlicher in der kombinierten Gruppe mittleren und niedrigen) HLA-Risikos. Die isolierte Betrachtung der HLA-Niedrigrisikogruppe erbrachte kein signifikantes TDT-Ergebnis –wahrscheinlich aufgrund der zu geringen Fallzahl. Der Unterschied der Transmissionsmuster zwischen der HLA-Hochrisikogruppe und den beiden anderen Gruppen war ebenfalls signifikant. TDT und Chi²-Tests für *BsmI* und *ApaI* erbrachten hingegen keine signifikanten Resultate.

Die differentielle Vererbung der 2-Locus-Haplotypen *FokI/TaqI* war knapp nicht signifikant. Die Unterschiede zwischen den HLA-Risikogruppen in der Transmission von *FokI/BsmI* (hohes vs. mittleres und hohes vs. mittleres + niedriges Risiko) und *FokI/BsmI/TaqI* waren signifikant. Die Analyse der erweiterten Haplotypen vermittelte jedoch keinen Informationsgewinn gegenüber der alleinigen Betrachtung von *FokI*. Als Gründe hierfür kommen folgende Szenarien in Betracht, die anhand der hier ermittelten Daten nicht erhellt werden können: 1) Ein signifikanter Unterschied der Transmissionsmuster für *BsmI* und *TaqI* wird lediglich durch das mit *FokI* bestehende Linkage Disequilibrium verursacht. Diese primäre Assoziation könnte auch durch einen noch nicht identifizierten –mit *FokI* gekoppelten– Polymorphismus bedingt sein. 2) Die Fallzahl ist für eine Analyse höheren Freiheitsgrades zu gering und liefert deshalb nur schwach signifikante Ergebnisse der erweiterten

Haplotypen. Die Klärung dieser Fragen bedarf weiterer Studien mit höheren Fallzahlen und einer ggf. größeren Markerdichte.

Die signifikanten Transmissionsunterschiede für die von *FokI* abgeleiteten Haplotypen machen eine Bedeutung dieser Allele als sekundäre Risikomarker für Typ 1 Diabetes mellitus wahrscheinlich.

CTLA4 Exon 1-Genotyp

Das CTLA4-Gen kodiert für einen T Zellrezeptor, der die Proliferation und Apoptose dieser Zellen kontrolliert und damit an den für das Entstehen von Typ 1 Diabetes verantwortlichen Pathomechanismen beteiligt ist. Das CTLA4-Gen auf Chromosom 2q ist polymorph und wurde in zahlreichen Linkage-Studien und Genomscans als potentiell Risikogen für Typ 1 Diabetes (*IDDM2*; siehe auch Kapitel 1.1.3) identifiziert^(113;117;125;457). Zur Detektion einer möglicherweise differentiellen Vererbung der VDR-Haplotypen an Patienten mit unterschiedlichem CTLA4 Exon 1-Genotyp wurde die entsprechende Konditionierung vorgenommen.

Ein signifikanter Unterschied in der Transmission der einzelnen Polymorphismen und der 2-Locus-Haplotypen zwischen den Gruppen bestand nicht. Für eine Analyse der 3- und 4-Locus-Haplotypen waren die Gruppengrößen zu gering. Obwohl eine für den CTLA4 Exon 1-Genotyp differentielle Vererbung der VDR-Haplotypen aufgrund der vorliegenden Daten unwahrscheinlich ist, müssen die Ergebnisse dieser Konditionierung mit Vorsicht interpretiert werden: Lediglich von 110 Patienten war der CTLA4 Exon 1-Genotyp bekannt, und durch die Einteilung in 3 Subgruppen ergaben sich relativ geringe Stichprobenumfänge. Zur Detektion eines nur schwachen Unterschieds der Transmissionmuster fehlt der Analyse daher die statistische Aussagekraft. Dennoch kann von der Abwesenheit einer hochsignifikanten Differenz in der Vererbung der VDR-Haplotypen zwischen den CTLA4-Gruppen ausgegangen werden.

4.1.5 Der nukleäre Vitamin D Rezeptor und Diabetes

Die Assoziation von Polymorphismen des VDR-Gens mit Typ 1 Diabetes mellitus bei Kaukasieren und Asiaten sowie eine differentielle Transmission der VDR-Haplotypen an kaukasische Patienten unterschiedlichen HLA-Risikos werfen die Frage nach der Bedeutung und der Plausibilität dieser Ergebnisse auf.

„Assoziation“ sagt zunächst nichts über die Kausalität des Befundes. Folgende Konstellationen sind daher denkbar: 1) Der mit einer Erkrankung assoziierte Polymorphismus selbst kann die Grundlage eines funktionellen Unterschiedes zwischen den Allelen eines Genes bilden und damit direkt am Entstehen der Erkrankung beteiligt sein. 2) Der untersuchte Marker ist selbst „a-funktionell“ und steht lediglich in einem mehr oder weniger starken Linkage Disequilibrium zu dem tatsächlich an der Pathogenese beteiligten Polymorphismus. Dieser „echte“ Polymorphismus kann dabei sowohl innerhalb als auch außerhalb des untersuchten Markergens liegen.

Der *TaqI*-Polymorphismus in Exon 9 verursacht eine sogenannte „stille“ T→C-Mutation, d.h. es kommt trotz Basenaustausch zu keinem Aminosäureaustausch⁽²⁹³⁾. Aus dem für die Translation in die Aminosäure Isoleucin am meisten bevorzugten Kodon wird durch den Austausch das für die entsprechende Translation am wenigsten bevorzugte Kodon. Fehler im Rahmen der Translation werden hierdurch etwas wahrscheinlicher. Bisher fehlen allerdings jegliche *in vivo* Daten, die eine physiologische Relevanz des beschriebenen Phänomens für VDR⁽⁴⁵⁸⁾ oder irgendein Protein zeigen. Damit scheidet *TaqI* als kausaler Polymorphismus praktisch aus.

Die Polymorphismen *BsmI* und *ApaI* liegen intronisch zwischen Exon 8 und Exon 9 und wirken sich damit nicht auf die Aminosäuresequenz des nukleären Vitamin D Rezeptors aus. Allerdings können intronische Sequenzen –wie bereits erwähnt– an der Transkriptionsregulation des sie enthaltenden Gens beteiligt sein. Bisher wurden jedoch keine Assoziationen von *BsmI* und *ApaI* mit der VDR-mRNA-Menge oder deren Stabilität beobachtet^(295;296).

Der *FokI*-Polymorphismus im ersten Kodon des Exons 2 führt zu einem um 3 Aminosäuren kürzeren Protein⁽²⁹¹⁾. Auf den ersten Blick erscheint es unwahrscheinlich, daß eine Fehlen von 3 Aminosäuren am 5'-Ende des mehr als 400 Aminosäuren umfassenden Proteins die Funktion des Vitamin D Rezeptors beeinträchtigt⁽²⁶¹⁾. Unter Berücksichtigung der Domänen⁽²⁶⁷⁾ des nukleären Steroidrezeptors VDR wird eine funktionelle Relevanz des *FokI*-Polymorphismus deutlich wahrscheinlicher: Der Verlust der 3 Aminosäuren betrifft die der Transaktivierung dienende Domäne A, die beim Vitamin D Rezeptor lediglich 20 Aminosäuren umfaßt und –im Vergleich zu anderen Steroidrezeptoren– stark verkürzt ist. Die Berichte über eine durch *FokI* veränderte Transaktivierung oder mRNA-Menge sind bisher widersprüchlich⁽²⁹⁹⁾, obwohl gerade zwei jüngst veröffentlichte Studien von funktionellen Unterschieden der *FokI*-Allele berichten^(297;298;300;301). Insgesamt erscheint es eher unwahrscheinlich, daß die in dieser Arbeit untersuchten Allele die kausalen Polymorphismen für die VDR-Assoziation mit Typ 1 Diabetes mellitus sind, zumal für den *FokI*-Polymorphismus in der Gesamtgruppe der Patienten gar kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht besteht.

Bei der Beurteilung der bisherigen Experimente zur Beleuchtung der Frage eines funktionellen Unterschieds der oben besprochenen Polymorphismen ist jedoch Skepsis angebracht. Die meisten Untersuchungen verwendeten Reportergeren-Assays, artifizielle Konstrukte, die nur sehr begrenzt die *in vivo* Situation reflektieren dürften. Der Nachweis multipler Promotoren und mRNA-Isoformen⁽²⁶⁴⁾ vermindert aber auch die Aussagekraft von *in vivo* Experimenten: Die Ab- oder Anwesenheit eines funktionellen Unterschieds im untersuchten Gewebe läßt *a priori* keinerlei Rückschlüsse auf die Verhältnisse in anderen Geweben zu.

Dadurch wird eine Diskussion des „echten“ kausalen Polymorphismus für die Assoziation von VDR mit Diabetes, die allein auf oben erwähnten Experimenten basiert, zur reinen Spekulation. –Ein anderer Ansatz führt jedoch zu derselben Schlußfolgerung, daß die untersuchten Polymorphismen *FokI*, *ApaI*, *BsmI* und *TaqI* selbst nicht die kausalen Polymorphismen sind: 1) *FokI* ist der einzige der untersuchten Polymorphismen, der die Aminosäuresequenz des nukleären Vitamin D Rezeptors verändert. Allerdings besteht für *FokI* (bezogen auf die Gesamtheit der betrachteten Patienten) kein signifikantes Vererbungsungleichgewicht und *FokI* steht auch in keinem relevanten Linkage Disequilibrium zu den anderen offensichtlich mit Diabetes assoziierten Polymorphismen. 2) In der vereinfachten Betrachtung müßte ein Polymorphismus die Interaktion von Rezeptor mit Ligand und DNA beeinträchtigen, um „kausal“ wirken zu können. Unter der Annahme, daß sich sowohl sein Ligand (1,25(OH)₂ D₃) als auch die DNA (VDREs) in verschiedenen Populationen nicht voneinander unterscheiden (wenn sie sogar im Laufe der Vertebratenevolution konserviert wurden), müßte ein und dasselbe Allel die gleiche Wirkung in verschiedenen Populationen haben. Die Daten über eine Assoziation von VDR und Diabetes bei Asiaten⁽⁴⁵⁵⁾ stützen zwar die Validität der Ergebnisse dieser Arbeit, machen aber *BsmI*, *ApaI* und *TaqI* als funktionelle Polymorphismen aus oben erwähntem Grund unwahrscheinlich. Während „*bAT*“ Risikoallel bei Asiaten ist, hat es einen protektiven Effekt in der kaukasischen Population. –Nach dem vereinfachten mechanistischen Modell ein Ding der Unmöglichkeit, wenn man *BsmI*, *ApaI* oder *TaqI* als kausale Polymorphismen in Erwägung zieht. Andererseits könnten auch variierende Umweltfaktoren dazu führen, daß unterschiedliche VDR-Allele die gleiche Disposition gegenüber Typ 1 Diabetes in verschiedenen Populationen vermitteln (in Analogie zur differentiellen Rolle einiger HLA-Allele). Ergebnisse, die letztere These stützten, liegen zur Zeit noch nicht vor.

Die beobachtete genetische Heterogenität in der Diabetes-Assoziation der VDR-Allele zwischen Kaukasiern und Asiaten macht damit einen kausalen Polymorphismus wahrscheinlich, der in einem unterschiedlichen Linkage Disequilibrium zu *BsmI*, *ApaI* und *TaqI* in verschiedenen Populationen steht.

In der Nachbarschaft des VDR-Locus auf Chromosom 12q13-14 befinden sich die Gene für eine Reihe von Proteinen mit immunologischen und regulatorischen Eigenschaften: IFN- γ ⁽⁴⁵⁹⁾, SP1 (ein Transkriptionsfaktor der unter anderem mit VDR⁽⁴⁶⁰⁾ interagiert)^(263;461),

STAT6 (ein IL-4 induzierter Transkriptionsverstärker)⁽⁴⁶²⁾, NRAMP2 (natural resistance associated macrophage protein 2)⁽⁴⁶³⁾. Desweiteren befindet sich eine Insertionsstelle von HPV18 in einem dort gelegenen Abschnitt der DNA⁽⁴⁶⁴⁾. Über Polymorphismen und Krankheitsassoziationen dieser Gene ist bisher wenig bekannt.

Innerhalb des VDR-Gens vermutet man aufgrund seiner Größe von mehr als 75 kb noch mehrere bisher unbekannte Polymorphismen. Ein weiterer Polymorphismus wurde kürzlich in Intron 8 zwischen der *BsmI*- und der *ApaI*-Schnittstelle entdeckt; Linkage Disequilibrium-Daten zu ihm gibt es bisher nicht⁽⁴⁶⁵⁾. Ein ausgesprochen interessant erscheinender Polymorphismus befindet sich am 3'-Ende des VDR-Gens in seiner untranslatierten Region⁽²⁹³⁾. 3'-UTRs können die mRNA-Stabilität eines Gens beeinflussen⁽³⁰²⁾. Wie für die RFLPs gibt es diesbezüglich auch für den 3'-UTR-Polymorphismus des VDR-Gens kontroverse Daten^(293;303). „Interessant“ wird der 3'-UTR-Polymorphismus durch zweierlei: 1) Seine Assoziation mit dem Prostatakarzinom wurde berichtet. (Die Bedeutung dieser Ergebnisse wird weiter unten ausführlicher diskutiert.) 2) Der 3'-UTR-Polymorphismus steht in einem starken Linkage Disequilibrium zu den RFLPs *BsmI*, *ApaI* und *TaqI*, das in verschiedenen Populationen unterschiedlich ausgeprägt ist⁽⁴⁶⁶⁾. Während das Allel „bL“ 90% der Haplotypen in asiatischen Populationen konstituiert, sind es bei Kaukasiern nur 56% (siehe Abbildung 14). Ein für die Diabetes-Assoziation des VDR-Gens kausaler 3'-UTR-Polymorphismus könnte den Widerspruch auflösen, daß „bAT“ bei Asiaten ein erhöhtes und bei Kaukasiern ein vermindertes Diabetes-Risiko vermittelt.

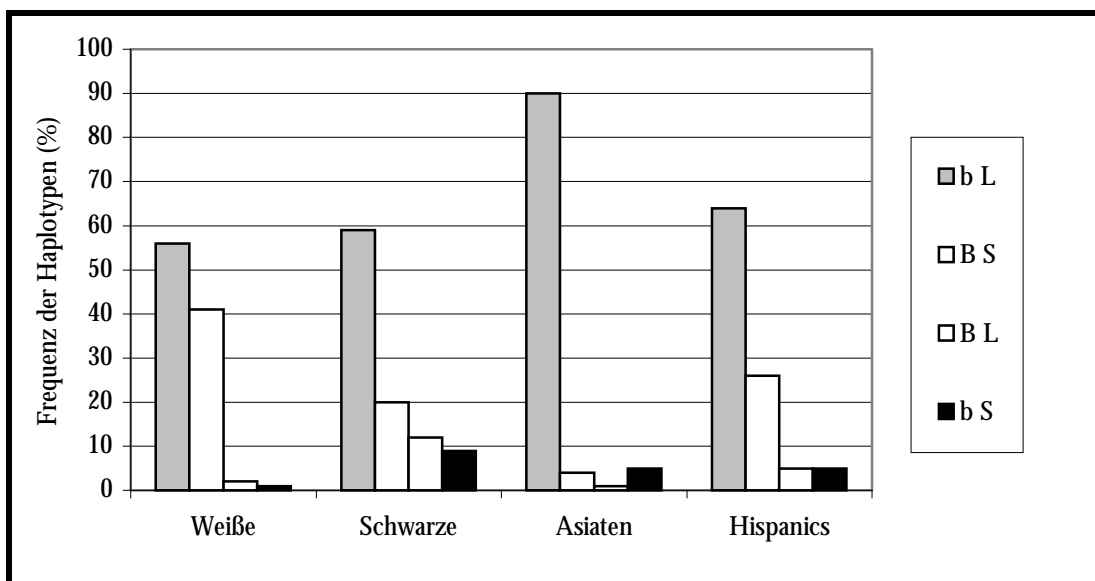


Abb. 14: Verteilung der *BsmI*-3'-UTR-Haplotypen des VDR-Gens in verschiedenen Populationen – Studie von Ingles *et al.*⁽⁴⁶⁶⁾: „S“ und „L“ bezeichnen ein kurzes (Short; A₁₃-A₁₇) bzw. ein langes (Long; A₁₈-A₂₄) Poly(A)-Repeat

Ferner gibt es eine Reihe weiterer Studien, welche die biologische Bedeutung der in dieser Arbeit ermittelten Assoziation von VDR-Allelen mit Typ 1 Diabetes –teils indirekt– stützen und den kausalen Polymorphismus eher innerhalb des VDR-Gens als in seiner Nachbarschaft vermuten lassen:

Eine Vielzahl von Studien hat sich mit der Rolle von VDR-Haplotypen bei der Entstehung der Osteoporose beschäftigt. In verschiedenen Populationen konnten Assoziationen zwischen VDR-Polymorphismen und verminderter Knochendichte nachgewiesen werden^(293;467), die in einer ebenso großen Anzahl von Studien jedoch nicht bestätigt werden konnten⁽³⁶⁴⁾. Die Fülle

positiver Assoziationsstudien kann sicher als Indiz für das tatsächliche Bestehen funktioneller Unterschiede der VDR-Allele gewertet werden, auch wenn die Diskussion über die klinische Relevanz der VDR-Polymorphismen für das Entstehen von Osteoporose bei weitem nicht abgeschlossen ist.

VDR-Polymorphismen scheinen ebenfalls mit dem Auftreten von Hyperparathyroidismus in Zusammenhang zu stehen. Sowohl zum primären^(468;469) als auch zum sekundären^(470;471) Hyperparathyroidismus gibt es Arbeiten, die von einer Assoziation berichten. Einige Studien kommen allerdings zu gegenteiligen Ergebnissen^(472;473). –Auch für Osteoporose und Hyperparathyroidismus sind die untersuchten VDR-RFLPs mit unterschiedlichen Risiken in verschiedenen Populationen assoziiert und erscheinen daher –wie für Typ 1 Diabetes mellitus erläutert– selbst nicht kausal zu sein.

Auch im Zusammenhang mit Psoriasis wurde der nukleäre Vitamin D Rezeptor näher untersucht. Bei Psoriasis handelt es sich um eine Erkrankung mit überschießender Keratinozytenproliferation, für die eine autoimmune Genese diskutiert wird⁽⁴⁷⁴⁾. Das Vitamin D-Analoga Calcipotriol ist mittlerweile in der Therapie der Psoriasis gut etabliert. Die Therapieresistenz psoriatischer Plaques gegenüber Vitamin D⁽⁴⁷⁵⁾ geht mit einer verminderten VDR-mRNA-Konzentration der betreffenden Keratinozyten einher⁽⁴⁷⁶⁾. Assoziationen von VDR-Polymorphismen und dem Auftreten von Psoriasis⁽⁴⁷⁷⁾ bzw. mit ihrem Ansprechen auf eine topische Vitamin D-Therapie⁽⁴⁷⁸⁾ wurden mit VDR-Allelen assoziiert, aber auch negative Studienergebnisse wurden publiziert⁽⁴⁷⁹⁾.

Eine Assoziation von Polymorphismen des VDR-Gens scheint erner auch mit systemischem Lupus erythematodes (SLE) zu bestehen⁽⁴⁸⁰⁾.

Für Prostata^(397;399;400), Mammakarzinom^(401;404) und malignes Melanom⁽⁴⁰⁵⁾ wurden ebenfalls Assoziationen mit Polymorphismen des VDR-Gens berichtet, die nicht in allen Studien bestätigt werden konnten⁽⁴⁸¹⁾. Dabei führt eine um 50% verringerte VDR-Expression zu einer Verdoppelung der Proliferationsrate der entsprechenden Zelle⁽⁴⁰⁶⁾. Die Prognose von Kolonkarzinomen scheint mit dem Ausmaß ihrer VDR-Expression korreliert zu sein⁽⁴⁰⁷⁾. Zwei kürzlich veröffentlichte Studien konnten eine Assoziation zwischen VDR-Polymorphismen und dem Auftreten von Prostatakarzinomen jedoch nicht bestätigen^(482;483).

Der Vollständigkeit halber seien noch Arbeiten erwähnt, die eine Assoziation von VDR-Polymorphismen mit Arthrose⁽⁴⁸⁴⁾, Parodontose⁽⁴⁸⁵⁾, Sarkoidose⁽⁴⁸⁶⁾ und erhöhter Anfälligkeit gegenüber Tuberkulose⁽⁴⁸⁷⁻⁴⁸⁹⁾, Hepatitis B⁽⁴⁹⁰⁾ und Lepra⁽⁴⁹¹⁾ berichten und somit die These von funktionellen Unterschieden der VDR-Allele untermauern.

VDR vermittelt die Transkriptionsregulation durch $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ im Zusammenspiel mit mehreren Kofaktoren. Dabei interagiert VDR entweder als VDR-VDR-Homodimer oder als VDR-RXR-Heterodimer mit der jeweiligen DNA-Erkennungssequenz (VDRE, RXRE). Die Bindung an eine bestimmte Sequenz und die nachfolgende Transkriptionsaktivierung bzw. –inhibition hängen sowohl von der Konzentration der Liganden ($1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, 9-cis RA), der Rezeptoren (VDR, RXR) und der Ionenkonzentration als auch von der Affinität der Rezeptoren zueinander und gegenüber ihren Liganden bzw. den DNA-Erkennungssequenzen ab. Polymorphismen innerhalb des VDR-Gens, welche die Affinität des Vitamin D Rezeptors zu einem seiner „Mitspieler“ auch nur minimal beeinflussen, könnten in diesem komplexen System durchaus eine relevante Veränderung des Transkriptionsmusters bewirken. Dabei müßte ein verändertes Transkriptionsmuster nicht in jeder Situation von funktioneller Bedeutung sein und könnte ggf. nur einzelne Zellen in einem bestimmten Zustand betreffen. Bestes Beispiel dafür stellen die nicht-hypercalcämischen, immunsuppressiven Vitamin D-Analoga (EB1089⁽⁴⁹²⁾, Calcipotrien⁽⁴⁹³⁾, OCT⁽⁴⁹⁴⁾ und andere) dar. Sowohl Calcium-Effekt als auch Immunsuppression werden über den gleichen Rezeptor vermittelt. Dennoch ist ein Ligand in der Lage, selektiv die Transkription derjenigen Gene zu induzieren, die die immunsuppressive Wirkung von Vitamin D vermitteln. Dabei scheint der differentielle Effekt der verschiedenen Vitamin D-Metabolite und -Analoga auf die

Degradation von VDR und auf die Stabilität des VDR-RXR-VDRE-Komplexes eine Schlüsselrolle zu spielen⁽⁴⁹⁵⁾. Eine weitere Ursache für die nicht-hypercalcämische Wirkung einiger Vitamin D-Analoga liegt sicher auch in ihrer gegenüber $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ veränderten Affinität gegenüber DBP und *CYP24*^(496;497). Die Entdeckung einer VDR-Isoform der Ratte, die durch Retention des Introns 8, die Heterodimerisation mit RXR inhibiert, die Homodimerisation jedoch unbeeinträchtigt läßt⁽⁴⁹⁸⁾, kann als weiteres Indiz für die physiologische Relevanz des „Feintunings“ der VDR-Interaktionen gewertet werden. Affinitätsstudien zeigen, daß die zum Krankheitsbild der Vitamin D-resistenten Rachitis führenden VDR-Mutationen sowohl die Ligand-Bindung als auch die Heterodimer-Bildung⁽⁴⁹⁹⁾ beeinträchtigen und somit einen dramatischen Effekt auf die filigrane VDR-vermittelte Transkriptionsregulation haben.

Die Haplotypen der HLA-Region sind für etwa 60% des genetischen Typ 1 Diabetes-Risikos verantwortlich⁽⁹²⁾. Berücksichtigt man dies, so verwundert es nicht, daß bei Abwesenheit eines Hochrisiko-HLA-Haplotyps anderen genetischen Faktoren eine größere Bedeutung für die Diabetesentstehung zukommt. Die –bezogen auf den HLA-Haplotyp– differentielle Vererbung einiger VDR-Allele steht mit einer Rolle der Haplotypen des nukleären Vitamin D Rezeptors als sekundäre Risikomarker für Typ 1 Diabetes mellitus im Einklang.

Vor dem Hintergrund des oben Dargestellten und vor allem unter Berücksichtigung der klinischen und molekularen Effekte des VDR-Liganden $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ (siehe hierzu auch Kapitel 4.3) verdient das VDR-Gen auf Chromosom 12q12-q14 als genetischer Risikomarker für Typ 1 Diabetes mellitus in weiteren Studien Beachtung. Eine Bestätigung der bezogen auf andere Risikofaktoren differentiellen Vererbung der VDR-Allele wäre gleichzeitig auch ein Indiz für die genetische Heterogenität des Typ 1 Diabetes mellitus bei Kaukasiern.

4.2 Das Vitamin D bindende Protein

4.2.1 Linkage Disequilibrium und Allelverteilung

Die Intron 8- und Exon 11-Polymorphismen stehen in einem deutlichen Linkage Disequilibrium zueinander. Die Allelverteilungen der Intron 8⁽³²⁹⁾- und Exon 11⁽⁵⁰⁰⁾-Genotypen entsprechen den bisher für Kaukasier publizierten^(327;501) Daten⁽³²⁹⁾. Auf die Allele „8 1s“ und „8 2“ entfallen etwa 80% aller beobachteten Haplotypen. Entsprechend hoch ist der Anteil homozygoter Individuen. Nur 123 Eltern waren heterozygot für den kombinierten Intron 8-Exon 11-Haplotyp, und die statistische Aussagekraft der folgenden Analysen ist entsprechend eingeschränkt. Das in einigen Populationen beobachtete Intron 8-Allel „11“ kam in den untersuchten Familien nicht vor. Dieses Ergebnis entspricht früheren Untersuchungen von kaukasischen Populationen, in den das Allel „11“ stets Häufigkeiten $\leq 1\%$ aufwies.

In Bezug auf die Polymorphismen des DBP-Gens scheinen die typisierten Familien damit repräsentativ für Individuen kaukasischen Ursprungs.

4.2.2 Vererbung an Patienten und gesunde Geschwister

Vererbung an Patienten

Die TDT- und ETDT-Ergebnisse der Exon 11-, der Intron 8- und der kombinierten Haplotypen waren allesamt nicht signifikant. Im Vergleich zur VDR-Analyse der gleichen Population war der Anteil für DBP homozygoter Eltern –wie Eingangs erwähnt– bedeutend. Die statistische Aussagekraft der DBP-Analyse liegt somit zwangsläufig unter derjenigen der VDR-Analyse.

Das Transmissionsmuster der DBP-Polymorphismen legt die Abwesenheit einer Assoziation von Haplotypen des DBP-Gens mit Typ 1 Diabetes mellitus nahe. Die Assoziation von DBP mit Typ 1 Diabetes in Subgruppen kann aufgrund dieses Ergebnisses jedoch nicht definitiv ausgeschlossen werden.

Vererbung an gesunde Geschwister

Auch die Vererbung der DBP-Haplotypen an die Gruppe der gesunden Geschwister wich nicht von den erwarteten Häufigkeiten ab, und es bestand kein signifikanter Unterschied zum Transmissionsmuster in der Patientengruppe. Somit konnte keine Assoziation zwischen genetischen Polymorphismen des Vitamin D bindenden Proteins und Typ 1 Diabetes mellitus nachgewiesen werden.

4.2.3 Konditionierungen

Die Konditionierungen für DBP wurden analog zu den beschriebenen Konditionierungen für die VDR-Haplotypen (siehe Kapitel 4.1.4) durchgeführt.

Es bestand kein Unterschied zwischen der Vererbung an weibliche und männliche Patienten und die Intron 8- und die Exon 11-Haplotypen wurden im Rahmen der erwarteten Häufigkeiten transmittiert.

Sowohl in der Gruppe der Patienten mit frühem (≤ 8 Jahre) als in der Gruppe mit späterem (> 8 Jahre) Erkrankungsalter wurden die DBP-Allele entsprechend den erwarteten Häufigkeiten vererbt. Auch zwischen beiden Gruppen bestand diesbezüglich kein signifikanter Unterschied für die Intron 8- und die Exon 11-Haplotypen.

Bezüglich der Intron 8- und der Exon 11-Haplotypen bestand weder für mütterliche noch für väterliche Allele ein Vererbungsungleichgewicht oder ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Während für die Exon 11-Haplotypen kein Unterschied in ihrer Vererbung Patienten hohen, mittleren und niedrigen HLA-Risikos bestand, ergab sich für die Patienten mittleren HLA-Risikos ein signifikantes Vererbungsungleichgewicht für die Intron 8-Haplotypen. Der Unterschied zwischen den Gruppen war knapp nicht-signifikant.

Für Vererbung die Intron 8-Haplotypen an Patienten mit dem CTLA4 Exon 1-Genotyp „AG“ war das Ergebnis zwar nur knapp nicht-signifikant. Aufgrund des hohen Homozygoten-Anteils beruht diese Analyse auf nur 21 Transmissionen und ihre Aussagekraft ist entsprechend limitiert. Die Transmissionsmuster der übrigen Intron 8- und Exon 11-Haplotypen wichen nicht von den erwarteten Häufigkeiten ab.

4.2.4 Das Vitamin D bindende Protein und Diabetes

Die genetischen Polymorphismen des Vitamin D bindenden Proteins sind in der untersuchten Gesamtpopulation nicht mit Typ 1 Diabetes mellitus assoziiert. Während für das Geschlecht des Patienten, väterliche und mütterliche Allele, Erkrankungsalter und CTLA4-Genotyp keine diffe-

rentielle Transmission der DBP-Haplotypen beobachtet wurde, bestanden Unterschiede hinsichtlich der HLA-Haplotypen. Das signifikante Vererbungsungleichgewicht der Intron 8-Allele und die nur knapp nicht-signifikante ETDT-Differenz zwischen der Gruppe hohen sowie der Gruppe mittleren und niedrigen HLA-Risikos werfen die Frage auf, ob es nicht doch einen Zusammenhang zwischen DBP-Allelen und Typ 1 Diabetes mellitus gibt. Sieht man von den HLA-Daten ab, gibt es aufgrund der übrigen Ergebnisse keinen Anhaltspunkt für eine solche Krankheitsassoziation. Wie jedoch die Analyse der VDR-Daten (siehe Kapitel 4.1.4-5) zeigt, muß man bei komplexen Erkrankungen wie dem Typ 1 Diabetes mit der Existenz sekundärer Risikogene rechnen, die nur in Subgruppen pathogenetische Relevanz erlangen. Angesichts der relativ geringen Fallzahlen besteht die Notwendigkeit weiterer Studien, die die Rolle der DBP-Allele in Subgruppen mit hinreichender statistischer Aussagekraft beleuchten können.

Eine jüngst veröffentlichte Arbeit beschreibt die Abwesenheit einer Assoziation der DBP-Exon 11-Polymorphismen mit Typ 1 Diabetes bei Kaukasiern⁽⁵⁰²⁾. Angesichts des geringen Stichprobenumfangs dieser Studie, der relativ geringen Sensitivität und Spezifität einer Fall-Kontrollstudie (siehe auch Kapitel 1.3.2) und der dort nicht vorgenommen Subgruppenanalyse muß dieses Ergebnis mit Zurückhaltung betrachtet werden.

Analog der für den nukleären Vitamin D Rezeptor diskutierten Bedeutung einer möglichen Assoziation mit Typ 1 Diabetes mellitus, sollten entsprechende Überlegungen auch für das Vitamin D bindende Protein angestellt werden:

DBP bindet den Großteil der Vitamin D-Metabolite im Blut und gewährleistet so ihre enzymatische Aktivierung bzw. Inaktivierung und ist für ihre Verfügbarkeit „vor Ort“, d.h. in den Vitamin D-Zielgeweben, essentiell. Gestützt wird diese Aussage unter anderem durch Beobachtungen, daß *in vitro* hochpotente Vitamin D-Analoga mit einer hohen VDR- und einer geringen DBP-Affinität, *in vivo* kaum wirksam sind⁽⁵⁰³⁾. Die $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ -Serumkonzentration ist eng mit der jeweiligen DBP-Konzentration korreliert⁽³⁴⁰⁾ und DBP-Knockout-Mäuse weisen schwere Vitamin D-Mangelerscheinungen auf⁽³⁴⁹⁾. Andererseits besitzt DBP selbst eine Reihe von immunmodulatorischen Eigenschaften, die es unabhängig von $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ vermittelt. Auf die Funktion des Vitamin D bindenden Proteins im Rahmen der Aktin-Bindung⁽³⁴²⁾ sowie bei der Makrophagen⁽⁵⁰⁴⁾- und Komplementaktivierung⁽⁵⁰⁵⁾ wurde bereits verwiesen (Kapitel 1.2.6).

Funktionelle Auswirkungen des Intron 8-Polymorphismus⁽³²⁹⁾ könnten durch eine Beeinträchtigung der DBP-mRNA-Stabilität zustande kommen⁽²⁹⁴⁾. Der Exon 11-Polymorphismen hingegen wirken sich direkt auf die Aminosäuresequenz des Vitamin D bindenden Proteins aus. Der *HaeIII*-Polymorphismus in Kodon 416 verursacht einen „*Glu* → *Asp*“-Austausch, im Kodon 420 (*StyI*) wird *Thr* durch *Lys* ersetzt⁽³²⁷⁾, wodurch die Glykosierbarkeit von DBP an dieser Stelle verloren geht⁽³²⁸⁾. Auswirkungen dieser Veränderung auf die Wirkung von DBP als Makrophagen aktivierender Faktor werden diskutiert⁽⁵⁰⁶⁾. Mutationen des Vitamin D bindenden Proteins beeinträchtigen seine Bindung von $25(\text{OH}) \text{D}_3$ ^(331;507).

Von Varianten des Vitamin D bindenden Proteins wurden bisher Assoziationen mit rheumatoider Arthritis⁽⁵⁰⁸⁾ und Osteoporose⁽⁵⁰⁹⁾ nachgewiesen. Negative Ergebnisse wurden für multiple Sklerose^(510;511) und systemischen Lupus erythematodes⁽⁴¹⁴⁾ gefunden. Die entsprechenden Daten für HIV-Infektionen⁽⁵¹²⁾ und Typ 2 Diabetes^(502;513) sind widersprüchlich. –Damit ergibt sich für das Vitamin D bindende Protein eine ähnliche Situation wie für den nukleären Vitamin D Rezeptor. Zwar sind die bisherigen Assoziationsdaten relativ uneinheitlich, aber stets handelt es sich bei den diskutierten Erkrankungen (vom Typ 2 Diabetes einmal abgesehen) um „immun-assoziierte“ Ereignisse, denn auch die an der Osteoporoseentstehung beteiligten Osteoklasten stammen letztlich von Makrophagen ab.

Die bisherigen Erkenntnisse über die Vielzahl der physiologischen Aufgaben des Vitamin D bindenden Proteins und über die funktionellen Auswirkungen der Polymorphismen des DBP-Gens erlauben bei weitem noch keine definitive Aussage über die Bedeutung der DBP-Allele für die Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus. Berücksichtigt man, daß nur rund 2% des Vitamin D

bindenden Proteins mit $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ gesättigt ist⁽⁵¹⁴⁾, würde man selbst von bedeutenden Affinitätsunterschieden für Vitamin D nur geringe physiologische Konsequenzen erwarten. Anders mag es da mit einer Beeinträchtigung seiner Makrophagen- und Komplement-aktivierenden Wirkung durch die diskutierten Polymorphismen aussehen.

4.3 Vitamin D-Stoffwechsel bei Diabetes und Autoimmunität

Beim Typ 1 Diabetes mellitus kommt es zur autoimmunologisch bedingten Zerstörung der pankreatischen β -Zellen, ohne daß die benachbarten Inselzellen Schaden nehmen. Dem klinisch manifesten Diabetes mit einer Zerstörung von über 80% der β -Zellen geht die Invasion von T- und B-Lymphozyten sowie von Makrophagen in das Pankreas voraus^(36;45). Bei nahezu allen Typ 1 Diabetikern sind Antikörper gegen β -Zell assoziierte Proteine vorhanden⁽⁶⁰⁾. Die von Lymphozyten sezernierten Zytokine stimulieren die Proliferation der Immunozyten, verstärken die HLA Klasse II-Expression auf β -Zellen und induzieren die Apoptose letzterer. Eine Vielzahl klinischer und molekularer Daten unterstreicht die Bedeutung des Vitamin D Stoffwechsels für die Pathogenese des Typ 1 Diabetes sowie von Autoimmunität. $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ ist an der Regulation nahezu aller Interaktionen beteiligt, welche bisher als kausal für die Typ 1 Diabetes-Entstehung diskutiert wurden:

Vitamin D und pankreatische β -Zellen beeinflussen sich gegenseitig. Einiges spricht dagegen, daß niedrige $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ -Spiegel bei Typ 1 Diabetes hauptsächlich auf den veränderten Glukose-Stoffwechsel zurückzuführen sind. Trotz optimaler Diabetes-Einstellung ist der Vitamin D-Metabolismus vieler Patienten gestört⁽²⁴⁸⁾. Dies ist oft schon unmittelbar bei Erkrankungsbeginn der Fall⁽⁵¹⁵⁾. Schwangere mit Typ 1 Diabetes weisen niedrigere $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ -Werte auf als Frauen mit Gestationsdiabetes⁽⁵¹⁶⁾. Schließlich liegen die Serumkonzentrationen der Vitamin D-Metabolite von Typ 2 Diabetikern deutlich über denen von Typ 1 Diabetikern⁽⁵¹⁷⁾. Allerdings weisen diese Veränderungen des Cholecalciferol-Stoffwechsels bei Typ 1 Diabetikern eine ausgeprägte saisonale Periodizität auf⁽⁵¹⁵⁾ und konnten nicht in allen Studien bestätigt werden⁽⁴¹²⁾. Daß ein beeinträchtigter Vitamin D-Stoffwechsel eher mit Autoimmunität als mit niedrigen Insulin- und hohen Blutglukose-Konzentrationen korreliert scheint, unterstreicht die Beobachtung verminderter $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ -Plasmaspiegel bei autoimmuner Hyperinsulinämie⁽⁵¹⁸⁾. Auch beim Morbus Basedow, einer autoimmunen Hyperthyreose, liegen die Vitamin D-Werte oft deutlich unterhalb des Normbereichs. Ist die Schilddrüsenüberfunktion hingegen durch ein autonomes Adenom bedingt, finden sich keine verminderten $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ -Konzentrationen⁽⁴¹⁶⁾. Ebenso wurden Beeinträchtigungen von Cholecalciferol-Stoffwechsel⁽⁴¹⁴⁾ und -Wirkung⁽⁵¹⁹⁾ bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses berichtet. Im Tiermodell lassen sich durch die Applikation von Vitamin D das Entstehen von Typ 1 Diabetes^(185;425;426), autoimmuner Thyreoiditis⁽⁴³¹⁾, rheumatoider Arthritis⁽⁵²⁰⁾ und multipler Sklerose^(427;428) verhindern. Eine epidemiologische Studie zeigte, daß eine erhöhte Vitamin D-Zufuhr in früher Kindheit mit einer geringeren Typ 1 Diabetes-Inzidenz korrelierte⁽⁴³²⁾, und die Behandlung von Morbus Basedow-Patienten mit $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ führte zur Restitution der Euthyreose⁽⁵²¹⁾.

Auf molekularer Ebene haben sich einige Modellvorstellungen (siehe auch Kapitel 1.1.2) zur Beantwortung der Frage, wie es zur Diabetes-Entstehung kommt, etabliert. Nach der Hypothese der β -Zell spezifischen Infektion verursachen β -Zell spezifische Viren die Bildung von Zytokinen und die Expression von HLA Klasse II-Molekülen auf infizierten β - sowie auf Antigen präsentierenden Zellen. Über ein molekulares Mimikri käme es aufgrund der Homologie von Fremd- und β -Zell-Protein zu einer „Verwechslung“ durch das Immunsystem. Das Modell der Immunmodulation sieht ein Ungleichgewicht zwischen $T_{\text{H}1}$ - und $T_{\text{H}2}$ -Lymphozyten als Ursache der Autoreaktivität bei Typ 1 Diabetes. Auch eine fehlerhafte HLA-Restriktion könnte das Immunsystem „in die Irre“ leiten: Obwohl normalerweise nur Antigen präsentierende Zellen HLA

Klasse II-Moleküle exprimieren, ist eine Reihe endokriner Zellen ebenfalls dazu in der Lage. β -Zellproteine würden den Lymphozyten dann fälschlicherweise präsentiert⁽⁵²²⁾. Sicherlich erklärt noch keines der genannten Modelle die Diabetes-Pathogenese, und die weitere Aufklärung wird sich mit den unterschiedlichen pathophysiologischen Vorgängen beschäftigen müssen, welche die verschiedenen Verläufe bei Typ 1 Diabetes bedingen. In allen Fällen käme jedoch der ektopen HLA Klasse II-Expression der Lymphozytenaktivierung und der Zytokinsekretion eine Schlüsselrolle zu.

Die im Rahmen der Insulitis gebildeten Zytokine verstärken die HLA Klasse II-Expression auf β -Zellen. Zudem induzieren sie DNA-Strangbrüche⁽⁵²³⁾, setzen die Expression von *bc1-2* in Inselzellen herab und bewirken so deren Apoptose⁽⁵²⁴⁾. Der Verlust von β -Zellen durch „Sui-zid“ ist quantitativ vermutlich ebenso bedeutsam wie deren direkte Zerstörung durch Immunozyten⁽⁵²⁵⁾. Vitamin D inhibiert die Expression von HLA Klasse II-Molekülen sowohl auf pankreatischen β -Zellen⁽²¹⁰⁾ als auch auf Antigen präsentierenden Zellen⁽¹⁶⁸⁾. $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ wirkt auf Lymphozyten und Monozyten anti-proliferativ und pro-differenzierend^(173;174). Das $\text{T}_{\text{H}1}/\text{T}_{\text{H}2}$ -Gleichgewicht wird durch Cholecalciferol zu Gunsten der gegenüber Diabetes protektiven $\text{T}_{\text{H}2}$ -Lymphozyten verschoben^(36;38;39), und die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF wird supprimiert⁽¹⁸⁷⁻¹⁸⁹⁾. Die β -Zell-Apoptose verhindert Vitamin D sowohl direkt durch Stimulation der Expression von *bc1-2*^(526;527) als auch indirekt durch eine Inhibition der Zytokinwirkung auf Inselzellen⁽⁵²⁴⁾. Nach heutiger Erkenntnis wirkt Vitamin D somit nahezu allen an der Typ 1 Diabetes-Pathogenese beteiligten Faktoren entgegen.

Neben den beschriebenen „peripheren“ Effekten kann man davon ausgehen, daß Vitamin D auch am Entstehen der zentralen Toleranz beteiligt ist. T- und B-Lymphozyten exprimieren während ihrer Reifung im Thymus außer Glukokortikoid Rezeptoren⁽¹⁷⁹⁾ auch VDR⁽¹⁷⁸⁾. Glukokortikoide regulieren dort die Apoptose der sich entwickelnden Lymphozyten⁽¹⁷⁹⁾. Wenn die Lymphozyten den Thymus verlassen, exprimieren sie kein GR oder VDR mehr; erst auf ihre Aktivierung hin beginnen sie erneut mit der Synthese dieser Rezeptoren. Das Mitwirken von $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ an der klonalen Deletion liegt folglich nahe. Da eine unvollständige zentrale Toleranz die Disposition für Autoimmunerkrankungen entscheidend beeinflussen würde, käme Vitamin D in früher Kindheit eine herausragende Rolle zu. Eine unzureichende $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ -Wirkung zu diesem Zeitpunkt hätte unter Umständen lebenslange Folgen. Obwohl die gerade angestellten Überlegungen rein spekulativ sind, erscheinen sie hoch interessant. Funktionelle Unterschiede des Vitamin D Stoffwechsels, die lediglich während der Embryonalentwicklung und der frühen Kindheit Relevanz erlangten, wären der experimentellen Betrachtung in späteren Stadien nicht mehr zugänglich –obwohl sie sich erst dann auf das Immunsystem auswirkten. Ähnliche Mechanismen könnten auch für Morbus Basedow, rheumatoide Arthritis und andere Autoimmunerkrankungen gelten.

Vor dem Hintergrund der Rolle des Vitamin D Metabolismus beim Entstehen von Autoimmunität kann die Assoziation zwischen Polymorphismen des nukleären Vitamin D Rezeptors und Typ 1 Diabetes mellitus eine funktionelle Erklärung finden. Aus den zahlreichen Interaktionen des Vitamin D Stoffwechsels mit dem Immunsystem und den pankreatischen β -Zellen könnten sich Möglichkeiten für eine Pharmakotherapie bzw. -prevention von Typ 1 Diabetes mellitus ergeben. Vitamin D-Analoga mit einer selektiven immunmodulatorischen Wirkung^(528;529) würden besonders Individuen mit einem hohen genetischen Diabetes-Risiko zugute kommen. Auch Patienten mit einem durch veränderte VDR-Funktionalität beeinträchtigten Vitamin D Wirkung wären durch Vitamin D-Analoga, welche die VDR-Konformation stabilisieren^(450;495;530), einer kausalen Therapie dieses Defektes zugänglich.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Typ 1 Diabetes mellitus ist ein durch Insulinmangel bedingter Defekt der Glukoseverwertung, der durch eine autoimmune Zerstörung der pankreatischen β -Zellen verursacht wird. Als häufigste Autoimmunerkrankung Jugendlicher und junger Erwachsener in den Industrienationen stellt sie durch ihre stetig steigende Inzidenz eine bedeutende medizinische und ökonomische Herausforderung dar.

Etwa 50% des Risikos, an Typ 1 Diabetes mellitus zu erkranken, wird exogenen Faktoren zugeschrieben, für die anderen 50% macht man genetische Faktoren verantwortlich. Etwa die Hälfte des genetischen Risikos wird durch die HLA-Region vermittelt.

Neben seiner „klassischen“ Rolle im Rahmen der Calcium- und Phosphat-Homeostase wirkt Vitamin D auch antiproliferativ und immunmodulierend. $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ inhibiert die Aktivierung von Lymphozyten, die Expression von HLA Klasse II-Molekülen und interagiert mit der Produktion von Zytokinen und Antikörpern. Tierexperimentell eignet sich Vitamin D zur Prävention von Autoimmun-Diabetes, -Thyreoiditis und -Enzephalitis. Wichtige Komponenten des Vitamin D Endokriniums stellen die (monomorphen) ana- und katabolen Enzyme des Vitamin D Stoffwechsels sowie der nukleäre Vitamin D Rezeptor (VDR; Chromosom 12q12-q14) und das Vitamin D bindende Protein (DBP; Chromosom 4q11-q13) dar. In der vorliegenden Arbeit wurden genetische Polymorphismen von VDR [*FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI*] und DBP [(TAAA)_n-Repeat, *StyI*, *HaeIII*] im Rahmen einer Familienanalyse auf eine Assoziation mit Typ 1 Diabetes mellitus untersucht.

Die Haplotypen der am 3'-Ende des VDR-Gens gelegenen Polymorphismen *BsmI*, *ApaI* und *TaqI* waren mit Typ 1 Diabetes in der hier untersuchten, kaukasischen Population assoziiert. Das Bestehen einer Assoziation derselben 3'-VDR-Polymorphismen mit Typ 1 Diabetes bei Asiaten bestätigt die Ergebnisse dieser Arbeit. Während die Vererbungsmuster der Konditionierungen hinsichtlich des Alters der Patienten, maternaler bzw. paternaler Transmission und CTLA Exon 1-Genotypen nicht von den erwarteten Häufigkeiten abwichen, bestand ein deutlicher Unterschied für die Konditionierung entsprechend der HLA-DR/DQ-Haplotypen und eine grenzwertige Differenz für das Geschlecht der Patienten.

Kein Abweichen von den erwarteten Vererbungshäufigkeiten wurde hingegen für die DBP-Polymorphismen beobachtet. Auch hier ergab sich für die Konditionierungen entsprechend des Alters und des Geschlechts der Patienten sowie bezüglich maternaler bzw. paternaler Transmission und CTLA Exon 1-Genotypen kein Unterschied zwischen den jeweiligen Subgruppen. Die Konditionierung nach HLA-DR/DQ-Haplotypen ergab ein grenzwertig signifikantes Abweichen von den erwarteten Werten.

Eine Assoziation von genetischen Polymorphismen des nukleären Vitamin D Rezeptors mit Typ 1 Diabetes mellitus legt funktionelle Unterschiede der VDR-Haplotypen bei der Vermittlung der immunmodulatorischen Vitamin D-Wirkung nahe. Positive Assoziationsstudien von VDR-Polymorphismen mit Osteoporose, diversen Malignomen und Psoriasis stützen diese Hypothese indirekt. Da teilweise „gegenteilige“ Haplotypen ein erhöhtes Diabetes-Risiko bei Asiaten und Kaukasier vermitteln, scheinen die hier betrachteten Polymorphismen lediglich Marker einer mit ihnen im Linkage Disequilibrium stehenden, kausalen genetischen Variante zu sein. Die Unterschiede in der Vererbung der VDR-Haplotypen an weibliche und männliche Patienten sowie die differentielle Transmission der VDR-Allele entsprechend der HLA-DR/DQ-Haplotypen unterstreicht die genetische Heterogenität von Typ 1 Diabetes mellitus in der hier untersuchten kaukasischen Population.

Vor dem Hintergrund des vielfältigen Einflusses von Vitamin D auf Faktoren, die am Entstehen von Typ 1 Diabetes und Autoimmunität beteiligt sind, erscheint ein für die VDR-Assoziation kausaler Polymorphismus innerhalb dieses Rezeptorgens wahrscheinlicher als ein kausaler Polymorphismus außerhalb desselben. Seine herausragende Bedeutung bei der Vermittlung

der immunmodulatorischen Eigenschaften von Vitamin D macht den nukleären Vitamin D Rezeptor zum potentiell interessanten „Hebel“ für eine medikamentöse Prävention und Therapie von Typ 1 Diabetes mellitus und anderen Autoimmunerkrankungen.

6. LITERATUR

1. **Palmer JP, Lernmark A:** Pathophysiology of type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Ellenberg an Rifkin's Diabetes Mellitus: Theory and Practice. Elsevier, New York*, 414-435, **1990**
2. **Bach JF:** Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr.Rev.* **15**, 516-542, **1994**
3. **Lernmark A, Kloppel G, Stenger D, Vathanaprida C, Falt K, Landin-Olsson M, Baskin DG, Palmer JP, Gown AM, Petersen JS, Linsong L, Edenvall H, Mauseth RS:** Heterogeneity of islet pathology in two children with recent onset diabetes mellitus. *Virchows Arch.* **425**, 631-640, **1995**
4. **Wallensteen M, Dahlquist G, Persson B, Landin-Olsson M, Lernmark A, Sundkvist G, Thalme B:** Factors influencing the magnitude, duration, and rate of fall of B-cell function in type 1 (insulin-dependant) diabetic children followed for two years from their clinical diagnosis. *Diabetologia* **31**, 664-669, **1988**
5. **Landin-Olsson M, Karlsson A, Dahlquist G, Blom L, Lernmark A, Sundkvist G:** Islet cell and other organ-specific autoantibodies in all children developing type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in Sweden during one year and in matched controls. *Diabetologia* **32**, 387-395, **1989**
6. **Karjalainen JK:** Islet cell antibodies as predictive markers for IDDM in children with high background incidence of disease. *Diabetes* **39**, 1144-1150, **1990**
7. **Landin-Olsson M, Palmer JP, Lernmark A, Blom L, Sundkvist G, Nystrom L, Dahlquist G:** Predictive value of islet cell and insulin autoantibodies for type 1 (insulin-dependent) diabetes in a population-based study of newly-diagnosed diabetic and matched control children. *Diabetologia* **35**, 1068-1073, **1992**
8. **Agner T, Damm P, Binder C:** Remission in IDDM: Prospective study of basal C-peptide and insulin dose in 268 consecutive patients. *Diabetes Care* **10**, 164-169, **1987**
9. **WHO Study Group Diabetes Mellitus:** *WHO Technical Report 727*, **1985**
10. **Diabetes Epidemiology Research International Group:** Geographic patterns of childhood insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* **39**, 1113-1119, **1988**
11. **Vaarala O, Hyoty H, Akerblom HK:** Environmental factors in the aetiology of childhood diabetes. *Diabetes Nutr.Metab.* **12**, 75-85, **1999**
12. **Karvonen M, Tuomilehto J, Libman I, LaPorte R, Group FW:** A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. World Health Organization DIAMOND Project Group. *Diabetologia* **36**, 883-892, **1993**
13. **Joner G, Sovik O:** Increasing incidence of diabetes mellitus in Norwegian children 0-14 years of age 1973-1982. *Diabetologia* **32**, 79-83, **1989**

14. **Dormann JS, LaPorte RE, Stone RA, Trucco M:** Worldwide differences in the incidence of type 1 diabetes are associated with amino acid variation at position 57 of the HLA-DQ beta chain. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **87**, 7370-7374, **1990**
15. **Muntoni S, Songini M:** High incidence rate of IDDM in Sardinia. Sardinian Collaborative Group for Epidemiology of IDDM. *Diabetes Care* **15**, 1317-1322, **1992**
16. **Laron ZV, Karp M, Modan M:** The incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in Israeli children and adolescents 0-20 years of age: a retrospective study 1975-1980. *Diabetes Care* **8**, 2-29,
17. **LaPorte RE, Fishbein HA, Drash AL, Kuller LH, Schneider BB, Orchard TJ, Wagener DK:** The Pittsburgh insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) registry: The incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in Allegheny County, Pennsylvania (1965-1976). *Diabetes* **30**, 279-284, **1981**
18. **Bingley PJ, Gale EA:** Rising incidence of IDDM in Europe. *Diabetes Care* **12**, 289-295, **1989**
19. **Dahlquist G, Blom L, Lonnberg G:** The Swedish Childhood Diabetes Study - a multivariate analysis of risk determinants for diabetes in different age groups. *Diabetologia* **34**, 757-762, **1991**
20. **Tuomilehto J, Rewers M, Reunanen A, Lounamaa P, Lounamaa R, Tuomilehto WE, Akerblom AK:** Increasing trend in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in childhood in Finland. Analysis of age, calendar time and birth cohort effects during 1965 to 1984. *Diabetologia* **34**, 282-287, **1991**
21. **Metcalfe MA, Baum JD:** Incidence of insulin-dependent diabetes in children aged under 15 years in the British Isles during 1988. *B.M.J.* **302**, 443-447, **1991**
22. **Dahlquist G, Gustavsson KH, Holmgren G, Hagglof B, Larsson Y, Nilsson KO, Samuelsson KO, Sterky G, Thalme B, Wall S:** The incidence of diabetes mellitus in Swedish children 0-14 years of age. *Acta Paediatr.Scand.* **71**, 7-14, **1982**
23. **Nystroem L, Dahlquist G, Rewers M, Wall S:** The Swedish Childhood Diabetes Study: An analysis of the temporal variation in diabetes incidence 1978-1987. *Int.J.Epidemiol.* **19**, 141-146, **1990**
24. **Michaelis D, Iutzi E:** Diabeteshaeufigkeiten in der BRD. *Diabetes Journal* , 4-7, **1991**
25. **Krolewski AS, Warram JH, Rand LI, Kahn CR:** Epidemiologic approach to the etiology of type 1 diabetes mellitus and its complications. *N.Engl.J.Med.* **317**, 1390-1398, **1987**
26. **Thomson G, Robinson WP, Kuhner MK, Joe S, MacDonald MJ, Gottschall JL, Barbosa J, Rich SS, Bertrams J, Baur MP, Partanen J, Tait BD, Schober E, Mayr WR, Ludvigsson J, Lindblom B, Farid NR, Thompson C, Deschamps I:** Genetic heterogeneity, modes of inheritance, and risk estimates for a joint study of Caucasians with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am.J.Hum.Genet.* **43**, 799-816, **1988**

27. **Gorsuch AN, Spencer KM, Lister J, Wolf E, Bottazo GF, Cudworth AG:** Can future type I diabetes be predicted? A study in families of affected children. *Diabetes* **31**, 862-866, **1982**
28. **Olmos P, A'Hern R, Heaton DA, Millward BA, Risley D, Pyke DA, Leslie RD:** The significance of the concordance rate for type 1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins. *Diabetologia* **31**, 747-750, **1988**
29. **Janeway CA, Travers P:** Grundbegriffe der Immunologie. *Immunologie.Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*, 1-43, **1995**
30. **Mosmann TR, Coffman RL:** TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu.Rev.Immunol.* **7**, 145-173, **1989**
31. **Murray JS, Madri J, Tite J, Carding SR, Bottomly K:** MHC control of CD4+ T cell subset activation. *J.Exp.Med.* **170**, 2135-2140, **1989**
32. **Hsieh CS, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM:** T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro. *J.Exp.Med.* **181**, 713-721, **1995**
33. **Romagnani S:** Biology of human Th1 and Th2 cells. *J.Clin.Immunol.* **15**, 121-129, **1995**
34. **De Carli M, D'Elis MM, Zancuoghi G, Romagnani S, Del Prete G:** Human Th1 and Th2 cells: Functional properties, regulation of development and role in autoimmunity. *Autoimmunity***18**, 301-308, **1994**
35. **Romagnani S:** Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu.Rev.Immunol.* **12**, 227-257, **1994**
36. **Foulis AK, McGill M, Farquharson MA:** Insulitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man - macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells. *J.Pathol.* **165**, 97-103, **1991**
37. **Pankewycz OG, Guan JX, Benedict JF:** Cytokines as mediators of autoimmune diabetes and diabetic complications. *Endocr.Rev.* **16**, 164-176, **1995**
38. **Trembleau S, Penna G, Bosi E, Mortara G, Gately MK, Adorini L:** Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice. *J.Exp.Med.* **181**, 817-821, **1995**
39. **Trembleau S, Penna G, Gregori S, Gately MK, Adorini L:** Deviation of pancreas-infiltrating cells to Th2 by interleukin-12 antagonist administration inhibits autoimmune diabetes. *Eur.J.Immunol.* **27**, 2330-2339, **1997**
40. **von Boehmer H, Kisielow P:** Self-nonsel self discrimination by T cells. *Science* **248**, 1369-1372, **1990**
41. **Schwartz RH:** Acquisition of immunologic self-tolerance. *Cell* **57**, 1073-1081, **1989**
42. **Ramsdell F, Fowlkes BJ:** Clonal deletion versus clonal anergy: the role of the thymus in inducing self tolerance. *Science* **248**, 1342-1348, **1990**

43. **Bloom BR, Salgame P, Diamond B:** Revisiting and revising suppressor T cells. *Immunol.Today* **13**, 131-136, **1992**
44. **Dorf ME, Kuchroo VK, Collins M:** Suppressor T cells: some answers but more questions. *Immunol.Today* **13**, 241-243, **1992**
45. **Gepts W:** Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* **14**, 619-633, **1965**
46. **Hanenberg H, Kolb-Bachofen V, Kantwerk-Funke G, Kolb H:** Macrophage infiltration precedes and is a prerequisite lymphocytic insulinitis in pancreatic islets in pre-diabetic BB rats. *Diabetologia* **32**, 126-132, **1989**
47. **Itoh N, Hanafusa T, Miyazaki A, Miyagawa J, Yamagata K, Yamamoto K, Waguri M, Imagawa A, Tamura S, Inada M, Kawata S, Tarui S, Kono N, Matsuzawa Y:** Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J.Clin.Invest.* **92**, 2313-2322, **1993**
48. **Huang X, Yuang J, Goddard A, Foulis A, James R, Lemmark A, Pujol-Borrel R, Rabinovitch A, Somoza N, Stewart TA:** Interferon expression in the pancreases of patients with type 1 diabetes. *Diabetes* **44**, 658-664, **1995**
49. **Sarvetnick N, Liggitt D, Pitts SL, Hansen SE, Stewart TA:** Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon-gamma. *Cell* **52**, 773-782, **1988**
50. **Atkinson MA, Maclaren NK:** The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N.Engl.J.Med.* **331**, 1428-1436, **1994**
51. **Hanninen A, Jalkanen S, Salmi M, Toikkanen S, Nikolakaros G, Simell O:** Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *J.Clin.Invest.* **90** , 1901-1910, **1992**
52. **Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL:** Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science* **222**, 1337-1339, **1983**
53. **Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, De Camilli P:** Identification of the 64k autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* **347**, 151-156, **1990**
54. **Karlsen AE, Hagopian WA, Petersen JS, Boel E, Dyrberg T, Grubin CE, Michelsen BK, Madsen OD, Lemmark A:** Recombinant glutamic acid decarboxylase (representing the single isoform expressed in human islets) detects IDDM-associated 64K autoantibodies. *Diabetes* **41**, 1355-1359, **1992**
55. **Seissler J, Amann J, Mauch L, Haubruck H, Wolfahrt S, Bieg S, Richter W, Holl R, Heinze E, Northemann W, Scherbaum WA:** Prevalence of autoantibodies

- to the 65- and 67-kD isoforms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J.Clin.Invest.* **92**, 1394-1399, **1993**
56. **Lernmark A:** Glutamic acid decarboxylase - Gene to Antigen to Disease. *J.Intern.Med.* **240**, 259-277, **1996**
57. **Rabin DU, Pleasic SM, Shapiro JA, Yoo-Warren H, Oles J, Hicks JM, Goldstein DE, Rae PM:** Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. *J.Immunol.* **152**, 3183-3188, **1994**
58. **Lan MS, Lu J, Goto Y, Notkins AL:** Molecular cloning and identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma. *DNA Cell Biol.* **13**, 505-514, **1994**
59. **Bonifacio E, Genovese S, Braghi S, Bazzigaluppi E, Lampasona V, Bingley PJ, Rogge L, Pastore MR, Bognetti E, Bottazzo GF, Gale EA, Bosi E:** Islet autoantibody markers in IDDM: Risk assessment strategies yielding high sensitivity. *Diabetologia* **38**, 816-822, **1995**
60. **Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HA, Eisenbarth GS:** Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* **45**, 926-933, **1996**
61. **Yoon JW:** Role of viruses in the pathogenesis of IDDM. *Ann.Med.* **23**, 437-445, **1991**
62. **Lindberg B, Ahlfors K, Carlsson A, Ericsson UB, Landin-Olsson M, Lernmark A, Ludvigsson J, Sundkvist G, Ivarsson SA:** Previous exposure to measles, mumps and rubella -but not vaccination during adolescence- correlates to the prevalence of pancreatic and thyroid autoantibodies. *Pediatrics* **104**, 12, **1999**
63. **McKinney PA, Parslow R, Gurney KA, Law GR, Bodansky HJ, Williams R:** Perinatal and neonatal determinants of childhood type 1 diabetes. A case-control study in Yorkshire, U.K. *Diabetes Care* **22**, 928-932, **1999**
64. **EURODIAB Substudy 2 Study Group:** Infections and vaccinations as risk factors for childhood type I (insulin-dependent) diabetes mellitus: a multicentre case-control investigation. *Diabetologia* **43**, 47-53, **2000**
65. **Nakagawa K, Harrison LC:** The potential roles of endogenous retroviruses in autoimmunity. *Immunol.Rev.* **152**, 193-236, **1996**
66. **Conrad B, Weissmahr RN, Boni J, Arcari R, Schupbach J, Mach B:** A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type 1 diabetes. *Cell* **90**, 303-313, **1997**
67. **Ginsberg-Fellner F, Witt ME, Yagihashi S, Dobersen MJ, Taub F, Fedun B, McEvoy RC, Roman S.H., Davies RG, Cooper LZ:** Congenital rubella syndrome as a model for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: increased prevalence of islet cell surface antibodies. *Diabetologia* **27 Suppl.**, 87-89, **1984**

68. **Dahlquist G, Ivarsson S, Lindberg B, Forsgren M:** Maternal enteroviral infection during pregnancy as a risk factor for childhood IDDM. A population-based case-control study. *Diabetes* **44**, 408-413, **1995**
69. **Hyoety H, Hiltunen M, Knip M, Laakkonen M, Vahasalo P, Karjalainen J, Koskela P, Roivainen M, Leinikki P, Hovi T:** A prospective study of the role of Coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study. *Diabetes* **44**, 652-657, **1995**
70. **Karjalainen J, Martin JM, Knip M, Ilonen J, Robinson BH, Savilahti E, Akerblom HK, Dosch HM:** A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus. *N.Engl.J.Med.* **327**, 302-307, **1992**
71. **Atkinson MA, Bowman MA, Kao KJ, Campbell L, Dush PJ, Shah SC, Simell O, Maclaren NK:** Lack of immune responsiveness to bovine serum albumin in insulin-dependent diabetes. *N.Engl.J.Med.* **329**, 1853-1858, **1993**
72. **Couper JJ, Steele C, Beresford S, Powell T, McCaul K, Pollard A, Gellert S, Tait B, Harrison LC, Colman PG:** Lack of association between duration of breast-feeding or introduction of cow's milk and development of islet autoimmunity. *Diabetes* **48**, 2145-2149, **1999**
73. **Harrison LC, Honeyman MC:** Cow's milk and type 1 diabetes: the real debate is about mucosal immune function. *Diabetes* **48**, 1501-1507, **1999**
74. **Hyponen E, Kenward MG, Virtanen SM, Piitulainen A, Virta-Autio P, Tuomilehto J, Knip M, Akerblom HK:** Infant feeding, early weight gain, and risk of type 1 diabetes. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetes Care* **22**, 1961-1965, **1999**
75. **Virtanen SM, Hyponen E, Laara E, Vahasalo P, Kulmala P, Savola K, Rasanen L, Aro A, Knip M, Akerblom HK:** Cow's milk consumption, disease-associated autoantibodies and type 1 diabetes mellitus: a follow-up study in siblings of diabetic children. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabet.Med.* **15**, 730-738, **1998**
76. **Szopa TM, Ward T, Dronfield DM, Portwood ND, Taylor KW:** Coxsackie B4 viruses with potential to damage beta cells of the islets are present in clinical isolates. *Diabetologia* **33**, 325-328, **1990**
77. **Szopa TM, Dronfield DM, Ward T, Taylor KW:** In vivo infection of mice with Coxsackie B4 virus induces long-term functional changes in pancreatic islets with minimal alteration in blood glucose. *Diabetic Med.* **6**, 314-319, **1989**
78. **Szopa TM, Tichener PA, Portwood ND, Taylor KW:** Diabetes mellitus due to viruses - some recent developments. *Diabetologia* **36**, 687-695, **1993**
79. **Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL:** Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N.Engl.J.Med.* **300**, 1173-1179, **1979**
80. **Bopegamage SA, Petrovicova A:** In vitro infection of mouse pancreatic islet cells with Coxsackie viruses. *Acta Virol.* **38**, 251-255, **1994**

81. **Campbell IL, Oxbrow L, West J, Harrison LC:** Regulation of MHC protein expression in pancreatic beta cells by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha. *Mol.Endocrinol.* **2**, 101-107, **1988**
82. **Campbell IL, Cutri A, Wilkinson D, Boyd AW, Harrison LC:** Intercellular adhesion molecule 1 expression is induced on isolated human endocrine islet cells by cytokines but not by reovirus infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **86**, 4282-4286, **1989**
83. **Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, Atkinson MA, Maclaren NK, Tobin AJ:** Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J.Clin.Invest.* **89**, 283-292, **1992**
84. **Hou J, Said C, Franchi D, Dockstader P, Chatterjee NK:** Antibodies to glutamic acid decarboxylase and P-2C peptides in sera from Cocksackie virus B4-infected mice and IDDM patients. *Diabetes* **43**, 1260-1266, **1994**
85. **Kwok WW, Domeier ML, Raymond FC, Byers P, Nepom GT:** Allele-specific motifs characterize HLA-DQ interactions with a diabetes-associated peptide derived from glutamic acid decarboxylase. *J.Immunol.* **156**, 2171-2177, **1996**
86. **Richter W, Mertens T, Schoel B, Muir P, Ritzkowsky A, Scherbaum WA, Boehm B:** Sequence homology of the diabetes-associated autoantigen glutamate decarboxylase with Cocksackie B4-2C protein and heat shock protein 60 mediates no molecular mimicry of autoantibodies. *J.Exp.Med.* **180**, 721-726, **1994**
87. **Friedman SM, Tumang JR, Crow MK:** Microbial superantigens as etiopathogenic agents in autoimmunity. *Rheum.Dis.Clin.North Am.* **19**, 207-222, **1993**
88. **Conrad B, Weidman E, Trucco G, Rudert WA, Behboo R, Ricordi C, Rodriguez-Rilo H, Finegold D, Trucco M:** Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetiology. *Nature* **371**, 351-355,
89. **Gold DP:** TCR V gene usage in autoimmunity. *Curr.Opin.Immunol.* **6**, 907-912, **1994**
90. **Crisa L, Mordes JP, Rossini AA:** Autoimmune diabetes mellitus in the BB rat. *Diabetes Metab.Rev.* **8**, 4-37, **1992**
91. **Bottazo GF, Dean BM, McNally JM, MacKay EH, Swift PG, Gamble DR:** In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N.Engl.J.Med.* **313**, 353-360, **1985**
92. **Van der Auwera B, Schuit F, Lyaruu I, Falorni A, Svanholm S, Vandewalle CL, Gorus FK:** 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**, 2567-2573, **1995**
93. **Singal DP, Blajchman MA:** Histocompatibility (HLA) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. *Diabetes* **22**, 429-432, **1973**

94. **Nerup J, Platz P, Anderseen OO:** HLA antigens and diabetes mellitus. *Lancet* **2(7885)**, 864-866, **1974**
95. **Campbell RD, Trowsdale J:** Map of the human MHC. *Immunol.Today***14**, 349-352, **1993**
96. **Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Charron D, Dupont B, Erlich HA, Mach B, Mayr WR:** Nomenclature for factors of the HLA system, 1995. *Tissue Antigens* **46**, 1-18, **1995**
97. **Platz P, Jakobsen BK, Morling N, Ryder LP, Svejgaard A, Thomsen M, Christy M, Kromann H, Benn J, Nerup J, Green A, Hauge M:** HLA-D and DR-antigens in genetic analysis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* **21**, 108-115, **1981**
98. **Owerbach D, Lemmark A, Platz P, Ryder LP, Rask L, Peterson PA, Ludvigsson J:** HLA-D region β -chain DNA endonuclease fragments differ between HLA-DR identical healthy and insulin-dependent diabetic individuals. *Nature* **303**, 815-817, **1983**
99. **Nepom BS, Palmer J, Kim SJ, Hansen JA, Holbeck SL, Nepom GT:** Specific genomic markers for the HLA-DQ subregion discriminate between DR4+ insulin-dependent diabetes mellitus and DR4+ seropositive juvenile rheumatoid arthritis. *J.Exp.Med.* **164**, 345-350, **1986**
100. **Livak KJ, Marmaro J, Todd JA:** Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nat.Genet.* **9**, 341-342, **1995**
101. **Badenhoop K, Walfish PG, Rau H, Fischer S, Nicolay A, Bogner U, Schleusener H, Usadel KH:** Susceptibility and Resistance Alleles of Human Leukocyte Antigen (HLA) DQA1 and HLA DQB1 Are Shared in Endocrine Autoimmune Diseases. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **80**, 2112-2117, **1995**
102. **Asagami C, Muto M, Hirota T, Shimizu T, Hamamoto Y:** Anti-tumor effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) in seborrheic keratosis. *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.* **1**, 94-96, **1996**
103. **Nepom GT:** Immunogenetics and IDDM. *Diabetes Rev.* **1**, 93-103, **1993**
104. **Sanjeevi CB, Hook P, Landin-Olsson M, Kockum I, Dahlquist G, Lybrand TP, Lemmark A:** DR4 subtypes and their molecular properties in a population based study of Swedish childhood diabetes. *Tissue Antigens* **47**, 275-283, **1996**
105. **Donner H, Tonjes RR, van der Auwera B, Siegmund T, Braun J, Weets I, Herwig J, Kurth R, Usadel KH, Badenhoop K:** The presence or absence of a retroviral long terminal repeat influences the genetic risk for type 1 diabetes conferred by human leukocyte antigen DQ haplotypes. Belgian Diabetes Registry. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **84**, 1404-1408, **1999**
106. **Kwok WW, Domeier ML, Johnson ML, Nepom GT, Koelle DM:** HLA-DQB1 codon 57 is critical for peptide binding and recognition. *J.Exp.Med.* **183**, 1253-1258, **1996**

107. **Nepom BS, Nepom GT, Coleman M, Kwok WW:** Critical contribution of β chain residue 57 in peptide binding ability of both HLA DR and DQ molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **93**, 7202-7206, **1996**
108. **Penzotti JE, Doherty D, Lybrand TP, Nepom GT:** A structural model for TCR recognition of the HLA class II shared epitope sequence implicated in susceptibility to rheumatoid arthritis. *J.Autoimmunity* **9**, 287-293, **1996**
109. **Todd JA, Acha-Orbea H, Bell JI, Chao N, Fronck Z, Jacob CO, McDermott M, Sinha AA, Timmerman L, Steinman L, McDevitt HO:** A molecular basis for MHC class II-associated autoimmunity. *Science* **240**, 1003-1009, **1988**
110. **Bell JI, Todd JA, McDevitt HO:** The molecular basis of HLA-disease association. *Adv.Hum.Genet.* **18**, 1-41, **1989**
111. **Atkinson MA, Maclaren NK:** The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N.Engl.J.Med.* **331**, 1428-1436, **1994**
112. **Lucassen AM, Julier C, Beressi JP, Boitard C, Froguel P, Lathrop M, Bell JI:** 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**, 305-310, **1993**
113. **Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, Copeman JB, Cordell HJ, Pritchard LE, Reed PW, Gough SC, Jenkins SC, Palmer SM, Balfour KM, Rowe BR, Farrall M, Barnett AH, Bain SC, Todd JA:** A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* **371**, 130-136, **1994**
114. **Thorsby E, Ronningen KS:** Particular HLA-DQ molecules play a dominant role in determining susceptibility or resistance to type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* **36**, 371-377, **1993**
115. **Copeman JB, Cucca F, Hearne CM, Cornall RJ, Reed PW, Ronningen KS, Undlien DE, Nistico L, Buzzetti R, Tosi R, Pociot F, Nerup J, Cornelis F, Barnett AH, Bain SC, Todd JA:** Linkage disequilibrium mapping of a type 1 diabetes susceptibility gene (IDDM7) to chromosome 2q31-q33. *Nat.Genet.* **9**, 80-85, **1995**
116. **Luo DF, Bui MM, Muir A, Maclaren NK, Thomson G, She JX:** Affected-sib-pair mapping of a novel susceptibility gene to insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM8) on chromosome 6q25-q27. *Am.J.Hum.Genet.* **57**, 911-919, **1995**
117. **Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, Giovannini C, Bosi E, Martinez Larrad, M.T., Rios MS, Chow SS, Cockram CS, Jakobs K, Mijovic C, Bain SC, Barnett AH, Vandewalle CL, Schuit F, Gorus FK, Reg BD, Rosi R, Pozzili P, Todd JA:** The CTLA-4 gene region on chromosome 2q33 is linked to, and associated with type 1 diabetes. *Hum.Mol.Genet.* **5**, 1075-1080, **1996**
118. **Todd JA, Farrall M:** Panning for gold: genome-wide scanning for linkage in type 1 diabetes. *Hum.Mol.Genet.* **5 Spec No**, 1443-1448, **1996**
119. **Cucca F, Todd JA:** HLA/MHC: Genes, Molecules and Function. *BIOS, Oxford* , 383-406, **1996**

120. **Bennett ST, Lucassen AM, Gough SC, Powell EE, Undlien DE, Pritchard LE, Merriman ME, Kawaguchi Y, Dronsfield MJ, Pociot F:** Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat.Genet.* **9**, 284-292, **1995**
121. **Field LL, Tobias R, Magnus T:** A locus on chromosome 15q26 (IDDM3) produces susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nat.Genet.* **8**, 189-194, **1994**
122. **Hashimoto L, Habita C, Beressi JP, Delepine M, Besse C, Cambon-Thomsen A, Deschamps I, Rotter JI, Djoulah S, James MR, Froguel P, Weissenbach J, Lathrop M, Julier C:** Genetic mapping of a susceptibility locus for insulin-dependent diabetes mellitus on chromosome 11q. *Nature* **371**, 161-164, **1994**
123. **Luo DF, Buzzetti R, Rotter JI, Maclaren NK, Raffel LJ, Nistico L, Giovannini C, Pozzilli P, Thomson G, She JX:** Confirmation of three susceptibility genes to insulin-dependent diabetes mellitus: IDDM4, IDDM5 and IDDM8. *Hum.Mol.Genet.* **5**, 693-698, **1996**
124. **Merriman T, Twells R, Merriman ME, Eaves I, Cox R, Cucca F, McKinney P, Shield J, Baum D, Bosi E, Pozzilli P, Nistico L, Buzzetti R, Joner G, Ronningen KS, Thorsby E, Undlien DE, Pociot F, Nerup J, Bain SC, Barnett AH, Todd JA:** Evidence for allelic association-dependent methods for a type 1 diabetes polygene (IDDM6) on chromosome 18q21. *Hum.Mol.Genet.* **6**, 1003-1010, **1997**
125. **Esposito L, Hill NJ, Pritchard LE, Cucca F, Muxworthy C, Merriman ME, Wilson A, Julier C, Delepine M, Tuomilehto J, Tuomilehto-Wolf E, Ionesco-Tirgoviste C, Nistico L, Buzzetti R, Pozzilli P, Ferrari M, Bosi E, Pociot F, Nerup J, Bain SC, Todd JA:** Genetic analysis of chromosome 2 in type 1 diabetes: analysis of putative loci IDDM7, IDDM12, and IDDM13 and candidate genes NRAMP1 and IA-2 and the interleukin-1 gene cluster. *IMDIAB Group. Diabetes* **47**, 1797-1799, **1998**
126. **Davies JL, Cucca F, Goy JV, Atta ZA, Merriman ME, Wilson A, Barnett AH, Bain SC, Todd JA:** Saturation multipoint linkage mapping of chromosome 6q in type 1 diabetes. *Hum.Mol.Genet.* **5**, 1071-1074, **1996**
127. **Rowe RE, Wapelhorst B, Bell GI, Risch N, Spielman RS, Concannon P:** Linkage and association between insulin-dependent diabetes (IDDM) susceptibility and markers near the glukokinase gene on chromosome 7. *Nat.Genet.* **10**, 240-242, **1995**
128. **Moczulski DK:** Major susceptibility locus for nephropathy in type 1 diabetes on chromosome 3q: results of a novel discordant sib-pair analysis. *Diabetes* **47**, 1164-1169, **1998**
129. **Reed PW, Cucca F, Jenkins SC, Merriman ME, Wilson A, McKinney P, Bosi E, Joner G, Ronningen KS, Thorsby E, Undlien DE, Merriman T, Barnett AH, Bain SC, Todd JA:** Evidence for a type 1 diabetes susceptibility locus (IDDM10) on human chromosome 10p11-10q11. *Hum.Mol.Genet.* **6**, 1011-1016, **1997**

130. **Field LL, Tobias R, Thomson G, Plon S:** Susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus maps to a locus (IDDM11) on human chromosome 14q24.3-q31. *Genomics* **33**, 1-8, **1996**
131. **Morahan G, Huang D, Tait BD, Colman PG, Harrison LC:** Markers on distal chromosome 2q linked to insulin-dependent diabetes mellitus. *Science* **272**, 1811-1813, **1996**
132. **Delepine M, Pociot F, Habita C, Hashimoto L, Froguel P, Rotter J, Cambon-Thomsen A, Deschamps I, Djoulah S, Weissenbach J, Nerup J, Lathrop M, Julier C:** Evidence of a non-MHC susceptibility locus in type 1 diabetes linked to HLA on chromosome 6. *Am.J.Hum.Genet.* **60**, 174-187, **1997**
133. **Owerbach D, Gabbay KH:** The HOXD8 locus (2q31) is linked to type I diabetes. Interaction with chromosome 6 and 11 disease susceptibility loci. *Diabetes* **44**, 132-136, **1995**
134. **Cucca F, Goy JV, Kawaguchi Y, Esposito L, Merriman ME, Wilson AJ, Cordell HJ, Bain SC, Todd JA:** A male-female bias in type 1 diabetes and linkage to chromosome Xp in MHC HLA-DR3-positive patients. *Nat.Genet.* **19**, 301-302, **1998**
135. **Hodge SE, Anderson CE, Neiswanger K, Field LL, Spence MA, Sparkes RS, Sparkes MC, Christ M, Terasaki PI, Rimo DL, Rotter JI:** Close linkage between diabetes mellitus and Kidd blood group. *Lancet* **2(8252)**, 893-895, **1981**
136. **Naparstek Y, Plotz PH:** The role of autoantibodies in autoimmune disease. *Annu.Rev.Immunol.* **11**, 79-104, **1993**
137. **Nepom GT, Erlich H:** MHC class II molecules and autoimmunity. *Annu.Rev.Immunol.* **9**, 493-525, **1991**
138. **Campbell RD, Milner CM:** MHC genes in autoimmunity. *Curr.Opin.Immunol.* **5**, 887-893, **1993**
139. **De Carli M, D'Elis MM, Mariotti S, Marocci C, Pinchera A, Ricci M, Romagnani S, Del Prete G:** Cytolytic T cells with Th1-like cytokine profile predominate in retroorbital lymphocytic infiltrates of Graves' ophthalmopathy. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **77**, 1120-1124, **1993**
140. **Quayle AJ, Chomarat P, Miossec P, Kjeldsen-Kragh J, Forre O, Natvig JB:** Rheumatoid inflammatory T-cell clones express mostly Th1 but also Th2 and mixed (Th0-like) cytokine patterns. *Scand.J.Immunol.* **38**, 75-82, **1993**
141. **Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B, Raus J, Weiner HL, Hafler DA:** Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J.Exp.Med.* **179**, 973-984, **1994**
142. **Sanchez-Lugo F:** Prevalence of thyroid autoimmunity in insulin dependent diabetes mellitus in the Bayamon region. *Bol.Assoc.Med.P.R.* **83**, 54-57, **1991**

143. **Hansen D, Bennedbaek FN, Hansen LK, Hoier-Madsen M, Jacobsen BB, Hegedus L:** Thyroid function, morphology and autoimmunity in young patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur.J.Endocrinol.* **140**, 512-518, **1999**
144. **Lorini R, D'Annunzio G, Vitali L, Scaramuzza A:** IDDM and autoimmune thyroid disease in the pediatric age group. *J.Pediatr.Endocrinol.Metab.* **9**, S89-S94, **1996**
145. **De Block CE, De Leeuw IH, Van Gaal LF:** High prevalence of manifestations of gastric autoimmunity in parietal cell antibody-positive type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. The Belgian Diabetes Registry. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **84**, 4062-4067, **1999**
146. **Mellanby E:** An experimental investigation on rickets. *Lancet* **1(4985)**, 407-412, **1919**
147. **McCollum EV, Simmonds N, Becker JE, Shipley PG:** Studies on experimental rickets. XXI. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. *J.Biol.Chem.* **53**, 293-312, **1922**
148. **Morii H, Lund J, Neville PF, Deluca HF:** Biological activity of a vitamin D metabolite. *Arch.Biochem.Biophys.* **120**, 508-512, **1967**
149. **Blunt JW, Deluca HF, Schnoes HK:** 25-Hydroxycholecalciferol: A biologically active metabolite of vitamin D3. *Biochemistry* **7**, 3317-3322, **1968**
150. **Holick MF, Schnoes HK, Deluca HF, Suda T, Cousins RJ:** Isolation and identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol. A metabolite of vitamin D active in intestine. *Biochemistry* **10**, 2799-2804, **1971**
151. **Lawson DE, Fraser DR, Kodicek E, Morris HR, Williams DH:** Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a new kidney hormone controlling calcium metabolism. *Nature* **230**, 228-230, **1971**
152. **Norman AW, Myrtle JF, Midgett RJ, Nowicki HG, Williams V, Popjak G:** 1,25-Dihydroxycholecalciferol: Identification of the proposed active form of vitamin D3 in the intestine. *Science* **173**, 51-54, **1971**
153. **Napoli JL, Horst RL:** Vitamin D Metabolism. *Martinus Nijhoff, Boston*, 91-123, **1984**
154. **Broadus AE, Horst RL, Lang R, Littledike ET, Rasmussen H:** The importance of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D in the pathogenesis of hypercalcuria and renal-stone formation in primary hyperparathyroidism. *N.Engl.J.Med.* **302**, 421-426, **1980**
155. **Reddy GS, Tsemg KY:** Calcitroic acid, end product of renal metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 through C-24 oxidation pathway. *Biochemistry* **28**, 1763-1769, **1989**
156. **Boyle IT, Miravet L, Gray RW, Holick MF, Deluca HF:** The response of intestinal calcium transport to 25-hydroxy- and 1,25-dihydroxyvitamin D in nephrectomized rats. *Endocrinology* **90**, 605-608, **1972**

157. **Bauer GC, Carlsson A, Lindquist B:** Evaluation of accretion, resorption, and exchange reactions in the skeleton. *Kungl.Fysiograf.Sallskapets I.Lund Forhandlingar* **25**, 3-18, **1955**
158. **Chambers TJ, Magnus CJ:** Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. *J.Pathol.* **136**, 27-39, **1982**
159. **Marx SJ, Liberman UA, Eil C:** Calciferols: actions and deficiencies in action. *Vitam.Horm.* **40**, 235-308, **1983**
160. **Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF:** Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol.Rev.* **78**, 1193-1231, **1998**
161. **Bhalla AK, Amento EP, Clemens TL, Holick MF, Krane SM:** Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **57**, 1308-1310, **1983**
162. **Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC:** 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ receptors in human leukocytes. *Science* **221**, 1181-1183, **1983**
163. **Bishop JE, Reichel H, Koeffler HP, Norman AW:** 1,25(OH)₂ D₃ receptor in pulmonary alveolar macrophages. *Vitamin D.Chemical, Biochemical and Clinical Update Walter de Gruyter & Co, Berlin*, 127, **1985**
164. **Girasole G, Wang JM, Pedrazzoni M, Pioli G, Balotta C, Passeri M, Lazzarin A, Ridolfo A, Mantovani A:** Augmentation of monocyte chemotaxis by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃: Stimulation of defective migration in AIDS patients. *J.Immunol.* **145**, 2459-2464, **1990**
165. **Crowle AJ, Salfinger M, May MH:** 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ synergizes with pyrazinamide to kill tubercle bacilli in cultured human macrophages. *Am.Rev.Respir.Dis.* **139**, 549-552, **1989**
166. **Cohen MS, Mesler DE, Snipes RG, Gray TK:** 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ activates secretion of hydrogen peroxide by human monocytes. *J.Immunol.* **136**, 1049-1053, **1986**
167. **Abe E, Shiina Y, Miyaura C, Tanaka H, Hayashi T, Kanegasaki S, Saito M, Nishii Y, Deluca HF, Suda T:** Activation and fusion induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and their relation in alveolar macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **81**, 7112-7116, **1984**
168. **Rigby WF, Waugh M, Graziano RF:** Regulation of human monocyte HLA-DR and CD4 antigen expression, and antigen presentation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Blood* **76**, 189-197, **1990**
169. **Griffin MD, Lutz WH, Phan VA, Bachman LA, McKean DJ, Kumar R:** Potent Inhibition of Dendritic Cell Differentiation and Maturation by Vitamin D Analogs. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **270**, 701-708, **2000**

170. **Tokuda N, Mizuki N, Kasahara M, Levy RB:** 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ down-regulation of HLA-DR on human peripheral blood monocytes. *Immunology* **75**, 349-354, **1992**
171. **Rigby WF, Waugh MG:** Decreased accessory cell function and costimulatory activity by 1,25-dihydroxyvitamin D₃-treated monocytes. *Arthritis Rheum.* **35**, 110-119, **1992**
172. **Koeffler HP, Reichel H, Bishop JE, Norman AW:** Gamma interferon stimulates production of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by normal human macrophage. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **127**, 596-603, **1985**
173. **Koeffler HP, Amatruda T, Ikekawa N, Kobayashi Y, Deluca HF:** Induction of macrophage differentiation of human normal and leukemic myeloid stem cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and its fluorinated analogues. *Cancer Res.* **44**, 5624-5628, **1984**
174. **Amento EP, Bhalla AK, Kurnick JT, Kradin RL, Clemens TL, Holick SA, Holick MF, Krane SM:** 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces maturation of the human monocyte cell line U937, and, in association with a factor from human T lymphocytes, augments production of the monokine, mononuclear cell factor. *J.Clin.Invest.* **73**, 731-739, **1984**
175. **Hewison M, Dabrowski M, Faulkner L, Hughson E, Vadher S, Rut A, Brickell PM, O'Riordan JL, Katz DR:** Transfection of the vitamin D receptor cDNA into the monoblastoid cell line U937: The role of vitamin D₃ in homotypic macrophage adhesion. *J.Immunol.* **153**, 5709-5719,
176. **Hewison M, Dabrowski M, Vadher S, Faulkner L, Cockerill FJ, Brickell PM, O'Riordan JL, Katz DR:** Antisense inhibition of vitamin D receptor induces apoptosis in monoblastoid U937 cells. *J.Immunol.* **156**, 4391-4400, **1996**
177. **Bunce CM, Wallington LA, Harrison P, Williams GR, Brown G:** Treatment of HL60 cells with various combinations of retinoids and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ results in differentiation towards neutrophils or monocytes or a failure to differentiate and apoptosis. *Leukemia* **9**, 410-418, **1995**
178. **Rigby WF:** The immunobiology of vitamin D. *Immunology Today* **9**, 54-58, **1988**
179. **Thompson EB:** Apoptosis and steroid hormones. *Mol.Endocrinol.* **8**, 665-673, **1994**
180. **Rigby WF, Stacy T, Fanger MW:** Inhibition of T lymphocyte mitogenesis by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol). *J.Clin.Invest.* **74**, 1451-1455, **1984**
181. **Rigby WF, Noelle RJ, Krause K, Fanger MW:** The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human T lymphocyte activation and proliferation: a cell-cycle analysis. *J.Immunol.* **135**, 2279-2286, **1985**
182. **Heberden C, Denis I, Pointillart A, Mercier T:** TGF-beta and calcitriol. *Gen.Pharmac.* **30**, 145-151, **1998**
183. **Meehan MA, Kerman RH, Lemire JM:** 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ enhances the generation of non-specific suppressor cells while inhibiting the induction of cytotoxic cells in human MLR. *Cell Immunol.* **140**, 400-409, **1992**

184. **Veldman CM, Cantorna MT, Deluca HF:** Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in the immune system. *Arch.Biochem.Biophys.* **374**, 334-338, **2000**
185. **Mathieu C, Waer M, Laureys J, Rutgeerts O, Bouillon R:** Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Diabetologia* **37**, 552-558, **1994**
186. **Lemire JM, Adams JS, Kermani-Arab V, Bakke AC, Sakai R, Jordan SC:** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses human T helper/inducer lymphocyte activity in vitro. *J.Immunol.* **134**, 3032-3035, **1985**
187. **Reichel H, Koeffler HP, Tobler A, Norman AW:** 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits gamma-interferon synthesis by normal human peripheral blood lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **84**, 3385-3389, **1987**
188. **Lemire JM, Archer DC, Beck L, Spiegelberg HL:** Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3: preferential inhibition of Th-1 functions. *J.Nutr.* **125**, 1704S-1708S, **1995**
189. **Lemire JM:** Immunomodulatory actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **53**, 599-602, **1995**
190. **Willheim M, Thien R, Schratlbauer K, Bajna E, Holub M, Gruber R, Baier K, Pietschmann P, Reinisch W, Scheiner O, Peterlik M:** Regulatory effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on the cytokine production of human peripheral blood lymphocytes. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **84**, 3739-3744, **1999**
191. **Mattner F, Smiroldo S, Galbiati F, Muller M, Di Lucia P, Poliani PL, Martino G, Panina-Bordignon P, Adorini L:** Inhibition of Th1 development and treatment of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Eur.J.Immunol.* **30**, 498-508, **2000**
192. **Manolagas SC, Hustmyer FG, Yu XP:** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and the immune system. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **191**, 238-245, **1989**
193. **Gedik O, Akalin S:** Effects of vitamin D deficiency and repletion on insulin and glucagon secretion in man. *Diabetologia* **29**, 142-145, **1986**
194. **Yousefi S, Vu D, Carandang G, Yamamoto R, Granger G, Vaziri N, Ocariz J, Cesario T:** Effect of vitamin D3 on the production of cytotoxic factors by human peripheral blood mononuclear cells. *Cancer Res.* **49**, 5083-5086, **1989**
195. **Gepner P, Amor B, Fournier C:** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 potentiates the in vitro inhibitory effect of cyclosporin A on T cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* **32**, 31-36, **1989**
196. **Tamori S, Uchiyama T, Uchino H:** 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances the up-regulation of interleukin-2 receptor (p55) by interleukin-2. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi* **52**, 996-1003, **1989**
197. **Connor RI, Rigby WF:** 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits productive infection of human monocytes by HIV-1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **176**, 852-859, **1991**

198. **Polla BS, Healy AM, Wojno WC, Krane SM:** Hormone 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ modulates heat shock response in monocytes. *Am.J.Physiol.* **252**, C640-C649, **1987**
199. **Gavison R, Bar-Shavit Z:** Impaired macrophage activation in vitamin D₃ deficiency: differential in vitro effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on mouse peritoneal macrophage functions. *J.Immunol.* **143**, 3686-3690, **1989**
200. **Pike WJ, Gooze LL, Haussler MR:** Biochemical evidence for 1,25-dihydroxyvitamin D receptor macromolecules in parathyroid, pancreatic, pituitary, and placental tissues. *Life Sci.* **26**, 407-414, **1980**
201. **Stumpf WE:** Vitamin D-Soltriol. The heliogenic steroid hormone: somatotrophic activator and modulator. Discoveries from histochemical studies lead to new concepts. *Histochemistry* **89**, 209-219, **1988**
202. **Walters MR:** Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocr.Rev.* **13**, 719-764, **1992**
203. **Ozono K, Seino Y, Yano H, Yamaoka K:** 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ enhances the effect of refeeding in steady state preproinsulin messenger ribonucleic acid levels in rats. *Endocrinology* **126**, 2041-2045, **1990**
204. **Ishida H, Seino Y, Seino S, Tsuda K, Takemura J, Nishi S, Isizuka S, Imura H:** Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on pancreatic B and D cell function. *Life Sci.* **33**, 1779-1786, **1983**
205. **Bourlon PM, Faure-Dussert A, Billaudel B:** The de novo synthesis of numerous proteins is decreased during vitamin D₃ deficiency and is gradually restored by 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ repletion in the islets of langerhans of rats. *J.Endocrinol.* **162**, 101-109, **1999**
206. **Bouillon R, Verhaeghe J, Nyomba BL, Visser WJ, Van Baelen H, Thomasset M:** Interaction between vitamin D, insulin and diabetes mellitus. *Vitamin D: Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology, Walter de Gruyter & Co., New York* , 875, **1988**
207. **Seino Y, Sierra RI, Sonn YM, Jafari A, Birge SJ, Avioli LV:** The duodenal 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in rats with experimentally induced diabetes. *Endocrinology* **113**, 1721-1725, **1983**
208. **Ishida H, Cunningham NS, Henry HL, Norman AW:** The number of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors is decreased in both intestine and kidney of genetically diabetic db/db mice. *Endocrinology* **122**, 2436-2443, **1988**
209. **Nyomba BL, Verhaeghe J, Thomasset M, Lissens W, Bouillon R:** Bone mineral homeostasis in spontaneously diabetic BB rats. I. Abnormal vitamin D metabolism and impaired active intestinal calcium absorption. *Endocrinology* **124**, 565-572, **1989**
210. **Hahn HJ, Kuttler B, Mathieu C, Bouillon R:** 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ reduces MHC antigen expression on pancreatic beta-cells in vitro. *Transplant.Proc.* **29**, 2156-2157, **1997**

211. **Tokuda N, Mano T, Levy RB:** 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ antagonizes interferon-gamma-induced expression of class II major histocompatibility antigens on thyroid follicular and testicular Leydig cells. *Endocrinology* **127**, 1419-1427, **1990**
212. **Norman AW, Frankel JB, Heldt AM, Grodsky GM:** Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science* **209**, 823-825, **1980**
213. **Tucker G, Gaganon RE, Haussler MR:** Vitamin D₃-25-hydroxylase: tissue occurrence and apparent lack of regulation. *Arch.Biochem.Biophys.* **155**, 47-57, **1973**
214. **Ponchon G, Deluca HF:** Metabolites of vitamin D₃ and their biological activity. *J.Nutr.* **99**, 157-167, **1969**
215. **Madhok TC, Deluca HF:** Characteristics of the rat liver microsomal enzyme system converting cholecalciferol into 25-hydroxycholecalciferol. Evidence for the participation of cytochrome P-450. *Biochem.J.* **184**, 491-499, **1979**
216. **Bjorkhem I, Holmberg I:** Assay and properties of a mitochondrial 25-hydroxylase active on vitamin D₃. *J.Biol.Chem.* **253**, 842-849, **1978**
217. **Hayashi S, Usui E, Okuda K:** Sex-related difference in vitamin D₃ 25-hydroxylase of rat liver microsomes. *J.Biochem.(Tokyo)* **103**, 863-866, **1988**
218. **Cali JJ, Russell DW:** Characterization of human sterol 27-hydroxylase. A mitochondrial cytochrome P-450 that catalyzes multiple oxidation reaction in bile acid biosynthesis. *J.Biol.Chem.* **266**, 7774-7778, **1991**
219. **Fraser DR, Kodicek E:** Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite. *Nature* **228**, 764-766, **1970**
220. **Paulson SK, Deluca HF:** Subcellular location and propertie of rat renal 25-hydroxyvitamin D₃-1alpha-hydroxylase. *J.Biol.Chem.* **260**, 11488-11492, **1985**
221. **Ambrecht HJ, Wongsurawat N, Zenser TV, Davis BB:** Differential effects of parathyroid hormone on the renal 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and 24,25-dihydroxyvitamin D₃ production of young and adult rats. *Endocrinology* **111**, 1339-1344, **1982**
222. **Henry HL, Norman AW:** Vitamin D: metabolism and biological action. *Annu.Rev.Nutr.* **4**, 493-520, **1984**
223. **Deluca HF:** Vitamin D: the vitamin and the hormone. *Fed.Proc.* **33**, 2211-2219, **1974**
224. **Ambrecht HJ, Okuda K, Wongsurawat N, Nemani RK, Chen ML, Boltz MA:** Characterization and regulation of the vitamin D hydroxylases. *J.Steroid Biochem.* **43**, 1073-1081, **1992**
225. **Mawer EB, Hayes ME:** Renal and extra-renal synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D. *Prog Endocrinol.* **87**, 382-386, **1992**
226. **Gray RW, Weber HP, Dominguez JH, Lemann J:** The metabolism of vitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃ in normal and anephric humans. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **39**, 1045-1056, **1974**

227. **Labuda M, Fujiwara TM, Ross MV, Morgan K, Garcia-Heras J, Ledbetter DH, Hughes MR, Glorieux FH:** Two hereditary defects related to vitamin D metabolism map to the same region of human chromosome 12q13-14. *J.Bone Miner.Res.* **7**, 1447-1453, **1992**
228. **Kong XF, Zhu XH, Pei YL, Jackson DM, Holick MF:** Molecular cloning, characterization, and promoter analysis of the human 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**, 6988-6993, **1999**
229. **Tanaka Y, Castillo L, Deluca HF:** The 24-hydroxylation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J.Biol.Chem.* **252**, 1421-1424, **1977**
230. **Holick MF, Schnoes HK, Deluca HF, Gray RW, Boyle IT, Suda T:** Isolation and identification of 24,25-dihydroxycholecalciferol, a metabolite of vitamin D₃ made in the kidney. *Biochemistry* **11**, 4251-4255, **1972**
231. **Madhok TC, Schnoes HK, Deluca HF:** Mechanism of 25-hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylation: incorporation of oxygen-18 into the 24 position of 25-hydroxyvitamin D₃. *Biochemistry* **16**, 2142-2145, **1977**
232. **Ohyama Y, Okuda K:** Isolation and characterization of a cytochrome P-450 from rat kidney mitochondria that catalyzes the 24-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃. *J.Biol.Chem.* **266**, 8690-8695, **1991**
233. **Nakamura T, Nagai Y, Yamato H, Suzuki K, Orimo H:** Regulation of bone turnover and prevention of bone atrophy in ovariectomized beagle dogs by the administration of 24R,25 (OH)₂ D₃. *Calcif.Tissue Int.* **50**, 221-227, **1992**
234. **Yamato H, Okazaki R, Ishii T, Ogata E, Sato T, Kumegawa M, Akaogi K, Taniguchi N, Matsumoto T:** Effect of 24R,25-dihydroxyvitamin D₃ on the formation and function of osteoclastic cells. *Calcif.Tissue Int.* **52**, 255-260, **1993**
235. **St Arnaud R, Arabian A, Glorieux FH:** Abnormal bone development in mice deficient for the vitamin D 24-hydroxylase gene. *J.Bone Miner.Res.* **11**, S126, **1996**
236. **Schwartz Z, Sylvia VL, Del Toro F, Hardin RR, Dean DD, Boyan BD:** 24R,25-(OH)₂D₃ mediates its membrane receptor-dependent effects on protein kinase C and alkaline phosphatase via phospholipase A₂ and cyclooxygenase-1 but not cyclooxygenase-2 in growth plate chondrocytes. *J.Cell Physiol.* **182**, 390-401, **2000**
237. **Schwartz Z, Gilley RM, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD:** The effect of prostaglandin E₂ on costochondral chondrocyte differentiation is mediated by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and protein kinase C. *Endocrinology* **139**, 1825-1834, **1998**
238. **Schwartz Z, Gilley RM, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD:** Prostaglandins mediate the effects of 1,25-(OH)₂D₃ and 24,25-(OH)₂D₃ on growth plate chondrocytes in a metabolite-specific and cell maturation-dependent manner. *Bone* **24**, 475-484, **1999**
239. **Schwartz Z, Sylvia VL, Curry D, Luna MH, Dean DD, Boyan BD:** Arachidonic acid directly mediates the rapid effects of 24,25-dihydroxyvitamin D₃ via protein kinase C and indirectly through prostaglandin production in resting zone chondrocytes. *Endocrinology* **140**, 2991-3002, **1999**

240. **Hannah SS, Norman AW:** 1 α ,25(OH)₂ vitamin D₃-regulated expression of the eukaryotic genome. *Nutr.Rev.* **52**, 376-382, **1994**
241. **Chen ML, Boltz MA, Armbrecht HJ:** Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and phorbol ester on 25-hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid levels in primary cultures of rat renal cells. *Endocrinology* **132**, 1782-1788, **1993**
242. **Uhland-Smith A, Deluca HF:** The necessity for calcium for increased renal vitamin D receptor in response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochim.Biophys.Acta* **1176**, 321-326, **1993**
243. **Baksi SN, Kenny AD:** Vitamin D₃ metabolism in immature Japanese quail: effects of ovarian hormones. *Endocrinology* **101**, 1216-1220, **1977**
244. **Tanaka Y, Castillo L, Deluca HF:** Control of renal D hydroxylases in birds by sex hormones. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **73**, 2701-2705, **1976**
245. **Beckman MJ, Goff JP, Reinhardt TA, Beitz DC, Horst RL:** In vivo regulation of rat intestinal 24-hydroxylase: potential new role of calcitonin. *Endocrinology* **135**, 1951-1955, **1994**
246. **Garabedian M, Holick MF, Deluca HF, Boyle IT:** Control of 25-hydroxycholecalciferol metabolism by parathyroid glands. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **69**, 1673-1676, **1972**
247. **Nishimura A, Shinki T, Jin CH, Ohyama Y, Noshiro M, Okuda K, Suda T:** Regulation of messenger ribonucleic acid expression of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase in rat osteoblasts. *Endocrinology* **134**, 1794-1799, **1994**
248. **Frazer TE, White NH, Hough S, Santiago JV, McGee BR, Bryce G, Mallon J, Avioli LV:** Alterations in circulating vitamin D metabolites in the young insulin-dependent diabetic. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **53**, 1154-1159, **1981**
249. **Wongsurawat N, Armbrecht HJ, Zenser TV, Davis BB, Thomas ML, Forte LR:** 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and 24,25-dihydroxyvitamin D₃ production by isolated renal slices is modulated by diabetes and insulin in the rat. *Diabetes* **32**, 302-306, **1983**
250. **Knutson JC, Deluca HF:** 25-Hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase. Subcellular location and properties. *Biochemistry* **13**, 1543-1548, **1974**
251. **Evans RM:** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**, 889-895, **1988**
252. **O'Malley BW, McGuire WL, Kohler PO, Korenman SG:** Studies on the mechanism of steroid hormone regulation of specific proteins. *Recent Prog.Horm.Res.* **25**, 105-160, **1969**
253. **Norman AW:** The mode of action of vitamin D. *Biol.Rev.Camb.Philos.Soc* **43**, 97-137, **1968**

254. **Haussler MR, Norman AW:** Chromosomal receptor for a vitamin D metabolite. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **62**, 155-162, **1969**
255. **Brumbaugh PF, Haussler MR:** Specific binding of 1,25-dihydroxycholecalciferol to nuclear components of chick intestine. *J.Biol.Chem.* **250**, 1588-1594, **1975**
256. **Walters MR, Hunziker W, Norman AW:** Unoccupied 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors. Nuclear/cytosol ratio depends on ionic strength. *J.Biol.Chem.* **255**, 6799-6805, **1980**
257. **Hunziker W, Walters MR, Bishop JE, Norman AW:** Unoccupied and in vitro and in vivo occupied 1,25-dihydroxyvitamin D₃ intestinal receptors. Multiple biochemical forms and evidence for transformations. *J.Biol.Chem.* **258**, 8642-8648, **1983**
258. **Mangelsdorf DJ, Pike JW, Haussler MR:** Avian and mammalian receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D₃: in vitro translation to characterize size and hormone-dependent regulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **84**, 354-358,
259. **Wecksler WR, Okamura WH, Norman AW:** Studies on the mode of action of vitamin D -XIV. Quantitative assessment of the structural requirements for the interaction of 1alpha,25-dihydroxyvitamin with its chick intestinal mucosa receptor system. *J.Steroid Biochem.* **9**, 929-937, **1978**
260. **Wecksler WR, Norman AW:** A kinetic and equilibrium binding study of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ with its cytosol receptor from chick intestinal mucosa. *J.Biol.Chem.* **255**, 3571-3574, **1980**
261. **Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Pike JW, Sline J, O'Malley BW:** Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **85**, 3294-3298, **1988**
262. **Taymans SE, Pack S, Pak E, Orban Z, Barsony J, Zhuang Z, Stratakis CA:** The human vitamin D receptor gene (VDR) is localized to region 12cen-q12 by fluorescent in situ hybridization and radiation hybrid mapping: genetic and physical VDR map. *J.Bone Miner.Res.* **14**, 1163-1166, **1999**
263. **Szipirer J, Szipirer C, Riviere M, Levan G, Marynen P, Cassiman JJ, Wiese R, Deluca HF:** The Sp1 transcription factor gene (SP1) and the 1,25-dihydroxyvitamin D receptor gene (VDR) are colocalized on human chromosome arm 12q and rat chromosome 7. *Genomics* **11**, 168-173, **1991**
264. **Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi, S, Inoue Y, Morita K, Takeda E, Pike JW:** Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Molecular Endocrinology* **11**, 1165-1179, **1997**
265. **Crofts LA, Hancock MS, Morrison NA, Eisman JA:** Multiple promoters direct the tissue-specific expression of novel N-terminal variant human vitamin D receptor gene transcripts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**, 10529-10534, **1998**
266. **Pike JW, Kesterson RA, Scott RA, Kerner SA, McDonnell DP, O'Malley BW:** Vitamin D receptors: molecular structure of the protein and its chromosomal

gene. *Vitamin D: Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology*, Walter de Gruyter & Co., New York, 215-224, **1988**

267. **Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P:** Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* **320**, 134-139, **1986**
268. **Umesono K, Evans RM:** Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* **57**, 1139-1146, **1989**
269. **Jin CH, Kerner SA, Hong MH, Pike JW:** Transcriptional activation and dimerization functions of the human vitamin D receptor. *Mol.Endocrinol.* **10**, 945-957, **1996**
270. **Kream BE, Jose M, Yamada S, Deluca HF:** A specific high affinity binding macromolecule for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in fetal bone. *Science* **197**, 1086-1088, **1977**
271. **Chandler JS, Pike JW, Haussler MR:** 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ receptors in rat kidney cytosol. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **90**, 1057-1063, **1979**
272. **Saunders TJ, Opperman LA, Gorman J, Bruns DE, Bruns ME:** Tissue distribution of vitamin D receptor (VDR) mRNA in mice and rats and its control during reproduction. *J.Bone Miner.Res.* **5**, S263, **1990**
273. **Reinhardt TA, Horst RL, Littledike ET, Beitz DC:** 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ receptor in bovine thymus gland. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **106**, 1012-1018, **1982**
274. **Simpson RU, Thomas GA, Arnold AJ:** Identification of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors and activities in muscle. *J.Biol.Chem.* **260**, 8882-8889, **1985**
275. **Walters MR:** 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ receptors in the seminiferous tubules of the rat testis increase at puberty. *Endocrinology* **114**, 2167-2174, **1984**
276. **Berger U, Wilson P, McClelland RA, Colston K, Haussler MR:** Immunocytochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in normal human tissues. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **67**, 607-613, **1988**
277. **Feldman D, Chen T, Hirst M, Colston K, Karasek M, Cone C:** Demonstration of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in human skin biopsies. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **51**, 1463-1465, **1980**
278. **Abdel-Malek ZA, Ross R, Trinkle L, Swope V, Pike JW, Nordlund JJ:** Hormonal effects of vitamin D₃ on epidermal melanocytes. *J.Cell Physiol.* **136**, 273-280, **1988**
279. **McDonnell DP, Mangelsdorf DJ, Pike JW, Haussler MR, O'Malley BW:** Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. *Science* **235**, 1214-1217, **1987**
280. **Jurutka PW, Hsieh JC, Remus LS, Whitfield GK, Thompson PD, Haussler CA, Blanco JC, Ozato K, Haussler MR:** Mutations in the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor identifying C-terminal amino acids required for transcriptional activation that are functionally dissociated from hormone binding, heterodimeric

- DNA binding, and interaction with basal transcription factor IIB, in vitro. *J.Biol.Chem.* **272**, 14592-14599, **1997**
281. **Li XY, Boudjelal M, Xiao JH, Peng ZH, Asuru A, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ:** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases nuclear vitamin D3 receptors by blocking ubiquitin/proteasome-mediated degradation in human skin. *Mol.Endocrinol.* **13**, 1686-1694, **1999**
282. **Jaaskelainen T, Ryhanen S, Mahonen A, Deluca HF, Maenpaa PH:** Mechanism of action of superactive vitamin D analogs through regulated receptor degradation. *J.Cell Biochem.* **76**, 548-558, **2000**
283. **Freedman LP, Luisi BF:** On the mechanism of DNA binding by nuclear hormone receptors: a structural and functional perspective. *J.Cell Biochem.* **51** , 140-150, **1993**
284. **Mangelsdorf DJ, Evans RM:** The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**, 841-850, **1995**
285. **Sone T, Kerner S, Pike JW:** Vitamin D receptor interaction with specific DNA: association as a 1,25-dihydroxyvitamin D3-modulated heterodimer. *J.Biol.Chem.* **266**, 23296-23305, **1991**
286. **Cheskis B, Freedman LP:** Ligand modulates the conversion of DNA-bound vitamin D3 receptor (VDR) homodimers into VDR-retinoid X receptor heterodimers. *Mol.Cell Biol.* **14**, 3329-3338, **1994**
287. **Lemon BD, Freedman LP:** Selective effects of ligands on vitamin D3 receptor- and retinoid X receptor-mediated gene activation in vivo. *Mol.Cell Biol.* **16**, 1006-1016, **1996**
288. **Cheskis B, Freedman LP:** Modulation of nuclear receptor interactions by ligands: kinetic analysis using surface plasmon resonance. *Biochemistry* **35**, 3309-3318, **1996**
289. **Cheskis B, Lemon BD, Uskokovic M, Lomedico PT, Freedman LP:** Vitamin D3-retinoid X receptor dimerization, DNA binding, and transactivation are differentially affected by analogs of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Mol.Endocrinol.* **9**, 1814-1824, **1995**
290. **Issa LL, Leong GM, Eisman JA:** Molecular mechanism of vitamin D receptor action. *Inflamm.Res.* **47**, 451-475, **1998**
291. **Saijo T, Ito M, Takeda E, Huq AH, Naito E, Yokota I, Sone T, Pike JW, Kuroda Y:** A unique mutation in the vitamin D receptor gene in three Japanese patients with vitamin D-dependent rickets type II: utility of single-strand conformation polymorphism analysis for heterozygous carrier detection. *Am.J.Hum.Genet.* **49**, 668-673, **1991**
292. **Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, Villa ML, Marcus R, Feldman D:** The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J.Bone Miner.Res.* **11**, 1850-1855, **1996**

293. **Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook, PN, Eisman JA:** Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* **367**, 284-287, **1994**
294. **Cheng J, Belgrader P, Zhou X, Maquat LE:** Introns are cis effectors of the nonsense-codon-mediated reduction in nuclear mRNA abundance. *Mol.Cell Biol.* **14**, 6317-6325, **1994**
295. **Mocharla H, Butch AW, Pappas AA, Flick JT, Weinstein RS, De Togni P, Jilka RL, Roberson PK, Parfitt AM, Manolagas SC:** Quantification of vitamin D receptor mRNA by competitive polymerase chain reaction in PBMC: lack of correspondence with common allelic variants. *J.Bone Miner.Res.* **12**, 726-733, **1997**
296. **Gross C, Musiol IM, Eccleshall TR, Malloy PJ, Feldman D:** Vitamin D receptor gene polymorphisms: analysis of ligand binding and hormone responsiveness in cultured skin fibroblasts. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **242**, 467-473, **1998**
297. **Colin EM, Weel AE, Uitterlinden AG, Buurman CJ, Birkenhager JC, Pols HA, Van Leeuwen JP:** Consequences of vitamin D receptor gene polymorphisms for growth inhibition of cultured human peripheral blood mononuclear cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Clin.Endocrinol.(Oxf.)* **52**, 211-216, **2000**
298. **Jurutka PW, Remus LS, Whitfield GK, Thompson PD, Hsieh JC, Zitzer H, Tavakkoli P, Galligan MA, Dang HT, Haussler CA, Haussler MR:** The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Mol.Endocrinol.* **14**, 401-420, **2000**
299. **Miyamoto K, Taketani Y, Tohna E, Nishisho T:** A novel polymorphism in the vitamin D receptor and bone mineral density: A study of vitamin D receptor expression and function in COS-7 cells. *J.Bone Miner.Res.* **11**, 116S, **1996**
300. **Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, Tonai T, Nishisho T, Mori S, Takeda E:** A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J.Bone Miner.Res.* **12**, 915-921, **1997**
301. **Gross C, Krishnan AV, Malloy PJ, Eccleshall TR, Zhao XY, Feldman D:** The vitamin D receptor gene start codon polymorphism: a functional analysis of FokI variants. *J.Bone Miner.Res.* **13**, 1691-1699, **1998**
302. **Nesic D, Cheng J, Maquat LE:** Sequences within the last intron function in RNA 3'-end formation in cultured cells. *Mol.Cell Biol.* **13**, 3359-3369, **1993**
303. **Durrin LK, Haile RW, Ingles SA, Coetzee GA:** Vitamin D receptor 3'-untranslated region polymorphisms: lack of effect on mRNA stability. *Biochim.Biophys.Acta* **1453**, 311-320, **1999**
304. **Nemere I, Norman AW:** Rapid action of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on calcium transport in perfused chick duodenum: effect of inhibitors. *J.Bone Miner.Res.* **2**, 99-107, **1987**

305. **Nemere I, Yoshimoto Y, Norman AW:** Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement with fourteen minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* **115**, 1476-1483, **1984**
306. **Baran DT, Sorensen AM, Honeyman TW, Ray R, Holick MF:** Rapid actions of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and calcium and phospholipids in isolated rat liver nuclei. *FEBS Lett.* **259**, 205-208, **1989**
307. **Selles J, Boland R:** Evidence on the participation of the 3',5'-cyclic AMP pathway in the non-genomic action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in cardiac muscle. *Mol.Cell Endocrinol.* **82**, 229-235, **1991**
308. **Mandla S, Boneh A, Tenenhouse HS:** Evidence for protein kinase C involvement in the regulation of renal 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase. *Endocrinology* **127**, 2639-2647, **1990**
309. **Slater SJ, Kelly MB, Taddeo FJ, Larkin JD, Yeager MD, McLane JA, Ho C, Stubbs CD:** Direct activation of protein kinase C by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *J.Biol.Chem.* **270**, 6639-6643, **1995**
310. **Nemere I, Dormanen MC, Hammond MW, Okamura WH, Norman AW:** Identification of a specific binding protein for 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in basal-lateral membranes of chick intestinal epithelium and relationship to transcaltachia. *J.Biol.Chem.* **269**, 23750-23756, **1994**
311. **Nemere I, Schwartz Z, Pedrozo H, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD:** Identification of a membrane receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ which mediates rapid activation of protein kinase C. *J.Bone Miner.Res.* **13**, 1353-1359, **1998**
312. **Daiger SP, Schanfield MS, Cavalli-Sforza LL:** Group-specific component (Gc) proteins bind vitamin D and 25-hydroxyvitamin D. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **72**, 2076-2080, **1975**
313. **Mendel CM:** The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr.Rev.* **10**, 232-274, **1989**
314. **Rosner W:** The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: recent advances. *Endocr.Rev.* **11**, 80-91, **1990**
315. **Hirschfeld J, Jonsson B, Rasmusson M:** Immune-electrophoretic demonstration of qualitative differences in human seras and their relation to the haptoglobins. *Acta Pathol.Microbiol.* **47**, 160-168, **1959**
316. **Haddad JG, Walgate J:** 25-Hydroxyvitamin D transport in human plasma: isolation and partial characterization of calcifidiol-binding protein. *J.Biol.Chem.* **251**, 4803-4809, **1976**
317. **Cooke NE, Willard HF, David EV, George DL:** Direct regional assignment of the gene for vitamin D binding protein (Gc-globulin) to human chromosome 4q11-q13 and identification of an associated DNA polymorphism. *Hum.Genet.* **73**, 225-229, **1986**

318. **Song YH, Naumova AK, Liebhaber SA, Cooke NE:** Physical and meiotic mapping of the region of human chromosome 4q11-q13 encompassing the vitamin D binding protein DBP/Gc-globulin and albumin multigene cluster. *Genome Res.* **9**, 581-587, **1999**
319. **Braun A, Kofler A, Morawietz S, Cleve H:** Sequence and organization of the human vitamin D-binding protein gene. *Biochim.Biophys.Acta* **1216**, 385-394, **1993**
320. **Cooke NE, David EV:** Serum vitamin D-binding protein is a third member of the albumin and alpha fetoprotein gene family. *J.Clin.Invest.* **76**, 2420-2424, **1985**
321. **Haeflinger DN, Moskaitis JE, Schoenberg DR, Wahli W:** Amphibian albumins as members of the albumin, alpha-fetoprotein, vitamin D binding protein multigene family. *J.Mol.Evol.* **29**, 344-354, **1989**
322. **McLeod JF, Cooke NE:** The vitamin D-binding protein, alpha-fetoprotein, albumin multigene family: detection of transcripts in multiple tissues. *J.Biol.Chem.* **264**, 21760-21769, **1989**
323. **Melartin L, Hirvonen T, Kaarsalo E, Toivanen P:** Group-specific component and transferrins in human fetal sera. *Scand.J.Haematol.* **3**, 117-122, **1966**
324. **Hartwell D, Riis BJ, Christiansen C:** Changes in vitamin D metabolism during natural and medical menopause. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **71**, 127-132, **1990**
325. **Brixen K, Nielsen HK, Bouillon R, Flyvbjerg A, Mosekilde L:** Effects of short-term growth hormone treatment on PTH, calcitriol, thyroid hormones, insulin and glucagon. *Acta Endocrinol.* **127**, 331-336, **1992**
326. **Guha C, Osawa M, Werner PA, Galbraith RM, Paddock GV:** Regulation of human Gc (vitamin D-binding) protein levels: hormonal and cytokine control of gene expression in vitro. *Hepatology* **21**, 1675-1681, **1995**
327. **Braun A, Bichlmaier R, Cleve H:** Molecular analysis of the gene for the human vitamin-D-binding protein (group-specific component): allelic differences of the common genetic GC types. *Hum.Genet.* **89**, 401-406, **1992**
328. **Cleve H, Patutschnick W:** Neuraminidase treatment reveals siliac acid differences in certain genetic variants of the Gc system (vitamin D-binding protein). *Hum.Genet.* **47**, 193-198, **1979**
329. **Braun A, Bichlmaier R, Muller B, Cleve H:** Molecular evaluation of an Alu repeat including a polymorphic variable poly(dA) (AluVpA) in the vitamin D binding protein (DBP) gene. *Hum.Genet.* **90**, 526-532, **1993**
330. **Cleve H, Constans J:** The mutants of the vitamin-D-binding protein: more than 120 variants of the GC/DBP system. *Vox Sang* **54**, 215-225, **1988**
331. **Arnaud J, Constans J:** Affinity differences for vitamin D metabolites associated with the genetic isoforms of the human serum carrier protein (DBP). *Hum.Genet.* **92**, 183-188, **1993**

332. **Bouillon R, Xiang DZ, Convents R, Van Baelen H:** Polyunsaturated fatty acids decrease the apparent affinity of vitamin D metabolites for human vitamin D-binding protein. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **42**, 855-861, **1992**
333. **Haddad JG:** Clinical aspects of measurements of plasma vitamin D sterols and the vitamin D binding protein. *Disorders of Bone and Mineral Metabolism.* Raven, New York , 195-216, **1992**
334. **Kawakami M, Blum CB, Ranakrishnan R, Dell RB, Goodman DS:** Turnover of the plasma binding protein for vitamin D and metabolites in normal human subjects. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **53**, 1110-1116, **1981**
335. **Cooke NE, Haddad JG:** Vitamin D binding protein (Gc-protein). *Endocr.Rev.* **10**, 294-307, **1989**
336. **Haddad JG:** Traffic, binding, and cellular access of vitamin D metabolites D sterols. *Bone and Mineral Research.* Elsevier, New York **5**, 281-308, **1987**
337. **Bikle DD, Gee E, Halloran BP, Kowalski MA, Haddad JG:** Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D binding protein. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **63**, 954-959, **1986**
338. **Holick MF, MacLaughlin JA, Doppelt SH:** Regulation of cutaneous previtamin D3 photosynthesis in man: skin pigment is not an essential regulator. *Science* **211**, 590-593, **1981**
339. **Haddad JG, Matsuoka LY, Hollis BW, Hu YZ, Wortsman J:** Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. *J.Clin.Invest.* **91**, 2552-2555, **1993**
340. **Bouillon R, Van Assche FA, Van Baelen H, Heyns W, De Moor P:** Influence of the vitamin D-binding protein on the serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D3. Significance of the free 1,25- dihydroxyvitamin D3 concentration. *J.Clin.Invest.* **67**, 589-596, **1981**
341. **Cooke NE, Walgate J, Haddad JG:** Human serum binding protein for vitamin D and its metabolites: II. Specific, high affinity association with a protein in nucleated tissue. *J.Biol.Chem.* **254**, 5965-5971, **1979**
342. **McLeod JF, Kowalski MA, Haddad JG:** Interactions among serum vitamin D binding protein, monomeric actin, profilin and profilactin. *J.Biol.Chem.* **264**, 1260-1267, **1989**
343. **Lees A, Haddad JG, Lin S:** Brevin and DBP: comparison of the effects of two serum proteins on actin assembly and disassembly. *Biochemistry* **23**, 3038-3047, **1984**
344. **Sanger JM, Dabiri G, Mittal B, Kowalski MA, Haddad JG, Sanger JW:** Disruption of microfilament organization in living nonmuscle cells by microinjection of plasma vitamin D-binding protein or DNase I. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **87** , 5474-5478, **1990**
345. **Lee WM, Galbraith RM:** The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity. *N.Engl.J.Med.* **326**, 1335-1341, **1992**

346. **Yamamoto N, Homma S, Haddad JG, Kowalski MA:** Vitamin D3 binding protein required for in vitro activation of macrophages after alkylglycerol treatment of mouse peritoneal cells. *Immunology* **74**, 420-424, **1991**
347. **Naraparaju VR, Yamamoto N:** Roles of beta-galactosidase of B lymphocytes and sialidase of T lymphocytes in inflammation-primed activation of macrophages. *Immunol.Lett.* **43**, 143-148, **1994**
348. **Yamamoto N, Lindsay DD, Naraparaju VR, Ireland RA, Popoff SN:** A defect in the inflammation-primed macrophage-activation cascade in osteopetrotic rats. *J.Immunol.* **152**, 5100-5107, **1994**
349. **Safadi FF, Thornton P, Magiera H, Hollis BW, Gentile M, Haddad JG, Liebhaber SA, Cooke NE:** Osteopathy and resistance to vitamin D toxicity in mice null for vitamin D binding protein. *J.Clin.Invest.* **103**, 239-251, **1999**
350. **Binder R, Kress A, Kan G, Herrmann K, Kirschfink M:** Neutrophil priming by cytokines and vitamin D binding protein (Gc-globulin): impact on C5a-mediated chemotaxis, degranulation and respiratory burst. *Mol.Immunol.* **36**, 885-892, **1999**
351. **Perez HD:** Gc globulin (vitamin D-binding protein) increases binding of low concentrations of C51 des Arg to human polymorphonuclear leukocytes: an explanation for its cochemotaxin activity. *Inflammation* **18**, 215-220, **1994**
352. **Kew RR, Webster RO:** Gc-globulin (vitamin D-binding protein) enhances the neutrophil chemotactic activity of C5a and C5a des Arg. *J.Clin.Invest.* **82**, 364-369, **1988**
353. **Kew RR, Mollison KW, Webster RO:** Binding of Gc globulin (vitamin D binding protein) to C5a or C5a des Arg is not necessary for co-chemotactic activity. *J.Leukocyte Biol.* **58**, 55-58,
354. **Kew RR, Fisher JA, Webster RO:** Co-chemotactic effect of Gc-globulin (vitamin D binding protein) for C5a. Transient conversion into an active co-chemotaxin by neutrophils. *J.Immunol.* **155**, 5369-5374, **1995**
355. **Scriver CR:** Vitamin D dependency. *Pediatrics* **45**, 361-363, **1970**
356. **Delvin EE, Glorieux FH, Marie PJ, Pettifor JM:** Vitamin D-dependency: replacement therapy with calcitriol? *J.Pediatr.* **99**, 26-34, **1981**
357. **Fraser D, Kooh SW, Kind HP, Holick MF, Tanaka Y, Deluca HF:** Pathogenesis of hereditary vitamin-D-dependent rickets. An inborn error of vitamin D metabolism involving defective conversion of 25-hydroxyvitamin D to 1alpha,25-dihydroxyvitamin D. *N.Engl.J.Med.* **289**, 817-822, **1973**
358. **Brooks MH, Bell NH, Love L, Stern PH, Orfei E, Queener SF, Hamstra AJ, Deluca HF:** Vitamin-D-dependent rickets type II. Resistance of target organs to 1,25-dihydroxyvitamin D. *N.Engl.J.Med.* **298**, 996-999, **1978**
359. **Marx SJ, Spiegel AM, Brown EM, Gardner DG, Downs RW, Attie M, Hamstra AJ, Deluca HF:** A familial syndrome of decrease in sensitivity to 1,25-dihydroxyvitamin D. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **47**, 1303-1310, **1978**

360. **Malloy PJ, Weisman Y, Feldman D:** Hereditary 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets resulting from a mutation in the vitamin D receptor deoxyribonucleic acid-binding domain. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **78**, 313-316, **1994**
361. **Kroger H, Tuppurainen M, Honkanen R, Alhava E, Saarikoski S:** Bone mineral density and risk factors of osteoporosis: a population based study of 1600 perimenopausal women. *Calif.Tissue Int.* **55**, 1-7, **1994**
362. **Smith DM, Nance WE, Kang KW, Christian JC, Johnston CC:** Genetic factors in determining bone mass. *J.Clin.Invest.* **52**, 2800-2808, **1973**
363. **Hauache OM, Lazaretti-Castro M, Andreoni S, Gimeno SG, Brandao C, Ramalho AC, Kasamatsu TS, Kunii I, Hayashi LF, Dib SA, Vieira JG:** Vitamin D receptor gene polymorphism: correlation with bone mineral density in a Brazilian population with insulin-dependent diabetes mellitus. *Osteoporos.Int.* **8**, 204-210, **1998**
364. **Looney JE, Yoon HK, Fischer M, Farley SM, Wergedal JE, Baylink DJ:** Lack of high prevalence of the BB vitamin D receptor genotype in severely osteoporotic women. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **80**, 2158-2162, **1995**
365. **Uitterlinden AG, Pols HA, Burger H, Huang Q, Van Daele PL, Van Duijn CM, Hofman A, Birkenhager JC, Van Leeuwen JP:** A large-scale population-based study of the association of vitamin D receptor gene polymorphisms with bone mineral density. *J.Bone Miner.Res.* **11**, 1241-1248, **1996**
366. **Garnero P, Borel L, Sornay-Rendu E, Arlot ME, Delmas PD:** Vitamin D receptor polymorphisms are not related to bone turnover, rate of bone loss, and bone mass in postmenopausal women: the OFELY study. *J.Bone Miner.Res.* **11**, 827-834, **1996**
367. **Wood RJ, Fleet JC:** The genetics of osteoporosis: vitamin D receptor polymorphisms. *Annu.Rev.Nutr.* **18:233-58**, 233-258, **1998**
368. **Garland CF, Garland FC:** Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer? *Int.J.Epidemiol.* **9**, 227-231, **1980**
369. **Garland CF, Comstock GW, Garland FC, Helsing KJ, Shaw EK, Gorham ED:** Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer: eight year prospective study. *Lancet* **2(8673)**, 1176-1178, **1989**
370. **Garland CF, Garland FC, Gorham ED:** Can colon cancer incidence and death rates be reduced with calcium and vitamin D? *Am.J.Clin.Nutr.* **54**, 193S-201S, **1991**
371. **Janowsky EC, Lester GE, Weinberg CR, Millikan RC, Schildkraut JM, Garrett PA, Hulka BS:** Association between low levels of 1,25-dihydroxyvitamin D and breast cancer risk. *Public Health Nutr.* **2**, 283-291, **1999**
372. **Schwartz GG, Hulka BS:** Is vitamin D deficiency a risk factor for prostatic cancer? (Hypothesis). *Anticancer Res.* **10**, 1307-1311, **1990**
373. **Corder EH, Friedman GD, Vogelmann JH, Orentreich N:** Seasonal variation in vitamin D, vitamin D-binding protein, and dehydroepiandrosterone: risk of

- prostate cancer in black and white men. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **4** , 655-659, **1995**
374. **Gorham ED, Garland FC, Garland CF:** Sunlight and breast cancer incidence in the USSR. *Int.J.Epidemiol.* **19**, 820-824, **1990**
375. **Niv Y, Sperber AD, Figer A, Igael D, Shany S, Fraser G, Schwartz B:** In colorectal carcinoma patients, serum vitamin D levels vary according to stage of the carcinoma. *Cancer* **86**, 391-397, **1999**
376. **Majewski S, Szmurlo A, Marczak M, Jablonska S, Bollag W:** Inhibition of tumor cell-induced angiogenesis by retinoids, 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and their combination. *Cancer Lett.* **75**, 35-39, **1993**
377. **Hansen CM, Frandsen TL, Brunner N, Binderup L:** 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits the invasive potential of human breast cancer cells in vivo. *Clin.Exp.Metastasis* **12**, 195-202, **1994**
378. **Yudoh K, Matsuno H, Kimura T:** 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits in vitro invasiveness through the extracellular matrix and in vivo pulmonary metastasis of B16 mouse melanoma. *J.Lab.Clin.Med.* **133**, 120-128, **1999**
379. **Lokeshwar BL, Schwartz GG, Selzer MG, Burnstein KL, Zhuang SH, Block NL, Binderup L:** Inhibition of prostate cancer metastasis in vivo: a comparison of 1,25-dihydroxyvitamin D (calcitriol) and EB1089. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **8**, 241-248, **1999**
380. **Freedman LP:** Transcriptional targets of the vitamin D₃ receptor-mediating cell cycle arrest and differentiation. *J.Nutr.* **129**, 581S-586S, **1999**
381. **Wallington LA, Bunce CM, Durham J, Brown G:** Particular combinations of signals, by retinoic acid and 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃, promote apoptosis of HL60 cells. *Leukemia* **9**, 1185-1190, **1995**
382. **Danielsson C, Fehsel K, Polly P, Carlberg C:** Differential apoptotic response of human melanoma cells to 1alpha,25- dihydroxyvitamin D₃ and its analogues. *Cell Death.Differ.* **5**, 946-952, **1998**
383. **Mathiasen IS, Lademann U, Jaattela M:** Apoptosis induced by vitamin D compounds in breast cancer cells is inhibited by bcl-2 but does not involve known caspases or p53. *Cancer Res.* **59**, 4848-4856, **1999**
384. **Katakami Y, Nakao Y, Katakami N, Koizumi T, Ogawa R, Yamada H, Takai Y, Fujita T:** Cooperative effects of tumor necrosis factor-alpha and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on growth inhibition, differentiation, and c-myc reduction in human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **152**, 1151-1157, **1988**
385. **Vink-van Wijngaarden T, Pols HA, Buurman CJ, Birkenhager JC, Van Leeuwen JP:** Inhibition of insulin- and insulin-like growth-factor-I-stimulated growth of human breast cancer cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and the vitamin D₃ analogue EB1089. *Eur.J.Cancer* **32**, 842-848, **1996**

386. **Tong WM, Hofer H, Ellinger A, Peterlik M, Cross HS:** Mechanism of antimitogenic action of vitamin D in human colon carcinoma cells: relevance for suppression of epidermal growth factor-stimulated cell growth. *Oncol.Res.* **11**, 77-84, **1999**
387. **Hedlund TE, Moffatt KA, Miller GJ:** Stable expression of the nuclear vitamin D receptor in the human prostatic carcinoma cell line JCA-1: evidence that the antiproliferative effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ are mediated exclusively through the genomic signaling pathway. *Endocrinology* **137**, 1554-1561, **1996**
388. **Solomon C, Sebag M, White JH, Rhim J, Kremer R:** Disruption of vitamin D receptor-retinoid X receptor heterodimer formation following ras transformation of human keratinocytes. *J.Biol.Chem.* **273**, 17573-17578, **1998**
389. **Mehta RR, Bratescu L, Graves JM, Green A, Mehta RG:** Differentiation of human breast carcinoma cells by a novel vitamin D analog: 1 α -hydroxyvitamin D₅. *Int.J.Oncol.* **16**, 65-73, **2000**
390. **Guzey M, Sattler C, Deluca HF:** Combinational effect of vitamin D₃ and retinoic acid (all trans and 9 cis) on proliferation, differentiation, and programmed cell death in two small cell lung carcinoma cell lines. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **28**, 735-744, **1998**
391. **Suzuki S, Takenoshita S, Furukawa H, Tsuchiya A:** Antineoplastic activity of 1,25(OH)₂D₃ and its analogue 22-oxacalcitriol against human anaplastic thyroid carcinoma cell lines in vitro. *Int.J.Mol.Med.* **4**, 611-614, **1999**
392. **Okano K, Usa T, Ohtsuru A, Tsukazaki T, Miyazaki Y, Yonekura A, Namba H, Shindoh H, Yamashita S:** Effect of 22-oxa-1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human thyroid cancer cell growth. *Endocr.J.* **46**, 243-252, **1999**
393. **Lipkin M:** Preclinical and early human studies of calcium and colon cancer prevention. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **889**, 120-127, **1999**
394. **Bower M, Colston KW, Stein RC, Hedley A, Gazet JC, Ford HT, Coombes RC:** Topical calcipotriol treatment in advanced breast cancer. *Lancet* **337(8743)**, 701-702, **1991**
395. **Kelsey SM, Newland AC, Cunningham J, Makin HL, Coldwell RD, Mills MJ, Grant IR:** Sustained haematological response to high-dose oral alfacalcidol in patients with myelodysplastic syndromes. *Lancet* **340(8814)**, 316-317, **1992**
396. **Gross C, Feldman D:** Calcitriol treatment of early recurrent prostate cancer: a pilot trial. *Proceedings of the 79th Annual Meeting of the Endocrine Society*, 261, **1997**
397. **Taylor JA, Hirvonen A, Watson M, Pittman G, Mohler JL, Bell DA:** Association of prostate cancer with vitamin D receptor gene polymorphism. *Cancer Res.* **56**, 4108-4110, **1996**
398. **Habuchi T, Suzuki T, Sasaki R, Wang L, Sato K, Satoh S, Akao T, Tsuchiya N, Shimoda N, Wada Y, Koizumi A, Chihara J, Ogawa O, Kato T:** Association of vitamin D receptor gene polymorphism with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in a Japanese population. *Cancer Res.* **60**, 305-308, **2000**

399. **Ingles SA, Ross RK, Yu MC, Irvine RA, La Pera G, Haile RW, Coetzee GA:** Association of prostate cancer risk with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. *J.Natl.Cancer Inst.* **89**, 166-170, **1997**
400. **Ingles SA, Coetzee GA, Ross RK, Henderson BE, Kolonel LN, Crocitto L, Wang W, Haile RW:** Association of prostate cancer with vitamin D receptor haplotypes in African-Americans. *Cancer Res.* **58**, 1620-1623, **1998**
401. **Ruggiero M, Pacini S, Aterini S, Fallai C, Ruggiero C, Pacini P:** Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with metastatic breast cancer. *Oncol.Res.* **10**, 43-46, **1998**
402. **Curran JE, Vaughan T, Lea RA, Weinstein SR, Morrison NA, Griffiths LR:** Association of A vitamin D receptor polymorphism with sporadic breast cancer development. *Int.J.Cancer* **83**, 723-726, **1999**
403. **Ingles SA, Garcia DG, Wang W, Nieters A, Henderson BE, Kolonel LN, Haile RW, Coetzee GA:** Vitamin D receptor genotype and breast cancer in Latinas (United States). *Cancer Causes.Control.* **11**, 25-30, **2000**
404. **Lundin AC, Soderkvist P, Eriksson B, Bergman-Jungstrom M, Wingren S:** Association of breast cancer progression with a vitamin D receptor gene polymorphism. South-East Sweden Breast Cancer Group. *Cancer Res.* **59**, 2332-2334, **1999**
405. **Hutchinson PE, Osborne JE, Lear JT, Smith AG, Bowers PW, Morris PN, Jones PW, York C, Strange RC, Fryer AA:** Vitamin D receptor polymorphisms are associated with altered prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin.Cancer Res.* **6**, 498-504, **2000**
406. **Dabrowski M, Robinson E, Hughes SV, Bland R, Hewison M:** Differential RNA display identifies novel genes associated with decreased vitamin D receptor expression. *Mol.Cell Endocrinol.* **142**, 131-139, **1998**
407. **Evans SR, Nolla J, Hanfelt J, Shabahang M, Nauta RJ, Shchepotin IB:** Vitamin D receptor expression as a predictive marker of biological behavior in human colorectal cancer. *Clin.Cancer Res.* **4**, 1591-1595, **1998**
408. **Storm TL, Sorensen OH, Lund B, Christiansen JS, Andersen AR, Lumholtz IB, Parving HH:** Vitamin D metabolism in insulin-dependent diabetes mellitus. *Metab.Bone Dis.Relat.Res.* **5**, 107-110, **1983**
409. **Rodland O, Markestad T, Aksnes L, Aarskog D:** Plasma concentrations of vitamin D metabolites during puberty of diabetic children. *Diabetologia* **28**, 663-666, **1985**
410. **Nyomba BL, Bouillon R, Bidingija M, Kandjingu K, De Moor P:** Vitamin D metabolites and their binding protein in adult diabetic patients. *Diabetes* **35**, 911-915, **1986**
411. **Haug CJ, Aukrust P, Haug E, Morkrid L, Muller F, Froland SS:** Severe deficiency of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human immunodeficiency virus infection: association with immunological hyperactivity and only minor changes in calcium homeostasis. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **83**, 3832-3838, **1998**

412. **Auwerx J, Dequeker J, Bouillon R, Geusens P, Nijs J:** Mineral metabolism and bone mass at peripheral and axial skeleton in diabetes mellitus. *Diabetes* **37**, 8-12, **1988**
413. **Aksoy H, Akcay F, Kurtul N, Baykal O, Avci B:** Serum 1,25 dihydroxy vitamin D (1,25(OH)₂D₃), 25 hydroxy vitamin D (25(OH)D) and parathormone levels in diabetic retinopathy. *Clin.Biochem.* **33**, 47-51, **2000**
414. **Muller K, Kriegbaum NJ, Baslund B, Sorensen OH, Thymann M, Bentzen K:** Vitamin D₃ metabolism in patients with rheumatic diseases: low serum levels of 25-hydroxyvitamin D₃ in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin.Rheumatol.* **14**, 397-400, **1995**
415. **MacFarlane IA, Mawer EB, Berry J, Hann J:** Vitamin D metabolism in hyperthyroidism. *Clin.Endocrinol.(Oxf.)* **17**, 51-59, **1982**
416. **Czernobilsky H, Scharla S, Schmidt-Gayk H, Ziegler R:** Enhanced suppression of 1,25(OH)₂D₃ and intact parathyroid hormone in Graves' disease as compared to toxic nodular goiter. *Calcif.Tissue Int.* **42**, 5-12, **1988**
417. **Nyomba BL, Bouillon R, Lissens W, Van Baelen H, De Moor P:** 1,25-Dihydroxyvitamin-D and and vitamin-D-binding protein are both decreased in streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* **116**, 2483-2488, **1985**
418. **Verhaeghe J, Suiker AM, Van Bree R, Van Herck E, Jans I, Visser WJ, Thomasset M, Allewaert K, Bouillon R:** Increased clearance of 1,25(OH)₂D₃ and tissue-specific responsiveness to 1,25(OH)₂D₃ in diabetic rats. *Am.J.Physiol.* **265**, E215-23, **1993**
419. **Chen TC, Mullen JP, Meglin NJ:** Modulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor by phospholipids and fatty acids. *J.Lipid Res.* **25**, 1306-1312, **1984**
420. **Patel SR, Koenig RJ, Hsu CH:** Effect of Schiff base formation on the function of the calcitriol receptor. *Kidney Int.* **50**, 1539-1545, **1996**
421. **Patel SR, Xu Y, Koenig RJ, Hsu CH:** Effect of glucose on the function of the calcitriol receptor and vitamin D metabolism. *Kidney Int.* **52**, 79-86, **1997**
422. **Lampeter EF, Signore A, Gale EA, Pozzilli P:** Lessons from the NOD mouse for the pathogenesis and immunotherapy of human type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* **32**, 703-708, **1989**
423. **Castano L, Eisenbarth GS:** Type-I diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. *Annu.Rev.Immunol.* **8**, 647-679, **1990**
424. **Rossini AA, Greiner DL, Friedman HP, Mordes JP:** Immunopathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes Rev.* **1**, 43-75, **1993**
425. **Mathieu C, Laureys J, Sobis H, Vandeputte M, Waer M, Bouillon R:** 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ prevents insulinitis in NOD mice. *Diabetes* **41**, 1491-1495, **1992**
426. **Mathieu C, Laureys J, Waer M, Bouillon R:** Prevention of autoimmune destruction of transplanted islets in spontaneously diabetic NOD mice by KH1060, a 20-epi

- analog of vitamin D: synergy with cyclosporine. *Transplant.Proc.* **26** , 3128-3129, **1994**
427. **Lemire JM, Archer DC:** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Clin.Invest.* **87**, 1103-1107, **1991**
428. **Hayes CE, Cantorna MT, DeLuca HF:** Vitamin D and multiple sclerosis. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **216**, 21-27, **1997**
429. **Cantorna MT, Humpal-Winter J, Deluca HF:** Dietary calcium is a major factor in 1,25-dihydroxycholecalciferol suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *J.Nutr.* **129**, 1966-1971, **1999**
430. **Nashold FE, Miller DJ, Hayes CE:** 1,25-dihydroxyvitamin D3 treatment decreases macrophage accumulation in the CNS of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Neuroimmunol.* **103**, 171-179, **2000**
431. **Fournier C, Gepner P, Sadouk M, Charreire J:** In vivo beneficial effects of cyclosporin A and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the induction of experimental autoimmune thyroiditis. *Clin.Immunol.Immunopathol.* **54**, 53-63, **1990**
432. **EURODIAB Substudy 2 Study Group:** Vitamin D supplement in early childhood and risk for type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* **42**, 51-54, **1999**
433. **Bennett ST, Wilson AJ, Cucca F, Nerup J, Pociot F, McKinney PA, Barnett AH, Bain SC, Todd JA:** IDDM2-VNTR-encoded susceptibility to type 1 diabetes: dominant protection and parental transmission of alleles of the insulin gene-linked minisatellite locus. *J.Autoimmun.* **9**, 415-421, **1996**
434. **Mein CA, Esposito L, Dunn MG, Johnson GC, Timms AE, Goy JV, Smith AN, Sebag-Montefiore L, Merriman ME, Wilson AJ, Pritchard LE, Cucca F, Barnett AH, Bain SC, Todd JA:** A search for type 1 diabetes susceptibility genes in families from the United Kingdom. *Nat.Genet.* **19**, 297-300, **1998**
435. **McClure L, Eccleshall TR, Gross C, Villa ML, Lin N, Ramaswamy V, Kohlmeier L, Kelsey JL, Marcus R, Feldman D:** Vitamin D receptor polymorphisms, bone mineral density, and bone metabolism in postmenopausal Mexican-American women. *J.Bone Miner.Res.* **12**, 234-240, **1997**
436. **Vandevyver C, Wylin T, Cassiman JJ, Raus J, Geusens P:** Influence of the vitamin D receptor gene alleles on bone mineral density in postmenopausal and osteoporotic women. *J.Bone Miner.Res.* **12**, 241-247, **1997**
437. **Riggs BL, Nguyen TV, Melton LJ, Morrison NA, O'Fallon WM, Kelly PJ, Egan KS, Sambrook PN, Muhs JM, Eisman JA:** The contribution of vitamin D receptor gene alleles to the determination of bone mineral density in normal and osteoporotic women. *J.Bone Miner.Res.* **10**, 991-996, **1995**
438. **Sham PC, Curtis D:** An extended transmission/disequilibrium test (TDT) for multi-allele marker loci. *Ann.Hum.Genet.* **59**, 323-336, **1995**

439. **Clayton D:** A generalization of the transmission/disequilibrium test for uncertain-haplotype transmission. *Am.J.Hum.Genet.* **65**, 1170-1177, **1999**
440. **Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N:** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* **230**, 1350-1354, **1985**
441. **Baril E, Mitchener J, Lee L, Baril B:** Action of pancreatic DNase: requirements for activation of DNA as a template primer for DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **4**, 2641-2653, **1977**
442. **Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J:** Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory, New York* , **1989**
443. **Weir BS, Cockerham CC:** Estimation of linkage disequilibrium in randomly mating populations. *Heredity* **42**, 105-111, **1979**
444. **Sachs L:** Angewandte Statistik. *Springer Verlag*, Kapitel 62, **1997**
445. **Falk CT, Rubinstein P:** Haplotype relative risk: an easy reliable way to construct a proper control sample for risk calculations. *Ann.Hum.Genet.* **51**, 227-233, **1987**
446. **Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ:** Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am.J.Hum.Genet.* **52**, 506-516, **1993**
447. **Conneally PM, Edwards JH, Kidd KK, Lalouel JM, Morton NE, Ott J, White R:** Report of the committee on methods of linkage analysis and reporting. *Cytogenet.Cell Genet.* **40**, 356-359, **1985**
448. **Peltekova VD, Cole DE, Pavlova A, Rubin LA:** Improved method for direct haplotyping at the vitamin D receptor gene locus. *Clin.Biochem.* **31**, 191-194, **1998**
449. **Lin NU, Malloy PJ, Sakati N, al-Ashwal A, Feldman D:** A novel mutation in the deoxyribonucleic acid-binding domain of the vitamin D receptor causes hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **81**, 2564-2569, **1996**
450. **Kragballe K:** Vitamin D analogues in the treatment of psoriasis. *J.Cell Biochem.* **49**, 46-52, **1992**
451. **Peltekova VD, Rubin L, Uitterlinden AG, Hawker G, Vieth R, Trang H, Cole DE:** Direct haplotyping at the vitamin D receptor locus improves genetic resolution. *J.Bone Miner.Res.* **12**, 494-495, **1997**
452. **Lucotte G, Mercier G, Burckel A:** The vitamin D receptor FokI start codon polymorphism and bone mineral density in osteoporotic postmenopausal French women. *Clin.Genet.* **56**, 221-224, **1999**
453. **Gennari L, Becherini L, Mansani R, Masi L, Falchetti A, Morelli A, Colli E, Gonnelli S, Cepollaro C, Brandi ML:** FokI polymorphism at translation initiation site of the vitamin D receptor gene predicts bone mineral density and

- vertebral fractures in postmenopausal Italian women. *J.Bone Miner.Res.* **14**, 1379-1386, **1999**
454. **Chang TJ, Lei HH, Yeh JI, Chiu KC, Lee KC, Chen MC, Tai TY, Chuang LM:** Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population. *Clin.Endocrinol.(Oxf.)* **52**, 575-580, **2000**
455. **McDermott MF, Ramachandran A, Ogunkolade BW, Aganna E, Curtis D, Boucher BJ, Snehalatha C, Hitman GA:** Allelic variation in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indian Asians. *Diabetologia* **40**, 971-975, **1997**
456. **Karvonen M, Pitkaniemi M, Pitkaniemi J, Kohtamaki K, Tajima N, Tuomilehto J:** Sex difference in the incidence of insulin-dependent diabetes mellitus: an analysis of recent epidemiological data. World Health Organization DIAMOND Project Group. *Diabetes Metab.Rev.* **13**, 275-291, **1997**
457. **Lee YJ, Huang FY, Lo FS, Wang WC, Hsu CH, Kao HA, Yang TY, Chang JG:** Association of CTLA4 gene A-G polymorphism with type 1 diabetes in Chinese children. *Clin.Endocrinol.(Oxf.)* **52**, 153-157, **2000**
458. **Verbeek W, Gombart AF, Shiohara M, Campbell M, Koeffler HP:** Vitamin D receptor: no evidence for allele-specific mRNA stability in cells which are heterozygous for the Taq I restriction enzyme polymorphism. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **238**, 77-80, **1997**
459. **Zimonjic DB, Rezanka LJ, Evans CH, Polymeropoulos MH, Trent JM, Popescu NC:** Mapping of the immune interferon gamma gene (IFNG) to chromosome band 12q14 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet.Cell Genet.* **71**, 247-248, **1995**
460. **Inoue T, Kamiyama J, Sakai T:** Sp1 and NF-Y synergistically mediate the effect of vitamin D(3) in the p27(Kip1) gene promoter that lacks vitamin D response elements. *J.Biol.Chem.* **274**, 32309-32317, **1999**
461. **Matera AG, Ward DC:** Localization of the human Sp1 transcription factor gene to 12q13 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* **17**, 793-794, **1993**
462. **Leek JP, Hamlin PJ, Bell SM, Lench NJ:** Assignment of the STAT6 gene (STAT6) to human chromosome band 12q13 by in situ hybridization. *Cytogenet.Cell Genet.* **79**, 208-209, **1997**
463. **Vidal S, Belouchi AM, Cellier M, Beatty B, Gros P:** Cloning and characterization of a second human NRAMP gene on chromosome 12q13. *Mamm.Genome* **6**, 224-230, **1995**
464. **Popescu NC, Amsbaugh SC, DiPaolo JA:** Human papillomavirus type 18 DNA is integrated at a single chromosome site in cervical carcinoma cell line SW756. *J.Virol.* **61**, 1682-1685, **1987**
465. **Ye WZ, Reis AF, Velho G:** Identification of a novel Tru9 I polymorphism in the human vitamin D receptor gene. *J.Hum.Genet.* **45**, 56-57, **2000**

466. **Ingles SA, Haile RW, Henderson BE, Kolonel LN, Nakaichi G, Shi CY, Yu MC, Ross RK, Coetzee GA:** Strength of linkage disequilibrium between two vitamin D receptor markers in five ethnic groups: implications for association studies. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **6**, 93-98, **1997**
467. **Gennari L, Becherini L, Masi L, Mansani R, Gonnelli S, Cepollaro C, Martini S, Montagnani A, Lentini G, Becorpi AM, Brandi ML:** Vitamin D and estrogen receptor allelic variants in Italian postmenopausal women: evidence of multiple gene contribution to bone mineral density. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **83**, 939-944, **1998**
468. **Carling T, Rastad J, Akerstrom G, Westin G:** Vitamin D receptor (VDR) and parathyroid hormone messenger ribonucleic acid levels correspond to polymorphic VDR alleles in human parathyroid tumors. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **83**, 2255-2259, **1998**
469. **Carling T, Kindmark A, Hellman P, Lundgren E, Ljunghall S, Rastad J, Akerstrom G, Melhus H:** Vitamin D receptor genotypes in primary hyperparathyroidism. *Nat.Med.* **1**, 1309-1311, **1995**
470. **Yokoyama K, Shigematsu T, Tsukada T, Ogura Y, Takemoto F, Hara S, Yamada A, Kawaguchi Y, Hosoya T:** Apa I polymorphism in the vitamin D receptor gene may affect the parathyroid response in Japanese with end-stage renal disease. *Kidney Int.* **53**, 454-458, **1998**
471. **Carling T, Ridefelt P, Hellman P, Rastad J, Akerstrom G:** Vitamin D receptor polymorphisms correlate to parathyroid cell function in primary hyperparathyroidism. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **82**, 1772-1775, **1997**
472. **Nagasaka S, Ishikawa S, Matoba H, Kubota K, Murakami T, Saito T:** Vitamin D receptors and hyperparathyroidism. *Nat.Med.* **2**, 834, **1996**
473. **Correa P, Rastad J, Schwarz P, Westin G, Kindmark A, Lundgren E, Akerstrom G, Carling T:** The vitamin D receptor (VDR) start codon polymorphism in primary hyperparathyroidism and parathyroid VDR messenger ribonucleic acid levels. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **84**, 1690-1694, **1999**
474. **Dam TN, Kang S, Nickoloff BJ, Voorhees JJ:** 1alpha,25-dihydroxycholecalciferol and cyclosporine suppress induction and promote resolution of psoriasis in human skin grafts transplanted on to SCID mice. *J.Invest.Dermatol.* **113**, 1082-1089, **1999**
475. **Smith EL, Pincus SH, Donovan L, Holick MF:** A novel approach for the evaluation and treatment of psoriasis: oral or topical use of 1,25-dihydroxyvitamin D3 can be a safe and effective therapy for psoriasis. *J.Am.Acad.Dermatol.* **19**, 516-528, **1988**
476. **Chen ML, Perez A, Sanan DK, Heinrich G, Chen TC, Holick MF:** Induction of vitamin D receptor mRNA expression in psoriatic plaques correlates with clinical response to 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J.Invest.Dermatol.* **106**, 637-641, **1996**
477. **Park BS, Park JS, Lee DY, Youn JI, Kim IG:** Vitamin D receptor polymorphism is associated with psoriasis. *J.Invest.Dermatol.* **112**, 113-116, **1999**

478. **Holick MF, Chen ML, Kong XF, Sanan DK:** Clinical uses for calcitropic hormones 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and parathyroid hormone-related peptide in dermatology: a new perspective. *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc* **1**, 1-9, **1996**
479. **Kontula K, Valimaki S, Kainulainen K, Viitanen AM, Keski-Oja J:** Vitamin D receptor polymorphism and treatment of psoriasis with calcipotriol. *Br.J.Dermatol.* **136**, 977-978, **1997**
480. **Ozaki Y, Nomura S, Nagahama M, Yoshimura C, Kagawa H, Fukuhara S:** Vitamin-D Receptor Genotype and Renal Disorder in Japanese Patients with Systemic Lupus erythematosus. *Nephron* **85**, 86-91, **2000**
481. **Blazer DG, Umbach DM, Bostick RM, Taylor JA:** Vitamin D receptor polymorphisms and prostate cancer. *Mol.Carcinog* **27**, 18-23, **2000**
482. **Kibel AS, Isaacs SD, Isaacs WB, Bova GS:** Vitamin D receptor polymorphisms and lethal prostate cancer. *J.Urol.* **160**, 1405-1409, **1998**
483. **Watanabe M, Fukutome K, Murata M, Uemura H, Kubota Y, Kawamura J, Yatani R:** Significance of vitamin D receptor gene polymorphism for prostate cancer risk in Japanese. *Anticancer Res.* **19**, 4511-4514, **1999**
484. **Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q, Odding E, Duijn CM, Hofman A, Birkenhager JC, Van Leeuwen JP, Pols HA:** Vitamin D receptor genotype is associated with radiographic osteoarthritis at the knee. *J.Clin.Invest.* **100**, 259-263, **1997**
485. **Hennig BJ, Parkhill JM, Chapple IL, Heasman PA, Taylor JJ:** Association of a vitamin D receptor gene polymorphism with localized early-onset periodontal diseases. *J.Periodontol.* **70**, 1032-1038, **1999**
486. **Niimi T, Tomita H, Sato S, Kawaguchi H, Akita K, Maeda H, Sugiura Y, Ueda R:** Vitamin D receptor gene polymorphism in patients with sarcoidosis. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* **160**, 1107-1109, **1999**
487. **Keen RW, Hart DJ, Lanchbury JS, Spector TD:** Association of early osteoarthritis of the knee with a Taq I polymorphism of the vitamin D receptor gene. *Arthritis Rheum.* **40**, 1444-1449, **1997**
488. **Bellamy R:** Identifying genetic susceptibility factors for tuberculosis in Africans: a combined approach using a candidate gene study and a genome-wide screen. *Clin.Sci.(Colch.)* **98**, 245-250, **2000**
489. **Wilkinson RJ, Llewelyn M, Toossi Z, Patel P, Pasvol G, Lalvani A, Wright D, Latif M, Davidson RN:** Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet* **355(9204)**, 618-621, **2000**
490. **Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Thursz M, Whittle HC, Hill AV:** Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J.Infect.Dis.* **179**, 721-724, **1999**

491. **Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV:** Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J.Infect.Dis.* **179**, 187-191, **1999**
492. **Shi WX, Chammas R, Varki A:** Induction of sialic acid 9-O-acetylation by diverse gene products: implications for the expression cloning of sialic acid O-acetyltransferases. *Glycobiology.* **8**, 199-205, **1998**
493. **Blum R, Schwartzel E, Siskin S, Epinette WW:** Evaluating the safety of calcipotriene 30 g per day in patients with psoriasis: a parallel group, vehicle-controlled study. *J.Clin.Pharmacol.* **38**, 368-372, **1998**
494. **Endo K, Katsumata K, Iguchi H, Kubodera N, Teramoto T, Ikeda K, Fujita T, Ogata E:** Effect of combination treatment with a vitamin D analog (OCT) and a bisphosphonate (AHPBP) in a nude mouse model of cancer-associated hypercalcemia. *J.Bone Miner.Res.* **13**, 1378-1383, **1998**
495. **Jaaskelainen T, Ryhanen S, Mahonen A, DeLuca HF, Maenpaa PH:** Mechanism of action of superactive vitamin D analogs through regulated receptor degradation. *J.Cell Biochem.* **76**, 548-558, **2000**
496. **Bouillon R, Verstuyf A, Zhao J, Tan BK, Van Baelen H:** Nonhypercalcemic vitamin D analogs: interactions with the vitamin D-binding protein. *Horm.Res.* **45**, 117-121, **1996**
497. **Brown AJ:** Vitamin D analogues. *Am.J.Kidney Dis.* **32**, S25-S39, **1998**
498. **Ebihara K, Masuhiro Y, Kitamoto T, Suzawa M, Uematsu Y, Yoshizawa T, Ono T, Harada H, Matsuda K, Hasegawa T, Masushige S, Kato S:** Intron retention generates a novel isoform of the murine vitamin D receptor that acts in a dominant negative way on the vitamin D signaling pathway. *Mol.Cell Biol.* **16**, 3393-3400, **1996**
499. **Whitfield GK, Selznick SH, Haussler CA, Hsieh JC, Galligan MA, Jurutka PW, Thompson PD, Lee SM, Zerwekh JE, Haussler MR:** Vitamin D receptors from patients with resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D₃: point mutations confer reduced transactivation in response to ligand and impaired interaction with the retinoid X receptor heterodimeric partner. *Mol.Endocrinol.* **10**, 1617-1631, **1996**
500. **Cleve H:** The variants of the group-specific component. A review of their distribution in human populations. *Isr.J.Med.Sci.* **9**, 1133-1146, **1973**
501. **Kamboh MI, Ferrell RE:** Ethnic variation in vitamin D-binding protein (GC): a review of isoelectric focusing studies in human populations. *Hum.Genet.* **72**, 281-293, **1986**
502. **Klupa T, Malecki M, Hanna L, Sieradzka J, Frey J, Warram JH, Sieradzki J, Krolewski AS:** Amino acid variants of the vitamin D-binding protein and risk of diabetes in white Americans of European origin. *Eur.J.Endocrinol.* **141**, 490-493, **1999**
503. **Bouillon R, Allewaert K, Xiang DZ, Tan BK, Van Baelen H:** Vitamin D analogs with low affinity for the vitamin D binding protein: enhanced in vitro and decreased in vivo activity. *J.Bone Miner.Res.* **6**, 1051-1057, **1991**

504. **Yamamoto N, Kumashiro R:** Conversion of vitamin D3 binding protein (group-specific component) to a macrophage activating factor by the stepwise action of beta-galactosidase of B cells and sialidase of T cells. *J.Immunol.* **151** , 2794-2802, **1993**
505. **Piquette CA, Robinson-Hill R, Webster RO:** Human monocyte chemotaxis to complement-derived chemotaxins is enhanced by Gc-globulin. *J.Leukoc.Biol.* **55**, 349-354, **1994**
506. **Haddad JG:** Plasma vitamin D-binding protein (Gc-globulin): multiple tasks. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **53**, 579-582, **1995**
507. **Braun A, Brandhofer A, Cleve H:** Interaction of the vitamin D-binding protein (group-specific component) and its ligand 25-hydroxy-vitamin D3: binding differences of the various genetic types disclosed by isoelectric focusing. *Electrophoresis* **11**, 478-483, **1990**
508. **Papiha SS, Pal B:** Gc (vitamin D binding protein) subtypes in rheumatoid arthritis. *Hum.Genet.* **70**, 278-280, **1985**
509. **Papiha SS, Allcroft LC, Kanan RM, Francis RM, Datta HK:** Vitamin D binding protein gene in male osteoporosis: association of plasma DBP and bone mineral density with (TAAA)(n)-Alu polymorphism in DBP. *Calif.Tissue Int.* **65**, 262-266, **1999**
510. **Lindblom B, Wetterling G, Link H:** Distribution of group-specific component subtypes in multiple sclerosis. *Acta Neurol.Scand.* **78**, 443-444, **1988**
511. **Steckley JL, Dyment DA, Sadovnick AD, Risch N, Hayes C, Ebers GC:** Genetic analysis of vitamin D related genes in Canadian multiple sclerosis patients. Canadian Collaborative Study Group. *Neurology* **54**, 729-732, **2000**
512. **Eales LJ, Nye KE, Parkin JM, Weber JN, Forster SM, Harris JR, Pinching AJ:** Association of different allelic forms of group specific component with susceptibility to and clinical manifestation of human immunodeficiency virus infection. *Lancet* **1(8540)**, 999-1002, **1987**
513. **Szathmary EJ:** The effect of Gc genotype on fasting insulin level in Dogrib Indians. *Hum.Genet.* **75**, 368-372, **1987**
514. **Kumar R:** The metabolism and mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Kidney Int.* **30**, 793-803, **1986**
515. **Baumgartl HJ, Standl E, Schmidt-Gayk H, Kolb HJ, Janka HU, Ziegler AG:** Changes of vitamin D3 serum concentrations at the onset of immune-mediated type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetes Res.* **16**, 145-148, **1991**
516. **Kuoppala T:** Alterations in vitamin D metabolites and minerals in diabetic pregnancy. *Gynecol.Obstet.Invest.* **25**, 99-105, **1988**
517. **Imura H, Seino Y, Ishida H:** Osteopenia and circulating levels of vitamin D metabolites in diabetes mellitus. *J.Nutr.Sci.Vitaminol.* **31**, S27-S32, **1985**

518. **Ishida H, Seino Y, Tsuda K, Matsukura S, Miyamoto Y, Ishizuka S, Imura H:** Circulating levels of vitamin D metabolites in patients with hyperinsulinaemia. *Hum.Nutr.Clin.Nutr.* **38**, 473-475, **1984**
519. **Chong PJ, Matzner WL, Wallace DJ, Klinenberg JR, Toyoda M, Jordan SC:** 1,25-dihydroxyvitamin-D3 regulation of immunoglobulin production in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus. *J.Autoimmun.* **2**, 861-867, **1989**
520. **Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF:** 1,25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis. *J.Nutr.* **128**, 68-72, **1998**
521. **Kawakami-Tani T, Fukawa E, Tanaka H, Abe Y, Makino I:** Effect of 1alpha-hydroxyvitamin D3 on serum levels of thyroid hormones in hyperthyroid patients with untreated Graves' disease. *Metabolism* **46**, 1184-1188, **1997**
522. **Bottazo GF, Dean BM, McNally JM, MacKay EH, Swift PG, Gamble DR:** In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N.Engl.J.Med.* **313**, 353-360, **1985**
523. **Delaney CA, Pavlovic D, Hoorens A, Pipeleers DG, Eizirik DL:** Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells. *Endocrinology* **138**, 2610-2614, **1997**
524. **Iwahashi H, Hanafusa T, Eguchi Y, Nakajima H, Miyagawa J, Itoh N, Tomita K, Namba M, Kuwajima M, Noguchi T, Tsujimoto Y, Matsuzawa Y:** Cytokine-induced apoptotic cell death in a mouse pancreatic beta-cell line: inhibition by bcl-2. *Diabetologia* **39**, 530-536, **1996**
525. **Trudeau JD, Dutz JP, Arany E, Hill DJ, Fieldus WE, Finegood DT:** Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes? *Diabetes* **49**, 1-7, **2000**
526. **Wang SH, Koenig RJ, Giordano TJ, Myc A, Thompson NW, Baker JR:** 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 up-regulates bcl-2 expression and protects normal human thyrocytes from programmed cell death. *Endocrinology* **140**, 1649-1656, **1999**
527. **Liu Y, Rabinovitch A, Suarez-Pinzon W, Mukherjee B, Brownlee M, Edelstein D, Federoff HJ:** Expression of the bcl-2 gene from a defective HSV-1 amplicon vector protects pancreatic beta-cells from apoptosis. *Hum.Gene Ther.* **7**, 1719-1726, **1996**
528. **Norman AW:** The vitamin D endocrine system: manipulation of structure-function relationships to provide opportunities for development of new cancer chemopreventive and immunosuppressive agents. *J.Cell Biochem.* **22 Suppl.**, 218-225, **1995**
529. **Hisatake J, Kubota T, Hisatake Y, Uskokovic M, Tomoyasu S, Koeffler HP:** 5,6-trans-16-ene-vitamin D3: a new class of potent inhibitors of proliferation of prostate, breast, and myeloid leukemic cells. *Cancer Res.* **59**, 4023-4029, **1999**
530. **Quack M, Carlberg C:** The impact of functional vitamin D(3) receptor conformations on DNA-dependent vitamin D(3) signaling. *Mol.Pharmacol.* **57**, 375-384, **2000**

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Michael Aleksander Pani
Geburtsdatum: 29. Oktober 1975
Geburtsort: Langen
Familienstand: Ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Eltern: Mare Luik-Pani, Dipl.-Soziologin
Alfred Emmerich Pani, Dipl.-Volkswirt, Jurist


Schulbildung:

Trinkbornschule, Rödermark	1982-1986
Edith-Stein-Schule, Darmstadt	1986-1994
Abschluß: Hochschulreife	1994

Studium:

Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main	10/1994-09/2000
Physikum	9/1996
1. Staatsexamen	8/1997
2. Staatsexamen	9/1999
3. Staatsexamen	10/2000

Ober-Ramstadt, den 27. Juni 2000



Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

**Genetische Polymorphismen
des nukleären Vitamin D Rezeptors und des Vitamin D bindenden Proteins
bei Typ 1 Diabetes mellitus**

im Zentrum der Inneren Medizin, Medizinische Klinik I, der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Badenhop ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

***AUTOIMMUNITY* 31(1): 67-72, 1999
DIABETES 49 (3): 504-507, 2000**

Ober-Ramstadt, den 27. Juni 2000

