

Universitätsklinikum des Saarlandes und Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes
Innere Medizin I – Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. Stephan Stilgenbauer

**Optimierte 25(OH)-Vitamin D-Serumspiegel
für die Antikörper-abhängige NK-Zell-Zytotoxizität
gegen B-Zell-Lymphome und Mamma-Karzinome**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2019

vorgelegt von
Fabian David Acker
geb. 13.02.1992 in Überlingen

Die Versuche zu der vorliegenden Promotionsarbeit wurden in der Klinik für Innere Medizin I - Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie, sowie im José-Carreras-Institut der Universität des Saarlandes in Homburg (Saar) durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie 2016

F. Acker, J. T. Bittenbring, M. Pfreundschuh and F. Neumann, *Optimizing 25-OH-Vitamin D3 serum levels for Rituximab- and Obinutuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity*. *Oncol Res Treat*, 2016. **39**(suppl. 3): p. 1-348. doi: 10.1159/000449050

57. Jahrestagung der *American Society of Hematology* 2015

Joerg Thomas Bittenbring, Michael Pfreundschuh, **Fabian Acker** and Frank Neumann, *Optimizing 25-OH-Vitamin D3 Serum Levels for Rituximab- and Obinutuzumab-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*, *Blood*, 2015. **126**(23): p. 2734

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Fachzeitschrift veröffentlicht:

Frank Neumann, **Fabian Acker**, Claudia Schormann, Michael Pfreundschuh and Joerg Thomas Bittenbring, *Determination of Optimum Vitamin D3 Levels for NK Cell-mediated Rituximab- and Obinutuzumab-dependent Cellular Cytotoxicity*, *Cancer Immunol Immunother*, 2018. **67**(11): pp. 1709-18. doi: 10.1007/s00262-018-2224-y

Inhalt

Inhalt	3
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1 Zusammenfassung	10
1.1 Abstract.....	11
2 Einleitung	12
2.1 B-Zell-Lymphome und zielgerichtete Therapien.....	12
2.1.1 Epidemiologie der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome	12
2.1.2 Einsatz von Anti-CD20-Antikörpern in der Therapie von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen	12
2.1.3 Wirkungsweise von Rituximab und Obinutuzumab.....	14
2.1.3.1 Vermittlung Komplement-abhängiger Zytotoxizität.....	14
2.1.3.2 Direkte Induktion von Apoptose	14
2.1.3.3 Vermittlung Antikörper-abhängiger zellulärer Zytotoxizität	15
2.1.3.4 Induktion spezifischer T-Lymphozyten	15
2.1.3.5 Sensibilisierung für Chemotherapien.....	16
2.2 Mamma-Karzinom und zielgerichtete Therapien	16
2.2.1 Epidemiologie des Mamma-Karzinoms	16
2.2.2 Einsatz von Anti-HER2-Antikörpern in der Behandlung des Mamma-Karzinoms.....	16
2.2.3 Wirkungsweise von Trastuzumab	18
2.2.3.1 Hemmung der HER2-Signalkaskaden.....	18
2.2.3.2 Abbau von membranständigem HER2	18
2.2.3.3 Vermittlung von Antikörper-abhängiger zellulärer Zytotoxizität	18
2.2.3.4 Aktivierung von T-Lymphozyten	19
2.3 Vitamin D-Insuffizienz und -Substitution bei Brustkrebs und Lymphomen.....	19
2.3.1 Vitamin D-Stoffwechsel.....	19
2.3.2 Vitamin D-Insuffizienz, -Mangel und Epidemiologie.....	21
2.3.3 Vitamin D im Knochen- und Elektrolytstoffwechsel	22

2.3.4	Vitamin D und Tumorinzidenzen	22
2.3.4.1	Non-Hodgkin-Lymphome	22
2.3.4.2	Brustkrebs	24
2.3.5	Vitamin D in Tumorthherapie und -prognose	25
2.3.5.1	Non-Hodgkin-Lymphome	25
2.3.5.2	Brustkrebs	26
2.3.6	Einfluss von Vitamin D auf Immunsystem und Neoplasien	27
2.3.6.1	Makrophagen	27
2.3.6.2	NK-Zellen	28
2.3.6.3	Adaptives Immunsystem	29
2.3.6.4	Barrierefunktion	30
2.3.6.5	Maligne Zellen	30
2.4	Zielsetzung der Arbeit	31
3	Probanden, Material und Methoden	33
3.1	Probanden	33
3.2	Material und Geräte	33
3.2.1	Vitamin D Präparat	33
3.2.2	Chemikalien, Puffer, Medien und Lösungen	33
3.2.3	Antikörper und Enzyme	35
3.2.4	Tumorzelllinien	35
3.2.5	Verbrauchsgegenstände	35
3.2.6	Geräte	36
3.2.7	Computersoftware	36
3.3	Methoden	36
3.3.1	Vitamin D-Substitution	36
3.3.2	Zellbiologische Methoden	37
3.3.2.1	Zellkultur	37
3.3.2.2	CD20-positive Zelllinie Daudi	37

3.3.2.3	HER2-positive Zelllinie ZR-75-1	38
3.3.2.4	Zellquantifizierung	38
3.3.2.5	Vorbereitung der Tumorzelllinien.....	38
3.3.2.6	Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Vollblut	39
3.3.2.7	Magnetische Zellsortierung	40
3.3.2.8	Durchflusszytometrie	41
3.3.3	Experimentelle Bestimmung der NK-Zell-Aktivität	42
3.3.3.1	Anlegen der Antikörper-Verdünnungsreihen	42
3.3.3.2	Vorbereiten der Target-Zellen	42
3.3.3.3	Vorbereiten der Effektorzellen	43
3.3.3.4	Kontrollansätze	44
3.3.3.4.1	Technischer Blank	44
3.3.3.4.2	Spontan-Lysen.....	44
3.3.3.4.3	Maximal-Lyse	44
3.3.3.5	Belegung der Reaktionsplatten und Inkubation	45
3.3.4	Messung der LDH-Freisetzung	46
3.3.5	Quantifizierung der NK-Zell-Aktivität.....	47
3.4	Statistische Auswertung.....	47
4	Ergebnisse	48
4.1	Probandendaten	48
4.2	Optimierung eines Vitamin D ₃ -Substitutionsprotokolls für die Immuntherapie und Substitutionsergebnisse.....	49
4.3	Nachweis einer NK-Zell-vermittelten ADCC unter Vitamin D-Mangel bzw. -Insuffizienz	52
4.3.1	Rituximab-induzierte Daudi-Lyse unter Vitamin D-Mangel und -Insuffizienz	52
4.3.2	Obinutuzumab-induzierte Daudi-Lyse Vitamin D-Mangel und -Insuffizienz	53
4.3.3	Trastuzumab-induzierte ZR-75-1-Lyse unter Vitamin D-Mangel und -Insuffizienz.....	54
4.3.4	Ausschluss unspezifischer Antikörper-Bindung	55
4.4	Verlauf der NK-Zell-Zytotoxizität vor und nach den drei Substitutionsstufen.....	56
4.4.1	Rituximab-induzierte Daudi-Lyse vor und nach den drei Substitutionsstufen	56

4.4.2	Obinutuzumab-induzierte Daudi-Lyse vor und nach den drei Substitutionsstufen	58
4.4.3	Trastuzumab-induzierte ZR-75-1-Lyse vor und nach den drei Substitutionsstufen	60
4.4.4	Vergleich der Lyse-Raten zwischen den einzelnen Antikörpern.....	62
4.4.5	Geschlechter-spezifische Auswertung	64
5	Diskussion	73
5.1	Einordnung der Ergebnisse	73
5.2	Bewertung der Vitamin D-Substitution.....	75
5.3	Möglicher Einfluss der angewandten Methodik auf die Ergebnisse	75
5.3.1	Möglicher Einfluss der eingesetzten Zelllinien	75
5.3.2	Möglicher Einfluss der eingesetzten Zytolyse-Nachweismethode	75
5.3.3	Unklarheit über die Stärke des Vitamin D-Effekts bei günstigeren ADCC-Bedingungen 76	
5.4	Einflussfaktor Geschlecht.....	76
5.5	Verringerung der ADCC auf hoch-normalen 25(OH)D-Serumspiegeln	78
5.5.1	Einfluss anderer Leukozyten auf die NK-Zell-ADCC	78
5.5.2	Debatte um U-förmige Vitamin D-/Effekt-Beziehung.....	79
5.6	Ausblick	80
6	Anhang	82
6.1	Abbildungsverzeichnis	82
6.2	Tabellenverzeichnis.....	84
6.3	Literaturverzeichnis	85
7	Danksagung.....	96

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
1,25(OH)₂D	1,25-Dihydroxyvitamin D (i.e. 1,25(OH) ₂ D ₂ und 1,25(OH) ₂ D ₃)
1,25(OH)₂D₂	1,25-Dihydroxyergocalciferol
1,25(OH)₂D₃	1,25-Dihydroxycholecalciferol
25(OH)D	25-Hydroxyvitamin D (i.e. 25(OH)D ₂ und 25(OH)D ₃)
25(OH)D₂	25-Hydroxyergocalciferol
25(OH)D₃	25-Hydroxycholecalciferol
95 %-KI	95 %-Konfidenzintervall
ADCC	engl. <i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i> ; Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
ADCP	engl. <i>antibody dependent cellular phagocytosis</i> ; Antikörper-abhängige zelluläre Phagozytose
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AMP	engl. <i>antimicrobial peptides</i> ; antimikrobielle Peptide
ANCA	Antineutrophile zytoplasmatische Antikörper
APC	engl. <i>antigen presenting cells</i> ; Antigen-präsentierende Zellen
B-NHL	Non-Hodgkin-Lymphom der B-Zell-Reihe
Calcidiol	25-Hydroxycholecalciferol
CalcioI	Cholecalciferol
Calcitriol	1,25-Dihydroxycholecalciferol
c-CBL	engl. <i>casitas B-lineage lymphoma</i>
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i> ; immunphänotypische Merkmale auf Zelloberflächen, die zur Zelldifferenzierung verwendet werden können
CDC	engl. <i>complement dependent cytotoxicity</i> ; Komplement-abhängige Zytotoxizität
CHOP	Chemotherapie-Protokoll bestehend aus Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CYP24A1	25-Hydroxyvitamin D-24-Hydroxylase
CYP27B1	25-Hydroxyvitamin D-1 α -Hydroxylase
DBP	engl. <i>vitamin D binding protein</i> ; Vitamin D-Bindeprotein
DC	engl. <i>dendritic cell</i> ; dendritische Zelle
DEGS1	Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland
DLBCL	engl. <i>diffuse large B-cell lymphoma</i> ; diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
E/T-Ratio	engl. <i>effector cell to target cell ratio</i> ; Effektor-Zielzellen-Verhältnis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	engl. <i>epidermal growth factor receptor</i> ; epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ErbB	engl. <i>avian erythroblastosis oncogene B</i>
F	engl. <i>female</i> ; weiblich
Fc	engl. <i>fragment crystallizable region</i> ; kristallisierbare Region, die konstante Region eines Antikörpers
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i> ; Fetales Kälberserum
FcγRIII	Fc-Gamma-Rezeptor III (CD16)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

Abkürzung	Erläuterung
FL	Follikuläres Lymphom
HER2	engl. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HR	engl. <i>hazard ratio</i>
HSA	Humanes Serumalbumin
IPI	engl. <i>international prognostic index</i> ; internationaler prognostischer Index für maligne Non-Hodgkin-Lymphome
i. S.	Im Serum
I. U.	engl. <i>international units</i> ; internationale Einheiten
IFN- γ	Interferon- γ
IGF-1R	engl. <i>insulin-like growth factor 1 receptor</i> ; Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1-Rezeptor
IL	Interleukin
KIR	engl. <i>killer cell immunoglobulin-like receptor</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
M	engl. <i>male</i> ; männlich
MACS	engl. <i>magnetic activated cell sorting</i> ; magnetisch aktivierte Zellsortierung
MAPK	engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i> ; mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i> ; Haupthistokompatibilitätskomplex
MZL	Mantelzelllymphom
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
ODCC	engl. <i>obinutuzumab dependent cellular cytotoxicity</i> ; Obinutuzumab-abhängige zelluläre Zytotoxizität
OR	engl. <i>odds ratio</i>
ORR	engl. <i>overall response rate</i> ; Gesamtansprechen
PAMP	engl. <i>pathogen-associated molecular pattern</i> ; Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBMC	engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> ; mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> ; phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PD-1	engl. <i>programmed death receptor 1</i>
PD-L1	engl. <i>programmed death ligand 1</i>
PD-L2	engl. <i>programmed death ligand 2</i>
PE	Phycoerythrin
PFS	engl. <i>progression-free survival</i> ; progressionsfreies Überleben
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat-3-Kinase
PI3P	Phosphatidylinositoltriphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMN	engl. <i>polymorphonuclear cells</i> ; polymorphkernige Zellen
PTEN	Phosphatase- und Tensin-Homolog
R-CHOP	Immunochemotherapie-Protokoll bestehend aus Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison
RCT	engl. <i>randomized controlled trial</i> ; randomisierte kontrollierte Studie
RDCC	engl. <i>rituximab dependent cellular cytotoxicity</i> ; Rituximab-abhängige zelluläre Zytotoxizität
ROS	engl. <i>reactive oxygen species</i> ; reaktive Sauerstoffspezies
RR	Relatives Risiko

Abkürzung	Erläuterung
SD	engl. <i>standard deviation</i> ; Standardabweichung
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TDCC	engl. <i>trastuzumab dependent cellular cytotoxicity</i> ; Trastuzumab-abhängige zelluläre Zytotoxizität
tDC	engl. <i>tolerogenic dendritic cell</i> ; tolerogene dendritische Zelle
T_{H1}	T-Helferzelle, Typ 1
T_{H17}	T-Helferzelle, Interleukin-17-Typ
T_{H2}	T-Helferzelle, Typ 2
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TLR	engl. <i>toll-like receptor</i> ; Toll-like-Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
T-NHL	Non-Hodgkin-Lymphom der T-Zell-Reihe
T_{reg}	Regulatorische T-Zelle
VD₂	Vitamin D ₂ , Ergocalciferol
VD₃	Vitamin D ₃ , Cholecalciferol
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDUP1	engl. <i>vitamin D upregulated protein 1</i> ; Vitamin D-hochreguliertes Protein 1

1 Zusammenfassung

Sowohl bei B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen (B-NHL) als auch beim Mamma-Karzinom ist ein höherer 25-Hydroxyvitamin D-Spiegel im Serum (25(OH)D) mit einem besseren Überleben assoziiert [1-3]. Zudem profitieren Patienten auch prospektiv von einer Vitamin D (VD)-Substitution [4, 5]. Bei den B-NHL, die standardmäßig mit dem therapeutischen Antikörper (AK) Rituximab behandelt werden, konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt zumindest teilweise auf einer gesteigerten Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) von Makrophagen beruht [6]. Diese Arbeit hatte das Ziel zu prüfen, ob auch NK-Zellen durch eine Substitution in ihrer ADCC verstärkt werden, ob sich dies auch für den Anti-HER2-AK Trastuzumab im Kontext des Mamma-Karzinoms reproduzieren lässt und bei welchen 25(OH)D-Spiegeln die ADCC-Steigerung, sofern vorhanden, ihr Optimum erreicht.

Hierfür wurden 20 gesunde Probanden (10 Frauen, 10 Männer) mit 25(OH)D-Insuffizienz (< 20 ng/ml i. S.) rekrutiert und in vivo entlang des Referenzwertrahmens auf 30, 65 und 90 ng/ml substituiert. Auf allen vier Stufen wurden NK-Zellen isoliert und mit Zellen der Burkitt-Lymphom-Zelllinie Daudi und den Anti-CD20-AK Rituximab (RTX) respektive Obinutuzumab (GA101), sowie mit Mamma-Karzinom-Zellen der ZR-75-1-Linie und Trastuzumab, inkubiert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Tumorlyse mithilfe eines photochemischen Laktatdehydrogenase-Nachweises.

Durch die Substitution kam es zu keiner signifikanten Veränderung der ADCC gegen ZR-75-1. Demgegenüber konnte für die Anti-CD20-AK ein Effekt nachgewiesen werden, der jedoch auf die weiblichen Probanden beschränkt war. Hier führte die Substitution vom Insuffizienzbereich (Mittleres 25(OH)D \pm Standardabweichung: 10,1 \pm 5,6 ng/ml) auf mittlere Serumspiegel (66,4 \pm 3,4 ng/ml) zu einer Steigerung der medianen Tumorlyse von 22,8 % auf 31,7 % (1 μ g/ml RTX; $p = 0,016$) bzw. von 33,4 % auf 44,0 % (1 μ g/ml GA101; $p = 0,016$). Die Substitution auf lediglich niedrig-normale VD3-Serumwerte (31,4 \pm 4,0 ng/ml) zeigte hingegen keine signifikante Steigerung der Daudi-Lyse. Die Lyse bei hoch-normalen Serumspiegeln (92,6 \pm 12,2 ng/ml) war im Vergleich zu der mittlerer VD3-Werte jedoch wieder signifikant schwächer mit 21,8 % gegenüber 31,7 % (1 μ g/ml RTX; $p = 0,037$) bzw. 37,2 % gegenüber 44,0 % (1 μ g/ml GA101; $p = 0,037$).

Es konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen von in vivo VD3-substituierten Frauen in vitro verstärkt zur ADCC mit RTX und GA101 befähigt sind. Dieser Effekt zeigt sich am stärksten bei einem mittleren 25(OH)D-Niveau von ca. 65 ng/ml. Wir empfehlen diesen Serumspiegel daher als Zielwert für künftige Interventionsstudien, die den Effekt von VD auf das Tumorüberleben bei B-NHL untersuchen. Zudem empfehlen wir, den 25(OH)D-Serumspiegel auch während der laufenden Therapie zu kontrollieren.

1.1 Abstract

For both B cell Non-Hodgkin Lymphoma (B-NHL) and breast cancer it was shown that higher 25-Hydroxyvitamin D (25(OH)D) serum levels are associated with better survival [1-3]. Furthermore, patients also benefit prospectively from vitamin D (VD) substitution [4, 5]. This effect on B-NHL, usually treated with chemotherapy and the monoclonal therapeutic antibody (AB) rituximab, is at least partly explicable by a VD-mediated improvement in the antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of macrophages [6]. The aim of this study was to test whether VD improves ADCC of natural killer (NK) cells as well and whether this also applies to the anti-HER2 AB Trastuzumab in the context of breast cancer. The paramount aim, however, was to determine the 25(OH)D level yielding maximum ADCC increase – if existing.

Therefore, 20 healthy subjects (10 females, 10 males) with VD insufficiency (serum 25(OH)D < 20 ng/ml) were recruited and substituted along the reference range to the target values 30, 65 and 90 ng/ml. On all four levels a blood sample was drawn, NK cells were isolated and subsequently incubated with cells of the Burkitt's lymphoma cell line Daudi and the anti-CD20 ABs Rituximab (RTX) and Obinutuzumab (GA101) respectively and with breast cancer cells of the ZR-75-1 lineage together with the anti-HER2 AB Trastuzumab. Tumor cell lysis was quantified using photochemical detection of lactate dehydrogenase.

VD substitution led to no significant change in the ADCC against ZR-75-1. In contrast, for the anti-CD20 ABs there was an effect, but it was limited to the female subjects. Substitution from insufficiency (mean 25(OH)D \pm standard deviation: 10.1 ± 5.6 ng/ml) to intermediate levels (66.4 ± 3.4 ng/ml) increased the median tumor lysis from 22.8 % to 31.7 % (1 μ g/ml RTX; $p = 0,016$) or 33.4 % to 44.0 % (1 μ g/ml GA101; $p = 0,016$) respectively. In contrast, substitution to low-normal 25(OH)D values (31.4 ± 4.0 ng/ml) yielded no significant increase in Daudi lysis. Compared to mid-range 25(OH)D level, lysis on high-normal level (92.6 ± 12.2 ng/ml) showed a significant decrease from 31.7 % to 21.8% (1 μ g/ml RTX; $p = 0,037$) or 44.0 % to 37.2 % (1 μ g/ml GA101; $p = 0,037$), respectively.

These results suggest that NK cells of women in vivo substituted with VD show stronger cytotoxicity in vitro with RTX and GA101. This effect was strongest on 25(OH)D levels around 65 ng/ml. We recommend this serum level as the target value for future clinical studies assessing the impact of VD substitution on the outcome of B-NHL treated with ADCC-mediating antibodies like RTX or GA101. Furthermore, these studies should determine 25(OH)D serum level not only on prior to inclusion but also during therapy.

2 Einleitung

2.1 B-Zell-Lymphome und zielgerichtete Therapien

2.1.1 Epidemiologie der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome

2014 lag in Deutschland die jährliche Erkrankungsrate der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) bei 19,1 pro 100.000 Frauen und 23,1 pro 100.000 Männer [7]. Das entspricht einem Anteil von 3,5 % bzw. 3,7 % aller malignen Neoplasien [7]. Dabei wird die Gruppe der NHL von einer Vielzahl einzelner Entitäten gebildet, die alle von Zellen der lymphatischen Reihe ausgehen. Bei Erwachsenen entspringen diese Neoplasien in ca. 85 % der B-Zell- (B-NHL) und nur in ca. 15 % der Fälle der T-Zell-Reihe (T-NHL) [8].

2.1.2 Einsatz von Anti-CD20-Antikörpern in der Therapie von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen

1997 wurde mit Rituximab der erste therapeutische Antikörper (AK) für die Behandlung von B-Zell-Lymphomen in den USA als *Rituxan*[®], 1998 dann in der EU als *MabThera*[®], zugelassen [9]. Rituximab ist ein chimärer, monoklonaler Antikörper gegen CD20 (engl. *cluster of differentiation*) mit humanen und murinen Anteilen. CD20 ist ein Oberflächenmarker auf B-Zellen, der abhängig vom Reifestadium ab den späten Pro-B-Zellen bis zu den Memory-Zellen exprimiert wird. Erst durch die Ausdifferenzierung zu Plasmablasten und Plasmazellen geht CD20 verloren [10]. Somit ist auch der Anteil an CD20⁺ B-Zell-Neoplasien hoch: lediglich 1-2 % der Fälle sind bei Diagnose CD20⁻ [11] und somit für eine Therapie mit Anti-CD20-AK ungeeignet. Davon zu unterscheiden sind Fälle, bei denen es im Rahmen der Therapie zu einem sekundären Verlust von CD20 durch Tumorselektion kommt [12]. Die eigentliche Funktion von CD20 ist derzeit nur unzulänglich geklärt [11]. Bekannt ist jedoch, dass ein CD20-Knockout bei der Maus sowohl zu einem fehlenden Einstrom von Kalzium während der B-Zell-Aktivierung als auch zu einer verminderten Antikörperbildung und Kostimulation von T-Zellen führt [13].

Die Entwicklung von Rituximab Mitte der 1970er Jahre markierte einen Meilenstein in der Lymphomtherapie, da erstmals ein Pharmakon im Vergleich zu Chemo- oder Radiotherapie sehr spezifisch nur gegen eine bestimmte Zellpopulation wirkte [14]. Der Nutzen dieses monoklonalen Antikörpers konnte seitdem in zahlreichen Studien nachgewiesen werden [15].

Beispielsweise konnte für das diffus-großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL), dem häufigsten B-NHL [16], gezeigt werden, dass bei 60- bis 80-Jährigen die Gabe von Rituximab zusätzlich zur bisherigen Standardtherapie aus Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison (CHOP) die progressionsfreie 10-Jahres-Überlebensrate von 20 % auf 36 % erhöht [17]. In einer anderen Studie

konnte bei jüngeren Patienten durch die Zugabe von Rituximab zu einem CHOP-ähnlichen Protokoll das ereignisfreie 3-Jahres-Überleben von 59 % auf 79 % verbessert werden [18]. Diese und ähnliche Ergebnisse bei anderen Krankheitsentitäten führten dazu, dass die Immunochemotherapie mit Rituximab in Kombination mit einer Chemotherapie heutzutage Teil der Erstlinientherapie vieler B-NHL ist. Dazu gehören neben dem DLBCL das folliculäre Lymphom (FL), Mantelzelllymphom (MZL) und die chronische lymphatische Leukämie (CLL) [16, 19, 20].

Der Erfolg von Rituximab einerseits sowie andererseits das Auftreten Rituximab-resistenter Rezidive forcierten die Entwicklung alternativer, potentiell effektiverer Antikörper gegen CD20. Daraus resultierte u. a. Ofatumumab (*Arzerra*®), ein rein humaner Antikörper, und Obinutuzumab (GA101, *Gazyvaro*®), ein humanisierter, muriner Antikörper. Aufgrund der vielversprechenden präklinischen Daten, auf die in 2.1.3 näher eingegangen wird, steht derzeit vor allem Obinutuzumab im Mittelpunkt verschiedener klinischer Studien, die den künftigen Stellenwert dieses Antikörpers evaluieren sollen [21].

Zwischenergebnisse der *CLL11-Studie* demonstrierten bei Patienten CLL für die Erstlinientherapie mit Obinutuzumab und Chlorambucil im Vergleich zu Rituximab und Chlorambucil mit einer *Hazard Ratio* (HR) von 0,18 (95 %-Konfidenzintervall [95 %-KI]: 0,14-0,24) ein signifikant verbessertes progressionsfreies Überleben (engl. *progression-free survival*, PFS) von median 29,9 gegenüber 15,4 Monaten bei jedoch gleichem Gesamtüberleben [22]. Auch für das folliculäre Lymphom wurde in der Ersttherapie ein verbessertes PFS für Obinutuzumab gegenüber Rituximab in Kombination mit verschiedenen Chemotherapien beschrieben (*GALLIUM-Studie*) [23]. Für das DLBCL konnte hingegen im Rahmen der *GOYA-Studie* kein Nutzen nachgewiesen werden. Im Vergleich von Obinutuzumab und Rituximab, jeweils mit CHOP, war hierbei das PFS nur unsignifikant verschieden [24]. Das Sicherheitsprofil von Obinutuzumab wurde in allen genannten Studien als vertretbar eingestuft.

Unabhängig vom Stellenwert Obinutuzumabs als Erstlinien-Therapeutikum gibt es Daten, die auf einen Nutzen bei Rituximab-vorbehandelten Rezidiven hinweisen. Diese Rezidive sprechen mitunter aufgrund von Resistenzbildungen nicht mehr auf eine weitere Behandlung mit Rituximab an [25]. In der *GADOLIN-Studie* konnte für solche Rituximab-refraktären Patienten mit indolentem NHL durch die Therapie Obinutuzumab mit Bendamustin im Vergleich zu Bendamustin mono ein verbessertes PFS gezeigt werden [26].

Abseits von onkologischen Indikationen können Anti-CD20-AK durch die effektive Depletion von B-Lymphozyten auch bei Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden, die mit der Bildung von Autoantikörpern einhergehen. So konnte für Rituximab beispielsweise in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis [27] oder den ANCA-positiven Vaskulitiden [28] ein Nutzen gezeigt werden.

2.1.3 Wirkungsweise von Rituximab und Obinutuzumab

Rituximab und Obinutuzumab binden auf ihrem Zielmolekül CD20 unterschiedliche, aber sich überlappende, Epitope [29]. Bei der Herstellung von Obinutuzumab werden Zuckerreste der konstanten Antikörperregion (Fc-Region) mittels *Glyco-Engineering* modifiziert, was zu einem anderen Bindungsverhalten an Fc-Rezeptoren führt und die Effektivität der B-Zell-Depletion *in vitro* und *in vivo* erhöht [30].

Grundsätzlich unterscheiden sich Rituximab und Obinutuzumab hinsichtlich der Ausbildung von *Lipid Rafts* (dt. Lipidflöße). Hierbei handelt es sich um selbstbildende Aggregate aus Proteinen und verschiedenen Lipiden innerhalb der Zellmembran der Zielzelle, die in dieser wie ein Floß schwimmen [31]. Insbesondere Rituximab und Ofatumumab führen zur Ausbildung dieser *Lipid Rafts* bestehend aus CD20/AK-Komplexen. Dieser Typ Anti-CD20-AK wird als Typ I bezeichnet [32]. Demgegenüber gehört Obinutuzumab zu den Typ II-AK.

Es wird davon ausgegangen, dass die Anordnung von CD20 in *Lipid Rafts* nach Bindung von Typ I-AK es der Zielzelle ermöglicht, diese zu internalisieren und so einer Immunantwort zu entgehen, was bei Typ II-AK in dieser Form nicht möglich ist [33].

2.1.3.1 Vermittlung Komplement-abhängiger Zytotoxizität

Typ I-Antikörper sind in der Lage über die Aktivierung von Komplementfaktoren eine Komplement-abhängige Zytotoxizität (engl. *complement dependent cytotoxicity*, CDC) zu induzieren. Hierfür bindet der Komplementfaktor C1q als Initiator der Komplementkaskade an den Komplex aus zwei quervernetzten CD20-Antikörpern [21]. Da diese Quervernetzung bei Typ II-AK wie Obinutuzumab nicht auftreten, sind diese kaum in der Lage Komplement zu binden. Folglich ist der Anteil der CDC an der Wirkung der durchaus effektiven Typ II-AK als eher gering zu bewerten.

Welche Rolle die CDC klinisch spielt, ist derzeit aufgrund widersprüchlicher Erkenntnisse umstritten [32]. Für Rituximab – nicht aber für Obinutuzumab – konnte sogar gezeigt werden, dass die Bindung von Komplementfaktoren die Fähigkeit zur antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (engl. *antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) verringert [34]. Hierfür wurde eine Konkurrenz zwischen humoralem und zellulärem Immunsystem um die Bindungsstellen des Antikörpers postuliert.

2.1.3.2 Direkte Induktion von Apoptose

Beide Typen Antikörper vermitteln auch eine direkte apoptotische Wirkung in den Zielzellen. Für Rituximab konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Quervernetzung zweier Rituximab-Moleküle durch die Bindung an Fc-Rezeptoren über einen noch unbekanntem Mechanismus zu einer direkten Induktion von Apoptose führt. Untersuchungen im Mausmodell an NOTAM-Mäusen, die trotz intakter

extrazellulärer Fc-Bindungsdomäne keine funktionsfähige intrazelluläre Signaltransduktion des Fc-Gamma-Rezeptors zeigen, suggerieren jedoch, dass dieser Effekt *in vivo* eher eine nachrangige Rolle spielt [32, 35].

Für Typ II-Antikörper konnte eine andere Form der direkten Apoptoseinduktion nachgewiesen werden, deren Wirkmechanismus derzeit ebenfalls noch unzureichend geklärt ist. Vermutlich führt jedoch eine Veränderung des Zytoskeletts zu einer erhöhten Permeabilität der lysosomalen Membranen in der Zelle, was zur Bildung und Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) führt [36]. Die Menge an freigesetzten ROS korreliert mit der Stärke dieser Antikörper-induzierten direkten Apoptose [21]. Dieser Mechanismus, der sich grundlegend von den bekannten Formen des programmierten Zelltodes unterscheidet, spielt möglicherweise eine Rolle für die Effektivität von Obinutuzumab in der Therapie Rituximab-resistenter Patienten [32].

2.1.3.3 Vermittlung Antikörper-abhängiger zellulärer Zytotoxizität

Anti-CD20-Antikörper sind in der Lage nach Bindung an Immunglobulin G-spezifische Rezeptoren (Fc γ -Rezeptoren) Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität zu vermitteln. Während eine Vielzahl von Leukozyten-Subpopulationen solche Rezeptoren exprimiert, werden für die *in vivo* und *in vitro* festgestellte ADCC vor allem NK-Zellen, Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten, mit jedoch unbekannter Gewichtung, verantwortlich gemacht [32]. In Versuchen mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein Knockout von aktivierenden Fc γ -Rezeptoren *in vivo* eine Tumorkontrolle durch Rituximab, und im Übrigen auch durch Trastuzumab, unmöglich macht [37]. Dies spricht dafür, dass ADCC einen relevanten Stellenwert in der Wirkweise der Anti-CD20-AK einnimmt. Dafür spricht auch, dass der Nachweis von Einzelnukleotid-Polymorphismen in den Genen, die für Fc γ -Rezeptoren kodieren, sowohl *in vitro* das Ausmaß der gemessenen ADCC beeinflussen kann als auch *in vivo* mit dem klinischen Ansprechen korreliert [32, 38, 39].

Im Vergleich mit Rituximab zeigte Obinutuzumab *in vitro* eine bis zu 35-fach gesteigerte ADCC [30]. Wie in 2.1.3.1 (Seite 14) bereits beschrieben, kam es bei Obinutuzumab zu keiner Beeinträchtigung der ADCC durch die Anwesenheit von Komplementfaktoren.

2.1.3.4 Induktion spezifischer T-Lymphozyten

Abseits der ADCC vermitteln Anti-CD20-AK auch die Phagozytose ihrer Zielzellen (engl. *antibody dependent cellular phagocytosis*, ADCP) insbesondere durch Monozyten und Makrophagen [21]. Ungeklärt ist bislang, ob es beim Menschen nach Internalisierung von Zielzellen durch dendritische Zellen zur Induktion einer T-Zell-Reaktion kommt, die auch längerfristige Tumorrogressionen erklären könnte [32]. Für die Maus hingegen konnte gezeigt werden, dass nach Rituximab-Therapie CD8⁺

zytotoxische T-Lymphozyten gegen CD20 induziert wurden, die auch eine spätere Tumorbelastung ohne Anwesenheit des Antikörpers kontrollieren konnten [40].

2.1.3.5 Sensibilisierung für Chemotherapien

Es konnte gezeigt werden, dass unter der Therapie mit Rituximab antiapoptotische Proteine auf Seiten der Tumorzellen herunterreguliert werden [41, 42]. Die Anwendung von Anti-CD20-AK scheint B-NHL-Zellen so gegenüber der zytotoxischen Wirkung einer Chemotherapie zu sensibilisieren.

2.2 Mamma-Karzinom und zielgerichtete Therapien

2.2.1 Epidemiologie des Mamma-Karzinoms

2014 erkrankten in Deutschland rund 69.200 Frauen an Brustdrüsenkrebs, entsprechend einer Erkrankungsrate von 167,7 pro 100.000 Frauen [7]. Damit führt die Krankheit mit 30,5 % aller Tumorlokalisationen die Liste der Krebsneuerkrankungen bei Frauen an. Durch moderne diagnostische und therapeutische Möglichkeiten konnte die krebspezifische Mortalität in den letzten Jahren gesenkt werden, sodass die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei derzeit 88 % liegt [7]. Nichtsdestotrotz ist das Mamma-Karzinom aufgrund seiner schieren Häufigkeit nach wie vor Platz 1 der Krebstodesursachen bei Frauen (anteilig 17,4 % an allen Lokalisationen).

Auch wenn das Brustdrüsenkarzinom bei Männern deutlich seltener ist, wird seine Inzidenz bei einer Erkrankungsrate von doch immerhin 1,6 pro 100.000 Männern und Jahr oft unterschätzt [7].

2.2.2 Einsatz von Anti-HER2-Antikörpern in der Behandlung des Mamma-Karzinoms

HER2 (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*, HER2/neu; auch: engl. *avian erythroblastosis oncogene B*, ErbB2) ist ein von 15-20 % der Mamma-Karzinome überexprimierter Rezeptor auf der Zelloberfläche [43]. Studien, die vor Einführung der HER2-Antagonisten durchgeführt wurden, konnten zeigen, dass eine Überexpression mit einer erhöhten Mortalität, schneller auftretenden Rezidiven sowie häufigerer Metastasierung verbunden ist [44].

HER2 gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR). Er wird auch von Geweben zahlreicher anderer Organe, darunter Niere, Lunge, Leber und zentrales Nervensystem, exprimiert und ist für deren natürliche Entwicklung essenziell [45]. HER2 ist eines von vier strukturhomologen Membranproteinen, die als HER1-4 bzw. ErbB1-ErbB4 durchnummeriert sind [46]. Ein essenzieller Schritt im Rahmen ihrer Aktivierung ist die Homo- oder Heterodimerisierung mit anschließender Autophosphorylierung, die zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden führt [47]. Dazu gehören der Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Signalweg (MAPK), der Phospholipase-C (PLC)/Proteinkinase C-Signalweg (PKC) sowie der

Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat-3-Kinase- (PI3K)/Akt-Signalweg. Diese induzieren Proliferation und Differenzierung der jeweiligen Gewebe [47]. Bisher ist für HER2 kein natürlicher aktivierender Ligand beschrieben worden; möglicherweise ist er konstitutiv aktiv und/oder dient lediglich als Partner für die Dimerisierung mit einem anderen Vertreter der HER-Familie [47].

Die Überexpression von HER2 im Mamma-Karzinom ermöglicht seine Verwendung für zielgerichtete Therapien. Hierbei werden verschiedene Wirkstoffklassen unterschieden. Dazu gehören einerseits Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI), die die Aktivierung der intrazellulären Signaltransduktion hemmen wie Lapatinib (*Tyverb®*) [44], andererseits die Anti-HER2-Antikörper, die neben dieser Inhibierung zusätzlich eine Immunantwort gegen den Tumor bewirken können. Mittlerweile wurden auch Antikörper entwickelt, die HER2 nutzen, um Toxine in die Zelle einzuschleusen, wie etwa Trastuzumab-Emtansin (*Kadcycla®*) [48].

Das erste zielgerichtete Therapeutikum für die Behandlung des metastasierten, HER2-positiven Brustkrebs war der monoklonale Antikörper Trastuzumab (*Herceptin®*), der 1998 in den USA und 2000 in der EU zugelassen wurde [49]. Durch seinen Einsatz konnte sowohl für metastasierte als auch nicht-metastasierte Mamma-Karzinome das krankheitsfreie Überleben verbessert werden [50-52].

Mit Pertuzumab (*Perjeta®*) wurde 2013 ein weiterer Anti-HER2-AK in der EU zugelassen. Aufgrund seines von Trastuzumab verschiedenen Epitops auf HER2 blockiert seine Bindung die Dimerisierung des Membranrezeptors und verhindert so eine Aktivierung der Signaltransduktion [53]. Daher wurde Pertuzumab im Rahmen der *CLEOPATRA-Studie* in Kombination mit Trastuzumab und dem Taxan Docetaxel mit der Kombination Placebo, Trastuzumab und Docetaxel verglichen. In dieser Phase III-Studie an insgesamt 808 Patienten mit lokalem Rezidiv oder Metastasierung betrug das PFS im Median 18,5 Monate im Therapiearm gegenüber 12,4 Monate in der Kontrollgruppe (HR: 0,64; 95 %-KI: 0,51-0,75) [54].

Für das Antikörper-Toxin-Konjugat Trastuzumab-Emtansin konnte für das lokal fortgeschrittene, metastasierte oder nicht resezierbare, HER2-positive Mamma-Karzinom, welches zuvor mit Trastuzumab und einem Taxan vorbehandelt war, ein Nutzen festgestellt werden (*EMILIA-Studie*) [55]. Hier zeigte es sich mit einem höheren progressionsfreien Überleben von median 9,6 Monaten gegenüber 6,4 Monaten in der Kontrollgruppe, die mit Lapatinib und dem 5-Fluoruracil-Prodrug Capecitabin behandelt wurde. In der Erstlinienbehandlung des metastasierten HER2-positiven Mamma-Karzinoms war Trastuzumab-Emtansin jedoch gegenüber der Standardtherapie aus Trastuzumab und Taxan weder über- noch unterlegen (*MARIANNE-Studie*) [56].

Trotz zahlreicher Fortschritte in der Therapie des metastasierten HER2-positiven Brustkrebses in den letzten Jahren, verbleibt die Prognose ungünstig. Es gilt daher abzuwarten, was künftige Therapieansätze und Wirkstoffe ergeben, die sich derzeit in der Entwicklung bzw. in klinischen Studien befinden [48].

2.2.3 Wirkungsweise von Trastuzumab

2.2.3.1 Hemmung der HER2-Signalkaskaden

Trastuzumab wirkt nach Bindung an HER2 auf verschiedene Arten. Dazu gehört die Blockade der dem Rezeptor nachgeschalteten Signalkaskaden. Dies geschieht über die Aktivierung von PTEN (engl. *phosphatase and tensin homolog*), welches den *Second Messenger* des PI3K-/AKT-Signalwegs, Phosphatidylinositoltriphosphat (PI3P), abbaut [57]. Der Antikörper vermindert so die proliferative und antiapoptotische Wirkung von HER2. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Trastuzumab in vitro zu höheren p27-Konzentrationen führt und die Cyclin-abhängige Kinase 2 (CDK2) hemmt. Somit kann Trastuzumab einen Zellzyklus-Arrest bewirken [45].

2.2.3.2 Abbau von membranständigem HER2

Trastuzumab führt zur verstärkten Aktivierung der Tyrosinkinase c-CBL (engl. *casitas B-lineage lymphoma*), die nach Aktivierung HER2 ubiquitiniert und so zu dessen Abbau führt [58, 59]. Dies scheint jedoch keinen Mechanismus der Resistenzbildung darzustellen, sondern wegen der Signalfunktion von HER2 eine antineoplastische Wirkung des Antikörpers [59]. Stattdessen zeigen Mamma-Karzinomzellen zur Resistenzbildung vielmehr eine verstärkte Bildung anderer Wachstumsfaktorrezeptoren wie HER3 und *Insulin-like Growth Factor 1 Receptor* (IGF-1R) [45]. Aufgrund seiner Bindungsdomäne ist Trastuzumab in Unterschied zu beispielsweise Pertuzumab nicht in der Lage die Heterodimerisierung dieser Rezeptoren zu unterbinden [45].

2.2.3.3 Vermittlung von Antikörper-abhängiger zellulärer Zytotoxizität

In mehreren Studien am humanen Xenograft-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen nach Bindung an Trastuzumab eine ADCC gegen Zellen HER2-positiver Mamma-Karzinome bewirken [60, 61]. In histologischen Schnittbildern von Tumorpräparaten findet man zudem nach Trastuzumab-Behandlung signifikant häufiger und mehr ADCC-fähige Zellen wie Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen [62]. Zudem korreliert das Überleben sowohl mit der NK-Zell-Aktivität zu Therapiebeginn [63] als auch mit der Anzahl zirkulierender CD16⁺ (FcγRIII) NK-Zellen sowie der Kopienzahl von CD16 auf diesen Zellen [64]. Umgekehrt konnte wie auch für Rituximab (siehe 2.1.3.3, Seite 15) gezeigt werden, dass nach Knockout des aktivierenden Fc-Rezeptors FcγRIII im Mausmodell keine Tumorkontrolle mehr möglich war [37].

Wie auch bei Rituximab können Einzelnukleotid-Polymorphismen in den Genen, die für Fc-Rezeptoren kodieren, das klinische Ergebnis einer Trastuzumab-Therapie beeinflussen [65].

2.2.3.4 Aktivierung von T-Lymphozyten

Sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen konnte gezeigt werden, dass nach Opsonierung HER2-positiver Zellen mit Trastuzumab und Phagozytose durch dendritische Zellen HER2-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten induziert werden [66]. Vermutlich kommt es dabei zur direkten zytotoxischen Wirkung von CD8⁺ T-Zellen [67]. Darüber hinaus scheint jedoch insbesondere die Chemotaxis und Aktivierung anderer Leukozyten-Subpopulationen durch T-Helferzellen eine Rolle bei der Tumorkontrolle zu spielen [68].

Der Stellenwert des adaptiven Immunsystems für die Therapie mit Trastuzumab ist nicht vollständig geklärt. Bei der Maus konnte jedoch gezeigt werden, dass ohne funktionsfähige T- oder B-Zellen eine Tumorregression durch Trastuzumab allein durch das innate Immunsystem nicht möglich ist [69]. Hingegen wurde in Mäusen mit intakten T-Zellen, bei denen es zur Tumorremission kam, eine hohe Dichte an CD8⁺ T-Lymphozyten in den Tumoren gefunden. Zudem führte die Depletion zytotoxischer T-Zellen durch Anti-CD8 α -Antikörper zu Rezidiven [69].

2.3 Vitamin D-Insuffizienz und -Substitution bei Brustkrebs und Lymphomen

2.3.1 Vitamin D-Stoffwechsel

Der Mensch kann Vitamin D sowohl selbst bilden als auch aus der Nahrung beziehen (siehe Abbildung 1) [70]. Der Begriff Vitamin D bezieht sich dabei auf verschiedene Verbindungen [70]. In der Haut wird unter Einwirkung von UV-Strahlung aus 7-Dehydrocholesterol Prävitamin D (engl. *provitamin D*) gebildet, welches im Anschluss autokatalytisch zu Cholecalciferol (Calcidiol, Vitamin D₃, VD₃) umgewandelt wird [70]. Mit der Nahrung nimmt der Mensch hingegen direkt Cholecalciferol sowie auch Ergocalciferol, ein pflanzliches Analogon (Vitamin D₂, VD₂), auf [70]. In der Leber entsteht aus den inaktiven Vorstufen VD₂ und VD₃ durch Vitamin D-25-Hydroxylasen (v. a. CYP2R1 [71]) 25-Hydroxyergocalciferol (25(OH)D₂) respektive 25-Hydroxycholecalciferol (Calcidiol, 25(OH)D₃), welche zusammen oft als 25-Hydroxyvitamin D (25(OH)D) zusammengefasst werden [70]. Dieses stellt eine Speicherform dar und ist als Labormarker zur Beurteilung des Vitamin D-Haushalts gut etabliert [70, 72].

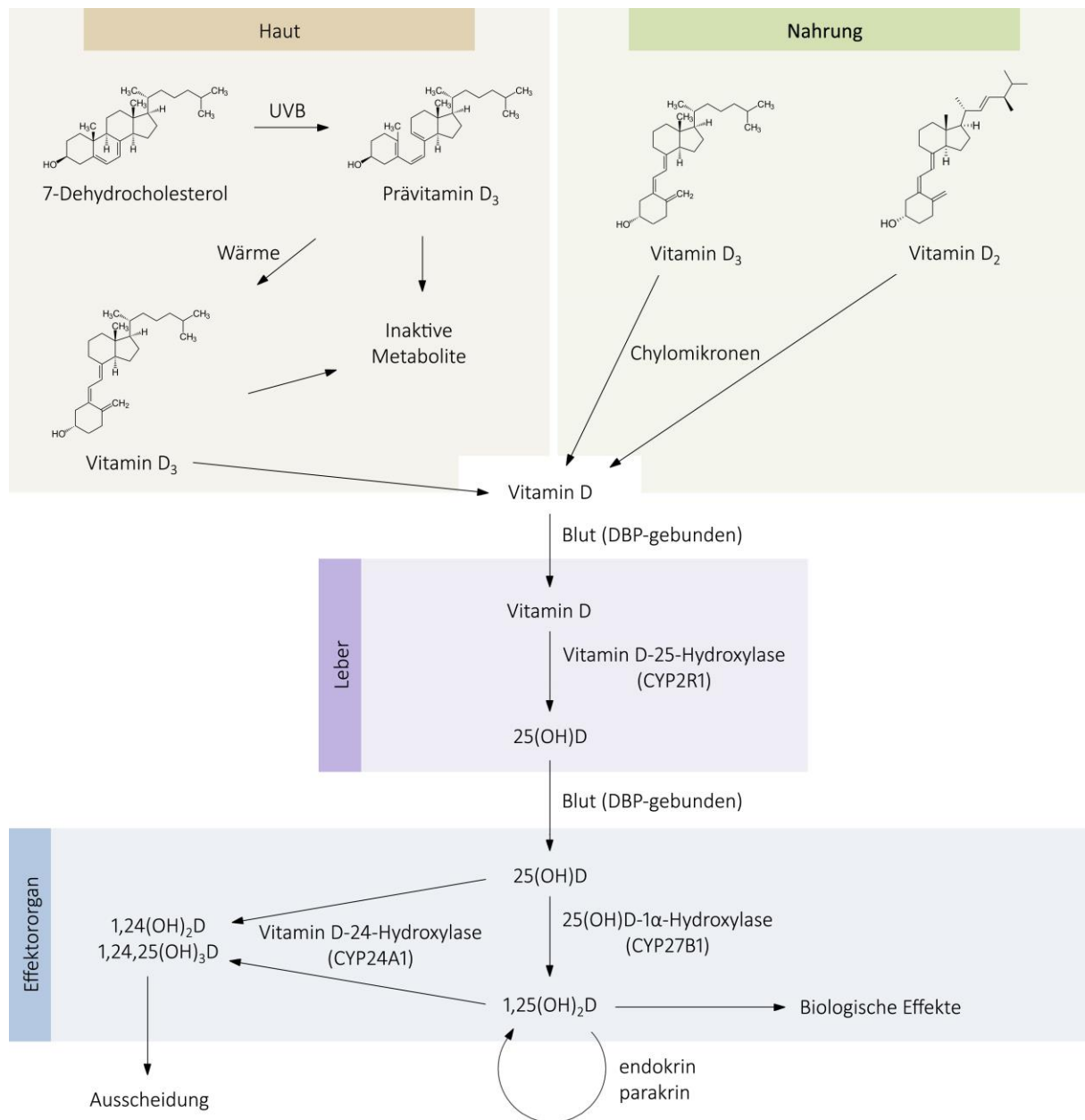


Abbildung 1 – Vitamin D-Stoffwechsel des Menschen
 Erläuterungen im Text. Grafik in Anlehnung an Holick [70].

Bei Bedarf wird in verschiedenen Geweben aus 25(OH)D durch 25-Hydroxyvitamin D-1α-Hydroxylasen (v. a. CYP27B1) der aktive Metabolit 1,25-Dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂D, also 1,25(OH)₂D₂ und 1,25(OH)₂D₃, letzteres auch Calcitriol genannt) gebildet [70]. Aktives Vitamin D bindet direkt an den Vitamin D-Rezeptor (VDR) [70]. Dies kann die Expression von über 200 Genen beeinflussen [70, 73]. Sowohl 25(OH)D als auch 1,25(OH)₂D können durch die 25-Hydroxyvitamin D-24-Hydroxylase (CYP24A1) an mehreren Kohlenstoff-Atomen hydroxyliert werden. Aufgrund der gesteigerten Hydrophilie werden die entstehenden Metabolite nierengängig und können ausgeschieden werden [71].

Während man früher davon ausging, dass VD₂ und VD₃ in ihrer biologischen Wirkung gleichwertig sind, gilt diese Vorstellung mittlerweile als überholt [74]. Obwohl beide Formen aus der Nahrung gut resorbiert werden können, führt die Gabe von VD₂ zu einem deutlich schwächeren Anstieg des 25(OH)D-Gesamtspiegel als dieselbe Menge VD₃ [75]. Dies liegt vermutlich an einer geringeren Affinität von VD₂ an Vitamin D-Bindeprotein (engl. *vitamin d binding protein*, DBP) im Plasma, was eine schnellere Ausscheidung nach sich zieht [74].

2.3.2 Vitamin D-Insuffizienz, -Mangel und Epidemiologie

Es existieren derzeit keine allgemeingültigen Normwerte für den 25(OH)D-Serumspiegel [70]. Das US-amerikanische *Institute of Medicine* definiert einen Spiegel größer 20 ng/ml als ausreichend für 97,5 % der US-Bevölkerung [76] (Tabelle 1). Dies scheint jedoch dem Vitamin D-Bedarf im Knochenstoffwechsel nicht gerecht zu werden, da im Rahmen eines sekundären Hyperparathyreoidismus erst 25(OH)D-Spiegel von 30 ng/ml oder höher zu einem Absinken der Parathormon-Konzentration im Blut sowie einer Zunahme der intestinalen Kalzium-Resorption führen [70, 72]. Daher bezeichnet die *Endocrine Society* erst Spiegel über 30 ng/ml als optimal („optimal“, „sufficient“), Werte zwischen 20 und 30 ng/ml als insuffizient („insufficient“) und Werte kleiner 20 ng/ml als mangelhaft („deficient“) [72]. Auch wenn Hyperkalzämien in der Regel erst ab Werten über 150 ng/ml auftreten [72], wurde die obere Normwertgrenze definiert als 100 ng/ml, um einen ausreichend großen Puffer zu garantieren. Diese Grenzwerte werden auch in dieser Arbeit angewandt. Es gilt jedoch zu beachten, dass dieser Vitamin D-Referenzrahmen lediglich anhand der Vitamin D-vermittelten Effekte auf den Knochenstoffwechsel und nicht aufgrund anderer Auswirkungen, wie etwa auf das Immunsystem, definiert wurde [72].

Tabelle 1 – Normwerte für 25-Hydroxyvitamin D im Serum

Empfehlung des <i>Institute of Medicine</i> [76]	Empfehlung der <i>Endocrine Society</i> [72].
Inadäquate Versorgung < 16 ng/ml	Mangelhaft („deficient“) < 20 ng/ml
Deckt den Bedarf von 50 % der Bevölkerung 16-20 ng/ml	Insuffizient („insufficient“) 20-30 ng/ml
Deckt den Bedarf von 97,5 % der Bevölkerung 20-50 ng/ml	Ausreichend („sufficient“) 30-100 ng/ml
Risiko für Intoxikation ≥ 50 ng/ml	Hyperkalzämie-Risiko ≥ 150 ng/ml

Basierend auf diesen Grenzwerten sind Vitamin D-Mangel und -Insuffizienz in den USA wie auch in Europa und Deutschland weit verbreitet [70, 72, 77]. In der *Studie zur Gesundheit Erwachsener in*

Deutschland (DEGS1), die das *Robert-Koch-Institut*s von 2008-2011 an 6.995 Probanden durchgeführt hat, waren lediglich 12 % der Probanden Vitamin D-suffizient (≥ 30 ng/ml), jedoch 27 % insuffizient (20-30 ng/ml) und 62,3 % sogar defizient (< 20 ng/ml) [78]. Laut selbiger Arbeit scheint das Alter ein maßgeblicher Risikofaktor für eine Vitamin D-Insuffizienz zu sein: in der Gruppe der 65-79-Jährigen waren lediglich 5,7 % der Frauen und 8,2 % der Männer noch ausreichend Vitamin D-versorgt [78]. Eine Studie an 1.578 Altenheimbewohnern in Deutschland ergab, dass lediglich 4 % der Heimbewohner optimale 25(OH)D-Serumspiegel aufweisen [79]. Diese hatten jedoch deutlich häufiger schwere Vitamin D-Mängel: 67 % der Bewohner hatten Spiegel unter 10 ng/ml gegenüber 30,2 % im DEGS1-Kollektiv (dort < 12 ng/ml) [78, 79]. Abgesehen vom Alter korrelierten geringe Vitamin D-Spiegel mit der Jahreszeit: so lag der mittlere 25(OH)D-Serumspiegel bei Frauen zwischen Juni und August mit 23,5 ng/ml (95 %-KI: 22,2-24,8) deutlich höher als im Winter mit 14,2 ng/ml (95 %-KI: 13,3-15,0); Männer: 24,8 ng/ml (95 %-KI: 23,4-26,2) gegenüber 12,5 ng/ml (95 %-KI: 11,6-13,4) [78]. Dieser Zusammenhang konnte auch in verschiedenen anderen Arbeiten reproduziert werden [77, 80-82]. Da das Ausmaß der körpereigenen Vitamin D-Bildung mit der einwirkenden UV-Strahlung korreliert, verwundert es nicht, dass neben der Jahreszeit auch der Breitengrad und die Hautfarbe Einflussfaktoren auf die 25(OH)D-Werte sind [70, 72, 78, 82].

2.3.3 Vitamin D im Knochen- und Elektrolytstoffwechsel

Größte Bekanntheit hat Vitamin D im Knochen- und Elektrolytstoffwechsel. So konnte mehrfach gezeigt werden, dass hohe 25(OH)D-Serumspiegel mit einer höheren Knochendichte assoziiert sind [83]. Insuffiziente Vitamin D-Werte führen hingegen zu verringerter intestinaler Kalziumabsorption, sekundärem Hyperparathyreoidismus und einer Demineralisierung von Knochensubstanz [70]. Abseits davon wurde gezeigt, dass Vitamin D-Insuffizienz mit niedriger Muskelkraft, schlechter Koordination und Gangstörungen assoziiert ist, während eine Substitution von 25(OH)D zu einer Verbesserung all dieser Parameter sowie zu einer niedrigeren Rate an Stürzen führt [84]. Diese Wirkungen von Vitamin D auf Muskulatur und Knochenstatus werden dafür verantwortlich gemacht, dass die Gabe von Vitamin D prospektiv das Risiko von Hüftfrakturen bei älteren Leuten reduziert [83].

2.3.4 Vitamin D und Tumorinzidenzen

2.3.4.1 *Non-Hodgkin-Lymphome*

Abseits des Bewegungsapparats konnten zahlreiche Assoziationen zwischen Vitamin D-Spiegel und dem Auftreten von Tumorerkrankungen und Präkanzerosen nachgewiesen werden. So korreliert ein niedriger Vitamin D-Status mit einer erhöhten Inzidenz von beispielsweise Prostata-, Kolon-, Mamma- (siehe unten) und Ovarial-Karzinomen sowie adenomatösen Darmpolypen [85, 86]. Analog zu diesen Erkenntnissen werden auch umgekehrt bei Patienten, die bereits eine Krebsdiagnose haben,

niedrigere 25(OH)D-Werte im Vergleich zu gesunden Kontrollen selben Alters und Geschlecht gefunden [87].

Während für Non-Hodgkin-Lymphome negative Korrelation zwischen Sonnenexposition und Tumorinzidenz nachgewiesen werden konnte (nach *Lu et al.* OR: 1,15; 95 %-KI: 1,05-1,23 [88]), gelang in mehreren retrospektiven Untersuchungen bislang kein zweifelsfreier Nachweis einer Korrelation des 25(OH)D-Serumspiegels mit dem Erkrankungsrisiko [73, 89, 90].

All diesen Untersuchungen ist gemein, dass es sich um retrospektive Fall-Kontroll- oder Kohorten-Studien handelte, die generell stark fehleranfällig sind und deren aufgezeigte Assoziationen keine kausalen Zusammenhänge repräsentieren. Zudem wird in diesen Studien der Vitamin D-Spiegel zumeist erst zum Zeitpunkt der Krebsdiagnose bestimmt, sodass auch eine reverse Korrelation, bei der die Krebserkrankung einen niedrigen Vitamin D-Spiegel bedingt, nicht ausgeschlossen werden kann [91]. Dennoch konnten auch prospektiv bislang mehrere Fall-Kontroll- und Kohorten-Studien keinen Zusammenhang zwischen 25(OH)D-Serumspiegel zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses und späterer Lymphom-Inzidenz zeigen [92-94].

Kelly et al. führten in einem Review-Artikel bezüglich der aktuellen Datenlage an, dass es generell nur wenige Studien adäquater Methodik gebe: in prospektiven Untersuchungen wäre häufig ein äußerst kurzer Beobachtungszeitraum gewählt worden und retrospektiv hätten Probanden zur Beurteilung der diätetischen Vitamin D-Zufuhr ungenaue Fragebögen über ihre Ernährungsgewohnheiten 1-2 Jahre vor der Tumordiagnose beantworten sollen [73].

Im Gegensatz dazu führte jedoch im Rahmen der *Women's Health Initiative*, einer doppelt verblindeten, randomisiert, kontrollierten Studie (RCT) an über 36.000 Frauen mit 10-jähriger Nachbeobachtungszeit [95, 96], die Kombination aus Vitamin D und Kalzium gegenüber Placebo zu einem verringerten Risiko, an einer lymphatischen Neoplasien zu erkranken (HR: 0,80; 95 %-KI: 0,65-0,99) [97].

Abseits dieser Daten gibt es weitere Indizien, die für einen Zusammenhang zwischen Vitamin D-Stoffwechsel und Tumorrisiko sprechen. So wurden bei mehreren NHL-Typen auf Keimbahnebene verschiedene Einzelnukleotid-Polymorphismen in den VDR- und CYP24A1-Genen festgestellt, die bei Erkrankten häufiger oder auch seltener als bei gesunden Kontrollen auftraten [98]. Diese Mutationen könnten somit entsprechende Risiko- respektive Schutzfaktoren für das Risiko, an einem NHL zu erkranken, darstellen. Diese Erkenntnis spricht für einen Einfluss von Vitamin D auf die Inzidenz von Lymphomen, der im Rahmen von Interventionsstudien bislang nur in geringem Umfang erbracht werden konnte.

2.3.4.2 Brustkrebs

Anders als bei den NHL konnte für das Mamma-Karzinom eine klare negative Korrelation zwischen 25(OH)D-Spiegel und dem Erkrankungsrisiko gezeigt werden [85, 86]. Gleiches gilt für die Sonnenexposition als indirektem Marker für das 25(OH)D-Niveau [99, 100].

Selbstverständlich gelten jedoch auch für diese Studien abhängig von ihrem Design die jeweiligen Einschränkungen, wie sie am Beispiel der NHL (siehe 2.3.4.1, Seite 22) erläutert wurden. Mehrere Review-Artikel über prospektive Fall-Kontroll-Studien konnten bislang jedoch keinen positiven Einfluss einer Vitamin D-Substitution auf die Inzidenz des Mamma-Karzinoms attestieren, wobei betont wurde, dass die bisherige Datenlage zu dünn für endgültige Aussagen sei [86, 101, 102]. Davon ungeachtet führen *Jacobs et al.* an, dass der Vitamin D-Spiegel mit der körperlichen Aktivität korreliere, welche in sich bereits einen etablierten Risikofaktor für das Entstehen von Tumorgeschehen darstelle [103]. Folglich wäre nicht auszuschließen, dass retrospektive epidemiologische Studien lediglich eine Korrelation zwischen Tumorinzidenz und körperlicher Aktivität ihrer Probanden feststellen [103]. Dies ließe sich nur durch RCT ausschließen.

Eine 2013 von *Sperati et al.* durchgeführte Meta-Analyse hierüber konnte lediglich zwei RCT einschließen und kam zu dem Ergebnis, dass eine Vitamin D-Substitution die Brustkrebs-Inzidenz nicht verringert [95]. In diese Analyse nicht miteinbezogen war die oben bereits erwähnte *Women's Health Initiative*. Im Rahmen dieser führte die Kombination aus Vitamin D und Kalzium gegenüber Placebo zwar nicht zu einer reduzierten Rate an Mamma-Karzinomen (HR: 0,96; 95 %-KI: 0,85-1,09) [96]. Dennoch zeigte sich 2013 bei einer späteren Auswertung der Studienergebnisse in der Subgruppe der Frauen, die zum Studieneinschluss bisher noch kein Vitamin D substituiert hatten, tatsächlich ein verringertes Brustkrebs-Risiko in der Substitutionsgruppe (HR: 0,65; 95 %-KI: 0,44-0,98) [104].

Unglücklicherweise wurden in dieser Studie weder vor Studieneinschluss noch bei Erreichen der Studienendpunkte den Probandinnen Blut abgenommen und der 25(OH)D-Spiegel kontrolliert. Welche 25(OH)D-Werte tatsächlich bei der eingesetzten Dosierung von täglich 400 I. U. (engl. *international units*; internationale Einheiten) Vitamin D₃ in der Verumgruppe erreicht wurden, ist folglich unbekannt. Diese Tagesdosis wird dabei von den meisten Fachgesellschaften für einen 25(OH)D-Zielspiegel von 20 ng/ml empfohlen [105]. *Garland et al.* schätzen anhand aktueller epidemiologischer Daten jedoch deutlich höhere Serumspiegel von über 42 ng/ml für eine protektive Wirkung gegenüber dem Mamma-Karzinom (sofern eine Wirkung denn vorhanden ist) als notwendig ein [106]. Laut *Mohr et al.* wäre anhand einer linearen Extrapolation der Daten für eine 50 %-Reduktion der Inzidenz ein Spiegel von 47 ng/ml erforderlich [107]. Für solche Zielwerte

veranschlagen die meisten veröffentlichten Substitutionsleitlinien jedoch Tagesdosen zwischen 1.000 und 2.000 I. U. [105].

Auch wenn die Daten bezüglich Vitamin D-Status und Tumorrisiken in Zusammenschau nicht konsistent sind, gibt es analog zu den NHL auch beim Mamma-Karzinom weitere Hinweise, die für einen möglichen Zusammenhang sprechen. Laut einer Meta-Analyse von *Iqbal et al.* haben Frauen mit Brustkrebs häufiger diverse Mutationen im VDR-Gen; dieser könne folglich einen Risikofaktor für die Erkrankung darstellen [108]. Andere Autoren konnten in bestehenden Studien keinen Zusammenhang entdecken [109].

2.3.5 Vitamin D in Tumortherapie und -prognose

2.3.5.1 Non-Hodgkin-Lymphome

Dass Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung einen niedrigen Vitamin D-Spiegel haben, ein schlechteres Outcome erwartet, ist mittlerweile gut belegt (HR: 0,48; 95 %-KI: 0,36-0,64) [110]. Dies scheint insbesondere Frauen zu betreffen, die mit Rituximab behandelt werden. So zeigte eine multivariate, retrospektive Analyse von Patientenprobe der *RICOVER-60-Studie*, die bei Patienten über 60 Jahren mit DLBCL Rituximab und CHOP (R-CHOP) mit CHOP alleine verglich, dass dieser Zugewinn an Überleben auf Frauen und den Antikörper-behandelten Therapiearm beschränkt war [1]. Dabei zeigten, bei ansonsten gleichen prognostischen Parametern, die Patienten im R-CHOP-Arm ein ereignisfreies Überleben von 79 % im Vergleich zu 59 % im CHOP-Arm ($p = 0,008$) [1]. Dies legt den Schluss nahe, dass, sollte sich auch prospektiv ein Vitamin D-vermittelter Effekt auf das Überleben zeigen, zumindest ein Teil davon auf eine gesteigerte Effektivität der zielgerichteten Therapie zurückzuführen sein könnte.

Die Frage zu klären, ob eine kausale Beziehung besteht oder ob niedrige 25(OH)D-Werte nicht doch durch reverse Korrelation oder gemeinsame Einflussfaktoren zustande kommen, erfordert jedoch Interventionsstudien. Hinsichtlich dieser ist die Datenlage bei Lymphomen bislang dünn. Januar 2018 konnten *Hohaus et al.* mit einer Studie an 155 Patienten mit DLBCL den ersten Nachweis dafür erbringen, dass sich unter R-CHOP-Therapie eine Vitamin D-Substitution positiv auf das ereignisfreie Überleben auswirkt [4]. Substituiert wurde hierbei nach drei verschiedenen Protokollen mit 3571-5612 I. U. VD₃ pro Tag [4]. Derzeit laufen verschiedene weitere RCT, die dieser Fragestellung nachgehen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2 – Laufende Interventionsstudien an Non-Hodgkin-Lymphomen über die Auswirkung einer Vitamin D-Substitution

Bezeichnung	Erkrankung (geschätzte Fallzahl)	Vitamin D-Intervention
OPTIMAL>60 / DR. CHOP, Improvement of Therapy of Elderly Patients With CD20+ DLBCL Using Rituximab Optimized and Liposomal Vincristine (OPTIMAL>60), NCT01478542 [111]	DLBCL (1.152)	Ungeachtet der Zuteilung in 6 Therapiearme: erste Hälfte der Patienten ohne VD ₃ -Substitution, zweite Hälfte mit; Substitution nicht randomisiert
A Study to Evaluate the Effect of Vitamin D on PFS in Indolent Non-Hodgkin's Lymphoma (ILyAD), NCT03078855 [112]	Indolente B-NHL (210)	Zwei Arme: I. Rituximab + Vitamin D II. Rituximab + Placebo
Cholecalciferol in Treating Patients With Newly Diagnosed Non-Hodgkin Lymphoma or Chronic Lymphocytic Leukemia With Vitamin D Deficiency, NCT02553447 [113]	NHL (312)	Drei Arme: I. Vitamin D hochdosiert II. Vitamin D niedrigdosiert III. Kein Vitamin D
Cholecalciferol in Improving Survival in Patients With Newly Diagnosed Cancer With Vitamin D Insufficiency (LS1293), NCT01787409 [114]	Agressive NHL, CLL, SLL (713)	Vitamin D-Substitution, sofern Spiegel bei Studieneinschluss nicht suffizient; keine Kontrollgruppe
Curcumin and Cholecalciferol in Treating Patients With Previously Untreated Stage 0-II Chronic Lymphocytic Leukemia or Small Lymphocytic Lymphoma (CASE 5913), NCT02100423 [115]	CLL, SLL (watch&wait) (35)	Vitamin D + Curcumin; keine Kontrollgruppe

2.3.5.2 Brustkrebs

Auch für Brustkrebs-Patientinnen wurde nachgewiesen, dass 25(OH)D-Serumspiegel bei Diagnosestellung mit dem Überleben korreliert [110, 116]. *Maalmi et al.* beschreiben in ihrer Meta-Analyse prospektiver Kohortenstudien ein schlechteres Gesamtüberleben (gepoolte HR: 0,62; 95 %-KI: 0,49-0,78) und erkrankungsfreies Überleben (gepoolte HR: 0,58; 95 %-KI: 0,38-0,84) zwischen den jeweiligen Gruppen mit dem niedrigsten gegenüber dem höchsten 25(OH)D-Spiegel [116].

Bezüglich der Frage, ob die Gabe von VD₃ als Intervention einen Nutzen hat, kamen *Autier et al.* in ihrer Meta-Analyse von 18 unabhängigen RCT zu dem Ergebnis, dass die Gabe von im Schnitt 528 I. U. 25(OH)D (Spannweite 300-2.000 I. U.) täglich die Gesamtmortalität von Brustkrebs-Patientinnen senkt (summiertes Relatives Risiko [RR]: 0,93; 95 %-KI: 0,87-0,99) [5]. Auch wenn nur knapp signifikant, so scheint die Gabe von Vitamin D einen Überlebensvorteil zu gewähren.

2.3.6 Einfluss von Vitamin D auf Immunsystem und Neoplasien

Die epidemiologisch nachgewiesenen Effekte von Vitamin D auf das Überleben bei Brustkrebs und Non-Hodgkin-Lymphomen werfen die Frage nach ihrem entsprechenden physiologischen Korrelat auf. Da für die Wirkungsweise Antikörper-gestützter Therapien das patienteneigene Immunsystem von großer Relevanz ist (siehe 2.1.3, Seite 14 und 2.2.3, Seite 18), sei an dieser Stelle die Wirkung von Vitamin D auf das Immunsystem beleuchtet.

1,25(OH)₂D wirkt nicht nur in endokriner Weise auf Leukozyten. Stattdessen können unter anderem Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen, dendritische Zellen, T-Zellen und B-Zellen selbst Vitamin D aktivieren und exprimieren VDR [117, 118]. Aktiviertes 1,25(OH)₂D kann dann sowohl parakrin auf andere Zellen als auch autokrin wirken [119]. Darüber hinaus beeinflusst 1,25(OH)₂D das Zytokin-Freisetzungsmuster professioneller Antigen-präsentierender Zellen (engl. *antigen presenting cells*, APC), was als indirekte, parakrine Wirkung verstanden werden kann und zu einem kaum überschaubaren Spektrum möglicher Wechselwirkungen zwischen den Zellen von innatem und adaptivem Immunsystem führt [117].

2.3.6.1 Makrophagen

Im Rahmen der Erregerabwehr sind Makrophagen in der Lage, Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) mithilfe verschiedener Rezeptoren zu erkennen – beispielsweise Lipopolysaccharide auf *Escherichia coli* über den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) [120]. Dies führt zu einer verstärkten Expression von CYP27B1, was die Konversion von 25(OH)D zu 1,25(OH)₂D bewirkt [120]. Im Anschluss daran verstärkt 1,25(OH)₂D in Makrophagen sowohl die Bereitschaft zur Phagozytose als auch die Freisetzung von ROS und antimikrobiellen Peptiden (engl. *antimicrobial peptides*, AMP) wie Cathelicidin oder Defensin hBD-2 [120, 121].

Cathelicidin vermittelt neben antiinfektiven auch antineoplastische Effekte durch die mitochondriale Freisetzung von ROS in schnell proliferierenden Zellen [6, 122]. *Bruns et al.* konnten zeigen, dass M1-Makrophagen gegenüber Zellen eines Burkitt-Lymphoms Cathelicidin freisetzen, nicht jedoch M2-Makrophagen und Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) [6]. Ursache hierfür war gemäß den Autoren die reduzierte Expression von VDR und CYP27B1, wohingegen die direkte Gabe von 1,25(OH)₂D oder einem 1,25(OH)₂D-Analogon die Freisetzung von Cathelicidin sowie auch die Fähigkeit zur Tumorlyse in diesen Zellen wiederherstellte [6]. Dies konnte auch in vivo bestätigt werden: Makrophagen von Vitamin D-insuffizienten Probanden zeigten nach VD₃-Substitution größere Rituximab-abhängige Zytotoxizität gegen Lymphomzellen als vor der Substitution [6].

Wieso TAM einen beeinträchtigten Vitamin D-Metabolismus zeigen und ob dies im Rahmen der Tumor-Immunevasion aktiv durch den Tumor verursacht wird, verbleibt indes unklar.

Die Freisetzung antimikrobieller Peptide durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ konnte auch in Keratinozyten [123], respiratorischen Epithelien [124], der Harnblase [125] sowie den Gallenwegen [126] gezeigt werden.

2.3.6.2 NK-Zellen

Die Rolle von Vitamin D im Kontext von NK-Zellen ist bislang nicht hinreichend verstanden und erscheint widersprüchlich [127, 128]. So sorgt ein Knockout von *Vitamin D upregulated protein 1* (VDUP1) zu einer eingeschränkten NK-Zell-Differenzierung und -Funktion [129]. Umgekehrt führt die Inkubation von reifen NK-Zellen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ zu einer gesteigerten Zytotoxizität [130]. Parallel dazu lässt sich eine verstärkte Expression von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren wie NKG2D, NKp30, NKp44 [130] und Granzym A, einer in zytotoxischen NK-Zell-Granula enthaltenen Protease, sowie Proteinkinase C, welche an der Freisetzung dieser Granula beteiligt ist, beobachten [131]. Darüber hinaus wird KIR2DL1 auf der Zelloberfläche herunterreguliert [130]. Hierbei handelt es sich um einen *killer cell immunoglobulin-like receptor* (KIR), welcher als inhibitorischer Rezeptor im Rahmen der Fremd-/Selbsterkennung körpereigenes MHC Klasse I (engl. *major histocompatibility complex*) auf potentiellen Zielzellen erkennt [132].

Andere Studien zeigen demgegenüber eine verringerte oder unveränderte NK-Zytotoxizität durch Inkubation mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ [133-135]. Abseits der Untersuchungen an reifen Zellen supprimiert $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ die Differenzierung von NK-Zellen aus hämatopoetischen Vorläufern zugunsten von Monozyten [133], während die so entstehenden NK-Zellen nur eingeschränkt funktionsfähig sind [133].

Als mögliche Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse suggerieren Studien an Mitogen-stimulierten, induzierten, NK-Zell-ähnlichen Leukozyten diesbezüglich, dass NK-Zellen nach $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -Inkubation zwar prinzipiell keinen Verlust an Zytotoxizität zeigen, jedoch schlechter aktivierbar seien [134]. Verantwortlich hierfür soll eine verringerte Sekretion von Interleukin 2 (IL-2) aus anderen Leukozyten sein [134]. Diese Theorie ist konsistent zu den Erkenntnissen, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ die Freisetzung von IL-2 aus T-Helferzellen supprimiert [136] und dass die Gabe von rekombinantem IL-2 die NK-Zell-Funktionalität wiederherstellen kann [134]. Die Zytotoxizität solcher Lymphokin-aktivierter NK-Zellen wird durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sogar deutlich gesteigert [137].

Während der Effekt von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ auf die Funktion reifer, unstimulierter NK-Zellen in vitro umstritten ist, zeigen andere Arbeiten in vivo einen positiven Einfluss. Studien an Patienten unter Hämodialyse-Therapie sowie Patienten mit Rachitis hatten nach einer Behandlung mit Calcitriol eine höhere Anzahl NK-Zellen, welche zudem in ihrer Aktivität gesteigert waren [138, 139].

Neben seinen direkten Effekten auf NK-Zellen erhöht $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ die Suszeptibilität verschiedener Tumor-Zellen gegenüber NK-Zell-Zytotoxizität (siehe 2.3.6.5, Seite 30).

2.3.6.3 *Adaptives Immunsystem*

Die Effekte von Vitamin D auf T- und B-Lymphozyten zeigen viele Parallelen auf [127, 128]. In erster Linie fördert $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ die Bildung regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) [140, 141], während die Proliferation aktiver T-Zellen und T-Gedächtniszellen ($\text{CD}45\text{R}^+$) gehemmt wird [142, 143]. Naive T-Zellen sind hiervon nicht betroffen [142, 143], da T-Zellen – wie auch B-Zellen – vermutlich erst nach Aktivierung überhaupt VDR exprimieren [128]. Neben der Differenzierung beeinflusst $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ auch das Zytokin-Freisetzungsmuster. Die Zugabe von Calcitriol hemmt die Produktion von IL-2, IL-5 und Interferon- γ (IFN- γ) aus $\text{CD}4^+$ T-Zellen [136, 144] und IL-17 aus $T_{\text{H}17}$ -Zellen [145, 146], während IL-4 [147] und anti-inflammatorisches IL-10 [141] stärker sezerniert werden. Dies erklärt die durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ begünstigte Differenzierung nicht-spezialisierter T-Helferzellen ($T_{\text{H}0}$ -Zellen) zu $T_{\text{H}2}$ -Zellen gegenüber $T_{\text{H}1}$ -Zellen, also zu einer humoralen gegenüber einer zellulären Immunreaktion [148].

Auf aktivierte B-Zellen hat $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ebenfalls eine anti-proliferative und auch pro-apoptotische Wirkung [128]. Zudem wird die Differenzierung zu Plasmazellen und die Antikörper-Produktion sowie der Antikörper-Klassenswitch gehemmt [127, 128]. So zeigen sich beispielsweise auch in RCT an Menschen mit systemischem Lupus erythematodes nach VD_3 -Substitution im Vergleich zu Placebo geringere Spiegel antinukleärer Antikörper [149]. Wie auch T-Zellen produzieren B-Zellen durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -Zugabe vermehrt IL-10. Darüber hinaus wird über eine verringerte Expression des kostimulatorischen Proteins CD86 auf APC die Aktivierung von T-Zellen erschwert [150].

Auf bereits aktivierte dendritische Zellen (DC) ist der Effekt von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ eher gering [151]. Erfolgt jedoch vor der Aktivierung bzw. während ihrer In-vitro-Differenzierung aus Makrophagen die Zugabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, entstehen sogenannte tolerogene dendritische Zellen (tDC), die die Aktivierung von $\text{CD}8^+$ T-Zellen hemmen und die Differenzierung von T_{reg} -Zellen fördern [117, 151, 152].

Wie hier grob umrissen, wird das adaptive Immunsystem durch aktives Vitamin D in vielerlei Hinsicht reguliert. Dazu passen epidemiologische Daten nachdem Patienten, die an Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 1, Multipler Sklerose, Rheumatoider Arthritis oder chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen leiden, im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant häufiger niedrige Vitamin D-Spiegel aufweisen [127]. Ebenfalls existieren Korrelationen zwischen Vorhandensein verschiedener Polymorphismen im VDR-Gen und dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen, wobei einige Polymorphismen sogar protektive Wirkung zu besitzen scheinen [127]. Während an Mausmodellen dieser Erkrankungen bereits ein positiver Einfluss einer VD_3 -Substitution gezeigt werden konnte [153-155], fehlt es für die Anwendung beim Menschen derzeit an RCT mit ausreichenden Fallzahlen [127].

2.3.6.4 Barrierefunktion

Körpereigene Barrieren wie beispielsweise Haut oder Darmepithel bilden eine wichtige Stütze des Immunsystems, die ebenfalls durch Vitamin D beeinflusst wird. CYP27B1-defiziente Mäuse, die kein aktives $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ bilden können, zeigten eine reduzierte Anzahl epidermaler Zelladhäsionsmoleküle sowie einen erhöhten transdermalen Wasserverlust [156]. Dies war assoziiert mit einer verringerten Expression Kalzium-regulierender Proteine, die für die Funktion dieser Adhäsionsproteine essenziell sind [156].

Ebenso wurde bei intestinalen Epithelzellen in der Zellkultur sowie im Mausmodell eine höhere Permeabilität bei niedrigen Vitamin D-Spiegeln beobachtet [157]. Welche Auswirkung dabei das ebenfalls durch den Vitamin D-Mangel veränderte Mikrobiom des Darms hatte, bleibt unklar [157].

An einer menschlichen Zelllinie von Endothelzellen kleiner Hirngefäße konnte gezeigt werden, dass nach Behandlung mit Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), ein Zytokin welches unter anderem die Blut-Hirn-Schranke schwächt, die Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ zur Hochregulierung von Zelladhäsionsproteinen führt [158]. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass Vitamin D protektive Einflüsse auf die eingeschränkte Blut-Hirn-Schranke von Patienten mit Multipler Sklerose haben könnte [158].

2.3.6.5 Maligne Zellen

Vitamin D hat nicht nur Auswirkungen auf die Effektorzellen zielgerichteter Therapien, sondern auch auf maligne entartete Zellen selbst [128]. So erhöht die Gabe von Calcitriol-Analoga bei akuter myeloischer Leukämie (AML) die Sensibilität gegenüber der Chemotherapie [128]. Abseits davon konnte unter anderem für die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) [159], die B-CLL [160], hochmaligne B-Zell-Lymphome [161, 162] und Mamma-Karzinome [163, 164], nachgewiesen werden, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ bzw. seine Analoga die Proliferation der Tumorzellen in vitro hemmen. Dieser Effekt war zumindest beim DLBCL in Anwesenheit des VDR-Polymorphismus Fok1 stärker ausgeprägt [165]. In einem Modell für ossär metastasierten Brustkrebs an Mäusen mit CYP27B1-Knockout verhinderte die Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ das Entstehen osteolytischer Herde [163]. Dies konnte in vivo bestätigt werden: athymische Mäuse zeigen nach Injektion humaner Brustkrebs-Zellen durch die Gabe eines Calcitriol-Analogons ein längeres Überleben und eine geringere Rate an Knochenläsionen [166].

Abgesehen von den direkten pro-apoptotischen Effekten auf maligne Zellen, erhöht Vitamin D die Suszeptibilität gegenüber NK-Zell-vermittelter ADCC. An Zelllinien von AML und dem Adenokarzinom der Brust zeigten *Min et al.*, dass eine Inkubation der Tumorzellen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ zu einer erhöhten Lyse durch Vitamin D-unbehandelte NK-Zellen führte [167]. Dies war auf eine hochregulierte Expression von ULBP2 und MIA/B auf den Tumorzellen zurückzuführen, beides Liganden für den

NK-Zell-ständigen Antigenrezeptor NKG2D [167]. Beim NHL wurde ein ähnlicher Effekt jedoch nicht beschrieben.

Zu diesen Erkenntnissen über die Wirkung von Vitamin D auf bzw. in malignen Zellen passt, dass viele Tumore im Rahmen ihrer malignen Transformation die Expression von Proteinen des Vitamin D-Stoffwechsels verändern. So wurde für das Prostata-Karzinom im Mausmodell gezeigt, dass die Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ die Expression von CYP24A1, welches $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ abbaut, erhöht und dass umgekehrt eine CYP24A1-Blockade mit dem Antimykotikum Ketoconazol zu einer größeren $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -abhängigen Apoptose der Tumorzellen führt [168]. Des Weiteren wird in Brustkrebs-Gewebe ebenso weniger VDR und CYP27B1 exprimiert als in gesunder Brust, allerdings mehr CYP24A1 [169]. Zudem reduzieren auch einige B-NHL-Linien die VDR-Expression nach Calcitriol-Behandlung [161].

An gesunden Epithelzellen konnte kürzlich gezeigt werden, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ die Oberflächenexpression von *Programmed Death Ligand 1* und 2 (PD-L1 und PD-L2) steigert [170]. Diese vermindern nach Bindung an *Programmed Death Receptor 1* (PD-1) die proinflammatorische Aktivität von T-Zellen, was ein häufiges Mittel der Immunevasion verschiedener Tumorentitäten darstellt [171]. Ob $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ auch an maligne entarteten Zellen die Expression von PD-L1 und PD-L2 verstärkt, ist indes unklar.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Eine VD_3 -Substitution bei Patienten mit $25(\text{OH})\text{D}$ -Mangel oder -Insuffizienz scheint sich positiv auf das Überleben bei Brustkrebs und DLBCL auszuwirken (siehe 2.3.5, Seite 25). Während sich dies beim Lymphom zumindest teilweise über eine gesteigerte ADCC von Makrophagen gegen Rituximab-markierte Tumorzellen erklären lässt (siehe 2.3.6.1, Seite 27), wurde dies an NK-Zellen bislang noch nicht untersucht. Ebenso fehlen diesbezüglich bislang Untersuchungen für Trastuzumab im Kontext des Mamma-Karzinoms. Während die Inkubation von NK-Zellen *in vitro* mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ zu widersprüchlichen Ergebnissen führte, scheint die VD_3 -Substitution *in vivo* eine gesteigerte NK-Zell-ADCC nach sich zu ziehen (siehe 2.3.6.2, Seite 28). Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, die Auswirkung von Vitamin D auf die Rituximab-, Obinutuzumab-, und Trastuzumab-abhängige zelluläre Zytotoxizität (RDCC, ODCC und TDCC) von NK-Zellen zu untersuchen.

Ebenso nicht geklärt ist, ob sich ein möglicher Substitutionseffekt auf NK-Zellen zwischen verschiedenen $25(\text{OH})\text{D}$ -Niveaus unterscheidet, respektive wann ggf. seine Sättigung erreicht wird. Da der Referenzrahmen für $25(\text{OH})\text{D}$ im Serum (i. S.) bislang allein nach den Vitamin D-vermittelten Effekten auf den Knochen- und Elektrolytstoffwechsel definiert ist (siehe 2.3.2, Seite 21), ist nicht

auszuschließen, dass im onkologischen Umfeld – wie von anderen Autoren bereits postuliert [106, 107] – nicht doch höhere Serumspiegel als 30 ng/ml förderlich sind.

In dieser Arbeit wurden gesunde Probanden *in vivo* auf verschiedene 25(OH)D-Level substituiert. Sowohl zu Beginn als auch nach jeder Substitutionsrunde wurden NK-Zellen isoliert und das Ausmaß an RDCC, ODCC und TDCC sowie die Antikörper-unabhängige NK-Zell-Zytotoxizität bestimmt. Die Erkenntnisse dieser Arbeit könnten möglicherweise für 25(OH)D-Richtzielwerte in künftigen klinischen Interventionsstudien dienlich sein.

Zudem sind bisherige Substitutionsprotokolle, wie etwa von *van Groningen et al.* [172] oder *Singh et al.* [173] beschrieben, lediglich für einen langfristigen und eher mäßigen Anstieg der 25(OH)D-Spiegel konzipiert. Diese Form der Substitution ist bei onkologischen Patienten nicht zielführend, da die erhoffte Steigerung der NK-Zell-Aktivität rechtzeitig und zu Beginn der AK-Immuntherapie erreicht sein sollte. Sekundäres Ziel dieser Studie war es somit, ein sicheres Protokoll für die rasche Substitution auf entsprechende 25(OH)D-Zielwerte zu konzipieren.

3 Probanden, Material und Methoden

3.1 Probanden

Für die etappenweise Substitution mit Vitamin D und die anschließende Isolierung von NK-Zellen wurden freiwillige Probanden rekrutiert. Einschlusskriterien waren ein Mindestalter von 30 Jahren sowie eine schriftliche Einverständniserklärung nach vorheriger detaillierter Aufklärung über das geplante Prozedere einschließlich möglicher Nebenwirkungen, die durch die Einnahme von *Dekristol*[®] entstehen können. Ausschlusskriterien waren fehlendes Einverständnisvermögen, das Vorliegen hämatologischer Erkrankungen sowie eine laufende Therapie mit immunmodulierenden oder -supprimierenden Medikamenten. So war insbesondere die Einnahme von Glukokortikoiden, Zytostatika oder Biologicals nicht mit der Aufnahme in die Studie vereinbar.

Die Daten der Probanden wurden verschlüsselt. Ebenso wurde jedem Teilnehmer eine studieninterne Identifikationsnummer zugeordnet, anhand derer Blutproben dem *Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Homburg* pseudonymisiert zugeschickt werden konnten, ohne eine Verletzung der Privatsphäre zu riskieren.

Die Studie wurde von der *Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes* bewilligt (Kennnummer 178/17) und gemäß der *Deklaration von Helsinki* durchgeführt.

3.2 Material und Geräte

3.2.1 Vitamin D Präparat

Zur Substitution der Teilnehmer wurde das Cholecalciferol-Präparat *Dekristol*[®] 20.000 I. U. der *mibe GmbH Arzneimittel* eingesetzt.

3.2.2 Chemikalien, Puffer, Medien und Lösungen

Tabelle 3 – Eingesetzte Chemikalien, Puffer, Medien und Lösungen mit Bezugsquellen

Bezeichnung	Inhaltsstoffe / Bezugsquelle
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland Artikelnummer D8537-1L
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, 0,5 M)	Life Technologies Europe BV Bleiswijk, Niederlande Artikelnummer 15575020
Trypsin-EDTA-Lösung (5 g/l Trypsin, 2 g EDTA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland Artikelnummer T4174-100ML

Bezeichnung	Inhaltsstoffe / Bezugsquelle
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland Artikelnummer F0804-500ML
Humanes Serumalbumin (HSA), 20%, salzarm	CSL Behring GmbH Marburg, Deutschland Zulassungsnummer 10530a/96
L-Glutamin (200 mM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland Artikelnummer G7513-100ML
Natrium-Pyruvat (100 mM)	PAN Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland Artikelnummer P04-43100
Hepes-Puffer (1 M)	PAN Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland Artikelnummer P05-01100
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	Sigma Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland Artikelnummer P0781-100ML
RPMI-1640 (Ø Phenolrot, Ø L-Glutamin)	PAN Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland Artikelnummer P04-16516
X-Vivo™ 15 (Ø Phenolrot, Ø Gentamicin)	Lonza SPRL Verviers, Belgien Artikelnummer BE02-061Q
Kulturmedium für Daudi	RPMI-1640 10% FCS 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Kulturmedium für ZR-75-1	RPMI-1640 10% FCS 2 mM L-Glutamin 2 mM Na-Pyruvat 25 mM Hepes-Puffer 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
ADCC-Medium	X-Vivo™ 15 mit 2 % HSA 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Pancoll human (Dichte 1,077 g/ml)	PAN Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland Artikelnummer P04-60500
Cell Wash	BD GmbH (Becton, Dickinson an Company) Heidelberg, Deutschland Artikelnummer 349524
MACS®-Puffer	0,5 % FCS 2 mM EDTA ad 15 ml PBS

Bezeichnung	Inhaltsstoffe / Bezugsquelle
MACS® NK Cell Isolation Kit, human mit Antikörpern und MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH Bergisch-Gladbach, Deutschland Artikelnummer 130-092-657
Cytotoxicity Detection Kit (LDH) mit Catalyst, Dye Solution, Stop Solution und Lysis Solution	Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Deutschland Artikelnummer 04744926001

3.2.3 Antikörper und Enzyme

Tabelle 4 – Eingesetzte Antikörper und Enzyme mit Bezugsquellen

Name	Zusammensetzung / Bezugsquelle
Anti CD16-FITC	BD GmbH (Becton, Dickinson and Company) Heidelberg, Deutschland Artikelnummer 656146
Anti CD56-PE	BD GmbH (Becton, Dickinson and Company) Heidelberg, Deutschland Artikelnummer 345812

3.2.4 Tumorzelllinien

Tabelle 5 – Eingesetzte Tumorzelllinien mit Bezugsquellen

Name	Entität	Bezugsquelle
Daudi	Burkitt-Lymphom	Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Braunschweig, Deutschland Katalognummer ACC 78
ZR-75-1	Duktales Mamma-Karzinom	Cell Lines Service GmbH Eppelheim, Deutschland Artikelnummer 300163

3.2.5 Verbrauchsgegenstände

Tabelle 6 – Eingesetzte Verbrauchsgegenstände

Name	Hersteller
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Sarstedt AG & Co KG Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 50 ml	
0,5 ml Reaktionsgefäß	
1,5 ml Reaktionsgefäß	
2,0 ml Reaktionsgefäß	
Diverse Pipettenspitzen	
Mikrotiterplatten (U-Boden)	
Mikrotiterplatten (F-Boden)	
Serologische Pipetten 5ml	
Serologische Pipetten 25ml	
Serologische Pipetten 10ml	Corning GmbH Kaiserslautern, Deutschland

Name	Hersteller
MACS® LS-Säulen	Miltenyi Biotec GmbH Bergisch-Gladbach, Deutschland Artikelnummer 130-042-401

Artikelnummern wurden nur angegeben, wenn es sich bei dem jeweiligen Gegenstand um Ausstattung handelt, die nicht in jedem biologischen Labor zu erwarten ist.

3.2.6 Geräte

Tabelle 7 – Eingesetzte Laborgeräte

Name	Hersteller
Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5415 D	
Pipette Research® 1-10 µl	
Pipette Research® 10-100 µl	
Pipette Research® 100-1.000 µl	
Handdispenser Multipette® M4	Life Technologies GmbH / Thermo Fisher Scientific Darmstadt, Deutschland
Sicherheitswerkbank für steriles Arbeiten HERAsafe™ HSP 18	
CO₂-Inkubator HERAccl™ 150	PerkinElmer Cellular Technologies Germany GmbH Hamburg, Deutschland
Microplate Reader Wallac 1420 Victor2	
MACS® MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotec GmbH Bergisch-Gladbach, Deutschland Artikelnummer 130-042-302
Durchflusszytometer FACSCalibur™	BD Biosciences GmbH Heidelberg, Deutschland Artikelnummer 342975
Vortexmischer Heidolph REAX top	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG Schwabach, Deutschland

3.2.7 Computersoftware

Zur Erstellung dieser Arbeit wurde auf verschiedene Software-Produkte aus dem Microsoft Office®-Paket zurückgegriffen. Die computergestützte Auswertung der fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometrie (engl. *fluorescence activated flow cytometry*) erfolgte mit CellQuest™ (BD Biosciences GmbH) und WinMDI 2.8 (Joe Trotter, Freeware).

3.3 Methoden

3.3.1 Vitamin D-Substitution

In dieser Studie wurde die NK-Zell-Zytotoxizität auf insgesamt vier vordefinierten 25(OH)D-Niveaus bestimmt: im Vitamin D-Mangel (< 20 ng/ml) sowie nach In-vivo-Substitution mittels Dekristol® 20.000 I. U. auf niedrig-normalen (30 ng/ml), mittleren (65 ng/ml) und hoch-normalen

(90 ng/ml) Serumspiegeln. Hierfür wurde zunächst die Substitutionsformel nach *van Groningen et al.* eingesetzt [172]. Diese ist für ein langfristiges Anheben des 25(OH)D-Wertes über mehrere Wochen konzipiert, sodass die Formel im Verlauf der Studie modifiziert wurde, um einen raschen Anstieg des Serumspiegels zu erreichen (siehe 4.2, Seite 49).

Auf jeder Substitutionsstufe erfolgte die Bestimmung von Kalzium und Phosphat im Blut, um im Fall einer Vitamin D-Intoxikation die Substitution sofort zu beenden und gegebenenfalls medikamentöse gegenzusteuern.

3.3.2 Zellbiologische Methoden

3.3.2.1 Zellkultur

Um mit im Labor geführten Zellen langfristig reproduzierbare Daten generieren zu können, ist ein standardisierter Umgang mit ebenso standardisierten Zelllinien notwendig. Die für diese Studie eingesetzten Zelllinien entstammen verschiedenen Tumorentitäten, gegen die die in dieser Studie verwendeten Antikörper auch therapeutisch eingesetzt werden. Für die Arbeit mit den Antikörpern Rituximab und Obinutuzumab wurde die CD20-positive Linie Daudi eingesetzt; für den Antikörper Trastuzumab die HER2-positive Zelllinie ZR-75-1.

Beide Zelllinien wurden gemäß Herstellerangaben in RPMI-1640-Medium kultiviert. Dieser bereits gepufferten, proteinfreien Nährstofflösung wurde L-Glutamin (2 mM) und fetales Kälberserum (engl. *fetal calf serum*, FCS; 10 % vol.) zugesetzt [174]. Zur Kontaminationsprophylaxe wurde außerdem Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) zugesetzt. Das Medium der ZR-75-1-Zelllinie war zudem mit Natrium-Pyruvat (2 mM) sowie HEPES-Puffer (25 mM) versetzt. Die Kulturen wurden zweimal wöchentlich jeweils am Tag vor dem Zytotoxizitäts-Assay passagiert, um einem Wachstumsarrest vorzubeugen. Nach ca. sechs Wochen wurde ein frisches Aliquot der gleichen Charge jeder Zelllinie aus dem Stickstofflager aufgetaut und wie beschrieben in Kultur genommen, um nach weiteren zwei Wochen die laufenden Linien in den Assays als Targets abzulösen. Beide Zelllinien wurden bei 37 °C in einer Atmosphäre mit angenähert gesättigter Luftfeuchte und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) inkubiert.

3.3.2.2 CD20-positive Zelllinie Daudi

Die Daudi-Zelllinie entstammt einem 1967 entnommenen Biopsat eines damals 16 Jahre alten Afrikaners, der an einem Burkitt-Lymphom erkrankt war [175, 176]. Es handelt es sich um eine CD20-positive, nicht-adhärenzte Zelllinie.

Im Gegensatz zu gesunden Zellen oder anderen B-Zell-Zelllinien exprimiert Daudi kein β 2-Mikroglobulin. Da β 2-Mikroglobulin ein integraler Bestandteil des MHC Klasse I-Proteins ist,

exprimieren Daudi-Zellen somit auch keine MHC-I-Moleküle an ihrer Zelloberfläche [177, 178]. Dies reduziert bei Zytotoxizitätsuntersuchungen mit allogenen NK-Zellen interindividuelle Schwankungen, da die sonst bei *Matched Pairs* auftretende NK-Zell-Hemmung über KIR wegfällt [132] (siehe 2.3.6.2, Seite 28). Somit können Daudi-Zellen als Zielzellen auch gegen NK-Zellen MHC-I-identischer Spender eingesetzt werden [132].

3.3.2.3 *HER2-positive Zelllinie ZR-75-1*

ZR-75-1 ist eine 1978 etablierte Zelllinie, die aus malignem Aszites einer 63-jährigen kaukasischen Frau mit metastasiertem Mamma-Karzinom gewonnen wurde [179]. Zellen dieser Kultur sind Tripel-positiv; sie exprimieren sowohl HER2 als auch Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren [180].

Bei ZR-75-1 handelt es sich im Gegensatz zu Daudi um eine adhärente Zelllinie, die sich am Boden der Kulturflasche anheftet. Zur Ablösung der Zellen wurde Lösung mit Trypsin (5 mg/ml) und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; 2 mg/ml), 1:10 verdünnt mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS), zugegeben.

3.3.2.4 *Zellquantifizierung*

Der Versuchsaufbau erforderte an mehreren Stellen die genaue Kenntnis über die Anzahl an Zellen in einer Suspension. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Zellquantifizierungen wurden nach demselben Zählprotokoll durchgeführt, welches an dieser Stelle verallgemeinert beschrieben werden soll. Da für die Berechnung der Zellzahl das genaue Volumen der Zellsuspension bekannt sein muss, wurde dieses zunächst mit Hilfe einer geeigneten Messpipette bestimmt. Dann wurden der Zellsuspension 5 µl entnommen und mit PBS auf insgesamt 50 µl Volumen verdünnt. Diese Lösung wurde anschließend mit 50 µl Trypanblau im Verhältnis 1:1 vermischt. Trypanblau ist ein in der Zellbiologie gängiges Färbemittel zur Identifizierung toter Zellen, da es ausschließlich von apoptotischen und nekrotischen Zellen aufgenommen wird, während vitale Zellen sich nicht färben [181]. Mit Trypanblau angefarbte Zellen wurden nicht gezählt. Durch eine auf die Zelllinie angepasste Zellkultur kann der Anteil toter Zellen deutlich unter 10 % gehalten werden. Zur Zählung wurde eine Zählkammer nach *Neubauer* verwendet.

3.3.2.5 *Vorbereitung der Tumorzelllinien*

Vor jedem Versuch mussten in ausreichender Menge Zellen der Tumorzelllinien geerntet werden (siehe 3.3.3.2, Seite 42). Nachdem ZR-75-1 mittels oben beschriebener Trypsin-Lösung von ihrer Zellkulturflasche abgelöst wurde, konnten beide Zelllinien quantifiziert werden. Abhängig von der Zelldichte wurde berechnet, welches Volumen beiden Kulturen jeweils entnommen werden musste, um die für einen Test benötigte Zahl an Zielzellen zu ernten. Zum Entfernen von Kulturmedium und Stoffwechselprodukten wurden die den Kulturen entnommenen Zellen zweimal mit ADCC-Medium

gewaschen (Zellpellet plus 1,5 ml ADCC-Medium für 2 min bei 400 G zentrifugiert) und in 200 µl ADCC-Medium in Suspension genommen. Um das zum Test notwendige Volumen mit der gewünschten Dichte einzustellen, wurden schlussendlich die Daudi in 15,1 ml, die ZR-75-1 in 7,55 ml ADCC-Medium gelöst. ADCC-Medium basiert auf X-Vivo™ 15, einem serumfreien, gepufferten Nährmedium, welches speziell für Immunzellen entwickelt wurde. Der nächste Schritt in der Prozedur der Tumorzellen, nämlich die Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern, ist unter 3.3.3.2 (Seite 42) beschrieben.

3.3.2.6 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Vollblut

Zur Isolierung der NK-Zellen wurden am Tag des ADCC-Tests dem jeweiligen Probanden ca. 50 ml Vollblut in handelsübliche Blutentnahmeröhrchen mit dem Gerinnungshemmer EDTA entnommen. Zur Isolierung der NK-Zellfraktion wurden zunächst die peripheren mononukleären Zellen (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) mittels Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt. PBMC sind ein Gemisch aus T- und B-Lymphozyten, Monozyten, dendritischen Zellen und NK-Zellen. Der relative Anteil der einzelnen Leukozyten-Populationen schwankt inter- und intraindividuell. In der Regel beträgt die NK-Zellfraktion zwischen 5 % und 20 % [182]. Nicht zu den PBMC gehören Granulozyten (auch: polymorphnukleäre Zellen; engl. *polymorphonuclear cells*, PMN).

Der zur Isolierung der PBMC benötigte Dichtegradient wurde mit Pancoll®, einem synthetischen Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer, aufgebaut. Mit einer Dichte von 1,077 g/ml trennt es während der Zentrifugation die PBMC-Fraktion von den Erythrozyten und Granulozyten, den beiden übrigen Zellpopulationen des peripheren Blutes, aufgrund derer höheren Dichte nach zentripetal hin ab. Wegen seiner leicht zytotoxischen Wirkung muss Pancoll® jedoch unmittelbar nach der Isolierung der PBMC wieder ausgewaschen werden [183].

Bei der Dichtegradientenzentrifugation lassen sich etwaige Verunreinigungen der extrahierten Phase mit anderen Zellen oder korpuskulären Blutbestandteilen nicht vermeiden. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass einerseits einzelne Zellen Schwankungen in ihrer Dichte aufweisen und andererseits in der Praxis ein vollständig erschütterungsfreies Arbeiten nicht möglich ist. Solche Verunreinigungen können im Rahmen der magnetischen Zellsortierung beseitigt werden (siehe 3.3.2.7, Seite 40).

Für die Dichtegradientenzentrifugation wurden in sechs Zentrifugenröhrchen à 15 ml jeweils 4 ml Pancoll® vorgelegt. Anschließend wurde das Pancoll® vorsichtig mit 11 ml des gespendeten EDTA-Vollbluts überschichtet und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur und mit 500 G zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde aus allen Röhrchen die PBMC-Phase geerntet und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Der nächste Schritt bestand in der Reinigung der PBMC von restlichem Serum und Pancoll®. Hierfür wurde das Röhrchen mit 4 °C kalter PBS aufgefüllt und in der zwischenzeitlich ebenfalls auf 4 °C vortemperierten Zentrifuge für 10 Minuten bei 300 G abgedreht.

Der flüssige Überstand des Röhrchens wurde anschließend verworfen und das am Boden anhaftende Zellpellet erneut in kalter PBS resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde einmal noch wiederholt. Nach dem zweiten Waschen wurde das Pellet in 7 ml PBS resuspendiert und die Anzahl der vorliegenden Zellen bestimmt (siehe 3.3.2.4, Seite 38).

3.3.2.7 Magnetische Zellsortierung

Die Isolierung der NK-Zellfraktion aus der vorliegenden PBMC-Suspension geschah mittels magnetisch aktivierter Zellsortierung (engl. *magnetic activated cell sorting*, MACS®). Bei diesem Verfahren werden Zellen anhand ihres zelltypischen Phänotyps, meistens spezifische Differenzierungscluster an der Zelloberfläche, mit einem für das entsprechende CD-Molekül spezifischen Antikörper markiert und können im Anschluss darüber selektiv getrennt werden.

Dabei unterscheidet man grundsätzlich zwei unterschiedliche Strategien. So können zum einen die zu isolierenden Zellen mit einem entsprechenden Antikörper „direkt“ markiert und dann im magnetischen Feld auf der (MACS®-) Trennsäule zurückgehalten werden, während die unerwünschten Zellen die Säule im Durchfluss passieren. Der Nachteil dieser Variante besteht darin, dass die meisten der zur Separation ausgewählten zelltypischen Marker-Moleküle nach der Separation mit einem Antikörper belegt sind, was die Funktion dieser Moleküle in den anstehenden funktionellen Untersuchungen einschränken kann. Im konkreten Fall der beabsichtigten Isolierung von NK-Zellen hätte die Verwendung von CD16 als Zielmolekül eine „Belegung“ dieses Fcγ-Rezeptors zur Folge gehabt, was zu einer erheblichen Beeinträchtigung der ADCC-Aktivität der so angereicherten NK-Zellen geführt hätte. Um das zu vermeiden, können zum anderen alle Zellen außer den NK-Zellen ihrerseits mit einem Gemisch Zelltyp-spezifischer Antikörper markiert und danach im magnetischen Feld der Trennsäule zurückgehalten und somit von den NK-Zellen separiert werden, die die Säule dann im Durchfluss „unangerührt“ (engl. *untouched*) passieren. Da in dieser Arbeit die ADCC-Aktivität von NK-Zellen untersucht wurde, kam zur Isolierung der NK-Zellen selbstredend nur die zweite Strategie in Frage.

Dazu wurde das *NK Cell Isolation Kit, human* der *Miltenyi Biotec GmbH* verwendet. Dieses Kit entfernt zusätzlich auch Verunreinigungen durch andere korpuskuläre Blutbestandteile wie Thrombozyten, Erythrozyten oder Granulozyten, die bei der Dichtegradientenzentrifugation nicht komplett ausgeschlossen werden können (siehe 3.3.2.6, Seite 39). Die Isolierung der NK-Zellen erfolgte nach dem Protokoll des Kit-Anbieters. Bei der Kalkulation der Anzahl der eingesetzten PBMC sind zum einen die Kapazität der verwendeten MACS®-Trennsäule und zum anderen die Strategie der Isolierung zu berücksichtigen. Aufgrund der Bindungskapazität der verwendeten Trennsäulen (LS-Format) von maximal 10^8 markierten (Nicht-NK-) Zellen und der zuvor beschriebenen Depletions-Strategie wurden

von jedem Probanden auch maximal nur 1×10^8 PBMC eingesetzt. Diese wurden erneut zentrifugiert (10 Minuten, 300 G, 4 °C), der flüssige Überstand verworfen und das PBMC-Pellet dann in 40 µl MACS[®]-Puffer pro 10^7 Zellen resuspendiert. Nun wurden zum Markieren der Nicht-NK-Zellen 10 µl des Biotin-Antikörpergemischs pro 10^7 Zellen hinzugegeben. Diese Suspension wurde gründlich gemischt und für 5 Minuten bei 4 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von weiteren 30 µl MACS[®]-Puffer und 20 µl MicroBeads zur Markierung der gebundenen Antikörper für die MACS[®]-Separation, erneut jeweils pro 10^7 Zellen. Nach anschließendem Mischen und 10-minütiger Inkubation bei 4 °C konnten die PBMC sortiert werden. Dafür wurde die Zellsuspension in die zwischenzeitlich mit 3 ml MACS[®]-Puffer äquilibrierte MACS[®]-LS-Säule gegeben. Nach Durchlaufen dieser Suspension wurde die Säule zweimal mit 3 ml MACS[®]-Puffer gespült.

Die LS-Säule mit den gebundenen Nicht-NK-Zellen wurde verworfen. Die im Durchlauf isolierten NK-Zellen wurden nach Entnahme einer Probe für die durchflusszytometrische Qualitätskontrolle (siehe 3.3.2.8) zentrifugiert, um den MACS[®]-Puffer zu entfernen (300 G, 10 Minuten, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 500 µl ADCC-Medium aufgenommen (NK-Zell-Stocksuspension). Anschließend wurden die Zellen quantifiziert (siehe 3.3.2.4, Seite 38).

3.3.2.8 Durchflusszytometrie

Ungefähr 90 % der NK-Zellen sind dem Subtyp CD56^{dim}/CD16⁺ zuzuordnen, der eine ausgeprägte Zytotoxizität aufweist [184]. CD16 bezeichnet dabei FcγIIIa, der als Antikörperrezeptor essenziell für die ADCC ist [185]. Andere Subpopulationen wie CD56^{bright}/CD16^{dim} zeigen stattdessen vermehrt immunregulatorische Funktionen wie die Produktion von Zytokinen. Möglicherweise sind sie auch Vorstufen von CD16⁺ NK-Zellen [186]. Da das Ziel dieser Arbeit jedoch die Untersuchung der Fähigkeit der NK-Zellen zur ADCC war, wurde der Anteil an CD16⁺ Zellen, ungeachtet der CD56-Expression, mittels fluoreszenzaktivierter Durchflusszytometrie bestimmt.

Hierfür wurden nach der MACS[®]-Isolierung 80 µl der NK-Zell-Stocksuspension entnommen und in einem Reaktionsgefäß zentrifugiert (2 Minuten, 400 G). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 50 µl PBS resuspendiert. Die NK-Suspension wurde mit je 2,5 µl der beiden fluoreszenzmarkierten Antikörper CD16-FITC (CD16-Fluoresceinisothiocyanat) und CD56-PE (CD56-Phycoerythrin) für 15 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (gleiche Parameter) zum Entfernen ungebundener Antikörper wurden die CD16- und CD56-markierten NK-Zellen nun in 120 µl Cell Wash gelöst. Anschließend wurde im Durchflusszytometer die Fraktion der CD16⁺ Zellen qualitativ kontrolliert und die Ausbeute an NK-Zellen bestimmt.

3.3.3 Experimentelle Bestimmung der NK-Zell-Aktivität

3.3.3.1 Anlegen der Antikörper-Verdünnungsreihen

Das Versuchsprotokoll sah vor, alle drei Antikörper in dekadisch logarithmisch absteigenden Konzentrationen von 1 µg/ml bis 0,0001 µg/ml mit den Zielzellen zu inkubieren bevor die NK-Zellen als Effektorzellen zugegeben werden.

Die drei getesteten Antikörper Rituximab, Obinutuzumab und Trastuzumab wurden von der Bezugsquelle in einer Konzentration von 2 mg/ml geliefert. Die folgende Tabelle 8 zum Anlegen einer Verdünnungsreihe gilt daher für alle Antikörper gleichermaßen.

Tabelle 8 – Anleitung zur Herstellung der Antikörper-Verdünnungsreihe

Verdünnung	D0-Stock	D2	D3	D4	D5	D6
Konzentration	2 mg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,01 µg/ml	0,001 µg/ml
Verdünnung	-	1:200	1:2.000	1:20.000	1:200.000	1:2.000.000
Ansatz	-	5 µl D0 + 995 µl ADCC-M.	100 µl D2 + 900 µl ADCC-M.	100 µl D3 + 900 µl ADCC-M.	100 µl D4 + 900 µl ADCC-M.	100 µl D5 + 900 µl ADCC-M.

Gezeigt wird die Anleitung zur Herstellung einer Antikörper-Verdünnungsreihe auf Basis einer Ausgangslösung mit der Konzentration 2 mg/ml. Im ersten Schritt musste zur Verdünnung auf 10 µg/ml zunächst 5 µl der Ausgangslösung mit 995 µl ADCC-Medium gemischt werden (Verhältnis 1:200). Nach gründlicher Durchmischung wurde dann aus 100 µl D2 und 900 µl ADCC-Medium die nächste Verdünnungsstufe eingestellt (usw.). Die finale Antikörperkonzentration wurde durch eine weitere 1:10-Verdünnung beim Zusammenpipettieren der Target-Ansätze erzielt (siehe 3.3.3.5, Seite 45).

3.3.3.2 Vorbereiten der Target-Zellen

Die Tests zur Bestimmung der NK-Zell-Aktivität wurden in 96-Well-Platten mit U-förmigen Wellböden angelegt, um trotz geringer Zellzahlen optimale Zell-Zell-Kontakte zu gewährleisten. Im Rahmen vorangegangener Arbeiten wurde eine Zahl von 4.000 Target-Zellen pro Well als ausreichend bestimmt, um saubere und eindeutig differenzierbare Lyse-Signale zu erhalten. Diese geringe Zahl an Target-Zellen erlaubte dann auch, die Tests mit einer noch vertretbaren Anzahl an Effektorzellen durchzuführen, da von jedem Probanden nur eine limitierte Zahl an NK-Zellen pro Test zur Verfügung stand.

Daudi-Zellen dienen sowohl für die durch Rituximab als auch für die durch Obinutuzumab vermittelte ADCC als Zielzellen. Jeder Ansatz wurde im Test als Triplette angelegt. Aufgrund der verschiedenen Test- und Kontrollansätze wurden insgesamt 9×10^5 Daudi in 15,1 ml ADCC-Medium und somit im Vergleich zu ZR-75-1 doppelt so viel Zellsuspension benötigt ($4,5 \times 10^5$ ZR-75-1 in 7,55 ml ADCC-Medium). Dabei wurde die Zelldichte der Target-Zell-Suspensionen so eingestellt, dass in 75 µl der Suspension 4.000 Target-Zellen vorlagen, die für ein Well der Testplatte vorgesehen waren. In Tabelle 9 ist die generelle Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze der Target-Zellen aufgeführt.

Die Target-Ansätze wurden für 20 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, um die Bindung der jeweiligen Antikörper an die entsprechenden Zielzellen zu ermöglichen.

Tabelle 9 – Anleitung zum Vorlegen der Antikörper-Zielzell-Lösungen

Ansatz	Antikörper-Verdünnung (µl)	Zielzell-Suspension (µl)	ADCC-Medium (µl)	Finale AK-Konzentration (µg/ml)	Anzahl Zielzellen (pro Well)	Anzahl Wells* (à 75 µl)
Ø AK	-	990 µl	110 µl	0	4.000	14
D2	110 µl D2	990 µl	-	1	4.000	14
D3	110 µl D3	990 µl	-	0,1	4.000	14
D4	110 µl D4	990 µl	-	0,01	4.000	14
D5	110 µl D5	990 µl	-	0,001	4.000	14
D6	110 µl D6	990 µl	-	0,0001	4.000	14

Die hier aufgezeigten sechs Ansätze (Ø AK bis D6) wurden pro Versuch jeweils für die Kombinationen Daudi mit Rituximab, Daudi mit Obinutuzumab sowie ZR-75-1 mit Trastuzumab angelegt. Dazu wurden die in den Spalten 2, 3 und 4 angegebenen Volumina der in der Kopfzeile gelisteten Komponenten zusammenpipettiert. (*) Jeder Ansatz wurde für zwei Well im Überschuss kalkuliert.

3.3.3.3 Vorbereiten der Effektorzellen

Das Studienprotokoll sah vor, die NK-Zellen in zwei verschiedenen Verhältnissen von Effektor- zu Zielzellen (engl. *effector cell to target cell ratio*, E/T-Ratio), nämlich 2,5:1 und 5:1, mit den antikörperbeladenen Zielzellen inkubieren.

Nachdem, wie in 3.3.2.8 (Seite 41) beschrieben, der Anteil an CD16⁺ NK-Zellen an der gesamten mittels MACS[®] angereicherten NK-Zell-Suspension bestimmt wurde, wurde nun ausgerechnet, wie viel von der der NK-Zell-Stocksuspension eingesetzt werden musste, um die für den ADCC-Test benötigten 2×10^6 CD16⁺ NK-Zellen zu erhalten. Dieses Volumen wurde anschließend entnommen und mit ADCC-Medium auf insgesamt 7,5 ml Volumen aufgefüllt. Die in dieser Suspension verbliebenen CD16⁻ Zellen wurden nicht entfernt. Da die Testplatten mit je 75 µl/Well des NK-Zellansatzes belegt wurden, lagen 20.000 NK-Zellen pro Well vor. Bei 4.000 Zielzellen pro Well (siehe oben), entsprach dieser Ansatz also bereits einer E/T-Ratio von 5:1. Um den Ansatz mit der E/T-Ratio von 2,5:1 herzustellen, wurden von dieser NK-Zell-Suspension, wie in Tabelle 10 beschrieben, 2.435 µl entnommen und im Verhältnis 1:1 mit ADCC-Medium verdünnt.

Tabella 10 – Anleitung zum Anfertigen der NK-Zell-Ansätze

E/T-Ratio	Anzahl NK-Zellen (pro Well)	Anzahl Zielzellen (pro Well)	NK-Suspension (µl)	ADCC-Medium (µl)
5:1	20.000	4.000	4.875	-
2,5:1	10.000	4.000	2.435	2.435

Die NK-Suspension wurde so verdünnt, dass die 75 µl, die im Verlauf in ein Well auf der Reaktionsplatte pipettiert wurden, insgesamt 20.000 NK-Zellen enthalten (siehe Text). Bei 4.000 Zielzellen im Well entspricht dies einer E/T-Ratio von 5:1. Ein Teil dieser Suspension wurde jedoch verdünnt, um daraus den 2,5:1-Ansatz herzustellen.

3.3.3.4 Kontrollansätze

3.3.3.4.1 Technischer Blank

Wie im nächsten Abschnitt (3.3.4, Seite 46) näher beschrieben, wurde die Aktivität der aus den Target-Zellen freigesetzten Laktatdehydrogenase (LDH) photometrisch gemessen. Diese diente als indirektes Maß für die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen. Wie bei jedem photometrischen Test musste dabei die Hintergrund-Absorption berücksichtigt werden. In diesem Fall also die der Mikrotiterplatte sowie die des zellfreien ADCC-Mediums in der Mikrotiterplatte. Die von diesem sogenannten technischen Hintergrund (engl. *Blank*) verursachte Absorption wurde von allen anderen gemessenen Absorptionen abgezogen.

3.3.3.4.2 Spontan-Lysen

Zur korrekten Quantifizierung der zytotoxischen Aktivität musste zudem die LDH-Freisetzung aus den im Test eingesetzten Target-Zellen ohne Einwirkung durch NK-Zellen bestimmt werden. Dazu wurde ein Ansatz nur aus 4.000 Tumorzellen/Well ohne NK-Zellen angelegt. Auch dieser Ansatz wurde unter den gleichen Bedingungen inkubiert wie die eigentlichen Effektor-/Target-Ansätze. Die von der spontanen Lyse verursachte Absorption wurde bei der Quantifizierung der Messergebnisse von allen anderen Test-Ansätzen mit den entsprechenden Target-Zellen subtrahiert.

Um die Möglichkeit nicht außer Acht zu lassen, dass auch die NK-Zellen während der Inkubationszeit einer spontanen Lyse unterliegen und somit LDH freisetzen, wurde diese für die Effektorzellen ebenfalls bestimmt. Zur Messung dieser spontanen Absorption wurden lediglich 10.000 (entsprechend E/T-Ratio 2,5:1) respektive 20.000 NK-Zellen (E/T Ratio 5:1) pro Well ohne Target-Zellen angelegt. Auch die Absorptionen der jeweiligen spontanen NK-Zell-Lysen würde gegebenenfalls von den Messwerten bei der entsprechenden E/T-Ratio abgezogen werden.

3.3.3.4.3 Maximal-Lyse

Des Weiteren musste ermittelt werden, wieviel LDH bei der Lyse aller 4.000 Tumorzellen eines Wells freigesetzt wurde. Dies wurde durch Zugabe eines Lyse-Mediums 15-20 min vor Beendigung der vollständigen Inkubationszeit erreicht. Das Konzentrat zur Induktion der Maximal-Lyse war Bestandteil

des *Cytotoxicity Detection Kit* (siehe 3.2.2, Seite 33) und wurde unmittelbar vor Gebrauch 1:10 mit ADCC-Medium verdünnt.

Das Lyse-Medium beinhaltete Octoxinol 9 (Triton® X-100). Dabei handelt es sich um ein nicht-ionisches, chemisches Detergens, das Zellmembranen perforiert ohne die dabei freigesetzten Proteine in einem nennenswerten Umfang zu denaturieren [187, 188]. Diese Eigenschaft des Lyse-Mediums war insofern wichtig, als dass die Freisetzung des Enzyms LDH in diesen Ansätzen mit 100 % Lyse gleichgesetzt wurde. Die Absorptionen aller anderen Test-Ergebnisse wurden auf diesen Wert relativ bezogen.

3.3.3.5 Belegung der Reaktionsplatten und Inkubation

Unmittelbar nach der Aufbereitung der NK- und Target-Zellansätze wurden die beiden Testplatten gemäß Abbildung 2 belegt.

Abbildung 2 – Belegung der Testplatten zur Inkubation von NK-Zellen mit ihren Zielzellen und Kontrollansätze.

Platte Nr. 1	Rituximab + Daudi						Obinutuzumab + Daudi					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Technischer Blank						-	-	-	-	-	-
B	0 µg/ml (∅)			0 µg/ml (∅)			0 µg/ml (∅)			0 µg/ml (∅)		
C	0,0001 µg/ml (D6)			0,0001 µg/ml (D6)			0,0001 µg/ml (D6)			0,0001 µg/ml (D6)		
D	0,001 µg/ml (D5)			0,001 µg/ml (D5)			0,001 µg/ml (D5)			0,001 µg/ml (D5)		
E	0,01 µg/ml (D4)			0,01 µg/ml (D4)			0,01 µg/ml (D4)			0,01 µg/ml (D4)		
F	0,1 µg/ml (D3)			0,1 µg/ml (D3)			0,1 µg/ml (D3)			0,1 µg/ml (D3)		
G	1 µg/ml (D2)			1 µg/ml (D2)			1 µg/ml (D2)			1 µg/ml (D2)		
H	Daudi-Spontanlyse			Daudi-Maximallyse			Daudi-Spontanlyse			Daudi-Maximallyse		
	E/T-Ratio 2,5:1			E/T-Ratio 5:1			E/T-Ratio 2,5:1			E/T-Ratio 5:1		

Platte Nr. 2	Trastuzumab + ZR-75-1						7	8	9	10	11	12
	1	2	3	4	5	6						
A	NK-Spontanl. (1×10 ⁴)			NK-Spontanl. (2×10 ⁴)			-	-	-	-	-	-
B	0 µg/ml (∅)			0 µg/ml (∅)			-	-	-	-	-	-
C	0,0001 µg/ml (D6)			0,0001 µg/ml (D6)			-	-	-	-	-	-
D	0,001 µg/ml (D5)			0,001 µg/ml (D5)			-	-	-	-	-	-
E	0,01 µg/ml (D4)			0,01 µg/ml (D4)			-	-	-	-	-	-
F	0,1 µg/ml (D3)			0,1 µg/ml (D3)			-	-	-	-	-	-
G	1 µg/ml (D2)			1 µg/ml (D2)			-	-	-	-	-	-
H	ZR-75-1-Spontanl.			ZR-75-1-Maximall.			-	-	-	-	-	-
	E/T-Ratio 2,5:1			E/T-Ratio 5:1								

Bei Wells der Spalten 1-3 sowie 7-9 wurden mit je 10.000 NK-Zellen belegt (Ausnahme Platte 1, Zeile A sowie auf beiden Platten Zeile H). Die Wells der Spalten 4-6 sowie 10-12 wurden mit 20.000 NK-Zellen belegt.

Wie bereits geschrieben, wurden außer den Wells zu Messung des technischen Blanks mit sechs Well, alle anderen Ansätze auf den Testplatten als Tripletten angelegt. Die Belegung der Testplatten erfolgte

in zwei Schichten. Zunächst wurden die verschiedenen Ansätze der Target-Zellen à 75 µl/Well vorgelegt. In die Well zur Bestimmung der NK-Spontanlysen wurden anstatt der Target-Zellsuspension 75 µl ADCC-Medium vorgelegt. Danach wurden die beiden E/T-Ansätze der Effektorzellen (2,5:1 und 5:1) ebenfalls à 75 µl/Well mit einem Hand-Dispenser verteilt. In die Well zur Messung der Spontan- bzw. Maximal-Lyse der Target-Zellen wurden, anstatt der jeweiligen NK-Zellsuspension, 75 µl ADCC-Medium bzw. 15-20 min vor Testende 75 µl der Lösung zur Induktion der Maximal-Lyse pipettiert.

Nachdem die Testplatten vollständig beladen waren, wurden diese eine Minute lang bei lediglich 100 G zentrifugiert, um in allen Well eine vollständige Sedimentation aller Zellen und somit einen synchronen ADCC-Beginn zu gewährleisten. Danach wurden sie für vier Stunden im Brutschrank (37 °C, in etwa gesättigte Luftfeuchte, 5 % CO₂) inkubiert.

3.3.4 Messung der LDH-Freisetzung

Nach der vierstündigen gemeinsamen Inkubation von Effektor- und Target-Zellen wurden beide Testplatten bei nur mäßiger G-Zahl zentrifugiert (200 G, 10 Minuten, Raumtemperatur), um sicherzustellen, dass sich alle Zellen am Boden der Wells befanden. Dann wurden von jedem Well 50 µl Überstand abbildungsgleich auf zwei 96-Well-ELISA-Platten mit Flachboden übertragen. Das Übertragen der Überstände von den Test- auf die ELISA-Platten musste möglichst schnell erledigt werden, damit es zu keiner weiteren, nennenswerten LDH-Freisetzung kam. Dennoch musste ein Aufwirbeln der Zellen dabei tunlichst vermieden werden, um zu gewährleisten, dass die Überstände tatsächlich Zell-frei waren.

Wie weiter oben beschrieben, wurde als Marker für die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen die Freisetzung von LDH aus den Zielzellen bestimmt. Als essenzieller Bestandteil des anaeroben Energiestoffwechsels ist dieses Enzym in fast allen menschlichen Zellen enthalten. LDH katalysiert die Oxidation von Laktat zu Pyruvat unter Reduktion eines Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Kations (NAD⁺) zu NADH/H⁺ [189]. Zur Quantifizierung der LDH wurde das *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)* der *Sigma-Aldrich GmbH* verwendet. Dabei geschieht der LDH-Nachweis über die Zugabe des Tetrazolium-Salzes INT (engl. *Dye Solution*; Färbelösung), welches durch einen ebenfalls zugegebenen, NADH/H⁺-abhängigen Katalysator (engl. *catalyst*) zum Formazan-Salz reduziert wird [190]. Im Gegensatz zu Tetrazolium absorbiert Formazan Licht in einem relativ breiten Wellenlängenspektrum zwischen 480 und 520 nm. Die LDH-Enzymaktivität kann somit indirekt photometrisch quantifiziert werden. Katalysator und Färbelösung wurden gemäß Herstellerangaben unmittelbar vor der Verwendung zur fertigen LDH-Nachweislösung gemischt. Die Menge der benötigten Nachweislösung wurde für 160 Wells kalkuliert (138 Wells auf den Nachweisplatten plus 22 Wells Überschuss, siehe Abbildung 2, Seite 45). Dazu wurden 7.333 µl *Dye Solution* und 167 µl *Catalyst* gemischt. Anschließend wurden

50 µl der Nachweislösung in jedes belegte Well der ELISA-Platten pipettiert und beide Platten bei Raumtemperatur inkubiert. Da sowohl das *Dye Solution-/Catalyst*-Gemisch als auch die Endprodukte der LDH-Reaktion photosensibel sind, wurde die Inkubation lichtgeschützt durchgeführt. Um die Zeit der Substratumsetzung zu normieren, damit die verschiedenen Tests untereinander vergleichbar waren, wurde die Entwicklungszeit der LDH-Reaktion den Angaben des Herstellers gemäß auf 30 min begrenzt und der Substratabbau durch Zugabe von 25 µl/Well einer Salzsäure-haltigen Stopp-Lösung abgebrochen.

3.3.5 Quantifizierung der NK-Zell-Aktivität

Nach Beenden der Nachweisreaktion wurde für jedes Well die Absorption bei 490 nm Wellenlänge im Photometer analysiert. Anschließend wurde zunächst von *allen* Absorptions-Werten die gemittelte Absorption des technischen Blanks abgezogen. Die gemessenen Absorptionen der Triplets wurden ebenfalls zu einem Wert gemittelt. Die relative Lyse in einem ADCC-Ansatz wurde dann nach folgender Formel errechnet (siehe 3.3.3.4, Seite 44):

$$\text{relative Lyse (\%)} = \frac{\text{ADCC-Absorption} - (\text{Target-Spontanlyse} + \text{NK-Spontanlyse})}{\text{Target-Maximallyse} - \text{Target-Spontanlyse}} \times 100$$

Die Begriffe Spontan- und Maximallyse beziehen sich hierbei auf die jeweilige Tumorzelllinie ohne Zugabe von NK-Zellen oder Antikörpern.

3.4 Statistische Auswertung

Ob eine Veränderung der relativen Lyse der Probanden zwischen zwei Substitutionszeitpunkten statistisch signifikant war, wurde mittels zweiseitigem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (engl. *Wilcoxon signed rank test*) bestimmt. Aufgrund der nur kleinen Stichprobengröße wurde für W keine Normalverteilung angenommen. Die resultierenden P-Werte wurden folglich exakt anhand der Verteilung von W berechnet. Statistische Tests zwischen zwei ungepaarten Stichproben hingegen wurden mittels zweiseitigem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (Mann-Whitney-U-Test) durchgeführt. Grundsätzlich wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Probandendaten

Insgesamt wurden 24 Probanden akquiriert. Davon zogen zwei ihre Einverständniserklärung zurück, ein Proband musste ausgeschlossen werden, da er sich nach dem ersten Test einer Therapie mit oralen Glukokortikoiden unterziehen musste, und ein Proband war nach dem ersten NK-Zellversuch nicht mehr erreichbar. Die restlichen 20 Personen (mittleres Alter $60,1 \pm 17,8$ Jahre), davon 10 Frauen und 10 Männer, verblieben bis zum Ende in der Studie eingeschlossen (siehe Tabelle 11). Fünf Probanden wurden direkt im niedrig-normalen 25(OH)D-Bereich und nicht im Insuffizienz- oder Mangelbereich rekrutiert.

Tabelle 11 – Alter, Geschlecht und 25(OH)D-Serumspiegel der eingeschlossenen Probanden

ID	Geschlecht	Alter (a)	25(OH)D-Serumspiegel zu den einzelnen Messungen (ng/ml)			
			Mangel- / Insuffizienz- bereich	Niedrig- normales 25(OH)D	Mittleres 25(OH)D	Hoch- normales 25(OH)D
1	m	50	-	35,1*	70,1	123,0
4	w	46	-	32,2*	71,5	110,0
50	m	33	11,4	34,6	57,2	103,0
55	m	32	14,3	33,3	67,4	93,6
56	m	59	4,0	32,5	71,7	-
57	w	30	-	31,5*	61,2	90,5
61	w	40	-	36,9*	68,4	102,0
66	w	64	8,7	27,7	68,2	86,4
67	m	70	9,0	33,8	65,5	89,6
70	m	78	5,9	24,5	64,3	110,0
71	w	71	23,0	33,9	68,2	115,0
72	m	57	15,7	45,8	62,6	89,0
73	w	78	4,6	28,1	68,8	83,4
74	m	79	6,1	31,3	72,8	94,9
75	w	79	9,7	31,7	68,5	72,1
87	m	56	-	30,5*	69,4	81,0
91	w	83	9,8	27,6	63,6	88,8
92	m	86	10,3	27,3	58,2	74,4
93	w	69	5,9	25,8	63,7	91,1
99	w	42	8,8	38,8	61,5	86,8

Aufgelistet werden nur die in die Studie einbezogenen Probanden. Das Geschlecht ist mit „w“ für weiblich und „m“ für männlich abgekürzt. () Proband wurde direkt auf dieser Vitamin D-Stufe rekrutiert.*

Hinsichtlich des Alters unterschieden sich Frauen ($60,2 \pm 18,0$ Jahre) und Männer ($60,0 \pm 17,6$ Jahre) nicht signifikant (T-Test nach Student $p = 0,98$; F-Test nach Fisher $p = 0,95$), wie Abbildung 3 veranschaulicht.

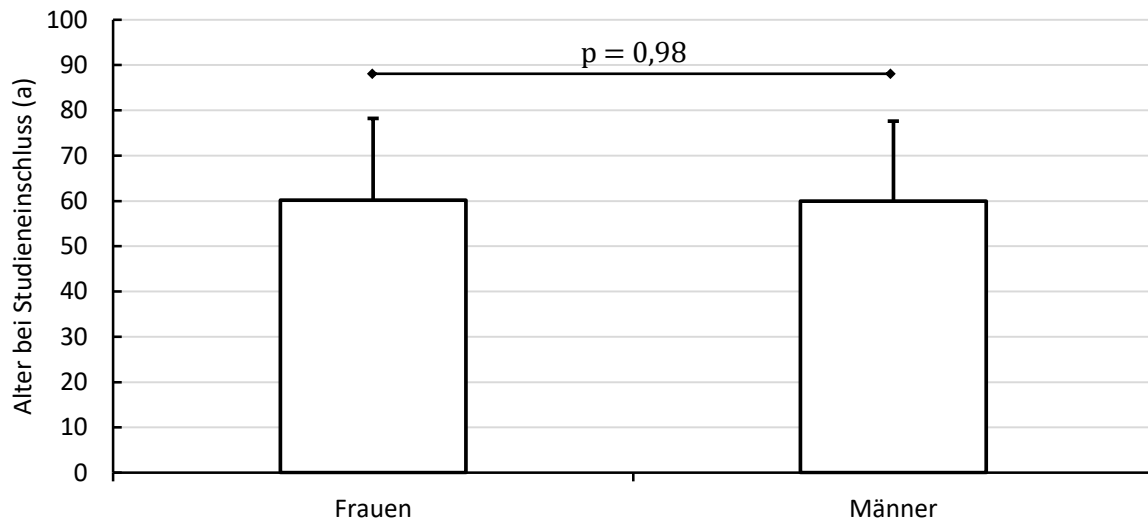


Abbildung 3 – Alter der Probanden zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses

4.2 Optimierung eines Vitamin D₃-Substitutionsprotokolls für die Immuntherapie und Substitutionsergebnisse

Abbildung 4 stellt die in Tabelle 11 aufgeführten 25(OH)D-Serumspiegel der Probanden zum Zeitpunkt der Rekrutierung sowie nach den maximal drei Substitutionsrunden dar. Der mittlere 25(OH)D-Spiegel zum Zeitpunkt der Rekrutierung lag mit $9,81 \text{ ng/ml}$ (Standardabweichung [SD] $4,76 \text{ ng/ml}$) wie geplant im Bereich des Vitamin D-Mangels ($< 20 \text{ ng/ml}$) [72].

Wie in 3.3.1 (Seite 36) beschrieben, erfolgte die VD₃-Substitution zunächst nach der von *van Groningen et al.* beschriebenen Substitutionsleitlinie [172]. Bei der im Vorfeld einer Immuntherapie deutlich geringer zur Verfügung stehenden Substitutionszeit von nur wenigen Tagen im Vergleich zu acht Wochen in der oben genannten Arbeit, erhöhten wir den Multiplikator der Formel sukzessive von 40 auf schließlich $200 \text{ IE} \times \text{ml} \times \text{kg}^{-1} \times \text{ng}^{-1}$:

$$VD_3\text{-Bedarf (IE)} = 200 \frac{\text{IE} \times \text{ml}}{\text{kg} \times \text{ng}} \times \text{Körpergewicht (kg)} \times \Delta 25(\text{OH})\text{D} \left(\frac{\text{ng}}{\text{ml}} \right)$$

Beim Einsatz dieser Formel war nur in wenigen Fällen eine Nach-Substitution notwendig, um das angestrebte 25(OH)D-Niveau zu erreichen. Die Dauer der Tabletteneinnahme wurde dabei je nach Gesamtdosis auf 3 oder 4 Tage verteilt, um eine VD₃-Tageshöchst-dosis von 200.000 I. U. nicht zu

überschreiten. Insgesamt dauerte eine einzelne Runde zwischen erstem Tag der Substitution und dem darauffolgenden ADCC-Versuch im Mittel 7,7 Tage (SD 1,6 Tage).

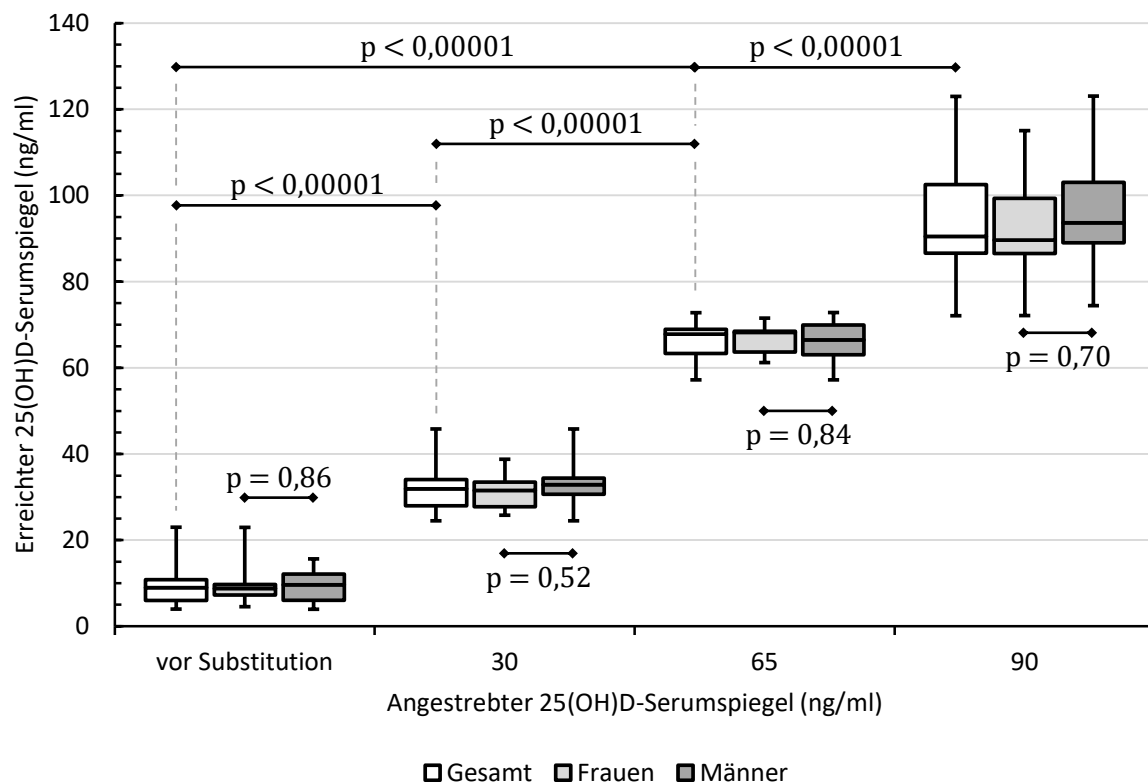


Abbildung 4 – 25(OH)D-Serumspiegel im Verlauf der drei Substitutionsrunden

Die 25(OH)D-Serumspiegel der insgesamt vier Stufen waren signifikant verschieden. Zwischen Frauen und Männern bestanden hingegen keine signifikanten Unterschiede. Die jeweiligen P-Werte sind angegeben (T-Test nach Student).

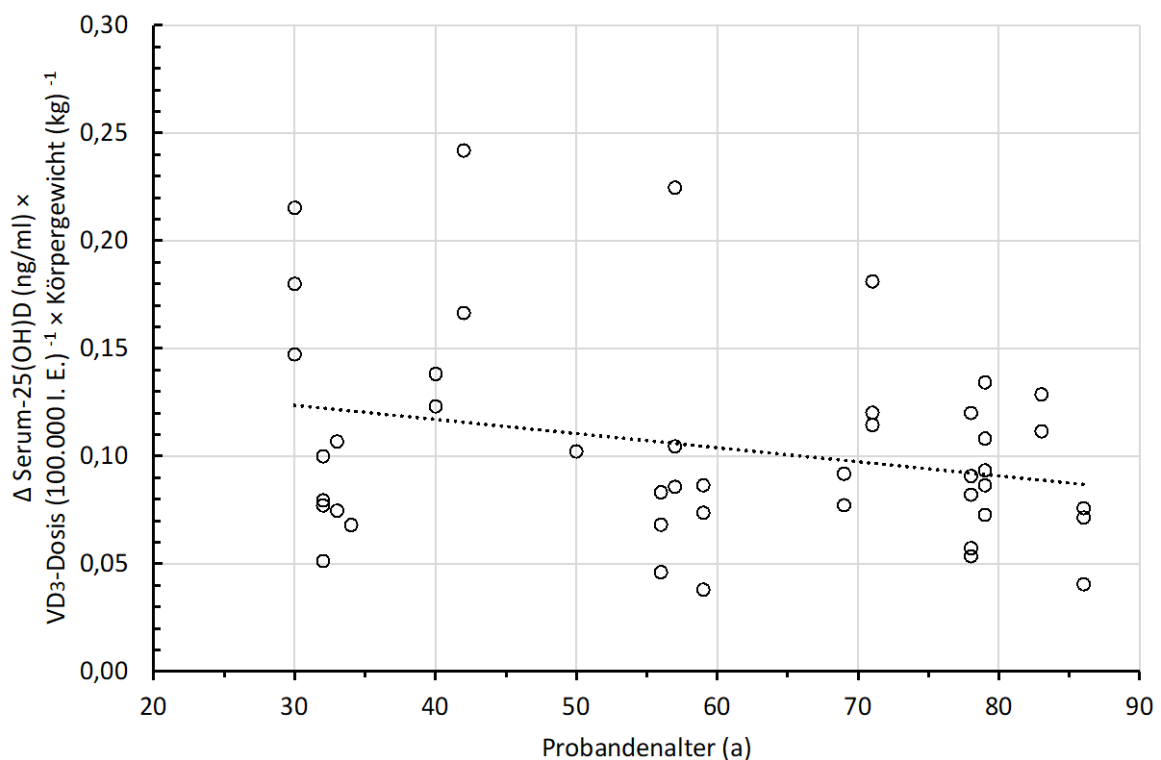
Wie die Ergebnisse der Einstichproben-T-Tests zwischen 25(OH)D-Spiegel und Sollwert zeigen (Tabelle 12), wurden die angestrebten Serumspiegel von 30, 65 und 90 ng/ml mithilfe dieses Substitutionsprotokolls ausreichend genau erreicht (mit einem p von jeweils $> 0,05$). Der Einstichproben-T-Test zum Zeitpunkt der Rekrutierung zeigt mit $p < 0,00001$ an, dass der mittlere Serumspiegel während des ersten ADCC-Tests signifikant unter 30 ng/ml lag.

Toxisch erhöhte 25(OH)D-Serumspiegel (> 150 ng/ml [72]; siehe 2.3.2, Seite 21) traten bei Anwendung der modifizierten Substitutionsformel nicht auf. Dennoch führte die Substitution auf den hoch-normalen Zielwert bei insgesamt sechs Probanden zu einem 25(OH)D-Spiegel oberhalb des Referenzrahmens (> 100 ng/ml). Diese Probanden zeigten keine Symptome. Ebenso waren Kalzium- und Phosphatspiegel innerhalb der Normbereiche. Der höchste, beobachtete 25(OH)D-Serumspiegel betrug 123 ng/ml i. S. (Tabelle 11).

Tabelle 12 – Mittlere 25(OH)D-Serumspiegel im Verlauf der Substitutionsrunden

	Rekrutierung	Substitution 1	Substitution 2	Substitution 3
Angestrebter Spiegel (ng/ml)	< 30	30	65	90
Mittleres Serum-25(OH)D ± SD (ng/ml)	9,8 ± 4,8 ♀: 10,1 ± 5,6 ♂: 9,6 ± 3,9	32,1 ± 4,8 ♀: 31,4 ± 4,0 ♂: 32,9 ± 5,3	66,1 ± 4,3 ♀: 66,4 ± 3,4 ♂: 65,9 ± 5,1	93,9 ± 13,2 ♀: 92,6 ± 12,2 ♂: 95,4 ± 14,0
F-Test nach Fisher	$p = 0,97$			
		$p = 0,67$		
			$p < 0,00001$	
		$p = 0,67$		
Einstichproben-T-Test (Abweichung vom Soll)	$p < 0,00001$	$p = 0,07$	$p = 0,27$	$p = 0,23$

Mit angegeben sind die Ergebnisse der F-Tests nach Fisher. Diese zeigen, dass sich die 25(OH)D-Spiegel erst nach der dritten Substitution in ihrer Streubreite bzw. Varianz von den vorherigen Messungen unterschieden. Die letzte Zeile zeigt die Ergebnisse der Einstichproben-T-Tests, bei denen die Abweichung der tatsächlichen 25(OH)D-Spiegel vom angestrebten Spiegel (Soll) ermittelt wurde. Alle P-Werte beziehen sich auf die gesamte Studienpopulation; eine geschlechter-getrennte Analyse fiel gleichartig aus, ist jedoch nicht dargestellt.

Abbildung 5 – 25(OH)D-Anstieg pro verabreichter VD₃-Dosis und Körpergewicht nach Probandenalter

Es konnte kein Zusammenhang zwischen Probandenalter und Anstieg des 25(OH)D-Serumspiegels pro Kilogramm Körpergewicht und verabreichter VD₃-Dosis festgestellt werden (Spearman's R = -0,18756 mit $p = 0,22279$). Drei Ausreißer wurden außer Acht gelassen.

Zwischen männlichen und weiblichen Probanden bestanden keine nennenswerten Unterschiede in den erreichten 25(OH)D-Spiegeln (Abbildung 4). Ebenso konnte keine signifikante Korrelation zwischen Probandenalter und 25(OH)D-Anstieg pro Menge verabreichten VD₃-Präparats beobachtet

werden (Abbildung 5). Bei Substitution auf hoch-normale Werte zeigte sich die Formel weniger prädiktiv, da es zu einer deutlichen Zunahme der Varianz der 25(OH)D-Spiegel kam (Tabelle 12).

4.3 Nachweis einer NK-Zell-vermittelten ADCC unter Vitamin D-Mangel bzw. -Insuffizienz

4.3.1 Rituximab-induzierte Daudi-Lyse unter Vitamin D-Mangel und -Insuffizienz

Abbildung 6 veranschaulicht das Ausmaß der NK-Zell-vermittelten Lyse von Daudi in Abhängigkeit der eingesetzten Rituximab-Konzentration zum Zeitpunkt des Vitamin D-Mangels bzw. der Vitamin D-Insuffizienz.

Hierbei führte das größere E/T-Verhältnis von 5:1 gegenüber 2,5:1 unabhängig von der Antikörperkonzentration stets zu einem größeren Ausmaß an Lyse.

Darüber hinaus zeigte sich für beide E/T-Verhältnisse gleichermaßen, dass erst ab 0,001 µg/ml Rituximab eine im Vergleich zur Antikörper-freien Kontrolle gesteigerte Lyse, und folglich eine ADCC oder genauer gesagt eine Rituximab-abhängige zelluläre Zytotoxizität (RDCC), nachweisbar war. Das Ausmaß der RDCC stieg dabei dosisabhängig mit der Antikörper-Konzentration an. Die größte eingesetzte Rituximab-Konzentration von 1 µg/ml zeigte dabei gegenüber 0,1 µg/ml keine signifikante Zunahme mehr, sodass hier von einem Sättigungseffekt auszugehen ist.

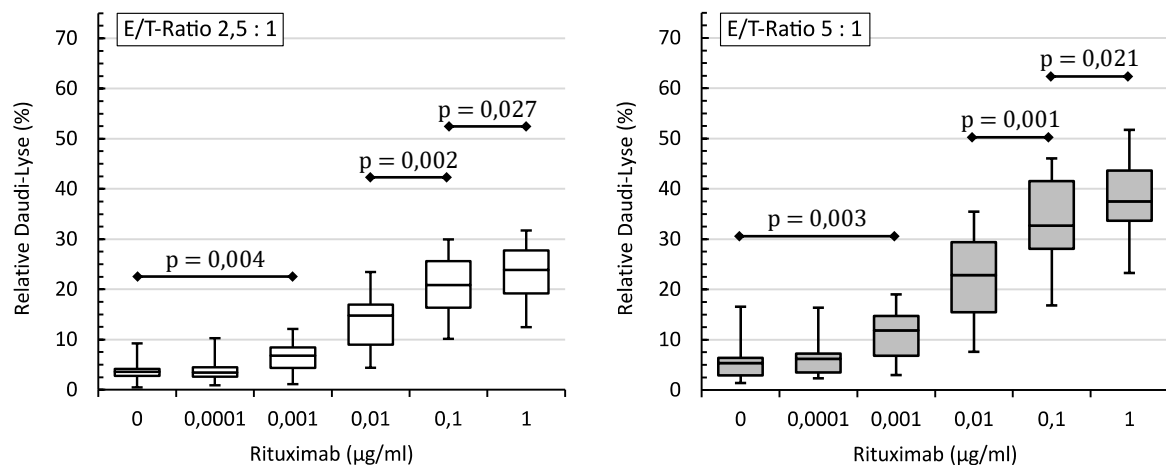


Abbildung 6 – Relative Daudi-Lyse in Abhängigkeit der Rituximab-Konzentration vor VD_3 -Substitution
 Einbezogen sind alle 15 Probanden mit 25(OH)D-Mangel oder -Insuffizienz. Dargestellt sind die beiden E/T-Ratios 2,5:1 (links) und 5:1 (rechts). P-Werte wurden mittels zweiseitigem T-Test nach Student bestimmt.

4.3.2 Obinutuzumab-induzierte Daudi-Lyse Vitamin D-Mangel und -Insuffizienz

Abbildung 7 stellt die NK-Zell-vermittelte prozentuale Lyse von Daudi aller Probanden in der 25(OH)D-Insuffizienz bzw. im 25(OH)D-Mangel in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an Obinutuzumab dar.

Analog zu Rituximab (siehe 4.3.1, Seite 52) zeigte sich auch bei Obinutuzumab eine durchwegs höhere Lyse beim Einsatz des höheren E/T-Verhältnisses von 5:1 gegenüber 2,5:1. Auch hier führte eine höhere Konzentration von Antikörper dosisabhängig zu einer stärkeren Lyse. Entsprechend fand auch hier eine Obinutuzumab-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ODCC) statt. Im Unterschied zu Rituximab war diese ODCC bereits bei der stärksten AK-Verdünnung (0,0001 µg/ml) nachweisbar und erreichte früher eine Sättigung.

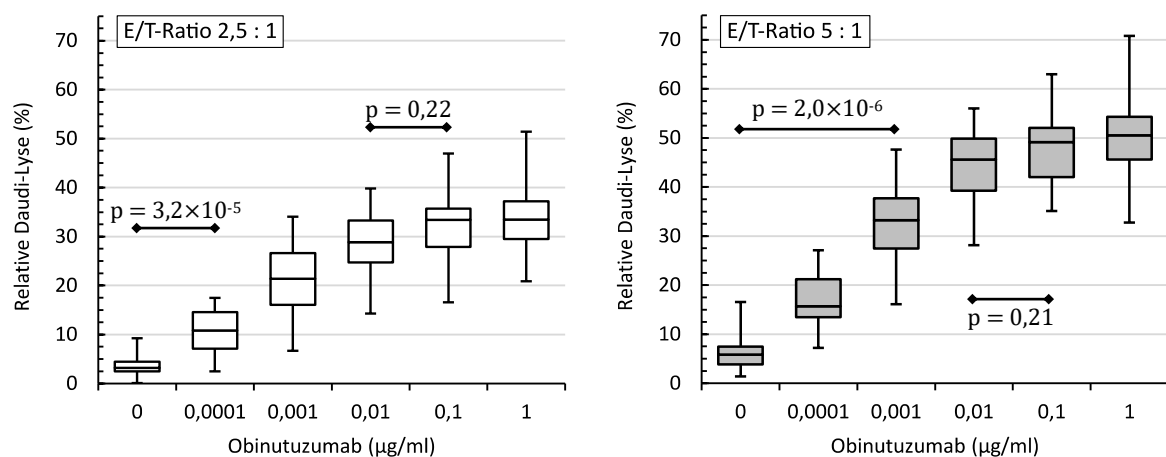


Abbildung 7 – Relative Daudi-Lyse in Abhängigkeit der Obinutuzumab-Konzentration vor VD_3 -Substitution
 Einbezogen sind alle 15 Probanden mit 25(OH)D-Mangel oder -Insuffizienz. Dargestellt sind die beiden E/T-Ratios 2,5:1 (links) und 5:1 (rechts). P-Werte wurden mittels zweiseitigem T-Test nach Student bestimmt.

4.3.3 Trastuzumab-induzierte ZR-75-1-Lyse unter Vitamin D-Mangel und -Insuffizienz

Die NK-Zell-abhängige Lyse von ZR-75-1 in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration von Trastuzumab zum Zeitpunkt des 25(OH)D-Mangels bzw. der 25(OH)D-Insuffizienz ist in Abbildung 8 dargestellt.

Wie auch zuvor führte der Einsatz eines höheren E/T-Verhältnis gegenüber dem niedrigen E/T-Verhältnis zu einer durchwegs höheren Lyse von Target-Zellen. Ebenso zeigte sich auch hier eine Trastuzumab-abhängige zelluläre Zytotoxizität (TDCC), da höhere Antikörper-Konzentrationen dosisabhängig zu höheren Lyse-Raten führten. Die TDCC ließ sich erst bei einer Trastuzumab-Konzentration von 0,001 µg/ml statistisch nachweisen und erreichte ihre Sättigung ebenfalls bei 0,1 µg/ml.

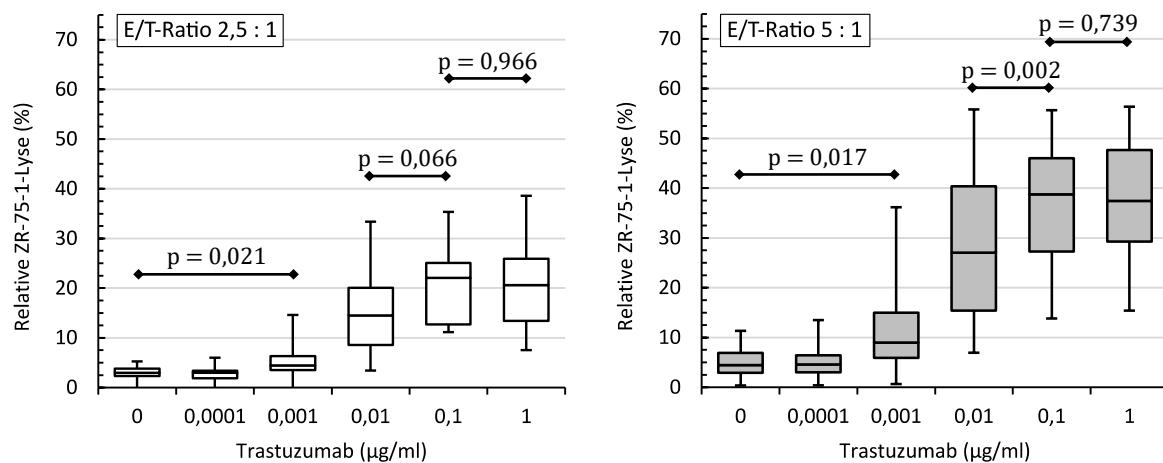


Abbildung 8 – Relative ZR-75-1-Lyse in Abhängigkeit der Trastuzumab-Konzentration vor VD₃-Substitution
 Einbezogen sind alle 15 Probanden mit 25(OH)D-Mangel oder -Insuffizienz. Dargestellt sind die beiden E/T-Ratios 2,5:1 (links) und 5:1 (rechts). P-Werte wurden mittels zweiseitigem T-Test nach Student bestimmt.

4.3.4 Ausschluss unspezifischer Antikörper-Bindung

Um das Auftreten unspezifischer Bindungen von Antikörper an die jeweiligen Target-Zellen auszuschließen, wurden die eingesetzten Zelllinien Daudi und ZR-75-1 einer Kreuzprobe unterzogen. Hierbei wurden die NK-Zellen einer Probandin mit zuvor Rituximab- bzw. Obinutuzumab-markierten ZR-75-1 sowie mit Trastuzumab-markierten Daudi inkubiert und der Anteil an relativer Lyse bestimmt. Als Negativkontrolle dienten unmarkierte Daudi- respektive ZR-75-1-Zellen.

Das Ausmaß sowohl an RDCC und ODCC gegenüber ZR-75-1 als auch an TDCC gegenüber Daudi unterschied sich hierbei nicht von der natürlichen NK-Zell-Zytotoxizität gegen die jeweiligen Zelllinien (Abbildung 9). Somit konnte eine Antikörper-unspezifische NK-Zell-vermittelte ADCC gegen die beiden Target-Zelllinien ausgeschlossen werden.

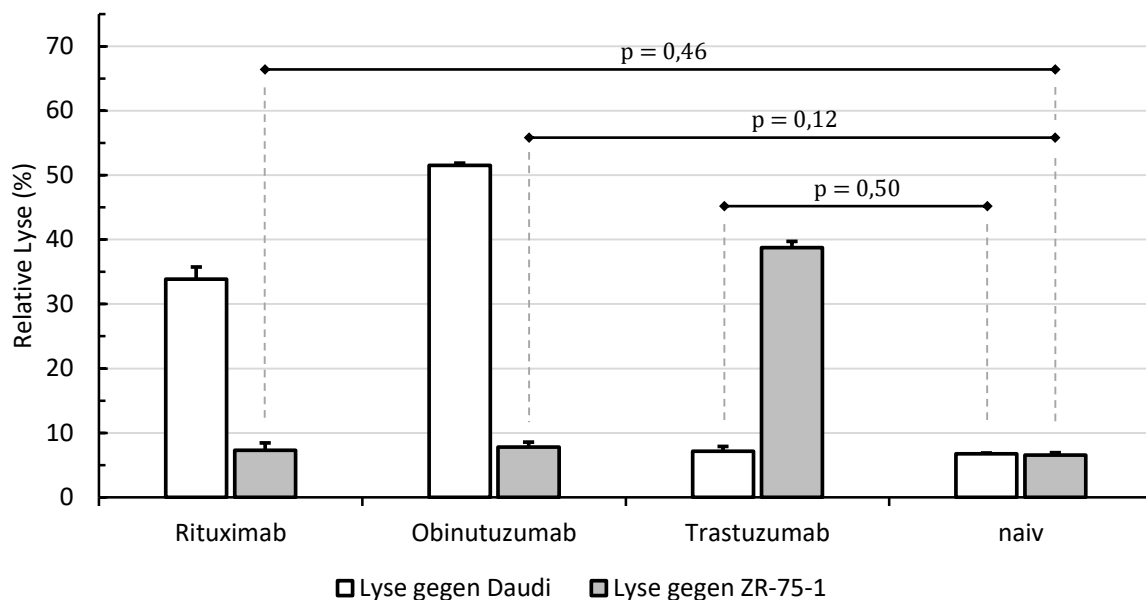


Abbildung 9 – Ausschluss einer Antikörper-Kreuzreaktion

Relative Lyse von Daudi und ZR-75-1 sowohl durch natürliche NK-Zell-Aktivität (naiv) als auch durch alle drei Antikörper (0,1 µg/ml). Eingesetzt wurden NK-Zellen von Proband 75 in der E/T-Ratio 5:1. Messung vor der ersten VD₃-Substitution bei 9,7 ng/ml 25(OH)D i. S.

4.4 Verlauf der NK-Zell-Zytotoxizität vor und nach den drei Substitutionsstufen

4.4.1 Rituximab-induzierte Daudi-Lyse vor und nach den drei Substitutionsstufen

Tabelle 13 zeigt für beide E/T-Verhältnisse jeweils das Ausmaß der Daudi-Lyse im Verlauf der Vitamin D-Substitution abhängig von der eingesetzten Konzentration an Rituximab. Wie zuvor (siehe 4.3.1, Seite 52) zeigte sich auch nach allen drei Substitutionsschritten bei höheren Rituximab-Konzentrationen eine höhere Lyse und folglich eine RDCC. Ebenso führte das höhere E/T-Verhältnis zu einer größeren Lyse.

Die Substitution vom Insuffizienzbereich (mittleres Serum-25(OH)D \pm SD: $9,8 \pm 4,8$ ng/ml) auf niedrignormale Werte ($32,2 \pm 4,8$ ng/ml) führte dabei, mit Ausnahme eines Ansatzes (E/T-Ratio 5:1; 0,01 μ g/ml AK), zu keiner signifikanten Zunahme an lysierten Daudi-Zellen. Demgegenüber stieg nach Substitution vom Mangel auf mittlere 25(OH)D-Spiegel ($66,1 \pm 4,3$ ng/ml) die natürliche NK-Zell-Aktivität, die im Rituximab-freien Kontrollansatz messbar ist, von 3,6 % auf 8,9 % ($p = 0,01$; E/T-Ratio 2,5:1) bzw. 5,4 % auf 10,3 % ($p = 0,005$; E/T-Ratio 5:1).

Tabelle 13 – Relative Daudi-Lyse durch Rituximab im Verlauf der VD₃-Substitution

		25(OH)D / Substitution (ng/ml)	Relative Daudi-Lyse (%) unter Rituximab					
			0 μ g/ml	0,0001 μ g/ml	0,001 μ g/ml	0,01 μ g/ml	0,1 μ g/ml	1 μ g/ml
E/T-Ratio 2,5:1	Med. Lyse	9,8	3,6	3,5	6,8	14,8	20,9	23,9
		32,1	2,9	3,5	6,8	15,0	22,1	26,2
		66,1	8,9	9,2	13,4	20,7	27,2	28,8
		93,9	3,8	4,8	8,4	17,5	22,9	24,8
	P-Werte	9,8 \rightarrow 32,1	0,639	0,599	0,561	0,208	0,252	0,188
		32,1 \rightarrow 66,1	0,014	0,002	< 0,001	0,002	0,007	0,021
		9,8 \rightarrow 66,1	0,010	0,005	0,003	0,007	0,001	0,003
		66,1 \rightarrow 93,9	0,104	0,040	0,016	0,036	0,045	0,104
		9,8 \rightarrow 93,9	0,058	0,030	0,049	0,025	0,091	0,058
E/T-Ratio 5:1	Med. Lyse	9,8	5,4	6,2	11,9	22,9	32,7	37,5
		32,1	5,3	6,3	11,7	23,1	32,6	39,9
		66,1	10,3	14,5	18,7	30,2	37,9	42,9
		93,9	7,2	9,3	13,8	30,4	39,5	44,4
	P-Werte	9,8 \rightarrow 32,1	0,679	0,454	0,303	0,041	0,229	0,169
		32,1 \rightarrow 66,1	0,004	0,001	< 0,001	0,001	0,017	0,202
		9,8 \rightarrow 66,1	0,005	0,012	0,003	0,004	0,015	0,007
		66,1 \rightarrow 93,9	0,156	0,045	0,032	0,087	0,275	0,651
		9,8 \rightarrow 93,9	0,020	0,049	0,030	0,030	0,104	0,030

Dargestellt werden die medianen (med.) relativen Lysen der zuvor Rituximab-markierten Daudi durch NK-Zellen für die E/T-Verhältnisse 2,5:1 (oberer Block) und 5:1 (unterer Block). Darunter jeweils die P-Werte durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zwischen den Lysen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der VD₃-Substitution. P-Werte wurden je nach Bezug zum Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ farblich hervorgehoben (grün: $p < 0,05$; rot: $p \geq 0,05$).

Die größte Steigerung ließ sich jedoch bei der RDCC mit der niedrigsten AK-Konzentration von 0,0001 $\mu\text{g/ml}$ nachweisen (Abbildung 10). Dabei stieg die Daudi-Lyse von 3,5 % auf 9,2 % ($p = 0,005$; E/T-Ratio 2,5:1) bzw. von 6,2 % auf 14,5 % ($p = 0,012$; E/T-Ratio 5:1). Für die AK-Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$, die ungefähr dem therapeutisch eingesetzten Wirkspiegel entspricht, nahm die Lyse von 20,9 % auf 27,2 % ($p = 0,001$; E/T-Ratio 2,5:1) bzw. von 32,7 % auf 37,9 % ($p = 0,015$; E/T-Ratio 5:1) zu (Abbildung 11; vgl. Abbildung 17, Seite 63).

Im Anschluss führte der letzte Substitutionsschritt auf hoch-normale 25(OH)D-Serumspiegel ($93,9 \pm 13,2$ ng/ml) im Vergleich zu mittleren Spiegeln zu einem Wiederabfallen der Daudi-Lyse. Dieser Abfall war nicht in allen Ansätzen der Verdünnungsreihen signifikant nachweisbar.

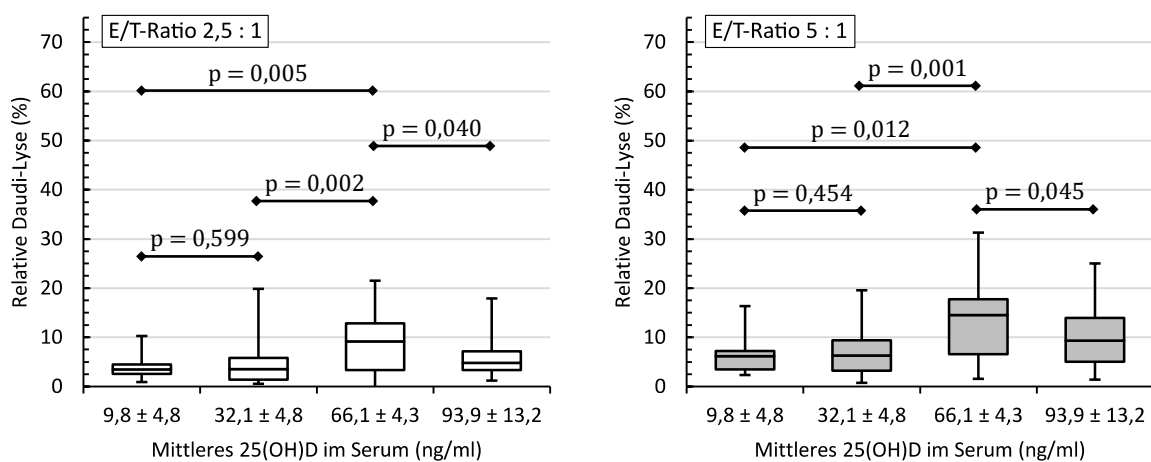


Abbildung 10 – Relative Daudi-Lyse durch Rituximab (0,0001 $\mu\text{g/ml}$) im Verlauf der VD_3 -Substitution
Für die E/T-Verhältnisse 2,5:1 (links) und 5:1 (rechts). Werte entsprechend Tabelle 13. P-Werte wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test bestimmt.

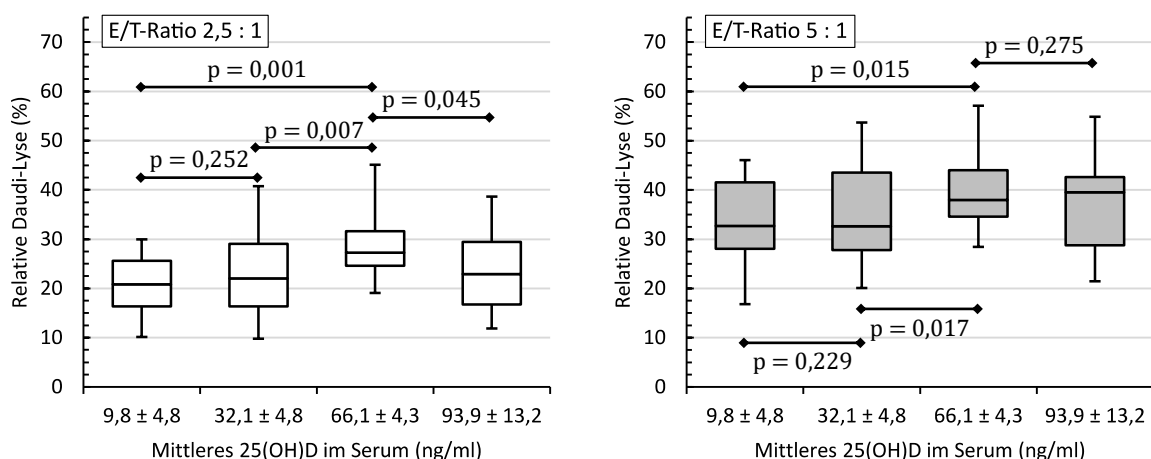


Abbildung 11 – Relative Daudi-Lyse durch Rituximab (0,1 $\mu\text{g/ml}$) im Verlauf der VD_3 -Substitution
Für die E/T-Verhältnisse 2,5:1 (links) und 5:1 (rechts). Werte entsprechend Tabelle 13. P-Werte wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test bestimmt.

4.4.2 Obinutuzumab-induzierte Daudi-Lyse vor und nach den drei Substitutionsstufen

Die Entwicklung der NK-Zell-vermittelten ODCC im Verlauf der drei Substitutionsstufen ist in Tabelle 14 dargestellt. Wie auch bei Rituximab (siehe oben) zeigte sich auch hier weiterhin eine Dosis-abhängige Beziehung zwischen Obinutuzumab-Konzentration bzw. E/T-Verhältnis einerseits und erreichter Daudi-Lyse andererseits.

Die Entwicklung der ODCC zeigte ein ähnliches Bild wie die der RDCC. So erreichte die Zunahme an Daudi-Lyse durch die Substitution vom Insuffizienzbereich (mittleres Serum-25(OH)D \pm SD: $9,8 \pm 4,8$ ng/ml) auf niedrig-normale Werte ($32,2 \pm 4,8$ ng/ml) nicht das Signifikanzniveau. Die weitere Substitution auf mittlere 25(OH)D-Serumspiegel ($66,1 \pm 4,3$ ng/ml) führte zu einer durchwegs höheren Daudi-Lyse, die jedoch nicht auf allen AK-Verdünnungsstufen signifikant war. Der Vergleich vom Insuffizienzbereich mit mittleren 25(OH)D-Werten ($66,1 \pm 4,3$ ng/ml) zeigte hingegen eine für alle AK-Verdünnungsstufen eine signifikante Steigerung an Lyse (vgl. Abbildung 17, Seite 63). Ebenso war, wie bereits zuvor beschrieben, auch im Antikörper-freien Kontrollansatz eine gesteigerte Daudi-Lyse, entsprechend einer gesteigerten natürlichen NK-Zell-Aktivität, nachweisbar.

Tabelle 14 – Relative Daudi-Lyse durch Obinutuzumab im Verlauf der VD₃-Substitution

		25(OH)D / Substitution (ng/ml)	Relative Daudi-Lyse (%) unter Obinutuzumab					
			0 µg/ml	0,0001 µg/ml	0,001 µg/ml	0,01 µg/ml	0,1 µg/ml	1 µg/ml
E/T-Ratio 2,5:1	Med. Lyse	9,8	3,2	10,8	21,4	28,8	33,4	33,5
		32,1	2,9	9,7	22,4	28,7	33,7	36,4
		66,1	8,1	17,8	28,4	34,8	36,8	40,0
		93,9	4,3	13,7	24,8	31,7	32,6	39,5
		9,8 → 32,1	0,804	0,330	0,277	0,720	0,359	0,151
	P-Werte	32,1 → 66,1	0,011	0,001	0,003	0,008	0,044	0,202
		9,8 → 66,1	0,018	0,002	0,007	0,003	0,007	0,018
		66,1 → 93,9	0,104	0,036	0,066	0,060	0,145	0,541
		9,8 → 93,9	0,017	0,009	0,078	0,463	0,542	0,004
E/T-Ratio 5:1	Med. Lyse	9,8	5,8	15,7	33,2	45,6	49,2	50,5
		32,1	6,1	17,4	35,5	46,4	52,2	52,3
		66,1	10,2	28,2	42,8	51,4	54,4	55,1
		93,9	6,6	24,4	40,4	43,9	51,9	55,9
		9,8 → 32,1	0,679	0,151	0,303	0,252	0,135	0,135
	P-Werte	32,1 → 66,1	0,007	0,001	0,002	0,027	0,154	0,133
		9,8 → 66,1	0,026	0,001	0,003	0,030	0,018	0,026
		66,1 → 93,9	0,080	0,113	0,156	0,312	0,293	0,623
		9,8 → 93,9	0,153	0,007	0,058	0,296	0,104	0,035

Dargestellt werden die medianen (med.) relativen Lysen der zuvor Obinutuzumab-markierten Daudi durch NK-Zellen für die E/T-Verhältnisse 2,5:1 (oberer Block) und 5:1 (unterer Block). Darunter jeweils die P-Werte durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zwischen den Lysen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der VD₃-Substitution. P-Werte wurden je nach Bezug zum Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ farblich hervorgehoben (grün: $p < 0,05$; rot: $p \geq 0,05$).

Wie zuvor bei Rituximab trat die stärkste relative Zunahme an ODCC bei der niedrigsten AK-Konzentration von 0,0001 $\mu\text{g/ml}$ auf (Abbildung 12). Hier führte die Substitution vom Mangel auf mittlere 25(OH)D-Spiegel zu einer Lyse-Steigerung von 10,8 % auf 17,8 % ($p = 0,002$; E/T-Ratio 2,5:1) bzw. von 15,7 % auf 28,2 % ($p = 0,001$; E/T-Ratio 5:1). Für die AK-Konzentration 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 13), entsprechend der therapeutischen Konzentration, nahm die Lyse von 33,4 % auf 36,8 % ($p = 0,007$; E/T-Ratio 2,5:1) bzw. von 49,2 % auf 54,4 % ($p = 0,018$; E/T-Ratio 5:1) zu.

Im Anschluss führte der letzte Substitutionsschritt auf hoch-normale 25(OH)D-Serumspiegel ($93,9 \pm 13,2$ ng/ml) wieder zu einem Abfall der ODCC. Dieser Abfall war nicht in allen Ansätzen der Verdünnungsreihen signifikant nachweisbar.

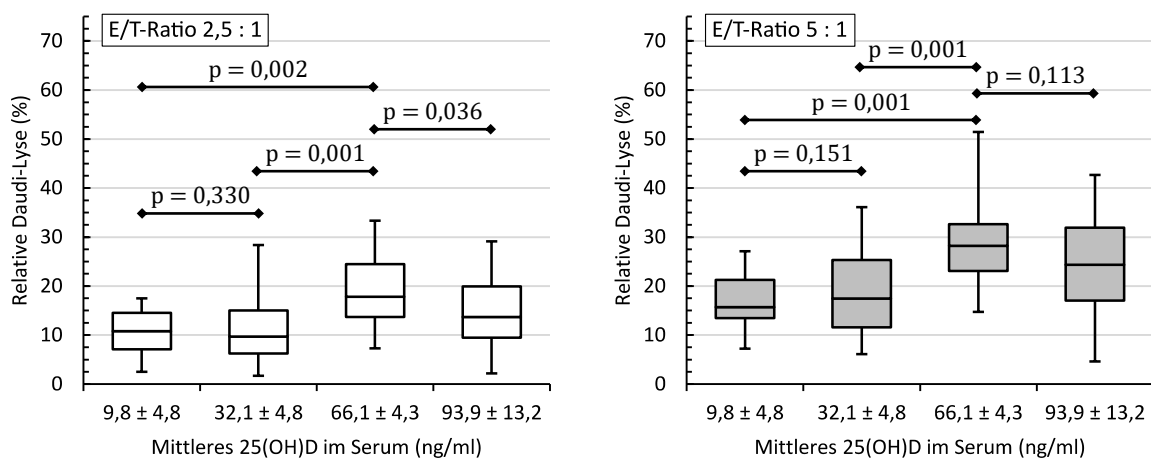


Abbildung 12 – Relative Daudi-Lyse durch Obinutuzumab (0,0001 $\mu\text{g/ml}$) im Verlauf der VD3-Substitution
Für die E/T-Verhältnisse 2,5:1 (links) und 5:1 (rechts). Werte entsprechend Tabelle 14. P-Werte wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test bestimmt.

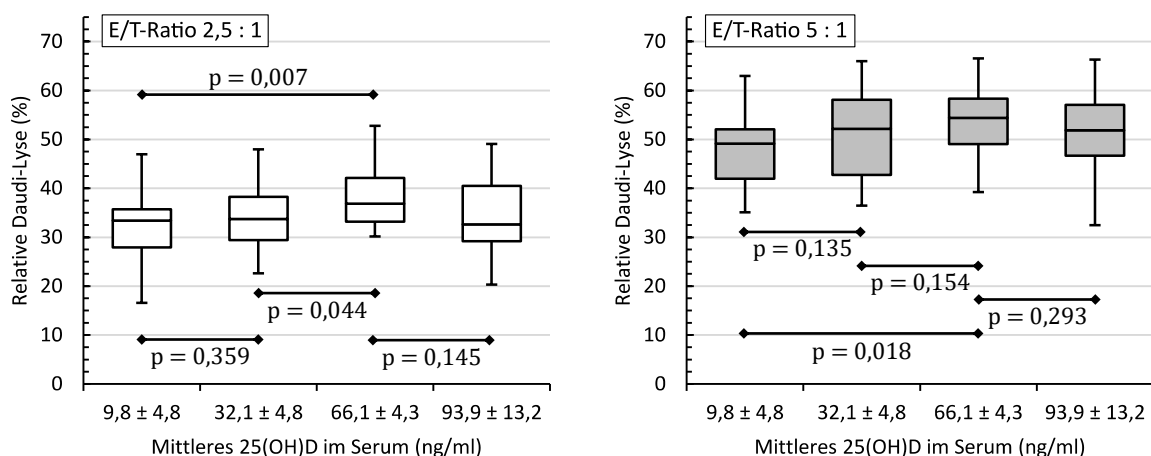


Abbildung 13 – Relative Daudi-Lyse durch Obinutuzumab (0,1 $\mu\text{g/ml}$) im Verlauf der VD3-Substitution
Für die E/T-Verhältnisse 2,5:1 (links) und 5:1 (rechts). Werte entsprechend Tabelle 14. P-Werte wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test bestimmt.

4.4.3 Trastuzumab-induzierte ZR-75-1-Lyse vor und nach den drei Substitutionsstufen
Wie bei den beiden CD20-AK zeigte sich auch mit Trastuzumab auf jeder Substitutionsstufe eine höhere Lyse an ZR-75-1 bei höheren Spiegeln von Antikörper oder einem höheren E/T-Verhältnis (Tabelle 15).

Die Entwicklung der TDCC durch die Vitamin D-Substitution zeigte prinzipiell eine ähnliche Dynamik wie beim Einsatz von Rituximab oder Obinutuzumab. So zeigte insbesondere die Substitution von der Insuffizienz (mittleres Serum-25(OH)D \pm SD: $9,8 \pm 4,8$ ng/ml) auf mittlere Serumspiegel ($66,1 \pm 4,3$ ng/ml) eine tendenzielle Zunahme an TDCC. Im Unterschied zu den CD20-AK wurde jedoch, ungeachtet des E/T-Verhältnisses, bei keiner AK-Konzentration das Signifikanzniveau erreicht (vgl. Abbildung 18, Seite 63).

Analog zu den vorherigen Kapiteln zeigen Abbildung 14 und Abbildung 15 den Einfluss der VD₃-Substitution auf die TDCC für die Trastuzumab-Konzentrationen 0,0001 μ g/ml und 0,1 μ g/ml.

Tabelle 15 – Relative ZR-75-1-Lyse durch Trastuzumab im Verlauf der VD₃-Substitution

		25(OH)D / Substitution (ng/ml)	Relative ZR-75-1-Lyse (%) unter Trastuzumab					
			0 μ g/ml	0,0001 μ g/ml	0,001 μ g/ml	0,01 μ g/ml	0,1 μ g/ml	1 μ g/ml
E/T-Ratio 2,5:1	Med. Lyse	9,8	3,0	2,9	4,5	14,5	22,1	20,6
		32,1	2,1	2,4	4,5	15,3	23,4	23,2
		66,1	3,2	3,5	7,6	19,8	24,5	24,7
		93,9	2,8	2,5	5,5	18,4	24,0	23,8
	P-Werte	9,8 → 32,1	0,524	0,720	0,421	0,454	0,303	0,804
		32,1 → 66,1	0,030	0,006	0,015	0,165	0,048	0,202
		9,8 → 66,1	0,095	0,083	0,151	0,151	0,064	0,073
		66,1 → 93,9	0,104	0,275	0,352	0,241	0,490	0,332
		9,8 → 93,9	0,391	0,241	0,391	0,217	0,104	0,268
E/T-Ratio 5:1	Med. Lyse	9,8	4,4	4,6	9,0	27,0	38,8	37,4
		32,1	3,6	3,8	6,9	27,3	39,2	41,0
		66,1	5,2	6,0	12,9	34,7	40,6	40,3
		93,9	4,1	4,6	10,2	29,7	38,0	40,9
	P-Werte	9,8 → 32,1	0,804	0,762	0,151	0,978	0,934	0,679
		32,1 → 66,1	0,004	0,006	0,009	0,064	0,165	0,277
		9,8 → 66,1	0,229	0,389	0,762	0,421	0,359	0,561
		66,1 → 93,9	0,229	0,523	0,369	0,130	0,284	0,352
		9,8 → 93,9	0,542	0,414	0,946	0,839	0,685	0,502

Der obere Block beschreibt die medianen Lysen der Trastuzumab-markierten ZR-75-1 durch NK-Zellen (E/T-Ratio 2,5:1). Der untere Block stellt die P-Werte der Unterschiede dieser Lysen jeweils gesamt (fett gedruckt) und nach Geschlechtern getrennt dar. Die P-Werte wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test bestimmt. Sie wurden je nach Bezug zum Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ farblich hervorgehoben (grün: $p < 0,05$; rot: $p \geq 0,05$)

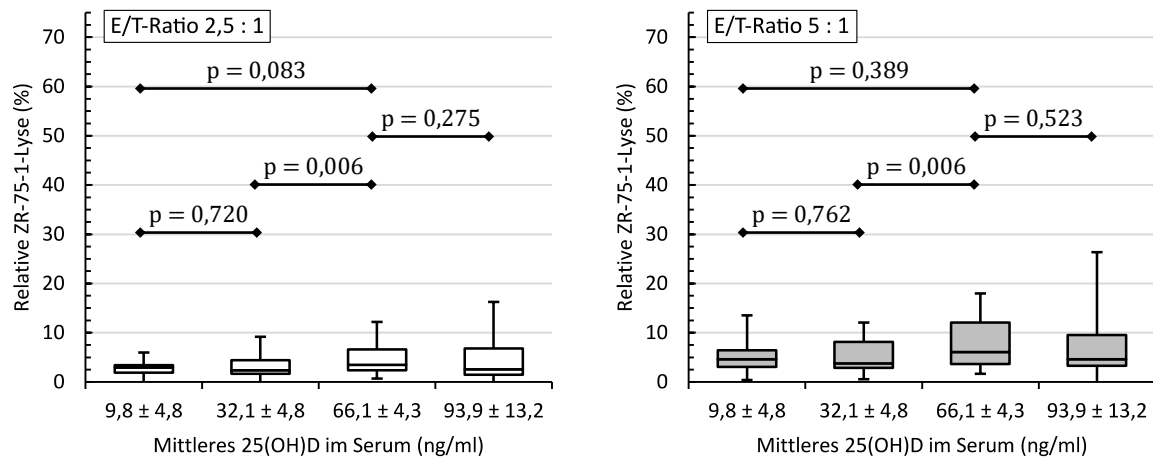


Abbildung 14 – Relative ZR-75-1-Lyse durch Trastuzumab (0,0001 µg/ml) im Verlauf der VD3-Substitution
Für die E/T-Verhältnisse 2,5:1 (links) und 5:1 (rechts). Werte entsprechend Tabelle 15. P-Werte wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test bestimmt.

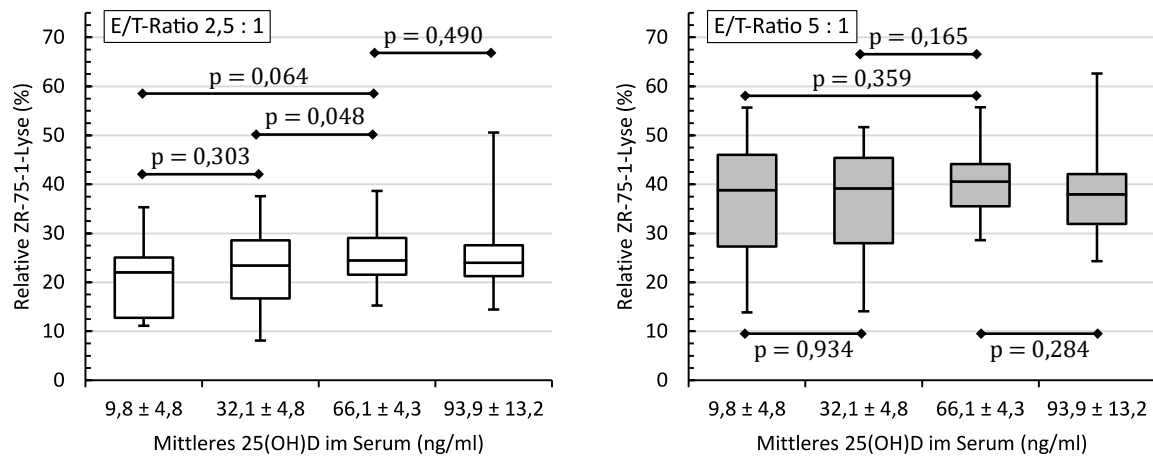


Abbildung 15 – Relative ZR-75-1-Lyse durch Trastuzumab (0,1 µg/ml) im Verlauf der VD3-Substitution
Für die E/T-Verhältnisse 2,5:1 (links) und 5:1 (rechts). Werte entsprechend Tabelle 15. P-Werte wurden mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test bestimmt.

4.4.4 Vergleich der Lyse-Raten zwischen den einzelnen Antikörpern

Die Kombination Obinutuzumab und Daudi zeigte im Vergleich zu Rituximab und Daudi bzw. Trastuzumab und ZR-75-1 die höchsten relativen Lysen. Dieser Unterschied in der ADCC war unabhängig von der Verdünnung des Antikörpers, dem eingesetzten E/T-Verhältnis sowie dem 25(OH)D-Serumspiegel. Sie lief bei Obinutuzumab somit auf einem grundlegend höheren Niveau ab (Abbildung 16; vgl. 4.4.1-4.4.3, Seite 56ff).

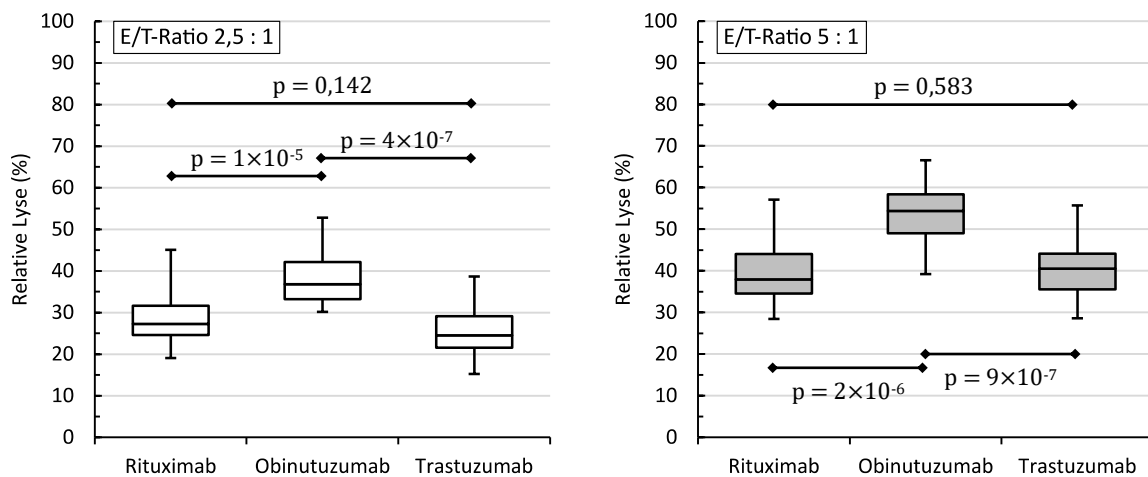


Abbildung 16 – Vergleich der drei Antikörper anhand der beobachteten Target-Lyse

Hier beispielhaft bei 66,1 ng/ml 25(OH)D i. S.; 0,1 µg/ml Antikörper. Links: E/T-Ratio 2,5:1. Rechts: E/T-Ratio 5:1. Unabhängig von AK-Verdünnung und 25(OH)D-Serumspiegel war die durch Obinutuzumab verursachte Target-Lyse im Vergleich zu Rituximab und Trastuzumab stets am stärksten ausgeprägt. Zwischen Rituximab und Trastuzumab konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Darüber hinaus zeigte sich für alle drei Antikörper, dass die Steigerung der NK-Zell-ADCC zwischen insuffizientem und mittlerem 25(OH)D-Spiegel (Zielwert 65 ng/ml) bei höheren Antikörperkonzentrationen oder höherem E/T-Verhältnis schwächer ausfiel. Anders formuliert: eine größere Konzentration an Antikörper oder NK-Zellen verringerte den Einfluss der VD₃-Substitution auf die ADCC (Abbildung 17 und Abbildung 18). Dabei übte die VD₃-Substitution auf mittleres Normalniveau auch auf die Antikörper-unabhängige NK-Zell-Aktivität einen ebenso deutlichen Einfluss aus und induzierte den stärksten Anstieg der Daudi-Lyse im Vergleich vor und nach Substitution (vgl. Tabelle 13-Tabelle 15, Seite 56ff).

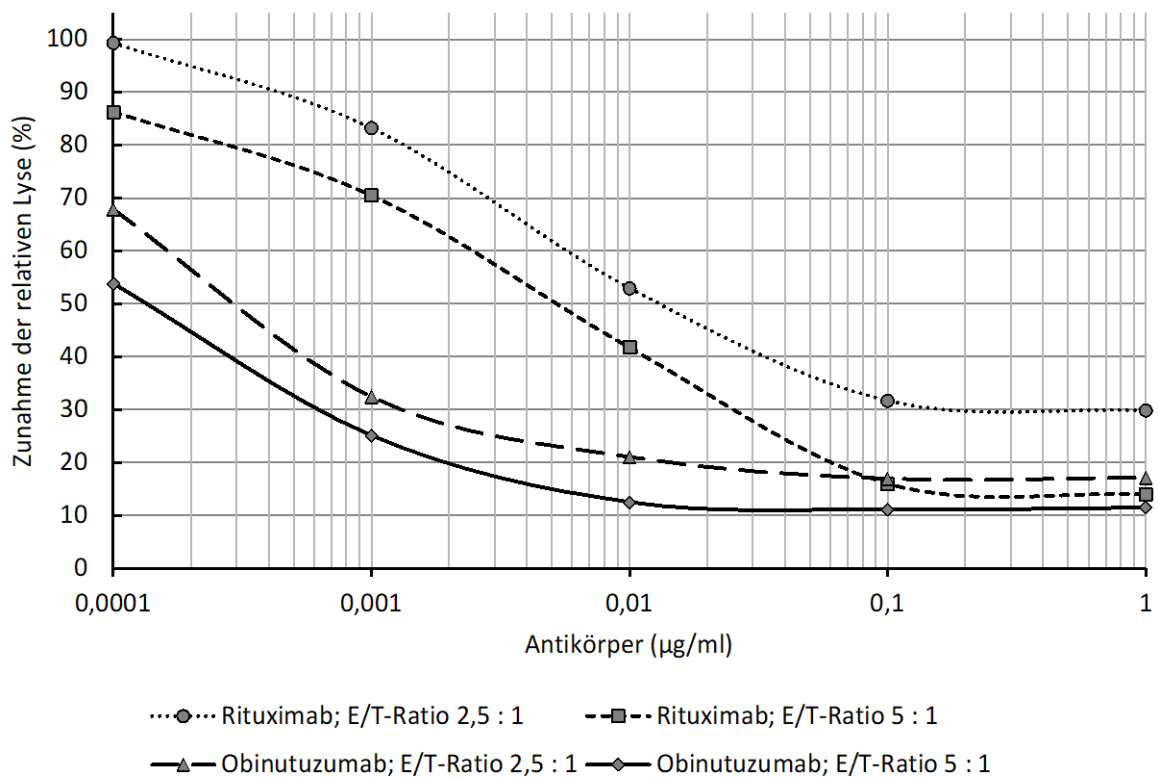


Abbildung 17 – Substitutionsbedingte Zunahme der Daudi-Lyse in Abhängigkeit der AK-Konzentration

Dargestellt ist der prozentuale Anstieg der relativen Lyse von Daudi durch die VD_3 -Substitution von $9,8 \pm 4,8$ ng/ml auf $66,1 \pm 4,3$ ng/ml 25(OH)D i. S. mit Rituximab und Obinutuzumab. Mit steigenden Konzentration an Antikörpern oder NK-Zellen sättigte sich die Zytotoxizitätssteigerung.

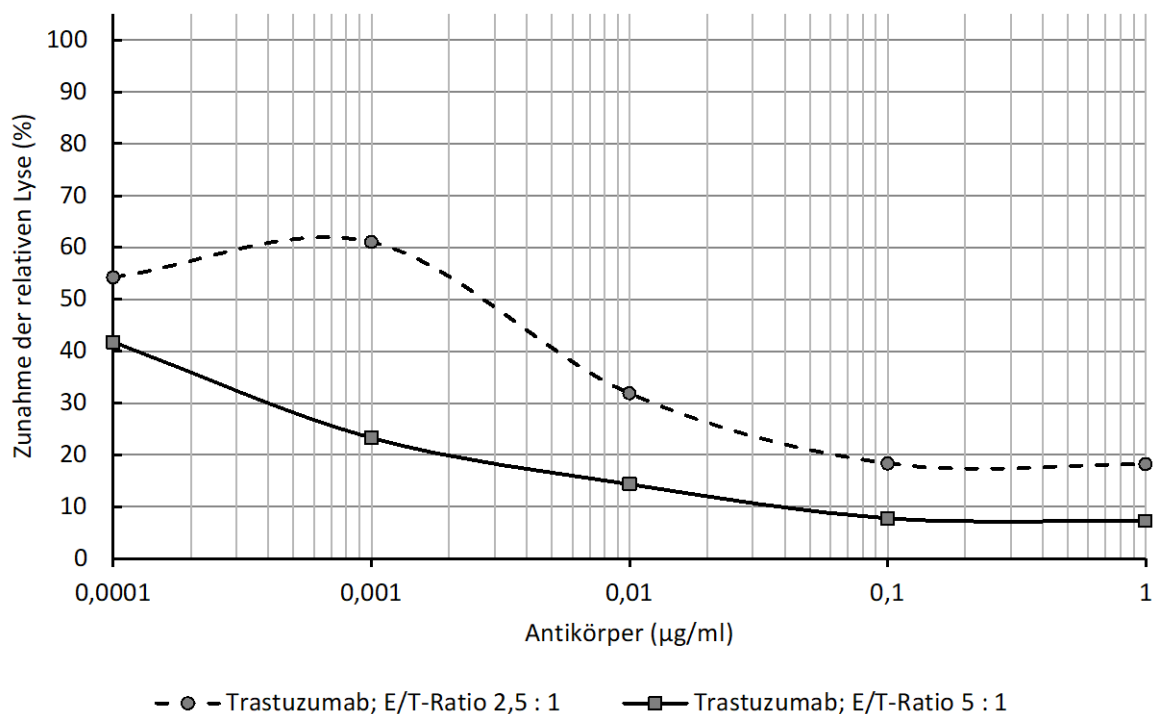


Abbildung 18 – Substitutionsbedingte Zunahme der ZR-75-1-Lyse in Abhängigkeit der AK-Konzentration

Dargestellt ist der prozentuale Anstieg der relativen Lyse von ZR-75-1 durch die VD_3 -Substitution von $9,8 \pm 4,8$ ng/ml auf $66,1 \pm 4,3$ ng/ml 25(OH)D i. S. mit Trastuzumab. Mit steigenden Konzentration an Antikörpern oder NK-Zellen sättigte sich die Zytotoxizitätssteigerung.

4.4.5 Geschlechter-spezifische Auswertung

Im Kontext der Publikation von *Bittenbring et al.*, die zeigte, dass die Korrelation von 25(OH)D-Serumspiegel und Überleben beim DLBCL unter Therapie mit R-CHOP auf Frauen beschränkt war (siehe 2.3.5.1, Seite 25) [1], führten wir eine Geschlechter-getrennte Auswertung unserer Daten durch. Hierbei zeigte sich, dass die von uns beobachtete Steigerung der Daudi-Lyse durch die VD₃-Substitution beim Einsatz der CD20-Antikörper ebenfalls auf Frauen beschränkt war (Tabelle 16 und Tabelle 17). Männer zeigten einen allenfalls tendenziellen, jedoch nicht signifikanten, Anstieg von RDCC und ODCC.

Darüber hinaus zeigte sich für beide CD20-Antikörper nun, dass die substituitionsbedingte Steigerung der ADCC bei der weiteren Substitution auf hoch-normale Serumspiegel (Zielwert 90 ng/ml) wieder abfiel. Dieser Verlauf der Daudi-Lyse war bereits in der Geschlechter-unspezifischen Auswertung tendenziell ersichtlich, erreichte bei alleiniger Betrachtung der weiblichen Studienteilnehmer jedoch statistische Signifikanz (Tabelle 16 und Tabelle 17).

Tabelle 16 – Geschlechter-getrennte relative Daudi-Lyse durch Rituximab im Verlauf der VD₃-Substitution

A	25(OH)D / Substitution (ng/ml)	Relative Daudi-Lyse (%) unter Rituximab						
		0 µg/ml	0,0001 µg/ml	0,001 µg/ml	0,01 µg/ml	0,1 µg/ml	1 µg/ml	
Rituximab; E/T-Ratio 2,5:1	Mediane Lyse	9,8 ♀: 10,1 ♂: 9,6	3,6 ♀: 3,5 ♂: 4,1	3,5 ♀: 3,7 ♂: 2,7	6,8 ♀: 5,0 ♂: 8,3	14,8 ♀: 14,7 ♂: 16,0	20,9 ♀: 20,9 ♂: 22,9	23,9 ♀: 22,8 ♂: 26,4
		32,1 ♀: 31,4 ♂: 32,9	2,9 ♀: 2,7 ♂: 3,9	3,5 ♀: 3,2 ♂: 4,7	6,8 ♀: 5,8 ♂: 7,1	15,0 ♀: 17,1 ♂: 13,7	22,1 ♀: 24,6 ♂: 19,6	26,2 ♀: 26,6 ♂: 24,2
		66,1 ♀: 66,4 ♂: 65,9	8,9 ♀: 9,5 ♂: 7,4	9,2 ♀: 9,7 ♂: 9,0	13,4 ♀: 13,4 ♂: 13,4	20,7 ♀: 21,5 ♂: 18,7	27,2 ♀: 29,3 ♂: 26,2	28,8 ♀: 31,7 ♂: 27,4
		93,9 ♀: 92,6 ♂: 95,4	3,8 ♀: 3,1 ♂: 5,9	4,8 ♀: 5,0 ♂: 4,8	8,4 ♀: 18,2 ♂: 10,4	17,5 ♀: 15,7 ♂: 20,6	22,9 ♀: 20,8 ♂: 26,8	24,8 ♀: 21,8 ♂: 28,9
	P-Werte	9,8 → 32,1 ♀: 10,1 → 31,4 ♂: 9,6 → 32,9	0,639 ♀: 0,578 ♂: 0,945	0,599 ♀: 0,578 ♂: 0,844	0,561 ♀: 0,469 ♂: 1,000	0,208 ♀: 0,219 ♂: 0,641	0,252 ♀: 0,375 ♂: 0,641	0,188 ♀: 0,219 ♂: 0,742
		32,1 → 66,1 ♀: 31,4 → 66,4 ♂: 32,9 → 65,9	0,014 ♀: 0,014 ♂: 0,322	0,002 ♀: 0,002 ♂: 0,322	< 0,001 ♀: 0,004 ♂: 0,105	0,002 ♀: 0,010 ♂: 0,105	0,007 ♀: 0,037 ♂: 0,160	0,021 ♀: 0,049 ♂: 0,275
		9,8 → 66,1 ♀: 10,1 → 66,4 ♂: 9,6 → 65,9	0,010 ♀: 0,016 ♂: 0,250	0,005 ♀: 0,031 ♂: 0,148	0,003 ♀: 0,016 ♂: 0,148	0,007 ♀: 0,016 ♂: 0,313	0,001 ♀: 0,016 ♂: 0,109	0,003 ♀: 0,016 ♂: 0,148
		66,1 → 93,9 ♀: 66,4 → 92,6 ♂: 65,9 → 95,4	0,104 ♀: 0,027 ♂: 1,000	0,040 ♀: 0,010 ♂: 0,820	0,016 ♀: 0,004 ♂: 0,820	0,036 ♀: 0,006 ♂: 1,000	0,045 ♀: 0,014 ♂: 0,820	0,104 ♀: 0,037 ♂: 1,000
		9,8 → 93,9 ♀: 10,1 → 92,6 ♂: 9,6 → 95,4	0,058 ♀: 0,375 ♂: 0,109	0,030 ♀: 0,156 ♂: 0,109	0,049 ♀: 0,156 ♂: 0,219	0,025 ♀: 0,297 ♂: 0,078	0,091 ♀: 0,297 ♂: 0,210	0,058 ♀: 0,578 ♂: 0,109

B		25(OH)D / Substitution (ng/ml)	Relative Daudi-Lyse (%) unter Rituximab					
			0 µg/ml	0,0001 µg/ml	0,001 µg/ml	0,01 µg/ml	0,1 µg/ml	1 µg/ml
Rituximab; E/T-Ratio 5:1	Mediane Lyse	9,8 ♀: 10,1 ♂: 9,6	5,4 ♀: 5,4 ♂: 5,7	6,2 ♀: 5,6 ♂: 6,8	11,9 ♀: 10,6 ♂: 14,1	22,9 ♀: 18,7 ♂: 24,9	32,7 ♀: 32,7 ♂: 36,1	37,5 ♀: 35,8 ♂: 39,2
		32,1 ♀: 31,4 ♂: 32,9	5,3 ♀: 4,6 ♂: 6,9	6,3 ♀: 6,0 ♂: 8,0	11,7 ♀: 9,1 ♂: 12,6	23,1 ♀: 22,5 ♂: 23,6	32,6 ♀: 31,7 ♂: 35,2	39,9 ♀: 40,0 ♂: 39,7
		66,1 ♀: 66,4 ♂: 65,9	10,3 ♀: 10,7 ♂: 10,3	14,5 ♀: 15,1 ♂: 12,4	18,7 ♀: 22,6 ♂: 18,4	30,2 ♀: 33,7 ♂: 28,8	37,9 ♀: 39,5 ♂: 37,9	42,9 ♀: 46,1 ♂: 40,8
		93,9 ♀: 92,6 ♂: 95,4	7,2 ♀: 5,7 ♂: 8,5	9,3 ♀: 9,1 ♂: 9,3	13,8 ♀: 11,8 ♂: 16,1	30,4 ♀: 24,0 ♂: 31,8	39,5 ♀: 35,0 ♂: 39,5	44,4 ♀: 40,4 ♂: 44,8
	P-Werte	9,8 → 32,1 ♀: 10,1 → 31,4 ♂: 9,6 → 32,9	0,679 ♀: 0,688 ♂: 0,844	0,454 ♀: 0,219 ♂: 0,742	0,303 ♀: 0,578 ♂: 0,547	0,041 ♀: 0,109 ♂: 0,250	0,229 ♀: 0,375 ♂: 0,461	0,169 ♀: 0,156 ♂: 0,844
		32,1 → 66,1 ♀: 31,4 → 66,4 ♂: 32,9 → 65,9	0,004 ♀: 0,014 ♂: 0,193	0,001 ♀: 0,002 ♂: 0,105	< 0,001 ♀: 0,002 ♂: 0,105	0,001 ♀: 0,002 ♂: 0,193	0,017 ♀: 0,014 ♂: 0,492	0,202 ♀: 0,193 ♂: 0,695
		9,8 → 66,1 ♀: 10,1 → 66,4 ♂: 9,6 → 65,9	0,005 ♀: 0,016 ♂: 0,148	0,012 ♀: 0,031 ♂: 0,250	0,003 ♀: 0,016 ♂: 0,109	0,004 ♀: 0,016 ♂: 0,250	0,015 ♀: 0,016 ♂: 0,383	0,007 ♀: 0,016 ♂: 0,313
		66,1 → 93,9 ♀: 66,4 → 92,6 ♂: 65,9 → 95,4	0,156 ♀: 0,037 ♂: 1,000	0,045 ♀: 0,014 ♂: 0,734	0,032 ♀: 0,006 ♂: 1,000	0,087 ♀: 0,020 ♂: 1,000	0,275 ♀: 0,020 ♂: 0,496	0,651 ♀: 0,084 ♂: 0,496
		9,8 → 93,9 ♀: 10,1 → 92,6 ♂: 9,6 → 95,4	0,020 ♀: 0,156 ♂: 0,109	0,049 ♀: 0,078 ♂: 0,469	0,030 ♀: 0,109 ♂: 0,219	0,030 ♀: 0,156 ♂: 0,047	0,104 ♀: 0,375 ♂: 0,297	0,030 ♀: 0,078 ♂: 0,219

Analog zu Tabelle 13 werden die medianen relativen Lysen der zuvor Rituximab-markierten Daudi durch NK-Zellen für die E/T-Verhältnisse 2,5:1 (A) und 5:1 (B) dargestellt. Hier sowohl für Männer und Frauen gemeinsam (fett gedruckt) als auch nach Geschlecht getrennt. In beiden Untertabellen unter den Lyse-Werten jeweils die P-Werte (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) der unterschiedlichen Lysen zu den verschiedenen 25(OH)D-Serumspiegeln. P-Werte wurden je nach Bezug zum Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ farblich hervorgehoben (grün: $p < 0,05$; rot: $p \geq 0,05$).

In der Subgruppe der Frauen fand die deutlichste prozentuale Zunahme an RDCC durch die Substitution von im Mittel 10,1 ng/ml auf 66,4 ng/ml 25(OH)D i. S. bei der E/T-Ratio 2,5:1 und der Rituximab-Konzentration 0,0001 µg/ml statt. Hier kam es zu einer Steigerung der Daudi-Lyse von median 3,7 % auf 9,7 % ($p = 0,031$; Abbildung 19). Bei diesem E/T-Verhältnis nahm bei der therapeutischen Rituximab-Konzentration von 0,1 µg/ml die Daudi-Lyse von 20,9 % auf 29,3 % zu ($p = 0,016$; Abbildung 19).

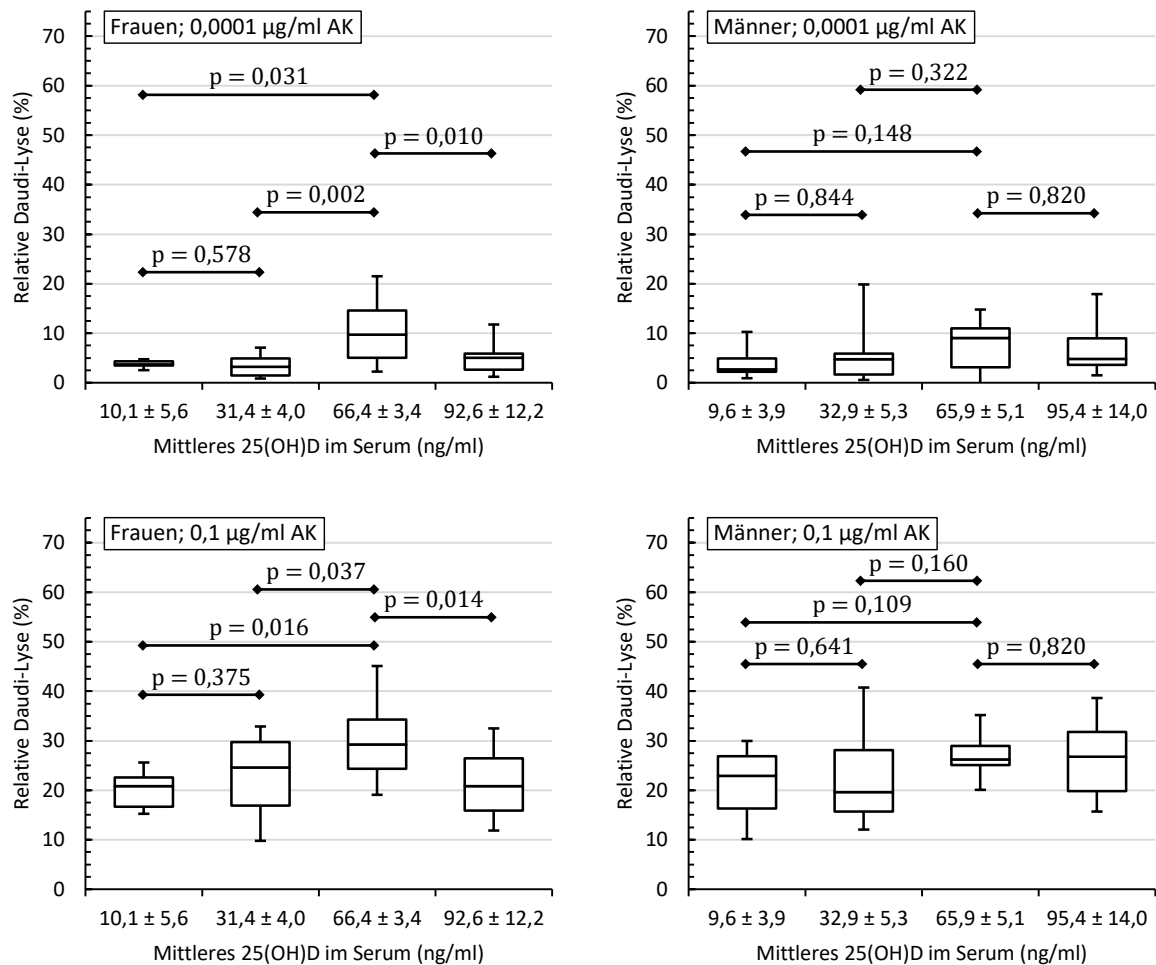


Abbildung 19 – Geschlechter-spezifische relative Daudi-Lyse durch Rituximab im Verlauf der VD₃-Substitution
 Frauen (links) zeigten im Vergleich zu Männern (rechts) einen statistisch signifikanten Anstieg der RDCC, sowohl bei niedrigen Rituximab-Konzentrationen (oben: 0,0001 µg/ml) als auch bei höheren (unten: 0,1 µg/ml). E/T-Ratio 2,5:1. Werte entsprechend Tabelle 16.

Die größte Steigerung der ODCC bei Frauen durch die Substitution von im Mittel 10,1 ng/ml auf 66,4 ng/ml 25(OH)D i. S. war bei 0,0001 µg/ml Obinutuzumab und dem E/T-Ratio 2,5:1 zu beobachten. Die relative Lyse nahm hier von median 8,1 % auf 20,2 % zu ($p = 0,016$; Abbildung 20). Bei 0,1 µg/ml Obinutuzumab steigerte sich die Daudi-Lyse von median 31,2 % auf 40,8 % ($p = 0,016$; E/T-Ratio 2,5:1; Abbildung 20).

Tabelle 17 – Geschlechter-getrennte relative Daudi-Lyse durch Obinutuzumab im Verlauf der VD₃-Substitution

A	25(OH)D / Substitution (ng/ml)	Relative Daudi-Lyse (%) unter Obinutuzumab						
		0 µg/ml	0,0001 µg/ml	0,001 µg/ml	0,01 µg/ml	0,1 µg/ml	1 µg/ml	
Obinutuzumab; E/T-Ratio 2,5:1	Mediane Lyse	9,8 ♀: 10,1 ♂: 9,6	3,2 ♀: 3,2 ♂: 3,4	10,8 ♀: 8,1 ♂: 14,6	21,4 ♀: 18,1 ♂: 26,6	28,8 ♀: 26,7 ♂: 31,6	33,4 ♀: 31,2 ♂: 35,5	33,5 ♀: 33,4 ♂: 35,9
		32,1 ♀: 31,4 ♂: 32,9	2,9 ♀: 2,5 ♂: 3,9	9,7 ♀: 8,5 ♂: 11,8	22,4 ♀: 22,4 ♂: 21,4	28,7 ♀: 30,6 ♂: 26,3	33,7 ♀: 33,7 ♂: 33,8	36,4 ♀: 36,4 ♂: 37,7
		66,1 ♀: 66,4 ♂: 65,9	8,1 ♀: 9,8 ♂: 5,4	17,8 ♀: 20,2 ♂: 14,1	28,4 ♀: 34,0 ♂: 25,7	34,8 ♀: 40,7 ♂: 32,9	36,8 ♀: 40,8 ♂: 35,4	40,0 ♀: 44,0 ♂: 37,3
		93,9 ♀: 92,6 ♂: 95,4	4,3 ♀: 3,3 ♂: 5,9	13,7 ♀: 11,4 ♂: 19,6	24,8 ♀: 22,9 ♂: 30,8	31,7 ♀: 26,8 ♂: 33,8	32,6 ♀: 31,2 ♂: 36,2	39,5 ♀: 37,2 ♂: 42,2
	P-Werte	9,8 → 32,1 ♀: 10,1 → 31,4 ♂: 9,6 → 32,9	0,804 ♀: 0,813 ♂: 0,641	0,330 ♀: 0,297 ♂: 0,742	0,277 ♀: 0,078 ♂: 0,945	0,720 ♀: 0,156 ♂: 0,383	0,359 ♀: 0,219 ♂: 0,945	0,151 ♀: 0,109 ♂: 0,742
		32,1 → 66,1 ♀: 31,4 → 66,4 ♂: 32,9 → 65,9	0,011 ♀: 0,010 ♂: 0,432	0,001 ♀: 0,002 ♂: 0,160	0,003 ♀: 0,002 ♂: 0,375	0,008 ♀: 0,006 ♂: 0,275	0,044 ♀: 0,105 ♂: 0,322	0,202 ♀: 0,084 ♂: 0,846
		9,8 → 66,1 ♀: 10,1 → 66,4 ♂: 9,6 → 65,9	0,018 ♀: 0,047 ♂: 0,250	0,002 ♀: 0,016 ♂: 0,109	0,007 ♀: 0,016 ♂: 0,461	0,003 ♀: 0,016 ♂: 0,250	0,007 ♀: 0,016 ♂: 0,313	0,018 ♀: 0,016 ♂: 0,383
		66,1 → 93,9 ♀: 66,4 → 92,6 ♂: 65,9 → 95,4	0,104 ♀: 0,027 ♂: 0,910	0,036 ♀: 0,006 ♂: 0,910	0,066 ♀: 0,014 ♂: 1,000	0,060 ♀: 0,027 ♂: 1,000	0,145 ♀: 0,020 ♂: 0,820	0,541 ♀: 0,037 ♂: 0,301
		9,8 → 93,9 ♀: 10,1 → 92,6 ♂: 9,6 → 95,4	0,017 ♀: 0,297 ♂: 0,047	0,009 ♀: 0,109 ♂: 0,078	0,078 ♀: 0,156 ♂: 0,469	0,463 ♀: 0,469 ♂: 0,813	0,542 ♀: 0,297 ♂: 1,000	0,004 ♀: 0,016 ♂: 0,109

B	25(OH)D / Substitution (ng/ml)	Relative Daudi-Lyse (%) unter Obinutuzumab						
		0 µg/ml	0,0001 µg/ml	0,001 µg/ml	0,01 µg/ml	0,1 µg/ml	1 µg/ml	
Obinutuzumab; E/T-Verhältnis 5:1	Mediane Lyse	9,8 ♀: 10,1 ♂: 9,6	5,8 ♀: 6,3 ♂: 5,3	15,7 ♀: 15,0 ♂: 21,2	33,2 ♀: 33,2 ♂: 33,1	45,6 ♀: 44,2 ♂: 45,8	49,2 ♀: 46,6 ♂: 50,2	50,5 ♀: 49,0 ♂: 51,3
		32,1 ♀: 31,4 ♂: 32,9	6,1 ♀: 5,4 ♂: 6,9	17,4 ♀: 17,2 ♂: 19,5	35,5 ♀: 35,5 ♂: 35,2	46,4 ♀: 46,9 ♂: 46,4	52,2 ♀: 49,5 ♂: 54,2	52,3 ♀: 50,8 ♂: 53,4
		66,1 ♀: 66,4 ♂: 65,9	10,2 ♀: 11,4 ♂: 9,4	28,2 ♀: 29,4 ♂: 25,5	42,8 ♀: 43,4 ♂: 40,0	51,4 ♀: 53,1 ♂: 45,6	54,4 ♀: 57,5 ♂: 50,2	55,1 ♀: 60,6 ♂: 51,9
		93,9 ♀: 92,6 ♂: 95,4	6,6 ♀: 5,5 ♂: 7,2	24,4 ♀: 20,8 ♂: 30,7	40,4 ♀: 36,2 ♂: 45,8	43,9 ♀: 41,9 ♂: 53,0	51,9 ♀: 49,9 ♂: 54,6	55,9 ♀: 55,5 ♂: 55,9
	P-Werte	9,8 → 32,1 ♀: 10,1 → 31,4 ♂: 9,6 → 32,9	0,679 ♀: 0,688 ♂: 0,742	0,151 ♀: 0,219 ♂: 0,461	0,303 ♀: 0,297 ♂: 0,945	0,252 ♀: 0,297 ♂: 0,641	0,135 ♀: 0,297 ♂: 0,461	0,135 ♀: 0,297 ♂: 0,383
		32,1 → 66,1 ♀: 31,4 → 66,4 ♂: 32,9 → 65,9	0,007 ♀: 0,027 ♂: 0,275	0,001 ♀: 0,004 ♂: 0,131	0,002 ♀: 0,004 ♂: 0,193	0,027 ♀: 0,010 ♂: 0,492	0,154 ♀: 0,037 ♂: 1,000	0,133 ♀: 0,037 ♂: 0,922
		9,8 → 66,1 ♀: 10,1 → 66,4 ♂: 9,6 → 65,9	0,026 ♀: 0,156 ♂: 0,148	0,001 ♀: 0,016 ♂: 0,109	0,003 ♀: 0,016 ♂: 0,195	0,030 ♀: 0,016 ♂: 0,641	0,018 ♀: 0,016 ♂: 0,461	0,026 ♀: 0,016 ♂: 0,641
		66,1 → 93,9 ♀: 66,4 → 92,6 ♂: 65,9 → 95,4	0,080 ♀: 0,037 ♂: 0,910	0,113 ♀: 0,027 ♂: 1,000	0,156 ♀: 0,020 ♂: 1,000	0,312 ♀: 0,049 ♂: 0,570	0,293 ♀: 0,014 ♂: 0,570	0,623 ♀: 0,037 ♂: 0,250
		9,8 → 93,9 ♀: 10,1 → 92,6 ♂: 9,6 → 95,4	0,153 ♀: 0,578 ♂: 0,297	0,007 ♀: 0,156 ♂: 0,031	0,058 ♀: 0,219 ♂: 0,219	0,296 ♀: 0,375 ♂: 0,297	0,104 ♀: 0,219 ♂: 0,469	0,035 ♀: 0,078 ♂: 0,375

Analog zu Tabelle 14 werden die medianen relativen Lysen der zuvor Obinutuzumab-markierten Daudi durch NK-Zellen für die E/T-Verhältnisse 2,5:1 (A) und 5:1 (B) dargestellt. Hier sowohl für Männer und Frauen gemeinsam (fett gedruckt) als auch nach Geschlecht getrennt. In beiden Untertabellen unter den Lyse-Werten jeweils die P-Werte (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) der unterschiedlichen Lysen zu den verschiedenen 25(OH)D-Serumspiegeln. P-Werte wurden je nach Bezug zum Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ farblich hervorgehoben (grün: $p < 0,05$; rot: $p \geq 0,05$).

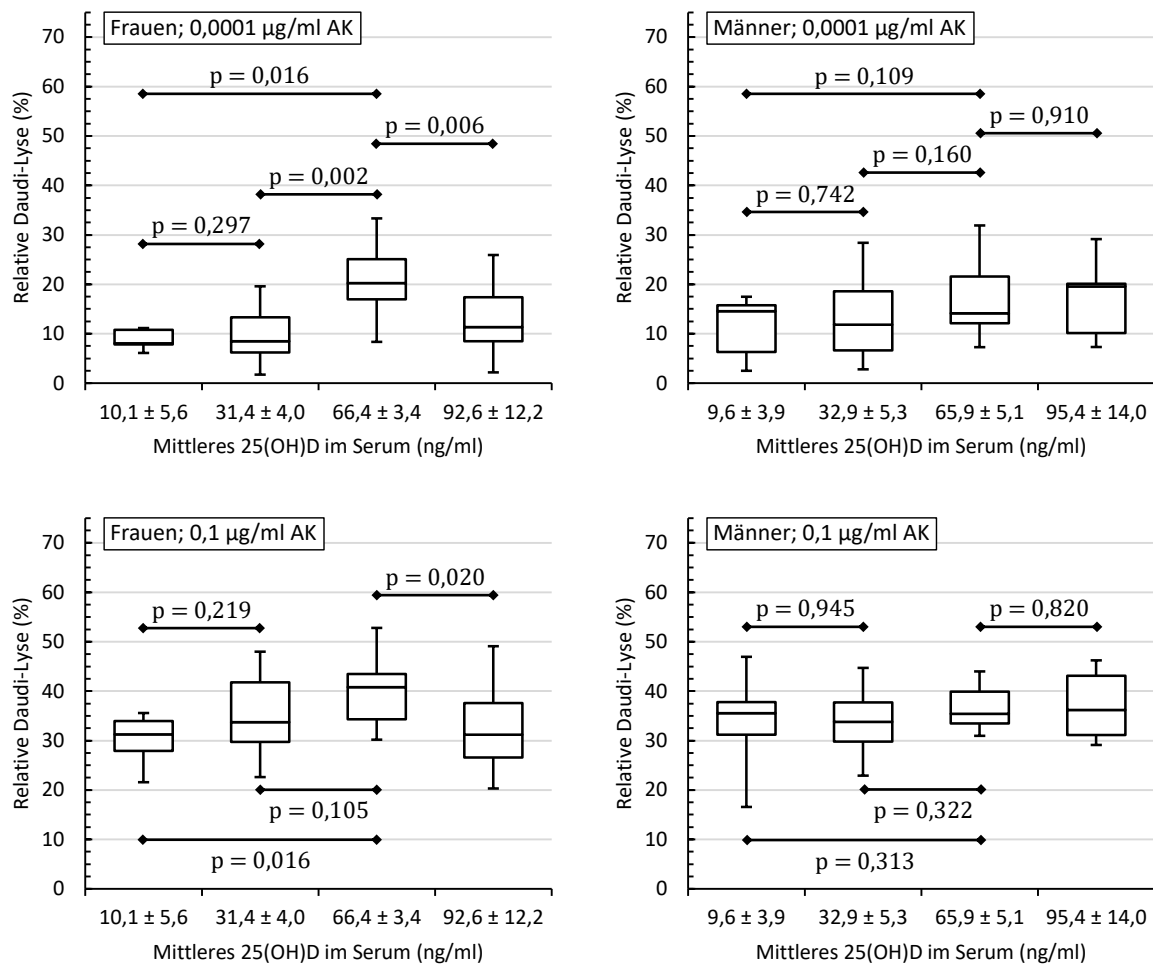


Abbildung 20 – Geschlechter-spezifische relative Daudi-Lyse durch Obinutuzumab im Verlauf der VD₃-Substitution

Frauen (links) zeigten im Vergleich zu Männern (rechts) einen statistisch signifikanten Anstieg der ODCC, sowohl bei niedrigen Obinutuzumab-Konzentrationen (oben: 0,0001 µg/ml) als auch bei höheren (unten: 0,1 µg/ml). E/T-Ratio 2,5:1. Werte entsprechend Tabelle 17.

Die Auswertung unserer Ergebnisse nach Geschlecht machte für die Kombination Trastuzumab und ZR-75-1 keine Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Probanden sichtbar. Sowohl bei Männern als auch bei Frauen war keine signifikante TDCC-Veränderung durch die VD₃-Substitution nachweisbar (Tabelle 18 und Abbildung 21).

Tabelle 18 – Geschlechter-getrennte relative ZR-75-1-Lyse durch Trastuzumab im Verlauf der VD₃-Substitution

A	25(OH)D / Substitution (ng/ml)	Relative ZR-75-1-Lyse (%) unter Trastuzumab						
		0 µg/ml	0,0001 µg/ml	0,001 µg/ml	0,01 µg/ml	0,1 µg/ml	1 µg/ml	
Trastuzumab; E/T-Ratio 2,5:1	Mediane Lyse	9,8 ♀: 10,1 ♂: 9,6	3,0 ♀: 3,0 ♂: 3,4	2,9 ♀: 2,7 ♂: 3,3	4,5 ♀: 5,4 ♂: 4,1	14,5 ♀: 14,7 ♂: 13,1	22,1 ♀: 22,1 ♂: 20,5	20,6 ♀: 20,6 ♂: 20,9
		32,1 ♀: 31,4 ♂: 32,9	2,1 ♀: 1,7 ♂: 2,7	2,4 ♀: 2,4 ♂: 2,4	4,5 ♀: 4,2 ♂: 4,7	15,3 ♀: 15,2 ♂: 16,3	23,4 ♀: 22,0 ♂: 24,4	23,2 ♀: 21,8 ♂: 23,2
		66,1 ♀: 66,4 ♂: 65,9	3,2 ♀: 2,9 ♂: 3,9	3,5 ♀: 3,3 ♂: 4,0	7,6 ♀: 6,5 ♂: 9,9	19,8 ♀: 19,6 ♂: 19,8	24,5 ♀: 24,5 ♂: 24,5	24,7 ♀: 25,4 ♂: 24,7
		93,9 ♀: 92,6 ♂: 95,4	2,8 ♀: 2,7 ♂: 3,3	2,5 ♀: 2,5 ♂: 6,1	5,5 ♀: 5,3 ♂: 5,7	18,4 ♀: 16,0 ♂: 18,9	24,0 ♀: 23,2 ♂: 24,3	23,8 ♀: 23,5 ♂: 24,5
	P-Werte	9,8 → 32,1 ♀: 10,1 → 31,4 ♂: 9,6 → 32,9	0,524 ♀: 1,000 ♂: 0,461	0,720 ♀: 0,938 ♂: 0,641	0,421 ♀: 0,578 ♂: 0,461	0,454 ♀: 0,469 ♂: 0,641	0,303 ♀: 0,938 ♂: 0,313	0,804 ♀: 0,375 ♂: 0,383
		32,1 → 66,1 ♀: 31,4 → 66,4 ♂: 32,9 → 65,9	0,030 ♀: 0,193 ♂: 0,105	0,006 ♀: 0,084 ♂: 0,064	0,015 ♀: 0,193 ♂: 0,027	0,165 ♀: 0,193 ♂: 0,492	0,048 ♀: 0,131 ♂: 0,275	0,202 ♀: 0,232 ♂: 0,695
		9,8 → 66,1 ♀: 10,1 → 66,4 ♂: 9,6 → 65,9	0,095 ♀: 0,375 ♂: 0,109	0,083 ♀: 0,375 ♂: 0,195	0,151 ♀: 0,297 ♂: 0,383	0,151 ♀: 0,297 ♂: 0,383	0,064 ♀: 0,375 ♂: 0,250	0,073 ♀: 0,375 ♂: 0,148
		66,1 → 93,9 ♀: 66,4 → 92,6 ♂: 65,9 → 95,4	0,104 ♀: 0,193 ♂: 0,570	0,275 ♀: 0,275 ♂: 0,820	0,352 ♀: 0,322 ♂: 0,820	0,241 ♀: 0,105 ♂: 0,910	0,490 ♀: 0,232 ♂: 0,820	0,332 ♀: 0,232 ♂: 1,000
		9,8 → 93,9 ♀: 10,1 → 92,6 ♂: 9,6 → 95,4	0,391 ♀: 0,578 ♂: 0,688	0,241 ♀: 0,813 ♂: 0,219	0,391 ♀: 0,578 ♂: 0,578	0,217 ♀: 0,375 ♂: 0,375	0,104 ♀: 0,156 ♂: 0,297	0,268 ♀: 0,469 ♂: 0,469

B	25(OH)D / Substitution (ng/ml)	Relative ZR-75-1-Lyse (%) unter Trastuzumab						
		0 µg/ml	0,0001 µg/ml	0,001 µg/ml	0,01 µg/ml	0,1 µg/ml	1 µg/ml	
Trastuzumab; E/T-Ratio 5:1	Mediane Lyse	9,8 ♀: 10,1 ♂: 9,6	4,4 ♀: 4,0 ♂: 4,7	4,6 ♀: 4,0 ♂: 4,8	9,0 ♀: 7,7 ♂: 10,3	27,0 ♀: 27,0 ♂: 29,5	38,8 ♀: 32,6 ♂: 40,9	37,4 ♀: 36,5 ♂: 41,3
		32,1 ♀: 31,4 ♂: 32,9	3,6 ♀: 2,4 ♂: 4,1	3,8 ♀: 3,9 ♂: 3,8	6,9 ♀: 6,7 ♂: 6,9	27,3 ♀: 27,3 ♂: 30,1	39,2 ♀: 36,4 ♂: 41,4	41,0 ♀: 39,2 ♂: 41,1
		66,1 ♀: 66,4 ♂: 65,9	5,2 ♀: 5,2 ♂: 5,5	6,0 ♀: 5,6 ♂: 6,2	12,9 ♀: 12,4 ♂: 14,2	34,7 ♀: 35,3 ♂: 33,6	40,6 ♀: 40,7 ♂: 40,1	40,3 ♀: 40,4 ♂: 39,8
		93,9 ♀: 92,6 ♂: 95,4	4,1 ♀: 4,0 ♂: 5,6	4,6 ♀: 4,5 ♂: 6,3	10,2 ♀: 7,6 ♂: 10,8	29,7 ♀: 24,6 ♂: 32,6	38,0 ♀: 34,7 ♂: 40,9	40,9 ♀: 38,3 ♂: 40,9
	P-Werte	9,8 → 32,1 ♀: 10,1 → 31,4 ♂: 9,6 → 32,9	0,804 ♀: 0,813 ♂: 1,000	0,762 ♀: 1,000 ♂: 0,742	0,151 ♀: 0,578 ♂: 0,250	0,978 ♀: 0,688 ♂: 0,844	0,934 ♀: 0,813 ♂: 0,844	0,679 ♀: 1,000 ♂: 0,742
		32,1 → 66,1 ♀: 31,4 → 66,4 ♂: 32,9 → 65,9	0,004 ♀: 0,105 ♂: 0,037	0,006 ♀: 0,232 ♂: 0,010	0,009 ♀: 0,160 ♂: 0,010	0,064 ♀: 0,105 ♂: 0,557	0,165 ♀: 0,027 ♂: 0,846	0,277 ♀: 0,275 ♂: 0,557
		9,8 → 66,1 ♀: 10,1 → 66,4 ♂: 9,6 → 65,9	0,229 ♀: 0,375 ♂: 0,641	0,389 ♀: 0,578 ♂: 0,742	0,762 ♀: 0,375 ♂: 0,461	0,421 ♀: 0,297 ♂: 1,000	0,359 ♀: 0,219 ♂: 0,742	0,561 ♀: 0,219 ♂: 0,844
		66,1 → 93,9 ♀: 66,4 → 92,6 ♂: 65,9 → 95,4	0,229 ♀: 0,250 ♂: 0,652	0,523 ♀: 0,570 ♂: 0,734	0,369 ♀: 0,164 ♂: 1,000	0,130 ♀: 0,020 ♂: 1,000	0,284 ♀: 0,074 ♂: 0,734	0,352 ♀: 0,193 ♂: 1,000
		9,8 → 93,9 ♀: 10,1 → 92,6 ♂: 9,6 → 95,4	0,542 ♀: 0,438 ♂: 1,000	0,414 ♀: 0,563 ♂: 0,688	0,946 ♀: 0,844 ♂: 0,938	0,839 ♀: 0,688 ♂: 0,938	0,685 ♀: 0,313 ♂: 0,938	0,502 ♀: 0,156 ♂: 0,938

Analog zu Tabelle 15 werden die medianen relativen Lysen der zuvor Trastuzumab-markierten ZR-75-1 durch NK-Zellen für die E/T-Verhältnisse 2,5:1 (A) und 5:1 (B) dargestellt. Hier sowohl für Männer und Frauen gemeinsam (fett gedruckt) als auch nach Geschlecht getrennt. In beiden Untertabellen unter den Lyse-Werten jeweils die P-Werte (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) der unterschiedlichen Lysen zu den verschiedenen 25(OH)D-Serumspiegeln. P-Werte wurden je nach Bezug zum Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ farblich hervorgehoben (grün: $p < 0,05$; rot: $p \geq 0,05$).

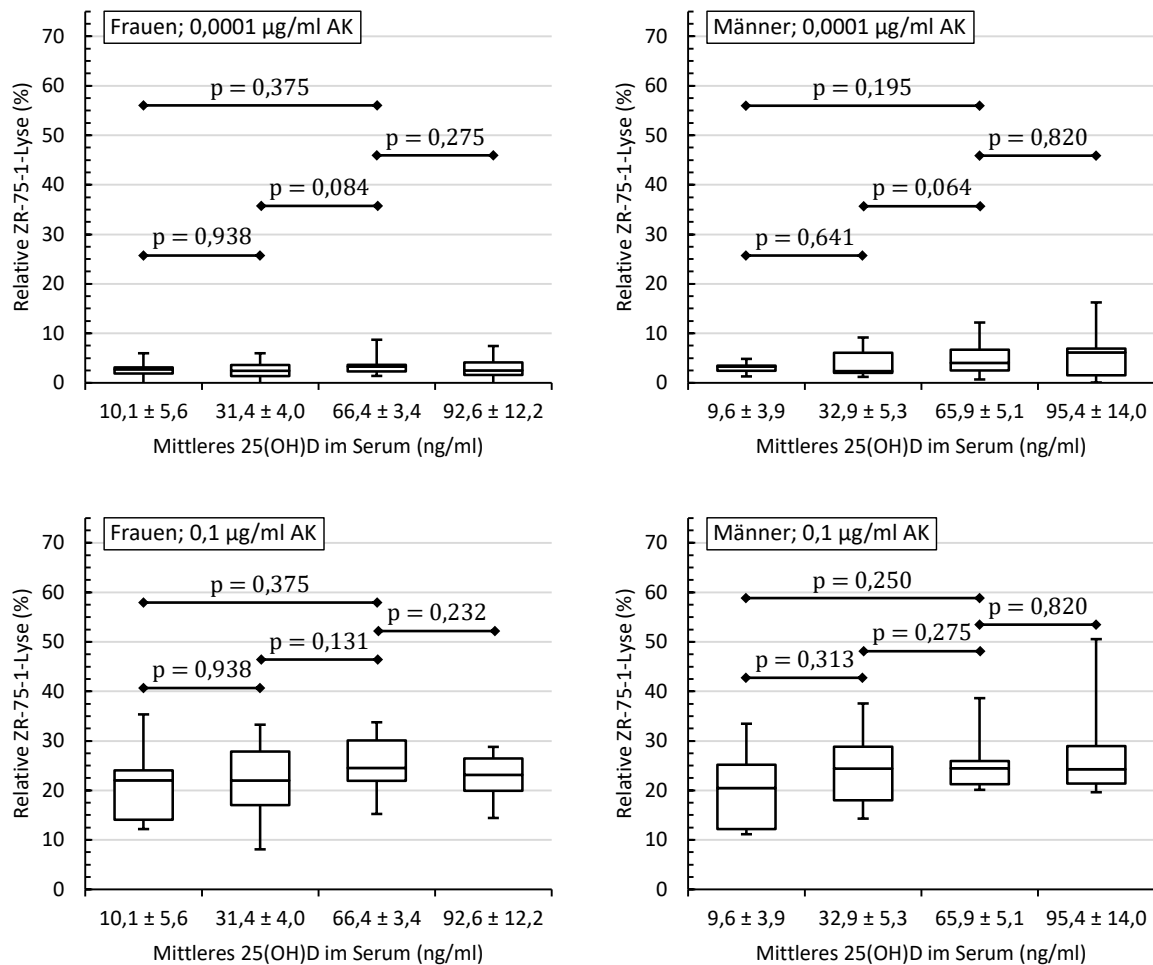


Abbildung 21 – Geschlechter-spezifische relative ZR-75-1-Lyse durch Trastuzumab im Verlauf der VD₃-Substitution

Frauen (links) zeigten wie Männer (rechts) keinen statistisch signifikanten Anstieg der TDCC, sowohl bei niedrigen Antikörper-Konzentrationen (oben: 0,0001 µg/ml) als auch bei höheren (unten: 0,1 µg/ml). E/T-Ratio 2,5:1. Werte entsprechend Tabelle 18.

5 Diskussion

5.1 Einordnung der Ergebnisse

Nachdem *Bruns et al.* zeigen konnten, dass eine In-vivo-Substitution mit Vitamin D in vitro zu einer höheren RDCC von Makrophagen gegen B-Zell-Lymphome führt [6], gelang uns erstmals der Nachweis, dass auch NK-Zellen eine gesteigerte RDCC nach VD₃-Substitution aufzeigen. Ebenso ließ sich hierdurch auch die NK-Zell-ODCC steigern und das sowohl vor als auch nach Substitution im Vergleich zur RDCC auf einem höheren Zytotoxizitätsniveau.

Interessanterweise beschränkte sich dieser Effekt auf die weiblichen Studienteilnehmer. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen von *Bittenbring et al.* aus Daten der *RICOVER-60-Studie*, wonach der 25(OH)D-Spiegel nur bei denjenigen DLBCL-Patientinnen mit dem Überleben korrelierte, die zusätzlich zur Chemotherapie CHOP auch Rituximab erhielten [1]. Wohlgemerkt wurden die Patienten adaptiert an vorliegende Risikofaktoren gemäß dem *International Prognostic Index (IPI)* verglichen, um die vielfach postulierte Rolle von 25(OH)D als Surrogatmarker der Patientenfitness zu reduzieren. Bei Männern korrelierte der 25(OH)D-Status weder in der R-CHOP- noch in der CHOP-Gruppe mit dem Überleben. Auch bei uns zeigten die NK-Zellen der männlichen Probanden allenfalls eine tendenzielle ADCC-Steigerung, die bei unserer Fallzahl nicht das festgelegte Signifikanzniveau erreichen konnte. Die Veröffentlichung zu der von *Hohaus et al.* durchgeführten RCT, die bei Lymphom-Patienten einen Überlebensvorteil durch VD₃-Substitution zeigen konnte, wurde leider nicht geschlechter-getrennt ausgewertet [4]. Andere Studien stehen derzeit aus (siehe Tabelle 2, Seite 26).

Die substitutionsbedingte Zytotoxizitätssteigerung bei Frauen erreichte ihr Maximum bei mittleren und nicht, wie zu erwarten wäre, bereits bei niedrig-normalen 25(OH)D-Serumspiegeln. Dies stellt den aktuell anerkannten Vitamin D-Referenzrahmen, der bislang über die Vitamin D-vermittelten Effekte auf den Knochen- und Elektrolytstoffwechsel definiert ist, im Kontext von Tumorthapien in Frage [72]. Zur Klärung, ob dieser Referenzrahmen angepasst werden sollte, sind jedoch weitere Daten, insbesondere aus Interventionsstudien, erforderlich.

Der von uns bestimmte 25(OH)D-Serumspiegel von 65 ng/ml, bei dem eine maximale ADCC beobachtet wurde, könnte für solche Studien als Richtwert dienen. Um diesen Wert adäquat zu erreichen, sind jedoch 25(OH)D-Kontrollen und ein valides Substitutionsprotokoll essenziell. Während es zu B-Zell-Lymphomen wenige Vitamin D-Substitutionsstudien gibt, litten in der Vergangenheit entsprechende Studien am Mamma-Karzinom oft daran, dass der 25(OH)D-Serumspiegel nach der

Substitution nicht kontrolliert wurde, oder dass unabhängig vom Ausgangswert mit einer fixen Dosisierung substituiert wurde [5].

Auch ohne Einsatz eines Antikörpers führte die VD_3 -Substitution zu einer stärkeren natürlichen NK-Zell-Zytotoxizität gegen Daudi. Mitunter ließe sich dieser Effekt jedoch durch die, in 2.3.6.2 (Seite 28) bereits erwähnte, Steigerung der NKG2D-Expression auf NK-Zellen durch $1,25(OH)_2D$ erklären [130]. Dieser Rezeptor ist maßgeblich an der Antikörper-unabhängigen Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber Daudi beteiligt [191]. Durch die Blockade von NKG2D und anderer *Pattern Recognition Receptors* (dt. Mustererkennungsrezeptoren), z. B. durch Antikörper, wäre es eventuell möglich gewesen, eine Aussage darüber zu treffen, welcher Anteil am Zugewinn der NK-Zell-Zytotoxizität nach VD_3 -Substitution durch eine gesteigerte ADCC und welcher durch eine gesteigerte natürliche Zytotoxizität gegen Daudi zustande kam. Die Auswertung der bereits mehrfach zitierten *RICOVER-60-Studie* [1] zeigte, dass ein $25(OH)D$ -Mangel nur bei denjenigen Frauen prognostisch ungünstig war, die neben Chemotherapie auch den Anti-CD20-AK Rituximab zur Therapie ihres Lymphoms erhielten. Das wiederum spricht jedoch dafür, dass der Hauptanteil der gesteigerten Lyse auf eine gesteigerte ADCC zurückzuführen ist. Das primäre Ziel dieser Studie war es jedoch, einen Substitutionsrichtwert im Hinblick auf eine möglichst maximale NK-Zell-vermittelte ADCC und ein entsprechend optimiertes Substitutionsprotokoll für künftige Interventionsstudien zu finden. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit keine weitergehenden Untersuchungen über die möglichen Ursachen der Aktivitätssteigerung durchgeführt.

Im Unterschied zur RDCC und ODCC zeigte die Trastuzumab-abhängige NK-Zell-Zytotoxizität, ungeachtet des Geschlechts, keinen signifikanten Anstieg durch die VD_3 -Substitution. Auch wenn eine tendenzielle Verbesserung bei mittleren $25(OH)D$ -Serumspiegeln von 65 ng/ml zu beobachten war, wurde das bei RDCC und ODCC beobachtete Niveau weder vor noch nach der Substitution erreicht. Möglicherweise hätte auch hier eine höhere Fallzahl zu statistischer Signifikanz geführt.

Dass eine Vitamin D-Substitution Anti-HER2-therapierter Brustkrebs-Patientinnen zu einem geringgradig besseren Überleben führt, konnte in RCT bereits gezeigt werden (siehe 2.3.5.1, Seite 25). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass Trastuzumab im Vergleich zu Rituximab generell weniger NK-Zell-ADCC zu vermitteln scheint und primär über seine anderen Wirkmechanismen agiert [192]. Nicht auszuschließen ist, ob beim Einsatz modifizierter Anti-HER2-Antikörper wie Pertuzumab, die, analog zu Obinutuzumab im Vergleich zu Rituximab, eine stärkere ADCC vermitteln können [193], eine VD_3 -Substitution nicht doch zu einem Zugewinn an Tumorlyse führt.

5.2 Bewertung der Vitamin D-Substitution

Die von uns eingesetzte VD_3 -Substitutionsformel, modifiziert nach *van Groningen et al.*, erwies sich in der Anwendung als sicher. Es traten bei keinem unserer Probanden Zeichen einer Vitamin D-Intoxikation wie beispielsweise Hyperkalzämie auf. Die Zielwerte 30 und 65 ng/ml konnten mit unserer Formel innerhalb weniger Tage erstaunlich treffsicher erreicht werden. Dies ist im Kontext von NHL insofern wichtig, als dass in der Regel nur wenig Zeit zwischen Diagnosestellung und Beginn der Immunochemotherapie liegt. Zudem ist VD_3 -Mangel in unseren Breitengraden ein so weit verbreitetes Phänomen, dass davon auszugehen ist, dass ein Großteil der Patienten nicht optimal Vitamin D-versorgt sind (siehe 2.3.2, Seite 21). Unser VD_3 -Substitutionsprotokoll zeigte lediglich bei dem Zielwert 90 ng/ml eine deutliche Zunahme der Streubreite der 25(OH)D-Werte. Dies sollte jedoch angesichts des gezeigten ADCC-Maximums bei mittleren 25(OH)D-Werten eher nachrangig sein.

5.3 Möglicher Einfluss der angewandten Methodik auf die Ergebnisse

5.3.1 Möglicher Einfluss der eingesetzten Zelllinien

Während ZR-75-1 auf der Zelloberfläche MHC-Moleküle der Klasse I exprimiert [194], ist dies bei Daudi aufgrund fehlenden $\beta 2$ -Mikroglobulins nicht der Fall [177]. Dies führt wegen der eingeschränkten, KIR-vermittelten Selbsterkennung über MHC I durch NK-Zellen (*Missing-Self*-Hypothese) zu einer höheren Vulnerabilität von Daudi gegenüber NK-Zellen [132].

Somit ist in den ZR-75-1-Versuchen ein Einfluss der, in dieser Arbeit nicht untersuchten, interindividuell verschiedenen MHC-Inkompatibilität von Effektor- und Zielzelle aufgrund einer KIR-vermittelten NK-Zell-Inhibition denkbar. Da jedoch kein relevanter Unterschied in der relativen Lyse zwischen den Kombinationen Rituximab und Daudi sowie Trastuzumab und ZR-75-1 vor der VD_3 -Substitution zu beobachten war (vgl. 4.3.1, Seite 52 und 4.3.3, Seite 54), erscheint ein maßgeblicher Einfluss der fehlenden KIR-vermittelten Inhibition in den Daudi-Experimenten eher unwahrscheinlich. Darüber hinaus konnten *Al-Jaderi et al.* in vitro zeigen, dass $1,25(OH)_2D$ die Expression von KIR auf NK-Zellen reduziert [130], wohingegen die Obinutuzumab-abhängige NK-Zell-Zytotoxizität nach *Terszowski et al.* ohnehin unabhängig von der KIR-Expression auf NK-Zellen ist [195].

5.3.2 Möglicher Einfluss der eingesetzten Zytolyse-Nachweismethode

Wir entschieden uns für den Einsatz eines quantitativen LDH-Nachweistests als Surrogatmarker für die Zahl lysierter Tumorzellen, da dieser bei gleicher Sensitivität und Spezifität deutlich einfacher und sicherer in der Handhabung ist als radioaktive Nachweistests, wie beispielsweise die etablierte Messung beim Zellzerfall freigesetzter, radioaktiver Chrom-Isotope [196].

Da der LDH-Nachweis mit Zellüberstand durchgeführt wurde, konnte dieser Zytotoxizitätsnachweis lediglich Zellnekrosen nachweisen. Im Unterschied hierzu kommt es bei der Apoptose nicht zur direkten Freisetzung von Enzymen wie LDH. Stattdessen werden diese mit anderen zytoplasmatischen Bestandteilen in kleinen Granula bzw. Vesikeln abgeschnürt. Diese werden in vivo dann nach Internalisierung durch Phagozyten abgebaut [197]. Da NK-Zellen bei ihren Zielzellen jedoch sowohl Nekrose als auch Apoptose induzieren [198, 199], kam es uns zu Gute, dass in einem In-vitro-Modell wie hier solche Proteinbestandteile im Rahmen der sekundären Nekrose zwangsweise freigesetzt werden und sich im Zellüberstand nachweisen lassen [200].

5.3.3 Unklarheit über die Stärke des Vitamin D-Effekts bei günstigeren ADCC-Bedingungen

Wie in 4.4.4 (Seite 62) beschrieben, war der Einfluss der VD_3 -Substitution auf die ADCC bei dem E/T-Verhältnis 2,5:1 deutlich stärker ausgeprägt als bei dem E/T-Verhältnis 5:1. Aufgrund des limitierten Blutvolumens, welches den Probanden im Rahmen eines Tests abgenommen werden konnte, war der Einsatz höherer E/T-Ratios wie 10:1 oder 20:1 nicht möglich. Da NK-Zellen, wie alle zytotoxischen Zellen des Immunsystems, eine natürliche Obergrenze an zytotoxischer Aktivität aufweisen, liegt es jedoch nahe, dass die ADCC-Steigerung bei solchen, eher „suboptimalen“, ADCC-Bedingungen, also einer niedrigen E/T-Ratio oder AK-Konzentration, besser sichtbar werden. Dass in vivo, insbesondere bei soliden Tumoren, noch kleinere E/T-Verhältnisse zu beobachten sind [201], lässt klar vermuten, dass eine VD_3 -Substitution auch in vivo die Immuntherapie mit ADCC-vermittelnden Antikörpern in ihrer Effektivität steigern kann.

5.4 Einflussfaktor Geschlecht

Wieso nur Frauen im Kontext von höheren 25(OH)D-Werten eine gesteigerte RDCC und ODCC aufweisen, ist unklar. Dass die eingangs erwähnte Arbeit von *Bittenbring et al.* [1] an Daten der *RICOVER-60-Studie* ausschließlich und unsere Studie größtenteils an postmenopausalen Frauen durchgeführt wurde, legt den Schluss nahe, dass der hormonelle Status einen bedeutenden Einflussfaktor darstellt. Dabei ist sowohl eine Modulation des Vitamin D-Stoffwechsels selbst denkbar, als auch synergistische oder antagonistische Effekte mit den Sexualhormonen in den entsprechenden Effektorzellen selbst.

Während bei anderen Säugetierspezies wie Schweinen und Ratten neben CYP27B1 und CYP24A1 weitere Cytochrom-Oxidasen beschrieben wurden, die eine geschlechtsabhängige Expression aufzeigen und den Vitamin D-Stoffwechsel beeinflussen, konnte hierfür bislang kein entsprechendes Korrelat anderer Cytochrom-Oxidasen beim Menschen gefunden werden [71]. *Olmos-Ortiz et al.*

konnten an kultivierten, plazentären Trophoblasten jedoch nachweisen, dass Testosteron die Expression von CYP27B1 verringert und die von CYP24A1 induziert [202]. Dies war begleitet von einer geringeren Sekretion des AMP Cathelicidin, worin die Autoren einen Teilaspekt der erhöhten Vulnerabilität männlicher Föten gegenüber Infektionen sehen [202].

Auch der Stoffwechsel von DBP kann Einfluss auf die Bereitstellung und Aktivierung von 25(OH)D in Effektorzellen nehmen. Dieses Plasmaprotein dient nicht nur, wie ursprünglich angenommen, dem Transport und Puffern von Vitamin D-Metaboliten im Serum, sondern wird auch von verschiedenen Zellen mittels Endozytose internalisiert und abgebaut [203]. Auf diese Weise können intrazelluläre Vitamin D-Spiegel erreicht werden, die durch reine transmembranöse Diffusion – bei einem Anteil von freiem bzw. nicht-proteingebundenem 25(OH)D von lediglich 0,003 % – nicht möglich wären [204]. Dieser Mechanismus wurde unter anderem in renalen Tubuluszellen [204], Hepatozyten [205], aktivierten T-Zellen [206] und malignen B-Zellen [207] nachgewiesen. In der Arbeit von *Kongsbak et al.* führte die Endozytose von DBP durch aktivierte T-Zellen zu einem Ausbleiben der 25(OH)D-Aktivierung zu 1,25(OH)₂D und damit auch zu keiner veränderten Expression Vitamin D-regulierter Gene [206]. Die Autoren konnten jedoch auch zeigen, dass eine Carbonylierung von DBP, wie sie durch Freisetzung von ROS während inflammatorischer Prozesse bei verschiedenen Proteinen zu beobachten ist, diese suppressive Wirkung aufhebt [206]. Untersuchungen, ob auch Zellen des innate Immunsystems DBP aufnehmen können und welchen Einfluss dies auf ihre Funktion hat, fehlen bislang, stellen jedoch einen interessanten Ansatz für weitere Forschung dar, insbesondere da der DBP-Stoffwechsel Geschlechtsunterschiede aufzeigt. So wird die DBP-Bildung durch Östrogen beeinflusst [208], was die höheren DBP-Serumspiegel bei Frauen im Vergleich zu Männern erklärt [209]. Darüber hinaus wäre auch ein Einfluss von Östrogen oder anderen Sexualhormonen auf die Endozytose von DBP durch Leukozyten denkbar. So wurde an Hepatozyten weiblicher Mäuse bereits gezeigt, dass 17β-Östradiol die Endozytose von DBP stimuliert [205]. Sollte sich ein ähnlicher Effekt für NK-Zellen bestätigen, könnte dies die Geschlechtsunterschiede, die in dieser Arbeit beobachtet wurden, miterklären, zumal NK- und Target-Zellen in Anwesenheit von Serum – und somit von DBP – inkubiert wurden.

Eine Modulation von NK-Zellen durch Sexualhormone wurde in der Vergangenheit mehrfach beschrieben. So senken sowohl Östrogen als auch Progesteron die Antikörper-unabhängige Aktivität menschlicher NK-Zellen [210]. Dies konnte bei prämenopausalen Frauen bestätigt werden, deren NK-Zellen eine synchron zu ihrem Menstruationszyklus schwankende Aktivität aufzeigen [210]. Das Ausmaß der Antikörper-abhängigen NK-Zellaktivität ist jedoch weniger Östrogen-abhängig und unterscheidet sich nicht zwischen prä- und postmenopausalen Frauen oder Östrogen-substituierenden postmenopausalen Frauen [211].

Weniger klar ist die Datenlage hinsichtlich möglicher synergistischer oder antagonistischer Effekte von Östrogen und Vitamin D. *Correale et al.* zeigten bei Patienten mit Multipler Sklerose, dass der Effekt von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ auf T-Zellen und Makrophagen Östrogen-abhängige Geschlechterunterschiede aufweist [212]. So exprimierten durch die Gabe von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ die T-Zellen weiblicher Patienten im Vergleich zu denen männlicher Patienten nach Aktivierung weniger CYP24A1, T_H -Zellen sezernierten weniger IFN- γ und IL-2 und mehr IL-10, die Zahl an T_reg -Zellen stieg an und Makrophagen und T-Zellen zeigten eine höhere Endozytose von DBP [212]. Diese $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -vermittelten Effekte ließen sich auch bei Zellen männlicher Patienten reproduzieren, wenn den Reaktionsansätzen Östrogen zugesetzt wurde [212]. Unklar bleibt die Frage, ob Östrogen im Kontext hoher Vitamin D-Konzentrationen auch einen Einfluss auf die NK-Zell-vermittelte ADCC nimmt. Dies könnte einen Erklärungsansatz für unsere Beobachtungen liefern; verbleibt bei aktueller Datenlage jedoch rein spekulativ.

Da *Bittenbring et al.* [1] das bessere Überleben jedoch bei überwiegend postmenopausalen Frauen beschrieben hat, die einen niedrigere Östrogen- und Gestagenspiegel im Blut haben als prämenopausale Frauen, scheint es nahezuliegen, dass Männer nicht aufgrund niedriger Östrogen- oder Gestagenspiegel sondern aufgrund höherer Testosteronspiegel eine schlechtere RDCC und ODCC aufzeigen. Während ein hemmender Einfluss von Testosteron auf die Antikörper-unabhängige NK-Zell-Aktivität in der Literatur bereits beschrieben wurde [210], ist die Datenlage für die Auswirkung auf die ADCC menschlicher NK-Zellen sehr dünn. Untersuchungen an splenischen mononukleären Zellen der Maus zeigten jedoch keinen Einfluss von Testosteron auf ihr ADCC-Vermögen [213].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es derzeit zahlreiche Hinweise auf Wechselwirkungen sowohl zwischen Testosteron, Östrogen, Vitamin D-Stoffwechsel und dem Immunsystem gibt. Dennoch ist der aktuelle Kenntnisstand nicht ausreichend für eine abschließende Bewertung des von uns beobachteten Phänomens.

5.5 Verringerung der ADCC auf hoch-normalen $25(\text{OH})\text{D}$ -Serumspiegeln

Nachdem die VD_3 -Substitution auf mittlere $25(\text{OH})\text{D}$ -Werte von 65 ng/ml i. S. zu einer gesteigerten RDCC und ODCC führte, nahm ihr Ausmaß nach weiterer Substitution auf 90 ng/ml wieder ab. Die Ursachen hierfür sind unklar.

5.5.1 Einfluss anderer Leukozyten auf die NK-Zell-ADCC

Die Regulation von $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ unterliegt dem Gleichgewicht von aktivierendem CYP27B1 und inaktivierendem CYP24A1. Zu hohe Konzentrationen an Calcitriol werden verhindert, indem renal aber auch in verschiedenen Leukozyten wie B-Zellen, T-Zellen und dendritischen Zellen abhängig von der Konzentration an $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ vermehrt CYP24A1 exprimiert wird [128].

Dieser Mechanismus ist bei längerfristiger VD_3 -Applikation möglicherweise überkompensierend. So konnten *Vieth et al.* zeigen, dass bei Ratten eine chronische, diätetische VD_3 -Zufuhr zu verringerten $1,25(OH)_2D$ -Serumspiegeln führt [214]. Zwar können auch NK-Zellen selbst Vitamin D aktivieren, ihre Expression von CYP27B1 ist jedoch ca. 4-Fach geringer als beispielsweise in T-Zellen [118], sodass NK-Zellen möglicherweise vor allem auf parakrines $1,25(OH)_2D$ zurückgreifen [119]. Während Tumorassoziierte Leukozyten in ihrem Milieu möglicherweise hohe $1,25(OH)_2D$ -Konzentrationen generieren und aufrechterhalten können, wurde diese Studie mit NK-Zellen durchgeführt, die dem peripheren Blut entnommen wurden. Da die tatsächlichen $1,25(OH)_2D$ -Konzentrationen nicht bestimmt wurden, ist somit nicht auszuschließen, dass die lang andauernde, pulsatile VD_3 -Substitution unserer Probanden wie bei *Vieth et al.* zu erniedrigten $1,25(OH)_2D$ -Werten am Ende der Substitutionsreihe führte.

5.5.2 Debatte um U-förmige Vitamin D-/Effekt-Beziehung

Unsere Beobachtung ließe sich mit einem U-förmigen Zusammenhang zwischen $25(OH)D$ -Spiegel und dem Auftreten verschiedener Krankheiten vereinbaren (engl. *U-shaped curve*), wie er in der Vergangenheit bereits mehrfach postuliert wurde. So war in einer longitudinalen Fall-Kontroll-Studie an norwegischen, finnischen und schwedischen Männern von *Tuohimaa et al.* das Risiko, an einem Prostata-Karzinom zu erkranken, sowohl mit niedrigen (≤ 19 ng/ml) als auch mit sehr hohen (≥ 80 ng/ml) $25(OH)D$ -Spiegeln vergesellschaftet [215]. *Vieth* formulierte als mögliche Erklärung dessen die Hypothese, dass in nördlichen Breitengraden $25(OH)D$ i. S. im Sommer schnell ansteigt, was das Verhältnis von CYP27B1 und CYP24A1 zugunsten CYP24A1 und damit zugunsten des Abbaus von Vitamin D verschiebt [216]. Dieser Mechanismus sei im Winter zwar umkehrbar, da jedoch der Vitamin D-Stoffwechsel in peripheren Geweben im Unterschied zur Niere nicht von den Konzentrationen von Parathormon und verschiedener Elektrolyte reguliert werde, geschehe dies in peripheren Geweben nur langsam [216]. Dies führe in der Peripherie zu einem schnellen Abfall von $25(OH)D$ im Winter und folglich niedrigen effektiven $1,25(OH)_2D$ -Konzentrationen in diesen Organen [216]. In nördlichen Breitengraden würden somit sowohl niedrige als auch sehr hohe $25(OH)D$ -Spiegel im Sommer, gemittelt über das Jahr, zu einer relativ zu niedrigen $1,25(OH)_2D$ -Konzentration führen [216]. Die Hypothese von *Vieth* ist konsistent mit den Daten von *Stolzenberg-Solomon et al.* [217], wonach finnische Raucher mit höheren $25(OH)D$ -Spiegeln ein gesteigertes Risiko haben, an einem Pankreas-Karzinom zu erkranken. Sie erklärt jedoch nicht, wieso auch in südlicheren Breitengraden ähnliche U-förmige Beziehungen zwischen $25(OH)D$ und verschiedenen Endpunkten beobachtet werden konnten, wie etwa für das Auftreten von Ösophagus-Karzinomen bei chinesischen Männern [218] oder der erkrankungsunabhängigen Gesamtmortalität in der US-amerikanischen

NHANES III-Kohorte [219]. Zudem wird nicht klar, wieso nicht auch bei anderen Tumoren eine U-förmige Beziehung zu beobachten ist [220].

Die Theorie einer U-förmigen Vitamin D-/Effekt-Beziehung ist umstritten. So schreibt *Grant* [220], dass es sich bei den jeweiligen Studien jeweils nur um wenige Veröffentlichungen handele, die in der Regel nicht reproduziert werden konnten, nicht einmal in den jeweiligen Ländern selbst. Eine Meta-Analyse von *Yin et al.* bezog die Arbeit von *Tuohimaa et al.* [221] ein, konnte jedoch bei der erweiterten Fallzahl selbst unter Berücksichtigung der geographischen Verteilung der Patienten keine U-förmige Assoziation nachweisen. Zudem ist die methodische Qualität entsprechender Studien mitunter nicht adäquat. Zur oben genannten Arbeit an Pankreas-Karzinomen von *Stolzenberg-Solomon et al.* [217] schrieben *Baggerly et al.* [222], dass die U-förmige Beziehung nur bei willkürlich gewählter Einteilung der 25(OH)D-Spiegel in einzelne Gruppen zu beobachten sei. Hierunter würden in den Gruppen mit den höchsten 25(OH)D-Werten extrem kleine Fallzahlen entstehen von teilweise nur 3 % der Probanden [222].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine U-förmige Vitamin D-Effekt-Beziehung im Kontext von Prostata- und Pankreaskarzinom derzeit zu bezweifeln ist. Ungeachtet dessen wurde solch eine Assoziation für Lymphome bislang nicht beschrieben. Unsere Ergebnisse sprechen jedoch dafür, dass immunologische Prozesse, die essenziell für moderne, zielgerichtete Tumorthérapien sind, bei sehr hohen 25(OH)D-Spiegeln auf bislang ungeklärte Weise supprimiert werden.

5.6 Ausblick

In der Therapie von NHL sind NK-Zellen wichtige Mediatoren der Rituximab- und Obinutuzumab-induzierten Tumorlyse. Diese Studie konnte erstmals zeigen, dass das Ausmaß von RDCC und ODCC *in vitro* bei 25(OH)D-Werten *in vivo* von 65 ng/ml ein Maximum erreicht. Dies stellt den von der *Endocrine Society* definierten Referenzbereich, nach dem Werte ab 30 ng/ml als optimal gelten [72], im Kontext der Immunkontrolle von Lymphomen in Frage. Die von *Hohaus et al.* durchgeführte RCT an Patienten mit B-NHL konnte bereits einen Nutzen einer VD₃-Substitution auf 30 ng/ml erbringen [4]. Unsere Arbeit legt den Schluss nahe, dass Patienten mehr noch von einer Substitution auf 65 ng/ml profitieren. Dies wird in weiteren Interventionsstudien geklärt werden müssen. Augenmerk liegt hierbei insbesondere auf der derzeit laufenden *OPTIMAL>60-Studie*, die eine Substitution auf solche mittleren 25(OH)D-Spiegel vorsieht [111].

Darüber hinaus ist das Verständnis um die mechanistischen Zusammenhänge zwischen Vitamin D-Spiegel bzw. -Metabolismus und innatem Immunsystem derzeit noch nicht zufriedenstellend. Insbesondere der Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Probanden dieser Studie weist auf

geschlechterspezifische Unterschiede hin, die bislang ungenügend beleuchtet wurden. Abseits der direkten Auswirkung auf den klinischen Alltag könnte die weitergehende Forschung über das in dieser Arbeit behandelte Thema und die daraus resultierenden Fragen einen wichtigen Beitrag zur Identifikation weiterer Therapieansätze leisten.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Vitamin D-Stoffwechsel des Menschen	20
Abbildung 2 – Belegung der Testplatten zur Inkubation von NK-Zellen mit ihren Zielzellen und Kontrollansätze	45
Abbildung 3 – Alter der Probanden zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses	49
Abbildung 4 – 25(OH)D-Serumspiegel im Verlauf der drei Substitutionsrunden	50
Abbildung 5 – 25(OH)D-Anstieg pro verabreichter VD ₃ -Dosis und Körpergewicht nach Probandenalter	51
Abbildung 6 – Relative Daudi-Lyse in Abhängigkeit der Rituximab-Konzentration vor VD ₃ -Substitution	52
Abbildung 7 – Relative Daudi-Lyse in Abhängigkeit der Obinutuzumab-Konzentration vor VD ₃ -Substitution	53
Abbildung 8 – Relative ZR-75-1-Lyse in Abhängigkeit der Trastuzumab-Konzentration vor VD ₃ -Substitution	54
Abbildung 9 – Ausschluss einer Antikörper-Kreuzreaktion	55
Abbildung 10 – Relative Daudi-Lyse durch Rituximab (0,0001 µg/ml) im Verlauf der VD ₃ -Substitution	57
Abbildung 11 – Relative Daudi-Lyse durch Rituximab (0,1 µg/ml) im Verlauf der VD ₃ -Substitution ...	57
Abbildung 12 – Relative Daudi-Lyse durch Obinutuzumab (0,0001 µg/ml) im Verlauf der VD ₃ -Substitution	59
Abbildung 13 – Relative Daudi-Lyse durch Obinutuzumab (0,1 µg/ml) im Verlauf der VD ₃ -Substitution	59
Abbildung 14 – Relative ZR-75-1-Lyse durch Trastuzumab (0,0001 µg/ml) im Verlauf der VD ₃ -Substitution	61
Abbildung 15 – Relative ZR-75-1-Lyse durch Trastuzumab (0,1 µg/ml) im Verlauf der VD ₃ -Substitution	61
Abbildung 16 – Vergleich der drei Antikörper anhand der beobachteten Target-Lyse	62
Abbildung 17 – Substitutionsbedingte Zunahme der Daudi-Lyse in Abhängigkeit der AK-Konzentration	63
Abbildung 18 – Substitutionsbedingte Zunahme der ZR-75-1-Lyse in Abhängigkeit der AK-Konzentration	63

Abbildung 19 – Geschlechter-spezifische relative Daudi-Lyse durch Rituximab im Verlauf der VD ₃ -Substitution.....	66
Abbildung 20 – Geschlechter-spezifische relative Daudi-Lyse durch Obinutuzumab im Verlauf der VD ₃ -Substitution.....	69
Abbildung 21 – Geschlechter-spezifische relative ZR-75-1-Lyse durch Trastuzumab im Verlauf der VD ₃ -Substitution.....	72

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Normwerte für 25-Hydroxyvitamin D im Serum	21
Tabelle 2 – Laufende Interventionsstudien an Non-Hodgkin-Lymphomen über die Auswirkung einer Vitamin D-Substitution.....	26
Tabelle 3 – Eingesetzte Chemikalien, Puffer, Medien und Lösungen mit Bezugsquellen	33
Tabelle 4 – Eingesetzte Antikörper und Enzyme mit Bezugsquellen	35
Tabelle 5 – Eingesetzte Tumorzelllinien mit Bezugsquellen.....	35
Tabelle 6 – Eingesetzte Verbrauchsgegenstände	35
Tabelle 7 – Eingesetzte Laborgeräte	36
Tabelle 8 – Anleitung zur Herstellung der Antikörper-Verdünnungsreihe	42
Tabelle 9 – Anleitung zum Vorlegen der Antikörper-Zielzell-Lösungen	43
Tabelle 10 – Anleitung zum Anfertigen der NK-Zell-Ansätze.....	44
Tabelle 11 – Alter, Geschlecht und 25(OH)D-Serumspiegel der eingeschlossenen Probanden.....	48
Tabelle 12 – Mittlere 25(OH)D-Serumspiegel im Verlauf der Substitutionsrunden.....	51
Tabelle 13 – Relative Daudi-Lyse durch Rituximab im Verlauf der VD ₃ -Substitution	56
Tabelle 14 – Relative Daudi-Lyse durch Obinutuzumab im Verlauf der VD ₃ -Substitution	58
Tabelle 15 – Relative ZR-75-1-Lyse durch Trastuzumab im Verlauf der VD ₃ -Substitution	60
Tabelle 16 – Geschlechter-getrennte relative Daudi-Lyse durch Rituximab im Verlauf der VD ₃ -Substitution.....	64
Tabelle 17 – Geschlechter-getrennte relative Daudi-Lyse durch Obinutuzumab im Verlauf der VD ₃ -Substitution.....	67
Tabelle 18 – Geschlechter-getrennte relative ZR-75-1-Lyse durch Trastuzumab im Verlauf der VD ₃ -Substitution.....	70

6.3 Literaturverzeichnis

1. Bittenbring, J.T., et al., *Vitamin D deficiency impairs rituximab-mediated cellular cytotoxicity and outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with but not without rituximab*. J Clin Oncol, 2014. **32**(29): p. 3242-8.
2. Kelly, J.L., et al., *Low Serum Vitamin D Levels Are Associated With Inferior Survival in Follicular Lymphoma: A Prospective Evaluation in SWOG and LYSA Studies*, in J Clin Oncol. 2015. p. 1482-1490.
3. Zeichner SB, K.-S.T., Shah N, Liu Q, Markward NJ, Montero AJ, Glück S, Silva O, Ahn ER, *Improved clinical outcomes associated with vitamin D supplementation during adjuvant chemotherapy in patients with HER2+ nonmetastatic breast cancer.*, in Clin Breast Cancer. 2015. p. e1-e11.
4. Hohaus, S., et al., *Vitamin D deficiency and supplementation in patients with aggressive B-cell lymphomas treated with immunochemotherapy*. Cancer Med, 2018. **7**(1): p. 270-281.
5. Autier, P. and S. Gandini, *Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials*. Arch Intern Med, 2007. **167**(16): p. 1730-7.
6. Bruns, H., et al., *Vitamin D-dependent induction of cathelicidin in human macrophages results in cytotoxicity against high-grade B cell lymphoma*. Sci Transl Med, 2015. **7**(282): p. 282ra47.
7. Robert-Koch-Institut and Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, *Krebs in Deutschland für 2013/2014*. 2017, Robert-Koch-Institut.
8. Vose, J., J. Armitage, and D. Weisenburger, *International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes*. J Clin Oncol, 2008. **26**(25): p. 4124-30.
9. Grillo-Lopez, A.J., et al., *Rituximab: the first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma*. Curr Pharm Biotechnol, 2000. **1**(1): p. 1-9.
10. Murphy, K. and C. Weaver, *Janeway's Immunobiology*. 9 ed. 2018: Garland Science. 314.
11. Katchi, T. and D. Liu, *Diagnosis and treatment of CD20 negative B cell lymphomas*, in Biomark Res. 2017.
12. Davis, T.A., D.K. Czerwinski, and R. Levy, *Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(3): p. 611-5.
13. Morsy, D.E., et al., *Reduced T-dependent humoral immunity in CD20-deficient mice*. J Immunol, 2013. **191**(6): p. 3112-8.
14. Levy, R., D.G. Maloney, and R. Miller, *Targeted Therapy for B-Cell Lymphoma: The Story of Rituximab*, in 50 Years in Hematology. 2008, American Society of Hematology.
15. Cheung, M.C., et al., *Rituximab in lymphoma: a systematic review and consensus practice guideline from Cancer Care Ontario*. Cancer Treat Rev, 2007. **33**(2): p. 161-76.
16. Dührsen, U., M.A. Fridrik, and N. Schmitz *Online-Leitlinie diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (Stand: November 2014)*. 2014.
17. Coiffier, B., et al., *Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte*. Blood, 2010. **116**(12): p. 2040-5.
18. Pfreundschuh, M., et al., *CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group*. Lancet Oncol, 2006. **7**(5): p. 379-91.
19. Buske, C., et al. *Online-Leitlinie folliculäres Lymphom (Stand: Januar 2017)*. 2017.
20. Dreyling, M., et al. *Online-Leitlinie Mantelzell-Lymphom (Stand: Juni 2017)*. 2017.
21. Tobinai, K., et al., *A Review of Obinutuzumab (GA101), a Novel Type II Anti-CD20 Monoclonal Antibody, for the Treatment of Patients with B-Cell Malignancies*, in Adv Ther. 2017. p. 324-56.
22. Goede, V., et al., *Obinutuzumab as frontline treatment of chronic lymphocytic leukemia: updated results of the CLL11 study*, in Leukemia. 2015: England. p. 1602-4.

23. Marcus, R., et al., *Obinutuzumab for the First-Line Treatment of Follicular Lymphoma*. N Engl J Med, 2017. **377**(14): p. 1331-1344.
24. Vitolo, U., et al., *Obinutuzumab or Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma*. J Clin Oncol, 2017. **35**(31): p. 3529-3537.
25. Chao, M.P., *Treatment challenges in the management of relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma - novel and emerging therapies*. Cancer Manag Res, 2013. **5**: p. 251-69.
26. Sehn, L.H., et al., *Obinutuzumab plus bendamustine versus bendamustine monotherapy in patients with rituximab-refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (GADOLIN): a randomised, controlled, open-label, multicentre, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2016. **17**(8): p. 1081-1093.
27. Cohen, S.B., et al., *Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(9): p. 2793-806.
28. Stone, J.H., et al., *Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis*. N Engl J Med, 2010. **363**(3): p. 221-32.
29. Evans, S.S. and A.B. Clemmons, *Obinutuzumab: A Novel Anti-CD20 Monoclonal Antibody for Chronic Lymphocytic Leukemia*. J Adv Pract Oncol, 2015. **6**(4): p. 370-4.
30. Mossner, E., et al., *Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity*. Blood, 2010. **115**(22): p. 4393-402.
31. Lingwood, D. and K. Simons, *Lipid rafts as a membrane-organizing principle*. Science, 2010. **327**(5961): p. 46-50.
32. Boross, P. and J.H.W. Leusen, *Mechanisms of action of CD20 antibodies*. Am J Cancer Res, 2012. **2**(6): p. 676-90.
33. Lim, S.H., et al., *Fc gamma receptor IIb on target B cells promotes rituximab internalization and reduces clinical efficacy*. Blood, 2011. **118**(9): p. 2530-40.
34. Kern, D.J., et al., *GA101 induces NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity more effectively than rituximab when complement is present*. Leuk Lymphoma, 2013. **54**(11): p. 2500-5.
35. de Haij, S., et al., *In vivo cytotoxicity of type I CD20 antibodies critically depends on Fc receptor ITAM signaling*. Cancer Res, 2010. **70**(8): p. 3209-17.
36. Honeychurch, J., et al., *Antibody-induced nonapoptotic cell death in human lymphoma and leukemia cells is mediated through a novel reactive oxygen species-dependent pathway*. Blood, 2012. **119**(15): p. 3523-33.
37. Clynes, R.A., et al., *Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 443-6.
38. Cartron, G., et al., *Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc gamma RIIIa gene*. Blood, 2002. **99**(3): p. 754-8.
39. Weng, W.K. and R. Levy, *Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma*. J Clin Oncol, 2003. **21**(21): p. 3940-7.
40. Abes, R., et al., *Long-lasting antitumor protection by anti-CD20 antibody through cellular immune response*. Blood, 2010. **116**(6): p. 926-34.
41. Jazirehi, A.R., et al., *Rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) inhibits the constitutive nuclear factor- κ B signaling pathway in non-Hodgkin's lymphoma B-cell lines: role in sensitization to chemotherapeutic drug-induced apoptosis*. Cancer Res, 2005. **65**(1): p. 264-76.
42. Alas, S. and B. Bonavida, *Rituximab inactivates signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3) activity in B-non-Hodgkin's lymphoma through inhibition of the*

- interleukin 10 autocrine/paracrine loop and results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization to cytotoxic drugs.* Cancer Res, 2001. **61**(13): p. 5137-44.
43. Krishnamurti, U. and J.F. Silverman, *HER2 in breast cancer: a review and update.* Adv Anat Pathol, 2014. **21**(2): p. 100-7.
 44. Ahmed, S., A. Sami, and J. Xiang, *HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer.* Breast Cancer, 2015. **22**(2): p. 101-16.
 45. Vu, T. and F.X. Claret, *Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer.* Front Oncol, 2012. **2**: p. 62.
 46. Burgess, A.W., et al., *An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors.* Mol Cell, 2003. **12**(3): p. 541-52.
 47. Iqbal, N., *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications.* Mol Biol Int, 2014. **2014**.
 48. Escriva-de-Romani, S., et al., *HER2-positive breast cancer: Current and new therapeutic strategies.* Breast, 2018. **39**: p. 80-88.
 49. Blackwell, K., et al., *The Global Need for a Trastuzumab Biosimilar for Patients With HER2-Positive Breast Cancer.* Clin Breast Cancer, 2018. **18**(2): p. 95-113.
 50. Piccart-Gebhart, M.J., et al., *Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer.* N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1659-72.
 51. Romond, E.H., et al., *Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer.* N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1673-84.
 52. Slamon, D., et al., *Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer.* N Engl J Med, 2011. **365**(14): p. 1273-83.
 53. Boix-Perales, H., et al., *The European Medicines Agency Review of Pertuzumab for the treatment of adult patients with HER2-positive metastatic or locally recurrent unresectable breast cancer: summary of the scientific assessment of the committee for medicinal products for human use.* Oncologist, 2014. **19**(7): p. 766-73.
 54. Baselga, J., et al., *Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer.* N Engl J Med, 2012. **366**(2): p. 109-19.
 55. Dieras, V., et al., *Trastuzumab emtansine versus capecitabine plus lapatinib in patients with previously treated HER2-positive advanced breast cancer (EMILIA): a descriptive analysis of final overall survival results from a randomised, open-label, phase 3 trial.* Lancet Oncol, 2017. **18**(6): p. 732-742.
 56. Perez, E.A., et al., *Trastuzumab Emtansine With or Without Pertuzumab Versus Trastuzumab Plus Taxane for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive, Advanced Breast Cancer: Primary Results From the Phase III MARIANNE Study.* J Clin Oncol, 2017. **35**(2): p. 141-148.
 57. Nagata, Y., et al., *PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients.* Cancer Cell, 2004. **6**(2): p. 117-27.
 58. Cuello, M., et al., *Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2.* Cancer Res, 2001. **61**(12): p. 4892-900.
 59. Klapper, L.N., et al., *Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2.* Cancer Res, 2000. **60**(13): p. 3384-8.
 60. Barok, M., et al., *Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance.* Mol Cancer Ther, 2007. **6**(7): p. 2065-72.
 61. Bianchini, G. and L. Gianni, *The immune system and response to HER2-targeted treatment in breast cancer.* Lancet Oncol, 2014. **15**(2): p. e58-68.
 62. Arnould, L., et al., *Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? Br J Cancer, 2006. 94(2): p. 259-67.*

63. Beano, A., et al., *Correlation between NK function and response to trastuzumab in metastatic breast cancer patients*, in *J Transl Med*. 2008: England. p. 25.
64. Varchetta, S., et al., *Elements related to heterogeneity of antibody-dependent cell cytotoxicity in patients under trastuzumab therapy for primary operable breast cancer overexpressing Her2*. *Cancer Res*, 2007. **67**(24): p. 11991-9.
65. Norton, N., et al., *Association studies of Fcγ receptor polymorphisms with outcome in HER2+ breast cancer patients treated with trastuzumab in NCCTG (Alliance) Trial N9831*. *Cancer Immunol Res*, 2014. **2**(10): p. 962-9.
66. Kono, K., et al., *Trastuzumab (Herceptin) enhances class I-restricted antigen presentation recognized by HER-2/neu-specific T cytotoxic lymphocytes*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(7): p. 2538-44.
67. Mahmoud, S.M., et al., *Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(15): p. 1949-55.
68. Muntasell, A., et al., *Interplay between Natural Killer Cells and Anti-HER2 Antibodies: Perspectives for Breast Cancer Immunotherapy*. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 1544.
69. Park, S., et al., *The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity*. *Cancer Cell*, 2010. **18**(2): p. 160-70.
70. Holick, M.F., *Vitamin D deficiency*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(3): p. 266-81.
71. Jones, G., D.E. Prosser, and M. Kaufmann, *Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D*. *J Lipid Res*, 2014. **55**(1): p. 13-31.
72. Holick, M.F., et al., *Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. **96**(7): p. 1911-30.
73. Kelly, J.L., et al., *Vitamin D and non-Hodgkin lymphoma risk in adults: a review*. *Cancer Invest*, 2009. **27**(9): p. 942-51.
74. Houghton, L.A. and R. Vieth, *The case against ergocalciferol (vitamin D2) as a vitamin supplement*. *Am J Clin Nutr*, 2006. **84**(4): p. 694-7.
75. Armas, L.A., B.W. Hollis, and R.P. Heaney, *Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(11): p. 5387-91.
76. Ross, A.C., et al., *The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. **96**(1): p. 53-8.
77. Spiro, A. and J.L. Buttriss, *Vitamin D: An overview of vitamin D status and intake in Europe*. *Nutr Bull*, 2014. **39**(4): p. 322-350.
78. Rabenberg, M., et al., *Vitamin D status among adults in Germany--results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)*. *BMC Public Health*, 2015. **15**: p. 641.
79. Schilling, S., *Epidemic vitamin D deficiency among patients in an elderly care rehabilitation facility*. *Dtsch Arztebl Int*, 2012. **109**(3): p. 33-8.
80. Hintzpeter, B., et al., *Vitamin D status and health correlates among German adults*. *Eur J Clin Nutr*, 2008. **62**(9): p. 1079-89.
81. Kramer, J., A. Diehl, and H. Lehnert, *[Epidemiological study on the dimension of vitamin D deficiency in North Germany]*. *Dtsch Med Wochenschr*, 2014. **139**(10): p. 470-5.
82. Valtuena, J., et al., *Factors associated with vitamin D deficiency in European adolescents: the HELENA study*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2013. **59**(3): p. 161-71.
83. Bischoff-Ferrari, H.A., et al., *Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes*. *Am J Clin Nutr*, 2006. **84**(1): p. 18-28.
84. Ceglia, L., *Vitamin D and skeletal muscle tissue and function*. *Mol Aspects Med*, 2008. **29**(6): p. 407-14.
85. Garland, C.F., et al., *The role of vitamin D in cancer prevention*. *Am J Public Health*, 2006. **96**(2): p. 252-61.

86. Gandini, S., et al., *Meta-analysis of observational studies of serum 25-hydroxyvitamin D levels and colorectal, breast and prostate cancer and colorectal adenoma*. *Int J Cancer*, 2011. **128**(6): p. 1414-24.
87. Churilla, T.M., et al., *Serum vitamin D levels among patients in a clinical oncology practice compared to primary care patients in the same community: a case-control study*. *BMJ Open*, 2011. **1**(2): p. e000397.
88. Lu, D., et al., *Occupational ultraviolet exposure and risk of non-Hodgkin's lymphomas: a meta-analysis*. *Oncotarget*, 2017. **8**(37): p. 62358-62370.
89. Lu, D., J. Chen, and J. Jin, *Vitamin D status and risk of non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis*. *Cancer Causes Control*, 2014. **25**(11): p. 1553-63.
90. Bertrand, K.A., et al., *Sunlight exposure, vitamin D, and risk of non-Hodgkin lymphoma in the Nurses' Health Study*. *Cancer Causes Control*, 2011. **22**(12): p. 1731-41.
91. Chlebowski, R.T., *Vitamin D and breast cancer incidence and outcome*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013. **13**(1): p. 98-106.
92. Purdue, M.P., et al., *Circulating 25-hydroxyvitamin D and risk of non-hodgkin lymphoma: Cohort Consortium Vitamin D Pooling Project of Rarer Cancers*. *Am J Epidemiol*, 2010. **172**(1): p. 58-69.
93. Luczynska, A., et al., *Plasma 25-hydroxyvitamin D concentration and lymphoma risk: results of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. *Am J Clin Nutr*, 2013. **98**(3): p. 827-38.
94. Lim, U., et al., *A prospective investigation of serum 25-hydroxyvitamin D and risk of lymphoid cancers*. *Int J Cancer*, 2009. **124**(4): p. 979-86.
95. Sperati, F., et al., *Vitamin D supplementation and breast cancer prevention: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials*. *PLoS One*, 2013. **8**(7): p. e69269.
96. Chlebowski, R.T., et al., *Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of breast cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2008. **100**(22): p. 1581-91.
97. Ammann, E.M., et al., *Incidence of hematologic malignancy and cause-specific mortality in the Women's Health Initiative randomized controlled trial of calcium and vitamin D supplementation*. *Cancer*, 2017. **123**(21): p. 4168-4177.
98. Kelly, J.L., et al., *Early life sun exposure, vitamin D-related gene variants, and risk of non-Hodgkin lymphoma*. *Cancer Causes Control*, 2012. **23**(7): p. 1017-29.
99. John, E.M., et al., *Vitamin D and breast cancer risk: the NHANES I Epidemiologic follow-up study, 1971-1975 to 1992. National Health and Nutrition Examination Survey*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1999. **8**(5): p. 399-406.
100. Garland, F.C., et al., *Geographic variation in breast cancer mortality in the United States: a hypothesis involving exposure to solar radiation*. *Prev Med*, 1990. **19**(6): p. 614-22.
101. Yin, L., et al., *Meta-analysis: serum vitamin D and breast cancer risk*. *Eur J Cancer*, 2010. **46**(12): p. 2196-205.
102. Kim, Y. and Y. Je, *Vitamin D intake, blood 25(OH)D levels, and breast cancer risk or mortality: a meta-analysis*. *Br J Cancer*, 2014. **110**(11): p. 2772-84.
103. Jacobs, E.T., et al., *Vitamin D and Colorectal, Breast, and Prostate Cancers: A Review of the Epidemiological Evidence*. *J Cancer*, 2016. **7**(3): p. 232-40.
104. Prentice, R.L., et al., *Health risks and benefits from calcium and vitamin D supplementation: Women's Health Initiative clinical trial and cohort study*. *Osteoporos Int*, 2013. **24**(2): p. 567-80.
105. Pludowski, P., et al., *Vitamin D supplementation guidelines*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2018. **175**: p. 125-135.
106. Garland, C.F., et al., *What is the dose-response relationship between vitamin D and cancer risk?* *Nutr Rev*, 2007. **65**(8 Pt 2): p. S91-5.
107. Mohr, S.B., et al., *Serum 25-hydroxyvitamin D and prevention of breast cancer: pooled analysis*. *Anticancer Res*, 2011. **31**(9): p. 2939-48.

108. Iqbal, M.U.N. and T.A. Khan, *Association between Vitamin D receptor (Cdx2, Fok1, Bsm1, Apa1, Bgl1, Taq1, and Poly (A)) gene polymorphism and breast cancer: A systematic review and meta-analysis*. *Tumour Biol*, 2017. **39**(10): p. 1010428317731280.
109. Lu, D., L. Jing, and S. Zhang, *Vitamin D Receptor Polymorphism and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis*. *Medicine (Baltimore)*, 2016. **95**(18): p. e3535.
110. Li, M., et al., *Review: the impacts of circulating 25-hydroxyvitamin D levels on cancer patient outcomes: a systematic review and meta-analysis*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014. **99**(7): p. 2327-36.
111. ClinicalTrials.gov. National Library of Medicine (U.S.). *OPTIMAL>60 / DR. CHOP, Improvement of Therapy of Elderly Patients With CD20+ DLBCL Using Rituximab Optimized and Liposomal (Identifier NCT01478542)*. 2011 01.07.2018]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/show/NCT01478542>.
112. ClinicalTrials.gov. National Library of Medicine (U.S.). *A Study to Evaluate the Effect of Vitamin D on PFS in Indolent Non-Hodgkin's Lymphoma (ILyAD) (Identifier NCT03078855)*. 2017 01.07.2018]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/show/NCT03078855>.
113. ClinicalTrials.gov. National Library of Medicine (U.S.). *Cholecalciferol in Treating Patients With Newly Diagnosed Non-Hodgkin Lymphoma or Chronic Lymphocytic Leukemia With Vitamin D Deficiency (Identifier NCT02553447)*. 2015 01.07.2018]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/show/NCT02553447>.
114. ClinicalTrials.gov. National Library of Medicine (U.S.). *Cholecalciferol in Improving Survival in Patients With Newly Diagnosed Cancer With Vitamin D Insufficiency (Identifier NCT01787409)*. 2013 01.07.2018]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01787409>.
115. ClinicalTrials.gov. National Library of Medicine (U.S.). *Curcumin and Cholecalciferol in Treating Patients With Previously Untreated Stage 0-II Chronic Lymphocytic Leukemia or Small Lymphocytic Lymphoma (Identifier NCT02100423)*. 2014 01.07.2018]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/show/NCT02100423>.
116. Maalmi, H., et al., *Serum 25-hydroxyvitamin D levels and survival in colorectal and breast cancer patients: systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies*. *Eur J Cancer*, 2014. **50**(8): p. 1510-21.
117. Townsend, K., et al., *Biological actions of extra-renal 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase and implications for chemoprevention and treatment*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005. **97**(1-2): p. 103-9.
118. Moran-Auth, Y., et al., *Vitamin D status and gene transcription in immune cells*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2013. **136**: p. 83-5.
119. Hewison, M., *Vitamin D and immune function: autocrine, paracrine or endocrine?* *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 2012. **243**: p. 92-102.
120. Schwalfenberg, G.K., *A review of the critical role of vitamin D in the functioning of the immune system and the clinical implications of vitamin D deficiency*. *Mol Nutr Food Res*, 2011. **55**(1): p. 96-108.
121. Xu, H., et al., *1,25-Dihydroxyvitamin D3 exerts opposing effects to IL-4 on MHC class-II antigen expression, accessory activity, and phagocytosis of human monocytes*. *Scand J Immunol*, 1993. **38**(6): p. 535-40.
122. Buchau, A.S., et al., *The host defense peptide cathelicidin is required for NK cell-mediated suppression of tumor growth*. *J Immunol*, 2010. **184**(1): p. 369-78.
123. Schaubert, J., et al., *Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(3): p. 803-11.
124. Hansdottir, S., et al., *Respiratory epithelial cells convert inactive vitamin D to its active form: potential effects on host defense*. *J Immunol*, 2008. **181**(10): p. 7090-9.
125. Hertting, O., et al., *Vitamin D induction of the human antimicrobial Peptide cathelicidin in the urinary bladder*. *PLoS One*, 2010. **5**(12): p. e15580.

126. D'Aldebert, E., et al., *Bile salts control the antimicrobial peptide cathelicidin through nuclear receptors in the human biliary epithelium*. *Gastroenterology*, 2009. **136**(4): p. 1435-43.
127. Dankers, W., et al., *Vitamin D in Autoimmunity: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential*. *Front Immunol*, 2016. **7**: p. 697.
128. Kulling, P.M., et al., *Vitamin D in hematological disorders and malignancies*. *Eur J Haematol*, 2017. **98**(3): p. 187-197.
129. Lee, K.N., et al., *VDUP1 is required for the development of natural killer cells*. *Immunity*, 2005. **22**(2): p. 195-208.
130. Al-Jaderi, Z. and A.A. Maghazachi, *Effects of vitamin D3, calcipotriol and FTY720 on the expression of surface molecules and cytolytic activities of human natural killer cells and dendritic cells*. *Toxins (Basel)*, 2013. **5**(11): p. 1932-47.
131. Balogh, G., et al., *Effect of 1,25(OH)(2)-vitamin D(3) on the activation of natural killer cells: role of protein kinase C and extracellular calcium*. *Exp Mol Pathol*, 1999. **67**(2): p. 63-74.
132. Yu, J., et al., *Hierarchy of the human natural killer cell response is determined by class and quantity of inhibitory receptors for self-HLA-B and HLA-C ligands*. *J Immunol*, 2007. **179**(9): p. 5977-89.
133. Weeres, M.A., et al., *The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on in vitro human NK cell development from hematopoietic stem cells*. *J Immunol*, 2014. **193**(7): p. 3456-62.
134. Merino, F., et al., *Regulation of natural killer cytotoxicity by 1,25-dihydroxyvitamin D3*. *Cell Immunol*, 1989. **118**(2): p. 328-36.
135. Ota, K., et al., *1,25-Dihydroxy-vitamin D3 regulates NK-cell cytotoxicity, cytokine secretion, and degranulation in women with recurrent pregnancy losses*. *Eur J Immunol*, 2015. **45**(11): p. 3188-99.
136. Mahon, B.D., et al., *The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells*. *J Cell Biochem*, 2003. **89**(5): p. 922-32.
137. Ravid, A., et al., *1,25(OH)2D3 increases cytotoxicity and exocytosis in lymphokine-activated killer cells*. *Mol Cell Endocrinol*, 1993. **96**(1-2): p. 133-9.
138. Quesada, J.M., et al., *The effect of calcitriol on natural killer cell activity in hemodialyzed patients*. *J Steroid Biochem*, 1989. **34**(1-6): p. 423-5.
139. Kitajima, I., et al., *Immune dysfunction in hypophosphatemic vitamin D-resistant rickets: immunoregulatory reaction of 1 alpha(OH) vitamin D3*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1989. **53**(1): p. 24-31.
140. Bock, G., et al., *The effect of vitamin D supplementation on peripheral regulatory T cells and beta cell function in healthy humans: a randomized controlled trial*. *Diabetes Metab Res Rev*, 2011. **27**(8): p. 942-5.
141. Korf, H., et al., *1,25-Dihydroxyvitamin D3 curtails the inflammatory and T cell stimulatory capacity of macrophages through an IL-10-dependent mechanism*. *Immunobiology*, 2012. **217**(12): p. 1292-300.
142. Chen, J., D. Bruce, and M.T. Cantorna, *Vitamin D receptor expression controls proliferation of naive CD8+ T cells and development of CD8 mediated gastrointestinal inflammation*. *BMC Immunol*, 2014. **15**: p. 6.
143. Müller, K. and K. Bendtzen, *Inhibition of human T lymphocyte proliferation and cytokine production by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Differential effects on CD45RA+ and CD45RO+ cells*. *Autoimmunity*, 1992. **14**(1): p. 37-43.
144. Thien, R., et al., *Interactions of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 with IL-12 and IL-4 on cytokine expression of human T lymphocytes*. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. **116**(3): p. 683-9.
145. Palmer, M.T., et al., *Lineage-specific effects of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) on the development of effector CD4 T cells*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(2): p. 997-1004.
146. Boonstra, A., et al., *1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells*. *J Immunol*, 2001. **167**(9): p. 4974-80.

147. Cantorna, M.T., et al., *Vitamin D and 1,25(OH)2D regulation of T cells*. *Nutrients*, 2015. **7**(4): p. 3011-21.
148. Yu, W., et al., *Decreased expression of vitamin D receptor may contribute to the hyperimmune status of patients with acquired aplastic anemia*. *Eur J Haematol*, 2016. **96**(5): p. 507-16.
149. Abou-Raya, A., S. Abou-Raya, and M. Helmii, *The effect of vitamin D supplementation on inflammatory and hemostatic markers and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus: a randomized placebo-controlled trial*. *J Rheumatol*, 2013. **40**(3): p. 265-72.
150. Drozdenko, G., et al., *Impaired T cell activation and cytokine production by calcitriol-primed human B cells*. *Clin Exp Immunol*, 2014. **178**(2): p. 364-72.
151. Gambhir, V., et al., *Influence of 1,25-dihydroxy vitamin D3 on TLR4-induced activation of antigen presenting cells is dependent on the order of receptor engagement*. *Immunobiology*, 2011. **216**(9): p. 988-96.
152. Penna, G. and L. Adorini, *1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation*. *J Immunol*, 2000. **164**(5): p. 2405-11.
153. Zella, J.B., L.C. McCary, and H.F. DeLuca, *Oral administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 completely protects NOD mice from insulin-dependent diabetes mellitus*. *Arch Biochem Biophys*, 2003. **417**(1): p. 77-80.
154. Cantorna, M.T., et al., *1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease*. *J Nutr*, 2000. **130**(11): p. 2648-52.
155. Waddell, A., J. Zhao, and M.T. Cantorna, *NKT cells can help mediate the protective effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in experimental autoimmune encephalomyelitis in mice*. *Int Immunol*, 2015. **27**(5): p. 237-44.
156. Bikle, D.D., et al., *25 Hydroxyvitamin D 1 alpha-hydroxylase is required for optimal epidermal differentiation and permeability barrier homeostasis*. *J Invest Dermatol*, 2004. **122**(4): p. 984-92.
157. Assa, A., et al., *Vitamin D deficiency promotes epithelial barrier dysfunction and intestinal inflammation*. *J Infect Dis*, 2014. **210**(8): p. 1296-305.
158. Takahashi, S., et al., *Active form of vitamin D directly protects the blood-brain barrier in multiple sclerosis*. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*, 2017. **8**: p. 244-254.
159. Consolini, R., et al., *Effects of vitamin D on the growth of normal and malignant B-cell progenitors*. *Clin Exp Immunol*, 2001. **126**(2): p. 214-9.
160. Pepper, C., et al., *The vitamin D3 analog EB1089 induces apoptosis via a p53-independent mechanism involving p38 MAP kinase activation and suppression of ERK activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in vitro*. *Blood*, 2003. **101**(7): p. 2454-60.
161. Hickish, T., et al., *The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on lymphoma cell lines and expression of vitamin D receptor in lymphoma*. *Br J Cancer*, 1993. **68**(4): p. 668-72.
162. Kozielowicz, P., et al., *Novel vitamin D analogues; cytotoxic and anti-proliferative activity against a diffuse large B-cell lymphoma cell line and B-cells from healthy donors*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2016. **164**: p. 98-105.
163. Lu, G., et al., *1,25(OH)2D3 deficiency increases TM40D tumor growth in bone and accelerates tumor-induced bone destruction in a breast cancer bone metastasis model*. *Biomed Pharmacother*, 2017. **95**: p. 1033-1039.
164. Koshizuka, K., et al., *Combined effect of vitamin D3 analogs and paclitaxel on the growth of MCF-7 breast cancer cells in vivo*. *Breast Cancer Res Treat*, 1999. **53**(2): p. 113-20.
165. Gascoyne, D.M., et al., *Vitamin D Receptor Expression in Plasmablastic Lymphoma and Myeloma Cells Confers Susceptibility to Vitamin D*. *Endocrinology*, 2017. **158**(3): p. 503-515.
166. El Abdaimi, K., et al., *The vitamin D analogue EB 1089 prevents skeletal metastasis and prolongs survival time in nude mice transplanted with human breast cancer cells*. *Cancer Res*, 2000. **60**(16): p. 4412-8.

167. Min, D., et al., *Downregulation of miR-302c and miR-520c by 1,25(OH)2D3 treatment enhances the susceptibility of tumour cells to natural killer cell-mediated cytotoxicity*. Br J Cancer, 2013. **109**(3): p. 723-30.
168. Muindi, J.R., et al., *CYP24A1 inhibition enhances the antitumor activity of calcitriol*. Endocrinology, 2010. **151**(9): p. 4301-12.
169. Lopes, N., et al., *Alterations in Vitamin D signalling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 483.
170. Dimitrov, V., et al., *Hormonal vitamin D up-regulates tissue-specific PD-L1 and PD-L2 surface glycoprotein expression in humans but not mice*. J Biol Chem, 2017. **292**(50): p. 20657-20668.
171. Alsaab, H.O., et al., *PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome*. Front Pharmacol, 2017. **8**: p. 561.
172. van Groningen, L., et al., *Cholecalciferol loading dose guideline for vitamin D-deficient adults*. Eur J Endocrinol, 2010. **162**(4): p. 805-11.
173. Singh, G. and A.J. Bonham, *A predictive equation to guide vitamin D replacement dose in patients*. J Am Board Fam Med, 2014. **27**(4): p. 495-509.
174. Arora, M., *Cell Culture Media: A Review*. Materials and Methods, 2013.
175. Klein, E., et al., *Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines*. Cancer Res, 1968. **28**(7): p. 1300-10.
176. Nadkarni, J.S., et al., *Characteristics of new cell lines derived from Burkitt lymphomas*. Cancer, 1969. **23**(1): p. 64-79.
177. Rothenfusser, S., et al., *Missing HLA class I expression on Daudi cells unveils cytotoxic and proliferative responses of human gammadelta T lymphocytes*. Cell Immunol, 2002. **215**(1): p. 32-44.
178. Li, X.C. and M. Raghavan, *Structure and function of major histocompatibility complex class I antigens*. Curr Opin Organ Transplant, 2010. **15**(4): p. 499-504.
179. Engel, L.W., et al., *Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas*. Cancer Res, 1978. **38**(10): p. 3352-64.
180. Subik, K., et al., *The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines*, in *Breast Cancer (Auckl)*. 2010. p. 35-41.
181. Strober, W., *Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability*. Current Protocols in Immunology, 2001.
182. Kleiveland, C.R., *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, in *The Impact of Food Bioactives on Health*. 2015, Springer, Cham. p. 161-167.
183. Luttmann, W., *Der Experimentator: Immunologie*. 2014: Springer-Verlag. 299.
184. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 633-40.
185. Nagler, A., et al., *Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells*. J Immunol, 1989. **143**(10): p. 3183-91.
186. Poli, A., et al., *CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset*. Immunology, 2009. **126**(4): p. 458-65.
187. Helenius, A. and K. Simons, *Solubilization of membranes by detergents*. Biochim Biophys Acta, 1975. **415**(1): p. 29-79.
188. Mohan, C., *A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry*. 2001.
189. Heinrich, P., M. Müller, and L. Graeve, *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9 ed. 2014: Springer-Verlag.
190. Chan, F.K.M., K. Moriwaki, and M.J. De Rosa, *Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity*. Methods Mol Biol, 2013. **979**: p. 65-70.

191. Pende, D., et al., *Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin.* Eur J Immunol, 2001. **31**(4): p. 1076-86.
192. Haen, S.P., et al., *Prognostic relevance of HER2/neu in acute lymphoblastic leukemia and induction of NK cell reactivity against primary ALL blasts by trastuzumab.* Oncotarget, 2016. **7**(11): p. 13013-30.
193. Luo, C., et al., *Glycoengineering of pertuzumab and its impact on the pharmacokinetic/pharmacodynamic properties.* Sci Rep, 2017. **7**: p. 46347.
194. Jabrane-Ferrat, N., et al., *Effect of gamma interferon on HLA class-I and -II transcription and protein expression in human breast adenocarcinoma cell lines.* Int J Cancer, 1990. **45**(6): p. 1169-76.
195. Terszowski, G., C. Klein, and M. Stern, *KIR/HLA interactions negatively affect rituximab- but not GA101 (obinutuzumab)-induced antibody-dependent cellular cytotoxicity.* J Immunol, 2014. **192**(12): p. 5618-24.
196. Korzeniewski, C. and D.M. Callewaert, *An enzyme-release assay for natural cytotoxicity.* J Immunol Methods, 1983. **64**(3): p. 313-20.
197. Reed, J.C., *Mechanisms of Apoptosis*, in *Am J Pathol.* 2000. p. 1415-30.
198. Smyth, M.J., et al., *Activation of NK cell cytotoxicity.* Mol Immunol, 2005. **42**(4): p. 501-10.
199. Gardiner, C.M. and D.J. Reen, *Differential cytokine regulation of natural killer cell-mediated necrotic and apoptotic cytotoxicity.* Immunology, 1998. **93**(4): p. 511-7.
200. Silva, M.T., *Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program.* FEBS Lett, 2010. **584**(22): p. 4491-9.
201. Larsen, S.K., Y. Gao, and P.H. Basse, *NK cells in the tumor microenvironment.* Crit Rev Oncog, 2014. **19**(1-2): p. 91-105.
202. Olmos-Ortiz, A., et al., *Evidence of sexual dimorphism in placental vitamin D metabolism: Testosterone inhibits calcitriol-dependent cathelicidin expression.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2016. **163**: p. 173-82.
203. Delanghe, J.R., R. Speeckaert, and M.M. Speeckaert, *Behind the scenes of vitamin D binding protein: more than vitamin D binding.* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2015. **29**(5): p. 773-86.
204. Nykjaer, A., et al., *An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3.* Cell, 1999. **96**(4): p. 507-15.
205. Pirani, T., J. Chen, and A. Vieira, *Effects of estradiol on the endocytic transport of vitamin D carrier protein in hepatocytes.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(6): p. 3421-6.
206. Kongsbak, M., et al., *Vitamin D-binding protein controls T cell responses to vitamin D.* BMC Immunol, 2014. **15**: p. 35.
207. Esteban, C., et al., *Receptor-mediated uptake and processing of vitamin D-binding protein in human B-lymphoid cells.* J Biol Chem, 1992. **267**(14): p. 10177-83.
208. Saki, F., et al., *Investigating the effect of testosterone by itself and in combination with letrozole on 1,25-dihydroxy vitamin D and FGF23 in male rats.* J Endocrinol Invest, 2018.
209. Bolland, M.J., et al., *Age-, gender-, and weight-related effects on levels of 25-hydroxyvitamin D are not mediated by vitamin D binding protein.* Clin Endocrinol (Oxf), 2007. **67**(2): p. 259-64.
210. Sulke, A.N., D.B. Jones, and P.J. Wood, *Hormonal modulation of human natural killer cell activity in vitro.* J Reprod Immunol, 1985. **7**(2): p. 105-10.
211. Albrecht, A.E., et al., *Effect of estrogen replacement therapy on natural killer cell activity in postmenopausal women.* Maturitas, 1996. **25**(3): p. 217-22.
212. Correale, J., M.C. Ysraelit, and M.I. Gaitan, *Gender differences in 1,25 dihydroxyvitamin D3 immunomodulatory effects in multiple sclerosis patients and healthy subjects.* J Immunol, 2010. **185**(8): p. 4948-58.
213. Hou, J. and W.F. Zheng, *Effect of sex hormones on NK and ADCC activity of mice.* Int J Immunopharmacol, 1988. **10**(1): p. 15-22.

214. Vieth, R. and S. Milojevic, *Moderate vitamin D3 supplementation lowers serum 1,25-dihydroxy-vitamin D3 in rats*. Nutrition Research, 1995. **15**(5): p. 725-731.
215. Tuohimaa, P., et al., *Both high and low levels of blood vitamin D are associated with a higher prostate cancer risk: a longitudinal, nested case-control study in the Nordic countries*. Int J Cancer, 2004. **108**(1): p. 104-8.
216. Vieth, R., *Enzyme kinetics hypothesis to explain the U-shaped risk curve for prostate cancer vs. 25-hydroxyvitamin D in nordic countries*. Int J Cancer, 2004. **111**(3): p. 468; author reply 469.
217. Stolzenberg-Solomon, R.Z., et al., *Circulating 25-hydroxyvitamin D and risk of pancreatic cancer: Cohort Consortium Vitamin D Pooling Project of Rarer Cancers*. Am J Epidemiol, 2010. **172**(1): p. 81-93.
218. Chen, W., et al., *Prospective study of serum 25(OH)-vitamin D concentration and risk of oesophageal and gastric cancers*. Br J Cancer, 2007. **97**(1): p. 123-8.
219. Melamed, M.L., et al., *25-hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population*. Arch Intern Med, 2008. **168**(15): p. 1629-37.
220. Grant, W.B., *Critique of the U-shaped serum 25-hydroxyvitamin D level-disease response relation*. Dermatoendocrinol, 2009. **1**(6): p. 289-93.
221. Yin, L., et al., *Meta-analysis of longitudinal studies: Serum vitamin D and prostate cancer risk*. Cancer Epidemiol, 2009. **33**(6): p. 435-45.
222. Baggerly, L.L. and C.F. Garland, *Vitamin D and pancreatic cancer risk - no U-shaped curve*. Anticancer Res, 2012. **32**(3): p. 981-4.

7 Danksagung

Wie jede wissenschaftliche Arbeit ist auch die Vorliegende ganz und gar nicht das alleinige Werk einer einzelnen Person. Ich möchte mich herzlich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Michael Pfreundschuh, bedanken, der leider bereits vor der Fertigstellung dieser Arbeit von uns gehen musste. Vielen Dank für Ihr Vertrauen, Ihre stetige Hilfe und Ihre Anregungen und dafür, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben haben, diese Arbeit überhaupt durchzuführen.

Ich bedanke mich bei meinem Betreuer und nachfolgendem Doktorvater, Priv.-Doz. Dr. Frank Neumann. Vielen Dank für die tolle Einführung, die Geduld und die zahlreichen kritischen Diskussionen und Hilfestellungen. Ich denke, nur wenige Betreuer investieren derart viel Zeit und Mühe in ihre Doktoranden. Ich kann mich glücklich schätzen, so eine großartige Betreuung erhalten zu haben. Ein großes Dankeschön gilt auch Claudia Schormann, die einen wesentlichen Anteil zu dieser Arbeit beigetragen hat und ohne die dieses Projekt kaum möglich gewesen wäre. Danke auch an Dr. Jörg Bittenbring, der stets neue Denkanstöße zur Thematik eingebracht hat und immer für eine kritische Auseinandersetzung mit der Thematik zur Seite stand. Dankeschön an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des *José-Carreras-Instituts* Homburg.

Ebenso möchte ich mich bei all unseren Probandinnen und Probanden bedanken. Dafür, dass sie uns ohne unmittelbaren, persönlichen Nutzen ihr Vertrauen geschenkt und wirklich großartig mit uns zusammengearbeitet haben.

Nicht zuletzt bedanke ich mich herzlich bei meinen Eltern, die mich sowohl im Studium als auch bei der Dissertation tatkräftig unterstützt haben und stets an meiner Seite waren.

Schließlich möchte ich mich bei der *Eva Mayr-Stihl Stiftung* und dem *Förderverein Krebsforschung Saar-Pfalz-Mosel* für ihre Unterstützung bedanken.