

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

# **Einfluss von Vitamin D und Testosteron auf die antikörper- abhängige zelluläre Zytotoxizität**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

der medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2023

vorgelegt von

Undine Margarete Mieth

geb. 10.11.1994 in Heidelberg

Tag der Promotion:

22.04.2024

Dekan:

Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter:

PD Dr. rer. nat. Frank Neumann

Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Vogt

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

Die Probandenrekrutierung erfolgte durch die Klinik für Urologie (UKS) in den Räumlichkeiten der urologischen Ambulanz.

Vitamin D-Serumspiegel-Bestimmungen erfolgten im Zentrallabor des Universitätsklinikums.

Das Vorhaben zur Durchführung der Studie wurde zuvor bei der klinikinternen Ethikkommission per Antrag eingereicht und erhielt ein positives Votum.

Die entsprechende Nr. der Zustimmung der Ethikkommission ist 205/18.

# **Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis .....	1
Abkürzungsverzeichnis .....	5
1 Zusammenfassung .....	10
1.1 Abstract.....	11
2 Einleitung .....	12
2.1 Antikörper in der Therapie lymphatischer Neoplasien.....	12
2.1.1 Monoklonale Anti-CD20-Antikörper .....	12
2.1.1.1 Rituximab.....	12
2.1.1.2 Obinutuzumab .....	13
2.1.2 Fc-Rezeptoren .....	13
2.1.3 Einfluss von Vitamin D und Geschlecht in der Immunochemotherapie .....	14
2.2 Natürliche Killerzellen .....	15
2.2.1 Reifung von Natürlichen Killer-Zellen .....	15
2.2.1.1 CD56 <sup>bright</sup> /CD16 <sup>-</sup> NK-Zellen .....	16
2.2.1.2 CD56 <sup>dim</sup> /CD16 <sup>+</sup> Natürliche Killer-Zellen.....	16
2.2.2 Erkennen von virusinfizierten oder neoplastischen Zellen .....	17
2.2.3 Interaktion mit anderen Immunzellen .....	19
2.2.4 Veränderungen im Zusammenhang mit Alter und Geschlecht .....	20
2.3 Vitamin D .....	22
2.3.1 Vitamin D-Stoffwechsel .....	22
2.3.2 Vitamin D-Rezeptor .....	23
2.3.3 Vitamin D-Referenzbereich.....	24
2.3.4 Wirkungen auf das Immunsystem .....	25
2.3.4.1 Wirkung auf Natürliche Killer-Zellen.....	26
2.4 Sexualhormone.....	27
2.4.1 Sexualhormoneller Regelkreis und Sexualhormone .....	27
2.4.1.1 Weibliche Sexualhormone.....	29
2.4.1.2 Männliche Sexualhormone.....	30
2.4.2 Transportproteine .....	31
2.4.3 Hormonrezeptoren.....	31
2.4.4 Wirkungen auf das Immunsystem .....	32

2.4.4.1 Modulation des Zytokinmilieus .....	33
2.4.5 Wirkungen auf Natürliche Killer-Zellen .....	34
2.4.5.1 Studien mit Hormonstatusveränderungen in vivo .....	34
2.4.5.2 In vitro-Hormonstudien.....	35
2.5 Prostatakarzinom .....	36
2.5.1 Androgendeprivationstherapie.....	36
2.5.2 Vitamin D-Substitution.....	37
2.6 Zielsetzung der Arbeit .....	38
<b>3 Methoden, Material, Probanden .....</b>	<b>40</b>
3.1 Probanden.....	40
3.2 Material und Geräte.....	42
3.2.1 Vitamin D-Präparat.....	42
3.2.2 Chemikalien, Puffer, Medien und Lösungen.....	42
3.2.3 Antikörper und Enzyme .....	44
3.2.4 Tumorzelllinien .....	44
3.2.5 Verbrauchsgegenstände .....	45
3.2.6 Geräte .....	46
3.2.7 Computersoftware .....	47
3.3 Methoden.....	47
3.3.1 Vitamin D-Supplementation und -Messung .....	47
3.3.2 Targetzellen .....	48
3.3.3 Isolierung von Natürlichen Killer-Zellen .....	49
3.3.3.1 Dichtezentrifugation.....	49
3.3.3.2 Magnetische Separation der NK-Zellen.....	49
3.3.3.3 Fluoreszenzaktivierte durchflusszytometrische Analyse auf Reinheit .....	50
3.3.4 Zytotox-Assay .....	51
3.3.4.1 Vorbereitung der Targetzellen .....	51
3.3.4.2 Vorbereitung der Natürlichen Killer-Zellen .....	53
3.3.4.3 Belegung der Inkubationsplatte zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität .....	54
3.3.4.4 LDH-Nachweisreaktion .....	55
3.3.4.5 Berechnung der relativen Lyserate aus den Daten des LDH-Assays .....	56
3.3.5 Anlegen von RNA-Proben .....	56
3.3.5.1 Inkubation von NK-Zellen mit Targetzellen .....	56
3.3.5.2 Isolation und Reinheitsanalyse der aktivierten NK-Zellen .....	57
3.3.5.3 NK-Zell-Lyse .....	57
3.3.6 Statistische Auswertung .....	58

---

4 Ergebnisse.....	59
4.1 Probandendaten .....	59
4.2 Vitamin D <sub>3</sub> -Supplementation.....	60
4.3 Antikörper-unabhängige zelluläre Zytotoxizität.....	61
4.4 Rituximab-abhängige zelluläre Zytotoxizität .....	63
4.4.1 RDCC bei einer E/T-Ratio von 2,5:1 .....	63
4.4.2 RDCC bei einer E/T-Ratio von 5:1 .....	65
4.5 Obinutuzumab-abhängige zelluläre Zytotoxizität .....	67
4.5.1 ODCC bei einer E/T-Ratio von 2,5:1 .....	67
4.5.2 ODCC bei einer E/T-Ratio von 5:1 .....	69
4.6 Vergleich von RDCC und ODCC.....	71
4.6.1 Vergleich der relativen Lysen vor Supplementation.....	71
4.6.2 Vergleich der relativen Lysen nach Supplementation.....	74
5 Diskussion .....	75
5.1 Diskussion der Methodik.....	75
5.1.1 Einfluss der verwendeten Zelllinien.....	75
5.1.2 Vitamin D-Supplementation.....	76
5.1.3 Probandenrekrutierung .....	77
5.1.4 GnRH-Analoga.....	78
5.2 Einordnung der Ergebnisse.....	80
5.2.1 Einfluss von Vitamin D auf Antikörpertherapien und Zelluläre Zytotoxizität.....	80
5.2.2 Einfluss von Geschlecht und Sexualhormonen auf Antikörpertherapien und zelluläre Zytotoxizität.....	81
5.2.3 Interaktion von Vitamin D und Geschlecht im Rahmen von Antikörpertherapien und zellulärer Zytotoxizität.....	84
5.2.4 Einfluss der Interaktion von Vitamin D und Sexualhormonen auf die zelluläre Zytotoxizität .....	85
5.2.5 Mögliche Modelle zur Interaktion zwischen Vitamin D und Testosteron .....	86
5.2.6 Vergleich von Rituximab mit Obinutuzumab.....	87
5.3 Ausblick.....	88
6 Anhang.....	90
6.1 Abbildungsverzeichnis .....	90
6.2 Tabellenverzeichnis .....	91
6.3 Literaturverzeichnis.....	92

7. Dank.....	101
8. Curriculum vitae.....	102

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon = Adrenocorticotropin
ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity = Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
AICC	antibody independent cellular cytotoxicity = (natürliche) Antikörper-unabhängige NK-Zell Zytotoxizität
AK	Antikörper
APC	antigen presenting cell = Antigenpräsentierende Zelle
AR iAR mAR	Androgenrezeptor intrazellulärer AR membranständiger AR
Bca	Bootstrap bias corrected and accelerated – Methode der Bootstrap-Stichprobenziehung zu Berechnung eines 95% CI des Medians
C5a	Komplementkomponente C5a
CAMP	Cathelicidin antimikrobielles Peptid
cAMP	cyclic adenosin monophosphat = zyklisches Adenosinmonophosphat
CD  CD56 <sup>dim</sup> CD56 <sup>bright</sup>	Cluster of Differentiation – Gruppen immunphänotypischer Zelloberflächenmerkmale  schwache CD56 Expression starke CD56 Expression
CDC	complement dependent cytotoxicity = Komplement-vermittelte Zytotoxizität
CI	confidence interval = Konfidenzintervall
CRP	C-reaktives Protein
CYP CYP24A1 CYP27B1	Cytochrome P450 – Enzyme 24-Hydroxylase, deaktiviert das Substrat Calcitriol 1 $\alpha$ -Hydroxylase, aktiviert das Substrat Calcidiol zu Calcitriol
DBP	Vitamin D-bindendes Protein
DC	dendritic cell = Dendritische Zelle
DEFB4	Offizieller HGNC Name für ein $\beta$ -Defensin kodierendes Gen



DHT	Dihydrotestosteron
DLBCL	diffuse large B-cell lymphoma = Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DNA	deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
ER iER mER	Estradiolrezeptor mit den Unterformen ER $\alpha$ und ER $\beta$ intrazellulärer ER membranständiger ER
E/T-Ratio	Effektor-Target-Zellverhältnis
E/T-AK-Ansatz	Ansatz mit einem bestimmten E/T-Zellverhältnis und einer bestimmten AK-Konzentration
FACS	fluorescence-activated cell sorting - Durchflusszytometrie
Fas FasL	Auch FasR oder Fas Rezeptor, gehört zur Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie Fas Ligand, Teil der Tumornekrosefaktor-Familie
Fc	Basale Domäne eines Immunglobulin, welches Bindungsstellen zur Erkennung anderer Proteine, wie Rezeptoren, Komplementfaktoren u.a., enthält
FCR	Fc-Rezeptor
Fc $\gamma$ R Fc $\gamma$ RIIIA	Fc-Rezeptor für IgG Typ IIIA, wird exprimiert auf NK-Zellen, Makrophagen u. a.. Entspricht CD16.
FGF-23	Fibroblast Growth Factor 23 = Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23
FSC	Forward Scatter = Vorwärtsstreulicht in der Durchflusszytometrie
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GA101	Kürzel für Obinutuzumab während der Entwicklungsphase
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Kolonien-stimulierender Faktor
GnRH	Gonadotropin Releasinghormon = Gonadoliberin
GR	Glukokortikoidrezeptor
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HRE	hormone responsive element = Hormon-responsive Elemente: hormonempfindlicher Bereich im Promotorbereich auf der DNA, welcher als Bindungsstelle für entsprechende Hormonrezeptoren dient.
I.E.	Internationale Einheiten

IFN	Interferon
Typ I Interferone	IFN- $\alpha$ und IFN- $\beta$
Typ II Interferon	IFN- $\gamma$
IgG	Immunglobulin Typ G
IL	Interleukin
ILC	innate lymphoid cell = angeborene lymphoide Zelle
iNOS	inducible nitric oxide Synthase
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activating motif = Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif = Immunrezeptor Tyrosin-basiertes Inhibitionsmotiv
LDH	Laktatdehydrogenase
LH	Luteinisierendes Hormon
LHRH	Luteininsierendes Hormon Releasinghormon = GnRH
MACS	magnetic activated cell sorting = magnetische Zellseparation
MARRS	membrane associated, rapid response steroid-binding = Gruppe membra-nassoziierter Rezeptor-Proteine mit schneller Signaltransduktion nach Steroidhormonbindung
1,25D <sub>3</sub> -MARRS	MARRS-Rezeptor für Calcitriol
1,25D <sub>3</sub> -MARRS/Erp57/Grp58	bei Menschen ist der MARRS-Rezeptor für Calcitriol möglicherweise iden-tisch mit den Proteinen „Erp57“ und „Grp58“
MHC	major histocompatibility complex = Haupthistokompatibilitätskomplex
MIP1 $\alpha$	Makrophagen inflammatorisches Protein 1a
mRNA	messenger ribonucleic acid = Boten-Ribonukleinsäure
NF- $\kappa$ B	nuclear factor ‘kappa-light-chain-enhancer’ of activated B-cells, Transkriptionsfaktor
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NKDI	natural killer development intermediate = Zwischenstufe in der NK-Zell-Rei-fung
NKG2D	Kürzel für einen bestimmten aktivierenden Subtyp aus der Gruppe der C-type lectine like-receptors, exprimiert auf NK-Zellen

NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NKT-Zelle	Natürliche Killer T-Zelle
ODCC	Obinutuzumab dependent cellular cytotoxicity = Obinutuzumab-abhängige zelluläre Zytotoxizität
1,25(OH) <sub>2</sub> D	1,25-Hydroxyvitamin D = Calcitriol
25(OH)D	25-Hydroxyvitamin D = Calcidiol
25(OH)D <sub>2</sub>	25-Hydroxyergosterol
25(OH)D <sub>3</sub>	25-Hydroxycholecalciferol
PAMP	pathogen-associated molecular pattern = Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBL	peripheral blood leucocyte = Leukozyten im peripheren Blut
PBMC	peripheral blood mononuclear cell = Mononukleäre Zellen im peripheren Blut
PCa	prostate cancer = Prostatakarzinom
PR	Progesteronrezeptor mit den Unterformen PR-A und PR-B
PTH	Parathormon
RAG	recombination activating gene = Rekombination-aktivierendes Gen
R-CHOP	Therapieschema mit Rituximab, Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin und Prednison
RDCC	Rituximab dependent cellular cytotoxicity = Rituximab-abhängige zelluläre Zytotoxizität
Ref.	Referenzbereich
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid X Rezeptor
SHGB	sexualhormonbindendes Globulin
SSC	sideward scatter = Seitwärtsstreulicht in der Durchflusszytometrie
TGF-β	Transforming Growth Factor β = Transformierender Wachstumsfaktor β
TH-Zellen	T-Helfer-Zellen
TLR	Toll-like-Rezeptor

TNF	Tumornekrosefaktor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand, Teil der TNF-Familie
TRAILR	TRAIL-Rezeptor, Teil der TNF-Rezeptoren-Superfamilie
T-reg	Regulatorische T-Zelle
UKS	Uniklinikum des Saarlandes
Vitamin D <sub>2</sub>	Ergocalciferol – inaktives Vitamin D, welches insbesondere über pflanzliche Nahrung aufgenommen wird
Vitamin D <sub>3</sub>	Cholecalciferol – inaktives Vitamin D, welches vom Körper selbst synthetisiert werden kann
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VDRE	Vitamine D-responsives Element – HRE für Vitamin D
$\tilde{x}$	median
♀	weiblich
♂	männlich

# 1 Zusammenfassung

Anti-CD20-Antikörper werden seit geraumer Zeit erfolgreich in der Tumorthherapie von diversen B-Zell-Neoplasien eingesetzt. Das Outcome dieser Antikörpertherapien zeigte sich bei Non-Hodgkin-Lymphomen sowohl vom 25(OH)D-Spiegel als auch dem Geschlecht der Patienten beeinflusst. Gleichzeitig schienen in einer retrospektiven Analyse der RICOVER-60-Studie durch Bittenbring et al. ältere Frauen unter Rituximabtherapie von einem 25(OH)D-Spiegel über 8ng/ml stärker als gleichaltrige Männer zu profitieren [1].

Wesentliche Effektorzellen von Antikörpertherapien sind u. a. NK-Zellen. Neumann et al. und Acker beobachteten *in vitro*, dass sowohl ADCC als auch AICC von NK-Zellen von einer Vitamin D<sub>3</sub> - *in vivo* - Supplementation auf optimale 25(OH)D-Serumspiegel von ca. 65ng/ml profitierten. In einer geschlechtergetrennten Auswertung fielen die Ergebnisse jedoch nur für Frauen signifikant aus [2, 3].

Die vorliegende Arbeit schließt daran mit Nachforschungen zum Effekt der Testosteron-Vitamin D-Interaktion auf die NK-Zell-ADCC an. Für Androgene wird allgemein ein immunsuppressiver oder anti-inflammatorischer Effekt postuliert. Bei Patienten unter GnRH-Analoga-Therapie sinken die Testosteronspiegel auf vergleichbare Werte wie bei postmenopausalen Frauen ab. Für die Arbeit konnten zehn Probanden mit Prostatakarzinom unter GnRH-Analoga-Therapie aus der Ambulanz der Urologie des UKS akquiriert werden, wovon acht in die Auswertung eingeschlossen werden konnten. Das mediane Alter lag bei 69,5 Jahren.

Bei den Probanden wurde zweimal Blut zur 25(OH)D-Spiegelbestimmung sowie zur NK-Zell-Isolation für die Zytotoxizitätsassays entnommen. Nach der ersten Blutentnahme wurden die Probanden über wenige Tage mit bis zu 200.000 IE Vitamin D<sub>3</sub> pro Tag supplementiert und nach weiteren 5 Tagen zur zweiten Blutentnahme einbestellt. Der 25(OH)D-Spiegel vor Supplementation lag median bei 12,4 ng/ml und nach Supplementation bei 67,45 ng/ml. Die Probanden zeigten einen signifikanten Anstieg (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test  $p < 0,05$ , 95 % CI der Mediane  $> 0$ ) der ADCC gegen DAUDI-Zellen nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation sowohl unter Rituximab (ab einer Konzentration von 0,001 $\mu$ g/ml) als auch unter Obinutuzumab (ab einer Konzentration von 0,0001 $\mu$ g/ml). Die AICC zeigte eine signifikante Änderung nach 95% CI, nicht jedoch nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erhärten somit die Vermutung, dass dem beeinträchtigten Vitamin D-Effekt auf die NK-Zell-ADCC von Männern der Studie von Neumann et al. eine Interaktion der Signalwege von Testosteron und Vitamin D zugrunde liege: Unter Testosterondepletion *in vivo* zeigte sich ein deutlicher Vitamin D-Effekt auf die NK-Zell-ADCC. Für NK-Zellen selbst ist jedoch bisher noch keine Androgenrezeptorexpression nachgewiesen worden. NK-Zellen nehmen aber an einem intensiven „Cross-Talk“ mit anderen Immunzellen, wie z. B. Makrophagen teil. Auf welcher Ebene und auf welche Art und Weise die Effekte von Vitamin D und Testosteron in Bezug auf ihre Auswirkung auf die NK-Zell-Aktivität interagieren, bleibt also weiterhin ein offener Forschungsgegenstand.

## 1.1 Abstract

### **Impact of vitamin D and testosterone on the antibody dependent cellular cytotoxicity**

Anti-CD20 antibodies have been applied successfully in tumor therapy of various B-cell neoplasms for many years. In non-Hodgkin lymphoma, the outcome of these antibody therapies is influenced both by the 25(OH)D-level and the sex of the patient. Furthermore, in a retrospective analysis of the RICOVER-60 study by Bittenbring et al. elderly women on rituximab therapy benefited more than same aged men from a 25(OH)D-level above 8ng/ml [1].

NK cells belong to the main effector cells of antibody therapies. Neumann et al. and Acker observed *in vitro* that both ADCC and AICC of NK cells benefited from vitamin D<sub>3</sub> - *in vivo* - supplementation to optimal serum - 25(OH)D - levels of approximately 65ng/mL. However, in a gender-separated analysis the results were only significant for women [2, 3].

The present study connects to the studies of Neumann et al., investigating the effect of testosterone-interference with vitamin D on the NK cell ADCC. An immunosuppressive or anti-inflammatory effect is generally postulated for androgens. In patients receiving GnRH analogue therapy, testosterone values drop down to levels comparable to those of postmenopausal women. For this study, ten patients with prostate cancer undergoing GnRH analogue therapy were acquired from the UKS urology outpatient clinic. eight patients could be included in the analysis later, their median age was 69.5 years.

Blood was taken twice from the volunteers to determine their 25(OH)D-level and to isolate NK cells for the cytotoxicity assays. After the first blood draw, the subjects were supplemented with up to 200,000 I.U. of vitamin D<sub>3</sub> per day for a few days. Another 5 days later they were seen for a second blood draw. The median 25(OH)D-level before supplementation was 12.4 ng/ml and after supplementation the median level was 67.45 ng/ml. Subjects showed a significant increase in ADCC against DAUDI cells after vitamin D<sub>3</sub> supplementation (Wilcoxon signed rank test  $p < 0.05$ , 95% CI of medians  $> 0$ ) using either rituximab (significant at a concentration of 0.001 µg/ml or higher) or obinutuzumab (significant at a concentration of 0.0001 µg/ml or higher). AICC showed a significant increase evaluated by 95% CI but not by Wilcoxon signed rank test.

The results of this study confirm the previous assumption that the impaired vitamin D effect on the NK-cell-ADCC of men in the study of Neumann et al. may be due to an interaction of the signaling pathways of testosterone and vitamin D: Under testosterone depletion *in vivo*, a significant effect of vitamin D on the NK-cell-ADCC was shown. However, no androgen receptor expression has yet been found in NK cells themselves. NK cells though participate in an intensive “cross-talk” with other immune cells such as macrophages. It remains to further research, in which explicit way the effects of vitamin D and testosterone interact in terms of their impact on NK-cell-activity.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Antikörper in der Therapie lymphatischer Neoplasien**

Seit über 20 Jahren sind monoklonale Anti-CD20-Antikörper ergänzend zur Chemotherapie in der hämatologischen Tumortherapie im Einsatz und haben die vormaligen klinischen Therapieoptionen revolutioniert [4]. Mittlerweile werden sie bei diversen B-Zell-Neoplasien, insbesondere Non-Hodgkin-Lymphomen wie der Chronisch Lymphatischen Leukämie, dem Follikulärem Lymphom, dem Diffus Großzelligem B-Zell-Lymphom (DLBCL), der Haarzelleukämie sowie bei CD20-positiver Akuter Lymphatischer Leukämie eingesetzt [5–8]. Daneben werden Anti-CD20-Antikörper auch bei einigen immunologischen Erkrankungen eingesetzt wie z. B. der Rheumatoiden Arthritis und dem Systemischen Lupus Erythematoses [9].

#### **2.1.1 Monoklonale Anti-CD20-Antikörper**

Therapeutisch eingesetzte Anti-CD20-Antikörper sind Immunglobuline vom Typ G und binden an die CD20-Oberflächenmoleküle, die von B-Zellen und einigen ihrer Vorläuferzellen exprimiert werden [8, 9].

Sie können über verschiedene Wege Effekte herbeiführen: Einerseits können sie direkt in der markierten Zelle Signale zur Wachstumsinhibition und Apoptose auslösen, andererseits können sie über Komplementbindung oder Bindung an Fcγ-Rezeptoren (FcγR) einiger Immunzellen zytotoxische Effekte auslösen (Komplementvermittelte Zytotoxizität = CDC und Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität = ADCC) [6, 10]. ADCC wird insbesondere von NK-Zellen vermittelt aber auch von Neutrophilen und Makrophagen [6, 11]. Neben zytotoxischen Effekten kann die FcγR-Bindung an Makrophagen und Neutrophilen auch Phagozytose auslösen (Antikörper-abhängige zelluläre Phagozytose) [11].

Die klinisch eingesetzten Anti-CD20-Antikörper lassen sich in zwei funktionelle Gruppen einteilen: Gruppe I, z. B. Rituximab, deren Vertreter eine CDC auslösen und mittelstark direkte Apoptose sowie ADCC induzieren, und Gruppe II, z. B. Obinutuzumab, welche kaum CDC auslösen und starke Wirkung v. a. über direkte Apoptoseinduktion und ADCC entfalten [7].

##### **2.1.1.1 Rituximab**

Rituximab (Handelsname in Deutschland MabThera<sup>®</sup>) gehört zu den früh erprobten klinisch erfolgreichen Anti-CD20-Antikörpern. Er wurde 1997 in den USA (Rituxan<sup>®</sup>) zugelassen und revolutionierte die Tumortherapie [4]. Rituximab ist ein chimärer (human/murin) IgG1-Antikörper gegen CD20 und wird u. a. für die Therapie diverser B-Zell-Neoplasien sowie einiger Autoimmunerkrankungen eingesetzt [7, 8]. Rituximab bindet mit hoher Affinität an CD20 [7]. Einige Patienten sprechen jedoch auf Rituximab nur unzureichend an oder erleiden nach Therapie ein Tumorrezidiv [7, 10]. Als mögliche Tumorresistenzstrategien werden verminderte

Expression von CD20 und Inhibition der Komplementreaktion durch die Tumorzellen diskutiert [7]. Auch Fc $\gamma$ R-Polymorphismen auf den Effektorzellen haben klinische Relevanz [7, 12].

### 2.1.1.2 Obinutuzumab

Obinutuzumab, zunächst als GA101 benannt, wurde erst 2010 entwickelt und ist mittlerweile ebenfalls ein klinisch erfolgreich eingesetzter Anti-CD20-Antikörper [7, 10]. Er ist der erste humanisierte glycoengineerte Gruppe II Anti-CD20-Antikörper. Obinutuzumab bildet andere Komplexformen mit CD20 als Rituximab und erreicht dabei schon bei geringeren Antikörpermengen eine Sättigung [10]. Er löst eine schwächere CDC aus und bindet wegen des Glycoengineering am Fc-Teil stärker an bestimmte FcR wie z. B. Fc $\gamma$ RIIIA (s. u., Kapitel 2.1.2.) [7].

Im Rahmen von *in vivo*- als auch *in vitro*- Studien konnte Obinutuzumab gegenüber Rituximab eine stärkere Wirksamkeit aufweisen: Direkte Apoptoseinduzierung, ADCC und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-Sekretion sowie bei mehreren hämatologischen Neoplasien auch die tumorfreie Überlebenszeit nach Therapie sind unter Obinutuzumab größer [2, 7, 10].

## 2.1.2 Fc-Rezeptoren

Um eine ADCC zu vermitteln, können Antikörper mit ihrem Fc-Teil an Fc $\gamma$ -Rezeptoren von Effektorzellen binden. Diese Rezeptoren finden sich auf den meisten Immunzellen außer T-Zellen, sowie auf bestimmten anderen Zellen wie Endothelzellen, Mesangiumzellen und Osteoklasten [6, 13]. Die Gene für Fc-Rezeptoren befinden sich bei Mäusen, Schimpansen und Menschen auf dem Chromosom 1 [13]. Aktuelle Modelle gehen davon aus, dass Immunzellen generell, mit Ausnahme der Natürlichen Killerzellen, sowohl inhibierende als auch aktivierende Fc $\gamma$ R exprimieren und das intrazelluläre Gleichgewicht an Signalen über die Aktivität der Immunzelle bestimmt. CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen exprimieren i. d. R. nur den schwach bindenden aktivierenden Fc $\gamma$ RIIIA, auch als CD16 bezeichnet [6, 13]. Fc $\gamma$ RIIIA findet sich auch auf anderen Immunzellen wie z. B. Makrophagen [7, 10].

Nach Bindung eines Antikörpers kommt es durch FcR-Cross-Linking über die Phosphorylierung des intrazellulären Immunrezeptor-Tyrosinbasierten-Aktivierungsmotivs (ITAM) des Fc-Rezeptors zur Induktion einer nachgeschalteten intrazellulären Signalkaskade [13, 14]. Werden die Zellen aktiviert, können je nach Zelltyp Proliferation, Zytokinausschüttung, Phagozytose oder zytotoxische Reaktion ausgelöst werden [13]. CD16 braucht jedoch Kosignale von anderen aktivierenden Rezeptortypen, um durch eine polarisierte, zielgerichtete Degranulation eine suffiziente ADCC auszulösen [15].

Diverse Mediatoren können die Reaktivität von Immunzellen der angeborenen Immunabwehr darüber beeinflussen, wie stark Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Im Allgemeinen erhöhen IFN- $\gamma$ , die Komplementkomponente C5a und Lipopolysaccharide die Expression von aktivierenden Fc-Rezeptoren,



während die Zytokine IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$  diese supprimieren. Die Wirkung variiert jedoch zelllinienspezifisch [13].

### 2.1.3 Einfluss von Vitamin D und Geschlecht in der Immunochemotherapie

Die Überlebenszeit nach Diagnose im Rahmen von antikörpergestützten Tumorthérapien wird von einem suffizienten 25(OH)D-Spiegel günstig beeinflusst: Unter Rituximab-Kombinationstherapien (wie z. B. „R-CHOP“) im Rahmen eines B-Zell-NHL ging eine Vitamin D-Defizienz (< 20 ng/ml) mit kürzerem rezidivfreiem Überleben sowie Gesamtüberleben einher. Dies konnte für das Hochrisiko-Mantelzelllymphom, das Follikuläre Lymphom sowie das DLBCL gezeigt werden [16–18]. Bei der Therapie des DLBCL konnte zudem bereits gezeigt werden, dass eine entsprechende therapeutische Intervention mit Supplementation des 25(OH)D-Spiegels auf Werte > 20 ng/ml die Prognose wieder verbesserte [18].

In Einklang mit internationalen Ergebnissen konnten Pfreundschuh et al. außerdem das Geschlecht als Einflussfaktor auf den Therapieerfolg ausmachen. In ihrer geschlechtsspezifischen retrospektiven Auswertung der R-CHOP-Therapie bei DLBCL zeigte sich, dass ältere Frauen über 60 Jahren im Rahmen der RICOVER-60 Studie stärker von der Antikörpertherapie profitierten als gleichaltrige Männer [19]. Unter jungen Patienten und Patientinnen der MapThera International Trial Study zeigte sich hingegen kein Unterschied. Gleichzeitig war die Rituximab-Eliminierungsrate bei älteren Frauen signifikant geringer als bei jungen Patienten und Patientinnen sowie gleichaltrigen Männern, und mit dem längerem rezidivfreien Überleben assoziiert. Eine Dosiserhöhung von Rituximab bei älteren Männern im Rahmen der SEXIE-R-Studie konnte diese Differenz in Rituximab-Serumspiegeln und rezidivfreiem Überleben ausgleichen – leider wurde der Effekt einer möglichen Dosiserhöhung bei Frauen jedoch nicht untersucht [20].

Schließlich beobachteten Bittenbring et al. in einer retrospektiven Auswertung der RICOVER-60 Studie ein interessantes Zusammenspiel der beiden Entitäten *Vitamin D* und *Geschlecht*: ältere Frauen mit Rituximab-Therapie schienen von einem 25(OH)D-Spiegel über 8 ng/ml etwas stärker als die in der Studie eingeschlossenen älteren Männer zu profitieren [1].

Analog zu diesen klinischen Studien konnten auch zur *in vitro*-Wirksamkeit von Anti-CD20-Antikörpern im Rahmen von NK-Zytotox-Assays ein Vitamin D-Effekt gezeigt werden, welcher in einer geschlechtergetrennten Analyse bei Neumann et al. ebenfalls geschlechtsspezifisch ausfiel (s. Kapitel 2.3.4.1., S.26) [2].

## **2.2 Natürliche Killerzellen**

Natürliche Killerzellen wurden erst Anfang der 70er Jahre als eigenständige Zelllinie entdeckt [6, 21–23]. Sie werden traditionell zwar zur angeborenen Immunantwort gezählt, jedoch zur lymphoiden Zellreihe gerechnet [6, 21, 23, 24]. In Abgrenzung zu NKT-Zellen werden sie als CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup> charakterisiert. Ihnen wird insbesondere bei der Virusabwehr, der Tumorbekämpfung, der Reproduktion (z. B. als Ursache von habituellen Aborten), Transplantationsreaktionen und Autoimmunitätsvorgängen eine wichtige Rolle zugeschrieben [21, 23, 24]. In Bezug auf klinische Antikörpertherapien wird postuliert, dass NK-Zellen mit ihrer ADCC eine wichtige Schlüsselrolle in der Vermittlung des antitumorösen Effekts dieser Therapien spielen [6, 21].

Morphologisch imponieren NK-Zellen als große Lymphozyten mit großen zytoplasmatischen Granula [23, 24]. NK-Zellen haben 3 wichtige Funktionsbereiche: Die Ausübung von zytotoxischen Reaktionen, die Beeinflussung und Mediation von Signalen an andere Immunzellen über Zytokinproduktion, sowie die direkte kostimulatorische Zell-Zell-Interaktion mit anderen Immunzellen wie Makrophagen und Dendritischen Zellen [24].

NK-Zellen finden sich in diversen Organen wie dem schwangeren Uterus, Lunge, Leber und Milz, jedoch nur in geringem Maß in Lymphknoten [21, 23].

### **2.2.1 Reifung von Natürlichen Killer-Zellen**

Nach neueren Klassifikationen gehören NK-Zellen zu den Angeborenen Lymphoiden Zellen (ILCs). ILCs tragen keine für myeloide oder dendritische Zelllinien typischen Oberflächenmoleküle, weisen starke morphologische Ähnlichkeit mit lymphoiden Zellen auf, und exprimieren, anders als T-Lymphozyten, keine RAG (recombination activating gene)-abhängig umgestaltbaren Antigenrezeptoren [22]. ILCs werden nach dieser Klassifikation in 3 Gruppen eingeteilt: Natürliche Killerzellen gehören zur Gruppe 1. ILC-1 zeichnen sich dadurch aus, dass sie IFN- $\gamma$  produzieren können [6, 22].

Da sich die Entwicklung der NK-Zellen des Menschen von der anderer Säugetiere, wie auch Mäusen, in Teilen unterscheidet, sind Ergebnisse aus murinen Experimenten nur mit Vorsicht auf das humane Modell übertragbar [15, 25]. Wie bei allen Zellen der lymphoiden Zellreihe sind die CD34<sup>+</sup> Stammzellen im Knochenmark die Vorläufer der NK-Zellen [24]. Die späteren Reifungsstadien finden vermutlich in sekundär lymphatischen Organen statt, können jedoch auch in anderen Geweben erfolgen [24–27]. Für die Entwicklung und das Überleben von NK-Zellen scheint das Zytokin IL-15 unbedingt notwendig zu sein [23, 24].

Über die Reifungsstadien der Progenitor-NK-Zellen, pre-NK-Zellen und NKDI (NK cell development intermediate), entwickeln sich schließlich CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>-</sup> NK-Zellen [25–27]. Möglicherweise gibt es in frühen Entwicklungsstadien Überschneidungen mit der Entwicklung anderer ILCs, Dendritischen Zellen und bestimmten T-Zellen [27]. Beim Menschen sind CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>-</sup> NK-Zellen vermutlich die direkten Vorläuferzellen von CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>+</sup> NK-Zellen [25, 26]. Die beiden letztgenannten Subtypen übernehmen

wichtige, aber verschiedene Aufgaben im Rahmen von Immunantwort und -regulation [23].

### **2.2.1.1 CD56<sup>bright</sup>/CD16<sup>-</sup> NK-Zellen**

CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen machen nur 5-10 % der peripher im Blut zirkulierenden NK-Zellen, jedoch über 90 % der NK-Zellen in Lymphknoten aus. Sie zeigen kaum zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen [6, 21, 23, 26, 27]. CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen sind jedoch sehr effektive Zytokinproduzenten und vermitteln nach Stimulation verschiedene Reaktionen an andere Immunzellen insbesondere mittels IFN- $\gamma$  Sekretion [21, 23, 26]. Neben IFN- $\gamma$  können NK-Zellen aber auch TNF- $\alpha$ , IL-5, IL-13, GM-CSF und andere Zytokine sezernieren [23].

Zytokine anderer Immunzellen, welche NK-Zellen aktivieren können, sind z. B. IL-12, IL-15, IL-18, Typ I Interferone und das T-Zell-typische IL-2 [21, 23, 24, 26]. Diese führen zur verstärkten Proliferation und Aktivierung von CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen und stimulieren die Reifung zu zytotoxischen CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen [21, 23].

### **2.2.1.2 CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>+</sup> Natürliche Killer-Zellen**

Während CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen einen eher langsamen Effekt ausüben, gehören CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>+</sup> NK-Zellen zur frühen Abwehrreaktion [6]. Die CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>+</sup> NK-Zellen reagieren in späten Entwicklungsstadien schwächer auf Zytokine, zeigen aber im Gegensatz zu CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen starke Zytotoxizität [21, 23, 27]. Durch Typ I Interferone und IL-12 kann ihre spontane Aktivität erheblich gesteigert werden [21]. Sie machen ca. 90-95 % der milzständigen und im Blut zirkulierenden NK-Zellen aus [21, 23, 24, 26].

NK-Zellen tragen inhibitorische und aktivierende Rezeptoren, mit denen sie mit anderen Zellen interagieren können [21, 24]. Inhibitorische Rezeptoren binden oft spezifisch an Zelloberflächenmoleküle des major histocompatibility complex-I (MHC-I) anderer Körperzellen [21, 23, 24]. Einige der aktivierenden Rezeptoren binden ebenfalls an MHC-Moleküle, jedoch HLA (Humanes Leukozyten Antigen )-unspezifisch [14, 15]. NK-Zellen sind in ihrer Reaktion allerdings nicht zwingend an die Expression von MHC-Proteinen auf anderen Zellen gebunden (s. u. Kapitel 2.2.2, S.17). Darüber hinaus gibt es noch weitere aktivierende Rezeptoren, wie Fc $\gamma$ RIIIA, welche z. B. nicht an MHC I, sondern an Antikörper binden [21, 23].

Viele der aktivierenden Rezeptoren sowie auch Fc $\gamma$ RIIIA binden intrazellulär an ein Polypeptid mit ITAM Motiv, während inhibierende Rezeptoren oft ein Immunrezeptor Tyrosinbasiertes Inhibitionsmotiv (ITIM) tragen. Inhibierende Rezeptoren können die Wirkung von aktivierenden Rezeptoren vermutlich bereits vor dem Auslösen der intrazellulären Signalkaskade durch Inhibierung der Phosphorylierung des ITAM Motivs unterdrücken, aber auch an vielen anderen Stellen die Signalkaskade blockieren [14, 15]. Aktivierende Rezeptoren, ausgenommen Fc $\gamma$ RIIIA, können sich zudem über einen Cross-Talk gegenseitig aktivieren [14]. Das Gleichgewicht aus inhibierenden und stimulierenden Signalen entscheidet schließlich über die Reaktion der NK-Zelle, wobei in Homöostase die inhibierenden Signale überwiegen [21, 23, 24, 27].

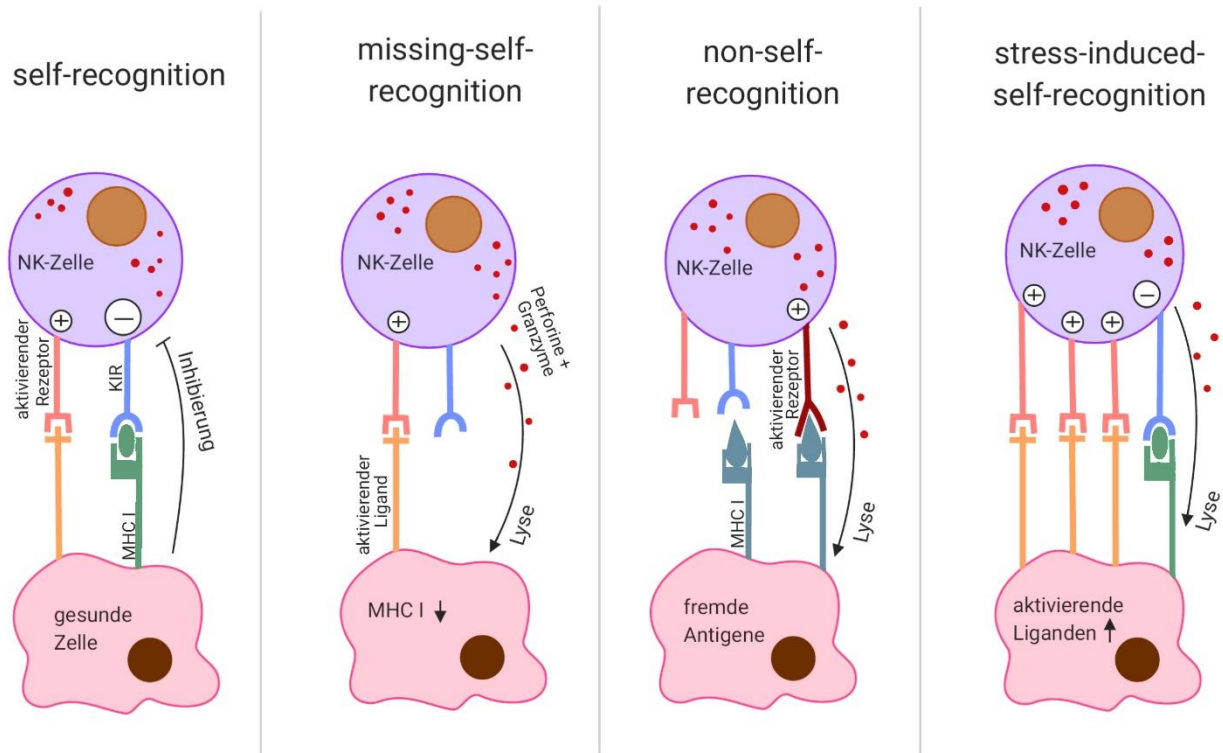
## 2.2.2 Erkennen von virusinfizierten oder neoplastischen Zellen

Zytotoxische NK-Zellen können ihre Targets auf verschiedenen Wegen erkennen und benötigen dafür keine vorherige Sensibilisierung oder Priming [23, 24].

Durch Tumoren oder Virusinfektion transformierte Zellen exprimieren auf der Zelloberfläche oft weniger MHC-I-Moleküle oder zusätzlich stressinduzierende Antigene. Dieses veränderte Expressionsmuster kann eine NK-Zelle wahrnehmen [15, 21]. Erstere Variante wird auch als *missing-self-recognition* bezeichnet, da eine verminderte Anzahl an MHC-I-Molekülen auf den Targetzellen die üblicherweise inhibitorischen Signale, die den NK-Zellen über ihre sog. Killer cell immunoglobulin-like Rezeptoren (KIR) vermittelt werden, abschwächt bis hin sogar aufhebt [21, 23, 24]. Die zweite Variante wird entweder *non-self-recognition* genannt, wenn körperfremdes Antigen erkannt wird, oder *stress-induced-self-recognition*, wenn es sich um körpereigene stressinduzierte Antigene handelt, was z. B. bei Tumorzellen der Fall sein kann [21].

Da diese drei Erkennungsmuster (vgl. **Abbildung 1**) zur Aktivierung von NK-Zellen ohne Interaktion mit Antikörpern ablaufen, werden sie auch als Antikörper-unabhängige zelluläre Zytotoxizität (AICC) bezeichnet.

Alternativ können CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>+</sup> Natürliche Killerzellen ihre Targets auch mithilfe des schwachbindenden Fc $\gamma$ -Rezeptors (Fc $\gamma$ RIIIa; CD16a) erkennen, wenn diese mit entsprechend Target-spezifischen Antikörpern markiert sind [21, 23, 24]. Diese Variante und die konsekutiv ausgelöste zytotoxische Reaktion wird dann als Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität, auch ADCC, bezeichnet [21]. Man geht davon aus, dass NK-Zellen mit ihrer Fähigkeit zur ADCC eine wichtige Schlüsselrolle bei den Antikörpertherapien von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) mittels Anti-CD20-Antikörpern sowie von Brustkrebs mittels Anti-Her2-Antikörpern übernehmen [6, 21].



**Abbildung 1: Target-Erkennung durch NK-Zellen und Auslöser der AICC**

Zum Vergleich ist ganz links zunächst die Zellinteraktion mit einer gesunden körpereigenen Zelle dargestellt. Die gesunde Zelle exprimiert sowohl MHC I als auch Liganden, welche an aktivierende Rezeptoren der NK-Zelle binden. Normalerweise überwiegen dabei die inhibitorischen Signale vermittelt durch Bindung von MHC I mit KIR. Die Zelle wird so als körpereigen wahrgenommen und nicht lysiert.

Bei den anderen dargestellten Zellinteraktionen überwiegen dagegen die aktivierenden Signale und induzieren in der NK-Zelle eine Lysereaktion (von links nach rechts):

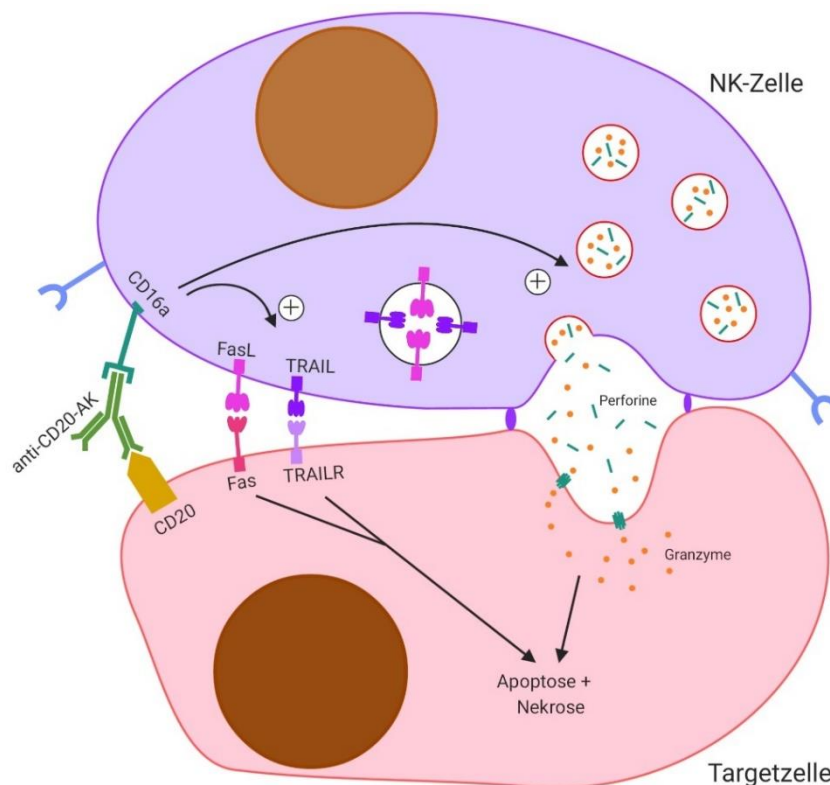
Bei der *missing-self-recognition* kommt es durch Herunterregulation der MHC I Expression auf der jetzt als Ziel (engl. Target) genannten interagierenden Zelle zu geringeren inhibitorischen Signalen in der NK-Zelle.

Bei der *non-self-recognition* werden aktivierende Signale durch Kontakt von Rezeptoren mit körperfremden Antigenen vermehrt generiert.

Bei der *stress-induced-self-recognition* exprimiert die Targetzelle vermehrt Liganden, welche an aktivierende Rezeptoren der NK-Zelle binden.

NK-Zellen lysieren ihre Targets meist mittels Perforinen und Granzyme, können aber auch mittels Liganden der Tumornekrosefaktor (TNF)-Superfamilie (z. B. FasL und TRAIL) an Todesrezeptoren (Fas, TRAILR) der Zielzelle binden und Apoptose induzieren [6, 21, 23]. Im Rahmen der Aktivierung bilden NK-Zellen mit ihrem Target eine immunologische Synapse, in welche sie die Perforine und Granzyme aus ihren Granula entleeren [21, 23] (s. **Abbildung 2**). Die Exozytose der Granula erfolgt kalziumabhängig [21].

Zytotoxische Reaktionen, sowohl AICC als auch ADCC, können schließlich in den Zielzellen je nach Zielzelllinie vermehrt Apoptose oder Nekrose auslösen [28]. Dabei kann Apoptose auch in eine sekundäre Nekrose münden [29].



**Abbildung 2: NK-Zell-ADCC**

NK-Zellen können ihre Targets mithilfe des Rezeptors CD16a / Fc $\gamma$ RIIIa erkennen, wenn diese antikörpermarkiert sind (hier beispielhaft mit dem anti-CD20-AK illustriert). Fc $\gamma$ RIIIa-Aktivierung führt zur Lyse der Targetzelle über verschiedene Reaktionen. Meistens bilden NK-Zellen dabei mit ihren Targets eine immunologische Synapse aus, in welche Perforine und Granzyme aus zytotoxischen Granula entleert werden. Dies führt konsekutiv zur Nekrose der Targetzelle.

Einige NK-Zellen können außerdem über Expression von Liganden der TNF-Superfamilie wie FasL und TRAIL die entsprechenden Todesrezeptoren auf den Targetzellen aktivieren und somit Apoptose induzieren. Diese kann sekundär ebenfalls in Nekrose münden.

### 2.2.3 Interaktion mit anderen Immunzellen

Viele der o. g. wichtigen Zytokine für die Reifung von NK-Zellen können insbesondere von Dendritischen Zellen und Makrophagen gebildet werden [24, 26, 30–33]. Man spricht dabei gelegentlich auch von einem “Cross-Talk” zwischen NK-Zellen und Dendritischen Zellen bzw. Makrophagen [24]. Denn gleichzeitig interagieren NK-Zellen über Sekretion von Zytokinen (s. o.) und direktem Zellkontakt auch mit anderen Zellen. Dadurch können sie Reaktionen vermitteln, wie z. B. die Reifung von zytotoxischen T-Zellen, von TH1-Zellen (mittels IFN- $\gamma$ ) sowie von Dendritischen Zellen (DCs) [21, 23, 26].

Interaktionen zwischen DCs und NK-Zellen werden insbesondere für frühe Phasen der Immunantwort postuliert [24, 32, 33]. Die Interaktion mit reifen DCs führt durch direkten Zell-Zell-Kontakt sowie Sekretion löslicher Zytokine wie Typ I Interferonen und IL-12 zur gegenseitigen Stimulierung [32, 33]. Dabei sind NK-Zellen unter bestimmten Umständen wahrscheinlich sogar zur DC-Reifung und -Aktivierung notwendig.

Auch das DC vermittelte Priming von T-Zellen im Lymphknoten hängt möglicherweise von vorherigem Kontakt der DC mit NK-Zellen ab [33]. Bei hohen NK/DC-Verhältnissen hingegen scheinen NK-Zellen unreife DCs wieder zu eliminieren [32, 33].

Ähnlich wie DCs können auch Makrophagen direkte Zellkontakte mit NK-Zellen bilden. Durch erhöhte Expression von Liganden für NKG2D, einem aktivierenden NK-Zell-Rezeptor, nach Pathogenkontakt oder im Rahmen der Tumorkontrolle, werden NK-Zellen von Makrophagen stimuliert. Infizierte Makrophagen werden auf diese Weise eliminiert. Im Rahmen der Tumorbekämpfung können Makrophagen sich jedoch auch mittels Expression von Liganden inhibitorischer NK-Zell-Rezeptoren vor diesen schützen [30, 31].

Gleichzeitig sezernieren aktivierte Makrophagen viele der wichtigen Zytokine für die Aktivierung und Reifung von NK-Zellen, wie IL-12, IL-15 und Typ I-Interferone [30, 31]. Über Sekretion von TGF- $\beta$  können sie NK-Zellen allerdings auch inhibieren [31].

Die Mechanismen der Interaktion Antigenpräsentierender Zellen mit NK-Zellen ähneln sich in vielerlei Hinsicht. Neben dieser Interaktion können NK-Zellen möglicherweise zusätzlich auch durch T-regs reguliert werden. Dabei gibt es Hinweise auf unmittelbare Interaktion, möglicherweise über TGF- $\beta$  vermittelte NK-Zell-Inhibierung. Gleichzeitig könnte IL-2-Deprivation durch T-regs im Rahmen einer T-Zell-Inhibierung auch analoge Auswirkungen auf die NK-Zell-Aktivität *in vivo* haben [34]. Bei einigen Erkrankungen konnte zudem eine inverse Korrelation der Zellzahlen von T-regs und NK-Zellen festgestellt werden [24, 34].

## 2.2.4 Veränderungen im Zusammenhang mit Alter und Geschlecht

NK-Zellen machen je nach Alter 5-20 % der im Blut zirkulierenden Leukozyten aus [23, 24]. Im Alter ändert sich das Verhältnis der Leukozytenpopulationen und es kommt zu einer Immunoseneszenz. Besonders bekannt sind Veränderungen in der T-Zell-Population zugunsten terminal differenzierter T-Zellen und einer Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der CD8<sup>+</sup> T-Zellen [35]. Doch auch die NK-Zell-Population und ihre Funktion sind von der Immunoseneszenz betroffen: Während die Anzahl der NK-Zellen im Blut mit dem Alter stark ansteigt und sich das Verhältnis von CD56<sup>bright</sup>/CD56<sup>dim</sup> zugunsten von CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen verschiebt, vermindert sich die Aktivität beider Subpopulationen auf Zellebene [35–38]. Eine größere Population kann somit vermutlich eine altersbedingt verminderte Aktivität kompensieren [35, 39].

Die verminderte spontane, Antikörper-unabhängige Aktivität lässt sich dabei durch ein verändertes Verhältnis von aktivierenden zu inhibierenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche sowie durch Beeinträchtigung intrazellulärer Signalwege und der Degranulation erklären [35–37, 40]. In Bezug auf die ADCC hingegen konnten bisher keine ausreichenden Anhaltspunkte für eine entsprechende Seneszenz gefunden werden [37, 39, 40]. Die Expression von Fc $\gamma$ RIIIA und die ADCC-Reaktion scheinen bis ins hohe Alter erhalten zu bleiben [35, 37, 39, 40].

Die Immunoseneszenz läuft bei Frauen und Männern allerdings nicht parallel ab, was auch mit hormonellen

Veränderungen zusammenhängen könnte [35]. Bei Frauen kommt es im Rahmen der Menopause zu einer schnellen hormonellen Veränderung, während der Testosteronabfall bei den Männern oft eher schrittweise verläuft [41, 42]. In der ersten Lebenshälfte haben Männer anteilig mehr NK-Zellen als Frauen, mit verhältnismäßig mehr terminal differenzierten NK-Zellen [36]. Mit dem Alter steigt der Anteil der NK-Zellen bei beiden Geschlechtern an, wobei Frauen einen stärkeren Anstieg aufweisen und später sogar größere NK-Zell-Anteile aufweisen, als Männer [23, 43].

In Bezug auf die Funktionalität auf Zellebene gibt es zum aktuellen Zeitpunkt keine eindeutigen Ergebnisse zu möglichen Geschlechtsunterschieden. So zitiert Oertelt-Prigione in ihrem Review von 2012 mehrere Untersuchungen, die aufzeigten, dass die natürliche Antikörper-unabhängige Aktivität von NK-Zellen bei jungen Frauen in der fertilen Lebensspanne geringer sei, als bei postmenopausalen Frauen oder generell bei Männern [44]. Phan et al. konnten keine bedeutsamen Unterschiede in der AICC ihrer untersuchten Probanden feststellen, werteten ihre Ergebnisse jedoch nicht nach Altersgruppen getrennt aus [36]. Al-Attar et al. hingegen fanden in einer geschlechtergetrennten Auswertung der NK-Zellfunktionalität unter 70- bis 90-Jährigen, dass die NK-Zellen jener untersuchten Frauen zwar ein größeres CD56<sup>bright</sup>/CD56<sup>dim</sup> Verhältnis aufwiesen, sich auf Zellebene jedoch in Bezug auf AICC und IFN- $\gamma$ -Sekretion reaktiver zeigten [45]. Mariani et al. (1999) beschrieben ähnliche AICC bei über 90-Jährigen bei beiden Geschlechtern, wobei die dargestellten Daten einen Trend zu höherer AICC bei den weiblichen Probanden zeigten [38]. Zusammenfassend könnten diese Daten so interpretiert werden, dass möglicherweise NK-Zellen jüngerer Frauen (über 50 Jahren) eine geringere Aktivität und Zytotoxizität, NK-Zellen älterer postmenopausaler Frauen eine höhere Aktivität und Zytotoxizität im Vergleich zu NK-Zellen gleichaltriger Männer aufweisen.

Alter und Geschlecht sollten also stets zusammen gedacht werden, da Geschlechterunterschiede der NK-Zellen vermutlich altersabhängig sind und umgekehrt. Ob sich die geschlechtsspezifische Immunoseneszenz auf hormonelle Ursachen zurückführen lässt, ist eine bisher gänzlich unbeantwortete Frage: In den zitierten Studien erfolgten keine vollständigen Erhebungen des Sexualhormonstatus bei den Probanden beider Geschlechter. Leider ist die Studienlage nicht umfassend genug, um explizitere Aussagen zur geschlechtsspezifischen Immunoseneszenz zu treffen.



## 2.3 Vitamin D

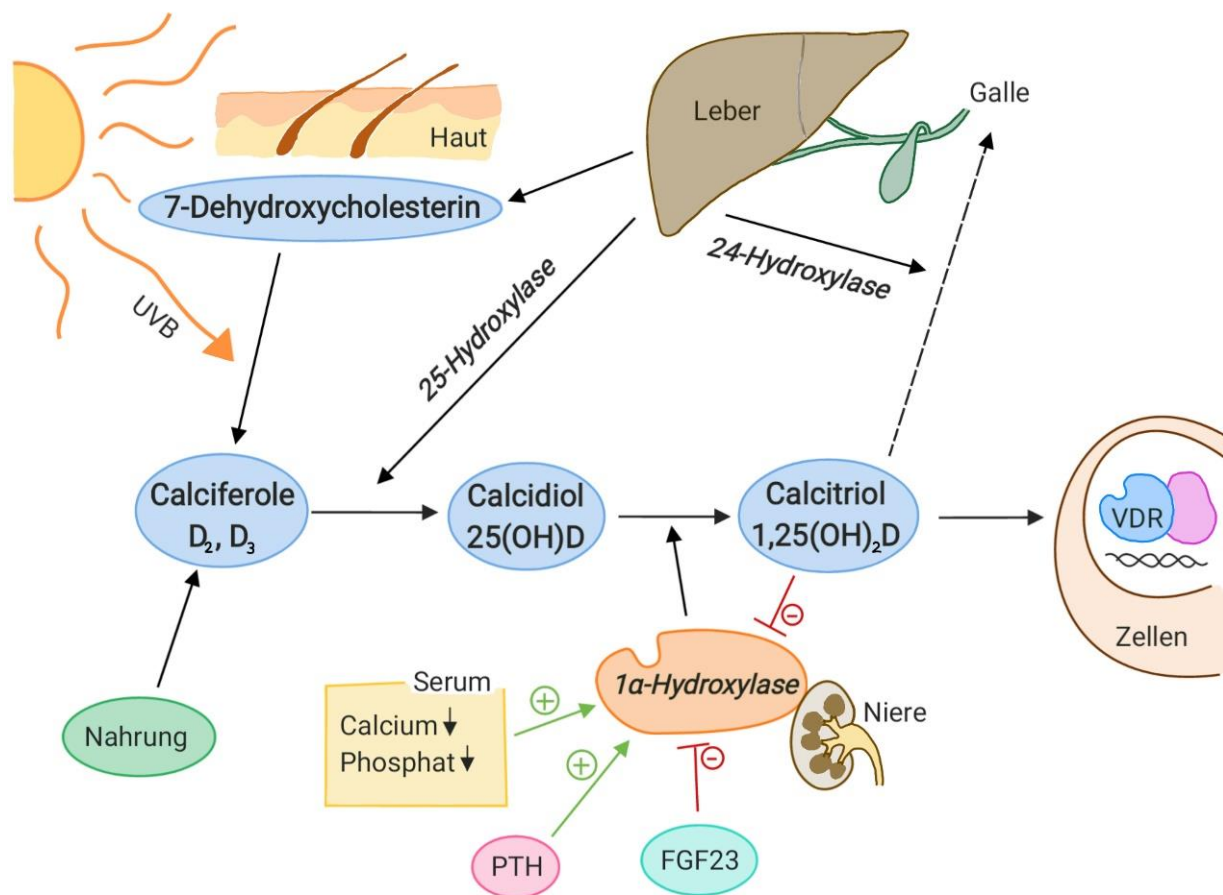
Seit über drei Jahrzehnten weiß man, dass Vitamin D für das Immunsystem eine wichtige Rolle spielt. Vitamin D ist nämlich nicht nur beim Knochenstoffwechsel und der Kalzium- und Phosphathomöostase ein wichtiger Botenstoff: Es ist bekannt, dass sehr viele Körperzellen, auch Immunzellen, Rezeptoren für Vitamin D exprimieren [46]. So wurden in den letzten Jahren zunehmend Studien publiziert, die eine Assoziation von Vitamin D-Mangel mit bestimmten chronischen Erkrankungen wie u. a. Diabetes mellitus, Morbus Crohn, Multipler Sklerose sowie einigen Krebserkrankungen aufzeigten [47, 48]. Ein kausaler Zusammenhang ließ sich bisher jedoch nicht beweisen [48].

### 2.3.1 Vitamin D-Stoffwechsel

Calciferole, die Grundlage der 25(OH)D-Synthese, können entweder exogen mit der Nahrung aufgenommen oder in der Haut aus endogenem 7-Dehydroxycholesterin unter UV-Strahlung synthetisiert werden. Inaktives Vitamin D (Cholecalciferol als Vitamin D<sub>3</sub> oder Ergocalciferol als Vitamin D<sub>2</sub>) kann anschließend in der Leber zu inaktivem 25(OH)D (Calcidiol) hydroxyliert werden [4, 46]. Klassischerweise erfolgt die finale Aktivierung in der Niere mittels 1 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP27B1) zu 1,25-Dihydroxyvitamin D (Calcitriol) [46] (s. **Abbildung 3**).

Der Transport von Calcidiol als auch von Calcitriol erfolgt über das Vitamin D-bindende Protein (DBP) im Blut, wobei Calcidiol im Vergleich stärker an DBP bindet [4, 46, 49].

Die Aktivität der renalen 1 $\alpha$ -Hydroxylase (und damit die zirkulierende Menge an aktivem Calcitriol) wird dabei im Sinne eines Feedbackmechanismus kontrolliert: Niedrige Phosphat- und Kalziumspiegel sowie Parathormon aktivieren die Calcitriolbiosynthese, während hohe Calcitriolspiegel sowie der Fibroblast Growth Factor 23 (FGF-23) die 1 $\alpha$ -Hydroxylase hemmen [4, 46]. Abgebaut wird Calcitriol durch die 24-Hydroxylase (CYP24A1) und schließlich über die Galle ausgeschieden [46]. 1 $\alpha$ -Hydroxylase wird unabhängig davon auch extrarenal exprimiert (s. Kapitel 2.3.4., S.25).



**Abbildung 3: Vitamin D-Metabolite**

Calciferole können als Vitamin D<sub>2</sub> oder D<sub>3</sub> aus der Nahrung aufgenommen oder körpereigen als Vitamin D<sub>3</sub> aus 7-Dehydroxycholesterin synthetisiert werden. Über zwei weitere Zwischenschritte entsteht schließlich Calcitriol, welches als aktives Vitamin D in den Zielzellen die Transkription über Bindung an den Vitamin D-Rezeptor (VDR) beeinflussen kann.

Die Aktivität der renalen 1α-Hydroxylase hat dabei wesentlichen Einfluss auf die Menge des aktiven Calcitriols. Sie wird von mehreren Parametern wie dargestellt beeinflusst.

*PTH = Parathormon. FGF23 = Fibroblast Growth Factor 23.*

### 2.3.2 Vitamin D-Rezeptor

In den Zielzellen wirkt Calcitriol über Bindung an den nukleären Vitamin D-Rezeptor (VDR) [46]. VDR wird in fast allen Zellen des Körpers exprimiert. Als ligandenbindendes Dimer, in der Regel als Heterodimer mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR), kann er an Vitamin D-responsive Elemente (VDRE) binden, und die Transkription responsiver Gene beeinflussen [46, 50]. Der VDR kann jedoch auch ohne Ligandenbindung durch Assoziation mit Korepressoren die Transkription beeinflussen, in der Regel mit entgegengesetzter, die Transkription unterdrückender Wirkung [51].

Ähnlich wie für die Sexualhormone (s. Kapitel 2.4.3., S.31) konnten auch für Vitamin D schnelle nicht-genomische Effekte gemessen werden [4, 52]. Unklar ist bisher, welcher Rezeptor beim Menschen dafür verantwortlich ist. In der Diskussion steht das multifunktionale Protein 1,25D<sub>3</sub>-MARRS/ERp57/GRp58, welches nachgewiesenermaßen bei Vögeln auch bei Prozessen der MHC-I-Beladung eine wichtige Rolle spielt [52, 53]. Ein entsprechender 1,25D<sub>3</sub>-MARRS Rezeptor wurde später auch in menschlichen Zellen wie u. a. Brustdrüsenzelllinien nachgewiesen [54].

Im Mineralhaushalt bewirkt das aktive Calcitriol eine Erhöhung der Plasmakalziumkonzentration sowie der Phosphataufnahme, insbesondere über Stimulierung der Resorption in Dünndarm und Niere. Es bewirkt einen verstärkten Einbau von Kalzium in den Knochen und greift mittels direkter Hormonwirkung in das Osteoblasten/Osteoklasten-Gleichgewicht ein. Gleichzeitig hemmt es die Parathormon-Transkription. Extremer Vitamin D-Mangel führt zu einer Störung des Mineralhaushaltes und zu Rachitis [4].

Daneben beeinflusst Vitamin D zelluläre Signale der Proliferation (im Sinne der Kontrolle des Zellzyklus) und der Differenzierung. Dies konnte u. a. auch bei diversen Krebszelllinien nachgewiesen werden. Neben Mineralhaushalt und Zellzyklus beeinflusst Vitamin D zelllinienspezifisch den Metabolismus. So unterscheiden sich VDR-bindende Stellen sowie das VDR-Transkriptom zwischen verschiedenen Zelltypen sehr stark [51].

### 2.3.3 Vitamin D-Referenzbereich

30,2 % der Erwachsenen in Deutschland sind laut Robert Koch Institut (RKI) mit Vitamin D mangelversorgt. Damit ist die Versorgungslage im innereuropäischen Vergleich verhältnismäßig schlecht. Das RKI gibt dabei als Referenzwerte die Empfehlungen des Institute of Medicine (IOM), USA, von 2011 an: Danach sind 25(OH)D-Werte < 12 ng/ml (30 nmol/l) insuffizient oder mangelhaft, Serumspiegel zwischen 12 ng/ml und 20 ng/ml defizient bzw. unzureichend, und Werte > 20ng/ml (50 nmol/l) suffizient oder ausreichend [48]. Im Gegensatz dazu postuliert die global arbeitende Endocrine Society 25(OH)D-Serumspiegel < 20 ng/ml als defizient, Werte zwischen 21-29 ng/ml als insuffizient und empfiehlt Vitamin D-Supplementation auf Serumspiegel > 30 ng/ml (> 75 nmol/l) [47]. Allgemein ist zu beachten, dass für positive immunmodulatorische Effekte vermutlich höhere Serumspiegel benötigt werden, als für die Kalziumhomöostase [2, 4]. Das Zentrallabor des Uniklinikum des Saarlandes gibt unabhängig davon den Referenzbereich für 25(OH)D mit 30-100 ng/ml an [55].

Eine große Schwierigkeit in der Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Studien, Institutionen sowie international stellt dabei die Vielzahl verschiedener Messmethoden mit unterschiedlicher Genauigkeit dar [47, 48]. Es wird allgemein empfohlen, mit reliablen Methoden das Gesamt-25(OH)D (also 25-Hydroxy-Ergocalciferol/D<sub>2</sub> plus 25-Hydroxy-Cholecalciferol/D<sub>3</sub>) zu messen [47].

Unklar ist bei der aktuellen Studienlage auch, wo die obere Grenze des Referenzbereichs liegen soll. Die IOM

postulierte, dass möglicherweise eine positive Assoziation von hohen 25(OH)D-Spiegeln mit Gesamtsterblichkeit ab Serumspiegeln von  $> 50$  ng/ml vorläge [47]. Andere Studien weisen diese bedenklichen Ergebnisse als Artefakte aus [56]. Einen Anhaltspunkt für eine gesunde obere Grenze des Referenzbereichs könnte auch der maximal auf natürlichem Wege generierbare 25(OH)D-Spiegel bieten. Ohne zusätzliche Supplementation gebildete 25(OH)D-Spiegel von  $> 60$  ng/ml sind bisher nur selten beschrieben worden [57].

Auch über eine definitiv gefährliche Obergrenze bzgl. akuter Toxizität ist die Studienlage uneinheitlich. Die Endocrine Society erwähnt eine Studie, die Werte  $< 150$  ng/ml für unbedenklich hält, gibt selbst jedoch keine Empfehlung für eine Definition der Toxizitätsgrenze [47]. Toxizität wird i. d. R. als das Auftreten erhöhter Kalziumserumspiegel mit begleitenden Symptomen definiert (vgl. [56, 57]). Mehrere Retrospektive Kohortenstudien kommen dabei zu dem überraschenden Schluss, dass Kalziumspiegel und 25(OH)D-Spiegel nicht miteinander assoziiert sind. Fälle von Vitamin D-Toxizität scheinen erst bei 25(OH)D-Spiegeln von ca. 200 ng/ml oder größer aufzutreten [57, 58]. Vorsicht ist jedoch bei besonderen Stoffwechselerkrankungen sowie granulomatösen Erkrankungen gegeben, bei denen Makrophagen vermehrt Calcitriol bilden oder Calcitriol schlechter abgebaut wird [56]. Dabei können Intoxikationserscheinungen bereits ab 30 ng/ml 25(OH)D auftreten [47].

### 2.3.4 Wirkungen auf das Immunsystem

Die Expression des VDR konnte bereits für die meisten Immunzellen wie T-Zellen, Makrophagen, Dendritische Zellen, Monozyten, neutrophile Granulozyten und B-Zellen gezeigt werden [46, 49, 59]. Es ist somit davon auszugehen, dass Vitamin D im gesamten Immunsystem modulatorisch eingreift. Man nimmt an, dass ein suffizienter Vitamin D-Spiegel die frühe Phase der Pathogenbekämpfung unterstützt und die adaptive Immunabwehr hemmt [46]. Es supprimiert Proliferation, Reifung und Aktivität von B- und T-Zellen, sowie von Dendritischen Zellen, während es die lokale Akkumulation von T-regs sowie generell Proliferation und Reifung von Makrophagen fördert [46, 60]. Vitamin D wird oft auch als Immunmodulator bezeichnet. Dabei können die von Vitamin D induzierten Effekte biphasisch ausfallen und sind, abhängig von der Zielzelle, sehr unterschiedlich [50, 61]. So unterstützt ein hoher Vitamin D-Spiegel beispielsweise die Produktion antimikrobieller Peptide wie Cathelicidin und Defensinen in Monozyten, schützt mit einigen Stunden Verspätung aber über verminderte Expression von Toll-like Rezeptoren (TLR) in Monozyten möglicherweise auch vor überschießender Sensitivität und Reaktion gegen sog. pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) und Pathogene [46, 49, 62]. Ein anderes Beispiel für einen biphasischen Vitamin D-Effekt ist IL-10, welchem oft antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben wird. Unter Vitamin D-Einfluss wird die Transkription von IL-10 in Monozyten initial unterdrückt und mit zeitlicher Verzögerung langfristig wieder gefördert [50].

Für die immunmodulatorische Wirksamkeit ist dabei der 25(OH)D-Spiegel, und nicht der Calcitriolspiegel entscheidend [60]. Unabhängig von der Niere kann Calcitriol nämlich von bestimmten Immunzellen auch selbst aus Calcidiol synthetisiert werden [46].

Extrarenal exprimierte  $1\alpha$ -Hydroxylase, wie zum Beispiel in Makrophagen und Dendritischen Zellen, ist unabhängig vom o. g. klassischen Feedbackmechanismus und wird vornehmlich über Immunstimuli reguliert [60, 63]. So stimulieren in Monozyten  $\text{IFN-}\gamma$  und IL-15 die CYP27B1-Expression, während  $\text{IFN-}\beta$  und IL-10 diese supprimieren. IL-4 wiederum stimuliert den Abbau von Calcitriol via Induktion von CYP24A1 [49, 63]. Makrophagen können also vermutlich auch bei insuffizienten Vitamin D-Spiegeln eine minimal notwendige Menge an auto- und parakrin wirksamem Calcitriol synthetisieren [46, 61]. So kann Vitamin D, anders als die Sexualhormone, zwischen den Immunzellen selbst als Messenger fungieren.

Als klinisches Korrelat zu diesen Erkenntnissen werden diverse Erkrankungen, die das Immunsystem schwer treffen, sowie schlechter Krankheitsverlauf mit erniedrigten Vitamin D-Serumspiegeln in Verbindung gebracht. Ein protektiver Effekt von Vitamin D zeigte sich beispielsweise bei Sepsispatienten sowie Tuberkuloseerkrankungen [49]. Auch bei diversen lymphatischen Neoplasien wurden unter antikörpergestützter Immunochemotherapie Assoziationen des Gesamtüberlebens mit 25(OH)D-Spiegeln festgestellt (s. Kapitel 2.1.3., S.14) [1, 16–18].

#### **2.3.4.1 Wirkung auf Natürliche Killer-Zellen**

Auch NK-Zellen exprimieren den Vitamin D Rezeptor und reagieren sensibel auf Inkubation mit Calcitriol [64]. Al-Jaderi et al. konnten nach Isolation von NK-Zellen zeigen, dass NK-Zellen auf *in vitro*-Stimulation mit Calcitriol mit veränderter Expression von Rezeptoren reagierten. Während Rezeptoren, die die Antikörper-unabhängige Zytotoxizität stimulieren, vermehrt exprimiert wurden, waren inhibitorische Rezeptoren vermindert. Diese Ergebnisse deckten sich auch mit verbesserten Lyseraten im Rahmen von Assays der gleichen Arbeitsgruppe zur AICC gegenüber sensiblen Tumorzellen [65].

Neben diesen Hinweisen auf eine direkte Vitamin D-Wirkung auf NK-Zellen bleibt jedoch auch eine parallele indirekte Vermittlung des Vitamin D-Effekts über andere Immunzellen *in vivo* denkbar. Wie in Kapitel 2.2.3. (S.19) näher erläutert, interagieren NK-Zellen stark mit anderen Immunzellen wie Makrophagen und Dendritischen Zellen. Für diese Immunzellen konnte VDR-Expression bereits gezeigt werden (s. o.).

So stellten Neumann et al. in einer Interventionsstudie zur NK-Zytotoxizität nach *in vivo*-Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation fest, dass die zelluläre Zytotoxizität, sowohl AICC als auch ADCC, mit dem Vitamin D-Status positiv assoziiert war [2, 3]. In einer anschließenden Auswertung nach Geschlecht zeigte sich jedoch ein Unterschied im Vitamin D-Effekt. Unter den männlichen Probanden nämlich fiel der Anstieg nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation, im Gegensatz zu den weiblichen Probandinnen, bei geschlechtergetrennter Betrachtung nicht signifikant aus. In dieser *in vitro*-Untersuchung stellte sich im Gegensatz zu den Vitamin D-Cut-off-Werten von 8 bzw 20 ng/ml, welche in den klinischen Antikörpertherapiestudien bei NHL gewählt wurden (s. Kapitel 2.1.3., S.14), ein deutlich höheres 25(OH)D-Serumlevel von 65 ng/ml als optimaler Wirkungszielbereich für die ADCC dar [2].

Auch in einer Querschnittsstudie an über 90-Jährigen zeigten Mariani et al. (1999) eine Assoziation zwischen

Vitamin D-Spiegeln und der Anzahl peripher zirkulierender CD16<sup>+</sup> NK-Zellen, sowie eine mäßige Korrelation zur AICC auf Zellebene. Dabei konnte jedoch keine Interferenz von Geschlecht mit dem Vitamin D-Effekt ausgemacht werden [38].

## **2.4 Sexualhormone**

Die Funktion des Immunsystems hängt neben vielen anderen Faktoren auch vom Geschlecht ab, und dieser Faktor kann das Entstehen oder Bekämpfen bestimmter Erkrankungen begünstigen oder erschweren [66]. So ist z. B. gemeinhin bekannt, dass Männer von Infektionen härter getroffen werden und das Outcome von jungen Männern mit Schock oder Sepsis deutlich schlechter ist als das von Frauen [66–68]. Einige genetische Immundefekte werden X-chromosomal vererbt und betreffen daher faktisch kaum Mädchen. Gleichzeitig erkranken Frauen an den meisten Autoimmunkrankheiten deutlich häufiger als Männer [43, 67]. Schwangerschaften, in deren Rahmen massive Umstellungen im Hormonhaushalt stattfinden, haben dabei je nach Grunderkrankung einen regelhaft positiven oder negativen Einfluss auf die Erkrankungsschwere [69]. Viele für die Immunfunktion wichtige Gene liegen auf dem X-Chromosom oder unterliegen sexualhormoneller Regulation [43, 44, 69].

Zur Erklärung geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Medizin empfiehlt man in der Gender Medizin neben anatomischen u. a. auch soziale, chromosomale sowie hormonelle Ursachen in Betracht zu ziehen [44, 66, 67, 69]. Auch das Alter der Erkrankten sollte dabei mit einbezogen werden, da Geschlechtsunterschiede je nach Alter unterschiedlich ausfallen können (s. Kapitel 2.2.4., S.20). Das Zusammenspiel beider Entitäten ist jedoch noch nicht ausreichend untersucht [35].

Da dieses Kapitel im Folgenden insbesondere von Sexualhormonen und weniger vom anatomischen Geschlecht handelt, finden sich Informationen zu Studien, welche den Einfluss des anatomischen Geschlechts auf Antikörpertherapien bzw. NK-Zellen untersuchten, in den entsprechenden anderen Kapiteln. Ein Anliegen in meiner Arbeit ist es mir schließlich, zwischen Geschlecht und Sexualhormonen sowie deren Assoziation mit Unterschieden im Immunsystem konsequent zu differenzieren. Da in einigen Publikationen zum Thema diese Entitäten leider nicht hinreichend unterschieden werden, gestaltete sich die Literaturlauswahl und -interpretation schwierig.

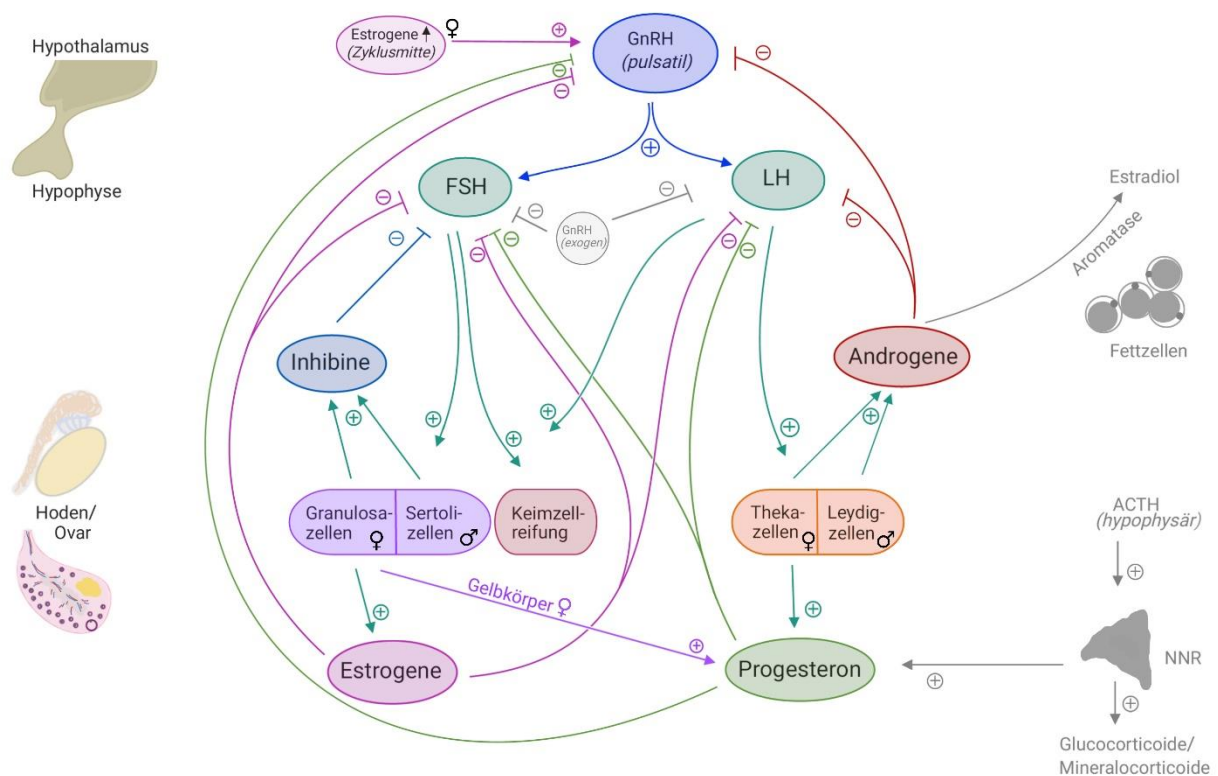
### **2.4.1 Sexualhormoneller Regelkreis und Sexualhormone**

Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH), vom Hypothalamus gebildet und pulsatil ausgeschüttet, regt in der Hypophyse die Sekretion von Luteinisierendem Hormon (LH) und Follikelstimulierendem Hormon (FSH) an. FSH fördert beim Mann die Spermatogenese, bei der Frau die Follikelreifung und Estrogensynthese [4]. LH fördert die Androgensynthese in den Leydigzellen des Mannes und den Thekazellen der Frau sowie in gewissem Maß die Progesteronsynthese [4, 41, 70]. Der LH-Peak im weiblichen Zyklus löst die Ovulation aus [4].

Estradiol übt unterhalb einer kritischen Konzentration ein negatives Feedback auf die Sekretion von GnRH, FSH und LH aus. Oberhalb der kritischen Konzentration jedoch, etwa während der Zyklusmitte einer fertilen Frau, übt Estradiol ein positives Feedback auf die GnRH-Sekretion des Hypothalamus aus, und führt somit zu einer Erhöhung der FSH- und LH- Spiegel [4]. Testosteron hemmt, aromatisiert zu Estradiol, die GnRH- und LH-Sekretion [4, 41, 71, 72]. Progesteron hemmt ebenfalls die LH-, FSH- sowie GnRH-Sekretion [4, 41]. Die Synthese von Progesteron kann jedoch auch unabhängig vom Sexualhormonellen Regelkreis reguliert werden. Adrenal wird es größtenteils Adrenocorticotropin (ACTH)-abhängig gebildet [70].

Daneben gibt es noch andere Hormone, welche in den Regelkreis eingreifen, zum Beispiel Inhibine. Diese werden in den Granulosazellen (♀) bzw. Sertolizellen (♂) FSH-abhängig gebildet und üben ein negatives Feedback auf die FSH-Sekretion aus [4].

Zwischen dem 45. und dem 55. Lebensjahr erleben Frauen i. d. R. ihre Menopause, also ihren letzten Zyklus, im Mittel jedoch im Alter von 51 Jahren. Wegen des Abfalls der Inhibin- und Estradiolsekretion im Ovar und des konsekutiven Ausfalls des negativen Feedbacks kommt es dabei zu einem kompensatorischen Anstieg der hypophysären FSH- als auch LH-Sekretion. Der FSH-Spiegel erreicht erst ein Jahr nach der Menopause sein Maximum und stabilisiert sich nach drei bis sechs Jahren wieder [41].



**Abbildung 4: Sexualhormoneller Regelkreis**

GnRH (=Gonadoliberin) aus dem Hypothalamus, pulsatil freigesetzt, stimuliert die Freisetzung von FSH (=Follikelstimulierendes Hormon) und LH (Luteinisierendes Hormon) aus der Hypophyse. Diese wirken stimulierend auf die Gonaden und die Sexualhormonsynthese.

Über negatives Feedback hemmen die Sexualhormone sowie die Inhibine die GnRH-, LH- und FSH-Sekretion.

Zur Zyklusmitte erwirken hohe Spiegel an Estrogenen bei der Frau ein positives Feedback am Hypothalamus. Die Progesteronsynthese erfolgt außerhalb des sexualhormonellen Regelkreises auch ACTH-(Adrenocorticotropin)-abhängig in der Nebennierenrinde (=NNR). Estradiol kann bei beiden Geschlechtern in Fettzellen aus Testosteron über Aromatisierung gebildet werden.

Exogen zugeführtes, nicht pulsatil verabreichtes GnRH hemmt die LH- und FSH-Sekretion auf Hypophysenebene mit konsekutiver Suppression der Sexualhormonsynthese.

♀ = nur bei fertilen Frauen. ♂ = nur bei Männern. Positive Effekte sind mit Pfeilen und Plusymbol, negative Effekte mit Minussymbol und Stop-Strich abgebildet.

### 2.4.1.1 Weibliche Sexualhormone

Estrogene werden bei Frauen in der fertilen Phase vor allem im Ovar synthetisiert. Beim Mann und postmenopausalen Frauen entsteht Estradiol hauptsächlich über periphere Aromatisierung von Testosteron im Fettgewebe [41].

Zu Beginn eines weiblichen Fertilitätszyklus, in der frühen Follikelphase, finden sich bei jungen Frauen die niedrigsten Estradiolserumwerte (durchschnittlich 0,06 ng/ml), in der späten Follikelphase, kurz vor dem Eisprung, die höchsten (ca. 0,33-0,7 ng/ml) [41, 73]. Postmenopausal sind insbesondere die ersten zwölf Monate



von einem starken Estrogenabfall gekennzeichnet [41]. Fünf bis zehn Jahre postmenopausal pendelt sich das durchschnittliche Estradiolserumlevel dann auf einen Wert von  $< 0,03$  ng/ml ein [73]. Dies entspricht in etwa den durchschnittlichen Estradiolspiegeln von Männern. Der Serumspiegel bleibt bei Männern im Alter weitestgehend gleich. Vergleicht man ihn jedoch mit jenem postmenopausaler Frauen gleichen Alters, sind die Estrogenlevel unter Männern sogar etwas höher [42].

Progesteron wird bei der Frau in der fertilen Lebensphase zyklisch in großen Mengen vom Gelbkörper sezerniert [4]. Zum Anfang eines neuen Zyklus sinkt der Serumspiegel auf nahezu vergleichbare Werte mit postmenopausalen und männlichen Progesteronwerten ( $< 0,3$  ng/ml) ab [41, 73–75]. Die höchsten Progesteronspiegel mit Peaks der 10fachen Konzentration lassen sich in der zweiten Hälfte des weiblichen Menstruationszyklus messen (Referenzbereich 3–30 ng/ml, durchschnittlich 11,3 ng/ml) [41, 73]. Außerhalb des Gelbkörpers wird Progesteron bei beiden Geschlechtern altersunabhängig v. a. in der Nebennierenrinde gebildet [70, 74].

### **2.4.1.2 Männliche Sexualhormone**

Während sich der Hormonhaushalt von Estrogenen und Progesteron bei Männern und Frauen mit dem Alter angleicht, bleiben Unterschiede im Androgenhaushalt bis zum Lebensende bestehen. Die beiden wirksamsten Androgene sind Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT) [41].

Testosteron wird bei Frauen insbesondere ovariell, bei Männern insbesondere testikulär synthetisiert, nur ein kleiner Teil ist adrenalen Ursprungs [71, 72]. Die Sekretion von Testosteron erfolgt in zirkadianer Rhythmik, mit einem Peak am Morgen [42, 71]. Die irreversible Metabolisierung von Testosteron zu DHT erfolgt durch das Enzym  $5\alpha$ -Reduktase [41]. Kleinere Mengen vom aktiven DHT werden im Hoden gebildet, größtenteils findet die Umwandlung zu DHT jedoch in den Zielgeweben statt [42]. Das Enzym  $5\alpha$ -Reduktase hat zwei Isoformen, die gewebsspezifisch exprimiert werden. Typ I wird vor allem in der Leber und extraurogenital exprimiert, Typ II in der Genitalhaut und im männlichem Urogenitaltrakt [41].

Abgebaut wird Testosteron in der Leber mittels Glukoronidierung oder Sulfatierung und anschließend hauptsächlich über die Niere ausgeschieden [71]. Nur 5–8 % des Testosterons werden vor Eliminierung zu DHT metabolisiert. Im Gegensatz zu Testosteron wird DHT größtenteils noch intrazellulär am Wirkort mittels einer  $3\alpha$ -Ketoreduktase zu  $3\alpha$ -Androstandiol abgebaut und glukoronidiert.  $3\alpha$ -Androstandiolglukuronid ist schließlich der Hauptmetabolit von DHT und im Plasma messbar [41].

Normale Testosteronserumspiegel liegen bei Frauen durchschnittlich bei 0,26 ng/ml (Ref.  $< 0,6$  ng/ml), bei Männern zwischen 3,5 und 8,6 ng/ml [41, 71]. Ein höherer Plasmaspiegel bedeutet dabei nicht eine stärkere Androgenwirkung. Entscheidend für die Wirkung im Organismus sind die Menge an bioverfügbarem Testosteron (freies Testosteron und albumingebundenes, s. u. Kapitel 2.4.2., S.31), die Expression der  $5\alpha$ -Reduktase im Zielgewebe, sowie die Expression eines Rezeptors und ein zellspezifischer Besatz mit Ko-Aktivatoren und -Repressoren [41, 42].

Bei Männern sinkt der Testosteronspiegel kontinuierlich mit dem Alter ab, jedoch nicht auf vergleichbare Werte gleichaltriger Frauen. Kaufman et al. arbeiteten in ihrem Review heraus, dass ab dem mittleren bis höheren Alter, spätestens jedoch mit 60 Jahren, ein zunehmend größerer Anteil der Männer ein Serumlevel an bioverfügbarem Testosteron unter dem Normwert vorweist. Gleichzeitig ist jedoch die interindividuelle Variabilität sehr groß [42].

### 2.4.2 Transportproteine

Der Transport der Sexualhormone über das Blut erfolgt proteingebunden. Testosteron wird im Blut teils schwach gebunden an Albumin, größeren Teils stark gebunden an Sexualhormonbindendes Globulin (SHGB) transportiert. Estrogen wird im Blut ebenfalls teilweise über SHBG transportiert, bindet an dieses allerdings schwächer als Testosteron [42]. So liegen ca. 60 % des Estradiol an Albumin gebunden vor [76]. Etwa 1 % des Estradiols und des Testosterons im Blut liegen ungebunden vor [41]. Die SHGB-Synthese selbst wird durch Sexualhormone ebenfalls beeinflusst. Sie wird durch Testosteron inhibiert und durch Estrogene stimuliert [71]. In der Schwangerschaft steigt der SHGB-Spiegel [76]. Sinkt die Menge an zirkulierendem SHGB, z. B. in der Postmenopause [41], oder würde Testosteron auf anderem Wege aus den Proteinbindungen verdrängt, könnte es zu einem Anstieg an freiem Testosteron kommen. Die klinische Aussagekraft einer SHGB-Messung zur Abschätzung von freiem Testosteron ist jedoch umstritten [71].

Die Funktion von SHGB wurde lange Zeit ausschließlich im Transport der Sexualhormone gesehen. Mittlerweile deuten jedoch immer mehr Ergebnisse darauf hin, dass SHGB selbst in die nichtgenomische Signaltransduktion der Sexualhormone eingebunden ist [76].

Der Transport von Progesteron im Blut erfolgt, im Gegensatz zu Estradiol und Testosteron, zu 80 % über Albumin und zu 18 % über Transkortin. Transkortin kann nur in geringem Maße Estradiol und Testosteron binden und zeigt hohe Affinität für Kortisol und Progesteron. Transkortin ist das Haupttransportprotein im Blut für Kortisol und bindet 75 % des zirkulierenden Kortisols. Hohe Spiegel an Progesteron könnten also Kortisol aus der Plasmaproteinbindung verdrängen und darüber zusätzliche Wirkung entfalten [41].

### 2.4.3 Hormonrezeptoren

Sexualhormone gehören zu den Steroidhormonen und binden klassischerweise an die sogenannten Waisenrezeptoren (orphan receptors), die sich intrazellulär in einem Gleichgewicht zwischen Zytosol und Zellkern befinden. Durch Bindung des entsprechenden Steroids dissoziieren sie von Konglomeraten mit intrazellulären Proteinen und können in den Zellkern transloziert werden. Unter Homo- oder Heterodimerisierung können sie dort als Transkriptionsfaktoren an die entsprechenden Hormon-responsiven Elemente (HREs) binden und unter Beeinflussung von Ko-Aktivatoren oder -Repressoren die Gentranskription hemmend oder stimulierend beeinflussen [41]. Sie können allerdings auch unabhängig von ihren HREs mit anderen Transkriptionsfaktoren

wie NF- $\kappa$ B interagieren und somit die Transkription von Genen beeinflussen, welche kein spezifisches HRE aufweisen [41, 77].

Zusätzlich können Sexualhormonrezeptoren auch mit Ko-Faktoren von NF- $\kappa$ B interagieren, und auf Transkriptionsebene teils antagonistische, im Fall von Estradiol ggf. auch ko-verstärkende Effekte auf die NF- $\kappa$ B-Wirkung ausüben [78].

Zu den Waisenrezeptoren gehören die überwiegend im Zellkern lokalisierten, estradiolbindenden Estrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$ , die progesteronbindenden Isoformen des Progesteronrezeptors PR-A und PR-B, sowie der (dihydro)testosteronbindende Androgenrezeptor (AR). Letztgenannter befindet sich in inaktivem Zustand vornehmlich im Zytosol [41, 42].

Von PR-A wird vermutet, dass er durch Inhibition der Transkription anderer Steroidhormonrezeptoren funktionell antagonistisch zu diesen Steroiden wirkt [41]. Progesteron kann außerdem in geringfügigem Maße auch an den Glucocorticoidrezeptor (GR) sowie den Mineralocorticoidrezeptor binden [77].

An den AR bindet DHT deutlich stärker als Testosteron [4, 41, 42]. Neben der klassischen Homodimerisation können AR und GR auch einen Heterodimer bilden und sich dadurch gegenseitig hemmen [42, 44, 77, 79]. Interessanterweise liegt die den intrazellulären AR codierende DNA auf dem X-Chromosom, während die Informationen für die anderen intrazellulären Sexualhormonrezeptoren auf Autosomen liegen [44, 80].

Einen alternativen Signalweg kann Testosteron allerdings auch über die Metabolisierung zu Estradiol auslösen [42, 67]. Etwa 0,2 % des Testosterons werden bei Männern mittels Aromatase zu Estradiol metabolisiert [42]. Dadurch könnte das Hormon auch in Zellen, die zwar keinen AR, aber einen Estrogenrezeptor exprimieren, eine direkte Wirkung entfalten, sofern eine Aromatase vorhanden ist. Bereits bekannt ist dieser Signalweg bei der Mineralisierung von Knochen [71].

Neben den "klassischen" Waisenrezeptoren weiß man mittlerweile auch von der Existenz von membranständigen Rezeptoren für alle drei aufgeführten Sexualhormone, mittels derer schnellere Signale übermitteln werden können [41, 42, 81].

#### **2.4.4 Wirkungen auf das Immunsystem**

Expression von Sexualhormonrezeptoren konnte bereits für viele Immunzellen nachgewiesen werden [81–85]. Nachweise finden sich u. a. für intrazelluläre ER in B-Zellen, T-Zellen und NK Zellen; für den membranständigen ER in T-Zellen und Makrophagen; für den intrazellulären AR in T-Zellen (bei diesen möglicherweise jedoch nicht transkriptiv aktiv), B-Zellen und Makrophagen; für den membranständigen AR in Makrophagen und T-Zellen [81, 84, 85].

Im Allgemeinen besteht die Hypothese, dass Androgene immunsuppressiv bzw. anti-inflammatorisch wirken, während zur Wirkung von Estradiol auf das Immunsystem verschiedene Theorien existieren [44, 77, 86]. Ein Standpunkt, wie von Bereshchenko et al. vertreten, nach welchem Estradiol nicht einseitige, sondern komplexe

Effekte hervorruft, scheint daher der sinnvollste Ansatz. Demnach hängt die entweder pro- oder antiinflammatorische Wirkung von der Gesamtsituation und den speziellen Eigenschaften der untersuchten Zelle ab. So schreiben Bereshchenko et al. : „Estrogens were shown to exert both, anti- and pro- inflammatory effects, depending on the context and combination of factors that include: the type of the immune cell target, the concentration of the hormone, the type of immune stimulus (foreign or auto- antigens), the target organ micro-environment, and the relative expression of ER $\alpha$  and ER $\beta$ “ [77]. Balogh et al. zeigten außerdem, dass neben dem zellspezifischen Besatz mit den klassischen Hormonrezeptoren auch SHGB in die nicht-genomische Signaltransduktionen in Lymphozyten eingreifen kann [76]. Dies könnte weitere Erklärungsmöglichkeiten für die kontextabhängig divergierende Wirkung von Estradiol bieten. Die Expression von SHGB wurde bereits in einigen Immunzellen nachgewiesen [76].

Die allgemeine immunsuppressive Wirkung von Testosteron wird hingegen meist auf eine Veränderung der pro- und antiinflammatorischen Signale zurückgeführt. Dies scheint über Modulation der Expression entsprechender Mediatoren insbesondere bei Makrophagen sowie T-Zellen vermittelt zu werden [77]. Makrophagen tragen sowohl intrazelluläre als auch membranständige Sexualhormonrezeptoren, sowohl für Estradiol als auch für Testosteron [42, 81–83, 85].

Diverse *in vitro* Untersuchungen zeigten einen breiten supprimierenden Effekt von Testosteron auf Makrophagen. So hemmt es *in vitro* die Proliferation und verstärkt Apoptose. Estradiol scheint dagegen einen Schutz vor Apoptosestimuli zu bieten [78]. In einigen Studien zeigte sich außerdem eine Einschränkung der Funktionalität von Makrophagen unter Testosteroneinfluss, z. B. durch verminderte Expression von TLR4 einhergehend mit verminderter TNF- $\alpha$  Antwort, oder durch supprimierte Abwehrmechanismen, wie verringerter Produktion der inducible nitric oxide Synthase (iNOS) oder dem antimikrobiellen Peptid Cathelicidin [83, 87, 88].

Progesteron übt auf Immunzellen vor allem suppressive Effekte aus, möglicherweise auch über Inhibierung von NF- $\kappa$ B [44, 77, 86]. Dies verwundert in Anbetracht der synergistischen Effekte und Ähnlichkeiten des Progesterons mit den Glukokortikoiden nicht. Wie bereits erwähnt, wird Progesteron (wie Kortisol) nämlich teilweise ACTH-abhängig gebildet, kann Kortisol aus der Plasmaproteinbindung an das Kortisoltransportprotein Transkortin verdrängen, wirkt wie Kortisol antagonistisch auf die NF- $\kappa$ B Signalkaskade, und kann in geringem Maße auch selbst an den Glucocorticoidrezeptor binden [41, 70, 77].

#### **2.4.4.1 Modulation des Zytokinmilieus**

Geschlechtsspezifische Unterschiede im Zytokingleichgewicht wurden vielfach publiziert, in anderen Reviews wiederum infrage gestellt [43, 44, 89]. Estradiol kann unter bestimmten Umständen eine TH1-, unter anderen Umständen eine TH2-typische Zytokinantwort fördern [77, 86]. Mehrfach publiziert ist eine Erhöhung der IFN- $\gamma$  Produktion in den entsprechenden Immunzellen [77, 90].

Wie voran beschrieben (s. Kapitel 2.4.4., s.o.), sind Makrophagen möglicherweise wichtige Vermittler immunmodulatorischer Effekte von Testosteron. Mehrere Studien der letzten Jahre an Probanden mit männlichem

Hypogonadismus oder an Probanden mit Erkrankungen, welche mit chronischer Inflammation assoziiert sind, sowie Studien mit *in vitro*-Experimenten an isolierten Immunzellpopulationen untersuchten in diesem Zusammenhang Serumlevel von verschiedenen Zytokinen, wie z. B. der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CRP und dem antiinflammatorischen Zytokin IL-10. Die Ergebnisse dieser Studien sprechen übereinstimmend für einen signifikant negativen Einfluss von Testosteron auf IL-1 $\beta$  [91–94]. TNF- $\alpha$  war bei einigen Studien ebenfalls mit Testosteron negativ assoziiert [91, 93–95]. In der Studie von Nettleship et al. mit Männern mit koronarer Herzerkrankung gab es dazu jedoch gegensätzliche Ergebnisse [92]. Widersprüchlich waren Ergebnisse auch über einen möglichen negativen Einfluss von Testosteron auf CRP und IL-6 [91, 92, 94]. Ebenso wurde Testosteron ein fördernder Effekt auf IL-10 zugeschrieben [82, 93]. In einigen Studien konnte jedoch keine signifikante Testosteronabhängigkeit der IL-10 Expression gezeigt werden, was die widersprüchliche Studienlage diesbezüglich offenbart [92, 94, 96]. Diverse andere Zytokine wurden in einzelnen Studien ebenfalls untersucht. Erwähnenswert sind in diesem Zusammenhange erste Hinweise auf eine testosteronvermittelte Suppression von IFN- $\gamma$  und dem Chemokin MIP1 $\alpha$  [95, 96].

## 2.4.5 Wirkungen auf Natürliche Killer-Zellen

Die Studienlage zum Effekt von Sexualhormonen auf NK-Zellen ist nicht umfangreich genug, um belastbare Aussagen treffen zu können. Zu den in NK-Zellen nachgewiesenen Sexualhormonrezeptoren zählen zum aktuellen Zeitpunkt nur die intrazellulären ER $\alpha$  und ER $\beta$  [84, 97] (s. Kapitel 2.4.5.2, S.35). Da Effekte von Sexualhormonen nach neueren Kenntnissen zudem konzentrationsabhängig diametral ausfallen könnten (s. o.), sind generalisierende Schlussfolgerungen aus den vorhandenen Publikationen schwierig. Untersucht wurden bisher Effekte auf die natürliche Antikörper-unabhängige Aktivität (AICC), die Antikörper-abhängige ADCC, Populationsgröße, Proliferation und IFN- $\gamma$ -Produktion.

### 2.4.5.1 Studien mit Hormonstatusveränderungen *in vivo*

In einer Erhebung aus dem Jahr 1999 an über 90-Jährigen fanden Mariani et al. keinen Zusammenhang von Sexualhormonen und NK-Aktivität [38]. Mehrere Studien mit Mäusen postulierten hingegen übereinstimmend eine reduzierte AICC unter Estradiol- oder Testosteronbehandlung *in vivo* [98–100]. Während die AICC bei Mäusen unter Estradioleinfluss *in vivo* also reduziert ist, scheint das gleiche Hormon die Produktion von IFN- $\gamma$  jedoch in NK-Zellen aus der Milz signifikant zu erhöhen [98]. In einer Untersuchung aus dem Jahr 1988 von Hou et al. zeigte sich hingegen keine Minderung der ADCC bei Mäusen unter Estradiol- oder Testosteronbehandlung *in vivo* [99].

Progesteron wird ebenfalls ein supprimierender Effekt auf die NK-Zellaktivität zugeschrieben [86].

Ob die Populationsgröße, also die Anzahl peripher zirkulierender NK-Zellen, mit Estradiol- und Testosteronserumspiegeln assoziiert ist, wird ebenfalls kontrovers diskutiert. So fand sich in der oben zitierten Studie von Mariani et al. bei über 90-Jährigen ein deutlich positiver Zusammenhang zwischen der Anzahl an NK-Zellen

und DHT, nicht aber mit freiem Testosteron oder Estradiol [38]. Im murinen Experiment hingegen stellten Hao et al. einen stimulierenden Effekt einer *in vivo*-Behandlung mit Estradiol auf die Anzahl von NK-Zellen in der Milz fest [98].

### 2.4.5.2 *In vitro*-Hormonstudien

Ob bei *in vitro* Inkubation mit Sexualhormonen ebenfalls sichere Effekte auf NK-Zellen gemessen werden können, ist nicht abschließend zu beantworten. Während mehrere Studien für eine Estrogen-Sensibilität der NK-Zellen sprechen, fehlen ähnliche Ergebnisse in Bezug auf Testosteron.

In *murinen* NK-Zellen konnten von Curran et al. 2001 sowohl ER $\alpha$  als auch ER $\beta$  nachgewiesen werden [97]. 2010 publizierten Pierdominici et al. Ergebnisse, die die Existenz beider Isoformen auch in *humanen* CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, isoliert aus Leukozyten aus peripherem Blut (PBL) männlicher Spender, nachwiesen. Sie lieferten auch starke Hinweise darauf, dass dieser NK-Subtyp auch einen membranständigen Estrogenrezeptor exprimiert: Stimulation mit nicht-membranpermeablem Estradiol führte zu signifikant erhöhter IFN- $\gamma$  Produktion [84].

Sorachi et al. publizierten 1993 eine Studie, bei welcher sie *humane* CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup> NK-Zellen der Linie YT-N17 sowie „Large Granular Lymphocytes“ aus PBL männlicher Spender für 48 Stunden *in vitro* mit Estradiol inkubierten. In getrennten Assays zeigten sich sowohl eine AICC gegen Targetzellen der Linie K562 als auch Proliferation der NK-Zellen erhöht. Die Inkubation mit Progesteron oder Testosteron zeigte dagegen keinen Effekt [101].

In der Literatur fand sich kein Nachweis einer Expression eines Androgenrezeptors in NK-Zellen, jedoch Hinweise auf eine mögliche indirekte Vermittlung einer Testosteronwirkung über andere Zellen. Hou et al. publizierten 1988 Untersuchungen des *in vitro*-Effekts von Estrogen und Testosteron auf die *murine* AICC. An Milzzellsuspensionen, die 12 Stunden *in vitro* mit einem Sexualhormon vorinkubiert wurden, konnten keine Effekte auf die AICC gemessen werden [99]. Hier lagen jedoch keine reinen NK-Zellen vor. NK-Zellen aus der Milz sind größtenteils CD56<sup>dim</sup>/CD16<sup>+</sup>. Auch auf die ADCC hatte eine *in vitro* Inkubation mit den beiden Sexualhormonen, so wie auch bei der *in vivo* Behandlung (s. o., S.34), keinen Einfluss. Eine *in vivo* Behandlung über zwei bis sechs Wochen (s. o., S.34) führte jedoch bei beiden Hormonen zu reduzierter AICC [99]. Da NK-Zellen eng mit anderen Immunzellen, z. B. Makrophagen, interagieren, ist folglich die indirekte Vermittlung einer Androgenwirkung auf NK-Zellen über andere Immunzellen denkbar (s. Kapitel 2.2.3., S.19).

## **2.5 Prostatakarzinom**

Zirka 13 % aller Männer erkranken im Laufe ihres Lebens an Prostatakrebs [72]. Damit ist das Prostatakarzinom die zweithäufigste Krebserkrankung unter Männern, und stellt gleichzeitig auch die dritthäufigste Tumortodesursache unter Männern in Deutschland dar [72, 79]. Durch verbesserte kurative Therapien und Früherkennungsuntersuchungen (in Deutschland ab 45 Jahren) konnte die Sterberate in entwickelten Ländern deutlich verbessert werden [72].

Als Risikofaktor ist insbesondere das Alter bekannt, wobei zusätzlich neben genetischen auch hormonelle Faktoren diskutiert werden. So werden männliche Geschlechtshormone als primäre Bedingung für die Entstehung des Prostatakarzinoms postuliert [72, 79]. Der Erkrankungsgipfel liegt im Alter von 70 Jahren, wobei sich die meisten Patienten (ca. 80 %) zum Zeitpunkt der Diagnose noch in einem frühen, lokalen Tumorstadium befinden [72].

Da die Tumorprogression bei einigen Patienten sehr langsam verläuft, orientieren sich Therapieempfehlungen zum Prostatakarzinom sehr stark an individuell vorliegenden Komorbiditäten sowie Patientenwünschen in Anbetracht möglicher Einschränkungen der Lebensqualität. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es in allen Tumorstadien verschiedene evidenzbasierte therapeutische Optionen gibt, und das Vorgehen nicht einheitlich, sondern individualisiert gestaltet wird [72].

In frühen Tumorstadien ist das "aktive Überwachen" ein weit verbreitetes Vorgehen, da Therapien auch mit erheblichen Lebensqualitätseinschränkungen einher gehen können. Als kurative Ansätze kommen in frühen Stadien insbesondere die radikale Prostatektomie sowie verschiedene Formen von Strahlentherapien infrage, teilweise (neo-)adjuvant begleitet von Androgendeprivationstherapien (Hormontherapien). In weiter fortgeschrittenen, insbesondere palliativen Erkrankungsstadien steht zunächst die dauerhafte Hormontherapie im Vordergrund. Eine chirurgische Tumorreduktion kann ebenfalls eine Prognoseverbesserung bieten [72]. Einige Prostatakarzinome sprechen auf Androgendeprivation jedoch nicht an oder werden später "kastrationsresistent" [72, 79]. In diesen Fällen kann eine Überlebenszeitverlängerung durch Umstellung der Hormontherapie auf andere Präparate oder Wirkmechanismen oder durch Ergänzung einer taxanhaltigen Chemotherapie erreicht werden [72].

### **2.5.1 Androgendeprivationstherapie**

Hormontherapien werden insbesondere in lokal fortgeschrittenen Stadien und als Dauertherapie bei metastasierten Stadien angewendet [72]. Grundlage dafür ist die Erkenntnis, dass Prostatazellen androgenabhängig sind und unter Androgenentzug den programmierten Zelltod einleiten [72, 79]. Androgendeprivationstherapie kann daher den Krankheitsprogress mit konsekutiven Komplikationen verlangsamen und möglicherweise lebensverlängernd wirken [72].

Am häufigsten werden dabei Gonadoliberein (GnRH)-Analoge, wie z. B. Leuprorelin eingesetzt [72, 79]. Diese

führen bei initialer Gabe in den ersten Tagen zunächst zu einer erhöhten Sekretion von FSH und LH in der Hypophyse, konsekutiv begleitet von einem initial erhöhten Testosteronspiegel [72, 102]. Wegen dieses initialen Testosteronspiegelanstiegs werden in den ersten Wochen i. d. R. Androgenrezeptorblocker verabreicht [72].

Durch Down-Regulation hypophysärer Rezeptoren kommt es anschließend zum Versagen der LH und FSH Sekretion, nach zwei bis vier Wochen sinkt der Testosteronspiegel auf Kastrationsniveau ab [72, 102]. Dieses ist definiert als  $< 0,5$  ng/ml bei hormoneller respektive  $< 0,2$  ng/ml bei chirurgischer Kastration (letztere wird kaum noch durchgeführt)<sup>1</sup>. Etwa 85 % der Patienten unter hormoneller Kastration erreichen sogar niedrigere Werte als  $< 0,2$  ng/ml. Ein ausbleibender konsekutiver PSA-Abfall kann nicht nur durch Kastrationsresistenz gegeben sein, sondern gelegentlich auch auf einen ungenügenden Testosteronabfall hinweisen [72].

Gleichzeitig mit dem Testosteronabfall kommt es auch zu einer fast gänzlichen Estrogendepletion [103].

## 2.5.2 Vitamin D-Substitution

Zirka 70 % der an Prostatakarzinom erkrankten Patienten in fortgeschrittenen Stadien leiden bereits an Knochenmetastasen. Durch das meist höhere Alter und die therapiebedingte Hormondepletion von Androgenen und Estradiol haben diese Patienten ein hohes Osteoporoserisiko [72]. Vorbeugend wird daher entsprechenden Patienten eine Prophylaxe mit Vitamin D und Kalzium empfohlen [72, 104].

---

1 Zum Vergleich hier noch einmal die Normwerte von Testosteron bei gesunden Männern ohne Therapie: 3,5-8,6 ng/ml [71]. Frauen haben im Mittel Spiegel von 0,26 ng/ml (Ref.  $< 0,6$  ng/ml) [41, 71].



## **2.6 Zielsetzung der Arbeit**

Bei den Antikörpertherapien einiger B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome wie auch bei vielen anderen Krebserkrankungen konnte in den letzten Jahren ein positiver Effekt von suffizienten 25(OH)D-Serumspiegeln auf die Prognose festgestellt werden (s. Kapitel 2.1.3., S.14). Wichtigste Effektorzellen für die ADCC sind nach heutigem Wissensstand NK-Zellen, sie kann aber auch von Makrophagen und anderen Immunzellen vermittelt werden [6, 11]. Experimentell bestätigte sich die Erkenntnis eines positiven Effekts von Vitamin D in Zytotoxizitäts-Assays sowohl mit NK-Zellen als auch mit Makrophagen, welche eine verbesserte ADCC nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation der Probanden *in vivo* bzw. Calcitriolinkubation *in vitro* aufzeigten [2, 62].

Interessanterweise ergab sich jedoch nach geschlechtergetrennter Betrachtung der Ergebnisse der RICOVER-60-Studie sowie den ADCC-Experimenten von Neumann et al., dass ein positiver Vitamin D-Effekt auf Antikörpertherapien bzw. experimentelle ADCC auf Frauen beschränkt war. Männer schienen von hohen 25(OH)D-Spiegeln weniger zu profitieren. Dies zeigte sich klinisch in einem längeren rezidivfreien Überleben sowie Gesamtüberleben der Frauen gegenüber den Männern der RICOVER-60-Studie mit 25(OH)D-Spiegeln über dem Insuffizienzbereich [1]. Experimentell wurde diese Erkenntnis durch Neumann et al. in ADCC-Assays mit NK-Zellen ergänzt, indem eine Veränderung der ADCC nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation nur bei Frauen signifikant größer ausfiel [2].

Basierend auf den Überlegungen der Gender-Medizin ließe sich eine solche Diskrepanz prinzipiell auf anatomische, chromosomale, hormonelle oder soziale Unterschiede zwischen den Geschlechtern als mögliche Ursachen zurückführen (s. Kapitel 2.4., S.27). Auch der Einfluss des "Alters" sollte stets in die Betrachtung aufgenommen werden, da sich das Verhältnis geschlechtsspezifischer Unterschiede im Rahmen der Seneszenz verändert (s. Kapitel 2.2.4., S.20).

Bisherige Studienergebnisse zu einer möglichen Geschlechterdisparität in der NK-Funktionalität stellen sich widersprüchlich dar (s. Kapitel 2.2.4., S.20). Gründe, wie solche Geschlechtsunterschiede bei den entsprechenden Studien zustande kommen können, sind ebenfalls nicht geklärt.

In den letzten Jahren haben jedoch vielfältige Untersuchungen gezeigt, dass das Immunsystem durch Sexualhormone tiefgreifend modulierbar ist [77]. Dieser Erkenntnis folgend stellte sich im Rahmen der Vorbereitung meiner Arbeit zunächst die Frage, welches Sexualhormon am wahrscheinlichsten für die Geschlechtsunterschiede in den ADCC-Assays von Neumann et al. ursächlich sein könnte. In Anbetracht des Alters der Probanden der ADCC-Studie [2] sowie der ebenfalls am UKS durchgeführten RICOVER-60-Studie [5] scheinen die weiblichen Sexualhormone weniger wahrscheinlich die Ursache, da sich Estrogen- und Progesteronspiegel zwischen Männern und Frauen über 60 Jahren kaum unterscheiden (s. Kapitel 2.4.1.1., S.29). Testosteronspiegelunterschiede hingegen bleiben bis ins hohe Alter bestehen [42].

---

Rezeptoren für Sexualhormone konnten bereits in vielen Immunzellen nachgewiesen werden (s. Kapitel 2.4.4., S.32). Die Modulation des Gleichgewichts im Immunsystem durch die Sexualhormone scheint jedoch nicht einheitlich oder unidirektional zu sein, sondern auch von Faktoren wie der jeweiligen Mikroumgebung oder auch Quantität und Dauer der Hormonexposition abzuhängen. Gleichzeitig können Effekte zelllinienspezifisch divergierend ausfallen [77]. Ein möglicher Zusammenhang der ADCC mit Sexualhormonen wurde gemäß Literaturrecherche nur einmal 1988 an murinen Milzzellsuspensionen untersucht [99]. Studien zur Antikörper-*unabhängigen* Aktivität muriner und humaner NK-Zellen sprechen jedoch dafür, dass die Funktionalität von NK-Zellen durch Sexualhormone beeinflusst wird [84, 86, 98–100].

Bei den Ergebnissen von Neumann et al. wurde jedoch genau genommen keine direkte Abhängigkeit der NK-Funktionalität vom Geschlecht oder von den Sexualhormonen festgestellt, sondern eine Interaktion von Geschlecht mit dem Vitamin D-Effekt auf die NK-ADCC [2]. Wie soeben bereits postuliert, könnten hormonelle Unterschiede zwischen den Geschlechtern, insbesondere das Sexualhormon Testosteron, die Ursache dafür sein. Aus Studien an Trophoblasten sowie an kastrationsresistenten Prostatakrebszellen ergaben sich in den letzten Jahren erste Hinweise darauf, wie Vitamin D und Testosteron miteinander interagieren können [88, 105]. Ob dies jedoch auch im Immunsystem der Fall ist, ist aktuell noch unzureichend geklärt.

Wegen des naheliegenden Testosteroneffekts bot sich für die aufkommende Fragestellung die Zusammenarbeit mit der Ambulanz der Klinik für Urologie an. Im Rahmen einer fortgeschrittenen Prostatakarzinomkrankung werden schließlich seit einigen Jahrzehnten viele Patienten mit androgendepletierenden Gonadoliberin (GnRH)-Analoga behandelt. Das mittlere Erkrankungsalter liegt beim Prostatakarzinom bei ca. 70 Jahren [72]. Damit zeigte das potenzielle Probandenkollektiv in Bezug auf das Alter als möglichen Einflussfaktor strukturelle Ähnlichkeiten mit den Kollektiven von Neumann et al. sowie der RICOVER-60-Studie [2, 5].

Diese Arbeit soll daher, in Anlehnung an die Doktorarbeit von Fabian Acker [3] (Doktorarbeit zum Paper von Neumann et al. 2018 [2]), dieses besonderes Patientenkollektiv in Augenschein nehmen, um hormonelle Beeinflussbarkeit der ADCC von NK-Zellen zu beleuchten. Dabei soll geprüft werden, ob NK-Zellen von männlichen Probanden unter Androgendepletionstherapie signifikant stärkere ADCC nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation auf hochnormale 25(OH)D-Spiegel von ca. 65 ng/ml entwickeln. Dies soll für die beiden gebräuchlichen Anti-CD20-Antikörper Rituximab und Obinutuzumab untersucht werden. Kann Androgendepletion den zunächst nur bei Frauen gemessenen stimulierenden Effekt von Vitamin D auf die ADCC von NK-Zellen “wiederherstellen”?

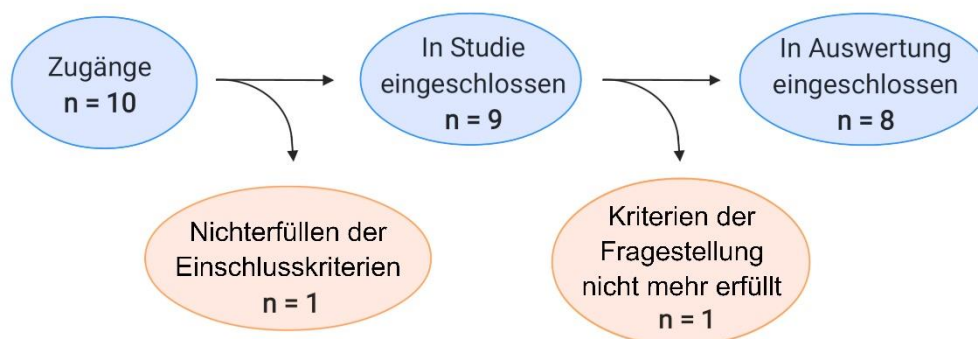
### **3 Methoden, Material, Probanden**

Die Arbeit sollte untersuchen, ob die NK-Zell-ADCC von männlichen Probanden unter chemischer Kastration nach Vitamin D-Supplementation auf hochnormale Werte von ca. 65 ng/ml signifikant ansteigen würde. Der Erhebungszeitraum, in dem die Versuche durchgeführt wurden, erstreckte sich von Anfang März bis Ende Mai 2019. Die Probandenrekrutierung erfolgte durch die Klinik für Urologie (UKS) und fand ausschließlich am Uniklinikum des Saarlandes statt. Blutentnahme und Versuchsdurchführung erfolgten durch die Klinik für Innere Medizin I (UKS). Hausintern wurden außerdem die 25(OH)D-Messungen durch das Zentrallabor (UKS) durchgeführt, und die Bereitstellung der Anti-CD20-Antikörper erfolgte durch die Klinikapotheke (UKS).

Das Vorhaben zur Durchführung der Studie wurde zuvor bei der klinikinternen Ethikkommission per Antrag eingereicht und erhielt ein positives Votum. Die entsprechende Nummer der Zustimmung der Ethikkommission ist 205/18.

#### **3.1 Probanden**

Vorgesehen war eine Rekrutierung von 15 Probanden. Insgesamt konnten im genannten Erhebungszeitraum jedoch nur 10 Probanden akquiriert werden. Davon wurde ein Proband wegen eines hohen initialen 25(OH)D-Spiegels noch vor Studieneinschluss abgewiesen. Ein anderer Proband musste später aus der Auswertung ausgeschlossen werden (s. Kapitel 4.2., S.60). Die Rekrutierung der Probanden erfolgte ausschließlich über die behandelnden Ärzte und Ärztinnen in der urologischen Ambulanz. Rekrutierung über die urologischen Stationen wurde von vorneherein ausgeschlossen, da die Gründe einer stationären Aufnahme von Prostatakarzinom-Patienten mit den Ausschlusskriterien der Studie zusammenfielen.



**Abbildung 5: Patientenflussdiagramm**

Einschlusskriterien für Probanden waren eine länger als vier Wochen laufende Gonadoliberin (GnRH)-Analogo-Therapie bei Erkrankung an Prostatakarzinom sowie Bereitschaft, Einwilligungsfähigkeit und schriftliche Einwilligung zur Studienteilnahme nach Aufklärung. Die Probanden mussten männlich, über 18 Jahre alt sein und sprachlich, mental und körperlich fähig sein, die Aufklärungsbögen selbstständig auszufüllen. Probanden erhielten vor der Aufklärung ein gesondertes Blatt zur Patienteninformation, welches im Besitz der Probanden verblieb.

Patienten wurden nicht in die Rekrutierung eingeschlossen, wenn sie in den sechs Monaten zuvor eine Therapie mit möglicher einhergehender Immunsuppression erhalten hatten, wie z. B. Chemotherapie, Radiotherapie, Kortisontherapie, Biologika etc. Auch eine schwere Infektion, wie z. B. eine Pneumonie, durfte in den vorangegangenen drei Monaten nicht vorliegen, da dies nachhallende Effekte auf die Funktion des Immunsystems haben kann. Patienten mit Krankheitsprogress der Krebserkrankung, schwerer Niereninsuffizienz oder Kalziumhomöostasestörung konnten ebenfalls nicht eingeschlossen werden. Angewandte Ausschlusskriterien in Bezug auf Vitamin D waren exzessiver Aufenthalt an der Sonne, eine regelmäßige Vitamin D-Einnahme, 25(OH)D-Spiegel über 20 ng/ml sowie eine bestehende Erdnussallergie. Das Ausschlusskriterium „Erdnussallergie“ konnte im Verlauf zurückgenommen werden, da neben dem erdnussöhlhaltigen Dekristol® seit wenigen Jahren in Deutschland ein zweites Medikament von Aristo auf Sojaölbasis in gleicher Dosierung und somit ähnlicher Darreichungsform erhältlich ist.

Der Erkrankungsgipfel des Prostatakarzinoms liegt bei ca. 70 Jahren [72]. Das mediane Alter der eingeschlossenen Probanden war 69,5 Jahre. Die meisten Probanden dieser Studie hatten einige Jahre vorher bereits eine Chemotherapie und/oder Strahlentherapie bekommen. Die GnRH-Analoga-Therapie lief bei den meisten Probanden schon länger als ein Jahr, bei zwei Probanden über sechs Monate, ein Proband wurde ein Monat nach Therapiebeginn eingeschlossen. Die chemische Kastration über GnRH-Analoga löst bei der ersten Gabe zunächst eine vermehrte Testosteronproduktion im Körper aus. Nach ca. drei, spätestens jedoch nach vier Wochen nach Therapiebeginn ist eine volle Testosteronsuppression zu erwarten [72, 102]. Begleitend erhielt der entsprechende, auf GnRH-Analoga neu eingestellte Proband bei Therapiebeginn leitliniengerecht eine Therapie mit Androgenrezeptor (AR)-Blockern.

Während der Erstkontakt und die Rekrutierung durch die behandelnden Ärzte und Ärztinnen der urologischen Ambulanz erfolgte, wurde die weitere Aufklärung durch meine Arbeitsgruppe in der Klinik für Innere I unter Aufsicht von Dr. Bittenbring übernommen.

Daten der Probanden wurden in pseudonymisierter Form abgespeichert. Zwecks Kontaktaufnahme und Verständigung zwischen den Kliniken wurden unter Wahrung der DG-SVO außerdem getrennt davon die patientenbezogenen Daten Name, Geburtsdatum, Anschrift und Kontaktmöglichkeit gespeichert. Auf einem getrennten Erhebungsbogen wurden für jedes Pseudonym außerdem Alter, Gewicht, Größe, bereits erfolgte Vitamin D-Supplementation, Infekt in den letzten drei Wochen, Vorliegen einer HIV- oder Hepatitis-Virus-Infektion, stattgehabte Chemotherapie oder Radiotherapie, zusätzliche bekannte Krebserkrankung in der Vergangenheit, Beginn der aktuellen antiandrogenen Therapie und gegebenenfalls Name des antiandrogenen

Medikaments, bekannte Allergie gegen Erdnuss oder Soja, sowie bekannte Niereninsuffizienz abgefragt. Dies diente einerseits als Checkliste, andererseits zur retrospektiven Identifikation von Störfaktoren (z. B. bei gehäuft hohem BMI).

Zur planmäßigen Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation erhielt jeder Proband ein individuell zugeschnittenes Supplementationschema am Tag der ersten Blutentnahme oder per Post (s. Kapitel 3.3.1., S.47).

## 3.2 Material und Geräte

### 3.2.1 Vitamin D-Präparat

Zur Vitamin D-Supplementation der Teilnehmenden wurde bevorzugt das Cholecalciferol-Präparat *Dekristol® 20.000 I.E.* der *mibe GmbH Arzneimittel* eingesetzt. Bei einem Probanden wurde aufgrund einer Erdnussallergie auf das Präparat *Colecalciferol Aristo® 20.000 I.E. Weichkapseln* der *Aristo Pharma GmbH* ausgewichen.

### 3.2.2 Chemikalien, Puffer, Medien und Lösungen

**Tabelle 1: Eingesetzte Chemikalien, Puffer, Medien und Lösungen mit Bezugsquellen**

Bezeichnung	Inhaltsstoffe / Bezugsquelle
<b>Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland Artikelnummer D8537-1L
<b>Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, 0,5 M)</b>	Life Technologies Europe BV Bleiswijk, Niederlande Artikelnummer 15575020
<b>Fetales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert</b>	Sigma Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland Artikelnummer F0804-500ML
<b>Humanes Serumalbumin (HSA), 20 %, salzarm</b>	CSL Behring GmbH Marburg, Deutschland Zulassungsnummer 10530a/96
<b>L-Glutamin (200 mM)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland Artikelnummer G7513-100ML
<b>Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)</b>	Sigma Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland Artikelnummer P0781-100ML
<b>RPMI-1640 (ohne Phenolrot, ohne L-Glutamin)</b>	PAN Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland Artikelnummer P04-16516
<b>X-Vivo™ 15 (ohne Phenolrot, ohne Gentamicin)</b>	Lonza SPRL Verviers, Belgien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Inhaltsstoffe / Bezugsquelle</b>
	Artikelnummer BE02-061Q
<b>Kulturmedium für DAUDI</b>	RPMI-1640 mit 10 % FCS 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
<b>ADCC-Medium</b>	X-Vivo™ 15 mit 2 % HSA 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
<b>Pancoll human (Dichte 1,077 g/ml)</b>	PAN Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland Artikelnummer P04-60500
<b>Cell Wash</b>	Becton Dickinson GmbH Heidelberg, Deutschland Artikelnummer 349524
<b>MACS®-Puffer</b>	15 ml PBS mit 0,5 % FCS 2 mM EDTA
<b>TRIzol™ Reagent</b>	Thermo Fisher Scientific Darmstadt, Deutschland Artikelnummer 15596-026
<b>Trypanblau 0,4 %ige Lösung</b>	SIGMA® Life Science / Merck KGaA Darmstadt, Deutschland Artikelnummer T8154

### 3.2.3 Antikörper und Enzyme

Tabelle 2: Eingesetzte Antikörper und Enzyme mit Bezugsquellen

Name	Zusammensetzung / Bezugsquelle
<b>Anti CD16-FITC</b>	Becton Dickinson GmbH Heidelberg, Deutschland Artikelnummer 656146
<b>Anti CD56-PE</b>	Becton Dickinson GmbH Heidelberg, Deutschland Artikelnummer 345812
<b>Anti CD19-PerCP</b>	Becton Dickinson GmbH Heidelberg, Deutschland Artikelnummer 345790
<b>MACS<sup>®</sup> NK Cell Isolation Kit, human mit Antikörpern und MicroBeads</b>	Miltenyi Biotec GmbH Bergisch-Gladbach, Deutschland Artikelnummer 130-092-657
<b>MACS<sup>®</sup> Anti CD19-MicroBeads</b>	Miltenyi Biotec GmbH Bergisch-Gladbach, Deutschland Artikelnummer 130-050-301
<b>MACS<sup>®</sup> Anti CD235a-MicroBeads, human</b>	Miltenyi Biotec GmbH Bergisch-Gladbach, Deutschland Artikelnummer 130-050-501
<b>Cytotoxicity Detection Kit (LDH) mit Lysis Solution, Catalyst, Dye Solution und Stop Solution</b>	Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Deutschland Artikelnummer 04744926001
<b>Rituximab MabThera<sup>®</sup> Therapeutischer Anti-CD20-AK Konzentration: 2 mg/ml</b>	Roche Pharma AG 79639 Grenzach-Wyhlen (bezogen über die Zytostatika-Herstellung der Krankenhausapotheke des UKS)
<b>Obinutuzumab Gazyvaro<sup>®</sup> Therapeutischer Anti-CD20-AK Konzentration: 2 mg/ml</b>	Roche Pharma AG 79639 Grenzach-Wyhlen (bezogen über die Zytostatika-Herstellung der Krankenhausapotheke des UKS)

### 3.2.4 Tumorzelllinien

Tabelle 3: Eingesetzte Tumorzelllinien mit Bezugsquellen

Name	Entität	Bezugsquelle
<b>DAUDI</b>	Burkitt-Lymphom	Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Braunschweig, Deutschland Katalognummer ACC 78

### 3.2.5 Verbrauchsgegenstände

Tabelle 4: 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 ml Reaktionsgefäß	
Diverse Pipettenspitzen	
Biosphere® Filter Tips 100-1000 µl	
Mikrotiterplatten (U-Boden) 96-Well	
Mikrotiterplatten (F-Boden) 96-Well	
S-Monovette® 9 ml K3E	
S-Monovette® 4,7 ml Z-Gel	
Serologische Pipetten 5 ml	
Serologische Pipetten 25 ml	
Serologische Pipetten 10 ml	Corning GmbH Kaiserslautern, Deutschland
TC-Flasche T25 Stand., Bel. Ka.	Sarstedt AG & Co KG Nümbrecht, Deutschland Artikelnummer 83.3910.002
TC-Flasche T75 Stand., Bel. Ka.	Sarstedt AG & Co KG Nümbrecht, Deutschland Artikelnummer 83.3911.002
Falcon® Polystyrol Rundbodenröhrchen 5ml	Corning GmbH Kaiserslautern, Deutschland Artikelnummer 352054
Nunclon™ Delta Surface 6-Well, steril mit Deckel	Nalge Nunc International / Thermo Fisher Scientific Darmstadt, Deutschland Artikelnummer 152795
MACS® LS-Säulen	Miltenyi Biotec GmbH Bergisch-Gladbach, Deutschland Artikelnummer 130-042-401
MACS® MS-Säulen	Miltenyi Biotec GmbH Bergisch-Gladbach, Deutschland Artikelnummer 130-042-201

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



### 3.2.6 Geräte

Tabelle 5: Eingesetzte Laborgeräte

Name	Hersteller
<b>Centrifuge 5810 R</b>	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
<b>Centrifuge 5415 D</b>	
<b>Pipette Research® 1-10 µl</b>	
<b>Pipette Research® 10-100 µl</b>	
<b>Pipette Research® 100-1.000 µl</b>	
<b>Handdispenser Multipipette® M4</b>	
<b>Zählkammer Neubauer</b>	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG Sondheim vor der Rhön, Deutschland
<b>Elektronisches Zählgerät</b>	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG Sondheim vor der Rhön, Deutschland
<b>Deckgläschen für Hämazytometer</b>	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG / Thermo Fisher Scientific Darmstadt, Deutschland
<b>Sicherheitswerkbank Klasse II für steriles Arbeiten HERAsafe™ HSP 18</b>	Thermo Electron LED GmbH Langenselbold, Deutschland
<b>CO<sub>2</sub>-Inkubator HERACell™ 150</b>	
<b>Biologische Sicherheitswerkbank Klasse II Thermo Scientific™ Safe 2020 1.2</b>	
<b>Spektralphotometer Thermo Scientific™ Varioskan® LUX Type 3020</b>	Thermo Fisher Scientific Darmstadt, Deutschland Artikelnummer VLB000D0
<b>MACS® MidiMACS™ Separator</b>	Miltenyi Biotec GmbH Bergisch-Gladbach, Deutschland Artikelnummer 130-042-302
<b>MACS® OctoMACS™ Separator</b>	Miltenyi Biotec GmbH Bergisch-Gladbach, Deutschland Artikelnummer 130-042-109
<b>MACS® MultiStand</b>	Miltenyi Biotec GmbH Bergisch-Gladbach, Deutschland Artikelnummer 130-042-303
<b>Durchflusszytometer FACSCalibur™</b>	BD Biosciences GmbH Heidelberg, Deutschland Artikelnummer 342975
<b>Vortexmischer Heidolph REAX top</b>	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG Schwabach, Deutschland
<b>Vortex-Schüttler VWR VV3</b>	VWR International GmbH Darmstadt, Deutschland Artikelnummer 444-0007
<b>Umgekehrtes Mikroskop Leitz Diavert</b>	Leica Microsystems Wetzlar GmbH Wetzlar, Deutschland

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

### 3.2.7 Computersoftware

Zur Erstellung dieser Arbeit wurde auf verschiedene Software-Produkte aus dem LibreOffice-Paket (The Document Foundation, Freeware) und dem Microsoft 365-Paket (Microsoft Corporation) zurückgegriffen. Die computergestützte Auswertung der fluoreszenz-aktivierten Durchflusszytometrie (engl. *fluorescence activated flow cytometry*) erfolgte mit CellQuest™ 3.2.1f1 (BD Biosciences GmbH) und WinMDI 2.8 (Joe Trotter, Freeware). Die computergestützte Spektralphotometrie erfolgte mit SkanIT® Software 4.1 for Microplate Readers (Thermo Scientific, Research Edition).

Die statistische Auswertung der Ergebnisse sowie die Erstellung der dazugehörigen Graphiken erfolgte mit IBM® SPSS® Statistics 25. Die anderen Schaubilder wurden handgezeichnet mithilfe der Software von Samsung Notes 4.2.01.40 und mit GNU Image Manipulation Program (GIMP) 2.10 (Freeware) weiter bearbeitet. Zur Verwaltung der Literatur und zum Einfügen der Zitationen wurde Mendeley (Elsevier, Freeware) eingesetzt.

## 3.3 Methoden

Zur Messung der Antikörper-abhängigen NK-Zell-Reaktivität wurden Zytotoxizitätsassays mit anschließendem LDH-Nachweis durchgeführt. Die eingesetzten Anti-CD20-Antikörper waren die therapeutisch häufig eingesetzten Antikörper Rituximab und Obinutuzumab (s. Kapitel 2.1., S.12). NK-Zellen wurden aus Blutentnahmen der Probanden gewonnen. Als Targetzellen kamen DAUDI-Zellen zum Einsatz. Um den Einfluss von Vitamin D auf die ADCC zu beurteilen, wurden die Probanden *in vivo* mit Vitamin D<sub>3</sub> supplementiert, und Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Assays vor und nach Supplementation statistisch ausgewertet.

### 3.3.1 Vitamin D-Supplementation und -Messung

Bei jedem Probanden wurden zwei ADCC-Assays durchgeführt, und am Morgen der Blutentnahme jeweils zeitgleich der 25(OH)D-Serumspiegel gemessen. Die Messung erfolgte im Zentrallabor des UKS mit dem Chemilumineszenz-Immunoassay LIAISON® 25 OH Vitamin D TOTAL ASSAY ([REF] 310600) der Firma DiaSorin Inc., USA. Die funktionelle Sensitivität dieses 25(OH)D-Nachweises wird vom Hersteller als 4 ng/ml bei einem Variationskoeffizient von 20 % angegeben. Er weist 25(OH)D<sub>2</sub> und 25(OH)D<sub>3</sub> ohne Differenzierung gemeinsam nach [55, 106].

Zwischen den beiden Versuchstagen sollten die Probanden auf ein 25(OH)D-Serumlevel von ca. 65 ng/ml supplementiert werden, da sich dieses in den vorherigen Versuchsreihen meiner Arbeitsgruppe als Level mit der höchsten NK-Zytotoxizität herausgestellt hatte [2]. Basierend auf den Untersuchungen von van Groningen et al. zur schnellen Vitamin D-Supplementation ausgehend von niedrigen Serumleveln entwickelte F. Acker in seiner Doktorarbeit (Teil der Arbeit für das Paper von Neumann et al.) eine auf die Versuche der Arbeitsgruppe

angepasste Formel (s. u.) [2, 3, 107]. Um Störfaktoren zu minimieren, sollten die beiden Messungen (Mangel/unterversorgt vs. supplementiert) zeitlich nur zwei bis vier Wochen auseinanderliegen. Daher wurde eine deutlich höhere Wochen- und Tagesdosis als in der Studie von van Groningen et al. eingesetzt [3]. In den vorangegangenen Versuchsreihen von F. Acker kam es unter Einsatz dieser modifizierten Formel bei der Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation auf einen 25(OH)D-Zielwert von 65 ng/ml nie zu einer Überdosierung über den vom Zentrallabor des UKS definierten oberen Normwert von 100 ng/ml oder zu gefürchteten Nebenwirkungen wie z. B. Hyperkalzämie [3, 55]. Daher wurde auf weitere Labormessungen wie z. B. der Kalzium-Serumkonzentration im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

Die Menge an einzunehmendem Cholecalciferol (I.E.) wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Cholecalciferol (I.E.)} = \Delta 25(\text{OH})\text{D-Serumspiegel (ng/ml)} \times \text{Körpergewicht (kg)} \times 200$$

Die Gesamtdosis wurde in gleichen Teilen auf fünf Einnahmetage mit je drei Dosen verteilt. Dabei enthält eine Dekristol<sup>®</sup>-Tablette 20.000 I.E.. Die Tageshöchstdosis war auf 200.000 I.E. Cholecalciferol begrenzt. Bei nicht gleichmäßig aufteilbarer Anzahl an Tabletten wurde bevorzugt am Morgen oder an den ersten Tagen höher supplementiert. Die Probanden erhielten nach Vorliegen des 25(OH)D-Ausgangsspiegels einen nach den genannten Kriterien individuell zugeschnittenen Medikationsplan. Die Gesamtmenge an Cholecalciferol lag bei den meisten Probanden zwischen 800.000 und 1.000.000 I.E.. Nur bei einem Probanden lag die errechnete Dosis unter 800.000 I.E.. Bei diesem wurden die Tabletten auf nur vier Einnahmetage verteilt, da sonst eine höhere prozentuale Aufnahme und Umsetzung und somit schlechtere Vergleichbarkeit zu erwarten gewesen wäre.

Am fünften Tag nach der letzten Dekristol<sup>®</sup>-Einnahme wurden die Probanden zur Blutentnahme für den zweiten NK-Zell-Test einbestellt.

### 3.3.2 Targetzellen

Um die zytotoxische Aktivität der Natürlichen Killerzellen der Probanden unter Einsatz der beiden Antikörper Rituximab und Obinutuzumab zu messen, wurde eine CD20-exprimierende Targetzellkultur benötigt. Wie in den Vorversuchen auch wurden daher DAUDI-Zellen als standardisierte, monoklonale Targetzellen eingesetzt. DAUDI-Zellen wurden über das Leibniz Institut DSMZ bezogen, das die Authentizität der Zelllinie garantiert.

DAUDI-Zellen sind EBV-Marker positive Burkitt-Lymphom-Zellen, die neben anderen auch CD19 und CD20 exprimieren. Sie sind CD3 negativ [108]. DAUDI-Zellen werden als NK-resistent beschrieben und eignen sich somit zur Untersuchung von ADCC [28]. Eine geringe AICC-Sensibilität ist jedoch schon mehrfach beschrieben worden [3, 109]. DAUDI-Zellen exprimieren kein MHC I an ihrer Oberfläche und können sich nicht über einen zufälligen MHC-I-Match mit den NK-Zellen der Probanden vor Zytolyse schützen [110].

Die Kultivierung dieser Targetzelllinie erfolgte laborintern nach den von der DSMZ empfohlenen Standards [108]. Dem Kulturmedium RPMI-1640 wurden hierzu L-Glutamin (2mM) und FCS (10 %) zugesetzt. Außerdem wurde das Medium mit den gebräuchlichen Antibiotika Penicillin und Streptomycin ergänzt, um bakteriellen Kontaminationen vorzubeugen. Kulturen wurden bei 37 °C und 5 % (CO<sub>2</sub>) bei gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert und zweimal pro Woche passagiert. Frische DAUDI-Zellen, gelagert in Stickstoff, wurden alle sechs Wochen zur Erneuerung der laufenden Targetzelllinien aufgetaut. Sie wurden nach zweiwöchiger Kultur bei 37 °C in den ADCC-Assays eingesetzt.

### **3.3.3 Isolierung von Natürlichen Killer-Zellen**

Die NK-Zellen als Effektorzellen wurden stets am Morgen des Versuchs aus frischem EDTA-Blut der Probanden gewonnen. Der Anteil der NK-Zellen beträgt i. d. R. 5-20 % der peripheren Leukozyten [23, 24].

Um die für die Versuche benötigte Anzahl von  $5,3 \times 10^6$  NK-Zellen sicher zu generieren, hatte sich in den vorangegangenen Versuchsreihen der Arbeitsgruppe die Abnahme von 6x 9 ml EDTA-Blut pro Proband als ausreichend erwiesen. Die Blutentnahmen erfolgten am Morgen des Tages der NK-Zell-Isolation.

#### **3.3.3.1 Dichtezentrifugation**

Dazu wurden in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen 4 ml Pancoll® vorsichtig mit 11 ml EDTA –Blut/PBS-Suspension (ca. 9 ml + 2 ml) überschichtet und 30 min lang bei 500 g und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der dabei entstandene PBMC-Ring wurde unter Mitnahme von etwas Plasma abgenommen und einmal mit kaltem PBS in 50 ml-Zentrifugenröhrchen gewaschen und 10 min bei 300 g bei 4 °C zentrifugiert. Zur Entfernung restlicher Thrombozyten wurde bei diesem zweiten Waschschrift die PBMC-Suspension 10 min mit nur 200 g bei 4 °C zentrifugiert. Die nach der zweiten Zentrifugation vorliegenden Zellpellets wurden abermals in kaltem PBS resuspendiert und in ein frisches 15ml-Zentrifugenröhrchen überführt.

Zur Zellzahlbestimmung wurde eine 5 µl-Zählprobe der PBMC-Suspension zunächst zehnfach mit PBS verdünnt und nach einer weiteren 1:1-Verdünnung mit Trypanblau manuell in einer Neubauer Zählkammer unter einem Umkehrmikroskop gezählt. Dabei ließ sich mikroskopisch schon ein grober Eindruck über die Menge noch vorhandener Erythrozyten gewinnen.

#### **3.3.3.2 Magnetische Separation der NK-Zellen**

Für die magnetische Zellseparation wurden LS-MACS®-Säulen verwendet, die mit bis zu  $1 \times 10^8$  Bead-markierten Zellen benetzt werden können. Das dieser Zellzahl entsprechende Volumen der PBMC-Suspension wurde aus den Ergebnissen der Zellzahlbestimmung von Kapitel 3.3.3.1. ermittelt, aus der Gesamtsuspension entnommen und 10 min unter 200 g bei 4 °C zentrifugiert. Aufgrund der Pelletfärbung konnte ebenfalls eine grobe Einschätzung über einen möglichen Überschuss an verbliebenen Erythrozyten erfolgen, welcher in wenigen Fällen vorlag.

Die magnetische Zelldepletion wurde nach Hersteller-Anleitung mit dem *MACS<sup>®</sup> NK Cell Isolation Kit* durchgeführt. Die Depletion aller Nicht-NK-Zellen bietet den Vorteil, dass die NK-Zellen selbst nicht „Antikörperbelastet“ aus der Separation hervorgehen. Zunächst wurde dazu das PBMC-Pellet in je 10 µl AK-Cocktail und 40 µl *MACS<sup>®</sup>*-Puffer pro  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert und 5 min bei 4 °C inkubiert. Im zweiten Schritt wurden die markierten Nicht-NK-Zellen innerhalb der PBMC mit MicroBeads gekoppelt und weitere 10 min bei 4 °C inkubiert. Dazu wurden 20 µl MicroBeads-Lösung und 30 µl *MACS<sup>®</sup>*-Puffer pro  $1 \times 10^7$  PBMC hinzugegeben. Im Fall eines hohen Überschusses an Erythrozyten (s.o.) wurde in diesem Schritt ein entsprechendes *MACS<sup>®</sup>*-Puffer-Volumen durch 10 µl anti-CD235a-MicroBeads /  $1 \times 10^7$  Zellen ersetzt.

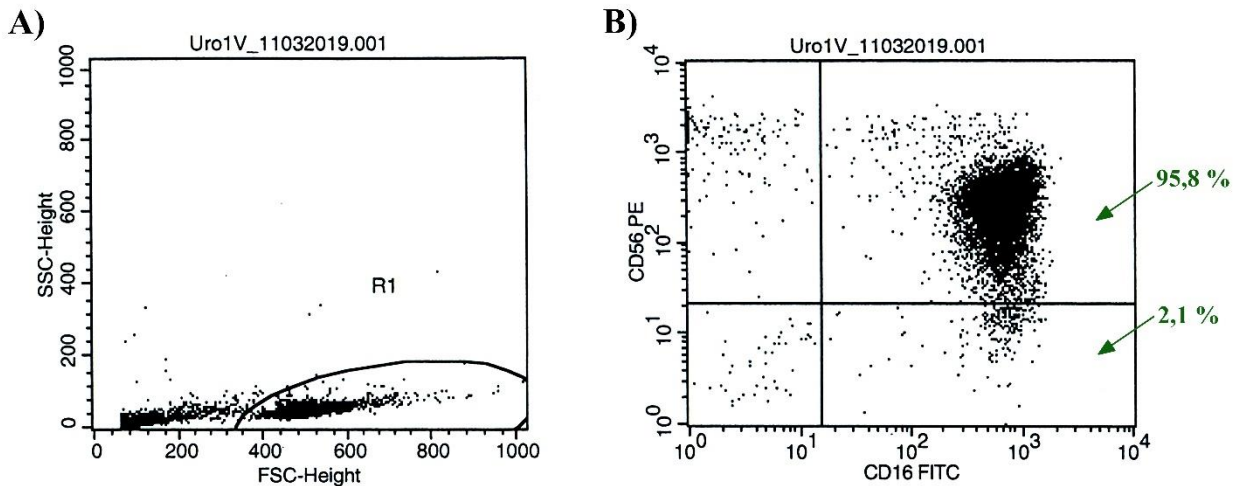
Kurz vor Inkubationsende wurde(n) die im magnetischen Feld arretierten LS-*MACS<sup>®</sup>*-Säule(n) mit je 3 ml *MACS<sup>®</sup>*-Puffer äquilibriert und dieser Durchlauf verworfen. Die PBMC-AK-Beads-Suspension wurde über die LS-*MACS<sup>®</sup>*-Säulen separiert und die durchlaufenden NK-Zellen sowie 3 ml Nachspülung mit *MACS<sup>®</sup>*-Puffer aufgefangen.

Die NK-Zell-Suspension wurde im Anschluss 10 min mit 300 g bei 4 °C zentrifugiert und je nach Trübheit in 0,5-1 ml ADCC-Medium aufgenommen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 5 µl der Suspension zunächst 10fach in PBS und anschließend 1:1 in Trypanblau verdünnt und nach Neubauer manuell gezählt (s. Kapitel 3.3.3.1., S.49).

### ***3.3.3.3 Fluoreszenzaktivierte durchflusszytometrische Analyse auf Reinheit***

Die Reinheit der isolierten Zellen wurde mittels FACS-Analyse ermittelt. Dafür wurden 40 µl der NK-Zell-Suspension vor derer finalen (dritten) Zentrifugation mit je 5 µl anti-CD16-FITC und anti-CD56-PE für 15 min bei RT lichtgeschützt inkubiert und anschließend 4 min bei 400 g und RT abgedreht. Das Pellet wurde in 200 µl Cellwash-Lösung aufgenommen und im Durchflusszytometer als Dot Plot dargestellt und mittels Quadranten-Statistik analysiert.

Als NK-Zellen wurden alle Ereignisse mit einem starken (CD16-) FITC-Signal gewertet (**Abbildung 6**). In den einzelnen NK-Zell-Suspensionen nach *MACS<sup>®</sup>* wurde eine Reinheit zwischen 93,9 % und 98,2 % erreicht. Die Reinheit wurde mit der gemäß Kapitel 3.3.3.2. berechneten Gesamtzellzahl verrechnet und das Ergebnis als Ausgangswert für die Berechnung der in den anstehenden Zytotox-Assays eingesetzten NK-Zellen verwendet.



**Abbildung 6: FACS-Auswertung als Dot Plot mit Quadranten-Statistik**

**A) Auswertung mittels FSC und SSC:** Eingrenzung der Lymphozyten in der Darstellung der Zellgröße (Forward Scatter – FSC-Hight) gegen die Granularität (Sideward Scatter – SSC-Hight) in der Region R1.

**B) CD16- und CD56-Expression:** Analyse der CD16- (FITC-markiert) und der CD56-Expression (PE-markiert) der Lymphozyten aus R1 (FSC/SSC-Plot). Als NK-Zellen wurden die Zellen mit einem CD16-Signal  $> 10^1$  gewertet, unabhängig von deren CD56-Signal. Der Anteil an NK-Zellen im MACS-Durchfluss entsprach somit der Summe der Prozentangaben im rechten unteren und oberen Quadranten.

*Auswertung erstellt mit CellQuest™ 3.2.1fl.*

### 3.3.4 Zytotox-Assay

Für die Messung der zytotoxischen Aktivität wurden LDH-Assays eingesetzt. LDH-Assays messen die Menge freigesetzten LDHs nach Nekrose (primäre und sekundäre) [29]. Wie in den vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe (vgl. [3]) wurde auch im Rahmen dieser Arbeit die ADCC-Aktivität der NK-Zellen in verschiedenen Konzentrationsstufen der Antikörper gemessen. Da sich die Spontanlyse der NK-Zellen in den Vorversuchen nicht vom technischen Hintergrundrauschen ("technischer Blank") unterschied, wurde in meiner Arbeit auf einen solchen Ansatz in Anbetracht begrenzter NK-Zell-Zahlen verzichtet.

#### 3.3.4.1 Vorbereitung der Targetzellen

Um die Spontanlysen der Targetzellen möglichst gering zu halten und eine gute Zellqualität für die Inkubationsplatte zu erhalten, wurde die Vorbereitung der Targetzellen parallel zur NK-Zell-Anreicherung (s. Kapitel 3.3.3., S.49) angelegt.

Die in Kultur gehaltenen DAUDI-Zellen wurden am Tag vor dem Assay passagiert und vor ihrem Einsatz nochmals im Mikroskop begutachtet (siehe auch Kapitel 3.3.2., S.48).

Im Zytotox-Assay wurden pro Well 4.000 DAUDI-Zellen eingesetzt. Um genügend DAUDI-Zellen bei simultanen Assays für zwei Probanden zu haben, wurden aus der Zellkultur-Suspension  $9 \times 10^5$  Zellen in ein 2 ml-Reagiergefäß geerntet und zweimal mit ADCC-Medium gewaschen und zentrifugiert (10 min, 240 g, RT). Anschließend wurde das Zellpellet in 15,1 ml ADCC-Medium resuspendiert. Daraus wurden dann die verschiedenen Target-Ansätze bedient.

Zur Inkubation der Targetzellen wurden von den beiden antiCD20-Antikörper Rituximab und Obinutuzumab zunächst in 2 ml-Reagiergefäßen Titrationsreihen in ADCC-Medium angesetzt. Ausgehend von der von der Krankenhausapotheke gelieferten Stock-Lösung A0 mit 2 mg/ml wurden die folgenden Verdünnungen zur Markierung der Targetzellen eingesetzt:

**Tabelle 6: Schema zur Erstellung der Titrationsreihen der Antikörper**

Name	A0-Stock	A2	A3	A4	A5	A6
<b>Ziel-Konz.</b>	2 mg/ml	20 µg/ml	2 µg/ml	0,2 µg/ml	0,02 µg/ml	0,002 µg/ml
<b>Stock-Verdünnung</b>	-	1:100	1:1.000	1:10.000	1:100.000	1:1.000.000
<b>Ansatz Bestandteile</b>	-	5 µl A0 +495 µl ADCC-Medium	100 µl A2 +900 µl ADCC-Medium	100 µl A3 +900 µl ADCC-Medium	100 µl A4 +900 µl ADCC-Medium	100 µl A5 +900 µl ADCC-Medium

A0-Stock entspricht der Konzentration, in welcher die Antikörper von der Krankenhausapotheke geliefert wurden.

Sowohl der A0-Stock als auch die fertige Titrationsreihe wurden bis zur Verwendung immer kühl gelagert.

**Tabelle 7: Ansatzschema der DAUDI-Targetzellen ohne/mit Antikörper zum Zytotox-Assay für zwei Probanden**

<b>DAUDI-Ansatz im Zytotox</b>	<b>Antikörper-Ansatz (µl)</b>	<b>DAUDI-Suspension (µl)</b>	<b>ADCC-Medium (µl)</b>	<b>Finale AK-Konzentration (µg/ml)</b>	<b>Anzahl Wells (à 75 µl)</b>
<b>unbehandelt</b>	-	990	110	<b>0</b>	14
<b>D2</b>	110 µl A2	990	-	<b>1</b>	14
<b>D3</b>	110 µl A3	990	-	<b>0,1</b>	14
<b>D4</b>	110 µl A4	990	-	<b>0,01</b>	14
<b>D5</b>	110 µl A5	990	-	<b>0,001</b>	14
<b>D6</b>	110 µl A6	990	-	<b>0,0001</b>	14

Die einzelnen DAUDI-Ansätze für den Zytotox-Assay (unbehandelt, D2, D3, D4, D5 und D6) wurden, wie in **Tabelle 7** dargestellt, bei RT in 2 ml-Reaktionsgefäßen angesetzt und zur Antikörper-Bindung 20 min bei 37 °C im Brutschrank (vor-) inkubiert. Das Prozedere erfolgte zeitlich angepasst an die parallele Vorbereitung der NK-Zellen, um längere Inkubationszeiten zu vermeiden. Danach wurden die DAUDI-Targets gemäß dem Belegungsplan auf die Inkubationsplatte (96Well/U-Boden) verteilt. Von jedem Ansatz wurden zur Sicherheit Zellen für zwei Well mehr als rechnerisch notwendig angelegt.

### **3.3.4.2 Vorbereitung der Natürlichen Killer-Zellen**

Für den Zytotox-Assay wurden insgesamt  $1,3 \times 10^6$  CD16<sup>+</sup> NK-Zellen pro Proband benötigt. Mit der, wie in Absatz 3.3.3.3. auf S.50 beschrieben, bestimmten NK-Zellkonzentration wurde das benötigte Volumen an NK-Zell-Suspension errechnet. Dieses Volumen wurde der Suspension entnommen und mit ADCC-Medium auf ein Gesamtvolumen von 4,9 ml aufgefüllt. Mit dieser NK-Zell-Dichte konnten die Ansätze mit einer E/T-Ratio von 5:1 im Zytotox-Assay bedient werden (20.000 NK-Zellen/75 µl). Für die Ansätze mit einer E/T-Ratio von 2,5:1 (10.000 NK-Zellen/75 µl) wurden von den 4,9 ml der NK-Zell-Suspension mit hoher Dichte 1.612 µl entnommen und mit dem gleichen Volumen ADCC-Medium verdünnt. So eingestellt, wurden dann die NK-Zellen in die jeweiligen Ansätze auf der Zytotox-Inkubationsplatte à 75 µl verteilt. Genau wie bei den Targetzellen wurden auch die NK-Effektorzellen mit einem kleinen Überschuss angelegt.



### ***3.3.4.3 Belegung der Inkubationsplatte zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität***

Die Inkubationsplatte (eine 96-Well-Platte pro Proband) wurde nun nach dem Plan (**Abbildung 7**) mit den vorbereiteten Ansätzen von NK-Effektor- und DAUDI-Target-Zellen belegt. Zunächst wurden für den technischen Blank je 150 µl ADCC-Medium in die Well A1-6 vorgelegt. Für die Messung der DAUDI-Spontanlyse wurden in die Well H1-3 und H7-9 je 75 µl ADCC-Medium vorgelegt.

Die Well B1-12 und H1-12 wurden mit je 75 µl Suspension unbehandelter DAUDI-Zellen und die Well C1-G12 mit je 75 µl der DAUDI-Suspensionen der verschiedenen Antikörperkonzentrationen belegt, sodass je sechs Well mit DAUDI-Zellen derselben Antikörperkonzentration belegt waren.

Anschließend wurden die beiden NK-Zell-Suspensionen mit einem Stepper à 75 µl in die Well B1-G12 verteilt. Dabei wurde die erste NK-Zell-Fraktion mit 10.000 CD16<sup>+</sup> Zellen/75 µl in die Spalten 1-3 und 7-9 pipettiert. Daraus resultierte eine E/T-Ratio von 2,5:1. Die zweite NK-Fraktion (20.000 CD16<sup>+</sup> Zellen/75 µl) wurde in die Spalten 4-6 und 10-12 verteilt. Somit wurde in diesen Well die NK-Zell-Aktivität bei einer E/T-Ratio von 5:1 bestimmt. Somit betrug das Volumen in jedem Well 150 µl, außer in den insgesamt sechs Well, die zur Bestimmung der Maximal-Lyse der DAUDI-Targetzellen vorgesehen waren. Um einen möglichst synchronen Start der Zytotox-Aktivität in jedem E/T-Well zu gewährleisten, wurde die Inkubationsplatte nach der „Beladung“ eine Minute bei 200 g (RT) kurz zentrifugiert. Dadurch gelangten alle Zellen gleichzeitig auf den Boden jedes Wells und die NK-Zellen in Kontakt mit den Targetzellen.

Die Platte wurde nun für 4 h bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Inkubator HERAcell™ 150 inkubiert.

20 min vor Ende der Inkubationszeit wurden die Well H4-6 und H10-12 mit je 75 µl Lysis-ADCC-Medium auf ebenfalls 150 µl ergänzt, um die Maximallyse der DAUDI-Zellen und somit die maximale LDH-Freisetzung „chemisch“ zu induzieren. Das Lysis-ADCC-Medium wurde unmittelbar vorher frisch angesetzt aus 900 µl warmem ADCC-Medium (37 °C) und 100 µl Triton™X-100-haltiger Lysis-Solution aus dem Cytotoxicity Detection Kit.

LDH Nr. xxx	Rituximab						Obinutuzumab					
	E/T = 2,5:1			E/T = 5:1			E/T = 2,5:1			E/T = 5:1		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	technisches Blank						-	-	-	-	-	-
<b>B</b>	unbehandelt			unbehandelt			unbehandelt			unbehandelt		
<b>C</b>	0,0001 µg/ml (= D6)			0,0001 µg/ml (= D6)			0,0001 µg/ml (= D6)			0,0001 µg/ml (= D6)		
<b>D</b>	0,001 µg/ml (= D5)			0,001 µg/ml (= D5)			0,001 µg/ml (= D5)			0,001 µg/ml (= D5)		
<b>E</b>	0,01 µg/ml (= D4)			0,01 µg/ml (= D4)			0,01 µg/ml (= D4)			0,01 µg/ml (= D4)		
<b>F</b>	0,1 µg/ml (= D3)			0,1 µg/ml (= D3)			0,1 µg/ml (= D3)			0,1 µg/ml (= D3)		
<b>G</b>	1 µg/ml (= D2)			1 µg/ml (= D2)			1 µg/ml (= D2)			1 µg/ml (= D2)		
<b>H</b>	DAUDI-Spontan			DAUDI-Maximal			DAUDI-Spontan			DAUDI-Maximal		

Abbildung 7: Belegplan mit DAUDI-Zellen für den LDH-Assay

1 Well-Platte stellte einen Assay für einen Probanden dar. Die zusätzliche Belegung mit NK-Zellen erfolgte erst später.

### 3.3.4.4 LDH-Nachweisreaktion

Nach der Inkubation wurde die Platte 6 min bei 200 g (RT) zentrifugiert. Dadurch befanden sich alle Zellen, auch die in den erst 20 min zuvor durch Zugabe des Detergenz aufgewirbelten DAUDI-Zellen, garantiert auf dem Wellboden. Somit konnte aus jedem der Well 50 µl zellfreier Überstand entnommen und in die analogen Wells einer frischen 96-Well-Platte mit flachen Böden zum LDH-ELISA übertragen werden.

Das LDH-Reaktions-Gemisch, ausreichend für eine 96-Well-Platte, wurde direkt vor Reaktionsstart aus 4.891 µl Dye Solution und 109 µl Catalyst des Cytotoxicity Detection Kit angesetzt. Anschließend konnte die LDH-Nachweis-Reaktion durch Zugabe von je 50 µl LDH-Reaktions-Gemisch auf jedes Well gestartet und 30 min lichtgeschützt bei RT inkubiert werden. Bei der Reaktion kommt es unter Oxidation des Substrates Lactat zu Pyruvat zur Reduktion von NAD<sup>+</sup> zu NADH. In einem zweiten Reaktionsschritt kann dieses NADH farbloses Tetrazolium zu rotem Formazan reduzieren [29]. Nach 30 min wurde die Reaktion mit je 25 µl salzsäurehaltiger Stop Solution beendet.

Die Menge an LDH und somit auch die Menge an rotem Formazan, die zuvor während der Inkubationzeit freigesetzt worden war, verhält sich dabei linear zur Menge an Targetzellen, die durch primäre oder sekundäre Nekrose zugrunde gegangenen sind. Sekundäre Nekrose bezeichnet Nekrose als Konsequenz nach Apoptose [29].

Im Anschluss wurde von jedem Well die Absorption bei 492 nm im Spektralphotometer Thermo Scientific™ Varioskan® LUX gemessen.

### 3.3.4.5 Berechnung der relativen Lyserate aus den Daten des LDH-Assays

Mit den vom Spektralphotometer gemessenen Absorptionswerten konnte nun die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen unter den gegebenen Testbedingungen für jedes Well berechnet werden. Dabei wurde die NK-Zell-Aktivität (a) korrigiert um die Spontan-Lyse und (b) relativ zur Maximal-Lyse der Targetzellen berechnet. Dazu wurde zunächst der Mittelwert der Absorption des technischen Blanks von allen andern gemessenen Absorptionswerten subtrahiert. Aus den Absorptionswerten aller Triplets wurde dann der Mittelwert berechnet. Die relative Lyse jedes experimentellen NK/DAUDI-Ansatzes wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Relative Lyse [\%]} = \frac{(\text{Feldabsorption} - \text{Spontanlyse})}{(\text{Maximallyse} - \text{Spontanlyse})} \times 100$$

Die Errechnung der relativen Lysen erfolgte mithilfe von LibreOffice Calc.

## 3.3.5 Anlegen von RNA-Proben

Für spätere Folgearbeiten wurden von jedem Probanden und Versuchstag zwei verschiedenartige RNA-Proben angelegt: eine RNA-Probe ohne Inkubation mit Targetzellen (RNA-passiv) und eine nach Inkubation und entsprechender Aktivierung der Targetzellen (RNA-aktiv). Die RNA-Proben wurden gesammelt und sollen später von einem externen Labor analysiert werden, um Veränderungen im Transkriptom der NK-Zellen vor und nach Vitamin D-Supplementation zu definieren.

### 3.3.5.1 Inkubation von NK-Zellen mit Targetzellen

Parallel zur Vorbereitung der Targetzellen für den LDH-Assay wurden auch die Targetzellen für den Zytotox-Assay für die „RNA-aktiv“-Probe vorbereitet. Dies erfolgte, wie zuvor auch, zeitlich abgestimmt mit der NK-Zell-Isolierung, um die Spontanlysen gering zu halten. Für zwei Probanden wurden analog zu Kapitel 3.3.4.1. (S.51)  $3 \times 10^6$  DAUDI-Zellen aus der Kultur geerntet und zweimal gewaschen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Rituximab-haltigem ADCC-Medium (0,1 µg Rituximab/ml) aufgenommen und 20 min bei 37 °C inkubiert. Das Rituximab-haltige ADCC-Medium wurde wie zuvor beschrieben (s. Kapitel 3.3.4.1., S.51) angesetzt. Von dieser Suspension mit Rituximab-markierten DAUDI-Zellen wurde zur Aktivierung der NK-Zellen zweier Probanden jeweils 1 ml in vier Well einer 6-Well-Platte vorgelegt.

Für die zwei 6-Well der „RNA-aktiv“-Probe wurden von jedem Probanden  $4 \times 10^6$  CD16<sup>+</sup> NK-Zellen benötigt. Diese wurden von der Suspension der bereits isolierten NK-Zellen (s. Kapitel 3.3.3. S.49) abgenommen, mit ADCC-Medium auf ein Gesamtvolumen von 2,67 ml eingestellt und ebenfalls à 1 ml/6-Well zu der bereits vorgelegten DAUDI-Suspension pipettiert. Aus den eingestellten Zellzahlen resultierte somit eine E/T-Ratio von 2,5:1. Danach wurde auch die 6-Well-Platte bei 37 °C für ca. 4 h inkubiert.

### **3.3.5.2 Isolation und Reinheitsanalyse der aktivierten NK-Zellen**

Die Effektorzell/Targetzell-Suspensionen der „RNA-aktiv“-Proben (je zwei 6-Well/Proband) wurden nach Inkubationsende vorsichtig in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen geerntet. Um die DAUDI-Zellen von den aktivierten NK-Zellen zu trennen, wurden die DAUDI-Zellen mit anti-CD19-Beads markiert und magnetisch aus der Suspension depletiert. Die Zellsuspension wurde dazu zunächst mit 5 ml kaltem MACS<sup>®</sup>-Puffer gewaschen und für 10 min bei 300 g, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 60 µl MACS<sup>®</sup>-Puffer aufgenommen und mit 40 µl Anti-CD-19-Beads für 15 min bei 4 °C inkubiert. Nach Inkubation mit den Beads wurde die Suspension kalt (4 °C) gewaschen und 10 min mit 300 g und bei 4 °C zentrifugiert. Zur MACS<sup>®</sup>-Depletion wurde das Pellet abschließend in 200 µl kaltem MACS<sup>®</sup>-Puffer resuspendiert und auf die im Magnetfeld arretierte und mit 500 µl MACS<sup>®</sup>-Puffer (4 °C) benetzte MS-Säule pipettiert und die Säule (nachdem die Zellsuspension sich auf der Säule verteilt hatte) einmal mit 500 µl kaltem MACS<sup>®</sup>-Puffer nachgespült. Der MACS<sup>®</sup>-Durchfluss wurde mit ca. 1 ml kaltem PBS auf ein Volumen von 2 ml eingestellt. Aus dieser NK-Zell-Suspension eine 5 µl Zählprobe gezogen und die Zellzahl, 1:1 mit Trypanblau verdünnt, nach Neubauer bestimmt (vgl. Kapitel 3.3.3.1., S.49).

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Reinheit der neuerlich isolierten NK-Zellen wurde jetzt zusätzlich der Antikörper anti-CD19-PerCP verwendet. Dazu wurden 20 µl MACS-Durchfluss mit je 5 µl anti-CD16-FITC, anti-CD56-PE und anti-CD19PerCP sowie 30 µl PBS für 15 min bei RT lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurde die FACS-Probe 4 min bei 400 g (RT) zentrifugiert, das Pellet in 200 µl Cellwash-Lösung aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung erfolgte später populationsbezogen über Quadranten-Statistik mithilfe der WinMDI-Freeware. Dabei ergab sich eine Reinheit von durchschnittlich 86,8 % (Min = 70,52 %; Max = 92,44 %). Somit war eine für die RNA-Gewinnung ausreichende Reinheit der NK-Zellen nach DAUDI-Kontakt gewährleistet.

### **3.3.5.3 NK-Zell-Lyse**

Sowohl aus den nicht an Targetzellen stimulierten „passiven“ NK-Zellen als auch aus den nach Kontakt mit ihren Targetzellen „aktivierten“ NK-Zellen wurde die RNA gewonnen. Dies erfolgte jeweils vor und nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation. Als Ausgangsmaterial dienten dazu die jeweiligen NK-Zell-Lysate. Je nach Ausbeute bis zu maximal  $2,5 \times 10^6$  „passive“ NK-Zellen (in Suspension) wurden dazu direkt nach deren Anreicherung aus den PBMC in zwei bis vier Teilproben in 2 ml-Reagiergefäße aufgeteilt. Diese wurden mit 400 g 4 min (RT) zentrifugiert, der Überstand danach verworfen und die Zellpellets in je 400 µl Trizol resuspendiert und dabei lysiert. Die „RNA-passiv“ Aliquots wurden bei -75 °C bis zur späteren Aufarbeitung der mRNA tiefgekühlt gelagert. Die aktivierten NK-Zellen wurden nach der Depletion der DAUDI-Zellen in gleicher Weise archiviert.

### 3.3.6 Statistische Auswertung

Die weiterführende Statistik der ermittelten relativen Lyseraten erfolgte mithilfe von IBM® SPSS® Statistics 25. Alle berechneten Parameter wurden stets zunächst pro Proband kalkuliert und gepaart (z. B. Parameter vor Supplementation mit analogem Parameter nach Supplementation, oder Parameter unter Rituximab mit analogem Parameter unter Obinutuzumab desselben Probanden).

Wegen der geringen Populationsgröße musste angenommen werden, dass keine Normalverteilung vorlag. Daher wurde der robustere Lageparameter „Median“ verwendet. Deshalb wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet, um die Signifikanz zu überprüfen. Es wurde ein Signifikanzniveau  $\alpha$  von 5 % zugrunde gelegt. Auf Basis des Lehrbuchs "An Adventure in Statistics" von A. Field wurde ergänzend zu den meisten im Ergebnisteil dargestellten Parametern einen 95 % Konfidenzintervall des Medians nach der Bootstrap-Methode (Bootstrap Bias-corrected and accelerated (BCa) Methode) berechnet [111]. Die Stichprobenziehung erfolgte einfach. Der eingesetzte Stichprobenumfang betrug 1.000.

Außerdem erfolgte eine Analyse auf nicht-parametrische Korrelation des erreichten 25(OH)D-Spiegels nach Supplementation mit den erhobenen Parametern Alter, Größe, Gewicht und BMI nach Spearman-Rho (ebenefalls mit SPSS®).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Probandendaten

Im Zeitraum März bis Mai 2019 wurden insgesamt neun Probanden akquiriert. Ein weiterer Kandidat konnte aufgrund eines zu hohen anfänglichen Vitamin D-Spiegels von 22,2 ng/ml nicht in die Studie eingeschlossen werden. Bei einem in die Studie eingeschlossenen Probanden (Uro3) stieg der 25(OH)D-Spiegel nach Cholecalciferol-Supplementation deutlich stärker an als nach dem Supplementationsprotokoll berechnet, sodass er von der Auswertung der NK-Zellaktivität ausgeschlossen wurde. Bei allen folgenden Auswertungen auch bzgl. der Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation ist Proband Uro3 von den Angaben ausgeschlossen.

Das mediane Alter der Probanden lag bei 69,5 Jahren (min = 51; max = 83) und war somit ähnlich wie in den vorausgehenden Studien von Neumann et al. [2]. Der mediane BMI lag bei 29,65 kg/m<sup>2</sup> (min = 25,4; max = 33,2).

**Tabelle 8: Charakterisierung der Probanden**

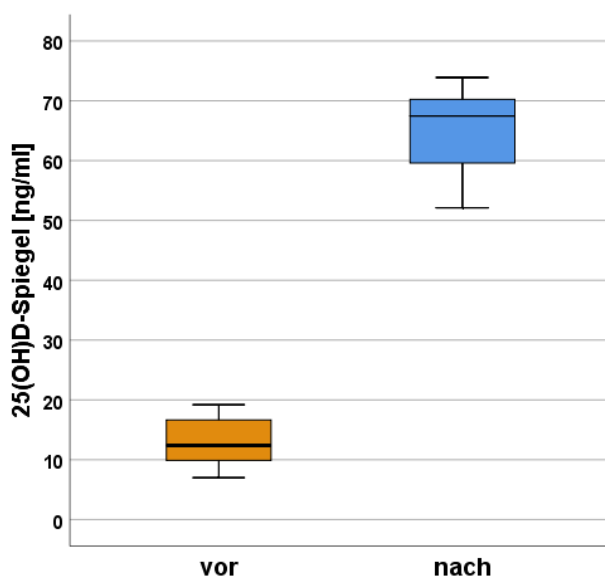
Probanden-alias	25(OH)-D-Spiegel vor Supplementation [ng/ml]	25(OH)-D-Spiegel nach Supplementation [ng/ml]	Alter [Jahre]	Gewicht [kg]	Größe [cm]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]
<b>Uro1</b>	12,4	54,9	78	105	193	28,2
<b>Uro2</b>	18,2	70,6	76	93	176	30,0
<i>Uro3</i>	8,3	<b>122</b>	69	90	178	28,4
<b>Uro4</b>	12	69,9	70	90	174	29,7
<b>Uro5</b>	7	52,1	83	65	160	25,4
<b>Uro6</b>	19,2	64,3	51	110	182	33,2
<b>Uro7</b>	7,8	65,3	69	110	187	31,5
<b>Uro8</b>	15,1	73,9	59	97	181	29,6
<b>Uro9</b>	12,4	69,6	69	96	184	28,4

Proband Uro3 entwickelte nach der Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation einen 25(OH)D-Spiegel von 122 ng/ml und lag damit deutlich über dem Zielwert von 65 ng/ml. Er musste daher von der Auswertung ausgeschlossen werden. Ein weiterer Kandidat hatte bereits bei der ersten Vorstellung einen 25(OH)D-Spiegel von 22ng/ml und wurde daher von der Studienteilnahme ausgeschlossen.

## 4.2 Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation

Die Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation nach der von F. Acker entwickelten Formel [3] (s. Kapitel 3.3.1., S. 47) erwies sich als relativ treffsicher. Der 25(OH)D-Spiegel vor Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation lag median bei 12,4 ng/ml. Mit Ausnahme des von der Auswertung ausgeschlossenen Probanden Uro3 waren die Abweichungen vom 25(OH)D - Zielwert von 65 ng/ml in allen Fällen tolerierbar ( $\bar{x}$  = 67,45 ng/ml; min = 52,1; max = 73,9), s. **Abbildung 8**.

Proband Uro3 erreichte nach Supplementation einen 25(OH)-D-Spiegel von 122 ng/ml und lag damit bereits außerhalb des vom Zentrallabor definierten Referenzbereichs von 30-100 ng/ml [55]. Damit verletzten die Daten den Rahmen der Fragestellung dieser Arbeit, und mussten aus den weiteren Auswertungen ausgeschlossen werden. Es ließ sich keine Ursache ausfindig machen, warum Proband Uro3 auf die Supplementation verstärkt reagierte.



**Abbildung 8: 25(OH)D-Spiegel vor und nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation**

Eine Korrelation zwischen der Abweichung des nach Supplementation erreichten 25(OH)D - Wertes vom Zielwert von 65 ng/ml und den anderen Parametern (Alter, Größe, Gewicht, BMI) ließ sich statistisch nicht feststellen (Spearman-Rho-Korrelationskoeffizienten ohne Signifikanz).

### 4.3 Antikörper-unabhängige zelluläre Zytotoxizität

In den Zytotox-Assays wurde vorrangig die *Antikörper-abhängige* zelluläre Zytotoxizität (*ADCC*) untersucht. Diese wurde pro Antikörper in fünf Antikörper-Konzentrationen (Ansätze) gemessen. Zusätzlich wurde von den NK-Zellen aller Probanden in einem Ansatz auch deren *Antikörper-unabhängigen* zellulären Zytotoxizität (im Folgenden *AICC*) bestimmt.

Nach in vivo Supplementation der 25(OH)D-Serumspiegel auf median 67,45 ng/ml erhöhte sich die relative Lyse bei einer E/T-Ratio von 2,5:1 median um 1,9 %. Wie aus den in **Abbildung 9A** (linkes Boxplot-Paar) dargestellten AICC-Lyseraten ersichtlich, induzierte die Supplementation dabei nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test knapp keine signifikant erhöhte Aktivität der NK-Zellen ( $p = 0,05$ ), jedoch eine Tendenz in Richtung einer verbesserten Lyserate. Dafür waren v. a. zum einen die mit nur acht Patienten geringe Datenmenge und zum anderen auch die bei solchen Assays typischen individuellen Schwankungen verantwortlich. Ein sehr ähnliches Bild zeigte sich auch bei den Lyseraten, die bei einem E/T-Verhältnis von 5:1 ermittelt wurden (**Abbildung 9A**, rechtes Boxplot-Paar). Mit einem p-Wert von 0,069 unterschied sich hier die Antikörper-unabhängige NK-Zellaktivität vor und nach Supplementation nicht signifikant.

Im Gegensatz zu den p-Werten nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test sprechen die 95 % Konfidenzintervalle des medianen Anstiegs nach Supplementation bei beiden Ansätzen für eine signifikante Zunahme der Zytotoxizität (**Abbildung 9B**). Das nicht signifikante Ergebnis des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und das signifikante 95 % CI nach Bootstrap-Stichprobenziehung widersprechen sich in diesem Fall. Zur besseren Darstellung sind die genauen Zahlen hinter den Schaubildern nochmals in **Tabelle 9** aufgelistet.

**Tabelle 9: Mediane relative Lysen der AICC**

E/T-Ratio	E/T = 2,5:1	E/T = 5:1
<b>relative Lyse vor Supplementation</b>	1,6 %	1,5 %
<b>relative Lyse nach Supplementation</b>	2,8 %	2,7 %
<b>p-Werte (vor vs. nach)</b> Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test	0,05	0,069
<b>Anstieg der relativen Lyse</b> [Median und BCa* 95% CI]	1,9 % [0,4 ; 3,0]	1,0 % [0,3 ; 4,4]

\* *Bootstrap Methode: Bias-corrected and accelerated (BCa) - Stichprobenziehung einfach, Stichprobenumfang 1.000, Konfidenzintervallniveau 95 % [SPSS 25].*



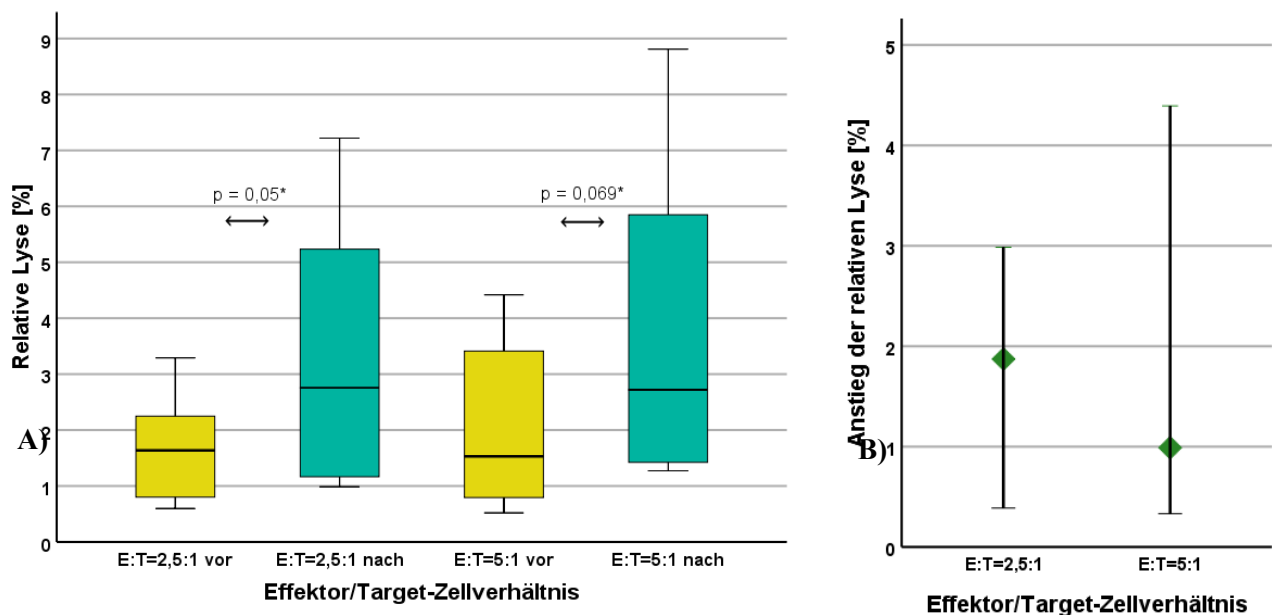


Abbildung 9: AICC

**A) Relative Lysen vor und nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation:** Darstellung der relativen Lysen jeweils vor (gelb) und nach (türkis) Supplementation für die E/T-Ratios 2,5:1 und 5:1 als Boxplot. Die dazugehörigen p-Werte nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test beim Vergleich der Lysen vor Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation mit den Lysen nach Supplementation sind eingeblendet.

**B) Anstieg der relativen Lyse nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation:** Auswertung des Anstiegs der relativen Lyse als Berechnung des 95 % Konfidenzintervalls des Medians mittels Bootstrap-Stichprobenziehung. Bootstrap Methode: Bias-corrected and accelerated (BCa) - Stichprobenziehung einfach, Stichprobenumfang 1.000, Konfidenzintervall-niveau 95 % [SPSS 25].

*Raute = Median, Balken = obere und untere Grenze 95% CI.*

*Einige den Abbildungen zugrundeliegenden Daten sind zusätzlich in **Tabelle 9** aufgelistet.*

## 4.4 Rituximab-abhängige zelluläre Zytotoxizität

### 4.4.1 RDCC bei einer E/T-Ratio von 2,5:1

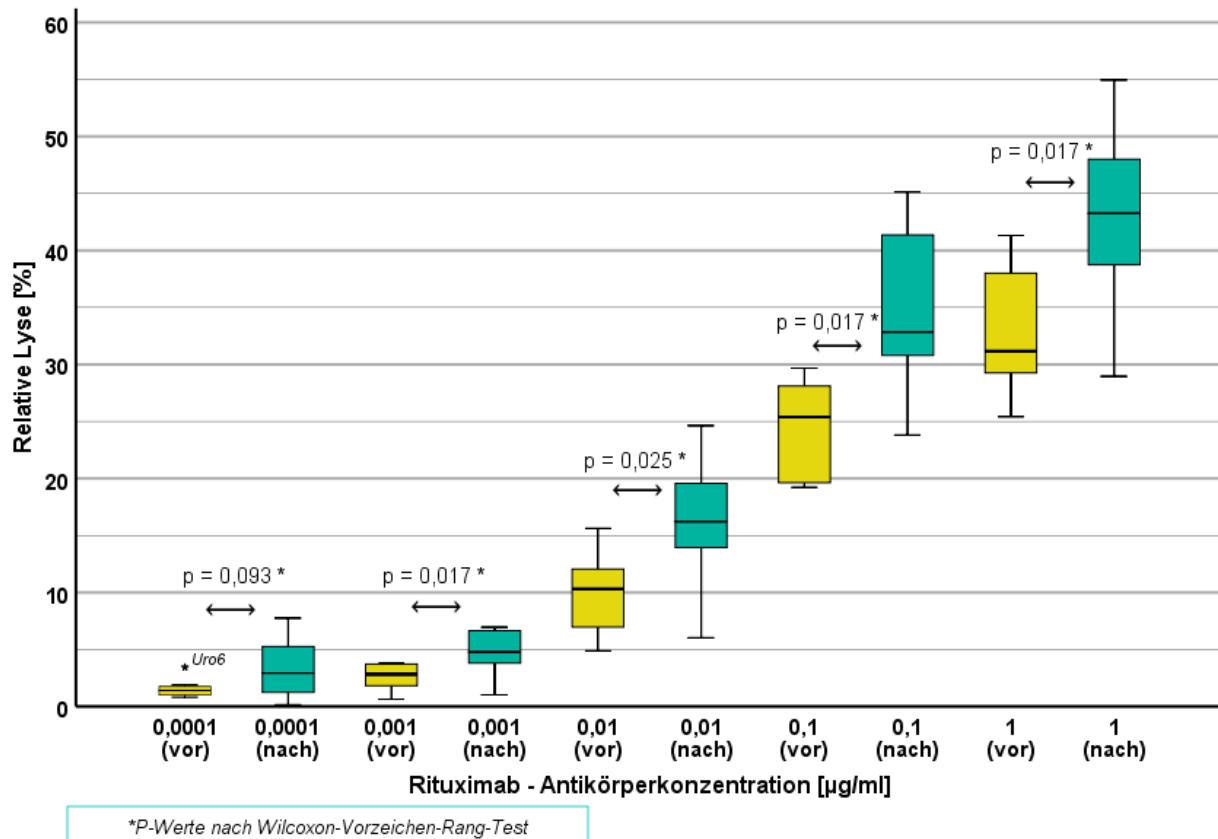
Die Rituximab dependent cellular cytotoxicity (kurz RDCC) zeigte bei einer E/T-Ratio von 2,5:1 und ab einer Antikörperkonzentration von 0,001 µg/ml einen signifikanten Anstieg nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation. Dies zeigten der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test als auch der 95 % CI des medianen Anstiegs nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation übereinstimmend (**Tabelle 10**).

Bei einer Antikörperkonzentration von 0,001 µg/ml stieg die relative Lyse nach Supplementation median um 2,2 %. Der stärkste mediane Anstieg nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation zeigte sich bei der Antikörperkonzentration von 0,1 µg/ml mit 7,5 %. Die entsprechenden Daten für die anderen Konzentrationsreihen finden sich in **Tabelle 10**. Zur besseren Darstellung sind dort auch die Mediane der relativen Lysen jeweils vor und nach Supplementation explizit genannt, da diese aus den Boxplots der **Abbildung 10** nur grob abzuschätzen sind.

**Tabelle 10: RDCC - Mediane relative Lysen bei einer E/T-Ratio von 2,5:1**

Antikörperkonzentration [µg/ml]	0,0001	0,001	0,01	0,1	1
<b>relative Lyse vor Supplementation</b>	1,4 %	2,8 %	10,3 %	25,4 %	31,2 %
<b>relative Lyse nach Supplementation</b>	2,9 %	4,8 %	16,2 %	32,8 %	43,3 %
<b>p-Werte (vor vs. nach)</b> Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test	0,093	0,017	0,025	0,017	0,017
<b>Anstieg der relativen Lyse</b> [Median und BCa* 95 % CI]	1,9 % [-0,4 ; 3,7]	2,2 % [0,9 ; 3,7]	4,4 % [0,6 ; 13,7]	7,5 % [2,5 ; 24,9]	5,3 % [2,0 ; 25,3]

\* Bootstrap Methode: Bias-corrected and accelerated (BCa) - Stichprobenziehung einfach, Stichprobenumfang 1.000, Konfidenzintervallniveau 95 % [SPSS 25].



**Abbildung 10: Relative RDCC-Lysen vor und nach Supplementation bei einer E/T-Ratio von 2,5:1**

Darstellung der relativen Lysen jeweils vor (gelb) und nach (türkis) Supplementation für die E/T-Ratio 2,5:1 als Boxplot. Die dazugehörigen p-Werte nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test sind eingeblendet.

Einige den Abbildungen zugrundeliegenden Daten sind zusätzlich in **Tabelle 10** aufgelistet.

#### 4.4.2 RDCC bei einer E/T-Ratio von 5:1

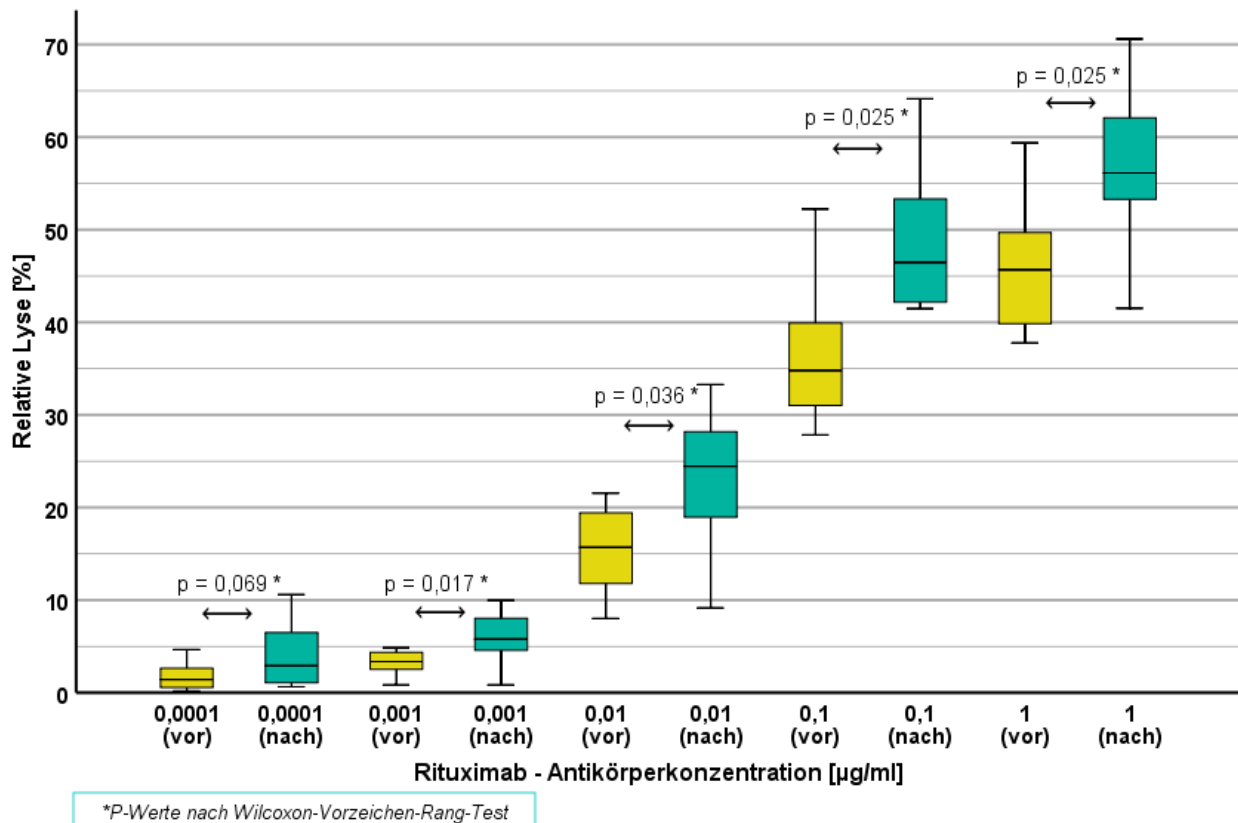
Auch bei einer E/T-Ratio von 5:1 zeigte die RDCC ab einer Antikörperkonzentration von 0,001 µg/ml einen signifikanten Anstieg nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation. Dies zeigten der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test als auch der 95 % CI des medianen Anstiegs nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation übereinstimmend (**Tabelle 11**).

Bei einer Antikörperkonzentration von 0,001 µg/ml stieg die relative Lyse nach Supplementation median um 2,1 %. Der stärkste mediane Anstieg nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation zeigte sich auch bei dieser E/T-Ratio bei der Antikörperkonzentration von 0,1 µg/ml mit 10,8 %. Die entsprechenden Daten für die anderen Ansätze finden sich in **Tabelle 11**. Zur besseren Darstellung sind dort auch die Mediane der Boxplots aus **Abbildung 11** sowie die p-Werte explizit genannt.

**Tabelle 11: RDCC - Mediane relative Lysen bei einer E/T-Ratio von 5:1**

Antikörperkonzentration [µg/ml]	0,0001	0,001	0,01	0,1	1
<b>relative Lyse vor Supplementation</b>	1,4 %	3,4 %	15,7 %	34,8 %	45,7 %
<b>relative Lyse nach Supplementation</b>	2,9 %	5,8 %	24,4 %	46,5 %	56,1 %
<b>p-Werte (vor vs. nach)</b> Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test	0,069	0,017	0,036	0,025	0,025
<b>Anstieg der relativen Lyse</b> [Median und BCa* 95 % CI]	1,2 % [-0,3; 3,9]	2,1 % [0,8; 4,5]	6,1 % [1,1; 17,6]	10,8 % [3,1; 18,1]	6,7 % [0,8; 25,4]

\* *Bootstrap Methode: Bias-corrected and accelerated (BCa) - Stichprobenziehung einfach, Stichprobenumfang 1.000, Konfidenzintervallniveau 95 % [SPSS 25].*



**Abbildung 11: Relative RDCC-Lysen vor und nach Supplementation bei einer E/T-Ratio von 5:1**

Darstellung der relativen Lysen jeweils vor (gelb) und nach (türkis) Supplementation für die E/T-Ratio 5:1 als Boxplot. Die dazugehörigen p-Werte nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test sind eingeblendet.

Einige den Abbildungen zugrundeliegenden Daten sind zusätzlich in **Tabelle 11** aufgelistet.

## 4.5 Obinutuzumab-abhängige zelluläre Zytotoxizität

### 4.5.1 ODCC bei einer E/T-Ratio von 2,5:1

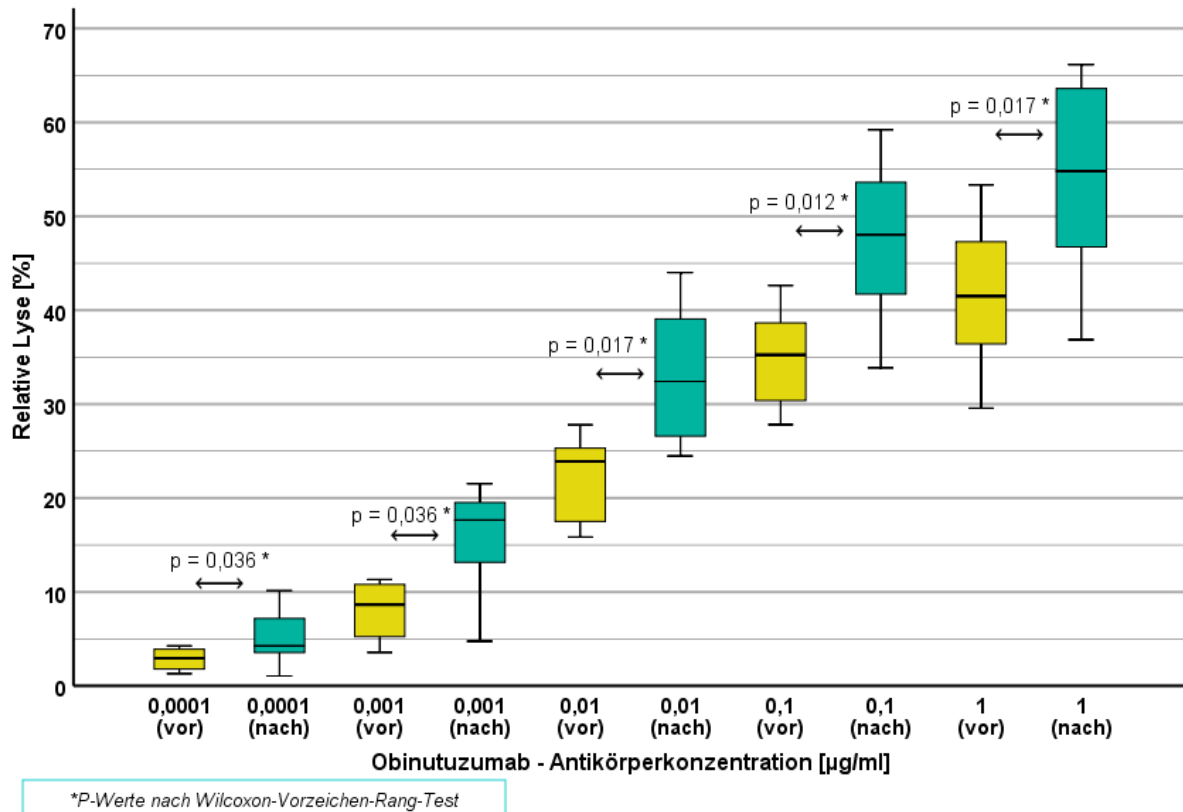
Die Obinutuzumab dependent cellular cytotoxicity (kurz ODCC) zeigte bei einer E/T-Ratio von 2,5:1 und ab einer Antikörperkonzentration von 0,0001 µg/ml einen signifikanten Anstieg nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation. Während im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test bei dieser Antikörperkonzentration der p-Wert bei 0,036 liegt, schließt der 95 % CI des medianen Anstiegs der relativen Lyse nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation jedoch den Wert 0 ein. Dieser Widerspruch ist v. a. durch die geringe Probandenmenge (n = 8) und individuelle Schwankungen zu erklären. In allen höheren Antikörperkonzentrationsreihen sprechen beide Auswertungsmethoden übereinstimmend für einen signifikanten Anstieg der relativen Lyse nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation (**Tabelle 12**).

Bei der nächsthöheren Antikörperkonzentration von 0,001 µg/ml stieg die relative Lyse nach Supplementation median um 8,4 %. Der stärkste mediane Anstieg nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation zeigte sich bei der Antikörperkonzentration von 0,1 µg/ml mit 10,4 %. Die entsprechenden Daten für die anderen Konzentrationsreihen sowie p-Werte finden sich in **Tabelle 12**. Zur besseren Darstellung sind dort auch die Mediane der Boxplots aus **Abbildung 12** sowie die p-Werte explizit genannt.

**Tabelle 12: ODCC - Mediane relative Lysen bei einer E/T-Ratio von 2,5:1**

Antikörperkonzentration [µg/ml]	0,0001	0,001	0,01	0,1	1
<b>relative Lyse vor Supplementation</b>	2,9 %	8,7 %	23,9 %	35,2 %	41,5 %
<b>relative Lyse nach Supplementation</b>	4,3 %	17,7 %	32,4 %	48,0 %	54,8 %
<b>p-Werte (vor vs. nach)</b> Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test	0,036	0,036	0,017	0,012	0,017
<b>Anstieg der relativen Lyse</b> [Median und BCa* 95 % CI]	1,6 % [-0,1; 5,3]	8,4 % [2,3; 12,7]	8,1 % [4,8; 22,7]	10,4 % [6,4; 19,1]	7,6 % [3,4; 23,7]

\* Bootstrap Methode: Bias-corrected and accelerated (BCa) - Stichprobenziehung einfach, Stichprobenumfang 1.000, Konfidenzintervallniveau 95 % [SPSS 25].



**Abbildung 12: Relative ODCC-Lysen vor und nach Supplementation bei einer E/T-Ratio von 2,5:1**

Darstellung der relativen Lysen jeweils vor (gelb) und nach (türkis) Supplementation für die E/T-Ratio 2,5:1 als Boxplot. Die dazugehörigen p-Werte nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test sind eingeblendet.

Einige den Abbildungen zugrundeliegenden Daten sind zusätzlich in **Tabelle 12** aufgelistet.

#### 4.5.2 ODCC bei einer E/T-Ratio von 5:1

Auch bei einer E/T-Ratio von 5:1 zeigte die ODCC ab einer Antikörperkonzentration von 0,0001 µg/ml einen signifikanten Anstieg nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation. Dies zeigten der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test mit einem p-Wert von 0,025 als auch der 95 % CI des medianen Anstiegs nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation übereinstimmend (**Tabelle 13**). Bereits vor Supplementation lag die relative Lyse bei diesem Ansatz mit der niedrigsten Antikörperkonzentration median bei 5,2 %. Nach Supplementation stieg die relative Lyse median um 4,5 %.

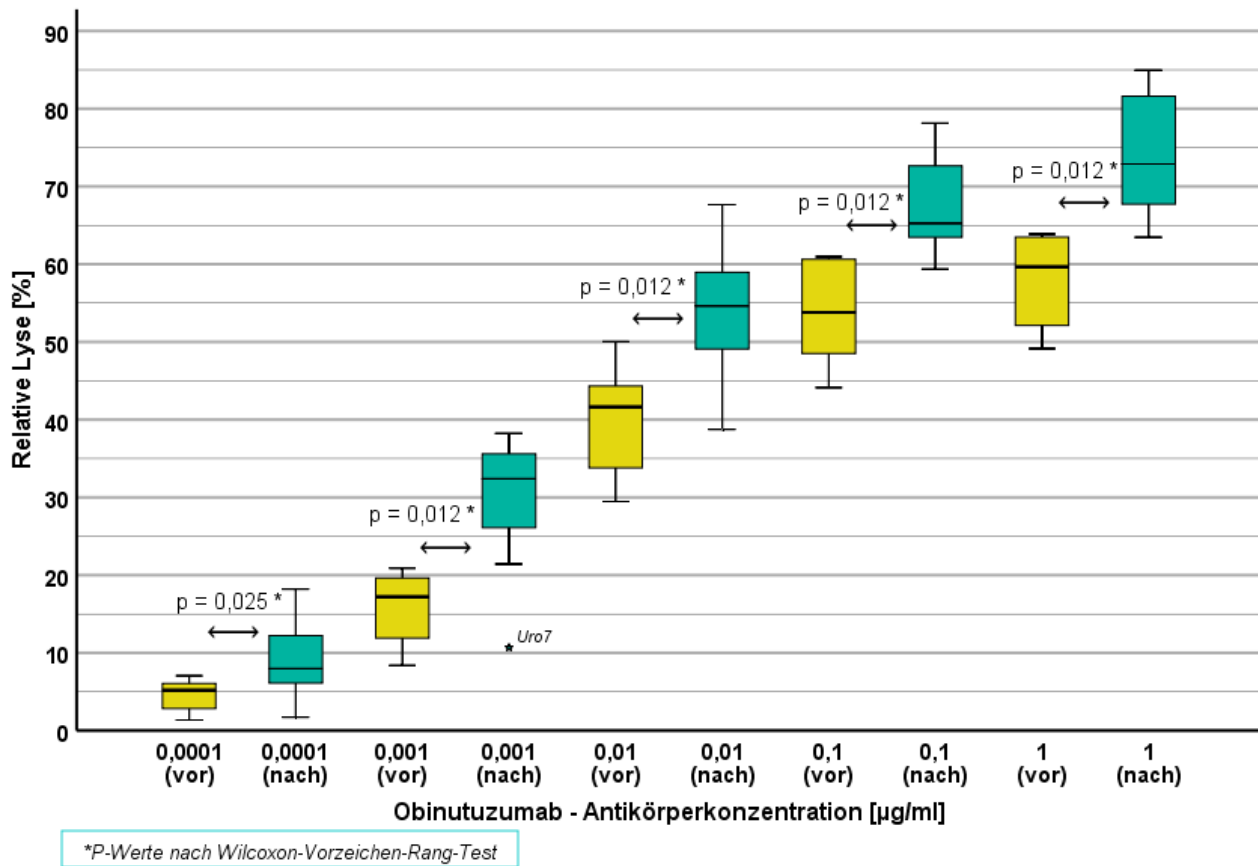
Bei der nächsthöheren Antikörperkonzentration von 0,001 µg/ml stieg die relative Lyse nach Supplementation median um 14,5 %. Die Antikörperkonzentrationsreihen 0,001 bis 1 µg/ml zeigten alle einen starken medianen Anstieg nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation, welcher zwischen 9,4 % und 14,5 % undulierte. Bei der höchsten Antikörperkonzentration mit 1 µg/ml lag die mediane relative Lyse vor Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation bei 59,7 % und nach Supplementation bei 72,9 %. Die entsprechenden, hier noch nicht genannten Daten für die anderen Konzentrationsreihen finden sich zusammen mit den p-Werten in **Tabelle 13**. Zur besseren Darstellung sind dort auch die Mediane der Boxplots aus **Abbildung 13** sowie die p-Werte nochmals explizit genannt.

**Tabelle 13: ODCC - Mediane relative Lysen bei einer E/T-Ratio von 5:1**

Antikörperkonzentration [µg/ml]	0,0001	0,001	0,01	0,1	1
<b>relative Lyse vor Supplementation</b>	5,2 %	17,2 %	41,6 %	53,8 %	59,7 %
<b>relative Lyse nach Supplementation</b>	8,0 %	32,4 %	54,6 %	65,3 %	72,9 %
<b>p-Werte (vor vs. nach)</b> Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test	0,025	0,012	0,012	0,012	0,012
<b>Anstieg der relativen Lyse</b> [Median und BCa* 95 % CI]	4,5 % [2,1; 6,5]	14,5 % [7,3; 20,8]	9,4 % [8,9; 20,9]	10,9 % [5,1; 19,7]	13,5 % [6,0; 25,5]

\* Bootstrap Methode: Bias-corrected and accelerated (BCa) - Stichprobenziehung einfach, Stichprobenumfang 1.000, Konfidenzintervallniveau 95 % [SPSS 25].





**Abbildung 13: Relative ODCC-Lysen vor und nach Supplementation bei einer E/T-Ratio von 5:1**

Darstellung der relativen Lysen jeweils vor (gelb) und nach (türkis) Supplementation für die E/T-Ratio 5:1 als Boxplot. Die dazugehörigen p-Werte nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test sind eingeblendet.

Einige den Abbildungen zugrundeliegenden Daten sind zusätzlich in **Tabelle 13** aufgelistet.

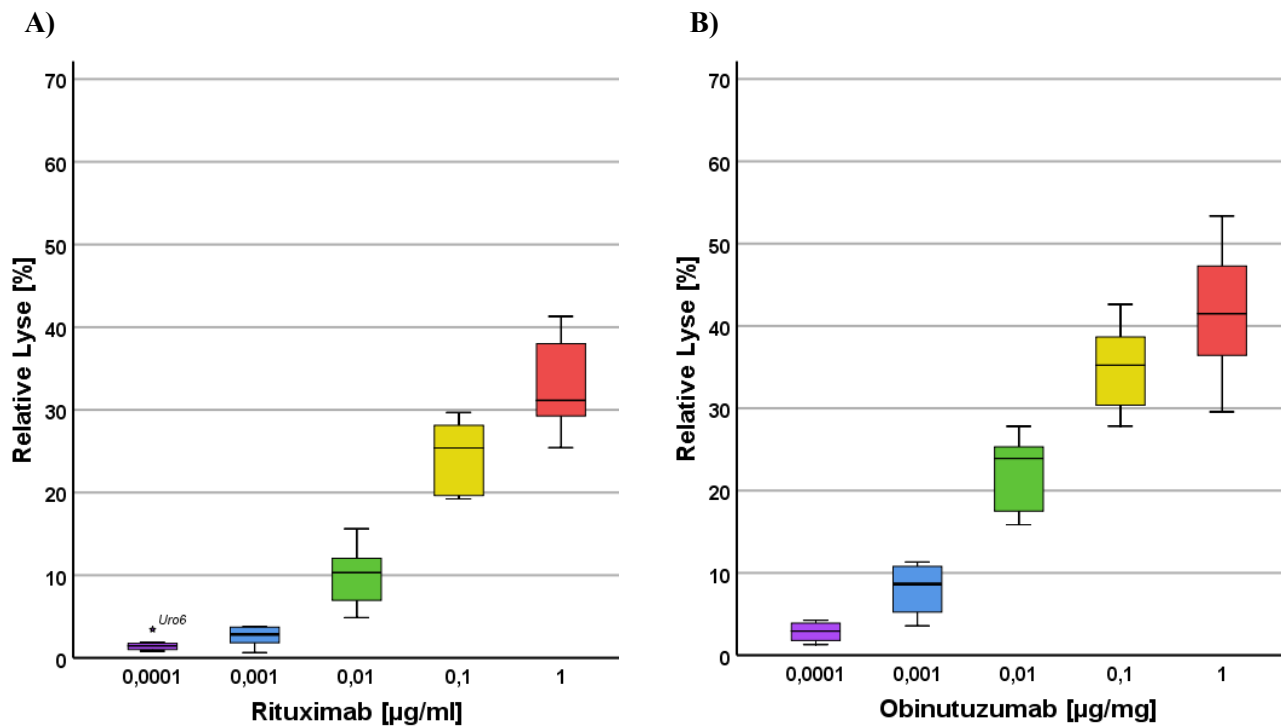
## **4.6 Vergleich von RDCC und ODCC**

Beim Vergleich der beiden Antikörper Rituximab und Obinutuzumab wurden insbesondere zwei Fragestellungen untersucht. Einerseits sollte überprüft werden, ob ein Antikörper, unabhängig vom Vitamin-D-Spiegel, mehr Lyse induziert als der andere, und andererseits, ob der stärker wirksame Antikörper zusätzlich auch noch einen größeren Anstieg der relativen Lyse nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation bewirkt als der schwächer wirksame Antikörper.

### **4.6.1 Vergleich der relativen Lysen vor Supplementation**

Um zu überprüfen, ob Obinutuzumab bei gleicher Konzentration mehr Lyse induziert als Rituximab, wurden die relativen Lysen vor Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test miteinander verglichen. Bereits ab einer Antikörperkonzentration von 0,0001 µg/ml lag die relative Lyse vor Supplementation bei beiden E/T-Ratios unter Obinutuzumab signifikant höher als unter Rituximab.

Zur Veranschaulichung sind die relativen Lysen unter beiden Antikörpern vor Supplementation in **Abbildung 14** für die E/T-Ratio von 2,5:1, in **Abbildung 15** für die E/T-Ratio von 5:1 als Boxplot aufgetragen. Bei einer E/T-Ratio von 5:1 wird der signifikante Unterschied besonders gut ersichtlich, da sich die Boxen gleicher Antikörperkonzentration teilweise gar nicht oder nur noch mit den Whiskers überschneiden.

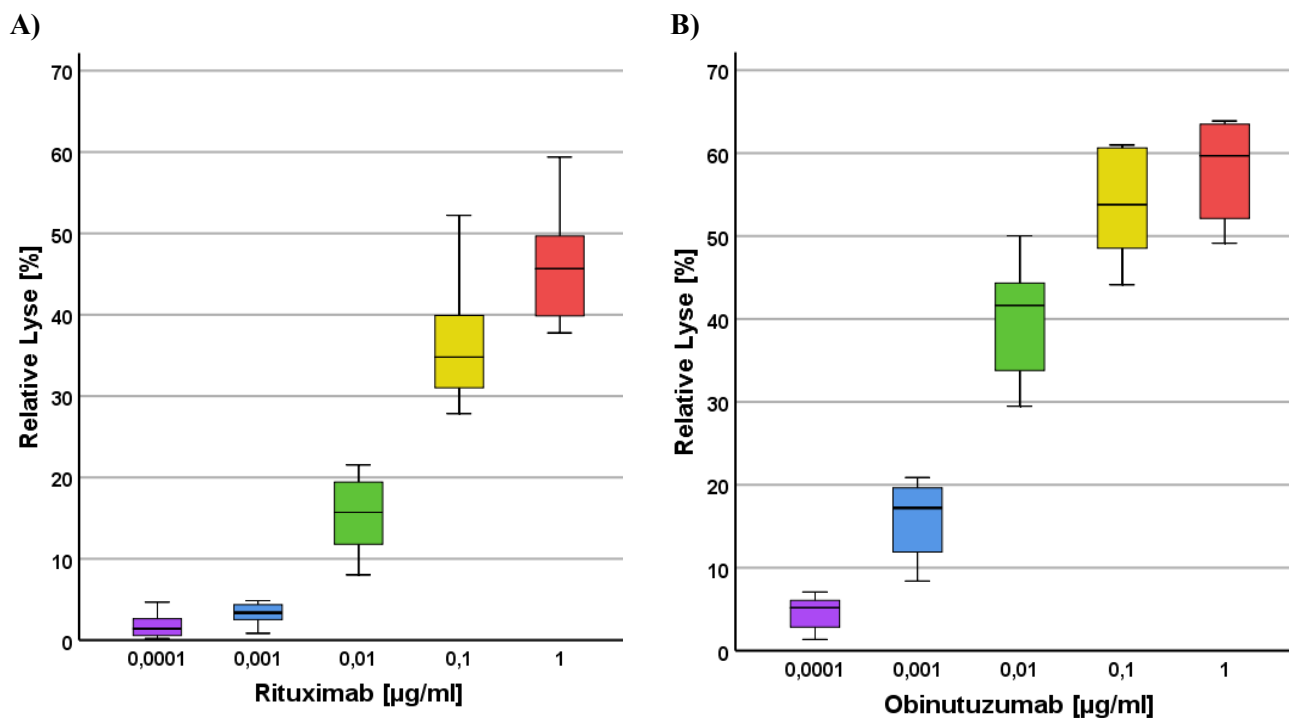


**Abbildung 14: Vergleich der relativen Lysen vor Supplementation bei einer E/T-Ratio von 2,5:1**

Die relativen Lysen unter (A) **Rituximab** und (B) **Obinutuzumab** sind nebeneinander als Boxplots aufgetragen. Die jeweiligen Antikörperkonzentrationen sind farblich differenziert. Dabei wird gut ersichtlich, dass Obinutuzumab eine stärkere Lyse erzielt als Rituximab bei analogen Konzentrationen. Die dazugehörigen Signifikanztests wurden mit Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test durchgeführt. Die p-Werte dazu sind in **Tabelle 14** zusammengefasst.

**Tabelle 14: P-Werte zum Vergleich der relativen Lysen vor Vitamin D3-Supplementation zwischen ODCC und RDCC bei einer E/T-Ratio von 2,5:1**

Antikörperkonzentration [µg/ml]	0,0001	0,001	0,01	0,1	1
p-Werte	0,017	0,017	0,012	0,012	0,012



**Abbildung 15: Vergleich der relativen Lysen vor Supplementation bei einer E/T-Ratio von 5:1**

Auch hier sind die relativen Lysen unter (A) **Rituximab** und (B) **Obinutuzumab** nebeneinander als Boxplots aufgetragen. Die jeweiligen Antikörperkonzentrationen sind farblich differenziert. Abermals wird deutlich, dass Obinutuzumab in allen Konzentrationen bei gleicher E/T-Ratio eine stärkere Lyse erzielt als Rituximab bei analogen Konzentrationen. Die dazugehörigen Signifikanztests wurden mit Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test durchgeführt. Die p-Werte dazu sind in **Tabelle 15** zusammengefasst.

**Tabelle 15: P-Werte zum Vergleich der relativen Lysen vor Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation zwischen ODCC und RDCC bei einer E/T-Ratio von 5:1**

Antikörperkonzentration [µg/ml]	0,0001	0,001	0,01	0,1	1
p-Werte	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012

## 4.6.2 Vergleich der relativen Lysen nach Supplementation

Analog zu Kapitel 4.6.1. wurden die relativen Lysen nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zwischen den beiden eingesetzten Antikörpern verglichen. Auch nach Supplementation lag die relative Lyse ab einer Antikörperkonzentration von 0,0001 µg/ml bei beiden E/T-Ratios unter Obinutuzumab signifikant höher als unter Rituximab. Die einzelnen p-Werte sind in **Tabelle 16** für die relativen Lysen nach Supplementation eingetragen.

Auf eine graphische Darstellung des RDCC/ODCC-Vergleichs der relativen Lysen nach Supplementation als Boxplot-Diagramm wurde ob des eindeutigen Ergebnisses (s. **Tabelle 16**) und einer somit großen visuellen Ähnlichkeit mit dem Vergleich der relativen Lysen vor Supplementation (s. Kapitel 4.6.1., S.71) verzichtet.

**Tabelle 16: Vergleich der relativen Lysen nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation zwischen ODCC und RDCC**

Antikörperkonzentration [µg/ml]	0,0001	0,001	0,01	0,1	1
p-Werte bei E/T = 2,5:1	0,017	0,012	0,012	0,012	0,012
p-Werte bei E/T = 5:1	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012

## **5 Diskussion**

### **5.1 Diskussion der Methodik**

Die Zytotox-Assays der vorliegenden Doktorarbeit wurden vornehmlich zur Untersuchung der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) von Natürlichen Killerzellen eingesetzt, die aus peripherem Blut gewonnen wurden. Die Frage dabei war, ob eine Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation der Probanden, welche im Rahmen ihres therapeutischen Settings eine Testosterondepletionstherapie erhielten, zu einer Änderung der ADCC führte.

In den meisten Ansätzen, abgesehen von den Antikörper-unabhängigen Lysereaktionen sowie den Ansätzen mit der niedrigsten Rituximabkonzentration, zeigte sich, dass eine erhöhte Effektorzellzahl (E/T-Ratio) bzw. eine Erhöhung der Antikörperkonzentration stets zu einer erhöhten medianen Lyse der Targetzellen führte (Daten nicht explizit einander gegenübergestellt, aber den **Tabelle 10-13** zu entnehmen). Damit weisen die Ergebnisse eine in sich notwendige Kongruenz und Logik auf.

Eine signifikante Erhöhung der ADCC nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation bei der niedrigsten Rituximab-Konzentration ließ sich nicht zeigen. Die AICC zeigte eine signifikante Änderung nach Auswertung als 95% Konfidenzintervall des Medians, nicht jedoch nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Die Unterschiede zwischen diesen beiden Ansätzen waren jedoch ohnehin sehr klein, sodass messbedingte Schwankungen stärker ins Gewicht fielen. Möglicherweise hätte hier die Wahl größerer E/T-Verhältnisse geholfen. Den Umständen geschuldet, dass nur eine begrenzte Anzahl an NK-Zellen pro Proband zur Verfügung stand, ließ sich dies jedoch nicht realisieren.

#### **5.1.1 Einfluss der verwendeten Zelllinien**

In dieser Arbeit kamen als Targetzellen DAUDI-Zellen zum Einsatz, welche als B-Zelllinie eines EBV- sowie BCL2-positiven Burkitt Lymphoms in den 60ern etabliert wurden. DAUDI-Zellen sind CD3 negativ, CD19 und CD20 positiv [108]. Die NK-Zell-vermittelte ADCC gegenüber DAUDI-Zellen wurde als Nekrose-induzierend beschrieben und lässt sich daher im LDH-Assay zuverlässig messen [28, 29]. Auch wenn DAUDI-Zellen als NK-resistent beschrieben wurden, zeigen NK-Zellen eine schwache AICC gegenüber DAUDI-Zellen [3, 28, 109]. Eine NK-Zelle kann nur dann zielgerichtet eine ADCC induzieren, wenn neben dem über FcγRIIIA vermittelten Signalfluss noch Kosignale anderer aktivierender Rezeptoren hinzukommen [15]. Daher ist der Umstand, dass DAUDI-Zellen in geringem Maße NK-Zell-sensibel sind, positiv zu bewerten. Die Messergebnisse liegen dadurch näher an einer *in vivo* Realität. Gleichzeitig ist die fehlende MHC-I-Expression der DAUDI-Zellen von Vorteil, da so ein zufälliger MHC-I-Match mit den NK-Zellen der Probanden nicht zu einer NK-Inaktivierung führen kann. Insbesondere inhibitorische KI-Rezeptoren binden an bestimmte MHC-I [14, 15, 21, 23, 24].

Als Effektorzellen wurden NK-Zellen von Probanden durch Depletion der Nicht-NK-Zellen mittels MicroBeads-gekoppelter Antikörper isoliert. In Studien mit ähnlichen Fragestellungen aus den 80er und teilweise 90er Jahren wurde die NK-Zell-Aktivität noch im Zellverband mit anderen mononukleären Zellen bestimmt [99, 112]. Dies machte eine Abgrenzung von den Aktivitäten anderer FcR-tragender Immunzellen sowie den Ausschluss simultaner Interaktion mit anderen Immunzellen teilweise schwierig. Die Isolierung von NK-Zellen mittels Antikörper, wie in meiner Arbeit, erlaubte hingegen NK-Zell-spezifische Aussagen.

Die eingesetzten NK-Zellen wurden außerdem keiner Präaktivierung mit Zytokinen unterzogen. Dadurch wurden weniger (störende) Einflussfaktoren in die Versuche eingebracht.

### 5.1.2 Vitamin D-Supplementation

Die verwendeten NK-Zellen als Effektorzellen wurden aus dem peripheren Blut von Probanden gewonnen, mit welchen ein schnelles Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementationsschema durchgeführt wurde. Im Unterschied zu einer *in vitro* Inkubation mit dem Vitamin D-Hormon wird in diesem Fall das ganze Immunsystem mit der hormonellen Veränderung konfrontiert. Dadurch lässt sich zwar später nicht differenzieren, wo der primäre Wirkort des veränderten Hormonstatus liegt, es gibt jedoch Hinweise auf einen möglichen generellen *in vivo* Effekt.

Bei der Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation und der dadurch tatsächlich erzielten Serumspiegel zeigte sich, dass mit Ausnahme eines Probanden alle Probanden mithilfe der von F. Acker [3] entwickelten Formel den gewünschten Zielbereich erreichten. Die Suppletionsformel lautete:

$$\text{Cholecalciferol (I.E.)} = \Delta 25(\text{OH})\text{D (ng/ml)} \times \text{Körpergewicht (kg)} \times 200$$

Die dazu erforderliche Anzahl an Tabletten wurde gleichmäßig auf fünf aufeinanderfolgende Tage verteilt. Die Messung des substituierten 25(OH)D-Serumspiegels erfolgte 5 Tage nach der letzten Tabletteneinnahme.

Während acht von neun supplementierten Probanden nach Supplementation einen 25(OH)D-Spiegel nahe des Zielwertes von 65 ng/ml aufwiesen, reagierte ein Proband mit einem außerordentlich starken 25(OH)D-Spiegel-Anstieg. Ein Hintergrund, warum jener Proband nach Supplementation einen 25(OH)D-Spiegel von 122 ng/ml verzeichnete, ließ sich nicht eruieren. Wegen der hohen Reliabilität der 25(OH)D-Messung erfolgte keine 2. Messung zur Überprüfung auf Messfehler [106]. Der erreichte 25(OH)D-Spiegel des Probanden lag zwar über dem in der Studienplanung angegebenen oberen Grenzwert des Referenzbereichs (30-100 ng/ml), jedoch mit sicherem Abstand unter dem gesundheitlich kritischen Bereich von > 150 ng/ml mit möglicher Toxizität [47, 55]. Als sich der Proband fünf Tage nach Ende der Supplementation zur zweiten Blutentnahme vorstellte, berichtete er über keinerlei neu aufgetretene Beschwerden oder andere Symptome. Die Ergebnisse aus den Assays dieses Probanden wurden jedoch von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

Unter Ausschluss jenes Probanden lagen die 25(OH)D-Spiegel nach der Supplementation der anderen Probanden meiner Arbeit im Bereich derer aus der vorangegangenen Studie (Neumann et al. [2]). Somit führte die eingesetzte Formel zur Berechnung der Cholecalciferol-Dosis zu einer ausreichend genauen Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation nahe an den gewünschten 25(OH)D-Zielspiegel von 65 ng/ml. Dennoch weist jener Ausreißer daraufhin, dass unklar ist, wie oft eine solche überschießende Vitamin D<sub>3</sub>-Aufnahme bei großflächigerem Einsatz dieser Suppletionsformel vorkommen würde.

### 5.1.3 Probandenrekrutierung

Die Funktionalität der NK-Zellen wird vom Faktor „Alter“ beeinflusst [39]. Dies war wichtig im Rahmen der Hypothesenbildung sowie der Probandenrekrutierung zu beachten, da sich geschlechtsspezifische Unterschiede in Funktionalität und Population der NK-Zellen sowie in Bezug auf die generelle Immunoseneszenz altersabhängig verschieden darstellen und teilweise sogar umkehren können [35, 43]. So weisen z. B. junge Frauen im peripheren Blut kleinere relative NK-Zell-Populationen als Männer auf, verzeichnen nach der Menopause jedoch einen deutlich stärkeren Anstieg in der NK-Zell-Population und überholen schließlich gleichaltrige Männer [43]. Auch die NK-Zell-Aktivität postmenopausaler Frauen ist vermutlich höher als diejenige gleichaltriger Männer [45]. Als Gründe für die geschlechtsspezifische Immunoseneszenz können Hormonveränderungen diskutiert werden, wie etwa die massive Hormonumstellung bei Frauen während der Menopause oder die Abnahme der Testosteronserumspiegel bei alternden Männern [35, 41, 42]. Vergleiche auf geschlechtsspezifische Unterschiede sollten also zwischen Gruppen altersadaptiert sein.

Die Rekrutierung von Prostatakarzinomkranken stellte insofern eine treffende Auswahl dar, da diese den Patienten der RICOVER-60-Studie in mehreren Eigenschaften entsprechen. Die retrospektive Analyse von Bittenbring et al. auf Vitamin D-Spiegel der Patienten der RICOVER-60-Studie hatte schließlich den Anstoß für die ADCC-Assays von Neumann et al. gegeben [1, 2]. Bei der RICOVER-60 Studie waren die untersuchten Patienten und Patientinnen zwischen 61 und 80 Jahren alt [5]. Das mittlere Erkrankungsalter des Prostatakarzinoms liegt bei 70 Jahren [72]. Das mediane Alter der Probanden in meiner Studie lag bei 69,5 Jahren (MIN = 51; MAX = 83). Auch in Hinblick auf das Vorliegen einer Krebserkrankung glichen sich die beiden Kollektive. Nach aktuellem Forschungsstand wird nämlich diskutiert, dass das Auftreten von Karzinomen im Allgemeinen mit schlechteren NK-Zell-Funktionen assoziiert sei [21]. Diese Assoziation könnte bei Vergleichen mit anderen Kollektiven zu einem Bias in Probandenrekrutierung und NK-Zell-Funktionalität führen.

Auch die gesunden Probanden der Studie von Neumann et al., aus welcher die Fragestellung für meine Arbeit hervorging, zeigten mit im Mittel 61,5 Jahren ein ähnliches Alter im Vergleich mit den Probanden in meiner Arbeit [2].

Jedoch scheint die ADCC, wie in der Einleitung bereits ausgeführt, anders als die Antikörper-unabhängige natürliche Aktivität der NK-Zellen (AICC), weniger oder kaum vom Alter abhängig zu sein [35–39]. Deshalb wäre möglicherweise auch ein Vergleich mit jüngeren männlichen Probanden unproblematisch, nicht jedoch



mit jüngeren weiblichen Probanden wegen der enormen Unterschiede im Haushalt der weiblichen Sexualhormone. Die Studienlage zu Altersabhängigkeit der NK-vermittelten ADCC ist jedoch dünn [39].

Leider konnte im Verlauf der vorliegenden Doktorarbeit nicht die gewünschte Anzahl an ca. 15 Probanden im festgesetzten Zeitraum März bis Mai 2019 rekrutiert werden. Dies war darauf zurückzuführen, dass seit längerer Zeit in der S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms bereits eine begleitende Vitamin D-Substitution empfohlen wird [104]. Als Probanden kamen für diese Studie also nur Patienten infrage, die von sich aus zuvor eine begleitende Vitamin D-Therapie abgelehnt oder aus anderen Gründen eine Substitution nicht oder nicht konsequent umsetzten. Wegen der geringen Probandenzahl ist also bis zum jetzigen Zeitpunkt ein statistischer Vergleich mit den Ergebnissen aus der Vorgänger-Studie (Neumann et al. [2]) v. a. mit den gesunden männlichen Probanden mithilfe von Signifikanztests wie dem Mann-Whitney-U-Test nicht möglich gewesen.

Abschließend sei darauf hingewiesen, dass alle Probanden der vorliegenden Doktorarbeit einen BMI  $> 25 \text{ kg/m}^2$  hatten (vgl. **Tabelle 8**), und daher in dieser Studie ein Gewichts-bias vorliegt. Dies könnte durch das typische Nebenwirkungsspektrum der GnRH-Analoga begründet sein, welche zu einer Gewichtszunahme führen können [72].

### 5.1.4 GnRH-Analoga

Die rekrutierten Probanden dieser Arbeit wurden mit Gonadoliberin (GnRH)-Analoga im Rahmen ihrer Prostatakreberkrankung behandelt. Ähnlich wie für die *in vivo* Supplementation mit Vitamin D<sub>3</sub> gilt auch bei der *in vivo*-Therapie mit GnRH-Analoga, dass nicht ohne Weiteres differenzierbar ist, wo genau sich der veränderte Hormonstatus auswirkt. Die Ergebnisse aus Studien mit einer Hormonstatusänderung *in vivo* (anstelle einer Inkubation der NK-Zellen *in vitro* nach deren Isolierung) geben jedoch durchaus einen Eindruck von der tatsächlichen *in vivo* Modulation im Verband des gesamten Organismus.

Im Rahmen einer GnRH-Analoga-Therapie wird allerdings nicht nur die Testosteron-, sondern auch die Estrogenbildung unterdrückt (vgl. Hormonstatuserhebungen bei Maggio et al. [103]). Somit kann als Alternativhypothese auch ein additiver Effekt der fehlenden Sexualhormone Estradiol und Testosteron angenommen werden. Außerdem pendelt sich zwar fünf bis zehn Jahre postmenopausal der Estradiolspiegel von Frauen auf gleiche Normwerte wie bei Männern ein, dennoch fallen die Estradiollevel bei alten Männern tendenziell geringfügig höher aus als bei gleichaltrigen postmenopausalen Frauen [41, 42, 73]. Insofern wäre eine genaue Hormonstatuserhebung während der Messung der NK-Zell-Aktivität (Zytotox-Assays) in beiden Studien (der vorliegenden sowie der von Neumann et al. [2]) aufschlussreich gewesen.

Khosla et al. zeigten an Männern unter Behandlung mit GnRH-Analoga plus Aromatasehemmer, dass Estradiol- und Testosteronentzug in Kombination einen additiven Effekt auf die Erhöhung der TNF- $\alpha$ -Level entfalteten, bei gleichzeitiger Einzelsubstitution je eines der Hormone jedoch eine Veränderung gegenüber kombinierter Substitution nicht signifikant ausfiel [113]. Maggio et al. postulierten jedoch im Gegensatz dazu,

dass diese Ergebnisse bezüglich inflammatorischer Zytokine mit Probanden unter langfristiger GnRH-Analoga-Therapie nicht reproduzierbar seien, sondern nur als kurzfristiger Effekt nach akuter Hormondepletion zu verstehen seien [103]. Die Probanden meiner Studie waren größeren Teils bereits seit über einem Jahr in Behandlung (s. Kapitel 3.1, S.40). Ob GnRH-Analoga also über veränderte Zytokinlevel meine Studienergebnisse beeinflusst haben, bleibt unklar.

Auch das GnRH-Analogon selbst, mit welchem die Probanden im Rahmen ihrer Prostatakarzinomkrankung therapiert wurden, sollte als möglicher Einflussfaktor in Betracht gezogen werden. Eine Studie von 1999 zum Effekt von GnRH-Analoga auf die AICC untersuchte die Zytotoxizität von mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMCs) von Frauen mit Endometriose oder Leiomyom. Umesaki et al. untersuchten dabei die NK-Aktivität im PBMC Zellverband an NK-Zell-sensitiven K562 Targetzellen mittels  $^{51}\text{Cr}$ -Release-Assay. Nach vier bis fünf Monaten GnRH-Analoga-Therapie der Patientinnen war die NK-Zytotoxizität signifikant gesteigert. Da sich kein signifikanter Zusammenhang der gesteigerten Zytotoxizität mit den gesunkenen Estradiolspiegeln der Patientinnen zeigte, führten Umesaki et al. den Effekt auf das GnRH-Analogon selbst zurück. Dabei muss jedoch angemerkt werden, dass die Testosteronspiegel in dieser Studie nicht untersucht wurden, und die Versuche zudem nach älterem Standard im PBMC-Zellverband ( $\leftrightarrow$  NK-Zellen) durchgeführt wurden [112]. Dennoch sollte dieser Umstand weiterverfolgt werden und dazu wären weitere Studien notwendig.

Im Gegensatz zum natürlichen GnRH haben GnRH-Analoga außerdem längere Halbwertszeiten und binden deutlich stärker an ihre Rezeptoren [114]. Hinzu kommt, dass GnRH-Analoga zur chemischen Kastration in Depotform verabreicht werden, und somit kontinuierliche Wirkspiegel erzielen, während natürliches GnRH pulsatil sezerniert wird. Theoretisch kann darüber hinaus auch eine indirekte Wirkung durch im Rahmen der Therapie veränderter LH- und FSH- Spiegel nicht ausgeschlossen werden [115]. Auch zu einer möglichen direkten Wirkung von GnRH auf das Immunsystem gibt es bereits Hinweise. Chen et al. wiesen nach, dass natürliches und analoges GnRH in PBMCs das Transkriptom veränderte. Es stimulierte signifikant die mRNA-Transkription des IL- $2\gamma$ -Rezeptors [116]. Unklar bleibt, ob bei längerer Behandlungsdauer ein ähnlicher Desensibilisierungseffekt in PBMCs wie in der Hypophyse erfolgen würde, und ob NK-Zellen davon in irgendeiner Weise betroffen sind.

## **5.2 Einordnung der Ergebnisse**

### **5.2.1 Einfluss von Vitamin D auf Antikörpertherapien und Zelluläre Zytotoxizität**

Eine Vielzahl von klinischen Studien konnte in den letzten Jahren zeigen, dass ein defizienter 25(OH)D-Spiegel mit schlechterem Outcome von Rituximabtherapien bei Non-Hodgkin-Lymphomen assoziiert ist. Entsprechende signifikante Daten liegen für das rezidivfreie Überleben sowie Gesamtüberleben beim DLBCL, dem Follikulären Lymphom und dem Hochrisiko-Mantelzelllymphom vor [1, 16–18]. Eine ähnliche Assoziation des 25(OH)D-Spiegels mit Therapieoutcome konnte bisher allerdings nicht für Rituximabtherapien autoimmunologischer Erkrankungen, wie z.B. der Rheumatoiden Arthritis, gezeigt werden [117].

Als Effektorzellen dieser antikörpergestützten Tumorthérapien werden insbesondere NK-Zellen diskutiert [6, 21]. *In vitro* Experimente zur antitumorösen Aktivität von NK-Zellen bekräftigten den Zusammenhang von Outcome nach Lymphomtherapie und Vitamin D-Status. Bereits 2013 beobachteten Al-Jaderi et al., dass NK-Zellen nach *in vitro*-Stimulation mit Calcitriol eine stärkere Antikörper-unabhängige Zytotoxizität (AICC) gegen Tumorzellen aufwiesen, und gleichzeitig mit veränderter Rezeptorexpression reagierten. Zytotoxizitätsaktivierende Rezeptoren waren dabei vermehrt exprimiert, während inhibierende vermindert waren [65]. Auch im Rahmen der Interventionsstudie unter Neumann stellte F. Acker eine Abhängigkeit der AICC vom Vitamin D nach Cholecalciferol-Supplementation *in vivo* fest [3]. Eine Querschnittsstudie von Mariani et al. von 1999 konnte diesen Zusammenhang von AICC mit Vitamin D-Status zwar nicht feststellen, fand jedoch eine positive Assoziation zwischen 25(OH)D-Spiegeln und der Anzahl peripher zirkulierender CD16<sup>+</sup>-NK-Zellen [38]. Zuletzt gelangen Neumann et al. schließlich im Rahmen ihrer Interventionsstudie der Nachweis, dass neben der NK-Zell-AICC auch die NK-Zell-ADCC signifikant vom Vitamin D-Status abhängt [2]. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein signifikanter Anstieg der NK-Zell-ADCC nach Vitamin D3-Supplementation sowohl unter Rituximab als auch unter Obinutuzumab. Da die Probanden meiner Arbeit aufgrund ihrer testosteronsuppressiven Therapie auch einen veränderten Sexualhormonstatus aufwiesen, werden die konkreten Ergebnisse dieser Arbeit zum Vitamin D-Effekt auf die NK-Zell-Zytotoxizität erst unter dem Kapitel 5.2.4. (S.85) erörtert.

Neumann et al. untersuchten dabei auch einen optimalen Wirkungsbereich, der deutlich höher lag, als der von Nationalen Gesundheitsinstituten (wie dem RKI) empfohlene 25(OH)D-Spiegel von mehr als 20 ng/ml [48]. Optimale ADCC wurde demnach erst bei Spiegeln von ca. 65 ng/ml erreicht [2].

Dennoch sind weitere Studien zur Vitamin D-Supplementation auf Werte über 50 ng/ml [25(OH)D] notwendig. Das Institute of Medicine, USA, gab in seiner Leitlinie zu bedenken, dass möglicherweise entsprechend hohe 25(OH)D-Serumspiegel mit erhöhter Gesamtmortalität in der Gesellschaft assoziiert seien [47]. Andere Studien wiesen diese Ergebnisse jedoch als Artefakt aus und widersprachen dieser Aussage [56].

Ob jedoch der Vitamin D-Effekt auf AICC und ADCC als direkte Wirkung in NK-Zellen zu verstehen ist, oder zumindest teilweise durch andere immunmodulatorische Zellen beeinflusst wird, ist nicht abschließend geklärt. NK Zellen zeigten bei *in vitro* Inkubation mit Calcitriol in den Experimenten von Al-Jaderi et al. erhöhte Zytotoxizität [65]. NK-Zellen interagieren allerdings stark mit anderen Immunzellen wie z.B. Makrophagen [24]. So sind Makrophagen im Besonderen selbst sehr sensibel für Vitamin D und außerdem fähig, auto- und parakrin wirksame Mengen an Calcitriol zu synthetisieren [60].

## 5.2.2 Einfluss von Geschlecht und Sexualhormonen auf Antikörpertherapien und zelluläre Zytotoxizität

Bei der geschlechtergetrennten Auswertung der RICOVER-60-Studie durch Pfreundschuh und Kollegen zeigte sich eine positive Assoziation des Outcome einer rituximabasierten Lymphomtherapie mit weiblichem Geschlecht [19]. Die Autoren erklärten diese Geschlechterdifferenz zwar über eine verlängerte Rituximab-Eliminierungsrate bei älteren Frauen. Im Folgenden möchte ich noch andere Faktoren diskutieren, die im Rahmen einer ergänzenden hormonellen Genese auf Ebene der Effektorzellen bei diesen Immuntherapien eine Rolle spielen könnten und somit für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit wichtig sind.

NK-Zellen, wesentliche Effektorzellen der Anti-CD20-Antikörpertherapien [6, 21], zeigen hinsichtlich ihrer Funktionalität möglicherweise eine Assoziation mit dem Geschlecht. Zwar sind die bisherigen Ergebnisse nicht eindeutig, dennoch zeichnet sich dabei eine altersabhängige Tendenz ab. Während die NK-Zellen jüngerer Frauen unter 50 Jahren laut Oertelt-Prigione eine geringere Aktivität und Zytotoxizität im Vergleich zu den NK-Zellen von Männern aufweisen, scheint sich dieses Verhältnis beim Vergleich postmenopausaler Frauen mit gleichaltrigen Männern umzukehren [36, 38, 44, 45]. Auch die Ergebnisse von Neumann et al. stützen diese Einschätzung [2]. Sowohl bei Neumann et al. als auch in der vorliegenden Arbeit waren die Probanden im Mittel über 60 Jahre alt.

Neben dem aktuell noch mäßig erforschten Einfluss des Geschlechts auf die Funktionalität von NK-Zellen ist die sexualhormonelle Beeinflussung hingegen schon vielfach beschrieben worden. In der bereits erwähnten Studie mit Patientinnen unter GnRH-Analoga-Therapie von Umesaki et al. (s. Kapitel 5.1.4., S.78) war die NK-Zytotoxizität (innerhalb der getesteten PBMC) gegenüber den NK-Zell-sensitiven K562 Targetzellen signifikant gesteigert [112].

Andere Studien untersuchten die sexualhormonelle Regulation der NK-Aktivität im *murinen* Experiment. Dabei wurde nach *in vivo*-Supplementation sowohl von Estradiol als auch Testosteron mehrfach eine reduzierte AICC von NK-Zellen gemessen, während die ADCC in einer Studie von 1988 als unbeeinflusst davon beschrieben wurde [86, 98–100]. Auch dem oft unbeachteten Progesteron wird ein suppressiver Effekt auf die NK-Zell-Aktivität zugeschrieben [86]. Die IFN- $\gamma$ -Produktion von milzständigen NK-Zellen schien *in vivo* durch Estradiol jedoch erhöht zu werden [98]. Im Gegensatz zur *in vivo*-Supplementation fand sich in der Literatur kein entsprechender Nachweis zu Effekten einer *in vitro*-Inkubation mit Sexualhormonen. Ergebnisse

zu *in vitro*-Hormoneffekten auf die AICC und ADCC unter Einsatz von Milzzellsuspensionen liegen aus dem Jahr 1988 mit alten Zellaufbereitungsmethoden vor. Inkubation der murinen Effektorzellen mit Estradiol und Testosteron zeigte hier keinen Effekt (das Medium war Globulin- also auch SHGB- frei) [99]. Dies könnte darauf hinweisen, dass entweder Sexualhormone an NK-Zellen keine oder nur geringe direkte Wirkung entfalten, während indirekte Wirkungen über andere Körperzellen vermittelt werden, oder aber dass Transportproteine oder andere Blutbestandteile notwendige Funktionen im Wirkmechanismus erfüllen. Fehlende Effekte bei *in vitro* Studien widersprechen also den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit insofern nicht, da die Hormonstatusveränderung (Testosterondepletion) hierbei *in vivo* erfolgte.

Unabhängig davon, inwiefern AICC und ADCC von NK-Zellen durch *in vitro*-Inkubation oder *in vivo*-Supplementation durch Sexualhormone beeinflusst werden, wurde auch die Expression von entsprechenden Rezeptoren in NK-Zellen in mehreren Studien untersucht. Sowohl in murinen als auch in humanen NK-Zellen konnten die *intrazellulären* Estrogenrezeptoren (ER)  $\alpha$  und  $\beta$  nachgewiesen werden [84, 97]. Ergebnisse aus Untersuchungen an humanen NK-Zellen zur IFN- $\gamma$ -Antwort auf Stimulierung mit einem nicht-membranpermeablen Estradiolanalogen sprechen zusätzlich auch für die Existenz eines *membranständigen* ER [84]. Meines Wissens ist dahingegen keine Studie mit Nachweis eines *intrazellulären* Androgenrezeptors in NK-Zellen publiziert. Für einen Androgeneffekt auf NK-Zellen gibt es dennoch vielfältige Erklärungsmöglichkeiten. So gibt es zur Frage nach der Existenz eines *membranständigen* Androgenrezeptors auf NK-Zellen meines Wissens ebenfalls noch keine publizierten Untersuchungen. Gleichzeitig kann Testosteron prinzipiell auch über Aromatisierung zu Estradiol Signale vermitteln [42, 67]. Dieser mögliche Signalweg ist im Immunsystem noch nicht hinreichend untersucht. Schließlich bleibt außerdem bei möglichen Effekten aller Sexualhormone die Frage offen, ob sich diese überhaupt als direkte Wirkung auf NK-Zellen selbst, oder besser als indirekte Wirkung durch Vermittlung über andere Immunzellen erklären lassen. Vor dem Hintergrund, dass ein Androgenrezeptor in NK-Zellen bisher nicht nachgewiesen wurde, ist die solideste Interpretation eines Testosteroneffekts auf NK-Zellen die einer indirekten Wirkung über Aromatisierung, Modulation des Zytokinmilieus oder über anderweitige Vermittlung durch medierende androgensensitive Zellen. Eine entsprechende Interpretation ist auch mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gut vereinbar, da der genaue Wirkmechanismus der Testosterondepletion nicht untersucht wurde.

Ergebnisse, wie Testosteron möglicherweise NK-Zellen auf indirektem Weg beeinflussen könnte, kommen aus der Leberzellkrebsforschung. Shi et al. konnten in Zytotox-Assays mit NK-Zell zeigen, dass erhöhte Expression des Androgenrezeptors mit einer erhöhten Überlebenswahrscheinlichkeit von HCC-Zellen einherging. Dies war begleitet von einer Suppression von IL-12A, einer Untereinheit des NK-Aktivators IL-12, durch Bindung des Androgenrezeptors in der Promotorregion in den HCC-Zellen [118]. Als Mediatoren der Testosteronwirkung *in vivo* kommen also neben Immunzellen auch die Zielzellen der NK-Zellen (z.B. Tumorzellen) selbst in Betracht. Da die in meiner Arbeit eingesetzten DAUDI-Zellen jedoch nicht mit Sexualhormonen behandelt wurden, sind die Erkenntnisse von Shi et al. nicht auf meine Arbeit übertragbar.

Einen anderen Weg der Mediation der Testosteronwirkung könnten andere androgensensitive Immunzellen

darstellen. Denn NK-Zellen interagieren sehr stark mit anderen Immunzellen, insbesondere mit Makrophagen und Dendritischen Zellen, aber auch mit T-Zellen [24, 34]. Tatsächlich wird bisweilen der allgemein immunsuppressive Effekt von Testosteron auch darauf zurückgeführt, dass Testosteron zu einer veränderten Expression pro- und antiinflammatorischer Mediatoren in Makrophagen und T-Zellen führt [77]. Zytokine könnten dann in einem zweiten Schritt die Funktionalität der NK-Zellen beeinflussen. So ist z. B. Suppression von FcR auf Zelloberflächen verschiedener Zelllinien bereits für einige Zytokine wie IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$  gezeigt worden, während z.B. IFN- $\gamma$  FcR-Expression zu stimulieren scheint [13].

Sexualhormone können das Zytokinmilieu im Organismus modulieren. Dabei zeigt Estradiol je nach Ausgangslage und untersuchtem Zusammenhang divergierende Effekte, während zu Testosteron vielfach die Unterdrückung inflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  publiziert wurde [77, 86, 91–95]. Diverse andere Zytokine wurden in einzelnen Studien ebenfalls untersucht, wobei die Studienlage oft widersprüchlich ist [91–96]. Erwähnenswert sind im Kontext dieser Arbeit erste Hinweise auf eine testosteronvermittelte Suppression von IFN- $\gamma$ , welches schließlich auch von NK-Zellen gebildet wird, und dem Chemokin MIP1 $\alpha$  (Macrophage Inflammatory Protein 1 $\alpha$ ) [95, 96]. Auch in der vorliegenden Arbeit könnte es also sein, dass die NK-Zell-Aktivität der Probanden durch ein verändertes Zytokinmilieu indirekt von der Testosterondepletion beeinflusst wurden.

Als zytokinproduzierende Zellen rücken Makrophagen bei der Untersuchung des immunmodulatorischen Effekts von Testosteron in den Vordergrund. Aktivierte Makrophagen können viele der Zytokine, die wichtig für Aktivierung und Reifung von NK-Zellen sind, sezernieren [30, 31]. Neben der Beeinflussung durch Zytokinsekretion interagieren Antigen-präsentierende Zellen und NK-Zellen auch über direkte Zell-Zell-Kontakte miteinander [30, 31, 33]. Makrophagen exprimieren Sexualhormonrezeptoren sowohl für Estradiol als auch für Testosteron [81–83, 85].

Diverse *in vitro* Untersuchungen zeigten einen breiten supprimierenden Effekt von Testosteron auf Makrophagen. So hemmt es *in vitro* die Proliferation und verstärkt Apoptose, während Estradiol einen Schutz vor Apoptosestimuli zu bieten scheint [78]. In anderen Studien zeigte sich außerdem eine Einschränkung der Funktionalität von Makrophagen unter Testosteroneinfluss, z. B. durch verminderte Expression von TLR4 (Toll-like-Rezeptor 4) mit einhergehend verminderter TNF- $\alpha$ -Antwort sowie durch supprimierte Abwehrmechanismen, wie z. B. verringerte Produktion von iNOS (inducible nitric oxide synthase) [83, 87].

Testosteron und Estradiol können also auf vielfältige Weise das Immunsystem und auch die Funktionalität von NK-Zellen beeinflussen. Während Pfreundschuh et al. in einer Auswertung der RICOVER-60-Studie die oben erwähnte Geschlechterdisparität beim Outcome der Lymphomtherapie durch eine verlängerte Rituximab-Eliminierungsrate älterer Frauen erklärten [19], sprechen diverse Ergebnisse aus der immunologischen Zellforschung für eine ergänzende hormonelle Genese auf Effektorzellebene. Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen für einen Einfluss von Sexualhormonen auf die NK-Zell-Funktionalität.

### 5.2.3 Interaktion von Vitamin D und Geschlecht im Rahmen von Antikörpertherapien und zellulärer Zytotoxizität

Die Funktion von NK-Zellen und das Outcome von Rituximabtherapien von Non-Hodgkin-Lymphomen zeigten sich demnach sowohl durch den Vitamin D-Status als auch durch das Geschlecht beeinflusst. Darüber hinaus interagieren diese beiden Komponenten auch miteinander. Sowohl in der klinischen retrospektiven Untersuchung von Bittenbring et al. als auch in den ADCC-Assays von Neumann et al. zeigte sich eine Geschlechterdisparität bezüglich des Vitamin D-Effekts. Frauen der RICOVER-60-Studie profitierten nämlich im Vergleich zu Männern stärker von höheren 25(OH)D-Spiegeln [1]. Bei Neumann et al. fiel der Anstieg der ADCC nach Supplementation in einer gesonderten Betrachtung der männlichen Probanden nicht signifikant aus, während er unter Frauen sowie in einer gemeinsamen Betrachtung beider Geschlechter signifikant war [2].

Damit zeigten Neumann et al. 2018 zum ersten Mal, dass die NK-Zell-ADCC vorrangig von Frauen von einer Vitamin D-Supplementation profitierte und dieser Vitamin D-Effekt folglich mit dem Geschlecht interagierte [2]. Die einzige frühere Publikation zu einer möglichen Interaktion dieses Vitamin D-Effekts mit dem Geschlecht ist von 1999 von Mariani et al.. Diese untersuchten in einer Querschnittsstudie an über 90-Jährigen eine Assoziation zwischen Geschlecht und Vitamin D-Effekt auf die Antikörper-*unabhängige* NK-Zell-Aktivität, jedoch ohne signifikantes Ergebnis. Mariani et al. bezogen sich dabei allerdings nur auf den spontanen 25(OH)D-Status ohne Supplementation und setzten andere Assays (Cr51-Release-Assay) sowie andere Targetzelllinien (K562) zur Zytotoxizitätsmessung ein. Interessanterweise verzeichneten in dieser Studie die männlichen Probanden in Mittelwert und Spannweite zudem höhere Estradiolspiegel als die weiblichen, während Testosteronspiegelmessungen bei den weiblichen Probandinnen nicht durchgeführt wurden [38]. Wie außerdem in der Einleitung bereits mehrfach angesprochen, stellt auch das Alter einen wichtigen Einflussfaktor bei Untersuchungen an NK-Zellen dar, und Mariani et al. untersuchten eine deutlich ältere Population als Neumann et al. [2, 38]. Die Methodik, Fragestellung und Untersuchungsgegenstand der Querschnittsstudie von Mariani et al. vs. der Interventionsstudien der Arbeitsgruppe von Neumann unterscheiden sich somit und es gibt vielfältige Gründe, warum Mariani et al. eine Interaktion zwischen Vitamin D-Status und Geschlecht im Rahmen ihrer Methodik nicht darstellen konnten.

Da Geschlecht und Sexualhormonstatus miteinander in Zusammenhang stehen, sind die genannten Studienergebnisse auch für die Interpretation der vorliegenden Arbeit relevant. Da Sexualhormone einen Einfluss auf NK-Zell-Funktionalität haben, kann auch die bei Neumann et al. beschriebene Interaktion zwischen Geschlecht und Vitamin D-Effekt viel mehr auf einer Interaktion zwischen Sexualhormonstatus und Vitamin D-Effekt beruhen [2].

## 5.2.4 Einfluss der Interaktion von Vitamin D und Sexualhormonen auf die zelluläre Zytotoxizität

Auf Basis des aktuellen Forschungsstands ergab sich also die Frage, ob die Geschlechterdisparität beim Vitamin D-Effekt auf die NK-Zytotoxizität wohlmöglich testosteronvermittelt sei. In Anbetracht des Alters der Probanden der Studien von Pfreundschuh [5] und Neumann et al. [2] scheint eine Vermittlung über Estradiol oder Progesteron insofern unwahrscheinlich, da diese Hormonspiegel sich in Altersgruppen über 60 Jahren kaum noch unterscheiden (vgl. [41, 42, 73]). Die hier vorliegende Doktorarbeit schloss nun also mit ADCC-Assays mit NK-Zellen prostatakarzinomerkrankter Probanden unter Androgendepletionstherapie an die Ergebnisse von Neumann et al. an. Zu erwarten war nach unserer Testosteron-Hypothese, dass die NK-Zellen der Probanden in dieser Arbeit ähnlich wie die NK-Zellen der weiblichen Probanden von Neumann et al. reagierten. Bestätigend zeigte sich, dass die NK-Zellen der Probanden im ADCC-Assay mit beiden eingesetzten Anti-CD20-Antikörpern signifikant auf eine Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation reagierten.

Ab einer Rituximabkonzentration von 0,001 µg/ml auf 4.000 Targetzellen war bei beiden untersuchten Effektor-Target-Zellverhältnissen von 2,5:1 und 5:1 eine signifikant höhere Zytolyse nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation messbar ( $p < 0,05$ ). Unter Obinutuzumab war das Ergebnis sogar noch ausgeprägter. Bei beiden eingesetzten E/T-Zellverhältnissen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Zytolyse bereits bei Antikörperkonzentrationen von 0,0001 µ/ml ( $p < 0,05$ ).

Auch führte bei der Antikörperkonzentration von 0,1 ng/ml die Vitamin D-Supplementation zu einer vergleichbaren, bzw. teilweise sogar höheren Lyserate wie die Verzehnfachung der Antikörperkonzentration von 0,1 auf 1 ng/ml (vgl. **Abbildung 10-13**, S.64 ff). Dies zeigte sich allerdings nicht so eindrücklich bei den niedrigeren Antikörperkonzentrationen.

Auch wenn dies nicht explizit gezeigt werden konnte, ist aufgrund der Ergebnisse zu erwarten, dass ähnliche Lyseraten bei höheren 25(OH)D-Spiegeln bereits mit geringeren Antikörperkonzentrationen erreicht werden könnten. Sollte sich diese Hypothese in weiteren Studien bestätigen, könnte im Rahmen von Optimierungsmöglichkeiten bereits bestehender Therapien gegebenenfalls eine Nebenwirkungsreduktion erreicht werden.

Neben einem signifikanten Vitamin D-Effekt auf die NK-Zell-vermittelte ADCC konnte in o. g. Ergebnissen auch ein verstärkender Effekt auf die AICC festgestellt werden. Diese zeigte nach Supplementation eine schwache Tendenz zu größeren Lyseraten, die teilweise Signifikanz erreichte (divergierende Ergebnisse nach 95 % CI vs. p-Werte). Dies steht im Einklang mit den signifikanten Ergebnissen von Neumann et al. [2, 3].

Somit wurde in im Rahmen meiner Arbeit gezeigt, dass die NK-Zell-vermittelte ADCC von männlichen Spendern unter Androgendepletionstherapie ( $n = 8$ ) wieder signifikant von einer Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation profitierten, während die analoge Untersuchung von Neumann et al. an NK-Zellen gesunder männlicher Spender ohne hormontherapeutischen Einfluss ( $n = 10$ ) nicht signifikant ausfiel [2].



### 5.2.5 Mögliche Modelle zur Interaktion zwischen Vitamin D und Testosteron

Die bisher diskutierten Ergebnisse meiner Arbeit bekräftigen also die eingangs formulierte Hypothese, dass Testosteron den verstärkenden Vitamin D-Effekt auf die ADCC von NK-Zellen unterdrückt. Unklar ist zum aktuellen Zeitpunkt jedoch, wie diese beiden Hormone miteinander interagieren.

Einige Studien der letzten zehn Jahre konnten dazu bereits erste Anhaltspunkte liefern. Unabhängig von immunologischen Aspekten wurde gezeigt, dass das Level des sexualhormonbindenden Globulins (SHGB), also des Hormonträgerproteins für Estradiol und insbesondere Testosteron, möglicherweise in Zusammenhang mit 25(OH)D-Spiegeln steht. So waren in der MESA Studie 2016 niedrige 25(OH)D-Spiegel mit niedrigeren SHGB-Spiegeln und konsekutiv höherem freiem Testosteron assoziiert [119]. Dies dürfte also auch Auswirkungen auf eine periphere Wirkungsentfaltung haben, ist jedoch bei der Erklärung der Ergebnisse von Neumann et al. sowie meiner Arbeit nicht weiter aufschlussreich. Andere Studien konnten die Ergebnisse von Zhao et al. nicht bestätigen [120].

Zur möglichen Interaktion zwischen dem intrazellulären Androgenrezeptor (AR) und dem intrazellulären Vitamin D-Rezeptor (VDR) gibt es aktuell nur wenige Daten. Eine intrazelluläre Interaktion zwischen anderen Steroidhormonrezeptoren, wie z. B. dem Glucocorticoidrezeptor mit den Estrogenrezeptoren oder dem AR, und ihren Liganden ist hingegen bereits ausführlicher beschrieben worden. Die Interaktion kann dabei sowohl direkt (z. B. wenn mehrere Hormon-responsive Elemente in einer Promotorregion liegen) als auch indirekt (z. B. über Modulation des Zytokinmilieus) im Rahmen genomischer (also primär die Transkription von Genen beeinflussender) oder „schneller“ nicht-genomischer Effekte stattfinden. Beispiele für genomische Effekte sind Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B, Inhibition spezifischer Proteinexpression via microRNA, Kompetition um nukleäre Ko-Aktivatoren oder -Repressoren. Schnelle nicht genomische Effekte können sich als Modulation bestimmter intrazellulärer Signalwege, Modulation von Ionenkanälen sowie intrazellulärem cAMP darstellen [77]. Analog zur sexualhormonellen Interaktion mit Glucocorticoidrezeptor ist also auch im Fall von Testosteron und Vitamin D eine komplexe Interaktion an verschiedensten Wirkorten denkbar.

Zur Interaktion zwischen VDR und AR in NK-Zellen oder Makrophagen sind meines Wissens keine Hinweise oder expliziten Erklärungen zu finden. Bei Zelllinien von soliden Tumoren ist eine solche Interaktion jedoch bereits beschrieben worden. In einer Studie an Prostatakrebszellen zeigte sich, dass die VDR-Expression von AR in kastrationsresistenten, nicht jedoch in kastrationssensiblen Zellen unterdrückt wurde. Prohibitin, lokalisiert in Mitochondrien und im Nukleus, wurde in diesen Zellen gleichsam analog zur verminderten VDR-Expression von AR supprimiert, und stellt hier möglicherweise den Vermittler des suppressiven AR-Effekts dar [105].

In einer Studie an aus humaner Plazenta isolierten Trophoblasten konnten erste Hinweise für immunologische Implikationen gewonnen werden. Olmos-Ortiz et al. stellten fest, dass Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT) eine cAMP-unabhängige Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP response element

binding protein) induzierten, welche unter Zugabe von Flutamid, einem Androgenrezeptor-Blocker, nicht erfolgte [88]. Die Gene der beiden Cytochrome CYP27B1 und CYP24A1, wichtige Hydroxylasen im Vitamin D-Metabolismus, tragen cAMP-responsive Elemente in den Promotorregionen. Es zeigte sich, dass Testosteron und DHT zu einer geringeren Expression der  $1\alpha$ -Hydroxylase CYP27B1, welche Calcidiol aktiviert, sowie zu einer erhöhten Expression des Calcitriol abbauenden CYP24A1 in den Trophoblasten führte. In einem nächsten Schritt untersuchten Olmos-Ortiz et al. außerdem den Einfluss von Androgenen auf die Vitamin D-induzierte Genexpression am Beispiel Cathelicidin. Cathelicidin ist ein Immunmarkerprotein, welches ein Vitamin D-responsives Element trägt und in Menschen direkt Calcitriol-abhängig gebildet wird. Inkubation mit Calcidiol oder Calcitriol induzierte Cathelicidin-Expression in den Trophoblasten. Unter VDR-Antagonisierung wurde dies unterdrückt. Zugabe von Testosteron oder DHT unterdrückte ebenfalls Calcidiol-induzierte Cathelicidin-Expression [88].

Als möglichen Mechanismus der Interaktion zwischen Androgenen und Vitamin D wurde daher eine androgenrezeptorabhängige Aktivierung von CREB mit konsekutiv verringerter Expression von CYP27B1 sowie erhöhter Expression von CYP24A1 diskutiert [88].

Eine Analoge Interaktion wäre in Makrophagen ebenfalls denkbar. Denn auch Makrophagen exprimieren sowohl CYP27B1 als auch den Androgenrezeptor und reagieren auf Calcitriol mit erhöhter Cathelicidin-Expression [49, 60, 62, 81, 85]. Makrophagen könnten diese Wirkungsinteraktion wiederum an andere Immunzellen mithilfe von interzellulären Signalen oder Kontakten weitervermitteln. Geht man davon aus, dass die Effekte der Testosterondepletion als auch der Vitamin D-Supplementation auf die NK-Zell-ADCC auf eine indirekte Vermittlung an die NK-Zellen durch andere Immunzellen zurückzuführen sind, bietet dieses Modell eine gute Erklärung für die Ergebnisse dieser Arbeit.

## 5.2.6 Vergleich von Rituximab mit Obinutuzumab

Im Rahmen meiner Arbeit wurden zwei verschiedene Anti-CD20-Antikörper, Rituximab und Obinutuzumab, untersucht. Die Entwickler von Obinutuzumab hatten in ihrem Paper von 2010 gezeigt, dass für die Sättigung von CD20 Molekülen mit Obinutuzumab im Vergleich zu Rituximab nur die halbe Antikörpermenge nötig war [10]. In meiner Arbeit zeigten sich signifikante Unterschiede in der Wirkungsstärke der Antikörper. Wie auch in der Studie zuvor von Neumann et al. [2] bestätigen auch meine Ergebnisse eine durchgehend stärkere Lyserate unter Obinutuzumab im Vergleich zu Rituximab, sowohl vor als auch nach Vitamin D<sub>3</sub>-Supplementation ( $p < 0,05$ , vgl. Kapitel 4.6, S. 71ff). Dabei stellen die beiden Antikörper Vertreter der zwei unterschiedlichen funktionellen Gruppen klinisch eingesetzter Anti-CD20-Antikörper dar. Rituximab (Vertreter der Gruppe I) induziert klinisch starke CDC und mittelstark direkte Apoptose sowie ADCC. Im vorliegenden Versuchsetting meiner Arbeit mit vornehmlicher Messung der ADCC (da im Medium kein Komplement enthalten ist) kann Rituximab einen Teil seiner klinischen Wirkung (die CDC) jedoch nicht entfalten. Obinutuzumab (Vertreter der Gruppe II) hingegen löst klinisch kaum CDC aus und entfaltet neben der ADCC

starke Wirkung auch über direkte Apoptoseinduktion [7, 10]. Dies gilt es bei der Interpretation der höheren Lyseraten unter Obinutuzumab zu berücksichtigen. Da Apoptose auch sekundär in Nekrose münden kann und somit zur LDH-Freisetzung beiträgt [29], ist die stärkere Lyse unter Obinutuzumab möglicherweise teilweise auch durch die NK-Zell-unabhängige direkte Apoptoseinduktion begründet. Dies schließt jedoch eine stärkere NK-Zell-vermittelte ADCC unter Obinutuzumab keineswegs aus, vielmehr ist dies auch von anderen Arbeitsgruppen bereits berichtet worden. Schließlich bindet Obinutuzumab wegen des Glycoengineering am Fc-Teil stärker an Fc-Rezeptoren wie FcγRIIIA und löst in NK-Zellen *in vitro* stärkere IFN-γ-Sekretion aus [7, 10].

Klinische Ergebnisse zur Vitamin D-Abhängigkeit von Obinutuzumabtherapien stehen aktuell noch aus, sind jedoch nach den Ergebnissen meiner Arbeit und der Studie von Neumann et al. zu erwarten [2]. Abzuwarten bleibt, ob Lymphomtherapien unter Typ-II Anti-CD20-Antikörpern ggf. eine geringere oder stärkere Assoziation mit dem Vitamin D-Status aufzeigen als unter dem Typ-I Vertreter Rituximab.

### **5.3 Ausblick**

Klein et al. arbeiteten in ihrem Review heraus, dass Stand 2016 in der Immunologie nur ca. 10 % aller Publikationen ihre Daten auch in Hinblick auf Geschlecht analysierten, während die Evidenz für geschlechtsspezifische immunologische Unterschiede zunehmend wächst [43]. Die Literaturrecherche zu dieser Arbeit ergab darüber hinaus, dass Studien zur hormonellen Beeinflussbarkeit des Immunsystems oft an sehr kleinen Populationen durchgeführt wurden. Dies erschwert bei einigen Fragestellungen die Bewertung bezüglich der Aussagekraft.

Des Weiteren wurde die Bewertung der aktuellen Datenlage auch dadurch erschwert, dass in den meisten der recherchierten Studien die Erhebung des Sexualhormonstatus nur "unvollständig" erfolgte. So wurde in fast keiner der Studien ein vollständiger Status aller drei Sexualhormone bei beiden Geschlechtern erhoben oder gar vom physischen Geschlecht auf Sexualhormone ohne empirische Erhebung rückgeschlossen. Gründe für diese systematisch lückenhafte Datengenerierung könnten erhöhte Kostenfaktoren oder gegebenenfalls auch antiquierte Vorstellungen von „weiblichen“ versus „männlichen“ Sexualhormonen sein. Insbesondere zur Wirkung von Progesteron wären mehr Daten interessant gewesen. So wurde in der Einleitung kurz auf die Ähnlichkeit von Progesteron zu und seine Interaktion mit Glukokortikoiden eingegangen. Diese Aspekte sollten in Zukunft mehr Beachtung finden.

Es bleibt schließlich festzuhalten, dass die vorliegende Arbeit in Zusammenschau mit den vorangegangenen Ergebnissen der Arbeitsgruppe [2] starke Hinweise darauf liefern konnte, dass Vitamin D und Sexualhormone im Immunsystem miteinander interagieren. Durch die Auswahl der Probanden und die Einordnung in den aktuellen Forschungsstand kann dabei davon ausgegangen werden, dass das in diesem Fall interagierende Sexualhormon am wahrscheinlichsten Testosteron ist. Dies wirft neue Fragen auf, z. B. ob eine solche Interaktion zwischen Vitamin D und Testosteron gezielt modulierbar wäre. Da jedoch bei älteren Männern die

Schere im Testosteronspiegel sehr groß ist und auch ältere Frauen einen geringen Testosteronspiegel aufweisen [41, 42], bleibt gleichzeitig offen, bei welchem Spiegel ein Schwellenwert zur wirksamen Interaktion mit Vitamin D liegen könnte. Dafür bräuchte es wiederum mehr umfassende Erhebungen der Sexualhormonstatus. Langfristig könnte die Folge entsprechender neuer Erkenntnisse eine bessere medizinische Versorgung durch an den Hormonstatus angepasste, individualisierte Medizin sein.

## **6 Anhang**

### **6.1 Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Target-Erkennung durch NK-Zellen und Auslöser der AICC .....	18
Abbildung 2: NK-Zell-ADCC .....	19
Abbildung 3: Vitamin D-Metabolite.....	23
Abbildung 4: Sexualhormoneller Regelkreis .....	29
Abbildung 5: Patientenflussdiagramm .....	40
Abbildung 6: FACS-Auswertung als Dot Plot mit Quadranten-Statistik .....	51
Abbildung 7: Belegplan mit DAUDI-Zellen für den LDH-Assay .....	55
Abbildung 8: 25(OH)D-Spiegel vor und nach Vitamin D <sub>3</sub> -Supplementation .....	60
Abbildung 9: AICC.....	62
Abbildung 10: Relative RDCC-Lysen vor und nach Supplementation bei einer E/T-Ratio von 2,5:1.....	64
Abbildung 11: Relative RDCC-Lysen vor und nach Supplementation bei einer E/T-Ratio von 5:1 .....	66
Abbildung 12: Relative ODCC-Lysen vor und nach Supplementation bei einer E/T-Ratio von 2,5:1 .....	68
Abbildung 13: Relative ODCC-Lysen vor und nach Supplementation bei einer E/T-Ratio von 5:1 .....	70
Abbildung 14: Vergleich der relativen Lysen vor Supplementation bei einer E/T-Ratio von 2,5:1 .....	72
Abbildung 15: Vergleich der relativen Lysen vor Supplementation bei einer E/T-Ratio von 5:1 .....	73

## 6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eingesetzte Chemikalien, Puffer, Medien und Lösungen mit Bezugsquellen .....	42
Tabelle 2: Eingesetzte Antikörper und Enzyme mit Bezugsquellen.....	44
Tabelle 3: Eingesetzte Tumorzelllinien mit Bezugsquellen.....	44
Tabelle 4: Eingesetzte Verbrauchsgegenstände .....	45
Tabelle 5: Eingesetzte Laborgeräte.....	46
Tabelle 6: Schema zur Erstellung der Titrationsreihen der Antikörper .....	52
Tabelle 7: Ansatzschema der DAUDI-Targetzellen ohne/mit Antikörper zum Zytotox-Assay für zwei Probanden.....	53
Tabelle 8: Charakterisierung der Probanden.....	59
Tabelle 9: Mediane relative Lysen der AICC .....	61
Tabelle 10: RDCC - Mediane relative Lysen bei einer E/T-Ratio von 2,5:1 .....	63
Tabelle 11: RDCC - Mediane relative Lysen bei einer E/T-Ratio von 5:1 .....	65
Tabelle 12: ODCC - Mediane relative Lysen bei einer E/T-Ratio von 2,5:1 .....	67
Tabelle 13: ODCC - Mediane relative Lysen bei einer E/T-Ratio von 5:1 .....	69
Tabelle 14: P-Werte zum Vergleich der relativen Lysen <i>vor</i> Vitamin D <sub>3</sub> -Supplementation zwischen ODCC und RDCC bei einer E/T-Ratio von 2,5:1 .....	72
Tabelle 15: P-Werte zum Vergleich der relativen Lysen <i>vor</i> Vitamin D <sub>3</sub> -Supplementation zwischen ODCC und RDCC bei einer E/T-Ratio von 5:1 .....	73
Tabelle 16: Vergleich der relativen Lysen <i>nach</i> Vitamin D <sub>3</sub> -Supplementation zwischen ODCC und RDCC.....	74

### **6.3 Literaturverzeichnis**

1. Bittenbring JT, Neumann F, Altmann B, et al (2014) 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* 32:3242–3248
2. Neumann F, Acker F, Schormann C, et al (2018) Determination of optimum vitamin D3 levels for NK cell-mediated rituximab- and obinutuzumab-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* 67:1709–1718
3. Acker FD (2019) Optimierte 25 (OH)-Vitamin D-Serumspiegel für die Antikörper-abhängige NK Zell-Zytotoxizität gegen B Zell-Lymphome und Mamma-Karzinome. Saarländische Universitäts-und Landesbibliothek
4. Rassow J, Hauser K, Deutzmann R et al (eds) (2016) Duale Reihe Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 601–648, 670, 712–715
5. Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, et al (2008) Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *Lancet Oncol* 9:105–116
6. Seidel U, Schlegel P, Lang P (2013) Natural Killer Cell Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Tumor Immunotherapy with Therapeutic Antibodies. *Front Immunol* 4:e76
7. Awasthi A, Ayello J, Van de Ven C, et al (2015) Obinutuzumab (GA101) compared to rituximab significantly enhances cell death and antibody-dependent cytotoxicity and improves overall survival against CD20+ rituximab-sensitive/-resistant Burkitt lymphoma (BL) and precursor B-acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 171:763–775
8. Matzdorff A, Duckert M, Fritze D (2018) Erkrankungen der Leukozyten. In: Arastéh K, Baenkler H-W, Bieber C, et al (eds) Duale Reihe Innere Medizin, 4th ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 1201–1265
9. Murphy K, Weaver C (2018) Das Immunsystem bei Gesundheit und Krankheit - Die gezielte Beeinflussung der Immunantwort. In: Janeway Immunologie, 9th ed. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 913–976
10. Mössner E, Brünker P, Moser S, et al (2010) 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* 115:4393–4402
11. VanDerMeid KR, Elliott MR, Baran AM, et al (2018) Cellular Cytotoxicity of Next-Generation CD20 Monoclonal Antibodies. *Cancer Immunol Res* 6:1150–1160

12. Ahlgrimm M, Pfreundschuh M, Kreuz M, et al (2011) The impact of Fc- $\gamma$  receptor polymorphisms in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP with or without rituximab. *Blood* 118:4657–4662. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-346411>
13. Nimmerjahn F, Ravetch JVB-T-A in I (2007) Fc-Receptors as Regulators of Immunity. *Adv Immunol* 96:179–204
14. Augugliaro R, Parolini S, Castriconi R, et al (2003) Selective cross-talk among natural cytotoxicity receptors in human natural killer cells. *Eur J Immunol* 33:1235–1241
15. Kumar S (2018) Natural killer cell cytotoxicity and its regulation by inhibitory receptors. *Immunology* 154:383–393
16. Xu D, Liang J, Wang L, et al (2020) 25-Hydroxy vitamin D deficiency predicts inferior prognosis in mantle cell lymphoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 146:1003–1009
17. Tracy SI, Maurer MJ, Witzig TE, et al (2017) Vitamin D insufficiency is associated with an increased risk of early clinical failure in follicular lymphoma. *Blood Cancer J* 7:e595
18. Hohaus S, Tisi MC, Bellesi S, et al (2018) Vitamin D deficiency and supplementation in patients with aggressive B-cell lymphomas treated with immunochemotherapy. *Cancer Med* 7:270–281
19. Pfreundschuh M, Müller C, Zeynalova S, et al (2014) Suboptimal dosing of rituximab in male and female patients with DLBCL. *Blood* 123:640–646
20. Pfreundschuh M, Murawski N, Zeynalova S, et al (2017) Optimization of rituximab for the treatment of DLBCL: increasing the dose for elderly male patients. *Br J Haematol* 179:410–420
21. Cheng M, Chen Y, Xiao W, et al (2013) NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol* 10:230–252
22. Spits H, Artis D, Colonna M, et al (2013) Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 13:145–149
23. Orange JS, Ballas ZK (2006) Natural killer cells in human health and disease. *Clin Immunol* 118:1–10
24. Mandal A, Viswanathan C (2015) Natural killer cells: In health and disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 8:47–55
25. Scoville SD, Freud AG, Caligiuri MA (2017) Modeling Human Natural Killer Cell Development in the Era of Innate Lymphoid Cells. *Front Immunol* 8:e360
26. Caligiuri MA (2008) Human natural killer cells. *Blood* 112:461–469
27. Di Vito C, Mikulak J, Mavilio D (2019) On the Way to Become a Natural Killer Cell. *Front Immunol* 10:e1812



- 
28. Oshimi Y, Oshimi K, Miyazaki S (1996) Necrosis and apoptosis associated with distinct Ca<sup>2+</sup> response patterns in target cells attacked by human natural killer cells. *J Physiol* 495:319–329
  29. Chan FK-M, Moriwaki K, De Rosa MJ (2013) Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase Activity. In: Snow AL, Lenardo MJ (eds) *Immune Homeostasis. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 979. Humana Press, Totowa, NJ, pp 65–70
  30. Zhou Z, Zhang C, Zhang J, Tian Z (2012) Macrophages Help NK Cells to Attack Tumor Cells by Stimulatory NKG2D Ligand but Protect Themselves from NK Killing by Inhibitory Ligand Qa-1. *PLoS One* 7:e36928
  31. Michel T, Hentges F, Zimmer J (2013) Consequences of the crosstalk between monocytes/macrophages and natural killer cells. *Front. Immunol.* 3:e403
  32. Chiesa M Della, Romagnani C, Thiel A, et al (2006) Multidirectional interactions are bridging human NK cells with plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells during innate immune responses. *Blood* 108:3851–3858
  33. Reschner A, Hubert P, Delvenne P, et al (2008) Innate lymphocyte and dendritic cell cross-talk: a key factor in the regulation of the immune response. *Clin Exp Immunol* 152:219–226
  34. Kerdiles Y, Ugolini S, Vivier E (2013) T cell regulation of natural killer cells. *J Exp Med* 210:1065–1068
  35. Pera A, Campos C, López N, et al (2015) Immunosenescence: Implications for response to infection and vaccination in older people. *Maturitas* 82:50–55
  36. Phan M-T, Chun S, Kim S-H, et al (2017) Natural killer cell subsets and receptor expression in peripheral blood mononuclear cells of a healthy Korean population: Reference range, influence of age and sex, and correlation between NK cell receptors and cytotoxicity. *Hum Immunol* 78:103–112
  37. Le Garff-Tavernier M, Béziat V, Decocq J, et al (2010) Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell* 9:527–535
  38. Mariani E, Ravaglia G, Forti P, et al (1999) Vitamin D, thyroid hormones and muscle mass influence natural killer (NK) innate immunity in healthy nonagenarians and centenarians. *Clin Exp Immunol* 116:19–27
  39. Hazeldine J, Lord JM (2013) The impact of ageing on natural killer cell function and potential consequences for health in older adults. *Ageing Res Rev* 12:1069–1078
  40. Mariani E, Mariani AR, Meneghetti A, et al (1998) Age-dependent decreases of NK cell phosphoinositide turnover during spontaneous but not Fc-mediated cytolytic activity. *Int Immunol* 10:981–989
  41. Leidenberger FA, Strowitzki T, Ortmann O et al (eds) (2014) *Klinische Endokrinologie für*

- Frauenärzte. In: 5th ed. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 1–45, 516–531, 621–651
42. Kaufman JM, Vermeulen A (2005) The Decline of Androgen Levels in Elderly Men and Its Clinical and Therapeutic Implications. *Endocr Rev* 26:833–876
  43. Klein SL, Flanagan KL (2016) Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol* 16:626–638
  44. Oertelt-Prigione S (2012) The influence of sex and gender on the immune response. *Autoimmun Rev* 11:479–485
  45. Al-Attar A, Presnell SR, Peterson CA, et al (2016) The effect of sex on immune cells in healthy aging: Elderly women have more robust natural killer lymphocytes than do elderly men. *Mech Ageing Dev* 156:25–33
  46. Skrobot A, Demkow U, Wachowska M (2018) Immunomodulatory Role of Vitamin D: A Review. In: Pokorski M (ed) *Current Trends in Immunity and Respiratory Infections. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1108. Springer, Cham, pp 13–23
  47. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al (2011) Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 96:1911–1930
  48. Rabenberg M, Mensink G (2016) Vitamin-D-Status in Deutschland. *Epidemiol und Gesundheitsberichterstattung* 1:36–42
  49. Chun RF, Liu PT, Modlin RL, et al (2014) Impact of vitamin D on immune function: lessons learned from genome-wide analysis. *Front. Physiol.* 5:e151
  50. Matilainen JM, Husso T, Toropainen S, et al (2010) Primary effect of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  on IL-10 expression in monocytes is short-term down-regulation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1803:1276–1286
  51. Long MD, Sucheston-Campbell LE, Campbell MJ (2015) Vitamin D Receptor and RXR in the Post-Genomic Era. *J Cell Physiol* 230:758–766
  52. Khanal RC, Nemere I (2007) Membrane Receptors for Vitamin D Metabolites. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 17:31–48
  53. Khanal R, Nemere I (2007) The ERp57/GRp58/1,25D<sub>3</sub>-MARRS Receptor: Multiple Functional Roles in Diverse Cell Systems. *Curr Med Chem* 14:1087–1093
  54. Richard CL, Farach-Carson MC, Rohe B, et al (2010) Involvement of 1,25D<sub>3</sub>-MARRS (membrane associated, rapid response steroid-binding), a novel vitamin D receptor, in growth inhibition of breast cancer cells. *Exp Cell Res* 316:695–703
  55. Zentrallabor UKS Vitamin D-3 (25-OH, Serum) Referenzbereich.

<http://zentrallaborweb.uniklinikum-saarland.de/labor/VListe.php?q=V&p=25DS6&Suche=Alphabet>.  
Accessed 23 Nov 2020

56. Marcinowska-Suchowierska E, Kupisz-Urbańska M, Łukaszkiwicz J, et al (2018) Vitamin D Toxicity—A Clinical Perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9:e550
57. Dudenkov D V, Yawn BP, Oberhelman SS, et al (2015) Changing Incidence of Serum 25-Hydroxyvitamin D Values Above 50 ng/mL: A 10-Year Population-Based Study. *Mayo Clin Proc* 90:577–586
58. Lee JP, Tansey M, Jetton JG, Krasowski MD (2018) Vitamin D Toxicity: A 16-Year Retrospective Study at an Academic Medical Center. *Lab Med* 49:123–129
59. Veldman CM, Cantorna MT, DeLuca HF (2000) Expression of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Receptor in the Immune System. *Arch Biochem Biophys* 374:334–338
60. Adams JS, Hewison M (2012) Extrarenal expression of the 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase. *Arch Biochem Biophys* 523:95–102
61. Heikkinen S, Väisänen S, Pehkonen P, et al (2011) Nuclear hormone 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> elicits a genome-wide shift in the locations of VDR chromatin occupancy. *Nucleic Acids Res* 39:9181–9193
62. Bruns H, Büttner M, Fabri M, et al (2015) Vitamin D-dependent induction of cathelicidin in human macrophages results in cytotoxicity against high-grade B cell lymphoma. *Sci Transl Med* 7:e47
63. Overbergh L, Stoffels K, Waer M, et al (2006) Immune Regulation of 25-Hydroxyvitamin D-1 $\alpha$ -Hydroxylase in Human Monocytic THP1 Cells: Mechanisms of Interferon- $\gamma$ -Mediated Induction. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3566–3574
64. Tamblyn JA, Jeffery LE, Susarla R, et al (2019) Transcriptomic analysis of Vitamin D responses in uterine and peripheral NK cells. *Reproduction* 158:211–221. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0509>
65. Al-Jaderi Z, Maghazachi AA (2013) Effects of vitamin D<sub>3</sub>, calcipotriol and FTY720 on the expression of surface molecules and cytolytic activities of human natural killer cells and dendritic cells. *Toxins (Basel)* 5:1932–1947
66. Kindler-Röhrborn A, Pfeleiderer B (2012) Gendermedizin – Modewort oder Notwendigkeit? – Die Rolle des Geschlechts in der Medizin. *XX Die Zeitschrift für Frauen der Medizin* 1:146–152
67. Fish EN (2008) The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat Rev Immunol* 8:737–744
68. Angele MK, Frantz MC, Chaudry IH (2006) Gender and sex hormones influence the response to trauma and sepsis: potential therapeutic approaches. *Clinics* 61:479–488

- 
69. Riemekasten G, Siegert E (2014) Geschlechtsspezifische Unterschiede des Immunsystems. *Z Rheumatol* 73:600–606
  70. Piva F, Gagliano P, Motta M, Martini L (1973) Adrenal Progesterone: Factors Controlling Its Secretion. *Endocrinology* 93:1178–1184
  71. Gressner AM, Arndt T (eds) (2019) Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. In: *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 2155–2157; 2273–2275
  72. Michel MS, Thüroff JW, Janetschek G et al (eds) (2016) *Die Urologie*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 1301–1384
  73. Hanusch M (2018) Knochendichte und Vitamin D bei prä-, peri- und postmenopausalen Frauen - eine Querschnitts- Untersuchung. Technische Universität München
  74. Vermeulen A, Verdonck L (1976) Radioimmunoassay of 17 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstane-3-one, 4-androstene-3,17-dione, dehydroepiandrosterone, 17-hydroxyprogesterone and progesterone and its application to human male plasma. *J Steroid Biochem* 7:1–10
  75. Gutai JP, Meyer WJ, Kowarski AA, Migeon CJ (1977) Twenty-four Hour Integrated Concentrations of Progesterone, 17-Hydroxyprogesterone and Cortisol in Normal Male Subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 44:116–120
  76. Balogh A, Karpati E, Schneider AE, et al (2019) Sex hormone-binding globulin provides a novel entry pathway for estradiol and influences subsequent signaling in lymphocytes via membrane receptor. *Sci Rep* 9:e4
  77. Bereshchenko O, Bruscoli S, Riccardi C (2018) Glucocorticoids, Sex Hormones, and Immunity. *Front. Immunol.* 9:e1332
  78. Cutolo M, Capellino S, Montagna P, et al (2005) Sex hormone modulation of cell growth and apoptosis of the human monocytic/macrophage cell line. *Arthritis Res Ther* 7:e1124
  79. Dehm SM, Tindall DJ (2007) Androgen Receptor Structural and Functional Elements: Role and Regulation in Prostate Cancer. *Mol Endocrinol* 21:2855–2863
  80. HUGO Gene Nomenclature Committee Gene Group: Nuclear hormone receptors (NR). [www.genenames.org/data/genegroup/#!/group/71](http://www.genenames.org/data/genegroup/#!/group/71). Accessed 8 Oct 2020
  81. Benten WPM, Stephan C, Wunderlich F (2002) B cells express intracellular but not surface receptors for testosterone and estradiol. *Steroids* 67:647–654
  82. Liva SM, Voskuhl RR (2001) Testosterone Acts Directly on CD4 + T Lymphocytes to Increase IL-10 Production. *J Immunol* 167:2060–2067

83. Friedl R, Brunner M, Moeslinger T, Spieckermann PG (2000) Testosterone inhibits expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages. *Life Sci* 68:417–429
84. Pierdominici M, Maselli A, Colasanti T, et al (2010) Estrogen receptor profiles in human peripheral blood lymphocytes. *Immunol Lett* 132:79–85
85. McCrohon JA, Death AK, Nakhla S, et al (2000) Androgen Receptor Expression Is Greater in Macrophages From Male Than From Female Donors. *Circulation* 101:224–226
86. Klein SL (2004) Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunol* 26:247–264
87. Rettew JA, Huet-Hudson YM, Marriott I (2008) Testosterone Reduces Macrophage Expression in the Mouse of Toll-Like Receptor 4, a Trigger for Inflammation and Innate Immunity. *Biol Reprod* 78:432–437
88. Olmos-Ortiz A, García-Quiroz J, López-Marure R, et al (2016) Evidence of sexual dimorphism in placental vitamin D metabolism: Testosterone inhibits calcitriol-dependent cathelicidin expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 163:173–182
89. Bouman A, Heineman MJ, Faas MM (2005) Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update* 11:411–423
90. Fox HS, Bond BL, Parslow TG (1991) Estrogen regulates the IFN-gamma promoter. *J Immunol* 146:4362–4367
91. Corcoran MP, Meydani M, Lichtenstein AH, et al (2010) Sex hormone modulation of proinflammatory cytokine and C-reactive protein expression in macrophages from older men and postmenopausal women. *J Endocrinol* 206:217–224
92. Nettleship J, Pugh P, Channer K, et al (2007) Inverse Relationship between Serum Levels of Interleukin-1 $\beta$  and Testosterone in Men with Stable Coronary Artery Disease. *Horm Metab Res* 39:366–371
93. Malkin CJ, Pugh PJ, Jones RD, et al (2004) The Effect of Testosterone Replacement on Endogenous Inflammatory Cytokines and Lipid Profiles in Hypogonadal Men. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3313–3318
94. Kalinchenko SY, Tishova YA, Mskhalaya GJ, et al (2010) Effects of testosterone supplementation on markers of the metabolic syndrome and inflammation in hypogonadal men with the metabolic syndrome: the double-blinded placebo-controlled Moscow study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 73:602–612
95. Bobjer J, Katrinaki M, Tsatsanis C, et al (2013) Negative Association between Testosterone Concentration and Inflammatory Markers in Young Men: A Nested Cross-Sectional Study. *PLoS One* 8:e61466

- 
96. Angele MK, Knöferl MW, Ayala A, et al (2001) Testosterone and Estrogen differently effect TH1 and TH2 Cytokine Release Following Trauma-Haemorrhage. *Cytokine* 16:22–30
  97. Curran EM, Berghaus LJ, Verneti NJ, et al (2001) Natural Killer Cells Express Estrogen Receptor- $\alpha$  and Estrogen Receptor- $\beta$  and Can Respond to Estrogen Via a Non-Estrogen Receptor- $\alpha$ -Mediated Pathway. *Cell Immunol* 214:12–20
  98. Hao S, Zhao J, Zhou J, et al (2007) Modulation of 17 $\beta$ -estradiol on the number and cytotoxicity of NK cells in vivo related to MCM and activating receptors. *Int Immunopharmacol* 7:1765–1775
  99. Hou J, Wu FZ (1988) Effect of sex hormones on NK and ADCC activity of mice. *Int J Immunopharmacol* 10:15–22
  100. Nilsson N, Carlsten H (1994) Estrogen Induces Suppression of Natural Killer Cell Cytotoxicity and Augmentation of Polyclonal B Cell Activation. *Cell Immunol* 158:131–139
  101. Sorachi K, Kumagai S, Sugita M, et al (1993) Enhancing effect of 17 $\beta$ -estradiol on human NK cell activity. *Immunol Lett* 36:31–35
  102. Altwein JE, Faul P (1990) Probleme und Prinzipien der Hormontherapie des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms. *Klin Wochenschr* 68:347–358
  103. Maggio M, Blackford A, Taub D, et al (2006) Circulating Inflammatory Cytokine Expression in Men With Prostate Cancer Undergoing Androgen Deprivation Therapy. *J Androl* 27:725–728
  104. Leitlinienprogramm Onkologie S3-Leitlinie Prostatakarzinom. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/prostatakarzinom/>. Accessed 24 Nov 2020
  105. Mooso B, Madhav A, Johnson S, et al (2010) Androgen Receptor Regulation of Vitamin D Receptor in Response of Castration-Resistant Prostate Cancer Cells to 1 -Hydroxyvitamin D5: A Calcitriol Analog. *Genes Cancer* 1:927–940
  106. DiaSorin Inc. (2016) LIAISON® 25 OH Vitamin D TOTAL Assay ([REF] 310600). [zentrallaborweb.uniklinikum-saarland.de/labor/data/Beipackzettel/Liaison/25DS6/Vitamin\\_D\\_2016-08.pdf](http://zentrallaborweb.uniklinikum-saarland.de/labor/data/Beipackzettel/Liaison/25DS6/Vitamin_D_2016-08.pdf). Accessed 3 Dec 2020
  107. van Groningen L, Opdenoort S, van Sorge A, et al (2010) Cholecalciferol loading dose guideline for vitamin D-deficient adults. *Eur J Endocrinol* 162:805–811
  108. Leibniz Institute - DSMZ Daudi cell line, DSMZ no.: ACC 78. [dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-78](http://dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-78). Accessed 23 Sep 2020
  109. Woods JA, Evans JK, Wolters BW, et al (1998) Effects of Maximal Exercise on Natural Killer (NK) Cell Cytotoxicity and Responsiveness to Interferon- in the Young and Old. *Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci* 53A:430–437

- 
110. de Prévall C, Mach B (1983) The absence of  $\beta$ 2-microglobulin in Daudi cells: Active gene but inactive messenger RNA. *Immunogenetics* 17:133–140
  111. Field A (2016) *An Adventure in Statistics - The Reality Enigma*. SAGE Publications Ltd, London
  112. Umesaki N, Tanaka T, Miyama M, et al (1999) Increased Natural Killer Cell Activities in Patients Treated with Gonadotropin Releasing Hormone Agonist. *Gynecol Obstet Invest* 48:66–68
  113. Khosla S, Atkinson EJ, Dunstan CR, O’Fallon WM (2002) Effect of Estrogen versus Testosterone on Circulating Osteoprotegerin and Other Cytokine Levels in Normal Elderly Men. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1550–1554
  114. Graefe KH (2016) Hypothalamus und Hypophyse. In: Graefe KH, Lutz W, Bönisch H (eds) (eds) *Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie*, 2nd ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 358–361
  115. Eckart O, Tunn U, Lübben G, Kienle E (1996) Leuprorelinacetat 3-Monats-Depot - ein neues galenisches Prinzip eines bewährten GnRH-Analogons zur Behandlung des Prostatakarzinoms. *Aktuelle Urol* 27:281–286
  116. Chen H-F, Jeung E-B, Stephenson M, Leung PCK (1999) Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Express Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH), GnRH Receptor, and Interleukin-2 Receptor  $\gamma$ -Chain Messenger Ribonucleic Acids That Are Regulated by GnRH in Vitro<sup>1</sup>. *J Clin Endocrinol Metab* 84:743–750
  117. M’Barek R Ben, Dupré T, Tubach F, et al (2014) 25-Hydroxyvitamin D status does not affect the clinical rituximab response in rheumatoid arthritis. *Jt Bone Spine* 81:96–97
  118. Shi L, Lin H, Li G, et al (2016) Targeting Androgen Receptor (AR)→IL12A Signal Enhances Efficacy of Sorafenib plus NK Cells Immunotherapy to Better Suppress HCC Progression. *Mol Cancer Ther* 15:731–742
  119. Zhao D, Ouyang P, de Boer IH, et al (2017) Serum vitamin D and sex hormones levels in men and women: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Maturitas* 96:95–102
  120. Lee DM, Tajar A, Pye SR, et al (2012) Association of hypogonadism with vitamin D status: the European Male Ageing Study. *Eur J Endocrinol* 166:77–85

## **7. Dank**

Ich möchte allen Personen danken, die mir die Durchführung und Vollendung dieser Doktorarbeit ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Erstberichterstatter PD Dr. rer. nat. Frank Neumann für die intensive Betreuung und Begleitung von Beginn bis zur Fertigstellung der Arbeit.

Ich danke Prof. Dr. med. Michael Stöckle und seiner Abteilung für die Kooperation, insbesondere auch Prof. Dr. med. Matthias Saar und PD Dr. med. Johannes Linxweiler, die mich in der urologischen Ambulanz mit der Patientenrekrutierung unterstützt haben.

Mein Dank gebührt auch Claudia Schormann, die mich im Labor sehr aufmerksam eingelernt hat und bei Fragen ebenfalls stets zur Seite stand.

Zuletzt möchte ich außerdem meiner Familie danken, die mich stets unterstützt und ermutigt hat.



## **8. Curriculum vitae**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.