

**Einfluss einer Vitamin D-Substitution
auf die intestinale Bakterienzusammensetzung**

bei M. Crohn

– eine Fall-Kontroll-Studie –

Inauguraldissertation zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
Zentrum für Innere Medizin
Abteilung Gastroenterologie
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt
von
Paul Klinitzke

Rostock 2025

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005173

Gutachter:

PD Dr.med. habil Holger Schäffler, Universität Rostock, Gastroenterologie

Prof. Dr. med. Ali A. Aghdassi, Universität Greifswald, Innere Medizin

Prof. Dr. rer. nat. habil Bernd Kreikemeyer, Universität Rostock, Mikrobiologie

Jahr der Einreichung: 2024

Jahr der Verteidigung:2025

Inhalt

I.	Einleitung	3
1.1	Morbus Crohn	3
1.2	Colitis Ulcerosa	5
1.3	Epidemiologie	6
1.4	Pathogenese	7
1.4.1	Das intestinale Mikrobiom	7
1.4.2	Genetische Faktoren	8
1.4.3	Vitamin D	10
1.5	Zusammenhang zwischen Vitamin D und CED	14
1.6	Krankheitsverlauf des M. Crohn	15
1.6.1	Klinik	15
1.6.2	Komplikationen	16
1.7	Diagnostik	18
1.8	Therapie	19
1.8.1	Glukokortikoide	19
1.8.2	Immunsuppressiva	20
1.8.3	Aminosalizylate	20
1.8.4	Biologika	21
1.8.5	Chirurgische Therapie	22
II.	Thesen	24
III.	Fragestellung	25
IV.	Material und Methoden	26
4.1	Studiendesign	26
4.2	DNA-Isolierung	28
4.2.1	Vorbereitung von 16S- rRNA-Gen für die Sequenzierung mit dem Illumina MiSeq System	32
4.2.2	Datenauswertung	38
4.2.3	Statistische Analyse	40
4.2.4	<i>NOD2</i> -Genotypisierung	41
V.	Ergebnisse	44
5.1	Effekte der Vitamin D-Substitution auf den Vitamin D-Spiegel von M. Crohn - Patienten und gesunden Probanden	44

5.2	Effekte der Vitamin D-Substitution auf Calprotectin-Spiegel und die Krankheitsaktivität.....	46
	Krankheitsaktivität.....	46
5.3	Vitamin D-Substitution führt zu einer temporären Verschiebung der intestinalen bakteriellen Komposition bei Patienten mit M. Crohn	47
	intestinalen bakteriellen Komposition bei Patienten mit M. Crohn	47
5.4	Änderungen der Abundanzen der am häufigsten auftretenden Bakterienstämme in Abhängigkeit einer Vitamin D-Substitution	49
	Änderungen der Abundanzen der am häufigsten auftretenden Bakterienstämme in Abhängigkeit einer Vitamin D-Substitution	49
5.5	Änderungen in der Anzahl der bakteriellen Taxa unter Vitamin D -Substitution	51
	Änderungen in der Anzahl der bakteriellen Taxa unter Vitamin D -Substitution	51
VI.	Diskussion	53
VII.	Zusammenfassung	63
VIII.	Literaturverzeichnis.....	65
IX.	Abbildungsverzeichnis:.....	77
X.	Tabellenverzeichnis	78
XI.	Abkürzungsverzeichnis	79
XII.	Publikationen	80
XIII.	Eidesstattliche Versicherung.....	81
XIV.	Lebenslauf	82
XV.	Danksagung	82

I. Einleitung

Chronische entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, welche zu einem Funktionsverlust sowie einer Störung der Darmstruktur führen können. Die am häufigsten auftretenden Formen von CED sind Morbus Crohn (M. Crohn) und Colitis Ulcerosa (CU) (Abraham und Cho 2009).

1.1 Morbus Crohn

Der M. Crohn, welcher auch die Bezeichnung „*Enterocolitis regionalis*“ bzw. „*Ileitis terminalis*“ trägt, wurde im Jahr 1932 in Bezug auf pathologische und klinische Aspekte zum ersten Mal von Burrill B. Crohn beschrieben (Crohn et al. 1932). Es handelt es sich um eine rezidivierende systemische Erkrankung, welche in unterschiedlicher Ausprägung, segmental den gesamten Gastrointestinaltrakt befallen kann (Hoffmann et al. 2008).

Histologisch sind eine transmurale Entzündung der Darmwand sowie eine Ansammlung von Lymphozyten und Makrophagen kennzeichnend, darüber hinaus können nicht verkäsende Epitheloidzellgranulome auftreten (Preiß et al. 2014).

Leitsymptom des M. Crohn ist der Abdominalschmerz, verbunden mit meist unblutiger Diarrhöe. Weiterhin klagen die Patienten über Übelkeit, Erbrechen, Stuhldrang, Fieber und Appetitlosigkeit sowie Gewichtsverlust (Hoffmann et al. 2008).

Um die Krankheitsaktivität objektiv bestimmen zu können, gibt es verschiedene Indices. Der am weitesten verbreitete ist der „Crohn´s Disease Activity Index“ (CDAI) (Best 2006). Hier wird anhand ausgewählter klinischer Parameter die Erkrankung stratifiziert, um so eine Einteilung in Remission, moderate sowie schwere Aktivität vorzunehmen (Best et al. 1976).

Neben dem CDAI findet vor allem im klinischen Bereich die Montreal-Klassifikation Anwendung. Gemäß dieser lässt sich der M. Crohn in einen nicht-strikurierenden, nicht-penetrierenden (B1), einen strikturierenden (B2) sowie eine penetrierend-fistulierenden (B3) Verlaufstyp einteilen (Gasche 2000). Weitere Einflussgrößen der Klassifikation sind die Krankheitslokalisation vom oberen Gastrointestinaltrakt bis zum Kolon (L1-L4), sowie das Patientenalter in 3 Altersgruppen von 16 - 40 Jahre (A1-A3) (Feuerstein und Cheifetz 2017).

Tabelle 1: Berechnung des CDAI nach Best et al. 1976

Klinische Parameter	Beurteilung	Gewichtungsfaktor
Stuhlkonsistenz	Anzahl ungeformter Stuhlgänge der letzten 7 Tage	*2
Bauchschmerzen	Summe der Tageswerte der letzten 7 Tage: 0=keine; 1= leicht; 2=mittel; 3 =stark	*5
Allgemeinbefinden	Summe der Tageswerte der letzten 7 Tage: 0: unbeeinträchtigt; 1= beeinträchtigt; 2= schlecht; 3= sehr schlecht; 4= unerträglich	*7
Komplikationen	Gesamtsumme; pro vorliegender Komplikation 1 Punkt; Haut-, Augen-, Gelenkbeteiligung, perianaler Befall (Fisteln, Fissuren, Abszesse), weitere Fisteln, Fieber	*20
Symptomatische Durchfallbehandlung	Pro Medikamenteneinnahme 1 Punkt	*30
Abdominelle Resistenzen	0=keine; 2= fraglich; 5=sicher	*10
Abweichungen vom Hämatokrit (Hkt)	Weiblich: 42- Hkt. Männlich:47- Hkt.	*6
Abweichungen vom Standardgewicht	Formel: $100 - ((\text{Gewicht} + 100) / \text{Standardgewicht})$	*1

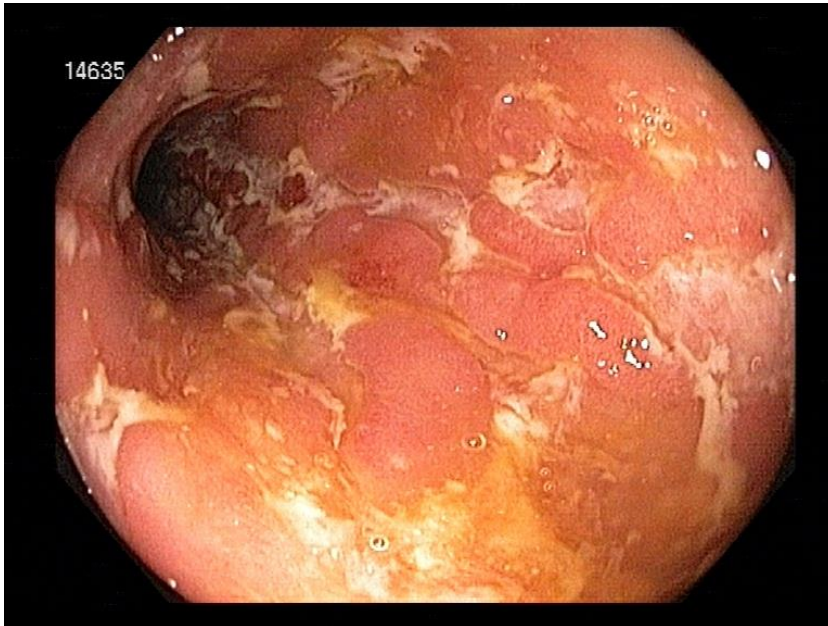


Abbildung 1:Endoskopisches Bild kolonischer Ulcerationen bei M. Crohn

Quelle: Universitätsmedizin Rostock, Abteilung für Gastroenterologie

1.2 Colitis Ulcerosa

Die CU fand ihre erste Erwähnung im Jahr 1859 durch den Physiker Sir Samuel Wilks (Baumgart und Carding 2007).

Während der M. Crohn im gesamten Gastrointestinaltrakt auftreten kann, ist für die CU eine entzündliche Veränderung der Darmmukosa im Kolon kennzeichnend. Lediglich in seltenen Fällen treten in Form einer so genannten „Backwash-Ileitis“ weitere Entzündungen im terminalen Ileum auf. Histologisch zeigt sich eine mukosale Entzündung der Kolonwand. In Abhängigkeit des Befalls kann eine Einteilung in eine Proktitis, Linksseitenkolitis sowie Pankolitis gemäß der Montreal-Klassifikation erfolgen (Silverberg et al. 2005). Leitsymptome der CU sind schleimige Durchfälle, Bauchschmerzen und Fieber (Ungaro et al. 2017).

1.3 Epidemiologie

Die Zahl der Neuerkrankungen an CED ist in den letzten Jahren weltweit ansteigend (Molodecky et al. 2012). In Deutschland liegt die aktuelle Prävalenz der CED bei etwa 0,4 % der Bevölkerung, was ca. 320.000 Erkrankten entspricht (Bokemeyer 2007).

Für M. Crohn lag die Inzidenz in Deutschland zuletzt bei 7 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern und zeigte in den letzten Jahren eine Stabilisierung (Ott et al. 2008). Es zeigen sich weltweit geographische Unterschiede sowie große regionale Differenzen in der Inzidenz des M. Crohn. So ist ein gehäuftes Auftreten vor allem in Nordamerika, Nordeuropa und Skandinavien zu beobachten (Baumgart und Carding 2007; Ott et al. 2008; Blanchard et al. 2001). Neben der stark steigenden Inzidenz in industrialisierten Ländern Nordamerikas sowie in Nord- und Westeuropa, ist auch in Entwicklungsländern ein Aufwärtstrend zu verzeichnen (Molodecky et al. 2012).

Im Vergleich zu M. Crohn findet sich für die CU mit 2-3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern eine niedrigere Inzidenz (Bokemeyer 2007).

In einer kanadischen Studie konnte ein Zusammenhang zwischen dem Durchschnittseinkommen einer Familie und dem Auftreten von M. Crohn hergestellt werden (Bernstein et al. 1999). Es wurde dargelegt, dass Familien mit einem höheren Durchschnittseinkommen eine höhere Inzidenz für das Auftreten eines M. Crohn hatten.

In einer weiteren Arbeit aus dem Jahr 2001 konnten Blanchard et al. zeigen, dass Menschen, die in Städten leben, im Vergleich zur ländlichen Bevölkerung häufiger an M. Crohn erkranken (Blanchard et al. 2001). Demzufolge ist bei Personen, welche sowohl in der Stadt leben als auch ein höheres Durchschnittseinkommen aufweisen, ein vermehrtes Auftreten von M. Crohn zu beobachten (Blanchard et al. 2001).

Bezüglich der Altersverteilung von M. Crohn zeigt sich ein Erkrankungsgipfel zwischen dem 16. und 25. Lebensjahr (Ott et al. 2008).

Eine eindeutige geschlechterspezifische Verteilung des M. Crohn konnte bisher nicht festgestellt werden. So beschrieben Loftus et al., dass Männer und Frauen gleich häufig betroffen waren, während Ott et al. von einer geringfügig höheren Prävalenz beim weiblichen Geschlecht berichteten (Ott et al. 2008).

1.4 Pathogenese

Die Pathogenese der CED ist noch nicht vollständig geklärt. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine überschießende Aktivierung des mukosalen Immunsystems, welche durch die kommensale Darmmikrobiota hervorgerufen wird, bei Patienten mit einem genetischen Risikoprofil einen entscheidenden Aspekt in der Pathogenese der CED darstellt (Liu et al. 2015; Liu und Stappenbeck 2016; Halfvarson et al. 2003). Ebenso wurde in weiteren Untersuchungen gezeigt, dass mikrobielle und Umweltfaktoren eine Rolle in der Entstehung spielen, weshalb auch von einer multifaktoriellen Pathogenese ausgegangen wird. (Sartor 2008; Abraham und Cho 2009; Baumgart und Sandborn 2012). Wie bereits erwähnt, spielen bei der Entstehung des M. Crohn auch verschiedene Umweltfaktoren wie z. B. das Rauchen eine wichtige Rolle, wobei es durch den Nikotinkonsum sogar zu erneuten Schüben und zunehmender Inflammation kommen kann. Unterstützend haben zahlreiche Studien bestätigt, dass Raucher mit M. Crohn ein erhöhtes Risiko an postoperativen Rezidiven haben (Ho et al. 2019).

1.4.1 Das intestinale Mikrobiom

Die Hauptlokalisationen des M. Crohn sind das terminale Ileum sowie das Kolon. Das Kolon enthält schätzungsweise etwa 70 % aller Mikroorganismen des menschlichen Körpers (Vyas und Ranganathan 2012). Neben etwa 1.000 verschiedenen Bakterienstämmen sind Archaea, Eukaryoten, Viren, Pilze und Bakteriophagen im Darm angesiedelt und bilden gemeinsam die Darmflora (McCracken und Lorenz 2001). Aufgrund der großen Oberfläche des Darms ist die Anzahl der Mikroorganismen sehr hoch und beträgt geschätzt etwa 10^{14} und übersteigt damit die Zahl der menschlichen Zellen im Körper um mehr als das 10fache (Qin et al. 2010). Das Mikrobiom besteht aus der Gesamtheit aller Genome der im Darm enthaltenen Mikroorganismen und ist etwa um den Faktor 100 größer als das menschliche Genom (Ley et al. 2006). Da der Darm pränatal keimfrei ist, setzt sich erst während der Geburt und im Laufe des ersten Lebensjahres das Mikrobiom aus Mikroorganismen sowohl von der Mutter als auch der Umwelt zusammen. Das Mikrobiom besteht zu über 90 %

aus den zwei bakteriellen Phyla *Bacteroidetes* und *Firmicutes* (Qin et al. 2010). Die Bakterien übernehmen in der Darmflora verschiedene Aufgaben. So erfüllen sie wichtige metabolische Funktionen und sind vor allem für die Verstoffwechslung von Vitamin B 12, die Synthetisierung von Aminosäuren und die Biotransformation von Galle verantwortlich (Curic et al. 2018). Des Weiteren führen die Mikroorganismen verschiedene Stoffwechselaktivitäten aus, die wesentlich für den menschlichen Metabolismus sind (Vyas und Ranganathan 2012). Das Mikrobiom hat die Aufgabe, sowohl die antimikrobielle Abwehr aufrecht zu erhalten als auch gleichzeitig einen Zustand der Immuntoleranz gegenüber den residenten Darmbakterien zu gewährleisten. Kommt es nun zu einer Dysbalance der bakteriellen Zusammensetzung in Form eines Überwiegens von pathogenen Bakterien, kann dies auch eine Schädigung der intestinalen Mukosa und der epithelialen Barriere verursachen. Als mögliche Konsequenzen können entzündliche Prozesse in der Mukosa auftreten (Seksik et al. 2006).

Aufgrund der vielseitigen Einflüsse auf den menschlichen Metabolismus ging man schon sehr früh davon aus, dass eine Dysbalance im Mikrobiom zur Pathogenese von CED beitragen kann. Bisher konnten jedoch keine eigenständigen bakteriellen Phyla bzw. Spezies ermittelt werden, welche die Entstehung von CED vollständig erklären würden. Dennoch konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, dass die CED mit einer mukosalen Dysbalance, einer sogenannten Dysbiose, in der bakteriellen Zusammensetzung assoziiert sind. Dies hat wiederum einen Einfluss auf die Homöostase der Darmbakterien (Manichanh et al. 2006; Seksik et al. 2006; Seksik et al. 2003). Eine intestinale Dysbiose kann sowohl zu einer Zunahme von proinflammatorisch wirkenden bzw. auch zur Abnahme von entzündungshemmenden Bakterienstämmen führen und infolgedessen zur Pathogenese der CED beitragen.

1.4.2 Genetische Faktoren

Eine genetische Komponente, welche für die Entstehung der CED mitverantwortlich erscheint, konnte schon in mehreren Studien beschrieben werden. Unter anderem wurde gezeigt, dass es im Vergleich zur Normalbevölkerung ein erhöhtes Risiko für Verwandte 1. Grades von CED-PatientInnen gibt, ebenfalls eine CED zu entwickeln

(Nunes et al. 2011). In verschiedenen internationalen Studien mit insgesamt mehr als 90.000 Probanden konnten mehr als 200 verschiedene Risikoloci, sogenannte „single nucleotide polymorphisms“ (SNP's), für die Entstehung von CED im menschlichen Genom identifiziert werden (Jostins et al. 2012; Liu et al. 2015). Im Jahr 2001 wurde das erste Gen, das „nucleotide-binding oligomerization domain containing protein“ 2 (*NOD2*) mit der Entstehung und Ausprägung von M. Crohn in Verbindung gebracht (Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A; Hugot et al. 2001).

Das *NOD2*-Gen codiert für ein Protein, das in Form eines intrazellulären Rezeptors bakterielle Oberflächenbestandteile erkennt und somit einen wichtigen Teil der angeborenen Immunität darstellt (Cuthbert et al. 2002a; Cooney et al. 2010; Hampe et al. 2002). *NOD2* -Rezeptoren gehören zu den sogenannten „*pathogen recognition receptors*“ (PRR) und damit zu der angeborenen Immunabwehr des Körpers. Er wird auf dendritischen Zellen, Makrophagen, intestinalen Epithelzellen sowie Monozyten und Granulozyten exprimiert (Cooney et al. 2010). Dadurch kann es zu einer Wechselwirkung zwischen der intestinalen Mukosa, der bakteriellen Komposition und dem Immunsystem kommen. Die Struktur des *NOD2*-Gens setzt sich aus einer zentralen Nukleotid-Bindungs-Domäne (NBD), zwei N-terminalen Caspase-Aktivierungs- und Rekrutierungs-Domänen (CARD) sowie 10 carboxyterminalen leucine-reichen Proteinen (LRR) zusammen (Cuthbert et al. 2002a). Durch die im *NOD2*-Gen enthaltenen LRR, ist der *NOD2*-Rezeptor in der Lage, bakterielle Peptidoglykane, insbesondere N-glycol-muramyl Dipeptide, die kleinste Einheit der Peptidoglykane, zu erkennen (Takeuchi und Akira 2010). Die genauen Pathomechanismen, welche durch eine Mutation im *NOD2*-Gen zu einer Entzündung im Darm führen, sind bis heute nicht abschließend geklärt. Obwohl *NOD2*-Mutationen als Risikofaktor für die Entstehung eines M. Crohn gelten, ist ein Nachweis einer Mutation nur bei etwa 32 % aller M. Crohn- Patienten möglich (Kupka et al. 2018). Darüber hinaus konnte selbst in verschiedenen Zwillingsstudien mit monozygotischen Zwillingen keine 100 % Penetranz der CED gesehen werden, trotz hoher Übereinstimmung der Erkrankung an einer CED zwischen 35 % bis 38 % bei M. Crohn (Halfvarson et al. 2003; M. Orholm, V. Binder, T. I. A. Sørensen, L. P. Rasmussen, K. O. Kyvik 2000).

Darüber hinaus sind Mutationen im *NOD2*-Gen nicht nur bei M. Crohn als Risikofaktor einzustufen. So wurden beispielsweise auch Verbindungen zwischen Mutationen im

NOD2-Gen bei Erkrankungen wie Graft-Versus-Host-Disease (Landfried et al. 2010), spontaner bakterieller Peritonitis bei Leberzirrhose (Appenrodt et al. 2010) als auch bei Komplikationen nach Darmtransplantationen (Fishbein et al. 2008) nachgewiesen. Neben dem *NOD2*-Gen konnte auch bei weiteren Risikogenen, wie *Autophagy-related protein 16-1 (ATG16L1)*, *Immunity Related GTPase M (IRGM)*, *Caspase recruitment domain-containing protein 9 (CARD9)* und *Interleukin-23 Rezeptor (IL23R)* eine Assoziation zum M. Crohn identifiziert werden. *ATG16L1* gilt als wichtiges Schlüsselprotein der Autophagie. Polymorphismen im *ATG16L1* können durch eine Dysbalance in der Zytokin-Produktion zu verminderten Abwehrmechanismen führen (Naser et al. 2012). Der *IL23-R*, welcher vor allem auf der Zellmembran von T-Gedächtniszellen, natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen sowie Monozyten exprimiert wird, spielt eine wichtige Rolle in der Vermittlung proinflammatorischer Signale, mittels einer Aktivierung von T-Helferzellen-17 (TH-17) sowie der Produktion von Interleukin 17. Gleichzeitig interagiert der *IL23-R* mit Interleukin-23, einem Zytokin, dass die Aktivität von Immunzellen reguliert. Auch hier können Polymorphismen zu einer Störung der Immunantwort auf pathogene Mikroorganismen führen (Naser et al. 2012).

Die oben genannten Risikogene zeigen eindrücklich den Zusammenhang, welcher zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem sowie der intestinalen Mukosa und den Darmbakterien besteht. So kann eine Mutation in den Genen dementsprechend auch funktionelle Einschränkungen der intestinalen Mukosa zur Folge haben und somit zu einer Dysbalance zwischen dem Immunsystem und den Darmbakterien führen. Diese intestinale Dysbalance begünstigt durch eine proinflammatorische Wirkung die Entstehung und Entwicklung einer CED (Cadwell et al. 2008).

1.4.3 Vitamin D

Vitamin D spielt vorrangig eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel des menschlichen Körpers, hier vor allem beim Aufbau der Knochenmatrix durch eine Regulation des Calciums- und Phosphat-Metabolismus (Holick 2007).

Neben der Bedeutung für den Knochenmetabolismus wurde in den letzten Jahren das Vitamin D zunehmend als wichtiger Faktor in der Regulation des zellulären und

humoralen Immunsystems betrachtet (Cantorna et al. 2004) . Dieser Aspekt spielt insbesondere bei rheumatologischen Erkrankungen eine Rolle (Harrison et al. 2019).

Es konnte u.a. eine Assoziation eines Vitamin D-Mangels bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 1, bei kardiovaskulären Erkrankungen wie arterieller Hypertonie bzw. Herzinsuffizienz, onkologischen Erkrankungen wie Kolon- und Mamma-Carcinomen und neurokognitiven Erkrankungen wie Morbus Alzheimer nachgewiesen werden (Lee et al. 2013). Eine Studie legt weiterhin nahe, dass ein Vitamin D-Mangel mit einer signifikanten Erhöhung der kardiovaskulären Mortalität, der Tumormortalität und einer gesteigerten Mortalität bei Atemwegserkrankungen einhergeht (Schöttker et al. 2013). Inwieweit ein Vitamin D Mangel jedoch Einfluss auf den Verlauf dieser Krankheiten hat, ist weiterhin noch nicht vollständig verstanden und Gegenstand vieler aktueller Studien.

Etwa 80-90 % des Bedarfs an Vitamin D werden durch die körpereigene Synthese abgedeckt, welche durch die im Sonnenlicht enthaltenen ultraviolette-Strahlen Typ B (UVB-Strahlen) induziert wird und bis zu 25.000 I.E./Tag synthetisiert (Khalili et al. 2012b; Reich et al. 2014).

Durch den Kontakt der Haut mit UVB-Strahlen (Wellenlänge 290-315 nm) bildet sich aus dem in dieser gespeicherten 7-Dehydrocholesterol das biologisch inaktive Prävitamin D₃ (Prä-Vitamin D). Durch die eigene Körperwärme erfolgt daraufhin eine Isomerisierung des Prävitamin D₃ zu Vitamin D₃ (Vitamin D). Dieses wird daraufhin über Vitamin D-bindende Proteine aus der Haut über den Blutkreislauf zur Leber transportiert (Holick 2004).

In der Leber erfolgt dann eine Hydroxylierung des Vitamin D durch das Enzym Vitamin D-25 Hydroxylase (Cyp2R1) zu 25-Hydroxy-Vitamin D (Cheng et al. 2004). Das 25-Hydroxy-Vitamin D ist der am häufigsten zirkulierende Metabolit und wird deshalb vor allem im klinischen Alltag zur laborchemischen Bestimmung des Vitamin D-Status genutzt (Holick 2006). Von der Leber aus erfolgt der Transport mittels Vitamin D-bindenden Proteinen zur Niere, wo eine weitere Hydroxylierung zum biologisch aktiven 1,25-Dihydroxy-Vitamin D durch das Enzym 1 α -Hydroxylase erfolgt. Über den Blutkreislauf wird der aktive Metabolit zu den Vitamin D-Rezeptoren transportiert, welche in vielen verschiedenen Geweben wie z. B. Knochen, Darm und Niere

exprimiert sind. Durch die Interaktion des Metaboliten mit dem Rezeptor wird eine Beeinflussung der Transkription von verschiedenen Zielgenen vermittelt (Hewison 2010). Der Vitamin D-Rezeptor gehört zur Familie der Steroidrezeptoren. Er übernimmt im Zusammenspiel mit weiteren Rezeptoren die Aufgabe, die Transkription von über 200 Genen zu regulieren (Gröber et al. 2013). Zusätzlich spielt Vitamin D eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase (Ooi et al. 2013). Daraus ergibt sich, dass neben einem Mangel an Vitamin D auch Störungen des Vitamin D-Rezeptors zu einer intestinalen Dysbalance und somit zu Entzündungsprozessen im Darm führen können.

Die benötigte Tagesmenge von Vitamin D ist abhängig vom Alter. So steigt mit dem Lebensalter auch die benötigte tägliche Vitamin D Menge an. Des Weiteren ist im Alter auch ein Anstieg der täglichen Höchstmenge, die zugeführt werden darf, zu verzeichnen (Ross 2011).

Über die optimale Höhe des Vitamin D-Spiegel gibt es in der Literatur bisher keinen eindeutigen Konsens, wobei zumeist ein Bereich zwischen 75 bis 150 nmol/l angegeben wird (Holick 2007).

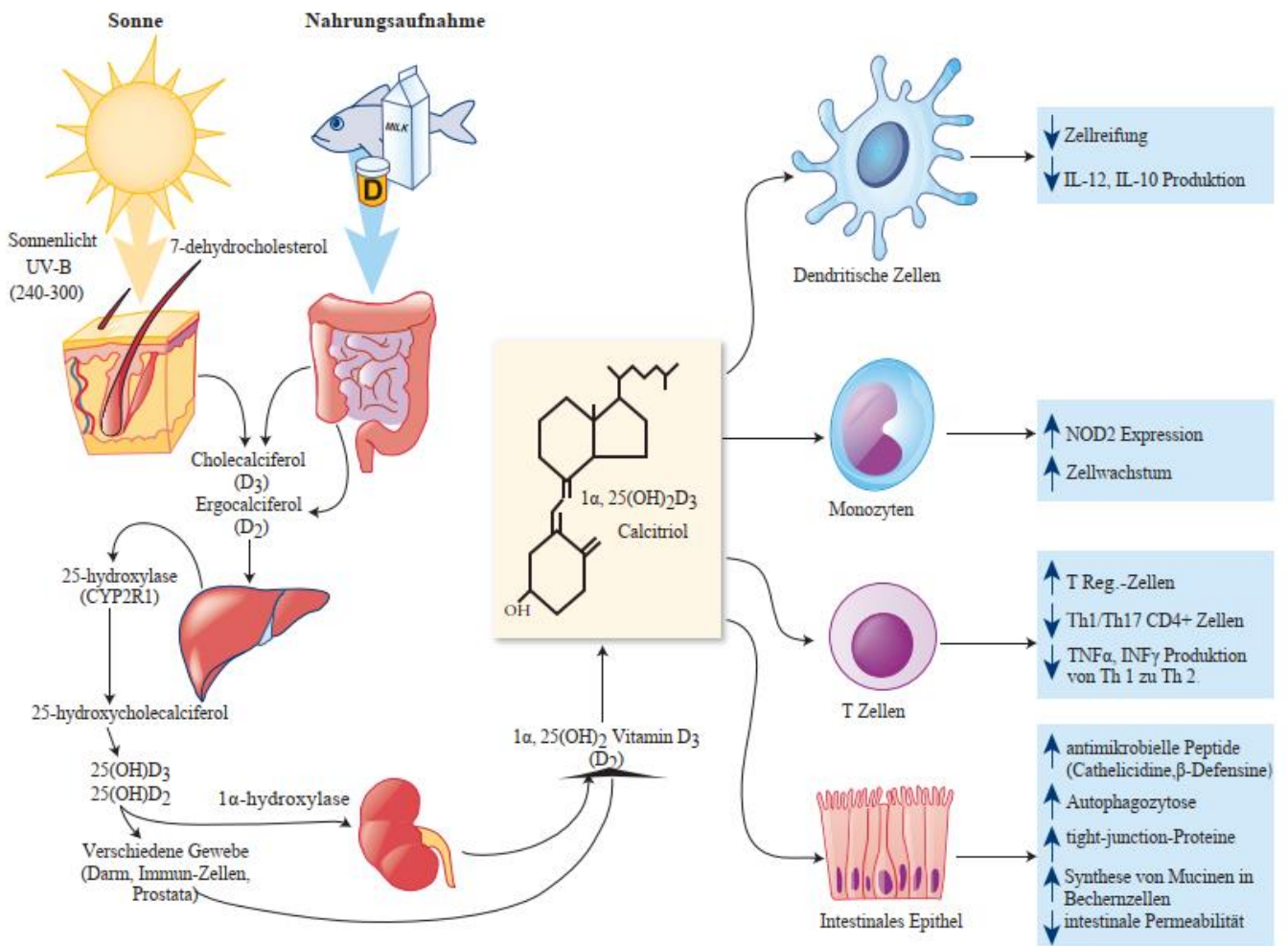


Abbildung 2: Vitamin D-Quellen, Metabolismus und Effekte nach (Hlavaty et al. 2015)
(Mit freundlicher Genehmigung des Autors)

Darstellung der Synthese sowie des Metabolismus von Vitamin D.

Nach der Vitamin D Aufnahme über die Nahrung oder Kontakt der Haut mit UV-B-Strahlen erfolgt ein erster Hydroxylierungsschritt in der Leber. Anschließend erfolgt über den Blutkreislauf der Transport zur Niere, wo eine erneute Hydroxylierung stattfindet. Der aktive Metabolit interagiert an verschiedenen Zielzellen, wo je nach Gewebe unterschiedliche Regulations- und Syntheseprozesse beeinflusst werden.

1.5 Zusammenhang zwischen Vitamin D und CED

Verschiedene Studien legten einen möglichen Zusammenhang zwischen einem Vitamin D-Mangel und der Krankheitsentstehung bzw. dem Krankheitsverlauf bei Patienten mit CED nahe (Mouli und Ananthkrishnan 2014). Unter anderem konnte gezeigt werden, dass es regionale Unterschiede in der Prävalenz eines Vitamin D-Mangels gibt. Je geringer die Sonnenlicht-Exposition ist, desto höher ist die Inzidenz für einen Vitamin D Mangel. Somit ist die Entfernung vom Äquator bzw. ein höherer Breitengrad ein Faktor in der Entstehung eines Vitamin D-Mangels, konkordant hierzu gibt es auch eine Zunahme der Inzidenz von CED je höher der Breitengrad wird (Khalili et al. 2012a).

Vitamin D ist weiterhin am Schutz der intestinalen Mukosa beteiligt, indem es in die Regulierung von „Tight-Junction“-Proteinen, wie „Claudin-2“-Kanälen eingreift. Studien haben hierbei gezeigt, dass es bei Patienten mit M. Crohn zu einer vermehrten Expression von „Claudin-2“-Kanälen in der Darmmukosa kommt (Nielsen et al. 2018). Vitamin D ist hierbei ein inhibierender Faktor bei der Transkription der Gene für den Claudin-2-Kanal. Bei einem Mangel an Vitamin D kommt es dementsprechend auch zu einer größeren Expression und gleichzeitig einer Störung der intestinalen Barriere. Im Zusammenhang mit der Darmmukosa hat Vitamin D weiterhin die Funktion regulierend in die Freisetzung antimikrobieller Peptide einzugreifen, sowie die Abwehrfunktion von T-Lymphozyten zu verbessern (Nielsen et al. 2018).

Darüber hinaus scheint Vitamin D-Mangel multiple Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf von CED-Patienten zu haben: Niedrige Vitamin D-Werte bei Patienten mit M. Crohn führten zu depressiven Verstimmungen (Wilkins et al. 2006), zum häufigeren Auftreten von Osteoporose (van den Bergh et al. 2011) sowie einer höheren Anzahl chirurgischer Interventionen (Ananthkrishnan et al. 2013). Hohe Vitamin D-Werte hingegen scheinen einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf des M. Crohn zu haben (Yang et al. 2013). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass jedoch nur ca. 21 % der Patienten mit M. Crohn einen normalen Vitamin D-Wert aufwiesen (Dumitrescu et al. 2014).

Eine Studie, welche den Effekt einer Vitamin D-Gabe auf den Krankheitsverlauf von CED-Patienten untersuchte, konnte zeigen, dass durch eine Vitamin D-Substitution eine signifikante Reduktion der Krankheitsaktivität - gemessen am CDAI erreicht -

werden konnte (Yang et al. 2013). Im Umkehrschluss konnte in einer Querschnittsstudie ebenso nachgewiesen werden, dass niedrige Vitamin D-Spiegel mit einer aktiven Krankheitsphase von CED korrelieren (Castro et al. 2015). Demgegenüber steht eine Studie von Reich et al. 2016, welche zeigen konnte, dass Patienten, welche eine Biologika-Therapie mit Infliximab erhielten, von niedrigeren Vitamin D-Spiegeln profitieren. So wiesen Patienten mit Vitamin D-Mangel eine höhere Rate klinischer Remission auf als solche mit normalen Vitamin D-Spiegeln.

Weiterhin konnte eine Metaanalyse zeigen, dass bei M. Crohn -Patienten am häufigsten das terminale Ileum, die primäre Lokalisation der Vitamin D-Resorption, betroffen ist (Shi et al. 2021). Die durch entzündliche Prozesse verminderte Resorption könnte wiederum einen Vitamin D-Mangel initiieren bzw. eine schon bestehenden Vitamin D-Mangel aggravieren (Shi et al. 2021). Ob ein Vitamin D-Mangel somit die Entstehung einer CED begünstigt oder im Verlauf der Erkrankung als Begleiterscheinung zutage tritt, kann zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt werden (Yang et al. 2013).

In der aktuellen deutschen Leitlinie „*Diagnostik und Therapie des M. Crohn*“ wird der Zusammenhang zwischen CED und Vitamin D mehrfach angeführt. So wird empfohlen, bei akuten Schüben bzw. Risikosituationen im Verlauf neben den standardmäßigen Verlaufsparemtern weiterhin den Vitamin D-Spiegel zu erheben. Ein laborchemisch nachgewiesener Mangel soll korrigiert werden (Sturm et al. 2022b).

1.6 Krankheitsverlauf des M. Crohn

1.6.1 Klinik

Neben dem terminalen Ileum als Hauptlokalisationsort (50 %) (Crohn et al. 1932), können auch das Ileokolon (41 %), der Dünndarm (28,6 %), das Kolon (27 %) sowie weitere Abschnitte des Gastrointestinaltraktes betroffen sein (Farmer et al. 1975). Zur Einteilung der Erkrankung wird die Montreal-Klassifikation genutzt, bei welcher eine Einteilung nach dem Alter bei Erstdiagnose, der Hauptlokalisierung und dem Krankheitsverhalten (nicht-strikturierende, nicht-penetrierende (B1), strikturierende (B2) und penetrierende-fistulierende (B3) Verlaufsform) erfolgt. Die Symptomatik, welche sich in Form von Bauchschmerzen, Durchfall, Fieber und Gewichtsverlust

äußert, ist abhängig vom Schweregrad der Entzündung, dem Befallsmuster sowie weiteren Krankheitskomplikationen. Zur Verlaufsbeurteilung haben sich vor allem der Harvey-Bradshaw-Index(HBI) (Harvey und Bradshaw 1980) sowie der CDAI nach Best (Best et al. 1976) etabliert.

Tabelle 2:Berechnung des HBI nach Harvey und Bradshaw 1980

Klinische Parameter	Bewertung
Allgemeinbefinden	0: gut, 1: beeinträchtigt, 2: schlecht, 3: sehr schlecht, 4: unerträglich
Abdominelle Schmerzen	0: keine, 1: leicht, 2: mittel, 3: schwer
Diarrhoe	Pro Stuhlgang 1 Punkt
Abdominelle Resistenzen	0: keine, 1: fraglich, 2: sicher, 3: sicher sowie schmerzhaft
Komplikationen	Pro Komplikation 1 Punkt: Abszess, Fistel, Analfissur, orale Aphthen, Arthralgie, Uveitis, Iritis, Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum

1.6.2 Komplikationen

Patienten, welche an M. Crohn erkrankt sind, können im Krankheitsverlauf eine Reihe von Komplikationen entwickeln, wobei sich große individuelle Unterschiede in der Ausprägung darstellen. Es werden intestinale von extraintestinalen Komplikationen unterschieden.

1.6.2.1 Intestinale Komplikationen

Da der M. Crohn durch eine transmurale Entzündung der Darmwand gekennzeichnet ist, kann es zu tiefergehenden intestinalen Schädigungen kommen. Zu den wichtigsten intestinalen Komplikationen zählen Fisteln, Fissuren, Abszesse, Strikturen sowie Organperforationen. (Preiß et al. 2014).

Fisteln können an unterschiedlichen Abschnitten des Darms auftreten und sowohl Verbindungen innerhalb des Verdauungstraktes als auch zu anderen Organsystemen bilden. Je nach Lokalisation werden sie als entero-enterische, entero-kutane, entero-vesikale, entero-vaginale oder retroperitoneale Fisteln bezeichnet (Schwartz et al. 2002). Eine wichtige Rolle spielen perianale Fisteln, welche bei etwa 20-40 % aller M. Crohn-Patienten auftreten und aufgrund des teilweise sehr verzweigten Fistel-Systems mitunter schwierig zu behandeln sein können (Steinberg et al. 1973). Auch die Erkrankungsdauer spielt hierbei eine wesentliche Rolle, da mit der Dauer der Erkrankung auch eine Zunahme der Häufigkeit von Fisteln zu verzeichnen ist. So liegt die kumulative Häufigkeit von Fisteln 1 Jahr nach Diagnosestellung bei 12 %, während sie nach 20 Jahren Erkrankungsdauer bei 26 % liegt (Schwartz et al. 2002). Für symptomatische Fisteln gibt es verschiedene therapeutische Behandlungsansätze, welche eine interdisziplinäre Zusammenarbeit verschiedener Fachrichtungen erforderlich machen. Als erste therapeutische Option steht die Gabe von Antibiotika wie Metronidazol bzw. Ciprofloxacin im Vordergrund. Bei Nichtansprechen werden Azathioprin bzw. 6-Mercaptopurin sowie Infliximab als weitere Therapieoptionen eingesetzt. In den meisten Fällen kommt es jedoch früher oder später zu einer chirurgischen Intervention (Hoffmann et al. 2008).

Weitere intestinale Komplikationen sind u.a. Stenosen. Hierbei muss zwischen entzündlichen und narbigen Stenosen differenziert werden. Die Behandlung der entzündlichen Veränderungen erfolgt in erster Linie konservativ durch entzündungshemmende Therapie. Durch die schubweise wiederkehrende Entzündung kann es jedoch im Laufe der Zeit auch zu narbigen Stenosierungen kommen. Hier ist dann eine chirurgische bzw. auch endoskopische Intervention der im Vordergrund stehende Behandlungsansatz (Stange et al. 2006; Preiß et al. 2014).

1.6.2.2 Extraintestinale Manifestationen

Neben den intestinalen Komplikationen treten bei etwa 30 % aller Patienten mit M. Crohn auch extraintestinale Manifestationen auf. Männer und Frauen sind hierbei gleichermaßen betroffen (Rothfuss et al. 2006). Mit 20-30% sind Gelenkmanifestationen die am häufigsten auftretenden extraintestinalen Komplikationen. Die Gelenkmanifestationen werden zu den seronegativen Spondyloarthritiden gezählt. Eine weitere wichtige Rolle spielen die Hautmanifestationen, hier sind vor allem das Erythema nodosum sowie das Pyoderma gangraenosum von Bedeutung. Hautmanifestationen gehen meist mit einem akuten Schub des M. Crohn einher. Neben den oben genannten Organsystemen, ist selten eine Manifestation auch in weiteren Organen, wie Herz, Lunge und der Leber möglich (Hoffmann et al. 2008; Rothfuss et al. 2006).

1.7 Diagnostik

Die Diagnostik eines M. Crohn setzt sich aus einer ausführlichen Anamnese, körperlicher Untersuchung, laborchemischer und mikrobiologischer Diagnostik und verschiedenen bildgebenden Verfahren zusammen. Ein Goldstandard in der Diagnostik der CED existiert nicht (Vetter und Neurath 2018).

Die bildgebenden Verfahren spielen bei der Erstdiagnostik, bei Verlaufskontrollen sowie beim akuten Schub eine wichtige Rolle. Hierbei werden sowohl Darmsonographien, Magnetresonanztomographie (MRT)-Untersuchungen sowie Endoskopien, welche mit histologischer Aufarbeitung von bioptischem Material ergänzt werden, durchgeführt. Gleichzeitig bilden die Daten aus diesen Untersuchungen eine Grundlage zur Unterscheidung eines M. Crohn und einer CU, welche allein aus klinischer Symptomatik nicht sicher erfolgen kann. Spezifische laborchemische Parameter für eine CED gibt es nicht, dennoch können auffällige Erhöhungen des C-reaktiven Protein, eine Erhöhung der Blutsenkungsgeschwindigkeit als auch eine Hypoalbuminämie hilfreich für die Diagnosestellung sein. Des Weiteren kann auch eine nicht anderweitig begründete Anämie, gekennzeichnet durch einen verminderten Hämoglobin-Wert, ein laborchemisches Indiz sein (Preiß et al. 2014).

1.8 Therapie

Die Therapie des Morbus Crohn ist sehr vielseitig, jedoch stellen weder medikamentöse noch chirurgische Maßnahmen eine kausale Therapie des M. Crohn dar. Ziel der Therapie ist somit die Remission, in welcher der Patient kaum bzw. keine Symptome der Erkrankung zeigt. Ebenfalls spielt hier die Lebensqualität der Patienten und eine Prophylaxe von Langzeitschäden eine wichtige Rolle. Die Therapie ist an das aktuelle Befalls-Muster, das Alter, die Krankheitsaktivität, potentielle Mangelzustände sowie die Vormedikation anzupassen (Preiß; Preiß et al. 2014).

Die Therapie des M. Crohn wird unterteilt in eine Induktionstherapie sowie eine Erhaltungstherapie nach Erreichen der Remission (Vetter und Neurath 2018; Preiß et al. 2014). Im Folgenden sollen wichtige Medikamentengruppen und ihre wichtigsten Vertreter beschrieben werden.

1.8.1 Glukokortikoide

Glukokortikoide spielen eine wichtige Rolle in der Remissionsinduktion bei den CED. So konnte eine Studie zeigen, dass ca. 43 % aller Patienten mit M. Crohn im Laufe ihrer Erkrankung eine Behandlung mit Glukokortikoiden erhalten (Faubion et al. 2001). Glukokortikoide zählen zu den Steroidhormonen und werden, in Form von Cortison bzw. Cortisol, endogen in der Nebennierenrinde gebildet. Zu den wichtigen Funktionen zählen eine katabole Stoffwechselwirkung, sowie eine antiinflammatorische Wirkung. Die wichtigsten Vertreter der Glukokortikoide sind Prednisolon, Hydrocortison, Dexamethason, Methylprednisolon, sowie das Betamethason (Shepherd et al. 1986). Die Dosierung erfolgt individuell je nach Krankheits- bzw. Entzündungsaktivität (Baumgart und Sandborn 2007). Die Gabe von Glukokortikoiden kann systemisch oder topisch erfolgen.

Glukokortikoide weisen ein breites Spektrum an Nebenwirkungen auf, weswegen sie nur zur Remissionsinduktion, nicht jedoch für eine Dauerbehandlung empfohlen werden (Fischer et al. 2018). Als Nebenwirkungen können vor allem Osteoporose, arterielle Hypertonie, Hautatrophien, Ulcera, sowie ein Glukokortikoid-induzierter Diabetes mellitus auftreten (Fischer et al. 2018).

1.8.2 Immunsuppressiva

Eine weitere wichtige Gruppe verschiedener Medikamente zur Behandlung des M. Crohn sind Immunsuppressiva. Hierzu zählen das Azathioprin sowie das 6-Mercaptopurin (6-MP), welche beide als Antimetaboliten in die DNA eingebaut werden. Hier kommt es zu einer Hemmung der Zellproliferation und Genaktivierung. Somit vermindern sie die Proliferationsrate von Immunzellen, was zu einer abgeschwächten Immunantwort führt. (Herrlinger und Stange 2000). Azathioprin und das in der Leber daraus gebildete 6-MP müssen erst zu ihrem aktiven Metaboliten 6-Thioguaninnukleotid umgewandelt werden, was jedoch mehrere Monate dauern kann. Deshalb sind sie zur alleinigen Remissionsinduktion nicht geeignet (Baumgart und Sandborn 2007). Aufgrund von potentiellen Nebenwirkungen erfolgt die Gabe von Azathioprin in der Regel zunächst einschleichend und wird im Verlauf gesteigert bis die optimale Dosis von 2,0 -2,5 mg/kg Körpergewicht erreicht ist (Fraser et al. 2002). Zu den Nebenwirkungen zählen allergische Reaktionen, eine Pankreatitis, Knochenmarksdepression, sowie ein erhöhtes Infektions- und Malignom-Risiko. Trotz dieser Nebenwirkungen vertragen etwa 85-90 % der Patienten das Medikament gut (Herrlinger und Stange 2000).

Ein weiteres Medikament aus der Gruppe der Immunsuppressiva ist Methotrexat (MTX). MTX ist ein Purinanalogon und inhibiert die Dihydrofolatreduktase, woraus sich die antiproliferative Wirkung erklärt (Fraser 2003). Die initiale Dosierung beträgt 25 mg/Woche und kann im Verlauf nach Erreichen eines „steady state“ nach etwa 8 Wochen auf 15-20 mg/Woche gesenkt werden (Baumgart und Sandborn 2007). Häufig auftretende Nebenwirkungen betreffen vor allem den Gastrointestinaltrakt, sodass Patienten über Übelkeit, Erbrechen, Durchfall sowie Entzündungen der Mundschleimhaut klagen. Um dem entgegenzuwirken, erfolgt 1-2 Tage nach MTX-Zufuhr die Gabe von 5 mg Folsäure, welche die Nebenwirkungen bei gleichbleibender Wirksamkeit des MTX verringert (Harten 2005).

1.8.3 Aminosalizylate

Bei leichter Krankheitsaktivität ist beim M. Crohn die Gabe von Aminosalizylaten möglich. Vertreter der auch 5-ASA-Präparate genannten Medikamentengruppe sind

z. B. Mesalazin oder Sulfasalazin. Die Gabe von 5-ASA-Präparaten kann sowohl oral in Form von magensaftresistenten Tabletten als auch topisch, z. B. als Rektal-Klysmen bzw. -Schaum erfolgen. Bei M. Crohn spielen 5-ASA-Präparate, im Gegensatz zur Colitis Ulcerosa, jedoch nur eine untergeordnete Rolle (Kucharzik et al. 2019; Preiß et al. 2014).

1.8.4 Biologika

Eine weitere wichtige Medikamentengruppe stellen die sogenannten Biologika dar. Hierbei handelt es sich um proteinerge Antikörper, welche in lebenden Zellen hergestellt werden. Infliximab als erster Vertreter dieser Gruppe, der bei der Behandlung des M. Crohn Verwendung fand (Sandborn und Hanauer 2002), gehört zu den Tumornekrosefaktor-alpha-Inhibitoren (TNF- α -Inhibitoren). Bei den TNF- α -Inhibitoren handelt es sich um die am häufigsten eingesetzte Gruppe von Biologika beim M. Crohn, welche durch eine Blockade des Rezeptors für den Tumornekrosefaktor- α eine Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen reduzieren (Seminerio et al. 2013). Sie werden bei mittelschwerem bis schwerem Verlauf zur Remissionsinduktion, der Remissionserhaltung bzw. bei Unverträglichkeiten von Immunsuppressiva sowie steroidabhängigem Verlauf eingesetzt (Hoffmann et al. 2008). Infliximab zeigt eine hohe Effektivität in der Behandlung des M. Crohn, sodass bei 70 % der Patienten mit steroidrefraktärem Verlauf eine Remission erreicht werden kann (Sandborn und Hanauer 2002). Mittlerweile wird bereits ein frühzeitiger Einsatz von TNF- α -Inhibitoren diskutiert, um Spätkomplikationen wie Malnutrition bzw. das Kurzdarmsyndrom zu vermeiden (Preiß et al. 2014).

Weitere Vertreter der TNF- α -Inhibitoren sind Adalimumab und Certolizumab (letzteres in Deutschland nicht zugelassen) sowie Golimumab, welches jedoch in Deutschland nur für die Therapie der CU zugelassen ist (Kucharzik et al. 2019).

Bei Adalimumab handelt es sich um einen humanen monoklonalen Antikörper gegen TNF- α , welcher sich sowohl in der Remissionsinduktion als auch -erhaltung bewährt hat. Vor allem bei Patienten mit moderater Krankheitsaktivität konnte unter Gabe von Adalimumab eine verminderte Hospitalisierung, eine Stabilisierung der Remission, die

Ausheilung von Fisteln sowie eine enorme Verbesserung der Lebensqualität gezeigt werden (Sandborn et al. 2012).

Nebenwirkungen von TNF- α -Inhibitoren werden vor allem durch die Immunsuppression bestimmt. So kann es zum vermehrten Auftreten sonst latent verlaufender Krankheiten wie Sepsis, Pneumonie oder Tuberkulose kommen, weswegen z. B. vor jedem Therapiebeginn der Ausschluss einer Tuberkulose erfolgen sollte (Seminerio et al. 2013).

Neben den TNF- α -Inhibitoren existieren weitere Biologika wie das Ustekinumab, welches als monoklonaler Antikörper gegen die p40-Untereinheit von Interleukin-12 sowie Interleukin-23 gerichtet ist (Feagan et al. 2016). Ustekinumab kommt vor allem bei Patienten zum Einsatz, beim denen eine Remissions-Erhaltung weder durch TNF- α -Inhibitoren noch durch Immunsuppressiva erreicht werden konnte. Ein weiteres Biologikum ist das Vedolizumab, welches als Anti-Integrin die Leukozytenmigration hemmt und somit die mukosale Entzündung vermindern kann (Colombel et al. 2017). In den letzten Jahren wurden an weiteren Therapieansätzen, wie z. B. Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptormodulatoren, geforscht. Sphingosin-1-Phosphat ist ein bioaktives Lipid, welches als Signalmolekül vielfältige Funktionen übernimmt und die Immigration von Lymphozyten in entzündete Gewebe fördert (Aoki et al. 2016). So konnte gezeigt werden, dass bei mittelschweren bis schweren Verläufen die additive Gabe von Ozanimod zu einer signifikanten Verringerung der Krankheitsaktivität sowie längerer Remission führt (Misselwitz und Senn 2022).

Ein weiterer Ansatz ist die Verabreichung von Jak-Inhibitoren wie Tofacitinib, welche zu einer signifikanten Abnahme der Stuhlfrequenz sowie des rektalen Blutabganges führte und so als ergänzende immunmodulierende Therapie im Einzelfall zur Anwendung kommt (Lohan et al. 2019).

1.8.5 Chirurgische Therapie

Die chirurgische Intervention nimmt neben der medikamentösen Therapie eine wichtige Rolle in der Behandlung des M. Crohn ein (Hoffmann et al. 2008). Bis zu 70 % aller Patienten müssen sich innerhalb der ersten 10 Jahre nach Diagnosestellung einer Operation unterziehen, wobei bei etwa 44 % eine Re-Operation erforderlich ist (Bernell et al. 2000). Hierbei steht vor allem die Behandlung der im Kapitel 1.6.2

genannten Komplikationen im Vordergrund, da es bis jetzt, im Gegensatz zur CU, keinen kurativen Therapieansatz beim M. Crohn gibt (Baumgart und Sandborn 2007). Je nach Ausmaß und Lokalisation kommen verschiedene operative Eingriffe in Betracht, wobei segmentparende Darmresektionen, langstreckigen Resektionen vorgezogen werden sollen (Heuman et al. 1983). Vor allem Patienten mit einem Dünndarmbefall bzw. im Ileozökum lokalisiertem M. Crohn sind besonders häufig von Resektionen betroffen (Bernell et al. 2000). Perianale Fisteln gehören ebenfalls zu den häufigsten Operationsindikationen (Hoffmann et al. 2008). Daneben stellen Abszesse im Perineum eine akute Operationsindikation dar. Sollte es zu therapierefraktären Fisteln bzw. schwerem anorektalen Fistelbefall kommen, kann als Ultima Ratio eine permanente Stoma-Anlage erfolgen. Dies wird v. a. bei Inkontinenz und damit einhergehender Lebensqualitätseinschränkung durchgeführt. Die Anlage eines temporären Stomas ist bei perianalen Fisteln möglich, um die Wundheilung zu unterstützen (Ommer et al. 2017).

Stenosen stellen ebenfalls wichtigen Teil der Indikation für eine chirurgische Intervention dar. Hierbei wird bei kurzstreckigen Stenosen (unter 5 cm) der Versuch einer Ballondilatation unternommen, während bei langstreckigen Stenosen eine laparoskopische Segmentresektion erfolgen kann (Preiß et al. 2014).

II. Thesen

1. Die Pathogenese des M. Crohn ist multifaktoriell.
2. Als ein wichtiger genetischer Risikofaktor der Pathogenese werden Mutationen im *NOD2*-Gen beschrieben.
3. Eine Vitamin D-Substitution führt zu einem Anstieg des 25-OH-Vitamin D-Spiegels im Blut.
4. Vitamin D-Substitution führt zu einer Reduzierung der Krankheitsaktivität bei M. Crohn Patienten gemessen am Crohn Disease Activity Index.
5. Unter Vitamin D-Substitution kommt es zu einer Veränderung der Abundanzen einzelner Bakterienstämme.
6. Die bakterielle Zusammensetzung des Mikrobioms hat einen Effekt auf die Krankheitsaktivität.

III. Fragestellung

In den letzten Jahren kam es sowohl zu einer Zunahme der Inzidenz des M. Crohn als auch des Vitamin D-Mangels. Ob jedoch ein Vitamin D-Mangel Einfluss auf die Entstehung eines M. Crohn hat, ist bis heute trotz intensiver Forschungsarbeiten noch nicht geklärt.

In dieser Arbeit wurde an einem singulären norddeutschen CED-Zentrum eine Fall-Kontroll-studie durchgeführt, in welcher unter Vitamin D-Substitution 7 an M. Crohn erkrankte Patienten sowie 10 gesunden Probanden hinsichtlich der bakteriellen intestinalen Zusammensetzung betrachtet wurden. Hierzu wurde nur Studienteilnehmer berücksichtigt, welche einen Vitamin D-Mangel aufwiesen.

Während des Studienverlauf erhielten alle Teilnehmer eine hochdosierte Vitamin D-Substitution, der Vitamin D Spiegel wurde engmaschig bestimmt. Es wurde nun unter Vitamin D Substitution untersucht, ob es zu Veränderungen der intestinalen bakteriellen Zusammensetzung in Form veränderter Abundanzen einzelner Bakterienstämme kommt. Die Untersuchung der intestinalen bakteriellen Zusammensetzung unter Vitamin D Substitution erfolgte an definierten Zeitpunkten mittels Stuhlprobe über ein Next Generation Sequencing ab.

Es wurde darüber hinaus geprüft werden, inwieweit eine hochdosierte Gabe von Vitamin D einen Einfluss auf die Krankheitsaktivität bei M. Crohn Patienten, gemessen an klinischen Scores wie dem Crohn´s Disease Activity Index (CDAI) und dem Harvey-Bradshaw Index (HBI), als auch auf laborchemische Parameter wie Calprotectin, nimmt.

IV. Material und Methoden

4.1 Studiendesign

In dieser Arbeit wurde an einem singulären norddeutschen CED-Zentrum, der Universitätsmedizin Rostock, eine Fall-Kontroll-Studie durchgeführt, welche den Einfluss einer Vitamin D-Substitution auf die intestinale bakterielle Zusammensetzung untersucht. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Rostock genehmigt (A 2016-0109).

Sämtliche Teilnehmer wurden in vollem Umfang über die Studie aufgeklärt und zeigten sich schriftlich einverstanden. Sieben PatientInnen mit ileokolonischem M. Crohn (Montreal Klassifikation L3) sowie einem begleitenden Vitamin D-Mangel wurden über die gastroenterologischen Ambulanz der Universitätsmedizin Rostock für die Untersuchungsgruppe rekrutiert.

Sämtliche Patienten waren in klinischer Remission und hatten in den letzten 6 Monaten keine Veränderungen ihrer medikamentösen Therapie.

Des Weiteren wurden 10 gesunde Probanden mit Vitamin D-Mangel unter den Studenten der Medizinischen Fakultät der Universitätsmedizin Rostock für die Kontrollgruppe rekrutiert. Abgesehen vom Vitamin D-Mangel waren sämtlichen Probanden ohne Vorerkrankungen und jedwede medikamentöse Behandlung.

Bei beiden Gruppen, sowohl den Patienten mit M. Crohn als auch den gesunden Probanden, erfolgte die Bestimmung eines Vitamin D-Spiegels im Blut sowie bei den M. Crohn-Patienten der Calprotectin-Spiegel aus einer Stuhlprobe zu Beginn der Studie. Ab diesem Zeitpunkt erhielten sämtliche Studienteilnehmer eine orale Vitamin D-Substitution mit Vitamin D 20.000 I.E. für 3 Tage. Nach Ablauf der drei Tage wurde die Substitution auf 20.000 I.E. alle 2 Tage reduziert für insgesamt vier Wochen weitergeführt. Die Zielwerte des Vitamin D-Spiegels lagen zwischen 100-150 nmol/L und es erfolgte eine wöchentliche Kontrolle der 25-OH-Vitamin D-Spiegel bei unverändertem Substitutionsschema sowie eine wöchentliche Stuhlprobenabnahme zur Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung. Insgesamt erhielt jeder Teilnehmer im Verlauf der Studie somit 300.000 I.E. Vitamin D. Der Calprotectin-Spiegel wurde bei den Patienten mit M. Crohn vor Beginn und am Ende der vierwöchigen Substitution bestimmt. Weiterhin wurde von jedem M. Crohn Patienten ein CDAI-Wert bei Beginn und Ende der Studie zu Beurteilung der Krankheitsaktivität ermittelt. Über den

Studienzeitraum wurden insgesamt 85 Blutproben entnommen, welche sich aus 50 Probanden- und 35 Patientenproben zusammensetzten. Des Weiteren wurden 85 Stuhlproben, die ebenfalls im Verhältnis 50 zu 35 auf die Untersuchungs- und Kontrollgruppe aufgeteilt waren.

Die Blutentnahme erfolgte sowohl bei Patienten als auch bei Probanden unter standardisierten klinischen Abläufen auf der gastroenterologischen Station sowie der gastroenterologischen Ambulanz der Universitätsmedizin Rostock. Das Blut wurde in 7,5 ml großen EDTA-Blut Röhrchen entnommen und dem Zentrallabor der Universitätsmedizin zugeführt. Hier erfolgte dann auch die Ermittlung des Vitamin D-Spiegels. Zusätzlich wurde im gastroenterologischen Forschungslabor das Vorliegen von Mutationen im *NOD2*-Gen bei den Patienten untersucht.

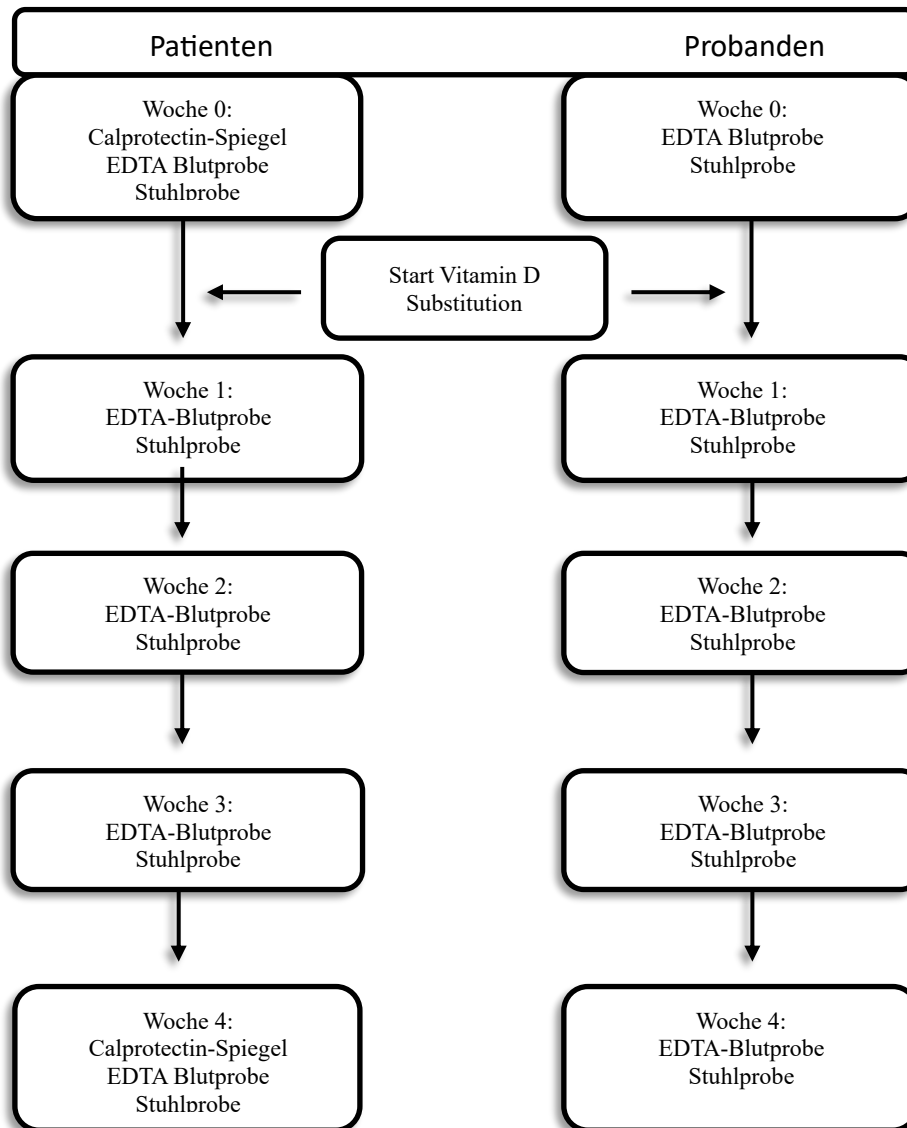


Abbildung 3: Studiendesign und Ablauf der Probenentnahme

Die Stuhlprobenentnahme führten die Studienteilnehmer am Tag des Abgabedatums morgens in der Häuslichkeit durch. Die Stuhlproben der Untersuchungsgruppe wurden unter Laborbedingungen auf zwei Stuhlröhrchen verteilt. Eines der Probenröhrchen wurde zur Ermittlung des Calprotectin an das Zentrallabor der Universitätsmedizin Rostock weitergeleitet. Aus dem anderen erfolgte die DNA-Extraktion zur Sequenzierung.

4.2 DNA-Isolierung

Zur Isolierung der DNA aus den Stuhlproben, wurde das „Stool Extraction Mini Kit“ der Firma QIAGEN GmbH, Hilden, Germany verwendet. Der verwendete Ablauf entsprach

dabei dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll: „Isolation of DNA from Stool for Pathogen Detection“ (QIAamp DNA Stool Handbook 06/2012, (QIAGEN GmbH)) welches im Kern folgende Schritte umfasst . Der Ablauf soll im Folgenden kurz zusammengefasst werden.

Zur optimalen Lagerung der Stuhlproben wurden diese nach Einwaage einer Menge von 180-220 mg in einem 2ml Tube auf -80 °C gekühlt.

Alle Proben wurden in Vorbereitung der DNA-Isolation schonend aufgetaut und mittels einem „stainless steel bead“ erfolgte eine Homogenisierung im Gewebetrenner.

Tabelle 3:Im DNA Stool Kit enthaltene Materialien

InhibitEX Tabletten	QIAGEN GMBH, Hilden,Germany
Puffer AL	QIAGEN GMBH, Hilden,Germany
Puffer AW1	QIAGEN GMBH, Hilden,Germany
PufferAW2	QIAGEN GMBH, Hilden,Germany
Puffer AE	QIAGEN GMBH, Hilden,Germany
Proteinkinase K	QIAGEN GMBH, Hilden,Germany
QIAamp-Spinsäule	QIAGEN GMBH, Hilden,Germany
Ethanol (96 -100 %)	QIAGEN GMBH, Hilden,Germany

Im nächsten Schritt erfolgte die Gabe von 1,4 ml Puffer ASL in das Mikroreaktionsgefäß mit anschließendem einminütigem Vortexen. Die so homogenisierte Probe wurde 5 min lang auf 70 °C erhitzt. Durch erneutes Vortexen für 15 s mit darauffolgender Zentrifugation bei 20.000 Umdrehungen für 1 Min., erfolgte die Bildung eines Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Vom darüberliegenden Überstand konnten 1,2 ml in ein neues 2 ml Mikroreaktionsgefäß übertragen werden, während der feste Rückstand in Form des Pellet verworfen wurde. Die entstandene Suspension musste nun von störenden PCR-Inhibitoren gereinigt werden. Dies geschah durch die Zugabe einer InhibitEX Tablette mit anschließendem einminütigem Vortexen sowie weiterer einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur.

Die in der InhibitEX Tablette enthaltene Matrix sorgt für eine Bindung der PCR-Inhibitoren und durch eine dreiminütige Zentrifugation bei 20.000 Umdrehungen erfolgte eine Abtrennung der an die Matrix gebundenen Substanzen. Der Überstand wurde wiederum in ein neues 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß übertragen und erneut 3 min bei 20.000 Umdrehungen zentrifugiert. Um störende Proteine in der Probe abzubauen wurden 15 µl Proteinkinase K in ein neues 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gegeben und im nächsten Schritt 200 µl des gelösten Überstandes hinzu pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl Puffer AL zur Suspension, welche daraufhin für 15 Sek. gevortext und 10 min bei 70 °C inkubiert wurde. Dies erfolgte, um einen weiteren Abbau von störenden Proteinen zu ermöglichen. Zur Fällung der DNA wurden 200 µl 96-100 % Ethanol zu der Probe hinzugegeben. Um eine optimale Durchmischung der Probe mit dem Ethanol gewährleisten zu können, wurde die Probe ca. 15 Sek. gevortext.

Das entstandene Lysat wurde auf ein QIAamp Spin Column übertragen und bei 20.000 Umdrehungen für 1min abzentrifugiert. Bei der QIAamp Spin Column handelt es sich um eine Aufreinigungssäule mit Silicagelmembran, welche dazu dient, die DNA an der Membran zu binden und restliche Bestandteile auszuwaschen. Das entstandene Filtrat wurde verworfen, während die QIAamp Spin Colum mit der darin an die Membran gebundenen DNA auf ein neues 2 ml Mikroreaktionsgefäß aufgesetzt wurde.

Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 500 µl Waschpuffer AW1 mit anschließender einminütiger Zentrifugation. Wiederum wurde das Filtrat verworfen und die Aufreinigungssäule auf ein neues 2 ml Mikroreaktionsgefäß gesetzt und das Filtrat verworfen. Nach Zugabe des Waschpuffers AW2 erfolgte die Zentrifugation bei 20.000 Umdrehungen für 3min und im Anschluss der Verwurf des Filtrats. Die QIAamp Spin Column wurde auf ein neues 2 ml Mikroreaktionsgefäß gesetzt und nochmals bei 20.000 Umdrehungen für 1 min zentrifugiert. Um die gereinigte DNA von der Membran der Aufreinigungssäule zu lösen, wurden 200 µl Elutionspuffer AE auf diese gegeben und anschließend 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch diese einminütige Inkubation und die darauffolgende einminütige Zentrifugation bei 20.000 Umdrehungen löste sich die DNA aus der Membran. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration.

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien für die DNA Stool Extraction

20 µl Pipette	Eppendorf, Hamburg, Germany
20 µl Pipettenspitze	Eppendorf, Hamburg, Germany
200 µl Pipette	Eppendorf, Hamburg, Germany
200 µl Pipettenspitze	Eppendorf, Hamburg, Germany
1.000 µl Pipette	Eppendorf, Hamburg, Germany
1.000 µl Pipettenspitze	Eppendorf, Hamburg, Germany
Mikroreaktionsgefäß 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Germany
Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Germany
Stuhlprobenröhrchen	Eppendorf, Hamburg, Germany

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch. Hierzu wurde eine Wellenlänge von 260 nmol/L verwendet. Die ermittelte DNA-Konzentration wurde im Anschluss mit destilliertem H₂O auf eine Konzentration von 5 ng/µl verdünnt. Sowohl die DNA-Probe als auch die Verdünnung auf 5 ng/µl wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren und gelagert.

Tabelle 5: Verwendete Gerätschaften für die DNA Stool Extraction

Vortex2X ³	Uniequip, Planegg, Germany
Biopsiegewebe Zertrümmerer	QIAGEN GMBH, Hilden, Germany
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, Germany
Inkubator DRI-Block DB	TECHNE, Staffordshire, United Kingdom

4.2.1 Vorbereitung von 16S- rRNA-Gen für die Sequenzierung mit dem Illumina MiSeq System

Für die Sequenzierung der DNA wurden Primer verwendet, die an die variablen V3 und V4 Regionen der 16S RNA-Gene binden (Klindworth et al. 2013a). Die Durchführung der Sequenzierung sowie das Hinzufügen der Illumina-Überhang-Adaptersequenzen zu den Locus-spezifischen Primern für die V3 und V4-Region, erfolgte nach dem „16S Metagenomic Sequencing Library Preparation“ Protokoll (www.illumina.com).

Die Isolierung und Aufreinigung der DNA, sowie die im Protokoll geforderte Normalisierung auf 5 ng/µl, wurden wie oben erläutert durchgeführt.

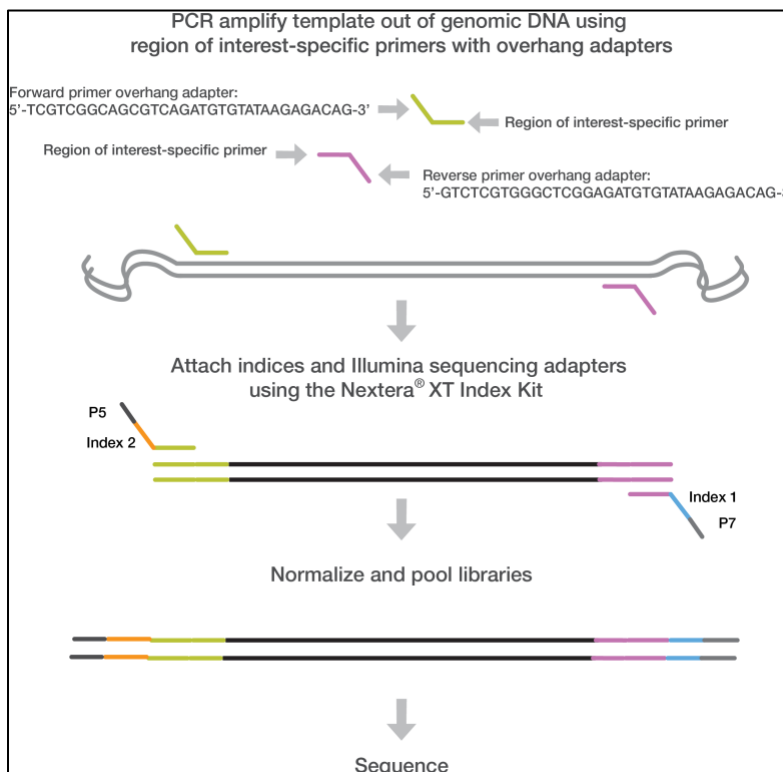


Abbildung 4:Arbeitsablauf des 16s V3 und V4 Amplicons (www.illumina.com)

Benutzerdefinierte Forward- und Reverse-Primer mit überhängenden Adaptern werden der komplementären Region angelagert, um eine Amplifizierung der Matrizen aus der genomischen DNA zu bewerkstelligen. Im nachfolgenden Amplifizierungsschritt werden Multiplexing Indices und Illumina Sequenzierungsadapter hinzugefügt. Die Bibliothek wird im normalisiert sowie gepoolt und daraufhin auf dem MiSeq-System mittels des v3 Kits sequenziert.

4.2.1.1 Ablauf

Nach der Normalisierung der DNA aus den Stuhlproben auf 5 ng/µl und Durchführung der Amplicon Polymerase-Chain-Reaction(PCR) erfolgte im Anschluss im Zuge eines Aufreinigungsprozesses eine Trennung der 16S-V3 und V4-Amplifikate von den Primern. Im weiteren Schritt der Index-PCR wurden Duale Indexe und Illumina Sequenzierungsadapter unter Verwendung des Nexera XT Index Kits an die Amplifikate gebunden. Um die Proben optimal auf die Quantifizierung vorzubereiten, folgte im Anschluss ein weiterer Aufreinigungsprozess. Bioanalyzer DNA 1.000 Chips und Qbit Kits wurden zur Quantität - und Qualitätskontrolle jeder Probe genutzt.

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien für die 16s Metagenomic Sequenzierung

Amplicon Forward Primer Bakt_341F (CCTACGGGNGGCWGCAG)	
Amplicon Reverse Primer Bakt_805R (GACTACHVGGGTATCTAATCC)	
KAPA Hifi Hotstart ReadyMix	KAPA Biosystems, Wilmington, USA
10 mM Tris pH 8,5	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ampure XP Beads	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
80 % Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nexera XT Index 1 Primers (N7XX) von dem Nexera XT Index kit	Illumina, San Diego, USA
Nexera XT Index 2 Primers (S5XX) von dem Nexera XT Index kit	Illumina, San Diego, USA
DNA-freies PCR Wasser	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hybridization Buffer HT 1	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

0,2 N NaOH	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PhiX Control Kit v3	Illumina, San Diego, USA
Microseal 'A' film	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Microseal 'B' film	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
96-well 0,2 ml PCR-Platte	Applied Biosystems, Foster City, USA
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Germany
10 µl Pipette	Eppendorf, Hamburg, Germany
10 µl Pipettenspitze	Eppendorf, Hamburg, Germany
20 µl Pipette	Eppendorf, Hamburg, Germany
20 µl Pipettenspitze	Eppendorf, Hamburg, Germany
200 µl Pipette	Eppendorf, Hamburg, Germany
200 µl Pipettenspitze	Eppendorf, Hamburg, Germany
1.000 µl Pipette	Eppendorf, Hamburg, Germany
1.000 µl Pipettenspitze	Eppendorf, Hamburg, Germany

4.2.1.2 Durchführung

1. Amplikon PCR

Auf der im Kit enthaltenen 96 Well 0,2 ml PCR-Platte wurden pro Well 2,5 µl der auf 5 ng/ml normalisierten DNA mit jeweils 5 µl sowohl des Amplikon-PCR-Forward-Primers (1 µM) und des Amplikon-PCR-Reverse-Primers (1 µM) sowie 12,5 µl aus 2xKAPA Hifi Hotstart ReadyMix zu einem Gesamtvolumen von 25 µl zusammengeführt. Im Anschluss erfolgte die Versiegelung der PCR-Platte mit einer Microseal A Folie und die Durchführung der PCR im ABI Prism 7000 Real Time PCR Instrument. Im Thermocycler erfolgte die Einstellung des Programms, sodass zuerst eine Erhitzung

auf 95 °C für 3 min stattfand. Gefolgt wurden diese von 25 Zyklen bestehend aus 95 °C, 55 °C und 72°C für jeweils 30 Sek. sowie anschließende 72 °C für 5 min. Im Anschluss wurde die PCR-Platte auf 4 °C abgekühlt. Mittels des Bioanalyzer-DNA-1.000-Chip erfolgte eine Kontrolle der Größe der DNA-Abschnitte. Die erwartete Amplikon-Größe von 550 bp konnte verifiziert werden.

2. PCR Aufreinigung

Zur Vorbereitung der Aufreinigung der Amplikons von den Primern, wurden die Ampure XP Beads auf Raumtemperatur gebracht. Dann erfolgte die Zentrifugierung der PCR-Platte bei 20 °C und 1.000 Umdrehungen für 1 min. Die Ampure XP Beads wurden für 30 Sek gevortext und anschließend in jedes Well der Amplikon PCR-Platte 20 µl der Beads gegeben. Durch 10-maliges hoch- und -runter-Pipettieren erfolgte eine optimale Durchmischung der Beads mit dem Amplifikat. Nach fünfminütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Amplicon PCR-Platte auf einen Magnetständer gestellt, bis sich ein Überstand bildete, welcher abpipettiert und verworfen wurde. Im weiteren Verlauf wurden 200 µl 80%iges Ethanol in jedes Well gegeben und für 30 Sek bei Raumtemperatur auf dem Magnetständer inkubiert. Der sich bildende klare Überstand wurde wiederum abpipettiert und verworfen. Nun erfolgte dieser Reinigungsschritt mit 200 µl 80%igen Ethanols ein weiteres Mal. Nach diesem wurde die Amplicon PCR-Platte auf dem Magnetständer belassen und die Beads bei Raumtemperatur für 10 min luftgetrocknet. Daraufhin konnte die Amplikon PCR-Platte vom Magnetständer heruntergenommen und in jedes der Wells 52,5 µl 10mM Tris pH 8,5 Puffer gegeben werden, welcher im Anschluss durch 10-maliges hoch- und -runter-Pipettieren mit den Beads vermischt wurde. Es folgte eine Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur. Wiederum wurde die Platte daraufhin auf dem Magnetständer platziert, bis sich erneut ein klarer Überstand gebildet hatte, welcher aus von Primern gereinigter DNA bestand. Im Anschluss erfolgte die Übertragung von 50 µl dieses Überstandes auf eine neue 96-Well PCR-Platte.

3. Index PCR

Von den 50 µl gereinigter DNA wurden 5 µl auf eine neue 96 Wells-Platte überführt. Im weiteren Verlauf erfolgte die Zugabe von 5 µl des Nextera XT Index Primers 1 sowie des Nextera XT Index Primers 2. Dies erfolgte, um die dual indices und Illumina-Sequencing-Adapter hinzuzufügen. Gefolgt wurde dies durch die Zugabe von 25 µl des 2x KAPA HIFI HotStart Ready Mix sowie 10 µl PCR-Wasser, womit sich das Volumen in jedem Well auf 50 µl erhöhte. Im Anschluss wurde durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren eine optimale Durchmischung der Amplifikate erreicht und die PCR-Platte daraufhin mit Microseal A Folie abgedeckt. Es erfolgte nun die 1-minütige Zentrifugation bei 20 °C und 1.000 Umdrehungen. Anschließend wurde die PCR durchgeführt, wobei folgende Einstellungen im Thermocycler eingestellt wurden: 95 °C für 3 min gefolgt von 8 Zyklen zu jeweils 95 °C, 55 °C und 72 °C für 30 Sek, sowie weiteren 5 min bei 72 °C. Danach wurde die PCR-Platte auf 4 °C heruntergekühlt.

4. PCR-Aufreinigung 2

Die Platte wurde nun mit 280 Umdrehungen bei 20 °C für 1 min zentrifugiert. Nach 30-sekündigem Vortexen der Ampure XP Beads wurden in jedes Well der PCR-Platte 56 µl der Beads hinzugegeben. Die weiteren Reinigungsschritte der PCR entsprechen den oben beschriebenen. Nach dem die Beads für 10 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet und die PCR vom Magnetständer entfernt wurde, erfolgte die Zugabe von 27,5 µl 10nmol/L Tris pH 8,5 Puffer in jedes Well der PCR-Platte sowie die optimale Durchmischung mit den Beads durch 10-maliges Hoch- und Runterpipettieren. Nach 2-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur sowie anschließendem Platzieren der PCR-Platte auf dem Magnetständer, bildete sich ein klarer Überstand aus gereinigter und in Lösung gegangener DNA. Von diesem Überstand wurden jeweils 25 µl auf eine neue 96 Wells PCR-Platte übertragen. Zur Kontrolle der DNA-Größe erfolgte eine Verdünnung von 1:50 von jeder Probe wobei 1 µl der Probe Verwendung fand. Im Anschluss wurde mit Hilfe des Bioanalyzer-1.000-Chips überprüft, ob die zu erwartende Amplikon-Größe von 630 bp verifiziert werden konnte, was hier auch der Fall war.

4.2.1.3 Library Quantifizierung, Normalisierung und Pooling

Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu erhalten, erfolgte eine Verdünnung auf 4 nmol/Lol/L. Dies erfolgt durch eine photometrische Messung der in den Proben enthaltenen DNA mittels Qbit. Die Verdünnung wurde mittels Zugabe von 10 nmol/L Tris pH 8,5 auf 4 nmol/L realisiert. Von jeder 4 nmol/L Library wurden nun von 5 µl zusammenpipettiert.

4.2.1.4 Library Denaturierung und MiSeq Sample Beladung

Um optimal für die Clustererstellung sowie die Sequenzierung vorbereitet zu sein, wurden die gepoolten Libraries zuerst durch 0,2N NaOH denaturiert, mit einem Hybridisierungspuffer verdünnt und am Ende hitzedenaturiert. Hierzu wurden 5 µl der gepoolten und auf 4 nmol/L verdünnten Library mit 5 µl 0,2N NaOH in einem Mikroreaktionsgefäß vermischt. Mittels Vortexer wurde die Probe nochmals durchmischt und anschließend bei 20 °C und 280 Umdrehungen für 1 Minute zentrifugiert. Es schloss sich eine 5-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur an, um die DNA in Einzelstränge zu denaturieren. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 990 µl des Hybridisierungspuffers HT1, wodurch eine 20 pM Library entstand. Um die von Illumina empfohlene Stoffmenge von 4 pM zu erhalten, wurden 120 µl der 20pM Library mit weiteren 480 µl des HT1 kombiniert. Es schloss sich eine Pulszentrifugation der Probe an. Als Kontrolle erfolgte eine 5 % PhiX Lösung. Hierfür wurden zunächst 2 µl 10 nmol/L PhiX Library mit 3 µl 10nmol/L Tris pH 8,5 Puffer kombiniert, mit dem Ziel eine 4nmol/L PhiX Library zu erhalten. Im Anschluss erfolgte die Durchmischung von 4 µl der 4nmol/L Phix Library mit 5 µl 0,2 N NaOH zu einer 2nmol/L Phix Library sowie das Vortexen derselbigen. Zur Denaturierung der Phix Library wurde die Probe 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um nun eine 20 pM PhiX Library herzustellen erfolgte daraufhin eine Kombination von 10 µl der denaturierten PhiX Library mit 990 µl des Hybridisierungspuffers HT1. Diese wurde, genau wie die Amplikon Library auf 4 pM verdünnt. Im nächsten Schritt erfolgte die Durchmischung von 30 µl der denaturierten und auf 4pM verdünnten PhiX Library mit 570 µl der denaturierten und verdünnten Amplikon Library. Die Probe wurde daraufhin für 2 min bei 96 °C im Hitzeblock denaturiert und anschließend im Eisbad für 5 min abgekühlt.

Tabelle 7: Verwendete Geräte für die 16s Metagenomic Sequenzierung

MiSeq Sequenzierer	Illumina, San Diego, USA
ABI Prism 7000 Real Time PCR	Applied Biosystems, Foster City, USA
Eppendorf, Hamburg, Germany	Eppendorf, Hamburg, Germany
Vortex 2X ³	Uniequip, Planegg Germany
Truseq Index Plate Fixture	Illumina, San Diego, USA
MiSeq reagent cartridge	Illumina, San Diego, USA
Magnetstand-96	Illumina, San Diego, USA
Bioanalyzer Agilent DNA 1.000 chip	Illumina, San Diego, USA
Qbit kit	Illumina, San Diego, USA

4.2.2 Datenauswertung

Für die Datenauswertung, welche in Kooperation mit Herrn Dr. Herlemann (Leibniz Institut für Ostseeforschung, Warnemünde, Rostock) erfolgte, wurde das Programm QIIME 1.9.1 genutzt. Die Sequenzen wurden mit der QIIME-Funktion „Joins Paired-End Illumina Reads“ mit Standardeinstellungen zusammengestellt, um somit die Forward- und Reverse-Sequenzen mit einer Überlappung von mindestens 30 bp zusammenzuführen (Caporaso et al. 2010). Sequenzen, die hierbei keine Überlappung aufwiesen, wurden verworfen. Mittels der Funktion „convert fast_aqual_fastq“ erfolgte die Konvertierung von fastq in fasta, woraufhin die resultierenden Sequenzen mit der SILVA NGS-Pipeline unter Verwendung der Standardeinstellungen ausgewertet wurden (Klindworth et al. 2013b). Bei der SILVA NGS-Pipeline handelt es sich um eine automatisierte Plattform, welche die Lesevorgänge mithilfe des SILVA Incremental Aligners analysiert, um eine Kontamination des Datensatzes zu entfernen (Pruesse et al. 2012). Problematische Lesevorgänge wie PCR- Artefakte, einschließlich potenzieller Chimären sowie nicht-

ribosomaler Lesevorgänge wurden herausgefiltert. Die Qualitätsfilterung der Lesevorgänge erfolgte mit folgenden Einstellungen: (1) Lesevorgänge mit weniger als 50 ausgerichteten Nukleotiden, (2) solche mit mehr als 2 % Mehrdeutigkeit, (3) 2 % Homopolymeren sowie mit einem geringeren Ausrichtungswert als einer der 40 von SINA gemeldeten Ausrichtungswerte, werden herausgefiltert. Nach der Qualitätskontrolle wurden die Sequenzen, welche identisch waren, in operative taxonomische Einheit (operative taxonomic Unit, OTU) getrennt (dereplicated), und im nächsten Schritt für jede OTU der Referenzabschnitt klassifiziert (Cluster-Bildung). Sowohl für die Dereplication als auch für die Cluster Bildung wurde Cluster Database at High Identify with Tolerance (CD-HIT) genutzt, wobei die minimale Sequenzidentität bei der Clusterbildung 98 % betrug (Li und Godzik 2006). Zur Klassifizierung wurde von der jeweiligen Sequenz der längste Abschnitt als Referenz des Clusters genommen, und für die taxonomische Klassifizierung mittels BLAST gegen SILVA REF 128 genutzt. Die daraus resultierende Klassifizierung der Referenzsequenz des Clusters wurde im Anschluss allen Mitgliedern des jeweiligen Clusters sowie deren Replikaten zugeordnet. Sequenzen, welche eine durchschnittliche Blast-Alignment-Abdeckung sowie eine Alignment-Identität von weniger als 93 % aufwiesen, wurden der virtuellen taxonomischen Gruppe „No Relatives“ zugeordnet und als nicht klassifiziert betrachtet. Insgesamt wurden 14.114 Sequenzen verworfen (1,09 %). Die restlichen 1.297.782 Sequenzen wurden im Zuge der weiteren Analyse genutzt und zu 229.689 OTU geordnet. Mit Hilfe des SILVA NGS erfolgte hieraus die Klassifizierung von 412 Bakteriengattungen.

Tabelle 8: Software und Datentools

QIIME Version 1.9.1	http://qiime.org
SILVA Next generation Sequencing (NGS) pipeline	https://ngs.arb-silva.de/silvangs/
cd-hit-est version 3.1.2	http://weizhongli-lab.org/cd-hit/
SILVA SSU Ref 128	https://www.arb-silva.de/documentation/release-128/
Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/news/04-05-2013-blast-2-2-28/
Explicet	http://www.explicet.org/Explicet
PAST software package version 3.08	http://folk.uio.no/ohammer/past/
LefSe	http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy
Word Office Professional Plus 2016	https://www.microsoft.com/de-de/
Word Excel Professional Plus 2016	https://www.microsoft.com/de-de/
Citavi 6	https://www.citavi.com/de

4.2.3 Statistische Analyse

Die Krankheitsaktivität widerspiegelnden CDAI-Werte sowie die in Woche 0 und Woche 4 bei den Patienten erhobenen Calprotectin-Spiegel wurden die Werte unter Verwendung eines gepaarten T-Testes miteinander verglichen.

Mit dem in QIIME implementierten Skript `single_rarefaction.py` wurde die Anzahl der OTU basierend auf der Gattungsstufe auf 3.500 Lesevorgänge pro Stichprobe verdünnt. Um einen Vergleich der dominanten Taxa zu den verschiedenen Zeitpunkten (Woche 0 bis Woche 4) während der Verabreichung von Vitamin D zu erhalten, wurde das Auftreten der 22 am häufigsten Vorkommende OTU in einer Heatmap mit Explicet

visualisiert (Robertson et al. 2013). Mit dem gleichen Programm wurde eine auf Verdünnungen basierende Analyse verwendet, indem Bootstrapping für Richness erfolgte. Der Unterschied in der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft, wurde durch nichtmetrisch mehrdimensionale Skalierung (NMDS) unter Verwendung von Bray-Curtis-Unähnlichkeitsindizes basierend auf der Gattungsrangklassifizierung sichtbar gemacht. Um die Unterschiede zwischen den OTU-Zusammensetzungen zu analysieren, fand das Softwarepaket PAST, für die nichtparametrische multivariante Varianzanalyse (PERMANOVA) Anwendung (Oyvind Hammer et al.). Ebenfalls wurde ein paarweiser Tukey-Test verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen der Anzahl der OTU zwischen den Proben zu berechnen. Eine Linear-Diskrimination-Effektgrößenanalyse (LDA) wurde mittels LefSe (Linear Diskrimination Analysis effect size) durchgeführt, um Bakteriengruppen zu bestimmen, die sich zwischen den Proben signifikant unterscheiden, wobei die Strategie „One against-All“ für die Mehrklassenanalyse verwendet wurde. LefSe verwendet einen nicht parametrischen Test, der die Standardtests für statistische Signifikanz mit zusätzlichen Tests kombiniert, die die biologische Konsistenz und Effektrelevanz codieren.

Für das Verfassen der Promotionsarbeit wurde rechnergestützt Microsoft Word Professional Plus 2016 von Microsoft verwendet. Für die Literaturrecherche sowie -verwaltung fand das Programm Citavi 6 der Swiss Academic Software GmbH Anwendung.

4.2.4 *NOD2*-Genotypisierung

Für die *NOD2*-Genotypisierung wurde jedem Patienten eine Blutprobe mittels einem Ethyldiamintetraacetat (EDTA)-Röhrchen abgenommen. Jeder Patient hatte zuvor eine schriftliche Einverständniserklärung zur Durchführung der Genotypisierung erteilt. Die Analyse wurde vom gastroenterologischen Labor der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt. Die Reinigung und Aufbereitung der DNA erfolgte mit dem QIAmp Blut Mini Kit (Qiagen; Hilden, Germany) gemäß der Herstellerangaben. Die Genotypisierung konzentrierte sich auf die drei Hauptmutationen im *NOD2*-Gen: SNP 8; R702W, National-Center for Biotechnology Information (NCBI)-Referenz-SNP-ID:rs2066844, SNP 12; G908R, NCBI-Referenz-SNP-ID:rs2066845 und SNP 12;

1007fs, NCBI-Referenz-SNP-ID:rs2066847. Für die Amplifikationen der jeweiligen Regionen des *NOD2*-Gens wurden das Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen; Hilden, Germany) genutzt. Die im Thermocycler (Stratogene RoboCycler; La Jolla CA, USA) verwendeten Primer sowie Temperatureinstellungen können der Tabelle 11 entnommen werden. Im Anschluss erfolgte die Sanger-Sequenzierung zur Bestimmung der Basenfolge in einem DNA-Molekül, welche von der Firma SeqLab in Göttingen durchgeführt wurde. Mittels *Chromas, Version 2.6* wurden die daraus resultierenden Daten analysiert und die Patienten, welche eine Mutation des *NOD2*-Gens aufwiesen, in homozygot, heterozygot sowie Compound heterozygot für die einzelnen SNP eingeteilt.

Tabelle 9: Verwendete Materialien und Primer für die *NOD2*-Genotypisierung

7,5 ml EDTA Röhrchen	Eppendorf, Hamburg, Germany
SNP 8 R702W SNP ID: rs2066844 Forward: 5'- CCTCTTCAATTGTGGCAGGC-3' Reverse: 5'- CTCCTGCATCTCGTACAGGC-3'	Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
SNP 12 G908R SNP ID: rs2066845 Forward: 5'- ATGGAGGCAGGTCCACTTTG-3' Reverse: 5'- TTACCTGAGCCACCTCAAGC-3'	Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
SNP 13 1007fs SNP ID: rs2066847 Forward: 5'- GATGGTACTGAGCCTTTGTTGA-3' Reverse: 5'- CAGACTTCCAGGATGGTGTCAT -3'	Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA

Tabelle 10:Primer und PCR-Temperaturbedingungen für die *NOD2*-Genotypisierung

SNP	Primer	PCR Temperaturbedingungen
8	Forward: 5'-CCTCTTCAATTGTGGCAGGC-3' Reverse: 5'-CTCCTGCATCTCGTACAGGC-3'	1. 5 min, 94 °C 2. 1 min, 94/60/72 °C (45 Zyklen) 3. 7 min, 72 °C 4. 4 °C
12	Forward: 5'-ATGGAGGCAGGTCCACTTTG-3' Reverse: 5'-TTACCTGAGCCACCTCAAGC-3'	
13	Forward: 5'-GATGGTACTGAGCCTTTGTTGA-3' Reverse: 5'-CAGACTTCCAGGATGGTGTCAT-3'	

v. Ergebnisse

5.1 Effekte der Vitamin D-Substitution auf den Vitamin D-Spiegel von M. Crohn - Patienten und gesunden Probanden

Die hochdosierte Gabe von Vitamin D führte zu einem signifikanten Anstieg des 25-OH-Vitamin D-Spiegels in den Blutproben der M. Crohn Patienten und gesunden Probanden (GP). In Woche 0 lag der Mittelwert des gemessenen 25-OH-Vitamin D bei den Patienten bei 39,7 nmol/L mit einer Standardabweichung von $\pm 23,0$. Der Wert der gesunden Probanden hingegen lag mit $29,6 \pm 6,3$ nmol/L deutlich darunter. Dem gegenübergestellt sind die Werte der Woche 4, wobei sich eine deutliche Steigerung des Mittelwertes sowohl bei den Patienten (Pat.) als auch den gesunden Probanden (GP) zeigte. Hierbei kam es zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,001$) unter Vitamin D-Substitution sowohl bei den M. Crohn Patienten auf $121,4 \pm 43,2$ nmol/L als auch bei den GP auf $143,0 \pm 25,2$ nmol/L.

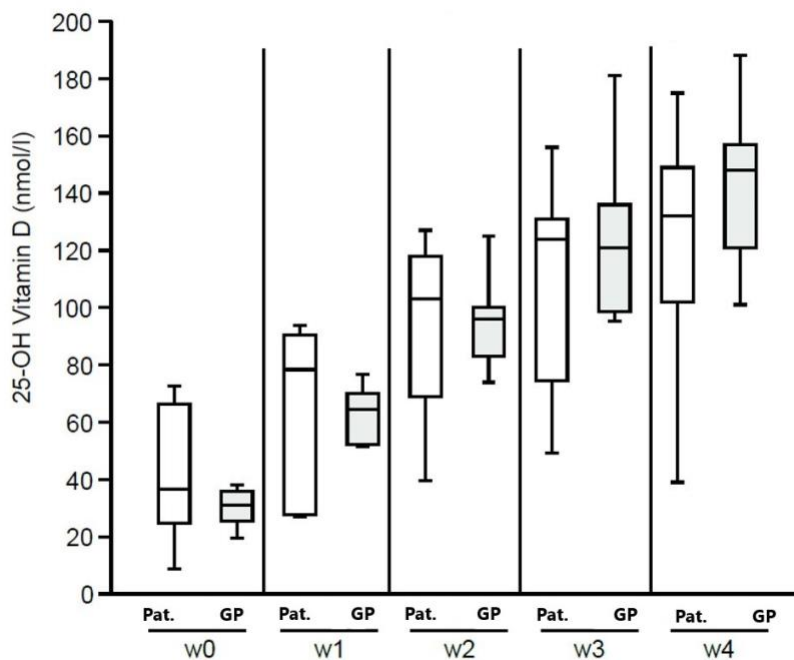


Abbildung 5:Veränderungen des Vitamin D-Spiegels bei Pat und GP unter Vitamin D Substitution

Darstellung des Anstiegs des 25-OH Vitamin D-Spiegels bei Pat und GP von Woche 0 bis Woche 4 in Form eines Boxplots. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Vitamin D-Spiegel unter Substitution über den zeitlichen Verlauf.

Der Anstieg der Vitamin D-Spiegel war bei den M. Crohn-Patienten zu keinem der Zeitpunkte von Woche 0 bis Woche 4 im Vergleich zu den GP signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$). Mit der Frage, ob der Anstieg der Vitamin D Werte unter Substitution vom *NOD2*-Mutationsstatus abhängig ist, wurde hier speziell nach Unterschieden im Rahmen des *NOD2* Mutationsstatus geschaut. Es wurden bei zwei der sieben Pat. eine Mutation im *NOD2*-Gen identifiziert (SNP 8, heterozygot, siehe **Tabelle 11**), wobei diese Patienten jedoch kein spezifisches Ansprechen auf die Vitamin D-Substitution zeigten.

Tabelle 11: Klinische Charakteristika der Untersuchungs- und Kontrollgruppe

Durchschnittsalter gesunde Probanden	27,7 ± 3,1
Durchschnittsalter Patienten	47,8 ± 12,4
Geschlecht gesunde Probanden (weiblich/männlich)	3/7
Geschlecht Patienten (weiblich/männlich)	3/4
Lokalisation des M. Crohn (Montreal Klassifikation)	L3
Anzahl der <i>NOD2</i> -Mutationen	2 (SNP 8 Heterozygot)
Patienten, welche mit TNF-Alpha-Inhibitoren behandelt wurden (Infliximab/Adalimumab)	5
Gesamtdosis des substituierten Vitamin D pro Studienteilnehmer	300000 I.E.
Mittelwert 25-OH-Vitamin D gesunde Probanden Woche 0	29,6 nmol/L ± 6,0
Mittelwert 25-OH-Vitamin D gesunde Probanden Woche 4	143,0 nmol/L ± 25,2
Mittelwert 25-OH-Vitamin D Patienten Woche 0	39,7 nmol/L ± 23,0
Mittelwert 25-OH-Vitamin D Patienten Woche 4	121,4 nmol/L ± 43,2
CDAI Woche 0	81,6 ± 43
CDAI Woche 4	57,3 ± 36,2
Calprotectin Woche 0	297,8 ± 613 mg/kg
Calprotectin Woche 4	178,6 ± 305,6 mg/kg

5.2 Effekte der Vitamin D-Substitution auf Calprotectin-Spiegel und die Krankheitsaktivität

Bei den M. Crohn-Patienten. war die Verabreichung von Vitamin D mit einem nicht signifikanten Abfall des CDAI und der Calprotectin-Spiegel zwischen Woche 0 und Woche 4 verbunden. So betrug der CDAI in der Woche 0 im Mittel: $81,6 \pm 43$ und in Woche 4: $57,3 \pm 36,2$. Eine ähnliche Entwicklung ist auch beim Calprotectin-Spiegel zu erkennen, wo der Mittelwert von $297,8 \text{ mg/kg} \pm 613,0$ in Woche 0 auf $178,6 \text{ mg/kg} \pm 305,6$ in Woche 4 fiel. Einer der Patienten wies hierbei einen massiven Abfall des Calprotectin-Spiegels auf, wobei er in der gesamten Zeit in klinischer Remission blieb (Calprotectin-Spiegel in Woche 0: 1685 mg/kg zu 793 mg /kg in Woche 4: siehe **Abbildung 6**).

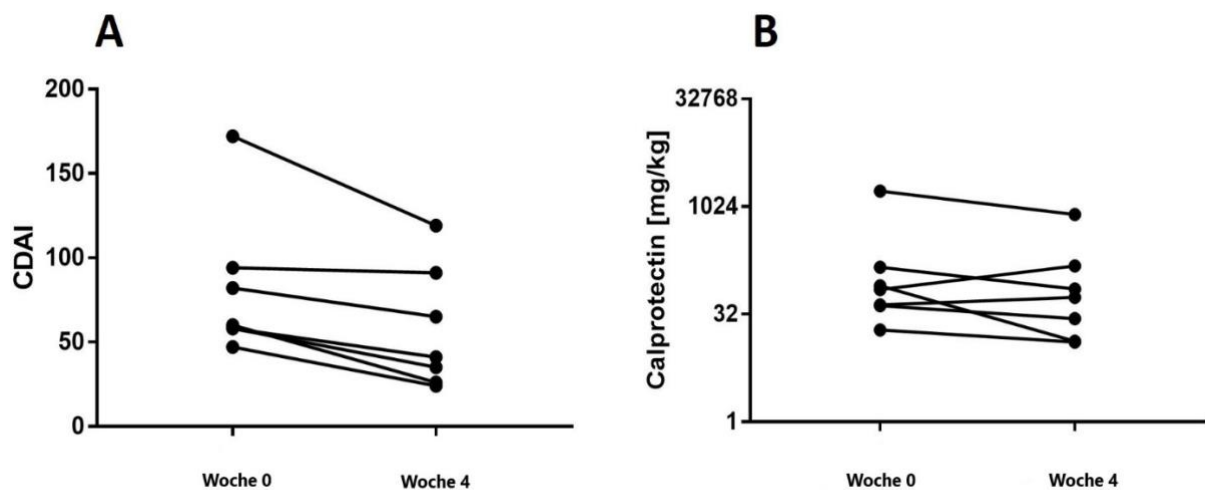


Abbildung 6:Veränderungen des CDAI und Calprotectin-Spiegels unter Vit.-D Substitution bei M. Crohn Patienten

Vitamin D-Substitution führt zu einem nicht signifikanten Abfall des CDAI-(A) bzw. des Calprotectin-Spiegels (B) bei den M. Crohn-Patienten.

(Beachte: Logarithmische Skala in B)

5.3 Vitamin D-Substitution führt zu einer temporären Verschiebung der intestinalen bakteriellen Komposition bei Patienten mit M. Crohn

Ziel der Studie war es, den Einfluss einer Vitamin D-Substitution auf die Darmmikrobiota zu untersuchen, insbesondere die Fragestellung, ob eine Vitamin D-Gabe zu einer Veränderung der intestinalen bakteriellen Zusammensetzung führt. Um die Effekte einer Verabreichung von Vitamin D auf die verschiedenen mikrobiellen Gemeinschaften zu bewerten, wurden die Änderungen unter Vitamin D-Substitution unter Verwendung eines nichtmetrischen mehrdimensionalen Skalierungsprogramms (NMDS) getrennt in Pat. (Abbildung 7A) und GP (Abbildung 7B) visualisiert.

Bei den GP gab es unter der Vitamin D-Substitution keine signifikante Verschiebung der bakteriellen Zusammensetzung zwischen den einzelnen Zeitpunkten zwischen Woche 0 und Woche 4. In der Gruppe der M. Crohn-Patienten konnte eine deutliche Änderung der Bakterienzusammensetzung unter Vitamin D-Substitution, insbesondere in Woche 1, beobachtet werden. So trat von Woche 0 zu Woche 1 eine Verschiebung der intestinalen bakteriellen Komposition auf, welche sich jedoch in den Wochen 2,3 und 4 wieder in den ursprünglichen Bereich zurück veränderte. Die beobachtete Verschiebung von Woche 0 zu Woche 1 war nicht signifikant. Die Bakterienpopulationen der Pat. in Woche 1 unterschieden sich hingegen signifikant von denen in Woche 2, Woche 3 und Woche 4 (Woche 1/ Woche 2: $p = 0,007$; Woche 1 / Woche 3: $p = 0,01$; Woche 1 / Woche 4: $p = 0,011$, siehe **Abbildung 8**). Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Bakteriengemeinschaften zu Beginn der Studie (Woche 0) nicht signifikant von denen in Woche 2,3, und 4.

Zusätzlich wurde ausgewertet, ob weitere Faktoren, wie z. B. die Begleitmedikation mit einem TNF-Alpha-Inhibitor, das Vorhandensein einer *NOD2*-Mutation bzw. die Krankheitsaktivität (gemessen am CDAI) einen Einfluss auf die bakterielle Komposition haben.

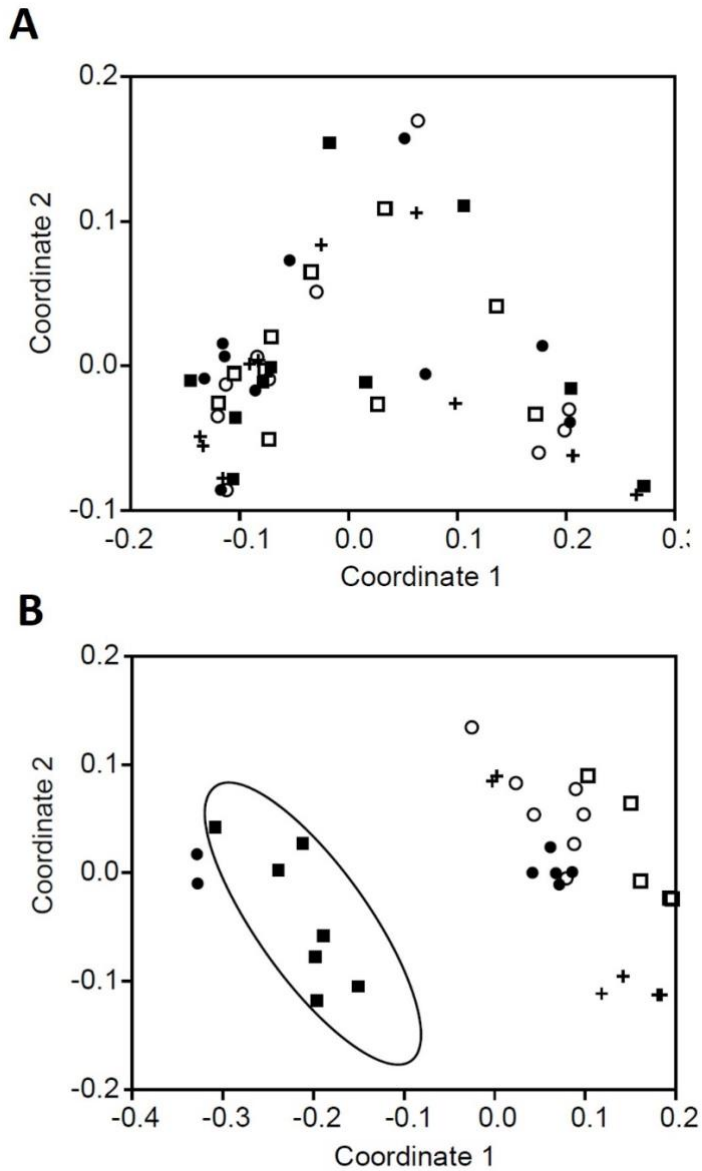


Abbildung 7: Nichtmetrische mehrdimensionale Skalierung unterteilt in GP und Pat.

Nichtmetrische mehrdimensionale Skalierung (NMDS) unterteilt in gesunde Probanden (Figure A) und M. Crohn Patienten (Figure B). (●) repräsentiert Proben der Woche 0, (■) repräsentiert Proben der Woche 1, (+) repräsentiert Proben der Woche 2, (□) repräsentiert Proben der Woche 3 und (○) repräsentiert Proben der Woche 4. Es zeigte sich eine Verschiebung der mikrobiellen Zusammensetzung zu Woche 1 bei den M. Crohn Patienten, dies wurde mit einem Kreis visualisiert.

Tabelle 12: Bonferroni-korrigierte PERMANOVA der Bakterienzusammensetzung der M. Crohn-Patienten

Woche	0	1	2	3	4
0		0.205	0.439	0.231	0.103
1			0.007	0.01	0.011
2				0.649	1
3					0.038
4					

Die Ähnlichkeit bzw. Unähnlichkeit der verschiedenen OTU zu den Zeitpunkten unter Vitamin D-Substitution wurde unter Verwendung einer Bonferroni-korrigierten PERMANOVA berechnet.

Hierbei ist zu sehen, dass ein signifikanter Unterschied zwischen der Bakterienzusammensetzung der Woche 1 und den Wochen 2,3 und 4 besteht. Die weiteren Unterschiede zwischen den Gruppen stellten sich größtenteils als nicht signifikant dar, lediglich zwischen Woche 3 und Woche 4 zeigte sich ein schwacher signifikanter Unterschied ($p = 0,038$).

5.4 Änderungen der Abundanzen der am häufigsten auftretenden Bakterienstämme in Abhängigkeit einer Vitamin D-Substitution

Um zu beurteilen, ob es zu einer Veränderung der Abundanz spezifischer bakterieller Genera sowohl bei den Pat. als auch den GP kommt, wurden mit Hilfe des Programmes LEfSe (Segata et al. 2011) Veränderungen in der mikrobiellen Gemeinschaft unter Vitamin D-Substitution untersucht.

Bei den GP konnte unter Vitamin D-Substitution keine vermehrten Abundanzen von spezifischen bakteriellen Genera beobachtet werden. Bei den Pat zeigte sich jedoch unter Vitamin D-Substitution zu den unterschiedlichen Zeitpunkten eine erhöhte

Abundanz von bestimmten bakteriellen Genera. Bei den M. Crohn Patienten erfolgte daraufhin eine weitere Differenzierung der bakteriellen Genera in 5 Bakteriengemeinschaften, um eine weitere Differenzierung der einzelnen Abundanzen zu ermöglichen.

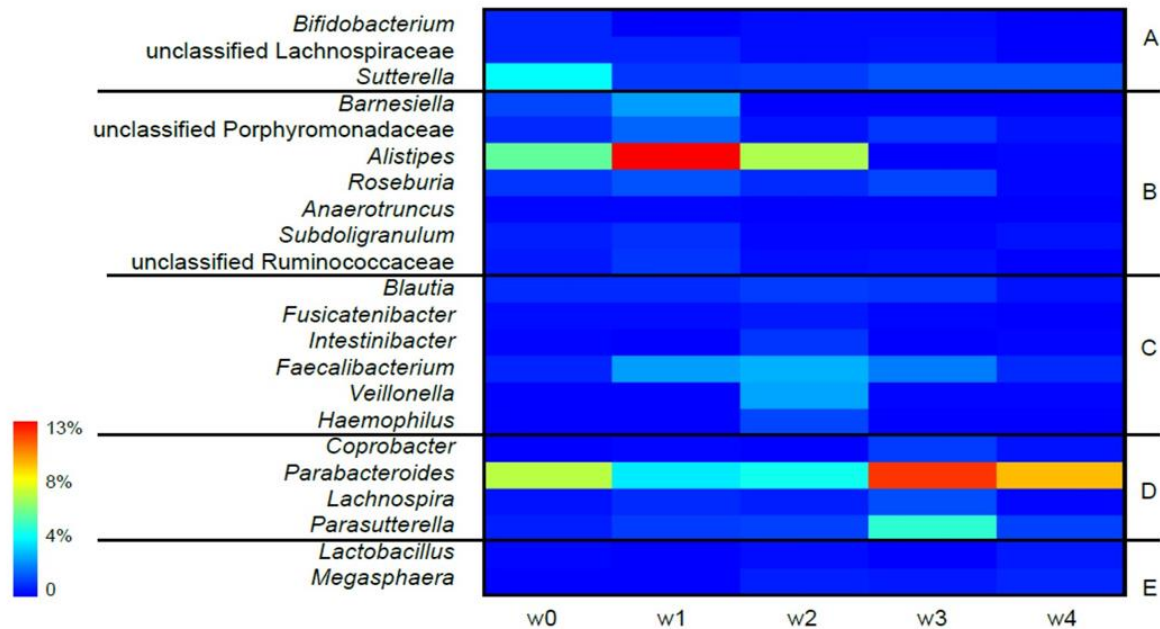


Abbildung 8: Heatmap der Bakteriengemeinschaften unter Gabe von Vitamin D bei MC Patienten

Die Grafik zeigt die Bakteriengenera bei den M. Crohn Patienten mit einer erhöhten Abundanz in Woche 0(w0), Woche 1 (w1), Woche 2 (w2), Woche 3 (w3) und Woche 4 (w4). Im Gegensatz hierzu war unter Gabe von Vitamin D in der GP-Gruppe keine signifikante Änderung der Abundanzen zu den jeweiligen Zeitpunkten zu verzeichnen.

So wurde die jeweils größte Abundanz der Bakterien auf Grundlage der LEfSe-Analyse in Woche 0, Woche 1, Woche 2, Woche 3, Woche 4 als Vergleichsgröße herangezogen. Vor der Verabreichung von Vitamin D, Woche 0, waren *Sutterella* (Betaproteobakterien) neben *Bifidobacterium* (Actinobakterien) und eine nicht näher klassifizierte Linie der Lachnospiraceae signifikant häufiger vorhanden.

Nach der ersten Woche Vitamin D-Substitution (Woche 1) kam es zu einer Verlagerung der am häufigsten auftretenden Bakterien in Richtung einer von *Alistipes* (Bacteroidetes) dominierten Bakteriengemeinschaft. Zu diesem Zeitpunkt waren des

Weiteren *Barnesiella* und nicht näher klassifizierte *Porphyromonadaceae* (beide *Actinobacteria*), *Roseburia*, *Anaerotruncus*, *Subdoligranulum* sowie ein nicht klassifizierter Stamm der *Ruminocaceae*, alle zur Familie der *Firmicutes* gehörend, in hoher Anzahl vorhanden.

In der zweiten Woche der Vitamin D-Substitution (Woche 2) gab es wiederum eine Verschiebung der bakteriellen Komposition bei den M. Crohn Patienten. Die zuvor prominenten *Bacteroides* verringerten sich in der Anzahl, während *Firmicutes*, insbesondere *Faecalibakterien*, *Veillonella* sowie *Blautia*, *Fusicantennibacter* und *Intestinibacter* signifikant häufiger auftraten. Nach einer weiteren Woche Vitamin D-Verabreichung waren *Parabacteroides*, zur Familie der *Bacteroides* gehörend, vermehrt vorhanden. Diese waren zwar während der gesamten Studie in großer Anzahl aufgetreten, jedoch in den Wochen 1 und 2 signifikant weniger häufig. Neben den *Parabacteroides* traten in Woche 3 auch *Lachnospira* (*Firmicutes*), *Coprobacter* (*Bacteroides*) und *Parasutterella* (*Betaproteobacteria*) in großer Anzahl auf. In der vierten Woche der Vitamin D-Gabe gab es eine signifikante Anreicherung von *Lactobacillus* und *Megasphaera*, welche beide zur Gruppe der *Firmicutes* gehören. Trotz der signifikanten Anreicherung wiesen beide jedoch insgesamt verhältnismäßig eine relativ geringe Abundanz auf.

5.5 Änderungen in der Anzahl der bakteriellen Taxa unter Vitamin D-Substitution

Bei Patienten mit M. Crohn kommt es laut Literatur im Verlauf der Erkrankung zu einer Verringerung der Bakteriendiversität (Ott et al. 2004; Joossens et al. 2011). Um die Frage zu beantworten, ob die Substitution mit Vitamin D einen Einfluss auf die Diversität - sowohl bei den GP als auch den Pat. - hat, wurde die Anzahl der bakteriellen Taxa zu den verschiedenen Zeitpunkten analysiert (Woche 0 bis Woche 4). Es zeigte sich hier, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den GP und Pat. vor der Vitamin D-Substitution gab (Tukey-Test $> 0,05$). Die Anzahl der bakteriellen Taxa bei den GP veränderte sich auch in den Wochen 1 bis Woche 4 nicht signifikant (Tukey-Test $> 0,05$). Bei den Pat. hingegen kam es unter Vitamin D-Gabe zu einer signifikanten Verringerung der Bakterienvielfalt (Woche 0 im Vergleich zu Woche 4, Tukey-Test $p = 0,001$). Auch die Anzahl der bakteriellen Taxa war bei den Pat im

Vergleich zu den GP in Woche 3 und Woche 4 der Vitamin D-Substitution signifikant niedriger (Tukey-Test Pat. im Vergleich zu GP: Woche 3 $p = 0,007$, Woche 4 $p = 0,001$).

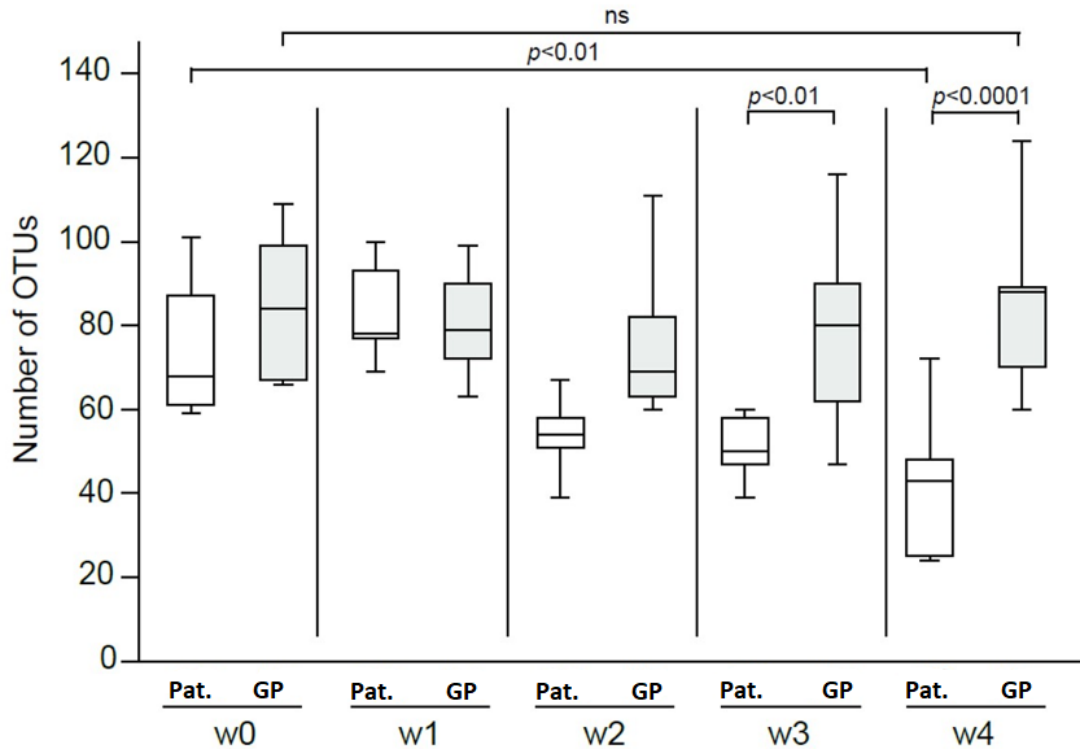


Abbildung 9:Anzahl der bakteriellen Taxa unter Vitamin D-Substitution in den Wochen 0-4

Während die Anzahl der bakteriellen Taxa, hier dargestellt als OTU, in Woche 0 bei den GP und Pat nicht signifikant unterschiedlich ist, kommt es in der Woche 3 und Woche 4 bei den Pat. zu einer signifikanten Verringerung der bakteriellen Taxa im Vergleich zu den GP.

vi. Diskussion

In den vergangenen Jahren ist es weltweit zu einem Inzidenzanstieg der CED gekommen (Ott et al. 2008). Die Ursache für dieses Phänomen ist nach wie vor nicht komplett verstanden, es erscheint jedoch zunehmend wichtig, ein intensiveres Verständnis für die Pathogenese der CED zu entwickeln. Zum jetzigen Zeitpunkt wird eine multifaktorielle Pathogenese der CED diskutiert: Neben einer überschießenden Aktivierung des mukosalen Immunsystems, hervorgerufen durch kommensale Darmmikrobiota bei Patienten mit einem genetischen Risikoprofil, scheinen mikrobielle Faktoren sowie Umweltfaktoren eine wichtige Rolle in der Entstehung dieser Krankheiten zu spielen (Ananthakrishnan 2015).

In verschiedenen Studien konnte eine Veränderung der intestinalen bakteriellen Zusammensetzung bei CED-Patienten nachgewiesen werden (Peterson et al. 2008; Sokol et al. 2008). Diese sogenannte Dysbiose wird als wichtiger Teil der Pathogenese der CED diskutiert, wobei die genauen Auswirkungen der Veränderungen auf das intestinale Immunsystem noch nicht abschließend geklärt werden konnten (Manichanh et al. 2006; Joossens et al. 2011).

Neben der Veränderung der bakteriellen Zusammensetzung und genetischen Faktoren scheinen auch Umweltfaktoren, wie z. B. ein Vitamin D-Mangel eine Rolle bei der Entwicklung und dem klinischen Krankheitsverlauf von M. Crohn und CU zu spielen.

Bei Vitamin D handelt es sich um ein fettlösliches Vitamin, welches in die Gruppe der Secosteroide eingeordnet wird. Der größte Anteil des Vitamin D wird in der Haut produziert, wobei unter UV-Exposition eine Konvertierung von 7-Dehydrocholesterol zu Vitamin D (Vitamin D₃) stattfindet. Darüber hinaus wird Vitamin D auch über die Nahrung aufgenommen. Reich an Vitamin D gelten vor allem Milch- und Milchprodukte, Eigelb, Rinderleber und Fisch.

Die Menge des gebildeten Vitamin D in der Haut ist proportional zum Winkel der Sonneneinstrahlung, was die mit steigendem Breitengrad zunehmende Prävalenz eines Vitamin D-Mangels erklärt (Jørgensen et al. 2010). In Studien konnte ebenfalls eine zunehmende Prävalenz von CED von Süd-nach-Nord innerhalb der nördlichen Hemisphäre festgestellt werden (Schultz und Butt 2012). Ob ein direkter

Zusammenhang zwischen einem Vitamin D-Mangel und der Entstehung der CED besteht, ist nach wie vor Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen.

Unterstützt wird die Annahme, dass es hier einen Zusammenhang gibt, durch die jahreszeitlichen Schwankungen der Schubaktivität von CED, welche dem jahreszeitlichen Verlauf des Vitamin D ähneln (Schultz und Butt 2012).

Bei Patienten mit CED spielt Vitamin D eine wichtige Rolle, da dieses Patientenkollektiv für einen Vitamin D-Mangel besonders prädestiniert ist. So weisen CED-Patienten vor allem am Winterende einen insuffizienten Vitamin D-Spiegel auf (van den Bergh et al. 2011; Schäffler et al. 2018; Preiß et al. 2014; Bours et al. 2011). Bisher ist es jedoch nach wie vor unklar, ob diese Häufung eines Vitamin D-Mangels eine Konsequenz aus der Erkrankung ist oder der Mangel als pathogenetisch bedeutsamer Faktor an der Entstehung der CED beteiligt ist, also ob es sich hierbei um eine Assoziation oder um eine Korrelation handelt. Es existieren aktuell mehrere Studien, die sich mit der Funktion des Vitamin D und dessen Einfluss auf den Krankheitsverlauf von CED beschäftigen (Wilkins et al. 2006; Schäffler et al. 2018), eine Differenzierung zwischen Assoziation und Korrelation gelang bisher nicht, wobei einzelne Studien nahe legen, dass ein Vitamin D-Mangel möglicherweise mit der Entstehung und auch mit einem schweren Krankheitsverlauf der CED einhergeht.

Eine Studie von Ananthakrishnan et al. 2012 konnte wiederum zeigen, dass ein höherer 25-OH-Vitamin D-Plasmaspiegel mit einem verringerten Risiko an einer CED zu erkranken einhergeht (Ananthakrishnan et al. 2012).

In einer Studie von Nielsen et al. 2019 konnte nachgewiesen werden, dass niedrigere Vitamin D-Spiegel mit einer höheren Krankheitsaktivität, höherem Schubrisiko sowie einer verminderten Lebensqualität einhergehen (Nielsen et al. 2019). So konnte nach kontinuierlicher Vitamin D-Gabe eine signifikante Reduktion der Krankheitsaktivität, gemessen am CDAI, beobachtet werden. Gleichzeitig konnte eine signifikante Reduktion der Schubrate unter Vitamin D-Supplementation beobachtet werden. Insgesamt scheint eine Vitamin D-Substitution in der Mangelsituation günstig zu sein und wird auch von den aktuellen deutschen Leitlinien entsprechend empfohlen (Kucharzik et al. 2019).

Dass Vitamin D auch in der Entstehung von CED eine wichtige Rolle spielt, zeigen auch experimentelle murine Studien mit IL-10KO-Mäusen und DSS-induzierter Colitis. So wiesen Versuchstiere mit einem Vitamin D-Mangel eine wesentlich höhere

Krankheitsaktivität auf. Vitamin D scheint hierbei eine antiinflammatorische Funktion einzunehmen (Tabatabaeizadeh et al. 2018). Untermuert wird dies durch weitere Versuche mit VDR-Knockout-Mäusen, bei denen ebenfalls ein Anstieg der Krankheitsaktivität beobachtet werden konnte. Veränderungen im VDR sorgten weiterhin für eine Veränderungen der bakteriellen Zusammensetzung der intestinalen Flora (Guo et al. 2014; Tabatabaeizadeh et al. 2018). Aufgrund dieser Studien lässt sich vermuten, dass ein Vitamin D-Mangel im direkten Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität und somit dem Verlauf von CED steht.

Des Weiteren wurde in einer Studie von Mouli und Ananthakrishnan 2014 et al. nachgewiesen, dass es unter Vitamin D-Substitution zu einer Verminderung der intestinalen Entzündung kommt, wobei nicht abschließend geklärt werden konnte, ob dies auf eine direkte Wirkung des Vitamin D auf die Entzündungsreaktion mit entsprechender sekundären Veränderung der Darmmikrobiota oder auf eine direkte Wirkung des Vitamin D auf die Darmmikrobiota zurückzuführen ist (Mouli und Ananthakrishnan 2014; Kucharzik et al. 2019).

Einen weiteren Hinweis, dass Vitamin D einen Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf von CED, insbesondere bei M. Crohn hat, ergibt sich durch die vermehrte Expression von *NOD2*-Rezeptoren durch Vitamin D (Wang et al. 2010). *NOD2* - Rezeptoren gehören zu den sogenannten „*pathogen recognition receptors*“ (PRR) und damit zu einem Teil der angeborenen Immunabwehr des Körpers (sogenannte „innate immunity“). Mutationen im *NOD2*-Gen konnten als Risikofaktor für die Entstehung eines M. Crohn identifiziert werden. Durch den Einfluss auf die Expression von *NOD2*-Rezeptoren ist somit eine Modulation des Immunsystems sowie ein Einfluss von Vitamin D auf die Pathogenese von CED zu diskutieren. Die genauen Pathomechanismen konnten jedoch bisher nicht abschließend geklärt werden und bedürfen weiterer Studien.

Vitamin D ist darüber hinaus ebenfalls an der Regulation von Tight-juntion-Proteinen, Interleukinen sowie der Unterdrückung der intestinalen Apoptose und somit Aufrechterhaltung der intestinalen Barriere beteiligt (Nielsen et al. 2018). Somit erscheint eine Modulation des mukosalen Immunsystems durch Vitamin D Gabe möglich (Dionne et al. 2014).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Vitamin D-Substitution und der Zusammensetzung des Darmmikrobioms bei M. Crohn-

Patienten und gesunden Probanden, da vorrangigere Arbeiten aufgezeigt haben, dass Vitamin D einen Einfluss auf die intestinale Entzündung und damit möglicherweise auch auf die Zusammensetzung der intestinalen bakteriellen Gemeinschaft hat (Ooi et al. 2013; Reich et al. 2014; Wilkins et al. 2006). Es sollte in der vorliegenden Studie geprüft werden, inwieweit eine hochdosierte Vitamin D Gabe Einfluss auf die Krankheitsaktivität bei M. Crohn Patienten, gemessen an einem klinischen Score wie dem CDAI als auch auf laborchemische Parameter wie das fäkale Calprotectin hat. Hierfür wurde eine Fall-Kontroll-Studie durchgeführt, welche M. Crohn Patienten und gesunde Probanden mit Vitamin D-Mangel einschloss, beide Gruppen erhielten eine Vitamin D-Substitution. Es sollte untersucht werden, ob eine Vitamin D-Substitution einen Einfluss, auf die bakterielle Zusammensetzung des Darms bei M. Crohn Patienten und gesunden Probanden hat. Zusätzlich sollten auch Veränderungen in der Abundanz einzelner Bakteriengenera unter Vitamin D-Substitution untersucht werden.

Als Einschlusskriterium für die Studienteilnahme wurde ein Vitamin D-Mangel im Serum unter 50 nmol/L festgelegt. Hierbei war jedoch auffällig, dass die GP mit $29,6 \text{ nmol/L} \pm 6,3$ im Durchschnitt einen signifikant geringeren Vitamin D-Wert aufwiesen als die M. Crohn-Patienten mit $39,7 \text{ nmol/L} \pm 23,0$. Dies könnte auf eine vorausgegangene Vitamin D-Substitution bei den M. Crohn Patienten hindeuten. Gleichzeitig handelte es sich bei den gesunden Probanden um MedizinstudentInnen, welche zum Untersuchungszeitpunkt in der Klausurenphase des Semesters waren und sich dementsprechend hauptsächlich in geschlossenen Räumen aufhielten. Als Kritikpunkt an der Selektion der GP muss angemerkt werden, dass die GP deutlich jünger waren als die Patienten.

Die Vitamin D-Gabe in dieser Arbeit beschränkte sich auf M. Crohn-Patienten, welche sich in Remission befanden, sowie gesunde Probanden, um die Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung des Stuhls in beiden Gruppen zu analysieren. Bei den Pat. kam es hierbei in Woche 1 unter Vitamin D-Substitution zu einer signifikanten Verschiebung der bakteriellen Gemeinschaft. Während die Bakterienzusammensetzung bei den GP durch die Verabreichung von Vitamin D nicht signifikant beeinflusst wurde, konnten bei den Patienten Veränderungen in den Bakteriengemeinschaften unter der Substitution im zeitlichen Verlauf beobachtet werden. Eine Vitamin D-Substitution scheint somit anhand der erhobenen Daten einen

Einfluss auf die mikrobielle Zusammensetzung bei den M. Crohn Patienten, nicht jedoch bei den GP zu haben. Die stärkste Veränderung unter Vitamin D-Verabreichung wurde in der Woche 1 beobachtet. Der weitere Anstieg des 25-OH-Vitamin D führte im zeitlichen Verlauf erneut zu einer Verschiebung der Darmmikrobiota, welche denen in Woche 0 ähnlich war. Für diese temporäre Verschiebung der Darmbakterien können es verschiedenen Ursachen diskutiert werde.

Es erscheint u.a. denkbar, dass Vitamin D nur einen zeitlich beschränkten Einfluss auf die Darmmikrobiota aufweist. Interessanterweise zeigte sich diese Veränderung nur bei Patienten mit M. Crohn, was ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung von Vitamin D in der Pathogenese des M. Crohn sein könnte. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass es einen optimalen 25-OH-Vitamin D-Bereich gibt, welcher dem Vitamin D-Spiegel bei den M. Crohn-Patienten in Woche 1 ($64,4 \pm 29,8$ nmol/l) ähnelt. Ein weiterer Anstieg des Vitamin D-Spiegels über diesen Bereich hinaus, könnte zu einer erneuten Veränderung der Darmmikrobiota führen. Die Rolle dieses positiven Wirkungsbereichs des Vitamin D sowie dessen genaue Ausdehnung müssten jedoch in weiteren prospektiven Studien mit einer höheren Patientenzahl überprüft werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit war die Veränderung der Bakterienvielfalt unter Vitamin D-Substitution. Verschiedene Studien ergaben, dass es bei Patienten mit M. Crohn zu einer Verringerung der intestinalen bakteriellen Diversität im Vergleich zur Normalbevölkerung kommt (Manichanh et al. 2006; Dicksved et al. 2008). In dieser Arbeit war die Anzahl der bakteriellen Taxa zwischen Pat. und GP in der Woche 0 nicht signifikant unterschiedlich. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich alle M. Crohn-Patienten zum Zeitpunkt des Studienbeginns in klinischer Remission befanden (CDAI $81,6 \pm 43$). Im Verlauf der Vitamin D-Substitution kam es jedoch ab Woche 2 zu einer Abnahme der bakteriellen Taxa bei den M. Crohn-Patienten, welche bei den GP jedoch nicht zu beobachten war.

Es konnte bereits in der Vergangenheit gezeigt werden, dass eine höhere Diversität der Darmmikrobiota mit einer vorteilhaften und protektiven Wirkung für den Wirt verbunden ist (Ott et al. 2004). Eine Abnahme der Diversität hingegen kann die Inflammation unterstützen und dadurch unter Umständen zur Progression der Erkrankung beitragen (Manichanh et al. 2006). In dieser Arbeit kam es durch eine fortgeführte Vitamin D-Substitution nach Woche 2 zu einer Reduktion der OTU sowie deren potentiell protektive Wirkung, was die Hypothese eines „Vitamin D-Fensters“

unterstützen würde. Um diese Hypothese zu untermauern, sind ebenfalls weitere prospektive Studien notwendig, zumal spekuliert werden kann, ob der Zeitpunkt zu Woche 4 zu früh ist, um einen langfristigen Effekt des Vitamin D auf die Darmmikrobiota bei M. Crohn zu sehen.

Die Mechanismen, wie die Verabreichung von Vitamin D zu einer reduzierten Diversität der bakteriellen Taxa führt, bleiben ebenfalls spekulativ. In einer Studie von Cantorna et al. 2014 zeigte sich eine Korrelation zwischen dem Vitamin D-Status, dem mukosalen Immunsystem sowie den Darmmikrobiota bei Pat mit CED (Cantorna et al. 2014). Es konnte darüber hinaus in weiteren Studien festgestellt werden, dass Mutationen im VDR ein Risikofaktor für die Entstehung von CED sind (Jostins et al. 2012). Eine weitere Studie konnte nachweisen, dass Variationen im VDR einen Einfluss auf die Darmmikrobiota haben (Wang et al. 2016).

Vitamin D ist darüber hinaus regulatorisch an der Genexpression von *NOD2* beteiligt (Wang et al. 2010). In verschiedenen Arbeiten wurde dargestellt, dass eine Modulation des mukosalen Immunsystems durch eine Gabe von Vitamin D bei M. Crohn-Patienten denkbar ist (Dionne et al. 2014). Genetische Risikofaktoren wie *NOD2*-Mutationen wirken sich ebenfalls auf die Zusammensetzung der Darmmikrobiota aus (Frank et al. 2011; Petnicki-Ocwieja et al. 2009). Auch in dieser Arbeit wurde bei M. Crohn Patienten untersucht, ob Mutationen im *NOD2*-Gen vorlagen, hierbei konnte bei 2 StudienteilnehmerInnen eine Mutation nachgewiesen werden, bei beiden Studienteilnehmern zeigte sich eine heterozygote Mutation in SNP 8, welche laut Cuthbert et al. 2002b insgesamt am häufigsten bei M. Crohn Patienten zu beobachten ist (Cuthbert et al. 2002b). Die Wahrscheinlichkeit an einem M. Crohn zu erkranken ist zwar durch das Vorhandenseins eines mutierten Allels erhöht, jedoch reicht dies nicht als alleinige Erklärung der Pathogenese aus. So konnte in der Arbeit von (Büning et al. 2004) nachgewiesen werden, das auch 15,5 % der gesunden Studienteilnehmer ein mutiertes Allel aufwiesen (Büning et al. 2004).

Letztlich sind die Zahlen in dieser Arbeit jedoch zu gering, um hier einen Effekt dieser Mutation auf die Veränderungen der bakteriellen Zusammensetzung im Stuhl unter Vitamin D-Substitution zu erfassen. Untersuchungen an einem größeren Kollektiv mit der Fragestellung, ob möglicherweise besonders Patienten mit einer *NOD2*-Mutation von einer Vitamin D-Substitution im Sinne einer personalisierten Medizin profitieren, wären perspektivisch sinnvoll.

In der vorliegenden Studie wurden fünf M. Crohn Patienten eingeschlossen, welche während des zeitlichen Verlaufs der Studie eine Therapie mit einem TNF-Alpha-Inhibitoren erhielten. Durch die geringe Patientenzahl erscheint eine Beurteilung schwierig, inwieweit eine TNF-Alpha-inhibierende Therapie einen Einfluss auf die bakterielle Zusammensetzung im Stuhl hat. Hierfür wäre eine Studie an einem deutlich größeren Patientenkollektiv durchzuführen.

In unserer Studie wurden darüber hinaus spezifische Bakterienarten analysiert, welche unter der Vitamin D-Substitution gehäuft auftraten. Insbesondere beobachteten wir eine deutliche Veränderung der Abundanzen von *Alistipes* und *Parabacteroides* bei den M. Crohn-Patienten, dieser Effekt war bei den GP nicht nachzuweisen. Das Häufigkeitsmuster der *Parabacteroides* zeigte im Gegensatz zu *Alistipes*, in Woche 1 und 2 eine verringerte Häufigkeit unter der Vitamin D-Substitution, jedoch einen Anstieg in Woche 3 und 4. Beide bakteriellen Gruppen scheinen von besonderem Interesse für die Pathogenese von CED zu sein. In vorausgegangenen Studien konnten dargelegt werden, dass es zu einer Abnahme von *Parabacteroides* in entzündeten Bereichen im Vergleich zu nicht entzündeten Bereichen im menschlichen Darm kommt (Walker et al. 2011; Zitomersky et al. 2013). Darüber hinaus führte die orale Verabreichung von *Parabacteroides distasonis* in einem Mausmodell für Dextransulfat-Natrium (DSS)-Kolitis zu einer Verminderung der intestinalen Entzündung (Kverka et al. 2011).

Insgesamt scheinen *Parabacteroides* hierbei eine protektive Rolle für den Verlauf von CED einzunehmen. Interessanterweise nahm in dieser Analyse die Abundanz von *Parabacteroides* in den ersten zwei Wochen ab, in Woche 3 und 4 erfolgte jedoch ein Anstieg, was auf einen Vitamin D Effekt hindeuten könnte.

Bei *Alistipes* kam es in den ersten zwei Wochen zu einer starken Zunahme der Abundanz unter Vitamin D-Substitution. Auch bezüglich *Alistipes* gibt es Untersuchungen zur Pathogenese der CED: In einem Maus-Colitis-Modell wurde festgestellt, dass *Alistipes finegoldii* protektiv bei einer DSS-induzierten Kolitis wirkt (Dziarski et al. 2016). Im Gegensatz dazu konnte jedoch in einer anderen Studie dargelegt werden, dass *Alistipes* eine Rolle in der Pathogenese von kolorektalen Karzinomen spielen (Parker et al. 2020). Die genauen Pathomechanismen konnten hier nicht abschließend geklärt werden. Einen Hinweis, dass ein Zusammenhang

zwischen Vitamin D und *Alistipes* existiert, konnte wiederum eine weitere Studie mit VDR-Knockout-Mäusen erbringen, hier stellte man bei diesen Mäusen eine Abnahme der Häufigkeit von *Alistipes* im Stuhl fest (Jin et al. 2015). Die genauen Zusammenhänge zwischen *Alistipes* und Vitamin D sind jedoch weiterhin Gegenstand aktueller Forschungen. Sowohl *Alistipes* als auch *Parabacteroides* scheinen jedoch insgesamt eine eher vorteilhafte Wirkung bei CED zu haben. Der vermehrte Nachweis dieser bakteriellen Gruppen unter Vitamin D-Substitution bei M. Crohn Patienten ist möglicherweise ein Hinweis, dass diese auch einen Einfluss auf die Pathogenese dieser Erkrankung haben. Hier bedarf es jedoch noch weiterer Untersuchung in einem größeren Patientenkollektiv.

Neben diesen beiden häufig vorkommenden Bakterienarten wurde festgestellt, dass es bei weiteren Arten zu einer signifikanten Erhöhung der Abundanz unter der Vitamin D-Substitution in den ersten beiden Wochen kam, wenngleich auch in einem geringeren Ausmaß, so war z.B. die Abundanz von *Roseburia* unter Vitamin D-Substitution vermehrt. In einer Studie konnte ein Zusammenhang zwischen der Abnahme von *Roseburia hominis* und einer Zunahme der Krankheitsaktivität bei CU festgestellt werden (Machiels et al. 2014). In einer weiteren Arbeit konnte eine Verbindung zwischen dem Fehlen von *Roseburia* und einem erhöhten Risiko für das Auftreten einer Pouchitis nach einer Kolektomie bei CU dargestellt werden (Machiels et al. 2017).

Faecalibacterium prausnitzii, welches in Woche 1 bis Woche 3 eine erhöhte Abundanz aufwies, ist ein bekannter Butyrat-produzierender Stamm, von dem angenommen wird, dass er entzündungshemmende Eigenschaften besitzt (Sokol et al. 2008). In einer weiteren Studie von Sokol et al. 2009 wurde beschrieben, dass es zu einer verminderten Abundanz von *Faecalibacterium prausnitzii* bei CED kommen kann (Sokol et al. 2009). Die Abundanz von *Faecalibacterien* in Woche 1 bis Woche 3 könnte somit auf eine Induktion des Wachstums durch die Vitamin D-Substitution hindeuten. *Barnesiella*, welches unter Vitamin D-Substitution vermehrt zu Woche 1 auftrat, hatte in vorausgegangenen Studien ebenfalls zu einer Reduzierung der Entzündungsaktivität geführt (Ubeda et al. 2013).

Zusammenfassend zeigte sich eine erhöhte Abundanz von verschiedenen Bakterienklassen unter Vitamin D-Substitution, in den oben genannten Studien waren

diese eher mit einem positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf assoziiert. Es wäre denkbar, diese Bakterien auch perspektivisch therapeutisch im Sinne einer Probiotika-Therapie, möglicherweise auch in Kombination mit Vitamin D zu nutzen.

Die Rolle der Probiotika in der Behandlung des M. Crohn ist weiterhin umstritten. Während Probiotika bei Patienten mit CU in bestimmten, genau definierten klinischen Situationen einen positiven Effekt aufzuweisen scheinen, konnte die Wirksamkeit bei M. Crohn bisher nicht abschließend geklärt werden (Derwa et al. 2017; Rahimi et al. 2008). In einem Maus-Colitis-Modell war ebenfalls Vitamin D notwendig, um eine positive probiotische Wirkung bei einer intestinalen Inflammation zu erzielen (Wu et al. 2015).

Auf Grundlage der vorliegenden Daten ist es prinzipiell vorstellbar, dass es unter Vitamin D-Substitution zu einer erhöhten Abundanz von Bakteriengenera kommt, welche potenziell antiinflammatorische Eigenschaften für die Darmmukosa und somit einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf bei M. Crohn haben könnten. Vitamin D könnte somit theoretisch eine mögliche probiotische Kapazität dieser Stämme über eine Erhöhung ihrer Abundanz beeinflussen. Zur Untersuchung dieser These wären jedoch weitere Arbeiten an einem größeren Patientenkollektiv notwendig.

In Betrachtung aller Ergebnisse der vorliegenden Studie bleiben weiterhin Fragen bezüglich des Zusammenhanges zwischen dem Einfluss von Vitamin D auf die intestinale bakterielle Zusammensetzung. Die unter Vitamin D-Substitution erfolgten Veränderungen der Darmmikrobiota sprechen möglicherweise für eine positive Beeinflussung des Krankheitsgeschehen, weswegen der rechtzeitige Beginn einer Substitutionstherapie weiter untersucht werden sollte. Die aktuelle S3-Leitlinie zur Therapie des M. Crohn greift dieses Thema ebenfalls auf und empfiehlt in Risikosituationen (Steroidtherapie, Resektion und/oder akuter Schub des terminalen Ileums, Malnutrition und Therapie mit Immunsuppressiva) den Vitamin D-Spiegel im Blut zu bestimmen. Weiterhin soll ein nachgewiesener Vitamin D-Mangel korrigiert werden (Sturm et al. 2022a).

Die genaue Wirkung der einzelnen Bakterienstämme auf den Krankheitsverlauf konnten in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden, wobei es sinnvoll erscheint, hier weitere Studien durchzuführen.

Zusammenfassend erscheint die Gabe von Vitamin D bei CED-Patienten, vor allem bei bestimmten Risikosituationen, in Anbetracht unserer Ergebnisse einen möglichen

sinnvollen Effekt zu haben. Negative Effekte einer Vitamin D-Substitution konnten hier nicht beobachtet werden. Eine umfassendere Studie mit einer höheren Fallzahl an Patienten sowie über einen längeren Zeitraum hinweg könnten die weiteren Veränderungen der Darmmikrobiota sowie mögliche Langzeitfolgen der Vitamin D-Substitution abbilden. Ebenfalls könnten dadurch weitere Untersuchungen der Effekte der verschiedenen Bakterienstämme auf den Krankheitsverlauf ermöglicht werden. Dies könnte dann des Weiteren einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Pathogenese von M. Crohn sowie zur Entwicklung eines möglichen Therapieansatzes mit Probiotika leisten.

vii. Zusammenfassung

Weiterhin wird bei der Entstehung der CED von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen. Hierbei spielen neben genetischen Ursachen und Umweltfaktoren auch Veränderungen des intestinalen Mikrobioms eine Schlüsselrolle in der Pathogenese als auch dem klinischen Verlauf von CED. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit M. Crohn und CU im Vergleich zu gesunden Probanden eine veränderte mikrobielle Zusammensetzung aufweisen. Als wichtiger Umweltfaktor, welcher ebenfalls in der Entstehung von CED diskutiert wird, gilt das Vitamin D. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob eine Vitamin D-Substitution einen Einfluss auf die bakterielle Zusammensetzung im Darm hat. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bakterienzusammensetzung im Stuhl bei 7 M. Crohn Patienten und 10 gesunden Probanden untersucht. Alle Teilnehmer wiesen zu Beginn einen Vitamin D-Mangel auf und erhielten während der Studie eine hochdosierte Vitamin D Substitution.

Im Verlauf erfolgten wöchentlich Blutentnahmen zur Kontrolle des Vitamin D-Spiegels sowie Stuhlproben zur Analyse der verschiedenen Bakterienzusammensetzung mittels der 16R mRNA Genamplikon Sequenzierung.

Unter der Vitamin D-Substitution kam es, sowohl bei den M. Crohn Patienten als auch gesunder Probanden zu einem signifikanten Anstieg des 25-OH-Vitamin D-Spiegels. Der Anstieg war hierbei bei beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Bei den M. Crohn-Patienten kam es weiterhin zu einem nicht signifikanten Abfall des Calprotectin-Spiegels sowie des CDAI-Wertes.

Weiterhin kam es unter der Vitamin D-Substitution zu einer temporären Verschiebung der Darmmikrobiota in Woche 1 bei den M. Crohn Patienten, welche jedoch nicht bei den gesunden Probanden auftrat. Die Bakterienpopulationen in Woche 1 bei den Patienten mit M. Crohn war hierbei signifikant unterschiedlich zu denen in Woche 2,3 und 4 jedoch nicht zu denen in Woche 0.

Des Weiteren trat bei den M. Crohn Patienten eine Änderung der Abundanzen der am häufigsten auftretenden Bakterienstämme in Abhängigkeit von der Vitamin D-Substitution auf. Besonders zu erwähnen sind hierbei Parabacteroides sowie Alistipes, welche beide von besonderem Interesse für die Pathogenese von CED zu sein scheinen. Bei den Parabacteroides kam es initial zu einer verringerten Häufigkeit, gefolgt von einem Anstieg in Woche 3 und 4, was auf ein vermehrtes Wachstum der

Spezies durch die erfolgte Vitamin D-Substitution hindeuten könnte. Bei den *Alistipes* hingegen kam es in den ersten beiden Wochen zu einer Zunahme der Häufigkeit. Bei beiden Spezies konnte in verschiedenen Studien eine positive Wirkung auf den Wirt festgestellt werden, sodass es für eine Klärung der mögliche Wachstumsinduktion durch eine Vitamin D Substitution weiterer Studien bedarf.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Rolle von Vitamin D in der Pathogenese sowie dem Krankheitsverlauf von CED nicht abschließend geklärt werden kann. Die vorliegende Arbeit gibt einen möglichen Hinweis darauf, dass eine Vitamin D-Substitution einen Einfluss auf die bakterielle Zusammensetzung bei M. Crohn Patienten hat. Es bleibt weiterhin spekulativ, ob eine Vitamin D-Substitution zu einer Erhöhung von potenziell benefiziellen Bakteriengenera führt. Letztendlich müssen die in dieser Studie nachgewiesenen Veränderungen noch einem größeren Patientenkollektiv bestätigt werden.

VIII. Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

- Abraham, Clara; Cho, Judy H. (2009): Inflammatory bowel disease. In: *The New England journal of medicine* 361 (21), S. 2066–2078. DOI: 10.1056/NEJMra0804647.
- Ananthkrishnan, Ashwin N. (2015): Epidemiology and risk factors for IBD. In: *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 12 (4), S. 205–217. DOI: 10.1038/nrgastro.2015.34.
- Ananthkrishnan, Ashwin N.; Cagan, Andrew; Gainer, Vivian S.; Cai, Tianxi; Cheng, Su-Chun; Savova, Guergana et al. (2013): Normalization of plasma 25-hydroxy vitamin D is associated with reduced risk of surgery in Crohn's disease. In: *Inflammatory bowel diseases* 19 (9), S. 1921–1927. DOI: 10.1097/MIB.0b013e3182902ad9.
- Ananthkrishnan, Ashwin N.; Khalili, Hamed; Higuchi, Leslie M.; Bao, Ying; Korzenik, Joshua R.; Giovannucci, Edward L. et al. (2012): Higher predicted vitamin D status is associated with reduced risk of Crohn's disease. In: *Gastroenterology* 142 (3), S. 482–489. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.11.040.
- Aoki, Masayo; Aoki, Hiroaki; Ramanathan, Rajesh; Hait, Nitai C.; Takabe, Kazuaki (2016): Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Immune Cells and Inflammation: Roles and Therapeutic Potential. In: *Mediators of inflammation* 2016, S. 8606878. DOI: 10.1155/2016/8606878.
- Appenrodt, Beate; Grünhage, Frank; Gentemann, Martin G.; Thyssen, Lydia; Sauerbruch, Tilman; Lammert, Frank (2010): Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) variants are genetic risk factors for death and spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 51 (4), S. 1327–1333. DOI: 10.1002/hep.23440.
- Baumgart, Daniel C.; Carding, Simon R. (2007): Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. In: *The Lancet* 369 (9573), S. 1627–1640. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60750-8.
- Baumgart, Daniel C.; Sandborn, William J. (2007): Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. In: *The Lancet* 369 (9573), S. 1641–1657. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60751-X.
- Baumgart, Daniel C.; Sandborn, William J. (2012): Crohn's disease. In: *The Lancet* 380 (9853), S. 1590–1605. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60026-9.
- Bernell, O.; Lapidus, A.; Hellers, G. (2000): Risk factors for surgery and postoperative recurrence in Crohn's disease. In: *Annals of surgery* 231 (1), S. 38–45. DOI: 10.1097/00000658-200001000-00006.
- Bernstein, C. N.; Blanchard, J. F.; Rawsthorne, P.; Wajda, A. (1999): Epidemiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in a central Canadian province: a population-based study. In: *American journal of epidemiology* 149 (10), S. 916–924. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a009735.
- Best, W. R.; Beckett, J. M.; Singleton, J. W.; Kern, F., JR (1976): Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. In: *Gastroenterology* 70 (3), S. 439–444.

-
- Best, William R. (2006): Predicting the Crohn's disease activity index from the Harvey-Bradshaw Index. In: *Inflammatory bowel diseases* 12 (4), S. 304–310. DOI: 10.1097/01.MIB.0000215091.77492.2a.
- Blanchard, J. F.; Bernstein, C. N.; Wajda, A.; Rawsthorne, P. (2001): Small-area variations and sociodemographic correlates for the incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis. In: *American journal of epidemiology* 154 (4), S. 328–335. DOI: 10.1093/aje/154.4.328.
- Bokemeyer, B. (2007): CED-Behandlung in Deutschland. In: *Gastroenterologe* 2 (6), S. 447–455. DOI: 10.1007/s11377-007-0113-6.
- Bours, P. H. A.; Wienders, J. P. M.; Vermeijden, J. R.; van de Wiel, A. (2011): Seasonal variation of serum 25-hydroxyvitamin D levels in adult patients with inflammatory bowel disease. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 22 (11), S. 2857–2867. DOI: 10.1007/s00198-010-1484-y.
- Büning, C.; Genschel, J.; Bühner, S.; Krüger, S.; Kling, K.; Dignass, A. et al. (2004): Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Crohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation (10). Online verfügbar unter <http://arxiv.org/pdf/2004.01967v1>.
- Cadwell, Ken; Liu, John Y.; Brown, Sarah L.; Miyoshi, Hiroyuki; Loh, Joy; Lennerz, Jochen K. et al. (2008): A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. In: *Nature* 456 (7219), S. 259–263. DOI: 10.1038/nature07416.
- Cantorna, Margherita T.; McDaniel, Kaitlin; Bora, Stephanie; Chen, Jing; James, Jamaal (2014): Vitamin D, immune regulation, the microbiota, and inflammatory bowel disease. In: *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 239 (11), S. 1524–1530. DOI: 10.1177/1535370214523890.
- Cantorna, Margherita T.; Zhu, Yan; Froicu, Monica; Wittke, Anja (2004): Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, and the immune system. In: *The American journal of clinical nutrition* 80 (6 Suppl), 1717S–20S. DOI: 10.1093/ajcn/80.6.1717S.
- Caporaso, J. Gregory; Kuczynski, Justin; Stombaugh, Jesse; Bittinger, Kyle; Bushman, Frederic D.; Costello, Elizabeth K. et al. (2010): QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. In: *Nature methods* 7 (5), S. 335–336. DOI: 10.1038/nmeth.f.303.
- Castro, Francisca Dias De; Magalhães, Joana; Carvalho, Pedro Boal; Moreira, Maria João; Mota, Paula; Cotter, José (2015): LOWER LEVELS OF VITAMIN D CORRELATE WITH CLINICAL DISEASE ACTIVITY AND QUALITY OF LIFE IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE. In: *Arquivos de gastroenterologia* 52 (4), S. 260–265. DOI: 10.1590/S0004-28032015000400003.
- Cheng, Jeffrey B.; Levine, Michael A.; Bell, Norman H.; Mangelsdorf, David J.; Russell, David W. (2004): Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (20), S. 7711–7715. DOI: 10.1073/pnas.0402490101.
- Colombel, Jean-Frédéric; Sands, Bruce E.; Rutgeerts, Paul; Sandborn, William; Danese, Silvio; D'Haens, Geert et al. (2017): The safety of vedolizumab for ulcerative colitis and Crohn's disease. In: *Gut* 66 (5), S. 839–851. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-311079.
-

Cooney, Rachel; Baker, John; Brain, Oliver; Danis, Benedicte; Pichulik, Tica; Allan, Philip et al. (2010): NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. In: *Nature medicine* 16 (1), S. 90–97. DOI: 10.1038/nm.2069.

Crohn, Burrill B.; Ginzburg, Leon; Oppenheimer, Gordon D. (1932): REGIONAL ILEITIS: A PATHOLOGIC AND CLINICAL ENTITY. In: *JAMA* 99 (16), S. 1323–1329. DOI: 10.1001/jama.1932.02740680019005.

Curic, Nikola; Ilincic, Branislava; Milic, Natasa; Cabarkapa, Velibor; Nikolic, Stanislava; Medic-Stojanoska, Milica et al. (2018): The relationship between the vitamin serum 25(OH)D and the B12 concentrations in obese women. In: *Minerva medica* 109 (2), S. 79–87. DOI: 10.23736/S0026-4806.17.05447-7.

Cuthbert, Andrew P.; Fisher, Sheila A.; Mirza, Muddassar M.; King, Kathy; Hampe, Jochen; Croucher, Peter J. P. et al. (2002a): The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. In: *Gastroenterology* 122 (4), S. 867–874. DOI: 10.1053/gast.2002.32415.

Cuthbert, Andrew P.; Fisher, Sheila A.; Mirza, Muddassar M.; King, Kathy; Hampe, Jochen; Croucher, Peter J. P. et al. (2002b): The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. In: *Gastroenterology* 122 (4), S. 867–874. DOI: 10.1053/gast.2002.32415.

Derwa, Y.; Gracie, D. J.; Hamlin, P. J.; Ford, A. C. (2017): Systematic review with meta-analysis: the efficacy of probiotics in inflammatory bowel disease. In: *Alimentary pharmacology & therapeutics* 46 (4), S. 389–400. DOI: 10.1111/apt.14203.

Dicksved, Johan; Halfvarson, Jonas; Rosenquist, Magnus; Järnerot, Gunnar; Tysk, Curt; Apajalahti, Juha et al. (2008): Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. In: *The ISME journal* 2 (7), S. 716–727. DOI: 10.1038/ismej.2008.37.

Dionne, S.; Calderon, M. R.; White, J. H.; Memari, B.; Elimrani, I.; Adelson, B. et al. (2014): Differential effect of vitamin D on NOD2- and TLR-induced cytokines in Crohn's disease. In: *Mucosal immunology* 7 (6), S. 1405–1415. DOI: 10.1038/mi.2014.30.

Dumitrescu, Gabriela; Mihai, Catalina; Dranga, Mihaela; Prelipcean, Cristina Cijevschi (2014): Serum 25-hydroxyvitamin D concentration and inflammatory bowel disease characteristics in Romania. In: *World journal of gastroenterology* 20 (9), S. 2392–2396. DOI: 10.3748/wjg.v20.i9.2392.

Dziarski, Roman; Park, Shin Yong; Des Kashyap, Raj; Dowd, Scot E.; Gupta, Dipika (2016): Pglyrp-Regulated Gut Microflora *Prevotella falsenii*, *Parabacteroides distasonis* and *Bacteroides eggerthii* Enhance and *Alistipes finegoldii* Attenuates Colitis in Mice. In: *PloS one* 11 (1), e0146162. DOI: 10.1371/journal.pone.0146162.

Farmer, R. G.; Hawk, W. A.; Turnbull, R. B., JR (1975): Clinical patterns in Crohn's disease: a statistical study of 615 cases. In: *Gastroenterology* 68 (4 Pt 1), S. 627–635.

Faubion, W. A.; Loftus, E. V.; Harmsen, W. S.; Zinsmeister, A. R.; Sandborn, W. J. (2001): The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. In: *Gastroenterology* 121 (2), S. 255–260. DOI: 10.1053/gast.2001.26279.

Feagan, Brian G.; Sandborn, William J.; Gasink, Christopher; Jacobstein, Douglas; Lang, Yinghua; Friedman, Joshua R. et al. (2016): Ustekinumab as Induction and Maintenance

Therapy for Crohn's Disease. In: *The New England journal of medicine* 375 (20), S. 1946–1960. DOI: 10.1056/NEJMoa1602773.

Feuerstein, Joseph D.; Cheifetz, Adam S. (2017): Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. In: *Mayo Clinic proceedings* 92 (7), S. 1088–1103. DOI: 10.1016/j.mayocp.2017.04.010.

Fischer, S.; Rath, T.; Neurath, M. F. (2018): Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen : Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. In: *Der Internist* 59 (7), S. 681–693. DOI: 10.1007/s00108-018-0442-1.

Fishbein, T.; Novitskiy, G.; Mishra, L.; Matsumoto, C.; Kaufman, S.; Goyal, S. et al. (2008): NOD2-expressing bone marrow-derived cells appear to regulate epithelial innate immunity of the transplanted human small intestine. In: *Gut* 57 (3), S. 323–330. DOI: 10.1136/gut.2007.133322.

Frank, Daniel N.; Robertson, Charles E.; Hamm, Christina M.; Kpadeh, Zegbeh; Zhang, Tianyi; Chen, Hongyan et al. (2011): Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. In: *Inflammatory bowel diseases* 17 (1), S. 179–184. DOI: 10.1002/ibd.21339.

Fraser, A. G.; Orchard, T. R.; Jewell, D. P. (2002): The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. In: *Gut* 50 (4), S. 485–489. DOI: 10.1136/gut.50.4.485.

Fraser, Alan G. (2003): Methotrexate: first-line or second-line immunomodulator? In: *European journal of gastroenterology & hepatology* 15 (3), S. 225–231. DOI: 10.1097/01.meg.0000049994.68425.dd.

Gasche, C. (2000): Complications of inflammatory bowel disease. In: *Hepato-gastroenterology* 47 (31), S. 49–56.

Gröber, Uwe; Spitz, Jörg; Reichrath, Jörg; Kisters, Klaus; Holick, Michael F. (2013): Vitamin D: Update 2013: From rickets prophylaxis to general preventive healthcare. In: *Dermato-endocrinology* 5 (3), S. 331–347. DOI: 10.4161/derm.26738.

Guo, Chunxiao; Sinnott, Brian; Niu, Brenda; Lowry, Malcolm B.; Fantacone, Mary L.; Gombart, Adrian F. (2014): Synergistic induction of human cathelicidin antimicrobial peptide gene expression by vitamin D and stilbenoids. In: *Molecular nutrition & food research* 58 (3), S. 528–536. DOI: 10.1002/mnfr.201300266.

Halfvarson, Jonas; Bodin, Lennart; Tysk, Curt; Lindberg, Eva; Järnerot, Gunnar (2003): Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. In: *Gastroenterology* 124 (7), S. 1767–1773. DOI: 10.1016/S0016-5085(03)00385-8.

Hampe, Jochen; Frenzel, Henning; Mirza, Muddassar M.; Croucher, Peter J. P.; Cuthbert, Andrew; Mascheretti, Silvia et al. (2002): Evidence for a NOD2-independent susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16p. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (1), S. 321–326. DOI: 10.1073/pnas.261567999.

-
- Harrison, Stephanie R.; Li, Danyang; Jeffery, Louisa E.; Raza, Karim; Hewison, Martin (2019): Vitamin D, Autoimmune Disease and Rheumatoid Arthritis. In: *Calcified tissue international*. DOI: 10.1007/s00223-019-00577-2.
- Harten, P. (2005): Folsäure zur Reduktion der Methotrexat-Toxizität. In: *Zeitschrift für Rheumatologie* 64 (5), S. 353–358. DOI: 10.1007/s00393-005-0638-3.
- Harvey, R. F.; Bradshaw, J. M. (1980): A SIMPLE INDEX OF CROHN'S-DISEASE ACTIVITY. In: *The Lancet* 315 (8167), S. 514. DOI: 10.1016/s0140-6736(80)92767-1.
- Herrlinger, K.; Stange, E. F. (2000): Azathioprin bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Die Evidenzbasis. In: *Medizinische Klinik (Munich, Germany : 1983)* 95 (4), S. 201–206. DOI: 10.1007/pl00002107.
- Heuman, R.; Boeryd, B.; Bolin, T.; Sjö Dahl, R. (1983): The influence of disease at the margin of resection on the outcome of Crohn's disease. In: *The British journal of surgery* 70 (9), S. 519–521. DOI: 10.1002/bjs.1800700904.
- Hewison, Martin (2010): Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. In: *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 39 (2), 365-79, table of contents. DOI: 10.1016/j.ecl.2010.02.010.
- Hlavaty, Tibor; Krajcovicova, Anna; Payer, Juraj (2015): Vitamin D therapy in inflammatory bowel diseases: who, in what form, and how much? In: *Journal of Crohn's & colitis* 9 (2), S. 198–209. DOI: 10.1093/ecco-jcc/jju004.
- Ho, Shuk-Mei; Lewis, James D.; Mayer, Emeran A.; Plevy, Scott E.; Chuang, Emil; Rappaport, Stephen M. et al. (2019): Challenges in IBD Research: Environmental Triggers. In: *Inflammatory bowel diseases* 25 (Suppl 2), S13-S23. DOI: 10.1093/ibd/izz076.
- Hoffmann, J. C.; Preiss, J. C.; Autschbach, F.; Buhr, H. J.; Häuser, W.; Herrlinger, K. et al. (2008): S3-Leitlinie "Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn". In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* 46 (9), S. 1094–1146. DOI: 10.1055/s-2008-1027796.
- Holick, Michael F. (2004): Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. In: *The American journal of clinical nutrition* 80 (6 Suppl), 1678S-88S. DOI: 10.1093/ajcn/80.6.1678S.
- Holick, Michael F. (2006): High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. In: *Mayo Clinic proceedings* 81 (3), S. 353–373. DOI: 10.4065/81.3.353.
- Holick, Michael F. (2007): Vitamin D deficiency. In: *The New England journal of medicine* 357 (3), S. 266–281. DOI: 10.1056/NEJMra070553.
- Hugot, J. P.; Chamaillard, M.; Zouali, H.; Lesage, S.; Cézard, J. P.; Belaiche, J. et al. (2001): Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. In: *Nature* 411 (6837), S. 599–603. DOI: 10.1038/35079107.
- Jin, Dapeng; Wu, Shaoping; Zhang, Yong-Guo; Lu, Rong; Xia, Yinglin; Dong, Hui; Sun, Jun (2015): Lack of Vitamin D Receptor Causes Dysbiosis and Changes the Functions of the Murine Intestinal Microbiome. In: *Clinical therapeutics* 37 (5), 996-1009.e7. DOI: 10.1016/j.clinthera.2015.04.004.
-

Joossens, Marie; Huys, Geert; Cnockaert, Margo; Preter, Vicky de; Verbeke, Kristin; Rutgeerts, Paul et al. (2011): Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. In: *Gut* 60 (5), S. 631–637. DOI: 10.1136/gut.2010.223263.

Jørgensen, S. P.; Agnholt, J.; Glerup, H.; Lyhne, S.; Villadsen, G. E.; Hvas, C. L. et al. (2010): Clinical trial: vitamin D3 treatment in Crohn's disease - a randomized double-blind placebo-controlled study. In: *Alimentary pharmacology & therapeutics* 32 (3), S. 377–383. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2010.04355.x.

Jostins, Luke; Ripke, Stephan; Weersma, Rinse K.; Duerr, Richard H.; McGovern, Dermot P.; Hui, Ken Y. et al. (2012): Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. In: *Nature* 491 (7422), S. 119–124. DOI: 10.1038/nature11582.

Khalili, Hamed; Huang, Edward S.; Ananthakrishnan, Ashwin N.; Higuchi, Leslie; Richter, James M.; Fuchs, Charles S.; Chan, Andrew T. (2012a): Geographical variation and incidence of inflammatory bowel disease among US women. In: *Gut* 61 (12), S. 1686–1692. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-301574.

Khalili, Hamed; Huang, Edward S.; Ananthakrishnan, Ashwin N.; Higuchi, Leslie; Richter, James M.; Fuchs, Charles S.; Chan, Andrew T. (2012b): Geographical variation and incidence of inflammatory bowel disease among US women. In: *Gut* 61 (12), S. 1686–1692. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-301574.

Klindworth, Anna; Pruesse, Elmar; Schweer, Timmy; Peplies, Jörg; Quast, Christian; Horn, Matthias; Glöckner, Frank Oliver (2013a): Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. In: *Nucleic acids research* 41 (1), e1. DOI: 10.1093/nar/gks808.

Klindworth, Anna; Pruesse, Elmar; Schweer, Timmy; Peplies, Jörg; Quast, Christian; Horn, Matthias; Glöckner, Frank Oliver (2013b): Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. In: *Nucleic acids research* 41 (1), e1. DOI: 10.1093/nar/gks808.

Kucharzik, Torsten; Dignass, Axel U.; Atreya, Raja; Bokemeyer, Bernd; Esters, Philip; Herrlinger, Klaus et al. (2019): Aktualisierte S3-Leitlinie Colitis ulcerosa. In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* 57 (11), S. 1321–1405. DOI: 10.1055/a-1015-7265.

Kupka, Tomas; Simova, Jarmila; Dvorackova, Jana; Martinek, Lubomir; Motyka, Oldrich; Uvirova, Magdalena; Dite, Petr (2018): Crohn's disease - genetic factors and progress of the disease. In: *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 162 (2), S. 139–143. DOI: 10.5507/bp.2017.058.

Kverka, M.; Zakostelska, Z.; Klimesova, K.; Sokol, D.; Hudcovic, T.; Hrnčir, T. et al. (2011): Oral administration of Parabacteroides distasonis antigens attenuates experimental murine colitis through modulation of immunity and microbiota composition. In: *Clinical and experimental immunology* 163 (2), S. 250–259. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2010.04286.x.

Landfried, K.; Bataille, F.; Rogler, G.; Brenmoehl, J.; Kosovac, K.; Wolff, D. et al. (2010): Recipient NOD2/CARD15 status affects cellular infiltrates in human intestinal graft-versus-host disease. In: *Clinical and experimental immunology* 159 (1), S. 87–92. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2009.04049.x.

-
- Lee, Ji Yeon; So, Tsz-Yin; Thackray, Jennifer (2013): A review on vitamin d deficiency treatment in pediatric patients. In: *The journal of pediatric pharmacology and therapeutics : JPPT : the official journal of PPAG* 18 (4), S. 277–291. DOI: 10.5863/1551-6776-18.4.277.
- Ley, Ruth E.; Peterson, Daniel A.; Gordon, Jeffrey I. (2006): Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. In: *Cell* 124 (4), S. 837–848. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.017.
- Li, Weizhong; Godzik, Adam (2006): Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 22 (13), S. 1658–1659. DOI: 10.1093/bioinformatics/btl158.
- Liu, Jimmy Z.; van Sommeren, Suzanne; Huang, Hailiang; Ng, Siew C.; Alberts, Rudi; Takahashi, Atsushi et al. (2015): Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. In: *Nature genetics* 47 (9), S. 979–986. DOI: 10.1038/ng.3359.
- Liu, Ta-Chiang; Stappenbeck, Thaddeus S. (2016): Genetics and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. In: *Annual review of pathology* 11, S. 127–148. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012615-044152.
- Lohan, Christoph; Diamantopoulos, Alex; LeReun, Corinne; Wright, Emily; Bohm, Natalie; Sawyer, Laura Marie (2019): Tofacitinib for the treatment of moderately to severely active ulcerative colitis: a systematic review, network meta-analysis and economic evaluation. In: *BMJ open gastroenterology* 6 (1), e000302. DOI: 10.1136/bmjgast-2019-000302.
- M. Orholm, V. Binder, T. I. A. Sørensen, L. P. Rasmussen, K. O. Kyvik (2000): Concordance of Inflammatory Bowel Disease among Danish Twins: Results of a Nationwide Study. In: *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 35 (10), S. 1075–1081. DOI: 10.1080/003655200451207.
- Machiels, Kathleen; Joossens, Marie; Sabino, João; Preter, Vicky de; Arijs, Ingrid; Eeckhaut, Venessa et al. (2014): A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. In: *Gut* 63 (8), S. 1275–1283. DOI: 10.1136/gutjnl-2013-304833.
- Machiels, Kathleen; Sabino, João; Vandermosten, Leen; Joossens, Marie; Arijs, Ingrid; Bruyn, Magali de et al. (2017): Specific members of the predominant gut microbiota predict pouchitis following colectomy and IPAA in UC. In: *Gut* 66 (1), S. 79–88. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-309398.
- Manichanh, C.; Rigottier-Gois, L.; Bonnaud, E.; Gloux, K.; Pelletier, E.; Frangeul, L. et al. (2006): Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. In: *Gut* 55 (2), S. 205–211. DOI: 10.1136/gut.2005.073817.
- McCracken, V. J.; Lorenz, R. G. (2001): The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. In: *Cellular Microbiology* 3 (1), S. 1–11. DOI: 10.1046/j.1462-5822.2001.00090.x.
- Misselwitz, Benjamin; Senn, Jon-Duri (2022): Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-Modulatoren bei Colitis ulcerosa – Game Changer oder einer unter vielen? In: *Schweiz. Gastroenterol.* 3 (4), S. 161–164. DOI: 10.1007/s43472-022-00087-x.
-

Molodecky, Natalie A.; Soon, Ing Shian; Rabi, Doreen M.; Ghali, William A.; Ferris, Mollie; Chernoff, Greg et al. (2012): Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. In: *Gastroenterology* 142 (1), 46-54.e42; quiz e30. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.10.001.

Mouli, V. P.; Ananthkrishnan, A. N. (2014): Review article: vitamin D and inflammatory bowel diseases. In: *Alimentary pharmacology & therapeutics* 39 (2), S. 125–136. DOI: 10.1111/apt.12553.

Naser, Saleh A.; Arce, Melissa; Khaja, Anam; Fernandez, Marlene; Naser, Najih; Elwasila, Sammer; Thanigachalam, Saisathya (2012): Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis. In: *World journal of gastroenterology* 18 (5), S. 412–424. DOI: 10.3748/wjg.v18.i5.412.

Nielsen, Ole Haagen; Hansen, Thomas Irgens; Gubatan, John Mark; Jensen, Kim Bak; Rejnmark, Lars (2019): Managing vitamin D deficiency in inflammatory bowel disease. In: *Frontline gastroenterology* 10 (4), S. 394–400. DOI: 10.1136/flgastro-2018-101055.

Nielsen, Ole Haagen; Rejnmark, Lars; Moss, Alan C. (2018): Role of Vitamin D in the Natural History of Inflammatory Bowel Disease. In: *Journal of Crohn's & colitis* 12 (6), S. 742–752. DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjy025.

Nunes, Tiago; Fiorino, Gionata; Danese, Silvio; Sans, Miquel (2011): Familial aggregation in inflammatory bowel disease: is it genes or environment? In: *World journal of gastroenterology* 17 (22), S. 2715–2722. DOI: 10.3748/wjg.v17.i22.2715.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A: frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411(6837):603–06.

Ommer, Andreas; Herold, Alexander; Berg, Eugen; Fürst, Alois; Post, Stefan; Ruppert, Reinhard et al. (2017): German S3 guidelines: anal abscess and fistula (second revised version). In: *Langenbeck's archives of surgery* 402 (2), S. 191–201. DOI: 10.1007/s00423-017-1563-z.

Ooi, Jot Hui; Li, Yunfei; Rogers, Connie J.; Cantorna, Margherita T. (2013): Vitamin D regulates the gut microbiome and protects mice from dextran sodium sulfate-induced colitis. In: *The Journal of nutrition* 143 (10), S. 1679–1686. DOI: 10.3945/jn.113.180794.

Ott, Claudia; Obermeier, Florian; Thieler, Sabine; Kemptner, Daniela; Bauer, Alexandra; Schölmerich, Jürgen et al. (2008): The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. In: *European journal of gastroenterology & hepatology* 20 (9), S. 917–923. DOI: 10.1097/MEG.0b013e3282f97b33.

Ott, S. J.; Musfeldt, M.; Wenderoth, D. F.; Hampe, J.; Brant, O.; Fölsch, U. R. et al. (2004): Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. In: *Gut* 53 (5), S. 685–693. DOI: 10.1136/gut.2003.025403.

Oyvind Hammer; David A.T. Harper; and Paul D. Ryan: PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis.

Parker, Bianca J.; Wearsch, Pamela A.; Veloo, Alida C. M.; Rodriguez-Palacios, Alex (2020): The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. In: *Frontiers in immunology* 11, S. 906. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00906.

-
- Peterson, Daniel A.; Frank, Daniel N.; Pace, Norman R.; Gordon, Jeffrey I. (2008): Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. In: *Cell host & microbe* 3 (6), S. 417–427. DOI: 10.1016/j.chom.2008.05.001.
- Petnicki-Ocwieja, Tanja; Hrnčir, Tomas; Liu, Yuen-Joyce; Biswas, Amlan; Hudcovic, Tomas; Tlaskalova-Hogenova, Helena; Kobayashi, Koichi S. (2009): Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (37), S. 15813–15818. DOI: 10.1073/pnas.0907722106.
- Preiß, J. C.; Bokemeyer, B.; Buhr, H. J.; Dignaß, A.; Häuser, W.; Hartmann, F. et al. (2014): Aktualisierte S3-Leitlinie--"Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn" 2014. In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* 52 (12), S. 1431–1484. DOI: 10.1055/s-0034-1385199.
- Preiß, Jan: Aktualisierte Leitlinie.
- Pruesse, Elmar; Peplies, Jörg; Glöckner, Frank Oliver (2012): SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 28 (14), S. 1823–1829. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts252.
- QIAGEN GmbH: QIAamp Fast DNA Stool Mini Handbook.
- Qin, Junjie; Li, Ruiqiang; Raes, Jeroen; Arumugam, Manimozhiyan; Burgdorf, Kristoffer Solvsten; Manichanh, Chaysavanh et al. (2010): A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. In: *Nature* 464 (7285), S. 59–65. DOI: 10.1038/nature08821.
- Rahimi, Roja; Nikfar, Shekoufeh; Rahimi, Fatemeh; Elahi, Behzad; Derakhshani, Saeed; Vafaie, Mohammad; Abdollahi, Mohammad (2008): A meta-analysis on the efficacy of probiotics for maintenance of remission and prevention of clinical and endoscopic relapse in Crohn's disease. In: *Digestive diseases and sciences* 53 (9), S. 2524–2531. DOI: 10.1007/s10620-007-0171-0.
- Reich, Krista M.; Fedorak, Richard N.; Madsen, Karen; Kroeker, Karen I. (2014): Vitamin D improves inflammatory bowel disease outcomes: basic science and clinical review. In: *World journal of gastroenterology* 20 (17), S. 4934–4947. DOI: 10.3748/wjg.v20.i17.4934.
- Reich, Krista M.; Fedorak, Richard N.; Madsen, Karen; Kroeker, Karen I. (2016): Role of Vitamin D in Infliximab-induced Remission in Adult Patients with Crohn's Disease. In: *Inflammatory bowel diseases* 22 (1), S. 92–99. DOI: 10.1097/MIB.0000000000000588.
- Robertson, Charles E.; Harris, J. Kirk; Wagner, Brandie D.; Granger, David; Browne, Kathy; Tatem, Beth et al. (2013): Explicet: graphical user interface software for metadata-driven management, analysis and visualization of microbiome data. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 29 (23), S. 3100–3101. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt526.
- Ross, A. Catharine (2011): Dietary reference intakes. Calcium, vitamin D. Washington DC: National Academies Press.
- Rothfuss, Katja S.; Stange, Eduard F.; Herrlinger, Klaus R. (2006): Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases. In: *World journal of gastroenterology* 12 (30), S. 4819–4831. DOI: 10.3748/wjg.v12.i30.4819.

Sandborn, William J.; Hanauer, Stephen B. (2002): Infliximab in the treatment of Crohn's disease: a user's guide for clinicians. In: *The American journal of gastroenterology* 97 (12), S. 2962–2972. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2002.07093.x.

Sandborn, William J.; van Assche, Gert; Reinisch, Walter; Colombel, Jean-Frederic; D'Haens, Geert; Wolf, Douglas C. et al. (2012): Adalimumab induces and maintains clinical remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. In: *Gastroenterology* 142 (2), 257-65.e1-3. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.10.032.

Sartor, R. Balfour (2008): Microbial influences in inflammatory bowel diseases. In: *Gastroenterology* 134 (2), S. 577–594. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.11.059.

Schäffler, Holger; Schmidt, Martin; Huth, Astrid; Reiner, Johannes; Glass, Änne; Lamprecht, Georg (2018): Clinical factors are associated with vitamin D levels in IBD patients: A retrospective analysis. In: *Journal of digestive diseases* 19 (1), S. 24–32. DOI: 10.1111/1751-2980.12565.

Schöttker, Ben; Haug, Ulrike; Schomburg, Lutz; Köhrle, Joseph; Perna, Laura; Müller, Heiko et al. (2013): Strong associations of 25-hydroxyvitamin D concentrations with all-cause, cardiovascular, cancer, and respiratory disease mortality in a large cohort study. In: *The American journal of clinical nutrition* 97 (4), S. 782–793. DOI: 10.3945/ajcn.112.047712.

Schultz, Michael; Butt, A. Grant (2012): Is the north to south gradient in inflammatory bowel disease a global phenomenon? (6). In: *Expert review of gastroenterology & hepatology* (4), S. 445–447.

Schwartz, David A.; Loftus, Edward V.; Tremaine, William J.; Panaccione, Remo; Harmsen, W. Scott; Zinsmeister, Alan R.; Sandborn, William J. (2002): The natural history of fistulizing Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota. In: *Gastroenterology* 122 (4), S. 875–880. DOI: 10.1053/gast.2002.32362.

Segata, Nicola; Izard, Jacques; Waldron, Levi; Gevers, Dirk; Miropolsky, Larisa; Garrett, Wendy S.; Huttenhower, Curtis (2011): Metagenomic biomarker discovery and explanation. In: *Genome biology* 12 (6), R60. DOI: 10.1186/gb-2011-12-6-r60.

Seksik, P.; Rigottier-Gois, L.; Gramet, G.; Sutren, M.; Pochart, P.; Marteau, P. et al. (2003): Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. In: *Gut* 52 (2), S. 237–242. DOI: 10.1136/gut.52.2.237.

Seksik, P.; Sokol, H.; Lepage, P.; Vasquez, N.; Manichanh, C.; Mangin, I. et al. (2006): Review article: the role of bacteria in onset and perpetuation of inflammatory bowel disease. In: *Alimentary pharmacology & therapeutics* 24 Suppl 3, S. 11–18. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2006.03053.x.

Seminario, Jennifer L.; Loftus, Edward V.; Colombel, Jean-Frédéric; Thapa, Prabin; Sandborn, William J. (2013): Infliximab for Crohn's disease: the first 500 patients followed up through 2009. In: *Digestive diseases and sciences* 58 (3), S. 797–806. DOI: 10.1007/s10620-012-2405-z.

Shepherd, H. A.; Barr, G. D.; Jewell, D. P. (1986): Use of an intravenous steroid regimen in the treatment of acute Crohn's disease. In: *Journal of clinical gastroenterology* 8 (2), S. 154–159. DOI: 10.1097/00004836-198604000-00010.

-
- Shi, Shanzhen; Feng, Jiaying; Zhou, Lixiang; Li, Yu; Shi, Huaxiu (2021): Risk Factors for Vitamin D Deficiency in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. In: *The Turkish journal of gastroenterology : the official journal of Turkish Society of Gastroenterology* 32 (6), S. 508–518. DOI: 10.5152/tjg.2021.20614.
- Silverberg, Mark S.; Satsangi, Jack; Ahmad, Tariq; Arnott, Ian D. R.; Bernstein, Charles N.; Brant, Steven R. et al. (2005): Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. In: *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie* 19 Suppl A, 5A-36A. DOI: 10.1155/2005/269076.
- Sokol, H.; Seksik, P.; Furet, J. P.; Firmesse, O.; Nion-Larmurier, I.; Beaugerie, L. et al. (2009): Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. In: *Inflammatory bowel diseases* 15 (8), S. 1183–1189. DOI: 10.1002/ibd.20903.
- Sokol, Harry; Pigneur, Bénédicte; Watterlot, Laurie; Lakhdari, Omar; Bermúdez-Humarán, Luis G.; Gratadoux, Jean-Jacques et al. (2008): *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (43), S. 16731–16736. DOI: 10.1073/pnas.0804812105.
- Stange, E. F.; Travis, S. P. L.; Vermeire, S.; Beglinger, C.; Kupcinkas, L.; Geboes, K. et al. (2006): European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. In: *Gut* 55 Suppl 1, i1-15. DOI: 10.1136/gut.2005.081950a.
- Steinberg, D. M.; Cooke, W. T.; Alexander-Williams, J. (1973): Abscess and fistulae in Crohn's disease. In: *Gut* 14 (11), S. 865–869. DOI: 10.1136/gut.14.11.865.
- Sturm, Andreas; Atreya, Raja; Bettenworth, Dominik; Bokemeyer, Bernd; Dignaß, Axel; Eehalt, Robert et al. (2022a): Aktualisierte S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“ der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) – August 2021 – AWMF-Registernummer: 021-004. In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* 60 (3), S. 332–418. DOI: 10.1055/a-1713-3941.
- Sturm, Andreas; Atreya, Raja; Bettenworth, Dominik; Bokemeyer, Bernd; Dignaß, Axel; Eehalt, Robert et al. (2022b): Aktualisierte S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“ der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) – August 2021 – AWMF-Registernummer: 021-004. In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* 60 (3), S. 332–418. DOI: 10.1055/a-1713-3941.
- Tabatabaeizadeh, Seyed-Amir; Tafazoli, Niayesh; Ferns, Gordon A.; Avan, Amir; Ghayour-Mobarhan, Majid (2018): Vitamin D, the gut microbiome and inflammatory bowel disease. In: *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences* 23, S. 75. DOI: 10.4103/jrms.JRMS_606_17.
- Takeuchi, Osamu; Akira, Shizuo (2010): Pattern recognition receptors and inflammation. In: *Cell* 140 (6), S. 805–820. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.022.
- Ubeda, Carles; Bucci, Vanni; Caballero, Silvia; Djukovic, Ana; Toussaint, Nora C.; Equinda, Michele et al. (2013): Intestinal microbiota containing *Barnesiella* species cures vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization. In: *Infection and immunity* 81 (3), S. 965–973. DOI: 10.1128/IAI.01197-12.
-

-
- Ungaro, Ryan; Mehandru, Saurabh; Allen, Patrick B.; Peyrin-Biroulet, Laurent; Colombel, Jean-Frédéric (2017): Ulcerative colitis. In: *The Lancet* 389 (10080), S. 1756–1770. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)32126-2.
- van den Bergh, Joop P. W.; Bours, Sandrine P. G.; van Geel, Tineke A. C. M.; Geusens, Piet P. (2011): Optimal use of vitamin D when treating osteoporosis. In: *Current osteoporosis reports* 9 (1), S. 36–42. DOI: 10.1007/s11914-010-0041-0.
- Vetter, Marcel; Neurath, Markus F. (2018): Treatment Perspectives in Crohn's Disease. In: *Digestion* 98 (3), S. 135–142. DOI: 10.1159/000488449.
- Vyas, Usha; Ranganathan, Natarajan (2012): Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond. In: *Gastroenterology research and practice* 2012, S. 872716. DOI: 10.1155/2012/872716.
- Walker, Alan W.; Sanderson, Jeremy D.; Churcher, Carol; Parkes, Gareth C.; Hudspith, Barry N.; Rayment, Neil et al. (2011): High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. In: *BMC microbiology* 11, S. 7. DOI: 10.1186/1471-2180-11-7.
- Wang, Jun; Thingholm, Louise B.; Skiecevičienė, Jurgita; Rausch, Philipp; Kummen, Martin; Hov, Johannes R. et al. (2016): Genome-wide association analysis identifies variation in vitamin D receptor and other host factors influencing the gut microbiota. In: *Nature genetics* 48 (11), S. 1396–1406. DOI: 10.1038/ng.3695.
- Wang, Tian-Tian; Dabbas, Basel; Laperriere, David; Bitton, Ari J.; Soualhine, Hafid; Tavera-Mendoza, Luz E. et al. (2010): Direct and indirect induction by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (4), S. 2227–2231. DOI: 10.1074/jbc.C109.071225.
- Wilkins, Consuelo H.; Sheline, Yvette I.; Roe, Catherine M.; Birge, Stanley J.; Morris, John C. (2006): Vitamin D deficiency is associated with low mood and worse cognitive performance in older adults. In: *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry* 14 (12), S. 1032–1040. DOI: 10.1097/01.JGP.0000240986.74642.7c.
- Wu, Shaoping; Yoon, Sonia; Zhang, Yong-Guo; Lu, Rong; Xia, Yinglin; Wan, Jiandi et al. (2015): Vitamin D receptor pathway is required for probiotic protection in colitis. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 309 (5), G341-9. DOI: 10.1152/ajpgi.00105.2015.
- Yang, Linlin; Weaver, Veronika; Smith, Jill P.; Bingaman, Sandra; Hartman, Terryl J.; Cantorna, Margherita T. (2013): Therapeutic effect of vitamin d supplementation in a pilot study of Crohn's patients. In: *Clinical and translational gastroenterology* 4, e33. DOI: 10.1038/ctg.2013.1.
- Zitomersky, Naamah L.; Atkinson, Benjamin J.; Franklin, Sarah W.; Mitchell, Paul D.; Snapper, Scott B.; Comstock, Laurie E.; Bousvaros, Athos (2013): Characterization of adherent bacteroidales from intestinal biopsies of children and young adults with inflammatory bowel disease. In: *PloS one* 8 (6), e63686. DOI: 10.1371/journal.pone.0063686.
-

IX. **Abbildungsverzeichnis:**

Abbildung 1:	Endoskopisches Bild kolonischer Ulcerationen bei M. Crohn	5
Abbildung 2:	Vitamin D-Quellen, Metabolismus und Effekte nach Hlavaty et al. 2015	13
Abbildung 3:	Studiendesign und Ablauf der Probenentnahme	28
Abbildung 4:	Arbeitsablauf des 16s V3 und V4 Amplicons	32
Abbildung 5:	Veränderungen des Vitamin D-Spiegel bei Pat und GP	44
Abbildung 6:	Veränderungen des CDAI und Calprotectin-Spiegels unter Vit.-D Substitution bei M. Crohn Patienten	46
Abbildung 7:	Nichtmetrische mehrdimensionale Skalierung unterteilt in GP und Pat.	48
Abbildung 8:	Heatmap der Bakteriengemeinschaften unter Gabe von Vitamin D	50
Abbildung 9:	Anzahl der bakteriellen Taxa unter Vitamin D-Substitution in den Wochen 0-4	52

x. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Berechnung des CDAI nach Best et al. 1976	4
Tabelle 2: Berechnung des HBI nach Harvey und Bradshaw 1980	16
Tabelle 3: Im DNA Stool Kit enthaltene Materialien	29
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien für die DNA Stool Extraction	31
Tabelle 5: Verwendete Gerätschaften für die DNA Stool Extraction	31
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien für die 16s Metagenomic Sequenzierung	33
Tabelle 7: Verwendete Geräte für die 16s Metagenomic Sequenzierung	38
Tabelle 8: Software und Datentools	40
Tabelle 9: Verwendete Materialien und Primer für die <i>NOD2</i> -Genotypisierung	42
Tabelle 10: Primer und PCR-Temperaturbedingungen für die <i>NOD2</i> -Genotypisierung	43
Tabelle 11: Klinische Charakteristika der Untersuchungs- und Kontrollgruppe	45
Tabelle 12: Bonferroni-korrigierte PERMANOVA der Bakterienzusammensetzung der M. Crohn-Patienten	49

xi. Abkürzungsverzeichnis

6-MP	<i>6-Mercaptopurin</i>
ATG16L1	<i>Autophagy-related protein16-1, Autophagy-related protein 16-1</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bzw.	beziehungsweise
ca	circa
CARD	<i>Caspase-Aktivierungs- und Rekrutierungs-Domänen</i>
CARD9	<i>Caspase recruitment domain-containing protein 9</i>
CDAI	<i>Crohn's Disease Activity Index, Crohn's Disease Activity Index</i>
CD-HIT	<i>Cluster Database at High Identify with Tolerance</i>
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CU	<i>Colitis Ulcerosa, Colitis Ulcerosa</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
GP	<i>gesunden Probanden</i>
HBI	Harvey-Bradshaw-Index
Hkt	<i>Hämatokrit, Hämatokrit</i>
I.E	<i>Internationale Einheiten</i>
IL23-R	Interleukin-23-Rezeptor
IL23R	<i>Interleukin-23 Rezeptor</i>
IRGM	Immunity Related GTPase M
LDA	<i>Linear Diskrimination Analysis</i>
LRR	<i>leucine rich repeat, leucine rich repeat</i>
M. Crohn	<i>Morbus Crohn</i>
MC	Morbus Crohn
MRT	<i>Magnetresonanztomographie</i>
MTX	<i>Methotrexat</i>
NBD	Nukleotid-Bindungs-Domäne
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>Next generation Sequencing</i>
NMDS	<i>nichtmetrisch mehrdimensionale Skalierung</i>
NOD2	<i>nucleotide-binding oligomerization domain containing protein</i>
OTU	<i>operative taxonomic Unit</i>
Pat.	<i>Patienten</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
RGM	<i>Immunity Related GTPase M</i>
SNP's	<i>single nucleotide polymorphisms, single nucleotide polymorphisms</i>
TH-17	<i>T-Helferzellen-17</i>
TNF- α -Inhibitoren	<i>Tumornekrosefaktor-alpha-Inhibitoren</i>
UVB-Strahlen	<i>Ultraviolette Strahlen Typ B</i>

xii. Publikationen

Vitamin D administration leads to a shift of the intestinal bacterial composition in Crohn's disease patients, but not in healthy controls.

Schäffler H, Herlemann DP, Klinitzke P, Berlin P, Kreikemeyer B, Jaster R, Lamprecht G.

J Dig Dis. 2018 Apr;19(4):225-234. doi: 10.1111/1751-2980.12591. Epub 2018 Apr 27. PMID: 29573237

xiii. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)

xiv. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Beteiligten dieser Studie für die Unterstützung und Hilfe bedanken.

Mein größter Dank gilt hierbei meinem Betreuer Dr. med. Holger Schäffler, der immer ein offenes Ohr für jedes Problem hatte und mich stets ermutigte, weiterzumachen und diese Arbeit zu beenden. Egal, welche Fragen ich auch hatte, welche Probleme auftraten oder wie viele Komma-Fehler ich auch in diese Arbeit einbaute, er unterstützte mich und half mit Rat, Tat oder auch mahnenden Worten. Ohne ihn würde diese Arbeit in dieser Form nicht existieren!

Weiterhin möchte ich mich bei Professor Jaster und sowie Peggy und Karen vom Forschungslabor der Abteilung für Gastroenterologie der Universitätsmedizin Rostock für die Geduld und die Hilfe bei der Aufarbeitung der Stuhlproben bedanken. In den vielen Stunden im Labor war immer jemand an meiner Seite, half bei Fragen und auch das eine oder andere private Gespräch durfte nicht fehlen.

Des Weiteren danke ich Herrn Professor Herlemann, der die Auswertung der Bakterienpopulationen übernahm und mir mit viel Geduld einen kleinen Einblick in deren Vielfalt verschaffte.

Mein weiterer Dank geht an die Mitarbeiter*Innen der gastroenterologischen Ambulanz, die mir nicht nur die Räumlichkeiten zur Probengewinnung zur Verfügung stellten, sondern auch bei der Auswahl der M. Crohn-Patienten sowie Terminplanung geholfen haben.

Und zum Schluss nicht zu vergessen danke ich meiner Familie und guten Freunden, die sich die Zeit genommen haben, diese Arbeit zu korrigieren und fertig zu stellen.