

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik II
Klinik der Universität München
Direktorin: Prof. Dr. med. Julia Mayerle

**Untersuchung potenzieller Vitamin D-abhängiger
Serum-Biomarker bei Patienten
mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Felix Erwin Reichl
aus
Eggenfelden

2024

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. med. Florian Beigel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Florian Kühn
Prof. Dr. rer. nat. Roland Kappler

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Johannes Stallhofer

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2024

Meinen Eltern

In der vorliegenden Dissertation wird zur besseren Lesbarkeit bei personenbezogenen Formulierungen ausschließlich die männliche Form verwendet. Diese Ausdrucksweise bezieht sich stets gleichermaßen auf alle Geschlechter.

Inhaltsverzeichnis

1	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)	1
1.1.1	Überblick	1
1.1.2	Epidemiologie	2
1.1.3	Ätiologie und Pathogenese	4
1.2	Vitamin D bei CED	9
1.3	Biomarker	14
1.3.1	C-reaktives Protein (CRP)	14
1.3.2	Fäkales Calprotectin (FC)	15
1.3.3	Serum-Calprotectin (SC)	16
1.3.4	CCL20	16
1.3.5	Antimikrobielle Peptide	18
2	<u>Zielsetzung</u>	23
3	<u>Material und Methoden</u>	24
3.1	Material	24
3.1.1	Verbrauchsmaterial	24
3.1.2	Geräte	25
3.2	Methoden	26
3.2.1	Rekrutierung des Patienten- und Kontrollkollektivs	26
3.2.2	Gewinnung des Untersuchungsmaterials und Klinische Chemie	27
3.2.3	Bestimmung der Vitamin D-Spiegel	28
3.2.4	Beurteilung der Krankheitsaktivität	29
3.2.5	ELISA-Messungen	29
3.2.6	Statistische Analysen	29
3.2.7	Definitionen	30
4	<u>Ergebnisse</u>	31
4.1	Deskriptive Daten der Studienpopulation	31
4.2	Vitamin D-Parameter in der Studienkohorte	34
4.2.1	25-(OH)-Vitamin D-Spiegel in den einzelnen Kollektiven	35
4.2.2	1,25-(OH) ₂ -Vitamin D-Spiegel in den einzelnen Kollektiven	37
4.2.3	Regressionsanalyse: Kontrolle auf Vitamin D-Supplementation und Nierenfunktion	39
4.3	ELISA-Messungen	40
4.3.1	Übersicht der Serum-Biomarker in einzelnen Studienkohorten	40
4.3.2	CCL20 und Vitamin D in den Kollektiven	41
4.3.3	Serum-Calprotectin (SC) und Vitamin D in den Kollektiven	48
4.3.4	Cathelicidin/ LL-37 und Vitamin D in den Kollektiven	57
4.3.5	Humanes beta-Defensin 2 (HBD-2) und Vitamin D in den Kollektiven	69
4.3.6	Regressionsanalyse der Serum-Biomarker und Vitamin D-Parameter in den einzelnen Studienkohorten	73
4.3.7	ROC-Analysen der Serum-Biomarker als Erkrankungs- oder Aktivitätsmarker	82
5	<u>Diskussion</u>	89
5.1	Bestätigung der Datenlage zum Vitamin D-Haushalt bei CED	89
5.2	Nachweis systemisch erhöhter CCL20-Konzentrationen erstmals auch bei CU-Patienten	92

5.2.1	Signifikante Assoziation des Vitamin D-Haushalts und CCL20 im CU- und Kontrollkollektiv	95
5.3	Erhöhte Calprotectin-Werte im Serum von CED-Patienten mit aktiver Erkrankung	98
5.3.1	Fehlende Assoziation von SC zu Vitamin D	100
5.4	Höhere LL-37-Konzentrationen bei CED mit Korrelation zur Krankheitsaktivität bei CU-Patienten	102
5.4.1	Inverse Assoziation der LL-37-Serumkonzentrationen zu den Vitamin D-Parametern bei CU-Patienten.....	105
5.5	Inkonsistente HBD-2-Spiegel im Serum von CED-Patienten	107
5.5.1	Fehlende Assoziation zu Vitamin D-Parametern und dem NOD2-Mutationsstatus	110
5.6	Stärken und Limitationen	113
6	<u>Zusammenfassung und Ausblick</u>	<u>115</u>
7	<u>Literaturverzeichnis.....</u>	<u>120</u>
8	<u>Abbildungsverzeichnis</u>	<u>142</u>
9	<u>Tabellenverzeichnis.....</u>	<u>145</u>
10	<u>Abkürzungsverzeichnis.....</u>	<u>149</u>
11	<u>Anhang</u>	<u>152</u>
12	<u>Affidavit.....</u>	<u>154</u>
13	<u>Publikationsliste.....</u>	<u>155</u>
14	<u>Danksagung.....</u>	<u>156</u>
15	<u>Lebenslauf</u>	<u>157</u>

1 Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

1.1.1 Überblick

Der Begriff chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) umfasst die beiden Entitäten Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU).¹ Gekennzeichnet sind sie vor allem durch eine anhaltende chronische Entzündung verschiedener Abschnitte des Verdauungstrakts.²⁻⁴

Beim MC findet sich typischerweise eine diskontinuierliche Entzündung, die segmental im gesamten Gastrointestinaltrakt, insbesondere aber im terminalen Ileum und proximalen Kolon auftritt.⁵ Der segmentale Befall führt zu sog. *skip lesions*, also befallenen im Wechsel mit nicht befallenen Abschnitten des Verdauungstrakts.^{3, 5} Charakteristisch zeigt sich histologisch eine transmurale Entzündung, d.h. eine Inflammation in allen vorhandenen Wandschichten mit histologischem Nachweis von Epitheloidzellgranulomen und hyperplastischen mesenterialen Lymphknoten.^{3, 5, 6}

Tiefe Ulzerationen im Wechsel mit ödematösen Schleimhautinseln lassen makroskopisch ein sog. *Pflastersteinrelief* der Schleimhaut erkennen.⁷ Strikturen, Fisteln und Abszesse können Komplikationen darstellen.^{8, 9} Klinisch klagten die Patienten meist über Diarrhö mit schleimigen, nicht blutigen Stühlen, Abdominalschmerzen und Gewichtsverlust.¹⁰

Extraintestinal kann sich ein MC an Gelenken mit Arthropathien, am Auge mit Uveitis, Iritis und Episkleritis, an der Leber bzw. an den Gallengängen mit einer primär sklerosierenden Cholangitis und an der Haut mit einem Erythema nodosum oder einer Pyoderma gangraenosa manifestieren.¹¹

Therapeutisch stehen beim MC neben Allgemeinmaßnahmen wie Nikotinkarenz und Substitution bei Malabsorptionssyndrom die medikamentöse Behandlung im Vordergrund. Hier werden je nach Schweregrad unter anderem Steroide, Mesalazin, Azathioprin, Interleukin (IL)-12-/23-Antikörper, Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)-Antikörper, Integrin-Inhibitoren oder Januskinase-Inhibitoren eingesetzt. Im akuten Schub erfolgt die Behandlung mit Steroiden, bei leichter Entzündungsaktivität mit topischem Budesonid und bei mittlerer bis schwerer Entzündung erfolgt eine systemische Gabe. Bei distalem Befall können Suppositorien, Klysmen oder Schäume verwendet werden.¹²

Bei der CU zeigt sich meist ein Befallsmuster mit Beginn im Rektum als Proktitis und typischerweise kontinuierlicher Ausbreitung im restlichen Dickdarm in Richtung oral, wobei der Befall in der Regel auf das Kolon beschränkt bleibt.¹³ Meist ist das gesamte Kolon betroffen (Pancolitis) und in seltenen Fällen auch das Ileum als sogenannte *backwash ileitis*.¹³ Die Läsionen sind im Gegensatz zum MC auf die Mukosa und Submukosa begrenzt und zeigen sich histologisch als Ulzerationen mit zerstörter Kryptenarchitektur und Kryptenabszessen.¹⁴ Die für MC charakteristischen Epitheloidzellgranulome sind bei der CU nicht vorhanden.¹⁴ Als Komplikationen können das toxische Megakolon mit Kolondilatation und klinisch starken Bauchschmerzen und das kolorektales Karzinom, für das bei CU-Patienten ein erhöhtes Risiko besteht, auftreten.¹³

Typische Symptome sind blutige Durchfälle, Inkontinenz, Stuhlfrequenzerhöhung, abdominelle Krämpfe und ein vom Ausmaß des Kolonbefalls abhängiger Gewichtsverlust.¹⁵

Extraintestinale Manifestationen ähneln denen des MC, jedoch tritt die primär sklerosierende Cholangitis ebenso wie die Pyoderma gangraenosum bei CU häufiger auf als bei MC.^{15, 16}

Therapeutisch kommen bei leichter CU lokale Präparate wie Mesalazin oder topische Steroide, bei mittelschwerer bis schwerer CU systemische Steroide, Thiopurine, Biologika wie TNF- α -Blocker, IL-12-/23-Antikörper und Integrin-Antagonisten oder *small molecules* wie Januskinase-Inhibitoren oder Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-Modulatoren zum Einsatz. Bei maligner Entartung oder therapierefraktärer Situation sollte zusätzlich eine operative Therapie durchgeführt werden. Das Standardverfahren ist eine restaurative Proktokolektomie mit Anlage eines protektiven Ileostomas und konsekutiven ileoanalen Pouches.¹⁷

Die Krankheitsaktivität kann anhand zahlreicher Indices beurteilt werden, in dieser Arbeit fanden der *Crohn's disease activity index* (CDAI) nach Best¹⁸ für Patienten mit MC und der klinische Colitis Aktivitäts Index (CAI) nach Rachmilewitz¹⁹ Verwendung.

Sollten die Befunde weder eindeutig einem Morbus Crohn noch einer Colitis ulcerosa zugeordnet werden können, wird die Diagnose einer Colitis indeterminata gestellt.²⁰

1.1.2 Epidemiologie

Inzidenz und Prävalenz der CED steigen aktuell weltweit zum Teil sprunghaft an, was die Erkrankung, die für die Betroffenen oft mit einer erheblichen Einschränkung

der Lebensqualität einhergeht, zu einem globalen und auch kostenintensiven Gesundheitsproblem macht.²¹

CED treten vor allem in westlichen, industrialisierten Gebieten wie Nordamerika, Nordeuropa und Großbritannien auf.² In den letzten 10 Jahren konnte jedoch auch ein Anstieg der Inzidenz in erst kürzlich industrialisierten Ländern Asiens, Südamerikas und Afrikas, in denen CED bisher kaum auftraten, verzeichnet werden.²²

Innerhalb Europas zeigt sich ein typischer Nord-Süd- und Ost-West-Gradient²³: Die Inzidenz von MC liegt bei 6,3/100.000 Einwohner pro Jahr in Nordeuropa im Gegensatz zu 3,6/100.000 Einwohner pro Jahr in Südeuropa (CU: 11,4 zu 8,0/100.000 Einwohner pro Jahr).^{23, 24}

In Europa variiert die Prävalenz von MC zwischen 1,5²⁵ und 213²⁶ und von CU zwischen 2,4²⁵ und 294/100.000 Einwohner²⁷ pro Jahr.²³

Insgesamt sind aktuell 0,3% der europäischen Bevölkerung mit einer Gesamtzahl von 2,5-3 Millionen Personen von CED betroffen, wobei jedes Jahr schätzungsweise 176.000 neue Fälle hinzukommen.²⁸

Hervorzuheben ist die besonders hohe Prävalenz von MC bei Ashkenazi-Juden, innerhalb derer eine besonders hohe Anzahl von Risikoallelen für die Entwicklung eines MC beschrieben wurde.²⁹

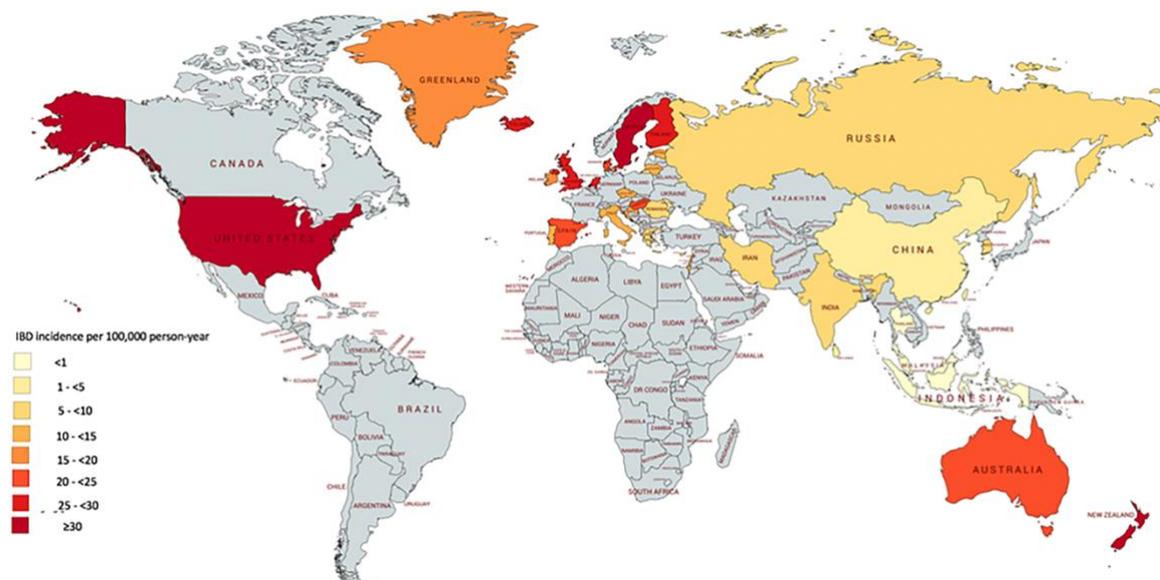


Abbildung 1: Weltweite Inzidenzen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen im Zeitraum 2010-2019

Quelle: aus Mak et al.²³

MC und CU werden in der Regel im jungen Erwachsenenalter diagnostiziert, es zeichnet sich ein Häufigkeitsgipfel zwischen 18 und 35 ab.¹ Innerhalb der letzten Jahre stieg die Inzidenz von CED sowohl in der Pädiatrie (*early-onset*), als auch in der Gruppe der über 65-jährigen, die als sog. *elderly-onset cases* mit meist der Diagnose einer CU die am schnellsten wachsende Subpopulation unter den CED-Patienten darstellen.^{1, 30-32}

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie und Pathogenese der CED ist trotz intensiver Forschungsbemühungen noch immer nicht vollständig verstanden. Derzeit geht man von einer multifaktoriellen Genese aus, bei der ein Zusammenspiel aus folgenden vier Faktoren eine chronische intestinale Entzündung hervorruft: a) genetische Suszeptibilität, b) intestinale Antigene aus der gastrointestinalen Mikrobiota und diverse Umweltfaktoren als Trigger, c) überschießende mukosale Immunreaktion, d) gestörte epitheliale Barriere,^{33, 34}

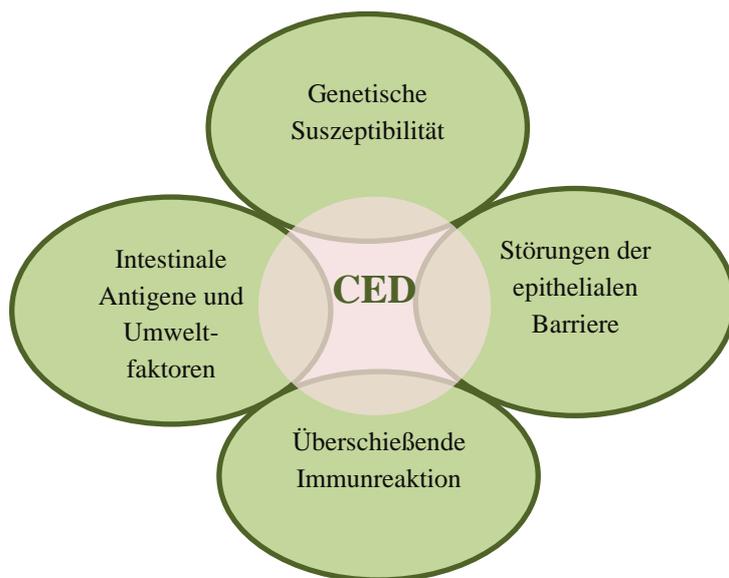


Abbildung 2: Ätiologie und Pathogenese der CED

Quelle: modifiziert nach Kucharzik et al.³⁴

- Genetische Suszeptibilität

Das NOD2-Gen, auch *nucleotide-binding oligomerization domain 2* oder CARD15, war das erste Gen, das mit MC in Zusammenhang gebracht werden konnte.^{34, 35} Mittlerweile wurden durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS), *Next Generation Sequencing*-Studien und andere Analysen mehr als 240 Risikogene für

CED ermittelt.^{35,36} Deshalb wird vermutet, dass diese Genloci und deren Signalwege an der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase beteiligt sind.³⁵

Das NOD2-Gen kodiert für ein Protein, das als intrazellulärer *pattern recognition receptor* konservierte Peptidoglykane, sog. Muramyl-dipeptide (MDP), grampositiver und -negativer Bakterien erkennt.^{37,38} Neuere Studien konnten den intrazellulären Rezeptor in zahlreichen Zelltypen des Darms nachweisen, so beispielsweise in T-Zellen³⁸, B-Zellen³⁹, Makrophagen³⁸, dendritischen Zellen⁴⁰, Mastzellen⁴¹, in Paneth-Zellen⁴⁰, Stammzellen⁴² und Enterozyten⁴⁰. Nach Stimulation von NOD2 durch den Liganden (MDP) kommt es *nuclear factor-kappa B* (NF-κB)-abhängig zu einer Aktivierung von proinflammatorischen Signalwegen.³⁴ MDP induzieren Prozesse der Autophagie, wodurch die bakterielle Replikation kontrolliert und Antigen-Präsentation initiiert wird.⁴⁰ So werden sowohl Immunantworten des angeborenen wie auch erworbenen Immunsystems moduliert.³⁸ Bei etwa einem Drittel der MC-Patienten liegt eine NOD2-Mutation vor³⁵, wo es durch beeinträchtigte lysosomale Abbauprozesse zur bakteriellen Persistenz kommt.⁴⁰ Auf eine bakterielle Invasion kann dadurch nicht mehr adäquat reagiert werden, was zu einer systemisch-dysregulierten Immunantwort führt.⁴³

Durch GWAS konnten zudem einige *Single Nucleotide* Polymorphismen in IL-10-Rezeptor-Genen, die mit *early-onset* Enterocolitis in Verbindung stehen, entdeckt werden.^{44,45} Wesentliche Funktion dieses Gens ist die Herabregulation der Entzündungsaktivität und die Sekretion von Tumornekrosefaktoren.⁴⁵

Für manche Genloci, die die Suszeptibilität für CED erhöhen, zeigt sich eine Heterogenität in verschiedenen Populationen: NOD2- und IL-23-Rezeptor-Mutationen konnten bei europäischen, jedoch nicht bei ostasiatischen Probanden mit einem erhöhten Risiko für CED in Verbindung gebracht werden.⁴⁶ Mutationen in CED-Risikogenen gehen nicht immer mit der Entwicklung einer CED einher, weshalb auch andere Ursachen für die Entstehung von CED in Betracht gezogen werden müssen.³⁵

- Intestinale Antigene aus der gastrointestinalen Mikrobiota und diverse Umweltfaktoren als Trigger

Der Anstieg von Inzidenzen bei CED in Entwicklungsländern, in Ländern mit zunehmender Anpassung an den westlichen Lebensstandard und bei Migranten spricht für die Annahme, dass Umweltfaktoren bei der Entwicklung von CED eine Rolle spielen.^{47,48} In einem erst kürzlich veröffentlichten *Umbrella Review*⁴⁹, der systematisch 71 Umweltfaktoren in 53 Metaanalysen untersuchte, konnten mit moderater bis starker epidemiologischer Evidenz 9 Faktoren ermittelt werden, die

das Risiko für CED signifikant erhöhten. Vitamin D-Defizienz, orale Kontrazeption, Einnahme von Antibiotika und urbaner Lebensraum standen beispielsweise mit CED in Zusammenhang. Rauchen und eine Appendektomie erhöhten das Risiko für MC, wohingegen appendektomierte Patienten und Raucher ein niedrigeres Risiko für die Entwicklung einer CU aufwiesen. Gleichzeitig konnten Piovani *et al.* auch protektive Umweltfaktoren ermitteln: körperliche Aktivität, Stillen, Schlafen des Säuglings bzw. Kindes im elterlichen Bett (*bed sharing*), Konsum von Tee, hohe Folsäure- und Vitamin D-Spiegel sowie eine Infektion mit *Helicobacter pylori*.⁴⁹

Die Einnahme von Antibiotika als Risikofaktor für CED steht mit dessen Effekten auf das Mikrobiom in Zusammenhang. So wurden nach Antibiotikatherapien Änderungen in der Biodiversität des intestinalen Mikrobioms, das aus zahlreichen Bakterienarten, Viren und Pilzen besteht, beschrieben.⁵⁰ Jeder Mensch besitzt nahezu 1000 individuell verschiedene Spezies an kommensalen Bakterien, die den größten Teil des Mikrobioms im Darm darstellen.^{50, 51} Untersuchungen der Darmflora von CED-Patienten zeigten eine Dysbiose der Mikrobiota, die sich als reduzierte Biodiversität im Vergleich zu nicht erkrankten Probanden darstellte.⁵⁰ Bei MC-Patienten konnte ein Anstieg von *Enterobacteriaceae* und des Adhärenz-Invasiven *Escherichia coli* AIEC, welcher *in vitro* die Bildung von Granulomen induziert, nachgewiesen werden.^{50, 52}

Im Kolon befindet sich eine kontinuierliche muköse Schicht, die aus zwei Unterstrukturen besteht: Die äußere, eher lose anhaftende Schicht ermöglicht eine bakterielle Kolonisation, die eher fest anhaftende innere Schicht, gebildet durch das Muzin 2, ist hingegen weitgehend steril und separiert das Mikrobiom vom intestinalen Epithel.⁵³ Bakterielle Proteasen können die schützende Muzinschicht durch Spaltung von Muzin 2 überwinden und dort als direkter Trigger des Immunsystems wirken.⁵⁴ Ein kausaler Zusammenhang zwischen dysbiotischem Mikrobiom und CED konnte allerdings noch nicht belegt werden, weshalb man eher davon ausgeht, dass genetische Mutationen, die überwiegend die Funktion der epithelialen Barriere, die Immunregulation und die Produktion von antimikrobiellen Peptiden (AMP) betreffen, zu einem dysregulierten Umgang mit dem gastrointestinalen Mikrobiom führt.⁵⁰

- Überschießende mukosale Immunreaktion

Die aktuelle Evidenz geht von dysfunktionalen Signalwegen des angeborenen und erworbenen Immunsystems bei CED-Patienten aus, die zu einer unkontrollierten mukosalen Immunantwort führen.⁵⁵ An der Entstehung und Aufrechterhaltung der CED sind sowohl das angeborene Immunsystem, bestehend aus Epithelzellen, neutrophilen Granulozyten, dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und

natürlichen Killerzellen, als auch das erworbene Immunsystem, hier vor allem die T-Lymphozyten, beteiligt.^{35, 55} Auch Entzündungsmediatoren wie Zytokine und Chemokine spielen eine Rolle.³⁵ Im Rahmen der angeborenen Immunantwort spielt die schnelle Ersterkennung und nicht-spezifische Abwehr von mikrobiellen Antigenen, vermittelt durch *pattern recognition receptors* wie *toll-like receptors* (TLRs) und zytoplasmatischen NOD-artigen Rezeptoren, und die Aufrechterhaltung der Homöostase durch Prozesse der Autophagie und der Produktion von AMP, eine zentrale Rolle.⁵⁵ Mutationen in den Bereichen, die deren Expression oder Funktion betreffen, konnten mit CED in Zusammenhang gebracht werden.⁵⁵ Antigen-präsentierende Zellen der Lamina propria, im Wesentlichen Makrophagen und dendritische Zellen, reagieren auf mikrobielle Komponenten am TLR mit der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen.⁵⁶ Dies führt zur Aktivierung von T-Lymphozyten als Teil der erworbenen, spezifischen Immunantwort.⁵⁶ Generell ist die Pathogenese der CED ist in hohem Maße T-Zell-vermittelt, deren abnormale Aktivierung mittels exzessiver Zytokin- und Chemokinausschüttung und fehlerhafter Suppression zu einer dysregulierten Entzündung führt.^{56, 57} Bei MC wird eine verstärkte T-Helferzelle 1 (Th1)-Immunantwort vermutet, da mukosale T-Zellen von MC-Patienten im Vergleich zu CU und gesunden Probanden höhere Level an IL-2 und Interferon (IFN)- γ produzieren.^{55, 58} Im Gegensatz dazu konnte bei CU eine abnormale Th2-vermittelte Immunantwort festgestellt werden.⁵⁹ Th17-Zellen spielen dagegen sowohl bei MC als auch bei CU eine Rolle, da deren Effektorzytokin IL-17A bei beiden Entitäten im Epithel in höheren Mengen detektierbar ist als bei gesunden Menschen.^{55, 59}

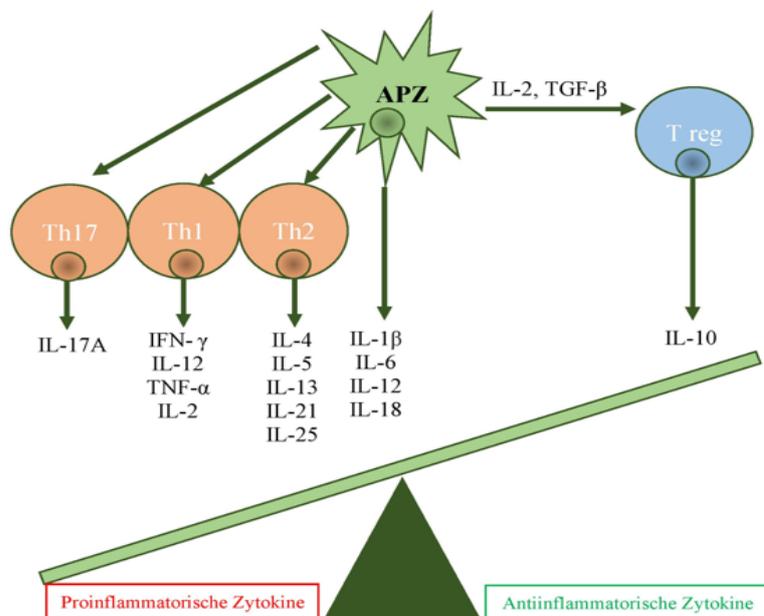


Abbildung 3: Übersicht der pro- und antiinflammatorischen Zytokinausschüttung in der Lamina propria

Quelle: modifiziert nach Brand⁵⁹; Abkürzungen: APZ: Antigen-präsentierende Zelle, T reg: regulatorische T-Zelle, Th1/2/17: T-Helfer-Zellen 1/2/17, IL: Interleukin, IFN: Interferon, TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; es ist nur eine Auswahl an beteiligten Zytokinen dargestellt.

- Gestörte epitheliale Barriere

Das gastrointestinale Epithel stellt die Barriere zwischen der Umwelt und dem Immunsystem des Körpers dar und hat die komplexe Funktion, einerseits auf potenzielle Krankheitserreger zu reagieren, andererseits die Permeabilität und selektive Absorption wichtiger Nahrungsbestandteile aufrecht zu erhalten.⁶⁰ Die intestinale Barriere setzt sich aus dem sezernierten Mukus, der Epithelzellschicht und den darunterliegenden nicht-epithelialen Zellen, vor allem Leukozyten mit Effektor- oder regulierenden Eigenschaften, zusammen.⁶¹ Neben den einzelnen Enterozyten existieren auch andere spezielle Zelltypen wie Becherzellen zur Schleimproduktion, Paneth-Zellen zur Bildung von AMP und *Microfold*-Zellen, die den Transport von großen luminalen Antigenen und Mikrobiota zu den Immunzellen der Lamina propria unterstützen.^{60, 62} Die einzelnen Epithelzellen werden durch junctionale Proteinkomplexe (sog. *Tight Junctions*, TJ) miteinander verbunden, die aus mindestens 50 verschiedenen Membran-assoziierten Proteinen bestehen und in ihrer *Gatekeeper*-Funktion die Durchlässigkeit für Ionen und kleine Moleküle bis 20 Kilodalton regulieren.^{62, 63} Die TJ-Proteine beinhalten: (1) integrale Membranproteine, wie junctionale Adhäsionsmoleküle, Claudine und Occludine, die sich in den Interzellularraum erstrecken; (2) zytoplasmatische Proteine des Zytoskeletts (bspw. Cingulin, Zona Occludens-1, 2, 3), die die Membranproteine am

Zytoskelett befestigen und (3) Signalproteine, die als Transkriptionsfaktoren und Zellregulatoren wirken.^{60, 63} *Adherens Junctions* und Desmosomen sorgen als weitere Komponenten des intestinalen Epithels für die Aufrechterhaltung der Kohäsion und der Integrität.⁶² Am basalen Pol bewirken Hemidesmosomen eine Verankerung auf der Basalmembran und der extrazellulären Matrix.⁶⁴ Es gibt viele Hinweise darauf, dass ein Zusammenhang zwischen Fehlfunktionen der TJ-Proteine und intestinalen Entzündungen besteht.⁶⁰ Eine gestörte epitheliale Barriere führt zu einem verstärkten Übertritt von intestinalen luminalen Antigenen und somit zu einer Aktivierung des Immunsystems und einer Entzündungsreaktion der Mukosa.^{60, 62} Proinflammatorische Zytokine erhöhen die epitheliale Permeabilität durch Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase, die zu Destabilisierung der TJ führt, und induzieren Apoptose.⁶⁵ Störungen der epithelialen Barriere bei CED umfassen eine Abnahme der Sekretion von AMP, eine erhöhte Permeabilität, Schädigung der TJ und zum Teil kompletten Verlust der epithelialen Struktur an Stellen mit Ulzerationen.⁶¹ Die erhöhte Permeabilität ist vermutlich auf Veränderungen der epithelialen TJ-Proteinexpression zurückzuführen: Intestinale Epithelzellen exprimieren bei CED-Patienten weniger Claudin-3 und 4 und bei MC-Patienten weniger Occludin als bei gesunden Probanden.^{66, 67} Zudem konnten genetische Polymorphismen bzw. Mutationen in TJ-assoziierten Genen mit der Entwicklung von CED in Zusammenhang gebracht werden.⁶⁰ Derzeit ist aber noch inkomplett verstanden, ob die gestörte epitheliale Barriere eine Folge der entzündlichen Prozesse bei CED ist oder als Ursache für die Entwicklung von CED angesehen werden muss.⁶⁸ In Studien mit gesunden, erstgradigen Verwandten von Patienten mit MC konnte eine erhöhte epitheliale Permeabilität festgestellt werden.⁶⁹ Zudem wurde gezeigt, dass bei MC eine Zunahme der gastrointestinalen Permeabilität einer Rezidiventwicklung und dem Symptombeginn bis zu einem Jahr vorausgehen kann.⁷⁰ Generell kann man aber davon ausgehen, dass eine Beeinträchtigung der Darmpermeabilität im Rahmen der multifaktoriellen Genese von CED nur eine der Suszeptibilitäten darstellt, die in Kombination mit anderen Faktoren zur Entwicklung chronischer Darmentzündungen führen kann.⁶⁰

1.2 Vitamin D bei CED

Eine Auswertung der prospektiven *Nurses' Health Study*, in der zwischen 1986 und 2008 72.719 US-amerikanische Frauen beobachtet wurden, kam zu dem Ergebnis, dass ein Lebensstil, der mit ausreichend hohen Spiegeln an 25-Hydroxyvitamin D (25(OH)-Vitamin D, Calcidiol, kurz 25(OH)D) einhergeht, das Risiko, an MC zu erkranken, signifikant reduziert.⁷¹ Auch ein kürzlich veröffentlichter *Umbrella-Review* konnte nach 53 Metaanalysen zu 71 möglichen Umweltrisikofaktoren für

CED die Vitamin D-Defizienz als einen von neun Risikofaktoren mit starker epidemiologischer Evidenz nachweisen.⁴⁹

Vitamin D wird als Überbegriff für die im menschlichen Körper vorkommenden Secosteroide Vitamin D3 (VD3, Cholecalciferol) und Vitamin D2 (VD2, Ergocalciferol) verwendet, welche sich in ihren Seitenketten unterscheiden.^{72, 73}

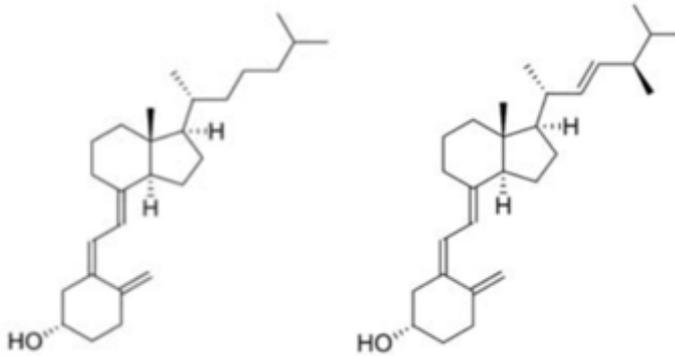


Abbildung 4: Cholecalciferol (links) und Ergocalciferol (rechts)

Quelle: aus Trochoutsou et al.⁷⁴

Quelle für VD2 ist nur die Nahrung oder Supplementation, VD3 hingegen kann vom Körper selbst hergestellt werden.⁷² Der größte Teil des VD3 stammt neben Supplementation aus der Synthese in der Haut während der Sonnenlichtexposition mit insbesondere Ultravioletter B-Strahlung, welche 7-Dehydrocholesterol als letztes Intermediat des Cholesterolzyklus in Cholecalciferol photokonvertiert.⁷⁵ Ein geringer Teil des VD3 stammt aus tierischen Quellen wie beispielsweise Fisch oder Eigelb und wird als fettlösliches Vitamin, ebenso wie VD2, mittels Chylomikronen über den Darm aufgenommen.^{72, 76}

Vitamin D3 wird im Kreislauf an das Vitamin D-Bindeprotein (VDBP) gebunden und wie auch VD2 zur Leber transportiert, wo sie, katalysiert durch Cytochrom P450-Enzyme, zum 25-Hydroxyvitamin D2 oder D3 (25(OH)D) hydroxyliert werden.^{72, 73} 25(OH)D stellt die Speicherform des Vitamin D dar und wird daher im klinischen Alltag als Indikator für den Vitamin D-Status verwendet.⁷² Der größte Teil des 25(OH)D zirkuliert im Blut und liegt hier zu 85-90% gebunden an VDBP, zu 10-15% gebunden an Albumin oder in weniger als 1% ungebunden vor.^{72, 77} Anschließend wird das 25(OH)D in der Niere zum 1,25-Dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂-Vitamin D, Calcitriol, kurz 1,25(OH)₂D), der aktiven Form des Vitamins, umgewandelt.⁷⁵ Dies wird katalysiert durch die 1- α -Hydroxylase, ein Cytochrom P450-Enzym (CYP27B1) im proximalen Tubulus der Niere.^{73, 78}

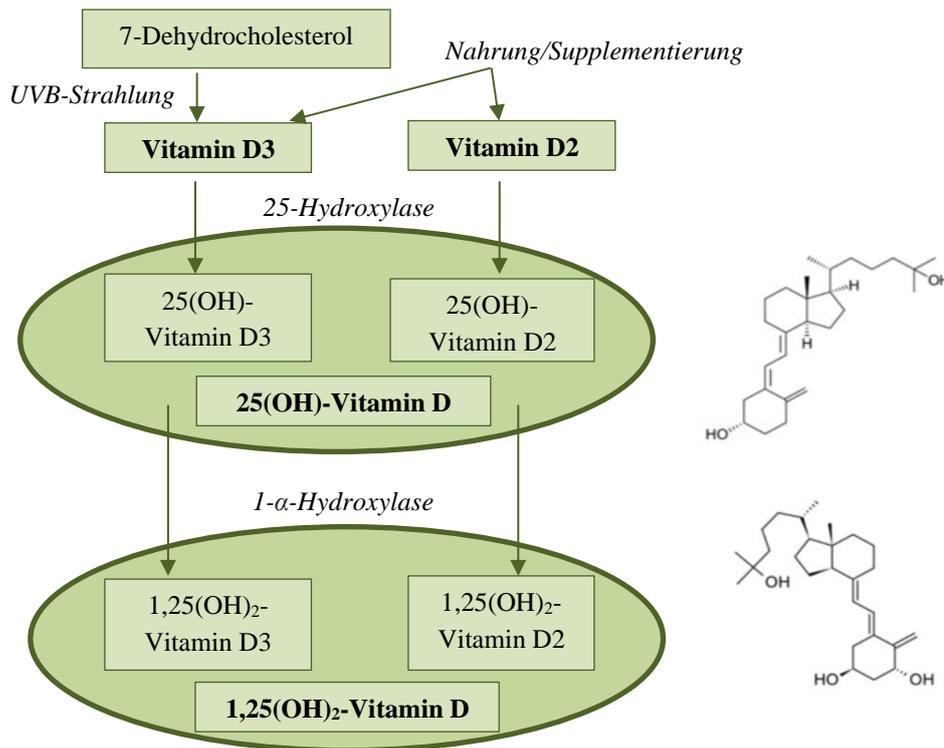


Abbildung 5: Vitamin D-Metabolisierung und chemische Strukturen von Calcidiol und Calcitriol

Quelle: Schema modifiziert nach Garg et al.⁷²; chemische Strukturen aus Trochoutsou et al.⁷⁴; UVB: Ultraviolette B-Strahlung

Die klassische Funktion von Vitamin D umfasst die Kalziumhomöostase und die Knochenmineralisation.⁷² Die Aktivität der 1- α -Hydroxylase und damit die Bildung von 1,25(OH)₂D wird durch den Kalzium- und Phosphat Spiegel und durch das Parathormon aus der Nebenschilddrüse reguliert.⁷⁹ 1,25(OH)₂D stimuliert die Kalzium- und Phosphatabsorption im Darm und erhöht zusammen mit Parathormon die Rückresorption von Kalzium und Phosphat aus dem Tubulussystem der Nieren.⁷² Durch einen negativen Feedback-Mechanismus wird die Produktion von Parathormon bei hohen Calcitriol-Spiegeln herunterreguliert.⁷⁹ Ohne Vitamin D können nur 10-15 % des Kalziums und nur etwa 60 % des Phosphats aus der Nahrung im Darm aufgenommen werden.⁷⁹ Aus diesem Grund konnte eine direkte Korrelation des Vitamin D-Spiegels mit der Knochendichte und Vitamin D als protektiver Faktor für osteoporotisch bedingte Frakturen ermittelt werden.⁸⁰ Ein relevanter Mangel an Vitamin D kann im Kindesalter zum Krankheitsbild der Rachitis oder bei Erwachsenen zur Osteomalazie führen.⁷⁸

Das Vitamin D hat aber auch viele Funktionen, die nicht den Knochen- bzw. Kalziumhaushalt betreffen. Der Vitamin D-Metabolismus konnte mit zahlreichen Erkrankungen wie beispielsweise kardiovaskulären Erkrankungen, Krebs- und Nierenerkrankungen, Asthma bronchiale, chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen, multipler Sklerose, psychiatrischen Erkrankungen und auch

mit CED assoziiert werden.⁷² Eine aktuelle Publikation der *Endocrine Society* befürwortet eine Vitamin D-Supplementation für Kinder, Schwangere und Erwachsene ab 75 Jahren, unabhängig vom individuellen Vitamin D-Status. Diese Empfehlung basiert auf Daten zu umfangreichen Assoziationen zwischen Vitamin D und häufigen Krankheitsbildern.⁸¹

Neben Zellen der Niere besitzen diverse andere Gewebe das Enzym CYP27B1, das die Hydroxylierung des 25(OH)D zum aktiven 1,25(OH)2D katalysiert.^{72, 78} Ebenso konnte der Vitamin D-Rezeptor (VDR), ein Kernrezeptor aus der Familie der Liganden-gesteuerten Transkriptionsfaktoren, in vielen Geweben isoliert werden.^{72, 78} 1,25(OH)2D bindet an den VDR, welcher mit Zellkern-Rezeptoren aus der Familie der *retinoid-X receptors* (RXR, Rezeptoren für Retinsäure) ein Heterodimer bildet.⁸² Dieser VDR-RXR-Komplex bindet anschließend an sogenannte *Vitamin D-responsive elements* (VDRE), welche vornehmlich in Promotorregionen von Vitamin D-abhängigen Genloci liegen.⁸² Durch Kombination verschiedener Transkriptionsfaktoren und Co-Proteinen wird die Transkription zahlreicher Gene induziert oder supprimiert.^{72, 82} Der VDR konnte in nahezu allen Zellen des Immunsystems isoliert werden, unter anderem in Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen mit konstitutiver Expression und in T-Zellen mit Hochregulation des VDR nach Aktivierung.⁸² *In vitro* zeigt systemisches oder lokal produziertes 1,25(OH)2D Effekte auf die Aktivität von Makrophagen und Monozyten, dendritischen Zellen, B- und T-Lymphozyten und damit sowohl auf das angeborene, unspezifische als auch auf das erworbene bzw. spezifische Immunsystem.⁸² Vitamin D induziert ein anti-entzündliches, toleranzförderndes Zytokinmilieu, indem es auf Effektor-T-Zellen überwiegend hemmend wirkt und die Differenzierung regulatorischer T-Zellen induziert.^{74, 82-84} 1,25(OH)2D inhibiert zusätzlich Th17-Zellen und deren assoziierte Zytokine, die in intestinalen Epithelzellen die Expression von Chemokinen wie CCL20 hervorrufen und als *t-cell-chemoattractant* wiederum proinflammatorische T-Zellen zum Ort der Entzündung weisen.⁸⁴⁻⁸⁶

Bei Zellen des angeborenen, unspezifischen Immunsystems zeigt 1,25(OH)2D inhibitorische wie auch stimulierende Eigenschaften⁸²: Es hemmt die Reifung und Differenzierung von dendritischen Zellen, indem es die Expression von Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse II und CD40, 80 und 86 herunterreguliert, das für die T-Zell-Aktivierung im Rahmen von Entzündungsprozessen erforderlich ist. Im Gegenzug induziert es die Bildung von regulatorischem IL-10 durch dendritische Zellen.⁸⁷ Eine wichtige Rolle spielt Vitamin D auch bei der Bildung von antimikrobiellen Peptiden, es reguliert durch Bindung an VDRE in Promotorregionen die Produktion der AMP in Epithelzellen,

Monozyten bzw. Makrophagen und in neutrophilen Granulozyten.^{82, 83, 88, 89} Zusammenfassend wirkt aktives Vitamin D auf Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems im Wesentlichen antientzündlich und toleranzfördernd. Ein Vitamin D-Mangel ist bei Patienten mit CED weit verbreitet, in vielen Studien konnte ein Zusammenhang von Vitamin D mit der Schwere der Erkrankung und der Lebensqualität festgestellt werden.^{71, 90-92} Die Inzidenz von CED folgt einem Nord-Süd-Gradienten, somit auch einem UV-Licht-Gradienten, der die Bildung von Vitamin D beeinflusst.⁹² Jørgensen *et al.* stellten fest, dass eine medikamentöse Substitution von 1200 *International Units* (IU) Vitamin D₃ über ein Jahr das Risiko einer Rezidiventwicklung bei MC-Patienten signifikant reduziert.⁹³ Yang *et al.* konnten eine Abnahme des Krankheitsaktivitätsindex bei MC-Patienten beobachten, die täglich 5.000 IU Vitamin D₃ über 24 Wochen einnahmen.⁹⁴ Daher wird vermutet, dass die immunregulatorischen Eigenschaften von Vitamin D eine Rolle in der Pathogenese von CED spielen, die meisten Studien legen einen Zusammenhang mit der epithelialen Barriere nahe.⁹⁵ So ließen sich bei VDR-*knockout* Mäusen mit Natrium-Dextransulfat (DSS)-induzierter Colitis im Vergleich zu Mäusen mit VDR-Expression histologisch gravierendere Ulzerationen in der epithelialen Barriere nachweisen.⁹⁶ Zudem stärkte 1,25(OH)₂D die Integrität des einschichtigen Epithels in Caco-2 Zellen durch Hochregulation der TJ-Proteine.⁹⁶ Cantorna *et al.* sahen im Mausmodell eine Verbesserung der CED-Symptomatik nach Gabe von 1,25(OH)₂D.⁹⁷ Zudem konnte nach Behandlung mit 1,25(OH)₂D *in vivo* eine Reduktion der Th17-Immunantwort beobachtet werden mit infolge erhöhter Anfälligkeit für *Citrobacter rodentium*, einer extrazellulären Mikrobe, die akute Kolitiden verursacht.⁹⁸ Diese Beobachtungen weisen auf eine mögliche Rolle von Vitamin D in der Regulation der Immun- und Entzündungsantwort bei CED hin, um die epitheliale Homöostase aufrechtzuerhalten und damit mukosale Schäden zu vermeiden.⁹⁵

1.3 Biomarker

Innerhalb der letzten Jahre stellte sich heraus, dass die Anpassung der CED-Therapie an die gastrointestinale Entzündungssituation das Outcome für Patienten mehr verbessert als die bloße Therapie von Symptomen.^{99, 100} Es ist hinreichend bekannt, dass das Beschwerdebild des Patienten das Vorhandensein oder die Schwere der Entzündung nicht optimal widerspiegelt.¹⁰⁰ Zum einen äußert ein Teil der Patienten die für eine aktive Entzündung sprechende Symptomatik bei gleichzeitig koloskopisch fehlender intestinaler Entzündungssituation.¹⁰¹ Dies führt möglicherweise zu einem Wechsel einer effektiven Therapiestrategie oder zu einer Therapieeskalation. Zum anderen können Patienten trotz aktiver Entzündung von geringen bis gar keinen Symptomen berichten mit der Folge einer fehlenden Therapieanpassung und einem eventuellem Fortschreiten der Entzündung bis hin zum Auftreten von Komplikationen.¹⁰⁰

Derzeit stellen die Ileokoloskopie mit Biopsien und Schnittbildverfahren wie die Computertomographie und Magnetresonanztomographie den Goldstandard im Monitoring der Krankheitsaktivität von Patienten mit CED dar, da sie den Zustand und die Verbreitung der intestinalen, mukosalen Entzündung am besten widerspiegeln.¹⁰⁰ Diese Methoden sind jedoch invasiv, kostenintensiv, zeitaufwändig und unkomfortabel.^{100, 102} Serum-Biomarker, die die gegenwärtige Entzündungssituation mit einer hohen Sensitivität und Spezifität wiedergeben, rücken daher mehr in den Fokus der Forschung. Ein idealer Marker sollte zahlreiche Eigenschaften aufweisen: Seine Messung sollte leicht und schnell durchführbar sein, er sollte in einem kostengünstigen Verfahren analysiert werden können und zwischen Patienten und Laboreinrichtungen reproduzierbar sein.¹⁰⁰ Gleichzeitig sollte er spezifisch für die Erkrankung sein und mit einer gewissen Sensitivität die Krankheitsaktivität und den Erfolg der Therapie messen können.^{100, 103} Unter den nicht-invasiven Biomarkern sind im klinischen Alltag allen voran das C-reaktive Protein (CRP) und das fäkale Calprotectin (FC) etabliert.¹⁰²

1.3.1 C-reaktives Protein (CRP)

Das CRP ist ein nicht-spezifischer Infektionsparameter, das als Akute-Phase-Protein fast ausschließlich von Hepatozyten, stimuliert durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α , gebildet wird.^{100, 103, 104} Das CRP wird nicht nur bei bakteriellen, mykobakteriellen, schweren viralen und Pilz-Infektionen gebildet, sondern auch bei Entzündungen, Stress, Gewebsnekrosen, Traumata und Neoplasien.¹⁰⁴ Mit einer Halbwertszeit von circa 19 Stunden ist es ein guter Indikator für akute Entzündungen.¹⁰² CRP ist ein kostengünstiger, minimal-invasiver und schnell zu bestimmender Biomarker und findet deshalb auch

außerhalb der Gastroenterologie Anwendung.¹⁰² Bei MC-Patienten ist CRP signifikant mit anderen Entzündungsmarkern wie der Blutsenkungsgeschwindigkeit, Thrombozytose, Anämie und Hypoalbuminämie assoziiert.¹⁰⁵ Außerdem konnte gezeigt werden, dass CRP zum Teil signifikant mit der endoskopisch festgestellten Krankheitsaktivität bei CED korrelierte^{102, 105} und im Rahmen von *Follow-ups* in hohem Maße mit dem Risiko eines Rezidivs assoziiert war.^{102, 106} Da auch genetische Faktoren Einfluss auf die Freisetzung von CRP nehmen können, sollte CRP lediglich als zusätzlicher, additiver Marker neben klinischer Symptomatik, Laborparametern, Radiologie und Endoskopie erhoben werden.^{103, 104, 107}

Herly *et al.* konnten bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis eine Assoziation von CRP und Vitamin D feststellen. So ging ein niedriger 1,25(OH)₂D-Spiegel mit höheren CRP-Werten einher.¹⁰⁸ In einer weiteren Veröffentlichung waren höhere 25(OH)D-Spiegel nur bei MC-, nicht aber bei CU-Patienten, mit niedrigeren CRP-Werten assoziiert.¹⁰⁹

1.3.2 Fäkales Calprotectin (FC)

Anders als Blut- bzw. Serumparameter haben Marker im Stuhl eine höhere Spezifität für Entzündungen im Bereich des Darmtrakts.¹⁰⁰ Insbesondere Proteine, die im Rahmen der Degranulation von Leukozyten ausgeschüttet werden, gelten als besonders stabil und sind bei CED-Patienten mit aktiver Krankheitsaktivität signifikant erhöht. Hierzu zählen die *damage-associated molecular pattern* Proteine S100A8/S100A9, die zusammengefasst als Calprotectin bezeichnet werden.¹⁰⁰ Calprotectin, erstmalig im Jahr 1980 beschrieben¹¹⁰, ist ein 36 Kilodalton schweres Protein im Zytosol von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Monozyten und stellt bis zu 60% der zytosolischen Proteine dar.^{102, 103} Calprotectin kann im Rahmen von entzündlichen Prozessen in höheren Konzentrationen nachgewiesen werden. Es zeigt antimikrobielle Effekte und inhibiert das bakterielle Wachstum.¹¹¹ Nachgewiesenes Calprotectin im Stuhl verhält sich direkt proportional zur Migration von neutrophilen Granulozyten in den Gastrointestinaltrakt im Rahmen von entzündlichen Vorgängen.^{102, 103} Mosli *et al.* kamen in einer Metaanalyse zu dem Ergebnis, dass fäkales Calprotectin (FC) mit einer Sensitivität von 88% und einer Spezifität von 73% die intestinale Entzündungsaktivität bei CED-Patienten präziser vorhersagt als CRP.¹¹² Auch zur Differenzierung eines Reizdarmsyndroms von einer CED-Erkrankung kann Calprotectin dienlich sein.¹¹³ Einen möglichen Zusammenhang von FC mit dem Vitamin D-Status konnten Raftery *et al.* bestätigen: Ein niedriger 25(OH)D-Spiegel ging in dieser Studie mit signifikant höheren Calprotectin-Werten im Stuhl einher.¹¹⁴

1.3.3 Serum-Calprotectin (SC)

Im ambulanten Umfeld werden Stuhlproben für die Bestimmung von FC in der Regel von den Patienten zuhause asserviert und per Post an die behandelnde Klinik oder das jeweilige Labor geschickt.¹¹⁵ Dieser Prozess kann die Messwerte verändern, da unter anderem eine signifikante tägliche Schwankungsbreite sowie ein Einfluss der Stuhlkonsistenz beschrieben wurde.^{116, 117} Zusätzlich ist FC lediglich 3 Tage bei Raumtemperatur stabil, eine Konzentrationsabnahme konnte nach 7 Tagen beschrieben werden.¹¹⁶ Daher können Verspätungen im Rahmen der Einsendung, extreme Temperaturspitzen während des Transports oder eine wässrige Diarrhö bei Probennahme die Messergebnisse beeinflussen.¹¹⁵ Vielen Patienten erscheint die Einsendung von Stuhlproben unangenehm, wodurch die Compliance leiden kann.¹¹⁵ Aus diesem Grund wurde bereits in mehreren Studien die Verwendung von Calprotectin als Serum-Krankheitsaktivitätsmarker (Serum-Calprotectin, SC) analysiert. Meuwis *et al.* konnten signifikant höhere SC-Spiegel bei MC-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachweisen, zudem waren die SC-Werte bei aktivem Krankheitsaktivitätsindex, d.h. einem *Crohn's disease activity index* (CDAI) >150, signifikant höher als bei Patienten in Remission (CDAI <150). Die Serumwerte korrelierten schwach signifikant mit den Werten im Stuhl, sowie hoch signifikant mit den Serum-CRP-Spiegeln und dem CDAI.¹¹⁸ Im Gegensatz zu FC war SC in dieser Studie nicht mit der endoskopischen Aktivität (CDEIS) assoziiert und konnte somit genauso wenig wie CRP den Status der epithelialen Entzündung widerspiegeln. Nach Meuwis *et al.* kann SC anders als FC somit lediglich als Krankheitsaktivitätsmarker, nicht aber als Marker für die Zustand des Epithels verwendet werden.¹¹⁸ Auch in weiteren Arbeiten konnten positive Korrelationen zu CRP, zur Krankheitsaktivität und signifikante Unterschiede zwischen CED-Patienten und gesunden Kontrollen festgestellt werden.¹¹⁹⁻¹²¹ Zusätzlich kann SC bei CED-Patienten zusammen mit FC und CRP als prognostischer Marker für die Entwicklung eines Rezidivs nach Therapie mit Infliximab verwendet werden.¹¹⁸ SC ist auch im Rahmen anderer Krankheitsbilder, wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis oder der zystischen Fibrose, in höheren Konzentrationen nachweisbar.^{122, 123} Eine Assoziation zu Vitamin D, wie es bereits für FC gezeigt werden konnte¹¹⁴, wurde für SC bisher nicht beschrieben.

1.3.4 CCL20

CCL20 (englisch *C-C motif chemokine ligand 20*, Synonym *macrophage inflammatory protein*, MIP-3 α oder *liver and activation-regulated chemokine*, LARC) aus der Familie der CC-Chemokine ist an Entzündungsprozessen beteiligt.^{124, 125} Chemokine bewirken durch hohe Spiegel von chemotaktischen

Zytokinen eine Einwanderung von immunkompetenten Zellen, wie beispielsweise aktivierten Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen zum Ort der Entzündung oder Verletzung.¹²⁶ Die Bildung von CCL20 wird durch verschiedene *toll-like*-Rezeptorliganden sowie Th17-Zytokine um das bis zu 200-fache induziert.^{85, 127} CCL20 interagiert als Ligand mit dem *CC chemokine receptor 6* (CCR6) und rekrutiert dadurch wiederum IL-17A-produzierende Zellen, wie Th17-, B- und unreife dendritische Zellen^{125, 128-130} Diese sog. CCL20-CCR6-Achse ist im Rahmen zahlreicher chronischer Entzündungsvorgängen, wie beispielsweise bei der Psoriasis, bei Arthritiden und bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen aktiviert.^{128, 130, 131} CCL20 wird von zahlreichen Zellen, unter anderem neutrophilen Granulozyten, Enterozyten, B- und dendritischen Zellen produziert, der CCR6-Rezeptor wird nur von regulatorischen T-Zellen, Th17-, B- und unreifen dendritischen Zellen exprimiert.^{127, 132} Die CCL20-Expression erfolgt dauerhaft im intestinalen, Follikel-assoziierten Epithel und wird bei entzündlichen Vorgängen, verstärkt durch *toll-like* Rezeptoren, induziert.^{127, 129} Dadurch kann das Epithel eine lokale Immunantwort bei Invasion von Bakterien oder Pathogenen sowie bei Verletzungen der Mukosa generieren.¹²⁹ CCL20 spielt eine Rolle in der Pathogenese von CED: Bei MC- und CU-Patienten konnte eine höhere *messenger ribonucleic acid* (mRNA)-Expression von CCL20 in Kolonbiopsien nachgewiesen werden.¹³¹ Serologisch sind bisher nur bei aktiver MC-Erkrankung hochregulierte CCL20-Spiegel beschrieben.¹³³ In Mausmodellen zeigten Esplugues *et al.*, dass Th17-Zellen durch CCL20 direkt aus dem Blut in den Dünndarm rekrutiert werden können.¹³⁴ Die infolgedessen vermehrte Produktion von IL-17A führt, wie oben beschrieben, zu einem positiven Feedback-Mechanismus, der die Entzündung aufrechterhält.¹³⁴ Ein Neutralisieren von CCL20 mittels monoklonaler Antikörper suppressierte die Rekrutierung von T-Zellen und schwächte dadurch die experimentell induzierte, murine Colitis ab.¹³⁵

CCL20 weist neben seiner entzündungsfördernden auch eine homöostatische Funktion auf: In der Leber, in der Haut und im lymphatischen System wird das Chemokin vorwiegend zu regulatorischen Zwecken sezerniert.¹²⁵

Karkeni *et al.* konnten *in vitro* zeigen, dass eine Inkubation mit 1,25(OH)₂D die durch TNF- α induzierte Bildung von CCL20 in humanen Adipozyten herunterreguliert.¹³⁶ Auch an Mausmodellen und Epithelzellen der menschlichen Kornea konnten Zusammenhänge zu Vitamin D-Metaboliten hergestellt werden.^{137,}

1.3.5 Antimikrobielle Peptide

Das Darmepithel ist zahlreichen Mikroorganismen, wie Bakterien, Pilzen, Viren und Parasiten ausgesetzt und muss diese möglichen Krankheitserreger über große Oberflächen hinweg vom körpereigenen Immunsystem trennen.^{139, 140} Intestinale Epithelzellen produzieren AMP, um Pathogene am Eindringen in den Körper zu hindern und eine Barriere zur Umwelt zu schaffen.¹³⁹ AMP sind Teil der angeborenen Immunabwehr und besitzen als Effektormoleküle eine breite Wirkung gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien, sowie gegen Pilze, Protozoen und manche Viren.^{141, 142} AMP können in drei Gruppen eingeteilt werden. Gruppe 1 stellen die linearen, alpha-helikalen Peptide ohne die Aminosäure Cystein dar. Hierzu gehört LL-37 als einziger menschlicher Vertreter der Familie der Cathelicidine.¹⁴¹ Gruppe 2 bilden die Defensine (α - und β -Defensine), die mittels Disulfidbrücken verbundene Cysteine enthalten und die zusammen mit LL-37 wegen ihrer breiten Funktionsweise in den letzten Jahren mehr in den Fokus der Forschung rückten.^{140, 141} Gruppe 3 stellen die Histatine und das PR-39 dar.¹⁴¹

TLR binden bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) und induzieren die Bildung von AMP.^{142, 143} Ihre Wirkungsweise lässt sich durch ihre kationische, polare Struktur erklären. Die negativ geladenen Phospholipidgruppen in der Membran von Mikroorganismen ziehen die einzelnen AMP-Moleküle an, wodurch diese mit der schützenden Lipiddoppelschicht agieren und die Lipide aus der Membran auslösen. Dies führt zu Porenbildung mit Austritt von Zellkomponenten und Auslösen eines Zelltods.^{141, 142, 144} Zudem induzieren AMP die Ausschüttung von Zytokinen, wirken chemotaktisch, antigenpräsentierend, angiogenetisch und tragen zur Wundheilung bei.¹⁴²

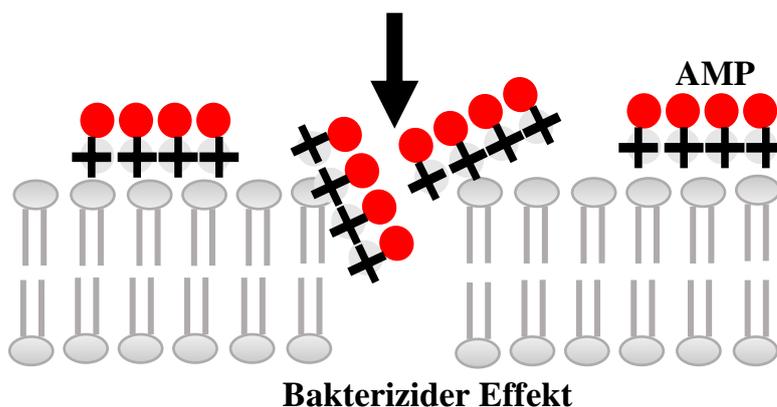


Abbildung 6: Bakterizide Wirkungsweise der antimikrobiellen Peptide am Beispiel von Cathelicidin

Quelle: Schema modifiziert nach Chromek¹⁴⁵; AMP: antimikrobielle Peptide

1.3.5.1 Cathelicidin LL-37

Alle Cathelicidine werden als Präproproteine mit einem antimikrobiell wirksamen C-Terminus und einem hoch konservierten N-Terminus synthetisiert. LL-37 ist das einzige menschliche Cathelicidin und stellt den C-Terminus des größeren Proteins hCAP18 dar, das nach Prozessierung durch spezifische Proteasen von hCAP18 abgespalten wird.^{140, 142} LL-37 besteht aus 37 Aminosäuren, beginnend mit zwei Aminosäuren Leucin, und wird daher auch mit LL-37 abgekürzt.¹⁴²

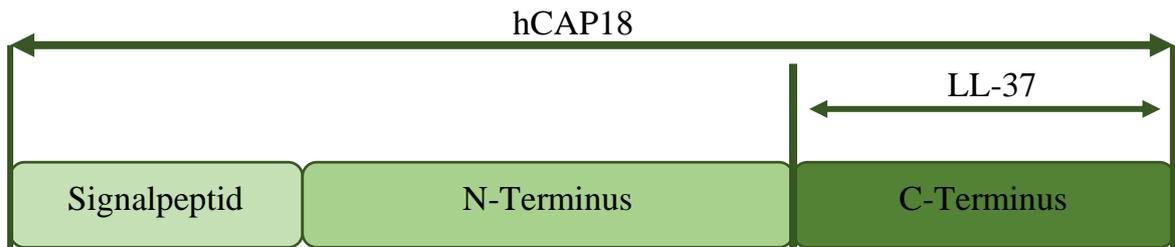


Abbildung 7: Human cationic antibacterial protein of 18 Kilodalton (hCAP18-Protein)

Quelle: Schema modifiziert nach Kuroda et al.¹⁴⁶

Der Promotor des hCAP18-Gens enthält mehrere Vitamin D-Rezeptoren (VDR), die eine Bindestelle für das hormonell aktive 1,25(OH)₂D darstellen.^{88, 147} Der VDR ist ein Liganden-stimulierter Transkriptionsfaktor, der spezifische DNA-Sequenzen, sog. *Vitamin D responsive elements* (VDRE), erkennt.⁸⁸ Demnach wird angenommen, dass Vitamin D durch eine Induktion der AMP-Bildung eine Rolle innerhalb des angeborenen Immunsystems spielen könnte.¹⁴⁸ Wang et al. konnten beweisen, dass die Expression von hCAP18 in Keratinozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten *ex vivo* durch 1,25(OH)₂D verstärkt wird.⁸⁸ Zudem produzierten Monozyten, die durch das *Mycobacterium tuberculosis* stimuliert wurden, *in vitro* bei 25(OH)D-Defizienz weniger Cathelicidin-mRNA. Die Behandlung mit 25(OH)D steigerte die Ausschüttung des AMP und führte somit zu einer besseren Abwehr vor Mikroorganismen.¹⁴⁹ Leaf et al. konnten zeigen, dass niedrige 25(OH)D-Werte bei intensivstationär behandelten Patienten mit niedrigen hCAP18-Plasmalevel korrelierten und mit einer höheren 90-Tage-Mortalität verbunden waren.¹⁴⁸ In randomisierten, doppelblinden Studien konnten für MC- und CU-Patienten signifikant höhere LL-37-Konzentrationen nach mehrwöchiger Vitamin D-Supplementation gezeigt werden.^{150, 151} Diese sog. Vitamin D-Cathelicidin-Achse konnte mit vielen Entzündungsvorgängen in Zusammenhang gebracht werden.¹⁵²

LL-37 kommt in unterschiedlichen Konzentration in zahlreichen Zellen, Geweben, Drüsen und Körperflüssigkeiten vor, unter anderem im Kolonepithel¹⁵³, in der Muttermilch¹⁵⁴, in Speicheldrüsen¹⁵⁵ und in verschiedenen Immunzellen.¹⁵⁶ Das Cathelicidin besitzt antibakterielle, antivirale, antiendotoxische, chemotaktische

und karzinogenetische Funktionen, in seiner antibakteriellen Wirkung zeigt LL-37 in alpha-helikaler Struktur eine stärkere Wirkung gegen Gram-negative als gegen Gram-positive Bakterien.¹⁵⁶ Hier kommt es gemäß oben beschriebener Wirkungsweise zu einem Zelltod infolge einer Lyse des Bakteriums durch eine Einlagerung von LL-37 in die negativ geladene bakterielle Membran.^{141, 152} LL-37 trägt zur Wundheilung und Angiogenese bei und fördert Apoptosevorgänge in Epithelzellen.^{146, 147} LPS bzw. Endotoxine aus bakteriellen Zellwänden können bei systemischen Zerfall eine Sepsis oder einen septischen Schock auslösen.¹⁵⁷ LL-37 neutralisierte als einziges AMP *in vivo* das freigesetzte LPS.¹⁵⁶ Gleichzeitig inhibiert es auch die Produktion von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen, die als Antwort auf LPS von Monozyten oder Makrophagen gebildet werden.¹⁵⁶ Während niedrige LL-37-Werte mit einer höheren Inzidenz septischer Verläufe auf Intensivstationen assoziiert waren, wurden hohe Level bei Autoimmunerkrankungen wie der Psoriasis oder bei Vaskulitiden beschrieben.^{148, 158, 159} Zusammenfassend demonstriert diese Evidenz, dass Cathelicidin eine breite Korrelation mit Infektionen, entzündlichen Prozessen wie CED und Autoimmunerkrankungen aufweist.¹⁶⁰ Schauber *et al.* zeigten eine vermehrte mRNA-Expression von Cathelicidin in der Kolon-Mukosa von CU-Patienten.¹⁶¹ Gleichzeitig waren aber Mäuse mit Cathelicidin-Defizienz suszeptibler gegenüber schweren Verläufen von DSS-induzierter Colitis und litten häufiger als Wildtyp-Mäuse an Gewichtsverlust, Diarrhö und Blutungen.^{162, 163} Tran *et al.* beschrieben eine inverse Korrelation von Cathelicidin mit der Krankheitsaktivität bei CED-Patienten und einer signifikanten negativen Assoziation von Cathelicidin mit dem Risiko einer intestinalen Strikturen bei MC-Patienten.¹⁶⁰ Die Autoren propagierten LL-37 daher als schnellen und günstigen Biomarker, der zusammen mit CRP die Krankheitsaktivität ausreichend darstellen und als Indikator für Strikturen und den weiteren klinischen Verlauf dienen könne.¹⁶⁰ Eine weitere Veröffentlichung zeigte, dass LL-37 als *serum panel* zusammen mit Neutrophile Gelatinase B-assoziiertem Lipocalin und Matrix-Metalloproteinase-9 (NGAL-MMP-9) sowie chitinase 3-like 1 (CHI3L1) als Parameter für die Remissionsinduktion unter Infliximab verwendet werden könnte, da sich die LL-37-Konzentrationen bei CU-Patienten mit Therapieansprechen als signifikant niedriger erwiesen.¹⁶⁴

1.3.5.2 Humanes beta-Defensin 2

Defensine sind in ihrer Funktion als endogene Antibiotika Teil des unspezifischen Immunsystems und werden neben Immunzellen wie neutrophilen Granulozyten auch in der Haut oder in intestinalen Epithelzellen exprimiert.^{165, 166} Bisher sind zehn unterschiedliche Defensine beschrieben, welche als alpha- und beta-Defensine nach der Position ihrer stabilisierenden Disulfidbrücken unterteilt werden.^{167, 168} Zu den α -Defensinen zählen die *human neutrophil peptides* (HNP-) 1 bis 4, die bei einer

Entzündung von neutrophilen Granulozyten ausgeschüttet werden, und das intestinale *human defensin 5* (HD-5) und 6 (HD-6), welche konstitutiv in Paneth-Zellen und in villösen Epithelzellen im Duodenum, Jejunum und Ileum exprimiert werden.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ Die *human beta defensine 1-4* (HBD-1 bis HBD-4) gehören zu den β -Defensinen und werden von zahlreichen Epithelzellen, unter anderem von Keratinozyten, von Enterozyten des Kolons und von Epithelzellen des Epididymis, der Kornea und der Konjunktiva, gebildet.¹⁶⁶

Tabelle 1: Unterteilung der Defensine

AMP	Unterteilung	Vorkommen	Stimuli
Alpha-Defensine	HNP-1-4	Neutrophile Granulozyten	Entzündung
	HD-5-6	Überwiegend in Paneth-Zellen	konstitutive Expression
Beta-Defensine	HBD-1	Zahlreiche Epithelzellen	konstitutive Expression
	HBD-2-4	Zahlreiche Epithelzellen, Plasmazellen im Kolon	Entzündung

Quelle: nach Ramasundara et al.¹⁶⁸; Abkürzungen: AMP: antimikrobielle Peptide, HNP: human neutrophil peptides, HD: human defensin, HBD: human beta defensin

Die Funktion von Defensinen ist ähnlich zu LL-37: Sie wirken bakterizid, indem sie durch Bildung von Mikroporen in der bakteriellen Phospholipiddoppelschicht die strukturelle Integrität des Bakteriums zerstören.^{166, 170} So besteht für Epithelien ein gewisser Schutz vor Pathogenen mit der Möglichkeit der Regulation der vorhandenen symbiotischen Mikrobiota.¹⁶⁶ Durch das Vorkommen in zahlreichen Epithelzellen besteht hohe Evidenz für einen Zusammenhang von Defensinen unter anderem mit Erkrankungen der Haut (z. B. atopische Dermatitis, Psoriasis, Akne vulgaris), der Atemwege (z. B. Zystische Fibrose, Otitis media) und des Gastrointestinaltrakts, hier v. a. bei infektiösen Diarrhöen, Gastritiden und MC.¹⁶⁶ So sind genetische Polymorphismen in der Promotor-Region des *Transcription factor 4*, der die Bildung der α -Defensine HD-5 und HD-6 in Paneth-Zellen reguliert, mit einer MC-Manifestation im Ileum assoziiert.¹⁷¹

Im Kolonepithel wird das Defensin HBD-1 konstitutiv exprimiert, während HBD-2, 3 und 4 im Epithel und in Plasmazellen der Lamina propria des Kolons erst durch proinflammatorische Zytokine oder Kontakt zu enteroinvasiven Bakterien produziert werden.^{167, 168} Wehkamp et al. konnten bei CED-Patienten an intestinalen Biopsien von makroskopisch nicht befallenen Arealen eine niedrigere HBD-2-Konzentration im Vergleich zu entzündeten Bereichen feststellen.¹⁶⁷ Auch in Mausmodellen mit DSS-induzierter Kolitis konnten höhere Konzentrationen an β -

defensin-3, dem murinen Ortholog zum HBD-2, ermittelt werden.¹⁷² Wehkamp *et al.* zeigten in einer weiteren Arbeit, dass die Level an HBD-2-mRNA in CU-Biopsien sowohl in entzündeten als auch in nicht entzündeten Bereichen signifikant höher waren als bei gesunden Probanden.¹⁷³ Bei MC-Patienten konnten die Autoren keinen signifikanten Unterschied zwischen entzündeten und nicht-entzündeten Arealen feststellen.¹⁷³ Auf systemischer Ebene konnten Yamaguchi *et al.* bezüglich HBD-2 keine signifikanten Konzentrationsunterschiede im Plasma von CED-Patienten und gesunden Kontrollen ermitteln.¹⁷⁴

An Zellkulturen zeigte sich eine NOD2-abhängige Expression von HBD-2: Nach Erkennung von bakteriellen Peptidoglykanen aktiviert das zytosolische Protein NOD2 den HBD-2-Promotor und induziert NF- κ B-abhängig die Bildung des Defensins.^{175, 176} Zudem induziert 1,25(OH)₂D das NOD2-Gen in Monozyten und Epithelzellen durch distale *Enhancer* und führt synergistisch mit bakteriellen Abbauprodukten (MDP) zu einem erhöhten Nachweis von HBD-2-mRNA.⁸⁹ Wang *et al.* stellten fest, dass genau dieser synergistische Mechanismus in Makrophagen mit einer homozygoten R702w-NOD2-Mutation, wie sie sehr häufig bei MC-Patienten vorkommt, nicht vorhanden ist.⁸⁹ Diese Daten legen einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Vitamin D-Haushalt, genetischer Prädisposition und den zum angeborenen Immunsystem zuzuordnenden antimikrobiellen Peptiden bei Patienten mit MC nahe.⁸⁹

2 Zielsetzung

Serologische Erkrankungs- und Aktivitätsmarker für CED sind in ihrer Verwendung im klinischen Alltag noch immer mit Limitationen verbunden und nicht breit verfügbar. Ziel der Arbeit war es daher, mögliche Marker im Serum von den in der Studie eingeschlossenen CED-Patienten als Erkrankungs- oder Krankheitsaktivitätsmarker zu untersuchen. Da auch ein Vitamin D-Mangel bei CED-Patienten weit verbreitet ist und in vielen Studien Zusammenhänge zwischen Vitamin D und der Schwere der Erkrankung sowie der Lebensqualität festgestellt wurden, sollte gleichzeitig überprüft werden, ob eine Assoziation zu den Vitamin D-Metaboliten besteht. Im Einzelnen wurden folgende Hypothesen untersucht:

- Besteht in unserem Patientenkollektiv ein **Vitamin D-Mangel**? Wie fallen die Spiegel an hormonell aktivem **1,25-(OH)₂-Vitamin D** im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe aus?
- Liegt **CCL20 als proinflammatorisches Th17-Chemokin** bei CED-Patienten in höheren Serumkonzentrationen vor als bei gesunden Kontrollen und besteht ein Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität und zu Vitamin D, wie es in Adipozyten, Korneazellen und im Mausmodell bereits nachgewiesen wurde?¹³⁶⁻¹³⁸ Zudem untersuchten wir mögliche Korrelationen der CCL20-Werte mit fäkalem Calprotectin und anderen klinischen Entzündungsindikatoren wie CRP, Leukozyten und Thrombozyten.
- Können bei CED-Patienten auch im **Serum** erhöhte **Calprotectin**-Werte detektiert werden und besteht eine Assoziation zur Krankheitsaktivität? Korrelieren die Spiegel mit fäkalem Calprotectin, CRP, Leukozyten und Thrombozyten? Bestehen wie vorbeschrieben Unterschiede bei Infliximab-Einnahme¹¹⁸ und ist ein Zusammenhang mit Vitamin D – wie auch bereits für fäkales Calprotectin beschrieben¹¹⁴ – vorhanden?
- Unterscheiden sich bei Patienten mit CED die Serumspiegel der **antimikrobiellen Peptide Cathelicidin/LL-37** und **Humanes β -Defensin 2** von der gesunden Kontrollgruppe und ist eine Assoziation mit der Krankheitsaktivität vorhanden? Besteht eine Korrelation zu fäkalem Calprotectin, CRP, Leukozyten und Thrombozyten? Kann die *in vitro* nachgewiesene Induktion der Bildung von LL-37 und HBD-2 durch Vitamin D auch systemisch im Serum nachgewiesen werden^{88, 89, 149} und bestehen aufgrund vorbeschriebener angiogenetischer Eigenschaften von LL-37 ein Zusammenhang zu Stenosen?¹⁴⁷ Gibt es Unterschiede in den LL-37-Konzentrationen bei Einnahme von Infliximab¹⁶⁴ und ergeben sich Unterschiede in den HBD-2-Spiegeln in Abhängigkeit vom NOD2-R702w-Genotyp?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial für ELISA-Messungen

Reaktionsgefäße	Eppendorf Safe-Lock Tubes, 2,0 mL, Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Blutentnahmeröhrchen	S-Monovette®, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht - K3 EDTA - Serum mit Gerinnungsaktivator - Citrat 3,2%
Reinstwasser	
Enzymgekoppelte Immunabsorptionsassays (ELISA-Kits)	
CCL20	Human MIP-3 alpha/CCL20 Human ELISA Kits der Firma Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Katalognummer EHCCL20, Chargennummer 165060619; Messbereich: 0,8-600 pg/mL; Sensitivität: 1,5 pg/mL ¹⁷⁷
SC	IDK® Calprotectin ELISA der Firma Immundiagnostik AG, Katalognummer K6935, Chargennummer 190703; Messbereich: 3,9-250 ng/mL ¹⁷⁸ ; Sensitivität: 0,789 ng/mL ¹⁷⁹
LL-37	LL-37 Human ELISA Kits der Firma Hycult Biotech, Katalognummern HK321-01 und HK321-02, Chargennummern 25649K0219-C und 25650K0219-F; Messbereich: 0,14-100 ng/mL; Sensitivität: 0,14 ng/mL ¹⁸⁰
HBD-2	Defensin 2, beta (Human) - ELISA Kits der Firma Phoenix Pharmaceuticals, Katalognummer EK-072-37, Chargennummer 608847; Messbereich: 15,6-1000 pg/mL; Sensitivität: 15,6 pg/mL ¹⁸¹

3.1.2 Geräte

In Tabelle 3 können die für die ELISA-Messungen verwendeten Geräte eingesehen werden.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller und Geräteinformationen
Tiefkühlschrank (-80 °C)	Thermo Scientific Heraeus Tiefkühlschrank HFU 586 Basic, 793 l, 230V, Arbeitstemperatur: -50 bis -86 °C
Zentrifuge	Rotofix 32 A, Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
ELISA-Reader	Tecan Austria GmbH, Grödig/ Salzburg, Österreich

3.2 Methoden

3.2.1 Rekrutierung des Patienten- und Kontrollkollektivs

Die in dieser Arbeit einbezogenen Probanden waren Teil einer größeren Querschnittstudie zu Serum-Biomarkern bei CED-Patienten. 254 erwachsene CED-Patienten, die sich zwischen März 2015 und Juli 2016 in der CED-Ambulanz der Medizinischen Klinik II am Universitätsklinikum der LMU München vorstellten, wurden gezielt für diese Biomarker-Studie rekrutiert. Einschlusskriterien waren ein Alter von 18 Jahren oder älter und eine nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten gesicherten Diagnose eines MC oder CU, basierend auf etablierten endoskopischen, histologischen und klinischen Kriterien. Zu den Ausschlusskriterien gehörten neben einer chronischen Nierenfunktionseinschränkung eine Leberzirrhose, eine bestehende Schwangerschaft sowie klinische Anzeichen einer anderen aktiven Infektionskrankheit. Weiteres Ausschlusskriterium war eine Vitamin D-Supplementierung in unbekannter Dosierung. Diesem Auswahlverfahren zufolge konnten 250 Probanden in die Studie eingeschlossen werden. Nach ausführlicher Aufklärung über Ablauf, Ziel und Bedeutung der Studienteilnahme wurde ein schriftliches Einverständnis eingeholt. Anschließend erfolgte die Blutentnahme. Es wurden anamnestisch Daten wie Alter, Geschlecht, *body mass index* (BMI), bisherige Erkrankungsdauer, Raucherstatus, derzeitige Medikation sowie die Einnahme von Vitamin D-Präparaten erfragt und in Form in einer Microsoft® Excel-Datenbank zusammengetragen. Aus den Akten und dem Klinikinformationssystem wurden bei Verfügbarkeit Informationen zu extraintestinalen Manifestationen, Fisteln, Stenosen, Abszessen, einer Voroperation, zum NOD2-Mutationsstatus sowie den fäkalen Calprotectin-Konzentrationen erfasst. Die Ausdehnung der CU-Erkrankung wurde gemäß Montreal-Klassifikation anhand der letzten Ileokoloskopie nach den Stadien E1 für Proktitis, E2 für Linksseitencolitis und E3 für eine ausgedehnte Colitis aufgenommen. Bei MC-Patienten erfolgte die Lokalisationseinteilung in die Kategorien „Ileum isoliert“, „Kolon isoliert“, „Ileokolon“, „Ileokolon“ und „Jejunum“ sowie „Ileokolon und oberer GIT“ (Gastrointestinaltrakt).

Das Kontrollkollektiv wurde im Zeitraum von August bis November 2016 aus zufällig ausgewählten Klinikmitarbeitern, Krankenhausbesuchern und aus dem Bekanntenkreis gebildet. Hierbei wurden ausschließlich anamnestisch gesunde Personen nach Ausschluss einer CED oder anderer chronisch-entzündlicher Erkrankungen, einer chronischen Nierenfunktionseinschränkung oder einer regelmäßigen Einnahme von entzündungshemmenden Medikamenten

eingeschlossen. Insgesamt konnten 60 gesunde Probanden ermittelt werden, die den Studienbedingungen zustimmten.

Die Ethikkommission der Universität München sicherte die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit gemäß den Standards der Deklaration von Helsinki unter der Projektnummer 343-09 zu. In einer anderen Publikation wurden bereits Analysen zu anderen Fragestellungen in einzelnen Kohorten dieser Population veröffentlicht.¹⁸² Zudem erfolgte vorab die Präsentation einzelner Analysen im Rahmen eines Kongressbeitrags, ein weiteres Manuskript befindet sich im *peer-review*-Verfahren (siehe Kapitel 13).

3.2.2 Gewinnung des Untersuchungsmaterials und Klinische Chemie

Am Tag des Ambulanzbesuchs wurde allen Probanden peripher venöses Blut entnommen und innerhalb von 15 Minuten zentrifugiert, abpipettiert und in einen Kühlschrank mit -80° Celsius eingelagert (verwendete Geräte und Verbrauchsmaterial siehe Tabelle 2 und Tabelle 3). So konnte sichergestellt werden, dass der Verlust empfindlicher Bestandteile weitestgehend minimiert wurde. Ein anderer Teil der gewonnenen Proben wurde im Zentrallabor des Universitätsklinikums München, Campus Großhadern, für die routinemäßige Bestimmung der Parameter für Blutbild und klinische Chemie verwendet. In Tabelle 4 sind die einzelnen Laborparameter, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, mit ihren jeweiligen Einheiten, Messmethoden und Gerätebezeichnungen aufgeführt.

Tabelle 4: Übersicht der Laborparameter mit zugehörigen Messmethoden

Parameter	Einheit	Messmethode/ Assay	Messgerät (Hersteller)
Leukozyten	Giga/L	Durchflusszytometrie	XN 9000 (Sysmex)
Thrombozyten	Giga/L	Impedanzmessung mit hydrodynamischer Fokussierung, Fluoreszenz-Durchflusszytometrie	XN 9000 (Sysmex)
Kreatinin (Jaffé)	mg/dL	Kinetischer Farbttest, basierend auf der Jaffé-Methode	AU 5800/ AU680 Beckman-Coulter
C-reaktives Protein	mg/dL	Partikelverstärkter immunologischer Trübungstest (Hoffmann-La Roche AG Basel, Schweiz)	AU 5800/ AU680 Beckman-Coulter

Calprotectin im Stuhl	mg/L	Partikelverstärkter turbimetrischer Immuntest (PETIA) der Firma BÜHLMANN (fCAL [®] turbo)	C502-Modul auf einem Cobas [®] 8000 (Hoffmann-La Roche AG Basel, Schweiz)
------------------------------	------	--	--

Die Messverfahren des Zentrallabors unterliegen täglichen internen, sowie vierteljährlichen externen Qualitätskontrollen.

Die Bestimmung des NOD2-Genotyps war vorab bei einzelnen Studienteilnehmern im Rahmen vorangegangener Studien erfolgt.¹⁸³ Nach Standardverfahren wurde aus venösem EDTA-Blut eine Amplifikation des NOD2-Exons 4 durchgeführt. Mittels Agarosegel-Elektrophorese wurde anschließend die Größe und Menge des PCR-Produkts analysiert. Die Fragmente wurden mit dem QIAquick[®] PCR-Reinigungskit (QIAGEN[®], Hilden, Deutschland) gereinigt und mit dem ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems[™], Foster City, CA, USA) sequenziert. Die Sequenzen wurden auf einem ABI PRISM[®] 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems[™]) mit dem Sequenzanalyseprogramm Version 3.4.5 (Applied Biosystems[™]) analysiert.

3.2.3 Bestimmung der Vitamin D-Spiegel

Der Gesamtgehalt an 25(OH)D (25-Hydroxyvitamin D3 und D2) im Serum wurde mit dencob Elecsys[®] Vitamin D total II Tests für das cobas 8000 e 801 System der Firma Roche an der Zentralen Einrichtung für Klinische Chemie der Universität Ulm durchgeführt. Die Bestimmung beruht auf dem Kompetitionsprinzip und verwendet ein Vitamin D-Bindeprotein als Fängerkomponente. Anschließend wird durch Anlage einer Spannung die Lumineszenzreaktion gestartet und mittels Photomultiplier gemessen. Eine Kreuzreaktivität mit 24,25(OH)₂-Vitamin D wird durch einen spezifischen monoklonalen Antikörper nahezu ausgeschlossen. Der Messbereich wird zwischen 3 und 100 ng/mL angegeben, Proben mit Werten oberhalb des Messbereichs wurden entsprechend mit Universalpuffer verdünnt.¹⁸⁴ Zur Auswertung des Vitamin D-Status wurden die Patienten und Kontrollen gemäß dem *Institute of Medicine* (IOM)¹⁸⁵ in Vitamin D-defiziente mit einem 25(OH)D-Spiegel < 20 ng/mL und in Vitamin D-suffiziente eingeteilt (25(OH)D-Spiegel ≥ 20 ng/mL).

Die quantitative Bestimmung von 1,25(OH)₂-Vitamin D (1,25(OH)₂D3 und 1,25(OH)₂D2) in unseren Serumproben erfolgte mittels IDS-iSYS 1,25 VitD^{xp}-Assay auf dem IDS-iSYS *Multi-Discipline Automated System* der Firma IDS[®] in der Zentralen Einrichtung für Klinische Chemie der Universität Ulm. Der Messbereich liegt laut Herstellerangaben zwischen 7,5 und 210 pg/mL.¹⁸⁶

3.2.4 Beurteilung der Krankheitsaktivität

In dieser Arbeit bestimmten wir die Krankheitsaktivität bei MC anhand des *Crohn's disease activity index* (CDAI) nach Best¹⁸ (Anhang 1). Bei CU-Patienten erfolgte die Klassifizierung anhand des klinischen Teils des *Colitis activity Index* (CAI) nach Rachmilewitz¹⁹ (Anhang 2). Der Krankheitsaktivitätsindex wurde am Tag der Blutentnahme im Rahmen des Ambulanzbesuches erhoben. Zur Berechnung des CDAI konnten durch Summieren von acht faktorisierten Bewertungsvariablen Werte zwischen 0 und 600 Punkten errechnet werden. Bei einem CDAI-Score von ≤ 150 Punkten lag ein geringer Aktivitätsindex („Remission“) vor, Werte > 150 sprachen für einen aktiven Krankheitsaktivitätsindex („aktive Erkrankung“).¹⁸⁷ Bei Patienten mit CU wurde die Krankheitsaktivität anhand des klinischen CAI nach Rachmilewitz quantifiziert. Aus sieben Variablen ließen sich maximal 29 Punkte errechnen. Ein CAI ≤ 3 wurde in dieser Arbeit als geringer Aktivitätsindex („in Remission“), ein CAI > 3 als aktive Erkrankung definiert.

3.2.5 ELISA-Messungen

Zur Bestimmung der Serumspiegel von CCL20, Calprotectin, LL-37 und HBD-2 wurden *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)-Kits verschiedener Hersteller (siehe Tabelle 2) verwendet und zusammen mit dem Labor für Gastroenterologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik 2 des Klinikums der Universität München (Campus Innenstadt) gemessen. Die Messungen erfolgten protokollkonform nach Herstellerangaben mit nicht aufgetauten Serumproben, lediglich die Bestimmung von Calprotectin erfolgte mit bereits aufgetauten Proben. Hier waren laut Protokollangaben bis zu drei Auftauzyklen tolerabel.¹⁷⁹ Die Protokollschemaschemata der jeweiligen Hersteller können auf den Webseiten der Hersteller eingesehen werden.¹⁷⁷⁻¹⁸¹ Bei Werten außerhalb der Standardkurve wurde erneut in verdünnter oder erhöhter Konzentration nachgemessen.

3.2.6 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen und graphischen Darstellungen wurden mit Hilfe der XLSTAT Statistikanalyse-Software (Version 2022.2.1, Addinsoft, Paris, Frankreich) erstellt. Die uni- und multivariaten Analysen sowie die Erstellung der *receiver operating characteristic* (ROC)-Graphen erfolgten mithilfe der Softwareplattform SPSS® (Version 29.0.0.0, IBM®, Armonk, New York, Vereinigte Staaten von Amerika). Allen Analysen wurde das Signifikanzniveau $p < 0,05$ zugrunde gelegt. Die p-Werte sind mit Ausnahme der asymptotischen p-Werte bei uni- und multivariaten Analysen als exakte p-Wert-Berechnungen angegeben. Zur Datensortierung wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Excel der Firma

Microsoft® Corporation (Version 16.69, Redmond, Washington, Vereinigte Staaten von Amerika) verwendet.

Beim Vergleich zweier unabhängiger Stichproben wurde für quantitative Variablen der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Bei kategorialen Variablen erfolgte der Vergleich mittels exaktem Fisher-Test. Die Ergebnisse wurden graphisch als Boxplots mit Median und Interquartilbereich dargestellt. Die Tests auf Normalverteilung wurden anhand des Shapiro-Wilk-, Anderson-Darlin- und Lilliefors-Test ermittelt. In allen Kollektiven zeigten sich ausschließlich nicht normalverteilte Parameter. Korrelationsanalysen wurden anhand der Spearman-Korrelation durchgeführt. Zur Auswertung der Assoziation der einzelnen Serumparameter zu verschiedenen Variablen wurden uni- und multivariate Regressionsmodelle unter Angabe der jeweiligen Kovariaten angewandt. Bei entsprechender Kennzeichnung erfolgten bei einzelnen abhängigen Variablen Datentransformationen ein Logarithmieren zur Herstellung normalverteilter Residuen, um die Voraussetzung für die uni- und multivariaten Modelle zu erfüllen. Zur Analyse der diagnostischen Qualität der einzelnen Serumparameter verwendeten wir ROC-Analysen. In der Beschreibung der Daten fanden Absolut- (n) und Prozentwerte (%), Mittelwerte mit Standardabweichung (SD), Mediane mit oberer und unterer Quartile (Q1; Q3) und bei Korrelationsanalysen der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient r_s Verwendung. Bei ROC-Analysen erfolgte die Angabe der *area under the curve* (AUC, Fläche unter der Kurve) mit Standardfehler und Konfidenzintervall sowie die Angabe eines aus den ROC-Tabellen ermittelten *Cut-off*-Werts mit jeweiliger Sensitivität und Spezifität samt Konfidenzintervallen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde bei uni- und multivariaten Analysen zum Teil auf die Angabe der Konfidenzintervalle verzichtet.

3.2.7 Definitionen

Krankheitsaktivität und Vitamin D-Status wurden in dieser Arbeit wie folgt definiert:

Tabelle 5: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Definitionen

Krankheitsaktivität (nach ECCO-Guidelines)¹⁸⁸	Aktiver MC: CDAI > 150 nach Best ¹⁸ (siehe Anhang 1) Aktive CU: CAI > 3 nach Rachmilewitz ¹⁹ (siehe Anhang 2)
Vitamin D-Status (nach IOM)¹⁸⁵	Unterteilung in Defiziente (= Vitamin D-Mangel) und Nicht-Defiziente Probanden
Vitamin D-Mangel¹⁸⁵	25-OH-Vitamin D < 20 ng/mL (< 50 nmol/L)

4 Ergebnisse

4.1 Deskriptive Daten der Studienpopulation

Die Daten von insgesamt 250 CED-Patienten und 60 gesunden Kontrollen bildeten die Grundlage für die Auswertungen. Die demographischen und klinischen Charakteristika der CED-Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme sind in Tabelle 6 als CED-, MC- und CU-Kollektiv aufgelistet.

Tabelle 6: Charakteristika der CED-Patienten mit Stratifizierung nach Entität

Eigenschaften	CED-Kollektiv n=250	MC-Kollektiv n=170	CU-Kollektiv n=80
	Median (Q1; Q3) oder n (%)	Median (Q1; Q3) oder n (%)	Median (Q1; Q3) oder n (%)
Demographie			
- Alter (Jahre)	38 (30; 49)	37 (30; 49)	40 (31; 51)
- Weibliches Geschlecht	136 (54)	82 (48)	54 (68)
- BMI (kg/m ²)	24 (21; 27)	24 (21; 27)	25 (22; 27)
Raucherstatus ^a			
- Nichtraucher	165 (73)	101 (65)	64 (90)
- Raucher	62 (27)	55 (35)	7 (10)
Krankheitsdauer (Jahre)	11 (7; 18)	12 (7; 19)	11 (6; 18)
Krankheitsaktivität			
- aktiv	68 (27)	26 (15)	42 (53)
- in Remission	182 (73)	144 (85)	38 (48)
- CDAI	-	60 (28; 100)	-
- CAI	-	-	4 (2; 5)
MC-Lokalisation			
- nur Ileum	-	29 (17)	-
- nur Kolon	-	11 (6)	-
- Ileokolon	-	90 (53)	-
- Ileokolon + Jejunum	-	13 (8)	-
- Ileokolon + oberer GIT	-	27 (16)	-
CU-Ausdehnung ^b			
- Proktitis	-	-	3 (4)
- Linksseitenkolitis	-	-	35 (44)
- Pankolitis	-	-	38 (48)
Extraintestinale Manifestationen	67 (27)	51 (30)	16 (20)

^a Raucherstatus bekannt bei 227 von 250 Probanden, im MC-Kollektiv bei 156 Probanden, im CU-Kollektiv bei 71 Probanden; Karente Raucher wurden als Nichtraucher gewertet.

^b 4 fehlende Daten zur Ausdehnung der CU

Fisteln	62 (25)	61 (36)	1 (1)
Stenosen	77 (31)	72 (42)	5 (6)
Abszesse	33 (13)	33 (19)	0 (0)
zurückliegende Operation	77 (31)	75 (44)	2 (3)
NOD2-Status			
- R702W-Mutation (rs2066844) ^a	32 (13)	28 (16)	4 (5)
Blutbild/ klinische Chemie			
- Erythrozyten (in T/L)	4,8 (4,5; 5,1)	4,8 (4,5; 5,1)	5,0 (4,7; 5,3)
- Hämoglobin (in g/dL)	14,3 (13,4; 15,2)	14,2 (13,3; 15,0)	14,7 (13,7; 15,6)
- Thrombozyten (in G/L)	280,0 (234,3; 312,8)	283,0 (238,3; 319,0)	265,5 (225,8; 305,3)
- Leukozyten (in G/L)	7,4 (6,2; 9,3)	7,4 (6,2; 9,4)	7,5 (6,2; 9,1)
- CRP (in mg/dL)	0,3 (0,1; 0,8)	0,3 (0,1; 0,8)	0,4 (0,1; 0,8)
- Kreatinin (in mg/dL)	0,9 (0,8; 1,0)	0,9 (0,8; 1,0)	1,0 (0,9; 1,1)
Fäkales Calprotectin ^b (in mg/L)	353 (91; 1497)	349 (91; 1511)	365 (98; 1484)
Aktuelle CED-Therapie			
- keine Medikation	15 (6)	15 (9)	0 (0)
- orale Steroid-Monotherapie	3 (1)	2 (1)	1 (1)
- orale Steroide + 5-ASA	10 (4)	3 (2)	7 (9)
- Immunsuppressiva-Monotherapie ^c	12 (5)	10 (6)	2 (3)
- Immunsuppressiva + Steroide	2 (1)	1 (1)	1 (1)
- Immunsuppressiva + 5-ASA	1 (0)	0 (0)	1 (1)
- Anti-TNF- α -Monotherapie ^d	142 (57)	111 (65)	31 (39)
- Anti-TNF- α + Steroide	6 (2)	4 (2)	2 (3)
- Anti-TNF- α + Steroid + 5-ASA	4 (2)	3 (2)	1 (1)
- Anti-TNF- α + Immunsuppressiva	5 (2)	2 (1)	3 (4)
- Anti-TNF- α + Steroid + Immunsuppressiva	3 (1)	3 (2)	0 (0)
- Anti-TNF- α + 5-ASA	16 (6)	3 (2)	13 (16)
- Vedolizumab	10 (4)	7 (4)	3 (4)
- Vedolizumab + Steroid	4 (2)	3 (2)	1 (1)
- Vedolizumab + 5-ASA	5 (2)	3 (2)	2 (3)
- 5-ASA-Monotherapie	11 (4)	0 (0)	11 (14)
Vitamin D – Einnahme: ja	134 (54)	90 (53)	44 (55)
- durchschnittliche Dosis (IE)	1000 (1000; 1000)	1000 (1000; 1000)	1000 (1000; 1000)

Abkürzungen: 5-ASA: 5-Aminosalicylate, IE: Internationale Einheiten

^a Insgesamt 2 homozygote, 32 heterozygote Genotypen

^b Daten zu fäkalem Calprotectin insgesamt bei 163 von 250 Probanden vorhanden; im MC-Kollektiv bei 108 Probanden, im CU-Kollektiv bei 55 Probanden

^c Immunsuppressiva umfassen Azathioprin und Methotrexat

^d TNF- α -Hemmer umfassen Infliximab, Adalimumab, Golimumab und Certolizumab

In Tabelle 7 sind die Charakteristika der gesunden Kontrollgruppe (n=60) zusammengefasst.

Tabelle 7: Charakteristika der gesunden Kontrollgruppe (K)

Eigenschaften	Gesunde Kontrollen
	n=60 Median (Q1; Q3) oder n (%)
Demographie	
- Alter (Jahre)	31 (25; 41)
- Weibliches Geschlecht	35 (58)
- BMI (kg/m ²)	22 (20; 25)
Raucherstatus	
- Raucher	3 (5)
- Nichtraucher	57 (95)
Vitamin D – Einnahme: ja	8 (13)
- Durchschnittliche Dosis (IE)	2000 (1700; 2250)

Abkürzung: IE: Internationale Einheiten

4.2 Vitamin D-Parameter in der Studienkohorte

In Tabelle 8 sind die medianen Konzentrationen der 25(OH)D- und 1,25(OH)2D-Spiegel der CED-Patienten (N=250) im Vergleich zu den gesunden Probanden (N=60) dargestellt. Tabelle 9 zeigt die Messergebnisse mit Differenzierung der Patienten in aktive Erkrankung (n=68) und Erkrankung in Remission (n=182) sowie mit Differenzierung der beiden Entitäten MC (n=170) und CU (n=80).

Tabelle 8: Mediane Vitamin D-Spiegel im CED-Kollektiv im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe

	CED-Kollektiv n=250 Median (Q1; Q3)	Kontrollkollektiv n=60 Median (Q1; Q3)	<i>p^a</i>
25(OH)D (in ng/mL)	22,0 (16,0; 29,0)	29,0 (22,0; 34,3)	<0,0001
1,25(OH)2D (in pg/mL)	30,7 (23,1; 39,5)	24,0 (15,2; 34,9)	0,0002

Tabelle 9: Mediane Vitamin D-Spiegel in den verschiedenen CED-Kollektiven

Kollektiv	25(OH)D (in ng/mL)	1,25(OH)2D (in pg/mL)
CED aktiv (n=68)	24,0 (17,0; 30,3)	31,9 (24,3; 46,6)
CED Remission (n=182)	22,0 (16,0; 28,0)	30,1 (22,6; 38,3)
MC (n=170)	22,0 (16,0; 29,0)	30,2 (23,0; 39,5)
CU (n=80)	21,0 (16,8; 28,0)	31,5 (24,0; 39,5)

^a Vergleich der zwei Stichproben mittels Mann-Whitney-U-Test

4.2.1 25-(OH)-Vitamin D-Spiegel in den einzelnen Kollektiven

Bei CED-Patienten (N=250) ergaben sich signifikant niedrigere Spiegel an 25(OH)D (Median: 22,0 ng/mL) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (n=60, Median: 29,0 ng/mL; $p < 0,0001$). Diese signifikanten Unterschiede zeigten sich auch bei Differenzierung der Krankheitsaktivität: CED-Patienten in aktivem Erkrankungszustand (n=68) wiesen niedrigere Spiegel (Median: 24,0 ng/mL) als die Kontrollprobanden ($p = 0,001$) auf, ebenso die CED-Patienten in Remission (n= 182; Median: 22,0 ng/mL; $p < 0,0001$). Zwischen CED aktive Erkrankung und CED in Remission bestand kein signifikanter Unterschied ($p = 0,20$).

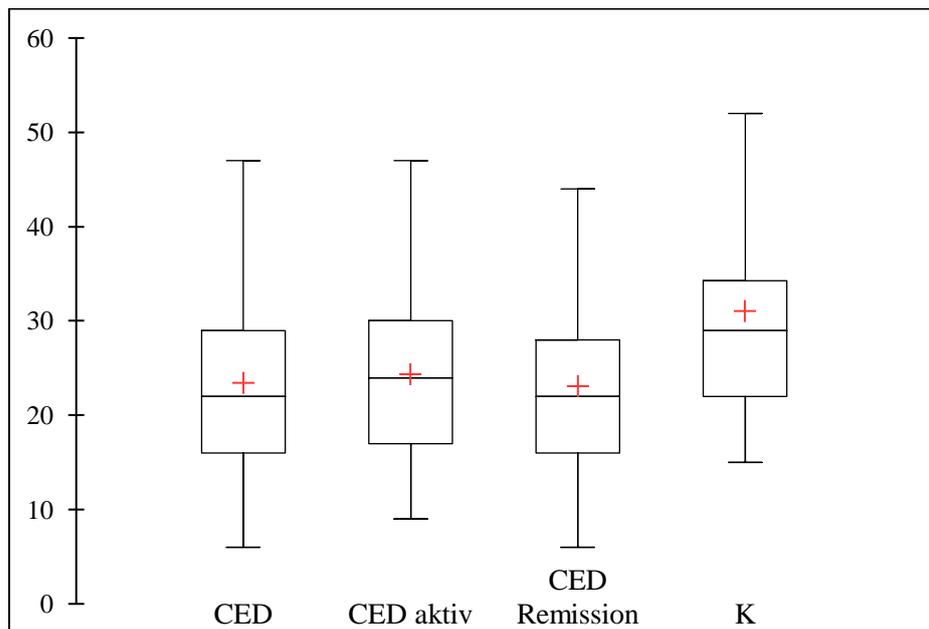


Abbildung 8: 25(OH)D-Spiegel (in ng/mL) bei CED-Patienten (N=250) mit Differenzierung der Krankheitsaktivität im Vergleich zu gesunden Kontrollen (K) (N=60)

Auch innerhalb der univariaten Regressionsanalyse ergab sich eine signifikante, negativ gerichtete Assoziation der dichotomen Variable „Erkrankung“ zu den 25(OH)D-Konzentrationen (Regressionskoeffizient $B = -7,675$; $SE = 1,514$; $p < 0,001$).

Im MC-Kollektiv (n=170) zeigten sich niedrigere 25(OH)D-Spiegel (Median: 22,0 ng/mL) als bei den gesunden Kontrollen (n=60; Median: 29,0 ng/mL; $p < 0,0001$), ebenso innerhalb der Gruppe der CU-Patienten (n=80; Median: 21 ng/mL) verglichen mit der Kontrollgruppe ($p < 0,0001$). Der Vergleich zwischen MC- und CU-Patienten ergab keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,57$).

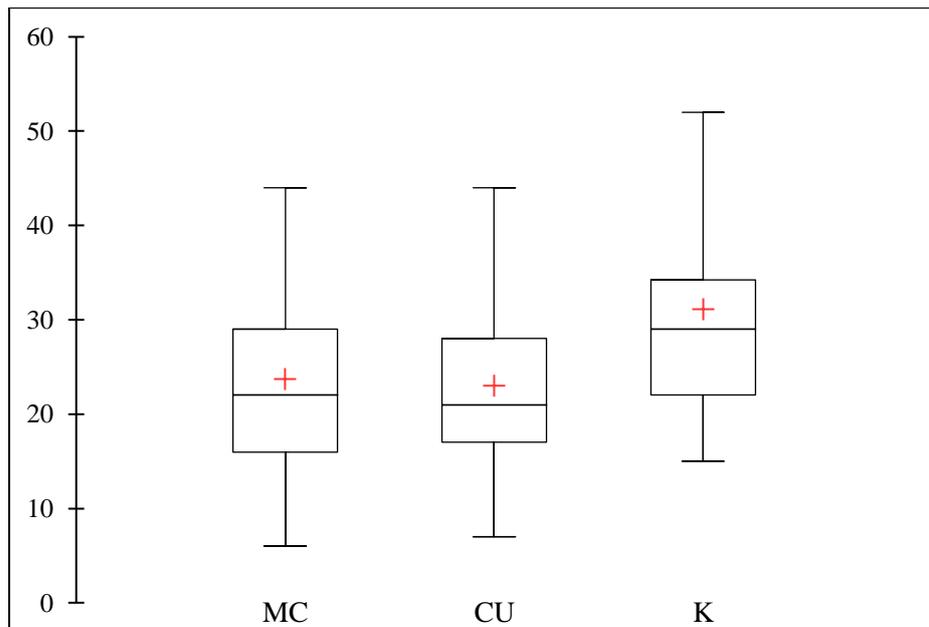


Abbildung 9: 25(OH)D-Spiegel (in ng/mL) bei MC- (n=170) und CU-Patienten (n=80) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (K) (N=60) (Ausreißer ausgeblendet)

- Assoziation zur Krankheitsaktivität

Zur Überprüfung einer möglichen Assoziation mit der Krankheitsaktivität erfolgte eine Korrelationsanalyse der 25(OH)D-Spiegel mit den CDAI-Werten bei MC- und den CAI-Werten bei CU-Patienten. Hier zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge.

Tabelle 10: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse der 25(OH)D-Spiegel mit den absoluten CDAI- und CAI-Scores im MC- und CU-Kollektiv

Parameter	Mittelwert (SD)	Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient r_s	p
CDAI im MC-Kollektiv (n=170)	81 (83)	0,08	0,30
CAI im CU-Kollektiv (n=80)	4 (3)	0,08	0,51

Im univariaten linearen Modell ergab sich keine signifikante Assoziation der Krankheitsaktivität zu den 25(OH)D-Konzentrationen (im CED-Kollektiv, n=250, Regressionskoeffizient $B=1,217$; $SE=1,435$; $p=0,397$).

4.2.2 1,25-(OH)₂-Vitamin D-Spiegel in den einzelnen Kollektiven

Bei CED-Patienten (N=250) ließen sich signifikant höhere 1,25(OH)₂D-Werte (Median: 30,7 pg/mL) feststellen als bei der gesunden Kontrollgruppe (N=60; Median: 24,0 pg/mL; $p=0,0002$). CED-Patienten in aktivem Erkrankungszustand (n=68; Median: 31,9 pg/mL; $p=0,0002$) wiesen, ebenso wie CED-Patienten in Remission (n=182; Median: 30,1 pg/mL; $p=0,001$), höhere 1,25(OH)₂D-Spiegel als die gesunden Probanden auf. Innerhalb der Krankheitsaktivität zeichnete sich im Vergleich CED aktiv – CED Remission kein signifikanter Unterschied ab ($p=0,10$).

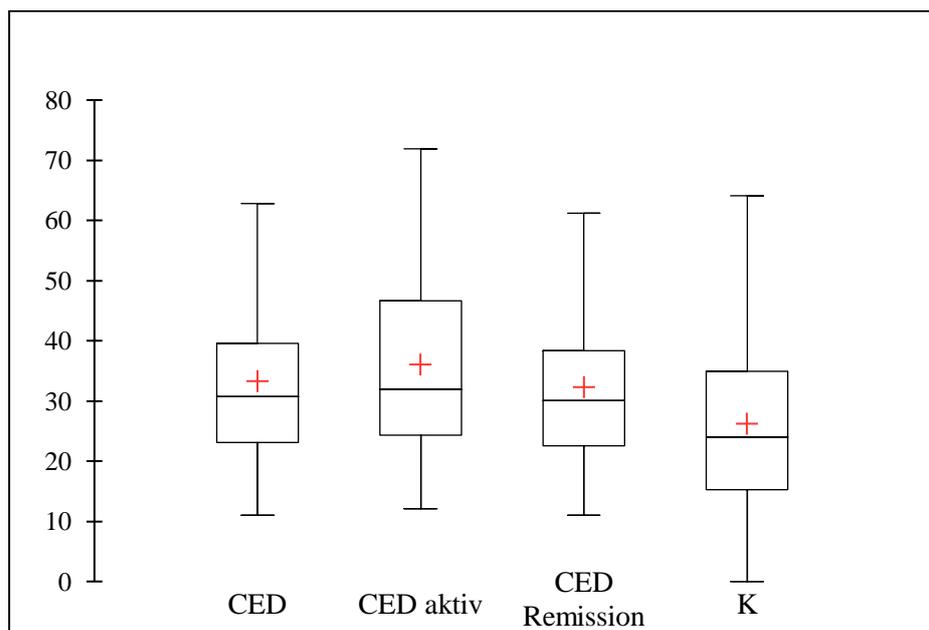


Abbildung 10: 1,25(OH)₂D-Spiegel (in pg/mL) bei CED-Patienten (N=250) mit Differenzierung der Krankheitsaktivität im Vergleich zu gesunden Kontrollen (K) (N=60) (Ausreißer ausgeblendet)

Auch im linearen Regressionsmodell ergab sich ein signifikanter, positiv gerichteter Einfluss der Erkrankung als dichotome Variable auf die 1,25(OH)₂D-Konzentration (Regressionskoeffizient $B=7,081$; $SE=2,226$; $p=0,002$).

Dieser Unterschied zeigte sich auch bei Aufteilung des CED-Kollektivs in die beiden Entitäten MC und CU ab: Bei MC-Patienten (n=170) ergaben sich signifikant höhere 1,25(OH)₂D-Spiegel (Median: 30,2 pg/mL) als bei den gesunden Kontrollen (N=60; Median: 24,0 pg/mL; $p=0,0005$). Dieser signifikante Unterschied war auch bei CU-Patienten (n=80; Median: 31,5 pg/mL) verglichen mit der Kontrollgruppe vorhanden ($p=0,002$). Zwischen den beiden Entitäten MC und CU bestand kein signifikanter Unterschied ($p=0,83$).

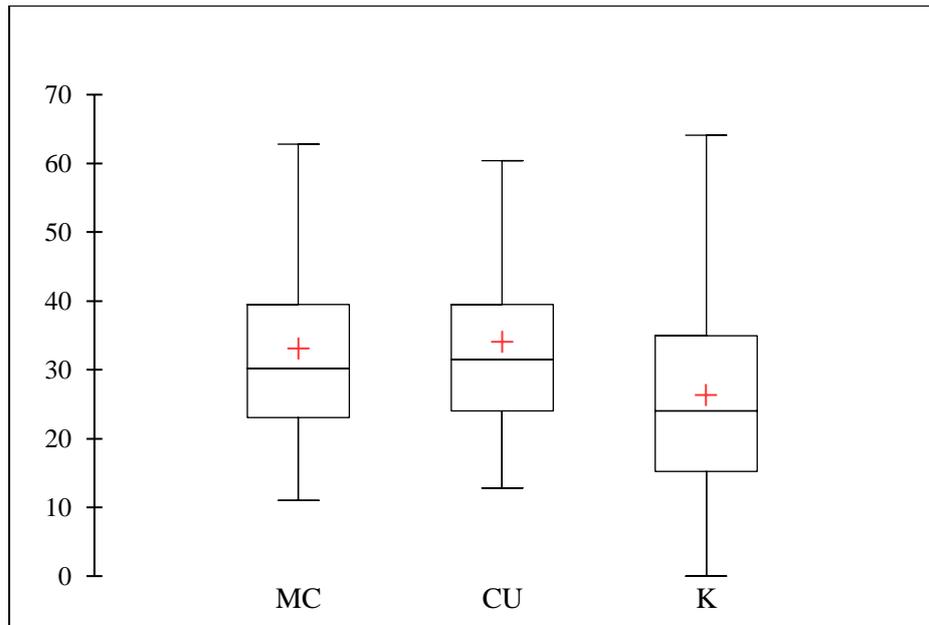


Abbildung 11: 1,25(OH)2D-Spiegel (in pg/mL) bei MC- ($n=170$) und CU-Patienten ($n=80$) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (K) ($N=60$) (Ausreißer ausgeblendet)

- Korrelation zur Krankheitsaktivität

Auch für 1,25(OH)2D erfolgte zur Überprüfung einer möglichen Assoziation mit der Krankheitsaktivität eine Korrelationsanalyse der 1,25(OH)2D-Spiegel der jeweiligen CED-Kollektive mit den CDAI-Werten bei MC- und den CAI-Werten bei CU-Patienten. Hier zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge.

Tabelle 11: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse der 25(OH)D-Spiegel mit den absoluten CDAI- und CAI-Scores im MC- und CU-Kollektiv

Parameter	Mittelwert (SD)	Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient r_s	p
CDAI im MC-Kollektiv ($n=170$)	81 (83)	0,09	0,27
CAI im CU-Kollektiv ($n=80$)	4 (3)	0,08	0,50

Im univariaten linearen Modell konnte kein signifikanter Einfluss der Krankheitsaktivität auf die 1,25(OH)2D-Spiegel (CED-Kollektiv, $n=250$) festgestellt werden ($B=3,748$; $SE=2,148$; $p=0,082$).

4.2.3 Regressionsanalyse: Kontrolle auf Vitamin D-Supplementation und Nierenfunktion

In den Kapiteln 4.2.1 und 4.2.2 konnten bei CED-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant niedrigere 25(OH)D- und signifikant höhere 1,25(OH)₂D-Serumkonzentrationen festgestellt werden. Dies bestätigte sich in den univariaten linearen Regressionsanalysen.

Diese Ergebnisse sollten mittels multipler Regression auf mögliche Einflüsse der Vitamin D-Supplementation und der Nierenfunktion kontrolliert werden. Da vorab CED-Patienten mit nephrologischen Erkrankungen, insbesondere chronischer Nierenfunktionseinschränkung, ausgeschlossen waren und die Kontrollgruppe nur aus gesunden, internistisch nicht vorerkrankten Personen bestand, konnte die Variable Kreatinin als Marker der Nierenfunktion außer Acht gelassen werden. Gleichzeitig zeigten sich hinsichtlich des Serumkreatinins keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der CED-Patienten mit bzw. ohne Vitamin D-Mangel (Median (Q1; Q3) des Serumkreatinins in mg/dl bei Hypovitaminose D: 1,0 (0,9; 1,1); ohne Hypovitaminose D: 1,0 (0,9; 1,1); $p=0,89$).

Die signifikante Assoziation der CED-Erkrankung zu den 25(OH)D- und 1,25(OH)₂D-Spiegeln ergab sich im multiplen Modell auch nach Korrektur auf die Vitamin D-Supplementation.

Tabelle 12: Multiple lineare Regression der Erkrankung als unabhängige Variable und der Vitamin D-Parameter als abhängige Zielvariablen im Gesamtkollektiv (N=310) aus CED-Patienten (n=250) und den gesunden Kontrollen (n=60) (Koeffizient: Regressionskoeffizient B; SE, Standardfehler)

CED-Erkrankung (ja/nein) als unabhängige Variable	Gesamtkollektiv aus CED + gesunden Kontrollen (N=310)			
	Koeffizient	95%-Konfidenzintervall	SE	p
25(OH)-Vitamin D	-9,415	[-12,504; -6,326]	1,570	<0,001
1,25(OH) ₂ -Vitamin D	7,960	[3,340; 12,580]	2,348	<0,001

Kovariate: Vitamin D-Supplementation

Im Kollektiv aus allen Probanden ging eine CED-Erkrankung mit signifikant niedrigeren 25(OH)D-Werten ($B= -9,415$; $SE=1,570$; $p<0,001$) sowie signifikant höheren 1,25(OH)₂D-Spiegeln ($B=7,960$; $SE=2,348$; $p<0,001$), korrigiert auf die Einnahme von Vitamin D-Präparaten, einher.

4.3 ELISA-Messungen

4.3.1 Übersicht der Serum-Biomarker in einzelnen Studienkohorten

In Tabelle 13 sind die Messergebnisse aller Serumparameter, die im Rahmen dieser Arbeit im CED-Kollektiv ermittelt wurden, dargestellt.

Tabelle 13: Übersicht der gemessenen Parameter im CED-Kollektiv verglichen mit der Kontrollgruppe

Serumparameter		CED-Kollektiv N=250 Median (Q1; Q3)	Kontrollkollektiv N=60 Median (Q1; Q3)	p^a
CCL20	(in pg/mL)	3,68 (2,23; 5,64)	2,12 (0; 5,06)	0,0003
SC	(in ng/mL)	1338,4 (651,0; 2885,9)	1344,7 (690,2; 2574,0)	0,93
LL-37	(in ng/mL)	46,98 (35,67; 59,93)	36,57 (31,57; 46,65)	0,0001
HBD-2	(in pg/mL)	7177,7 (3125,3; 19149,3)	8145,2 (3267,2; 21441,3)	0,74

In Tabelle 14 sind die Serumparameter in Abhängigkeit vom Vitamin D-Status, eingeteilt gemäß Definition der IOM¹⁸⁵, aufgelistet.

Tabelle 14: Serumparameterkonzentrationen in Abhängigkeit vom Vitamin D-Status

Serumparameter		Mediane (Q1; Q3) Serum-Konzentrationen bei CED-Patienten mit 25(OH)D-Defizienz (n=98)	Mediane (Q1; Q3) Serum-Konzentrationen bei CED-Patienten mit suffizienten 25(OH)D- Spiegeln (n=152)	p^a
CCL20	(in pg/mL)	3,68 (2,45; 5,78)	3,48 (2,23; 5,64)	0,54
SC	(in ng/mL)	1470,9 (642,4; 3261,7)	1300,5 (656,7; 2699,2)	0,50
LL-37	(in ng/mL)	47,15 (38,23; 60,85)	46,69 (34,46; 58,45)	0,30
HBD-2	(in pg/mL)	6565,4 (2936,4; 19417,3)	7397,3 (3455,4; 19105,8)	0,67

^a Vergleich der zwei Stichproben mittels Mann-Whitney-U-Test

4.3.2 CCL20 und Vitamin D in den Kollektiven

- Serumkonzentrationen in Abhängigkeit von Krankheitsaktivität und Entität

In Tabelle 15 können die gemessenen CCL20-Konzentrationen im CED-Kollektiv mit Aufteilung nach Entzündungsaktivität und Entität eingesehen werden. Zum Vergleich sind die ermittelten Konzentrationen der Kontrollgruppe angegeben.

Tabelle 15: Vergleich der CCL20-Serumkonzentrationen in den einzelnen CED- und im Kontrollkollektiv (K)

CCL20-Konzentration in den CED-Kollektiven		CCL20-Konzentration im jeweiligen Kollektiv		p^a
	Median (Q1; Q3) (in pg/mL)		Median (Q1; Q3) (in pg/mL)	
CED gesamt (N=250)	3,68 (2,23; 5,64)	K (n=60)	2,12 (0; 5,06)	0,0003
CED aktiv (n=68)	3,58 (2,39; 5,92)	CED Remission	3,68 (2,23; 5,45)	0,46
CED aktiv (n=68)	3,58 (2,39; 5,92)	K	2,12 (0; 5,06)	0,0007
CED Remission (n=182)	3,68 (2,23; 5,45)	K	2,12 (0; 5,06)	0,001
MC (n=170)	3,78 (2,23; 5,97)	CU	3,28 (2,45; 5,25)	0,50
MC (n=170)	3,78 (2,23; 5,97)	K	2,12 (0; 5,06)	0,0005
CU (n=80)	3,28 (2,45; 5,25)	K	2,12 (0; 5,06)	0,004
MC aktiv (n=26)	4,08 (2,86; 6,58)	MC Remission (n=144)	3,78 (2,23; 5,69)	0,23
CU aktiv (n=42)	3,28 (2,23; 5,54)	CU Remission (n=38)	3,28 (2,50; 5,21)	0,87

Zwischen CED-Patienten (N=250; Median: 3,68 pg/mL) und der gesunden Kontrollgruppe (N=60; Median: 2,12 pg/mL) ergaben sich hinsichtlich der Serumspiegel von CCL20 signifikante Unterschiede ($p=0,0003$). Die Unterteilung der CED-Patienten in aktiven bzw. nicht-aktiven Krankheitsaktivitätsindex zeigte, dass die CED-Patienten mit aktivem Krankheitsindex (n=68; Median: 3,58 pg/mL) signifikant höhere CCL20-Konzentrationen aufwiesen als die gesunden Probanden ($p=0,0007$). Dieser Unterschied war auch beim Vergleich von CED-Patienten in Remission (n=182; Median 3,68 pg/mL) und den gesunden Kontrollen vorhanden

^a Vergleich der zwei Stichproben mittels Mann-Whitney-U-Test

($p=0,001$). Zwischen Patienten mit aktiver Erkrankung und Patienten in Remission bestand keine signifikante Disparität ($p=0,456$).

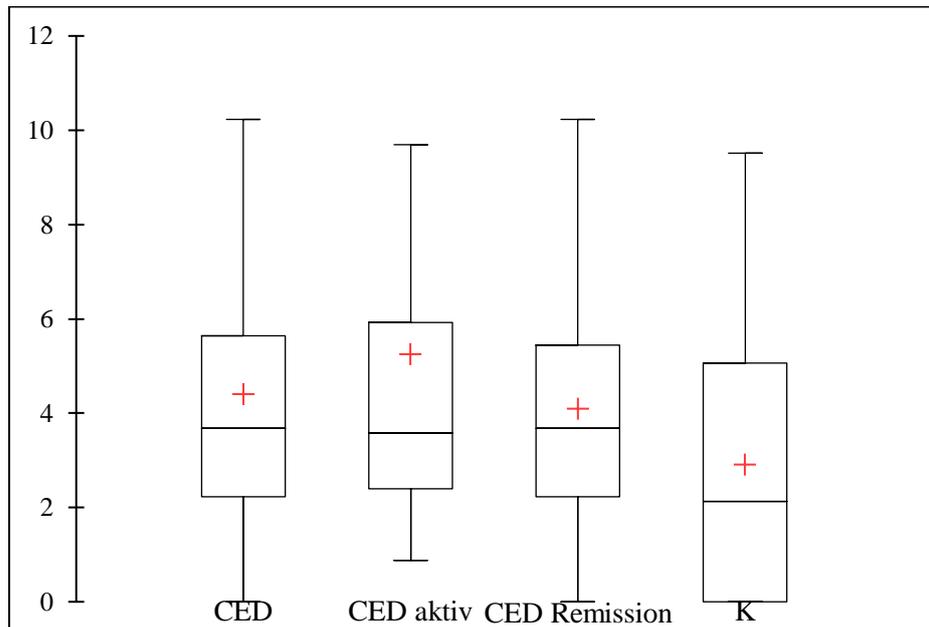


Abbildung 12: CCL20-Konzentrationen (in pg/mL) bei CED-Patienten ($N=250$) mit Differenzierung der Krankheitsaktivität im Vergleich zu gesunden Kontrollen (K) ($N=60$) (Ausreißer ausgeblendet)

Die Unterteilung der CED-Patienten in MC ($n=170$; Median: 3,78 pg/mL) und CU ($n=80$; Median: 3,28 pg/mL) zeigte, dass die beiden Entitäten jeweils signifikant höhere CCL20-Konzentrationen aufwiesen als die Kontrollgruppe (MC: $p=0,0005$; CU: $p=0,004$). Zwischen den beiden Hauptformen bestand kein Unterschied ($p=0,501$).

Eine weitere Stratifizierung nach Krankheitsaktivität innerhalb der Entitäten MC und CU erbrachte auch bei Vergleich der aktiv Erkrankten und der Patienten in Remission keine messbaren Unterschiede (MC aktiv-MC Remission: $p=0,23$; CU aktiv-CU Remission: $p=0,87$).

Die Ergebnisse zu CCL20 in den einzelnen Kohorten wurden teils vorab in einem Kongressmanuskript veröffentlicht (siehe Kapitel 13 Publikationsliste).

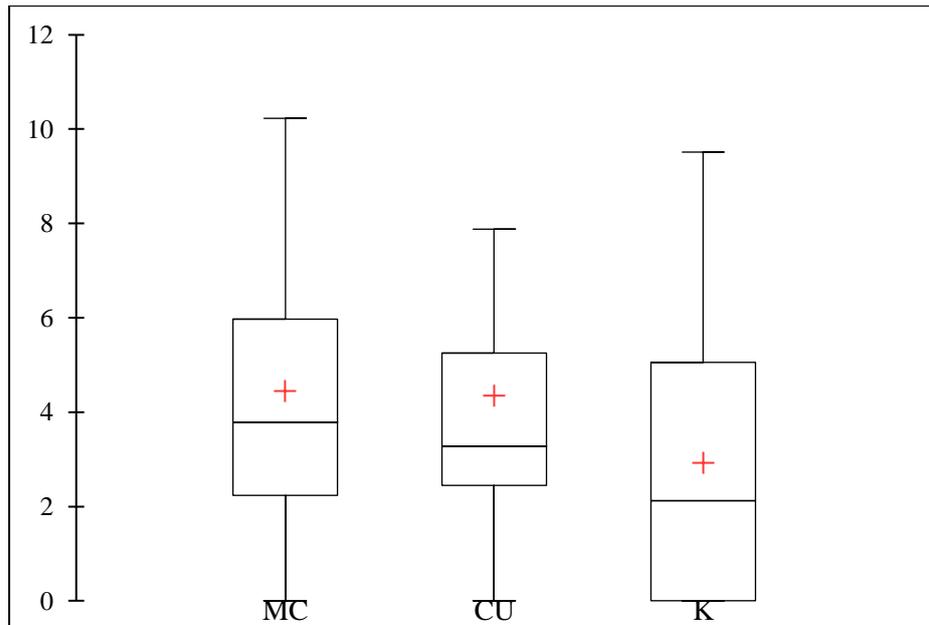


Abbildung 13: CCL20-Konzentrationen (in pg/mL) bei MC- (n=170) und CU-Patienten (n=80) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (K) (N=60) (Ausreißer ausgeblendet)

- Assoziation zur Krankheitsaktivität

Neben der dichotomen Einteilung der CED-Patienten nach Krankheitsaktivität erfolgte eine Korrelationsanalyse der absoluten Werte der Krankheitsaktivität bei MC (CDAI) und CU (CAI) zu den CCL20-Serumparametern.

Tabelle 16: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse der CCL20-Spiegel mit den absoluten CDAI- und CAI-Scores im MC- und CU-Kollektiv

Parameter	Mittelwert (SD)	Spearman'scher Rangkorrelations- koeffizient r_s	p
CDAI im MC-Kollektiv (n=170)	81 (83)	0,009	0,91
CAI im CU-Kollektiv (n=80)	4 (3)	0,14	0,23

Im univariaten linearen Modell ergab sich kein signifikanter Einfluss der Krankheitsaktivität auf die CCL20-Spiegel^a innerhalb der MC- (Regressionskoeffizient $B=0,242$; $SE=0,131$; $p=0,066$) und der CU-Patienten ($B=0,083$; $SE=0,126$; $p=0,512$).

^a CCL20-Spiegel logarithmiert zur Herstellung normverteilter Residuen

- Vergleich von CCL20 mit fäkalem Calprotectin (FC) und weiteren klinischen Entzündungsindikatoren

Im Rahmen der Vorstellung in der Ambulanz für CED bestimmten wir bei allen Patienten (N=250) auch die Parameter CRP, Leukozyten und Thrombozyten. Zudem wurden bei insgesamt 163 CED-Patienten die Calprotectin-Werte im Stuhl (FC) analysiert. Um die Eigenschaften von CCL20 als Entzündungsindikator und Biomarker näher zu charakterisieren, wurden diese Werte im Rahmen einer Spearman-Korrelation mit den CCL20-Konzentrationen assoziiert. Für FC ($r_s=0,18$, $p=0,02$) sowie CRP ($r_s=0,15$, $p=0,02$) konnte eine signifikante positive Korrelation nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Anzahl der Leukozyten und Thrombozyten im Blutbild ergab sich ein positiv gerichteter, nicht signifikanter Zusammenhang.

Tabelle 17: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse von CCL20 im CED-Kollektiv mit den Parametern fäkales Calprotectin (FC), CRP, Leukozyten und Thrombozyten

Parameter	Median (Q1; Q3)	Spearman'scher Rangkorrelations- koeffizient r_s	p
FC (n=163, in mg/L)	349,5 (90,8; 1491,0)	0,18	0,02
CRP (n=250, in mg/dL)	0,3 (0,1; 0,8)	0,15	0,02
Leukozyten (n=250, in Giga/L)	0,9 (6,2; 9,3)	0,02	0,80
Thrombozyten (n=250, in Giga/L)	280 (234,25; 312,75)	0,04	0,52

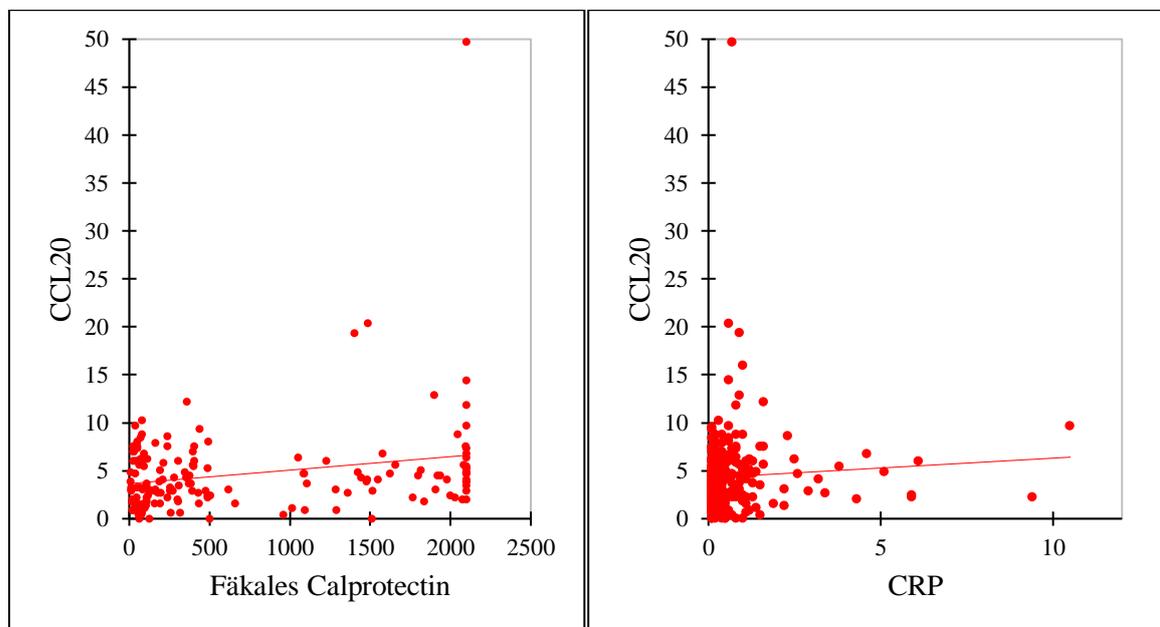


Abbildung 14: Korrelation von CCL20 (in pg/mL) mit fäkalem Calprotectin (in mg/dL) (N=163; $r_s=0,18$; $p=0,02$) und CRP (in mg/dL) (N=250; $r_s=0,15$; $p=0,02$)

- Zusammenhang mit 25-(OH)-Vitamin D

Zur Analyse des Zusammenhangs der CCL20-Konzentrationen mit Vitamin D wurden auch bei den ELISA-Messungen die Kollektive in 25(OH)D-defiziente und 25(OH)D-suffiziente, welche ausreichende 25(OH)D-Spiegel von ≥ 20 ng/mL aufwiesen, unterteilt. Die einzelnen 25(OH)D-Werte in den jeweiligen Gruppen können in Tabelle 9 eingesehen werden. Anschließend wurden die CCL20-Konzentrationen miteinander verglichen und auf statistische Unterschiede überprüft, die medianen Konzentrationen und die p-Werte sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Mediane CCL20-Konzentrationen bei CED-Patienten und bei gesunden Kontrollen (K), differenziert nach 25(OH)D-Defizienz und suffizienten 25(OH)D-Spiegeln

Kollektiv	Mediane (Q1; Q3) CCL20-Werte (in pg/mL) bei Patienten mit 25(OH)D-Defizienz	Mediane (Q1; Q3) CCL20-Werte (in pg/mL) bei Patienten mit suffizienten 25(OH)D-Spiegeln	p^a
CED (N=250)	3,68 (2,45; 5,78) (n=98)	3,48 (2,23; 5,64) (n=152)	0,54
CED aktiv (N=68)	3,28 (2,86; 6,39) (n=25)	3,68 (2,23; 5,73) (n=43)	0,79
CED Remission (N=182)	3,68 (2,45; 5,45) (n=73)	3,48 (2,23; 5,25) (n=109)	0,56
MC (N=170)	3,68 (2,39; 5,45) (n=64)	4,18 (2,23; 6,02) (n=106)	0,67
MC aktiv (n=26)	3,07 (2,92; 5,85) (n=6)	4,57 (2,71; 6,58) (n=20)	0,98
MC Remission (n=144)	3,68 (2,23; 5,40) (n=58)	3,98 (2,07; 6,02) (n=86)	0,79
CU (N=80)	3,88 (2,50; 6,30) (n=34)	3,07 (2,29; 4,72) (n=46)	0,10
CU aktiv (n=42)	3,68 (2,23; 6,02) (n=19)	3,07 (2,23; 5,06) (n=23)	0,57
CU Remission (n=38)	4,48 (2,66; 6,67) (n=15)	2,86 (2,45; 3,78) (n=23)	0,11
Kontrollen (N=60)	5,06 (3,88; 6,39) (n=5)	2,02 (0; 4,87) (n=55)	0,031

Bei den Gruppen CED, CED-Remission, CU und bei den gesunden Kontrollen ging eine Vitamin D-Defizienz mit höheren CCL20-Konzentrationen einher. Diese Tendenz erwies sich nur bei der gesunden Kontrollgruppe als statistisch signifikant

^a Vergleich der zwei Stichproben mittels Mann-Whitney-U-Test

($p=0,03$). CED-Patienten mit aktiver Erkrankung und die MC-Patienten isoliert betrachtet zeigten bei suffizienten Vitamin D-Spiegeln nicht signifikant im Median höhere CCL20-Werte als diejenigen mit 25(OH)D-Mangel.

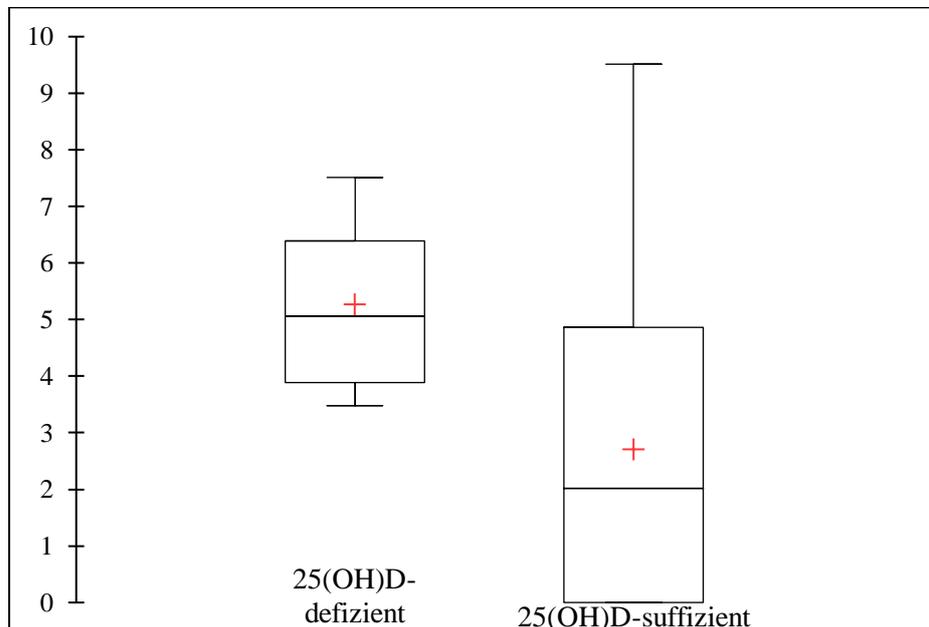


Abbildung 15: CCL20-Konzentrationen (in pg/mL) innerhalb der gesunden Kontrollgruppe (N=60) bei Probanden mit 25(OH)D-Mangel (n=5) und suffizienten 25(OH)D-Spiegeln (n=55) ($p=0,03$) (Ausreißer ausgeblendet)

- Zusammenhang mit 1,25-(OH)₂-Vitamin D

Eine etwaige Assoziation der CCL20-Spiegel mit den 1,25(OH)₂D-Spiegeln wurde durch eine Spearman-Korrelationsanalyse ermittelt.

Tabelle 19: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse von CCL20 mit 1,25(OH)₂D im CED- und Kontrollkollektiv (K)

Kollektiv	Median 1,25(OH) ₂ D (Q1; Q3) (in pg/mL)	Spearman'scher Rangkorrelations- koeffizient r_s	p
CED (N=250)	30,7 (23,1; 39,5)	-0,05	0,46
CED aktiv (n=68)	31,9 (24,3; 46,6)	-0,06	0,61
CED Remission (n=182)	30,1 (22,6; 38,3)	-0,05	0,52
MC (n=170)	30,2 (23,0; 39,5)	0,006	0,94
MC aktiv (n=26)	31,6 (23,3; 59,1)	-0,007	0,97
MC Remission (n=144)	30,1 (22,9; 38,3)	0,002	0,98
CU (n=80)	31,5 (24,0; 39,5)	-0,17	0,12
CU aktiv (n=42)	31,9 (25,2; 41,4)	-0,1	0,53
CU Remission (n=38)	29,0 (22,3; 38,1)	-0,23	0,16
Kontrollen (N=60)	24,0 (15,2; 34,9)	-0,33	0,011

Höhere 1,25(OH)₂D-Spiegel gingen bei CED-Patienten, auch bei Einzelbetrachtung der Gruppen mit unterschiedlicher Krankheitsaktivität und der Entität CU, mit niedrigeren Spiegeln an CCL20 einher. Bei MC-Patienten in Remission konnte eine schwach positive Korrelation festgestellt werden. Bei allen Analysen zeigte sich für CED-Patienten keine statistische Signifikanz. Innerhalb des gesunden Kontrollkollektivs (K; N=60) ergab sich eine signifikante inverse Korrelation ($r_s = -0,33$; $p = 0,01$).

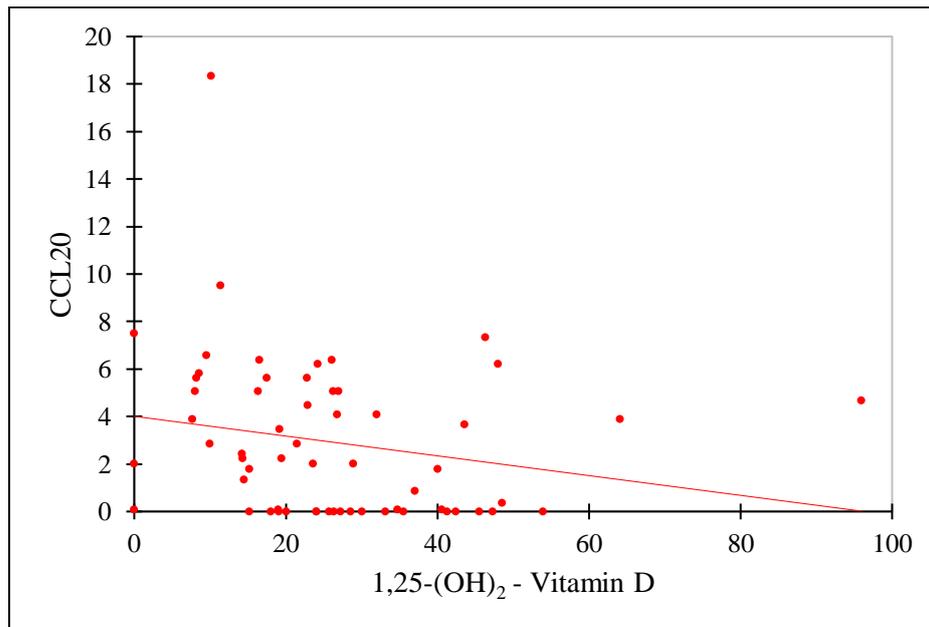


Abbildung 16: Spearman-Korrelation von CCL20 (in pg/mL) mit 1,25(OH)₂D (in pg/mL) innerhalb des gesunden Kontrollkollektivs (N=60; $r_s = -0,33$; $p = 0,01$)

4.3.3 Serum-Calprotectin (SC) und Vitamin D in den Kollektiven

- Serumkonzentrationen in Abhängigkeit von Krankheitsaktivität und Entität

Die SC-Spiegel der CED-Patienten, differenziert nach Krankheitsaktivität und Entität, sowie der gesunden Probanden sind in Tabelle 20 angegeben.

Tabelle 20: Vergleich der SC-Serumkonzentrationen in den einzelnen CED- und im Kontrollkollektiv (K)

SC-Konzentration im CED-Kollektiv Median (Q1; Q3) (in ng/mL)		SC-Konzentration im jeweiligen Kollektiv Median (Q1; Q3) (in ng/mL)		p^a
CED gesamt (N=250)	1338,4 (651,0; 2885,9)	K (n=60)	1344,7 (690,2; 2574,0)	0,93
CED aktiv (n=68)	2358,2 (1135,8; 4372,2)	CED Remission	1123,1 (1123,1; 1991,6)	<0,0001
CED aktiv (n=68)	2358,2 (1135,8; 4372,2)	K	1344,7 (690,2; 2574,0)	0,007
CED Remission (n=182)	1123,1 (1123,1; 1991,6)	K	1344,7 (690,2; 2574,0)	0,28
MC (n=170)	1224,0 (619,5; 2662,9)	CU	1490,7 (899,9; 3099,9)	0,28
MC (n=170)	1224,0 (619,5; 2662,9)	K	1344,7 (690,2; 2574,0)	0,76
CU (n=80)	1490,7 (899,9; 3099,9)	K	1344,7 (690,2; 2574,0)	0,42
MC aktiv (n=26)	1768,5 (939,2; 5616,6)	MC Remission (n=144)	1162,8 (568,9; 2456,2)	0,012
CU aktiv (n=42)	2418,5 (1413,6; 3875,1)	CU Remission (n=38)	933,7 (593,8; 1885,0)	0,003

Zwischen CED-Patienten (N=250; Median: 1338,4 ng/mL) und gesunden Kontrollen (n=60; Median: 1344,7 ng/mL) bestand in den SC-Werten kein statistisch feststellbarer Unterschied ($p=0,928$). Bei Unterteilung des CED-Kollektivs in aktiven (n=68, Median: 2358,2 ng/mL) bzw. nicht-aktiven Erkrankungszustand (n=182, Median: 1123,1 ng/mL) zeigte sich, dass CED-Patienten mit aktiver Krankheitsaktivität signifikant höhere SC-Spiegel aufwiesen als die gesunden Kontrollen ($p=0,007$) und CED-Patienten in Remission ($p<0,0001$). Kein signifikanter Unterschied war beim Vergleich der Gruppen CED-Patienten in Remission und Kontrollen vorhanden ($p=0,282$).

^a Vergleich der zwei Stichproben mittels Mann-Whitney-U-Test

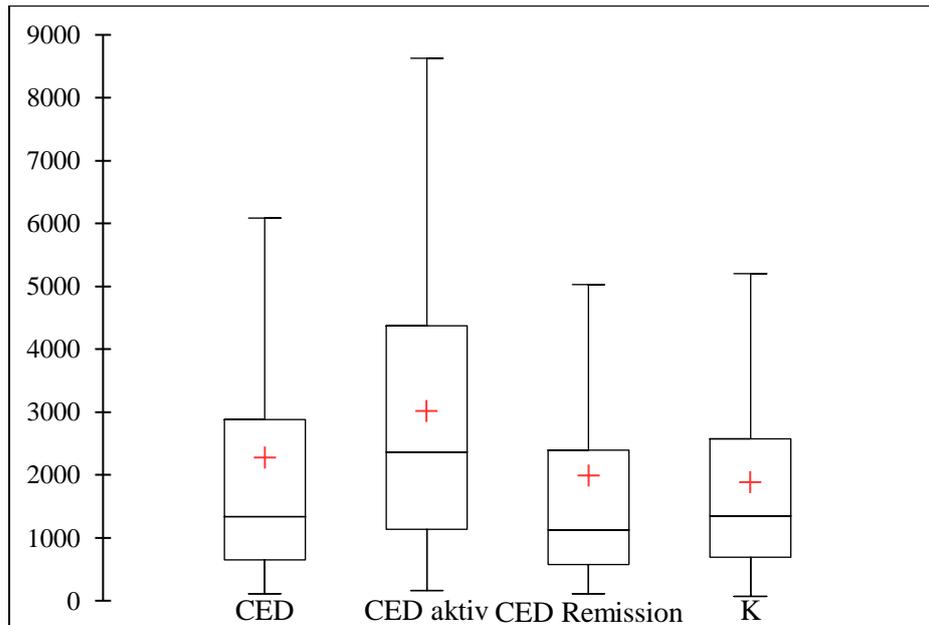


Abbildung 17: SC-Spiegel (in ng/mL) bei CED-Patienten (N=250) unter Aufschlüsselung der Krankheitsaktivität im Vergleich zu gesunden Kontrollen (K) (N=60) (Ausreißer ausgeblendet)

Der Vergleich der beiden Entitäten MC (n=170; Median: 1224,0 ng/mL) und CU (n=80; Median: 1490,7 ng/mL) mit den gesunden Probanden lieferte in den Analysen keinen signifikanten Unterschied ($p=0,758$ bzw. $p=0,415$). Innerhalb der beiden Hauptformen bestand ebenso kein Unterschied ($p=0,281$).

Eine weitere Unterteilung der MC- und CU-Patienten nach Krankheitsaktivität zeigte, dass auch MC-Patienten mit aktiver Erkrankung (n=26; Median: 1768,5 ng/mL) signifikant höhere SC-Spiegel aufwiesen als MC-Patienten in Remission (n=144; Median: 1162,8 ng/mL; $p=0,012$). Dieser Unterschied bestand auch bei Vergleich der CU-Patienten mit aktivem Krankheitsindex (n=42; Median: 2418,5 ng/mL) und CU-Patienten in Remission (n=38; Median: 933,7 ng/mL; $p=0,003$).

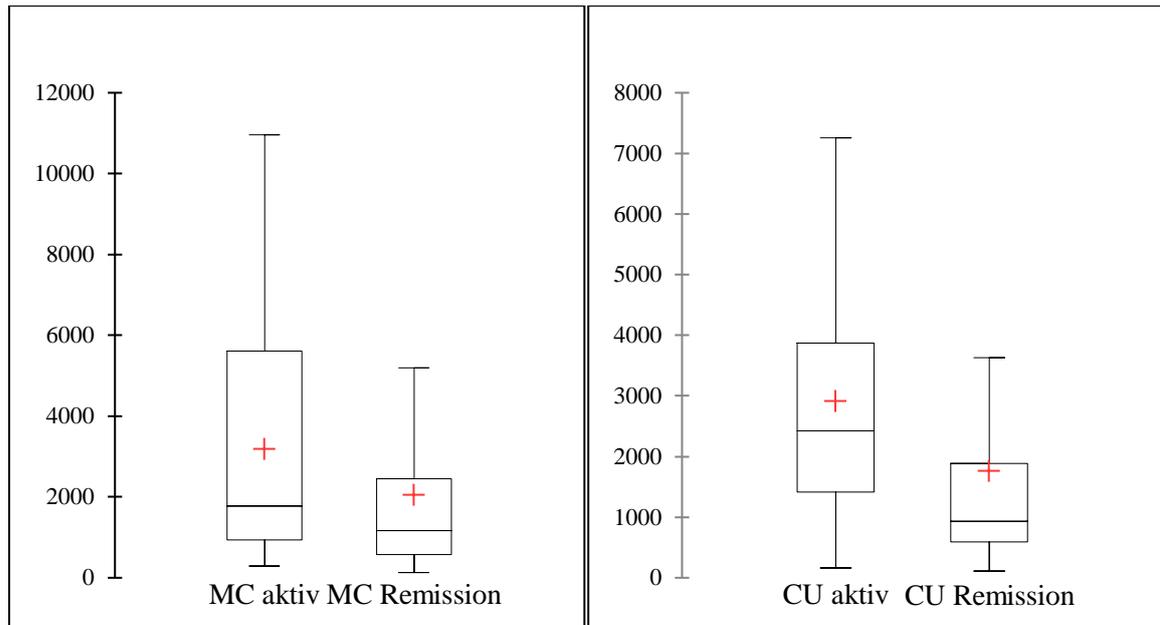


Abbildung 18: SC-Spiegel (in ng/mL) bei MC-Patienten (N=170) mit Krankheitsaktivität (n=26) im Vergleich zu MC-Patienten in Remission (n=144) und bei CU-Patienten (N=80) mit Krankheitsaktivität (n=43) im Vergleich zu CU-Patienten in Remission (n=38) (Ausreißer ausgeblendet)

- Korrelation zur Krankheitsaktivität

Die Korrelation der absoluten Werte für CDAI und CAI bei MC bzw. CU und den SC-Konzentrationen ergab für CDAI/MC ($p=0,0003$) und CAI/CU ($p=0,002$) signifikante, positiv gerichtete Assoziationen.

Tabelle 21: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse der SC-Spiegel mit den absoluten CDAI- und CAI-Scores im MC- und CU-Kollektiv

Parameter	Mittelwert (SD)	Spearman'scher Rangkorrelations- koeffizient r_s	p
CDAI im MC-Kollektiv (n=170)	81 (83)	0,27	0,0003
CAI im CU-Kollektiv (n=80)	4 (3)	0,35	0,002

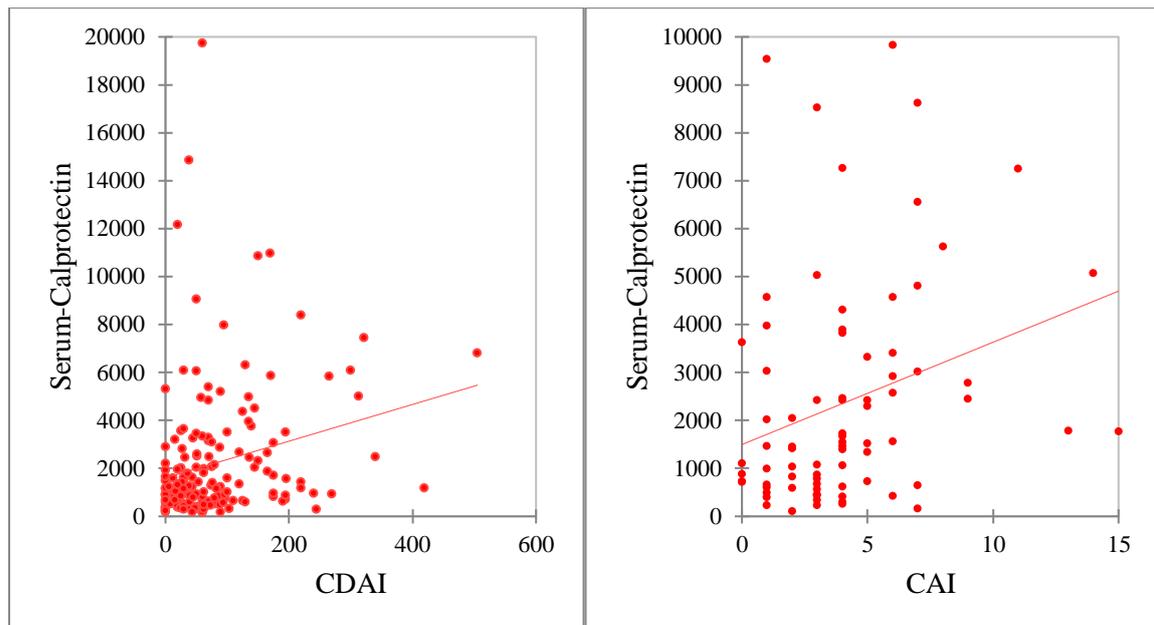


Abbildung 19: Spearman-Korrelationen von Serum-Calprotectin (in ng/mL) mit den absoluten CDAI-Werten innerhalb MC-Kollektivs ($N=170$; $r_s=0,27$; $p=0,0003$) und den absoluten CAI-Werten innerhalb CU-Kollektivs ($N=80$; $r_s=0,35$; $p=0,002$)

Im univariaten linearen Modell konnte die signifikante Assoziation der Krankheitsaktivität auf die SC-Spiegel^a sowohl im MC-, als auch im CU-Kollektiv bestätigt werden. Es zeigten sich signifikant positive gerichtete Zusammenhänge (im MC-Kollektiv: Regressionskoeffizient $B=0,555$; $SE=0,215$; $p=0,011$; im CU-Kollektiv: $B=0,631$; $SE=0,220$; $p=0,005$).

- Vergleich von SC mit fäkalem Calprotectin (FC) und weiteren klinischen Entzündungsindikatoren

Im Rahmen der Routineuntersuchungen wurde von einigen Patienten auch fäkales Calprotectin (FC) bestimmt. Dies erfolgte bei insgesamt 163 Patienten im Mittel 66 Tage (SD 74 Tage) um den Zeitraum der Blutentnahme für unsere Serumstudie. Der Median des FC lag bei 349,5 mg/L (90,75; 1491,0 mg/L). Die SC-Spiegel der CED-Patienten ($n=163$) zeigten eine hochsignifikante, positive Korrelation mit den Werten von FC ($r_s=0,37$; $p<0,0001$).

^a SC-Spiegel logarithmiert zur Herstellung normverteilter Residuen

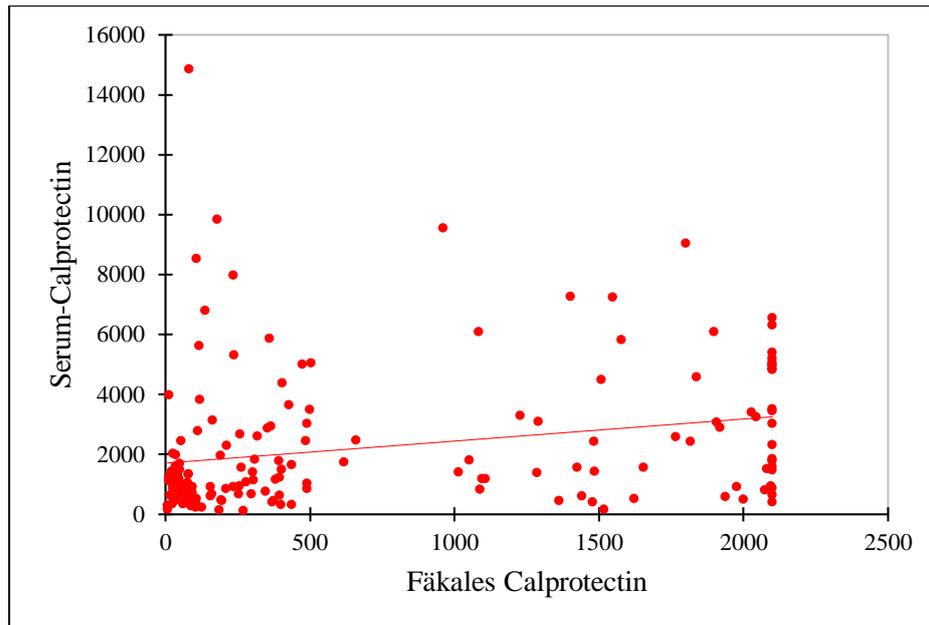


Abbildung 20: Spearman-Korrelation von Serum-Calprotectin (in ng/mL) mit fäkalem Calprotectin (in mg/L; $n=163$; $r_s=0,37$; $p<0,0001$)

Eine signifikante, positiv gerichtete Assoziation konnte auch im Zusammenhang mit den Werten von CRP, Leukozyten und Thrombozyten festgestellt werden. In Tabelle 22 sind die jeweiligen Korrelationskoeffizienten nach Spearman und die p-Werte zur Angabe der statistischen Signifikanz aufgeführt.

Tabelle 22: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse von SC im CED-Kollektiv mit den Parametern fäkales Calprotectin (FC), CRP, Leukozyten und Thrombozyten

Parameter	Median (Q1; Q3)	Spearman'scher Rangkorrelations- koeffizient r_s	p
FC (n=163, in mg/L)	349,5 (90,8; 1491,0)	0,37	<0,0001
CRP (n=250, in mg/dL)	0,3 (0,1; 0,8)	0,54	<0,0001
Leukozyten (n=250, in Giga/L)	0,9 (6,2; 9,3)	0,58	<0,0001
Thrombozyten (n=250, in Giga/L)	280 (234,25; 312,75)	0,29	<0,0001

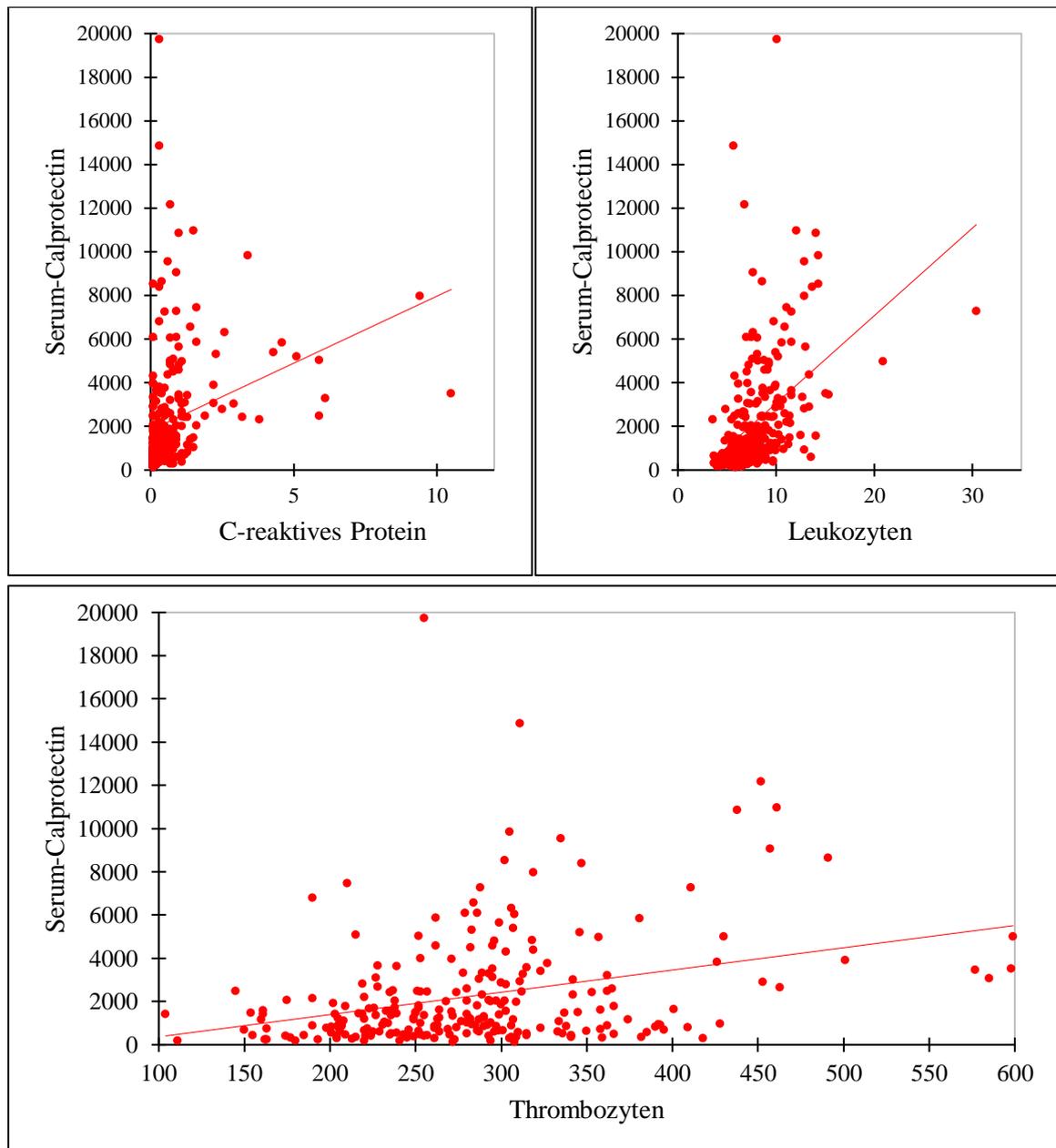


Abbildung 21: Korrelation von Serum-Calprotectin (in ng/mL) mit C-reaktivem Protein (in mg/dL; $n=250$; $r_s=0,54$; $p<0,0001$), Leukozyten (in Giga/L; $n=250$; $r_s=0,58$; $p<0,0001$) und Thrombozyten (in Giga/L; $n=250$; $r_s=0,29$; $p<0,0001$)

- Serum-Calprotectin und Einnahme von TNF- α -Hemmer Infliximab

Bei MC-Patienten konnte SC zusammen mit CRP als prognostischer Marker für eine Rezidiventwicklung nach Therapie mit Infliximab identifiziert werden.¹¹⁸ Deshalb analysierten wir zusätzlich die SC-Spiegel abhängig von der Einnahme von Infliximab zum Zeitpunkt der Blutentnahme.

Hier ergaben sich bei Betrachtung des gesamten CED-Kollektivs ($p < 0,0001$), ebenso nach Aufteilung in MC ($p = 0,001$) und CU ($p = 0,019$), signifikant niedrigere SC-Werte unter Einnahme von Infliximab.

Tabelle 23: SC in Abhängigkeit einer Infliximab-Therapie im CED- ($N=250$), MC- ($n=170$) und CU- ($n=80$)-Kollektiv

Kollektiv	Mediane (Q1; Q3) SC-Werte (in ng/mL) bei Patienten ohne Infliximab-Therapie	Mediane (Q1; Q3) SC-Werte (in ng/mL) bei Patienten mit Infliximab-Therapie	p^a
CED ($N=250$)	1789,9 (788,9; 3639,2) ($n=129$)	990,1 (558,1; 1985,1) ($n=121$)	<0,0001
- nur MC ($n=170$)	1687,0 (769,1; 3639,2) ($n=85$)	910,1 (515,1; 1914,7) ($n=85$)	0,001
- nur CU ($n=80$)	2229,9 (999,7; 3696,3) ($n=44$)	1041,8 (635,5; 2093,4) ($n=36$)	0,019

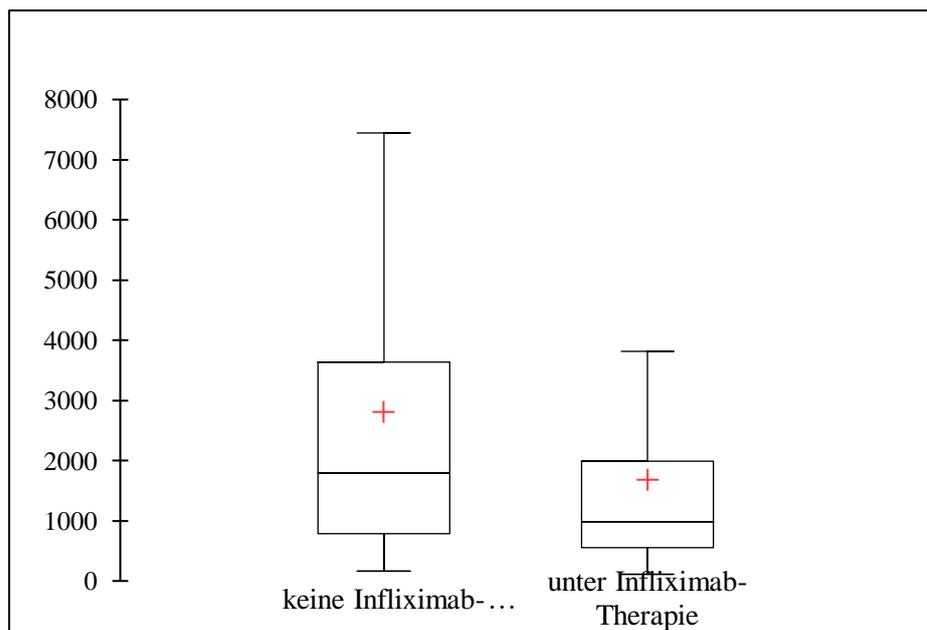


Abbildung 22: SC-Konzentrationen (in ng/mL) bei CED-Patienten ($N=250$) mit ($n=121$) und ohne ($n=129$) Infliximab-Therapie (Ausreißer ausgeblendet)

^a Vergleich der zwei Stichproben mittels T-Test bei normalverteilten oder Mann-Whitney-U-Test bei nicht normalverteilten metrischen Variablen

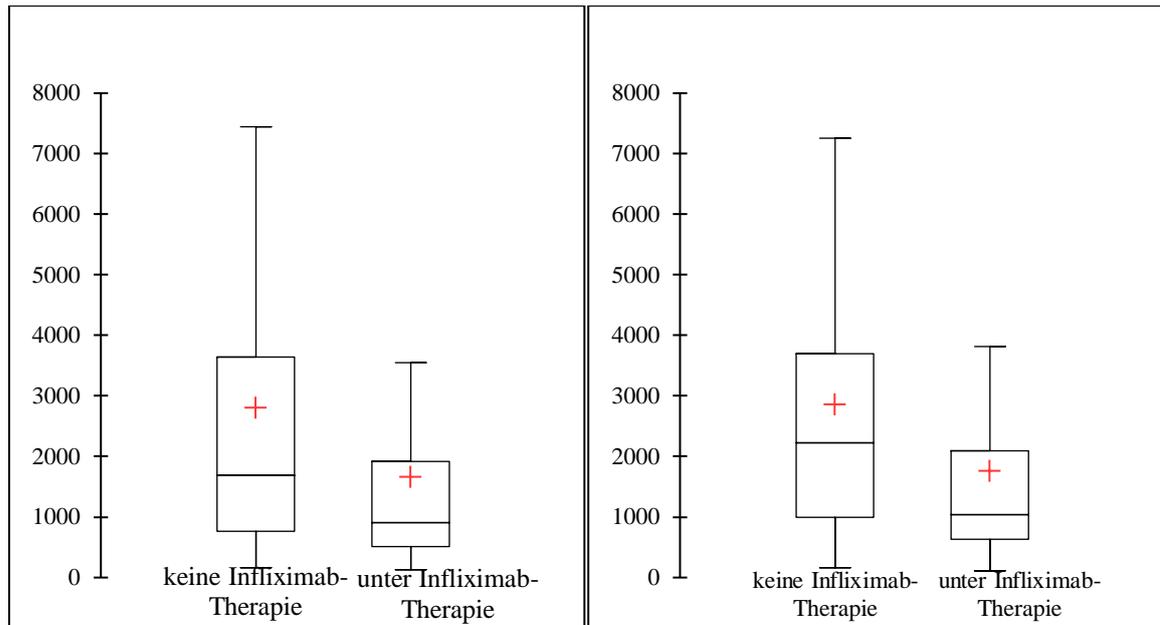


Abbildung 23: SC-Konzentrationen (in ng/mL) bei MC-Patienten (N=170) mit (n=85) und ohne (n=85) Infiximab-Therapie (links); CU-Patienten (N=80) mit (n=36) und ohne (n=44) Infiximab-Therapie (rechts) (Ausreißer ausgeblendet)

- Zusammenhang mit 25-(OH)-Vitamin D

Um den Zusammenhang mit Vitamin D näher zu charakterisieren, erfolgte die Unterteilung der Kollektive in 25(OH)D-defiziente (25(OH)D-Spiegel < 20 ng/mL) und 25(OH)D-suffiziente (25(OH)D-Spiegel \geq 20 ng/mL). Die einzelnen 25(OH)D-Spiegel in den jeweiligen Gruppen können in Tabelle 9 eingesehen werden.

Tabelle 24: Mediane SC-Konzentrationen bei CED-Patienten und bei gesunden Kontrollen (K), differenziert nach 25(OH)D-Defizienz und suffizienten 25(OH)D-Spiegeln

Kollektiv	Mediane (Q1; Q3) SC-Werte (in pg/mL) bei Patienten mit 25(OH)D-Defizienz	Mediane (Q1; Q3) SC-Werte (in pg/mL) bei Patienten mit suffizienten 25(OH)D-Spiegeln	p^a
CED (N=250)	1470,9 (642,4; 3261,7) (n=98)	1300,5 (656,7; 2699,2) (n=152)	0,50
CED aktiv (N=68)	1849,9 (937,5; 3815,7) (n=25)	2443,6 (1169,6; 5347,0) (n=43)	0,41
CED Remission (N=182)	1143,1 (615,0; 2808,3) (n=73)	1069,9 (558,1; 2033,9) (n=109)	0,20
MC (N=170)	1257,6 (613,2; 3221,0) (n=64)	1224,0 (637,4; 2460,5) (n=106)	0,45

^a Vergleich der zwei Stichproben mittels T-Test bei normalverteilten oder Mann-Whitney-U-Test bei nicht normalverteilten metrischen Variablen

MC aktiv (n=26)	2454,9 (1165,6; 4507,4) (n=6)	1617,2 (935,8; 5918,2) (n=20)	0,93
MC Remission (n=144)	1173,2 (595,6; 3102,5) (n=58)	1148,5 (544,3; 2051,5) (n=86)	0,29
CU (N=80)	1597,5 (676,3; 3110,7) (n=34)	1456,7 (724,8; 3022,7) (n=46)	0,90
CU aktiv (n=42)	1789,9 (1057,5; 3570,2) (n=19)	2578,1 (1472,0; 4937,1) (n=23)	0,29
CU Remission (n=38)	990,1 (687,6; 2033,3) (n=15)	862,6 (573,6; 1456,7) (n=23)	0,49
Kontrollen (N=60)	1352,1 (952,3; 1411,1) (n=5)	1337,3 (681,1; 2660,8) (n=55)	0,60

CED-Patienten mit Vitamin D-Defizienz zeigten in den Gruppen CED, CED Remission, MC und CU jeweils im Median höhere SC-Spiegel als Patienten mit ausreichenden 25(OH)D-Werten, jedoch ohne Nachweis einer statistischen Signifikanz. Bei CED-Patienten und CU-Patienten mit aktivem Krankheitsindex sowie bei den gesunden Kontrollen erwies sich dieser Unterschied als nicht signifikant entgegengesetzt.

- Zusammenhang mit 1,25-(OH)₂-Vitamin D

Eine etwaige Assoziation der SC-Spiegel mit den 1,25(OH)₂D-Werten wurde ähnlich zu vorherigen Analysen durch eine Spearman-Korrelationsanalyse ermittelt.

Tabelle 25: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse von SC mit 1,25(OH)₂D im CED- und Kontrollkollektiv (K)

Kollektiv	Median 1,25(OH)₂D (Q1; Q3) (in pg/mL)	Spearman'scher Rangkorrelations- koeffizient r_s	p
CED (N=250)	30,7 (23,1; 39,5)	-0,08	0,21
CED aktiv (n=68)	31,9 (24,3; 46,6)	-0,22	0,08
CED Remission (n=182)	30,1 (22,6; 38,3)	-0,07	0,33
MC (n=170)	30,2 (23,0; 39,5)	-0,10	0,22
MC aktiv (n=26)	31,6 (23,3; 59,1)	-0,34	0,09
MC Remission (n=144)	30,1 (22,9; 38,3)	-0,07	0,42
CU (n=80)	31,5 (24,0; 39,5)	-0,05	0,64
CU aktiv (n=42)	31,9 (25,2; 41,4)	-0,09	0,59
CU Remission (n=38)	29,0 (22,3; 38,1)	-0,06	0,72
Kontrollen (N=60)	24,0 (15,2; 34,9)	0,05	0,70

Bei den CED-Patienten zeigte sich auch bei Einzelbetrachtung der Krankheitsaktivitäten und der Entitäten MC und CU eine inverse Korrelation, bei

keiner Gruppe war eine statistische Signifikanz feststellbar. Innerhalb des gesunden Kontrollkollektivs konnte ein leicht positiver, nicht signifikanter Zusammenhang ermittelt werden.

4.3.4 Cathelicidin/ LL-37 und Vitamin D in den Kollektiven

- Serumkonzentrationen in Abhängigkeit von Krankheitsaktivität und Entität

Die medianen LL-37-Konzentrationen von CED-Patienten, aufgeteilt nach Krankheitsaktivität und Entität, sowie der Gruppe der gesunden Kontrollen sind in Tabelle 26 aufgelistet.

Tabelle 26: Vergleich der LL-37-Serumkonzentrationen in den einzelnen CED- und im Kontrollkollektiv (K)

LL-37-Konzentration im CED-Kollektiv Median (Q1; Q3) (in ng/mL)		LL-37-Konzentration im jeweiligen Kollektiv Median (Q1; Q3) (in ng/mL)		p^a
CED gesamt (N=250)	46,98 (35,67; 59,93)	K (n=60)	36,57 (31,57; 46,65)	<0,0001
CED aktiv (n=68)	50,28 (39,84; 64,24)	CED Remission	45,75 (34,56; 56,85)	0,03
CED aktiv (n=68)	50,28 (39,84; 64,24)	K	36,57 (31,57; 46,65)	<0,0001
CED Remission (n=182)	45,75 (34,56; 56,85)	K	36,57 (31,57; 46,65)	0,001
MC (n=170)	47,55 (35,50; 58,90)	CU	46,86 (36,04; 60,70)	0,86
MC (n=170)	47,55 (35,50; 58,90)	K	36,57 (31,57; 46,65)	0,0001
CU (n=80)	46,86 (36,04; 60,70)	K	36,57 (31,57; 46,65)	0,001
MC aktiv (n=26)	51,24 (41,11; 70,46)	MC Remission (n=144)	46,08 (34,78; 58,21)	0,14
CU aktiv (n=42)	49,45 (39,96; 62,65)	CU Remission (n=38)	44,29 (33,38; 52,36)	0,042

Bei CED-Patienten zeigten sich mit einem Median von 46,98 ng/mL signifikant höhere LL-37-Konzentrationen im Serum als bei den gesunden Kontrollen (Median: 36,57 ng/mL; $p < 0,0001$). Bei CED-Patienten mit aktiver Erkrankung (Median: 50,28 ng/ml; $p < 0,0001$) ergaben sich, ebenso wie CED-Patienten in Remission (Median: 45,75 ng/mL; $p = 0,001$), signifikant höhere LL-37-Werte als bei den

^a Vergleich der zwei Stichproben mittels Mann-Whitney-U-Test

Kontrollen. Zudem bestand ein signifikanter Unterschied innerhalb der Krankheitsaktivität mit höheren LL-37-Spiegeln bei CED aktiv im Vergleich zu CED Remission ($p=0,03$).

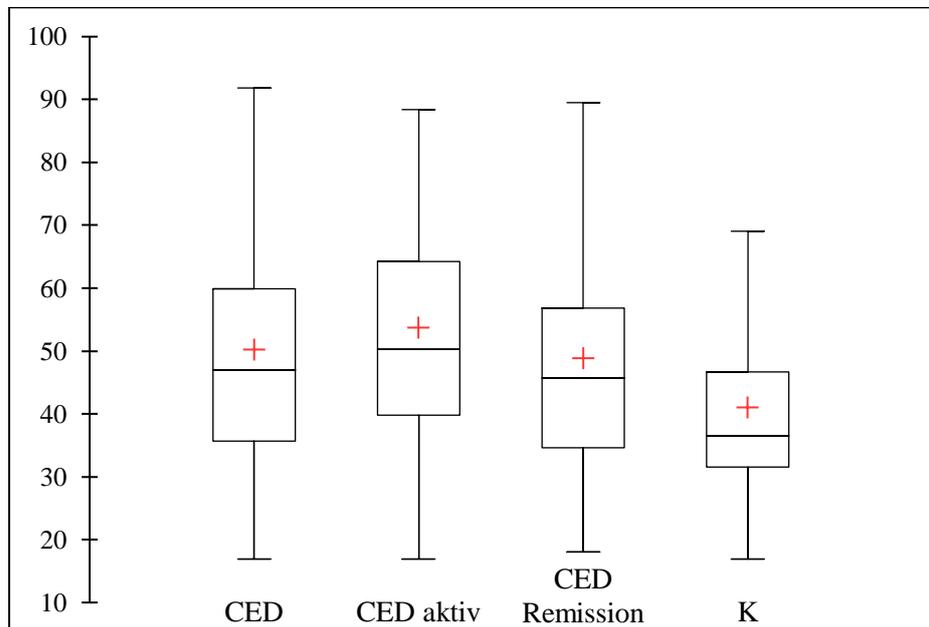


Abbildung 24: LL-37-Konzentrationen (in ng/mL) bei CED-Patienten ($N=250$) mit Differenzierung der Krankheitsaktivität im Vergleich zu gesunden Kontrollen (K) ($N=60$) (Ausreißer ausgeblendet)

Ein signifikanter Unterschied zum Kontrollkollektiv zeigte sich auch bei Unterteilung des CED-Kollektivs in die beiden Entitäten MC ($n=170$) und CU ($n=80$): MC-Patienten hatten mit einem Median von 47,55 ng/mL und CU-Patienten mit einem Median von 46,86 ng/mL signifikant höhere LL-37-Serumkonzentrationen ($p=0,0001$ bzw. $p=0,001$). Im Vergleich MC-CU konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($p=0,86$).

Bei weiterer Unterteilung der MC- und CU-Patienten nach Krankheitsaktivität zeigten sich im MC-Kollektiv nicht-signifikant höhere LL-37-Spiegel bei aktiver Erkrankung ($n=26$; Median: 51,24 ng/mL) im Vergleich zu MC-Patienten in Remission ($n=144$; Median: 46,08; $p=0,14$). Bei CU-Patienten ergab sich ein signifikanter Unterschied mit im Median ebenso höheren LL-37-Serumwerten bei aktiver Erkrankung ($n=42$; Median: 49,45 ng/mL) verglichen mit dem Kollektiv CU Remission ($n=38$; Median: 44,29 ng/mL; $p=0,042$).

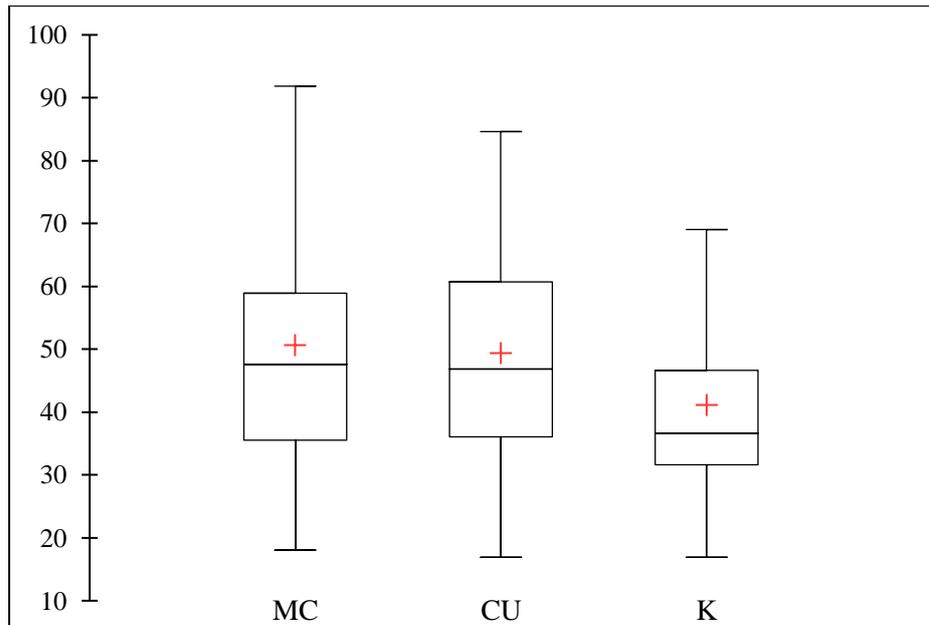


Abbildung 25: LL-37-Konzentrationen (in ng/mL) bei MC- (n=170) und CU-Patienten (n=80) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (K) (N=60) (Ausreißer ausgeblendet)

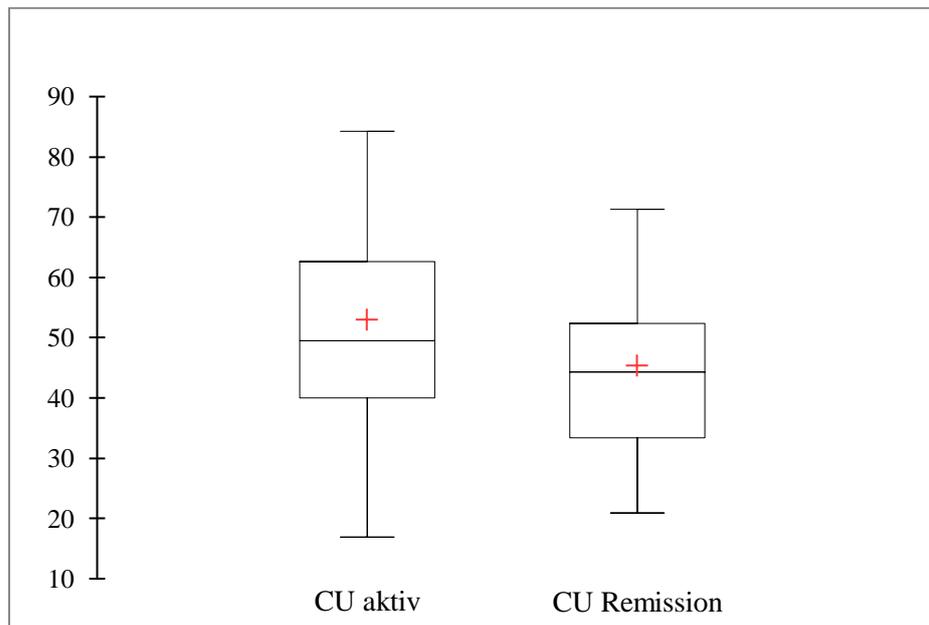


Abbildung 26: LL-37-Konzentrationen (in ng/mL) bei CU-Patienten (N=80) mit Krankheitsaktivität (n=43) im Vergleich zu CU-Patienten in Remission (n=38) (Ausreißer ausgeblendet)

- Korrelation zur Krankheitsaktivität

Im MC- und CU-Kollektiv erfolgte auch für LL-37 eine Korrelationsanalyse zu den absoluten Werten der Krankheitsaktivität nach CDAI für MC und CAI für CU. Eine signifikante, positive Assoziation konnte nur im CU-Kollektiv hergestellt werden.

Tabelle 27: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse der LL-37-Spiegel mit den absoluten CDAI- und CAI-Scores im MC- und CU-Kollektiv

Parameter	Mittelwert (SD)	Spearman'scher Rangkorrelations- koeffizient r_s	p
CDAI im MC-Kollektiv (n=170)	81 (83)	0,1	0,19
CAI im CU-Kollektiv (n=80)	4 (3)	0,22	0,046

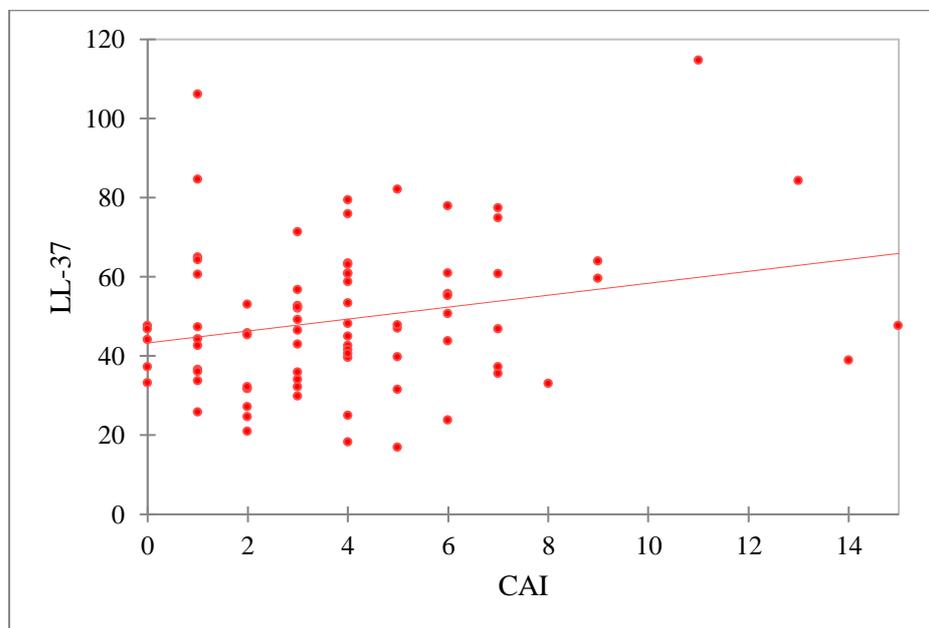


Abbildung 27: Spearman-Korrelation von LL-37 (in ng/mL) mit absoluten CAI-Werten innerhalb CU-Kollektivs (N=80; $r_s=0,22$; $p=0,046$)

Im univariaten linearen Modell ergab sich keine signifikante Assoziation der Krankheitsaktivität zu den LL-37-Spiegeln^a bei MC-Patienten. Bei CU-Patienten lag der Regressionskoeffizient knapp außerhalb des statistischen Signifikanzniveaus (im MC-Kollektiv: Regressionskoeffizient $B=0,110$; $SE=0,087$; $p=0,206$; im CU-Kollektiv: $B=0,141$; $SE=0,084$; $p=0,098$).

^a LL-37-Spiegel logarithmiert zur Herstellung normverteilter Residuen

- Vergleich von LL-37 mit fäkalem Calprotectin (FC) und weiteren klinischen Entzündungsindikatoren

Zur näheren Charakterisierung von LL-37 als Entzündungsindikator und Biomarker wurden die Werte für fäkales Calprotectin (bei n=163 der CED-Patienten bestimmt), CRP, Leukozyten und Thrombozyten durch eine Spearman-Korrelation mit den LL-37-Konzentrationen assoziiert. Für alle vier Parameter ergaben sich signifikante, positiv gerichtete Assoziationen, die Korrelationskoeffizienten sind Tabelle 28 aufgelistet.

Tabelle 28: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse von LL-37 im CED-Kollektiv mit den Parametern fäkales Calprotectin (FC), CRP, Leukozyten und Thrombozyten

Parameter	Median (Q1; Q3)	Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient r_s	p
FC (n=163, in mg/L)	349,5 (90,8; 1491,0)	0,38	<0,0001
CRP (n=250, in mg/dL)	0,3 (0,1; 0,8)	0,34	<0,0001
Leukozyten (n=250, in Giga/L)	0,9 (6,2; 9,3)	0,27	<0,0001
Thrombozyten (n=250, in Giga/L)	280 (234,25; 312,75)	0,13	0,045

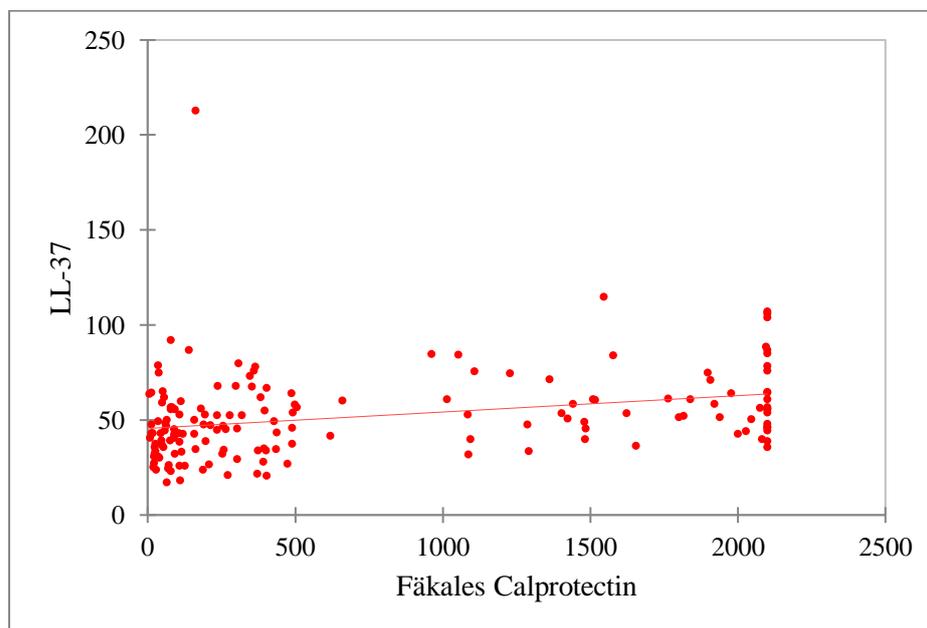


Abbildung 28: Spearman-Korrelation von LL-37 (in ng/mL) mit fäkalem Calprotectin (in mg/L; n=163; $r_s=0,38$; $p<0,0001$)

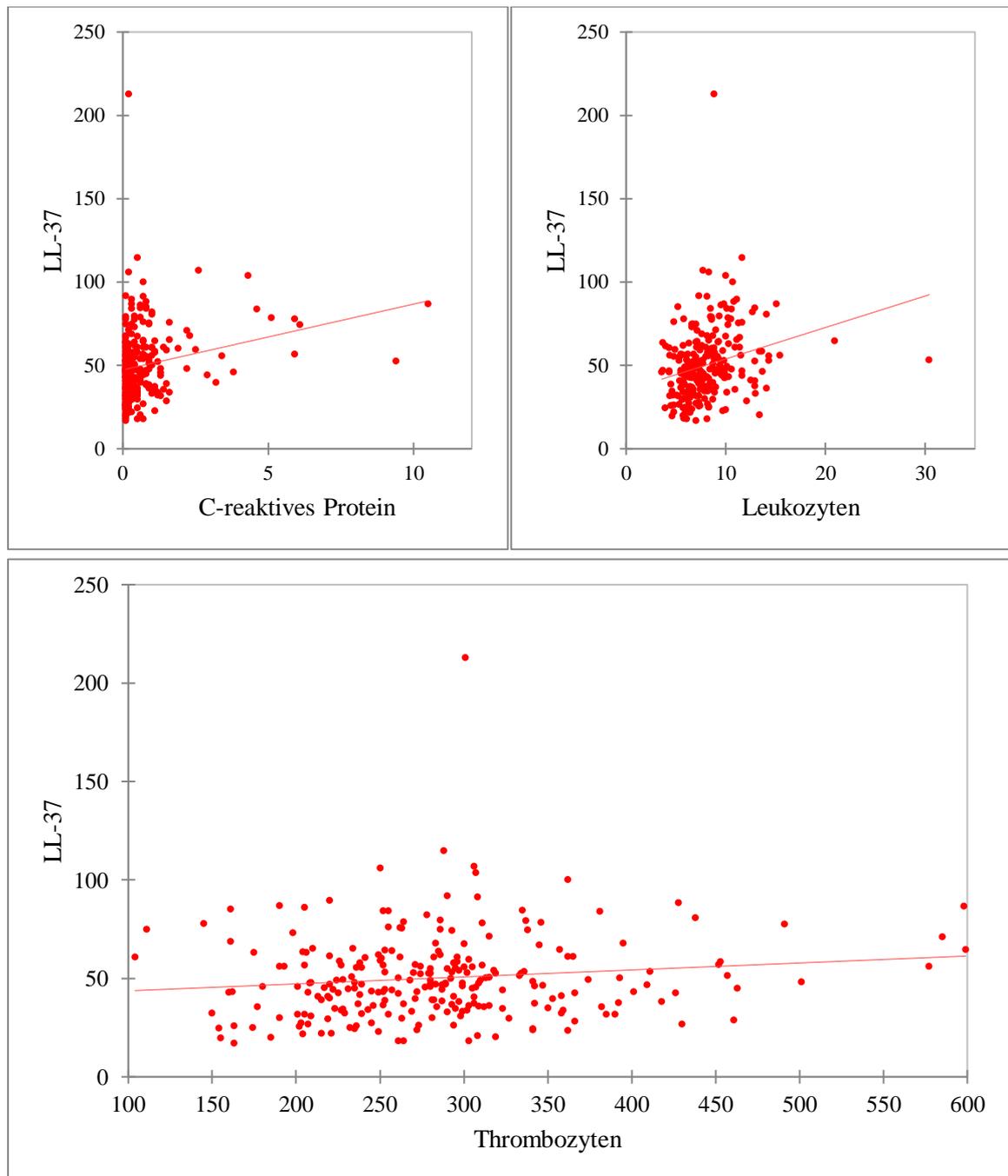


Abbildung 29: Korrelation von LL-37 (in ng/mL) mit C-reaktivem Protein (in mg/dL; $n=250$; $r_s=0,34$; $p<0,0001$), Leukozyten (in Giga/L; $n=250$; $r_s=0,27$; $p<0,0001$) und Thrombozyten (in Giga/L; $n=250$; $r_s=0,13$; $p=0,045$)

- LL-37 bei CED-Patienten mit Stenosierung

Aufgrund vorbeschrieben erhöhtem Risiko von intestinalen Strikturen bei MC-Patienten mit niedrigen LL-37-Spiegeln¹⁶⁰ analysierten wir die Daten zu Stenosen im MC- und CU-Kollektiv.

Innerhalb des MC-Kollektivs wiesen Patienten mit Stenose (n=72; Median: 49,2 ng/mL) höhere LL-37-Spiegel auf als MC-Patienten ohne Stenose in der Vorgeschichte (n=98; Median: 45,4 ng/mL; $p=0,048$). Innerhalb des CU-Kollektivs zeichneten sich entgegengesetzte Verhältnisse ab: Bei positiver Stenoseanamnese (n=5; Median: 27,2 ng/mL) ergaben sich signifikant niedrigere LL-37-Konzentrationen als bei CU-Patienten ohne vorbekannte Stenose (n=75; Median: 47,4 ng/mL; $p=0,004$).

Tabelle 29: Mediane LL-37-Konzentrationen im MC- (n=170) und CU-Kollektiv (n=80) in Abhängigkeit von vorbekannter Stenose

Kollektiv	Mediane (Q1; Q3) LL-37-Werte (in ng/mL) in den CED-Kollektiven ohne Stenose	Mediane (Q1; Q3) LL-37-Werte (in ng/mL) in den CED-Kollektiven mit Stenose	p^a
MC (n=170)	45,4 (33,7; 56,8) (n=98)	49,2 (39,2; 67,0) (n=72)	0,048
CU (n=80)	47,4 (38,1; 60,8) (n=75)	27,2 (25,1; 33,3) (n=5)	0,004

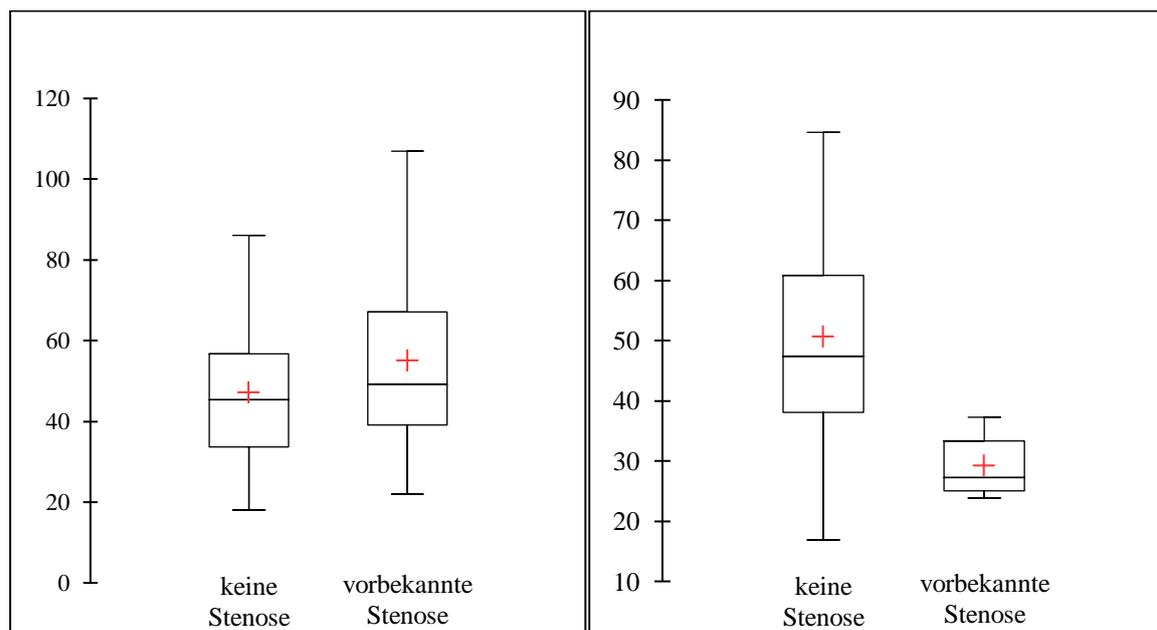


Abbildung 30: LL-37-Konzentrationen (in ng/mL) bei MC-Patienten (N=170) mit (n=72) und ohne (n=98) vorbekannter Stenose sowie bei CU-Patienten (N=80) mit (n=5) und ohne (n=75) vorbekannter Stenose (Ausreißer jeweils ausgeblendet)

^a Vergleich der zwei Stichproben mittels Mann-Whitney-U-Test

- LL-37 und Einnahme von TNF- α -Hemmer Infliximab

Bei CU-Patienten mit Therapieansprechen auf den TNF- α -Blocker Infliximab konnte eine Abnahme der LL-37-Serumkonzentrationen nachgewiesen werden.¹⁶⁴ Wir analysierten die LL-37-Spiegel abhängig von der Einnahme von Infliximab zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Hier ergaben sich bei Betrachtung des gesamten CED-Kollektivs signifikant geringere LL-37-Werte unter Einnahme von Infliximab ($p=0,042$). Dieser Unterschied erwies sich bei weiterer Unterteilung nach Entität nur im CU-Kollektiv als signifikant ($p=0,027$).

Tabelle 30: LL-37 in Abhängigkeit einer Infliximab-Therapie im CED- (N=250), MC- (n=170) und CU-Kollektiv (n=80)

Kollektiv	Mediane (Q1; Q3) LL-37-Werte (in ng/mL) bei Patienten ohne Infliximab-Therapie	Mediane (Q1; Q3) LL-37-Werte (in ng/mL) bei Patienten mit Infliximab-Therapie	p^a
CED (N=250)	50,1 (37,0; 63,2) (n=129)	44,7 (34,7; 56,0) (n=121)	0,042
- MC (n=170)	50,1 (34,6; 64,4) (n=85)	45,7 (36,0; 57,7) (n=85)	0,31
MC aktiv (n=26)	55,7 (36,5; 75,8) (n=21)	46,9 (46,6; 49,3) (n=5)	0,66
MC Remission (n=144)	49,2 (34,5; 60,2) (n=64)	45,0 (35,6; 57,7) (n=80)	0,59
- CU (n=80)	49,4 (42,4; 61,5) (n=44)	41,2 (32,8; 53,4) (n=36)	0,027
CU aktiv (n=42)	55,7 (41,6; 63,9) (n=29)	45,0 (39,6; 55,2) (n=13)	0,17
CU Remission (n=38)	46,6 (42,8; 52,3) (n=15)	36,6 (32,2; 50,9) (n=23)	0,31

^a Vergleich der zwei Stichproben mittels Mann-Whitney-U-Test

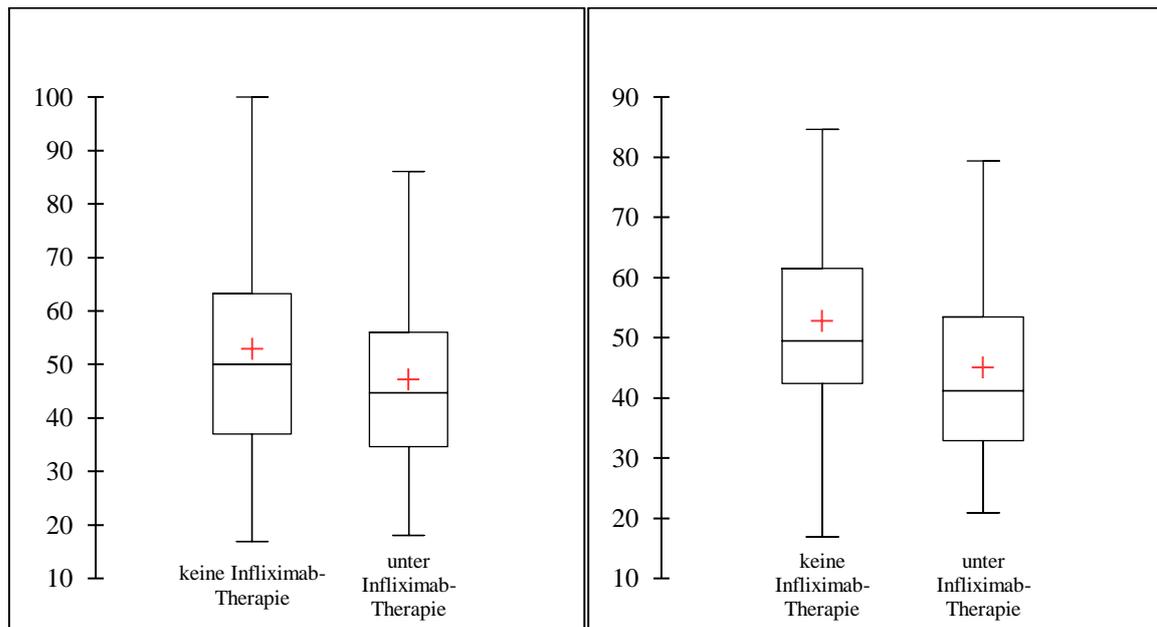


Abbildung 31: LL-37-Konzentrationen (in ng/mL) links bei CED-Patienten (N=250) mit (n=121) und ohne (n=129) Infliximab-Therapie, rechts bei CU-Patienten (N=80) mit (n=36) und ohne (n=44) Infliximab-Therapie (Ausreißer ausgeblendet)

- Zusammenhang mit 25-(OH)-Vitamin D

Zur Auswertung des Zusammenhangs mit Vitamin D erfolgte auch für LL-37 die Unterteilung der CED-Patienten und der Kontrollgruppe in Vitamin D-defiziente und Vitamin D-suffiziente. Die medianen LL-37-Konzentrationen in den einzelnen Kollektiven und die ermittelten p-Werte können in Tabelle 31 eingesehen werden.

Tabelle 31: Mediane LL-37-Konzentrationen bei CED-Patienten und bei gesunden Kontrollen (K), differenziert nach 25(OH)D-Defizienz und suffizienten 25(OH)D-Spiegeln

Kollektiv	Mediane (Q1; Q3) LL-37-Werte (in pg/mL) bei Patienten mit 25(OH)D-Defizienz	Mediane (Q1; Q3) LL-37-Werte (in pg/mL) bei Patienten mit suffizienten 25(OH)D-Spiegeln	p ^a
CED (N=250)	47,15 (38,23; 60,85) (n=98)	46,69 (34,46; 58,45) (n=152)	0,30
CED aktiv (N=68)	55,23 (46,57; 74,83) (n=25)	48,86 (38,10; 62,27) (n=43)	0,32
CED Remission (N=182)	46,08 (36,96; 57,71) (n=73)	45,67 (32,20; 56,57) (n=109)	0,46

^a Vergleich der zwei Stichproben mittels T-Test bei normalverteilten oder Mann-Whitney-U-Test bei nicht normalverteilten metrischen Variablen

MC (N=170)	46,08 (37,49; 58,04) (n=64)	48,95 (34,63; 59,90) (n=106)	0,95
MC aktiv (n=26)	51,28 (46,65; 67,18) (n=6)	51,24 (39,04; 70,50) (n=20)	0,98
MC Remission (n=144)	45,20 (37,13; 57,71) (n=58)	47,96 (34,30; 58,37) (n=86)	0,93
CU (N=80)	47,82 (40,44; 64,59) (n=34)	44,05 (32,41; 55,15) (n=46)	0,04
CU aktiv (n=42)	55,23 (44,76; 75,40) (n=19)	47,05 (38,10; 60,83) (n=23)	0,18
CU Remission (n=38)	46,81 (36,64; 56,88) (n=15)	42,68 (31,84; 50,61) (n=23)	0,068
Kontrollen (N=60)	48,62 (40,52; 52,16) (n=5)	35,86 (31,57; 44,01) (n=55)	0,14

Die Analyse der Daten ergab, dass CED-Patienten (N=250) mit 25(OH)D-Mangel (n=98) höhere LL-37-Serumkonzentrationen (Median: 47,15 ng/mL) aufwiesen als diejenigen mit ausreichenden Vitamin D-Spiegeln im Blut (n=152; Median: 46,69 ng/mL). Eine statistische Signifikanz konnte nicht festgestellt werden ($p=0,30$). Dieser Unterschied erwies sich auch bei differenzierter Betrachtung der Krankheitsaktivität als nicht signifikant. CED-Patienten mit aktiver Erkrankung (N=68) hatten bei Vitamin D-Mangel (n=25) mit einem Median von 55,23 ng/mL höhere LL-37-Spiegel als CED-aktive Patienten mit suffizienten 25(OH)D-Werten (n=43; Median: 48,86 ng/mL; $p=0,32$). CED-Patienten in Remission (N=182) zeigten bei Vitamin D-Mangel im Serum (n=73) mit einem Median von 46,08 ng/mL ebenso höhere LL-37-Konzentrationen als die Vitamin D-suffizienten CED-Patienten in Remission (n=109; Median: 45,67 ng/mL; $p=0,46$).

Durch Unterteilung der CED-Patienten in MC und CU wurde ersichtlich, dass CU-Patienten (N=80) bei Vitamin D-Defizienz (n=34) signifikant höhere LL-37-Serumkonzentrationen (Median: 47,82 ng/mL) aufwiesen als Vitamin D-suffiziente (n=46; Median: 44,05 ng/mL; $p=0,04$). Bei MC-Patienten (N=170) zeigten sich als einzige Subgruppe bei 25(OH)D-Mangel (n=64) niedrigere LL-37-Serumspiegel (Median: 46,08 ng/mL) als MC-Patienten mit ausreichenden 25(OH)D-Werten (n=106; Median: 48,95 ng/mL; $p=0,95$). Die weitere Unterteilung des MC- und CU-Kollektivs nach Krankheitsaktivität erbrachte keine statistisch signifikanten Unterschiede. Der Vergleich innerhalb der gesunden Kontrollgruppe (N=60) erwies sich ebenso als statistisch nicht signifikant ($p=0,14$): Bei 25(OH)D-defizienten Probanden (n=5) zeigten sich höhere LL-37-Konzentrationen (Median: 48,62 ng/mL) als bei 25(OH)D-suffizienten Probanden (n=55; Median: 35,86 ng/mL).

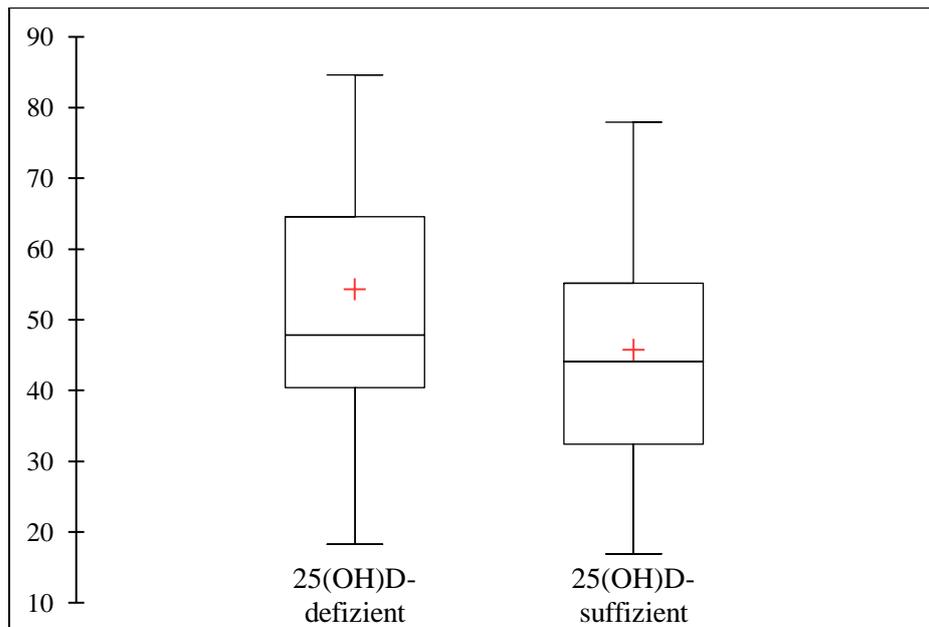


Abbildung 32: LL-37-Konzentrationen (in ng/mL) bei CU-Patienten (N=80) mit 25(OH)D-Mangel (n=34) und ausreichenden 25(OH)D-Spiegeln (n=46) ($p=0,04$) (Ausreißer ausgeblendet)

- Zusammenhang mit 1,25-(OH)₂-Vitamin D

Der Zusammenhang der LL-37-Konzentrationen mit 1,25(OH)₂D, der aktiven Form des Vitamin D, wurde mit einer Spearman-Korrelation analysiert.

Tabelle 32: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse von LL-37 mit 1,25(OH)₂D im CED- und Kontrollkollektiv (K)

Kollektiv	Median 1,25(OH) ₂ D (Q1; Q3) (in pg/mL)	Spearman'scher Rangkorrelations- koeffizient r_s	p
CED (N=250)	30,7 (23,1; 39,5)	-0,15	0,02
CED aktiv (n=68)	31,9 (24,3; 46,6)	-0,19	0,12
CED Remission (n=182)	30,1 (22,6; 38,3)	-0,17	0,02
MC (n=170)	30,2 (23,0; 39,5)	-0,14	0,07
MC aktiv (n=26)	31,6 (23,3; 59,1)	-0,30	0,14
MC Remission (n=144)	30,1 (22,9; 38,3)	-0,11	0,18
CU (n=80)	31,5 (24,0; 39,5)	-0,19	0,10
CU aktiv (n=42)	31,9 (25,2; 41,4)	-0,07	0,66
CU Remission (n=38)	29,0 (22,3; 38,1)	-0,45	0,004
Kontrollen (N=60)	24,0 (15,2; 34,9)	-0,17	0,20

Die LL-37-Spiegel korrelierten sowohl bei CED-Patienten als auch bei gesunden Probanden invers mit den 1,25(OH)₂D -Spiegeln. So gingen höhere 1,25(OH)₂D-Spiegel im Serum mit niedrigeren LL-37-Werten einher, was sich bei CED-Patienten, der Kohorte der CED-Patienten in Remission und CU-Patienten in

Remission als statistisch signifikant erwies. Bei den Gruppen CED aktiv, MC, CU und der Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

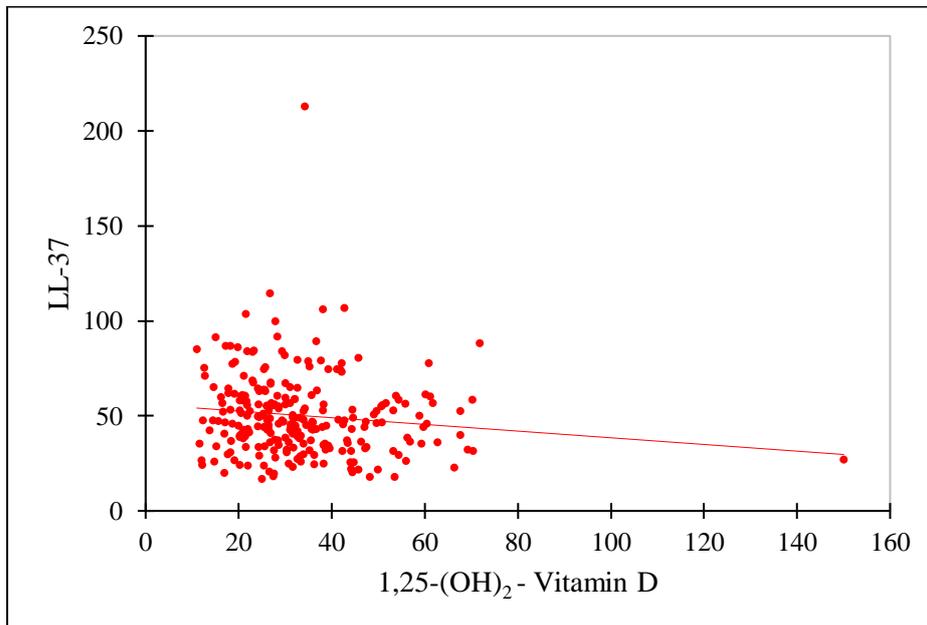


Abbildung 33: Spearman-Korrelation von LL-37 (in ng/mL) mit 1,25(OH)₂D (in pg/mL) bei CED-Patienten (N=250; $r_s=-0,15$; $p=0,02$)

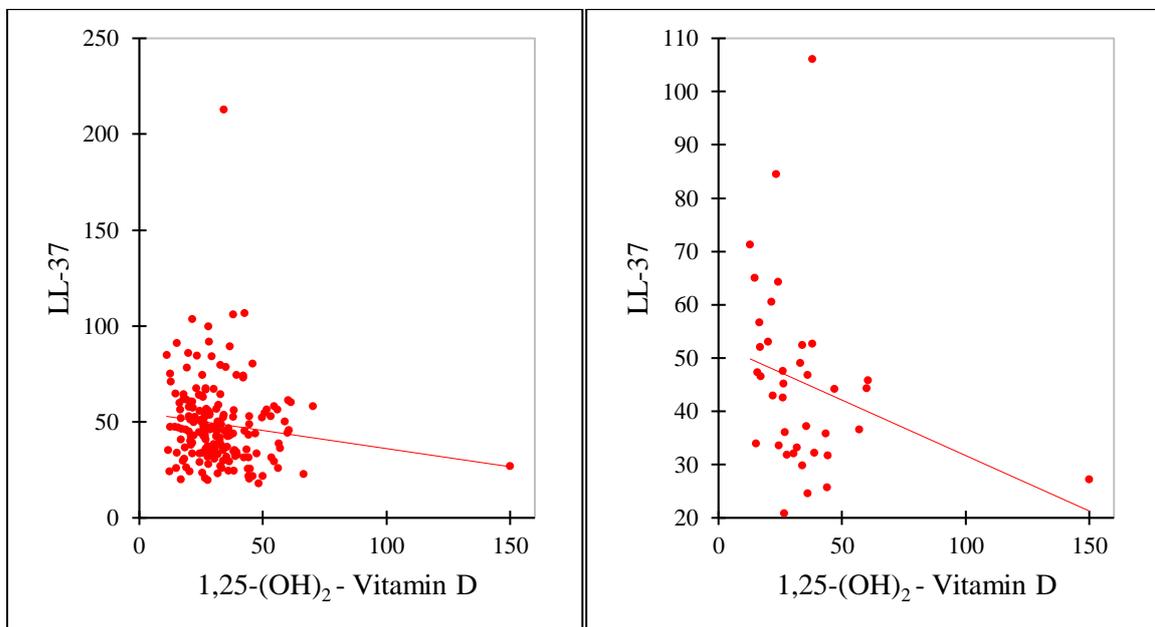


Abbildung 34: Spearman-Korrelation von LL-37 (in ng/mL) mit 1,25(OH)₂D (in pg/mL) bei CED-Patienten in Remission ($n=182$; $r_s=-0,17$; $p=0,02$) und bei CU-Patienten in Remission ($n=38$; $r_s=-0,45$; $p=0,004$)

4.3.5 Humanes beta-Defensin 2 (HBD-2) und Vitamin D in den Kollektiven

- Serumkonzentrationen in Abhängigkeit von Krankheitsaktivität und Entität

In Tabelle 33 können die gemessenen HBD-2-Konzentrationen im CED-Kollektiv mit sowohl Aufteilung in Krankheitsaktivität aktiv bzw. Remission als auch in Entität MC und CU eingesehen werden. Zum Vergleich sind auch die ermittelten Konzentrationen der Kontrollgruppe angegeben.

Tabelle 33: Vergleich der HBD-2-Serumkonzentrationen in den einzelnen CED- und im Kontrollkollektiv (K)

HBD-2-Konzentration im CED-Kollektiv Median (Q1; Q3) (in pg/mL)		HBD-2-Konzentration im jeweiligen Kollektiv Median (Q1; Q3) (in pg/mL)		p^a
CED gesamt (N=250)	7177,7 (3125,3; 19149,3)	K (n=60)	8145,2 (3267,2; 21441,3)	0,74
CED aktiv (n=68)	6822,5 (3484,3; 22659,5)	CED Remission	7177,7 (3009,4; 18397,8)	0,59
CED aktiv (n=68)	6822,5 (3484,3; 22659,5)	K	8145,2 (3267,2; 21441,3)	0,94
CED Remission (n=182)	7177,7 (3009,4; 18397,8)	K	8145,2 (3267,2; 21441,3)	0,64
MC (n=170)	7177,7 (3488,5; 17868,3)	CU	7018,0 (2962,9; 27443,0)	0,59
MC (n=170)	7177,7 (3488,5; 17868,3)	K	8145,2 (3267,2; 21441,3)	0,66
CU (n=80)	7018,0 (2962,9; 27443,0)	K	8145,2 (3267,2; 21441,3)	0,94
MC aktiv (n=26)	6200,7 (3401,8; 16310,3)	MC Remission (n=144)	7239,5 (3491,4; 18157,3)	0,66
CU aktiv (n=42)	8463,2 (3943,0; 30615,0)	CU Remission (n=38)	6741,4 (2070,1; 19269,0)	0,52

Die Analyse der HBD-2-Konzentrationen zeigte, dass zwischen CED-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe kein statistisch feststellbarer Unterschied bestand. CED-Patienten hatten mit einem Median von 7177,7 pg/mL ($p=0,74$), genauso wie CED-Patienten mit aktiver Erkrankung (Median: 6822,5 pg/mL; $p=0,94$) und CED-Patienten in Remission (Median: 7177,7 pg/mL; $p=0,64$) niedrigere HBD-2-Spiegel als die Kontrollgruppe mit einem Median von 8145,2 pg/mL. Zwischen CED-

^a Vergleich der zwei Stichproben mittels Mann-Whitney-U-Test

Patienten mit aktiver Erkrankung und CED-Patienten in Remission war kein signifikanter Unterschied feststellbar ($p=0,59$).

Die Differenzierung der CED-Patienten nach Entität zeigte, dass auch MC-Patienten mit einem Median von 7177,8 ng/mL ($p=0,66$), ebenso wie CU-Patienten (Median 7018,0 pg/mL; $p=0,94$), zwar niedrigere HBD-2-Konzentrationen als die Kontrollen aufwiesen, jedoch kein statistisch feststellbarer Unterschied bestand. Der Vergleich MC-CU ergab ebenso nicht signifikante Disparitäten ($p=0,59$). Die weitere Unterteilung des MC- und CU-Kollektivs nach Krankheitsaktivität zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede (MC aktiv-MC Remission: $p=0,66$; CU aktiv-CU Remission: $p=0,52$).

- Korrelation zur Krankheitsaktivität

Im Rahmen der Korrelationsanalyse der HBD-2-Serumkonzentrationen mit den absoluten Werten der Krankheitsaktivität (CDAI für MC, CAI für CU) zeichnete sich keine signifikante Assoziation ab.

Tabelle 34: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse der HBD-2-Spiegel mit den absoluten CDAI- und CAI-Scores im MC- und CU-Kollektiv

Parameter	Mittelwert (SD)	Spearman'scher Rangkorrelations- koeffizient r_s	p
CDAI im MC-Kollektiv (n=170)	81 (83)	-0,02	0,77
CAI im CU-Kollektiv (n=80)	4 (3)	-0,19	0,77

Im univariaten linearen Modell ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und den HBD-2-Werten^a (im MC-Kollektiv Regressionskoeffizient $B=-0,024$; $SE=0,32$; $p=0,941$; im CU-Kollektiv: $B=0,363$; $SE=0,377$; $p=0,339$).

- Vergleich von HBD-2 mit fäkalem Calprotectin (FC) und weiteren klinischen Entzündungsindikatoren

Eine Assoziation von HBD-2 mit klinischen Entzündungsparametern wie FC, CRP, Leukozyten und Thrombozyten konnte in Spearman-Korrelationsanalysen nicht nachgewiesen werden.

^a HBD-2-Spiegel logarithmiert zur Herstellung normverteilter Residuen

Tabelle 35: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse von HBD-2 im CED-Kollektiv mit den Parametern fäkales Calprotectin (FC), CRP, Leukozyten und Thrombozyten

Parameter	Median (Q1; Q3)	Spearman'scher Rangkorrelations- koeffizient r_s	p
FC (n=163, in mg/L)	349,5 (90,8; 1491,0)	0,10	0,22
CRP (n=250, in mg/dL)	0,3 (0,1; 0,8)	-0,01	0,85
Leukozyten (n=250, in Giga/L)	0,9 (6,2; 9,3)	-0,08	0,21
Thrombozyten (n=250, in Giga/L)	280 (234,25; 312,75)	-0,08	0,20

- Zusammenhang mit 25-(OH)-Vitamin D

Zur Assoziation der HBD-2-Spiegel mit dem Vitamin D-Status wurde auch hier das CED- und Kontrollkollektiv in Patienten mit Vitamin D-Mangel (25(OH)D < 20 ng/mL) und Patienten mit suffizienten 25(OH)D-Spiegeln (≥ 20 ng/mL) unterteilt. Dies erfolgte auch in den nach Krankheitsaktivität und Entität aufgeteilten Kollektiven.

Tabelle 36: Mediane HBD-2-Konzentrationen bei CED-Patienten und bei gesunden Kontrollen (K), differenziert nach 25(OH)D-Defizienz und suffizienten 25(OH)D-Spiegeln

Kollektiv	Mediane (Q1; Q3) HBD- 2-Werte (in pg/mL) bei Patienten mit 25(OH)D- Defizienz	Mediane (Q1; Q3) HBD-2-Werte (in pg/mL) bei Patienten mit suffizienten 25(OH)D-Spiegeln	p^a
CED (N=250)	6565,4 (2936,4; 19417,3) (n=98)	7397,3 (3455,4; 19105,8) (n=152)	0,67
CED aktiv (N=68)	5461,5 (3829,1; 44854,0) (n=25)	7397,3 (3443,0; 18079,5) (n=43)	0,89
CED Remission (N=182)	6637,9 (2764,9; 17616,0) (n=73)	7397,3 (3487,0; 20956,0) (n=109)	0,56
MC (N=170)	6565,4 (2689,1; 15447,0) (n=64)	7397,3 (3552,1; 19081,0) (n=106)	0,38
MC aktiv (n=26)	12275,7 (1381,5; 53287,3) (n=6)	6200,7 (3484,3; 13023,0) (n=20)	0,88
MC Remission (n=144)	6565,4 (2709,1; 13971,3) (n=58)	7999,2 (3695,4; 21864,3) (n=86)	0,27
CU (N=80)	6176,9 (3925,1; 35403,5) (n=34)	7375,6 (2358,8; 21291,8) (n=46)	0,82

^a Vergleich der zwei Stichproben mittels Mann-Whitney-U-Test

CU aktiv (n=42)	5461,5 (4103,4; 38527,5) (n=19)	12540,0 (3722,2; 24058,5) (n=23)	0,84
CU Remission (n=38)	6719,2 (3594,7; 28094,0) (n=15)	6763,6 (1999,2; 9686,6) (n=23)	0,65
Kontrollen (N=60)	6665,7 (3280,1; 7026,1) (n=5)	8316,2 (3288,7; 23511,5) (n=55)	0,41

Die Auswertung zeigte, dass bei allen CED-Kollektiven, mit Ausnahme der Gruppe der aktiv erkrankten MC-Patienten im Median höhere HBD-2-Konzentrationen bei suffizienter Vitamin D-Versorgung vorlagen. Dies war auch bei der gesunden Kontrollgruppe feststellbar. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte weder im CED- noch im Kontrollkollektiv ermittelt werden.

- Zusammenhang mit 1,25-(OH)₂-Vitamin D

Die Rangkorrelationskoeffizienten und zugehörigen p-Werte der Korrelationsanalyse der HBD-2-Spiegel und dem aktiven 1,25(OH)₂D können in Tabelle 37 eingesehen werden.

Tabelle 37: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse von LL-37 mit 1,25(OH)₂D im CED- und Kontrollkollektiv (K)

Kollektiv	Median 1,25(OH) ₂ D (Q1; Q3) (in ng/mL)	Spearman'scher Rangkorrelations- koeffizient r _s	p
CED (N=250)	30,7 (23,1; 39,5)	-0,05	0,41
CED aktiv (n=68)	31,9 (24,3; 46,6)	-0,14	0,24
CED Remission (n=182)	30,1 (22,6; 38,3)	-0,03	0,73
MC (n=170)	30,2 (23,0; 39,5)	-0,11	0,15
MC aktiv (n=26)	31,6 (23,3; 59,1)	-0,30	0,14
MC Remission (n=144)	30,1 (22,9; 38,3)	-0,06	0,46
CU (n=80)	31,5 (24,0; 39,5)	0,05	0,67
CU aktiv (n=42)	31,9 (25,2; 41,4)	-0,08	0,64
CU Remission (n=38)	29,0 (22,3; 38,1)	0,12	0,47
Kontrollen (N=60)	24,0 (15,2; 34,9)	0,16	0,21

Die Korrelation mit 1,25(OH)₂D erwies sich in keiner Gruppe als statistisch signifikant. Bei Betrachtung des kompletten CED-Kollektivs zeigte sich eine schwach negative Korrelation, genauso bei Einzelbetrachtung der CED-Patienten mit aktivem Krankheitszustand bzw. Erkrankung in Remission. Bei Differenzierung nach MC und CU war dieser inverse Zusammenhang nur bei MC-Patienten vorhanden, bei CU-Patienten war mit Ausnahme der aktiv Erkrankten eine schwach positive Assoziation nachweisbar. Innerhalb des gesunden Kollektivs ergab sich ebenso eine nicht signifikante, positive Korrelation.

4.3.6 Regressionsanalyse der Serum-Biomarker und Vitamin D-Parameter in den einzelnen Studienkohorten

4.3.6.1 Assoziation des Vitamin D-Haushalts zu den Spiegeln der Serumparameter

Die in o.g. Korrelations- und nicht-parametrischen Tests ausgewerteten Serummarker wurden mittels eines multiplen linearen Modells unter Einbezug von Kovariaten untersucht, um mögliche Störgrößen aus dem Modell zu entfernen. Nach Analyse einer univariaten Assoziation des Vitamin D-Haushalts als unabhängige Variable auf die vier gemessenen Serumparameter, demnach abhängigen Variablen, erfolgte eine multiple, lineare Regression unter Einbezug von Kovariablen. Im Gesamtkollektiv aus CED-Erkrankten und gesunden Kontrollen mit N=310 wurde dieses Modell auf die Kovariablen Alter, Geschlecht, BMI, Raucher, Vitamin D-Supplementation und Erkrankung kontrolliert. In den CED-Kollektiven (n=250) mit MC- (n=170) und CU-Kollektiv (n=80) wurden die Kovariablen Alter, Geschlecht, Raucherstatus, Vitamin D-Supplementation, BMI, Krankheitsaktivität und CRP, im Kontrollkollektiv die Variablen Alter, Geschlecht, Raucherstatus, BMI und Vitamin D-Supplementation mit einbezogen. Bei den abhängigen Zielvariablen CCL20, SC, LL-37 und HBD-2 erfolgten logarithmische Datentransformationen zur Herstellung normalverteilter Residuen, um die Voraussetzung für die uni- und multivariaten Regressionsmodelle zu erfüllen. Einzelne Beobachtungen mussten bei fehlenden Daten zum Raucherstatus entfernt werden, dies ist in den Fußnoten entsprechend gekennzeichnet. Die Ergebnisse der Analysen sind den Tabellen 38 bis 42 aufgelistet.

Im Gesamtkollektiv (N=310) aus CED-Erkrankten (n=250) und Gesunden (n=60) zeigten sich bei Probanden mit Hypovitaminose D ≤ 20 ng/mL signifikant höhere Serumspiegel des proinflammatorischen Chemokins CCL20 (B=0,236; SE=0,082; $p=0,004$). Diese signifikante Assoziation bestand auch nach Korrektur auf potenzielle Confounder im multivariaten Modell (B=0,210; SE=0,088; $p=0,019$). Für das aktive 1,25(OH)₂D war im Gesamtkollektiv unter Berücksichtigung der Kovariablen ein signifikanter, negativer Zusammenhang zum CCL20 nachweisbar (B= -0,0051; SE=0,0025; $p=0,044$). Diese Assoziationen zum 1,25(OH)₂D ließen sich bei weiteren Analysen innerhalb des CED-Kollektivs nur für die CU-Patienten bestätigen. Hier gingen uni- und multivariat betrachtet höhere 1,25(OH)₂D-Serumspiegel mit niedrigeren CCL20-Konzentrationen einher (univariat: B= -0,007; SE=0,003; $p=0,040$; multivariat: B= -0,008; SE=0,004; $p=0,023$). Ein Vitamin D-Mangel war bei CU-Patienten im multivariaten Modell mit höheren CCL20-Spiegeln assoziiert (B=0,315; SE=0,148; $p=0,037$). Im Kontrollkollektiv zeigte sich multivariat betrachtet eine signifikant negative Assoziation der 25(OH)D-Spiegel zu

den CCL20-Serumparametern ($B = -0,023$; $SE = 0,010$; $p = 0,025$), hinsichtlich der 1,25(OH)2D-Werte ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge. Bei gesunden Probanden mit Vitamin D-Mangel waren univariat signifikant höhere CCL20-Spiegel nachweisbar ($B = 0,861$; $SE = 0,393$; $p = 0,033$), multivariat erwiesen sich die Werte als knapp außerhalb des festgelegten Signifikanzniveaus ($B = 0,789$; $SE = 0,402$; $p = 0,055$).

Für das Cathelicidin LL-37 zeigte sich im Gesamtkollektiv eine positive Assoziation zum Vitamin D-Mangel ($B = 0,098$; $SE = 0,047$; $p = 0,039$), die bei multivariater Analyse nicht signifikant blieb ($p = 0,288$). Nur im CU-Kollektiv ergaben sich ähnliche Zusammenhänge, auch hier ließ sich nur univariat betrachtet eine signifikante, positive Assoziation zur dichotomen Variable Vitamin D-Mangel nachweisen ($B = 0,169$; $SE = 0,084$; $p = 0,049$). Im CED-Kollektiv gingen in uni- und multivariaten Analysen zudem höhere 1,25(OH)2D-Spiegel mit niedrigeren LL-37-Konzentrationen einher (univariat: $B = -0,004$; $SE = 0,002$; $p = 0,024$; multivariat: $B = -0,004$; $SE = 0,002$; $p = 0,018$), im CU-Kollektiv blieb dieser Zusammenhang knapp außerhalb des statistischen Signifikanzniveaus ($p = 0,078$ bzw. $p = 0,052$). Innerhalb der MC-Patienten sowie des gesunden Probandenkollektivs ergaben sich keine signifikanten Assoziationen.

Hinsichtlich der SC- und HBD-2-Konzentrationen konnten keine konsistenten Assoziationen zu den Vitamin D-Parametern festgestellt werden, die Analysen blieben in allen Kollektiven außerhalb des statistischen Signifikanzniveaus.

Insgesamt zeigte sich, dass vor allem bei CU-Patienten für das proinflammatorische Chemokin CCL20 multivariat betrachtet signifikante Assoziationen zu den Vitamin D-Parametern bestanden. Für das Cathelicidin LL-37 konnte in den multivariaten Modellen im CED-Kollektiv ein signifikant negativ gerichteter Zusammenhang zum 1,25(OH)2D hergestellt werden, in allen anderen Kollektiven zum Teil knapp außerhalb des statistischen Signifikanzniveaus.

Die Ergebnisse der Regressionsanalysen zu CCL20 wurden teils vorab in einem Kongressmanuskript veröffentlicht (siehe Kapitel 13 Publikationsliste).

- Multiple lineare Regressionsanalysen im Gesamtkollektiv (N=310)

Tabelle 38: Multiple lineare Regressionsanalyse im Gesamtkollektiv (N=310) mit Vitamin D als unabhängige Variable und den logarithmierten Serumparametern als abhängige Variablen unter Einbezug unten angegebener Kovariablen

Abhängige Variable (log):	25(OH)D als unabhängige Variable					
	Univariat			Multivariat ^a		
	Koeffizient	SE	<i>p</i>	Koeffizient	SE	<i>p</i>
CCL20	-0,004	0,004	0,278	0,00064	0,0037	0,864
SC	-0,004	0,005	0,472	-0,0032	0,0057	0,578
LL-37	-0,004	0,002	0,083	-0,00083	0,0022	0,698
HBD-2	0,003	0,008	0,704	0,0026	0,0082	0,754
	1,25(OH)2D als unabhängige Variable					
CCL20	-0,002	0,002	0,353	-0,0051	0,0025	0,044
SC	-0,002	0,004	0,593	-0,0023	0,0039	0,563
LL-37	-0,002	0,001	0,131	-0,0028	0,0015	0,057
HBD-2	-0,001	0,005	0,972	0,00017	0,0056	0,976
	Vitamin D-Mangel (ja/nein) als unabhängige Variable					
CCL20	0,236	0,082	0,004	0,210	0,089	0,019
SC	0,065	0,122	0,594	0,085	0,137	0,534
LL-37	0,098	0,047	0,039	0,055	0,052	0,288
HBD-2	-0,102	0,183	0,578	-0,072	0,198	0,715

Kovariablen im multivariaten Modell: Alter, Geschlecht, Raucherstatus, BMI, Vitamin D-Supplementation, Erkrankung

^a 22 Beobachtungen bei fehlenden Daten zum Raucherstatus entfernt

- Multiple lineare Regressionsanalysen im CED-Kollektiv (n=250)

Tabelle 39: Multiple lineare Regressionsanalyse im CED-Kollektiv (n=250) mit Vitamin D als unabhängige Variable und den logarithmierten Serumparametern als abhängige Variablen unter Einbezug unten angegebener Kovariablen

Abhängige Variable (log):	25(OH)D als unabhängige Variable					
	Univariat			Multivariat ^a		
	Koeffizient	SE	p	Koeffizient	SE	p
CCL20	-0,003	0,004	0,422	-0,004	0,004	0,338
SC	-0,005	0,006	0,430	-0,005	0,006	0,448
LL-37	-0,005	0,002	0,067	-0,003	0,003	0,184
HBD-2	-0,004	0,010	0,704	-0,002	0,010	0,820
	1,25(OH)2D als unabhängige Variable					
CCL20	-0,003	0,002	0,226	-0,004	0,003	0,094
SC	-0,003	0,004	0,454	-0,005	0,004	0,201
LL-37	-0,004	0,002	0,024	-0,004	0,002	0,018
HBD-2	-0,004	0,007	0,536	-0,004	0,007	0,577
	Vitamin D-Mangel (ja/nein) als unabhängige Variable					
CCL20	0,083	0,077	0,282	0,117	0,085	0,170
SC	0,093	0,133	0,484	0,073	0,136	0,593
LL-37	0,054	0,052	0,294	0,026	0,055	0,636
HBD-2	-0,061	0,203	0,764	-0,041	0,214	0,846

Kovariablen im multivariaten Modell: Alter, Geschlecht, Raucherstatus, BMI, Vitamin D-Supplementation, Krankheitsaktivität, CRP

^a 22 Beobachtungen bei fehlenden Daten zum Raucherstatus entfernt

- Multiple lineare Regressionsanalysen im MC-Kollektiv (n=170)

Tabelle 40: Multiple lineare Regressionsanalyse im MC-Kollektiv (n=170) mit Vitamin D als unabhängige Variable und den logarithmierten Serumparametern als abhängige Variablen unter Einbezug unten angegebener Kovariablen

Abhängige Variable (log):	25(OH)D als unabhängige Variable					
	Univariat			Multivariat ^a		
	Koeffizient	SE	p	Koeffizient	SE	p
CCL20	-0,002	0,005	0,686	-0,003	0,005	0,583
SC	-0,007	0,008	0,355	-0,005	0,008	0,516
LL-37	-0,003	0,003	0,324	-0,002	0,003	0,496
HBD-2	0,004	0,011	0,746	0,001	0,012	0,921
	1,25(OH)2D als unabhängige Variable					
CCL20	0,0003	0,003	0,937	-0,002	0,004	0,626
SC	-0,006	0,006	0,331	-0,010	0,006	0,079
LL-37	-0,003	0,002	0,138	-0,004	0,002	0,125
HBD-2	-0,009	0,008	0,270	-0,011	0,009	0,191
	Vitamin D-Mangel (ja/nein) als unabhängige Variable					
CCL20	0,016	0,098	0,874	0,058	0,109	0,595
SC	0,139	0,162	0,392	0,106	0,171	0,537
LL-37	-0,001	0,065	0,988	-0,015	0,068	0,822
HBD-2	-0,124	0,240	0,607	-0,012	0,257	0,962

Kovariablen im multivariaten Modell: Alter, Geschlecht, Raucherstatus, BMI, Vitamin D-Supplementation, Krankheitsaktivität, CRP

^a 13 Beobachtungen bei fehlenden Daten zum Raucherstatus entfernt

- Multiple lineare Regressionsanalysen im CU-Kollektiv (n=80)

Tabelle 41: Multiple lineare Regressionsanalyse im CU-Kollektiv (n=80) mit Vitamin D als unabhängige Variable und den logarithmierten Serumparametern als abhängige Variablen unter Einbezug unten angegebener Kovariablen

Abhängige Variable (log):	25(OH)D als unabhängige Variable					
	Univariat			Multivariat ^a		
	Koeffizient	SE	p	Koeffizient	SE	p
CCL20	-0,006	0,006	0,384	-0,006	0,007	0,370
SC	0,0001	0,012	0,992	-0,004	0,012	0,720
LL-37	-0,008	0,004	0,059	-0,006	0,005	0,229
HBD-2	-0,019	0,019	0,314	0,004	0,020	0,827
	1,25(OH)2D als unabhängige Variable					
CCL20	-0,007	0,003	0,040	-0,008	0,004	0,023
SC	0,0005	0,006	0,942	0,0002	0,006	0,969
LL-37	-0,004	0,002	0,078	-0,005	0,002	0,052
HBD-2	0,002	0,011	0,817	0,002	0,010	0,876
	Vitamin D-Mangel (ja/nein) als unabhängige Variable					
CCL20	0,222	0,125	0,079	0,315	0,148	0,037
SC	-0,017	0,234	0,941	0,030	0,255	0,905
LL-37	0,169	0,084	0,049	0,178	0,103	0,088
HBD-2	0,040	0,383	0,918	-0,157	0,420	0,709

Kovariablen im multivariaten Modell: Alter, Geschlecht, Raucherstatus, BMI, Vitamin D-Supplementation, Krankheitsaktivität, CRP

^a 9 Beobachtungen bei fehlenden Daten zum Raucherstatus entfernt

- Multiple lineare Regressionsanalysen im Kontrollkollektiv (N=60)

Tabelle 42: Multiple lineare Regressionsanalyse im Kontrollkollektiv (N=60) mit Vitamin D als unabhängige Variable und den logarithmierten Serumparametern als abhängige Variablen unter Einbezug unten angegebener Kovariablen

Abhängige Variable (log):	25(OH)D als unabhängige Variable					
	Univariat			Multivariat		
	Koeffizient	SE	<i>p</i>	Koeffizient	SE	<i>p</i>
CCL20	-0,013	0,009	0,157	-0,023	0,010	0,025
SC	0,001	0,010	0,940	0,00020	0,012	0,986
LL-37	0,006	0,004	0,089	0,0074	0,0039	0,062
HBD-2	0,021	0,014	0,136	0,010	0,015	0,495
	1,25(OH)2D als unabhängige Variable					
CCL20	-0,010	0,007	0,127	-0,0081	0,0071	0,258
SC	0,001	0,007	0,872	0,0014	0,0080	0,859
LL-37	-0,001	0,003	0,758	0,00029	0,0028	0,916
HBD-2	0,013	0,010	0,211	0,0047	0,010	0,643
	Vitamin D-Mangel (ja/nein) als unabhängige Variable					
CCL20	0,861	0,393	0,033	0,789	0,402	0,055
SC	-0,387	0,435	0,378	-0,342	0,465	0,466
LL-37	0,155	0,160	0,337	0,120	0,160	0,457
HBD-2	-0,550	0,608	0,370	-0,427	0,585	0,469

Kovariablen im multivariaten Modell: Alter, Geschlecht, Raucherstatus, BMI, Vitamin D-Supplementation

4.3.6.2 HBD-2-Serumspiegel in Abhängigkeit vom NOD2-Mutationsstatus

In der univariaten linearen Regression zeigte sich kein signifikanter Einfluss der NOD2-Mutation R702w auf die gemessenen HBD2-Konzentrationen (im CED-Kollektiv: Regressionskoeffizient $B=-0,237$; $SE=0,268$; $p=0,379$ / im MC-Kollektiv: $B=-0,261$; $SE=0,285$; $p=0,361$). Aktives 1,25(OH)2D induziert das mit MC assoziierte NOD2-Gen in Monozyten und Epithelzellen durch distale Enhancer und führt synergistisch mit bakteriellen Abbauprodukten (MDP) zu einer signifikanten Expressionssteigerung von HBD-2. Wang *et al.* stellten fest, dass dieser synergistische Mechanismus in Makrophagen mit einer R702w-NOD2-Mutation nicht vorhanden ist.⁸⁹ Das CED-Kollektiv wies $n=32$ (14%) mutierte, das MC-Kollektiv $n=28$ (17%) mutierte Patienten auf (siehe Tabelle 6). Eine homozygote Mutation lag bei $n=2$ (7%) der mutierten MC-Patienten vor. In den nicht-parametrischen Tests ergaben sich zwar im Median niedrigere HBD-2-Spiegel bei homozygoter HBD-2-Mutation, bei geringer Fallzahl ($n=2$) blieben die Analysen allerdings außerhalb des statistischen Signifikanzniveaus.

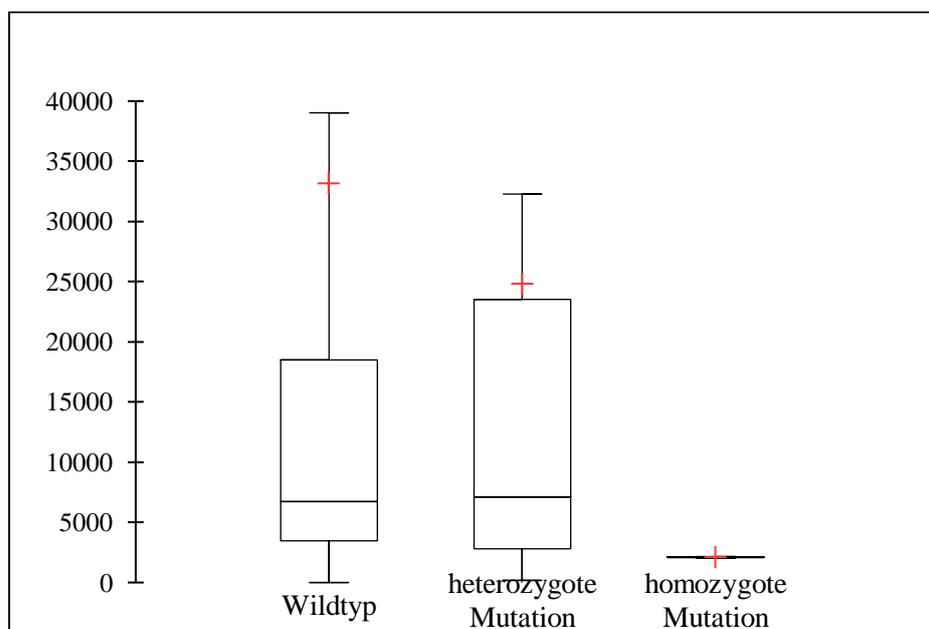


Abbildung 35: HBD-2-Spiegel (in pg/mL) im CED-Kollektiv mit Wildtyp R702w-Status ($n=198$), heterozygoter R702w-Mutation ($n=30$) und homozygoter R702w-Mutation ($n=2$) (nicht signifikante Unterschiede)

In einem multivariaten Modell sollte daher überprüft werden, ob bei NOD2-mutierten CED- und MC-Patienten höhere Vitamin D-Spiegel anders als bei Patienten ohne eine Mutation nicht mit höheren HBD-2-Spiegeln assoziiert sind. Die Assoziation des 25(OH)D, 1,25(OH)2D und des Vitamin D-Mangels (dichotome Variable) zu den HBD-2-Serumspiegeln (durch Logarithmieren in Normalverteilung gebracht) sollte in einem multivariaten Modell, korrigiert auf die Confounder Alter, Geschlecht, Raucherstatus, Vitamin D-Supplementation, BMI,

Krankheitsaktivität und dem CRP-Spiegel, dargestellt werden. Einzelne Beobachtungen mussten bei fehlenden Daten zum Raucherstatus entfernt werden, dies ist in den Fußnoten entsprechend gekennzeichnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 43 und Tabelle 44 aufgelistet.

In den multivariaten Modellen ließen sich keine signifikanten Assoziationen der einzelnen Vitamin D-Parameter zu den HBD-2-Serumkonzentrationen herstellen. Die Analysen ergaben inkonsistente Zusammenhänge.

Tabelle 43: Multiple lineare Regressionsanalyse im NOD2-mutierten und nicht mutierten CED-Kollektiv mit den Vitamin D-Serumparametern als unabhängige Variable und den logarithmierten HBD-2-Spiegeln als abhängige Variablen unter Einbezug unten angegebener Kovariablen

	CED-Kollektiv R702w-Mutation (n=32) ^a		CED-Kollektiv Wildtyp (n=198) ^b	
	Koeffizient (SE)	<i>p</i>	Koeffizient (SE)	<i>p</i>
25(OH)D als unabhängige Variable				
Abhängige Variable (log): HBD-2	0,006 (0,026)	0,810	0 (0,012)	0,978
1,25(OH)2D als unabhängige Variable				
	0 (0,027)	0,992	-0,001 (0,007)	0,848
Vitamin D-Mangel (ja/nein) als unabhängige Variable				
	0,360 (0,777)	0,648	-0,175 (0,237)	0,461

Kovariablen im multivariaten Modell: Alter, Geschlecht, Raucherstatus, BMI, Vitamin D-Supplementation, Krankheitsaktivität, CRP

Tabelle 44: Multiple lineare Regressionsanalyse im NOD2-mutierten und nicht mutierten MC-Kollektiv mit den Vitamin D-Serumparametern als unabhängige Variable und den logarithmierten HBD-2-Spiegeln als abhängige Variablen unter Einbezug unten angegebener Kovariablen

	MC-Kollektiv R702w-Mutation (n=28) ^c		MC-Kollektiv Wildtyp (n=136) ^d	
	Koeffizient (SE)	<i>p</i>	Koeffizient (SE)	<i>p</i>
25(OH)D als unabhängige Variable				
Abhängige Variable (log): HBD-2	0,003 (0,026)	0,901	0,005 (0,016)	0,740
1,25(OH)2D als unabhängige Variable				
	-0,005 (0,027)	0,870	-0,011 (0,010)	0,309
Vitamin D-Mangel (ja/nein) als unabhängige Variable				
	0,453 (0,813)	0,585	-0,156 (0,282)	0,580

Kovariablen im multivariaten Modell: Alter, Geschlecht, Raucherstatus, BMI, Vitamin D-Supplementation, Krankheitsaktivität, CRP

^a 3 Beobachtungen bei fehlenden Daten zum Raucherstatus entfernt

^b 16 Beobachtungen bei fehlenden Daten zum Raucherstatus entfernt

^c 2 Beobachtungen bei fehlenden Daten zum Raucherstatus entfernt

^d 10 Beobachtungen bei fehlenden Daten zum Raucherstatus entfernt

4.3.7 ROC-Analysen der Serum-Biomarker als Erkrankungs- oder Aktivitätsmarker

Mittels ROC-Analysen sollte die diagnostische Qualität der einzelnen Serumparameter als Indikatoren für eine CED-Erkrankung oder als Marker für die Entzündungsaktivität evaluiert werden.

Für die ROC-Berechnungen wurden die Serumbiomarker CCL20, SC, LL-37 und HBD-2 als Testvariablen und die Erkrankung sowie die Krankheitsaktivität als dichotome Zustandsvariablen verwendet. Die AUC ist mit jeweiligem *Cut-off*-Wert, Standardfehler und dem Konfidenzintervall in untenstehenden Tabellen angegeben. Die Auswertungen erfolgten für die Erkrankungsmarker bei N=310 für den Test CED-Gesund, bei n=230 für den Test MC-Gesund und bei n=140 für den Test CU-Gesund. Die Berechnungen für die Qualität als Krankheitsaktivitätsmarker wurden bei N=250 für das CED-Kollektiv, bei n=170 für das MC-Kollektiv und bei n=80 für das CU-Kollektiv durchgeführt.

4.3.7.1 Serum-Biomarker als Indikator für Erkrankung

- Erkrankungsmarker für das CED-Kollektiv

Die ROC-Analyse ergab für CCL20 mit einer AUC=0,649 ($p=0,001$) und LL-37 mit einer AUC=0,667 ($p<0,0001$) einen signifikanten Unterschied zur diagonalen Bezugslinie und der AUC von 0,5. Für SC und HBD-2 konnte die Nullhypothese der wahrscheinlichen AUC<0,5 nicht abgelehnt werden.

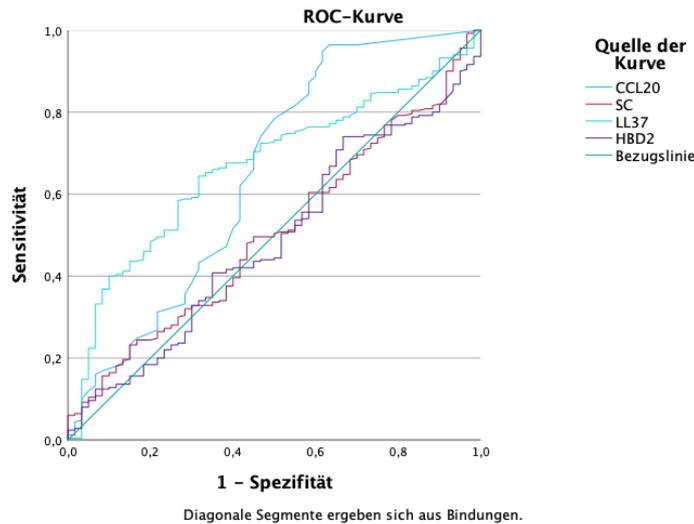


Abbildung 36: ROC-Kurve der Serumparameter als Indikator für eine CED-Erkrankung

Tabelle 45: ROC-Analyse der Serumparameter als Indikatoren für eine CED-Erkrankung mit Angabe des Cut-off-Werts, der Area under the curve (AUC) sowie Sensitivität und Spezifität mit Konfidenzintervallen (KI)

Parameter mit Cut-off Level	AUC (SE; 95% KI)	Sensitivität (95% KI)	Spezifität (95% KI)	<i>p</i>
CCL20 ≥ 3,726 pg/mL	0,649 (0,05; 0,56-0,74)	0,54 (0,47-0,60)	0,58 (0,46-0,70)	0,001
SC ≥ 1337,3 ng/mL	0,504 (0,04; 0,43-0,58)	0,50 (0,44-0,57)	0,50 (0,38-0,62)	0,923
LL-37 ≥ 41,157 ng/mL	0,667 (0,04; 0,60-0,74)	0,64 (0,58-0,70)	0,68 (0,56-0,79)	<0,0001
HBD-2 ≥ 6665,7 pg/mL	0,486 (0,04; 0,41-0,57)	0,52 (0,46-0,59)	0,450 (0,33-0,58)	0,725

- Erkrankungsmarker für das MC-Kollektiv

Die ROC-Analyse innerhalb des MC-Kollektivs (n=170) ergab für CCL20 mit einer AUC=0,652 ($p=0,001$) und LL-37 mit einer AUC=0,665 ($p<0,0001$) einen signifikanten Unterschied zur diagonalen Bezugslinie und der AUC von 0,5. Für SC und HBD-2 konnte die Nullhypothese der wahrscheinlichen AUC<0,5 nicht abgelehnt werden.

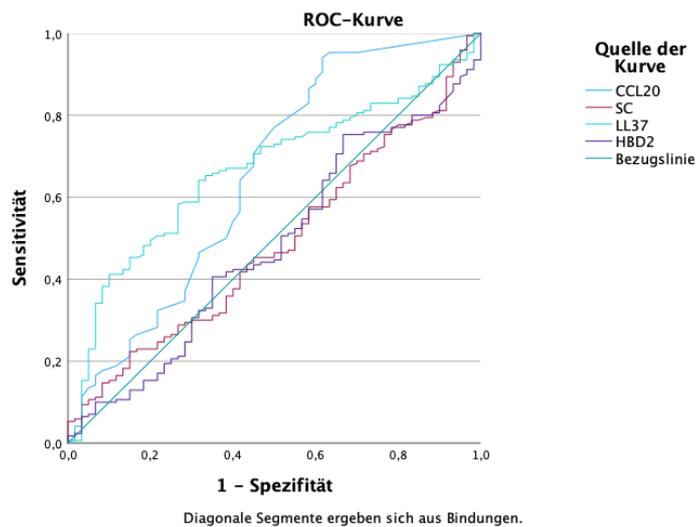


Abbildung 37: ROC-Kurve der Serumparameter als Indikator für eine MC-Erkrankung

Tabelle 46: ROC-Analyse der Serumparameter als Indikatoren für eine MC-Erkrankung mit Angabe des Cut-off-Werts, der Area under the curve (AUC) sowie Sensitivität und Spezifität mit Konfidenzintervallen (KI)

Parameter mit Cut-off Level	AUC (SE; 95% KI)	Sensitivität (95% KI)	Spezifität (95% KI)	p
CCL20 ≥ 2,864 pg/mL	0,652 (0,05; 0,56-0,74)	0,64 (0,57-0,71)	0,58 (0,46-0,70)	0,001
SC ≥ 1307,8 ng/mL	0,487 (0,04; 0,41-0,57)	0,47 (0,40-0,55)	0,47 (0,35-0,59)	0,748
LL-37 ≥ 41,157 ng/mL	0,665 (0,04; 0,59-0,74)	0,64 (0,57-0,71)	0,68 (0,56-0,79)	<0,0001
HBD-2 ≥ 6665,7 pg/mL	0,481 (0,04; 0,40-0,57)	0,52 (0,45-0,60)	0,45 (0,33-0,58)	0,660

- Erkrankungsmarker für das CU-Kollektiv

Innerhalb des CU-Kollektivs (n=80) ergab sich in den ROC-Berechnungen für CCL20 mit einer AUC=0,643 ($p=0,005$) und LL-37 mit einer AUC=0,671 ($p<0,0001$) ein signifikanter Unterschied zur diagonalen Bezugslinie und der AUC von 0,5. Für SC und HBD-2 konnte die Nullhypothese der wahrscheinlichen AUC<0,5 nicht abgelehnt werden.

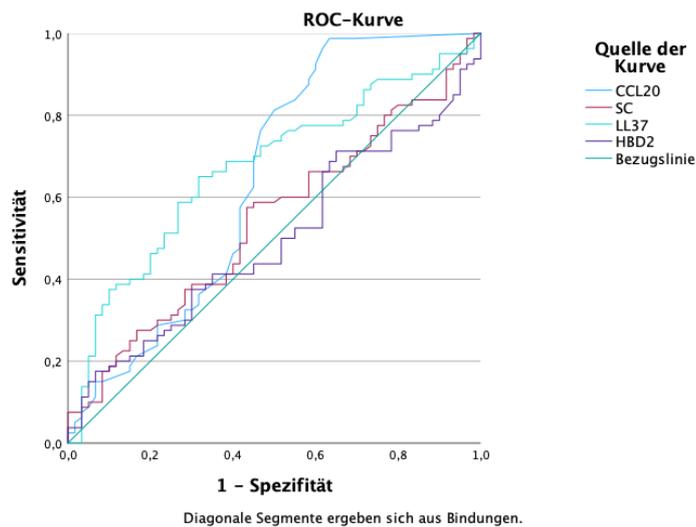


Abbildung 38: ROC-Kurve der Serumparameter als Indikator für eine CU-Erkrankung

Tabelle 47: ROC-Analyse der Serumparameter als Indikatoren für eine CU-Erkrankung mit Angabe des Cut-off-Werts, der Area under the curve (AUC) sowie Sensitivität und Spezifität mit Konfidenzintervallen (KI)

Parameter mit Cut-off Level	AUC (SE; 95% KI)	Sensitivität (95% KI)	Spezifität (95% KI)	p
CCL20 ≥ 2,656 pg/mL	0,643 (0,05; 0,54-0,74)	0,63 (0,52-0,72)	0,55 (0,43-0,67)	0,005
SC ≥ 1411,1 ng/mL	0,540 (0,05; 0,45-0,64)	0,58 (0,47-0,68)	0,57 (0,44-0,68)	0,408
LL-37 ≥ 41,157 ng/mL	0,671 (0,05; 0,58-0,76)	0,65 (0,54-0,75)	0,68 (0,56-0,79)	0,0001
HBD-2 ≥ 6665,7 pg/mL	0,496 (0,05; 0,40-0,59)	0,53 (0,42-0,63)	0,45 (0,33-0,58)	0,939

4.3.7.2 Serum-Biomarker als Krankheitsaktivitätsmarker

Mittels ROC-Analysen sollte zudem die diagnostische Qualität der einzelnen Serumparameter als Krankheitsaktivitätsmarker ermittelt werden.

- Krankheitsaktivitätsmarker im CED-Kollektiv

Die ROC-Analyse als Krankheitsaktivitätsmarker innerhalb des CED-Kollektivs (n=250) ergab für SC mit einer AUC=0,664 ($p<0,0001$) und LL-37 mit einer AUC=0,591 ($p=0,026$) einen signifikanten Unterschied zur diagonalen Bezugslinie und der AUC von 0,5. Für CCL20 und HBD-2 konnte die Nullhypothese der wahrscheinlichen AUC<0,5 nicht abgelehnt werden.

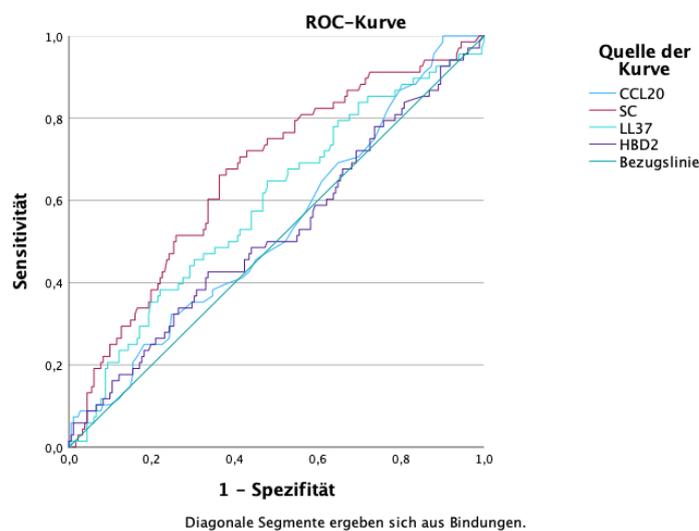


Abbildung 39: ROC-Kurve der Serumparameter als Krankheitsaktivitätsmarker im CED-Kollektiv

Tabelle 48: ROC-Analyse der Serumparameter als Krankheitsaktivitätsmarker im CED-Kollektiv mit Angabe des Cut-off-Werts, der Area under the curve (AUC) sowie Sensitivität und Spezifität mit Konfidenzintervallen (KI)

Parameter mit Cut-off Level	AUC (SE; 95% KI)	Sensitivität (95% KI)	Spezifität (95% KI)	<i>p</i>
CCL20 ≥ 3,479 pg/mL	0,531 (0,04; 0,45-0,61)	0,50 (0,39-0,62)	0,48 (0,41-0,55)	0,450
SC ≥ 1477,7 ng/mL	0,664 (0,04; 0,59-0,74)	0,66 (0,54-0,76)	0,64 (0,57-0,70)	<0,0001
LL-37 ≥ 46,079 ng/mL	0,591 (0,04; 0,51-0,67)	0,65 (0,53-0,75)	0,52 (0,45-0,59)	0,026
HBD-2 ≥ 7367,7 pg/mL	0,520 (0,04; 0,44-0,60)	0,50 (0,39-0,62)	0,52 (0,45-0,59)	0,640

- Krankheitsaktivitätsmarker im MC-Kollektiv

Die ROC-Analyse im MC-Kollektiv (n=170) ergab für SC mit einer AUC=0,655 (p=0,006) einen signifikanten Unterschied zur diagonalen Bezugslinie und der AUC von 0,5. Für CCL20, LL-37 und HBD-2 konnte die Nullhypothese der wahrscheinlichen AUC<0,5 nicht abgelehnt werden.

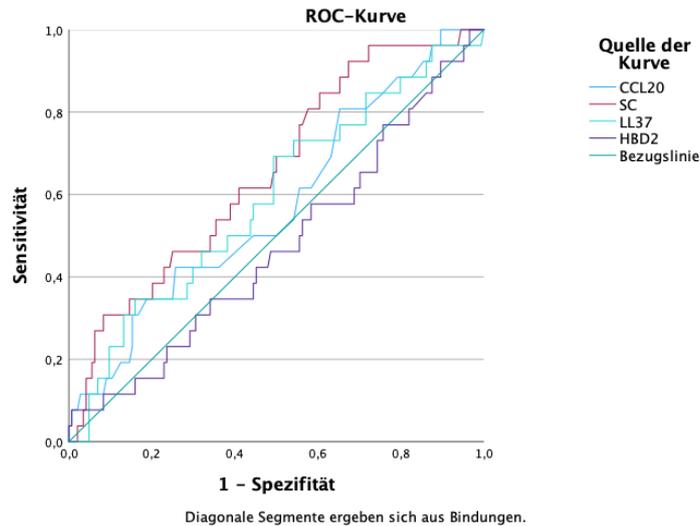


Abbildung 40: ROC-Kurve der Serumparameter als Krankheitsaktivitätsmarker im MC-Kollektiv

Tabelle 49: ROC-Analyse der Serumparameter als Krankheitsaktivitätsmarker im MC-Kollektiv mit Angabe des Cut-off-Werts, der Area under the curve (AUC) sowie Sensitivität und Spezifität mit Konfidenzintervallen (KI)

Parameter mit Cut-off Level	AUC (SE; 95% KI)	Sensitivität (95% KI)	Spezifität (95% KI)	p
CCL20 ≥ 4,279 pg/mL	0,575 (0,06; 0,45-0,70)	0,50 (0,32-0,68)	0,56 (0,47-0,63)	0,227
SC ≥ 1477,7 ng/mL	0,655 (0,06; 0,54-0,77)	0,58 (0,39-0,74)	0,61 (0,53-0,69)	0,006
LL-37 ≥ 46,079 ng/mL	0,591 (0,06; 0,47-0,71)	0,69 (0,50-0,84)	0,51 (0,43-0,59)	0,142
HBD-2 ≥ 6222,9 pg/mL	0,472 (0,06; 0,35-0,60)	0,50 (0,32-0,68)	0,44 (0,367-0,53)	0,663

- Krankheitsaktivitätsmarker im CU-Kollektiv

Die ROC-Berechnungen ergaben innerhalb des CU-Kollektivs (n=80) für SC mit einer AUC=0,694 (p=0,001) und LL-37 mit einer AUC=0,633 (p=0,035) einen signifikanten Unterschied zur diagonalen Bezugslinie und der AUC von 0,5. Für CCL20 und HBD-2 konnte die Nullhypothese der wahrscheinlichen AUC<0,5 nicht abgelehnt werden.

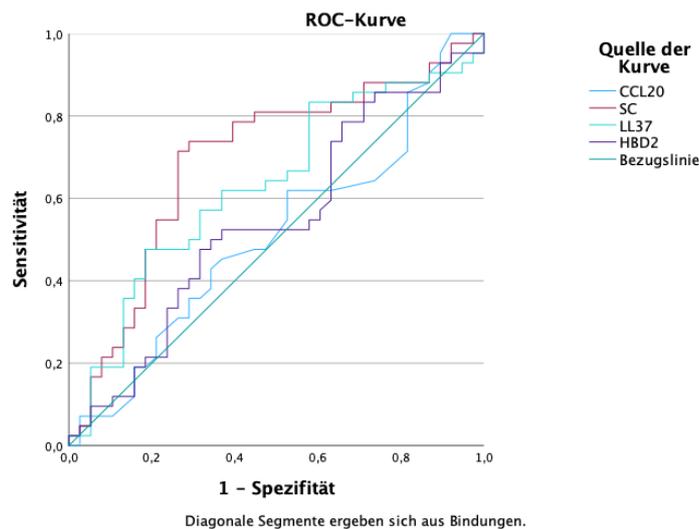


Abbildung 41: ROC-Kurve der Serumparameter als Krankheitsaktivitätsmarker im CU-Kollektiv

Tabelle 50: ROC-Analyse der Serumparameter als Krankheitsaktivitätsmarker im CU-Kollektiv mit Angabe des Cut-off-Werts, der Area under the curve (AUC) sowie Sensitivität und Spezifität mit Konfidenzintervallen (KI)

Parameter mit Cut-off Level	AUC (SE; 95% KI)	Sensitivität (95% KI)	Spezifität (95% KI)	p
CCL20 ≥ 2,864 pg/mL	0,511 (0,07; 0,38-0,64)	0,62 (0,47-0,75)	0,47 (0,33-0,63)	0,871
SC ≥ 1464,3 ng/mL	0,694 (0,06; 0,57-0,81)	0,71 (0,56-0,83)	0,74 (0,58-0,85)	0,001
LL-37 ≥ 46,814 ng/mL	0,633 (0,06; 0,51-0,76)	0,62 (0,47-0,75)	0,63 (0,47-0,77)	0,035
HBD-2 ≥ 7752,3 pg/mL	0,542 (0,07; 0,41-0,67)	0,52 (0,38-0,67)	0,63 (0,47-0,77)	0,518

5 Diskussion

5.1 Bestätigung der Datenlage zum Vitamin D-Haushalt bei CED

Ein Vitamin D-Mangel ist bei CED-Patienten weit verbreitet, in vielen Studien konnten Zusammenhänge zwischen dem Vitamin D-Haushalt und der Schwere der Erkrankung sowie der Lebensqualität festgestellt werden.^{71, 90-92} In Metaanalysen erwies sich eine Vitamin D-Defizienz als Risikofaktor für eine CED, ein Nord-Süd-Gradient und somit ein UV-Licht-Gradient in der Inzidenz chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist hinlänglich bekannt.^{49, 92} Typischer Marker des Vitamin D-Status ist das einfach hydroxylierte 25(OH)-Vitamin D, da es sowohl die ernährungsbedingte Aufnahme als auch die Sonnenlichtexposition am besten widerspiegelt.¹⁸⁹ Unsere Daten bestätigten den hinreichend beschriebenen 25(OH)-Vitamin D-Mangel bei CED. Es zeigten sich signifikant niedrigere 25(OH)D-Spiegel im Vergleich zu den gesunden Probanden, auch bei Stratifizierung des CED-Kollektivs in MC und CU. In unseren Kollektiven bestand hinsichtlich der Krankheitsaktivität (Patienten mit aktiver Erkrankung und in Remission nach Best¹⁸ bzw. Rachmilewitz¹⁹) kein signifikanter Unterschied in den 25(OH)D-Spiegeln. Die Datenlage bezüglich des Zusammenhangs von Vitamin D-Status und Krankheitsaktivität ist inkonsistent: Die Arbeiten von El-Matary *et al.* und Levin *et al.* fanden in Querschnittsstudien von CED-Kohorten eine Korrelation von Vitamin D-Spiegeln und Krankheitsaktivität.^{190, 191} Im Gegensatz dazu zeigte eine retrospektive Studie von Ulitsky *et al.*, dass ein Vitamin D-Mangel bei Patienten mit MC, nicht aber mit CU, mit einer höheren Krankheitsaktivität sowie einer geringeren gesundheitsbezogenen Lebensqualität assoziiert war.⁹⁰ Schütte *et al.* zeigten erst kürzlich eine protektive Rolle von 25(OH)D bei CED, eine dauerhafte Vitamin D-Supplementation ging unabhängig vom initialen Vitamin D-Status mit einem besserem Ansprechen auf eine Biologikatherapie einher.¹⁹² Daten zur Krankheitsaktivität der CED-Patienten waren nicht angegeben, allerdings ist bei verbessertem Ansprechen auf CED-spezifische Therapien von einer im Verlauf niedrigeren Krankheitsaktivität auszugehen. Unsere Analysen der 25(OH)D-Werte fanden keine signifikanten Assoziationen zur Krankheitsaktivität. Multivariat zeigten sich korrigiert auf die Einnahme einer Vitamin D-Supplementation niedrigere 25(OH)D-Spiegel bei CED-Patienten. Demnach bleibt unklar, ob niedrige Vitamin D-Spiegel oder eine Hypovitaminose D zu einer höheren Krankheitsaktivität führen können oder ob die in den CED-Kollektiven gemessenen, niedrigeren 25(OH)D-Werte nur Folge der schweren Erkrankung sind. Eine sichere Aussage über den Zusammenhang lässt sich anhand unserer Daten nicht treffen.

Zusätzlich zum einfach hydroxylierten 25(OH)-Vitamin D bestimmten wir auch die aktive Form des Vitamin D, das mittels des Enzyms 1- α -Hydroxylase aus 25(OH)D entsteht. Anders als 25(OH)D ist der aktive Metabolit durch seine Halbwertszeit von 4 bis 20 Stunden nicht als reliabler Indikator für den Vitamin D-Speicher geeignet.¹⁸⁹ In zahlreichen Veröffentlichungen wurden die bei CED potenziell antiinflammatorischen Eigenschaften von 1,25(OH)2D aufgegriffen. An Caco-2-Zellen konnte eine Hochregulation der *Tight-Junction*-Proteine und somit eine Besserung der Integrität des intestinalen Epithels durch 1,25(OH)2D nachgewiesen werden.⁹⁶ Zudem wurde im Mausmodell eine rückläufige CED-Symptomatik nach Gabe von 1,25(OH)2D beobachtet, während ein VDR-Mangel bei induzierter Colitis mit schweren CED-Symptomen einher ging.^{96, 97} Unsere Daten zeigten in den einzelnen CED-Kollektiven signifikant höhere 1,25(OH)2D-Spiegel im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe. In einem multivariaten Modell wurde diese Beobachtung zusätzlich auf eine bestehende Einnahme von Vitamin D-Präparaten zum Zeitpunkt der Blutentnahme korrigiert. Auch im bereinigten Modell ließen sich signifikant höhere 1,25(OH)2D-Konzentrationen im CED-Kollektiv nachweisen. Die Nierenfunktion unterschied sich im Vergleich der CED-Patienten mit bzw. ohne Vitamin D-Mangel nicht. Innerhalb der Krankheitsaktivität zeigten sich beim Vergleich der Patienten mit aktiver Entzündung und Patienten in Remission keine Unterschiede. Ähnliche Ergebnisse veröffentlichten Abreu *et al.*, sie beschrieben bei MC- und CU-Patienten höhere 1,25(OH)2D-Werte im Vergleich zu gesunden Probanden und zusätzlich eine signifikante Korrelation zur Krankheitsaktivität bei MC.¹⁹³ Eine Metaanalyse von Li *et al.* stützte diese Thesen, sie stellte bei MC und CU signifikant höhere 1,25(OH)2D-Serumkonzentrationen im Vergleich zu Gesunden fest mit ebenso signifikanten Unterschieden beim Vergleich der Entitäten MC und CU.¹⁸⁹ Einen Unterschied innerhalb der beiden CED-Formen konnten wir anhand unserer Daten nicht feststellen.

Abreu *et al.* konnten in einer multivariaten Analyse 1,25(OH)2D als unabhängigen Risikofaktor für eine geringe Knochenmineralisation ermitteln und stellten eine erhöhte Expression des Enzyms 1- α -Hydroxylase im Darm fest, was die Autoren als Reaktion auf die chronische Entzündungssituation oder als direkte Folge der Osteopenie oder Osteoporose bei CED-Patienten interpretierten.¹⁹³ Im Rahmen der Inflammation befinden sich vermehrt Monozyten in der Lamina propria, welche die 1- α -Hydroxylase besitzen und somit vermehrt 1,25(OH)2D bilden können.¹⁹³ Gleichzeitig wurde in dieser Arbeit diskutiert, ob die erhöhten 1,25(OH)2D-Serumspiegel durch sekundären Hyperparathyreoidismus bei Hypocalcämie bedingt sein könnten. Aufgrund der normwertigen Parathormon-Spiegel und des normwertigen 25(OH)D wurde dies allerdings ausgeschlossen. Zudem ist es aufgrund des retrospektiven Charakters der Studie von Abreu *et al.* nicht möglich

festzustellen, ob der Anstieg von 1,25(OH)2D dem Auftreten von Osteoporose vorausgeht oder mit dem Schweregrad der zugrunde liegenden CED zusammenhängt.¹⁹³ Somit scheinen die erhöhten 1,25(OH)2D-Konzentrationen auf eine vermehrte Hydroxylaseaktivität zurückzuführen zu sein. Dieser Mechanismus ist in Verbindung mit einer Hypercalcämie bereits bei anderen granulomatösen Erkrankungen wie der Sarkoidose, Tuberkulose, der Granulomatose mit Polyangiitis, vormals Wegener Granulomatose, und in einem Fallbericht auch bei zwei MC-Patienten beschrieben.¹⁹⁴ Für weitere Analysen wäre der Calcium- und Parathormonspiegel unseres Patientenkollektivs interessant, diese wurden aber nicht erfasst. Möglicherweise könnte ein Mangel des Vitamin D-Rezeptors bei CED zu reaktiv erhöhten 1,25(OH)2D-Konzentrationen führen. VDR-Polymorphismen wurden bereits mit einem erhöhtem CED-Risiko assoziiert.¹⁹⁵ Auch hierzu fehlen in unseren Kollektiven Daten, um einen möglichen Zusammenhang näher charakterisieren zu können.

In anderen Studien konnten hingegen geringere 1,25(OH)2D-Konzentrationen bei CED ermittelt werden, hier wurde eine verbesserte Knochenmineralisation bei Erreichen der Remission als Ursache für die Normalisierung des 1,25(OH)2D-Parameters angegeben.^{189, 196} Diese Daten stützen eher die oben erwähnten protektiven Eigenschaften von 1,25(OH)2D aus verschiedenen Veröffentlichungen der Grundlagenforschung. Zielińska *et al.* sahen hingegen bei MC- und CU-Patienten keine Unterschiede in den 1,25(OH)2D-Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Probanden. Eine Korrelation zur Krankheitsaktivität, dem Supplementationsstatus oder den CRP-Spiegeln konnte nicht hergestellt werden.¹⁹⁷

Aufgrund der inkonsistenten Datenlage kann anhand des 1,25(OH)2D-Spiegels somit nicht auf die Erkrankungs- oder Entzündungssituation bei CED-Patienten geschlossen werden. So scheinen sowohl die Aktivierung der Hydroxylierung von 25(OH)D als Reaktion auf Inflammation als auch lokale, intestinale protektive Eigenschaften von 1,25(OH)2D Einfluss auf den CED-Verlauf zu nehmen. Gleichzeitig können verschiedene Faktoren die Serumspiegel an Vitamin D beeinflussen. In dieser Arbeit wurden Daten zur Krankheitsaktivität, zum Entzündungsstatus, zur Nierenfunktion sowie zum Raucher- und Supplementationsstatus erfasst. Im Gegensatz dazu wurden keine Daten über die Jahres- und Tageszeit der Blutentnahme, die Dauer der täglichen Sonnenexposition, Daten zur Ethnizität der Probanden, dem epithelialen VDR-Status oder der Parathormonspiegel gesammelt.^{76, 193, 198, 199} Zwar kann im Nachhinein von einem überwiegend kaukasischen Patienten- und Kontrollkollektiv ausgegangen werden, jedoch könnte man abschließend feststellen, dass unser Modell zur Angabe des Vitamin D-Spiegels anhand verschiedener Einflussfaktoren nicht vollständig ist. In

jedem Falle scheint aber ein suffizienter Vitamin D-Haushalt den Krankheitsverlauf positiv zu beeinflussen.^{72, 93, 94}

5.2 Nachweis systemisch erhöhter CCL20-Konzentrationen erstmals auch bei CU-Patienten

CCL20 ist als proinflammatorisches Chemokin an Entzündungsprozessen beteiligt und bewirkt als Ligand durch Interaktion mit seinem CCR6-Rezeptor die Einwanderung von immunkompetenten Zellen wie aktivierten Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen an den Ort der Entzündung.^{124, 126, 130} Produziert wird es von neutrophilen Granulozyten, Enterozyten, B- und dendritischen Zellen.^{127, 132} Die CCL20-CCR6-Achse ist bei vielen chronischen Entzündungsvorgängen wie der Psoriasis, der Arthritis und auch bei CED aktiviert.^{128, 130, 131} Im intestinalen Epithel wird CCL20 dauerhaft exprimiert und bei entzündlichen Prozessen hochreguliert.^{127, 129} Das Darmepithel kann durch die chemotaktische Wirkung des CCR6-Rezeptors von CCL20 als Teil des angeborenen Immunsystems bei einer möglichen Invasion von Erregern eine Immunantwort auf lokaler Ebene generieren und so unter anderem die intestinale Einwanderung von Th17-Zellen bewirken.^{129, 200} Kaser *et al.* stellten in Kolonbiopsien von sowohl MC- als auch CU-Patienten eine erhöhte mRNA-Expression von CCL20 fest. Zudem konnte ein signifikanter Unterschied zu Patienten mit *irritable bowel syndrome* (Reizdarmsyndrom) gezeigt werden.¹³¹ In Mausmodellen bewirkte CCL20 die Rekrutierung von IL-17A-produzierenden Th17-Zellen aus dem Blut in den Dünndarm, bei Neutralisierung von CCL20 mittels neutralisierender Antikörper stellten Katchar *et al.* eine Abschwächung der experimentell induzierten Colitis und eine Hemmung der Rekrutierung von T-Zellen fest.¹³⁵ Friedrich *et al.* zeigten eine Induktion der Genexpression von CCL20 und zahlreichen weiteren Zytokinen und Chemokinen durch IL-17A, was die intestinale Chemotaxis proinflammatorischer Th17-Zellen durch epithelial ausgeschüttetes CCL20 als möglichen pathophysiologischen Schlüsselmechanismus bei CED vermuten lässt.⁸⁵

Auf *in vitro*-Ebene konnte auch ein Zusammenhang zu Vitamin D hergestellt werden: Karkeni *et al.* supprimierten bei Inkubation humaner Adipozyten mit 1,25(OH)2D die Bildung von CCL20.¹³⁶ In Mausmodellen konnte eine Abnahme von CCL20 im Serum bei Vitamin D3-Substitution nachgewiesen werden.^{137, 201} Erst kürzlich zeigte eine randomisiert verblindete sowie placebokontrollierte Interventionsstudie bei gesunden Erwachsenen mit experimentell induzierten Hautentzündungen eine Herabregulation von CCL20 nach Verabreichung einer vergleichsweise hohen oralen Cholecalciferol-Dosis von 200.000 IE.²⁰²

Angesichts der bekannten intestinalen Hochregulation von CCL20 bei CED und der vermuteten supprimierenden Wirkung von 1,25(OH)₂D auf CCL20 wollten wir daher prüfen, ob CCL20 als proinflammatorisches Chemokin bei CED-Patienten in höheren Serumkonzentrationen vorliegt als bei gesunden Kontrollen und ob ein Zusammenhang zur Krankheitsaktivität besteht. Es wurde untersucht, ob suffiziente Vitamin D-Spiegel mit niedrigeren CCL20-Serumkonzentrationen einhergehen und ob CCL20 mit anderen klinischen Entzündungsmarkern wie fäkalem Calprotectin, CRP, Leukozyten und Thrombozyten korreliert.

Wir konnten bei CED systemisch erhöhte Konzentrationen von CCL20 feststellen. CED-Patienten wiesen im Vergleich zu unserer gesunden Kontrollgruppe signifikant höhere Serumspiegel auf. Erstmals konnte gemäß aktueller Literaturrecherche eine serologische Hochregulation von CCL20 nicht nur bei MC-, sondern auch bei CU-Patienten gezeigt werden.¹³³ Dies legt nahe, dass sich die vorwiegend in der Lamina propria lokalisierte Produktion und Ausschüttung von CCL20 auch systemisch durch Übertritt in die Blutbahn als Serumparameter bei beiden CED-Entitäten nachweisen lässt. Zusätzlich ließen sich signifikante, positive Korrelationen zu fäkalem Calprotectin und CRP, die beide als klinisch relevante Entzündungsindikatoren in der Verlaufsbeurteilung von CED-Patienten verwendet werden, nachweisen. Zur Anzahl der Leukozyten und Thrombozyten im Blutbild konnte ebenfalls ein positiver, gleich gerichteter Zusammenhang festgestellt werden, der sich aber als statistisch nicht signifikant erwies. In den ROC-Analysen zeigte sich CCL20 mit einer signifikanten AUC als potenzieller Erkrankungsmarker.

Interessanterweise bestand kein relevanter Unterschied hinsichtlich der Krankheitsaktivität: Beim Vergleich der Gruppen „aktive Erkrankung“ versus „Patienten in Remission“ waren bei Patienten mit aktiver Erkrankung im Median nicht signifikante, minimal geringere CCL20-Spiegel festzustellen. Auch Korrelations- und Regressionsanalysen konnten keinen signifikanten Zusammenhang herstellen. In ROC-Analysen erwies sich CCL20 nicht als dienlicher Aktivitätsmarker. So scheint die Krankheitsaktivität die Expression von CCL20 systemisch nicht wesentlich zu steigern. Möglicherweise ist allein durch die bestehende Entzündungssituation bereits ein höherer Expressionsgrad vorhanden, der auch bei eskalierender Entzündungslage nicht weiter ansteigt. Diese Annahme stützen auch die Ergebnisse von Annunziato *et al.*, die bei Th17-Zellen aus MC-Biopsien auch nach prolongierter T-Zell-Rezeptoraktivierung eine kontinuierliche Expression des CCR6-Rezeptors CCL20 nachweisen konnten und somit für CCL20 eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Entzündungssituation vermuteten.²⁰³ Jabłoński *et al.* konnten andererseits bei Patienten mit Endometriose neben einer entzündungsfördernden auch eine homöostatische Funktion von CCL20

nachweisen: In der Leber, in der Haut und im lymphatischen System erfolgt die Sekretion vorwiegend zu regulatorischen Zwecken.¹²⁵ Dementsprechend könnte die Homöostase im Darmtrakt bei CED-Patienten in Remission durch ein hohes CCL20-Sekretionsniveau erreicht worden sein und sich daher nicht von Patienten mit aktivem Erkrankungszustand unterscheiden. Andererseits konnten Skovdahl *et al.* in Kolonbiopsien von MC- und CU-Patienten signifikant höhere CCL20-mRNA-Konzentrationen bei aktivem Erkrankungszustand feststellen.¹²⁷ Kaser *et al.* zeigten zudem, dass nur bei Kolonbiopsien aus makro- und mikroskopisch betroffenen Regionen signifikant erhöhte CCL20-mRNA-Konzentrationen nachgewiesen werden konnten.¹³¹ Zhang *et al.* konnten in Kolonbiopsien von CU-Patienten signifikant erhöhte CCL20-Konzentrationen mit positiver Korrelation zur Krankheitsaktivität feststellen.²⁰⁴ Unsere Einteilung der Krankheitsaktivität nach Best bei MC bzw. nach Rachmilewitz bei CU berücksichtigte nur klinisch-anamnestische Daten und keine endoskopisch festgestellte Entzündungsaktivität. Eine andere Publikation beschreibt signifikant höhere CCL20-Konzentrationen in Rektumbiopsien von Kindern mit *early-onset* Colitis ulcerosa im Vergleich zu Studienteilnehmern mit *adult-onset* Colitis ulcerosa.²⁰⁵ Somit könnte CCL20 insbesondere in der Pädiatrie als Biomarker dienlich sein. Eine Unterscheidung hinsichtlich der Krankheitsaktivität mittels Serum-CCL20 scheint unseren Daten zufolge nicht gegeben.

Die Aufteilung des CED-Kollektivs in MC und CU zeigte kein unterschiedliches Expressionsmuster innerhalb der beiden Gruppen. Die Datenlage hierzu ist nicht eindeutig: Kaser *et al.* konnten ebenso keine relevanten Unterschiede innerhalb der beiden Entitäten feststellen, während Kwon *et al.* nur bei aktiver MC-Erkrankung, nicht aber bei aktiver CU-Erkrankung signifikante erhöhte CCL20-mRNA in Kolonbiopsien nachweisen konnten.^{131, 206} Eine sichere Differenzierung der CED-Entität durch CCL20 ist somit weder auf lokaler noch auf systemischer Ebene gegeben.

Zur genaueren Analyse sollten die CCL20-Konzentrationen in Kolonbiopsien, stratifiziert nach Krankheitsaktivität und Entität, mit anschließender Korrelation zur systemischen Expression erfolgen. CCL20 ist sowohl bei Morbus Crohn als auch Colitis ulcerosa als Erkrankungsmarker dienlich, bei beiden CED-Formen ist das Chemokin signifikant erhöht. In den ROC-Analysen und -Graphiken ergab sich für CCL20 in den klinisch relevanten Bereichen mit hoher Sensitivität nur eine geringe Spezifität als CED-Erkrankungsmarker. Die ermittelten *Cut-offs* in den einzelnen Studienkohorten ergaben eine signifikante AUC mit etwa 0,65, allerdings nur mit einer geringen Sensitivität von 0,54 bis 0,64 und einer Spezifität zwischen 0,55 und 0,58. Eine sichere Unterscheidung zu Patienten mit Reizdarmsyndrom konnten

Kaser *et al.* bereits an Kolonbiopsien zeigen, hierzu wären noch Vergleiche hinsichtlich des systemisch feststellbaren Unterschieds interessant. Eine Differenzierung der Entitäten MC und CU ist gemäß der nicht-parametrischen Tests nicht gegeben. Als Krankheitsaktivitätsmarker ist CCL20 im Serum bei unserem Patientenkollektiv nicht dienlich, möglicherweise nur in Zusammenschau mehrerer Biomarker im Sinne eines *Scores*. Plevy *et al.* stellten für den etablierten Entzündungsmarker CRP eine im Vergleich zum CCL20 ähnliche AUC von etwa 0,61 in den ROC-Analysen zur Unterscheidung CED versus keine CED fest. In Kombination verschiedener serologischer, entzündlicher sowie genetischer Marker gelang den Autoren zufolge neben der Unterscheidung einer CED-Erkrankung von Gesunden auch eine Differenzierung der Entität, so dass die Autoren ein „Multimarker-Panel“ im Assessment von CED propagierten.²⁰⁷ So könnte sich auch CCL20 in einem Panel als dienlicher Erkrankungsmarker etablieren.

Hashimoto *et al.* konnten eine Assoziation der CCL20-Expression im Rektum und dem Auftreten von Colitis ulcerosa-assoziiierter Neoplasien feststellen.²⁰⁸ Demnach könnte CCL20 auch als *Follow-up*-Parameter zur Detektion von Patienten mit hohem Risiko für Neoplasien dienlich sein. Bei Patienten mit kolorektalem Karzinom konnte CCL20 zusammen mit IL-17A als früher diagnostischer und prognostischer Serum-Biomarker ermittelt werden.²⁰⁹ Klinisch-anamnestische Daten zu Neoplasien fehlten in unseren Kollektiven, weshalb sich hierzu anhand unseres Patientenguts keine Aussage treffen lässt. Zusammenfassend zeigten wir, dass eine CED-Erkrankung mit erhöhten Konzentrationen des Th17-Chemokins CCL20 einhergeht und ähnlich vorangegangener Analysen intestinaler Biopsien^{127, 206} CCL20 nicht nur bei MC¹³³, sondern auch bei CU systemisch hochreguliert ist.

5.2.1 Signifikante Assoziation des Vitamin D-Haushalts und CCL20 im CU- und Kontrollkollektiv

Karkeni *et al.* stellten *in vitro* an humanen Adipozyten eine Herabregulation von CCL20 durch aktives 1,25(OH)₂-Vitamin D fest.¹³⁶ Ähnliche Ergebnisse lieferten die Analysen von Reins *et al.* an Epithelzellen der menschlichen Kornea.¹³⁷ Eine weitere Arbeit zeigte *in vivo* und *in vitro*, dass Vitamin D₃ CCL20-Spiegel reduziert und so bei Mäusen mit Colitis-assoziiertem kolorektalem Karzinom die Tumorlast reduziert.²⁰¹ Jafarzadeh *et al.* stellten bei Mäusen mit autoimmuner Enzephalomyelitis im Falle einer Aufnahme von 200 ng 1,25(OH)₂D jeden zweiten Tag über insgesamt 30 Tage geringere Konzentrationen an CCL20 im Rückenmark fest.¹³⁸ Th17-Zellen und deren assoziierte Zytokine induzieren die intestinale epitheliale Expression von CCL20 um das bis zu 200-fache, gleichzeitig hemmt

aktives Vitamin D die Th17-Zelldifferenzierung und Funktion sowie Expression von CCL20.^{85, 86, 127}

Die Aufteilung unseres Patientenkollektivs in Vitamin D-Defiziente und Vitamin D-suffiziente gemäß Definition der IOM¹⁸⁵ zeigte, dass CED-Patienten mit ausreichender Vitamin D-Versorgung im Median zwar niedrigere CCL20-Serumkonzentrationen aufwiesen, sich diese aber nicht signifikant unterschieden. Bei weiterer Unterteilung der CED-Patienten nach Krankheitsaktivität und Entität zeichneten sich inkonsistente, nicht signifikante Daten ab. Nur innerhalb der gesunden Kontrollgruppe war eine signifikante Differenz nachweisbar: Probanden mit suffizienten 25(OH)D-Spiegeln zeigten im Median geringere CCL20-Konzentrationen, allerdings wiesen nur fünf gesunde Probanden einen Vitamin D-Mangel gemäß o.g. Definition auf. Auch die Korrelation mit dem hormonell aktiven Metaboliten des Vitamin D (1,25(OH)2D) stellte sich nur bei der gesunden Kontrollgruppe als signifikant heraus. Höhere 1,25(OH)2D-Spiegel gingen hier mit niedrigeren CCL20-Serumkonzentrationen einher.

In den Regressionsanalysen ging im Gesamtkollektiv aus CED und gesunden Kontrollen ein Vitamin D-Mangel auch multivariat um u.a. eine Vitamin D-Supplementation korrigiert mit niedrigeren CCL20-Spiegeln einher. Zudem zeigte sich eine signifikante negative Assoziation der 1,25(OH)2D-Spiegel und der CCL20-Konzentrationen. Innerhalb der einzelnen CED-Kollektive zeichneten sich diese signifikanten Zusammenhänge nur bei den CU-Patienten ab. So gingen ähnlich den Daten von Karkeni *et al.*¹³⁶ höhere 1,25(OH)2D-Spiegel auch multivariat kontrolliert mit niedrigeren Werten an CCL20 einher. Gleichzeitig zeigte sich eine um Confounder bereinigte Assoziation von Vitamin D-Mangel und erhöhten CCL20-Serumkonzentrationen im CU-Kollektiv. Im MC-Kollektiv konnten diese Zusammenhänge nicht gezeigt werden. Bei den gesunden Probanden erwies sich die Assoziation eines Vitamin D-Mangels zu den CCL20-Spiegeln nur univariat als statistisch signifikant, multivariat ergab sich ein mit einem p-Wert von 0,055 ein Ergebnis knapp außerhalb des statistischen Signifikanzniveaus. Multivariat zeigte sich hier, anders als bei den CU-Patienten, nur hinsichtlich der 25(OH)D-Werte und nicht der 1,25(OH)2D-Spiegel ein negativ gerichteter Zusammenhang.

CCL20 wurde bereits mit Zellproliferationen bei Colitis-assoziierten Karzinomen, sowie bei Bronchial- und Mammakarzinom durch u.a. Aktivierung des MAP-Kinase- und NF- κ B-*pathway* in Verbindung gebracht.^{201, 210, 211} 1,25(OH)2D regulierte die Aktivität dieser Signalwege *in vivo* und *in vitro* herab.²⁰¹ Zudem beschrieben Xin *et al.*, dass CCL20 eine gewisse „Mediatorrolle“ in der durch 1,25(OH)2D vermittelten Hemmung der o.g. Signalwege in der Colitis-assoziierten Karzinogenese einnehme.²⁰¹ Somit könnte CCL20 lediglich bei CU-Patienten und

bei den gesunden Probanden Einfluss auf die beschriebenen Signalwege nehmen. Gubatan *et al.* fanden eine signifikante Korrelation von höheren 25(OH)D-Serumwerten und niedrigeren Konzentrationen an CCL20-induzierendem IL-17A bei CU-Patienten.²¹² Bei MC-Patienten konnte ein suffizienter Vitamin D-Status bisher nicht mit einer Herabregulation proinflammatorischer Zytokine in Verbindung gebracht werden.²¹³ Möglicherweise schlägt bei MC die Inhibition durch 1,25(OH)2D aufgrund eines anderen proinflammatorischen Zytokinprofils und folglich vermehrter Ausschüttung von CCL20 fehl. Auch eine reduzierte VDR-Expression, die für CED-Patienten bereits gezeigt wurde, könnte eine fehlende Herabregulation von CCL20 bei MC-Patienten erklären.^{193, 199} Eine epitheliale VDR-Defizienz im Intestinaltrakt wurde an Biopsien mit vermehrter Einwanderung von Immunzellen in Verbindung gebracht und ging in Mausmodellen mit der Entwicklung einer CED einher.¹⁹⁹ Ein herabregulierter VDR korreliert mit beeinträchtigter Expression von *ATG16L1*, einem Risikogen, das mit inadäquater Autophagie und beeinträchtigter Funktion von Panethzellen vor allem bei MC in Verbindung steht.²¹⁴ Polymorphismen im VDR wurden insbesondere mit MC assoziiert, demnach könnte bei MC eine VDR-Defizienz eine entscheidendere Rolle spielen als bei CU-Patienten.²¹⁵ Eine randomisierte kontrollierte Studie zeigte an erwachsenen, eineiigen Zwillingen eine bis zu 60-fache Hochregulation der VDR-Genexpression bei Substitution von 2000 I.E. Vitamin D pro Tag.²¹⁶ In unseren Kollektiven lag die durchschnittliche Substitutionsdosis bei 1000 IE pro Tag, bei MC-Patienten könnte demnach eine höhere Dosis eine VDR-Expression und damit eine CCL20-Suppression bewirken. Im Mausmodell mit induzierter TNBS-Colitis, die vom Zytokinprofil am ehesten einer humanen MC-Erkrankung entspricht^{135, 199}, reduzierte eine Calcitriol-Substitution die Produktion von CCL20-induzierendem IL-17.⁸⁴ Somit scheint auch bei MC eine antiinflammatorische Wirkung von 1,25(OH)2D hinsichtlich der Expression von CCL20 zu gelten, systemisch lässt sich dies anhand unseres MC-Kollektivs nicht zeigen.

Eine kausale Verbindung zwischen CCL20 und Vitamin D bei Colitis-Patienten kann durch diese Daten aufgrund des retrospektiven Charakters der Studie nur vermutet werden. Ein Vitamin D-Mangel korrelierte, wie oben beschrieben^{190, 191}, in manchen Studien mit der Krankheitsaktivität, so könnte ein defizienter Vitamin D-Haushalt eine höhere Krankheitsaktivität und folglich höhere Chemokin-Serumspiegel bewirken. Andererseits konnte die Assoziation zum Vitamin D-Haushalt in unseren Kollektiven multivariat und somit auf die Krankheitsaktivität kontrolliert getroffen werden. Gleichzeitig zeigten sich auch univariat betrachtet keine Zusammenhänge zwischen den Vitamin D-Parametern und der Krankheitsaktivität. An porcinen, viral infizierten Enterozyten konnte eine Konzentrationsabnahme der CCL20-mRNA nach Inkubation mit 1,25(OH)2D

beobachtet werden.²¹⁷ Auch bei VDR-*knockout*-Mäusen mit induzierter, chronischer Cholangitis konnten höhere CCL20-Konzentrationen sowie des CCL20-Rezeptors CCR6 im Vergleich zum Wildtyp und gesunden Tieren ermittelt werden. Interessanterweise wurde aber nach vierwöchiger Behandlung mit Calcipotriol, einem Vitamin D-Analogon, nur bei den VDR^{-/-}-Mäusen eine Suppression der CCL20-Spiegel beobachtet. Dies bestätigten auch anschließende *in vitro*-Analysen an humanen Gallengangsepithel-Zelllinien.²¹⁸ Hosokawa *et al.* konnten hingegen an humanen Parodontalligament-Zellen den Vitamin D-Rezeptor und zudem bei Inkubation mit Calcitriol eine Suppression der Produktion von CCL20 nachweisen.²¹⁹ Ein direkter Zusammenhang von Vitamin D und CCL20-Spiegel anhand VDR-abhängiger Suppression kann damit vermutet werden, ein antiinflammatorischer Einfluss einer Vitamin D-Supplementierung wird möglicherweise aber über andere Rezeptoren und Signalwege vermittelt. Daten zum VDR-Status an beispielsweise intestinalen Biopsien unserer CED-Kollektive fehlten, so dass es hier weiterer Interventionsstudien unter Einbezug des VDR-Status aus Biopsien bedarf. Der Interventionsstudie von Ernst *et al.* zufolge supprimierte eine hohe orale Cholecalciferol-Dosis signifikant die CCL20-Spiegel zumindest bei Probanden mit induzierten Hauterkrankungen.²⁰² Eine womöglich systemisch-antiinflammatorische Wirkung von Vitamin D durch Herabregulation der CCL20-Expression könnte in unseren Analysen im multivariaten Modell lediglich für Colitis-Patienten sowie gesunde Probanden vermutet werden. Zusammenfassend sollte eine Hypovitaminose D bei allen CED-Patienten konsequent therapiert werden und regelmäßige Kontrollen des Vitamin D-Status erfolgen, um auch Effekte auf lokaler Ebene im Darmtrakt zu erreichen.

5.3 Erhöhte Calprotectin-Werte im Serum von CED-Patienten mit aktiver Erkrankung

Der fäkale Neutrophilenmarker Calprotectin (FC) ist ein gut etablierter Biomarker im klinischen Assessment von CED.²²⁰ Als Protein im Zytosol von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Monozyten wird es im Rahmen von entzündlichen Prozessen zur Hemmung bakteriellen Wachstums ausgeschüttet.^{103, 111} Es gilt als besonders stabil und korreliert direkt mit der Krankheitsaktivität und der Migration von neutrophilen Granulozyten in den Gastrointestinaltrakt.^{102, 220} Relevante Messungenauigkeiten konnten bei Hämatochezie, Diarrhoe und logistischen Problemen durch Temperaturspitzen oder Transportverzögerungen festgestellt werden.^{115-117, 221, 222} Wir wollten daher evaluieren, ob Calprotectin auch als serologischer Biomarker dienlich ist und ob eine Assoziation zur Krankheitsaktivität besteht.

In unserer Studienpopulation konnte beim Vergleich der Kohorten CED und gesunde Kontrollen kein Unterschied festgestellt werden, die Serum-Calprotectin-Spiegel waren im Median ähnlich verteilt. Die Stratifizierung nach Krankheitsaktivität zeigte, dass vor allem bei aktivem Erkrankungsstatus signifikant höhere SC-Konzentrationen im Vergleich zu CED-Patienten in Remission und zu den gesunden Kontrollen gemessen werden konnten. Signifikante Unterschiede zwischen MC und CU bestanden nicht. Die Serumwerte korrelierten hoch signifikant mit den fäkal gemessenen Calprotectinwerten, ebenso mit den klinischen Entzündungsindikatoren CRP und der Anzahl der Leukozyten im Blutbild. Ein signifikanter, gleichgerichteter Zusammenhang konnte auch zur Thrombozytenzahl festgestellt werden, am ehesten im Sinne einer reaktiven, entzündungsbedingten Thrombozytose. In mehreren Arbeiten konnten im Gegensatz zu unseren Messungen signifikante Unterschiede zu gesunden Probanden nachgewiesen werden, allerdings nicht immer mit Korrelation zu den Konzentrationen im Stuhl.^{118-121, 223} Nach Meuwis *et al.* korrelierten die SC-Werte bei MC-Patienten, anders als fäkales Calprotectin, nicht mit der endoskopisch festgestellten Krankheitsaktivität (CDEIS) und konnten somit genauso wie das CRP den epithelialen Entzündungsstatus nicht widerspiegeln.¹¹⁸ Ein Übersichtsartikel von Azramezani Kopi *et al.* zeigte eine heterogene Datenlage zu SC, es wurden u. a. Zusammenhänge zur Krankheitsaktivität, zur Prognose und zum Rezidivrisiko beschrieben. Bei signifikanter Korrelation von SC und Serum-CRP, nicht aber von FC und CRP, vermuteten die Autoren für SC eine stärkere Assoziation zur systemischen Entzündungssituation und nicht zum intestinalen Status der Inflammation.⁴ Womöglich konnten deswegen in unseren Analysen nur bei CED-Patienten mit erhöhter Krankheitsaktivität Unterschiede zu den gesunden Probanden hergestellt werden. Die nicht signifikanten Unterschiede zur gesunden Kontrollgruppe könnten in unserem Gesamt-CED-Kollektiv durch eine hohe Anzahl an Patienten in Remission, welche sich in ihren SC-Spiegeln nicht signifikant von den gesunden Kontrollen unterschieden, bedingt sein. So zeigte sich SC in den ROC-Analysen nicht als dienlicher Erkrankungsmarker zur Stratifizierung zwischen CED-Erkrankten und Gesunden. Beschrieben ist zudem eine Calprotectin-Erhöhung im Serum bei unter anderem der rheumatoiden Arthritis oder der zystischen Fibrose, die bei möglichen Komorbiditäten falsch positive Werte ergäben.^{122, 123} Als Krankheitsaktivitätsmarker zur serologischen Unterscheidung von CED-Patienten mit aktiver Entzündung zu CED-Patienten in Remission könnte Calprotectin im Serum bei signifikanter AUC innerhalb der ROC-Analysen jedoch etabliert werden, für unsere *Cut-off*-Werte ergab sich insbesondere bei CU-Patienten eine Sensitivität und Spezifität von je über 0,7. Die Entzündungsaktivität sollte trotzdem nicht ausschließlich über SC, sondern möglicherweise auch in Kombination mit weiteren

serologischen Markern beurteilt werden. In den nicht-parametrischen Tests konnten wir keinen Unterschied innerhalb der Entität zeigen, so dass unseren Daten zufolge eine sichere Differenzierung der CED-Form mittels SC nicht zielführend ist. Kalla *et al.* zeigten SC als signifikanten Prädiktor für eine CED- und MC-Erkrankung und gemeinsam mit CRP oder Albumin als Prädiktor für eine Eskalation der Krankheitsaktivität.¹²⁰ Meuwis *et al.* zufolge war SC zusammen mit CRP als prognostischer Marker für eine Rezidiventwicklung bei MC-Patienten nach Therapie mit Infliximab dienlich.¹¹⁸ Einen ähnlichen Trend ergaben auch unsere Daten: CED-Patienten unter Therapie mit Infliximab wiesen signifikant geringere SC-Spiegel auf als diejenigen ohne Infliximab-Einnahme zum Zeitpunkt der Blutentnahme, diese Assoziation konnte auch in unserem CU-Kollektiv festgestellt werden. Gegebenenfalls könnte SC so als Verlaufsparemeter in Therapien mit Infliximab oder zusammen mit anderen serologischen Markern als Prädiktor für einen akuten Schub etabliert werden. Den ROC-Analysen in dieser Arbeit zufolge ist Calprotectin als Serum-Biomarker zum Ausschluss einer CED bzw. einer Unterscheidung zum Reizdarmsyndrom, wie es bereits für Messungen im Fäzes gezeigt werden konnte¹¹³, nicht geeignet. Bei bekanntermaßen weltweit steigender CED-Inzidenzen sollten weitere Untersuchungen zu SC als Verlaufsparemeter bei CED erfolgen, da insbesondere in pandemischen Lagen, wie zuletzt auch während der COVID-19-Pandemie, serologische sowie fäkale Marker eine sinnvolle Ergänzung zur endoskopischen Diagnostik darstellen.^{21, 224}

5.3.1 Fehlende Assoziation von SC zu Vitamin D

Für FC ist bereits ein Zusammenhang mit Vitamin D beschrieben: Ein niedriger 25(OH)D-Spiegel ging in mehreren Studien mit erhöhten FC-Werten einher.^{114, 225, 226} Zudem konnten im Tiermodell bei VDR-*knockout* Mäusen mit induzierter, chronischer Cholangitis höhere S100A8 und S100A9-Konzentrationen, die als Heterodimer als Calprotectin bezeichnet werden, detektiert werden.^{100, 218} Dies legt eine VDR-abhängige Expression und eine damit negativ gerichtete Assoziation zum Vitamin D nahe. Entsprechende Daten zum Zusammenhang von Vitamin D mit den Calprotectin-Spiegeln im Serum konnten auch nach intensiver Literaturrecherche nicht ermittelt werden. Wir wollten daher überprüfen, ob CED-Patienten mit 25(OH)D-Defizienz auch höhere SC-Konzentrationen aufweisen und ob eine Korrelation zu 1,25(OH)2D besteht. Der Vergleich der Gruppe CED-Patienten mit Vitamin D-Defizienz und der CED-Patienten mit suffizienten Vitamin D-Spiegeln erbrachte keine statistisch signifikanten Unterschiede, auch nicht im Vergleich der Subpopulationen. Zwar bestand bei den meisten Kollektiven bei Vitamin D-Mangel im Median ein höherer SC-Spiegel, eine statistische Signifikanz ergab sich in keiner Kohorte. Zudem bestand eine inverse, aber statistisch nicht signifikante Korrelation

von SC zu 1,25(OH)2D. Auch in den uni- und multivariaten Regressionsanalysen zeigten sich keine signifikanten Assoziationen zu den Vitamin D-Parametern 25(OH)D und 1,25(OH)2D sowie einem bestehenden Vitamin D-Mangel als dichotome Variable.

Raftery *et al.* konnten in ihrer Studie bei Patienten mit MC in Remission eine inverse Assoziation von Vitamin D zu Calprotectin im Stuhl, aber nicht zu CRP oder zum CDAI feststellen.¹¹⁴ Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Garg *et al.*, es zeigte sich eine signifikante negative Assoziation zum FC, nicht aber zu systemischen Krankheitsaktivitätsmarkern wie CRP oder Leukozyten.²²⁵ Diese Daten lassen einen intestinalen Zusammenhang von Vitamin D und FC vermuten, 25(OH)D könnte hier die lokale, nicht aber die systemische Entzündungssituation beeinflussen. Auch unsere Messungen der SC-Spiegel konnten keine signifikanten Zusammenhänge zum Vitamin D-Haushalt herstellen. Die Beziehung zwischen 25(OH)D im Serum und serologischen Entzündungsmarkern wurde abseits vom SC bereits für verschiedene Erkrankungen untersucht. Die Ergebnisse erwiesen sich bisher als widersprüchlich, in den meisten Fällen konnte keine eindeutige Korrelation hergestellt werden.²²⁷⁻²²⁹ Möglicherweise wird auch hier durch immunmodulatorische Eigenschaften von Vitamin D auf lokaler Ebene die Degranulation von Calprotectin herabreguliert, deren Effekt sich nur im Fäzes, nicht aber serologisch nachweisen lässt. Dies lassen auch die Veröffentlichungen von Raftery *et al.* und Garg *et al.* vermuten^{114, 225}: beide Autoren konnten bei deutlich erhöhtem Serum-25(OH)D von mindestens 100 nmol/L eine signifikante Abnahme des fäkalen Calprotectin nachweisen, zum Teil von weniger als 100 µg/g – einem Wert, der mit einer endoskopischen Remission assoziiert ist.^{230, 231} Im Tiermodell konnten zwar bei VDR-*knockout* Mäusen höhere S100A8- und S100A9-Konzentrationen festgestellt werden, bei Calcipotriol-Behandlung über mehrere Wochen konnten allerdings nur bei VDR^{-/-}, nicht bei VDR^{+/+}-Mäusen niedrigere Calprotectin-Konzentrationen detektiert werden.²¹⁸ Somit lassen sich sowohl VDR-abhängige als auch -unabhängige Expressionswege vermuten.

Um die Hypothese der intestinalen Immunregulation durch Vitamin D endgültig stützen zu können bedarf es Interventionsstudien mit Evaluation der lokalen Entzündungsmuster im Gewebe und der serologischen Effekte einer Vitamin D-Supplementierung. Ein systemischer Zusammenhang von Vitamin D auf Calprotectin im Serum lässt sich anhand unserer Messergebnisse nicht feststellen.

5.4 Höhere LL-37-Konzentrationen bei CED mit Korrelation zur Krankheitsaktivität bei CU-Patienten

LL-37 ist ein antimikrobielles Peptid, das aus 37 Aminosäuren – beginnend mit zwei Aminosäuren Leucin – besteht und als einziger Vertreter der Cathelicidine im menschlichen Körper in zahlreichen Geweben antibakterielle, antivirale, antiendotoxische und chemotaktische Funktionen einnimmt.^{140, 142, 156}

Es besteht eine hohe Evidenz für eine pathophysiologische Rolle von LL-37 bei Infektionen, Entzündungen und Autoimmunerkrankungen, weshalb es auch im Zusammenhang mit CED untersucht wurde.¹⁶⁰ Wir wollten prüfen, ob sich bei Patienten mit CED die Serumspiegel des Cathelicidins LL-37 von der gesunden Kontrollgruppe unterscheiden und ob eine Assoziation zur Krankheitsaktivität besteht. Zudem wollten wir einen möglichen Zusammenhang zu den gemessenen Vitamin D-Metaboliten gemäß der vorbeschriebenen Vitamin D-Cathelicidin-Achse evaluieren.¹⁵²

Unser CED-Kollektiv wies im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant höhere LL-37-Serumkonzentrationen auf. Auch innerhalb der Krankheitsaktivität bestanden relevante Unterschiede zwischen dem CED-Kollektiv mit aktivem Erkrankungszustand und dem Kollektiv in Remission mit im Median höheren LL-37-Konzentrationen bei aktivem Krankheitsaktivitätsindex. Der Vergleich der beiden Entitäten MC und CU zeigte keinen signifikanten Unterschied. Die weitere Unterteilung der MC- und CU-Patienten nach Krankheitsaktivität ergab nur bei CU-Patienten eine signifikante, positive Korrelation zum CAI-Score. Zudem bestanden im CED-Kollektiv signifikante, positiv gerichtete Assoziationen zum CRP-Spiegel, der Anzahl der Leukozyten und Thrombozyten im Blutbild und den Konzentrationen an fäkalem Calprotectin.

Die Angaben in der Literatur sind nicht konsistent: Schauber *et al.* beschrieben, dass die mRNA-Expression von Cathelicidin in der Kolon-Mukosa von CU-Patienten, nicht aber bei MC-Patienten, im Vergleich zu gesunden Kontrollbiopsien signifikant erhöht sei.¹⁶¹ Dem gegenüber zeigten Tran *et al.*, dass hohe LL-37-Spiegel bei CU-Patienten mit einer positiven Prognose, bei MC und CU invers mit der Krankheitsaktivität und bei MC-Patienten signifikant negativ mit dem Auftreten von Strikturen assoziiert waren. Andererseits zeigten sich ähnlich unserer Daten signifikant höhere LL-37-Spiegel bei MC- und CU-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden.¹⁶⁰ Mäuse mit DSS-induzierter Kolitis litten bei Cathelicidin-Defizienz im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen häufiger an Gewichtsverlust, Diarrhö und Blutungen.^{162, 163} Durch eine rasche Einlagerung von LL-37 in negativ geladene bakterielle Membranen kommt es zur Lyse des Erregers.^{141, 152} Demnach müssten

höhere LL-37-Spiegel mit einem günstigen Krankheitsverlauf assoziiert sein, zumal auch die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und Stickstoffmonoxid durch hohe Spiegel an LL-37 reduziert wird.¹⁵⁶ Unsere Daten zeigten nun eher, dass - ähnlich der Publikation von Schaubert *et al.* - auch systemisch vermehrt LL-37 bei CED-Patienten nachgewiesen werden kann. Ferner ergaben sich signifikante, positive Korrelationen zu klinisch relevanten Entzündungsindikatoren wie fäkalem Calprotectin, CRP, Leukozyten und Thrombozyten, was einen starken Zusammenhang zur Krankheitsaktivität vermuten lässt. Ähnliche Ergebnisse veröffentlichten Kusaka *et al.*, hier zeigte sich eine erhöhte Expression von LL-37 innerhalb der entzündeten Darmbereiche bei MC- und CU-Patienten mit signifikanten Unterschieden im Vergleich zu gesunden Probanden.¹³⁹ Auch Gutiérrez *et al.* konnten bei MC-Patienten mit Darmbarrierestörung und konsekutiver Translokation bakterieller DNA in die Blutstrombahn signifikant höhere LL-37-Konzentrationen zeigen als bei MC-Patienten ohne Nachweis bakterieller DNA.²³² Möglicherweise wird, induziert durch Entzündung, bakterielle Abbauprodukte und überschießende Immunreaktion, die Ausschüttung von LL-37 aus den Granula neutrophiler Granulozyten mit dem Ziel der Regulation der Entzündungsaktivität gesteigert. LL-37 ist als antimikrobielles Peptid an der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase beteiligt.^{139, 140} Die Barriestörung bei erhöhter Krankheitsaktivität könnte durch Erregerkontakt die Sekretion lokal anregen, die folglich auch systemisch nachgewiesen werden kann. Bei anderen immunassoziierten Erkrankungen wie der Psoriasis vulgaris und Vaskulitiden konnten ebenso höhere Serumspiegel, sowie bei Patienten mit mykobakteriellen Lungenerkrankungen eine erhöhte Cathelicidin-Genexpression, nachgewiesen werden.^{158, 159, 233} Zudem könnten durch höhere LL-37-Werte die bereits vorbeschriebenen protektiven Eigenschaften der Förderung von Angiogenese und Wundheilung bewirkt werden.¹⁴⁷ Yoo *et al.* stellten im Mausmodell sowohl bei infektiöser als auch akuter und chronischer Kolitis einen Rückgang der Kollagenproduktion durch Fibroblasten bei intravenöser Gabe Cathelicidin-exprimierender Lentiviren oder oraler Applikation von Cathelicidin fest. Die Autoren beschrieben eine breite antifibrotische Wirkung von Cathelicidin und schlugen demnach die Gabe von LL-37 als präventive Therapieoption für Colitis-assoziierte Fibrosen vor.²³⁴ Tran *et al.* fanden Hinweise auf ein erhöhtes intestinales Strikturrisiko bei MC-Patienten mit LL-37-Defizienz.¹⁶⁰ Deshalb untersuchten wir auch die LL-37-Spiegel hinsichtlich vorbekannter Stenosen bei MC- und CU-Patienten. Bei CU-Patienten konnten wir signifikant niedrigere LL-37-Spiegel bei positiver Stenoseanamnese ermitteln. Bei MC-Patienten zeigte sich dieser Unterschied entgegengesetzt, hier ergaben sich signifikant höhere LL-37-Spiegel bei vorbekannter Stenose.

Die in der Literatur beschriebenen protektiven Eigenschaften von Cathelicidin könnten somit nur im CU-Kollektiv vermutet werden. Möglicherweise führen Stenosingen zu mehr Erregerkontakt und bakterieller Durchwanderung, was - wie bereits bei MC beschrieben²³² - zu erhöhter Ausschüttung von antimikrobiellen Peptiden und somit auch einer systemisch höheren Serumkonzentration an Cathelicidin führt. Schauber *et al.* konnten in Kolonbiopsien von MC-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden keine Unterschiede in den LL-37-Konzentrationen feststellen.¹⁶¹ Unsere Daten zeigten zwar Unterschiede zwischen MC und den Kontrollen, allerdings auch nicht zwischen MC-Patienten mit aktiver Erkrankung und MC-Patienten in Remission. Eine Korrelation zum CDAI bestand bei MC nicht. Womöglich misslingt bei MC-Patienten die Hochregulation der AMP-Produktion auf lokaler Ebene, was zu mehr bakterieller Translokation, Stenosen und Fisteln führt mit in Folge einer systemisch hochregulierten LL-37-Produktion. Dies erklärt jedoch nicht, warum in unserem CED-Kollektiv auch bei CU-Patienten höhere LL-37-Serumkonzentrationen verglichen mit den gesunden Probanden nachgewiesen werden konnten. Die vorbeschriebene, negative Korrelation von LL-37 und Strikturen bei MC-Patienten und die antifibrotischen Eigenschaften im Mausmodell können wir somit anhand unserer Daten am ehesten nur für CU-Patienten vermuten.

De Bruyn *et al.* konnten neben Zusammenhängen zur Krankheitsaktivität auch Assoziationen zur Medikation ermitteln: Die medianen LL-37-Konzentrationen bei CU-Patienten mit Ansprechen auf die Infliximab-Therapie waren signifikant niedriger im Vergleich zu CU-Patienten mit hoher endoskopisch festgestellter Krankheitsaktivität und blieben auch im Vergleich zu den Kontrollen erhöht.¹⁶⁴ Unsere Analysen unterstützen diese Ergebnisse, auch in unserem CU-Kollektiv ergaben sich signifikant niedrigere LL-37-Konzentrationen bei Einnahme von Infliximab. Ein Unterschied zwischen CU-Patienten in Remission bzw. mit aktiver Erkrankung ergab sich unseren Auswertungen zufolge nicht. De Bruyn *et al.* kamen ferner zu dem Ergebnis, dass LL-37 zusammen mit Neutrophile Gelatinase B-assoziiertem Lipocalin und Matrix-Metalloproteinase-9 (NGAL-MMP-9) sowie Chitinase 3-like 1 (CHI3L1) als Parameter für die Remissionsinduktion unter Infliximab verwendet werden könnte. Ebenso könnte LL-37 *non-responder* identifizieren und so in der Entscheidungsfindung bezüglich eines Therapiewechsels dienlich sein.¹⁶⁴ B. Siegmund plädierte aufgrund dieser Daten für die Verwendung von Serum-LL-37 als *Panel* zusammen mit CRP, der Anzahl der neutrophilen Granulozyten, NGAL-MMP-9 und CHI3L1 zum Monitoring der Therapie mit TNF- α -Inhibitoren und des Heilungszustands der intestinalen Mukosa.²³⁵ Diese Parameter standen in dieser Studie nicht zur Verfügung, die vorbeschriebenen Unterschiede in

den Serumkonzentration von LL-37 bei Einnahme von TNF- α -Hemmern kann anhand unserer Daten jedoch unterstützt werden.

In den ROC-Analysen erwies sich LL-37 in allen CED-Kollektiven mit einer signifikanten AUC als möglicher Erkrankungsmarker, für die ermittelten *Cut-offs* ergaben sich allerdings in den einzelnen Kohorten Sensitivitäten und Spezifitäten von etwas über 0,6. Somit könnte LL-37 zur Diagnosestellung einer CED-Erkrankung nur in Zusammenschau mit anderen Parametern angewandt werden. Zur Verwendung als Krankheitsaktivitätsmarker konnte nur im CU-Kollektiv eine signifikante AUC ermittelt werden. Das Cathelicidin LL-37 könnte somit in Kombination mit anderen Parametern als Erkrankungs- und Krankheitsaktivitätsmarker bei CU-Patienten etabliert werden. Durch die inkonsistente Datenlage bleibt allerdings weiterhin unklar, ob höhere LL-37-Spiegel für erhöhte Krankheitsaktivität sprechen. Zudem ist eine sichere Differenzierung der Entität nicht gegeben.

5.4.1 Inverse Assoziation der LL-37-Serumkonzentrationen zu den Vitamin D-Parametern bei CU-Patienten

Die Promotorregion des LL-37-Gens enthält mehrere Vitamin D-Rezeptoren (VDR), die eine Bindestelle für die aktive Form des Vitamin D darstellen.¹⁴⁷ Wang *et al.* zeigten eine Hochregulation der Expression von LL-37-Vorstufen in isolierten Keratinozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten durch 1,25(OH)2D.⁸⁸ In zwei weiteren Veröffentlichungen konnten Korrelationen zwischen niedrigen LL-37-Vorstufen bzw. -mRNA und niedrigen 25(OH)D-Serumspiegeln nachgewiesen werden.^{148, 149} An humanen Korneazellen zeigte sich eine Hochregulation von LL-37 durch 25(OH)D und 1,25(OH)2D.¹³⁷ Raftery *et al.* stellten in einer randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Studie nach dreimonatiger Vitamin D-Supplementation signifikant höhere Cathelicidin-Konzentrationen bei MC-Patienten mit suffizientem Vitamin D-Haushalt im Vergleich zu MC-Patienten mit defizienter Versorgung fest.¹⁵⁰ Auch bei CU-Patienten zeigte eine randomisierte, placebokontrollierte Studie ähnliche Zusammenhänge zwischen Vitamin D-Supplementierung und der Genexpression von LL-37.¹⁵¹

Diese Evidenz konnten wir anhand unserer Ergebnisse sowohl für 25(OH)D als auch für 1,25(OH)2D nicht bestätigen: CED-Patienten mit Vitamin D-Defizienz wiesen im Median höhere LL-37-Serumspiegel auf als Patienten mit ausreichenden 25(OH)D-Werten. Dieser Unterschied erwies sich allerdings nur innerhalb der Gruppe der CU-Patienten als schwach signifikant. Die Auswertung der

1,25(OH)2D-Spiegel zeigte bei CED-Patienten in Remission, insbesondere bei CU-Patienten in Remission, hochsignifikant eine inverse Korrelation zu den LL-37-Serumspiegeln. In den multivariaten Regressionsanalysen blieben diese negativ gerichteten Assoziationen zum 1,25(OH)2D im CED-Kollektiv auch nach Korrektur auf die Krankheitsaktivität, eine Vitamin D-Supplementation und weitere Kovariaten statistisch signifikant. Im CU-Kollektiv lagen die Ergebnisse multivariat betrachtet knapp außerhalb des statistischen Signifikanzniveaus, es ergab sich nur univariat eine signifikante Assoziation. Dies widerspricht den Angaben der Literatur, die zum Teil höhere 25(OH)D- und 1,25(OH)2D-Werte mit höheren LL-37-Leveln in Zusammenhang bringen. Möglicherweise besteht auch hier bei CED-Patienten durch die Barrierestörung im Darmtrakt eine höhere basale Sekretionsrate, die unabhängig vom Vitamin D-Status entzündungsbedingt erfolgt. Bei anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der Rosazea zeigten Studien hohe Cathelicidin-Spiegel bei gleichzeitig niedrigen Vitamin D-Werten.¹⁵² Genauso konnten bei Sepsis-Patienten niedrige Vitamin D-Spiegel und gleichzeitig erhöhte LL-37-Konzentrationen gemessen werden, weshalb LL-37 eine systemische Rolle in der Pathogenese von entzündlichen Erkrankungen spielen könnte.^{152, 236} Chung *et al.* gingen daher davon aus, dass die Cathelicidin-Vitamin D-Achse innerhalb der Pathogenese von akuten und chronischen Entzündungskrankheiten verändert sein könnte, zumal die Studienlage diesen Zusammenhang überwiegend *in vitro* nachgewiesen habe.¹⁵² *In vivo*-Untersuchungen bei CED-Patienten konnten Korrelationen zum Vitamin D-Status nur nach mehrmonatiger, hochdosierter Vitamin D-Therapie herstellen. Raftery *et al.* supplementierten 2.000 I.E./Tag über 3 Monate, Sharifi *et al.* einmalig 300.000 I.E.^{150, 151} Beide Studien schlossen nur Patienten in Remission ein, sodass mögliche Interaktionen durch Entzündungsprozesse vermindert wurden. Zwei weitere Interventionsstudien konnten nach hochdosierter Vitamin D-Therapie *in vivo* keinen Anstieg der Cathelicidin-Spiegel feststellen.^{237, 238} Auch Kim *et al.* konnten in Serumproben von Patienten mit nichttuberkulöser, mykobakterieller Lungenerkrankung keine Korrelationen zum 25(OH)D und zum Vitamin D-Status herstellen, die Autoren vermuteten eine überwiegend von der Erkrankung und weniger vom Vitamin D-Haushalt regulierten Expression der AMP.²³³ In einer prospektiven Kohortenstudie an Pneumonie-Patienten ließ sich im Serum keine Korrelation der LL-37- und 25(OH)D-Spiegel feststellen, Leow *et al.* vermuteten daher eine vom hormonell aktiven Vitamin D abhängige Expression.²³⁹ Unseren Daten zufolge bestand allerdings bei CED-Patienten in Remission, insbesondere bei nicht aktiv erkrankten CU-Patienten, eine negative Assoziation zum 1,25(OH)2D. Demnach könnte bei niedriger Entzündungs- und Krankheitsaktivität ein systemischer Shift vom 25(OH)D zum 1,25(OH)2D niedrigere LL-37-Spiegel bewirken. Dies würden auch

die Ergebnisse von Abreu *et al.*, die in ihrer Publikation erhöhte Serumspiegel von 1,25(OH)₂D mit signifikanter Korrelation zur Krankheitsaktivität bei MC und vermehrter Expression der intestinalen 1- α -Hydroxylaseaktivität beschrieben, unterstützen.¹⁹³ In unserem Kollektiv aller CED-Patienten erwies sich die negative Assoziation zwischen 1,25(OH)₂D und LL-37 auch korrigiert auf die Krankheitsaktivität als statistisch signifikant. Zwar zeigten die *in vitro*-Daten überwiegend eine positiv gerichtete Assoziation zum 1,25(OH)₂D^{88, 89}, möglicherweise erfolgt aber durch den Shift vom 25(OH)D zum aktiven 1,25(OH)₂D und damit einem geringeren 25(OH)-Speicher-Vitamin D eine Herabregulation der Cathelicidin-Produktion. Das würde allerdings nicht erklären, warum in unserem CU-Kollektiv mit 25(OH)-Vitamin D-Defizienz im Median signifikant höhere LL-37-Spiegel gemessen werden konnten.

Laut Chung *et al.* deuten die Daten darauf hin, dass die Expression von LL-37 *in vivo* bei Infektionen durch Vitamin D-abhängige und -unabhängige Wege reguliert wird, welche je nach Bakterienstamm, Zelltyp und Immunstatus des Wirts variieren.¹⁵² Die bei Vitamin D-defizienten, septischen Patienten gezeigten, erhöhten LL-37-Konzentrationen lassen insbesondere bei eskalierender Entzündungssituation eine Vitamin D-unabhängige Expression vermuten. Diese These unterstützt auch eine Interventionsstudie, die bei kritisch erkrankten, septischen Patienten nach Vitamin D-Supplementation keinen Anstieg der Cathelicidin-Plasma-Spiegel nachweisen konnte.²⁴⁰ Zudem stellten auch Chen *et al.* bei Pertussis-Patienten trotz Vitamin D-Defizienz serologisch erhöhte LL-37-Konzentrationen ohne Korrelation zum 25(OH)D fest.²⁴¹ So scheint eine Hochregulation als Reaktion auf Krankheitserreger unabhängig vom Vitamin D-Haushalt zu erfolgen. Weitere Veröffentlichungen konnten im Kontext von anderen Erkrankungen *in vivo* keine Zusammenhänge zwischen den Vitamin D-Parametern und den Cathelicidin-Spiegeln herstellen.^{233, 242} Zusammenfassend bleibt bei heterogener Datenlage weiter unklar, inwiefern die einzelnen Vitamin D-Metaboliten *in vivo* den VDR-Signalweg, die Produktion sowie Sekretion von LL-37 und folglich auch die intestinale Homöostase bei CED-Patienten beeinflussen.

5.5 Inkonsistente HBD-2-Spiegel im Serum von CED-Patienten

Das Humane β -Defensin 2 wird bei Entzündungsprozessen u.a. von Enterozyten des Kolons gebildet und bewirkt als endogenes Antibiotikum der angeborenen Immunabwehr, ähnlich der Funktionsweise von LL-37, eine Störung der Integrität des Bakteriums durch Bildung von Mikroporen in der bakteriellen Phospholipiddoppelschicht.^{166, 170} So können sich epitheliale Oberflächen vor Pathogenen schützen und insbesondere im Darm die Homöostase der symbiotischen

Mikrobiota aufrechterhalten.¹⁶⁶ Die Produktion wird von Plasmazellen der *Lamina propria* im Kolon sowie in Enterozyten durch proinflammatorische Zytokine oder enteroinvasive Bakterien im Rahmen eines Entzündungsprozesses induziert, eine konstitutive Expression ist nur für das HBD-1 beschrieben.^{167, 168} Wehkamp *et al.* zeigten an Biopsien von CED-Patienten geringe Konzentrationen an HBD-2-mRNA aus makroskopisch nicht entzündeten Arealen im Vergleich zu entzündeten Bereichen.¹⁶⁷ In einer weiteren Biopsie-Studie konnte dieser Unterschied nur bei CU-Patienten festgestellt werden.¹⁷³ In Mausmodellen mit induzierter Kolitis wurden hingegen erhöhte Konzentrationen an HBD-2-Orthologen festgestellt.¹⁷² Wir wollten daher untersuchen, ob sich bei Patienten mit CED die Serumspiegel des antimikrobiellen Peptids HBD-2 auch systemisch von gesunden Kontrollen unterscheiden und ob eine Assoziation mit der Krankheitsaktivität vorhanden ist.

Unser CED-Kollektiv wies im Vergleich zu den gesunden Probanden eine im Median niedrigere HBD-2-Konzentration im Serum auf, jedoch ohne statistisch feststellbaren Unterschied. Die Stratifizierung nach Krankheitsaktivität und Entität erbrachte ebenso keine relevanten Unterschiede, es zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge zu klinisch relevanten Entzündungsindikatoren. In den ROC-Analysen erwies sich HBD-2 bei fehlender Assoziation zur Erkrankung und Krankheitsaktivität in allen CED-Kollektiven nicht als dienlicher Erkrankungs- oder Aktivitätsmarker.

Wehkamp *et al.* zeigten eine Hochregulation von HBD-2 und HBD-3 im Kolonepithel von CU-Patienten, nicht aber bei MC-Patienten.¹⁷³ Bei MC bestand in dieser Publikation kein signifikanter Unterschied zwischen entzündeten und nicht-entzündeten Arealen, zudem waren die Level in nicht-entzündeten Bereichen gleich zu den gesunden Kontrollen.¹⁷³ Zu einem ähnlichen Ergebnis bei MC-Patienten kamen auch Fahlgren *et al.*, auch hier konnten in Biopsien nur bei CU-Patienten signifikant höhere Level an HBD-2-mRNA im Vergleich zu Proben von Patienten ohne CED-Erkrankung detektiert werden.²⁴³ Dies ist womöglich der Grund, warum in Kolonbiopsien von MC-Patienten weniger effektive antimikrobielle Abwehrmechanismen gegen intestinale Mikrobiota als bei CU-Patienten und gesunden Probanden festgestellt werden konnte.²⁴⁴ So lässt sich eine Barrierestörung mit defizienter Produktion antimikrobieller Peptide insbesondere bei MC vermuten.¹⁷³

Diese Evidenz auf lokaler Ebene konnten wir systemisch im Serum nicht bestätigen, es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen CED-Patienten und den gesunden Kontrollen. Auch die Differenzierung nach MC und CU blieb außerhalb des statistischen Signifikanzniveaus. Weiterhin konnte keine Assoziationen zur Krankheitsaktivität, zum CRP-Spiegel, der Anzahl der Leukozyten und

Thrombozyten oder dem fäkalen Calprotectin hergestellt werden. Ähnliche Daten lieferten die Analysen von Yamaguchi *et al.*, auch hier ließen sich systemisch keine signifikanten Unterschiede im Plasma von 55 CED-Patienten und 57 gesunden Kontrollen, auch nicht innerhalb der MC-/CU-Subpopulationen, ermitteln.¹⁷⁴ Die Sekretion von AMP wird über NF- κ B-abhängige Signalwege durch proinflammatorische Zytokine wie u.a. TNF- α oder IL-17 induziert.^{175, 176} Möglicherweise erfolgt bei intestinaler Entzündung eine vorwiegend luminale Sekretion der Defensine, die sich systemisch nicht nachweisen lässt. Diese These würden auch die Daten von Isomoto *et al.* bestätigen. Im Magensaft von Patienten mit *Helicobacter pylori*-Infektion konnten im Vergleich zu nicht infizierten Patienten signifikant höhere HBD-2-Konzentrationen festgestellt werden, die sich allerdings systemisch im Plasma als unabhängig von *Helicobacter pylori*-Status erwiesen.²⁴⁵ Dem gegenüber konnten bei pädiatrischen CED-Patienten im Vergleich zu gesunden Kindern im Stuhl keine Unterschiede in den HBD-2-Spiegeln und ebenso keine Korrelation zur Krankheitsaktivität festgestellt werden.²⁴⁶ So könnte zwar eine vorwiegend luminale Sekretion zu homöostatischen Zwecken erfolgen, im Fäzes lässt sich diese allerdings nicht nachweisen. Insgesamt bleibt die Datenlage zu Defensinen bei CED heterogen. So konnten in einer Kohorte aus europäischen und US-amerikanischen Patienten eine geringere Anzahl an Genkopien von HBD-2 mit MC und einer beeinträchtigten antimikrobiellen Aktivität assoziiert werden²⁴⁷, während Bentley *et al.* bei neuseeländischen Patienten eine hohe Anzahl an HBD-2-Genkopien als einen Risikofaktor für eine MC-Erkrankung beschrieben.²⁴⁸ Bei intestinaler Translokation bakterieller Bestandteile nach basolateral durch eine entzündungsbedingte Schrankenstörung konnten bei MC-Patienten systemisch erhöhte HBD-2-Spiegel, die mit der Anzahl der bakteriellen DNA-Bestandteile im Serum korrelierten, nachgewiesen werden. Gleichzeitig war die Anzahl der DNA-Partikel mit proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-21 und IFN- γ , welche wiederum die Produktion des Defensins beeinflussen, assoziiert.²³² Somit könnte eine systemisch nachweisbare, erhöhte HBD-2-Expression erst bei eskalierender Entzündungssituation mit Darmbarrierestörung detektierbar sein. Durch die hohe Anzahl an Patienten in Remission innerhalb unseres Studienkollektivs könnte sich dadurch kein signifikanter Effekt abgezeichnet haben. Gleichzeitig bestand allerdings auch keine signifikante Korrelation zur Krankheitsaktivität. Sakemi *et al.* konnten bei 105 MC-Patienten zwar serologisch höhere HBD-2-Spiegel im Vergleich zu 92 gesunden Probanden ermitteln, eine Assoziation zur Krankheitsaktivität konnte aber auch nicht hergestellt werden.²⁴⁹ Die Hypothese einer defizienten HBD-2-Produktion bei MC-Patienten kann anhand der Ergebnisse von Sakemi und Kollegen sowie unseres Datensatzes somit nicht bestätigt werden. Schauber *et al.* unterstützen in ihrer Publikation die These einer von der Art des

Epithels abhängigen Expression der AMP. Die Autoren zeigten, dass neben einer signifikant höheren Expression von AMP bei CU die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 in Kolonepithelzellen keinen Einfluss auf die AMP-Expression nahmen.¹⁶¹ Bei der atopischen Dermatitis – einer neben der CU auch chronischen, Th2-gesteuerten Entzündungskrankheit – konnten Nomura *et al.* eine Herabregulation der Expression von HBD-2 in Keratinozyten durch IL-4 und IL-13 nachweisen.²⁵⁰ Dies führte zu einer verminderten HBD-2-Peptidexpression mit der Folge einer vermutlich erhöhten Suszeptibilität für bakterielle Infektionen.²⁵⁰ Diese Diskrepanz einer verminderten Expression des AMP HBD-2 bei Th2-gesteuerten Hauterkrankungen und einer erhöhten Expression des AMP Cathelicidin bei Th2-gesteuerten Darmerkrankungen deutete den Autoren zufolge auf unterschiedliche Regulationsmechanismen in verschiedenen Epithelgeweben hin.¹⁶¹ Deshalb könnte sich bei serologischer Messung von HBD-2 ein heterogenes Bild abzeichnen, das, bedingt durch die unterschiedlichen Expressions- und Regulationswege in den einzelnen Geweben, systemisch keine Assoziationen mit der Erkrankung oder der Krankheitsaktivität zeigt. Als Biomarker für eine CED-Erkrankung oder als Aktivitätsmarker für die Krankheitslast kann HBD-2 unseren Auswertungen und ebenso heterogener Datenlage zufolge nicht etabliert werden, in den ROC-Analysen erwies sich das Defensin als nicht geeignet.

5.5.1 Fehlende Assoziation zu Vitamin D-Parametern und dem NOD2-Mutationsstatus

An Zellkulturen zeigte sich eine NOD2-abhängige Expression von HBD-2. Nach Erkennung bakterieller Abbauprodukte (MDP) aktiviert das zytosolische Protein NOD2 den HBD-2-Promotor und induziert NF- κ B-abhängig die Bildung des Defensins.^{175, 176} Die Bildung von NOD2 wiederum scheint mit der hormonell aktiven Form des Vitamin D assoziiert zu sein. 1,25(OH)₂D induziert das NOD2-Gen in Monozyten und Epithelzellen durch distale *Enhancer* und führt synergistisch mit bakteriellen Peptidoglykanen zu einer signifikanten Expressionssteigerung der mRNA von HBD-2.⁸⁹ Wang *et al.* stellten fest, dass dieser synergistische Mechanismus in Makrophagen aus MC-Patienten mit einer R702w-NOD2-Mutation nicht vorhanden ist.⁸⁹ In humanen Korneazellen konnte zudem ein Anstieg der HBD-2-Expression bei Inkubation mit 1,25(OH)₂D beobachtet werden.¹³⁷ Diese Evidenz legt einen möglichen Zusammenhang von Vitamin D, Genetik und antimikrobiellen Peptiden bei Patienten mit MC nahe.⁸⁹

Anhand unseres Datensatzes wollten wir daher analysieren, ob sich ein Vitamin D-Mangel in einer systemischen Defensin 2-Defizienz widerspiegelt, ob Assoziationen zu den einzelnen Vitamin D-Parametern bestehen und ob ein Zusammenhang zum

NOD2-Mutationsstatus besteht. In uni- und multivariaten Analysen konnte kein Zusammenhang zu den einzelnen Vitamin D-Parametern hergestellt werden, die Analysen blieben außerhalb des statistischen Signifikanzniveaus. Die vorbeschriebene Assoziation zum Vitamin D konnte bisher nur *in vitro* an Zellkulturen festgestellt werden.^{88, 89, 137, 251} Verschiedene *in vivo*-Analysen lieferten heterogene Ergebnisse. In muriner, Salmonellen-induzierter Kolitis konnte nach mehrtägiger Vitamin D-Supplementation ein signifikanter Anstieg der HBD-2-mRNA-Konzentrationen nachgewiesen werden.²⁵² Dem gegenüber ließen sich bei Patienten mit unterer Harnwegsinfektion²⁵³, mykobakteriellen Lungenerkrankungen²³³, Tuberkulose-²⁴² und Pneumonie-Patienten²³⁹ im Serum oder in bronchoalveolärer Lavage keine Zusammenhänge zum Vitamin D herstellen. Eine intensive Literaturrecherche zur Assoziation der Vitamin D-Metaboliten und HBD-2 im Kontext von CED ergab nur eine Veröffentlichung, die randomisiert, placebokontrolliert und doppelverblindet u. a. das Defensin 2 nach hochdosierter Vitamin D-Supplementierung bei MC-Patienten untersuchte. Auch hier konnten nach täglicher Applikation von 2000 I.E. Vitamin D3 über drei Monate keine signifikanten Zusammenhänge nachgewiesen werden.¹⁵⁰ Weitere Studien, insbesondere auch bei CU-Patienten, konnten nicht ausfindig gemacht werden.

Die Expression von HBD-2 *in vivo* scheint unabhängig von den Vitamin D-Metaboliten zu erfolgen. Dies vermuteten auch Kim *et al.* in ihrer Veröffentlichung zur fehlenden Korrelation von 25(OH)D und HBD-2 bei Patienten mit mykobakterieller Lungenerkrankung.²³³ Hertting *et al.* konnten systemisch keine Zusammenhänge zwischen AMP-Spiegeln und den 25(OH)D-Werten herstellen, erst *ex vivo* konnte in Urothelproben nach Infektion mit *Escherichia coli* ein signifikanter Anstieg der Expression des AMP nachgewiesen werden. Die Autoren nahmen daher an, dass 25(OH)D die Zellen darauf vorbereitet, nur dann mehr AMP zu produzieren, wenn dies zum Schutz der Harnwege vor bakteriellen Infektionen erforderlich sei.²³⁸ Ähnliche Hinweise lieferten Adams *et al.*, die im Serum keine Korrelation des AMP Cathelicidin und einer Vitamin D-Supplementation feststellten, allerdings *ex vivo* nach Inkubation mit Vitamin D höhere Expressionsraten des AMP in Monozyten nachweisen konnten.²³⁷ Somit scheint die Vitamin D-abhängige Expression der antimikrobiellen Peptide und somit auch des HBD-2 *in vivo* komplexer reguliert zu sein, so dass nur *in vitro* Zusammenhänge zu den Vitamin D-Metaboliten hergestellt werden konnten. Unsere multivariat getroffenen Analysen lassen bei ausreichender Zahl an Probanden keine systemische Korrelation zum Vitamin D-Status vermuten. Die oben beschriebene Interventionsstudie von Raftery *et al.* konnte bei MC-Patienten keine Hochregulation der HBD-2-Spiegel nach einer mehrwöchigen Vitamin D-Supplementation nachweisen.²³⁸ Demnach sollten noch prospektive Daten bei CU-

Patienten erhoben werden, um auch für diese Entität der CED einen systemischen Zusammenhang ausschließen zu können.

An Zellkulturen zeigte sich neben einer Vitamin D-abhängigen Expression eine Assoziation zu den CARD15/NOD2-Genotypen. 1,25(OH)₂D induziert synergistisch mit Muramyldipeptiden (MDP) das zytosolische Protein NOD2, das zu einer Expressionssteigerung von HBD-2 führt.^{89, 175} Wir wollten prüfen, ob bei NOD2-mutierten Patienten höhere Vitamin D-Spiegel gegebenenfalls anders als bei Patienten ohne eine Mutation nicht mit höheren HBD-2-Spiegeln assoziiert waren. In den multivariaten Regressionsanalysen ergaben sich, differenziert nach Wildtyp- und R702w-mutierten CED- und MC-Patienten, keine signifikanten Einflüsse der einzelnen Vitamin D-Parameter auf die HBD-2-Spiegel. Die Datenlage zu den NOD2-Genotypen im Zusammenhang mit der Expression antimikrobieller Peptide und Defensine ist inkonsistent. Mehrere Veröffentlichungen konnten an Zellkulturen reduzierte Defensin-Expressionen bei verschiedenen NOD2-Genvarianten nachweisen.^{89, 175, 251} Nach intensiver Literaturrecherche konnte nur eine Veröffentlichung zur systemischen *in vivo*-Bestimmung der β -Defensin in Korrelation zu den NOD2-Varianten aufgefunden werden. Gutiérrez *et al.* stellten bei MC-Patienten mit Wildtyp-NOD2-Status auf mRNA- und Protein-Ebene eine signifikante Korrelation von HBD-2 und der Konzentration an bakteriellen DNA-Bestandteilen in Blutproben fest. Bei MC-Patienten mit einer NOD2-Variante konnte dieser Zusammenhang nicht nachgewiesen werden. Die Autoren vermuteten daher für NOD2 eine Mediatorrolle in der Regulation bakterieller Infekte und der Bildung antimikrobieller Peptide.²³² Ähnliche Hinweise lieferten die Auswertungen von Voss *et al.*, die bei Herabregulation der NOD2-Expression in Zellkulturen eine mangelnde Induktion von HBD-2 feststellten.¹⁷⁵ Dem gegenüber zeigten Simms *et al.* aus Ileumbiopsien bei MC, dass die α -Defensin Expression unabhängig vom NOD2-Status erfolgte und mehr mit dem Status der Inflammation assoziiert war. So wurde eher eine Schädigung des intestinalen Epithels und eine damit assoziierte niedrigere Defensin-Expression vermutet.²⁵⁴ Schaubert *et al.* stellten für das AMP Cathelicidin keine Zusammenhänge zu den drei NOD2-Varianten R702w/SNP8, L100fs/SNP13 und G908R/SNP12 fest.¹⁶¹ In unseren Analysen erfolgte nur eine Datenauswertung der NOD2-Variante R702w/SNP8. Wang *et al.* wiesen die defekte Induktion der HBD-2-Expression durch 1,25(OH)₂D und MDP in Monozyten mit homozygoter R702w-Mutation nach.⁸⁹ Unser Kollektiv enthielt nur zwei homozygot mutierte MC-Patienten, 26 wiesen eine heterozygote R702w-Mutation auf. Somit könnte bei geringer Anzahl homozygot mutierter Patienten kein statistisch signifikanter Effekt erreicht worden sein. Zusammenfassend ließen sich in unserem klinisch gut charakterisierten Patientenkollektiv systemisch keine Zusammenhänge

zwischen den HBD-2-Konzentrationen, dem Vitamin D-Status und der überwiegend heterozygot mutierten NOD2-R702W-Variante herstellen.

5.6 Stärken und Limitationen

Unsere Studie weist mehrere Stärken auf. Das Studienkollektiv bestand aus kumulativ 310 Probanden mit insgesamt 250 gut charakterisierten CED-Patienten und 60 gesunden Kontrollpersonen. Es ergab sich eine Kohorte mit breitem Spektrum an CED-Phänotypen samt Daten zu unter anderem Demographie, Krankheitsaktivität, intestinaler Ausbreitung der CED, NOD2-Status und medikamentöser Therapie. Wir untersuchten im Gegensatz zu den meisten Vorarbeiten nicht nur die 25(OH)D-Spiegel, sondern auch die Konzentrationen des aktiven Hormons 1,25(OH)₂D. Der zirkulierende 25(OH)D-Metabolit wird als Marker für die VD-Speicher in Leber und Fettgewebe und damit zur Definition einer Hypovitaminose D verwendet, während das 1,25(OH)₂D erst nach Hydroxylierung aus 25(OH)D entsteht.⁷² Diese Reaktion wird katalysiert durch das Enzym 1- α -Hydroxylase, das von Nierenzellen, Immunzellen sowie Zellen des Gastrointestinaltrakts exprimiert wird.^{72, 78, 79} 1,25(OH)₂D bindet spezifisch an VD-Rezeptoren (VDR) und moduliert über kernspezifische Rezeptoren die VD-abhängige Genexpression.⁸² Somit wurden in dieser Arbeit neben der VD-Speicherform auch die systemischen, endokrin wirksamen VD-Metabolite näher untersucht. Eine weitere Stärke dieser Arbeit stellen die uni- und multivariaten linearen Regressionsmodelle dar. Wir analysierten die Zusammenhänge der einzelnen Biomarker zu den Vitamin D-Parametern in allen CED-Kohorten und im gesunden Kollektiv multivariat kontrolliert. Die Aussagen wurden korrigiert um potenzielle Confounder wie CED-Erkrankung^{33, 189}, Geschlecht¹⁹⁸, Raucherstatus^{33, 90}, BMI⁷⁹, Vitamin D-Supplementation¹⁵⁰, Krankheitsaktivität³³ und CRP³³ getroffen. Ebenso wurde die Variable „Alter“^{79, 198} einbezogen, um den Einfluss des Probandenalters bei einem im Median jüngeren Kontrollkollektiv zu kontrollieren. Vorab wurden Teilnehmer mit Nierenfunktionseinschränkung sowie Leberzirrhose ausgeschlossen, um mögliche Störfaktoren durch reduzierte Hydroxylierung der Vitamin D-Metaboliten im Leber- und Nierengewebe zu reduzieren.⁷²

Eine mögliche Schwäche dieser Arbeit besteht im Design der Studie. Als Querschnittstudie lassen sich die Aussagen nur als Korrelation oder Assoziation ohne kausale Interpretation treffen. Hier bedarf es weiterer Interventionsstudien, um sichere Daten über den Einfluss der VD-Metabolite auf die einzelnen Serum-Biomarker zu generieren. Fehlende Daten zur intestinalen Krankheitsaktivität anhand endoskopischer Scores stellen eine Limitation dieser Arbeit dar. Wir definierten die Krankheitsaktivität ausschließlich mittels klinischer Parameter des

CDAI nach Best¹⁸ bzw. des klinischen CAI nach Rachmilewitz¹⁹. Die verwendeten Daten zu fäkalem Calprotectin lagen im Mittel 66 Tage um die Blutentnahme. In den multivariaten Analysen bezogen wir daher zudem den CRP-Spiegel ein, der am selben Tag der Messung der Vitamin D-Parameter und Biomarker bestimmt wurde und gemäß Ishida *et al.* zumindest bei aktiv erkrankten CU-Patienten mehr als FC mit der intestinalen Entzündungssituation assoziiert war.^{112, 255} Als weitere Schwäche dieser Arbeit könnte ein unvollständiges Vitamin D-Modell genannt werden. Verschiedene Faktoren können die VD-Serumspiegel beeinflussen. Es wurden Daten zur Krankheitsaktivität, zum Entzündungsstatus sowie zum Raucher- und VD-Supplementationsstatus erfasst. Patienten mit chronischer Nierenfunktionseinschränkung und somit etwa bestehendem sekundären Hyperparathyreoidismus als Genese einer 1,25(OH)₂D-Hochregulation wurden vorab ausgeschlossen. Im Gegensatz dazu wurden keine Informationen zur Jahres- und Tageszeit der Blutentnahme, Ausmaß der Sonnenexposition, zur Ethnizität der Studienteilnehmer, dem intestinalen VDR-Status oder zum exakten Parathormonspiegel einbezogen.^{76, 193, 198, 199} Insgesamt aber kann trotz dieser fehlenden Daten von einem kaukasischen, gut charakterisierten Patienten- und Kontrollkollektiv ausgegangen werden, in dem die Aussagen multivariat um die wichtigsten Störgrößen kontrolliert getroffen wurden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Ein Vitamin D-Mangel ist bei CED-Patienten weit verbreitet. In zahlreichen Studien konnten Assoziationen zum Krankheitsverlauf, zur Krankheitsaktivität und zur Lebensqualität hergestellt werden.^{71, 90-92} Ebenso sind einfach bestimmbare, nicht invasive Serumbiomarker im klinischen Assessment von CED noch immer limitiert. So wurden im Rahmen dieser Arbeit vier Serumparameter mit aus Grundlagenforschung bekannter Vitamin D-Assoziation näher untersucht: CCL20, Serum-Calprotectin, Cathelicidin/LL-37 und Humanes β -Defensin 2 wurden in einem Probandenkollektiv aus 170 Morbus Crohn-Patienten, 80 Colitis ulcerosa-Patienten und 60 gesunden Kontrollpersonen analysiert, klinische Daten wurden erfasst und die Parameter des Vitamin D-Haushaltes laborchemisch ermittelt. Die Studienpopulation wurde neben der Krankheitsaktivität und Entität anhand des Vitamin D-Status in „Defiziente“- und „Suffiziente“-Kollektive eingeteilt, die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels parametrischer und nicht-parametrischer Tests bewertet. Die Beziehung zwischen den Vitamin D-Parametern und den einzelnen Serum-Biomarkern wurde in einem multivariaten Regressionsmodell untersucht, wobei die folgenden relevanten Kovariablen berücksichtigt wurden: Alter, Geschlecht, BMI, Raucherstatus, Krankheitsaktivität, CRP und Vitamin D-Supplementation. Vorab waren Probanden mit bekannter Nierenfunktionseinschränkung ausgeschlossen worden, zudem zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Nierenretentionsparameter beim Vergleich der Probanden mit und ohne Vitamin D-Mangel. Mittels ROC-Analysen wurden die einzelnen Serum-Biomarker als Erkrankungs- sowie Krankheitsaktivitätsmarker für die Gruppen CED, MC oder CU analysiert.

Unsere Daten bestätigten einen bereits mehrfach publizierten 25(OH)-Vitamin D-Mangel bei CED-Patienten, es zeigten sich korrigiert auf eine mögliche Vitamin D-Supplementation niedrigere 25(OH)D-Spiegel bei CED-Patienten.^{71, 90-92} Eine Assoziation zur Krankheitsaktivität bestand nicht, die Datenlage hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen Vitamin D-Haushalt und Entzündungsaktivität ist inkonsistent.^{90, 190, 191} Entgegen der aus Grundlagenforschung und Mausmodellen angenommenen antiinflammatorischen und integritätssteigernden Wirkung des aktiven Vitamin D 1,25(OH)2D^{96, 97} zeigten wir in allen CED-Kollektiven, auch um die Einnahme von Vitamin D-Präparaten korrigiert, signifikant höhere Konzentrationen an 1,25(OH)2D im Vergleich zu gesunden Probanden. Diese Ergebnisse unterstützen die Metaanalyse von Li *et al.*, die bei CED höhere 1,25(OH)2D-Konzentrationen beschrieben. Eine reaktiv hochregulierte Hydroxylaseaktivität oder die Folge eines sekundären Hyperparathyreoidismus bei Hypocalcämie werden diskutiert.¹⁹³ Einzelne Arbeiten stellten niedrigere

1,25(OH)₂D-Spiegel bei CED fest und stützten damit eher die beschriebenen protektiven Eigenschaften des hormonell aktiven Vitamin D.^{189, 196} Verschiedene Faktoren wie Sonnenlichtexposition und Ethnizität können Einfluss auf die Vitamin D-Serumspiegel nehmen, insgesamt stellt sich die Datenlage aufgrund der vermutlich teils unterschiedlichen Kohorten heterogen dar. Trotzdem sollte ein Vitamin D-Mangel bei CED-Patienten konsequent behandelt werden.

Die Auswertungen zeigten für den potenziellen Biomarker CCL20 bei CED-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant höhere Serumkonzentrationen des proinflammatorischen Th17-Chemokins. Erstmals konnten auch bei CU-Patienten systemisch hochregulierte CCL20-Spiegel nachgewiesen werden. In den ROC-Analysen erwies sich CCL20 in allen Gruppen als signifikanter Erkrankungsmarker, allerdings für den ermittelten *Cut-off*-Wert nur mit geringer Sensitivität und Spezifität. In Kombination mit weiteren serologischen, immunologischen oder genetischen Markern könnte CCL20 etabliert werden. Zur Krankheitsaktivität konnten wir keinen Zusammenhang herstellen, als Aktivitätsmarker ist CCL20 auch in den ROC-Analysen nicht dienlich. In dieser Arbeit konnte zudem erstmals die in Zellkulturen und Mausmodellen beschriebene inverse Korrelation zu den Vitamin D-Spiegeln systemisch im Serum bestätigt werden.^{136, 137, 201} Es zeigten sich in den multivariaten Regressionsanalysen signifikant höhere CCL20-Konzentrationen bei CU-Patienten mit Vitamin D-Mangel, ebenso gingen höhere 1,25(OH)₂D-Spiegel mit signifikant niedrigeren CCL20-Werten einher. Auch innerhalb der gesunden Kontrollkohorte gingen multivariat kontrolliert höhere 25(OH)D-Spiegel mit niedrigeren CCL20-Konzentrationen einher. Diese Evidenz lässt in Anbetracht der bekannt hohen Prävalenz eines VD-Mangels bei CED-Patienten^{71, 90-92} sowie der chemotaktischen Wirkung der sog. CCL20-CCR6-Achse auf proinflammatorische Th17-Zellen, Vitamin D als eine potenziell therapeutische Option bei CU-Patienten vermuten.^{127, 135, 202, 206} Hier bedarf es aufgrund des Querschnittsdesigns dieser Arbeit weiterer Interventionsstudien im Kontext von CED-Erkrankungen.

Das Serum-Calprotectin (SC) könnte als Krankheitsaktivitätsmarker dienlich sein, es fanden sich signifikante Unterschiede beim Vergleich der Patienten mit aktiver Erkrankung zu Patienten in Remission. Gleichzeitig bestanden hochsignifikante Korrelationen zum fäkalen Calprotectin, zum CRP und zur Anzahl der Leukozyten im Blutbild. SC erwies sich in den ROC-Analysen insbesondere bei CU-Patienten als signifikanter Krankheitsaktivitätsmarker. Unterschiede zu gesunden Probanden bestanden nicht, so dass SC als Biomarker für eine CED-Erkrankung ausscheidet. Die vorbeschriebene Assoziation der SC-Konzentrationen zur Einnahme von Infliximab bei MC-Patienten¹¹⁸ konnte auch für die Colitis ulcerosa bestätigt

werden. Erstmals wurden in dieser Arbeit zudem die einzelnen Vitamin D-Parameter mit den Serum-Calprotectin-Spiegeln assoziiert. Die bereits für fäkales Calprotectin beschriebene inverse Korrelation zum 25(OH)-Vitamin D konnte systemisch im Serum, auch multivariat kontrolliert, nicht bestätigt werden.

Das Cathelicidin LL-37 ist als antimikrobielles Peptid Teil des angeborenen Immunsystems und bewirkt durch die kationische, polare Struktur lytische Vorgänge und Apoptose bakterieller Krankheitserreger.^{141, 152} Die aktuelle Evidenz zeigt eine breite Korrelation mit Infektionen, Entzündungen und Autoimmunerkrankungen.¹⁶⁰ Hinsichtlich der Assoziation zu CED ist die Datenlage heterogen. Unser Patientenkollektiv wies im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höhere LL-37-Spiegel auf, es bestanden im CU-Kollektiv positive Korrelationen zur Krankheitsaktivität sowie bei allen CED-Patienten zum CRP-Spiegel, der Anzahl der Leukozyten und Thrombozyten im Blutbild und der Konzentration an Calprotectin im Stuhl. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu Veröffentlichungen, die hohe Cathelicidin-Spiegel mit niedriger Krankheitsaktivität und guter Prognose der CED-Erkrankung in Verbindung bringen.¹⁶⁰ Gleichzeitig konnten aber in Biopsien von CED-Patienten höhere LL-37-Konzentrationen als bei gesunden Probanden festgestellt werden.^{139, 161} Demnach erweist sich die bestehende Evidenz als inkonsistent, so dass LL-37 trotz meist signifikanter AUC in den ROC-Analysen als potenzieller Erkrankungs- oder Krankheitsaktivitätsmarker ausscheidet.

Die Cathelicidin-Vitamin D-Achse beschreibt eine VDR-abhängige Hochregulation der LL-37-Expression durch Vitamin D-Metabolite.¹⁵² So gingen *in vivo* und *in vitro* eine suffiziente Vitamin D-Versorgung mit höheren Cathelicidin-Spiegeln einher.^{88, 137, 150, 151} Unseren Auswertungen zufolge ergaben sich in den nicht-parametrischen Tests allerdings signifikant höhere LL-37-Serumspiegel bei CED-Patienten mit Vitamin D-Defizienz, es zeigte sich insbesondere bei CU-Patienten eine signifikante negative Korrelation zum 1,25(OH)₂D. In den multivariaten Regressionsanalysen blieb diese negativ gerichtete Assoziation bei CU knapp außerhalb des statistischen Signifikanzniveaus. Die Expression scheint demnach insbesondere bei entzündlichen Erkrankungen, ähnlich den Hinweisen von Chung *et al.*, über Vitamin D-unabhängige Signalwege reguliert.¹⁵² Einen antiinflammatorischen Effekt der Vitamin D-Metabolite durch Hochregulation des antimikrobiellen Peptids LL-37 konnten wir systemisch an CED-Patienten nicht feststellen. In induzierter, muriner Colitis bewirkte appliziertes Cathelicidin eine Herabregulation der Kollagenproduktion, die Autoren vermuteten daher eine antifibrotische Wirkung durch LL-37.²³⁴ Unsere Auswertungen konnten dies erstmals systemisch bei CU-Patienten mit positiver Stenoseanamnese bestätigen, diese wiesen signifikant niedrigere LL-37-Spiegel auf. In Serumproben von MC-Patienten beschrieben Tran

et al. ähnliche Zusammenhänge¹⁶⁰, bei entgegengesetzter Assoziation in unserem MC-Kollektiv konnten wir diese Annahme nicht unterstützen.

Für das antimikrobielle Peptid Humanes β -Defensin 2 konnten keine Assoziationen zur CED-Erkrankung oder zur Krankheitsaktivität festgestellt werden. Die in Mausmodellen, Zellkulturen und Schleimhautbiopsien beobachtete Hochregulation von HBD-2 bei CED, insbesondere bei CU-Patienten, sowie die Korrelation zur Krankheitsaktivität ließ sich serologisch nicht bestätigen.^{167, 172, 173} In den ROC-Analysen erwies sich HBD-2 als Biomarker nicht geeignet. *In vitro* zeigten Wang *et al.* eine Vitamin D- und NOD2-abhängige Expression.⁸⁹ Dies war systemisch nicht festzustellen, multivariate Regressionsanalysen konnten keine Assoziationen zu den Vitamin D-Parametern und zum NOD2-R702w-Mutationsstatus nachweisen. So konnte in diesem klinisch gut charakterisierten Patientenkollektiv, multivariat auf potenzielle Confounder korrigiert, der vermutete Zusammenhang von Vitamin D, Genetik und antimikrobiellen Peptiden bei CED-Patienten auf systemischer Ebene nicht bestätigt werden.

Insgesamt erwiesen sich in unseren Analysen nur das CCL20 als Erkrankungsmarker und das SC als Krankheitsaktivitätsmarker geeignet, für LL-37 bedarf es aufgrund der inkonsistenten Datenlage und vermutlich heterogener Expressionsmuster weiterer Studien. Die vorbeschriebenen Assoziationen der einzelnen Serumparameter zum Vitamin D ließen sich nur hinsichtlich des Parameters CCL20 nachweisen, erstmals konnte hier eine Assoziation zum Vitamin D als bekanntem Umweltrisikofaktor für die Entwicklung einer CED^{49, 92} auf systemischer Ebene multivariat in einem klinisch gut charakterisierten Kollektiv bestätigt werden. Die Suppression des Th17-Chemokins CCL20 durch hohe Spiegel an 1,25(OH)₂-Vitamin D und einem suffizienten Vitamin D-Haushalt könnte bei CU-Patienten und gesunden Probanden vermutet werden. In Anbetracht der hohen Prävalenz eines Vitamin D-Mangels bei CED und der hinreichend bekannten Zusammenhänge zur Schwere der Erkrankung und der Lebensqualität könnten VD-Präparate durch die erzielte Herabregulation des Th17-Chemokins zumindest bei CU-Patienten eine relevante Therapieoption darstellen.^{71, 90-92} Insbesondere bei MC sind Polymorphismen im VDR beschrieben, eine vermutlich reduzierte VDR-Expression bei MC könnte signifikante Zusammenhänge in unserem MC-Kollektiv verhindert haben.²¹⁵ Die Supplementation von 2000 I.E. Vitamin D pro Tag führte in einer randomisierten kontrollierten Studie bei gesunden Probanden zu einer bis zu 60-fachen Induktion des VDR und VD-abhängigen Signalwegen, die wiederum die CCL20-Produktion regulieren.²¹⁶ Mit nur durchschnittlich 1000 I.E. Cholecalciferol pro Tag in unseren Kollektiven könnte eine höhere Dosis auch bei MC-Patienten zu niedrigeren CCL20-Konzentrationen führen. Insgesamt könnten

die Ergebnisse dieser Arbeit eine Grundlage für weitere Untersuchungen zur Ursache einer CED-Prädisposition Vitamin D-defizienter Patienten darstellen. Hierfür bedarf es weiterer Interventionsstudien, auch zum Einfluss einer Vitamin D-Supplementation auf Th17-assoziierte Zytokine und Chemokine.

7 Literaturverzeichnis

1. Windsor, J. W., Kaplan, G. G.: Evolving Epidemiology of IBD. *Current Gastroenterology Reports*, 21: 40, 2019.
2. Baumgart, D. C., Carding, S. R.: Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*, 369: 1627-40, 2007.
3. Cheifetz, A. S.: Management of active Crohn disease. *Jama*, 309: 2150-58, 2013.
4. Azramezani Kopi, T., Shahrokh, S., Mirzaei, S., et al.: The role of serum calprotectin as a novel biomarker in inflammatory bowel diseases: a review study. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 12: 183-89, 2019.
5. Feuerstein, J. D., Cheifetz, A. S.: Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. *Mayo Clinic Proceedings*, 92: 1088-103, 2017.
6. Williams, W. J.: Histology of Crohn's Syndrome. *Gut*, 5: 510-16, 1964.
7. Leshchinskiy, S., Ali, N., D'Agostino, R.: Cobblestone sign. *Abdominal Radiology (New York)*, 43: 3532-33, 2018.
8. Rieder, F., Zimmermann, E. M., Remzi, F. H., et al.: Crohn's disease complicated by strictures: a systematic review. *Gut*, 62: 1072-84, 2013.
9. Abraham, C., Cho, J. H.: Inflammatory bowel disease. *The New England Journal of Medicine*, 361: 2066-78, 2009.
10. Laass, M. W., Roggenbuck, D., Conrad, K.: Diagnosis and classification of Crohn's disease. *Autoimmunity Reviews*, 13: 467-71, 2014.
11. Harbord, M., Annese, V., Vavricka, S. R., et al.: The First European Evidence-based Consensus on Extra-intestinal Manifestations in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's & Colitis*, 10: 239-54, 2016.
12. Sturm, A., Atreya, R., Bettenworth, D., et al.: Aktualisierte S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“ der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) (Version 4.1) – living guideline. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 62: 1229-318, 2024.
13. Di Sabatino, A., Biancheri, P., Rovedatti, L., et al.: Recent advances in understanding ulcerative colitis. *Internal and Emergency Medicine*, 7: 103-11, 2012.
14. Danese, S., Fiocchi, C.: Ulcerative colitis. *The New England Journal of Medicine*, 365: 1713-25, 2011.

15. Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P. B., et al.: Ulcerative colitis. *Lancet*, 389: 1756-70, 2017.
16. Vavricka, S. R., Rogler, G., Gantenbein, C., et al.: Chronological Order of Appearance of Extraintestinal Manifestations Relative to the Time of IBD Diagnosis in the Swiss Inflammatory Bowel Disease Cohort. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21: 1794-800, 2015.
17. Kucharzik, T., Dignass, A., Atreya, R., et al.: Aktualisierte S3-Leitlinie Colitis ulcerosa (Version 6.2). *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 62: 769-858, 2024.
18. Best, W. R., Beckett, J. M., Singleton, J. W., et al.: Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*, 70: 439-44, 1976.
19. Rachmilewitz, D.: Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomised trial. *BMJ*, 298: 82-86, 1989.
20. Mitchell, P. J., Rabau, M. Y., Haboubi, N. Y.: Indeterminate colitis. *Techniques in Coloproctology*, 11: 91-96, 2007.
21. Coward, S., Clement, F., Benchimol, E. I., et al.: Past and Future Burden of Inflammatory Bowel Diseases Based on Modeling of Population-Based Data. *Gastroenterology*, 156: 1345-53, 2019.
22. Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., et al.: Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*, 390: 2769-78, 2018.
23. Mak, W. Y., Zhao, M., Ng, S. C., et al.: The epidemiology of inflammatory bowel disease: East meets west. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 35: 380-89, 2020.
24. Shivananda, S., Lennard-Jones, J. E., Logan, R., et al.: Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut*, 39: 690-97, 1996.
25. Gheorghe, C., Pascu, O., Gheorghe, L., et al.: Epidemiology of inflammatory bowel disease in adults who refer to gastroenterology care in Romania: a multicentre study. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 16: 1153-59, 2004.
26. Lapidus, A.: Crohn's disease in Stockholm County during 1990-2001: an epidemiological update. *World Journal of Gastroenterology*, 12: 75-81, 2006.

27. Jacobsen, B. A., Fallingborg, J., Rasmussen, H. H., et al.: Increase in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in northern Denmark: a population-based study, 1978-2002. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 18: 601-06, 2006.
28. Burisch, J., Jess, T., Martinato, M., et al.: The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *Journal of Crohn's and Colitis*, 7: 322-37, 2013.
29. Rivas, M. A., Avila, B. E., Koskela, J., et al.: Insights into the genetic epidemiology of Crohn's and rare diseases in the Ashkenazi Jewish population. *PLoS Genetics*, 14: e1007329, 2018.
30. Carroll, M. W., Kuenzig, M. E., Mack, D. R., et al.: The Impact of Inflammatory Bowel Disease in Canada 2018: Children and Adolescents with IBD. *Journal of the Canadian Association of Gastroenterology*, 2: 49-67, 2019.
31. Benchimol, E. I., Bernstein, C. N., Bitton, A., et al.: The Impact of Inflammatory Bowel Disease in Canada 2018: A Scientific Report from the Canadian Gastro-Intestinal Epidemiology Consortium to Crohn's and Colitis Canada. *Journal of the Canadian Association of Gastroenterology*, 2: S1-S5, 2019.
32. Hou, J. K., Kramer, J. R., Richardson, P., et al.: The incidence and prevalence of inflammatory bowel disease among U.S. veterans: a national cohort study. *Inflammatory Bowel Disease*, 19: 1059-64, 2013.
33. Nielsen, O. H., Rejnmark, L., Moss, A. C.: Role of Vitamin D in the Natural History of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's & Colitis*, 12: 742-52, 2018.
34. Kucharzik, T., Maaser, C., Lügering, A., et al.: Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies. *Inflammatory Bowel Disease*, 12: 1068-83, 2006.
35. Guan, Q.: A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Immunology Research*, 2019: 7247238, 2019.
36. Mirkov, M. U., Verstockt, B., Cleynen, I.: Genetics of inflammatory bowel disease: beyond NOD2. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 2: 224-34, 2017.
37. Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., et al.: Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 5509-12, 2003.

38. Shaw, M. H., Reimer, T., Sánchez-Valdepeñas, C., et al.: T cell-intrinsic role of Nod2 in promoting type 1 immunity to *Toxoplasma gondii*. *Nature Immunology*, 10: 1267-74, 2009.
39. Petterson, T., Jendholm, J., Månsson, A., et al.: Effects of NOD-like receptors in human B lymphocytes and crosstalk between NOD1/NOD2 and Toll-like receptors. *Journal of Leukocyte Biology*, 89: 177-87, 2011.
40. Cooney, R., Baker, J., Brain, O., et al.: NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nature Medicine*, 16: 90-97, 2010.
41. Okumura, S., Yuki, K., Kobayashi, R., et al.: Hyperexpression of NOD2 in intestinal mast cells of Crohn's disease patients: preferential expression of inflammatory cell-recruiting molecules via NOD2 in mast cells. *Clinical Immunology*, 130: 175-85, 2009.
42. Nigro, G., Rossi, R., Commere, P. H., et al.: The cytosolic bacterial peptidoglycan sensor Nod2 affords stem cell protection and links microbes to gut epithelial regeneration. *Cell Host & Microbe*, 15: 792-98, 2014.
43. Al Nabhani, Z., Dietrich, G., Hugot, J. P., et al.: Nod2: The intestinal gate keeper. *PLoS Pathog*, 13: e1006177, 2017.
44. Glocker, E. O., Kotlarz, D., Boztug, K., et al.: Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *The New England Journal of Medicine*, 361: 2033-45, 2009.
45. Liu, T. C., Stappenbeck, T. S.: Genetics and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Annual Review of Pathology*, 11: 127-48, 2016.
46. Liu, J. Z., van Sommeren, S., Huang, H., et al.: Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nature Genetics*, 47: 979-86, 2015.
47. Ng, S. C., Bernstein, C. N., Vatn, M. H., et al.: Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut*, 62: 630-49, 2013.
48. Ng, S. C., Tang, W., Leong, R. W., et al.: Environmental risk factors in inflammatory bowel disease: a population-based case-control study in Asia-Pacific. *Gut*, 64: 1063-71, 2015.
49. Piovani, D., Danese, S., Peyrin-Biroulet, L., et al.: Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. *Gastroenterology*, 157: 647-59, 2019.
50. Becker, C., Neurath, M. F., Wirtz, S.: The Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *ILAR Journal*, 56: 192-204, 2015.

51. Qin, J., Li, R., Raes, J., et al.: A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464: 59-65, 2010.
52. Meconi, S., Vercellone, A., Levillain, F., et al.: Adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients induce granulomas in vitro. *Cellular Microbiology*, 9: 1252-61, 2007.
53. Johansson, M. E. V., Phillipson, M., Petersson, J., et al.: The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 15064-9, 2008.
54. Chen, S. J., Liu, X. W., Liu, J. P., et al.: Ulcerative colitis as a polymicrobial infection characterized by sustained broken mucus barrier. *World Journal of Gastroenterology*, 20: 9468-75, 2014.
55. Zhang, Y. Z., Li, Y. Y.: Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 20: 91-99, 2014.
56. Neurath, M. F.: Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews: Immunology*, 14: 329-42, 2014.
57. Choy, M. C., Visvanathan, K., De Cruz, P.: An Overview of the Innate and Adaptive Immune System in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 23: 2-13, 2017.
58. Breese, E., Braegger, C. P., Corrigan, C. J., et al.: Interleukin-2- and interferon-gamma-secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. *Immunology*, 78: 127-31, 1993.
59. Brand, S.: Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut*, 58: 1152-67, 2009.
60. Pastorelli, L., De Salvo, C., Mercado, J. R., et al.: Central role of the gut epithelial barrier in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation: lessons learned from animal models and human genetics. *Frontiers in Immunology*, 4: 280, 2013.
61. McGuckin, M. A., Eri, R., Simms, L. A., et al.: Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15: 100-13, 2009.
62. Vancamelbeke, M., Vanuytsel, T., Farré, R., et al.: Genetic and Transcriptomic Bases of Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 23: 1718-29, 2017.
63. Cereijido, M., Contreras, R. G., Flores-Benítez, D., et al.: New diseases derived or associated with the tight junction. *Archives of Medical Research*, 38: 465-78, 2007.

64. Walko, G., Castañón, M. J., Wiche, G.: Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell and Tissue Research*, 360: 529-44, 2015.
65. Su, L., Nalle, S. C., Shen, L., et al.: TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. *Gastroenterology*, 145: 407-15, 2013.
66. Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., et al.: Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*, 56: 61-72, 2007.
67. Prasad, S., Mingrino, R., Kaukinen, K., et al.: Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Laboratory Investigation*, 85: 1139-62, 2005.
68. Salim, S. a. Y., Söderholm, J. D.: Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17: 362-81, 2011.
69. Hollander, D., Vadheim, C. M., Brettholz, E., et al.: Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Annals of Internal Medicine*, 105: 883-85, 1986.
70. D'Incà, R., Di Leo, V., Corrao, G., et al.: Intestinal permeability test as a predictor of clinical course in Crohn's disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 94: 2956-60, 1999.
71. Ananthakrishnan, A. N., Khalili, H., Higuchi, L. M., et al.: Higher predicted vitamin D status is associated with reduced risk of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 142: 482-89, 2012.
72. Garg, M., Lubel, J. S., Sparrow, M. P., et al.: Review article: vitamin D and inflammatory bowel disease--established concepts and future directions. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 36: 324-44, 2012.
73. Omdahl, J. L., Morris, H. A., May, B. K.: Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation. *Annual Review of Nutrition*, 22: 139-66, 2002.
74. Trochoutsou, A. I., Kloukina, V., Samitas, K., et al.: Vitamin-D in the Immune System: Genomic and Non-Genomic Actions. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 15: 953-63, 2015.
75. Tavera-Mendoza, L. E., White, J. H.: Cell defenses and the sunshine vitamin. *Scientific American*, 297: 62-65, 68-70, 72, 2007.
76. Holick, M. F., Binkley, N. C., Bischoff-Ferrari, H. A., et al.: Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96: 1911-30, 2011.

77. Bikle, D. D., Siiteri, P. K., Ryzen, E., et al.: Serum protein binding of 1,25-dihydroxyvitamin D: a reevaluation by direct measurement of free metabolite levels. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 61: 969-75, 1985.
78. Holick, M. F.: Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *The Journal of Clinical Investigation*, 116: 2062-72, 2006.
79. Holick, M. F.: Vitamin D deficiency. *The New England Journal of Medicine*, 357: 266-81, 2007.
80. Bischoff-Ferrari, H. A., Giovannucci, E., Willett, W. C., et al.: Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84: 18-28, 2006.
81. Demay, M. B., Pittas, A. G., Bikle, D. D., et al.: Vitamin D for the Prevention of Disease: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 109: 1907-47, 2024.
82. Mora, J. R., Iwata, M., von Andrian, U. H.: Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nature Reviews: Immunology*, 8: 685-98, 2008.
83. Dimitrov, V., White, J. H.: Vitamin D signaling in intestinal innate immunity and homeostasis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 453: 68-78, 2017.
84. Daniel, C., Sartory, N. A., Zahn, N., et al.: Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 324: 23-33, 2008.
85. Friedrich, M., Diegelmann, J., Beigel, F., et al.: IL-17A alone weakly affects the transcriptome of intestinal epithelial cells but strongly modulates the TNF- α -induced expression of inflammatory mediators and inflammatory bowel disease susceptibility genes. *Inflammatory Bowel Diseases*, 20: 1502-15, 2014.
86. Chang, J. H., Cha, H. R., Lee, D. S., et al.: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the differentiation and migration of T(H)17 cells to protect against experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One*, 5: e12925, 2010.
87. Penna, G., Adorini, L.: 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *The Journal of Immunology*, 164: 2405-11, 2000.

88. Wang, T. T., Nestel, F. P., Bourdeau, V., et al.: Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *The Journal of Immunology*, 173: 2909-12, 2004.
89. Wang, T. T., Dabbas, B., Laperriere, D., et al.: Direct and indirect induction by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 2227-31, 2010.
90. Ulitsky, A., Ananthakrishnan, A. N., Naik, A., et al.: Vitamin D deficiency in patients with inflammatory bowel disease: association with disease activity and quality of life. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 35: 308-16, 2011.
91. Kabbani, T. A., Koutroubakis, I. E., Schoen, R. E., et al.: Association of Vitamin D Level With Clinical Status in Inflammatory Bowel Disease: A 5-Year Longitudinal Study. *The American Journal of Gastroenterology*, 111: 712-19, 2016.
92. Mouli, V. P., Ananthakrishnan, A. N.: Review article: vitamin D and inflammatory bowel diseases. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 39: 125-36, 2014.
93. Jørgensen, S. P., Agnholt, J., Glerup, H., et al.: Clinical trial: vitamin D3 treatment in Crohn's disease - a randomized double-blind placebo-controlled study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 32: 377-83, 2010.
94. Yang, L., Weaver, V., Smith, J. P., et al.: Therapeutic effect of vitamin d supplementation in a pilot study of Crohn's patients. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 4: e33, 2013.
95. Yin, K., Agrawal, D. K.: Vitamin D and inflammatory diseases. *Journal of Inflammation Research*, 7: 69-87, 2014.
96. Kong, J., Zhang, Z., Musch, M. W., et al.: Novel role of the vitamin D receptor in maintaining the integrity of the intestinal mucosal barrier. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 294: G208-16, 2008.
97. Cantorna, M. T., Munsick, C., Bemiss, C., et al.: 1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. *The Journal of Nutrition*, 130: 2648-52, 2000.
98. Ryz, N. R., Patterson, S. J., Zhang, Y., et al.: Active vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D3) increases host susceptibility to *Citrobacter rodentium* by suppressing mucosal Th17 responses. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 303: G1299-311, 2012.

99. Papi, C., Fasci-Spurio, F., Rogai, F., et al.: Mucosal healing in inflammatory bowel disease: treatment efficacy and predictive factors. *Digestive and Liver Disease*, 45: 978-85, 2013.
100. Sands, B. E.: Biomarkers of Inflammation in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, 149: 1275-85.e2, 2015.
101. Peyrin-Biroulet, L., Reinisch, W., Colombel, J. F., et al.: Clinical disease activity, C-reactive protein normalisation and mucosal healing in Crohn's disease in the SONIC trial. *Gut*, 63: 88-95, 2014.
102. Chang, S., Malter, L., Hudesman, D.: Disease monitoring in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 21: 11246-59, 2015.
103. Vermeire, S., Van Assche, G., Rutgeerts, P.: Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut*, 55: 426-31, 2006.
104. Vermeire, S., Van Assche, G., Rutgeerts, P.: C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 10: 661-65, 2004.
105. Solem, C. A., Loftus, E. V., Jr., Tremaine, W. J., et al.: Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 11: 707-12, 2005.
106. Koelewijn, C. L., Schwartz, M. P., Samsom, M., et al.: C-reactive protein levels during a relapse of Crohn's disease are associated with the clinical course of the disease. *World Journal of Gastroenterology*, 14: 85-89, 2008.
107. Danik, J. S., Ridker, P. M.: Genetic determinants of C-reactive protein. *Current Atherosclerosis Reports*, 9: 195-203, 2007.
108. Herly, M., Stengaard-Pedersen, K., Vestergaard, P., et al.: The D-vitamin metabolite 1,25(OH)(2) D in serum is associated with disease activity and Anti-Citrullinated Protein Antibodies in active and treatment naïve, early Rheumatoid Arthritis Patients. *Scandinavian Journal of Immunology*, 88: e12704, 2018.
109. Jun, J. C., Yoon, H., Choi, Y. J., et al.: The effect of vitamin D administration on inflammatory markers in patients with inflammatory bowel disease. *Intestinal Research*, 17: 210-17, 2019.
110. Fagerhol, M. K., Dale, I., Andersson, T.: A radioimmunoassay for a granulocyte protein as a marker in studies on the turnover of such cells. *Bulletin europeen de physiopathologie respiratoire*, 16 Suppl: 273-82, 1980.

111. Manceau, H., Chicha-Cattoir, V., Puy, H., et al.: Fecal calprotectin in inflammatory bowel diseases: update and perspectives. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 55: 474-83, 2017.
112. Mosli, M. H., Zou, G., Garg, S. K., et al.: C-Reactive Protein, Fecal Calprotectin, and Stool Lactoferrin for Detection of Endoscopic Activity in Symptomatic Inflammatory Bowel Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *American Journal of Gastroenterology*, 110: 802-19, 2015.
113. Menees, S. B., Powell, C., Kurlander, J., et al.: A meta-analysis of the utility of C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, fecal calprotectin, and fecal lactoferrin to exclude inflammatory bowel disease in adults with IBS. *American Journal of Gastroenterology*, 110: 444-54, 2015.
114. Raftery, T., Merrick, M., Healy, M., et al.: Vitamin D Status Is Associated with Intestinal Inflammation as Measured by Fecal Calprotectin in Crohn's Disease in Clinical Remission. *Digestive Diseases and Sciences*, 60: 2427-35, 2015.
115. Carlsen, K., Malham, M., Hansen, L. F., et al.: Serum Calprotectin in Adolescents With Inflammatory Bowel Disease-A Pilot Investigation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 68: 669-75, 2019.
116. Lason, A., Stotzer, P. O., Öhman, L., et al.: The intra-individual variability of faecal calprotectin: a prospective study in patients with active ulcerative colitis. *Journal of Crohn's & Colitis*, 9: 26-32, 2015.
117. Calafat, M., Cabré, E., Mañosa, M., et al.: High within-day variability of fecal calprotectin levels in patients with active ulcerative colitis: what is the best timing for stool sampling? *Inflammatory Bowel Diseases*, 21: 1072-76, 2015.
118. Meuwis, M. A., Vernier-Massouille, G., Grimaud, J. C., et al.: Serum calprotectin as a biomarker for Crohn's disease. *Journal of Crohn's & Colitis*, 7: e678-e83, 2013.
119. Leach, S. T., Yang, Z., Messina, I., et al.: Serum and mucosal S100 proteins, calprotectin (S100A8/S100A9) and S100A12, are elevated at diagnosis in children with inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 42: 1321-31, 2007.
120. Kalla, R., Kennedy, N. A., Ventham, N. T., et al.: Serum Calprotectin: A Novel Diagnostic and Prognostic Marker in Inflammatory Bowel Diseases. *The American Journal of Gastroenterology*, 111: 1796-805, 2016.
121. Okada, K., Okabe, M., Kimura, Y., et al.: Serum S100A8/A9 as a Potentially Sensitive Biomarker for Inflammatory Bowel Disease. *Laboratory Medicine*, 50: 370-80, 2019.

122. Nordal, H. H., Fagerhol, M. K., Halse, A. K., et al.: Calprotectin (S100A8/A9) should preferably be measured in EDTA-plasma; results from a longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 78: 102-08, 2018.
123. Gray, R. D., Imrie, M., Boyd, A. C., et al.: Sputum and serum calprotectin are useful biomarkers during CF exacerbation. *Journal of Cystic Fibrosis*, 9: 193-98, 2010.
124. Rossi, D. L., Vicari, A. P., Franz-Bacon, K., et al.: Identification through bioinformatics of two new macrophage proinflammatory human chemokines: MIP-3alpha and MIP-3beta. *The Journal of Immunology*, 158: 1033-36, 1997.
125. Jabłoński, G., Sobkiewicz, B., Kaczmarek, M., et al.: Serum concentrations of CCL20/MIP-3alpha in women with endometriosis. *Menopause Review*, 18: 9-14, 2019.
126. He, C., Zhang, S. L., Hu, C. J., et al.: Higher levels of CCL20 expression on peripheral blood mononuclear cells of chinese patients with inflammatory bowel disease. *Immunological Investigations*, 39: 16-26, 2010.
127. Skovdahl, H. K., Granlund, A. v. B., Østvik, A. E., et al.: Expression of CCL20 and Its Corresponding Receptor CCR6 Is Enhanced in Active Inflammatory Bowel Disease, and TLR3 Mediates CCL20 Expression in Colonic Epithelial Cells. *PLOS One*, 10: e0141710, 2015.
128. Becher, B., Pantelyushin, S.: Hiding under the skin: Interleukin-17-producing $\gamma\delta$ T cells go under the skin? *Nature Medicine*, 18: 1748-50, 2012.
129. Trivedi, P. J., Adams, D. H.: Chemokines and Chemokine Receptors as Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease; Pitfalls and Promise. *Journal of Crohn's & Colitis*, 12: S641-S52, 2018.
130. Hirota, K., Yoshitomi, H., Hashimoto, M., et al.: Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *The Journal of Experimental Medicine*, 204: 2803-12, 2007.
131. Kaser, A., Ludwiczek, O., Holzmann, S., et al.: Increased expression of CCL20 in human inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Immunology*, 24: 74-85, 2004.
132. Krzysiek, R., Lefevre, E. A., Bernard, J., et al.: Regulation of CCR6 chemokine receptor expression and responsiveness to macrophage inflammatory protein-3alpha/CCL20 in human B cells. *Blood*, 96: 2338-45, 2000.

133. Cayatte, C., Joyce-Shaikh, B., Vega, F., et al.: Biomarkers of Therapeutic Response in the IL-23 Pathway in Inflammatory Bowel Disease. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 3: e10, 2012.
134. Esplugues, E., Huber, S., Gagliani, N., et al.: Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature*, 475: 514-18, 2011.
135. Katchar, K., Kelly, C. P., Keates, S., et al.: MIP-3alpha neutralizing monoclonal antibody protects against TNBS-induced colonic injury and inflammation in mice. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292: G1263-71, 2007.
136. Karkeni, E., Marcotorchino, J., Tourniaire, F., et al.: Vitamin D limits chemokine expression in adipocytes and macrophage migration in vitro and in male mice. *Endocrinology*, 156: 1782-93, 2015.
137. Reins, R. Y., Baidouri, H., McDermott, A. M.: Vitamin D Activation and Function in Human Corneal Epithelial Cells During TLR-Induced Inflammation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 56: 7715-27, 2015.
138. Jafarzadeh, A., Azizi, S. V., Arabi, Z., et al.: Vitamin D down-regulates the expression of some Th17 cell-related cytokines, key inflammatory chemokines, and chemokine receptors in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nutritional Neuroscience*, 22: 725-37, 2019.
139. Kusaka, S., Nishida, A., Takahashi, K., et al.: Expression of human cathelicidin peptide LL-37 in inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 191: 96-106, 2018.
140. Fabisiak, A., Murawska, N., Fichna, J.: LL-37: Cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity. *Pharmacological Reports*, 68: 802-08, 2016.
141. Bals, R.: Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respiratory Research*, 1: 141-50, 2000.
142. Lai, Y., Gallo, R. L.: AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology*, 30: 131-41, 2009.
143. Zasloff, M.: Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415: 389-95, 2002.
144. Brogden, K. A.: Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews: Microbiology*, 3: 238-50, 2005.
145. Chromek, M.: The role of the antimicrobial peptide cathelicidin in renal diseases. *Pediatric Nephrology*, 30: 1225-32, 2015.

146. Kuroda, K., Okumura, K., Isogai, H., et al.: The Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL-37 and Mimics are Potential Anticancer Drugs. *Frontiers in Oncology*, 5: 144, 2015.
147. Nijnik, A., Hancock, R. E. W.: The roles of cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications. *Current Opinion in Hematology*, 16: 41-47, 2009.
148. Leaf, D. E., Croy, H. E., Abrahams, S. J., et al.: Cathelicidin antimicrobial protein, vitamin D, and risk of death in critically ill patients. *Critical Care*, 19: 80, 2015.
149. Liu, P. T., Stenger, S., Li, H., et al.: Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*, 311: 1770-73, 2006.
150. Raftery, T., Martineau, A. R., Greiller, C. L., et al.: Effects of vitamin D supplementation on intestinal permeability, cathelicidin and disease markers in Crohn's disease: Results from a randomised double-blind placebo-controlled study. *United European Gastroenterology Journal*, 3: 294-302, 2015.
151. Sharifi, A., Hosseinzadeh-Attar, M. J., Vahedi, H., et al.: A randomized controlled trial on the effect of vitamin D3 on inflammation and cathelicidin gene expression in ulcerative colitis patients. *Saudi Journal of Gastroenterology*, 22: 316-23, 2016.
152. Chung, C., Silwal, P., Kim, I., et al.: Vitamin D-Cathelicidin Axis: at the Crossroads between Protective Immunity and Pathological Inflammation during Infection. *Immune Network*, 20: e12, 2020.
153. Tollin, M., Bergman, P., Svenberg, T., et al.: Antimicrobial peptides in the first line defence of human colon mucosa. *Peptides*, 24: 523-30, 2003.
154. Armogida, S. A., Yannaras, N. M., Melton, A. L., et al.: Identification and quantification of innate immune system mediators in human breast milk. *Allergy and Asthma proceedings*, 25: 297-304, 2004.
155. Murakami, M., Ohtake, T., Dorschner, R. A., et al.: Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. *Journal of Dental Research*, 81: 845-50, 2002.
156. Sun, L., Wang, W., Xiao, W., et al.: The Roles of Cathelicidin LL-37 in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 22: 1986-91, 2016.
157. Opal, S. M.: Endotoxins and other sepsis triggers. *Contributions to Nephrology*, 167: 14-24, 2010.

158. Al-Mutairi, N., El Eassa, B., Nair, V.: Measurement of vitamin D and cathelicidin (LL-37) levels in patients of psoriasis with co-morbidities. *Indian Journal of Dermatology, Venerology and Leprology*, 79: 492-96, 2013.
159. Zhang, Y., Shi, W., Tang, S., et al.: The influence of cathelicidin LL37 in human anti-neutrophils cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. *Arthritis Research & Therapy*, 15: R161, 2013.
160. Tran, D. H.-N., Wang, J., Ha, C., et al.: Circulating cathelicidin levels correlate with mucosal disease activity in ulcerative colitis, risk of intestinal stricture in Crohn's disease, and clinical prognosis in inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterology*, 17: 63, 2017.
161. Schaubert, J., Rieger, D., Weiler, F., et al.: Heterogeneous expression of human cathelicidin hCAP18/LL-37 in inflammatory bowel diseases. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 18: 615-21, 2006.
162. Koon, H. W., Shih, D. Q., Chen, J., et al.: Cathelicidin signaling via the Toll-like receptor protects against colitis in mice. *Gastroenterology*, 141: 1852-63.e3, 2011.
163. Tai, E. K., Wu, W. K., Wang, X. J., et al.: Intrarectal administration of mCRAMP-encoding plasmid reverses exacerbated colitis in Cnlp(-/-) mice. *Gene Therapy*, 20: 187-93, 2013.
164. de Bruyn, M., Ringold, R., Ferrante, M., et al.: P382 A panel of serum markers for early detection of endoscopic healing with infliximab in patients with ulcerative colitis. *Journal of Crohn's and Colitis*, 11: S271-S72, 2017.
165. Wehkamp, J., Schmid, M., Stange, E. F.: Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, 23: 370-78, 2007.
166. Underwood, M. A., Bevins, C. L.: Defensin-barbed innate immunity: clinical associations in the pediatric population. *Pediatrics*, 125: 1237-47, 2010.
167. Wehkamp, J., Fellermann, K., Herrlinger, K. R., et al.: Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 14: 745-52, 2002.
168. Ramasundara, M., Leach, S. T., Lemberg, D. A., et al.: Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24: 202-08, 2009.
169. Cunliffe, R. N.: Alpha-defensins in the gastrointestinal tract. *Molecular Immunology*, 40: 463-67, 2003.

170. Fujii, G., Selsted, M. E., Eisenberg, D.: Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Protein Science*, 2: 1301-12, 1993.
171. Koslowski, M. J., Kübler, I., Chamaillard, M., et al.: Genetic variants of Wnt transcription factor TCF-4 (TCF7L2) putative promoter region are associated with small intestinal Crohn's disease. *PLoS One*, 4: e4496, 2009.
172. Rahman, A., Fahlgren, A., Sundstedt, C., et al.: Chronic colitis induces expression of β -defensins in murine intestinal epithelial cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 163: 123-30, 2011.
173. Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., et al.: Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 9: 215-23, 2003.
174. Yamaguchi, N., Isomoto, H., Mukae, H., et al.: Concentrations of alpha- and beta-defensins in plasma of patients with inflammatory bowel disease. *Inflammation Research*, 58: 192-97, 2009.
175. Voss, E., Wehkamp, J., Wehkamp, K., et al.: NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 2005-11, 2006.
176. van Heel, D. A., Ghosh, S., Butler, M., et al.: Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet*, 365: 1794-96, 2005.
177. Thermo Fisher Scientific Inc.: *Invitrogen: Human MIP-3 alpha/CCL20 ELISA Kit*. ohne Jahr. Online: <https://www.thermofisher.com/elisa/product/MIP-3-alpha-CCL20-Human-ELISA-Kit/EHCCL20>, Stand: 19.12.2024.
178. Immundiagnostik AG: *IDK® Calprotectin (MRP 8/14) (Serum, Plasma) ELISA*. 2024. Online: <https://www.immudiagnostik.com/de/testkits/k-6935>, Stand: 19.12.2024.
179. Immundiagnostik AG: *IDK® Calprotectin ELISA: Zur in-vitro-Bestimmung von Calprotectin (MRP 8/14, S100A8/A9) in Serum und Plasma*. 2022. Online: https://www.immudiagnostik.com/media/pages/portfolio/testkits/k-6935/b6ba18f7b8-1716973078/k6935_2022-03-22_calprotectin_sp.pdf, Stand: 19.12.2024.
180. HycultBiotech: *LL-37, Human, ELISA kit*. 2024. Online: <https://www.hycultbiotech.com/hk321-01>, Stand: 19.12.2024.
181. Phoenix Pharmaceuticals: *Defensin 2, beta (Human) - ELISA Kit*. 2021. Online: <https://phoenixpeptide.com/products/defensin-2-beta-human-elisa-kit/>, Stand: 19.12.2024.

182. Stallhofer, J., Veith, L., Diegelmann, J., et al.: Iron Deficiency in Inflammatory Bowel Disease Is Associated With Low Levels of Vitamin D Modulating Serum Hepcidin and Intestinal Ceruloplasmin Expression. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 13: e00450, 2022.
183. Schnitzler, F., Friedrich, M., Angelberger, M., et al.: Development of a uniform, very aggressive disease phenotype in all homozygous carriers of the NOD2 mutation p.Leu1007fsX1008 with Crohn's disease and active smoking status resulting in ileal stenosis requiring surgery. *PLoS One*, 15: e0236421, 2020.
184. Roche Diagnostics Deutschland GmbH: *Vitamin D total II*. 2017. Online: https://labogids.sintmaria.be/sites/default/files/files/vit. d total ii 2017-11_v2.pdf, Stand: 25.08.2024.
185. Institute of Medicine: *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*, Washington (DC), The National Academies Press, 2011.
186. Immunodiagnostic Systems: *1,25 VitDXp*. ohne Jahr. Online: <https://www.idsplc.com/products/125-vitdexp/#>, Stand: 25.08.2024.
187. Sandborn, W. J., Feagan, B. G., Hanauer, S. B., et al.: A review of activity indices and efficacy endpoints for clinical trials of medical therapy in adults with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 122: 512-30, 2002.
188. Sturm, A., Maaser, C., Calabrese, E., et al.: ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 2: IBD scores and general principles and technical aspects. *Journal of Crohn's & Colitis*, 13: 273-84, 2019.
189. Li, X. X., Liu, Y., Luo, J., et al.: Vitamin D deficiency associated with Crohn's disease and ulcerative colitis: a meta-analysis of 55 observational studies. *Journal of Translational Medicine*, 17: 323, 2019.
190. Levin, A. D., Wadhera, V., Leach, S. T., et al.: Vitamin D deficiency in children with inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 56: 830-36, 2011.
191. El-Matary, W., Sikora, S., Spady, D.: Bone mineral density, vitamin D, and disease activity in children newly diagnosed with inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 56: 825-29, 2011.
192. Schütte, O., Tessmer, L., Stötzel, J., et al.: Influence of vitamin D on effectiveness of biologic therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 61: e417, 2023.
193. Abreu, M. T., Kantorovich, V., Vasiliauskas, E. A., et al.: Measurement of vitamin D levels in inflammatory bowel disease patients reveals a subset of Crohn's disease patients with elevated 1,25-dihydroxyvitamin D and low bone mineral density. *Gut*, 53: 1129-36, 2004.

194. Bosch, X.: Hypercalcemia due to endogenous overproduction of 1,25-dihydroxyvitamin D in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 114: 1061-65, 1998.
195. Xue, L. N., Xu, K. Q., Zhang, W., et al.: Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease: a meta-analysis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 19: 54-60, 2013.
196. Vogelsang, H., Ferenci, P., Schilling, R., et al.: Vitamin D status in outpatients with Crohn's disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 6: 513-17, 1994.
197. Zielińska, A., Sobolewska-Włodarczyk, A., Wiśniewska-Jarosińska, M., et al.: The 25(OH)D3, but Not 1,25(OH)2D3 Levels Are Elevated in IBD Patients Regardless of Vitamin D Supplementation and Do Not Associate with Pain Severity or Frequency. *Pharmaceuticals (Basel)*, 14, 2021.
198. Mithal, A., Wahl, D. A., Bonjour, J. P., et al.: Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporosis International*, 20: 1807-20, 2009.
199. Liu, W., Chen, Y., Golan, M. A., et al.: Intestinal epithelial vitamin D receptor signaling inhibits experimental colitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 123: 3983-96, 2013.
200. Wang, C., Kang, S. G., Lee, J., et al.: The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunology*, 2: 173-83, 2009.
201. Xin, Y., Wang, H., Wang, Y., et al.: CCL20 mediates the anti-tumor effect of vitamin D3 in p38MAPK/NF-κB signaling in colitis-associated carcinogenesis. *European Journal of Cancer Prevention*, 30: 76-83, 2021.
202. Ernst, M. K., Evans, S. T., Techner, J.-M., et al.: Vitamin D3 and deconvoluting a rash. *JCI Insight*, 8, 2023.
203. Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., et al.: Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 204: 1849-61, 2007.
204. Zhang, H., Zhong, W., Zhou, G., et al.: Expression of chemokine CCL20 in ulcerative colitis. *Molecular Medicine Reports*, 6: 1255-60, 2012.
205. Uchida, K., Koike, Y., Hashimoto, K., et al.: The Increased Expression of CCL20 and CCR6 in Rectal Mucosa Correlated to Severe Inflammation in Pediatric Ulcerative Colitis. *Gastroenterology Research and Practice*, 2015: 856532, 2015.

206. Kwon, J. H., Keates, S., Bassani, L., et al.: Colonic epithelial cells are a major site of macrophage inflammatory protein 3alpha (MIP-3alpha) production in normal colon and inflammatory bowel disease. *Gut*, 51: 818-26, 2002.
207. Plevy, S., Silverberg, M. S., Lockton, S., et al.: Combined serological, genetic, and inflammatory markers differentiate non-IBD, Crohn's disease, and ulcerative colitis patients. *Inflammatory Bowel Diseases*, 19: 1139-48, 2013.
208. Hashimoto, K., Saigusa, S., Araki, T., et al.: Correlation of CCL20 expression in rectal mucosa with the development of ulcerative colitis-associated neoplasia. *Oncology Letters*, 6: 1271-76, 2013.
209. Wang, D., Yuan, W., Wang, Y., et al.: Serum CCL20 combined with IL-17A as early diagnostic and prognostic biomarkers for human colorectal cancer. *Journal of Translational Medicine*, 17: 253, 2019.
210. Chen, W., Qin, Y., Wang, D., et al.: CCL20 triggered by chemotherapy hinders the therapeutic efficacy of breast cancer. *PLoS Biology*, 16: e2005869, 2018.
211. Wang, B., Shi, L., Sun, X., et al.: Production of CCL20 from lung cancer cells induces the cell migration and proliferation through PI3K pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20: 920-29, 2016.
212. Gubatan, J., Mitsuhashi, S., Longhi, M. S., et al.: Higher serum vitamin D levels are associated with protective serum cytokine profiles in patients with ulcerative colitis. *Cytokine*, 103: 38-45, 2018.
213. Kelly, P., Suibhne, T. N., O'Morain, C., et al.: Vitamin D status and cytokine levels in patients with Crohn's disease. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 81: 205-10, 2011.
214. Lu, R., Zhang, Y. G., Xia, Y., et al.: Paneth Cell Alertness to Pathogens Maintained by Vitamin D Receptors. *Gastroenterology*, 160: 1269-83, 2021.
215. Simmons, J. D., Mullighan, C., Welsh, K. I., et al.: Vitamin D receptor gene polymorphism: association with Crohn's disease susceptibility. *Gut*, 47: 211-14, 2000.
216. Medeiros, J. F. P., de Oliveira Borges, M. V., Soares, A. A., et al.: The impact of vitamin D supplementation on VDR gene expression and body composition in monozygotic twins: randomized controlled trial. *Scientific Reports*, 10: 11943, 2020.

217. Yang, J., Chen, D., Tian, G., et al.: 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) Negatively Regulates the Inflammatory Response to Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infection by Inhibiting NF- κ B and JAK/STAT Signaling Pathway in IPEC-J2 Porcine Epithelial Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23: 10603, 2022.
218. Gonzalez-Sanchez, E., El Mourabit, H., Jager, M., et al.: Cholangiopathy aggravation is caused by VDR ablation and alleviated by VDR-independent vitamin D signaling in ABCB4 knockout mice. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease*, 1867: 166067, 2021.
219. Hosokawa, Y., Hosokawa, I., Shindo, S., et al.: Calcitriol Suppressed Inflammatory Reactions in IL-1 β -Stimulated Human Periodontal Ligament Cells. *Inflammation*, 38: 2252-58, 2015.
220. Ricciuto, A., Griffiths, A. M.: Clinical value of fecal calprotectin. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 56: 307-20, 2019.
221. Frei, P., Rogler, G.: Unterscheidung von funktioneller und entzündlicher Darmkrankheit leicht gemacht - Calprotectin: sinnvoller Test in der Praxis? *Der Informierte Arzt*, 6: 17-19, 2016.
222. Labor Dr. Heidrich & Kollegen: *Analysenverzeichnis: Calprotectin im Stuhl*. ohne Jahr. Online: http://map.labor-heidrich.de:443/analysen?order_code=CALPRO&lang=DE, Stand: 29.11.2023.
223. Fukunaga, S., Kuwaki, K., Mitsuyama, K., et al.: Detection of calprotectin in inflammatory bowel disease: Fecal and serum levels and immunohistochemical localization. *International Journal of Molecular Medicine*, 41: 107-18, 2018.
224. Khaki-Khatibi, F., Qujeq, D., Kashifard, M., et al.: Calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clinica Chimica Acta*, 510: 556-65, 2020.
225. Garg, M., Rosella, O., Lubel, J. S., et al.: Association of circulating vitamin D concentrations with intestinal but not systemic inflammation in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 19: 2634-43, 2013.
226. Jung, J. H., Park, S. H.: Correlation between Fecal Calprotectin Levels in Meconium and Vitamin D Levels in Cord Blood: Association with Intestinal Distress. *Journal of Clinical Medicine*, 9: 4089, 2020.
227. Michos, E. D., Streeten, E. A., Ryan, K. A., et al.: Serum 25-hydroxyvitamin d levels are not associated with subclinical vascular disease or C-reactive protein in the old order amish. *Calcified Tissue International*, 84: 195-202, 2009.

228. Baykal, T., Senel, K., Alp, F., et al.: Is there an association between serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and disease activity in rheumatoid arthritis? *Bratislavske Lekarske Listy*, 113: 610-11, 2012.
229. Amer, M., Qayyum, R.: Relation between serum 25-hydroxyvitamin D and C-reactive protein in asymptomatic adults (from the continuous National Health and Nutrition Examination Survey 2001 to 2006). *American Journal of Cardiology*, 109: 226-30, 2012.
230. Røseth, A. G., Aadland, E., Grzyb, K.: Normalization of faecal calprotectin: a predictor of mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 39: 1017-20, 2004.
231. Molander, P., af Björkesten, C. G., Mustonen, H., et al.: Fecal calprotectin concentration predicts outcome in inflammatory bowel disease after induction therapy with TNF α blocking agents. *Inflammatory Bowel Diseases*, 18: 2011-17, 2012.
232. Gutiérrez, A., Holler, E., Zapater, P., et al.: Antimicrobial peptide response to blood translocation of bacterial DNA in Crohn's disease is affected by NOD2/CARD15 genotype. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17: 1641-50, 2011.
233. Kim, S. Y., Chang, B., Jeong, B. H., et al.: Implication of vitamin D-associated factors in patients with non-tuberculous mycobacterial lung disease. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 20: 1594-602, 2016.
234. Yoo, J. H., Ho, S., Tran, D. H.-Y., et al.: Anti-fibrogenic effects of the antimicrobial peptide cathelicidin in murine colitis-associated fibrosis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 1: 55-74.e1, 2015.
235. Siegmund, B.: Are Serum-Based Markers Going to Replace Faecal Neutrophil Markers in Ulcerative Colitis? *Journal of Crohn's and Colitis*, 14: 151-52, 2020.
236. Greulich, T., Regner, W., Branscheidt, M., et al.: Altered blood levels of vitamin D, cathelicidin and parathyroid hormone in patients with sepsis-a pilot study. *Anaesthesia and Intensive Care*, 45: 36-45, 2017.
237. Adams, J. S., Ren, S., Liu, P. T., et al.: Vitamin d-directed rheostatic regulation of monocyte antibacterial responses. *Journal of Immunology*, 182: 4289-95, 2009.
238. Hertting, O., Holm, Å., Lühje, P., et al.: Vitamin D induction of the human antimicrobial Peptide cathelicidin in the urinary bladder. *PLoS One*, 5: e15580, 2010.

239. Leow, L., Simpson, T., Cursons, R., et al.: Vitamin D, innate immunity and outcomes in community acquired pneumonia. *Respirology*, 16: 611-16, 2011.
240. Leaf, D. E., Raed, A., Donnino, M. W., et al.: Randomized controlled trial of calcitriol in severe sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 190: 533-41, 2014.
241. Chen, S., Ye, W., Zheng, W., et al.: Increased serum antimicrobial peptide LL-37 and HBD-2 combined with 25-hydroxyvitamin D3 deficiency in infants with pertussis. *Journal of Infection in Developing Countries*, 14: 1164-69, 2020.
242. Cakir, E., Torun, E., Gedik, A. H., et al.: Cathelicidin and human β -defensin 2 in bronchoalveolar lavage fluid of children with pulmonary tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 18: 671-75, 2014.
243. Fahlgren, A., Hammarström, S., Danielsson, A., et al.: Increased expression of antimicrobial peptides and lysozyme in colonic epithelial cells of patients with ulcerative colitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 131: 90-101, 2003.
244. Nuding, S., Fellermann, K., Wehkamp, J., et al.: Reduced mucosal antimicrobial activity in Crohn's disease of the colon. *Gut*, 56: 1240-47, 2007.
245. Isomoto, H., Mukae, H., Ishimoto, H., et al.: High concentrations of human beta-defensin 2 in gastric juice of patients with *Helicobacter pylori* infection. *World Journal of Gastroenterology*, 11: 4782-87, 2005.
246. Kolho, K. L., Sipponen, T., Valtonen, E., et al.: Fecal calprotectin, MMP-9, and human beta-defensin-2 levels in pediatric inflammatory bowel disease. *International Journal of Colorectal Disease*, 29: 43-50, 2014.
247. Fellermann, K., Stange, D. E., Schaeffeler, E., et al.: A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *The American Journal of Human Genetics*, 79: 439-48, 2006.
248. Bentley, R. W., Pearson, J., Gearry, R. B., et al.: Association of higher DEFB4 genomic copy number with Crohn's disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 105: 354-59, 2010.
249. Sakemi, R., Mitsuyama, K., Morita, M., et al.: Altered serum profile of the interleukin-22 system in inflammatory bowel disease. *Cytokine*, 136: 155264, 2020.

250. Nomura, I., Goleva, E., Howell, M. D., et al.: Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *Journal of Immunology*, 171: 3262-69, 2003.
251. Huang, F. C.: The differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on Salmonella-induced interleukin-8 and human beta-defensin-2 in intestinal epithelial cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 185: 98-106, 2016.
252. Huang, F. C., Huang, S. C.: Active vitamin D3 attenuates the severity of Salmonella colitis in mice by orchestrating innate immunity. *Immunity, Inflammation and Disease*, 9: 481-91, 2021.
253. Georgieva, V., Kamolovit, W., Herthelius, M., et al.: Association between vitamin D, antimicrobial peptides and urinary tract infection in infants and young children. *Acta Paediatrica*, 108: 551-56, 2019.
254. Simms, L. A., Doecke, J. D., Walsh, M. D., et al.: Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut*, 57: 903-10, 2008.
255. Ishida, N., Higuchi, T., Miyazu, T., et al.: C-reactive protein is superior to fecal biomarkers for evaluating colon-wide active inflammation in ulcerative colitis. *Scientific Reports*, 11: 12431, 2021.

8 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Weltweite Inzidenzen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen im Zeitraum 2010-2019	3
Abbildung 2: Ätiologie und Pathogenese der CED	4
Abbildung 3: Übersicht der pro- und antiinflammatorischen Zytokinausschüttung in der Lamina propria	8
Abbildung 4: Cholecalciferol (links) und Ergocalciferol (rechts)	10
Abbildung 5: Vitamin D-Metabolisierung und chemische Strukturen von Calcidiol und Calcitriol	11
Abbildung 6: Bakterizide Wirkungsweise der antimikrobiellen Peptide am Beispiel von Cathelicidin	18
Abbildung 7: Human cationic antibacterial protein of 18 Kilodalton (hCAP18-Protein)	19
Abbildung 8: 25(OH)D-Spiegel (in ng/mL) bei CED-Patienten (N=250) mit Differenzierung der Krankheitsaktivität im Vergleich zu gesunden Kontrollen (K) (N=60).....	35
Abbildung 9: 25(OH)D-Spiegel (in ng/mL) bei MC- (n=170) und CU-Patienten (n=80) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (K) (N=60) (Ausreißer ausgeblendet).....	36
Abbildung 10: 1,25(OH)2D-Spiegel (in pg/mL) bei CED-Patienten (N=250) mit Differenzierung der Krankheitsaktivität im Vergleich zu gesunden Kontrollen (K) (N=60) (Ausreißer ausgeblendet)	37
Abbildung 11: 1,25(OH)2D-Spiegel (in pg/mL) bei MC- (n=170) und CU-Patienten (n=80) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (K) (N=60) (Ausreißer ausgeblendet).....	38
Abbildung 12: CCL20-Konzentrationen (in pg/mL) bei CED-Patienten (N=250) mit Differenzierung der Krankheitsaktivität im Vergleich zu gesunden Kontrollen (K) (N=60) (Ausreißer ausgeblendet)	42
Abbildung 13: CCL20-Konzentrationen (in pg/mL) bei MC- (n=170) und CU-Patienten (n=80) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (K) (N=60) (Ausreißer ausgeblendet).....	43
Abbildung 14: Korrelation von CCL20 (in pg/mL) mit fäkalem Calprotectin (in mg/dL) (N=163; $r_s=0,18$; $p=0,02$) und CRP (in mg/dL) (N=250; $r_s=0,15$; $p=0,02$)	44
Abbildung 15: CCL20-Konzentrationen (in pg/mL) innerhalb der gesunden Kontrollgruppe (N=60) bei Probanden mit 25(OH)D-Mangel (n=5) und suffizienten 25(OH)D-Spiegeln (n=55) ($p=0,03$) (Ausreißer ausgeblendet) .	46

Abbildung 16: Spearman-Korrelation von CCL20 (in pg/mL) mit 1,25(OH) ₂ D (in pg/mL) innerhalb des gesunden Kontrollkollektivs (N=60; $r_s=-0,33$; $p=0,01$)	47
Abbildung 17: SC-Spiegel (in ng/mL) bei CED-Patienten (N=250) unter Aufschlüsselung der Krankheitsaktivität im Vergleich zu gesunden Kontrollen (K) (N=60) (Ausreißer ausgeblendet)	49
Abbildung 18: SC-Spiegel (in ng/mL) bei MC-Patienten (N=170) mit Krankheitsaktivität (n=26) im Vergleich zu MC-Patienten in Remission (n=144) und bei CU-Patienten (N=80) mit Krankheitsaktivität (n=43) im Vergleich zu CU-Patienten in Remission (n=38) (Ausreißer ausgeblendet) .	50
Abbildung 19: Spearman-Korrelationen von Serum-Calprotectin (in ng/mL) mit den absoluten CDAI-Werten innerhalb MC-Kollektivs (N=170; $r_s=0,27$; $p=0,0003$) und den absoluten CAI-Werten innerhalb CU-Kollektivs (N=80; $r_s=0,35$; $p=0,002$).....	51
Abbildung 20: Spearman-Korrelation von Serum-Calprotectin (in ng/mL) mit fäkalem Calprotectin (in mg/L; n=163; $r_s=0,37$; $p<0,0001$)	52
Abbildung 21: Korrelation von Serum-Calprotectin (in ng/mL) mit C-reaktivem Protein (in mg/dL; n=250; $r_s=0,54$; $p<0,0001$), Leukozyten (in Giga/L; n=250; $r_s=0,58$; $p<0,0001$) und Thrombozyten (in Giga/L; n=250; $r_s=0,29$; $p<0,0001$)	53
Abbildung 22: SC-Konzentrationen (in ng/mL) bei CED-Patienten (N=250) mit (n=121) und ohne (n=129) Infliximab-Therapie (Ausreißer ausgeblendet)...	54
Abbildung 23: SC-Konzentrationen (in ng/mL) bei MC-Patienten (N=170) mit (n=85) und ohne (n=85) Infliximab-Therapie (links); CU-Patienten (N=80) mit (n=36) und ohne (n=44) Infliximab-Therapie (rechts) (Ausreißer ausgeblendet).....	55
Abbildung 24: LL-37-Konzentrationen (in ng/mL) bei CED-Patienten (N=250) mit Differenzierung der Krankheitsaktivität im Vergleich zu gesunden Kontrollen (K) (N=60) (Ausreißer ausgeblendet)	58
Abbildung 25: LL-37-Konzentrationen (in ng/mL) bei MC- (n=170) und CU-Patienten (n=80) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (K) (N=60) (Ausreißer ausgeblendet).....	59
Abbildung 26: LL-37-Konzentrationen (in ng/mL) bei CU-Patienten (N=80) mit Krankheitsaktivität (n=43) im Vergleich zu CU-Patienten in Remission (n=38) (Ausreißer ausgeblendet).....	59
Abbildung 27: Spearman-Korrelation von LL-37 (in ng/mL) mit absoluten CAI-Werten innerhalb CU-Kollektivs (N=80; $r_s=0,22$; $p=0,046$).....	60
Abbildung 28: Spearman-Korrelation von LL-37 (in ng/mL) mit fäkalem Calprotectin (in mg/L; n=163; $r_s=0,38$; $p<0,0001$)	61

Abbildung 29: Korrelation von LL-37 (in ng/mL) mit C-reaktivem Protein (in mg/dL; n=250; $r_s=0,34$; $p<0,0001$), Leukozyten (in Giga/L; n=250; $r_s=0,27$; $p<0,0001$) und Thrombozyten (in Giga/L; n=250; $r_s=0,13$; $p=0,045$)	62
Abbildung 30: LL-37-Konzentrationen (in ng/mL) bei MC-Patienten (N=170) mit (n=72) und ohne (n=98) vorbekannter Stenose sowie bei CU-Patienten (N=80) mit (n=5) und ohne (n=75) vorbekannter Stenose (Ausreißer jeweils ausgeblendet).....	63
Abbildung 31: LL-37-Konzentrationen (in ng/mL) links bei CED-Patienten (N=250) mit (n=121) und ohne (n=129) Infliximab-Therapie, rechts bei CU-Patienten (N=80) mit (n=36) und ohne (n=44) Infliximab-Therapie (Ausreißer ausgeblendet).....	65
Abbildung 32: LL-37-Konzentrationen (in ng/mL) bei CU-Patienten (N=80) mit 25(OH)D-Mangel (n=34) und ausreichenden 25(OH)D-Spiegeln (n=46) ($p=0,04$) (Ausreißer ausgeblendet).....	67
Abbildung 33: Spearman-Korrelation von LL-37 (in ng/mL) mit 1,25(OH)2D (in pg/mL) bei CED-Patienten (N=250; $r_s=-0,15$; $p=0,02$).....	68
Abbildung 34: Spearman-Korrelation von LL-37 (in ng/mL) mit 1,25(OH)2D (in pg/mL) bei CED-Patienten in Remission (n=182; $r_s=-0,17$; $p=0,02$) und bei CU-Patienten in Remission (n=38; $r_s=-0,45$; $p=0,004$).....	68
Abbildung 35: HBD-2-Spiegel (in pg/mL) im CED-Kollektiv mit Wildtyp R702w-Status (n=198), heterozygoter R702w-Mutation (n=30) und homozygoter R702w-Mutation (n=2) (nicht signifikante Unterschiede).....	80
Abbildung 36: ROC-Kurve der Serumparameter als Indikator für eine CED-Erkrankung	83
Abbildung 37: ROC-Kurve der Serumparameter als Indikator für eine MC-Erkrankung	84
Abbildung 38: ROC-Kurve der Serumparameter als Indikator für eine CU-Erkrankung	85
Abbildung 39: ROC-Kurve der Serumparameter als Krankheitsaktivitätsmarker im CED-Kollektiv	86
Abbildung 40: ROC-Kurve der Serumparameter als Krankheitsaktivitätsmarker im MC-Kollektiv	87
Abbildung 41: ROC-Kurve der Serumparameter als Krankheitsaktivitätsmarker im CU-Kollektiv	88

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Unterteilung der Defensine	21
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial für ELISA-Messungen	24
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Geräte	25
Tabelle 4: Übersicht der Laborparameter mit zugehörigen Messmethoden	27
Tabelle 5: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Definitionen	30
Tabelle 6: Charakteristika der CED-Patienten mit Stratifizierung nach Entität	31
Tabelle 7: Charakteristika der gesunden Kontrollgruppe (K).....	33
Tabelle 8: Mediane Vitamin D-Spiegel im CED-Kollektiv im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe	34
Tabelle 9: Mediane Vitamin D-Spiegel in den verschiedenen CED-Kollektiven ..	34
Tabelle 10: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse der 25(OH)D-Spiegel mit den absoluten CDAI- und CAI-Scores im MC- und CU-Kollektiv	36
Tabelle 11: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse der 25(OH)D-Spiegel mit den absoluten CDAI- und CAI-Scores im MC- und CU-Kollektiv	38
Tabelle 12: Multiple lineare Regression der Erkrankung als unabhängige Variable und der Vitamin D-Parameter als abhängige Zielvariablen im Gesamtkollektiv (N=310) aus CED-Patienten (n=250) und den gesunden Kontrollen (n=60) (Koeffizient: Regressionskoeffizient B; SE, Standardfehler)	39
Tabelle 13: Übersicht der gemessenen Parameter im CED-Kollektiv verglichen mit der Kontrollgruppe	40
Tabelle 14: Serumparameterkonzentrationen in Abhängigkeit vom Vitamin D- Status	40
Tabelle 15: Vergleich der CCL20-Serumkonzentrationen in den einzelnen CED- und im Kontrollkollektiv (K)	41
Tabelle 16: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse der CCL20-Spiegel mit den absoluten CDAI- und CAI-Scores im MC- und CU-Kollektiv	43
Tabelle 17: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse von CCL20 im CED-Kollektiv mit den Parametern fäkales Calprotectin (FC), CRP, Leukozyten und Thrombozyten	44
Tabelle 18: Mediane CCL20-Konzentrationen bei CED-Patienten und bei gesunden Kontrollen (K), differenziert nach 25(OH)D-Defizienz und suffizienten 25(OH)D-Spiegeln	45
Tabelle 19: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse von CCL20 mit 1,25(OH)2D im CED- und Kontrollkollektiv (K)	46
Tabelle 20: Vergleich der SC-Serumkonzentrationen in den einzelnen CED- und im Kontrollkollektiv (K).....	48
Tabelle 21: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse der SC-Spiegel mit den absoluten CDAI- und CAI-Scores im MC- und CU-Kollektiv	50

Tabelle 22: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse von SC im CED-Kollektiv mit den Parametern fäkales Calprotectin (FC), CRP, Leukozyten und Thrombozyten	52
Tabelle 23: SC in Abhängigkeit einer Infliximab-Therapie im CED- (N=250), MC- (n=170) und CU- (n=80)-Kollektiv	54
Tabelle 24: Mediane SC-Konzentrationen bei CED-Patienten und bei gesunden Kontrollen (K), differenziert nach 25(OH)D-Defizienz und suffizienten 25(OH)D-Spiegeln	55
Tabelle 25: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse von SC mit 1,25(OH)2D im CED- und Kontrollkollektiv (K)	56
Tabelle 26: Vergleich der LL-37-Serumkonzentrationen in den einzelnen CED- und im Kontrollkollektiv (K)	57
Tabelle 27: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse der LL-37-Spiegel mit den absoluten CDAI- und CAI-Scores im MC- und CU-Kollektiv	60
Tabelle 28: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse von LL-37 im CED-Kollektiv mit den Parametern fäkales Calprotectin (FC), CRP, Leukozyten und Thrombozyten	61
Tabelle 29: Mediane LL-37-Konzentrationen im MC- (n=170) und CU-Kollektiv (n=80) in Abhängigkeit von vorbekannter Stenose.....	63
Tabelle 30: LL-37 in Abhängigkeit einer Infliximab-Therapie im CED- (N=250), MC- (n=170) und CU-Kollektiv (n=80).....	64
Tabelle 31: Mediane LL-37-Konzentrationen bei CED-Patienten und bei gesunden Kontrollen (K), differenziert nach 25(OH)D-Defizienz und suffizienten 25(OH)D-Spiegeln	65
Tabelle 32: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse von LL-37 mit 1,25(OH)2D im CED- und Kontrollkollektiv (K)	67
Tabelle 33: Vergleich der HBD-2-Serumkonzentrationen in den einzelnen CED- und im Kontrollkollektiv (K)	69
Tabelle 34: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse der HBD-2-Spiegel mit den absoluten CDAI- und CAI-Scores im MC- und CU-Kollektiv	70
Tabelle 35: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse von HBD-2 im CED-Kollektiv mit den Parametern fäkales Calprotectin (FC), CRP, Leukozyten und Thrombozyten	71
Tabelle 36: Mediane HBD-2-Konzentrationen bei CED-Patienten und bei gesunden Kontrollen (K), differenziert nach 25(OH)D-Defizienz und suffizienten 25(OH)D-Spiegeln	71
Tabelle 37: Spearman'sche Rangkorrelationsanalyse von LL-37 mit 1,25(OH)2D im CED- und Kontrollkollektiv (K)	72

Tabelle 38: Multiple lineare Regressionsanalyse im Gesamtkollektiv (N=310) mit Vitamin D als unabhängige Variable und den logarithmierten Serumparametern als abhängige Variablen unter Einbezug unten angegebener Kovariablen	75
Tabelle 39: Multiple lineare Regressionsanalyse im CED-Kollektiv (n=250) mit Vitamin D als unabhängige Variable und den logarithmierten Serumparametern als abhängige Variablen unter Einbezug unten angegebener Kovariablen	76
Tabelle 40: Multiple lineare Regressionsanalyse im MC-Kollektiv (n=170) mit Vitamin D als unabhängige Variable und den logarithmierten Serumparametern als abhängige Variablen unter Einbezug unten angegebener Kovariablen	77
Tabelle 41: Multiple lineare Regressionsanalyse im CU-Kollektiv (n=80) mit Vitamin D als unabhängige Variable und den logarithmierten Serumparametern als abhängige Variablen unter Einbezug unten angegebener Kovariablen	78
Tabelle 42: Multiple lineare Regressionsanalyse im Kontrollkollektiv (N=60) mit Vitamin D als unabhängige Variable und den logarithmierten Serumparametern als abhängige Variablen unter Einbezug unten angegebener Kovariablen	79
Tabelle 43: Multiple lineare Regressionsanalyse im NOD2-mutierten und nicht mutierten CED-Kollektiv mit den Vitamin D-Serumparametern als unabhängige Variable und den logarithmierten HBD-2-Spiegeln als abhängige Variablen unter Einbezug unten angegebener Kovariablen	81
Tabelle 44: Multiple lineare Regressionsanalyse im NOD2-mutierten und nicht mutierten MC-Kollektiv mit den Vitamin D-Serumparametern als unabhängige Variable und den logarithmierten HBD-2-Spiegeln als abhängige Variablen unter Einbezug unten angegebener Kovariablen	81
Tabelle 45: ROC-Analyse der Serumparameter als Indikatoren für eine CED-Erkrankung mit Angabe des Cut-off-Werts, der Area under the curve (AUC) sowie Sensitivität und Spezifität mit Konfidenzintervallen (KI)	83
Tabelle 46: ROC-Analyse der Serumparameter als Indikatoren für eine MC-Erkrankung mit Angabe des Cut-off-Werts, der Area under the curve (AUC) sowie Sensitivität und Spezifität mit Konfidenzintervallen (KI)	84
Tabelle 47: ROC-Analyse der Serumparameter als Indikatoren für eine CU-Erkrankung mit Angabe des Cut-off-Werts, der Area under the curve (AUC) sowie Sensitivität und Spezifität mit Konfidenzintervallen (KI)	85

Tabelle 48: ROC-Analyse der Serumparameter als Krankheitsaktivitätsmarker im CED-Kollektiv mit Angabe des Cut-off-Werts, der Area under the curve (AUC) sowie Sensitivität und Spezifität mit Konfidenzintervallen (KI)	86
Tabelle 49: ROC-Analyse der Serumparameter als Krankheitsaktivitätsmarker im MC-Kollektiv mit Angabe des Cut-off-Werts, der Area under the curve (AUC) sowie Sensitivität und Spezifität mit Konfidenzintervallen (KI)	87
Tabelle 50: ROC-Analyse der Serumparameter als Krankheitsaktivitätsmarker im CU-Kollektiv mit Angabe des Cut-off-Werts, der Area under the curve (AUC) sowie Sensitivität und Spezifität mit Konfidenzintervallen (KI)	88

10 Abkürzungsverzeichnis

1,25(OH) ₂ D	1,25-Dihydroxyvitamin D / Calcitriol
25(OH)D	25-Hydroxyvitamin D / Calcidiol
5-ASA	5-Aminosalicylate
AMP	antimikrobielles Peptid
AUC	<i>area under the curve</i>
CaCo2	<i>Cancer Coli-2-Zelllinie</i>
CAI	<i>Colitis activity index</i> nach Rachmilewitz
CCL20	<i>C-C motif chemokine ligand 20</i>
CCR6	<i>C-C motif chemokine receptor 6</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDAI	<i>Crohn's Disease Activity Index</i> nach Best
CDEIS	<i>Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity</i>
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CRP	C-reaktives Protein
CU	Colitis ulcerosa
dL	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	<i>Dextran Sulfate Sodium</i> / Natriumdextransulfat
ECCO	<i>European Crohn's and Colitis Organisation</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FC	fäkales Calprotectin
G	Giga
g	Gramm
GIT	Gastrointestinaltrakt
GWAS	Genomweite Assoziationsstudien
Hb	Hämoglobin
HBD	humanes beta-Defensin
hCAP18	<i>Human Cationic Antibacterial Protein of 18 Kilodalton</i>

HD	<i>human defensin</i>
HNP	<i>Human Neutrophil Peptides</i>
IE / IU	Internationale Einheiten / <i>International Units</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IOM	<i>Institute of Medicine</i>
K	Kontrollkollektiv
kg	Kilogramm
KI	Konfidenzintervall
L	Liter
LL-37	Cathelicidin
log	Logarithmus/Logarithmieren
LPS	Lipopolysaccharide
m	Meter
MAP-Kinase	<i>Mitogen-activated Protein-Kinase</i>
MC	Morbus Crohn
MDP	Muramyl-dipeptide
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
n/N	Anzahl
NF- κ B	<i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NGAL-MMP-9	Neutrophile Gelatinase B-assoziertes Lipocalin und Matrix-Metalloproteinase-9
NOD2	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2</i>
pg	Picogramm
Q1; Q3	Erstes und drittes Quartil
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RXR	<i>Retinoid-X Receptors</i>
SC	Serum-Calprotectin
SE	<i>Standard error</i> (Standardfehler)

SD	Standardabweichung
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
T	Tera
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TJ	<i>Tight Junctions</i>
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
VD2	Vitamin D2 / Ergocalciferol
VD3	Vitamin D3 / Cholecalciferol
VDBP	Vitamin D-bindendes Protein
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDRE	<i>Vitamin D-Responsive Elements</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

11 Anhang

11.1 Anhang 1: Punkteskala von Aktivität und Schweregrad des Morbus Crohn: CDAI nach Best

Kriterium	Multiplikator	Ergebnis
Anzahl der ungeformten Stühle der letzten Woche: _____	x2	
Grad der Bauchschmerzen Keine Schmerzen an ___ Tagen x0 =____ Leichte Schmerzen an ___ Tagen x1 =____ Mäßige Schmerzen an ___ Tagen x2 =____ Starke Schmerzen an ___ Tagen x3 =____ <p style="text-align: right;">Gesamtsumme: _____</p>	x5	
Grad des Allgemeinbefindens über eine Woche Gutes Allgemeinbefinden an ___ Tagen x 0 =____ Mäßiges Befinden an ___ Tagen x 1 =____ Schlechtes Befinden an ___ Tagen x 2 =____ Sehr schlechtes Befinden an ___ Tagen x 3 =____ Unerträgliches Befinden an ___ Tagen x 4 =____ <p style="text-align: right;">Gesamtsumme: _____</p>	x7	
Assoziierte Symptome <ul style="list-style-type: none"> • Iritis/Uveitis • Stomatitis aphthosa • Pyoderma gangraenosum • Erythema nodosum • Arthralgien/Arthritis • Analfissur/Analfisteln • Andere Fisteln • Temperatur > 37°C <p style="text-align: right;">Anzahl der zutreffenden Punkte: _____</p>	x20	
Symptomatische Durchfallbehandlung (z.B. Loperamid) Ja = 30 Nein = 0		
Resistenz im Abdomen Nein = 0 Fraglich = 2 Sicher = 5	x10	
Hämatokrit Männer: 47 <p style="text-align: center;">Minus Hämatokrit = _____</p> Frauen: 42	x6	
Gewicht 1 – (Körpergewicht in kg / Standardgewicht in kg) = _____	x100	
GESAMMTSUMME AKTIVITÄTSINDEX		

Quelle: Interner Klinikleitfaden (2005), Medizinische Klinik und Poliklinik II der Universität München, Seite 249

11.2 Anhang 2: Punkteskala von Aktivität und Schweregrad der Colitis Ulcerosa: CAI-Score nach Rachmilewitz

Klinischer Aktivitäts Index nach Rachmilewitz ¹⁹			Score
1	Anzahl der Stühle pro Woche	<18	0
		18-35	1
		35-60	2
		>60	3
2	Blut im Stuhl (im Wochendurchschnitt)	Keines	0
		Wenig	2
		Viel	4
3	Allgemeine Beurteilung des Patientenzustandes	Gut	0
		Durchschnittlich	1
		Schlecht	2
		Sehr schlecht	3
4	Bauchschmerzen/ Krämpfe	Keine	0
		Leichte	1
		Mäßige	2
		Schwere	3
5	Körpertemperatur (Kolitis-bedingt)	37–38 °C	0
		>38 °C	3
6	Extraintestinale Manifestationen	Iritis	3
		Erythema nodosum	3
		Arthritis	3
7	Laborbefunde	BSG >50 mm in der 1. Stunde	1
		BSG >100 mm in der 1. Stunde	2
		Hb <100 g/l	4

12 Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Reichl, Felix Erwin

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Untersuchung potenzieller Vitamin D-abhängiger Serum-Biomarker bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 19.12.2024

Ort, Datum

Felix Erwin Reichl

Unterschrift Felix Reichl

13 Publikationsliste

Teile der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen dieser Publikationen veröffentlicht:

Kongressbeitrag:

F. Reichl, M. Lauseker, L. Waldenmaier, H. Török, J. Mayerle, T. Olszak, F. Schnitzler, S. Breiteneicher, S. Brand, A. Stallmach, J. Diegelmann, I. Frasheri, F. Beigel, J. Stallhofer: **Vitamin D supprimiert die intestinale und systemische Expression des bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen systemisch erhöhten Th17-Chemokins CCL20.** *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 61(08): e407-e409, 2023.

Eingereichte Veröffentlichung, derzeit im peer-review-Verfahren:

J. Stallhofer, F. Reichl, M. Lauseker, L. Waldenmaier, H. P. Török, J. Mayerle, T. Olszak, F. Schnitzler, I. Frasheri, S. Breiteneicher, S. Brand, A. Stallmach, J. Diegelmann, F. Beigel: **Vitamin D Attenuates Upregulation of the Th17 Cell Chemoattractant CCL20 in Inflammatory Bowel Disease.** *Scientific reports*, ca. 2025.

14 Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei allen, die dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit entstehen konnte.

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. med. Julia Mayerle für die Möglichkeit, diese Dissertation an Ihrer Klinik durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. med. Florian Beigel für dessen Unterstützung und die zeitnahen und konstruktiven Korrekturen, er war mir stets ein kompetenter Lehrer und Ansprechpartner.

Zudem trug zur Entstehung dieser Arbeit ganz maßgeblich Herr Dr. med. Johannes Stallhofer bei. Bei ihm möchte ich mich herzlichst für die umfassende Betreuung und die ausführliche Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten bedanken.

Ich möchte auch Frau Diplom-Biotechnologin Nicole Lichter der Abteilung für Klinische Pharmakologie für den exzellenten technischen Support der ELISA-Messungen danken.

Frau Simone Breiteneicher danke ich sehr für die logistische und organisatorische Unterstützung, sie war mir in vielen Belangen eine sehr große Hilfe.

Abschließend möchte ich meinen Eltern Heidi und Werner Reichl für die mentale, aber auch finanzielle Unterstützung danken, ohne Sie wäre das gesamte Medizinstudium nicht möglich gewesen. Ihnen und allen meinen Freunden gilt mein größter Dank.

15 Lebenslauf

