

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

betreut am  
Zentrum der Inneren Medizin  
Medizinische Klinik 1  
Direktor: Prof. Dr. Stefan Zeuzem

**Einfluss von Polymorphismen der Vitamin D-Systemgene auf  
die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 sowie die  
pharmakogenetische Analyse unter Vitamin D Therapie**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Edith Leydecker, geb. Klahold

aus Paderborn

Frankfurt am Main, 2022

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem  
Referent: Prof. Dr. Klaus Badenhoop  
Korreferent:  
ggf. 2. Korreferent:  
Tag der mündlichen Prüfung:

*Nicht das Beginnen wird belohnt, sondern  
einzig und allein das Durchhalten.*

*Katharina von Siena*

Ich danke Holger, Nora und Lotte dafür, dass sie mit mir durchgehalten haben!

Ich danke meinen Eltern, die durch ihre selbstlose Unterstützung, meinen Weg  
in den schönsten Beruf überhaupt ermöglicht haben.

Ich danke Marissa Penna-Martinez, für ihre wertvollen Tipps, ihre Geduld, ihren  
fachlichen Rat und ihr offenes Ohr. Ohne dich hätte ich das nie geschafft!

Ich danke allen, die einen Abschnitt des Weges mit mir gegangen sind und  
noch gehen. Jeder hat seinen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>5</b>
<b>2. Abstract</b> .....	<b>7</b>
<b>3. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>9</b>
<b>4. Übergreifende Zusammenfassung</b> .....	<b>10</b>
4.1 Einleitung .....	10
4.2 Übersicht des zur Veröffentlichung angenommenen Manuskripts bzw. Publikation: „Vitamin D in Type 2 Diabetes: Genetic Susceptibility and the Response to Supplementation“ .....	13
4.3 Diskussion.....	15
<b>5. Manuskript/Publikation</b> .....	<b>21</b>
<b>6. Darstellung des eigenen Anteils an der Publikation</b> .....	<b>30</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>32</b>
<b>8. Anhang</b> .....	<b>45</b>
Ethikvotum .....	45
Tabelle 1: Eigenschaften und Konditionen der RFLP und rtPCR.....	46
Tabelle 2: Assoziation der VD-Systemgen-SNPs mit T2D.....	47
Tabelle 3: Assoziation der VD-Systemgen-SNPs mit 25(OH)D <sub>3</sub> und 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> Konzentrationen .....	48
Tabelle 4: 25(OH)D <sub>3</sub> Konzentrationen (ng/ml) Verum vs. Placebo .....	50
Tabelle 5: PTH-Konzentrationen (pg/ml) der Verumgruppe.....	51
<b>9. Schriftliche Erklärung</b> .....	<b>52</b>

## 1. Zusammenfassung

Diabetes mellitus Typ 2 (T2D) ist eine der häufigsten Stoffwechselerkrankungen mit weltweit steigender Inzidenz. Zur Reduktion wachsender Behandlungskosten und Vermeidung von Folgeerkrankungen sind die Erforschung und Weiterentwicklung wirksamer Therapiekonzepte und Präventionsstrategien entscheidend.

Diverse Studien zeigen einen Einfluss des Vitamin D (VD) Status auf den Bodymassindex (BMI), die Glucosehomöostase, Insulinsekretion und -resistenz sowie die  $\beta$ -Zellfunktion. Erniedrigte VD-Konzentrationen scheinen sich dabei negativ auf Blutzuckerwerte und Insulinsensitivität auszuwirken. Ein manifester VD-Mangel ist mit einem erhöhten Risiko für T2D assoziiert. Während die Wahrscheinlichkeit eines VD-Mangels durch eine VD-Einnahme reduzierbar ist, unterliegen die individuellen Veränderungen der VD-Konzentration einer großen Varianz.

Der Einfluss einer VD-Einnahme auf die Glucosehomöostase ist strittig. Unter VD-Einnahme wurden sowohl positive, als auch negative Auswirkungen auf den Blutzucker bei Gesunden, T2D Risikopatienten, oder Patienten mit manifestem T2D beschrieben. Genetische Variationen können einen Teil dieser interindividuellen Streuung erklären. In welchem Ausmaß der genetische Hintergrund die Stoffwechselveränderungen durch eine VD-Einnahme bei Patienten mit T2D beeinflusst wurde bislang wenig erforscht.

In dieser Arbeit wurde der genetische Einfluss von SNPs (Single nucleotide polymorphisms) in Genen des VD-Stoffwechsels auf (1) Anfälligkeit für T2D, (2)  $25(\text{OH})\text{D}_3$ - und  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Plasmakonzentrationen sowie (3) Änderungen in der Stoffwechseleinstellung nicht insulinabhängiger Patienten mit T2D unter Einnahme mit Cholecalciferol ( $\text{VD}_3$  = Vigantol) untersucht. Zwölf SNPs in fünf VD-Stoffwechselgenen (CYP2R1, CYP27B1, DBP, VDR und CYP24A1) wurden analysiert. 553 Patienten mit T2D und 916 gesunde Kontrollpersonen wurden mittels RFLP und rtPCR genotypisiert. Die VD-Plasmakonzentrationen ( $25(\text{OH})\text{D}_3$  und  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) wurden per  $^{125}\text{I}$ -Radioimmunoassay (RIA) gemessen.

Die Allele VDR rs7975232 G, rs1544410 G und CYP2R1 rs10741657 A waren bei Patienten mit T2D signifikant häufiger. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigten T2D Patienten erniedrigte 25(OH)D<sub>3</sub>- und 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Plasmakonzentrationen. Ein VD-Mangel war mit einem 13,9fach erhöhten Risiko für T2D assoziiert.

Patienten mit T2D und den Genotypen CYP27B1 rs10877012 CC, DBP rs4588 CC, rs7041 GG, CYP24A1 rs2585426 CG oder rs2248137 CG wiesen im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant niedrigere 25(OH)D<sub>3</sub>-Plasmakonzentrationen auf. Patienten mit dem Genotyp DBP rs4588 CC hatten zusätzlich niedrigere 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Konzentrationen.

Die Analyse des genetischen Einflusses auf Stoffwechseländerungen durch eine VD<sub>3</sub> Substitution bei nicht insulinabhängigen Patienten mit T2D erfolgte über eine doppelt-verblindete randomisierte Interventionsstudie. 65 Patienten erhielten über 6 Monate entweder 1904 IU Vigantol-Öl/d (VD<sub>3</sub>) oder ein Placebo-Öl. Bis zu einem 6-monatigen Follow-up wurden die 25(OH)D<sub>3</sub> und 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Konzentrationen, der HbA<sub>1c</sub>, die Parathormon-Konzentration (PTH) und das C-Peptid dreimonatlich bestimmt.

Träger des Genotyps CYP24A1 rs2296241 GG zeigten trotz VD-Einnahme keine signifikante Änderung der 25(OH)D<sub>3</sub>-Werte. Hingegen zeigten sich für die Genotypen CYP27B1 rs10877012 CC, DBP 4588 CC, VDR rs7975232 AG und VDR rs1544410 GG bis zum Studienende anhaltend signifikant erhöhte 25(OH)D<sub>3</sub>-Konzentrationen in der Verumgruppe. Eine PTH-Suppression zeigte sich für die Genotypen CYP2R1 rs10741657 AG, DBP rs4588 CC, VDR rs2228570 TC und CYP24A1 rs2248137 GG. Weder das C-Peptid noch der HbA<sub>1c</sub> zeigten genotypabhängige Veränderungen.

Diese Studie bestätigt VD-Mangel als Risikofaktor für T2D. Sie zeigt deutlich, dass genetische Varianten des VD-Systems für T2D prädisponieren und anteilig den VD-Stoffwechsel regulieren. Auch die Auswirkungen einer VD<sub>3</sub> Einnahme, messbar im Anstieg der 25(OH)D<sub>3</sub>-Konzentration und der Suppression des PTH, sind durch die Gene des VD-Systems beeinflusst.

## 2. Abstract

Type 2 diabetes mellitus (T2D) is one of the most important endocrinological disorders with worldwide growing incidence. Research on prevention strategies is needed to reduce secondary diseases and rising economic pressure.

Current studies on functions of vitamin D (VD) discovered its impact on body mass index (BMI), glucose homeostasis, insulin secretion and resistance, and  $\beta$ -cell function. Most of them explore adverse metabolic effects (e.g. higher blood glucose or BMI) by lower VD levels. VD insufficiency is associated with an increased risk of T2D. VD supplementation has been shown to reduce the risk of VD insufficiency, while the change in VD levels in response to VD supplementation is highly variable between individuals.

The effects of VD on glucose metabolism are controversial. Nonetheless VD supplementation for T2D prevention or in patients with T2D yielded results ranging from improved metabolic control to worsening of T2D. Underlying genetic effects are suspected, but the individual response to VD-supplementation with regard to the individual genetic make-up is poorly been investigated.

This study investigated the impact of single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the VD metabolism genes on (1) susceptibility to T2D, (2) circulating 25(OH)D<sub>3</sub> and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> concentrations and (3) the metabolic response to Cholecalciferol (Vigantol = VD<sub>3</sub>) supplementation in non insulin-requiring patients with T2D. 553 T2D patients and 916 healthy were genotyped for twelve single nucleotide polymorphisms (SNPs) within five VD metabolism genes (CYP2R1, CYP27B1, DBP, VDR, CYP24A1) using RFLP or rtPCR. 25(OH)D<sub>3</sub> and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> concentrations were measured using <sup>125</sup>Iod-radioimmunoassay.

T2D risk alleles are CYP2R1 rs10741657 A and VDR rs7975232 G and rs1544410 G. Patients had overall lower 25(OH)D<sub>3</sub> and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> than healthy controls. In our cohort VD insufficient subjects had a 13.9 times higher T2D risk.

A genotype dependent 25(OH)D<sub>3</sub> reduction in T2D was detected for the genotypes CYP27B1 rs10877012 CC, DBP rs4588 CC, rs7041 GG, CYP24A1 rs2585426 CG and rs2248137 CG. The genotype rs4588 CC showed lower 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> concentrations.

The impact of 25(OH)D<sub>3</sub> supplementation on metabolic control of patients with non-insulin requiring T2D has been analyzed in a double-blind placebo controlled randomized study with 65 patients receiving 1904 IU Vigantol-oil/d (VD<sub>3</sub>) oil or placebo oil during six months intervention. Up to six months follow-up 25(OH)D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, HbA<sub>1c</sub>, C-peptide, and parathyroid hormone (PTH) levels were analyzed every three month.

VD supplementation did not change 25(OH)D<sub>3</sub> concentrations in patients with the genotype CYP24A1 rs2296241 GG while the genotypes DBP 4588 CC, VDR rs7975232 AG and VDR rs1544410 GG were associated with higher 25(OH)D<sub>3</sub> concentration up to the six month follow-up period. A significant PTH-Suppression was found for CYP2R1 rs10741657 AG, DBP rs4588 CC, VDR rs2228570 TC und CYP24A1 rs2248137 GG. Neither HbA<sub>1c</sub> nor C-Peptide showed genotype associated changes.

This study validates VD insufficiency as a risk factor for T2D. We could show that genetic variants of the VD system predispose to T2D and regulate - partially - VD metabolism. The response to cholecalciferol supplementation, measurable as 25(OH)D<sub>3</sub> increment and PTH suppression, is regulated by genes of the VD system.



### 3. Abkürzungsverzeichnis

A	DNA Base Adenin
BMI	Bodymaßindex
C	DNA Base Cytosin
CI	Konfidenzintervall
CYP24A1	Cytochrom P 450 Familie 24, Subfamilie A1
CYP27B1	Cytochrom P 450 Familie 27, Subfamilie B1
CYP2R1	Cytochrom P 450 Familie 2, Subfamilie R1
DBP	Vitamin D Bindeprotein
G	DNA Base Guanin
GC	Group-specific component
GWAS	genomweite Assoziationsstudie
HbA <sub>1c</sub>	Hämoglobin A <sub>1c</sub>
LD	Linkage disequilibrium
OR	Odds Ratio
p <sub>c</sub>	korrigierter p-Wert
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PTH	Parathormon
RIA	Radioimmunoassay
RFLP	Restriktionsfragmentlängen Polymorphismus
rtPCR	realtime PCR
SNP	Einnukleotid Polymorphismus (Single Nucleotide Polymorphism)
T	DNA Base Thymin
T2D	Diabetes mellitus Typ 2
VD	Vitamin D
VD <sub>3</sub>	Cholecalciferol/ Vigantol
VDR	Vitamin D Rezeptor
VDRE	Vitamin D reguliertes Element

## 4. Übergreifende Zusammenfassung

### 4.1 Einleitung

Diabetes mellitus Typ 2 (T2D) gehört mit mehr als 537 Millionen Erkrankten und ca. 6.700.000 Todesfällen im Jahr 2021, sowie prognostisch über 794 Millionen Erkrankten im Jahr 2045, zu den Erkrankungen mit der weltweit höchsten Inzidenz. Etwa 10% der globalen Gesundheitsausgaben entfallen auf die Behandlung von Diabetes mellitus und dessen Folgen [5]. Achtzig Prozent der Betroffenen leben in Ländern mit kleinen und mittleren Einkommen, in denen die Therapiekosten zu einer enormen ökonomischen Belastung werden. Die Erforschung und Entwicklung wirksamer Therapie- und Präventionsstrategien wird entsprechend von einem hohen wirtschaftlichen Interesse gestützt.

Der internationalen Diabetesföderation zufolge zählen eine positive Familienanamnese, Übergewicht, ungesunde Ernährung, Bewegungsmangel, steigendes Lebensalter, Bluthochdruck und eine beeinträchtigte Glucosetoleranz neben der ethnischen Zugehörigkeit, der Anamnese für einen Schwangerschaftsdiabetes sowie schlechter mütterlicher Ernährung während der Schwangerschaft zu den Risikofaktoren für T2D [6]. Nachdem diverse Studien negative Einflüsse eines Vitamin D (VD)-Mangels ( $25(\text{OH})\text{D}_3 < 20 \text{ ng/ml}$ ) [7] auf die Insulinresistenz [8] und die Glukosehomöostase sowie inverse Assoziationen zwischen VD-Konzentration und der Inzidenz für T2D [9-15] zeigen, wird auch VD als mögliche Variable für die Entwicklung eines T2D diskutiert. Song et al. beschreiben in ihrer 2018 publizierte Metaanalyse eine 4%ige Risikoreduktion für T2D für je  $10 \text{ nmol/L}$  Anstieg der  $25(\text{OH})\text{D}_3$  Konzentration [16]. Eine Anhebung der VD-Konzentration reduziert das Risiko eines metabolischen Syndroms [17] und der Ausgleich eines VD-Mangels kann zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität führen [18]. Dabei herrscht eine große Heterogenität in den Studienergebnissen und weder über die Kausalität dieser Assoziationen, noch deren Ausprägung herrscht wissenschaftlicher Konsens [19-25].

Das fettlösliche VD, korrekter Weise eigentlich als Prohormon zu bezeichnen [26], kann über die Nahrung aufgenommen oder unter UVB-Strahlungseinwirkung in der Haut gebildet werden. Prävitamin  $\text{D}_3$  isomerisiert

spontan zu Vitamin D<sub>3</sub> und wird durch die 25-Hydroxylase (CYP2R1 - Cytochrom P450 Familie 2, Subfamilie R1) in der Leber zu 25(OH)D<sub>3</sub> hydroxyliert. Dieser Schritt ist nur geringfügig reguliert, so dass 25(OH)D<sub>3</sub> die Hauptvariante des im Blut zirkulierenden VD und Indikator der VD-Versorgung ist [7,27]. Im Blut werden die VD-Metaboliten hauptsächlich an das VD-Bindeprotein (DBP, auch GC (group-specific component)) gebunden transportiert. Das stoffwechselaktivste 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> entsteht über die D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP27B1 - Cytochrom P450 Familie 27, Subfamilie B1) hauptsächlich in der Niere [28]. Dieser Schritt unterliegt einer engen Regulation durch das Parathormon (PTH) und das Produkt 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> selbst [29]. Nach Bindung an den VD-Rezeptor (VDR) verbindet sich dieser zu einem Heterodimer mit dem Retinoid X Rezeptor alpha (RXR $\alpha$ ). Dieser VDR-RXR $\alpha$  Komplex reguliert die Expression von Genen durch Bindung VD-regulierter Elemente (VDRE) [29]. Die erste Inaktivierungsreaktion wird durch die 25-Hydroxyvitamin-D-24-Hydroxylase (CYP24A1 - CYP24A1 Cytochrom P450 Familie 24, Subfamilie A1) katalysiert, deren Endprodukt die biliär eliminierte Calcitriolinsäure ist [30].

Neben Ernährungsfaktoren, BMI und UVB-Exposition ist die adäquate VD-Versorgung von genetischen Varianten, unter anderem Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs - Single Nucleotide Polymorphisms), der im VD-Stoffwechsel beteiligten Gene abhängig [31-46]. Im Fokus der Forschung stehen SNPs der auf- und abbauenden Enzyme (CYP2R1, CYP27B1 und CYP24A1) sowie der Transport- (DBP) und Effektorproteine (VDR). SNPs dieser Gene werden mit der Kontrolle des Glukosestoffwechsels und dem Risiko für T2D in Verbindung gebracht [12,47-50]. Das Ausmaß des genetischen Einflusses sowie die Kausalität der beobachteten Assoziationen sind noch nicht abschließend geklärt.

Auch die Varianz in individuellen Veränderungen der VD-Konzentration während einer oralen VD-Einnahme unterliegt genetischen Einflüssen [51-58]. Inwieweit diese Assoziationen auch bei Patienten mit T2D relevant sind wurde bisher kaum untersucht. Lediglich eine Arbeitsgruppe um Neyestani et al. beschrieben einen signifikant höheren Anstieg der 25(OH)D<sub>3</sub> Konzentration für den Genotyp VDR rs2228570 CC bei Patienten mit T2D [59].

Zur Ergänzung der lückenhaften und kontroversen Datenlage wurde in dieser Arbeit der Einfluss von zwölf SNPs in fünf Genen des VD-Stoffwechsels, zu folgenden drei Aspekten analysiert:

- (1) Risiko an T2D zu erkranken
- (2) 25(OH)D<sub>3</sub> und 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Konzentrationen bei Patienten mit T2D
- (3) Genetischer Einfluss auf 25(OH)D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, PTH, C-Peptid und HbA<sub>1c</sub> auf die Wirkung einer Nahrungsergänzung mit VD<sub>3</sub> bei nicht insulinabhängigen T2D Patienten.

Die SNPs waren im Einzelnen: CYP2R1 (rs10741657), CYP27B1 (rs10877012), DBP (rs4588, rs7041), VDR (rs7975232, rs731236, rs2228570, rs1544410) und CYP24A1 (rs2582426, rs927650, rs2296241, rs2248137).

## 4.2 Übersicht des zur Veröffentlichung angenommenen Manuskripts bzw. Publikation: „Vitamin D in Type 2 Diabetes: Genetic Susceptibility and the Response to Supplementation“

Varianten von VD-Stoffwechselgenen können die VD-Konzentrationen beeinflussen und zu T2D prädisponieren. Diese Studie untersuchte die Auswirkungen dieser Varianten auf die Krankheitsanfälligkeit, die VD-Konzentration sowie Änderungen der VD-, PTH-, C-Peptid- und HbA<sub>1c</sub>-Konzentrationen nach Cholecalciferol Einnahme bei Patienten mit T2D. Insgesamt wurden 12 Polymorphismen der VD-Stoffwechselgene untersucht: CYP2R1 (rs10741657), CYP27B1 (rs10877012), DBP (rs4588, rs7041), VDR (rs7975232, rs731236, rs2228570, rs1544410) und CYP24A1 (rs2582426, rs927650, rs2296241, rs2248137).

Verglichen mit gesunden Kontrollen fanden sich bei Patienten mit T2D häufiger die Allele CYP2R1 rs10741657 A, VDR rs7975232 G und rs1544410 G (Tabelle 2). In unserer Studienpopulation war ein VD-Mangel mit einem 13,9-fachen Risiko für T2D assoziiert (CI [4,8 - 39,2],  $p_c < 0,001$ ). Die Genotypen CYP27B1 rs10877012 CC, DBP rs4588 CC, rs7041 GG, CYP24A1 rs2585426 CG und rs2248137 CG zeigten eine Assoziation zu niedrigeren 25(OH)D<sub>3</sub> Konzentrationen bei Patienten mit T2D (Tabelle 3). Signifikant niedrigere 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Konzentrationen ergaben sich für den Genotyp DBP rs4588 CC (Tabelle 3).

Der Einfluss des genetischen Hintergrundes auf Stoffwechseländerungen während einer VD-Einnahme wurde im Rahmen einer doppelt-verblindeten, Placebo-kontrollierten Interventionsstudie untersucht. Fünfundsechzig Patienten erhielten über 6 Monate entweder Cholecalciferol- oder Placebo-Öl. Bis zu einem 6 monatigen Follow-up wurden alle drei Monate die 25(OH)D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, PTH-, C-Peptid- und HbA<sub>1c</sub>-Konzentrationen gemessen. Ein zum Ende des Beobachtungszeitraums signifikanter Anstieg oder Trend ( $p < 0,1$ ) der 25(OH)D<sub>3</sub> Konzentration in der Therapie- verglichen mit der Placebogruppe wurde als „gutes Ansprechen“ definiert und für die Genotypen CYP27B1 rs10877012 AC, DBP rs4588 CC, VDR rs7975323 AG und rs1544410 GG beobachtet. Trotz Substitution zeigten Patienten mit dem Genotyp CYP24A1 rs2296241 GG keine

signifikante Änderung der VD-Konzentration während des Studienzeitraums (Tabelle 4). Eine signifikante PTH-Absenkung nach sechs Monaten Intervention zeigte sich die Genotypen CYP2R1 rs10741657 AG, DBP rs4588 CC, VDR rs2228570 CT und CYP24A1 rs2248137 GG (Tabelle 5).

Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass genetische Varianten des VD-Stoffwechsels für T2D prädisponieren. Zudem ergeben sich Hinweise für eine genetische Regulation des VD-Stoffwechsels. Als einer der Ersten zeigen wir, dass sowohl 25(OH)D<sub>3</sub>-, als auch PTH-Konzentrationsänderungen während einer Cholecalciferol-Einnahme bei Patienten mit T2D genetischen Einflüssen durch die VD-Stoffwechselfgene unterliegen.

### 4.3 Diskussion

Eine Assoziation von niedrigen VD-Konzentrationen und T2D wurde schon vor mehr als 25 Jahren beschrieben [60] und in diversen Folgestudien bestätigt [13,16,61]. Die Kausalität wurde in den vergangenen Jahren, bislang ohne abschließenden Konsens, intensiv diskutiert [15,17,26,62]. In ihrem Review fassen Szymczak-Pajor et al. die molekularen Verknüpfungen zwischen Insulinresistenz, Adipozytenstoffwechsel und VD zusammen [8]. Die Lokalisation eines VDRE in den Promotorregionen des Insulingens und am pankreatischen  $\beta$ -Zellwachstum beteiligter Gene, legen einen direkten Einfluss von VD auf die Insulinsekretion und  $\beta$ -Zellfunktion nahe. Auch nicht genomische Effekte, wie die Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration und eine konsekutive Stimulation der Insulinsekretion in pankreatischen  $\beta$ -Zellen, sowie die Aktivierung diverser kalziumabhängiger Signalkaskaden spielen hier eine Rolle [8]. In vivo lässt sich dieser Zusammenhang nicht eindeutig reproduzieren, so dass eine Kausalität bezweifelt wird [19,25,62]. Die Überschneidung von Risikofaktoren für einen VD-Mangel und einen T2D wie hoher BMI, geringe körperliche Aktivität und ungesunde Ernährung, erschweren den klinischen Nachweis eines kausalen Zusammenhangs.

Der Versuch auf genetischer Ebene Ursachen für klinische Assoziationen zu finden, hat zu einer Vielfalt an Publikationen mit sehr heterogenen Studienprotokollen und ebenso vielfältigen Ergebnissen geführt. In der vorliegenden Studie wurde dem Einfluss von zwölf SNPs in fünf unmittelbar dem VD-Stoffwechsel zugehörigen Genen auf die Krankheitsanfälligkeit für T2D, die VD-Konzentrationen von Patienten mit T2D und den Einfluss auf Stoffwechseleränderungen von Patienten während und nach einer oralen VD-Einnahme nachgegangen.

Das Genprodukt des CYP2R1 Gens ist das Schlüsselenzym der ersten Hydroxylierungsreaktion des VD-Stoffwechsels [63]. Viele Studien zeigen einen Einfluss von SNPs des CYP2R1 Gens, unter anderem rs10741657, auf die VD-Konzentration [1,32,34,39,41,64-66]. In unserer Studienkohorte zeigte sich ein Trend für erniedrigte VD-Konzentrationen bei Patienten mit dem Genotyp GG verglichen mit gesunden Kontrollen. Diese Assoziation zeigt sich auch in

verschiedenen, nicht T2D spezifischen Studien [19,38,43,45,51,66-68], wobei die Effekte zum Teil jahreszeitspezifisch beobachtet wurden [1]. Obwohl der SNP in vielen Publikationen beschrieben wird und diverse Assoziationen bekannt sind, steht eine differenzierte Betrachtung der genetischen Veränderung und Auswirkungen auf molekularer Ebene noch aus. Der SNP rs10741657 liegt in der Promotorregion des CYP2R1 Gens und ist durch einen G zu A Basenaustausch gekennzeichnet. Für das G-Allel wird eine reduzierte Enzymaktivität und somit eine verringerte Konversionsrate des Vitamin D<sub>3</sub> zu 25(OH)D<sub>3</sub> vermutet [1], welche entsprechend zu reduzierten 25(OH)D<sub>3</sub> Konzentrationen führen würde. Bezüglich einer Beeinflussung der VD-Konzentrationen bei T2D Patienten fanden sich in unserer Studie jedoch keine Hinweise. Yuan et al. zeigen, dass genetisch beeinflusste VD-Konzentrationen in Abhängigkeit des rs10741657 SNPs mit dem Risiko für T2D assoziiert sind [12]. In unserer Kohorte war das A-Allel mit einem erhöhten T2D Risiko assoziiert, während weitere Publikationen keinen Einfluss dieses SNPs auf das Risiko für T2D beschreiben [64,69]. Diese Diskrepanz ergibt sich möglicher Weise aus einem unterschiedlichen Umgang mit möglichen Confoundern, welche zu einem Fehler erster Art geführt haben könnten.

Für den CYP27B1 rs10877012-SNP finden sich in der spärlichen Datenbasis keine Auswirkungen auf das Krankheitsrisiko von T2D [69]. Bezüglich 25(OH)D<sub>3</sub> zeigten zwei Studien signifikante, jedoch entgegengesetzte Ergebnisse [78,79], während in den meisten Analysen kein Zusammenhang gefunden wurde [32-34,65]. Wir fanden bei Patienten mit T2D und dem CC-Genotyp signifikant niedrigere 25(OH)D<sub>3</sub> Konzentrationen als bei gesunden Kontrollen, welches nach unserem Wissen die derzeit einzige Beschreibung einer T2D bezogenen Betrachtung der VD-Konzentrationen in Verbindung mit diesen SNP ist. Der beschriebene SNP befindet sich in der Promotor-Region des CYP27B1-Gens. Grundsätzlich könnte eine reduzierte mRNA Konzentration über Veränderungen der Proteinkonzentration den beobachtbaren Prozessen zu Grunde liegen [80]. Hyppönen et al. beschreiben in ihrer Studie eine jahreszeitliche Abhängigkeit der beobachteten Assoziation [79]. Entsprechend wäre eine Adjustierung der Ergebnisse nach Jahreszeit der Blutabnahme zu bedenken.



T2D Patienten wiesen signifikant häufiger die G-Allele der VDR rs7975232 und rs1544410-SNPs auf (In vielen Publikationen nach den Restriktionsenzymen des Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) auch unter *ApaI* (rs7975232), *TaqI* (rs731236), *FokI* (rs2228570) und *BsmI* (rs1544410) beschrieben). Zwar gibt es einzelne Studien, die Assoziationen dieser SNPs mit der Entwicklung eines T2D in Verbindung bringen [47,70-72], in größer angelegten Meta-Analysen und GWAS konnte dies jedoch nicht bestätigt werden [49,69,73-76].

In unserer Studienkohorte zeigte sich auch einen Einfluss auf die Änderung der VD-Konzentration unter VD-Einnahme durch VDR-SNPs. Die Genotypen rs7975232 AG und rs1544410 GG zeigten am Studienende erhöhte VD-Konzentrationen in der Verumgruppe. Gaffney-Stomberg et al. zeigen in ihrer Studie einen positiven Einfluss des rs1544410 GG-Genotyps auf die VD-Konzentration [57] und Serrano et al. berichteten einen positiven Einfluss auf die Lipidwerte, jedoch keine Auswirkungen auf 25(OH)D<sub>3</sub> Konzentrationen, während VD-Einnahme über angereicherte Lebensmittel (48). Der Zusammenhang zwischen VDR-SNPs und VD-Einnahme in Bezug auf T2D wurde bisher kaum untersucht. Neyestani et al. zeigen ein schlechtes Ansprechen des Genotyps VDR rs2228570 TT, welches in unserer Studie nicht reproduzierbar war. Uitterlinden et. al beschreiben in ihrem Review ein hohes LD der VDR rs7975232, rs731236 und rs1544410 Polymorphismen. Die beiden häufigsten Haplotypen sind mit 48% GGT (=baT, entsprechend der Nomenklatur der Restriktionsenzyme) und mit 40% AAC (=Bat), welche wiederum mit einem Poly-A-Schwanz in LD stehen [77]. Eine haplotypenbasierte Analyse wäre entsprechend für diesen VDR-Genabschnitt sinnvoll. Zudem sind phänotypische Ausprägungen nicht ohne weiteres durch Varianten zweier intronischer (rs7975232 und rs1544410) und eines synonymen (rs731236) SNPs zu erklären. Hier sind komplexe genetische Analysen sind notwendig, um entsprechende Konstellationen zu detektieren und schließlich mit klinisch relevanten Risiken in Verbindung zu bringen. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen VDR-SNPs ist für rs2228570 kein bekanntes LD beschrieben. Die C zu T Mutation führt über einen Aminosäureaustausch Lysin zu Methionin zu einem zweiten Startcodon und einem um drei Aminosäuren verlängertes VDR Protein. Dieses zeichnet sich

durch eine niedrigere Transkriptionsaktivität aus, welche phänotypischen Veränderungen zu Grunde liegen könnte [77].

Patienten mit T2D und den Genotypen DBP rs4588 CC und rs7041 GG zeigten in der vorliegenden Studie erniedrigte 25(OH)D<sub>3</sub> Konzentrationen. In der Literatur finden sich interessanter Weise überwiegend entgegengesetzte Assoziationen [31,37,38,66,81-85]. Der Basenaustausch (C zu A für rs4588 und T zu G für rs7041) führt über eine Veränderung der Aminosäuresequenz (Threonin zu Lysin für rs4588 und Asparagin zu Glutamin für rs7041) zu einer reduzierten 25(OH)D<sub>3</sub> Bindungsaffinität [86]. Die Mutation rs4588 geht mit dem Verlust einer O-Glycosylierungs-Stelle des Threonins einher, welches zu einem veränderten Glycosylierungsmuster des DBP führt [87-89]. GlcNac-Acetylierungen können bei diversen Proteinen auftreten und spielen eine zentrale Rolle in der Regulation wichtiger Signalwege, des Zellzyklus, von Protein-Protein-Interaktionen und der Transkriptionsregulation. Hyperinsulinämie, Hyperlipidämie und Hyperglykämie sind assoziiert mit vermehrter GlcNac-Acetylierung verschiedener Signalmoleküle, welche ihrerseits die Insulinsignalkaskade regulieren und so zu einer Insulinresistenz beitragen können [90,91]. Das vordergründig widersprüchlich erscheinende Ergebnis der vorgelegten Studie kann verschiedene Hintergründe haben. Die sehr niedrige Prävalenz der Minor-Allele könnte zu einem Fehler erster Art geführt haben. Des Weiteren sind die Studienpopulationen der genannten Publikationen sehr heterogen und keine andere Studie bezieht sich auf T2D. Wenn Glykosylierungsmuster über einen hohen Blutzucker verändert werden können oder umgekehrt Veränderungen im Glykosylierungsverhalten verschiedener Proteine zu einer Blutzuckererhöhung führen, ist möglicherweise der pathologisch veränderte Metabolismus bei T2D der Grund für die hier beobachteten genetischen Effekte und deren Abweichung von bisher beschriebenen Assoziationen.

Das gute Ansprechen auf eine VD-Einnahme, welches für den DBP rs4588 CC-Genotyp beobachtet wurde, ist auch bei gesunden Probanden beschrieben worden und möglicher Weise Ausdruck von Änderungen im VD-DBP Bindeverhalten [52]. Dieser- war zudem als einziger auch mit erniedrigten 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> bei T2D-Patienten assoziiert und zeigte zusätzlich eine signifikante PTH Reduktion unter VD-Einnahme. Daher scheinen weitere genetische,

epigenetische und molekularbiologische Untersuchungen dieses SNP vielversprechend zu sein.

Auch im letzten Stoffwechselprozess, dem Abbau des D-Vitamins, sind genetische Einflüsse auf den VD-Stoffwechsel evident. Verschiedene SNPs des CYP24A1 Gens sind mit erniedrigten 25(OH)D<sub>3</sub> Konzentrationen assoziiert [27]. Für CYP24A1 rs2582426 CG und rs2248137 CG fanden sich erniedrigte VD-Konzentrationen in unserer Studienpopulation. Für den Genotyp rs2582426 GG zeigte sich ein Trend zu ebenfalls niedrigen VD-Konzentrationen ( $p_c = 0,087$ ), weshalb das G-Allel das Risiko codieren könnte und sich durch die limitierte Probandenzahl nicht in dieser Form in unseren Daten wiederfindet. T2D Patienten mit dem CYP24A1 rs2296241 GG-Genotyp unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt in den VD-Konzentrationen zwischen Verum- und Placebogruppe. Die Datenlage bezüglich der untersuchten SNPs ist dünn. Es werden vereinzelte Assoziationen mit Multiple Sklerose [92] oder Asthma bronchiale [93], nicht alkoholischer Steatosis hepatis oder Mundhöhlenkrebs erwähnt [94,95]. Metaanalysen, umfassende Reviews oder Positivbefunde in GWAS fehlen jedoch. Zwei SNPs liegen intronisch (rs927650 und rs2248137), der dritte SNP 2kb upstream des Transkripts (rs2585426) und bei dem vierten SNP handelt es sich um eine stille Mutation (rs2296241). Kausale und klinische relevante Ausprägungen sind damit eher unwahrscheinlich und mögliche Beobachtungen nur über ein LD oder epigenetische, bislang unbekannte Effekte, erklärbar. Veränderungen der Abbaugeschwindigkeit von VD könnten grundsätzlich klinisch relevante Folgen haben, für die untersuchten SNPs wurde diese bisher nicht beschrieben.

Abschließend bestätigt diese Arbeit einen ausgeprägt prävalenten VD-Mangel bei Patienten mit T2D. Zudem ergeben sich Anhaltspunkte für einen Einfluss der genetischen Varianten auf das Risiko zur Entwicklung eines T2D und die VD-Konzentration bei Erkrankten. Als eine der Ersten beschreiben wir in dieser Studie jedoch T2D spezifische Assoziationen von Genen der VD-Kaskade mit relevanten Stoffwechselfparametern. Die Ursache-Wirkungs-Frage bleibt mangels bilateraler Signifikanzen überwiegend ungeklärt. Grundsätzlich konnte diese Studie aber zeigen, dass das Ansprechen auf eine VD-Substitution genetisch beeinflusst ist.

Es besteht noch großer Bedarf, das Prohormon VD genauer zu charakterisieren, um es als Therapieoption oder zur Prävention eines T2D sinnvoll einzusetzen. Hervorzuheben ist der DBP rs4588 Genotyp CC. Er zeigt eine Assoziation mit sowohl erniedrigten 25(OH)D<sub>3</sub>-, als auch 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Konzentrationen und ein sehr gutes Ansprechen auf die VD-Einnahme inklusive einer signifikanten PTH-Suppression, so dass hier weitere Studien vielversprechend erscheinen. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse sollten insbesondere Studien mit verschiedenen VD-Dosierungen, längeren Einnahmeintervallen und einer deutlich größeren Anzahl von Probanden folgen.

## 5. Manuskript/Publikation

Die vorliegende publikationsbasierte Dissertation basiert auf der folgenden, der Auflistung angehängten, Originalarbeit:

Klahold E, Penna-Martinez M, Bruns F, Seidl C, Wicker S, Badenhoop K. Vitamin D in Type 2 Diabetes: Genetic Susceptibility and the Response to Supplementation. *Horm Metab Res.* 2020 Jul;52(7):492-499. doi: 10.1055/a-1157-0026. Epub 2020 Jun 15. PMID: 32542627; PMCID: PMC7746514.

Impact factor (2020) 2,936

# Vitamin D in Type 2 Diabetes: Genetic Susceptibility and the Response to Supplementation

OPEN ACCESS



## Authors

Edith Klahold<sup>1</sup>, Marissa Penna-Martinez<sup>1\*</sup>, Franziska Bruns<sup>1</sup>, Christian Seidl<sup>2</sup>, Sabine Wicker<sup>3</sup>, Klaus Badenhoop<sup>1\*</sup>

## Affiliations

- 1 Department of Internal Medicine I, Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, Goethe-University Hospital, Frankfurt/Main, Germany
- 2 German Red Cross Blood Donor Service, Institute for Transfusion Medicine and Immunohaematology, Frankfurt/Main, Germany
- 3 Occupational Health Service, Goethe-University Hospital, Frankfurt/Main, Germany

## Key words

CYP2R1, CYP27B1, DBP, VDR, CYP24A1, GC

received 15.03.2019

accepted 07.04.2020

published online 15.6.2020

## Bibliography

Horm Metab Res 2020; 52: 492–499

DOI 10.1055/a-1157-0026

ISSN 0018-5043

© 2020. The Author(s).

This is an open access article published by Thieme under the terms of the Creative Commons Attribution-NonDerivative-NonCommercial-License, permitting copying and reproduction so long as the original work is given appropriate credit. Contents may not be used for commercial purpose, or adapted, remixed, transformed or built upon. (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Georg Thieme Verlag KG, Rüdigerstraße 14,  
70469 Stuttgart, Germany

## Correspondence:

Edith Klahold

Department of Internal Medicine I, Division of Endocrinology,  
Diabetes and Metabolism, Goethe-University Hospital

Theodor-Stern-Kai 7

60590 Frankfurt/Main

Germany

Tel.: +49 69 6301 83977, Fax: +49 69 6301 83343

eklahold@gmx.de



Supplementary Material for this article is available online at <http://www.thieme-connect.de/products>.

## ABSTRACT

Variants of vitamin D metabolism-genes may predispose to type 2 diabetes (T2D). This study investigated the impact of these variants on disease susceptibility, Vitamin D, parathyroid hormone, C-peptide and HbA1c levels before and after cholecalciferol supplementation in patients with T2D. Twelve polymorphisms within CYP2R1, CYP27B1, DBP, VDR and CYP24A1 were genotyped in 553 T2D patients and 916 controls. In addition 65 patients receiving either cholecalciferol or placebo were analyzed during 6 months intervention and 6 months follow-up. T2D risk alleles are VDR rs7975232 “G” ( $p_c = 0.031$ ), rs1544410 “G” ( $p_c = 0.027$ ) and CYP2R1 rs10741657 “A” ( $p_c = 0.016$ ). Patients with genotypes CYP27B1 rs10877012 “CC” ( $p_c = 4 \times 10^{-5}$ ), DBP rs7041 “GG” ( $p_c = 0.003$ ), rs4588 “CC” ( $p_c = 3 \times 10^{-4}$ ), CYP24A1 rs2585426 “CG” ( $p_c = 0.006$ ) and rs2248137 “CG” ( $p_c = 0.001$ ) showed lower 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and DBP rs4588 “CC” lower 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> levels ( $p_c = 0.005$ ). Whereas DBP rs4588 “CC” ( $p_c = 0.009$ ), CYP27B1 rs10877012 “AC” ( $p_c = 0.059$ ), VDR rs7975323 “AG” ( $p_c = 0.033$ ) and rs1544410 “GG” ( $p_c = 0.013$ ) are associated with higher 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> levels at 6 months’ follow-up. Significant PTH suppression was detected for CYP2R1 “AG” ( $p_c = 0.002$ ), DBP rs4588 “CC” ( $p_c < 0.001$ ), VDR rs110735810 “CT” ( $p_c < 0.001$ ) and CYP24A1 rs2248137 “GG” ( $p_c = 0.021$ ). Genetic variants of the vitamin D system predispose to type 2 diabetes and regulate – partially – vitamin D metabolism, concentrations and the vitamin D status. Vitamin D insufficiency is a T2D risk factor. The response to cholecalciferol supplementation can be measured as 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> increment and PTH suppression. This process is regulated by genes of the vitamin D system conferring modest T2D risk.

\* equal contribution Penna-Martinez & Badenhoop

## Introduction

Vitamin D (VD) insufficiency impairs glucose homeostasis and confers susceptibility to type 2 diabetes (T2D) [1]. The VD status reflects endogenous synthesis via UVB irradiation, dietary intake, and genetic background [2]. The liver enzyme CYP2R1 25-hydroxylase converts vitamin D<sub>3</sub>, obtained from previtamin D<sub>3</sub> isomerization, into 25(OH)D<sub>3</sub>, which is the major circulating VD metabolite and indicates the VD status [3]. Circulating VD metabolites are mainly bound to vitamin D binding protein (DBP, also known as GC – group-specific component). The D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -hydroxylase (CYP27B1) catalyzes the activation to 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in the kidney and macrophages [4]. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> activates the vitamin D receptor (VDR), which regulates the expression of genes with a vitamin D response element [5]. Finally, VD is degraded via 24-hydroxylation catalyzed by 25-hydroxyvitamin D 24-hydroxylase (CYP24A1) [6].

Besides environmental factors also genetic variation in the VD system as defined by single nucleotide polymorphisms (SNPs) influences VD serum levels [7].

The purpose of this study was to investigate VD system SNPs in T2D patients, whether they specifically regulate the basal VD status and its response to supplementation. Twelve SNPs of the VD system genes CYP2R1 (rs10741657), CYP27B1 (rs10877012), DBP (rs4588, rs7041), VDR (rs7975232, rs731236, rs2228570, rs1544410), CYP24A1 (rs2582426, rs927650, rs2296241, rs2248137) were analyzed in a case-control design. These SNPs were correlated with 25(OH)D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, parathyroid hormone (PTH), C-Peptide, and HbA1c concentrations in an interventional trial where patients with T2D had been supplemented with VD<sub>3</sub>.

## Patients and Methods

### SNPs of the VD system: T2D susceptibility and the VD status

A case-control cohort study was conducted to investigate an association of VD system SNPs with T2D. Data from up to 553 T2D patients and 916 healthy controls were available, but sufficient DNA for genotype analysis only in 464 patients (209 women and 255 men) and 292 (138 women and 154 men) controls.

Patients were recruited from the Endocrine & Diabetes Clinic, healthy controls from the Occupational Health service of the University Hospital in Frankfurt/Main and the Blood Donor Service. 25(OH)D<sub>3</sub> and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> concentrations were available for 62 (31 women and 31 men) patients and 73 (38 women and 35 men) healthy controls.

### VD intervention study

This preliminary pharmacogenetic analysis was conducted on samples from a recently published randomized trial [8], which investigated the effects of VD<sub>3</sub> treatment in T2D. Sixty-seven patients had been recruited (15 women, 18 men in therapy group and 16 women, 18 men in placebo group) to receive either Vigantol (VD<sub>3</sub>, 20 drops/week, 1904 IU/d) or placebo oil for 6 months and were followed for 6 months.

## Clinical parameters

Parameters were analyzed initially and after every three months until the trial's observational end at 12 months. 25(OH)D<sub>3</sub> (ng/ml) and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (pg/ml) concentrations were measured by radioimmunoassay (RIA), PTH (pg/ml) and C-Peptide (ng/ml) by solid phase chemiluminescence assay (CLIA), and HbA1c (mmol/mol) by spectrophotometric method.

## Vitamin D system genes and SNPs

Twelve SNPs in five genes were investigated: CYP2R1 (rs10741657), CYP27B1 (rs10877012), DBP (rs4588, rs7041), VDR (rs7975232, rs731236, rs2228570, rs1544410), and CYP24A1 (rs285426, rs927659, rs2296241, rs2248137).

Genomic DNA was extracted from whole blood by salting out [9]. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) and real-time polymerase chain reaction (rtPCR) were used for genotyping. Restriction enzymes were used according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs, Frankfurt/Main, Germany). Digestions products were separated on 3% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Rtpcr analysis was conducted in Taqman (ABI7300 system) under manufacturer's conditions (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). To confirm accuracy, random samples of all SNPs were genotyped twice with a concordance of 100%.

## Statistical analysis

All statistical analyses were performed using Bias for Windows 10.01. Non parametric testing was chosen for the metabolic parameters due to a non-Gaussian distribution ( $p \leq 10^{-4}$  in Shapiro-Wilk-test). Statistical significance was defined as  $p \leq 0.05$ .

## SNPs within the VD system genes and VD status

Kruskal-Wallis-test was applied for the genetic effects on 25(OH)D<sub>3</sub> and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> concentrations. For each SNP a global test, comparing patients and controls, was conducted first. In case of a significant result each genotype of this SNP was compared separately. Additionally the tests for a higher risk of VD insufficiency and the SNPs were performed by Chi<sup>2</sup>-test comparing the frequency of VD insufficient individuals between patients and healthy controls.

Bonferroni correction considered the number of SNPs in this gene (CYP2R1: 1, CYP27B1: 1, DBP: 2, VDR: 4, CYP24A1: 4), genotypes within one gene (3) and the amount of analyzed parameters (2).

## VD system SNPs and T2D susceptibility

Tests for the impact of VD insufficiency on T2D risk was performed by Chi<sup>2</sup>-test comparing the frequency of VD insufficient and VD sufficient individuals in our cohort study according to the status of disease. T2D susceptibility was investigated using Chi<sup>2</sup>-test comparing the SNP distribution between patients and healthy controls. To allow multiple testing, all p-values were Bonferroni corrected ( $p_c$ ) considering the number of genotypes (3) or alleles (2) and the amount of analyzed genes (12).

## VD intervention trial

Changes in 25(OH)D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, PTH, C-Peptide, and HbA1c concentrations during VD<sub>3</sub> supplementation were examined by Kruskal-Wallis-test comparing therapy and placebo group for each

genotype and study visit. For analysis of intervention associated changes of metabolic parameters within one genotype Friedman-test was used. Bonferroni-correction was performed considering the parameters (5), genotypes (3) and number of study visits during intervention/ follow-up (4).

## Results

### VD and T2D risk

Patients showed overall lower 25(OH)D<sub>3</sub> and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> concentrations compared to healthy controls [25(OH)D<sub>3</sub>: 18.00 vs. 12.25 ng/ml,  $p = 7 \times 10^{-4}$ ; 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>: 51.00 vs. 44.95 pg/ml  $p = 0.001$ ]. 25(OH)D<sub>3</sub> concentration is the standard parameter representing the individual VD status [10]. In our cohort study, VD insufficiency [25(OH)D<sub>3</sub> < 20 ng/ml] increases the risk of T2D by odds ratio (OR) 13.9 (confidence interval (CI) 4.8–39.2,  $p < 0.001$ ).

### VD system genes predispose to T2D

All genotyping data were in Hardy–Weinberg Equilibrium ( $p > 0.05$ ) for each SNP. VDR rs7975232 allele “G” [40.6% vs. 47.0%; OR: 1.30, CI: 1.05–1.60,  $p_c = 0.034$ ] was more frequent in T2D and there was a trend for VDR rs1544410 allele “G” (52.6% vs. 57.9%; OR: 1.24, CI: 1.01–1.53,  $p_c = 0.098$ ). These results were validated testing all samples available for that gene (VDR rs7975232 “G”: 43.2% vs. 48.0%; OR: 1.21, 95% CI: 1.04–1.41,  $p_c = 0.031$ , and VDR rs1544410 “G”: 53.9% vs. 58.7%; OR: 1.12, CI: 1.04–1.41,  $p_c = 0.027$ ). Furthermore, the “A” allele of CYP2R1 rs10741657 (36.3% vs. 42.1%; OR: 1.28, CI: 1.07–1.53,  $p_c = 0.016$ ) was more frequent among patients (► Table 1).

### VD system genes affect the VD metabolism in patients with T2D

#### VD status and SNPs

VD insufficiency was observed in 101 and VD sufficiency in 34 individuals. None of the analyzed SNPs showed a significant association to the individual’s VD status (► Table 1).

#### VD status and T2D associated SNPs

The VDR rs7975232 “G”, VDR rs1544410 “G”, and CYP2R1 rs10741657 “A” were associated with a higher T2D risk. The SNP dependent risk for T2D was analyzed in relation to VD insufficiency. This analysis did not reveal any significant impact of the three SNPs on T2D risk in this subgroup (Supplement ► Table 15).

#### Vitamin D level and T2D

Analyses of VD status allow a risk-calculation but to quantify the difference of VD levels between T2D and controls a testing based on VD concentrations is necessary. To screen for SNPs that are specifically associated with lower VD concentrations in T2D patients a lower  $p$ -value was applied ( $p < 0.01$ ). That way the specificity is raised and the per se lower VD concentrations in patients compared to controls are taken into account.

Lower 25(OH)D<sub>3</sub> concentrations were detected for the genotypes CYP27B1 rs10877012 “CC” ( $p_c = 4 \times 10^{-5}$ ), DBP rs7041 “GG” ( $p_c = 0.0003$ ), rs4588 “CC” ( $p_c = 3 \times 10^{-4}$ ), CYP24A1 rs2585426 “CG” ( $p_c = 0.006$ ), and rs2248137 “CG” ( $p_c = 0.001$ ). Additionally, the DBP

genotype rs4588 “CC” showed lower 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> concentrations ( $p_c = 0.005$ ) (► Table 2).

### VD system genes affect the response to Vitamin D<sub>3</sub> supplementation

Sixty-five participants in the interventional study were genotyped and – with an exploratory intention – analyzed for changes in 25(OH)D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, PTH, C-Peptide, and HbA<sub>1c</sub>. The following genotypes showed continuously higher 25(OH)D<sub>3</sub> concentrations till 6 months’ follow-up compared to placebo (significant/trend): CYP27B1 rs10877012 “AC” (18.80 vs. 13.85,  $p_c = 0.059$ ), DBP rs4588 “CC” (18.80 vs. 10.50,  $p_c = 0.086$ ), VDR rs7975232 “AG” (20.00 vs. 10.90,  $p_c = 0.034$ ) and VDR rs1544410 “GG” (21.10 vs. 9.90,  $p_c = 0.013$ ) whereas the genotype CYP24A1 rs2296241 “GG” did not show any significant difference for the response to VD<sub>3</sub> supplementation any time (Supplement ► Table 25).

PTH was significantly suppressed during intervention in carriers of the genotypes CYP2R1 “AG” (median difference (MD) 12.0, CI 5.0–21.0,  $p_c = 0.002$ ), DBP rs4588 “CC” (MD 14.5, CI 8.0–24.0,  $p_c < 0.001$ ), VDR rs2228570 “TC” (MD 13.5, CI 7.0–20.5,  $p_c < 0.001$ ), CYP24A1 rs927650 “TT” (MD 13.6, CI 5.0–23.0,  $p_c = 0.045$ ), CYP24A1 rs2296241 “AG” (MD 13.03, CI 7.00–20.50,  $p_c = 0.005$ ) and CYP24A1 rs2248137 “CC” (MD 14.5, CI 6.3–25.0,  $p_c = 0.021$ ).

For changes in 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, C-Peptide or HbA<sub>1c</sub> there was no significant association to any investigated SNP (data not shown).

## Discussion and Conclusions

In our cohort study, we find a higher risk for T2D conferred by CYP2R1 rs10741657 “A”, VDR rs7975232 “G”, and VDR rs1544410 “G”. These two loci control VD synthesis (CYP2R1) and VD action (VDR). A recently published GWAS identified 143 risk variants for T2D in Europeans but none of the VD pathway [11] and a study from Norway did not find any association of CYP2R1 SNPs with T2D [12]. However a recently published Mendelian randomization study on more than 890 000 individuals including the CYP2R1 SNP showed that genetically predicted higher 25(OH)D<sub>3</sub> levels conferred significant protection from T2D [13]. Since genetic associations do not explain a cause-effect relation, the functional explanation for the observed effects might be due to linkage of the analyzed SNPs with other causal genes. The detection of such genes would guide to pathways of interest.

For 25(OH)D<sub>3</sub> levels associations with CYP2R1 genotypes were established by GWAS and large scale population studies [14,15] while there was no effect on VD concentrations in our small amount of patients with T2D. The CYP2R1 gene codes for the key enzyme in the vitamin D metabolism for the 25-hydroxylation. How a variant of this gene, which is located near the 3’UTR affects a different function remains unclear. Potential explanations include changes in enzyme activity resulting in lower 25(OH)D<sub>3</sub> synthesis, altered transcription rate, mRNA stability, substrate affinity and protein instability [16]. Linkage disequilibrium and more complex gene-gene or gene-environment interactions may affect the gene’s regulation and warrant further investigations.

For the three intronic SNPs of the VDR genes, rs1544410, rs7975232, and rs731236 (also known as BsmI, ApaI, and TaqI, respectively), associations with the VD status and also with T2D risk



**Table 1** SNPs in VD system genes and susceptibility to T2D and VD status [25(OH)D<sub>3</sub> < 20 ng/ml].

Gene	SNP	Allele	Control	n	Patients	n	OR (95% CI)	P <sub>c</sub>	VD Status (25(OH)D <sub>3</sub> )		OR (95% CI)	P <sub>c</sub>
									< 20 ng/ml n = 101	≥ 20 ng/ml n = 34		
CYP2R1	rs10741657	A	350 (36.3%)	482	455 (42.1%)	540	1.28 [1.07–1.53]	<b>0.016</b>	70	29	0.72 [0.41–1.25]	0.299
		G	614 (63.7%)		625 (57.9%)		0.78 [0.66–0.94]		132	39	1.4 [0.8–2.46]	
CYP27B1	rs10877012	A	303 (34.9%)	434	344 (31.5%)	546	0.86 [0.71–1.04]	0.245	70	21	1.19 [0.66–2.14]	0.674
		C	565 (65.1%)		748 (68.5%)		1.17 [0.97–1.41]		132	47	0.84 [0.47–1.52]	
DBP	rs4588	A	223 (28.6%)	390	300 (27.2%)	551	0.93 [0.76–1.15]	1.000	60	18	1.17 [0.63–2.18]	0.723
		C	557 (71.4%)		802 (72.8%)		1.07 [0.87–1.31]		142	50	0.85 [0.46–1.58]	
DBP	rs7041	T	353 (46.2%)	382	489 (44.7%)	547	1.06 [0.88–1.28]	1.000	96	23	1.77 [1.0–3.14]	0.068
		G	411 (54.8%)		605 (55.3%)		1.06 [0.88–1.28]		106	45	0.56 [0.32–1.0]	
VDR	rs7975232	G	746 (43.2%)	863	518 (48.0%)	540	1.21 [1.04–1.41]	<b>0.031</b>	98	27	1.43 [0.82–2.5]	0.263
		A	980 (56.8%)		562 (52.0%)		0.83 [0.71–0.96]		104	41	0.7 [0.4–1.22]	
VDR	rs731236	T	682 (39.2%)	871	418 (39.4%)	530	1.01 [0.87–1.18]	1.000	74	41	0.88 [0.5–1.54]	0.758
		C	1060 (60.8%)		642 (60.6%)		0.99 [0.85–1.16]		128	41	1.14 [0.65–2.0]	
VDR	rs2228570	T	652 (38.5%)	847	412 (38.1%)	540	0.99 [0.84–1.15]	1.000	77	31	0.74 [0.42–1.28]	0.345
		C	1042 (61.5%)		668 (61.9%)		1.01 [0.87–1.19]		125	37	1.36 [0.78–2.37]	
VDR	rs1544410	A	844 (46.1%)	916	457 (41.3%)	553	0.82 [0.7–0.96]	<b>0.027</b>	76	28	0.86 [0.49–1.51]	0.700
		G	988 (53.9%)		649 (58.7%)		1.12 [1.04–1.41]		126	40	1.16 [0.66–2.03]	
CYP24A1	rs2585426	C	957 (74.6%)	641	759 (73.1%)	519	0.92 [0.77–1.11]	0.864	125	45	1.12 [0.62–2.03]	0.82
		G	325 (25.4%)		279 (26.9%)		1.08 [0.90–1.30]		57	23	0.89 [0.49–1.61]	
CYP24A1	rs927650	C	736 (53.8%)	684	607 (55.4%)	548	1.07 [0.91–1.25]	0.915	96	37	0.76 [0.44–1.32]	0.400
		T	632 (46.2%)		489 (44.6%)		0.94 [0.80–1.10]		106	31	1.32 [0.76–2.29]	
CYP24A1	rs2296241	A	366 (53.5%)	342	544 (50.7%)	537	0.89 [0.74–1.08]	0.526	108	37	0.96 [0.55–1.67]	0.996
		G	318 (46.5%)		530 (49.3%)		1.12 [0.93–1.36]		94	31	1.04 [0.60–1.80]	
CYP24A1	rs2248137	G	260 (38.3%)	339	416 (36.6%)	568	0.93 [0.76–1.13]	0.985	120	43	0.85 [0.48–1.50]	0.678
		C	418 (61.7%)		720 (63.4%)		1.08 [0.88–1.31]		82	25	0.18 [0.67–2.07]	

Significant results are highlighted in bold letters. P<sub>c</sub>: P<sub>c</sub> corrected for multiple testing.

▶ Table 2 SNPs in VD system genes and the vitamin D metabolites: 25(OH)D<sub>3</sub> and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> concentrations.

SNP	25(OH)D <sub>3</sub> (ng/ml)			1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (pg/ml)			25(OH)D <sub>3</sub> (ng/ml)			1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (pg/ml)			
	Group	n	Median	P <sub>global</sub>	P <sub>c</sub>	Median	P <sub>global</sub>	P <sub>c</sub>	Group	n	Median	P <sub>global</sub>	P <sub>c</sub>
CYP2R1 rs10741657													
AA	T2D	7	8.50	0.003	0.056	43.30	0.045	0.232	T2D	5	7.90	0.003	1.000
	Co	13	21.20			51.00			14.40	47.50	1.000		
AG	T2D	32	13.30	0.097	58.00	0.045	0.044	0.003	T2D	28	12.65	0.003	0.0945
	Co	27	18.90						18.65	54.50	0.079		
GG	T2D	23	10.90	0.011	44.50	0.045	0.396	0.056	T2D	29	12.20	0.056	0.500
	Co	33	15.80						48.00	54.00	0.500		
CYP2B1 rs10877012													
AA	T2D	8	16.70	1.000	46.05	0.058	0.058	0.153	T2D	9	13.60	0.153	1.000
	Co	11	12.50						51.00	22.50	57.50		
AC	T2D	25	12.60	0.222	44.90	0.058	0.058	0.014	T2D	33	12.30	0.014	0.534
	Co	28	15.20						53.50	20.20	55.00		
CC	T2D	29	11.00	<0.001	44.50	0.058	0.058	1.000	T2D	20	12.05	1.000	0.428
	Co	34	20.45						52.00	16.20	49.50		
DBP rs4588													
AA	T2D	3	12.60	1.000	30.70	0.058	0.058	1.000	T2D	32	12.05	0.086	0.075
	Co	9	15.80						38.00	17.90	51.00		
AC	T2D	25	13.60	0.866	46.80	0.058	0.058	0.210	T2D	27	13.60	<0.001	0.006
	Co	29	15.60						58.00	20.90	50.00		
CC	T2D	34	11.45	<0.001	43.45	0.058	0.058	0.005	T2D	3	7.80	0.641	1.000
	Co	35	19.20						51.00	11.40	59.00		
DBP rs7041													
TT	T2D	11	12.60	1.000	46.80	0.058	0.058	1.000	T2D	20	11.05	0.133	1.000
	Co	15	15.80						45.00	16.20	47.50		
TG	T2D	31	13.60	0.175	45.00	0.058	0.058	0.284	T2D	29	13.00	0.004	1.000
	Co	36	17.30						49.50	17.65	51.00		
GG	T2D	20	10.95	<0.001	43.90	0.058	0.058	0.015	T2D	13	11.90	0.505	0.030
	Co	22	21.20						55.50	18.90	56.00		
VDR rs7975232													
GG	T2D	13	11.90	1.000	39.70	0.058	0.058	0.701	T2D	19	11.20	0.214	0.110
	Co	16	15.70						48.00	14.10	58.00		
AG	T2D	31	12.30	0.046	44.50	0.058	0.058	0.117	T2D	29	12.70	0.006	1.000
	Co	36	18.90						55.50	18.05	49.00		
AA	T2D	18	13.15	0.064	46.70	0.058	0.058	1.000	T2D	14	11.80	1.000	1.000
	Co	21	19.20						51.00	19.05	51.50		

**Table 2** Continued.

SNP	25(OH)D <sub>3</sub> (ng/ml)			1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (pg/ml)			25(OH)D <sub>3</sub> (ng/ml)			1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (pg/ml)				
	Group	n	Median	P <sub>global</sub>	P <sub>c</sub>	Median	P <sub>global</sub>	P <sub>c</sub>	Median	P <sub>global</sub>	P <sub>c</sub>	Median	P <sub>global</sub>	P <sub>c</sub>
VDR rs731236														
TT	T2D	21	11.90	0.999	0.123	41.80	0.123	0.919	10	0.919	1.000	47.50	1.000	
	Co	30	16.20			50.50			14			13.10		54.50
TC	T2D	32	12.45	0.011	0.944	44.35	0.017	0.001	30	0.001	0.304	44.95	0.304	
	Co	35	20.20			48.00			29			20.20		51.00
CC	T2D	9	12.60	0.289	1.000	46.80	1.000	1.000	22	1.000	0.066	43.90	0.066	
	Co	8	22.05			60.50			30			17.95		51.50

SNP: CYP24A1 rs2248137

Group: T2D; Co: Control

Significant results are highlighted in bold letters. Significance:  $p_{\text{global}} < 0.05$ ,  $p_c < 0.01$ .  $p_c$ : p corrected for multiple testing; T2D: Diabetes mellitus type 2; Co: Control.

have been described [17–20] whereas other studies did not find this [21–25]. The prevalence of T2D was found higher for carriers of the rs1544410 “A” allele in an Indian [19] and German cohorts [17] but for the “G” allele in East Asians [20]. The heterogeneity of previous study results indicates a high variability of the genetic impact. Our study results present VDR 7975232 “G” VDR rs1544410 “G” as a risk factor for T2D but none of them was associated with significant changes neither of VD status nor VD concentrations.

In contrast, we found lower 25(OH)D<sub>3</sub> concentrations associated with the genotypes CYP27B1 rs10877012 “CC”, DBP rs4588 “CC”, DBP rs7041 “GG”, CYP24A1 rs2585426 “CG” and CYP24A1 rs2248137 “CG” in patients. This confirms previous findings for CYP27B1 [26–29]. Since the analyzed SNP is in the promoter region of the CYP27B1 gene lower mRNA concentrations may explain the associations as this has been reported for the genotype “CC” in patients with type 1 diabetes mellitus [30] also leading to lower protein and enzyme activity. For DBP rs4588 “A” allele and “AA” genotype and rs7041 “T” allele and genotype “TT” lower VD concentrations have been reported [7,31–36]. The rs4588 C to A mutation corresponds with a deprivation of the O-glycosylation side of threonine [37] it can be hypothesized that hyperglycemia changes O-glycosidic modifications which might lower VD concentrations in T2D due to alterations in VD binding affinity [38,39]. Hereby VD supplementation improves VD concentrations in patients particularly with the rs4588 “CC” genotype, indicating a better VD binding capacity in case of high substrate availability. Also in healthy subjects the “CC” genotype is associated with higher 25(OH)D<sub>3</sub> level in response to VD supplementation [40]. Other genotypes have been found such as the VDR rs1544410 “GG” to be better responders to VD supplementation. Serrano et al. reported the same effect in healthy individuals after VD supplementation with retinol fortified soybean for two month [41].

Also SNPs of the CYP24A1 gene, coding for the VD degrading 24-hydroxylase [42] are associated with lower 25(OH)D<sub>3</sub> concentrations. We find lower 25(OH)D<sub>3</sub> concentrations for the genotypes rs2585426 “CG” and rs2248137 “CG”. Since the genotype rs2585426 “GG” showed a trend for lower 25(OH)D<sub>3</sub> concentrations ( $p_c = 0.087$ ) the “G” allele can be assumed to mediate this effect presumably via degradation.

None of the analyzed SNPs showed an association with the VD status. Combining the SNP analysis with the VD status also did not detect a significant T2D risk. In our cohort study the potential cause-effect relation leading to associations cannot be clarified. It is possible, that the impact of SNPs and VD insufficiency on T2D risk is independent of each other and not directly linked to the genetic loci that we investigated.

The odds ratio in our cohort study reveals that VD insufficiency has a modest impact on T2D risk and the impact of the SNPs is also relatively small. In conclusion the limited sample size for the VD-SNP analysis cannot detect a genetic impact of the VD status in relation to T2D risk. Therefore our results neither prove nor exclude a functional role of VD in T2D risk.

Nimitphong et al. analyzed the effect of DBP SNPs rs4588 on D<sub>3</sub> or D<sub>2</sub> supplementation in healthy subjects and showed a higher increase for the “CC” genotype compared to “AA” and “CA” which is congruent with our findings [40]. However, this effect was limited to D<sub>3</sub> supplementation. Two further studies confirm these results,

but showed a higher relative increase for the genotype DBP rs4588 "AA" [43,44]. One supplementation trial in T2D including VDR SNPs detected a low response for the VDR "TT" genotype [25]. This effect was not confirmed in our study which might be due to the limited sample size. Moreover only a modest dose for VD supplementation was used and possible confounding variables like age, bio-physical activity, diet, and sun exposure were not addressed.

Still, our results provide preliminary evidence for a genetic control of the response to VD supplementation resulting in variable suppression of PTH in patients with T2D. Until today there is only limited knowledge about the role of VD metabolism genes on the response to VD supplementation in general and in patients with T2D in particular. The PTH plateau threshold for rising 25(OH)D<sub>3</sub> levels appears to be fixed and to differ between white and black women [45] and from Chinese [46] implying a genetic mechanism in the parathyroid response to vitamin D.

Recently, a trial from Saudi Arabia recruited 204 T2D subjects for an intervention using 2000 IU/d cholecalciferol and showed significant improvements of several metabolic parameters of diabetes and lipids that also were related to genotypic variation of the VDR [47]. These findings imply, that in order to achieve optimal cardiometabolic effects any vitamin D supplementation may need to be dosed individually. Such VD effects on the glucometabolism depend on interaction with VDR both in peripheral tissues but also in the central nervous system where receptors and the activating D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -hydroxylase are expressed [48]. Furthermore VD action on the hypothalamus and the arcuate nucleus appears to regulate glucose homeostasis and body weight in animals [49].

Taken together the steroidal hormone vitamin D needs to be further characterized as an adjunct in diabetes treatment. Therefore, additional studies with higher VD doses for supplementation and larger cohorts are desirable.

Our study confirms that vitamin D deficiency is highly prevalent in type 2 diabetes and most patients are also functionally affected by low levels of the active metabolite 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Furthermore vitamin D system genes affect the risk of type 2 diabetes and 25(OH)D<sub>3</sub> concentration. But the cause-effect association remains not clarified. The response to VD<sub>3</sub> supplementation is influenced by genotypes regulating their magnitude and persistence of a sufficient vitamin D status and the parathyroid response. In order to confirm these preliminary results follow-up trials are necessary as well as functional studies to identify mechanisms how the VD system affects T2D pathophysiology.

## Funding Information

EU-FP7 program NAIMIT 241447

## Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- [1] Mezza T, Muscogiuri G, Sorice GP et al. Vitamin D deficiency: A new risk factor for type 2 diabetes? *Ann Nutr Metab* 2012; 61: 337–348
- [2] Lopez ER, Regulla K, Pani MA et al. CYP27B1 polymorphisms variants are associated with type 1 diabetes mellitus in Germans. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004; 89–90 155–157
- [3] Cheng JB, Levine MA, Bell NH et al. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 7711–7715
- [4] Zehnder D, Bland R, Walker EA et al. Expression of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -hydroxylase in the human kidney. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2465–2473
- [5] Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92: 4–8
- [6] Sakaki T, Sawada N, Nonaka Y et al. Metabolic studies using recombinant escherichia coli cells producing rat mitochondrial CYP24 CYP24 can convert 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> to calcitric acid. *Eur J Biochem* 1999; 262: 43–48
- [7] Kurylowicz A, Ramos-Lopez E, Bednarczuk T et al. Vitamin D-binding protein (DBP) gene polymorphism is associated with Graves' disease and the vitamin D status in a Polish population study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006; 114: 329–335
- [8] Strobel F, Reusch J, Penna-Martinez M et al. Effect of a randomised controlled vitamin D trial on insulin resistance and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 2014; 46: 54–58
- [9] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215
- [10] Ross AC, Manson AE, Abrams SA et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D. *Public Health Nutr* 2011; 14: 938–939
- [11] Xue A, Wu Y, Zhu Z et al. Genome-wide association analyses identify 143 risk variants and putative regulatory mechanisms for type 2 diabetes. *Nat Commun* 2018; 9: 2941
- [12] Jorde R, Schirmer H, Willsgaard T et al. Polymorphisms related to the serum 25-hydroxyvitamin D level and risk of myocardial infarction, diabetes, cancer and mortality. The Tromsø Study. *PLoS One* 2012; 7: e37295
- [13] Yuan S, Jiang X, Michaëlsson K et al. Genetic prediction of serum 25-hydroxyvitamin D, calcium, and parathyroid hormone levels in relation to development of type 2 diabetes: A mendelian randomization study. *Diabetes Care* 2019; 42: 2197–2203
- [14] Wang TJ, Zhang F, Richards JB et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: A genome-wide association study. *Lancet* 2010; 376: 180–188
- [15] Ye Z, Sharp SJ, Burgess S et al. Association between circulating 25-hydroxyvitamin D and incident type 2 diabetes: A mendelian randomisation study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015; 3: 35–42
- [16] Ramos-Lopez E, Bruck P, Jansen T et al. CYP2R1 (vitamin D 25-hydroxylase) gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes and vitamin D levels in Germans. *Diabetes Metab Res Rev* 2007; 23: 631–636
- [17] Ortlepp JR, Lauscher J, Hoffmann R et al. The vitamin D receptor gene variant is associated with the prevalence of type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Diabet Med* 2001; 18: 842–845
- [18] Bid HK, Konwar R, Aggarwal CG et al. Vitamin D receptor (FokI, BsmI and TaqI) gene polymorphisms and type 2 diabetes mellitus: a North Indian study. *Indian J Med Sci* 2009; 63: 187–194
- [19] Mukhopadhyaya PN, Acharya A, Chavan Y et al. Metagenomic study of single-nucleotide polymorphism within candidate genes associated with type 2 diabetes in an Indian population. *Genet Mol Res* 2010; 9: 2060–2068

- [20] Li L, Wu B, Liu JY et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and type 2 diabetes: A meta-analysis. *Arch Med Res* 2013; 44: 235–241
- [21] Ogunkolade BW, Boucher BJ, Prah J et al. Vitamin D receptor (VDR) mRNA and VDR protein levels in relation to vitamin D status, insulin secretory capacity, and VDR genotype in Bangladeshi Asians. *Diabetes* 2002; 51: 2294–2300
- [22] Malecki MT, Frey J, Moczulski D et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and association with type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003; 111: 505–509
- [23] Dilmeç F, Uzer E, Akkafa F et al. Detection of VDR gene Apal and TaqI polymorphisms in patients with type 2 diabetes mellitus using PCR-RFLP method in a Turkish population. *J Diabetes Complicat* 2010; 24: 186–191
- [24] Wang Q, Xi B, Reilly KH et al. Quantitative assessment of the associations between four polymorphisms (FokI, Apal, BsmI, TaqI) of vitamin D receptor gene and risk of diabetes mellitus. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 9405–9414
- [25] Neyestani TR, Djazayeri A, Shab-Bidar S et al. Vitamin D receptor Fok-I polymorphism modulates diabetic host response to vitamin D intake: Need for a nutrigenetic approach. *Diabetes Care* 2013; 36: 550–556
- [26] Ramos-Lopez E, Kahles H, Weber S et al. Gestational diabetes mellitus and vitamin D deficiency: Genetic contribution of CYP27B1 and CYP2R1 polymorphisms. *Diabetes Obes Metab* 2008; 10: 683–685
- [27] Hypponen E, Berry DJ, Wjst M et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and IgE - a significant but nonlinear relationship. *Allergy* 2009; 64: 613–620
- [28] Signorello LB, Shi J, Cai Q et al. Common variation in vitamin D pathway genes predicts circulating 25-hydroxyvitamin D Levels among African Americans. *PLoS One* 2011; 6: e28623
- [29] Hussein AG, Mohamed RH, Alghobashy AA. Synergism of CYP2R1 and CYP27B1 polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Egyptian children. *Cell Immunol* 2012; 279: 42–45
- [30] Ramos-Lopez E, Bruck P, Jansen T et al. CYP2R1-, CYP27B1- and CYP24-mRNA expression in German type 1 diabetes patients. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103: 807–810
- [31] Simon KC, Munger KL, Kraft P et al. Genetic predictors of 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *J Neurol* 2011; 258: 1676–1682
- [32] Lu L, Sheng H, Li H et al. Associations between common variants in GC and DHCR7/NADSYN1 and vitamin D concentration in Chinese Hans. *Hum Genet* 2012; 131: 505–512
- [33] Azad AK, Bairati I, Qiu X et al. Genetic sequence variants in vitamin D metabolism pathway genes, serum vitamin D level and outcome in head and neck cancer patients. *Int J Cancer* 2013; 132: 2520–2527
- [34] Carpenter TO, Zhang JH, Parra E et al. Vitamin D binding protein is a key determinant of 25-hydroxyvitamin D levels in infants and toddlers. *J Bone Miner Res* 2013; 28: 213–221
- [35] Engelman CD, Meyers KJ, Iyengar SK et al. Vitamin D intake and season modify the effects of the GC and CYP2R1 genes on 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J Nutr* 2013; 143: 17–26
- [36] Santos BR, Mascarenhas LP, Boguszewski MC et al. Variations in the vitamin D-binding protein (DBP) gene are related to lower 25-hydroxyvitamin D levels in healthy girls: A cross-sectional study. *Horm Res Paediatr* 2013; 79: 162–168
- [37] Coppenhaver DH, Solenne NP, Bowman BH. Post-translational heterogeneity of the human vitamin D-binding protein (group-specific component). *Arch Biochem Biophys* 1983; 226: 218–223
- [38] Ravensborg T, Olsen DT, Thysen AH et al. The glycosylation and characterization of the candidate Gc macrophage activating factor. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804: 909–917
- [39] Testa R, Vanhooren V, Bonfigli AR et al. N-glycomic changes in serum proteins in type 2 diabetes mellitus correlate with complications and with metabolic syndrome parameters. *PLoS One* 2015; 10: e0119983
- [40] Nimitphong H, Saetung S, Chanprasertyotin S et al. Changes in circulating 25-hydroxyvitamin D according to vitamin D binding protein genotypes after vitamin D(3) or D(2) supplementation. *Nutr J* 2013; 12: 39
- [41] Serrano JC, De Lorenzo D, Cassanye A et al. Vitamin D receptor BsmI polymorphism modulates soy intake and 25-hydroxyvitamin D supplementation benefits in cardiovascular disease risk factors profile. *Genes Nutr* 2013; 8: 561–569
- [42] Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): Its important role in the degradation of vitamin D. *Arch Biochem Biophys* 2012; 523: 9–18
- [43] Fu L, Yun F, Oczak M et al. Common genetic variants of the vitamin D binding protein (DBP) predict differences in response of serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] to vitamin D supplementation. *Clin Biochem* 2009; 42: 1174–1177
- [44] Muindi JR, Adjei AA, Wu ZR et al. Serum vitamin D metabolites in colorectal cancer patients receiving cholecalciferol supplementation: Correlation with polymorphisms in the vitamin D genes. *Horm Cancer* 2013; 4: 242–250
- [45] Aloia JF, Chen DG, Chen H. The 25(OH)D/PTH threshold in black women. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 5069–5073
- [46] Yao P, Sun L, Lu L et al. Effects of Genetic and nongenetic factors on total and bioavailable 25(OH)D responses to vitamin D supplementation. *J Clin Endocrinol Metab* 2017; 102: 100–110
- [47] Al-Daghri NM, Mohammed AK, Al-Attas OS et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms modify cardiometabolic response to vitamin D supplementation in T2DM Patients. *Sci Rep* 2017; 7: 8280
- [48] Eyles DW, Smith S, Kinobe R et al. Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat* 2005; 29: 21–30
- [49] Sisley SR, Arble DM, Chambers AP et al. Hypothalamic vitamin D improves glucose homeostasis and reduces weight. *Diabetes* 2016; 65: 2732–2741

## 6. Darstellung des eigenen Anteils an der Publikation

1. Theoretische Konzeption/ Studienplanung: selbstständig
2. Analyse der SNPs:
  - Probenakquise: Die zu analysierenden Blutproben (DNA und Plasma) lagen dem Labor bereits vor. Die Rekrutierung der Probanden und Kontrollen erfolgte in der endokrinologischen Institutsambulanz der Goethe Universität Frankfurt und des Blutspendedienstes des deutschen roten Kreuzes in Frankfurt.
  - Probenverarbeitung inklusive DNA-Extraktion von insgesamt 553 Patienten- und 916 Kontrollproben: selbstständig
  - Genotypisierung aller 1469 Proben mittel RFLP für die Gene (SNPs) CYP2R1 (rs10741657), DBP (rs4588, rs7041), VDR (rs7975232, rs731236, rs2228570, rs1544410) und CYP24A1 (rs2582426, rs927650) und rtPCR für die Gene CYP27B1 (rs10877012), CYP24A1 (rs2582426, rs927650) (ergänzend s. Tabelle 1: Eigenschaften und Konditionen der RFLP und rtPCR): selbstständig
  - Dokumentation und Datenbankpflege: selbstständig
3. Statistische Auswertung: selbstständig
4. Die Messung der Vitamin D Konzentrationen erfolgte im Hormonlabor am Universitätsklinikum der Goethe Universität Frankfurt.  
Die Übertragung der Daten in die Datenbank, sowie die vollständige statistische Auswertung erfolgten selbstständig.
5. Interventionsstudie
  - Die Patientenrekrutierung, Aufklärungsgespräche, Stellung des Ethikantrages (s. Anhang) und klinische Durchführung der Studie erfolgte durch Frau Franziska Strobel in der Praxisgemeinschaft Dr. med. B. Eckrich, A. Kischel, Dr. med. Ch. Klepzig, Dr. med. G. Nitzsche und St. Kowallik in Offenbach am Main sowie am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Schwerpunkt Endokrinologie, Diabetes und Stoffwechsel der Medizinischen Klinik 1

- Messung der klinischen Parameter: Die Blutprobenanalyse erfolgte im Zentral- und Hormonlabor des Universitätsklinikums Frankfurt am Main und mit Medizin (25(OH)D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, C-Peptid, PTH) sowie der oben genannten Gemeinschaftspraxis (HbA<sub>1c</sub>, Nüchtern-glucose im Fluoridplasma), Übertragung der Werte in die Datenbank: Selbstständig
  - Experimenteller Studienanteil: selbstständig
  - DNA-Extraktion erfolgte mittels „salting out Methode“ nach Miller und Dykes von insgesamt 65 Patienten mit anschließender DNA-Konzentrationsmessung mittels Photometrie und Genotypisierung der Proben: selbstständig
  - Datenbankpflege: Selbstständig
  - Statistische Auswertung: selbstständig
6. Manuskripterstellung: selbstständig

## 7. Literaturverzeichnis

1. Ramos-Lopez E, Bruck P, Jansen T, Herwig J, Badenhoop K. CYP2R1 (vitamin D 25-hydroxylase) gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes and vitamin D levels in Germans. *Diabetes Metab Res Rev* 2007; 23: 631-636
2. Penna-Martinez M, Ramos-Lopez E, Stern J, Kahles H, Hinsch N, Hansmann ML, Selkinski I, Grunwald F, Vorlaender C, Bechstein WO, Zeuzem S, Holzer K, Badenhoop K. Impaired Vitamin D activation and association with CYP24A1 haplotypes in differentiated thyroid carcinoma. *Thyroid* 2012, DOI: 10.1089/thy.2011-0330:
3. Rose K, Penna-Martinez M, Klahold E, Karger D, Shoghi F, Kahles H, Bayer M, Hintermann E, Pfeilschifter JM, Badenhoop K, Ramos-Lopez E, Christen U. Influence of the vitamin D plasma level and vitamin D-related genetic polymorphisms on the immune status of patients with type 1 diabetes: a pilot study. *Clin Exp Immunol* 2013; 171: 171-185
4. Penna-Martinez M, Ramos-Lopez E, Stern J, Hinsch N, Hansmann ML, Selkinski I, Grunwald F, Vorlander C, Wahl RA, Bechstein WO, Zeuzem S, Holzer K, Badenhoop K. Vitamin D receptor polymorphisms in differentiated thyroid carcinoma. *Thyroid* 2009; 19: 623-628
5. International Diabetes-Federation Web site. <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>. Accessed February 23, 2022
6. Diabetes-Federation Web site. <https://www.idf.org/aboutdiabetes/type-2-diabetes.html>. Accessed February 23; 2022
7. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, Durazo-Arvizu RA, Gallagher JC, Gallo RL, Jones G, Kovacs CS, Mayne ST, Rosen CJ, Shapses SA. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 53-58
8. Szymczak-Pajor I, Sliwinska A. Analysis of Association between Vitamin D Deficiency and Insulin Resistance. *Nutrients* 2019; 11:



9. Mezza T, Muscogiuri G, Sorice GP, Prioletta A, Salomone E, Pontecorvi A, Giaccari A. Vitamin D deficiency: a new risk factor for type 2 diabetes? *Ann Nutr Metab* 2012; 61: 337-348
10. Mattila C, Knekt P, Mannisto S, Rissanen H, Laaksonen MA, Montonen J, Reunanen A. Serum 25-hydroxyvitamin D concentration and subsequent risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30: 2569-2570
11. Boucher BJ, Mannan N, Noonan K, Hales CN, Evans SJ. Glucose intolerance and impairment of insulin secretion in relation to vitamin D deficiency in east London Asians. *Diabetologia* 1995; 38: 1239-1245
12. Yuan S, Jiang X, Michaelsson K, Larsson SC. Genetic Prediction of Serum 25-Hydroxyvitamin D, Calcium, and Parathyroid Hormone Levels in Relation to Development of Type 2 Diabetes: A Mendelian Randomization Study. *Diabetes Care* 2019; 42: 2197-2203
13. Scragg R, Sowers M, Bell C, Third National H, Nutrition Examination S. Serum 25-hydroxyvitamin D, diabetes, and ethnicity in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care* 2004; 27: 2813-2818
14. Pittas AG, Jorde R, Kawahara T, Dawson-Hughes B. Vitamin D Supplementation for Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus: To D or Not to D? *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105:
15. Grimnes G, Emaus N, Joakimsen RM, Figenschau Y, Jenssen T, Njolstad I, Schirmer H, Jorde R. Baseline serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in the Tromso Study 1994-95 and risk of developing type 2 diabetes mellitus during 11 years of follow-up. *Diabet Med* 2010; 27: 1107-1115
16. Song Y, Wang L, Pittas AG, Del Gobbo LC, Zhang C, Manson JE, Hu FB. Blood 25-hydroxy vitamin D levels and incident type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Care* 2013; 36: 1422-1428
17. Pham TM, Ekwaru JP, Setayeshgar S, Veugelers PJ. The Effect of Changing Serum 25-Hydroxyvitamin D Concentrations on Metabolic

- Syndrome: A Longitudinal Analysis of Participants of a Preventive Health Program. *Nutrients* 2015; 7: 7271-7284
18. Belenchia AM, Tosh AK, Hillman LS, Peterson CA. Correcting vitamin D insufficiency improves insulin sensitivity in obese adolescents: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2013; 97: 774-781
  19. Ye Z, Sharp SJ, Burgess S, Scott RA, Imamura F, InterAct C, Langenberg C, Wareham NJ, Forouhi NG. Association between circulating 25-hydroxyvitamin D and incident type 2 diabetes: a mendelian randomisation study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015; 3: 35-42
  20. Orwoll E, Riddle M, Prince M. Effects of vitamin D on insulin and glucagon secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 1083-1087
  21. Sabherwal S, Bravis V, Devendra D. Effect of oral vitamin D and calcium replacement on glycaemic control in South Asian patients with type 2 diabetes. *Int J Clin Pract* 2010; 64: 1084-1089
  22. Avenell A, Cook JA, MacLennan GS, McPherson GC, group Rt. Vitamin D supplementation and type 2 diabetes: a substudy of a randomised placebo-controlled trial in older people (RECORD trial, ISRCTN 51647438). *Age Ageing* 2009; 38: 606-609
  23. Eftekhari MH, Akbarzadeh M, Dabbaghmanesh MH, Hasanzadeh J. Impact of treatment with oral calcitriol on glucose indices in type 2 diabetes mellitus patients. *Asia Pac J Clin Nutr* 2011; 20: 521-526
  24. Taylor AV, Wise PH. Vitamin D replacement in Asians with diabetes may increase insulin resistance. *Postgrad Med J* 1998; 74: 365-366
  25. Bejar CA, Goyal S, Afzal S, Mangino M, Zhou A, van der Most PJ, Bao Y, Gupta V, Smart MC, Walia GK, Verweij N, Power C, Prabhakaran D, Singh JR, Mehra NK, Wander GS, Ralhan S, Kinra S, Kumari M, de Borst MH, Hypponen E, Spector TD, Nordestgaard BG, Blackett PR, Sanghera DK. A Bidirectional Mendelian Randomization Study to evaluate the causal role of reduced blood vitamin D levels with type 2 diabetes risk in South Asians and Europeans. *Nutr J* 2021; 20: 71

26. Cavalier E, Delanaye P, Souberbielle JC, Radermecker RP. Vitamin D and type 2 diabetes mellitus: where do we stand? *Diabetes Metab* 2011; 37: 265-272
27. Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): its important role in the degradation of vitamin D. *Arch Biochem Biophys* 2012; 523: 9-18
28. Zehnder D, Bland R, Walker EA, Bradwell AR, Howie AJ, Hewison M, Stewart PM. Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in the human kidney. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2465-2473
29. Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* 1998; 78: 1193-1231
30. Sakaki T, Sawada N, Nonaka Y, Ohyama Y, Inouye K. Metabolic studies using recombinant escherichia coli cells producing rat mitochondrial CYP24 CYP24 can convert 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 to calcitric acid. *Eur J Biochem* 1999; 262: 43-48
31. Kurylowicz A, Ramos-Lopez E, Bednarczuk T, Badenhoop K. Vitamin D-binding protein (DBP) gene polymorphism is associated with Graves' disease and the vitamin D status in a Polish population study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006; 114: 329-335
32. Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, Simon KC, McCullough ML, Gallicchio L, Jacobs EJ, Ascherio A, Helzlsouer K, Jacobs KB, Li Q, Weinstein SJ, Purdue M, Virtamo J, Horst R, Wheeler W, Chanock S, Hunter DJ, Hayes RB, Kraft P, Albanes D. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 2739-2745
33. Engelman CD, Meyers KJ, Ziegler JT, Taylor KD, Palmer ND, Haffner SM, Fingerlin TE, Wagenknecht LE, Rotter JI, Bowden DW, Langefeld CD, Norris JM. Genome-wide association study of vitamin D concentrations in Hispanic Americans: the IRAS family study. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 122: 186-192
34. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, van Meurs JB, Berry D, Kiel DP, Streeten EA, Ohlsson C, Koller DL, Peltonen L, Cooper JD,

- O'Reilly PF, Houston DK, Glazer NL, Vandenput L, Peacock M, Shi J, Rivadeneira F, McCarthy MI, Anneli P, de Boer IH, Mangino M, Kato B, Smyth DJ, Booth SL, Jacques PF, Burke GL, Goodarzi M, Cheung CL, Wolf M, Rice K, Goltzman D, Hidiroglou N, Ladouceur M, Wareham NJ, Hocking LJ, Hart D, Arden NK, Cooper C, Malik S, Fraser WD, Hartikainen AL, Zhai G, Macdonald HM, Forouhi NG, Loos RJ, Reid DM, Hakim A, Dennison E, Liu Y, Power C, Stevens HE, Jaana L, Vasani RS, Soranzo N, Bojunga J, Psaty BM, Lorentzon M, Foroud T, Harris TB, Hofman A, Jansson JO, Cauley JA, Uitterlinden AG, Gibson Q, Jarvelin MR, Karasik D, Siscovick DS, Econs MJ, Kritchevsky SB, Florez JC, Todd JA, Dupuis J, Hypponen E, Spector TD. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet* 2010; 376: 180-188
35. Signorello LB, Shi J, Cai Q, Zheng W, Williams SM, Long J, Cohen SS, Li G, Hollis BW, Smith JR, Blot WJ. Common variation in vitamin D pathway genes predicts circulating 25-hydroxyvitamin D Levels among African Americans. *PLoS One* 2011; 6: e28623
36. Dastani Z, Li R, Richards B. Genetic regulation of vitamin D levels. *Calcif Tissue Int* 2013; 92: 106-117
37. Santos BR, Mascarenhas LP, Boguszewski MC, Spritzer PM. Variations in the vitamin D-binding protein (DBP) gene are related to lower 25-hydroxyvitamin D levels in healthy girls: a cross-sectional study. *Horm Res Paediatr* 2013; 79: 162-168
38. Lafi ZM, Irshaid YM, El-Khateeb M, Ajlouni KM, Hyassat D. Association of rs7041 and rs4588 Polymorphisms of the Vitamin D Binding Protein and the rs10741657 Polymorphism of CYP2R1 with Vitamin D Status Among Jordanian Patients. *Genet Test Mol Biomarkers* 2015; 19: 629-636
39. Bu FX, Armas L, Lappe J, Zhou Y, Gao G, Wang HW, Recker R, Zhao LJ. Comprehensive association analysis of nine candidate genes with serum 25-hydroxy vitamin D levels among healthy Caucasian subjects. *Hum Genet* 2010; 128: 549-556

40. Manousaki D, Dudding T, Haworth S, Hsu YH, Liu CT, Medina-Gomez C, Voortman T, van der Velde N, Melhus H, Robinson-Cohen C, Cousminer DL, Nethander M, Vandenput L, Noordam R, Forgetta V, Greenwood CMT, Biggs ML, Psaty BM, Rotter JI, Zemel BS, Mitchell JA, Taylor B, Lorentzon M, Karlsson M, Jaddoe VVW, Tiemeier H, Campos-Obando N, Franco OH, Utterlinden AG, Broer L, van Schoor NM, Ham AC, Ikram MA, Karasik D, de Mutsert R, Rosendaal FR, den Heijer M, Wang TJ, Lind L, Orwoll ES, Mook-Kanamori DO, Michaelsson K, Kestenbaum B, Ohlsson C, Mellstrom D, de Groot L, Grant SFA, Kiel DP, Zillikens MC, Rivadeneira F, Sawcer S, Timpson NJ, Richards JB. Low-Frequency Synonymous Coding Variation in CYP2R1 Has Large Effects on Vitamin D Levels and Risk of Multiple Sclerosis. *Am J Hum Genet* 2017; 101: 227-238
41. Zhang M, Zhao LJ, Zhou Y, Badr R, Watson P, Ye A, Zhou B, Zhang J, Deng HW, Recker RR, Lappe JM. SNP rs11185644 of RXRA gene is identified for dose-response variability to vitamin D3 supplementation: a randomized clinical trial. *Sci Rep* 2017; 7: 40593
42. Hatchell KE, Lu Q, Hebring SJ, Michos ED, Wood AC, Engelman CD. Ancestry-specific polygenic scores and SNP heritability of 25(OH)D in African- and European-ancestry populations. *Hum Genet* 2019; 138: 1155-1169
43. Arabi A, Khoueiry-Zgheib N, Awada Z, Mahfouz R, Al-Shaar L, Hoteit M, Rahme M, Baddoura R, Halabi G, Singh R, El Hajj Fuleihan G. CYP2R1 polymorphisms are important modulators of circulating 25-hydroxyvitamin D levels in elderly females with vitamin insufficiency, but not of the response to vitamin D supplementation. *Osteoporos Int* 2017; 28: 279-290
44. Jiang X, O'Reilly PF, Aschard H, Hsu YH, Richards JB, Dupuis J, Ingelsson E, Karasik D, Pilz S, Berry D, Kestenbaum B, Zheng J, Luan J, Sofianopoulou E, Streeten EA, Albanes D, Lutsey PL, Yao L, Tang W, Econs MJ, Wallaschofski H, Volzke H, Zhou A, Power C, McCarthy MI, Michos ED, Boerwinkle E, Weinstein SJ, Freedman ND, Huang WY, Van Schoor NM, van der Velde N, Groot L, Enneman A, Cupples LA, Booth SL, Vasan RS, Liu CT, Zhou Y, Ripatti S, Ohlsson C, Vandenput L,

- Lorentzon M, Eriksson JG, Shea MK, Houston DK, Kritchevsky SB, Liu Y, Lohman KK, Ferrucci L, Peacock M, Gieger C, Beekman M, Slagboom E, Deelen J, Heemst DV, Kleber ME, Marz W, de Boer IH, Wood AC, Rotter JI, Rich SS, Robinson-Cohen C, den Heijer M, Jarvelin MR, Cavadino A, Joshi PK, Wilson JF, Hayward C, Lind L, Michaelsson K, Trompet S, Zillikens MC, Uitterlinden AG, Rivadeneira F, Broer L, Zgaga L, Campbell H, Theodoratou E, Farrington SM, Timofeeva M, Dunlop MG, Valdes AM, Tikkanen E, Lehtimäki T, Lyytikäinen LP, Kahonen M, Raitakari OT, Mikkilä V, Ikram MA, Sattar N, Jukema JW, Wareham NJ, Langenberg C, Forouhi NG, Gundersen TE, Khaw KT, Butterworth AS, Danesh J, Spector T, Wang TJ, Hyppönen E, Kraft P, Kiel DP. Genome-wide association study in 79,366 European-ancestry individuals informs the genetic architecture of 25-hydroxyvitamin D levels. *Nat Commun* 2018; 9: 260
45. Duan L, Xue Z, Ji H, Zhang D, Wang Y. Effects of CYP2R1 gene variants on vitamin D levels and status: A systematic review and meta-analysis. *Gene* 2018; 678: 361-369
46. Mehramiz M, Khayyatzadeh SS, Esmaily H, Ghasemi F, Sadeghi-Ardekani K, Tayefi M, Mirmousavi SJ, Hanachi P, Bahrami-Taghanaki H, Eslami S, Vatanparast H, Ferns GA, Ghayour-Mobarhan M, Avan A. Associations of vitamin D binding protein variants with the vitamin D-induced increase in serum 25-hydroxyvitamin D. *Clin Nutr ESPEN* 2019; 29: 59-64
47. Ortlepp JR, Lauscher J, Hoffmann R, Hanrath P, Joost HG. The vitamin D receptor gene variant is associated with the prevalence of type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Diabet Med* 2001; 18: 842-845
48. Ogunkolade BW, Boucher BJ, Prah J, Bustin SA, Burrin JM, Noonan K, North BV, Mannan N, McDermott MF, DeLuca HF, Hitman GA. Vitamin D receptor (VDR) mRNA and VDR protein levels in relation to vitamin D status, insulin secretory capacity, and VDR genotype in Bangladeshi Asians. *Diabetes* 2002; 51: 2294-2300
49. Wang Q, Xi B, Reilly KH, Liu M, Fu M. Quantitative assessment of the associations between four polymorphisms (FokI, Apal, BsmI, TaqI) of

- vitamin D receptor gene and risk of diabetes mellitus. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 9405-9414
50. Li L, Wu B, Liu JY, Yang LB. Vitamin D receptor gene polymorphisms and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Arch Med Res* 2013; 44: 235-241
  51. Yao P, Sun L, Lu L, Ding H, Chen X, Tang L, Xu X, Liu G, Hu Y, Ma Y, Wang F, Jin Q, Zheng H, Yin H, Zeng R, Chen Y, Hu FB, Li H, Lin X. Effects of Genetic and Nongenetic Factors on Total and Bioavailable 25(OH)D Responses to Vitamin D Supplementation. *J Clin Endocrinol Metab* 2017; 102: 100-110
  52. Nimitphong H, Saetung S, Chanprasertyotin S, Chailurkit LO, Ongphiphadhanakul B. Changes in circulating 25-hydroxyvitamin D according to vitamin D binding protein genotypes after vitamin D(3) or D(2) supplementation. *Nutr J* 2013; 12: 39
  53. Serrano JC, De Lorenzo D, Cassanye A, Martin-Gari M, Espinel A, Delgado MA, Pamplona R, Portero-Otin M. Vitamin D receptor BsmI polymorphism modulates soy intake and 25-hydroxyvitamin D supplementation benefits in cardiovascular disease risk factors profile. *Genes Nutr* 2013; 8: 561-569
  54. Slow S, Pearson JP, Florkowski CM, Elder PA, Lewis JG, Kennedy MA, Murdoch DR. Effect of genetic factors on the response to vitamin D3 supplementation in the VIDARIS randomized controlled trial. *Nutrition* 2020; 75-76: 110761
  55. Elkum N, Alkayal F, Noronha F, Ali MM, Melhem M, Al-Arouj M, Bennakhi A, Behbehani K, Alsmadi O, Abubaker J. Vitamin D insufficiency in Arabs and South Asians positively associates with polymorphisms in GC and CYP2R1 genes. *PLoS One* 2014; 9: e113102
  56. Bahrami A, Mehramiz M, Ghayour-Mobarhan M, Bahrami-Taghanaki H, Sadeghi Ardekani K, Tayefi M, Sadeghzade M, Rashidmayvan M, Safari Ghalezou M, Ferns GA, Avan A, Sadeghnia HR. A genetic variant in the cytochrome P450 family 2 subfamily R member 1 determines response to vitamin D supplementation. *Clin Nutr* 2019; 38: 676-681

57. Gaffney-Stomberg E, Lutz LJ, Shcherbina A, Ricke DO, Petrovick M, Cropper TL, Cable SJ, McClung JP. Association Between Single Gene Polymorphisms and Bone Biomarkers and Response to Calcium and Vitamin D Supplementation in Young Adults Undergoing Military Training. *J Bone Miner Res* 2017; 32: 498-507
58. Nissen J, Vogel U, Ravn-Haren G, Andersen EW, Madsen KH, Nexø BA, Andersen R, Mejborn H, Bjerrum PJ, Rasmussen LB, Wulf HC. Common variants in CYP2R1 and GC genes are both determinants of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations after UVB irradiation and after consumption of vitamin D(3)-fortified bread and milk during winter in Denmark. *Am J Clin Nutr* 2015; 101: 218-227
59. Neyestani TR, Djazayeri A, Shab-Bidar S, Eshraghian MR, Kalayi A, Shariatzadeh N, Khalaji N, Zahedirad M, Gharavi A, Houshiarrad A, Chamari M, Asadzadeh S. Vitamin D Receptor Fok-I polymorphism modulates diabetic host response to vitamin D intake: need for a nutrigenetic approach. *Diabetes Care* 2013; 36: 550-556
60. Scragg R, Holdaway I, Singh V, Metcalf P, Baker J, Dryson E. Serum 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> is related to physical activity and ethnicity but not obesity in a multicultural workforce. *Aust N Z J Med* 1995; 25: 218-223
61. Pittas AG, Dawson-Hughes B, Li T, Van Dam RM, Willett WC, Manson JE, Hu FB. Vitamin D and calcium intake in relation to type 2 diabetes in women. *Diabetes Care* 2006; 29: 650-656
62. Tabatabaeizadeh SA, Tafazoli N. The role of vitamin D in prevention of type 2 diabetes. A meta-analysis. *Clin Nutr ESPEN* 2021; 41: 88-93
63. Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, Russell DW. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 7711-7715
64. Jorde R, Schirmer H, Wilsgaard T, Joakimsen RM, Mathiesen EB, Njolstad I, Lochen ML, Figenschau Y, Berg JP, Svartberg J, Grimnes G. Polymorphisms related to the serum 25-hydroxyvitamin D level and risk of



- myocardial infarction, diabetes, cancer and mortality. The Tromso Study. *PLoS One* 2012; 7: e37295
65. Manousaki D, Mitchell R, Dudding T, Haworth S, Harroud A, Forgetta V, Shah RL, Luan J, Langenberg C, Timpson NJ, Richards JB. Genome-wide Association Study for Vitamin D Levels Reveals 69 Independent Loci. *Am J Hum Genet* 2020; 106: 327-337
  66. Simon KC, Munger KL, Kraft P, Hunter DJ, De Jager PL, Ascherio A. Genetic predictors of 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *J Neurol* 2011; 258: 1676-1682
  67. Didriksen A, Grimnes G, Hutchinson MS, Kjaergaard M, Svartberg J, Joakimsen RM, Jorde R. The serum 25-hydroxyvitamin D response to vitamin D supplementation is related to genetic factors, BMI, and baseline levels. *Eur J Endocrinol* 2013; 169: 559-567
  68. Petersen RA, Larsen LH, Damsgaard CT, Sorensen LB, Hjorth MF, Andersen R, Tetens I, Krarup H, Ritz C, Astrup A, Michaelsen KF, Molgaard C. Common genetic variants are associated with lower serum 25-hydroxyvitamin D concentrations across the year among children at northern latitudes. *Br J Nutr* 2017; 117: 829-838
  69. Xue A, Wu Y, Zhu Z, Zhang F, Kemper KE, Zheng Z, Yengo L, Lloyd-Jones LR, Sidorenko J, Wu Y, e QC, McRae AF, Visscher PM, Zeng J, Yang J. Genome-wide association analyses identify 143 risk variants and putative regulatory mechanisms for type 2 diabetes. *Nat Commun* 2018; 9: 2941
  70. Oh JY, Barrett-Connor E. Association between vitamin D receptor polymorphism and type 2 diabetes or metabolic syndrome in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study. *Metabolism* 2002; 51: 356-359
  71. Mukhopadhyaya PN, Acharya A, Chavan Y, Purohit SS, Mutha A. Metagenomic study of single-nucleotide polymorphism within candidate genes associated with type 2 diabetes in an Indian population. *Genet Mol Res* 2010; 9: 2060-2068

72. Ezhilarasi K, Dhamodharan U, Vijay V. BSM1 single nucleotide polymorphism in vitamin D receptor gene is associated with decreased circulatory levels of serum 25-hydroxyvitamin D among micro and macrovascular complications of type 2 diabetes mellitus. *Int J Biol Macromol* 2018; 116: 346-353
73. Dilmeç F, Uzer E, Akkafa F, Kose E, van Kuilenburg AB. Detection of VDR gene Apal and Taql polymorphisms in patients with type 2 diabetes mellitus using PCR-RFLP method in a Turkish population. *J Diabetes Complications* 2010; 24: 186-191
74. Zhu B, Zhao HL, Ou C, Huang LS, Li PZ, Lao M. Association of vitamin D receptor Bsm1 gene polymorphism with the risk of type 2 diabetes mellitus. *J Recept Signal Transduct Res* 2014; 34: 458-462
75. Sattar NA, Shaheen S, Hussain F, Jamil A. Association analysis of vitamin D receptor gene polymorphisms in North England population with Type 2 diabetes mellitus. *Afr Health Sci* 2021; 21: 8-14
76. Yu F, Cui LL, Li X, Wang CJ, Ba Y, Wang L, Li J, Li C, Dai LP, Li WJ. The genetic polymorphisms in vitamin D receptor and the risk of type 2 diabetes mellitus: an updated meta-analysis. *Asia Pac J Clin Nutr* 2016; 25: 614-624
77. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004; 338: 143-156
78. Ramos-Lopez E, Kahles H, Weber S, Kukic A, Penna-Martinez M, Badenhoop K, Louwen F. Gestational diabetes mellitus and vitamin D deficiency: genetic contribution of CYP27B1 and CYP2R1 polymorphisms. *Diabetes Obes Metab* 2008; 10: 683-685
79. Hypponen E, Berry DJ, Wjst M, Power C. Serum 25-hydroxyvitamin D and IgE - a significant but nonlinear relationship. *Allergy* 2009; 64: 613-620
80. Ramos-Lopez E, Bruck P, Jansen T, Pfeilschifter JM, Radeke HH, Badenhoop K. CYP2R1-, CYP27B1- and CYP24-mRNA expression in

- German type 1 diabetes patients. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103: 807-810
81. Lu L, Sheng H, Li H, Gan W, Liu C, Zhu J, Loos RJ, Lin X. Associations between common variants in GC and DHCR7/NADSYN1 and vitamin D concentration in Chinese Hans. *Hum Genet* 2012; 131: 505-512
  82. Azad AK, Bairati I, Qiu X, Huang H, Cheng D, Liu G, Meyer F, Adjei A, Xu W. Genetic sequence variants in vitamin D metabolism pathway genes, serum vitamin D level and outcome in head and neck cancer patients. *Int J Cancer* 2013; 132: 2520-2527
  83. Carpenter TO, Zhang JH, Parra E, Ellis BK, Simpson C, Lee WM, Balko J, Fu L, Wong BY, Cole DE. Vitamin D binding protein is a key determinant of 25-hydroxyvitamin D levels in infants and toddlers. *J Bone Miner Res* 2013; 28: 213-221
  84. Engelman CD, Meyers KJ, Iyengar SK, Liu Z, Karki CK, Igo RP, Jr., Truitt B, Robinson J, Sarto GE, Wallace R, Blodi BA, Klein ML, Tinker L, LeBlanc ES, Jackson RD, Song Y, Manson JE, Mares JA, Millen AE. Vitamin D intake and season modify the effects of the GC and CYP2R1 genes on 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J Nutr* 2013; 143: 17-26
  85. Gozdzik A, Zhu J, Wong BY, Fu L, Cole DE, Parra EJ. Association of vitamin D binding protein (VDBP) polymorphisms and serum 25(OH)D concentrations in a sample of young Canadian adults of different ancestry. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011; 127: 405-412
  86. Arnaud J, Constans J. Affinity differences for vitamin D metabolites associated with the genetic isoforms of the human serum carrier protein (DBP). *Hum Genet* 1993; 92: 183-188
  87. Coppenhaver DH, Sollenne NP, Bowman BH. Post-translational heterogeneity of the human vitamin D-binding protein (group-specific component). *Arch Biochem Biophys* 1983; 226: 218-223
  88. Ravensborg T, Olsen DT, Thyssen AH, Christiansen M, Houen G, Hojrup P. The glycosylation and characterization of the candidate Gc macrophage activating factor. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804: 909-917

89. Testa R, Vanhooren V, Bonfigli AR, Boemi M, Olivieri F, Ceriello A, Genovese S, Spazzafumo L, Borelli V, Bacalini MG, Salvioli S, Garagnani P, Dewaele S, Libert C, Franceschi C. N-glycomic changes in serum proteins in type 2 diabetes mellitus correlate with complications and with metabolic syndrome parameters. *PLoS One* 2015; 10: e0119983
90. Myslicki JP, Shearer J, Hittel DS, Hughey CC, Belke DD. O-GlcNAc modification is associated with insulin sensitivity in the whole blood of healthy young adult males. *Diabetol Metab Syndr* 2014; 6: 96
91. Dias WB, Hart GW. O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. *Mol Biosyst* 2007; 3: 766-772
92. Agnello L, Scazzone C, Lo Sasso B, Ragonese P, Milano S, Salemi G, Ciaccio M. CYP27A1, CYP24A1, and RXR-alpha Polymorphisms, Vitamin D, and Multiple Sclerosis: a Pilot Study. *J Mol Neurosci* 2018; 66: 77-84
93. Pillai DK, Iqbal SF, Benton AS, Lerner J, Wiles A, Foerster M, Ozedirne T, Holbrook HP, Payne PW, Jr., Gordish-Dressman H, Teach SJ, Freishtat RJ. Associations between genetic variants in vitamin D metabolism and asthma characteristics in young African Americans: a pilot study. *J Investig Med* 2011; 59: 938-946
94. Wang M, Zhang R, Wang M, Zhang L, Ding Y, Tang Z, Wang H, Zhang W, Chen Y, Wang J. Genetic Polymorphism of Vitamin D Family Genes CYP2R1, CYP24A1, and CYP27B1 Are Associated With a High Risk of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Case-Control Study. *Front Genet* 2021; 12: 717533
95. Zeljic K, Supic G, Stamenkovic Radak M, Jovic N, Kozomara R, Magic Z. Vitamin D receptor, CYP27B1 and CYP24A1 genes polymorphisms association with oral cancer risk and survival. *J Oral Pathol Med* 2012; 41: 779-787

## 8. Anhang

### Ethikvotum



Fachbereich Medizin der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

Universitätsklinikum · Theodor-Stern-Kai 7 · 60590 Frankfurt

Herr  
Prof. Dr. Klaus Badenhoop  
Medizinische Klinik I  
ZIM

Ethik-Kommission  
Der Vorsitzende

Bearbeiterin: Dr. Astrid Giessler  
Tel.: 069/63 01-45 97  
Fax: 069/63 01-83434  
E-Mail: Astrid.Giessler@kgu.de

Montag, 21. Januar 2008

**Geschäfts-Nr.:** 9/07 **BITTE STETS ANGEBEN!**  
**EudraCT-Nr.:** 2006-006180-23  
**Protokoll-Nr.:** EMD 28162-600  
**Sponsor:** Prof. Dr. Badenhoop, Klinikum der J. W. Goethe-Universität

**Titel:** Einfluss einer Vitamin D-Substitution auf die Insulinresistenz, die Stoffwechseleinstellung und die Lymphozytenfunktion bei Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus

Geschäftsführung der  
Ethik-Kommission  
Tel.: 069/63 01-4597

Sekretariat der  
Ethik-Kommission  
Tel.: 069/63 01-7239

<http://ethik-kommission.klinik.uni-frankfurt.de>

Sehr geehrter Herr Professor Badenhoop,

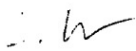
die Studienunterlagen zur nachträglichen substantiellen Änderung nach GCP-V § 10 zur o. g. klinischen Prüfung sind am 18.01.2008 in der Geschäftsstelle der Ethik-Kommission eingegangen.

Wir haben das Amendment 2 vom 16.01.2008 zur Kenntnis genommen.

Dagegen bestehen keine berufsrechtlichen und berufsethischen Bedenken.

Die Abmeldung der Prüfer Kai Götte und Karolina Piech haben wir ebenfalls zur Kenntnis genommen.

Mit freundlichen Grüßen

  
Prof. Dr. med. Sebastian Harder  
Vorsitzender der Ethik-Kommission

#### Vorgelegte Unterlagen:

- Studiensynopsis, Version 2.3 vom 15.01.2008
- Studienprotokoll, Version 04 vom 15.01.2008
- Patienteninformation, Version 2.4 vom 27.12.2007

Kopie: BfArM

*Germanium mehr wissen helfen und helfen*

9-07h.doc

Finanzamt Frankfurt: St.-Nr. 47.250.99779; USt-ID-Nr. DE 212 1374 61  
Postanschrift: Universitätsklinikum 60590 Frankfurt Straßenbahn: 12,15,21 [www.klinik.uni-frankfurt.de](http://www.klinik.uni-frankfurt.de)

Gen/ Chromosom	SNP minor/ major Allel	Position	Primer/ realtime PCR Sonde	Annealing- Temperatur	Verdau	Referenz
CYP2R1 11p15.2	<b>rs10741657</b> A/G	nahe 3'UTR	For: 5'-GGG AAG AGC AAT GAC ATG GA-3' Rev: 5'-GCC CTG GAA GAC TCA TTT TG-3'	61°C	Mnl I 6h, 37°C	[1]
CYP27B1 12q13.1-13.3	<b>rs10877012</b> A/C	Promotor	For 5'-GGG AGT AAG GAG CAG AGA GAG GTA AA-3' Rev 5'-AAC AGA GAG AGG GCC TGT CT-3'	Assay by design		[2]
DBP (=Gc)	<b>rs4588</b> A/C	Exon 11	For 5'-GTT GCC TGT GTT CAC AGA CTC-3' Rev 5'-GAT CTC GAA GAG GCA TGT TTC-3'	58.8°C	Sty I 3h, 37°C	[3]
	<b>rs7041</b> T/G	Exon 11	For 5'-GTT GCC TGT GTT CAC AGA CTC-3' Rev 5'-GAT CTC GAA GAG GCA TGT TTC-3'	58.8°C	Hae III 3h, 37°C	[3]
VDR 12q13-14	<b>rs7975232</b> A/C	Intron zwischen Exon 8 und 9	For 5'-AGT AAG AGT CTG GCA AAG ATA GC-3' Rev 5'-AAA CAC TTC GAG CAC AAG G-3'	58°C	Apa I 4h 25°C	[4]
	<b>rs731236</b> T/C	Exon 9	For 5'-AGT AAG AGT CTG GCA AAG ATA GC-3' Rev 5'-AAA CAC TTC GAG CAC AAG G-3'	58°C	Taq I 4h, 65°C	[4]
	<b>rs2228570</b> T/C	Exon 2	For 5'-ATG GAA ACA CCT TGC TTC TTC TCC CTC-3' Rev 5'-AGC TGG CCC TGG CAC TGA CTC TGC TCT-3'	60°C	Fok I 4h, 37°C	[4]
CYP24A1 20q13.2-13.3	<b>rs1544410</b> A/G	Intron zwischen Exon 8 und 9	For 5'-GGC AAC CTG AAG GGA GAC CTA-3' Rev 5'-CTC TTT GGA CCT CAT CAC CGA C-3'	60°C	Bsm I 4h, 65°C	[4]
	<b>rs2585426</b> C/G	Intron	For 5'-GTT TTA TGT GCT GAC GGT GG-3' Rev 5'-TTA TTT CCT CTT CTC CTT GTG C-3'	59°C	BstU I 3h, 60°C	[2]
	<b>rs927650</b> C/T	Intron	For 5'-TGG TTG CAT AAC ACA AAC CTA-3' Rev 5'-CTG AAA GCC AGT AAC AAT GGT-3'	59°C	Bgl II 3h, 37°C	[2]
	<b>rs2296241</b> A/G	Exon 4	C_1915656_30			[2]
	<b>rs2248137</b> G/C	Intron	C_1915659_1			[2]

rs10877012, rs22967241 und rs2248137: Real time PCR - Taqman assay Firma Life Technologies - entsprechend der Herstellerangaben

Tabelle 2: Assoziation der VD-Systemgen-SNPs mit T2D

Gene	SNP	allele	Kontrolle	Patienten	OR (95% CI)	p <sub>c</sub>	Erweiterte Analyse			
			(n=292)	(n=464)			Kontrolle	Patienten	OR (95% CI)	p <sub>c</sub>
CYP2R1	rs10741657	A	212 (36,3%)	377 (40,6%)	1,20 [0,97 - 1,49]	0,209	350 (36,3%)	455 (42,1%)	1,28 [1,07 - 1,53]	<b>0,016</b>
		G	372 (63,7%)	551 (59,4%)	0,83 [0,67 - 1,03]		614 (63,7%)	625 (57,9%)	0,78 [0,66 - 0,94]	
CYP27B1	rs10877012	A	201 (34,4%)	292 (31,5%)	0,87 [0,70 - 1,09]	0,512	303 (34,9%)	344 (31,5%)	0,86 [0,71 - 1,04]	0,245
		C	383 (65,6%)	636 (68,5%)	1,14 [0,92 - 1,42]		565 (65,1%)	748 (68,5%)	1,17 [0,97 - 1,41]	
DBP	rs4588	A	172 (29,5%)	257 (27,7%)	0,92 [0,73 - 1,15]	0,993	223 (28,6%)	300 (27,2%)	0,93 [0,76 - 1,15]	1,000
		C	412 (70,5%)	671 (72,3%)	1,09 [0,87 - 1,37]		557 (71,4%)	802 (72,8%)	1,07 [0,87 - 1,31]	
DBP	rs7041	T	265 (45,4%)	407 (43,9%)	0,94 [0,76 - 1,16]	1,000	353 (46,2%)	489 (44,7%)	1,06 [0,88 - 1,28]	1,000
		G	319 (54,6%)	521 (56,1%)	1,06 [0,76 - 1,16]		411 (54,8%)	605 (55,3%)	1,06 [0,88 - 1,28]	
VDR	rs7975232	A	237 (40,6%)	436 (47,0%)	1,30 [1,05 - 1,60]	<b>0,034</b>	746 (43,2%)	518 (48,0%)	1,21 [1,04 - 1,41]	<b>0,031</b>
		C	347 (59,4%)	492 (53,0%)	0,77 [0,63 - 0,95]		980 (56,8%)	562 (52,0%)	0,83 [0,71 - 0,96]	
VDR	rs731236	T	226 (38,7%)	373 (40,2%)	1,06 [0,86 - 1,32]	1,000	682 (39,2%)	418 (39,4%)	1,01 [0,87 - 1,18]	1,000
		C	358 (61,3%)	555 (59,8%)	0,94 [0,76 - 1,16]		1060 (60,8%)	642 (60,6%)	0,99 [0,85 - 1,16]	
VDR	rs2228570	T	223 (38,2%)	355 (38,3%)	1,00 [0,81 - 1,24]	1,000	652 (38,5%)	412 (38,1%)	0,99 [0,84 - 1,15]	1,000
		C	361 (61,8%)	573 (61,7%)	1,00 [0,81 - 1,23]		1042 (61,5%)	668 (61,9%)	1,01 [0,87 - 1,19]	
VDR	rs1544410	A	277 (47,4%)	319 (42,1%)	0,81 [0,66 - 0,99]	0,098	844 (46,1%)	457 (41,3%)	0,82 [0,71 - 0,96]	<b>0,027</b>
		G	307 (52,6%)	537 (57,9%)	1,24 [1,01 - 1,53]		988 (53,9%)	649 (58,7%)	1,12 [1,04 - 1,41]	
CYP24A1	rs2585426	C	432 (74,0%)	676 (72,8%)	0,94 [0,75 - 1,19]	1,000	957 (74,6%)	759 (73,1%)	0,92 [0,77 - 1,11]	0,864
		G	152 (26,0%)	252 (27,2%)	1,06 [0,75 - 1,19]		325 (25,4%)	279 (26,9%)	1,08 [0,90 - 1,30]	
CYP24A1	rs927650	C	291 (49,8%)	513 (55,3%)	1,24 [1,01 - 1,53]	0,088	736 (53,8%)	607 (55,4%)	1,07 [0,91 - 1,25]	0,915
		T	293 (50,2%)	415 (44,7%)	0,80 [0,65 - 0,99]		632 (46,2%)	489 (44,6%)	0,94 [0,80 - 1,10]	
CYP24A1	rs2296241	A	311 (53,3%)	456 (49,1%)	0,85 [0,69 - 1,04]	0,264	366 (53,5%)	544 (50,7%)	0,89 [0,74 - 1,08]	0,526
		G	273 (46,7%)	472 (50,9%)	1,18 [0,96 - 1,45]		318 (46,5%)	530 (49,3%)	1,12 [0,93 - 1,36]	
CYP24A1	r2248137	G	227 (38,9%)	356 (38,4%)	0,98 [0,79 - 1,21]	1,000	260 (38,3%)	416 (36,6%)	0,93 [0,76 - 1,13]	0,985
		C	357 (61,1%)	572 (61,6%)	1,02 [0,83 - 1,26]		418 (61,7%)	720 (63,4%)	1,08 [0,88 - 1,31]	

p<sub>c</sub> – p korrigiert für multiples Testen (Anzahl von: Genen insgesamt, mögliche Genotypen, SNPs dieses Gens), Fett: signifikante Ergebnisse

Tabelle 3: Assoziation der VD-Systemgen-SNPs mit 25(OH)D<sub>3</sub> und 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Konzentrationen

Genotyp	Gruppe	n	25(OH)D <sub>3</sub> (ng/ml)			1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (pg/ml)			
			Median	p <sub>global</sub>	p <sub>c</sub>	Median	p <sub>global</sub>	p <sub>c</sub>	
CYP2R1 rs10741657	AA	T2D	7	8,50	0,003	0,097	43,30	0,232	
		Ko	13	21,20			51,00		
	AG	T2D	32	13,30			45,95		
		Ko	27	18,90			58,00		0,045
	GG	T2D	23	10,90			44,50		
		Ko	33	15,80			48,00		0,396
CYP27B1 rs10877012	AA	T2D	8	16,70	<0,001	0,222	46,05	0,058	
		Ko	11	12,50			51,00		
	AC	T2D	25	12,60			44,90		
		Ko	28	15,20			53,50		
	CC	T2D	29	11,00			44,50		
		Ko	34	20,45			52,00		<0,001
DBP 4588	AA	T2D	3	12,60	<0,001	0,866	30,70	1,000	
		Ko	9	15,80			38,00		
	AC	T2D	25	13,60			46,80		
		Ko	29	15,60			58,00		0,006
	CC	T2D	34	11,45			43,45		
		Ko	35	19,20			51,00		0,005
DBP rs7041	TT	T2D	11	12,60	<0,001	0,175	46,80	1,000	
		Ko	15	15,80			45,00		
	TG	T2D	31	13,60			45,00		
		Ko	36	17,30			49,50		0,014
	GG	T2D	20	10,95			43,90		
		Ko	22	21,20			55,50		0,015
VDR rs7975232	GG	T2D	13	11,90	0,001	0,046	39,70	0,701	
		Ko	16	15,70			48,00		
	AG	T2D	31	12,30			44,50		
		Ko	36	18,90			55,50		0,036
	AA	T2D	18	13,15			46,70		
		Ko	21	19,20			51,00		1,000
VDR rs731236	TT	T2D	21	11,90	0,002	0,011	41,80	0,123	
		Ko	30	16,20			50,50		
	TC	T2D	32	12,45			44,35		
		Ko	35	20,20			48,00		0,017
	CC	T2D	9	12,60			46,80		
		Ko	8	22,05			60,50		1,000
VDR rs2228570	TT	T2D	5	7,90	0,003	0,095	47,10	1,000	
		Ko	16	14,40			47,50		
	TC	T2D	28	12,65			43,45		
		Ko	38	18,65			54,50		0,039
	CC	T2D	29	12,20			45,10		
		Ko	19	28,90			54,00		0,500
VDR rs1544410	AA	T2D	9	13,60	0,002	0,014	45,10	1,000	
		Ko	10	22,50			57,50		
	AG	T2D	33	12,30			46,80		
		Ko	33	20,20			55,00		0,034
	GG	T2D	20	12,05			43,15		
		Ko	30	16,20			49,50		0,428



Fortsetzung:

Tabelle 3: Assoziation der VD-Systemgen-SNPs mit 25(OH)D<sub>3</sub> und 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Konzentrationen

Genotyp	Gruppe	n	25(OH)D <sub>3</sub> (ng/ml)			1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (pg/ml)			
			Median	p <sub>global</sub>	p <sub>c</sub>	Median	p <sub>global</sub>	p <sub>c</sub>	
CYP24A1 rs2585426	CC	T2D	32	12,05		0,086	44,75		0,075
		Ko	41	17,90			51,00		
	GC	T2D	27	13,60	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,006</b>	44,90	<b>0,031</b>	1,000
		Ko	23	20,90			50,00		
	GG	T2D	3	7,80		0,641	69,00		1,000
		Ko	9	11,40			59,00		
CYP24A1 rs927650	CC	T2D	20	11,05		0,133	42,70		1,000
		Ko	20	16,20			47,50		
	TC	T2D	29	13,00	<b>0,004</b>	0,230	46,90	<b>0,013</b>	1,000
		Ko	28	17,65			51,00		
	TT	T2D	13	11,90		0,505	40,00		0,030
		Ko	25	18,90			56,00		
CYP24A1 rs2296241	AA	T2D	19	11,20		0,214	40,50		0,110
		Ko	23	14,10			58,00		
	GA	T2D	29	12,70	<b>0,006</b>	0,041	44,90	<b>0,040</b>	1,000
		Ko	32	18,05			49,00		
	GG	T2D	14	11,80		1,000	45,70		1,000
		Ko	18	19,05			51,50		
CYP24A1 rs2248137	GG	T2D	10	9,10		0,919	47,50		1,000
		Ko	14	13,10			54,50		
	GC	T2D	30	12,10	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,001</b>	44,95	<b>0,048</b>	0,304
		Ko	29	20,20			51,00		
	CC	T2D	22	13,50		1,000	43,90		0,066
		Ko	30	17,95			51,50		

Fett: signifikante Ergebnisse; Signifikanzniveau: p<sub>global</sub> < 0,05; p<sub>c</sub> < 0,01 (p<sub>c</sub> - p korrigiert für multiples Testen); Ko – Kontrolle

Genotyp		Gr	V1					V3					V5				
			med	min	max	n	p <sub>c</sub>	med	min	max	n	p <sub>c</sub>	med	min	max	n	p <sub>c</sub>
CYP27B1 rs10877012	AA	V	8,40	4,60	21,30	5	1,000	21,75	4,30	44,50	4	1,000	21,30	19,30	22,20	3	0,256
		P	12,90	3,60	18,40	4		9,80	2,90	22,60	4		12,20	4,90	16,10	4	
	AC	V	12,65	6,30	22,30	12	1,000	29,40	11,50	36,80	13	<0,001	18,80	9,40	30,40	13	0,059
		P	12,30	6,40	19,20	13		12,50	5,90	25,10	11		13,85	4,10	27,20	10	
	CC	V	12,20	2,00	38,90	15	1,000	29,30	5,70	48,30	15	<0,001	17,00	7,50	47,50	15	0,146
		P	12,60	6,40	18,60	17		10,15	44,40	21,50	14		10,90	2,50	18,20	14	
DBP rs4458	AA	V	17,80	17,80	17,80	1	1,000	19,50	19,50	19,50	1	1,000	20,00	20,00	20,00	1	1,000
		P	14,15	12,60	15,70	2		6,80	6,80	6,80	1		5,70	5,70	5,70	1	
	AC	V	12,65	6,30	38,90	14	1,000	28,10	4,30	48,30	18	0,019	17,90	7,60	47,50	17	1,000
		P	14,30	7,90	15,10	7		10,35	4,40	25,10	6		15,80	9,90	27,20	6	
	CC	V	10,90	2,00	21,30	13	1,000	29,70	5,70	44,50	13	<0,001	18,80	7,50	30,80	13	0,086
		P	11,90	3,60	19,20	25		10,80	2,90	22,60	22		10,50	2,50	21,30	21	
VDR rs7975232	GG	V	12,05	8,60	38,90	6	1,000	25,60	5,70	48,30	6	0,037	18,80	11,90	47,50	6	0,225
		P	14,30	3,60	18,80	9		8,90	2,90	13,00	7		9,30	2,50	16,50	7	
	AG	V	13,70	8,40	21,30	13	1,000	28,95	21,40	44,50	14	<0,001	20,00	7,60	30,80	14	0,034
		P	11,80	6,40	19,20	16		10,80	6,80	22,60	13		10,90	8,30	21,30	12	
	AA	V	12,70	5,60	22,30	9	1,000	28,45	17,50	36,80	8	0,027	15,35	9,40	30,40	8	0,225
		P	13,00	7,90	18,60	8		12,55	4,40	25,10	8		15,30	9,90	27,20	8	
VDR rs1544410	GG	V	12,05	7,70	38,90	10	1,000	30,55	5,70	48,30	10	<1,000	21,10	11,90	47,50	10	0,013
		P	14,30	3,60	19,20	11		10,70	2,90	13,00	9		9,90	2,50	16,50	9	
	AG	V	12,60	2,00	22,03	19	1,000	25,80	4,30	33,80	19	0,005	18,35	7,50	30,40	18	1,000
		P	11,00	6,40	16,80	16		11,00	6,60	15,10	13		11,50	8,30	27,20	12	
	AA	V	13,60	6,40	18,70	3	1,000	30,10	18,50	36,80	3	0,135	16,00	14,70	21,30	3	1,000
		P	12,60	7,90	18,60	7		9,50	4,40	20,70	7		15,20	9,70	20,30	7	
CYP24 rs2296241	AA	V	14,00	2,00	38,90	12	1,000	29,00	21,40	48,30	12	0,001	18,80	7,50	47,50	12	1,000
		P	10,30	6,40	18,60	9		11,75	7,00	18,60	8		12,40	8,30	18,20	8	
	AG	V	13,15	4,60	21,30	12	1,000	29,35	4,30	44,50	12	<0,001	19,30	9,40	23,10	11	1,000
		P	12,80	3,60	18,80	18		8,90	2,90	25,10	15		10,25	2,50	27,20	14	
	GG	V	11,00	5,60	20,10	7	1,000	23,70	5,70	31,70	7	1,000	18,80	11,30	30,80	7	1,000
		P	15,50	6,40	19,20	7		10,80	5,90	22,60	6		13,70	4,10	20,30	6	

Fett: signifikante Ergebnisse ( $p_c < 0,05$ ) und Trend ( $p_c < 0,1$ ); dunkelgrau – "gutes" oder "schlechtes" Ansprechen; V1 – Studienbeginn; V3 – 6 Monate; V5 – 12 Monate; Gr – Gruppe; V – Verum; P – Placebo; p<sub>c</sub> – p korrigiert für multiples Testen; med – Median; min – Minimalwert, max –Maximalwert

Tabelle 4: 25(OH)D<sub>3</sub> Konzentrationen (ng/ml) Verum vs. Placebo

Tabelle 5: PTH-Konzentrationen (pg/ml) der Verumgruppe

Genotyp	V1			V3			n	p <sub>global</sub>	p <sub>c</sub>	MD	95% CI	
	Median	min	max	Median	min	max						
CYP2R1 rs1074165	AA	np	np	np	np	np	3					
	AG	46,5	19,0	69,0	27,0	16,1	64,0	12	<b>0,003</b>	<b>0,002</b>	12,0	5,0 - 21,0
	GG	29,0	11,5	79,0	21,0	11,7	67,0	7	0,422			
CYP27B1 rs1087701	AA	35,0	22,0	48,0	22,8	15,2	31,0	4	0,297			
	AC	46,0	11,5	55,0	28,0	17,1	44,0	9	0,008	0,240		
	CC	33,0	19,0	79,0	19,0	11,7	67,0	13	0,053			
DBP rs4588	AA	np	np	np	np	np	1					
	AC	44,5	11,5	79,0	33,0	11,7	67,0	12	0,271			
	CC	41,5	19,0	55,0	21,5	15,4	44,0	10	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	14,5	8,0 - 24,0
DBP rs7041	GG	47,0	29,0	60,0	24,0	15,4	64,0	5	<b>0,037</b>	0,074		
	GT	45,5	20,0	79,0	29,5	17,0	67,0	12	0,081			
	TT	26,0	11,5	49,0	19,0	17,1	37,0	6	0,166			
VDR rs7975232	GG	38,0	11,5	54,0	24,0	16,1	55,0	6	0,113			
	AG	29,0	19,0	79,0	19,0	11,7	67,0	11	<b>0,042</b>	0,119		
	AA	54,5	46,0	60,0	34,0	24,0	64,0	4	0,119			
VDR rs731236	TT	38,0	11,5	69,0	24,0	15,4	77,0	8	0,082			
	TC	35,5	19,0	79,0	24,5	11,7	67,0	12	<b>0,030</b>	0,088		
	CC	np	np	np	np	np	np	3				
VDR rs2228570	TT	np	np	np	np	np	np	2				
	TC	44,5	20,0	55,0	25,0	15,4	44,0	12	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	13,5	7,0 - 20,5
	CC	41,5	11,5	79,0	23,5	11,7	67,0	10	0,320			
VDR rs1544410	AA	np	np	np	np	np	np	3				
	AG	41,5	19,0	79,0	28,5	11,7	67,0	14	<b>0,028</b>	0,183		
	GG	38,0	11,5	69,0	24,0	15,4	55,0	8	0,082			
CYP24 rs2585426	CC	48,5	11,5	60,0	21,5	15,4	64,0	8	<b>0,024</b>	0,088		
	CG	47,0	19,0	79,0	30,0	18,3	67,0	7	0,097			
	GG	np	np	np	np	np	np	1				
CYP24 rs927650	CC	47,0	20,0	69,0	37,0	11,7	55,0	7	0,422			
	CT	42,0	19,0	79,0	24,5	16,1	67,0	8	0,131			
	TT	37,5	11,5	55,0	23,0	15,4	29,0	8	<b>0,011</b>	<b>0,045</b>	13,6	5,0 - 23,0
CYP24 rs2296241	AA	46,0	19,0	79,0	37,0	11,7	77,0	9	0,530			
	AG	35,5	23,0	55,0	25,5	19,0	44,0	8	<b>0,004</b>	<b>0,005</b>	13,0	7,0 - 20,5
	GG	44,0	11,5	60,0	19,5	15,4	64,0	6	<b>0,026</b>	1,000		
CYP24 rs2248137	GG	41,0	29,0	69,0	38,0	11,7	55,0	4	0,648			
	CG	45,5	11,5	79,0	25,0	17,1	79,0	10	0,105			
	CC	38,0	20,0	54,0	22,0	15,4	30,0	9	<b>0,004</b>	<b>0,021</b>	12,6	7,2 - 21,0

Fett: signifikante Ergebnisse ( $p_c < 0,05$ ); V1 – Studienbeginn; V3 – 6 Monate;  $p_c$  – p korrigiert für multiples Testen; MD – mittlere Differenz, np – nicht auswertbar; CI – Konfidenzintervall

## 9. Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Einfluss von Polymorphismen der Vitamin D-Systemgene auf die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 sowie die pharmakogenetische Analyse unter Vitamin D Therapie.

im Zentrum der Inneren Medizin, Medizinische Klinik 1, Schwerpunkt Diabetologie/ Endokrinologie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Klaus Badenhoop mit Unterstützung durch Dr. phil. nat. Marissa Penna-Martinez ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht\*. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden (oder werden) in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Edith Klahold, Marissa Penna-Martinez, Franziska Bruns, Christian Seidl, Sabine Wicker, Klaus Badenhoop, Vitamin D in Type 2 Diabetes: Genetic Susceptibility and the Response to Supplementation. Hormone and Metabolic Research., 2020 Jul;52(7):492-499., 2020

---

(Ort, Datum)  
\*) im Falle des Nichtzutreffens entfernen

---

(Unterschrift)