

Aus dem Bereich
Klinische Medizin - Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Der Einfluss von Vitamin D₃ auf die antitumorale Immunantwort,
Tumorinitiation und Progression von Plattenepithelzellkarzinomen
des Kopf-Hals-Bereichs – Untersuchungen an einem murinen,
oralen Karzinogenese-Modell**

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

2023

Vorgelegt von:
Lukas Alexander Brust
Geb. am 04.12.1998 in Bonn

Widmung

*Ich widme diese Dissertation meiner Familie, die mich jederzeit bedingungslos unterstützt.
Meiner Partnerin Viola Katharina Merk, die mir immer zur Seite steht und in schwierigen
Situationen hilft.*

Meinen Freunden, die jederzeit ein offenes Ohr für mich haben.

*Schließlich möchte ich diese Arbeit meinen akademischen Mentoren der Kopf-Hals-Tumor
Arbeitsgruppe widmen, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich wäre.*

Tag der Promotion: 03.06.2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. Maximilian Linxweiler

Prof. Dr. Dr. Kolja Freier

Prof. Dr. Susanne Wiegand

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	8
1.1	Deutsche Zusammenfassung	8
1.2	Summary	10
2.	Einleitung und aktueller Stand der Forschung	12
2.1	Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals Bereiches	12
2.1.1	Übersicht - HNSCCs	12
2.1.2	Epidemiologie	13
2.1.3	Molekulare Pathogenese und Risikofaktoren	14
2.1.4	Immunologische Tumormikroumgebung	21
2.1.5	Diagnostik/ Therapie/ Prognose	29
2.2	Vitamin D ₃	33
2.2.1	Stoffwechsel/ Vorkommen/ Versorgungsstatus	33
2.2.2	Bedeutung von Vitamin D ₃ bei Tumorerkrankungen	35
2.2.3	Bedeutung von Vitamin D ₃ in der Karzinogenese von HNSCCs	39
2.3	Klinische Relevanz des bearbeiteten Themas	41
2.4	Stand der Wissenschaft und aktuelle Evidenzlücken	42
2.5	Fragestellungen	43
3.	Materialien und Methoden	44
3.1	Zellkulturversuche	44
3.1.1	Kultivierung der UM-SCC1-Zelllinie	45
3.1.2	Ermittlung der Zellzahlen mithilfe des LUNA™ Automated Cell Counter L10001	46
3.1.3	Vorversuch: Ermittlung der optimalen Menge der auszusäenden Zellen	46
3.1.4	Hauptversuch: Behandlung der UM-SCC1-Zellen mit Vitamin D ₃ über 4 Tage	48
3.2	Western-Blot	49
3.2.1	Zellpräparation für die Western-Blot Analyse	52
3.2.2	Proteinauftrennung mit Hilfe der Gel-Elektrophorese	55
3.2.3	Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gele mit Hilfe des BioRad Gel-Kits	55
3.2.4	Beladen der Gele und Elektrophorese-Prozess	56
3.2.5	Elektrischer Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)	57
3.2.6	Ponceau S-Färbung	58
3.2.7	Blockierung, Immundetektion und Analyse	58
3.3	RNA-Sequenzierung	61
3.4	Migrations- und Proliferationsassay	63
3.5	Tierexperimenteller Versuchsteil	67
3.5.1	Mausvorversuche: Tiere und Futter, venöse Blutentnahme	68

3.5.2	Operative Organentnahme	70
3.5.3	Orale 4NQO-induzierte Karzinogenese im immunkompetenten Mausmodell	71
3.6	Immunhistochemische Analyse	74
3.7	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	77
3.8	ELISA zur 25-OH Vitamin D ₃ -Serumkonzentrations-Analyse	77
3.8.1	Extinktionsanalyse bei 450 nm	80
3.9	Statistische Analysen	83
4.	Ergebnisse	83
4.1	Zellkulturversuche: Behandlung von UM-SCC1-Zellen mit 1,25-(OH) ₂ Vitamin D ₃	83
4.1.1	Western-Blot Analyse	83
4.1.2	Ergebnisse der RNA-Sequenzierung	86
4.1.2.1	FaDu-Zelllinie	86
4.1.2.2	UM-SCC1-Zelllinie	89
4.1.2.3	Genontologische Signalwege	92
4.1.3	Proliferations- und Migrations-Analyse der FaDu-Zelllinie	95
4.2	Tierexperimenteller Versuchsteil	99
4.2.1	Mausvorversuche	99
4.2.1.1	Klinische Evaluation	99
4.2.1.2	Makroskopische und mikroskopische Evaluation der Mausorgane	102
4.2.2	Maushauptversuch	107
4.2.2.1	Mausgewicht, klinische Evaluation, makroskopische Tumoranalyse	107
4.2.2.2	Immunologisches Tumormikromilieu	111
5.	Diskussion	114
5.1	Einfluss von Vitamin D ₃ auf die Entstehung und Progression von HNSCCs	114
5.2	Einfluss von Vitamin D ₃ auf antitumorale Aktivität des Immunsystems	118
5.3	Einfluss von Vitamin D ₃ auf molekulare <i>Pathways</i> von HNSCCs	121
5.4	Vitamin D ₃ im Kontext therapeutischer Ansätze für Kopf-Hals-Tumoren	130
5.5	Fazit und Ausblick	135
6.	Literaturverzeichnis (in alphabetischer Reihenfolge)	138
7.	Publikationen	153
8.	Danksagung	154
9.	Lebenslauf	155

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomische Lokalisation von HNSCCs	13
Abbildung 2: Geschlechterbezogenes Krebsverteilungsmuster	14
Abbildung 3: Zellzyklus regulierende Elemente	15
Abbildung 4: Tumorprogression und Schlüsselmutationen bei Noxen-induzierten HNSCCs.	16
Abbildung 5: Molekulare Signalwege der Tumorinitiation und Progression von Noxen- induzierten (A) und HPV-positiven (B) HNSCCs	19
Abbildung 6: Noxen-induzierte Karzinogenese von HNSCCs	21
Abbildung 7: Immunsuppressive Zellpopulationen in TME und therapeutische Targets.....	26
Abbildung 8: Zellulärer <i>Cross-Talk</i> zwischen APC und T-Lymphozyt physiologisch (A) und innerhalb der TME (B).....	27
Abbildung 9: Gesamtüberleben von HPV-positiven und HPV-negativen HNSCCs, Verteilungsmuster des HPV-Status.....	32
Abbildung 10: (A) Stoffwechsel und (B) genomische Wirkung von Vitamin D ₃	35
Abbildung 11: Antineoplastische Wirkmechanismen von Vitamin D ₃	38
Abbildung 12: Proliferations- und migrationshemmender Effekt von 1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃ <i>in vitro</i>	41
Abbildung 13: Vorversuch und Behandlung der UM-SCC1-Zellen mit Vitamin D ₃ und 0,1 % DMSO über 4 Tage (96 Stunden)	47
Abbildung 14: Ablauf der Probenpräparation, Gelelektrophorese, Membran-Transfer und Immundetektion	52
Abbildung 15: Mechanismen zur Generierung von Transkriptom-Datensätzen.....	61
Abbildung 16: xCELLigence-Proliferationsassay	64
Abbildung 17: Multiwellplattensystem (Boyden-Chamber Assay)	65
Abbildung 18: Orale Vitamin D ₃ -Supplementation im Mausmodell:.....	69
Abbildung 19: Operationsdurchführung und makroskopische Beurteilung	70
Abbildung 20: Sektion von einer Maus aus der 200.000 IU/Kg Behandlungsgruppe.....	71
Abbildung 21: Versuchsaufbau des oralen 4NQO-Karzinogenese-Modells an immunkompetenten Mäusen.....	72
Abbildung 22: Fotografische Dokumentation der enoralen Befunde unter Isofluran-Narkose	73
Abbildung 23: Sektion von einer Maus aus der 0 IU/Kg Behandlungsgruppe	74
Abbildung 24: Kalibrierung und Probenladeschema der 96 Well Platten.....	79
Abbildung 25: Funktioneller Mechanismus der Vitamin D ₃ -Detektion mit Hilfe von ,Mouse/Rat 25-OH-Vitamin D ELISA Assay Kit‘	80
Abbildung 26: Spektrophotometrische Messung der Absorption bei 450 nm, Gruppe 200.000 IU/Kg und 50.000 IU/Kg.....	81

Abbildung 27: Kalibrierungskurve für Serumproben der Gruppe 200.000 IU/Kg und 50.000 IU/Kg Vitamin D ₃	81
Abbildung 28: Spektrophotometrische Messung der Absorption bei 450 nm Low-Dose Gruppe.....	82
Abbildung 29: Kalibrierungskurve für Serumproben der Low-Dose Gruppe	82
Abbildung 30: Western-Blot der Replikate 1-4 nach 96-stündiger 1,25-(OH) ₂ Vitamin D ₃ -Behandlung.....	84
Abbildung 31: VDR-Expressionen nach 96-stündiger Vitamin D ₃ -Behandlung.....	85
Abbildung 32: RNA-Sequenzierung der FaDu-Zelllinie	88
Abbildung 33: RNA-Sequenzierung der UM-SCC1-Zelllinie.....	91
Abbildung 34: Signifikant regulierte Gene und GO-Pathways in beiden Zelllinien.....	95
Abbildung 35: 1,25-(OH) ₂ Vitamin D ₃ abhängige Hemmung der Tumorzellproliferation und Tumorzellmigration bei FaDu-Zellen	97
Abbildung 36: Statistische Auswertung des Proliferations- und Migrationsassays	99
Abbildung 37: Mausegewicht, 25-OH Vitamin D ₃ -Serumlevel und klinische Mausuntersuchung.....	101
Abbildung 38: Abdominaler Situs bei der Sektion der Tiere	103
Abbildung 39: Histologische Aufarbeitung der Leber, Milz und Niere der 200.000 IU/Kg 1,25-(OH) ₂ Vitamin D ₃ -Behandlungsgruppe	105
Abbildung 40: Histologische Aufarbeitung der Leber, Milz und Niere der 50.000 IU/Kg 1,25-(OH) ₂ Vitamin D ₃ -Behandlungsgruppe	106
Abbildung 41: 1,25-(OH) ₂ Vitamin D ₃ -Supplementation reduziert Tumoranzahl und extralinguale Tumormanifestationen	110
Abbildung 42: Repräsentative Tumorausschnitte nach immunhistochemischer CD8-Färbung.....	111
Abbildung 43: Die immunhistochemische Färbung zeigt eine höhere Immuninfiltration von Tumoren innerhalb der mit Vitamin D ₃ behandelten Gruppen.....	113

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben.....	44
Tabelle 2: Verwendete Utensilien und Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben	45
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben.....	49
Tabelle 4: Verwendete Utensilien und Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben	50
Tabelle 5: Verwendete Antikörper mit Herstellerangaben und Verdünnung	50
Tabelle 6: Herstellung des 10x Tris-Glycin/SDS-Laufpuffer, pH 8,6.....	55
Tabelle 7: Herstellung des 10x TBS-Puffer/TBS-T Puffers	55
Tabelle 8: Herstellung des Transferpuffers	57
Tabelle 9: Herstellung der Ponceau S-Lösung	58
Tabelle 10: Herstellung der Block-Lösung	58
Tabelle 11: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben.....	63
Tabelle 12: Verwendete Utensilien und Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben.....	63
Tabelle 13: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben.....	67
Tabelle 14: Verwendete Utensilien und Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben.....	67
Tabelle 15: Verwendete primäre Antikörper mit Herstellerangaben und Verdünnung	74
Tabelle 16: Herstellung des Demaskierungspuffer (pH 6).....	74
Tabelle 17: Herstellung der Substrat-Chromogen-Lösung	74
Tabelle 18: Paraffineinbettung mit Tissue-Tek®VIPTM5 JR	75
Tabelle 19: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben.....	77
Tabelle 20: Verwendete Utensilien und Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben.....	77

1. Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Plattenepithelzellkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (Head and Neck Squamous Cell Carcinomas, HNSCCs) gehören zu den sechs häufigsten Krebsentitäten weltweit. Die Prognose von Noxen-induzierten HNSCCs ist weiterhin mit einer 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 50 % schlecht. Die Therapie von Kopf-Hals-Karzinomen bedeutet oftmals eine starke physische und psychische Belastung für den Patienten und geht häufig mit funktionellen und ästhetischen Beeinträchtigungen einher. Das therapeutische Regime ist in fortgeschrittenen oder metastasierten Stadien stark eingeschränkt. In den vergangenen Jahren wurde jedoch durch die Zulassung von Immuncheckpoint-Inhibitoren bei bestimmten Patientengruppen mit fortgeschrittenen oder metastasierten Tumoren ein vielversprechendes therapeutisches Ansprechen erreicht.

Diverse Arbeiten konnten antineoplastische Wirkweisen von 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃ aufzeigen. Diese beschriebenen Mechanismen wurden fast ausschließlich *in vitro* beschrieben, lassen jedoch systemische antiproliferative Mechanismen von Vitamin D₃ *in vivo* erwarten. In diesem Zusammenhang konnten klinische Studien zeigen, dass es signifikante Unterschiede im 25-OH Vitamin D₃-Serumversorgungsstatus von Kopf-Hals-Tumorpatienten gibt. Dabei war ein fortgeschrittenes Stadium und eine schlechte Prognose mit defizienten 25-OH Vitamin D₃-Serumspiegeln verbunden, während eine deutlich bessere Prognose, ein niedriges Tumorstadium sowie eine verstärkte antitumorale Immunantwort mit hohen 25-OH Vitamin D₃-Serumspiegeln assoziiert waren. Aussagekräftige Studien, welche die antitumoralen Wirkweisen von Vitamin D₃ *in vivo* im immunkompetenten Mausmodell untersuchen, gibt es derzeit nicht.

Vor diesem Hintergrund ist die Hauptfragestellung dieser Arbeit, welchen Einfluss Vitamin D₃ auf die antitumorale Immunantwort, Tumorigenese und Tumorprogression von Plattenepithelzellkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs an einem murinen, oralen Karzinogenese-Modell hat. Zusätzlich werden die molekularen Wirkungsweisen von Vitamin D₃ auf die Tumorzellbiologie in verschiedenen Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien untersucht.

Diese Arbeit lässt sich in zwei Projektabschnitte einteilen: Im Rahmen von Zellkulturversuchen wurden HNSCC-Zelllinien mit unterschiedlichen Vitamin D₃-Behandlungskonzentrationen über definierte Zeiträume von 96 Stunden behandelt. Die Behandlungseffekte wurden anschließend mittels Western-Blot, Migrations- und Proliferationsassays und RNA-Sequenzierung ausgewertet.

Hierbei zeigte sich eine deutliche Reduktion der Migration und Proliferation der FaDu-Zelllinie. Die Inhibition korrelierte mit steigenden Behandlungskonzentrationen von Vitamin D₃. Die RNA-Sequenzierung bot ein komplexes Bild von vielen verschiedenen signifikant regulierten Genen und genontologischen *Pathways*. Es zeigten sich beispielsweise signifikante

Zusammenfassung

Regulationen im Bereich des proonkogenen *Pathways* vom Wnt-Signalweg und immunstimulierender Signalwege, die den folgend beobachteten Mausphänotyp miterklären könnten.

Der zweite Projektabschnitt untersuchte die immunologischen Wirkweisen und antitumoralen Effekte von Vitamin D₃ im oralen 4NQO-Karzinogenese-Modell an immunkompetenten männlichen C57BL/6NRj-Mäusen. Wir stellten einen 22-wöchigen Vorversuch mit verschiedenen Vitamin D₃-Futterkonzentrationen voran, um systemische Toxizität und Verträglichkeitsprobleme der oralen Vitamin D₃-Supplementation auszuschließen. Hierbei zeigte sich eine im Zeitverlauf stabile Steigerung des 25-OH Vitamin D₃-Serumspiegels unter oraler Vitamin D₃-Substitution. In der höchsten getesteten Dosierung mit 200.000 IU/Kg Vitamin D₃ wurde eine toxische Wirkweise mit Hauptmanifestationsort im Bereich der Nieren sichtbar.

Die in dem Vorversuch ermittelten Vitamin D₃-Futterkonzentrationen von 50.000 IU/Kg, 7.500 IU/Kg und 0 IU/Kg wurden im anschließenden Maushauptversuch verwendet. Bei diesem erfolgte eine tägliche klinische Kontrolle der Tiere, eine wöchentliche Fotodokumentation des klinischen Untersuchungsbefundes der enoralen Tumore in Isoflurannarkose, eine venöse Blutentnahme zur Bestimmung des 25-OH Vitamin D₃-Serumstatus alle 5 Wochen sowie eine abschließende immunhistochemische Aufarbeitung der tumoralen und peritumoralen Immunpopulationen in den verschiedenen Behandlungsgruppen.

Der Maushauptversuch konnte deutliche tumorsupprimierende Effekte der Vitamin D₃-Supplementation aufzeigen. Mit $p < 0,0001$ konnte eine hochsignifikante Reduktion der makroskopisch bestimmten Tumoranzahl in der 50.000 IU/Kg Vitamin D₃-Behandlungsgruppe gegenüber der 0 IU/kg Kontrolle nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigten sich mit $p = 0,0137$ signifikante Unterschiede in der extralingualen Tumormanifestation zwischen der 0 IU/Kg Kontrollgruppe und der 50.000 IU/Kg Behandlungsgruppe. Unter Vitamin D₃-Behandlung kam es zu einer hochsignifikanten Steigerung der antitumoralen Immunpopulationen von CD3+ T-Zellen, CD8+ T-Zellen und NK-Zellen. Die Anzahl immunsupprimierender FOXP3+ T_{reg}-Zellen im peritumoralen Stroma konnte hingegen durch die Vitamin D₃-Behandlung signifikant reduziert werden.

Zusammenfassend zeigte diese Arbeit *in vivo* und *in vitro* antitumorale Wirkweisen sowie immunstimulatorische Effekte von Vitamin D₃ auf. Diese könnten in Zukunft einen wesentlichen Beitrag zur Weiterentwicklung der medikamentösen Tumorthherapie bei Kopf-Hals Tumoren leisten. Insbesondere im Kontext der immer relevanteren Immuncheckpoint-Inhibition könnten die beschriebenen immunmodulierenden Effekte der Vitamin D₃-Behandlung dabei synergistische Effekte erzielen. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse befinden sich derzeit Folgeuntersuchungen in Arbeit, die diese potenziellen synergistischen Effekte einer Vitamin

D₃-Behandlung mit Immuncheckpoint-Inhibitoren im Mausmodell untersuchen. Ebenso werden Konzepte für klinische Studien erarbeitet.

1.2 Summary

Head and Neck Squamous Cell Carcinomas (HNSCCs) are among the six most common cancer entities worldwide. The prognosis of noxious-induced HNSCCs remains poor, with a 5-year survival probability of 50 %. Therapy for head and neck cancer often imposes a severe physical and psychological burden on the patient and is frequently associated with functional and aesthetic impairment. The therapeutic regimen is severely limited in advanced or metastatic stages. However, in recent years, the approval of immune checkpoint inhibitors in certain groups of patients with advanced or metastatic tumors has yielded promising therapeutic responses.

Various papers have demonstrated antineoplastic modes of action of 1,25-(OH)₂ vitamin D₃. These described mechanisms were almost exclusively *in vitro* but suggest systemic antiproliferative mechanisms of vitamin D₃ *in vivo*. In this context, clinical studies have shown that there are significant differences in the 25-OH vitamin D₃ serum supply status of head and neck tumor patients. In this regard, advanced stage and poor prognosis were associated with deficient 25-OH vitamin D₃ serum levels, whereas significantly better prognosis, low tumor stage, and enhanced antitumor immune response were associated with high 25-OH vitamin D₃ serum levels. Significant studies investigating the antitumor modes of action of vitamin D₃ *in vivo* in immunocompetent mouse models are currently lacking.

The main question of this work is the impact of vitamin D₃ on the antitumor immune response, tumor initiation, and tumor progression of head and neck squamous cell carcinoma in a murine oral carcinogenesis model. In addition, the molecular modes of action of vitamin D₃ on tumor cell biology in different head and neck carcinoma cell lines will be investigated.

This work can be divided into two project sections: Cell culture experiments were performed to treat HNSCC cell lines with different vitamin D₃ treatment concentrations for defined periods of 96 hours. Treatment effects were subsequently evaluated by Western blot, migration and proliferation assays, and RNA sequencing.

This showed a significant reduction in migration and proliferation of the FaDu cell line. The inhibition correlated with increasing treatment concentrations of vitamin D₃. RNA sequencing provided a complex picture of many different significantly regulated genes and genontological pathways. For example, significant regulation in the prooncogenic pathway from the Wnt pathway and immunostimulatory pathways emerged, which may help explain the mouse phenotype observed below.

The second stage of the project investigated the immunological modes of action and antitumor effects of vitamin D₃ in an oral 4NQO carcinogenesis model using immunocompetent male

Zusammenfassung

C57BL/6NRj mice. We preceded a 22-week preliminary experiment with different vitamin D₃ dietary concentrations to rule out systemic toxicity and tolerance problems of oral vitamin D₃ supplementation. This showed a stable increase in serum 25-OH vitamin D₃ levels over time with oral vitamin D₃ supplementation. In the highest tested dosage with 200,000 IU/Kg vitamin D₃ a toxic mode of action with main site of manifestation in the kidneys became visible.

The vitamin D₃ dietary concentrations of 50,000 IU/Kg, 7,500 IU/Kg and 0 IU/Kg determined in the preliminary experiment were used in the subsequent main mouse experiment. In this trial, the animals underwent daily clinical monitoring, weekly photodocumentation of the clinical examination findings of the enoral tumors under isoflurane anesthesia, venous blood sampling for determination of the 25-OH vitamin D₃ serum status every 5 weeks, and a final immunohistochemical workup of the tumoral and peritumoral immune populations in the different treatment groups.

The main mouse experiment was able to demonstrate significant tumor suppressive effects of vitamin D₃ supplementation. With $p < 0.0001$, a highly significant reduction in macroscopically determined tumor number was demonstrated in the 50,000 IU/Kg vitamin D₃ treatment group compared to the 0 IU/kg control. In addition, there were significant differences in extralingual tumor manifestation between the 0 IU/Kg control group and the 50,000 IU/Kg treatment group with $p = 0.0137$. Vitamin D₃ treatment resulted in a highly significant increase in the antitumor immune populations of CD3⁺ T cells, CD8⁺ T cells, and NK cells. In contrast, the number of immunosuppressive FOXP3⁺ Treg cells in the peritumoral stroma was significantly reduced by vitamin D₃ treatment.

In summary, this work demonstrated *in vivo* and *in vitro* antitumor modes of action as well as immunostimulatory effects of vitamin D₃. In the future, these could make a significant contribution to the further development of drug-based tumor therapy for head and neck tumors. Especially in the context of the increasingly relevant immune checkpoint inhibition, the described immunomodulatory effects of vitamin D₃ treatment could thereby achieve synergistic effects. Based on these results, follow-up studies are currently underway to investigate these potential synergistic effects of vitamin D₃ treatment with immune checkpoint inhibitors in the mouse model. Concepts for clinical trials are also being developed.

2. Einleitung und aktueller Stand der Forschung

2.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals Bereiches

2.1.1 Übersicht - HNSCCs

Plattenepithelzellkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (Head and Neck Squamous Cell Carcinomas, HNSCCs) sind maligne Neoplasien, die weltweit für mehr als 700.000 Neumanifestationen und 380.000 Tote pro Jahr verantwortlich sind (Cohen, Bell, *et al.*, 2019). Damit zählen sie seit Jahren zu den weltweit häufigsten Krebserkrankungen. Das Spektrum der HNSCCs umfasst eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren. Allen gemeinsam ist, dass sie dem Schleimhautepithel des oberen Aerodigestivtraktes entspringen. Im engeren Sinne zählen Nasopharynx-, Oropharynx-, Hypopharynx-, Larynx- und Mundhöhlenkarzinome dazu (s. Abbildung 1) (Johnson *et al.*, 2020).

Das Auftreten von Kopf-Hals-Tumoren an definierten Lokalisationen ist mit bestimmten Risikofaktoren assoziiert. Hauptrisikofaktoren sind die exogene Zuführung von Noxen wie Zigarettenrauch und Alkohol sowie chronisch entzündliche Schleimhautveränderungen (Rivera, 2015). Darüber hinaus spielen anatomische, prädisponierende Faktoren eine Rolle. Für Oropharynx- und Tonsillen-Karzinome gilt das Humane-Papilloma-Virus (HPV) als Hauptrisikofaktor, da das Virus in diesen Lokalisationen recht einfach auf den Grund der Krypten in der oropharyngealen Mukosa gelangen und die dort befindlichen Stammzellen infizieren kann (Michaud *et al.*, 2014). Auf dem Boden der chronischen HPV-Infektion können sich maligne Neoplasien entwickeln. Mundboden- und Mundhöhlenkarzinome hingegen sind zusammen mit Larynx-Karzinomen am häufigsten mit chronischem Nikotin- und/oder Alkoholkonsum assoziiert (Koufman and Burke, 1997). Aufgrund der ätiologischen Faktoren kann man entsprechend HPV-positive von HPV-negativen HNSCCs unterscheiden. Die Prognose unterscheidet sich hierbei deutlich mit einer besseren Prognose für HPV-positive Entitäten (Chen *et al.*, 2020). Zudem zeigen HPV-positive HNSCCs ein besseres Ansprechen auf eine Radiochemotherapie, alleinige Radiatio und primär-chirurgische Therapie (Spence *et al.*, 2016) trotz der meist ausgedehnteren lymphnodalen Metastasierung in frühen Stadien (Posner *et al.*, 2011). Die Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren sind im Schnitt jünger und haben weniger Begleiterkrankungen (O'Sullivan *et al.*, 2013).

Die Tumorinitiation sowie die Tumorprogression von HNSCCs sind ein mehrstufiger Prozess, dem komplexe Serien von Veränderungen auf genetischer und molekularer Ebene vorausgehen (Leemans, Snijders and Brakenhoff, 2018). Nach wie vor ist die Gesamtüberlebensrate im fortgeschrittenen Tumorstadium schlecht, obwohl man diesbezüglich Unterschiede in verschiedenen molekularen Phänotypen beobachten kann (Chamorro Petronacci *et al.*, 2020).

HNSCCs haben eine hohe Rezidivneigung, fast 50 % aller Patienten entwickeln innerhalb der ersten 5 Jahre nach der Ersttumor Erkrankung einen Krankheitsrückfall. Die Therapie ist sehr

radikal, nahezu ausschließlich multimodal (Chirurgie, Radiatio, Chemotherapie) und geht oftmals mit entstellenden und funktionell beeinträchtigenden Folgen für den Patienten einher mit deutlicher Reduktion der Lebensqualität (Jethwa and Khariwala, 2017; Alshafi *et al.*, 2019). Potenzielle antineoplastische und immunmodulatorische Therapiemöglichkeiten von HNSCCs sind daher Gegenstand aktueller Forschung. Viele klinische Studien befinden sich gerade in fortgeschrittenen Studienphasen mit dem Ziel neue immunmodulatorische Therapieansätze zu entwickeln (Economopoulou, Kotsantis and Psyrii, 2020). Ein verbessertes Verständnis von den intratumoral ablaufenden Prozessen und deren Interaktion mit Vitamin D₃ könnten als Grundlage neuer Therapiemöglichkeiten dienen, wie in den folgenden Kapiteln näher beschrieben wird.

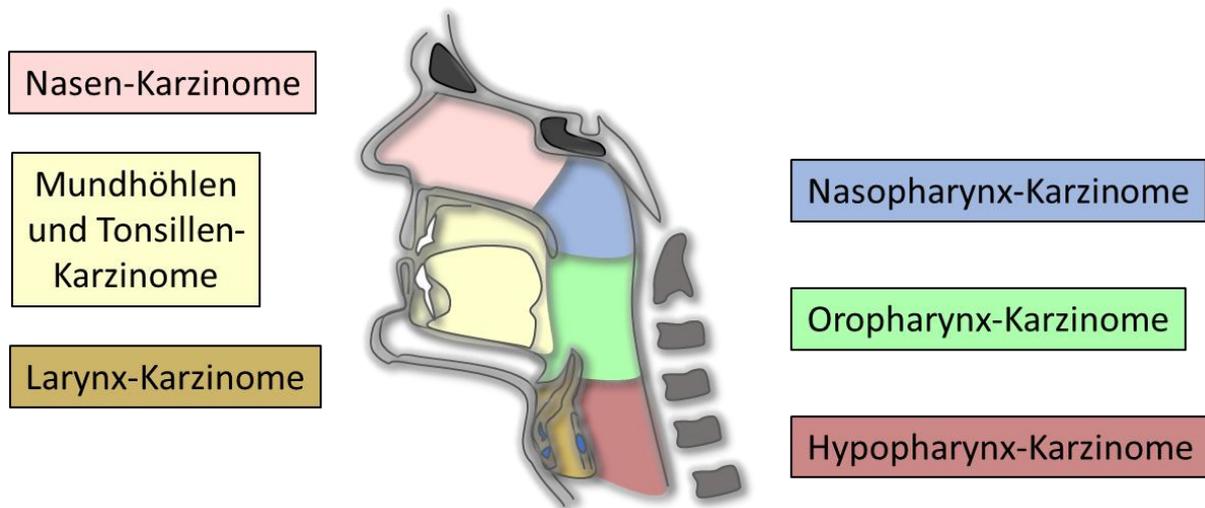


Abbildung 1: Anatomische Lokalisation von HNSCCs

2.1.2 Epidemiologie

HNSCCs stellen sowohl durch die Häufigkeit als auch die Schwere der Erkrankung eine große gesellschaftliche Belastung dar. Mit mehr als 5 % aller menschlichen Malignome (Bray *et al.*, 2018) zählen HNSCCs zu den sechs häufigsten Krebsarten weltweit (siehe Abbildung 2). Jedes Jahr gibt es weltweit insgesamt zwischen 550.000 und 700.000 neudiagnostizierte Fälle von HNSCCs. Über 380.000 Patienten sterben jährlich durch diese Neoplasie und dessen Folgen (McDermott and Bowles, 2019). Je nach untersuchter Quelle zeigen sich sogar deutlich höhere Inzidenzen und Todeszahlen (Johnson *et al.*, 2020). Die Tendenz dieser Zahlen ist zudem steigend (Bray *et al.*, 2018). Innerhalb des letzten Jahrzehnts konnte zudem eine Zunahme von bis zu 36,5 % der Inzidenz für HNSCCs, hierunter bis zu 23,1 % für Larynxkarzinome, beobachtet werden (Simard, Torre and Jemal, 2014). Unter allen Krebsarten haben HNSCCs, insbesondere die oropharyngeale Manifestation, eine der am schnellsten steigenden Inzidenzen in Ländern mit hohem Einkommen (Lechner *et al.*, 2019). Darüber hinaus liegt eine auffällige geographische Verteilung vor. Als Gründe werden

vermutlich umweltbedingte Ursachen oder oral aufgenommene Karzinogene angenommen. Stark erhöhte Inzidenzen finden sich in Südostasien und in Nordafrika, Grönland und Alaska (Simard, Torre and Jemal, 2014).

Der Häufigkeitsgipfel der Erkrankung liegt zwischen der 4. bis 7. Lebensdekade, wobei das Durchschnittsalter für HPV-negative HNSCCs bei 66 Jahren und bei HPV-positiven bei 53 Jahren liegt (Huang *et al.*, 2015).

Unabhängig der Ätiologie haben Männer für alle Formen von HNSCCs ein deutlich höheres Risiko als Frauen, mit einem Verhältnis von 2 bis zu 4:1 (Bray *et al.*, 2018). Während HNSCCs weltweit für 7-8 % aller Tumoren beim Mann verantwortlich sind, liegt dieser Wert für Frauen zwischen 2-3 % (Bray *et al.*, 2018). Zurückzuführen ist dieser Gradient unter anderem auf das geschlechtsspezifische Risikoverhalten in Bezug auf Alkohol- und Tabakkonsum (Jethwa and Khariwala, 2017).

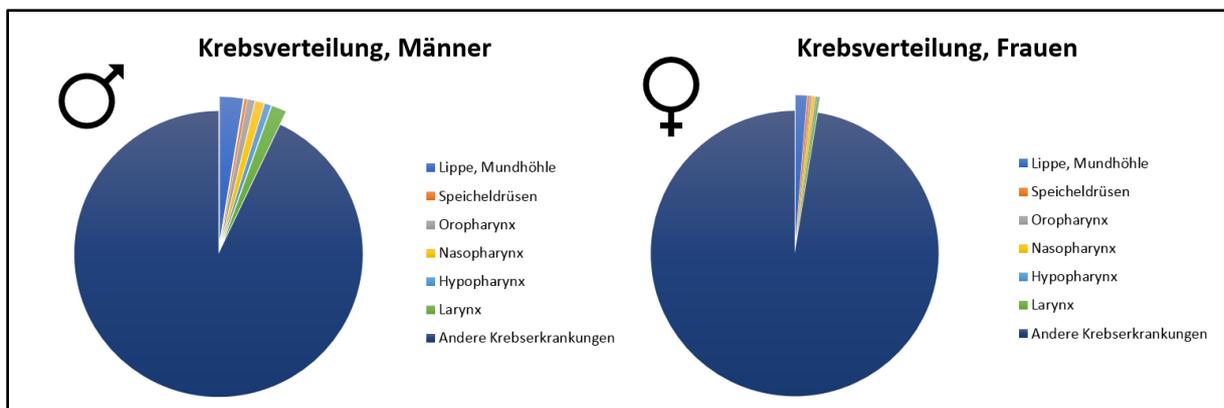


Abbildung 2: Geschlechterbezogenes Krebsverteilungsmuster

In der Krebsverteilung der einzelnen Kopf-Hals-Karzinome zwischen Männern und Frauen stellt sich dar, dass bei beiden Geschlechtern Lippen- und Mundhöhlen- Karzinome, gefolgt von Larynxkarzinomen die häufigsten Kopf-Hals-Tumore sind. Zahlen von Global Cancer Statistics (Bray *et al.*, 2018)

2.1.3 Molekulare Pathogenese und Risikofaktoren

Im Folgenden werden zunächst die **physiologischen Regulationsprozesse des Zellzyklus** aufgezeigt. Dabei werden die bei HNSCCs relevanten Gene, Enzyme und Proteine genauer charakterisiert.

Der Zellzyklus ist ein streng regulierter Prozess, der eine periodische Ereignisabfolge besitzt. Dieser lässt sich in zwei Phasen unterteilen: Die Mitose und die Interphase. Während der Interphase bereitet sich die Zelle in jeweils drei Zwischenphasen auf die bevorstehende Zellteilung vor. Dabei durchläuft sie die G₁-Phase (Zellwachstum, Differenzierung), die S-Phase (Synthese von Histonen und DNA-Replikation) und die G₂-Phase (Reparatur von Replikationsfehlern) (Suski *et al.*, 2021). Während der Mitose teilt sich die Zelle in zwei identische Tochterzellen. Damit die Zelle von einer Phase in die nächste Phase übergehen kann benötigt sie die Aktivität von Cyclin abhängigen Kinasen (Cyclin-dependent-Kinases;

CDKs), die ihrerseits durch das Vorliegen von Cyclinen aktiviert werden. Cyclin-CDK-Komplexe phosphorylieren dann spezifische Signalmoleküle, welche durch Transkriptionsprozesse den Übertritt in die nächste Zellzyklusphase initiieren (Sherr and Roberts, 2004).

Damit sich die Zelle nicht bei unkorrekter Replikation von DNA, Mutationen oder toxischen Veränderungen weiter teilt, gibt es Zellzyklus Kontrollpunkte. Neben den in der Abbildung 3 als roter Punkt aufgeführten Kontrollpunkten zwischen G₁ - S, G₂ - M gibt es auch einen Mitosekontrollpunkt. Bei unterlaufenen Fehlern wird der Zyklus arretiert und bei Irreversibilität der Fehler die Zelle in die Apoptose überführt. Wesentlich für diese Kontrollmechanismen sind das Tumorsuppressorgen TP53 welches für das Protein p53 codiert und das Retinoblastom-Protein (RB). P53 wird bei Schädigung des Erbgutes durch die Aktivität intrazellulärer Kinasen weniger stark abgebaut und wirkt damit als Transkriptionsfaktor. Es induziert unter anderem proapoptotisch wirksame Proteine der BCL-2 Familie und das Protein p21, welches die Ausbildung von Zellzyklus-vorantreibenden Cyclin-CDK-Komplexen hemmt und damit den Zellzyklus arretiert (Malumbres and Barbacid, 2001). RB bindet im aktiven Zustand den Transkriptionsfaktor E2F und inhibiert diesen dadurch. Durch Phosphorylierungsreaktionen durch Cyclin E/CDK2 oder Cyclin D/CDK4 wird diese Bindung aufgelöst und E2F kann den Übergang der Zelle von G₁ in S initiieren. Reguliert wird dieser Schritt unter anderem durch das Gen CDKN2A, welches für p16^{INK4A} kodiert. P16^{INK4A} inhibiert die Bildung von Cyclin D/CDK4 (Suski *et al.*, 2021).

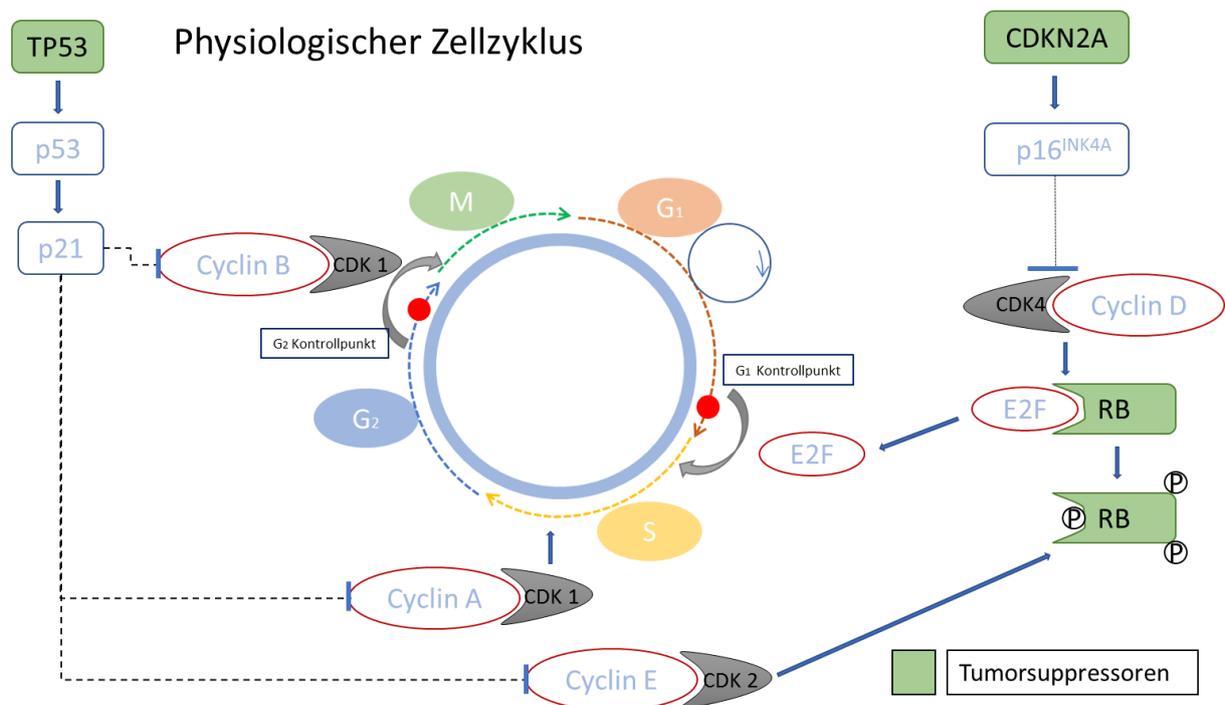


Abbildung 3: Zellzyklus regulierende Elemente

Der Zellzyklus ist ein streng regulierter Prozess, der eine periodische Ereignisabfolge besitzt. Es besteht eine strenge Regulation, um unkontrolliertes Wachstum zu verhindern. Wesentliche Bestandteile der Regulation sind Tumorsuppressoren. Dazu zählen p21, p16^{INK4A}, und RB (Im Bild grün unterlegt).

Der **Entstehung von HNSCCs** liegt ein mehrstufiger Prozess komplexer genetischer und epigenetischer Veränderung zugrunde (Molinolo *et al.*, 2009). Obwohl es sich bei HNSCCs um sehr heterogene Tumore handelt, kann man histologisch mehrere nacheinander ablaufende Phasen beobachten (Califano *et al.*, 2015). Die klinische Praxis zeigt jedoch, dass diese Karzinome zumeist erst in einem recht fortgeschrittenen Stadium (invasives Karzinom) detektiert werden (Johnson *et al.*, 2020). Dabei fällt auf, dass bei HNSCCs für die Tumorinitiation und Tumorprogression der Verlust von Tumorsuppressorgenen eine wesentliche Rolle spielt, während für viele andere Neoplasien initial die Mutation von Protoonkogenen für die maligne Entartung ursächlich sind. Dabei gilt, dass der Tumorprogress erst bei dem Verlust beider Allele funktioneller Tumorsuppressoren beginnt (LOH-*loss of heterozygoty*) (Johnson *et al.*, 2020).

Grundsätzlich kann man den histologischen Stadien eher frühere und eher späte Mutationen zuordnen, wie Abbildung 4 zeigt: Die Inaktivierung von *CDKN2A* und *TP53* (kodierend für p16^{INK4A} bzw. p53, Tumorsuppressoren) erfolgt eher früh, während die Amplifikation von *CCND1* (kodierend für Cyclin D1, Protoonkogen) in einem späteren Stadium erfolgt. Zusammen mit CDK4 (Cyclin-dependent-Kinase 4) fördert Cyclin D1 den Durchgang der G1-Phase des Zellzyklus. Im weiteren Verlauf kommt es zur Inaktivierung von *PTEN* (Phosphatase and Tensin homolog), welches physiologisch ebenfalls als Tumorsuppressor wirksam ist (Johnson *et al.*, 2020). Onkogene Mutation wie die Amplifikation von Genen des PI3K-Signalwegs führen mit vielen weiteren genetischen Aberrationen zum Zellzyklusverlust.

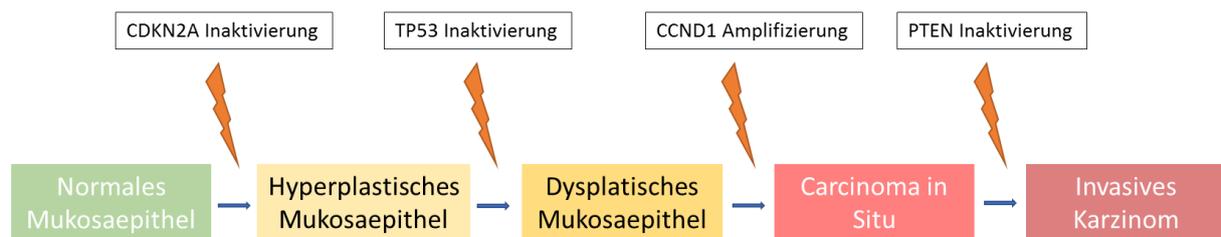


Abbildung 4: Tumorprogression und Schlüsselmutationen bei Noxen-induzierten HNSCCs

Man kann histologisch eine Progredienz der Entartung mit Schlüsselmutationen in Verbindung bringen. Für HNSCCs ist typisch, dass es initial zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie *TP53* oder *CDKN2A* kommt. Im Verlauf kommt es auch zu Veränderung in Protoonkogenen wie *CCND1*.

Grundsätzlich unterscheidet man die Karzinogenese von HPV- von Noxen-induzierten HNSCCs. Bei der Tumorinitiation von **Noxen-induzierten HNSCCs** spielen typischerweise die Regulation der Kontrollpunkte von G₁ und G₂ durch p53 und RB sowie Schlüsselmutationen in Tumorsuppressorgenen wie *TP53* und *CDKN2A* eine wesentliche Rolle (Shah *et al.*, 2011). Mit dem Ausfall dieser kommt es zu einer Dysregulation des Zellzyklus, welcher ungehemmt abläuft und somit auch die Entstehung neuer proneoplastischer Mutationen fördert.

Einleitung und aktueller Stand der Forschung

Die wesentlichen molekularen *Pathways* der Tumorinitiation und Progression von Noxen-induzierten HNSCCs werden durch DNA-Addukte hervorgerufen. Diese entstehen durch kovalente Bindung zwischen den reaktiven toxischen Metaboliten und der DNA im Rahmen von z.B. Alkylierungsreaktionen. Dadurch entstehen irreversible DNA-Schäden. Bei dem Verlust beider Allele (*loss of heterozygosity*, LOH) von Tumorsuppressoren beginnt die Tumorinitiation. Durch den Verlust von *TP53* wird das Protein p53 nicht mehr gebildet. Konsekutiv wirkt p53 nicht mehr als Transkriptionsfaktor. Folglich wird vermindert p21 exprimiert und somit auch kein Zellzyklusarrest verursacht oder pro-apoptotische Moleküle induziert. Es resultiert eine Dysregulation des Zellzyklus (Shah *et al.*, 2011).

Durch die Disinhibition diverser Cyclin/CDK-Komplexe kommt es effektiv zu einem ungehinderten Voranschreiten des Zellzyklus. Wesentliche Regulationskomplexe der Cyclin Superfamilie sind Cyclin B/CDK1, Cyclin A/CDK1 und Cyclin E/CDK2. Mit dem Funktionsverlust von *CDKN2A* wird die Expression vom Tumorsuppressor p16^{INK4A} unterdrückt und damit wird eine verminderte Hemmung von Cyclin D/CDK4 erreicht. Die Disinhibition führt zu einer gesteigerten Phosphorylierung von RB und damit zu einer gesteigerten Wirksamkeit von E2F. E2F ist nun in der Lage als Transkriptionsfaktor alle notwendigen Proteine für den Übergang von G₁ zu S zu induzieren. Während die Tumorinitiation eher durch den Verlust von Tumorsuppressoren gekennzeichnet ist, kommt es im Kontext der Tumorprogression zur Amplifikation von Onkogenen wie *CCND1*. Dies führt zu einer gesteigerten Expression von Cyclin D und damit zu einer Aktivitätssteigerung von CDK4 (Cancer Genome Atlas Network, 2015; Johnson *et al.*, 2020).

Auffallend ist die überwiegende Dominanz von Mutationen von bekannten und potenziellen Tumorsuppressoren, einschließlich *TP53*, *CDKN2A*, *FAT1*, *NOTCH1*, *KMT2D*, *NSD1* und *TGFBR2* (Curry *et al.*, 2014; Cancer Genome Atlas Network, 2015). *PIK3CA*, welches für die katalytische Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) kodiert, ist das einzige Onkogen, das in HNSCCs häufig mutiert ist (~ 14 %). Mutationen in RAS-Genen sind insgesamt selten, wobei HRAS-Mutationen am häufigsten sind (~ 4 % der Tumoren) (Johnson *et al.*, 2020). In fortgeschrittenen Krankheitsstadien erfolgt häufig eine Amplifikation der Gene, die für die Rezeptor-Tyrosinkinasen EGFR und HER2 kodieren (Cancer Genome Atlas Network, 2015). Dabei konnte für fast 90 % aller HNSCCs eine Amplifikation von EGFR nachgewiesen werden, was somit als molekulares Target für Therapieansätze in Frage kommt und auch schon in der klinischen Routine als Target für den monoklonalen Antikörper Cetuximab genutzt wird.

Neben genetischen Aberrationen findet man auch epigenetische Hypermethylierungsmuster in Tumorsuppressorgenen wie *CDKN2A*, *RARB* und *MGMT*, was in einer verminderten Genexpression resultiert (Foy *et al.*, 2015). Das Gen *MGMT* ist erwähnenswert, da dieses direkt in die Reparatur von Tabak-assoziiierter DNA-Schädigung involviert ist. Insgesamt wird

Tumorinitiation und Tumorprogression von HNSCCs durch sämtliche Einflussfaktoren, die eine Inflammation des Mukosaepithels zur Folge haben können, begünstigt. Die damit einhergehende gesteigerte Zellteilung führt zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einer malignen Entartung.

Neben den klassischen Noxen-vermittelten Risikofaktoren ist eine Infektion mit **Humanen Papillomaviren (HPV)** für einen wachsenden Anteil von HNSCCs verantwortlich. HPV-Infektionen lassen sich bei über 70 % der oropharyngealen HNSCCs nachweisen (Stein *et al.*, 2015). HPV-positive HNSCCs weisen unterschiedliche Genexpressionsmuster im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren auf. Daneben ist ein wesentlich kleinerer Teil durch das Epstein-Barr-Virus (EBV) erzeugt. Virus-assoziierte Tumoren zeigen die häufigste Lokalisation im Nasopharynx (EBV) und Oropharynx (HPV) (Tsang *et al.*, 2020). Im Rahmen der HPV-assoziierten Karzinogenese ist bei Oropharynxkarzinomen hauptsächlich der high-risk-Typ HPV-16 beteiligt (Michaud *et al.*, 2014). Weitere High-risk Typen sind HPV-18, HPV-31, HPV-33 und HPV-52 (Michaud *et al.*, 2014). HPV-Viren sind unbehüllte doppelsträngige DNA-Viren und gehören zur Familie der Papillomaviridae. Ihr Genom besteht aus zirkulär angeordneter DNA mit einer Größe von ca. 8 Kb. Ein wesentlicher Schritt der HPV-assoziierten Tumorinitiation ist die Infiltration der Krypten in der oropharyngealen Mukosa. Ein begünstigender Zustand stellt die leichte Erreichbarkeit der Stammzellen am Grund der Krypten dar. Typischerweise integriert das Virus seine DNA an variablen Stellen in der Wirtszelle. Dabei kommt sieben frühen (early) Genen (E1-E7) und zwei späten (late) Genen (L1-L2) eine besondere Bedeutung zu. Die frühen Gene sind verantwortlich für die virale Replikation, Transkription (E1-E5) sowie für die onkogene Transformation (E6-E7). Die späten Gene (L1-L2) kodieren für das virale Kapsid. E6 bildet mit dem zellulären Enzym Ubiquitin-Protein-Ligase E3A (UBE3A) einen Komplex, welcher den proteasomalen Abbau von p53 initiiert (Scheffner *et al.*, 1993). Im Vergleich zu Noxen-induzierten HNSCCs bleibt das Gen *TP53* erhalten, funktionell bleibt das Genprodukt p53 dennoch inaktiv. E7 führt hingegen zu dem proteasomalen Abbau von RB1, einem wesentlichen Zellzyklus-Regulations-Protein (Tomaić, 2016). Durch den Funktionsverlust von RB1 wird konsekutiv p16^{INK4A} kompensatorisch hochreguliert und somit als diagnostischer Marker verwendet, um Tumoren entsprechend der 8. Version der TNM-Klassifikation als HPV-positiv zu klassifizieren (Johnson *et al.*, 2020). Die molekularen Mechanismen der Tumorinitiation und Tumorprogression von Noxen-induzierten und HPV-assoziierten HNSCCs sind in Abbildung 5 dargestellt.

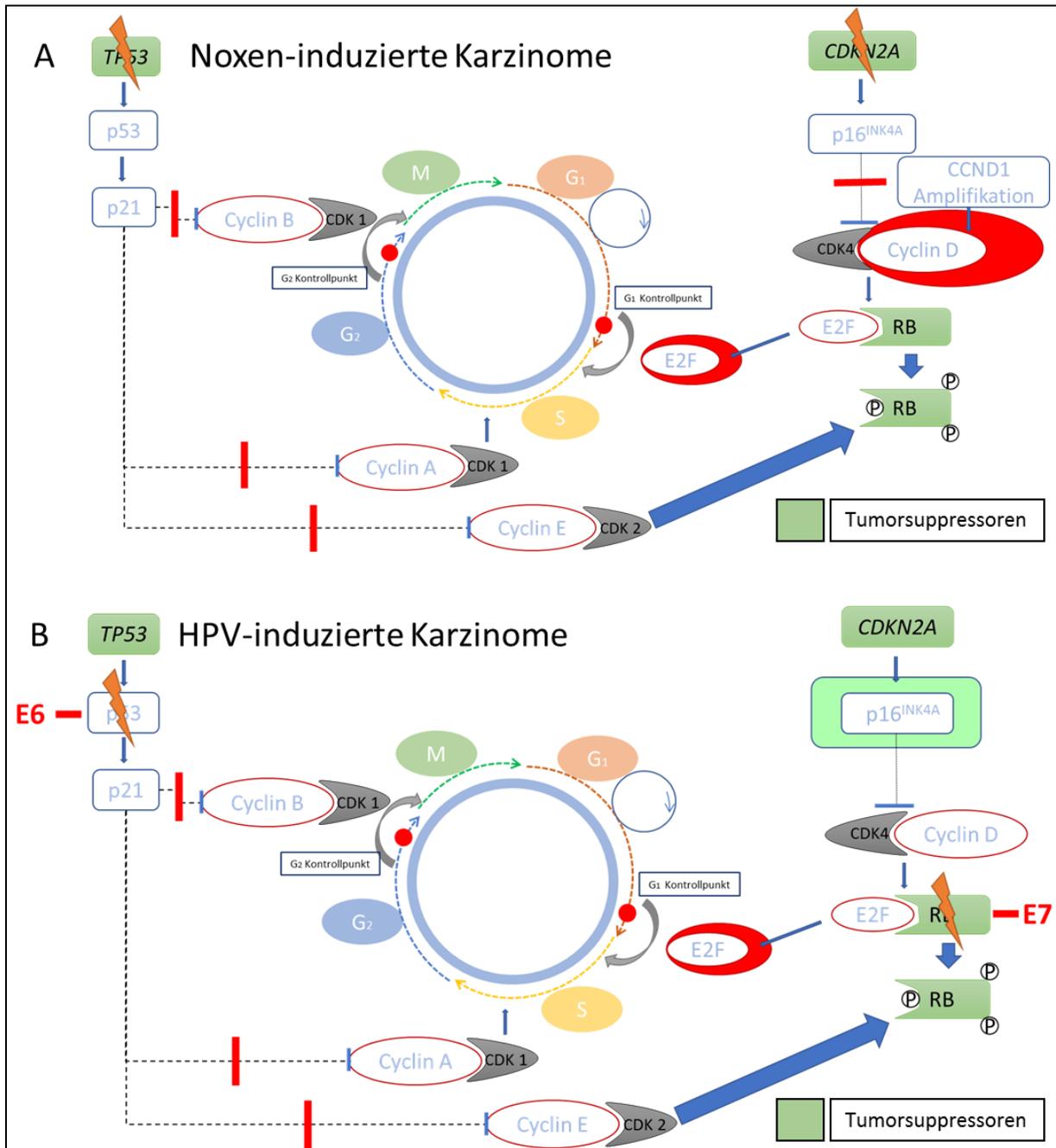


Abbildung 5: Molekulare Signalwege der Tumorentstehung und Progression von Noxen-induzierten (A) und HPV-positiven (B) HNSCCs

In beiden Situationen sind Schlüsselregulator-Moleküle inaktiviert. Dadurch kommt es zum unkontrollierten Zellzyklus mit konsekutiver Tumorentartung. Grün unterlegte Moleküle sind Tumorsuppressoren.

Noxen-induzierte HNSCCs, welche in Europa etwa zwei Drittel und damit den Großteil aller Fälle ausmachen, entstehen durch die Exposition von exogenen Karzinogenen wie zum Beispiel Zigaretten- und Alkoholkonsum oder durch Luftverschmutzung (Jethwa and Khariwala, 2017). Eine weitere spezifische Noxe stellt das Kauen der Betelnuss im Indo-Malaysischen Raum dar. Dieser Umstand ist ursächlich für die lokal angehobene Inzidenz (Anand *et al.*, 2014). Generell sind alle exogen zuführbaren Noxen, die bei Exposition zu Schleimhautdefekten führen, potenzielle Risikofaktoren.

70-80 % aller neu diagnostizierten HNSCCs sind mit Tabak- und Alkoholkonsum assoziiert (Jethwa and Khariwala, 2017). Der alleinige Alkoholkonsum ist für ca. 5 % der HNSCCs ursächlich, Zigarettenrauch alleine für ca. 35 % und die Kombination von Alkohol und Zigaretten für ebenfalls 35 % (Jethwa and Khariwala, 2017). Schlechte orale Hygiene, chronischer Eisen- und Vitamin-A-Mangel resultieren in einer gesteigerten Labilität der Schleimhaut im Aerodigestivtrakt, was in Kombination mit den konstanten physiko-mechanischen Beanspruchungen ebenfalls relevante Einflussfaktoren zur Entstehung einer Neoplasie sind (Singh *et al.*, 2019).

Nach Aufnahme der Karzinogene kommt es zur lokalen Akkumulation von schädlichen Zwischenprodukten (Kleier, Werkmeister and Joos, 1998). Die chronische Exposition schädigt das Epithel und löst eine lokale Inflammation aus. Die toxischen Metabolite der Karzinogene führen zu kovalenten DNA-Wechselwirkungen und induzieren eine Tumorumitiation durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Leemans, Snijders and Brakenhoff, 2018). Das gleichzeitige Vorliegen begünstigender Faktoren wie schlechte orale Hygiene und Vitamin A Mangel (Kleier, Werkmeister and Joos, 1998) fazilitiert die lokale Tumorumitiation (Hashim *et al.*, 2016).

Neben einer direkten mutagenen Wirkung exogener Noxen wird die lokale Immunantwort geschwächt und eine lokale Inflammation ausgelöst. Zigarettenrauch z.B. enthält über 5000 beschriebene Substanzen, die karzinogene Wirkung zeigen. Zu den Hauptmediatoren mit kanzerogener Wirkung zählen Nitrosamine, Benzopyrene und aromatische Kohlenwasserstoffe (Hecht, 1999). Diese Substanzen werden initial als Prä-Kanzerogene bezeichnet. Nach Modifikation durch oxidierende Enzyme binden die oxidierten Metabolite kovalent an die DNA, wodurch es zur Ausbildung von DNA-Addukten kommt. Die lokale Metabolisierung der in Zigarettenrauch vorliegenden Substanzen kann zudem freie Radikale produzieren und Mutationen durch weiteren oxidativen Stress fördern (Rivera, 2015; Jethwa and Khariwala, 2017). Erwähnenswert ist außerdem, dass bei der Inhalation von Zigarettenrauch das Schwermetall Cadmium in den oberen Atemwegen akkumuliert. Es gehört zu den stärksten proneoplastisch wirksamen Substanzen und steigert das Entartungsrisiko zusätzlich (Genchi *et al.*, 2020).

Chronischer Alkoholkonsum labilisiert lokal die Epithelbarriere und führt somit zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Mundschleimhaut. Dabei kommt es zu einem gesteigerten Toxindurchtritt, einer epithelialen Atrophie und zu Interferenzen mit DNA-Reparaturmechanismen (Reidy, McHugh and Stassen, 2011). Zusammen mit den systemischen hepatotoxischen Effekten kommt es zu einer Beeinträchtigung der angeborenen und erworbenen Immunantwort, was die Suszeptibilität für Neoplasien wesentlich erhöht. Die Kombination verschiedener Risikofaktoren bei gleichzeitiger labilisierter Epithelbarriere der

Mundschleimhaut potenziert die Wahrscheinlichkeit zur Entstehung von HNSCCs (Rivera, 2015).

Zellzykluskontrollmechanismen und DNA-Reparaturmechanismen können lokale Schäden zu einem gewissen Grad beheben und einer malignen Entartung entgegenwirken. Bei irreversibler Schädigung der DNA und systemischer Schwächung der Immunantwort überwiegen jedoch die toxischen Effekte der exogenen Noxen (s. Abbildung 6). Schließlich akkumulieren Mutationen in kritischen DNA regulierenden Bereichen, was zu der Entstehung invasiver HNSCCs führt (Johnson *et al.*, 2020).

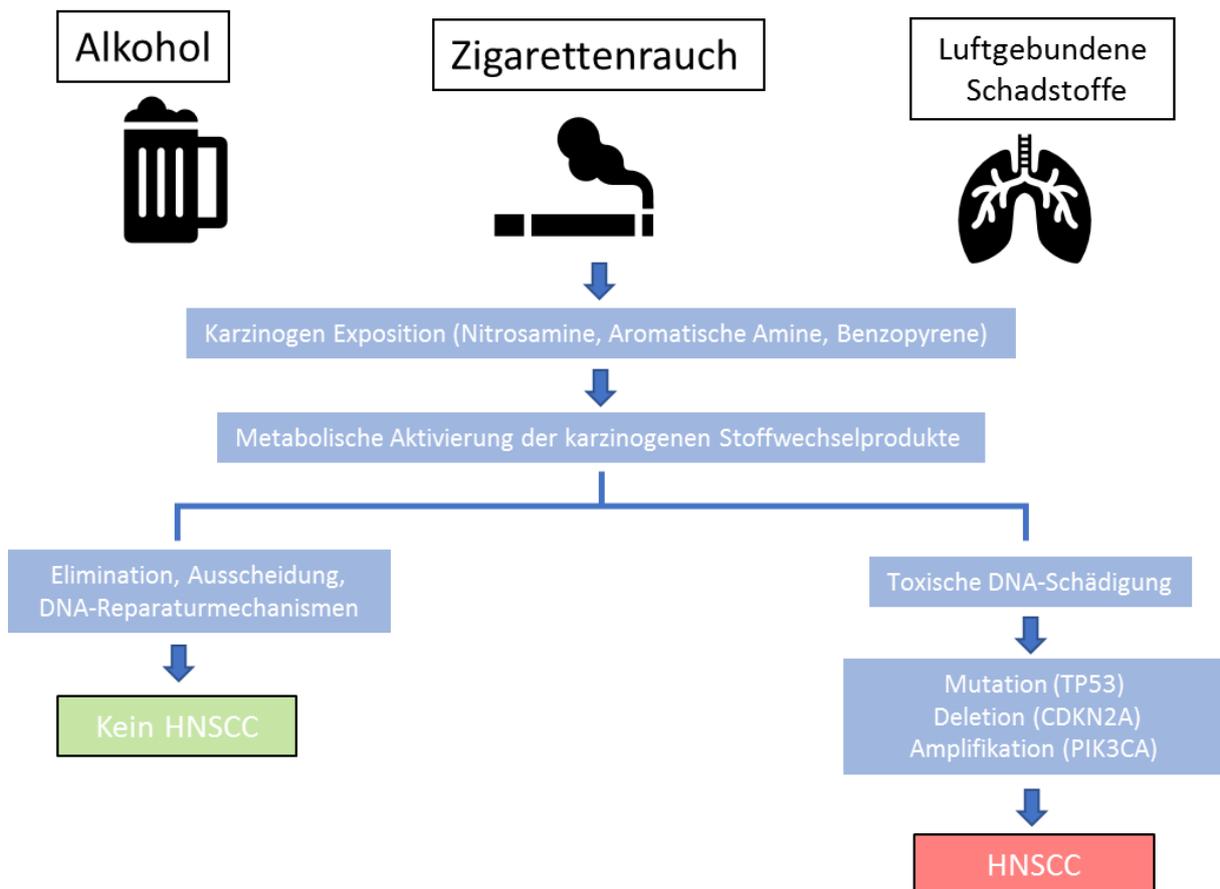


Abbildung 6: Noxen-induzierte Karzinogenese von HNSCCs

Tabakerzeugnisse, übermäßiger Alkoholkonsum und Umweltschadstoffe sind gesellschaftliche Hauptrisikofaktoren der Noxen-induzierten HNSCC.

2.1.4 Immunologische Tumormikroumgebung

Im Rahmen der **physiologischen Immunreaktion** kommt es mittels Antigenpräsentation zu einer gerichteten Immunantwort. Für die Aktivierung von T-Zellen bedarf es mehrerer Signale: Das erste Signal beschreibt die Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor auf der T-Zelle und einem MHC-I/II-Komplex auf der Antigen-präsentierenden-Zelle (APC), der mit einem Antigen beladen ist. Die simultane Aktivierung von kostimulatorischen Signalen wie die Interaktion CD40 und CD40-L (Ligand) oder OX40-OX40-L, CD137-CD137-L, CD80/CD86-CD28 ist für

die Lymphozyten-Aktivierung essenziell. Bei Vorliegen von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-12 oder IFN- γ kommt es zur T-Zell-Aktivierung (Sckisel *et al.*, 2015).

Leukozyten, und insbesondere CD8⁺ zytotoxische T-Zellen, haben die Fähigkeit Krebszellen durch Tumorantigenpräsentation zu identifizieren und durch unterschiedliche Mechanismen zu eliminieren.

Tumorantigene (TA) sind Gewebe-spezifisch und stellen neue Genprodukte dar, die ausschließlich von Tumorzellen gebildet werden (Dalglish and Pandha, 2007). Daher bieten sie sich als therapeutische *Targets* an und sind Gegenstand aktueller Forschung. Diese Antigen determinanten (Neoantigene) werden im Rahmen der unkontrollierten Zellteilung durch Tumorsuppressorverluste vermehrt exprimiert. Die TA werden durch Makrophagen, B-Zellen oder dendritische Zellen internalisiert und über MHC-Moleküle (*Major histocompatible complex*) dem T-Zell-Rezeptor (TCR) präsentiert. Diese Aktivierung induziert die antitumorale Immunantwort, bei der toxische Granula oder eine direkte Zellinteraktion den Zelltod der Krebszelle induziert (Aleksic *et al.*, 2012). Neuere Studienergebnisse konnten weiterführend zeigen, dass CD4⁺ T-Zellen ebenfalls direkt antitumorale zytotoxische Effekte hervorrufen können (Oh and Fong, 2021).

Die Aktivierung der T-Zelle ist komplex und wird streng reguliert, damit es nicht zu überschießenden autoreaktiven Immunreaktionen kommt und eine gezielte, spezifische und zielgerichtete Immunreaktion möglich ist.

Die Aktivität der T-Zellen wird daher durch **Imm checkpoints** reguliert. Wichtige dazugehörige Proteine sind in diesem Kontext PD-1 und CTLA4, die ebenfalls als therapeutische *Targets* klinisch etabliert sind (Buchbinder and Desai, 2016). Oberflächenmoleküle von Antigen-präsentierenden-Zellen (APC) und T-Zellen wie B7-1/B7-2 und CD28 initiieren kostimulatorisch die T-Zell-Aktivierung (Davis, Ferris and Schmitt, 2016). PD-1 (*Programmed cell death protein 1*) und CTLA4 (*Cytotoxic T-lymphocyte protein 4*) wirken diesbezüglich antagonistisch, unterdrücken die Immunantwort und induzieren den Zelltod der Immunzelle. Dabei bindet CTLA4 an B7-1/B7-2 und PD-1 an PD-L1 (*Programmed cell death ligand 1*) (Davis, Ferris and Schmitt, 2016). Zur letztendlichen Immunzellaktivierung bedarf es weiterer Co-Aktivatoren und komplexer Signalkaskaden, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird.

Während der Tumorprogression passt sich das tumorumgebende Stromagewebe mit Fibroblasten und Makrophagen den Signalwegen des Tumors an. Die umgebenden Immunzellen, Fibroblasten, Zytokine und Chemokine tragen zum tumorspezifischen Milieu bei und werden in Summe als **Tumormikroumgebung** (*TME-tumor micro-environment*) bezeichnet (Mao *et al.*, 2021). Die TME spielt eine wichtige Rolle für die Aggressivität und weiteren biologischen Eigenschaften des Tumors. Die komplexe Interaktion zwischen

Stromazellen, Krebszellen, Immunzellen und Interleukinen führt zu einer Immunsuppression und proonkogenen Effekten.

Die Mikroumgebung von HNSCCs besteht aus einer Vielzahl tumorinfiltrierender Immunzellen, Myofibroblasten, Endothelzellen, und einzelnen Neuronen. Unter den Immunzellen findet man Lymphozyten (T-Zellen, B-Zellen, Natürliche Killerzellen) und Zellen der myeloischen Zellreihe (u.a. Makrophagen, neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen und Myeloide Suppressorzellen (*Myeloid-derived-suppressor-cells* – MDSCs). Daneben kommen CAFs (*Cancer associated Fibroblasts*) und Endothelzellen in großer Anzahl vor. CAFs produzieren vaskuläre Wachstumsfaktoren wie VEGF, EGF und HGF, die die Neoangiogenese, das Tumorwachstum und die TME-Ausbreitung stimulieren (Canning *et al.*, 2019a). Die neu einsproßenden Endothelzellen hingegen produzieren Signalmoleküle für das Überleben und die Proliferation der Tumorzellen (Krishnamurthy *et al.*, 2010). Es entsteht so ein synergistischer *Feedback-Loop* zur Proliferation innerhalb der TME.

HNSCCs sind weiterhin durch Hypoxie charakterisiert. Dabei sind hohe Level einer Hypoxie mit einer schlechten Prognose und einer Strahlenresistenz assoziiert (Göttgens *et al.*, 2019). Die lokale Hypoxie induziert dabei die Expression von HIF1 (Hypoxie-induzierter Faktor 1), welcher die Expression diverser Gene stimuliert. Dazu zählen u.a. Angiogenese-fördernde Faktoren wie VEGF (*Vascular endothelial growth factor A*). Darüber hinaus werden metabolische Stoffwechselwege verändert und immunmodulatorische Zytokine vermehrt gebildet (Alsahafi *et al.*, 2019). Zusammen mit den proangiogenetisch wirksamen CAFs wird so in der TME eine sehr starke Vaskularisierung induziert, um das aggressive Tumorwachstum und den entsprechenden Nährstoffbedarf zu decken.

Grundsätzlich unterscheidet man entzündliche TMEs von nicht-entzündlichen TMEs, die über das Vorliegen von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs), weiteren Immunzellen und effektorischen Zytokinen definiert werden (Chen and Mellman, 2017). Dabei wird durch die TA-Präsentation vermehrt Interferon- γ (INF- γ) ausgeschüttet, was zu einer gesteigerten Expression inhibitorischer Moleküle wie PD-L1 und Indoleamine 2,3- dioxigenase (IDO) führt (Spranger *et al.*, 2013). Das inflammatorische Milieu ist ein Indikator für eine stattfindende Immunantwort auf den Tumor, die jedoch schnell durch das immunsuppressive Milieu der TME unterdrückt wird. Dieser Umstand gibt Hinweise darauf, dass eine Immuntherapie gute Ansprechraten erzielen könnte (Herbst *et al.*, 2014).

HNSCCs zählen neben anderen soliden Tumoren wie Lungenkrebs, dem malignen Melanom und Nierenzellkarzinomen zu den am stärksten **immuninfiltrierten Tumoren** (Hendry *et al.*, 2017), sodass Checkpoint-Inhibitoren vielversprechende Ansätze darstellen. Das Ausmaß und die Zellzusammensetzung variiert je nach Ätiologie stark (HPV-positiv vs. HPV-negativ) (Mandal *et al.*, 2016). Für die verschiedenen Tumore können unterschiedliche Immunphänotypen identifiziert werden. Diese könnten die Wirksamkeit von Immuntherapien,

wie Checkpoint-Inhibitoren, bis zu einem gewissen Grad vorhersagen. Hohe Spiegel von Tumor-infiltrierenden-Lymphozyten wie NK-Zellen, CD8+ T-Zellen und M1-Makrophagen (TILs) sind prognostisch günstiger als hohe Level von regulatorischen T-Zellen (T_{reg} -Zellen), MDSCs und M2-Makrophagen hinsichtlich des Ansprechens auf eine Immuntherapie (Peltanova, Raudenska and Masarik, 2019; Chen *et al.*, 2021). Dabei zeigte sich in Studien der vergangenen Jahre, dass die antitumorale Aktivität hauptsächlich von Effektor T-Zellen (T_{eff} -Zellen) und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) ausgeht. T_{reg} -Zellen, MDSCs und M2-Makrophagen besitzen eher eine immunsupprimierende Aktivität und sind mit einem fortgeschrittenen Stadium sowie einer schlechten Prognose verbunden (Peltanova, Raudenska and Masarik, 2019).

Einige Tumorentitäten entwickeln im Verlauf der Tumorerkrankung die Fähigkeit, der antineoplastischen Aktivität des **Immunsystems zu entgehen**, indem sie die Antigenpräsentation modulieren, wie zum Beispiel durch Überexpression von PD-L1 oder durch Ausschüttung immunsuppressiver Faktoren (Drake, Jaffee and Pardoll, 2006). Auch im Kontext von HNSCCs zeigt sich, dass sich diese Tumoren über verschiedene Mechanismen der Immunantwort entziehen können. Das tumorumgebende Mikromilieu ist in dieser Tumorentität reich an immunsupprimierenden Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die die antitumorale Wirkung von T_{eff} -Zellen und NKs hemmen und die Rekrutierung von MDSCs, T_{reg} -Zellen und M2-Makrophagen fördern. Relevanten Einfluss nehmen dazu die Interleukine IL-6, IL-10, VEGF und TGF- β (Canning *et al.*, 2019a). Gleichzeitig führt die zelluläre Dysplasie zu einer Verringerung der oberflächlichen Humanen-Leukozyten-Antigen (HLA) Expression, was zusammen mit der Hochregulation des PD-L1-Checkpoints die zytotoxische Aktivität von T-Zellen abschwächt (Ferris *et al.*, 2016). Funktionell ähnlich inhibierend wirken die von HNSCCs rekrutierten M2-Makrophagen und T_{reg} -Zellen über CTLA4 Lymphozyten. In HPV-positiven HNSCCs führen virale E5-, E6-, E7-Proteine zur Immunevasion auf Genexpressionsebene. Eine besondere Bedeutung kommt in diesem Fall dem Verlust von *TRAF3* zu, welches physiologischerweise eine Rolle bei der antiviralen Immunität spielt und auch im Rahmen der Immunevasion von virusassoziierten HNSCCs ein relevanter Faktor ist (Gu *et al.*, 2017).

Im Rahmen der Dissertation wurde das intratumorale und peritumorale Immunzellinfiltrat der in immunkompetenten Mäusen induzierten HNSCCs immunhistochemisch untersucht, sodass an dieser Stelle die wichtigsten **antiproliferativ wirksamen Zellpopulationen** beschrieben werden. Dabei sind 4 Zellpopulationen von herausragender Relevanz. Jeder dieser Populationen können spezifische therapeutische Ziele zugeordnet werden. In Abbildung 7 werden diese einzelnen Populationen abgebildet.

(A) Tumor assoziierte Makrophagen (TAM) lassen sich grundsätzlich in zwei Subpopulationen einordnen: M1-Makrophagen wirken proinflammatorisch und fördern die lokale antitumorale Immunantwort durch die Produktion von IL-12, IL-23, und INF- γ . M2-Makrophagen exprimieren

das Oberflächenmolekül **CD163** und stellen den dominierenden Phänotyp dar. Sie wirken stark immunsuppressiv, indem sie T-Zellen inaktivieren und auf diesen eine Steigerung der PD-1-Expression induzieren (DeNardo and Ruffell, 2019). Darüber hinaus produzieren sie die antiinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-10, TGF- β . Therapeutisch werden Chemokine wie CCL2 (*CC-chemokine ligand 2*), CSF1R (*Colony stimulating factor 1 receptor*), welche die Zellmigration in die TME fördern und die Zellaktivität steigern, gehemmt (Economopoulou, Kotsantis and Psyri, 2020). Ein anderer Ansatz stellt die therapeutische Differenzierungsförderung zu M1-Makrophagen durch die Ziele TLR (*Toll-like receptor*), CD40 (Kostimulator in Immunzellen) und PI3Ky (Immunmodulatorische *Pathways*) dar (sog. „phenotype-switch“) (Kaneda *et al.*, 2016).

(B) MDSCs stellen eine sehr heterogene Gruppe unreifer myeloider Zellen dar. Sie fördern die Ausbildung von Neovaskularisationen und hemmen die Aktivität von CTLs (Quail and Joyce, 2013). Darüber hinaus können sie zu TAMs differenzieren. Sie werden chemotaktisch durch CXCL1, GM-CSF, IL-8, und CSF1 zur TME rekrutiert (Chen *et al.*, 1999; Davis, Van Waes and Allen, 2016). Sie sind durch die Expression von CD14-CD11b, CD33 ohne MHC-II charakterisiert. Insgesamt ist ihr vermehrtes Vorliegen mit einem negativen prognostischen *Outcome* und fortgeschrittenen Stadium korreliert. Therapeutische Ziele sind das immunsuppressiv-wirksame IDO1 Enzym (Indolamin-2,3-Dioxygenase), CXCR2 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2), ein proangiogenetischer Chemokinrezeptor, und PDE5 (Phosphodiesterase-V), welches über mehrere Reaktionen die lymphozytäre Antigen-getriggerte Aktivierung unterdrückt (Yu *et al.*, 2013; Califano *et al.*, 2015).

(C) T_{regs} repräsentieren einen Subtyp von CD4+ T-Zellen. Sie supprimieren die Immunaktivität durch Sekretion von IL-10 und TGF- β . Sie exprimieren viele Oberflächenmarker und Moleküle, die als therapeutische Ziele genutzt werden können. Dazu zählt CD25 (Teil des Interleukin-2-Rezeptors), CD134 (OX40, ein kostimulatorischer Immuncheckpoint), CD73 (5'-Nukleotidase), **FOXP3+** (intranukleärer Transkriptionsfaktor), CTLA4 (inaktivierender Immuncheckpoint bei Bindung mit CD80 oder CD86) und GITR (*glucocorticoid-induced TNFR-related protein*, aktivierender Immuncheckpoint) (Bruni, Angell and Galon, 2020). Darüber hinaus kann therapeutisch die Rekrutierung durch Chemotaxis über CCR4 (Chemokinrezeptor) inhibiert werden (Nishikawa and Sakaguchi, 2014).

(D) CAFs stellen den dominierenden Zelltyp in der TME dar. Sie ähneln phänotypisch den während der Wundheilung aktiven Myofibroblasten. Ihre Funktion besteht in der Modulierung der EZM (Extrazelluläre-Matrix), Förderung von Tumorproliferation, Migration und Metastasierung (Schmitz and Machiels, 2016). Sie exprimieren unter anderem α -SMA (ein Aktinbestandteil) und FAP (*Fibroblast activation protein*). Sie tragen mit Kollagenase- und Gelatinaseaktivität zur malignen EZM-Erweiterung bei (Teichgräber *et al.*, 2015; Kalluri, 2016). Darüber hinaus produzieren CAFs Wachstumsfaktoren wie VEGF (*Vascular Endothelial*

Growth Factor), EGF (epidermaler Wachstumsfaktor) und HGF (*Hepatocyte Growth Faktor*). Diese verstärken die Angiogenese und ermöglichen die ausreichende Versorgung mit Nährstoffen für den Tumor (Johnson *et al.*, 2020). In therapeutischen Ansätzen wird FAP gehemmt. IL-6 und JAK2/STAT3 Signalwege werden zur Unterdrückung der Tumorexpansion angesteuert. Weiterhin werden MMPs (Matrix-Metallo-Proteasen) inaktiviert, um das *Remodeling* der EZM zu verhindern (Economopoulou, Kotsantis and Psyri, 2020).

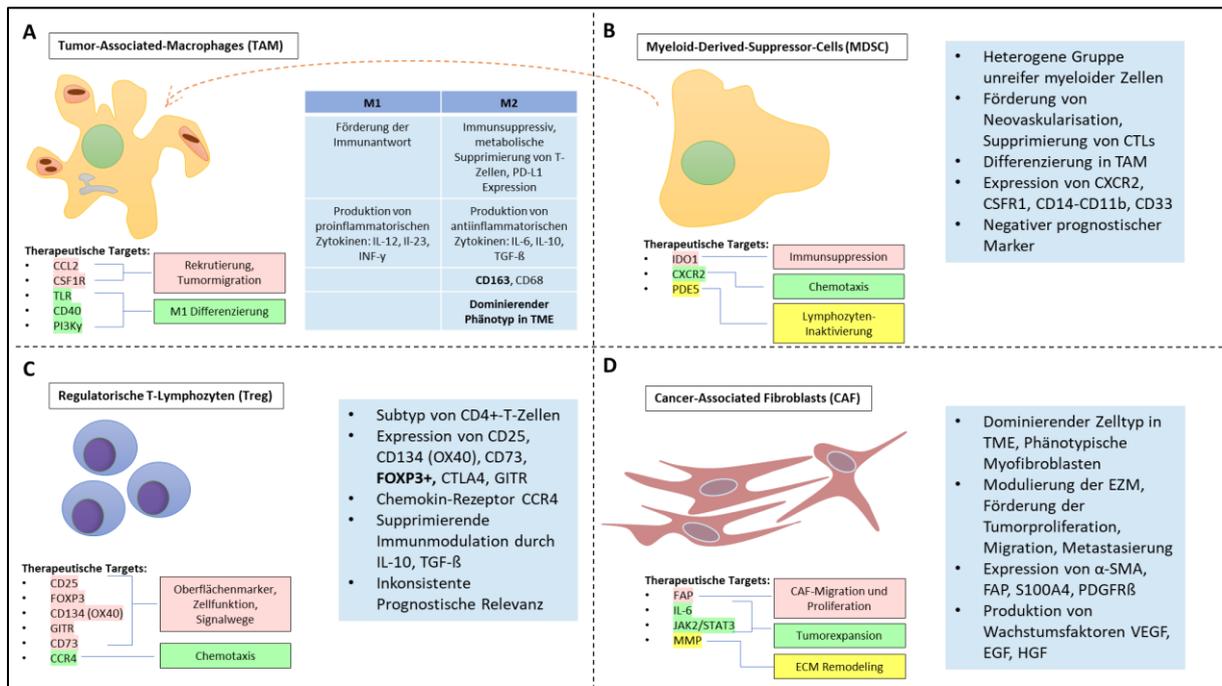


Abbildung 7: Immunsuppressive Zellpopulationen in TME und therapeutische Targets

Es werden neben den wichtigsten Eigenschaften der Zellen, Oberflächenmarker und mögliche therapeutische *Targets* dargestellt. **CD163⁺** Makrophagen und **FOXP3⁺** T_{regs} wurden im Rahmen der immunhistochemischen Aufarbeitung in der Dissertation analysiert.

HNSCCs fördern die **Immunsuppression** innerhalb der TME durch die Hochregulation von PD-L1, Ausschüttung von immunsuppressiven Faktoren und durch die Rekrutierung von TAMs, T_{regs}, CAFs und MDSCs (Allen *et al.*, 2015). Das komplexe Zusammenspiel von Inhibitoren und Aktivatoren kann anhand von Abbildung 8 in wesentlichen Zügen abgebildet werden. Dabei ermöglicht die Balance zwischen kostimulatorischen (grün) und koinhibitorischen (rot) Signalen eine Aktivierung des auf Lymphozyten befindlichen T-Zell-Rezeptors. Diese Aktivierung vermittelt eine zielgerichtete, dosierte Immunreaktion, wie Abbildung 8 (A) zeigt. Innerhalb der TME kommt der Einfluss diverser weiterer Zellen hinzu. Darunter fallen MDSCs, TAM, T-reg, CAF und der Tumor selbst. Dabei überwiegt der deutlich immunsupprimierende Effekt der TME und die antitumorale Immunantwort wird gehemmt, wie in 8 (B) abgebildet.

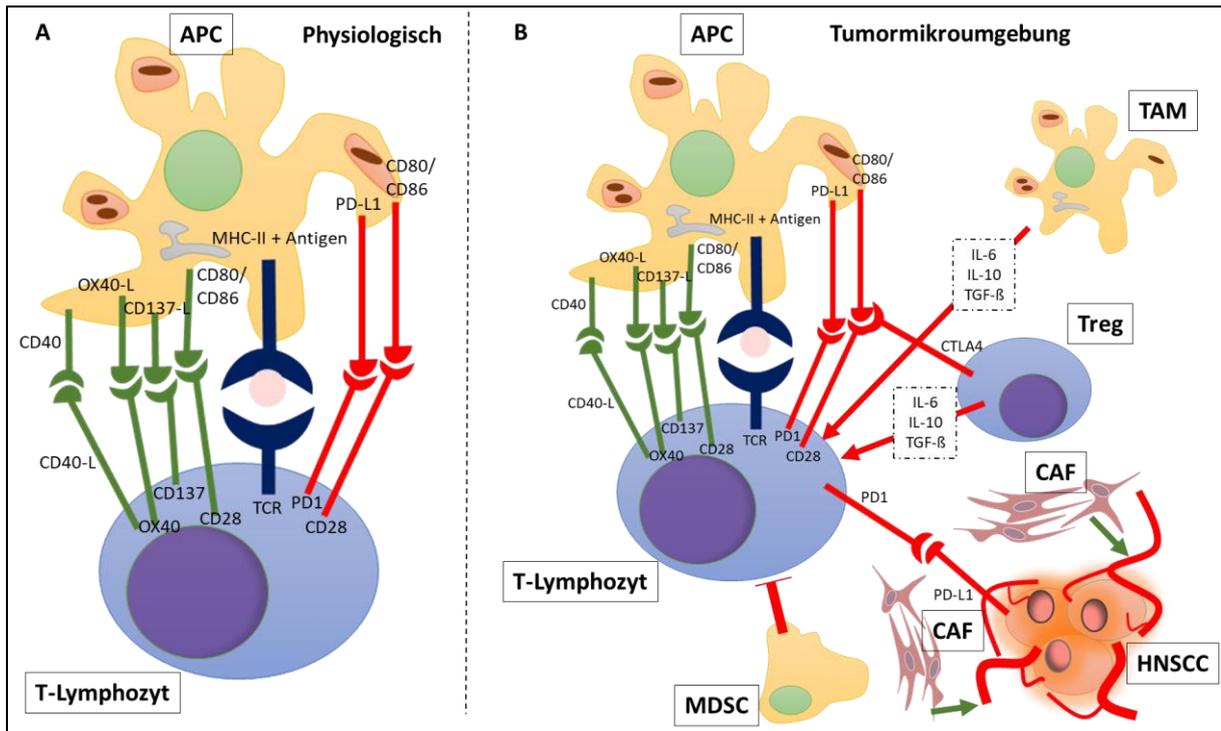


Abbildung 8: Zellulärer Cross-Talk zwischen APC und T-Lymphozyt physiologisch (A) und innerhalb der TME (B)

Kostimulatorische Signale (grün) und Koinhibitorische (rot) Signale sind farblich gekennzeichnet. Eine komplexe Interaktion verschiedener Zelllinien ermöglicht eine koordinierte Immunantwort.

Im Kontext einer antineoplastischen Immuntherapie ist das Verständnis der **intratumoral und peritumoral ablaufenden Prozesse** von großer Bedeutung. Die komplexen Zellinteraktionen zwischen Immunzellen, Tumorzellen und den tumorassoziierten Fibroblasten sind nach aktuellem Verständnis ausschlaggebend für das Ansprechen einer antitumoralen, immunmodulierenden Therapie und damit prognosebestimmend. Die Modulation des Immunzellinfiltrates der TME durch Vitamin D₃ könnte somit einen entscheidenden Schritt zur Optimierung einer immunologischen Therapie darstellen. Im Folgenden werden die in der Abbildung 8 genannten kostimulatorischen oder koinhibitorischen Mechanismen und Moleküle genauer beschrieben, um die grundlegenden Mechanismen auf molekularer Ebene zu erörtern. Die damit einhergehenden Signalwege zur Immunaktivierung sind Gegenstand aktueller Forschung und potenzielle Zielstrukturen für immunmodulierende Therapien.

CD137 ist ein kostimulatorischer Rezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen. Bei Bindung von CD137-L auf APCs kommt es zur Rezeptortrimerisation. Insgesamt wird dadurch die Proliferation, zytotoxische Aktivität und das Überleben der T-Zellen verstärkt (Lynch, 2008).

CD40-L wird auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen exprimiert. Bei Bindung von CD40 kommt es zur Aktivierung und Rekrutierung von CD8+ zytotoxischen T-Zellen. Dabei ist zu beobachten, dass bei voranschreitendem Tumorstadium eine Herunterregulierung von CD40-L vorliegt (Sathawane *et al.*, 2013). *In vitro* Versuche mit CD40-agonistischen monoklonalen Antikörpern konnten die APC-Reifung und -Aktivierung verstärken (Bergstrom *et al.*, 2004).

Die Zugabe von rekombinantem CD40-L konnte sogar naive T-Zellen gegen TA primen (Hoffmann *et al.*, 2001).

OX40 ist wie die oben genannte Proteine ebenfalls ein kostimulatorisches Signalmolekül, welches auf der T-Zell-Oberfläche liegt. Es ist an der Proliferation, Zytokinausschüttung und der Aufrechterhaltung des Immungedächtnisses beteiligt (Bauman and Ferris, 2014). Es besitzt eine antiapoptotische Wirkung und fördert das T-Zell Überleben ab einer Dauer von 72 Stunden. Ebenfalls inhibiert OX40 eine T_{reg} medierte Immunsuppression (Weinberg *et al.*, 2000). In einigen Patienten mit soliden Tumoren konnte die therapeutische OX40-Agonisierung das tumorfreie Überleben durch die Expansion von CD4+ T-Zellen verlängern (Weinberg *et al.*, 2000).

PD-1 ist ein Transmembranprotein, welches auf aktivierten CD8+ T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert ist. Es dient dem Zweck eine überschießende Immunreaktion zu verhindern (Bauman and Ferris, 2014). Im Rahmen der immunvermittelten Krebstherapie konnten in den letzten Jahren vielversprechende Erfolge erzielt werden. Dabei spielt PD-1 eine entscheidende Rolle bei der Hemmung der Immunantwort und Förderung der Selbsttoleranz, indem es die Aktivität von T-Zellen inhibiert und auch die Apoptose von T-Zellen induziert. PD-L1 ist ebenfalls ein Transmembranprotein, welches als koinhibitorischer Faktor PD-1 bindet und somit die Proliferation und das Überleben von PD-1 positiven Zellen reduziert. Als therapeutisches Ziel des monoklonalen Antikörpers Pembrolizumab spielt die PD-1/PD-L1-Achse eine zunehmende Rolle in der Therapie von HNSCCs (Han, Liu and Li, 2020). PD-L1 wird gehäuft von HNSCCs produziert, um die lokale antineoplastische Immunreaktion zu unterdrücken.

CTLA4 ist ein inhibitorischer Rezeptor, der hauptsächlich von T-Zellen exprimiert wird. Innerhalb der TME findet sich eine konstitutive Expression von CTLA4 auf T_{regs} (Strauss *et al.*, 2007). Seine Liganden CD80, und weniger affin CD86, liegen auf der Oberfläche von APCs und binden entweder CD28 oder CTLA4, was entweder kostimulatorisch oder koinhibitorisch wirkt. Genau wie auch PD-1/PD-L1 zählt CTLA4/CD80 zu den *Imm checkpoints* und ist damit ein entscheidender Regulator der T-Zell-Homöostase und Selbsttoleranz. Die Hauptwirkung entwickelt CTLA4 durch konkurrierende Bindung mit CD28 um CD80/CD86. Im Rahmen der Therapie solider Tumoren wird CTLA4 ein zunehmendes Potential zugeschrieben (Van Coillie, Wiernicki and Xu, 2020), auch wenn Anti-CTLA4-Antikörper in der klinischen Praxis aktuell bei deutlich weniger Tumorentitäten eingesetzt werden können als beispielsweise Anti-PD1- und Anti-PD-L1-Antikörper.

TLRs (*Toll-like receptors*) sind Transmembran-Rezeptoren, die pathogene Oberflächenantigene erkennen und dadurch das angeborene Immunsystem unspezifisch aktivieren. TLR7 und TLR8 sind spezifische therapeutische Ziele zur Steigerung der antitumoralen Immunaktivität. Die therapeutische Agonisierung an TLR8 kann eine Aktivierung

von dendritischen Zellen und Makrophagen hervorrufen. In Studien konnte hierbei eine vermehrte TNF- α und IL-12 Sekretion beobachtet werden. Darüber hinaus wurde die NK-Zell Aktivität und INF- γ Sekretion gesteigert (Lu *et al.*, 2012).

2.1.5 Diagnostik/ Therapie/ Prognose

Für Karzinome des Aerodigestivtraktes gilt, dass sie meist keine hochspezifischen Frühsymptome bieten. Entscheidend für die Symptomkonstellation ist die anatomische Lokalisation des Tumors und dessen ätiologische Herkunft (HPV-assoziiert vs. HPV-negativ). Karzinome der **Mundhöhle** fallen i.d.R. recht früh wegen der nicht heilenden oralen Läsion auf, die u.U. deutliche Probleme beim Sprechen, Schlucken oder Kauen bereiten kann. Bei gleichzeitigem Vorliegen von Risikofaktoren und persistierenden Beschwerden sollte eine Abklärung der oralen Läsion erfolgen.

P16^{INK4A}-negative **oropharyngeale und hypopharyngeale Tumore** hingegen fallen durch die relative Symptomarmut und durch die versteckte anatomische Lokalisation erst sehr spät auf. Im fortgeschrittenen Stadium kann es zu Dysphagie, Odynophagie und Ohrenschmerzen durch Reflexotalgie kommen. Bei letzterem handelt es sich um fortgeleitete Schmerzen durch die Innervation mehrerer sensibler Bereiche durch denselben Hirnnerven (*N. glossopharyngeus*). P16^{INK4A}-positive Oropharyngeal-Tumorpatienten präsentieren sich häufig mit neuen, schmerzlosen zervikalen Lymphknotenschwellungen. Bei Abwesenheit der typischen Risikofaktoren ist aufgrund der weitreichenden Durchseuchung mit HPV diesen Patienten besondere Aufmerksamkeit zu schenken. Die Hauptrisikofaktoren zur HPV-Infektion sind männliches Geschlecht und häufig wechselnde Sexualpartner (Gillison *et al.*, 2015).

Patienten mit **Larynxkarzinomen** weisen häufig Stimmveränderungen oder floride Heiserkeit auf, was zu einer frühzeitigen Diagnose führt. In weit fortgeschrittenem Stadium kann es durch laryngeale Einengung zu Dyspnoe kommen. Durch die funktionelle anatomische Lokalisation führen Karzinome der Glottis zu deutlich früheren Symptomen wie Heiserkeit und Stimmveränderungen als extraglottisch lokalisierte Larynxtumore.

Die am häufigsten auftretenden Symptome eines **Nasopharynxkarzinoms** sind geschwollene Halslymphknoten und Epistaxis mit unilateraler Nasenatmungsbehinderung (Yu-Pei Chen *et al.*, 2019). Aufgrund der Nähe des Nasopharynx zur Schädelbasis können fortgeschrittenere Tumoren mit Hörverlust oder Lähmungen von Hirnnerven auftreten.

Es zeigen sich insgesamt in frühen Stadien somit recht unspezifische Symptome, die im weiteren Progress durch die anatomische Funktionseinschränkung spezifische Symptome hervorrufen können.

Die klinische Verdachtsdiagnose eines HNSCCs muss **bioptisch gesichert** werden. Dazu ist eine Probe aus dem Primärtumor und/oder einer Lymphknotenmetastase notwendig (Pynnönen *et al.*, 2017). Die Entnahmemethode ist abhängig von der Lokalisation. Etablierter

und in den gängigen nationalen und internationalen Leitlinien empfohlener Standard ist als diagnostischer Schritt eine Panendoskopie zur HNO-diagnostischen Abklärung Malignomverdächtiger, therapierefraktärer Läsionen. Diese dient der Abklärung von synchron oder metachron auftretender Zweitmalignome. Diese treten gehäuft in anatomischer Nachbarschaft auf (z.B. Ösophaguskarzinom und Tonsillenkarzinome oder Larynx- und Bronchialkarzinome) im Sinne einer Feldkanzerisierung. Die Panendoskopie bietet außerdem die Möglichkeit innerhalb einer Sitzung zur bioptischen Probenentnahme und konsekutiven histologischen Sicherung der Diagnose sowie zum *Grading*. Ebenso dient sie der optimierten Ausdehnungsbestimmung des Tumors, um die Resektabilität und die zu wählende chirurgische Technik einschätzen zu können.

Das **histopathologische Bild** ist definiert durch zelluläre Atypien und durch epitheliale Dedifferenzierung. Gut differenzierte Tumore zeigen geschichtetes Epithel mit ausgereiften Zellen. Dedifferenzierte Tumoren zeigen unreife Zellen mit nukleären Pleomorphismen und atypischen Mitosefiguren bei nicht vorhandener Zellschichtung. Allgemein kann man bei HPV-negativen HNSCCs eine bessere Differenzierung erkennen als bei HPV-positiven Tumoren (Pai and Westra, 2009). Normalerweise kann die pathologische Diagnose mit Hilfe einer Hämatoxylin- und Eosin-Färbung mit ausreichender Sicherheit erfolgen. Starke Dedifferenzierung kann die immunhistochemische Anfärbung mit Panzytokeratin-Antikörpern gegen Zytokeratin 5, Zytokeratin 6 und p63 erforderlich machen (Yi, Jim Zhai and Wang, 2017).

Darüber hinaus ist die Testung bezüglich **HPV-Status** bei Oropharynxkarzinomen obligat. Diesbezüglich gibt es mehrere verwendete Techniken, ohne dass bisher in der Literatur ein eindeutiger Konsensus bzgl. der optimalen Methode herrscht. Einerseits kann die direkte Detektion von E6- und E7-mRNA mittels reverser-Transkriptase PCR (RT-PCR) erfolgen, andererseits der HPV-DNA Nachweis mittels PCR oder *in-situ* Hybridisierung (ISH). Den aktuell am weitesten verbreiteten Standard stellt der indirekte Nachweis einer HPV-Infektion durch die immunhistochemische Detektion einer Überexpression von p16^{INK4A} dar (Taberna *et al.*, 2017). Die Inaktivierung von RB durch das virale Protein E7 steigert die funktionelle Expression von p16^{INK4A}, was somit als indirekter Virus-Marker geeignet ist.

Im Rahmen des **Tumor-Stagings** erfolgt die Klassifizierung je nach Ursprung des Primarius. Die Einteilung entspricht dem *Tumor-node-metastasis* System (TMN), wobei die lokale Tumorausdehnung, der Lymphknoten-Befall und Fernmetastasen neben weiteren Faktoren wie dem HPV-Status, Lymph- und Hämangiainvasion berücksichtigt werden. Grundlage der TNM-Klassifizierung sind neben der histopathologischen Untersuchung des Tumorgewebes sog. Staginguntersuchungen, wobei vor allem Schnittbildverfahren wie das Computertomogramm (CT) oder das Magnet-Resonanz-Tomogramm (MRT) zum Einsatz kommen (Pfister *et al.*, 2020). Dabei wird üblicherweise die Schädelbasis bis zur oberen

Thoraxapertur, sowie der Thorax selbst untersucht. Für bereits metastasierte Absiedelungen eignen sich funktionelle Schnittbildverfahren wie das PET-CT. Auch Sonographie spielt zur Beurteilung der Halslymphknoten und der Beurteilung von ggf. vorhandenen Lebermetastasen eine wichtige Rolle.

Therapieprinzipien mit kurativer Intention bei lokoregionär beschränkten Tumoren sind die chirurgische Resektion, Bestrahlung und systemische Chemotherapie. Dabei sollte neben einem onkologisch optimalen Ergebnis (idealerweise komplette Remission bzw. R0-Resektion) der funktionelle Erhalt mitberücksichtigt werden. Bei geringer lymphonodaler Metastasierung ≤ 1 Lymphknoten liegt die Heilungsrate bei einmaliger Intervention bei 80 % (Lee *et al.*, 2018).

Kurativ intendierte radikal chirurgische Operationen bei lokal fortgeschrittenen Tumoren sind aufgrund der komplexen anatomischen Verhältnisse deutlich erschwert und erfordern meist eine zusätzliche adjuvante Radiatio oder Radiochemotherapie (Marur and Forastiere, 2016). Bei nicht-resektablen Tumoren steht als Alternative zu einer primär-chirurgischen Therapie eine primäre Radiochemotherapie zur Verfügung. Bei inkompletter Remission kann eine *Salvage*-Chirurgie erforderlich werden, mit dann deutlich erhöhter Komplikationsrate. Für Nasopharynxkarzinome existiert ein sich von den übrigen HNSCCs unterscheidendes Therapiekonzept mit dem gegenwärtigen Standard einer Induktionschemotherapie gefolgt von einer kombinierten primär-definitiven Radiochemotherapie. Insgesamt geht die für HNSCC-Patienten meist sehr intensive und belastende Therapie oft mit optischer Stigmatisierung, bedingt durch die Tumorresektion, Rekonstruktion und die häufig erforderliche Tracheotomie, sowie mit einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität einher (Jethwa and Khariwala, 2017).

Neuere Therapieansätze umfassen das 2006 eingeführte Medikament Cetuximab, ein EGFR-Antikörper aus dem Bereich der zielgerichteten Therapie (Taberna, Oliva and Mesía, 2019). Dieses kann in Kombination mit einer Radiatio oder im Rahmen einer palliativen Systemtherapie in Form des EXTREME- oder TP-EXTREME-Schemas eingesetzt werden (Taberna, Oliva and Mesía, 2019; Kitamura *et al.*, 2020). Für weit vorangeschrittene, metastasierte oder rekurrende Entitäten gibt es immunmodulatorische Therapiemöglichkeiten durch die PD-1-Antikörper Pembrolizumab und Nivolumab (Cramer, Burtneß and Ferris, 2019). In der Erstlinie ist eine Therapie mit Pembrolizumab, einem PD-1-Rezeptor-Blocker, in der Behandlung von therapienaiven Patienten mit rekurrenten oder metastasierten HNSCCs (R/M HNSCCs) zugelassen. Als Zweitlinien-Therapie kommen Pembrolizumab oder Nivolumab bei platinrefraktären R/M HNSCCs in Frage. Die Schlüsselstudien, die zur Zulassung der Immuncheckpoint-Inhibitoren geführt haben, waren CHECKMATE-141 (Gillison *et al.*, 2018) für Nivolumab als Zweitlinien-Therapie, sowie

KEYNOTE-048 für Pembrolizumab bei PD-L1 positiven Tumoren als Erstlinien-Therapie (Pai *et al.*, 2019).

Eine zu späte Diagnosestellung führt zur Erschwerung der kurativen Behandlungsoptionen und der klinischen Erfolgsrate. Zudem entwickelt die Hälfte aller Patienten im weiteren Verlauf ein Rezidiv. Die 5-Jahres-**Überlebensrate** liegt insgesamt zwischen 40-50 % für Noxen-induzierte, HPV-negative Karzinome (Marur and Forastiere, 2016; Bean *et al.*, 2019). Eine leichte Steigerung der Gesamtüberlebensrate in den letzten Jahren kann im Wesentlichen auf den zunehmenden Anteil von HPV-positiven HNSCCs zurückgeführt werden, die mit einer deutlich besseren Überlebensrate assoziiert sind, wie Abbildung 9 zeigt (Lewis *et al.*, 2015; Wagner *et al.*, 2018). Immunologischen Ansätze konnten für bestimmte Patientengruppen eine deutliche Verbesserung der Prognose erzielen. Insgesamt bietet das Therapieregime allerdings für bereits metastasierte Tumoren wenig neue Ansätze und die Prognose in fortgeschrittenen Stadien ist weiterhin schlecht.

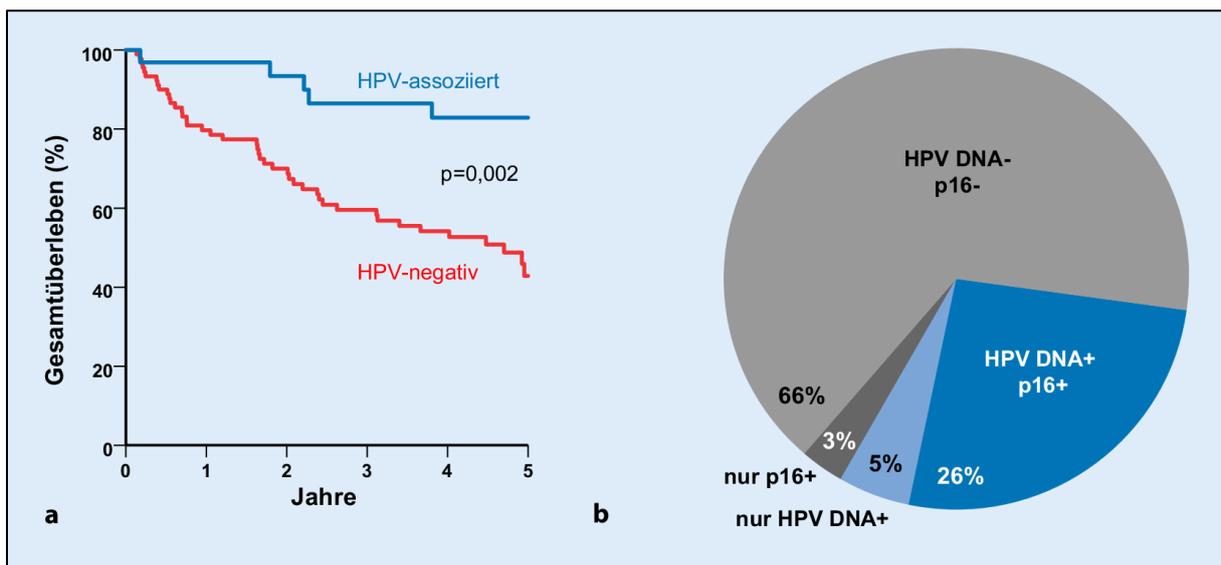


Abbildung 9: Gesamtüberleben von HPV-positiven und HPV-negativen HNSCCs, Verteilungsmuster des HPV-Status

(A) Gesamtüberleben von Patienten, die an einem Pharynxkarzinom erkrankt sind. Ein deutlich signifikanter ($p=0,002$) Unterschied zwischen den Gruppen ist in den 5-Jahres-Endpunkten zu erkennen, bei der HPV-assoziierte Tumore ein Gesamtüberleben von 80 % aufweisen. Noxen-induzierte, HPV-negative HNSCCs weisen mit 40 % Gesamtüberleben nach 5 Jahren eine deutlich schlechtere Prognose auf. **(B)** Dargestellt ist die prozentuale Verteilung des HPV-Status bei Pharynxkarzinomen. HPV-positiv sind lediglich 34 % aller Tumoren. Grafik von (Wagner *et al.*, 2018).

2.2 Vitamin D₃

2.2.1 Stoffwechsel/ Vorkommen/ Versorgungsstatus

Aktiviertes Vitamin D₃ (Calcitriol) zählt zu den fettlöslichen Vitaminen. Es kann vollständig körpereigen produziert werden oder durch die Nahrung als Vorstufe oder bereits wirksames Calcitriol zugeführt werden. Durch die pleiotropischen Effekte, die Vitamin D₃ zur Erhaltung der Gesundheit und vor allem zur Prävention von Krankheiten hat, rückt dieses Vitamin zunehmend in den Fokus der Wissenschaft. Während die Effekte von Calcitriol auf den Knochenstoffwechsel bereits sehr gut und seit vielen Jahrzehnten verstanden sind, ist die Wirksamkeit in anderen Geweben weniger gut beschrieben (Izreig *et al.*, 2020). Dabei ist die Wirkreichweite von Vitamin D₃ deutlich größer und schließt u.a. die Regulation des Immunsystems, des muskuloskelettalen Systems, des kardiovaskulären Systems und des Metabolismus ein (Jeon and Shin, 2018). Auch ein antineoplastischer Wirkmechanismus von Vitamin D₃ konnte in diversen Arbeiten der letzten Jahre beschrieben werden und ist von zunehmendem wissenschaftlichem Interesse (Jeon and Shin, 2018).

Die Vorstufe Cholecalciferol kann über mehrere Syntheseschritte in Haut, Leber und Niere zum funktionellen, aktiven Hormon Calcitriol überführt werden. Vitamin D₃ nimmt hierbei mit seiner hauptsächlich endogenen Synthese durch verschiedene Organsysteme eine Sonderstellung unter den Vitaminen ein. Vitamin D₃ kommt natürlicherweise nur in sehr wenigen Lebensmitteln vor. Dazu gehören fetthaltiger Fisch, Fischleberöle und Eier von Hühnern, die mit Vitamin D₃ gefüttert wurden, sowie einige angereicherte Lebensmittel in Ländern mit entsprechenden Vorschriften durch die Gesundheitsbehörden (Bendik *et al.*, 2014).

Die oben erwähnte doppelte Absicherung einer suffizienten Vitamin D₃-Versorgung einerseits über die Supplementation und andererseits durch die Synthese in Haut, Leber und Niere hebt die enorme physiologische Wichtigkeit dieses Vitamins hervor. Normalerweise stellt die Synthese in der Haut die wichtigste Vitamin D₃-Quelle dar. Der Großteil von Vitamin D₃ wird durch energiereiche UV-B Strahlung der Wellenlänge 290–315 nm (Sonnenlicht Exposition) in der Haut ausgehend von 7-Dehydrocholesterin durch Konversion zu Vitamin D₃ umgewandelt (Bendik *et al.*, 2014). Lediglich ein Bruchteil wird über die Nahrung zugeführt. So ergeben sich aus der UV-B-abhängigen Synthese heraus signifikante Unterschiede der Vitamin D₃-Serumspiegel in Bezug auf die Jahreszeit. In Ländern mit klimatisch bedingter unzureichender Möglichkeit der Sonnenexposition sind die Menschen jedoch auf eine exogene Zufuhr angewiesen (Bendik *et al.*, 2014).

Man unterscheidet grundsätzlich die Hauptformen Cholecalciferol (Vitamin D₃) und Ergocalciferol (Vitamin D₂). Vitamin D₃ stellt die endogen produzierte Form dar (Lehmann *et al.*, 2013) und zeichnet sich durch das Vorkommen in tierischen Produkten aus, während Vitamin D₂ vornehmlich in Pilzen vorkommt. Für beide Vitamin-Hauptformen wird

angenommen, dass die konsekutive molekulare Wirkung identisch ist. Die molekulare Wirksamkeit von Vitamin D₃ ist jedoch stärker.

Der Stoffwechsel von Vitamin D₃ ist sehr komplex und unterliegt diversen Kontrollmechanismen. Nach Produktion in der Haut wird Vitamin D₃ in die Leber transportiert, wo es durch das mikrosomale Enzym *CYP2R1* zu 25-Hydroxy Vitamin D₃ (25-OH Vitamin D₃) umgewandelt wird (Izreig *et al.*, 2020). Dieses Zwischenprodukt wird als Calcidiol bezeichnet und beschreibt die am meisten vorliegende Form von zirkulierendem Vitamin D₃. 25-OH Vitamin D₃ selbst wird zur klinischen Messung zur Bestimmung des Vitamin D₃-Status herangezogen (Bikle, 2016). Calcidiol wird in der Niere durch *CYP27B1* oder 1 α -Hydroxylase zum biologisch stoffwechselaktiven Calcitriol hydroxyliert (Jones, Prosser and Kaufmann, 2014). Dieser Schritt findet hauptsächlich in der Niere statt und ist der wesentliche Effektor für den Serumspiegel von 1,25-Dihydroxycholecalciferol. Erwähnenswert ist jedoch, dass dieser Schritt ebenfalls lokal an diversen Zielzellen außerhalb der Niere stattfindet, um räumlich beschränkte Vitamin D₃-Effekte zu generieren (Carlberg, 2014). Nachgewiesen wurde die Calcitriol-Synthese neben der Niere auch in der Haut, der Prostata, in Keratinozyten und in Tumorzellen (Ness, Miller and Li, 2015).

Parathormon und cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) stimulieren den Schritt der Hydroxylierung, während hohe Calcium- und Phosphat-Spiegel sowie FGF-23 (*Fibroblasten-Growth-factor*) diesen Schritt inhibieren. Das aktivierte Vitamin D₃ zirkuliert Protein-gebunden im Blut zu seinen Zielzellen. Dort bindet es an sein Rezeptormolekül, den zytoplasmatischen Vitamin-D-Rezeptor (VDR). VDR vermittelt auf zellulärer Ebene die Haupteffekte von Calcitriol. Dabei heterodimerisiert der Vitamin D₃ gebundene VDR mit dem Retinoid-X-Rezeptor, wodurch eine nukleäre Translokation erfolgt. Die Effekte von Calcitriol erfolgen dann über den aktivierten VDR als Transkriptionsfaktor, welcher die Expression diverser Zielgene induziert (s. Abbildung 10). Dazu gehört auch *CYP24A1*, ein Gen, welches für das Enzym 24-Hydroxylase in den Zielzellen kodiert. Dieses Enzym vermittelt durch Hydroxylierung an C24 die Inaktivierung und Ausscheidung von Vitamin D₃ im Sinne einer negativen *Feedback* Schleife zur Autoregulation (Jones, Prosser and Kaufmann, 2014). Die entstandenen Produkte 1,24,25-(OH)₂D₃ und 24,25-(OH)₂D₃ werden schließlich über die Gallenflüssigkeit ausgeschieden.

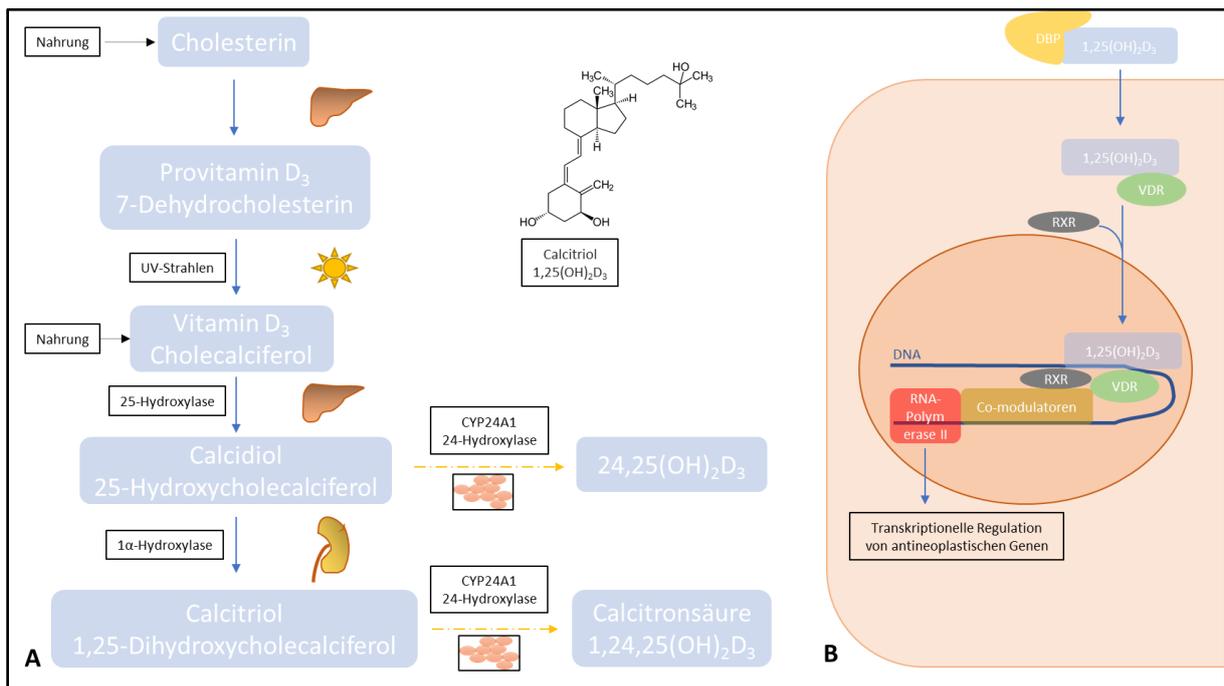


Abbildung 10: (A) Stoffwechsel und (B) genomische Wirkung von Vitamin D₃

Mit Hilfe des Vitamin D₃-Serumspiegels kann man differenzieren, ob ein Individuum eine insuffiziente oder ausreichende Vitamin D₃-Versorgung aufweist. Zur Ermittlung des Serum-Status wird in der klinischen Praxis der 25-OH Vitamin D₃-Serumspiegel herangezogen (Bikle, 2016). Der Grund dafür ist, dass die intravasale Halbwertszeit des stoffwechselaktiven Calcitriols etwa 6 Stunden beträgt. Dagegen besitzt 25-OH Vitamin D₃ eine Halbwertszeit von wenigen Wochen (Dusso, Brown and Slatopolsky, 2005). Calcitriol unterliegt einer strengen Regulation durch diverse Mechanismen. Hierdurch kann ein manifester Vitamin D₃-Mangel fälschlicherweise maskiert werden. Dies lässt sich u.a. dadurch erklären, dass bei wenig aktivem Vitamin D₃ die intestinale Calcium-Resorption verringert ist. Damit sinkt konsekutiv das Serumcalcium. Über den calciumsensitiven Rezeptor (CASR) der Nebenschilddrüsen wird daraufhin vermehrt Parathormon produziert, was kurzfristig die 1α-Hydroxylase-Aktivität der Niere steigert. Es kommt kurzfristig zu einem kompensatorischen Calcitriol Anstieg, obwohl eine Unterversorgung mit Vitamin D₃ vorliegt. 25-OH Vitamin D₃ entspricht folglich einer Speicherform und somit repräsentiert es die längerfristige Körperversorgung mit Vitamin D₃ (Holick, 2009).

2.2.2 Bedeutung von Vitamin D₃ bei Tumorerkrankungen

Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass geografische Regionen mit geringer Sonneneinstrahlung mit einer erhöhten Krebsinzidenz und Gesamt mortalität korreliert sind

(Giovannucci *et al.*, 2006). Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass Vitamin D₃ antineoplastische Effekte zuzuschreiben sind (Izreig *et al.*, 2020).

Vitamin D₃ entfaltet seine genomischen Effekte über die Bindung an den VDR und dessen nukleäre Translokation. Durch Induktionsprozesse als aktivierter Transkriptionsfaktor fördert Calcitriol die Expression diverser Komponenten antineoplastisch wirksamer Stoffwechselwege. Epidemiologische Daten zeigen, dass hohe Serumlevel von Vitamin D₃ stark assoziiert sind mit einer Risikoreduktion der Progression von diversen Tumoren. Dazu zählen Blasen-, Brust-, Colorektaler-, Magen-, Ovarial-, Nieren-, Hämatoonkologischer-, Lungen-, Prostata-, Pankreas-, Leber-, Haut-Krebs und auch HNSCCs (Fathi *et al.*, 2019).

Zu den Mechanismen, durch die Vitamin D₃ vor Karzinogenese schützen kann, zählen neben antiproliferativen Effekten auch die Hemmung von Überlebenssignalen, die Förderung von Apoptose, die Begrenzung von DNA-Schäden in Folge der Bindung reaktiver Sauerstoffspezies und eine antiinflammatorische Aktivität (Feldman *et al.*, 2014). Calcitriol induziert die Expression der CDK-Inhibitoren p21 und p27 und stabilisiert dadurch den E2F-RB-Komplex und erzielt damit eine Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase (Samuel and Sitrin, 2008). *In vitro* durchgeführte Versuche mit Brustkrebszellen konnten nach Vitamin D₃-Behandlung eine gesteigerte p53-Expression nachweisen (Swami *et al.*, 2003). Vitamin D₃ antagonisiert auch den PI3K/AKT/mTOR-Weg durch die Hochregulation der Phosphatase PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*), die als Tumorsuppressor dient (Pan *et al.*, 2010). Bezüglich des Zellüberlebens fördert Vitamin D₃ die Hochregulation pro-apoptotisch wirksamer Moleküle wie Bax, Bak und Bad bei gleichzeitiger Hemmung anti-apoptotisch wirksamer Faktoren wie Bcl-2 und Bcl-XL (Díaz *et al.*, 2000).

ROS (reaktive Sauerstoffspezies) vermitteln unter physiologischen Umständen das Gleichgewicht zwischen Zellüberleben und Zelltod. Dabei fungieren sie als sekundärer Botenstoff. Zellen mit erhöhter Exposition gegenüber oxidativem Stress regulieren dabei protektive antioxidative Schutzmechanismen hoch, um die oxidative Schädigung der DNA zu minimieren. Im Rahmen einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von Vitamin D₃-Präparaten oxidativ bedingte Schädigungen der DNA in kolorektaler Schleimhaut reduziert (Fedirko *et al.*, 2010). Analog dazu zeigte sich bei Mäusen ohne VDR in der kolorektalen Schleimhaut eine erhöhte oxidativ bedingte DNA-Schädigung (Kállay *et al.*, 2002). Die Hauptwirkung zur Reduktion von oxidativem Stress durch Vitamin D₃ könnte durch die Transkription von NRF2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), einem Transkriptionsfaktor, der antioxidativ wirksame Proteine codiert, begründet sein (Gold *et al.*, 2012). Darüber hinaus findet eine gesteigerte Expression protektiver Moleküle wie Thioredoxin, welches Disulfidbrücken reduziert, oder Superoxiddismutase 2, welche mitochondriale ROS in H₂O₂ und O₂ reduziert, statt (Bao *et al.*, 2008). Daraus lässt sich schließen, dass Vitamin D₃ protektiv gegenüber oxidativer DNA-Schädigung wirkt.

Vitamin D₃ besitzt darüber hinaus immunmodulatorische Eigenschaften. Immunzellen aller Abstammungslinien exprimieren zu einem bestimmten Zeitpunkt ihrer Reifung VDR (Hewison, 2011). Es wurden mehrere Mechanismen beschrieben, auf welche Weise Vitamin D₃ antiinflammatorisch wirksam ist. Einerseits konnte eine Unterdrückung der Prostaglandinsynthese durch die Inhibition von COX2 (Cyclooxygenase 2) nachgewiesen werden. Eine inverse Korrelation zwischen VDR und COX2 fand sich in malignen Prostata-, Ovarial- und Mammakarzinomen (Cordes *et al.*, 2012). Der aktivierte VDR ist ebenfalls dazu in der Lage die nukleare Translokation von NF-κB, sowie die Transkription von proinflammatorischer IL-6-mRNA und TNF-α zu inhibieren (Chen *et al.*, 2013). Gleichzeitig erfolgt eine Steigerung der Expression von PD-L1 (Dimitrov *et al.*, 2017). Die eindeutige Wirkung von Vitamin D₃ bezüglich seiner antiinflammatorischen Wirkweise bleibt Gegenstand aktueller Forschung. In einigen Tumoren der Schilddrüse und der Niere konnte sogar eine erhöhte Vitamin D₃-Produktion durch *CYP27B1* nachgewiesen werden, was die Immuntoleranz in diesen Tumoren durchaus fördern könnte (Blomberg Jensen *et al.*, 2010). VDR ist in einer Vielzahl von verschiedenen Zellen exprimiert, darunter auch in vielen Tumorentitäten. Während der dysplastischen Dedifferenzierung des Karzinoms kommt es auch zu einer Minderung der VDR-Expression in Brust-, Ovarial-, und Prostatakarzinomen (Clinckspoor *et al.*, 2012). Zudem konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Nicht-Kleinzelligen-Lungenkarzinomen (NSCLC), mit hohen VDR-Expressionsmustern eine verbesserte Gesamtüberlebenschance verglichen mit Patienten mit niedrigen VDR-Expressionsraten hatten (Srinivasan *et al.*, 2011). Darüber hinaus scheint der lokale Vitamin D₃-Metabolismus innerhalb des Tumors ebenfalls eine relevante Rolle zu spielen. Es konnte eine Herunterregulation von *CYP27B1* beobachtet werden, wodurch weniger Calcitriol in Darm-, Prostata- und Hautkrebs produziert wurde (Matusiak and Benya, 2007). Umgekehrt fand man in einigen Tumoren erhöhte Expressionsmuster von *CYP24A1*, welches für die lokale Vitamin D₃-Inaktivierung zuständig ist (Horváth *et al.*, 2010). Es wird deutlich, dass Vitamin D₃ einen relevanten Einfluss auf die Tumorbilogie hat. Viele Tumore mindern daher die VDR-Expression und/oder umgehen den Vitamin D₃-Einfluss durch den vermehrten lokalen Abbau über *CYP24A1*.

Neben den molekularbiologischen Effekten konnte durch die Gabe von Vitamin D₃ in *in vivo* Versuchen die Ansprechrate auf eine Strahlentherapie in Mamma- und Lungenkarzinomen erhöht werden (Wilson *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2014).

In weiteren Studien konnte eine Korrelation von niedrigen Vitamin D₃-Serumspiegeln und dem erhöhten Risiko, kolorektalen- oder Brustkrebs zu entwickeln, beobachtet werden (Maalmi *et al.*, 2014). In großangelegten Folgeversuchen wurden daher Placebo-kontrollierte, randomisierte Studien zu einer Vitamin D₃-Supplementation durchgeführt. Es konnte jedoch keine signifikante Risikoreduktion bezüglich der Inzidenz von invasivem Krebs jeglicher Art

entdeckt werden (Manson *et al.*, 2019). Im Gegensatz dazu steht, dass in anderen Studien belegt wurde, dass niedrige Vitamin D₃-Serumlevel mit dem Risiko ein kolorektales Karzinom zu entwickeln einhergeht. Dieser Effekt wurde vornehmlich für Frauen nachgewiesen (McCullough *et al.*, 2019). Eine andere Metaanalyse konnte eine Korrelation eines erniedrigten Vitamin D₃-Serumlevel mit einem erhöhten Risiko an Krebs zu erkranken eruieren (Han *et al.*, 2019). Passend zu diesem Ergebnis der Studie konnte in einem weiteren *Review* eine Assoziation zwischen der Vitamin D₃-Substitution und erniedrigter Mortalität von Krebspatienten aufgestellt werden (Kanellopoulou *et al.*, 2021). Die letztendliche Effektivität von Vitamin D₃ bezüglich der Krebsprävention oder Krebsprogression bleibt durch die widersprüchlichen Ergebnisse weiterhin offen. Durch die Vielzahl der protektiven Mechanismen bleibt aber eine potenzielle antineoplastische Wirkweise von Vitamin D₃ zu erwarten. In diesem Kontext konnte die großangelegte, hochrangig publizierte Metaanalyse von Vaughan-Shaw *et al.*, 2017, bei insgesamt 44.165 humanen Tumorpatienten aus 64 Studien zeigen, dass höhere 25-OH Vitamin D₃-Serumspiegel mit einem besseren Gesamtüberleben und einem progressionsfreien Überleben assoziiert waren.

Im Rahmen der Dissertation werden auf molekularer Ebene die Effekte einer Vitamin D₃-Behandlung mittels RNA-Sequenzierung untersucht. Vor dem Hintergrund der pleiotropischen Effekte werden an dieser Stelle die onkologisch relevanten Effekte in groben Zügen in Abbildung 11 zusammenfassend dargestellt. Einige der molekularen Mechanismen werden im Gesamtkontext der Diskussion aufgegriffen.

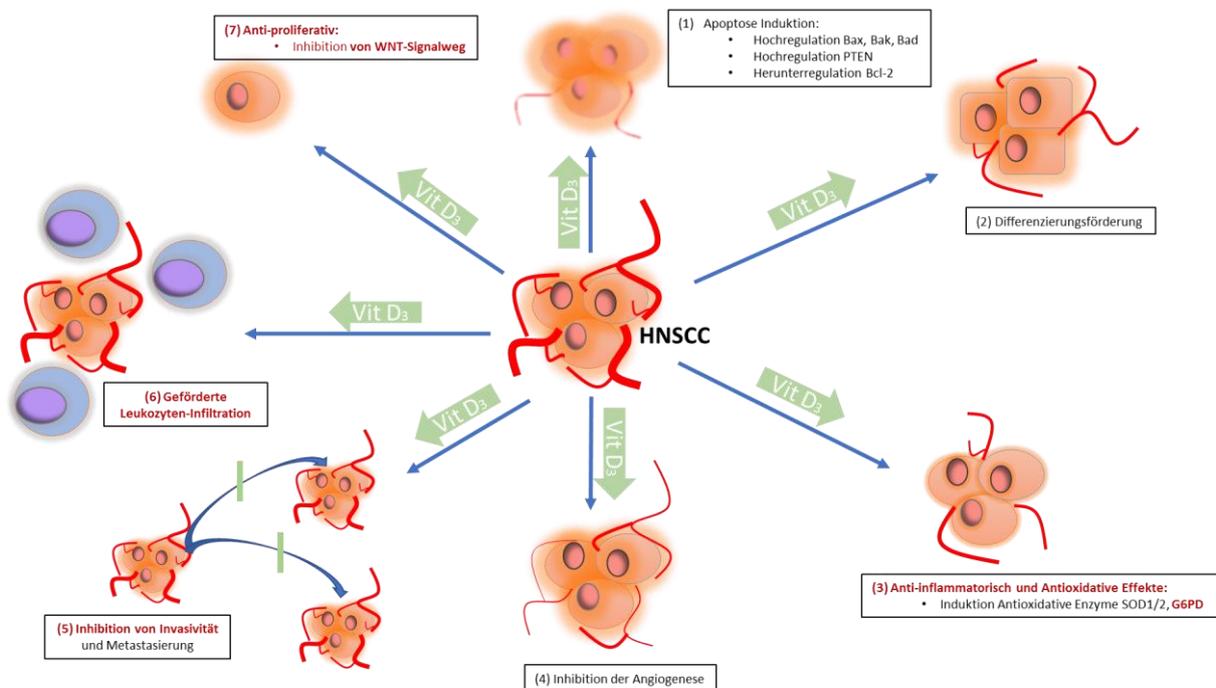


Abbildung 11: Antineoplastische Wirkmechanismen von Vitamin D₃

Für Vitamin D₃ wurde in diversen Studien antineoplastische Wirkungen beschrieben: (1) Apoptosevermittelnde Prozesse, (2) Differenzierungsförderung des entdifferenzierten Tumors, (3) anti-

inflammatorische Effekte, (4) Inhibition der Angiogenese, (5) Verringerung der Invasivität und Metastasierung, (6) geförderte Leukozyten-Infiltration in die Mikroumgebung des Tumors und (7) anti-proliferative Effekte. **Rot** markierte Prozesse werden in unserer Arbeit nachgewiesen.

2.2.3 Bedeutung von Vitamin D₃ in der Karzinogenese von HNSCCs

Die pleiotropischen antineoplastischen und immunmodulierenden Wirkweisen von Vitamin D₃ im Kontext von HNSCCs sind vielfach *in vitro* beschrieben. Die Behandlung von oralen Plattenepithelzellkarzinomlinien mit Vitamin D₃ konnte bereits in der Arbeit von Enepekides et al., 1999 eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation zeigen. Zudem scheint eine Vitamin D₃-Behandlung die Expression mehrerer Zellzyklus-Checkpoint-Inhibitoren sowie von p21, p18 und p27 zu steigern (Hager et al., 2001). Darüber hinaus kann die Behandlung mit Vitamin D₃ eine TERT (Telomerasekomplex) Expression *in vitro* reduzieren (Chiang et al., 2013). Weiterhin werden differenzierungsfördernde und genetisch stabilisierende Mechanismen sowie DNA-Reparatur Mechanismen durch Vitamin D₃ beobachtet (Chiang et al., 2013). Zudem wird eine Inhibition der Invasivität und Metastasierung erreicht (Yang et al., 2016).

Wie oben bereits erwähnt zählen HPV-induzierte als auch Noxen-induzierte HNSCCs zu den am stärksten immuninfiltrierten Tumoren (Cillo et al., 2020). Bestimmte immunologische Infiltrationsmuster sind dabei mit einem verbesserten Überleben assoziiert (de Ruiter et al., 2017). Damit stellen HNSCCs eine vielversprechende Entität für immunonkologische Behandlungsansätze dar.

In vitro Untersuchungen konnten zeigen, dass die gegen HNSCCs gerichtete Immunaktivität deutlich von einem ausreichenden Vitamin D₃-Spiegel abhängig ist (Vaughan-Shaw et al., 2017). In diesem Kontext zeigte sich, dass HNSCCs eine lokale Immundysfunktion und eine entzündliche TME erzeugen, die Malignität und Invasivität der Tumoren begünstigen (Nasser and St John, 2018). Klinische Studien konnten zeigen, dass die Effektivität der antitumoralen Immunantwort auf HNSCCs kritisch mit der 25-OH Vitamin D₃-Serumkonzentration korreliert. Dabei zeigte sich, dass das Tumorstroma immunsuppressive MDSCs anreicherte (Almand et al., 2001). Insgesamt zeigte sich, dass HNSCC-Patienten mit einem höheren zirkulierenden Vitamin D₃-Serumspiegel verstärkte CD4+ T-Zellen-, CD8+ T-Zellen-, Natürliche Killerzellen- und M1-Makrophagen-Infiltrationen im tumoralen und peritumoralen Stroma besaßen (Bochen et al., 2018). Das Gesamtüberleben und die Prognose korrelierte ebenfalls mit der Vitamin D₃-Serumkonzentration und zeigte eine Verbesserung der Prognose durch erhöhte 25-OH Vitamin D₃-Serumspiegel (Bochen et al., 2018). In weiteren Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Mehrzahl der HNSCC-Patienten einen Vitamin D₃-Mangel aufweist (Orell-Kotikangas et al., 2012; Bochen et al., 2018). Auch gab es Hinweise auf eine insgesamt schlechtere Prognose und ein erhöhtes Risiko zu einem Rezidiv bei einem erniedrigten Vitamin D₃-Serumlevel (Gugatschka et al., 2011).

Einleitung und aktueller Stand der Forschung

In der klinischen Praxis beobachtet man häufig einen reduzierten BMI assoziiert mit einer Mangelernährung bei HNSCC-Patienten. Diese Effekte können durch eine behandlungsbedingte Mukositis aggraviert werden. Patienten mit Mukositis entwickeln mit einer signifikant erhöhten Wahrscheinlichkeit einen Muskelschwund, was mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Klinische Daten konnten zeigen, dass sich bei HNSCC-Patienten mit Mukositis durch eine Vitamin D₃-Supplementation die mukokutane Integrität verbesserte (Nejatinamini *et al.*, 2018).

Eine weitere Studie zeigte im Rahmen einer Rezidiv-Situation, dass Patienten mit niedriger oraler Zufuhr von Vitamin D₃ das höchste Risiko für das Wiederauftreten ihres Tumors aufweisen. Zum Vergleich wurden Patienten mit hoher oraler Aufnahme von Vitamin D₃ herangezogen. Die Aufnahmemengen wurden mit Hilfe eines Fragebogens quantifiziert (Yokosawa *et al.*, 2018).

Mehrere Studien der vergangenen Jahre legen nahe, dass genetische Variationen des VDR mit unterschiedlichen Metabolisierungsraten von Vitamin D₃ einhergehen. In der Folge verändert sich das Risikoprofil der Patienten bezüglich der Entwicklung und Progression von HNSCCs. Patienten, die den VDR FokI T/T Genotyp tragen besitzen eine verminderte Aktivität des VDR-Komplexes, was in einer kürzeren progressionsfreien Überlebenszeit resultiert (Hama *et al.*, 2011). Für andere den Vitamin D₃-Metabolismus betreffenden Gene wie *CYP2R1* und *CYP24A1* konnte eine ähnliche Korrelation beobachtet werden (Zeljic *et al.*, 2012). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass prognostische Marker durch die intrinsischen Unterschiede innerhalb der Metabolisierung identifiziert werden könnten. Für exakte Aussagen müssten allerdings weitere klinische Untersuchungen durchgeführt und größere Patientenkollektive analysiert werden.

Innerhalb der histologischen Progression ausgehend von normalem Plattenepithel über Dysplasie zu einem *Carcinoma in situ* konnten unterschiedliche Expressionslevel von VDR nachgewiesen werden. Auffällig war, dass alle Tumoren eine erhöhte VDR-Expression aufwiesen (Anand *et al.*, 2017). Frühe präkanzeröse Läsionen exprimierten dabei größere Mengen an VDR als invasive Karzinome (Grimm *et al.*, 2015). Die Effektivität einer Vitamin D₃-Behandlung könnte also abhängig von dem jeweiligen Tumorentwicklungsstadium sein.

In einer Versuchsreihe der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. M. Linxweiler an der Klinik für HNO-Heilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes wurde der Einfluss von Vitamin D₃ auf die Proliferation und Migration von HNSCC-Zellen in zahlreichen Versuchen analysiert. Dabei wurden Hypopharynxkarzinomzellen der FaDu-Zelllinie mit verschiedenen 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Konzentrationen inkubiert und deren Proliferations- und Migrationsverhalten in verschiedenen Assays untersucht. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der Migration und Proliferation. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 zusammengefasst

(Ergebnisse bisher nicht publiziert). Diese Daten stellen die Grundlage der Migrations- und Proliferationsversuche im Rahmen dieser Dissertation dar.

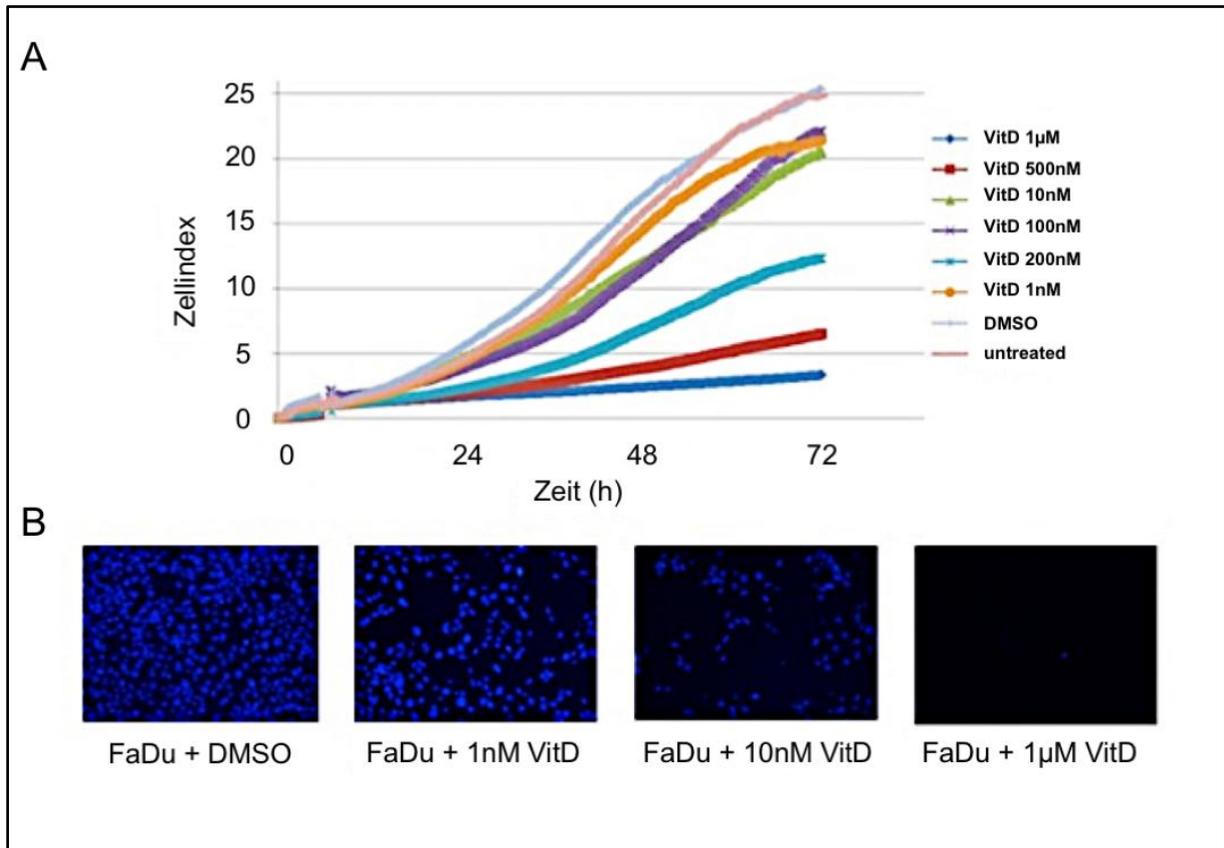


Abbildung 12: Proliferations- und migrationshemmender Effekt von 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃ *in vitro*
(A) Dosisabhängige Hemmung der Proliferation von FaDu-Zellen durch Vitamin D₃ im xCellLigence real-time Proliferationsassay. Als Parameter des Zellwachstums wird der einheitslose Zellindex angegeben.
(B) Dosisabhängige Hemmung der Migration von FaDu-Zellen durch Vitamin D₃ im FluoroBlok Transwell Migrationsassay. Die Kerne der nach einem Zeitraum von 72 Stunden durch die Poren einer fluoreszenzichten Membran migrierten Zellen sind mit DAPI blau gefärbt. Die Daten wurden durch Prof. Dr. Linxweiler generiert und sind nicht veröffentlicht.

2.3 Klinische Relevanz des bearbeiteten Themas

HNSCCs zählen zu den häufigsten Krebsarten, die Prognose in fortgeschrittenen Stadien ist nach wie vor schlecht und aus therapeutischer Sicht gab es mit Ausnahme der Einführung von Cetuximab, Pembrolizumab und Nivolumab bei fortgeschrittenen Tumorerkrankungen kaum relevante Erweiterungen des Therapieregimes in den zurückliegenden Jahrzehnten (Ghanizada *et al.*, 2019).

Die starke Immuninfiltration der Tumore lässt darauf schließen, dass HNSCCs eine vielversprechende Tumorentität zielgerichteter Immuntherapien sein könnten. Die aktuellen Studien immunonkologischer Behandlungsversuche zeigen jedoch lediglich ein mäßiges Ansprechen (Burtneß *et al.*, 2019).

Die TME ist maßgeblich an Tumorinitiation, Tumorprogression und Invasivität einiger maligner Tumoren beteiligt und spielt eine signifikante Rolle in Bezug auf das Therapieversagen der

Immuntherapien. Einige Zellpopulationen supprimieren über verschiedene Mechanismen die lokale antineoplastische Immunreaktion gegen den Tumor. Vor diesem Hintergrund sind **Immunescape-Mechanismen** Gegenstand aktueller Forschung geworden.

Zukünftig gilt es also diese Mechanismen genau zu verstehen, therapeutisch diese *Escape*-Mechanismen, die immunsuppressive Mikroumgebung sowie Resistenzen gegen etablierte Immuncheckpoint-Inhibitoren zu umgehen und eine gezielte immunonkologische und ggf. personalisierte Therapie zu etablieren (Economopoulou, Kotsantis and Psyri, 2020). Dabei gilt es prognoseverbessernde Eigenschaften bei gleichzeitiger Verringerung des Nebenwirkungsprofils zu erreichen.

Auf dieser Grundlage basiert die Idee der Verwendung von Vitamin D₃ im Kontext der onkologischen Immuntherapie von HNSCC-Patienten. Im Rahmen einer zunehmend personalisierten Therapie könnten die vielfach beschriebenen und zitierten antitumoralen und immunmodulierenden Wirkungsweisen von Vitamin D₃ eine Rolle in der medikamentösen Therapie von Kopf-Hals Tumoren einnehmen.

2.4 Stand der Wissenschaft und aktuelle Evidenzlücken

In diversen Studien konnte *in vitro* eine antitumorale Aktivität für Vitamin D₃ nachgewiesen werden. In welchem Umfang sich diese Ergebnisse auf den immunkompetenten Gesamtorganismus übertragen lassen, bleibt jedoch zunächst ungeklärt.

Zur Beantwortung der Frage, ob und welchen Nutzen die Behandlung mit Vitamin D₃ auf die Tumorinitiation und das Tumorwachstum im immunkompetenten Organismus hat, gibt es nur wenige ausgewählte Studien, die diese Wissenslücke behandeln:

Meier et al. konnten 2007 in einem oralen Krebs-Modell im Hamster durch die Vitamin D₃-Behandlung einen protektiven Effekt gegen orale Plattenepithelzellkarzinome nachweisen (Meier *et al.*, 2007). Innerhalb der Studie entwickelte lediglich ein Hamster von insgesamt 10 mit intraperitonealer (i.p.) Vitamin D₃-Behandlung ein histologisch nachweisbares Plattenepithelzellkarzinom. In der Kontrollgruppe konnte die Karzinominduktion bei 7 von 10 Tieren nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei jedoch um sehr kleine Tierzahlen. Zudem gab es keine Folgeversuche, die weitere Applikationsformen untersucht haben. Weiterhin zeigen die induzierten Tumore im Hamstermodell deutliche Unterschiede in der Mutationssignatur im Vergleich zu humanen HNSCCs. Ebenfalls weisen die Tumoren ausgedehnte Nekrose-Areale auf, sodass die Repräsentativität durch die genannten Punkte stark eingeschränkt ist. Bezüglich einer repräsentativen Tumor-Mutationssignatur im Tiermodell eignet sich die orale Tumorinduktion mit 4NQO im C57BL/6NRj-Mausmodell.

Bezüglich der Studienlage zu Untersuchungen der oralen Karzinogenese am immunkompetenten 4NQO-C57BL/6NRj-Mausmodell, das auch in dieser Arbeit verwendet wurde (Details s. Material und Methoden), gibt es bisher lediglich zwei veröffentlichte Arbeiten:

In einer Studie wurden 4 bis 6 Tiere pro Gruppe entweder mit Placebo oder 0,1 µg Vitamin D₃ i.p. 3 x pro Woche für unterschiedlich lange Zeiträume behandelt (Vincent-Chong et al., 2019). Es zeigte sich dabei kein Unterschied in der Tumorinduktionsrate zwischen der Kontrollgruppe und der Verumgruppe. Das Immunzellinfiltrat der Tumoren wurde nicht untersucht. In einem vergleichbaren Versuchsansatz und in dem gleichen Mausmodell untersuchten Verma et al. den Effekt der oralen Vitamin D₃-Supplementation in Bezug auf die Tumorinitiation und Tumorprogression. Beobachtet werden konnte dabei eine tendenzielle Inhibition der Tumorinduktion bei mäßiger Substitution, jedoch eine Stimulation der Tumorinduktion bei hoher Vitamin D₃-Substitution (Verma *et al.*, 2020). Durch die kleine Gruppengröße konnte jedoch keine statistische Signifikanz erreicht werden. Zudem wurden im Immunzellinfiltrat lediglich CD3+ Zellen untersucht, die je nach Vitamin D₃-Konzentration teils vermehrt und teils vermindert vorlagen. Auch diese Studie scheint aufgrund geringer Tierzahlen und widersprüchlicher Ergebnisse eine geringe Generalisierbarkeit zu besitzen.

In der Summe scheint es somit wenige aussagekräftigen Studien bezüglich der Effekte von Vitamin D₃ im immunkompetenten Organismus auf die Tumorinduktion und -progression sowie auf die antitumorale Aktivität des Immunsystems bei HNSCCs zu geben. Zu einer definitiven Aussage über antiproliferative und immunmodulatorische Effekte von Vitamin D₃ im Rahmen von HNSCCs bedarf es weiterer valider und methodisch gut geplanter Studien.

Genau diese beschriebene Wissenslücke adressiert diese Dissertationsarbeit in einem experimentellen Ansatz am immunkompetenten Mausmodell.

Übergeordnetes Ziel war es, auf der Grundlage eines besseren Verständnisses der molekularen Signalwege und der Effekte von Vitamin D₃ *in vivo*, Ansatzpunkte für eine Optimierung der Ansprechraten der Immuntherapie bei Kopf-Hals-Karzinomen und potenzielle neue *Targets* einer immunonkologischen Therapie zu identifizieren.

2.5 Fragestellungen

Die beschriebenen Wirkweisen von Vitamin D₃ und die aktuelle Studiensituation münden in die Formulierung der folgenden Fragestellungen:

- I. *Welchen Einfluss hat Vitamin D₃ auf die molekularen Signalwege von HNSCC-Zellen in vitro?*
- II. *Hat Vitamin D₃ einen direkten Einfluss auf die Entstehung und die Progression von HNSCCs im immunkompetenten 4NQO-C57BL/6NRj murinen HNSCC-Modell?*
- III. *Kann Vitamin D₃ im o.g. Mausmodell eine antitumorale Aktivität des Immunsystems stimulieren?*

3. Materialien und Methoden

Die Dissertationsarbeit gliedert sich in zwei große Projektabschnitte: In **Projektabschnitt 1** werden Zellkulturversuche mit anschließenden Analyseverfahren durchgeführt, in **Projektabschnitt 2** folgt ein tierexperimenteller Versuchsteil.

Im Rahmen der Zellkulturversuche wurde der Einfluss von Vitamin D₃ auf die molekularen Prozesse in HNSCC-Zellen *in vitro* basierend auf einer RNA-Sequenzierung sowie auf Proliferations- und Migrationsassays untersucht. Zu diesem Zweck erfolgte eine Vitamin D₃-Behandlung von Kopf-Hals Karzinomzelllinien. In Vorversuchen wurde zunächst eine interne Behandlungsvalidierung durch das Western-Blot Verfahren bestätigt.

Der tierexperimentelle Projektabschnitt diente der Untersuchung der antineoplastischen Wirkweisen von Vitamin D₃ in einem immunkompetenten Mausmodell. Dabei wurden die Tumorinduktion, das Tumorwachstum und die potenzielle Stimulation der antitumoralen Immunaktivität mittels klinischer Evaluation, Serumuntersuchungen und anschließender immunhistochemischer Darstellung untersucht. Die Tierversuche ließen sich wiederum in einen Vorversuch und in einen Hauptversuch von jeweils 22 Wochen Versuchsdauer untergliedern. Im Vorversuch wurden verschiedene Konzentrationen von Vitamin D₃ oral substituiert, um zu beobachten, ob Verträglichkeitsprobleme und mögliche systemische Toxizität bei den verschiedenen getesteten Konzentrationen vorlagen. Im Hauptversuch wurde mit Hilfe der zuvor bestimmten Vitamin D₃-Futterkonzentrationen das weiter unten beschriebene orale 4NQO-Karzinogenese-Modell an immunkompetenten Mäusen durchgeführt.

3.1 Zellkulturversuche

In den nachfolgenden Tabellen sind die in Projektabschnitt 1 verwendeten Chemikalien, deren Herkunft sowie die verwendeten Geräte und deren Hersteller aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben

Benötigte Chemikalien	Hersteller/Herkunft
1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ , Art. D1530-1MG	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid, Art. D2650-100ML	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) GlutaMAX™, Art. 31966047	GIBCO® Life Technologies, Darmstadt
fötales Kälberserum (FCS), Art. F7524	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Penicillin/Streptomycin, Art. P3444-100ML	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Materialien und Methoden

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,4, Art. 10010023	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA
Trypan Blau, Art. T10282	Invitrogen™ Life Technologies, Darmstadt
Trypsin (0,25 %)/EDTA (0,2 %), Art. T4049	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 2: Verwendete Utensilien und Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben

Beschreibung	Hersteller/Herkunft
CELLSTAR TC, K75, Art. 658175	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Durchlichtmikroskop, 4316184	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Forma™ Series II 3110 CO2-Inkubatoren	Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA
LUNATM Cell Counting Slides L12001	Logos Biosystems, Annandale, VA, USA
LUNA™ Automated Cell Counter L10001	Logos Biosystems, Annandale, VA, USA
OneTouch Pipettenspitzen (20 µl), Art. 10320	Sorenson Bioscience, Inc. Murray, UT; USA
Pasteurpipetten, Art. 9250201	Hirschmann, Eberstadt
Pipetman M P100, M P1200, Art. F81042, F81045	Gilson, Inc., Middleton, WI, USA
Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml, 15ml, 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht
SafeSeal SurPhob Pipettenspitzen (1000 µl, 200 µL), Art. VT0260, VT0230	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Serologische Pipetten (25 ml, 10 ml, 5 ml), Art. 20010106, 20010105, 20010104	Sarstedt, Nümbrecht
Transferpette® (1000 µl, 100 µl, 10 µl), Art. 704780, 704774, 704770	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Wasserbad, Medax Typ WB24	Medax Nagel GmbH, Kiel
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg

3.1.1 Kultivierung der UM-SCC1-Zelllinie

Die HNSCC-Zelllinie UM-SCC1 wurde kultiviert und anschließend funktionell analysiert genommen. Zur Kultivierung der Zellen wurde DMEM-Medium mit 10 % (V/V) Fötalis-Kälberserum und 1 % (V/V) Penicillin/Streptomycin verwendet. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden hierfür 30 s in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Im Anschluss wurden

die Zellen mit jeweils 5 ml des oben genannten Standard-Kulturmediums, das zuvor ebenfalls auf 37 °C vorgewärmt wurde, versetzt. Die Zellen wurden zunächst vorsichtig resuspendiert und anschließend für 4 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Der zurückbleibende Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Das durch die Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde dann erneut mit 10 ml des Standard-Kulturmediums resuspendiert. Die vereinzelt Zellen wurden anschließend in eine Zellkulturflasche mit 75 cm² Zellwachstumsfläche überführt.

Die Zellkultivierung erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Luftgehalt. Im weiteren Verlauf wurden die Kulturen in Abhängigkeit der Zelldichte und Vitalität nach dem entsprechenden Bedarf einem Ausdünnungsprozess (sog. „Splitting“) unterzogen. Dabei wurde initial das Kulturmedium abgesaugt und die adhärennten Zellen mit 4 ml PBS-Puffer gewaschen, um FKS-Reste zu entfernen, die den Ablöse-Prozess potenziell stören könnten. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 1 ml Trypsin (0,25 %)/EDTA (0,2 %). Hiermit wurden die Adhärenzen der Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflasche enzymatisch abgelöst, indem sie für 7-10 min im Brutschrank inkubiert wurden. Im Folgeschritt wurde die Reaktion durch Hinzugabe von 4 ml Kulturmedium abgestoppt. Durch gründliches Resuspendieren des Zellgemisches konnten Zellakkumulationen aufgelöst und die Zellen vereinzelt werden. Die entsprechende Zellmenge, welche grob zu Beginn des Prozesses anhand der Zell-Konfluenz im Lichtmikroskop abgeschätzt werden konnte, wurde je nach erforderlichem Splitverhältnis zurück in die Zellkulturflasche überführt und anschließend mit neuem Kulturmedium auf etwa 15 ml Gesamtflüssigkeitsvolumen aufgefüllt. Schließlich erfolgte die weitere Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂- Luftgehalt im Brutschrank.

3.1.2 Ermittlung der Zellzahlen mithilfe des LUNA™ Automated Cell Counter L10001

Um genaue Zellzahlen bei den verschiedenen Zellkulturexperimenten zu ermitteln, wurde der LUNA™ Automated Cell Counter L10001 verwendet. Dabei wurden neben quantitativen Daten wie der Anzahl lebender Zellen, toter Zellen und der Gesamtzellzahl auch qualitative Daten der Zellen wie deren prozentuale Vitalität ermittelt. Hierzu wurden 10 µL Zellsuspension mit 10 µL Trypanblau im Verhältnis 1:1 vermischt. Anschließend wurden 10 µl des Gemischs in die jeweiligen Zählkammern geladen und die automatisierte Zählung gestartet.

3.1.3 Vorversuch: Ermittlung der optimalen Menge der auszusäenden Zellen

Vor dem Start der Hauptzellkulturversuche wurden die verwendeten Zellen für 10-14 Tage in Kultur gehalten, sodass sich die physiologischen Prozesse in den Zellen nach dem Auftauen normalisieren konnten. Die Zellen wurden maximal über 6 Wochen in Kultur gehalten, um vergleichbare Ausgangsbedingungen des Zellmetabolismus zu simulieren. Bei Überschreiten dieser zeitlichen Schwelle wurde zur Durchführung der Versuche ein neues kryokonserviertes

Aliquot der UM-SCC1-Zellen aufgetaut und in Kultur genommen. Zu Beginn wurde jeweils eine 75 cm² Kulturflasche mit jeweils 5x10⁵ und 1x10⁶ UM-SCC1-Zellen ausgesät. Bei täglichem Mediumwechsel, einschließlich 0,1 % DMSO Mock-Lösung, zeigte sich nach 96 Stunden ein entsprechend der zuvor ausgesäten Zellzahl konfluenter Zellrasen. Von Relevanz für die zu wählende Zellzahl waren die Konfluenz und die Vitalität der Zellen. Es wurde demnach eine Zellzahl zur Aussaat bestimmt, die nach 96-stündiger Behandlung ca. 90 % Konfluenz aufwies und die Zellen damit nicht in eine konkurrierende Stoffwechselsituation um Nährstoffe, Platz und Sauerstoff brachte.

Es zeigte sich, dass bei einer Zellaussaat von 5x10⁵ UM-SCC1-Zellen nach 96 Stunden Kultivierung keine ausreichende Konfluenz erreicht wurde und somit nicht genügend Zellen geerntet werden konnten, um ausreichend Zellmaterial für die Folgeuntersuchungen zu erhalten. Bei der Zellaussaat von 1x10⁶ UM-SCC1-Zellen zeigte sich nach der Inkubation und Mock-Behandlung mit 0,1 % DMSO über 96 Stunden eine übermäßige Konfluenz mit mehreren übereinander gelagerten Zellschichten. Der pH-Indikator im Kulturmedium wies ebenfalls auf eine Stoffwechsellage hin, die auf eine übermäßige Zellpopulation hindeutete. Für die Folgeversuche wurde deshalb eine Zellzahl von 7.5x10⁵ Zellen zur Aussaat gewählt. Der Versuchsablauf wird schematisch in Abbildung 13 dargestellt.

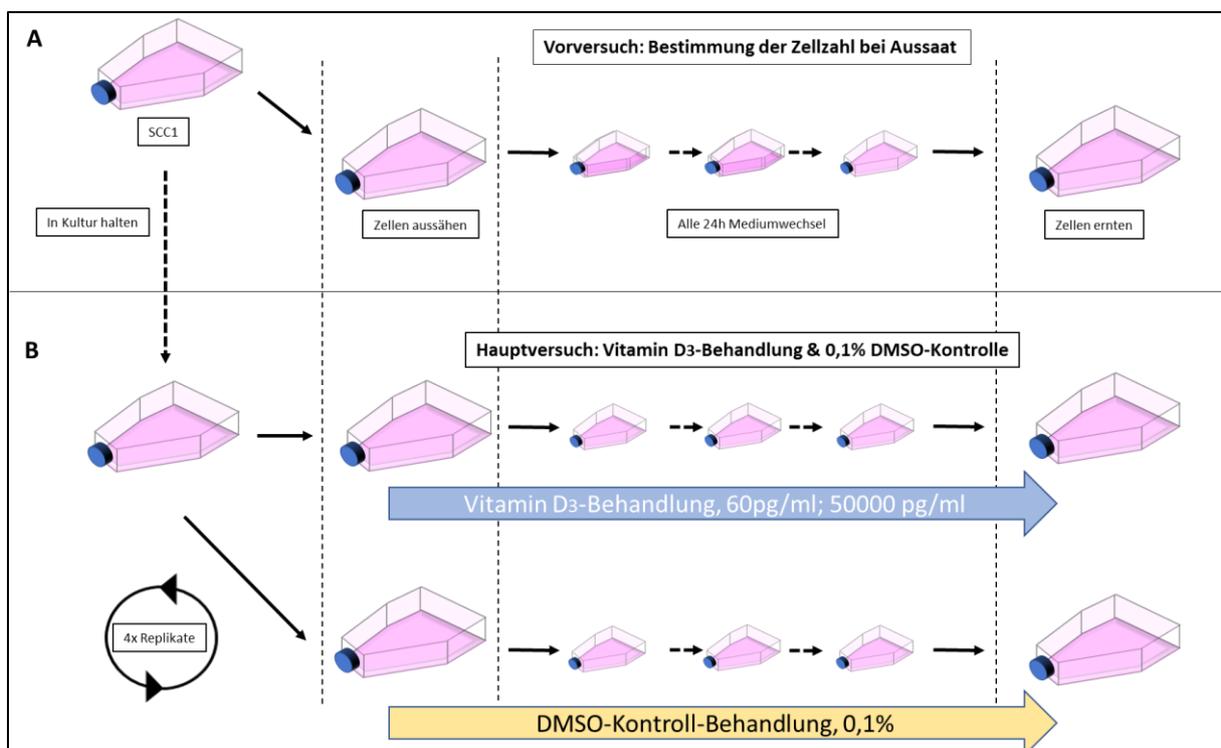


Abbildung 13: Vorversuch und Behandlung der UM-SCC1-Zellen mit Vitamin D₃ und 0,1 % DMSO über 4 Tage (96 Stunden)

(A) Der Vorversuch umfasst die genaue Ermittlung der optimalen Zellaussaatmenge. Dabei wurden jeweils 5x10⁵ oder 1x10⁶ UM-SCC1-Zellenausgesät. Alle 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel in allen Kultivierungsbedingungen. Nach 96 Stunden erfolgte die Ernte der Zellen. Mit Hilfe der automatisierten Zellzählung konnte die optimale Menge der auszusäenden Zellen für die Hauptversuche

ermittelt werden. **(B)** Der Hauptversuch umfasst insgesamt 4 Replikate. Vergleichend wird eine UM-SCC1 Kultur mit 50.000 pg/ml Vitamin D₃ behandelt und die Kontrollgruppe mit 0,1 % DMSO-Lösung. Hierzu wurde jeden Tag unter Abdunkelung des Raumes das mit Vitamin D₃ versetzte Medium gewechselt. Analog hierzu wurde bei der Kontrollgruppe ebenfalls täglich das Medium mit 0,1 % DMSO gewechselt. Nach 96 Stunden Behandlung erfolgt die Ernte und Aufbewahrung der Zellen für die Folgeversuche.

3.1.4 Hauptversuch: Behandlung der UM-SCC1-Zellen mit Vitamin D₃ über 4 Tage

Anhand der gemittelten vitalen Zellzahlen aus der automatisierten Zellzählung mittels LunaTM Automated Cell Counter konnte die Gesamtzellzahl in dem vorliegenden Gesamtvolumen der Zellsuspension errechnet werden. Nach der exakten Zellzahl-Bestimmung erfolgte die Entnahme von exakt so viel Volumen der Zellsuspension, welches genau 7.5×10^5 Zellen entsprach. Die Zellsuspension wurde dann auf insgesamt 15 ml mit Kulturmedium aufgefüllt. Je nach Versuchsgruppe wurde der Suspension anschließend 15 µL DMSO oder 15 µL Vitamin D₃ der Konzentration 60 ng/ml bzw. 50.000 ng/ml zugeführt um die entsprechenden Konzentrationen 0,1 % DMSO und 60 pg/ml bzw. 50.000 pg/ml Vitamin D₃ zu erhalten. Die gewählten Behandlungsdosierungen entsprachen den Resultaten zuvor durchgeführter Versuchsreihen aus vorangegangenen Arbeiten. Nach ausreichender Durchmischung der Zellsuspension wurde diese in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt und über 24 Stunden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Lufkonzentration inkubiert. In der Folgezeit wurde alle 24 Stunden das Medium gewechselt. Dabei war darauf zu achten, dass das empfindliche Vitamin D₃ tiefgefroren gelagert wurde und das Medium in einem abgedunkelten Raum neu angesetzt wurde. Dies diente dem Schutz des Vitamin D₃ vor potenziellen energiereichen UV-B Strahlen, die möglicherweise das Molekül verändern könnten. Nach 96 Stunden erfolgte die Zellernte (siehe Kultivierung der UM-SCC1-Zelllinie). Für die Folgeuntersuchungen wurden unterschiedliche Mengen von Zellmaterial benötigt. Für den Western-Blot wurden 1×10^6 Zellen und für die RNA-Sequenzierung 3×10^6 Zellen benötigt. Die entsprechenden Volumina der Zellsuspension wurden dafür in ein passendes Gefäß überführt. Im Anschluss wurden die Proben für 3 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Das verbleibende Zellpellet wurde mit 1 ml PBS-Puffer resuspendiert und somit von verbleibendem Medium gereinigt. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 2000 rpm für 3 Minuten. Die Proben für den Western-Blot konnten nach einmaligem Waschschrift und nach erneutem Abpipettieren des Überstandes bei -20 °C bzw. bei -80 °C eingefroren werden. Die Proben für die RNA-Sequenzierung erhielten einen zweiten Waschschrift mit PBS-Puffer und anschließender Zentrifugation bei 2000 rpm und 3 Minuten. Danach wurden diese Proben ebenfalls bei -80 °C eingefroren.

3.2 Western-Blot

In den nachfolgenden Tabellen sind die für den Western-Blot verwendeten Chemikalien, deren Herkunft sowie die verwendeten Geräte und deren Hersteller aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben

Benötigte Chemikalien	Hersteller/Herkunft
Ammoniumpersulfat (APS 10 %), Art. 190106	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau, Art. 15375	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT), Art. 210477	Serva, Heidelberg
Essigsäure 100 % 1L, Art. 1000631000	Merck, Darmstadt
Glycerin 87 % reinst, Art. 1040912500	Merck, Darmstadt
Glycin kristallin, Art. 180946	Serva, Heidelberg
H ₂ O bidest, Art. 1088811	Fresenius Kabi, Bad Homburg
HCL 25 %, Art. X8971.1	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe
Methanol, Art. 1060091000	Merck, Darmstadt
Na-Dodecylsulfat (SDS), Art. 20771	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid (NaCl, kristallin), Art. 2438	Caelo, Hilden
Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate Thermo Scientific, Art. 32132	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RIPA Lysis and Extraction Buffer, Art. 160413	Serva, Heidelberg
Skim Milk Powder for blotting, Art. 210328	Serva, Heidelberg
Tetramethylethyldiamin (TEMED), Art. 3593002	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 10 %, Art. 1610182	BioRad, USA
Trizma® base, Art. 061M5400V	Sigma, USA
Tween, Art. 141010	Serva, Heidelberg

Materialien und Methoden

Tabelle 4: Verwendete Utensilien und Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben

Beschreibung	Hersteller/Herkunft
Aufsatz für 60 Reaktionsgefäße, Art. 7-0504	NeoLab Migge GmbH, Heidelberg
ChemoStar ECL & Fluorescence Imager	Intas Science Imaging, Göttingen
Elektrophoresekammer für Proteine Mini-PROTEAN® Series	Biorad, München
Filterpapier, DE81	Schleicher und Schüll, Dassel
Flüssiger Stickstoff	AIR LIQUIDE Medical GmbH, Düsseldorf
Glaskügelchen, Säure-gewaschen, 425-600 µm, Art. G8772-100G	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hamilton™ 700 Serie Microliter™ Spritze, 50 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Immobilon-P Transfermembran (PVDF, 0,45 µm Porengröße), IPVH00010	Merck, Darmstadt
Magnetrührer Combimag RCT	IKA, Staufen
Thermomixer comfort, Tischkühlzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Thermo-Shaker BioSan TS-100C	Biosan, Riga, Lettland
Tischzentrifuge (Centrifuge 5415)	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad	Sonics & Materials, Inc. Newtown, CT
Vortex-Mixer (Genie2™)	Scientific Industries, Bohemie, New York, USA

Tabelle 5: Verwendete Antikörper mit Herstellerangaben und Verdünnung

β-Aktin (Primär)	Maus, Thermo Fisher, USA Art. MA5-15739	1:5000
VDR (Primär)	Hase, Abcam, UK, Art. EPR4552	1:1000
F_c-anti-maus (Cy3) (Sekundär)	ECL™ Plex goat-α-mouse IgG Cy™3, PA43009, Merck, USA	1:2500
F_c-anti-rabbit (Cy5) (Sekundär)	ECL™ Plex Goat anti-rabbit IgG, Cy™5, PA45012, Fisher Scientific	1:2500
F_c-anti-maus (HRP) (Sekundär)	anti-mouse IgG, HRP-gekoppelt #7076 Cell Signaling Technology Europe B.V., Leiden, Netherlands	1:2000
F_c-anti-rabbit (HRP) (Sekundär)	anti-rabbit IgG, HRP-gekoppelt #7074 Cell Signaling Technology Europe B.V., Leiden, Netherlands	1:2000

In mehreren aufeinander folgenden Schritten wurden die UM-SCC1-Zellproben so weit aufbereitet, dass man schließlich spezifische Proteine mit Hilfe der Western-Blot Methode nachweisen konnte. Um die Zellen zugänglich für den Western-Blot zu machen, wurde zunächst ein suffizientes Lyse-Protokoll für die UM-SCC1-Zelllinie etabliert, wie unten genauer beschrieben wird. Dazu kamen die Methoden einer mechanischen Lyse via Glaskügelchen, „Freeze/thaw“, Ultraschall oder chemische Lyse via Detergenzien in RIPA-Puffer in Frage. Nach suffizienter Zellaufspaltung mit dem geeigneten Protokoll wurde die Suspension dem 2. Schritt, der Gelelektrophorese, zugeführt. Dazu wurde ein spezieller Laufpuffer angesetzt, in dem die Reaktion ablief. Zuvor wurde die Suspension mit SDS (Natriumdodecylsulfat) versetzt, um die vorhandenen Proteine zu denaturieren. Durch die Bindung von SDS erhielten die bereits denaturierten Proteine eine gleichmäßige negative Ladung. Die Hinzugabe von Bromphenolblau diente der Sichtbarmachung der Proben während des Beladens der Geltaschen und dem Fortschreiten der Lauffront. Die Proteine wanderten somit durch Anlegung einer Spannung in einer Geschwindigkeit durch das Gel, die proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts des Proteins ist. Durch die SDS-Maskierung wurden die nativen Ladungen des Proteins neutralisiert und ließen somit das Laufverhalten unbeeinflusst. Proteine mit niedrigem Molekulargewicht wanderten weiter durch die Poren des Gels als Proteine mit hohem Molekulargewicht. Nach erfolgreicher Probenauftrennung durch die Gelelektrophorese erfolgte der Membran-Transfer. Dazu wurde zunächst ein Transferpuffer angesetzt, in dem der Prozess stattfand. Das Gel mit den durch die Elektrophorese aufgetrennten Proteinen wurde vertikal durch Anlegung einer Spannung auf eine Membran übertragen. Im letzten Schritt wurden die auf die Membran transferierten Proteinbanden nachgewiesen. Dabei wurden die auf der Membran vorliegenden Proteine zunächst zwecks Blockierung unspezifischer Bindungen mit einer Milchpulverlösung inkubiert. Es folgten zwei Inkubationen mit spezifischen Antikörpern, die nur ein spezifisches Epitop auf den Proben erkannten und diese banden, beziehungsweise zu dem gebundenen Antikörper passten. Zunächst folgte die Inkubation mit einem primären Antikörper, welcher das gesuchte Protein band. Um diese Bindung sichtbar zu machen, folgte die Inkubation mit einem sekundären Antikörper, welches am F_c-Teil des Antikörpers Horseradish Peroxidase (HRP), ein Reporterenzym, gebunden hat. Der sekundäre Antikörper band spezifisch an den F_c-Teil des primären Antikörpers. Diese Bindung konnte im Folgeschritt durch eine Reaktion detektiert werden, indem man ein geeignetes Substrat (Luminol) auf die Antikörper gab. HRP katalysiert bei ausreichend Substrat und geeigneten Reaktionsbedingungen eine detektierbare Chemolumineszenz. Diese kann mit geeigneten Geräten detektiert und mit einer speziellen Software quantifiziert werden.

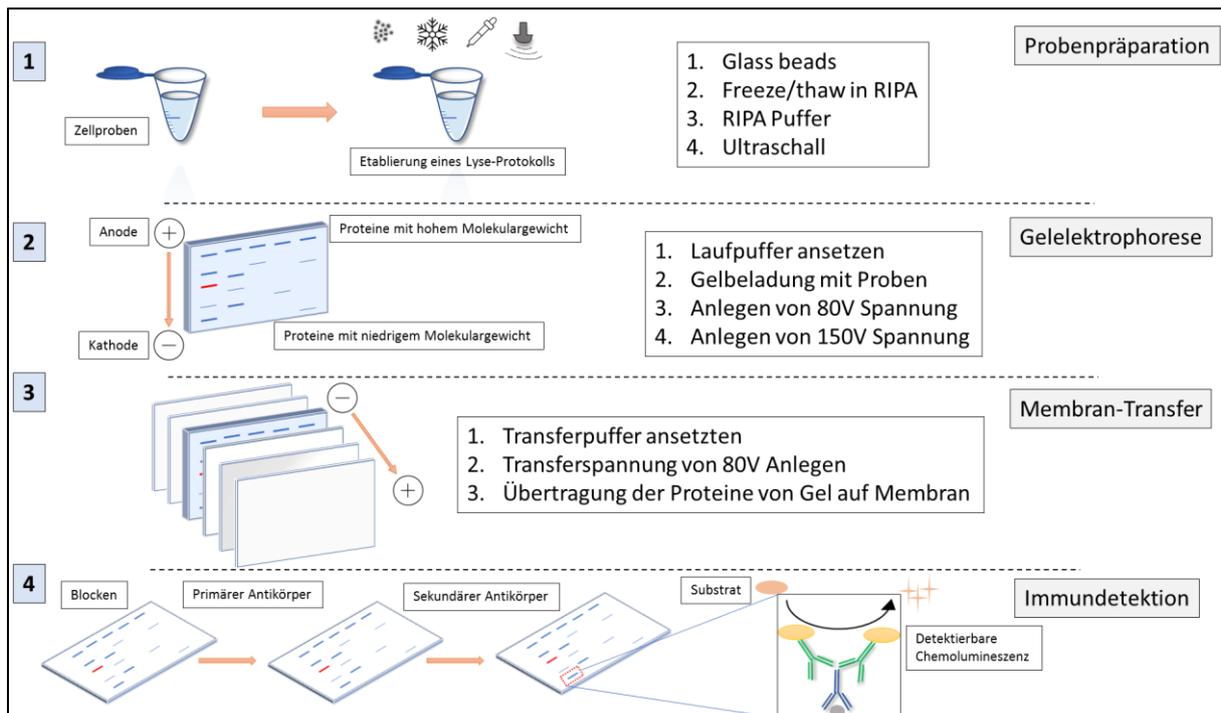


Abbildung 14: Ablauf der Probenpräparation, Gelelektrophorese, Membran-Transfer und Immundetektion

Die Western-Blot Analyse konnte in 4 wesentliche Schritte unterteilt werden. Zunächst wurden die Proben unterschiedlichen Lyse-Protokollen zugeführt. Danach erfolgte eine Gelelektrophorese mit anschließendem Membran-Transfer. Zuletzt erfolgte die Immundetektion mittels HRP-gekoppelten sekundären Antikörpern.

3.2.1 Zellpräparation für die Western-Blot Analyse

Im Rahmen der folgenden Schritte werden die erforderlichen Puffer in den jeweiligen Unterkapiteln aufgeführt. Die Rezeptur zum Ansetzen des entsprechenden Puffers ist tabellarisch aufgelistet. Die entsprechenden Fließtexte beschreiben detailliert das Vorgehen und erläutern grobsumfassend den wissenschaftlichen Hintergrund der Einzelschritte.

Tabelle 6: Herstellung des 5x Lämmli-Probenpuffers

Komponenten:	Konzentration:
DTT	500 mM
Tris/HCL, pH 6,8	300 mM
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
SDS, 1g	10 % (w/v)
Glycerin, 5ml	50 % (v/v)
H ₂ O bidest	10 ml

Die Einzelsubstanzen des Lämmli-Probenpuffer versehen die Proben mit spezifischen Eigenschaften zur Durchführung der Elektrophorese. Deshalb soll an dieser Stelle kurz deren Funktion erläutert werden. Bromphenolblau ermöglicht die visuelle Beurteilung der Migration der Proteine durch das Polyacrylamid-Gel und deren Lauffront. Glycerin erhöht die Dichte der

Proben, was das Beladen der Taschen mit den Proben ermöglicht und gleichzeitig das Vermischen mit dem Laufpuffer verhindert. SDS denaturiert die Proteine und versieht diese mit negativer Ladung. Damit ist die Menge an Ladung proportional zur Proteingröße und ermöglicht die Wanderung in einem Spannungsfeld. Tris/HCL ist ein Puffersystem. DTT verhindert die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen (SH-) zu Disulfidbrücken. Damit wird der Ausbildung intramolekularer Wechselwirkungen wie Disulfidbrücken entgegengewirkt, die das Laufverhalten behindern würden.

Zur Etablierung eines Lyse-Protokolls für die UM-SCC1-Zelllinie wurden verschiedene Lyse-Verfahren in ihrer Effektivität verglichen. Dazu wurde ein Protokoll mit RIPA-Puffer, ein Protokoll mit Einfrieren in flüssigem Stickstoff und raschem Auftauen, ein Protokoll mit der mechanischen Lyse via Glaskügelchen und Ultraschall durchgeführt. Vorab wurde 1000 µL RIPA-Puffer mit 10 µL Protease Inhibitor im Verhältnis 1:100 und der 5x Lämmli-Probenpuffer nach oben genanntem Protokoll angesetzt. Im Folgenden sind diese verschiedenen Protokolle zum Zellaufschluss im Detail beschrieben.

Glaskügelchen: Die mechanische Lyse der Zellen erfolgte mithilfe von Glaskügelchen. Dabei wurde versucht die Zellintegrität zu zerstören, indem man durch die kinetische Energie bewegter Glaskügelchen die Zellmembran zerreißt und den Zellinhalt dadurch freisetzt. Anfänglich wurde zu dem auf Eis aufgetauten Zellpellet pro 1×10^4 Zellen 1 µL 1x Lämmli-Probenpuffer hinzugegeben und gründlich resuspendiert. Für 1×10^6 Zellen aus unseren Zellpellets wurde folglich 100 µL 1x Lämmli-Probenpuffer verwendet. Danach folgte ein Kochschritt bei 56 °C für 20 Minuten im Thermoschüttler. Anschließend wurden chemikalienbeständige und in Säure gewaschene Glaskügelchen, einsetzbar als Mahlkugeln, hinzugefügt. Die Menge entsprach einem Fünftel des Gesamtprobenvolumens. Die mit Glaskügelchen versehene Probe wurde anschließend mit einem speziellen Vortexaufsatz für 25 Minuten bei maximaler Leistung geschüttelt. Im Anschluss folgte ein 15-minütiger Kochschritt im Thermoschüttler zur Homogenisierung. Danach wurde die Probe für 3 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert und der Überstand abpipettiert und in ein weiteres Gefäß überführt. Dabei war darauf zu achten, dass keine Glaskügelchen zusammen mit den Proben mit der Pipette aufgenommen wurden. Die Proben waren im Anschluss für die weiteren Schritte aufbereitet.

Freeze/thaw in RIPA-Puffer: Mit einem weiteren Lyse-Protokoll wurde versucht, ein mechanisches Aufbrechen der Zellen durch massive Temperaturänderung mit Hilfe von flüssigem Stickstoff (LN₂) zu erreichen. Dazu wurde zunächst das zuvor tiefgefrorene Zellpellet bei Raumtemperatur aufgetaut. Danach wurde die Probe mit 1 ml RIPA-Probenpuffer/Protease-Inhibitor pro 5×10^6 Zellen versetzt und ausreichend resuspendiert. Die

Materialien und Methoden

Zusammensetzung des Lösungsvolumens des RIPA-Probenpuffers bestand zu 80 % aus RIPA-Puffer und 20 % 5x Lämmli. Für den Ansatz von $1,5 \times 10^6$ Zellen entsprach dies 240 μL RIPA und 60 μL 5x Lämmli. Für alle folgenden Lyseprotokolle galt, dass initial nur RIPA-Puffer in die Zellsuspension gegeben wurde und erst anschließend die entsprechende Menge an Lämmli-Probenpuffer in der angegebenen Konzentration zugesetzt wurde. Nach Möglichkeit wurde im Rahmen der Resuspendierung eine Schaumbildung zur Protektion der enthaltenen Proteine vermieden. Im Anschluss wurde die Probe für ca. 15 Sekunden in LN_2 getaucht und schockgefroren, um anschließend wieder bei Raumtemperatur aufzutauen. Dieser Schritt wurde insgesamt 3 Mal wiederholt. Nach dem letzten Auftauschritt erfolgte ein 10-minütiges Schütteln der Proben auf Eis. Hiernach erfolgte die Zentrifugation bei 14.000 g für 15 Minuten bei 15 °C. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und entsprechend mit 60 μL 5x Lämmli-Probenpuffer versetzt. Es folgte ein 10-minütiger Kochschritt bei 56 °C im Thermoschüttler, um anschließend in die Geltaschen der Elektrophoresekammer geladen zu werden.

RIPA-Puffer: Die chemische Lyse mit RIPA-Puffer folgte dem Protokoll von Serva. Dabei sorgten diverse Detergenzien in der Lösung des RIPA-Puffers für eine Permeabilisierung der Zellmembran und somit zur Freisetzung des Zellinhaltes. Für ein optimales Verhältnis der Lyse benötigte man 1 mL RIPA-Puffer für 5×10^6 Zellen, wie den vorangegangenen Protokollen bereits zu entnehmen war. Demnach betrug das Gesamtvolumen für $1,5 \times 10^6$ Zellen 300 μL . Die Lyse begann mit dem Auftauen der Proben auf Eis. Danach wurde 240 μL RIPA-Puffer bei gründlicher Resuspendierung hinzugefügt. Schaumbildung sollte vermieden werden. Anschließend erfolgte ein 15-minütiges Schütteln der Probe auf Eis. Wie im Protokoll *Freeze/thaw* wurde die Probe zu diesem Zeitpunkt bei 14.000 g für 15 Minuten bei 15 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 60 μL 5x Lämmli-Probenpuffer für $1,5 \times 10^6$ Zellen entsprechend ausreichend resuspendiert. Es folgte ein letzter Kochschritt im Thermoschüttler bei 56 °C für 10 Minuten. Danach waren die Proben bereit, um auf das Gel geladen zu werden.

Ultraschallbad und RIPA-Puffer: Ein weiterer mechanischer Lyse-Ansatz erfolgte durch die Anwendung von energiereichen Ultraschallwellen. Dabei wurden die Moleküle innerhalb der Zellen durch Resonanz zum Schwingen gebracht, bis die Integrität der Zellmembran verloren ging und der Zellinhalt freigesetzt wurde. Initial wurde auch hier die Probe auf Eis aufgetaut. Auch in diesem Lyseprotokoll wurde 1 ml RIPA/Protease-Inhibitor pro 5×10^6 Zellen hinzugegeben und ausreichend resuspendiert. Dazu erfolgte zunächst die Hinzugabe von 240 μL RIPA (entsprechend $1,5 \times 10^6$ Zellen) mit nachfolgendem 10-minütigem Schütteln der Probe auf Eis. Im Anschluss folgte das Ultraschallbad in mit Eis versetztem Wasser für insgesamt 10

Minuten. Dazu wurde das Gefäß in einen Schaumstoffschwimmer gesteckt, um bei Eintauchen des Probeninhalts in das Wasser diesen suffizient emittierten Ultraschallwellen auszusetzen. Das Eiswasser verhinderte hierbei ein Überhitzen der Proben. Es folgte ein erneuter 10-minütiger Schüttelschritt auf Eis. Die Proben wurden dann bei 14.000 g für 15 Minuten bei 15 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 60 µL 5x Lämmli-Probenpuffer resuspendiert. Nach einem letzten Kochschritt für 10 Minuten bei 56 °C im Thermoschüttler waren die Proben bereit, um auf das Gel geladen zu werden.

3.2.2 Proteinauftrennung mit Hilfe der Gel-Elektrophorese

Tabelle 6: Herstellung des 10x Tris-Glycin/SDS-Laufpuffer, pH 8,6

Komponenten:	Konzentration:
SDS, 10 g/L	1 %
Trizma® base, 30,3 g/L	0,25 M
Glycin 144 g/L	1,92 M
H ₂ O bidest	Auf 1 L auffüllen

Tabelle 7: Herstellung des 10x TBS-Puffer/TBS-T Puffers

Komponenten:	Konzentration:
NaCl, 90 g/L	(9 %)
Trizma® base, 13,44g/L	112 mM
HCl (32 %)	8,3 ml, pH 7,4
H ₂ O bidest	Auf 1 L auffüllen
Tween (optional)	0,5 %

3.2.3 Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gele mit Hilfe des BioRad Gel-Kits

Zur Herstellung von Polyacrylamid Gelen wurde das TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit 10 % von BioRad verwendet. Dabei wurden zunächst die vorgefertigten Trenngel- und Sammelgel-Lösungen in geeigneten Gefäßen angesetzt. Zur Trenngel-Lösung wurden anschließend für jeweils zwei Gele insgesamt 6 µL TEMED und 60 µL 10 % APS hinzugegeben. Durch Vortexen des Gefäßes wurden alle Substanzen ausreichend untermischt. Dabei wurde eine starke Schaumbildung vermieden. Anschließend wurde das Trenngel unter ca. 60° angulierter Gelvorrichtung bis 1 cm unter das zuvor markierte Kamm-

Ende gegossen. Für das Sammelgel wurde entsprechend für zwei Gele 4 μL TEMED und 20 μL 10 % APS hinzugefügt. Durch vortexen wurden die Einzelkomponenten vermischt. Zuletzt wurde das Sammelgel ebenfalls unter ca. 60° angulierter Gelvorrichtung vollständig bis zum Rand aufgefüllt. Anschließend folgte die Einführung des Kamms unter Vorsicht keine Luft einzuschließen. Die anschließende Polymerisationszeit betrug 30-45 Minuten. Für die Zeit der anschließenden Lagerung wurden die Gele bei 4 °C in angefeuchteten Tüchern aufbewahrt, jedoch maximal für 7 Tage bis zur Verwendung im Versuch.

3.2.4 Beladen der Gele und Elektrophorese-Prozess

Das zuvor hergestellte Gel wurde zusammen mit dem 10x Tris-Glycin/SDS-Laufpuffer, welcher zuvor auf ein Zehntel verdünnt wurde, in eine Elektrophorese-Kammer der Firma BioRad gebracht. Dazu wurde zunächst das Gel mitsamt der Halteapparatur mit den vorgesehenen Elektroden verbunden. Anschließend wurde der komplette Reaktionsraum mit ca. 750 mL Laufpuffer aufgefüllt. Dabei war darauf zu achten, dass das gesamte Gel vollständig mit Laufpuffer benetzt wurde. Die Geltaschen wurden vor dem Beladen vorsichtig gespült, um eventuell noch vorhandene Gelreste und Luftblasen zu entfernen. Zu diesem Zweck wurde die Hamilton™ 700 Serie Microliter™ Spritze (50 μl) verwendet. Im Anschluss daran wurden die Taschen nach einem vorher festgelegten Schema mit den Lämmliproben beladen. Für eine Referenzlaufront wurde in jedem Versuch jeweils eine Tasche mit 2 μL Marker und eine Negativkontrolle mit 10 μL Rauen Mikrosomen (RM) aus Hundepankreas beladen. Im Kontext der Probenauftragung der Geltaschen war darauf zu achten, dass benachbarte Laufronten mit etwa dem gleichen Ausgangsvolumen an aufbereiteter Probe beladen wurden, um eine Asymmetrie der Laufront zu vermeiden.

Nach dem Auftragen sämtlicher Proben und der Einbettung in Laufpuffer wurde initial für 20 Minuten eine Spannung von 80 V angelegt. Im Anschluss erfolgte die Erhöhung der Spannung auf 150-180 V für weitere 35 Minuten. Die Proben wurden beim Elektrophorese-Prozess durch die zuvor beschriebene Komplexierung mit SDS proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts aufgetrennt. Dabei wanderten die zu diesem Zeitpunkt negativ geladenen Proteine von der Anode in Richtung Kathode. Die Auftrennung der Proteine sowie der Fortschritt der Laufront der Proben konnte durch eine visuelle Beurteilung der Elektrophorese-Kammer beurteilt werden. Durch das Variieren der Spannung mit eher niedrigen Werten zu Versuchsbeginn und später deutlich höheren Werten konnte aktiv die Geschwindigkeit des Probenlaufverhaltens moduliert werden.

3.2.5 Elektrischer Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)

Tabelle 8: Herstellung des Transferpuffers

Komponenten:	Konzentration:
Trizma® base,	1,45 g
Glycin	0,7 g
SDS	250 µL, 10 %
MeOH	37,5 ml
H ₂ O _{bidest}	Auf 250 ml auffüllen

Nach der gelelektrophoretischen Proteinauftrennung der Proben erfolgte der Proben transfer auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid, Porengröße 0,45 µm). Dies erfolgte für eine anschließende immunologische Detektion der immobilisierten Zielproteine auf der Trägermembran. Dieser Prozess wurde mit Hilfe eines „Semi-Dry“-Transferverfahrens durchgeführt. Dazu wurde ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, wodurch die mit SDS-beladenen Proteine in Richtung Anode bewegt wurden. Insgesamt bot das „Semi-Dry“-Transferverfahren den Vorteil deutlich weniger Zeit in Anspruch zu nehmen als beispielsweise der Transfer mittels reiner Kapillarwirkung oder das Nassblot-Verfahren. Die PVDF-Membran wurde initial in direkten Kontakt zu dem Gel gebracht. Danach wurde das Gel-Membran Paar beidseits mit jeweils 3 Filterpapieren eingedeckt, um ausreichend Transferpuffer für das elektrische Feld zu Verfügung zu stellen. Sobald die elektrische Spannung angelegt wurde, wanderten die negativ geladenen Proteine in vertikaler Laufrichtung auf die Membran.

Vor dem eigentlichen Proben transfer wurde die Membran zunächst einer wässrigen Umgebung zugänglich gemacht, in der diese für ca. 20 Sekunden mit Methanol aktiviert wurde. Das Methanol wurde anschließend 3–4-mal mit destilliertem Wasser abgespült. Die für den Blot notwendigen Filterpapiere sowie das Gel wurden vorher für ca. 10 Minuten in Transferpuffer eingetaucht und equilibriert. Dann wurde das „Transfer-Sandwich“, bestehend aus Gel, Membran und jeweils 3 mit Transferpuffer getränkten Filterpapieren beidseits, zwischen zwei Plattenelektroden gelegt. Dabei war stets darauf zu achten, jede Schicht einzeln unter dem Ausschluss von Luftblasen möglichst passgenau auf die vorliegende Schicht aufzutragen. Zusätzlicher Transferpuffer wurde schließlich über das System gegossen, um eine ausreichende Benetzung aller Strukturen zu erreichen. Hiernach wurden die Plattenelektroden von oben und unten aufgesetzt. Im Anschluss wurde elektrischer Strom angelegt. Dieser war abhängig von der verwendeten Membrangröße und betrug je nach angewendeten Plattenelektroden zwischen 1 mA/h bis 2,4 mA/h pro cm² Membranfläche. Der angelegte Strom ermöglichte den vertikalen Übertritt der Proteine vom Gel auf die Membran. Die Dauer des Blot-Vorgangs betrug insgesamt ca. 60 Minuten.

3.2.6 Ponceau S-Färbung

Tabelle 9: Herstellung der Ponceau S-Lösung

Komponenten:	Konzentration:
5 % Essigsäure	10 ml
H ₂ O _{bidest}	190 ml
Ponceau S	0,2 g

Ponceau S ist roter ein Bisazofarbstoff, der verwendet wurde, um reversibel auf der PVDF-Membran Proteine anzufärben. Dabei band Ponceau S an die positiv geladenen Aminoreste der Proteine. Die Färbung konnte im Anschluss leicht mit Wasser oder einer Block-Lösung ausgewaschen werden. Dieses Verfahren diente dem schnellen quantitativen Nachweis der Gesamtproteinmenge auf der Membran und erlaubte so erste Rückschlüsse über das Gelingen des Western-Blots und den vorher durchgeführten Lyse-Methoden. Im Rahmen der anschließenden Quantifizierung der Proteinmengen pro Bande konnte die Ponceau-Bandenfärbung ebenfalls als Referenz herangezogen werden (als Alternative zur *Housekeeping*-Protein-Methode). Dazu wurden die detektierten Färbeintensitäten der Zielmoleküle auf die Färbeintensität einer Referenzbande der Ponceau-Färbung normiert. Im Kontext dieser Arbeit wurde die Methodik der Ponceau-Färbung zur Probenquantifizierung für die weiteren Folgeuntersuchungen etabliert. Hierzu erfolgte zunächst die 2-minütige Inkubation der Membran mit der vorher angesetzten Ponceau S-Lösung. Anschließend wurde die Lösung von der Membran entfernt und vorsichtig mit destilliertem Wasser abgespült. Nach 2-3 Spülungen ließen sich rosafarbene Banden differenzieren. Es folgte ein standardisiertes fotografisches Festhalten der gefärbten Banden. Zum Schluss konnten die restlichen an Proteine gebundene Ponceaus S-Moleküle mit destilliertem Wasser vollständig abgespült werden. Die Immundetektion der Zielmoleküle auf der PVDF-Membran konnte hiernach angeschlossen werden.

3.2.7 Blockierung, Immundetektion und Analyse

Tabelle 10: Herstellung der Block-Lösung

Komponenten:	Konzentration:
Skimmed Milk Serva	1 g
TBS	20 ml

Nach dem vollständigen Elektrotransfer der Proteine auf die Membran wurde diese für ca. 30 Minuten in einer Block-Lösung, bestehend aus Skimmed Milk Serva/5 % TBS, inkubiert. Durch das gelöste Milchpulver wurden unspezifische Antikörperbindungen weitgehend verhindert. Die komplexen Moleküle aus dem Milchpulver konnten die freien Bindungsstellen der Membran „blockieren“ und somit die nachfolgende spezifische Immundetektion mit Antikörpern

möglich machen. Zu diesem Zweck wurde die Trägermembran vollständig mit der Milch-Blocklösung benetzt und in einem geeigneten Behältnis für die Dauer der Inkubation kontinuierlich bewegt.

Im Anschluss an die Blockierung mit der TBS-Milchlösung wurde die Membran mit dem primären Antikörper inkubiert. Dabei wurde im ersten Schritt ein primärer Antikörper gerichtet gegen das *Housekeeping Gene* β -Aktin eingesetzt. Die Verdünnung des primären Antikörpers betrug 1:5000 und wurde verdünnt in 10 ml 5 % (w/v) Milch-TBS. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank. Die Trägermembran wurde durch kontinuierliches Schwenken des Inkubationsschüttlers mit der Antikörper-Milch Lösung gleichmäßig benetzt. Im Anschluss folgte eine Waschreihe, die für jeden Waschschrift 5 Minuten benötigte. Dazu wurde 3-5 ml der jeweiligen Waschsubstanz gleichmäßig auf die Trägermembran aufgetragen. Für die Zeit der einzelnen Waschschrift wurde die Membran auf dem Inkubationsschüttler gleichmäßig geschwenkt. Begonnen wurde mit TBS, danach folgte 2-mal TBS-T und zuletzt wieder TBS. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von sekundärem Antikörper gerichtet gegen die wirtsspezifische Fc-Region von murinen Antikörpern (anti-mouse) mit der Verdünnung 1:2500 in 10 ml 5 % (w/v) Milch-TBS. Die Inkubation mit sekundärem Antikörper betrug 60 Minuten und erfolgte bei Raumtemperatur. Schließlich kam die oben bereits genannte Waschreihe erneut zur Anwendung. Zum Schluss wurde die Trägermembran über Nacht in einem lichtgeschützten Bereich zum Trocknen aufbewahrt. Das Verfahren wurde erneut mit dem primären Antikörper gegen VDR durchgeführt. Entsprechend wurde auch der sekundäre Antikörper angepasst. Die Schritte entsprachen im Wesentlichen den oben genannten. Je nach Art des sekundären Antikörpers war darauf zu achten, dass die Membran vor Licht geschützt inkubiert wurde, um den fluoreszierenden Sekundärantikörper nicht auszubleichen. Die anschließende Detektion wurde mit Hilfe des ChemoCam Imagers (Intas Science Imaging) durchgeführt. Zur Detektion diente ein sekundärer Antikörper, welcher mit dem Fluorophor Cy3 gekoppelt war (anti-mouse-Cy3). Cy3 ist ein orange-fluoreszierender Farbstoff, der mit definierten Lichtimpulsen der Wellenlänge 532 nm angeregt und mit TRITC (Tetramethylrhodamin)-Filtersätzen visualisiert werden kann. Dieser wurde zur Detektion von β -Aktin herangezogen. Zur Detektion von VDR wurde ein Cy5 gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet (anti-abbit-Cy5). Cy5 ist ein rot fluoreszierender Farbstoff mit Anregungsspektrum zwischen 633 nm und 647 nm. Bei initial nicht ausreichendem oder aussagekräftigem Proteinsignal im ersten Durchlauf der Proteindetektion erfolgte eine Reaktivierung der getrockneten Membran mit Methanol. Danach erfolgten die oben bereits beschriebenen Verfahren zur Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper.

Im Rahmen der Detektion des Fluoreszenzsignals der Sekundärantikörper zeigten sich in den ersten Versuchsreihen teilweise nur eingeschränkt aussagekräftige Ergebnisse. Folglich war eine mehrfache Anpassung des Protokolls erforderlich, sodass in letzter Konsequenz zur

Detektion statt Cy-gekoppelten Sekundärantikörpern die Chemolumineszenz als Detektionsmethode herangezogen wurden. Das Protokoll der Immundetektion entsprach dem oben genannten. Eine Abweichung stellten jedoch die letzten Schritte zur Detektion dar. Anstelle der oben erwähnten Fc-anti-maus (Cy3) und Fc-anti-rabbit (Cy5) Antikörper wurden nun Fc-anti-maus (HRP) und Fc-anti-rabbit (HRP) als sekundäre Antikörper verwendet. Nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte die Zugabe von geeignetem Substrat. Dabei katalysiert das an den sekundären Antikörper gebundene HRP die Spaltung von Wasserstoffperoxid in einem hinzugefügten, geeigneten HRP-Substrat. Konsekutiv wird dadurch ein zuvor farbloses Chromogen der zugegebenen Lösung in ein farbiges, quantifizierbares Endprodukt umgewandelt, welches mit dem ChemoCam Imager detektiert werden konnte. Die finalen Aufnahmen für die im Ergebnisteil dargestellten Versuche wurden aufgrund der aussagekräftigeren Blot-Ergebnisse mit dieser Methode beurteilt und ausgewertet.

Zur anschließenden Quantifizierung der Proteinbanden im Western-Blot wurde das Programm ImageJ verwendet. Dazu wurde jede einzelne Bande auf die Intensität des Signals untersucht. Es wurden insgesamt 4 Replikate analysiert. Der Nachweis über den Behandlungserfolg der kultivierten HNSCC-Zellen mit $1,25\text{-(OH)}_2$ Vitamin D_3 gelang durch die Quantifizierung von VDR als Zielmolekül dieser Substanz. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet, um ein nicht reguliertes *Housekeeping*-Protein als Referenz der Auftragungsmenge zu erhalten. Mit Hilfe der grafischen Ermittlung der *Area under the curve* (AUC) konnte das Signal der Einzelbanden quantifiziert werden. Zur relativen Vergleichbarkeit der Expressionsraten des Zielproteins wurden diese Daten auf die Auftragungsmenge von β -Aktin normiert. Zu diesem Zweck wurde zunächst für jedes Replikat in der Kontrollgruppe die VDR und β -Aktin Expression auf 1 normiert. Das Signal aus der Verumgruppe wurde mit dem Verhältnis aus detektiertem Signal für β -Aktin und VDR zum gemessenen Signal aus der Kontrolle beschrieben. Zur letztendlichen Quantifizierung des Zielproteins wurde der Quotient aus VDR-Verhältnis zu β -Aktin-Verhältnis gebildet. Die errechneten Quotienten wurden anschließend statistisch unter Verwendung des Programms Graph Pad Prism 9 ausgewertet. Initial wurden die Wertepaare auf Normalverteilung untersucht. Zur Anwendung kamen der Anderson-Darling-Test, der D'Agostino & Pearson-Test, der Shapiro-Wilk-Test und der Kolmogorov-Smirnov-Test. Es zeigte sich hierbei in allen Versuchen keine Normalverteilung der Wertegruppen. Zur weiteren Analyse wurde folglich der Mann-Whitney Test bei nicht parametrischen Werten verwendet.

3.3 RNA-Sequenzierung

Nach der internen Validierung der Probenbehandlung mit Vitamin D₃ durch das Western-Blot Verfahren schloss sich die externe RNA-Sequenzierung und deren konsekutive bioinformatische Analyse an, wobei in der vorgelegten Arbeit vorrangig die mRNA betrachtet wurde. Die Sequenzierung der mRNA ermöglicht die Bestimmung der Nukleotid-Abfolge der zu untersuchenden Proben. Diese Informationen geben Aufschluss über die Genexpression. Durch die Genexpressions-Analyse oder auch Transkriptom-Analyse kann identifiziert werden, welche Gene verstärkt, oder vermindert aktiv sind. Dies erlaubt Rückschlüsse auf Ebene der mRNA, welche Stoffwechsel- bzw. Signalwege unter bestimmten vorgegebenen Bedingungen (z.B. Vitamin-D₃-Behandlung) vermehrt oder vermindert ablaufen. Die RNA-Sequenzierung vergleicht in der vorgelegten Arbeit die Konzentration von mRNA unter einer Behandlung von HNSCC-Zellen mit DMSO (Negativkontrolle) vs. 50.000 ng/ml Vitamin D₃. Die umfassende Analyse des Transkriptoms sollte so Einblicke über die komplexen Regulationsprozesse ermöglichen, die durch die Vitamin D₃-Behandlung in Karzinomzelllinien induziert werden. Eine grobe Übersicht über die Verfahren zur Generierung von Transkriptom-Datensätzen zeigt Abbildung 15.

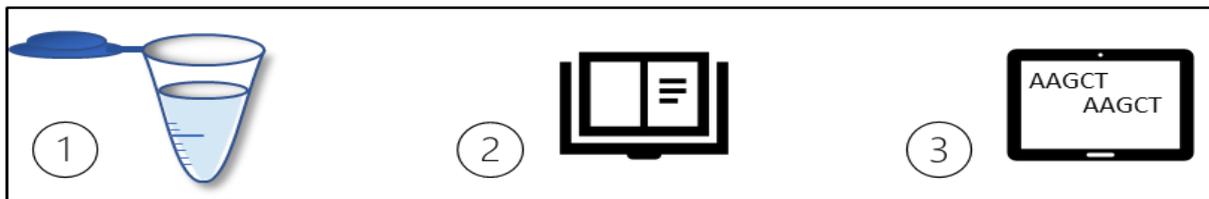


Abbildung 15: Mechanismen zur Generierung von Transkriptom-Datensätzen

1 Initial erfolgt die Versuchsdurchführung mit konsekutiver Probenaufbereitung. **2** Anschließend werden die RNA-Fragmente für die RNA-Sequenzierungsbibliothek modifiziert, aufbereitet und sequenziert. **3** Schließlich erfolgt die bioinformatische Analyse der generierten Datensätze.

Nach Durchführung der Zellkulturversuche mit Behandlung von UM-SCC1 und FaDu Zelllinien mit Vitamin D₃ und 0,1 % DMSO über 96 Stunden wurden jeweils 2×10^6 Zellen nach oben genanntem Protokoll geerntet. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS. Dazu wurde die Zellsuspension für 3 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der verbleibende Überstand wurde vorsichtig abpipettiert. Das Zellpellet wurde unter Hinzugabe von 1 ml PBS erneut resuspendiert. Anschließend wurden die verbleibenden Zellen bis zur Einsendung bei -80 °C in Kryoröhrchen eingefroren. Die Zellen wurden schließlich zur RNA-Sequenzierung an die Firma GENEWIZ Germany GmbH (Leipzig) gesendet.

Die im Folgenden beschriebenen Schritte wurden vollständig durch die Firma GENEWIZ Germany GmbH durchgeführt. Dennoch werden an dieser Stelle grob orientierend die wesentlichen Mechanismen der durchgeführten Sequenzierung beschrieben. Initial wird die mRNA der Proben isoliert und angereichert. Es erfolgt im Anschluss die Fragmentierung der

mRNA in 200-300 Basenpaar lange Segmente, die für die Sequenzierungsmaschine lesbar sind. Danach erfolgt die Hinzugabe von spezifischen *Primern*. Dies ermöglicht die Synthese von doppelsträngigen cDNA-Strängen. cDNA ist wesentlich stabiler und ermöglicht die anschließende Modifizierung und Amplifikation der Folgeschritte. Im Anschluss werden die Enden der cDNA modifiziert. Dabei wird das 5'-Ende phosphoryliert, das 3'-Ende wird mit einem dA-Rest versehen. Dies ist die Voraussetzung für die Ligation der Enden mit Adaptoren. Spezifische Adaptoren ermöglichen das Auslesen durch die Sequenzierungsmaschine, was zudem multiple Probenanalysen zur gleichen Zeit erlaubt. Die Bindungen der Adaptoren kann auch fehlerhaft sein, was eine anschließende Qualitätskontrolle der Fragmentlängen erforderlich macht. Die modifizierten cDNA-Stränge werden via PCR amplifiziert und der Sequenzierung durch eine Illumina NovaSeq Sequenziermaschine (350M read pairs) zugeführt. Die Sequenzierung erfolgt durch die parallele Auswertung der Bindungen der cDNA-Fragmente durch fluoreszierende Sonden. Im Rahmen der bioinformatischen Analyse wird zunächst die Sequenzierungsqualität evaluiert. Dabei werden z.B. Fehlbindungen der Adaptoren identifiziert. Vor der weiteren Analyse werden die Daten „getrimmt“. Dies führt dazu, dass alle Sequenzen, die von derselben biologischen Matrize stammten, an derselben Position im Gen beginnen und dieselbe Länge haben. Die ausgelesenen und „getrimmten“ Daten werden nun an entsprechende Genorte angeglichen. Zueinander passende Sequenzen aus den Auslesungen und dem Genom können dem entsprechenden *Genlocus* und dem Chromosom zugeordnet werden. Die konsekutive Auswertung der Trefferanzahl für ein bestimmtes Gen ermöglicht schließlich die mathematische Auswertung der Genexpression. Vor der Datenanalyse wurden die Verteilung der *Read-Zählungen* in der Datenbibliothek normalisiert, um verschiedene *Confounder* auszugleichen. Die anschließend normalisierten Lesezahlen der Gene wurden herangezogen, um differenzielle Genexpressionen zu bestimmen. Anschließend erfolgte die Datenqualitätsbewertung, um nicht repräsentative Proben zu erkennen. Dazu wurde die Gesamtähnlichkeit zwischen den Proben bestimmt und der euklidische Abstand zwischen den Proben bewertet. Durch die Ähnlichkeitsbestimmung der einzelnen Proben zueinander erfolgte die *Clustering*.

DESeq2 wurde verwendet, um die Genexpression zwischen den Probengruppen zu vergleichen. Der Wald-Test wurde verwendet, um p-Werte und log₂-fache Änderungen zu generieren. Gene mit einem angepassten p-Wert <0,05 und einer absoluten log₂-fachen Änderung >1 wurden als differentiell exprimierte Gene betrachtet.

Die zusätzlich durchgeführte Analyse der *Gene Ontology* (GO) ist die formale Darstellung der Systematik von Zusammenhängen innerhalb der Molekulargenetik. Durch die Analyse mit dem exakten Fisher-Test mit einem angepassten p-Wert von weniger als 0,05 konnten signifikant regulierte Gene genontologischen Gruppen zugeordnet werden. Wenn innerhalb einer GO-Einheit ≥ 3 signifikant regulierte Gene vorhanden waren, wurde dieser Signalweg nach Prüfung

auf statistische Signifikanz als reguliert angesehen. Die Regulation war unabhängig davon, ob eine Über- oder Unterexpression vorlag.

3.4 Migrations- und Proliferationsassay

Tabelle 11: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben

Benötigte Chemikalien	Hersteller/Herkunft
1,25-Dihydroxyvitamin D ₃ , Art. D1530-1MG	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
DAPI 1:1000, MBD0015-5ML	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) GlutaMAX™, Art. 31966047	GIBCO® Life Technologies, Darmstadt
fötales Kälberserum (FCS), Art. F7524	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
MeOh Art. 1060091011,	Merck, Darmstadt

Tabelle 12: Verwendete Utensilien und Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben

Beschreibung	Hersteller/Herkunft
Cell culture Companion Plates – 24 well	Corning, Inc, New York, USA
FluoroBlok™ 24-Multiwell Insert Systems, PET Membrane, 8 µm	Corning, Inc, New York, USA
xCELLigence Platten 96-well e-plate	Acea Biosciences INC., San Diego, USA
xCELLigence Station RTCA SP instrument	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz

Der xCELLigence-Proliferationsassay ermöglicht die Überwachung des Wachstums und der Proliferation adhärenter FaDu-Zellen in Echtzeit. Der Assay verwendet dazu mit Gold beschichtete Mikroelektroden als spezielle Zellkulturplatten (sog. E-Plates). Die in diesen Platten ausgesäten Zellen breiten sich über den Boden der mit Goldelektroden beschichteten Wells aus und bilden so einen elektrischen Stromkreis mit der Elektrode. Wenn sich die Zellen teilen und vermehren, bedecken sie einen zunehmend größeren Teil der Elektrodenoberfläche, was die elektrische Impedanz über den Stromkreis erhöht. Dieser Impedanzanstieg wird vom xCELLigence-System in Echtzeit gemessen und in die einheitslose Größe des sog. „Zellindex“ überführt. Der Zellindex-Verlauf über die Zeit generiert so eine kontinuierliche Wachstumskurve für die Zellen. Abbildung 16 bildet die mechanistischen Grundlagen des xCELLigence-Proliferationsassays ab.

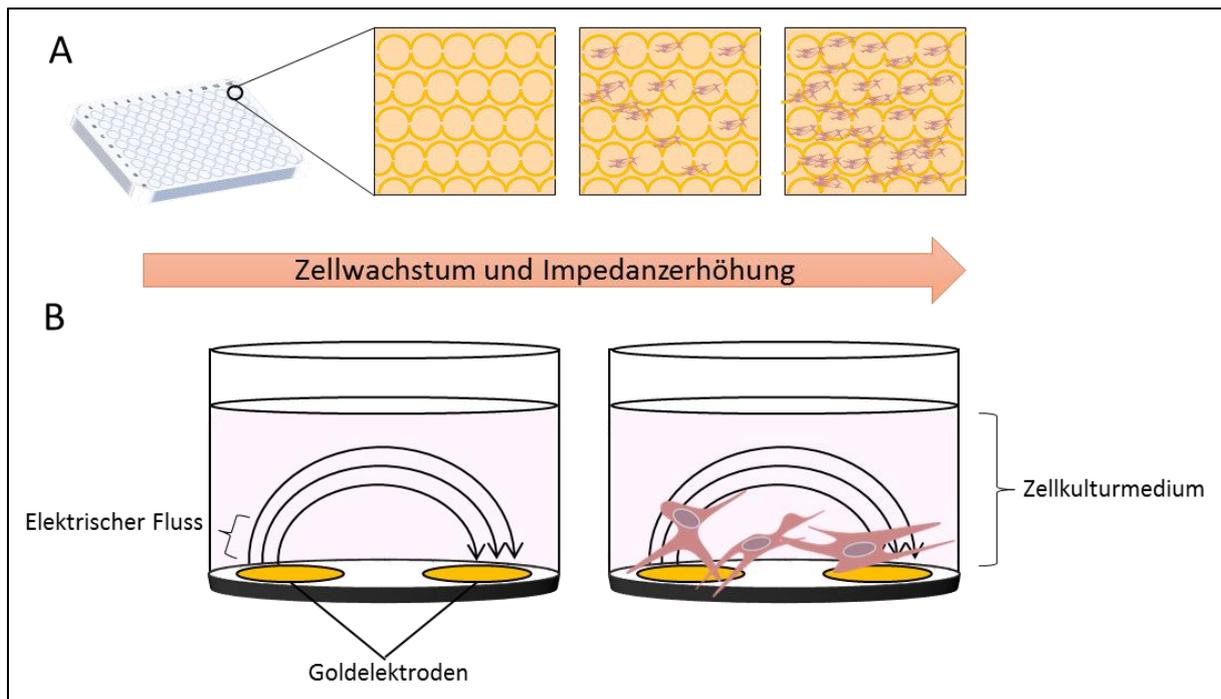


Abbildung 16: xCELLigence-Proliferationsassay

(A) Gold beschichtete Mikroelektroden dienen den FaDu-Zellen als spezielle Zellkulturplatten (sog. E-Plates). (B) Mit zunehmendem Zellwachstum und zunehmender Proliferation nehmen die HNSCCs-Zellen mehr Raum ein und erhöhen den elektrischen Widerstand zwischen den Goldelektroden. Durch den gemessenen Impedanzanstieg kann ein einheitsloser Zellindex generiert werden.

Im Kontext der Zellmigration wurde ein kompartimentiertes Multiwellplattensystem (Boyden-Chamber Assay) verwendet, welches die verschiedenen Zellbehandlungsgruppen beinhaltet. Das FluoroBlok-System nutzt eine spezielle Membran zur Untersuchung der Zellmigration. Diese Membran besteht aus einem transparenten Polykarbonatfilm mit einer fluoreszenzdichten Beschichtung und definierten Porengrößen der Größe 8 μm .

Durch die fluoreszenzdichte Beschichtung der Membran ist es möglich, die *bottom-reading* Fluoreszenzmikroskopie anzuwenden. Dabei wird das Fluoreszenzsignal von der Unterseite der Membran erfasst, was eine Echtzeitbeobachtung und Quantifizierung der Zellmigration ermöglicht. Dabei ist die Menge migrierter Zellen umgekehrt proportional zum Fluoreszenzsignal, da die Zellen, welche die Poren der Membran passieren, das Signal blockieren.

Im FluoroBlok-Assay werden die zu untersuchenden Zellen auf die Oberseite der Membran gebracht. Die Kammer wird mit Nährmedium der Konzentration 0,1 % FCS gefüllt. Auf der Unterseite der Membran befindet sich ebenfalls ein Reservoir mit Nährmedium für die Zellen. Das Medium der Unterseite beinhaltet 10 % FCS, was als chemischer Lockstoff dient.

Die semi-automatisierte *bottom-reading* Fluoreszenzmikroskopie erfasst die Fluoreszenzsignale mit einem Detektor. Die Daten können direkt verwendet werden, um die Migrationsrate der Zellen zu quantifizieren.

Die Bilder, die durch die *bottom-reading* Fluoreszenzmikroskopie erzeugt werden, zeigen den Fortschritt der Zellmigration durch die Membran. Dabei wurden die migrierten Zellen mit DAPI Blau angefärbt und sichtbar gemacht. Damit konnte eine visuelle Beurteilung der migrierten Zellen erfolgen.

Im Rahmen der Versuchsreihe erfolgte initial die 96-stündige Behandlung von HNSCC-Zellen mit verschiedenen Vitamin D₃-Konzentrationen der Versuchsgruppen nach dem oben bereits beschriebenen Protokoll. Die Behandlungskonzentrationen wurden in vorangegangenen Experimenten ermittelt. Diese betragen 20 pg/ml, 60 pg/ml, 200 pg/ml, 2.000 pg/ml und 50.000 pg/ml. Als Kontrolle wurde die Behandlung mit 0,1 % DMSO herangezogen. Nach Abschluss der Behandlung erfolgte die Zellernte nach oben bereits geschildertem Protokoll. Die zu erntende Zellzahl betrug für den xCELLigence Proliferationsassay $7,5 \times 10^4$ Zellen und für den Migrationsassay $0,2 \times 10^6$ Zellen pro Behandlungsgruppe. Abbildung 17 illustriert den Aufbau des kompartimentierten Multiwellplattensystems (Boyden-Chamber Assay) und die *bottom-reading* Fluoreszenzmikroskopie des Migrationsassays.

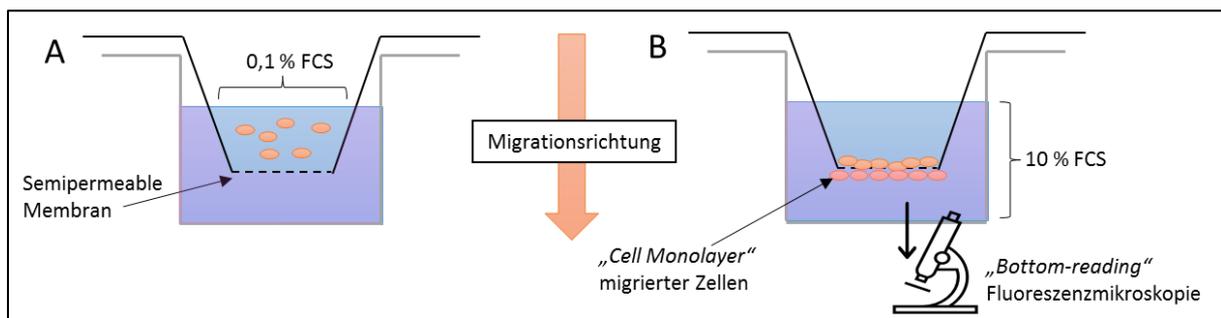


Abbildung 17: Multiwellplattensystem (Boyden-Chamber Assay)

(A) Schematischer Aufbau einer Migrationskammer in seitlicher Ansicht. Die HNSCC-Zellen wurden in die obere Kammer mit 0,1 % FCS gegeben. Die untere Kammer beinhaltet 10 % FCS als chemischen Lockstoff. Eine fluoreszenzdichte, semipermeable Membran mit definierten Porengrößen des Durchmessers 8 μm trennt beide Reaktionsräume. **(B)** Die migrierten Zellen bilden im unteren Reaktionsraum eine einzelne Zellschicht. Nach der DAPI-Kernfärbung können die Zellen mittels *bottom-reading* Fluoreszenzmikroskopie detektiert und ausgewertet werden.

Für das xCELLigence Proliferationsassay erfolgte vor dem Beginn der eigentlichen Messung eine Blank-Messung zum Nullabgleich. Dazu wurde 100 μl DMEM-Medium in jedes Well einer E96 xCELLigence-Platte mittels Elektropipette hinzugegeben und die Blank Messung gestartet. Nach Äquilibrieren auf 37 °C im CO₂-Inkubator wurden die Platten in die xCELLigence-Station eingesetzt und die Basislinienimpedanz gemessen. Der nach diesem Schritt gemessene Zellindex musste <0 betragen. Anschließend wurden je 50 μl Zellsuspension mit $7,5 \times 10^4$ FaDu-Zellen in jedes Well ausgesät, resultierend in einem Gesamtvolumen von 150 μl pro Well. Um eine ausreichende Absetzung der Zellen auf die Elektroden zu erreichen, wurde die erste Impedanzmessung 30 Minuten nach Aussäen der Zellen durchgeführt. Abhängig von der durch Zelladhäsion und Proliferation verursachten

Impedanz konnte ein Zellindex bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen werden. Der Untersuchungszeitraum betrug 50 Stunden, wobei die Impedanz in allen Wells alle 15 min gemessen wurde (insgesamt 2880 Messungen pro Well). Die erhaltenen Daten wurden mit der Software RTCA xCELLigence analysiert. Zur Beurteilung des Proliferationsverhaltens der verschiedenen Behandlungsgruppen wurde eine statistische Analyse der Steigung des Zellindex durchgeführt. Dazu wurde ein Zeitraum untersucht, im dem exponentielles Wachstum in allen Untersuchungsgruppen vorlag. Der geeignetste Zeitraum für alle 3 Replikate lag für diese Analyse zwischen Stunde 16 und Stunde 40. Es erfolgte eine lineare Regression mit der Software RTCA xCELLigence. Die Steigungen wurden anschließend mit dem Programm Prism 9 (GraphPad Software Inc., Boston MA, USA) ausgewertet.

Für die Zellmigration wurden FluoroBlok™ 24-Multiwell-Platten verwendet, in deren oberes Kompartiment (Inserts) je 5×10^4 Zellen in 500 μ l DMEM-Mediensuspension mit 0,1 % FCS und verschiedenen 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃-Konzentrationen ausgesät wurden. Die untere Kammer enthielt das gleiche Medium, jedoch unterschied sich die FCS-Konzentration deutlich. Diese betrug im unteren Kompartiment 10 % und fungierte somit als chemischer Lockstoff für die Migration der Zellen durch den Boden der Inserts, der von einer mit Poren durchsetzten Membran gebildet wurde. Während der Untersuchungszeit von 72 Stunden wanderten die Zellen durch die Poren der Membran in die untere Kammer. Nach Abschluss der Untersuchungszeit wurde das Medium aus allen Kompartimenten abgesaugt und die Inserts mit den migrierten Zellen an deren Unterfläche mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die an den Inserts haftenden Zellen mit MeOH bei -20 °C über 10 Minuten fixiert. Es erfolgte danach 3 Waschschrte über jeweils 3 Minuten mit PBS. Zum Schluss erfolgte die Färbung der Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, 1:1000) unter lichtgeschützten Bedingungen für 7 Minuten. Zuletzt erfolgte ein erneuter dreimaliger Waschschrte über jeweils 3 Minuten mit PBS zur Ablösung aller nicht fixierten Zellrückstände. Danach konnten die am Boden der Inserts fixierten und mit DAPI markierten Zellen mittels semi-automatisierter, *bottom-reading* Fluoreszenzmikroskopie detektiert und quantifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde das inverse Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse TE 2000-S Mikroskop, Nikon Corporation, Tokio, Japan) verwendet. Für jedes Well wurden 3 repräsentative Bildausschnitte detektiert und mit der Software NIS elements AR 3.0 (Nikon Corporation, Tokio, Japan) ausgewertet. Dazu wurde eine benutzerdefinierte Einstellung zur Größe und Fluoreszenzintensität einer migrierten FaDu-Zelle erstellt, anhand derer eine einzelne Zelle eindeutig identifiziert werden konnte. Es folgte die statistische Auswertung der Anzahl migrierter HNSCC-Zellen mittels Prism 9.

3.5 Tierexperimenteller Versuchsteil

Der tierexperimentelle Versuchsteil gliederte sich in **zwei Versuchsabschnitte**. Der **Mausvorversuch** untersuchte über 22 Wochen verschiedene Futterkonzentrationen von Vitamin D₃ und dessen potenzielle toxische Wirkungen im immunkompetenten, für die nachfolgenden Versuche verwendeten Mausstamm C57BL/6NRj. Der **Maushauptversuch** verwendete die ermittelten Futterkonzentrationen zur Analyse der antitumoralen Wirkungsweise und der immunmodulatorischen Wirkweise von Vitamin D₃ im oralen 4NQO-Karzinogenese-Modell an immunkompetenten männlichen C57BL/6NRj-Mäusen.

Tabelle 13: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben

Benötigte Chemikalien	Hersteller/Herkunft
0,9 % NaCl-Lösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
4-Nitrochinolin-1-oxid (4NQO) Art. MFCD00006738	Sigma-Aldrich, USA
Isofluran Piramal, PZN: 9714675	Piramal Critical Care Deutschland GmbH, Halberghaus
Ketaminhydrochlorid Ursotamin® 100 mg/ml	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg
Propylene Glycol	Sigma, USA
Vitamin D ₃ -Futter (verschiedene Konzentrationen)	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage
Xylazin 20 mg/ml	WDT e.G., Garbsen, Germany

Tabelle 14: Verwendete Utensilien und Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben

Beschreibung	Hersteller/Herkunft
Espen-Einstreu	Tapvei Estonia OÜ, Harjumaa, Estonia
Feinwaagen BP 61, BP 4100	Sartorius, Göttingen
IVC-Mauskäfig Blue Line	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg
Maus Käfig Deckel, Art. MS2	Innovive, San Diego, CA, USA
Maus Käfig Futterraufe Art. M.FEED.P	Innovive, San Diego, CA, USA
Maus Käfig Unterteil, Art. M-BTM-C8	Innovive, San Diego, CA, USA
Medipoint 5X200 Goldenrod Animal Lancet GR-5 mm, Art. 13454406	Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Materialien und Methoden

Mouse Rat 25-OH Vitamin D ELISA, Art. VID21-K01	Eagle Bioscience Inc., Amherst, NH, USA
Probengefäß 1,3ml/Z, Art. 41.1392.005	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Tränkeflasche 260 ml, Art. ACBT0262	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg
Tränkeflaschen, Aquavive, Art. M-WB-300	Innovive, San Diego, CA, USA
Tränkekappe 65 mm, Art. ACCP6521	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg
Zählwaage, EMB 500-1GN	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Zentrifuge 5804R	Eppendorf SE, Hamburg

3.5.1 Mausvorversuche: Tiere und Futter, venöse Blutentnahme

Alle Tierversuche wurden vorher durch Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes vom Landesamt für Verbraucherschutz genehmigt (Versuchsnummer 12-2021).

Im Rahmen des tierexperimentellen Mausvorversuchs wurden in einem 22-wöchigen Zeitraum immunkompetente, männliche C57BL/6NRj-Mäuse mit unterschiedlichen Vitamin D₃-Futterkonzentrationen gefüttert. Dabei wurden wesentliche Parameter wie Gewicht, Serumkonzentration und Allgemeinbefinden aufgezeichnet. Ziel dieser Beobachtungen war es für das sich anschließende orale Karzinogenese-Modell an immunkompetenten Mäusen gut verträgliche Vitamin D₃-Futterkonzentrationen zu etablieren, die zu einem suffizienten und über den Versuchszeitraum stabilen Anstieg der 25-OH Vitamin D₃-Serumkonzentrationen der Tiere führen. Darüber hinaus wurden systemische toxische Effekte zu hoher Vitamin D₃-Serumwerte organspezifisch und im Gesamtorganismus untersucht. Die verwendete Spezialdiät wurde zuvor extern durch die Firma Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG eigens für die Versuche hergestellt. Hinsichtlich der Futterkonzentrationen orientierten wir uns an durch andere Arbeitsgruppen, wenn auch für andere Mausstämme, publizierten Richtwerten (Gorman *et al.*, 2013; Takiishi *et al.*, 2014; Romualdo *et al.*, 2017; Verma *et al.*, 2020).

Zu Versuchsbeginn betrug das Versuchsgewicht der 8 Wochen alten männlichen C57BL/6NRj-Mäuse zwischen 22 und 25 Gramm. Die ausschließlich männliche Auswahl der Tiere diente dem Zweck der Repräsentativität. Wie oben bereits beschrieben sind männliche Individuen insgesamt deutlich häufiger Risikofaktoren wie Rauchen und Alkohol exponiert und entwickeln dementsprechend häufiger invasive HNSCCs. Zudem sollte ein geschlechtsbedingtes Bias vermieden werden. Die Tiere wurden unter reinen Bedingungen in einem isolierten Bereich in Einmalkäfigen gehalten. Die Räumlichkeiten standen unter einem

12 Stunden Hell/Dunkel-Zyklus, um die natürliche physiologische zirkadiane Rhythmik zu simulieren. Für den Vorversuch wurden jeweils 4 Mäuse (n=4) mit 200.000 IU Vitamin D₃/kg (Käfig 1), 50.000 IU Vitamin D₃/KG (Käfig 2) und Low-Dose Vitamin D₃ (=0 IU/Kg) gefüttert (Käfig 3). Eine Übersicht über den Versuchsablauf und die durchgeführten Maßnahmen sind in Abbildung 18 dargestellt.

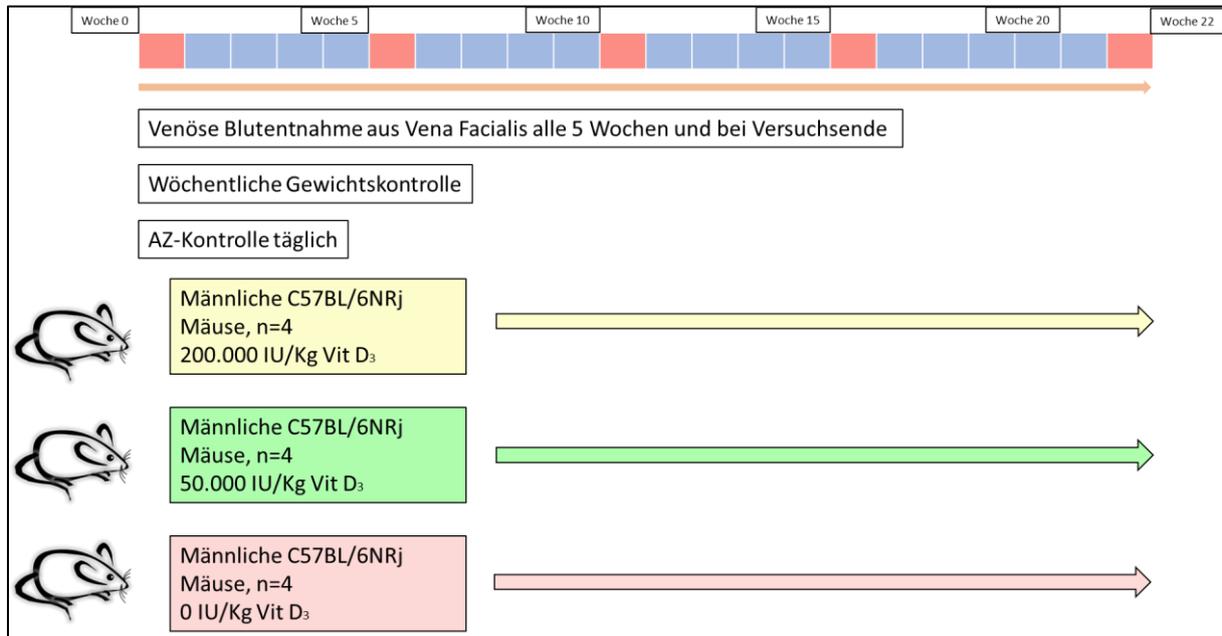


Abbildung 18: Orale Vitamin D₃-Supplementation im Mausmodell:

Für die Ermittlung der optimalen Vitamin D₃-Futterkonzentrationen im Mausmodell wurden männliche C57BL/6NRj-Mäuse für insgesamt 22 Wochen mit unterschiedlichen Vitamin D₃-Konzentrationen im Futter behandelt. Es wurden täglich AZ-Kontrollen durchgeführt und einmal wöchentlich das Gewicht bestimmt. Zur Ermittlung des Vitamin D₃-Serumspiegels wurde alle 5 Wochen ca. 150-200 µL venöses Blut aus der *Vena facialis* entnommen.

Die Tiere wurden in sterilen Einmalkäfigen bei durchgehender Raumtemperatur von 21 °C gehalten. Zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur und zum Nestbau wurde den Tieren mehrere Lagen Zellstoff in den Käfig zugegeben. Um eine übermäßige toxische Ammoniakbildung im Käfig zu verhindern, wurden die Käfige täglich zwecks Ventilation für mindestens 5 Minuten geöffnet. Während der täglichen Routinekontrolle erfolgte eine klinische Begutachtung des Allgemeinzustandes der Tiere. Augenmerk wurde auf Erkundungsverhalten, Nestbauverhalten und Piloerektion (Schmerzverhalten) gelegt. Es erfolgte ein wöchentlicher Wechsel der Einmalkäfige, um Schadstoffe und Erreger innerhalb der anfallenden Mäuseexkrememente zu reduzieren. Dabei erfolgte ebenfalls der Einstreuwechsel. Um zusätzlichen Stress und damit einhergehende Aggressivität bei der Umsetzung in neue Käfige zu vermeiden, wurden teilweise vertraute Zellstofftücher mit umgelagert. Im Sinne des „*Environmental Enrichment*“ erhielten alle Käfige ein Plastik-Häuschen oder eine Plastik-Röhre, die zusammen mit dem Einstreu und den Zellstofftüchern als Grundlage eines Nestbaus und als Rückzugsmöglichkeit dienten.

Die Mäuse erhielten Wasser und das mit Vitamin D₃ behandelte Futter *ad libitum*. Es erfolgte eine wöchentliche Gewichtsbestimmung. Venöses Blut wurde zu Versuchsbeginn, danach alle 5 Wochen und schließlich bei Versuchsende entnommen. Die venöse Blutentnahme erfolgte am wachen Tier unter mechanischer Fixierung und manueller Punktion der *V. facialis* bei gestauten Halsvenen. Es erfolgte eine Entnahme von jeweils maximal 150-200 µL Vollblut. Zur Kompensation wurden den Tieren im Anschluss an die Blutentnahme subkutan 1 ml 0,9 % NaCl-Lösung injiziert.

Im Anschluss an die venösen Blutentnahmen wurden die Serumröhrchen mit ca. 150-200 µL Vollblut zur weiteren Analyse bei 14.000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Danach hatte sich die korpuskulären Blutbestandteilen am Boden des Gefäßes abgesetzt. Durch vorsichtiges Pipettieren wurde der Überstand, das Serum, in Kryoröhrchen überführt und bis zur weiteren Analyse bei -82 °C gelagert. Die mindestens erforderliche Serummenge zur folgenden ELISA Analyse zur Bestimmung der 25-OH Vitamin D₃-Serumkonzentration betrug 70 µL. Der zelluläre Überstand wurde verworfen.

3.5.2 Operative Organentnahme

Nach 22-wöchiger Versuchsdurchführung wurden sämtliche Tiere mit einer letalen Dosis Ketamin/Xylazin (100/5,0 mg/kg i.p.) getötet und anschließend der operativen Aufarbeitung zugeführt. Dazu wurde jede Maus mittels 27 Gauge Kanülen an jeder Extremität auf einer Korkplatte fixiert. Zusätzlich erfolgte die capitäre Fixation mit Hilfe eines weiteren Fixationspunktes durch die Nase. Anschließend erfolgte eine großflächige antiseptische Desinfektion des gesamten Operationsgebietes mit 70 % Ethanol. Die intraoperative Darstellung eines Maussitus ist in Abbildung 19 gezeigt.

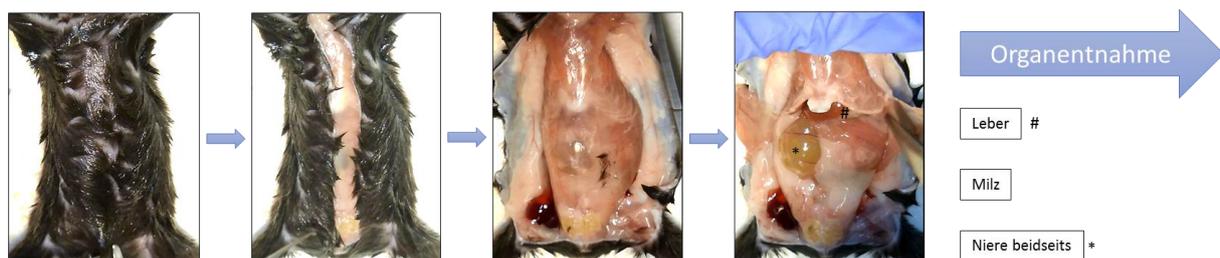


Abbildung 19: Operationsdurchführung und makroskopische Beurteilung

Nach Töten der Tiere und Fixation erfolgte die schrittweise Präparation des abdominalen Situs. Dazu erfolgte initial eine großflächige Desinfektion. Danach wurde die obere Bauchdecke und anschließend das Peritoneum gespalten. Vor weiterer Organentnahme erfolgte die makroskopische Beurteilung der Bauchorgane. Die dargestellte Operation entspricht einem Tier aus der Behandlungsgruppe mit 200.000 IU/Kg Vitamin D₃. Auf dem Bild ganz rechts mit (*) gekennzeichnet zeigt sich eine massiv, zystisch erweiterte rechte Niere. Die Leber mit (#) gekennzeichnet manifestiert sich bei weiterer Präparation blutig verändert. Die Milz ist in dieser Darstellung nicht zu sehen.

Initial wurde vorsichtig die abdominelle Bauchhaut unter Schonung des Peritoneums entlang der Linea alba von kaudal nach kranial eröffnet. Nach makroskopischer Beurteilung des Situs

erfolgte anschließend die Eröffnung des Peritoneums. Im nächsten Schritt erfolgte die makroskopische Beurteilung der intraabdominellen Organe. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Nieren gelegt. Nach operativer Präparation und Absetzen wurde zur Quantifizierung eine Messung der Organgröße durchgeführt. Es wurden für alle Tiere die linke und rechte Niere, die Leber und Milz entnommen. In jeder Versuchsgruppe wurde weiterhin bei einem Tier Herz, Lunge und Gehirn entnommen. Es erfolgte die Einbettung der Organe in Formalin zur weiteren Probenpräparation.

Mit dem nachfolgenden QR-Code aus Abbildung 20 kann die komplette OP-Aufzeichnung eines repräsentativen Tiers (K1M3) aus der 200.000 IU/Kg Behandlungsgruppe aufgerufen werden:



Abbildung 20: Sektion von einer Maus aus der 200.000 IU/Kg Behandlungsgruppe

Es zeigte sich intraoperativ eine deutliche Reduktion von intraabdominellen Fettreserven sowie eine massive zystische Erweiterung der Nieren. Milz und Leber stellten sich ebenfalls makroskopisch verändert dar.

3.5.3 Orale 4NQO-induzierte Karzinogenese im immunkompetenten Mausmodell

Im Rahmen der biologischen Modellierung der Tumorinduktion und Tumorprogression von HNSCCs wurde das orale 4NQO-Karzinogenese-Modell an immunkompetenten C57BL/6NRj-Mäusen durchgeführt. Dazu wurden 3 Versuchsgruppen mit unterschiedlichen Vitamin D₃-Futterkonzentrationen gebildet. Die verwendeten Vitamin D₃-Futterkonzentrationen wurden in den vorangegangenen Vorversuchen ermittelt (s. Kapitel 3.5.1). Jede Versuchsgruppe beinhaltete n=12 männliche Tiere des Stamms C57BL/6NRj. Die Futterkonzentrationen entsprachen für Verumgruppe 1 und 2 jeweils 50.000 IU/Kg bzw. 7.500 IU/Kg (Vitamin D₃ pro kg Futter). Die Kontrollgruppe erhielt entsprechend den Vorversuchen Low-Dose Vitamin D₃ mit 0 IU/Kg Futter. Die Tiere wurden in individuell belüfteten Käfigsystemen (IVC) der Firma Tecniplast zu jeweils 4 Tieren pro Käfig gehalten. Die Raumtemperatur entsprach 21 °C. Der Allgemeinzustand der Tiere wurde täglich durch ausgebildete Tierpfleger des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie untersucht. Die Mäuse erhielten in den ersten 16 Wochen

mit 50 µg/ml 4NQO versetztes Wasser *ad libitum*. Ab Woche 16 folgte die Bereitstellung von 4NQO freiem Wasser (s. Abbildung 21). Die Tiere erhielten das Vitamin D₃ behandelte Futter über den gesamten Versuchszeitraum von 22 Wochen *ad libitum*. Das 4NQO-haltige Wasser wurde alle 7 Tage neu angesetzt, das Futter wurde alle 5 Tage ausgewechselt. Das Gewicht der Tiere wurde parallel dazu alle 5 Tage kontrolliert und aufgezeichnet. Ab Woche 10 wurde eine wöchentliche Fotodokumentation der enoralen und endopharyngealen Schleimhaut unter Isofluran-Narkose durchgeführt, da in diesem Schleimhautbereich eine Tumorinduktion ab diesem Zeitraum zu erwarten war, basierend auf bisherigen Publikationen zu diesem Tumormodell (Vincent-Chong *et al.*, 2019; Verma *et al.*, 2020). Zuvor erfolgte die Fotodokumentation bei nur geringer Wahrscheinlichkeit von Schleimhautveränderungen in diesem Versuchsabschnitt alle 5 Wochen. Venöses Blut wurde alle 5 Wochen, zu Beginn und bei Versuchsende entnommen. Eine venöse Blutentnahme erfolgte am wachen Tier unter mechanischer Fixierung und manueller Punktion der *Vena facialis* bei gestauten Halsvenen. Es erfolgte eine Entnahme von 150-200 µL Vollblut. Zur Kompensation wurde im Anschluss 1 ml 0,9 % NaCl-Lösung subkutan injiziert.

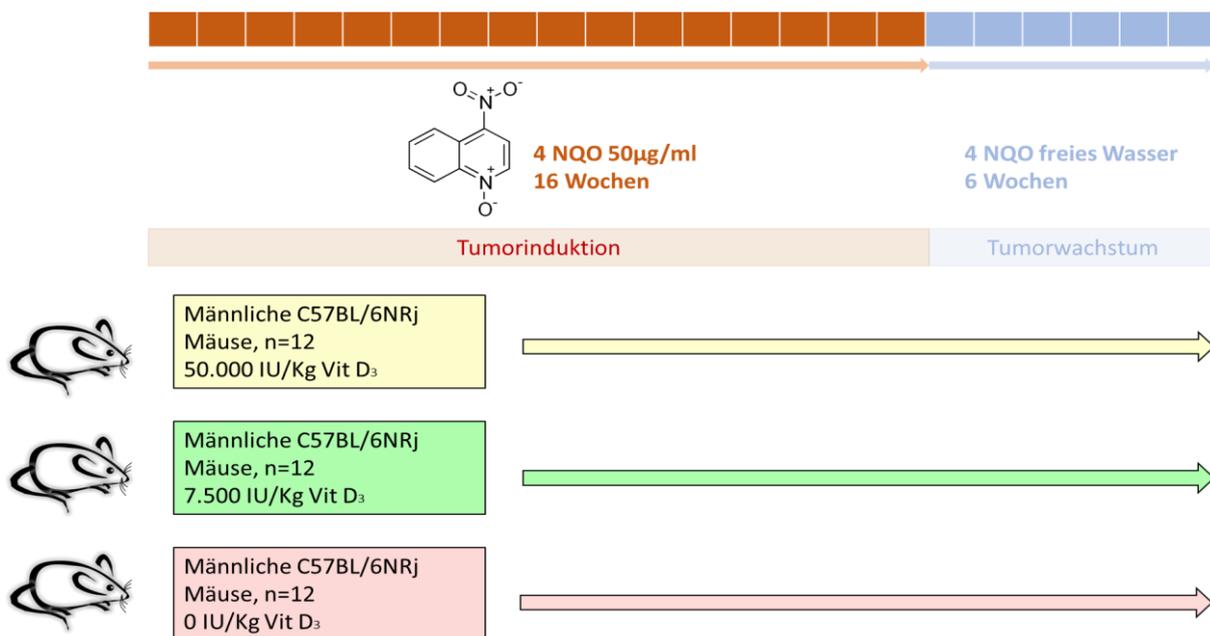


Abbildung 21: Versuchsaufbau des oralen 4NQO-Karzinogenese-Modells an immunkompetenten Mäusen

Im Rahmen der Erhebung der enoralen Befunde wurde wöchentlich eine Isoflurannarkose durchgeführt. Dazu wurde jedes Tier für ca. 1 Minute in eine Box mit 3 % Isofluran angereicherte Luft geführt. Anschließend erfolgte unter vorsichtiger Kieferöffnung die klinische Inspektion von hartem Gaumen, weichem Gaumen, Backentaschen, Zunge, Zungengrund und Zungenunterseite. Parallel dazu wurde jede Untersuchung fotografisch dokumentiert.

Abbildung 22 zeigt das zeitliche Voranschreiten der enoralen Karzinogenese an einem Beispieltier.

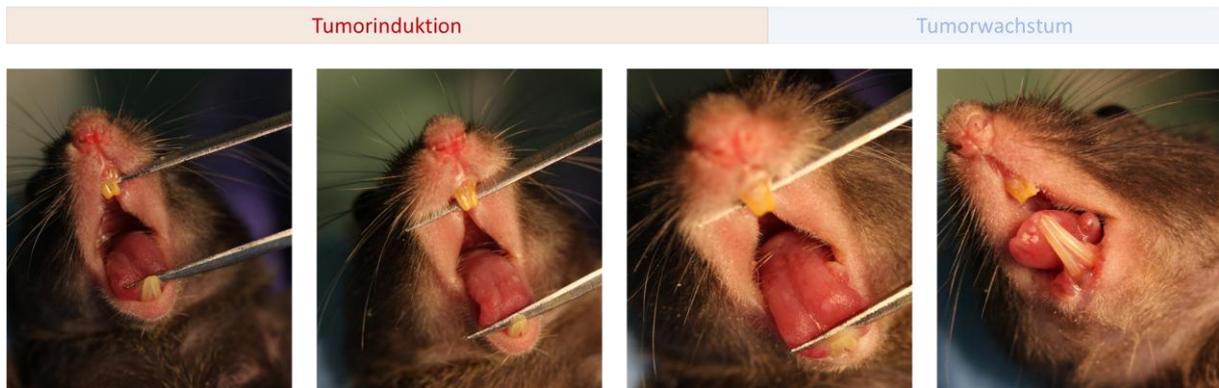


Abbildung 22: Fotografische Dokumentation der enoralen Befunde unter Isofluran-Narkose

Man erkennt initial Leukoplakie-artige Veränderungen der Zunge, die im weiteren Versuchsablauf zu exophytischen Tumoren wurden.

Nach 22-wöchiger Versuchsdurchführung wurden sämtliche Tiere mit einer letalen Dosis Ketamin/Xylazin (100/5,0 mg/kg i.p.) getötet und anschließend der operativen Aufarbeitung zugeführt. Dazu wurde jede Maus mittels 27 Gauge Kanülen an jeder Extremität auf einer Korkplatte fixiert. Zusätzlich erfolgte die capitäre Fixation mit Hilfe eines weiteren Fixationspunktes durch die Nase. Anschließend erfolgte eine großflächige antiseptische Desinfektion des gesamten Operationsgebietes mit 70 % Ethanol. Im Rahmen der operativen Präparation wurde initial ein cervikaler Hautschnitt in der Medianebene gesetzt, der anschließend scharf mit einer Schere erweitert wurde. Es folgte anschließend die Darstellung von der ausgeprägten Kaumusculatur. Danach wurde der Unterkiefer scharf zwischen den Schneidzähnen gespalten (*midline split*). Dies ermöglichte eine übersichtliche Darstellung der gesamten Mundhöhle und des Rachens. Im Anschluss erfolgte die Entnahme von sämtlichen Tumoren des Mundraumes mit der gesamten Zunge, nachdem zuvor durch eine sorgfältige Inspektion des Mund-Rachen-Raums mit einer Lupenbrille die Anzahl der makroskopisch sichtbaren Tumore bestimmt und dokumentiert wurde. Dazu wurde eine systematische Examination von Zunge, Zahnfleisch, hartem Gaumen, weichem Gaumen, Mundboden und Rachen durchgeführt. Die makroskopisch, exophytisch sichtbaren Tumoren wurden *in situ* mit Hilfe eines digitalen Messschiebers in Länge und Breite vermessen. Das anschließend errechnete Tumolvolumen ergab sich aus der Annahme, dass die Tumore morphologisch rotationselliptisch konfiguriert sind. Damit konnte man unter Anwendung folgender Formel in Abhängigkeit der Länge (A) und Breite (B) ein Tumolvolumen errechnen (bei Einsetzen der Längen- und Breitenmaße in mm ergibt sich das Tumolvolumen in mm³ bzw. µl).

$$\frac{A \times B \times B}{2}$$

Anschließend erfolgte die Entnahme von Nieren, Milz und Leber. Sämtliche Organe und Tumoren wurden unmittelbar nach der Entnahme zur weiteren Probenpräparation in Formalin fixiert.

Mit Aufrufen des folgenden QR-Codes aus Abbildung 23 kann man die gesamte Dissektion mit Darstellung und Resektion der enorale Tumore als Video ansehen. Das gezeigte Tier wies dabei deutliche enorale Tumorbefunde auf und stammte aus der Versuchsgruppe mit 0IU/Kg Vitamin D₃.



Abbildung 23: Sektion von einer Maus aus der 0 IU/Kg Behandlungsgruppe

Es zeigten sich nach Durchtrennung der Mandibula deutlich exophytisch wachsende tumoröse Läsionen an der linken Zungenunterseite.

3.6 Immunhistochemische Analyse

Tabelle 15: Verwendete primäre Antikörper mit Herstellerangaben und Verdünnung

CD3	Hase, Abcam, UK, Art. ab215212	1:5000
CD8	Hase, Abcam, UK, Art. ab209775	1:2000
CD163	Hase, Abcam, UK, Art. ab182422	1:750
NKRp16	Hase, Abcam, UK, Art. ab289553	1:100
FOXP3	Hase, Abcam, UK, Art. ab215206	1:75

Tabelle 16: Herstellung des Demaskierungspuffer (pH 6)

Komponenten:	Konzentration:
Lösung A	4,5 ml
Lösung B	20,5 ml
H ₂ O bidest	225 ml

Tabelle 17: Herstellung der Substrat-Chromogen-Lösung

Komponenten:	Konzentration:
DAB+ Substrat-Puffer	1 ml
DAB+ Chromogen	20 µL

Die Immunhistochemie (IHC) ist ein Verfahren, welches eine direkte oder indirekte Detektion von Antigenen in Gewebeschnitten ermöglicht. Das Prinzip beruht auf Antikörpern, die spezifische Epitope im Gewebe binden und über fluoreszierende Marker, Enzyme oder Radioaktivität diese Zielstrukturen sichtbar machen. In den Versuchen im Rahmen der vorgelegten Dissertation wurde das indirekte Nachweisverfahren angewendet. Dazu wurden primäre Antikörper gegen oben genannte Mausgewebe-Epitope verwendet, die konsekutiv durch das Dako EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit sichtbar gemacht wurden.

Nach der Entnahme der Mausorgane wurden die Gewebeproben in PBS-gepuffertem 4 % Formalin über mindestens 24 Stunden gegeben und anschließend in Paraffin eingebettet. Im Rahmen der Gewebefixation zur Bewahrung der Integrität des Gewebes sowie zum Verhindern von Befall durch Pilze oder Bakterien wurde der Reagenz-Transfer-Prozessor Tissue-Tek®VIP™5 JR verwendet. Dabei erfolgte die automatisierte Gewebedehydratation durch Hinzugabe von Alkohol in aufsteigenden Konzentrationen. Die dehydratisierten Proben konnten im Anschluss zur weiteren Gewebestabilisierung in Paraffin eingebettet werden. Die folgende Tabelle beschreibt die automatisierten Schritte der Probenfixierung.

Tabelle 18: Paraffineinbettung mit Tissue-Tek®VIPTM5 JR

Reagenz	Temperatur (°C)	Dauer (Minuten)
4 % Formalin/1xPBS	45	120
70 % Ethanol	40	30
70 % Ethanol	40	60
70 % Ethanol	40	60
96 % Ethanol	40	30
99 % Ethanol	40	60
99 % Ethanol	40	60
Xylol	40	60
Xylol	40	60
Xylol	40	60
Paraffin	60	30
Paraffin	60	30
Paraffin	60	60
Paraffin	60	60

Materialien und Methoden

Nach der automatisierten Einbettung der Gewebeproben erfolgte das Schneiden der hergestellten Probenblöcke (Formalin-fixed Paraffin embedded tissue, FFPE) mittels Rotationsmikrotom. Dazu wurden initial 3 Gewebeschnitte der Dicke 10 µm verworfen, um anschließend 3 µm dicke Schnitte zur weiteren Verarbeitung zu generieren. Die Schnitte wurden anschließend in einem warmen Wasserbad zur Entfaltung aufgefangen und auf Objektträger übertragen. Die Objektträger mit Gewebeproben wurden über Nacht bei 37 °C zur weiteren Analyse getrocknet.

Am Folgetag wurden die Präparate zur Paraffinextraktion drei Mal in Xylol eingetaucht. Die Proben wurden dazu zunächst für 30 Sekunden und danach jeweils zwei Mal für 10 Minuten behandelt. Anschließend wurden die Gewebeproben für jeweils 30 Sekunden drei Mal in 99 % Ethanol, dann drei Mal in 70 % Ethanol eingelegt und schließlich mit H₂O_{bidest} abgespült. Anschließend erfolgte die Epitop-Demaskierung. Dazu wurde der zuvor angesetzte Citratpuffer (pH 6) auf 95 °C in einer Kunststoffküvette in der Mikrowelle erhitzt. Die Präparate wurden in den aufgekochten Demaskierungspuffer überführt und im Wasserbad für 30 Minuten bei 95 °C demaskiert. Im Anschluss wurden die Präparate aus dem Wasserbad entnommen und bei Raumtemperatur auf 50 °C abgekühlt. Danach erfolgte die dreimalige Spülung mit PBS Waschpuffer (pH 7,2) für jeweils 5 Minuten. Unspezifische Bindungen wurden durch die anschließende Inkubation der Präparate mit 3 % BSA in PBS (pH 7,2) für 30 min blockiert. Die Blockierlösung wurde im Anschluss abtropfen gelassen. Dann erfolgte die Inkubation der Präparate mit dem jeweiligen primären Antikörper. Für jedes Präparat wurden jeweils Negativ- und Positiv-Kontrollen durchgeführt. Anstelle des primären Antikörpers wurden die Negativkontrollen mit ausschließlich mit PBS/1 % BSA inkubiert. Danach erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit PBS (pH 7,2) für jeweils 5 Minuten. Anschließend erfolgte die Hinzugabe von 3-4 Tropfen des HRP-gekoppelten (Horseradish-Peroxidase) sekundären Antikörpers pro Objektträger. Es folgte ein erneuter dreifacher Waschschrift mit PBS Waschpuffer (pH 7,2) für jeweils 5 Minuten. Danach folgte die Inkubation mit Substrat-Chromogen-Lösung für 25 Minuten. Die Lösung wurde vor Inkubation frisch angesetzt. Nach erfolgter Chromogen-Inkubation wurden die Objektträger erneut mit H₂O_{bidest} für 5 Minuten gespült. Anschließend wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 9 Minuten durchgeführt. Es folgte eine konsekutive 10-minütige fließende Wässerung.

Schließlich erfolgte eine erneute Dehydratation durch die dreimalige Spülung mit 70 % Ethanol und Xylol. Zuletzt erfolgte die Eindeckung mit Entellan. Die eingedeckten Proben wurden schließlich über Nacht unter den Abzug gestellt und getrocknet. Am Folgetag waren die IHC-Präparate bereit zur mikroskopischen Analyse.

3.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Tabelle 19: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben

Beschreibung	Hersteller/Herkunft
Hämatoxylin-Lösung nach Mayer, Art. MHS32-1L	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Eosin, Art. 1159350100	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Eisessig 100 %, Art. 64-19-7	Merck KGaA, Darmstadt, Germany

Zur mikroskopischen Organ- und Tumoruntersuchung wurde die HE-Färbung verwendet. Diese ist die am weitesten verbreitete pathologische Färbemethode weltweit. Die Färbung setzt sich aus 2 wesentlichen Färbeschritten zusammen: Zuerst färbt der natürliche Farbstoff Hämatoxylin die Zellkerne blau. Eosin färbt das extranukleäre Zytoplasma und insbesondere acidophile Bestandteile rot.

Ein Großteil der asservierten Präparate wurden von der Medizin-technischen Assistentin Ulrike Bechtel bearbeitet und gefärbt. Die Objektträger mit den eingebetteten Gewebeschnitten wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet und anschließend zur Paraffinextraktion drei Mal in Xylol eingetaucht. Die Proben wurden dazu zunächst für 30 Sekunden und danach jeweils zwei Mal für 10 Minuten behandelt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für jeweils 30 Sekunden drei Mal in 99 % Ethanol, dann drei Mal in 70 % Ethanol eingelegt und schließlich mit H₂O_{bidest} abgespült. Nach der Entfernung der Paraffinreste waren die Präparate für die weitere Färbung zugänglich. Initial wurden die Objektträger für 9 Minuten in Hämatoxylin-Lösung inkubiert und anschließend mit Leitungswasser abgespült. Danach wurden die Objektträger mit Eisessig abgespült, um Färbereste zu entfernen. Es folgte ein 10-minütiger Waschschriff unter fließendem Leitungswasser zum Nachbläuen. Hiernach erfolgte die Gegenfärbung mit Eosin für 30 Sekunden. Es schloss sich ein erneuter Waschschriff unter fließendem Leitungswasser an, bis die gesamte Farbe ausgewaschen war. Die Objektträger wurden schließlich einer aufsteigenden Ethanolreihe mit 3 mal 70 % und danach 3 mal 100 % Ethanol zugeführt. Es folgten 3 aufeinanderfolgende Xylolbäder, bevor die Objektträger mit Entellan eigedeckt wurden und der weiteren mikroskopischen Analyse zugänglich waren.

3.8 ELISA zur 25-OH Vitamin D₃-Serumkonzentrations-Analyse

Tabelle 20: Verwendete Utensilien und Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben

Beschreibung	Hersteller/Herkunft
<u>Mouse/Rat 25-OH Vitamin D ELISA Assay Kit</u> Komponenten:	Eagle Biosciences Amherst, New Hampshire

Materialien und Methoden

Vitamin D Antikörper versetzte 96-Wells Mikrotiterplatte HRP-Streptavidin Biotinyliertes Vitamin D Analogon Assay Puffer ELISA Wasch-Puffer ELISA HRP Substrat ELISA Stop-Lösung Vitamin D Kalibrator-Lösungen Vitamin D Kontroll-Lösungen	
Mikrotiterplatten-Reader infinite 200pro	Tecan, Männedorf, Schweiz
Transferpette® (1000 µl, 100 µl, 10 µl), Art. 704780, 704774, 704770	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim

Zur Bestimmung der 25-OH Vitamin D₃-Serumspiegel wurde das Mouse/Rat 25-OH Vitamin D ELISA Assay Kit von Eagle Biosciences verwendet. Die Analysemethode wurde sowohl für den Mausvorversuch als auch für den Maushauptversuch genutzt. Die Darstellung des Auftragungsschemas und die Ermittlung der Kalibrierungskurve werden im Folgenden nur für den Vorversuch dezidiert beschrieben. Die Analyse für den Hauptversuch erfolgte exakt nach dem gleichen Protokoll.

Für alle folgenden Schritte galt, dass diese unter lichtgeschützten Verhältnissen stattfinden mussten, um potenzielle, labilisierende Effekte der beteiligten Moleküle zu verhindern. Initial wurden jeweils 25 µL Kalibrator-Lösung, Kontroll-Lösung und Serumproben in die vorgesehenen Wells einer 96-Well-Platte des Kits pipettiert. Für die konsekutive Probenanalyse war eine zweifache Probenauftragung und die anschließende Ermittlung des gemessenen Mittelwertes erforderlich. Anschließend wurde jedes Well mit 100 µL Vitamin-D-Assay-Puffer bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert. Die Inkubation erfolgte auf einem ELISA-Plattenschüttler mit 170 U/min. Im Anschluss folgten 5 zyklische Waschrinne, bei der jeweils 350 µL Waschpuffer auf jede Probe gegeben und schließlich abgesaugt wurde. Es schloss sich eine 30-minütige Inkubation mit jeweils 100 µL biotinyliertem Vitamin D-Analogon in jedem Well an. Danach erfolgte die 5-fache Wiederholung des oben genannten Waschrinnes. Im Anschluss wurde 100 µL Streptavidin-HRP auf jede Probe hinzugegeben und danach 20 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Nach erneuten 5 Waschrinnes nach oben genanntem Schema wurde 100 µL TMB-Reagenz zu jeder Probe hinzugefügt und bei diesem Schritt 20 Minuten statisch inkubiert. Zuletzt wurde zum Reaktionsstopp 100 µL der ELISA-Stopplösung in jedes Well gegeben. Die konsekutive Extinktionsanalyse der Proben bei 450 nm erfolgte im Anschluss.

Zur Analyse der relativen Absorptionskapazität jeder Probe wurde der errechnete Mittelwert aus jeweils 2 Auftragungen in benachbarten Wells der Probe herangezogen. Gleiches galt für Kalibrator-Lösungen und Kontroll-Lösungen. Für jedes ELISA-Assay Kit musste die

Kalibrierungskurve neu ermittelt werden. Die ermittelten 25-OH Vitamin D₃-Konzentrationen der mitgegebenen Kontroll-Lösungen sollten in einem bestimmten Bereich der zuvor ermittelten Kalibrierung liegen. Zur Auftragung der 5 erhaltenen Serumproben jeder Maus wurden folglich insgesamt 120 Wells benötigt. Um die Analyse der Low-Dose Behandlungsgruppe durchzuführen, wurde eine neues Kit verwendet und somit ebenfalls eine neue Kalibrierung durchgeführt. Abbildung 24 zeigt das Probenauftragungsschema, es wird deutlich, dass jedes Kit eine eigene Kalibrierung beinhaltet.

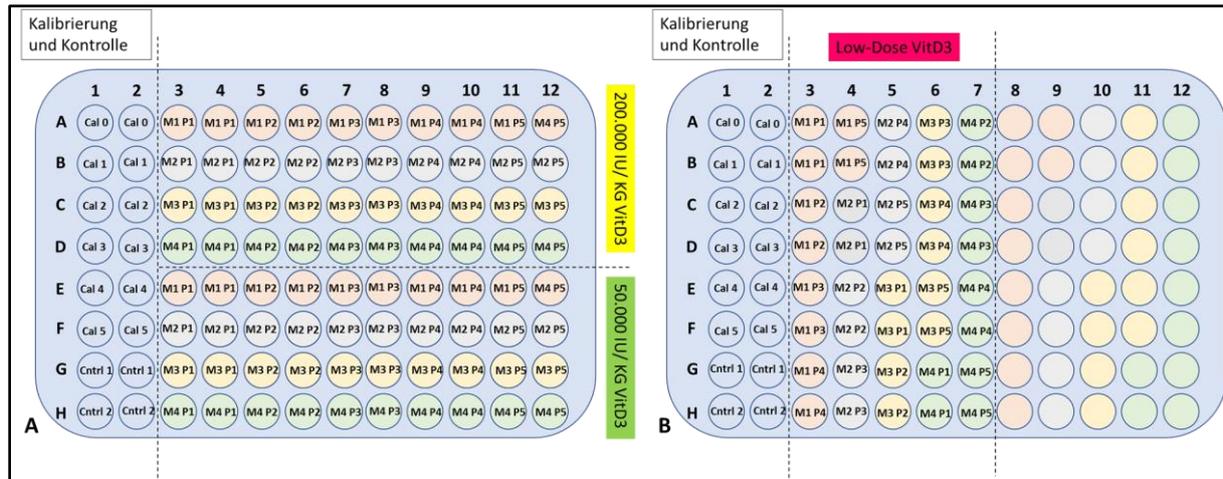


Abbildung 24: Kalibrierung und Probenladeschema der 96 Well Platten

Alle 5 Serumproben pro Tier wurden zweifach aufgetragen. **(A)** zeigt das Ladeschema für die Behandlungsgruppen von 200.000 IU/Kg Vitamin D₃ und 50.000 IU/Kg Vitamin D₃. **(B)** zeigt das Ladeschema der Proben aus der Low-Dose Behandlungsgruppe.

Das Funktionsprinzip des Mouse/Rat 25-OH Vitamin D ELISA Assay Kits entspricht einem inversen ELISA-Verfahren. Die wesentlichen Schritte werden orientierend anhand von Abbildung 25 erläutert: **1** Immobilisierte Antikörper gegen 25-OH-Vitamin D₂/D₃ werden in den Vertiefungen der 96 Wells Mikrotiterplatte fixiert. Nach dem Herauslösen von Vitamin D₃-Metaboliten aus Proteinbindungen innerhalb des Serums werden die Serumproben und damit das freie 25-OH Vitamin D₃ auf den Wells inkubiert. Es kommt nun zu einer spezifischen Bindung der Antikörper mit 25-OH Vitamin D₃. **2** Anschließend werden die noch freien Bindungsstellen (abhängig von der 25-OH Vitamin D₃-Konzentration in der Probe) mit biotinyliertem Vitamin D₃ besetzt. **3** Im Folgenden werden sämtliche Proben mit HRP-konjugiertem Streptavidin inkubiert, welches spezifisch Biotin bindet und intrinsische Enzymaktivität besitzt. **4** Im letzten Schritt erfolgt die Zugabe eines geeigneten HRP-Substrates, was in ein detektierbares Signal umgesetzt wird. Das HRP gekoppelte Streptavidin katalysiert die Umwandlung eines zuvor farblosen Chromogen in ein farbiges, quantifizierbares Endprodukt. Es handelt sich somit um eine kompetitive Immunoassaymethode. Durch die zuvor blockierten Bindungsstellen durch 25-OH Vitamin D₃ aus dem Serum findet an entsprechenden Lokalisationen keine Substratumwandlung statt. Es resultiert somit eine

inverse Korrelation zwischen der Absorption bei 450 nm und der 25-OH Vitamin D₃-Probenkonzentration.

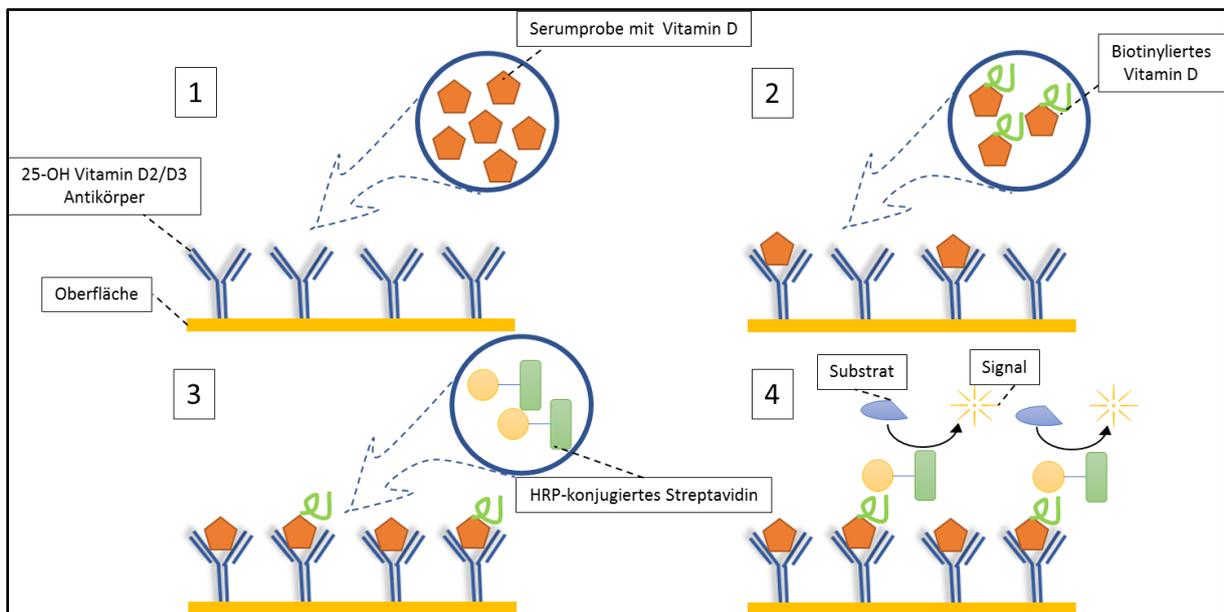


Abbildung 25: Funktioneller Mechanismus der Vitamin D₃-Detektion mit Hilfe von ‚Mouse/Rat 25-OH-Vitamin D ELISA Assay Kit‘

Die Schritte 1-4 zeigen die Fixierung der 25-OH Vitamin D₃ Moleküle und die konsekutive Detektion mittels Horseradish-Peroxidase Reaktion.

Vor Interpretation der relativen Extinktionswerte erfolgte die interne Kalibrierung auf definierte Probenwerte und Kalibrierungslösungen. Nach stattgehabter Kalibrierung und Vergleich mit Eichlösungen konnte die relative Absorption der Probenwerte mit denen der Kalibratoren verglichen werden. Die erhaltenen Werte wurden mit Hilfe einer mathematischen Annäherung beschrieben und konnten in direkt ablesbare Serumwerte übersetzt werden.

3.8.1 Extinktionsanalyse bei 450 nm

Die Probenanalyse erfolgte anschließend in einem spektrophotometrischen Mikroplatten-Reader von Tecan (Tecan infinite 200pro). Bei kurzzeitiger Belichtungszeit von wenigen Sekunden wurden durch das Analysegerät verschiedene Absorptionsstärken der Kalibrierungs-Lösungen und der Proben ermittelt. Man erhielt eine tabellarische Darstellung der verschiedenen Proben-Absorptionen in Form des vorher gewählten Auftragungsschemas. Anhand definierter Vitamin D₃-Konzentrationen innerhalb der Kalibrierungslösungen und den entsprechenden Absorptionen ließ sich eine Kalibrierungskurve darstellen, anhand derer man die Vitamin D₃-Probenkonzentration ermitteln konnte. Zum Nachvollziehen der erhaltenen Werte wurden diese für die durchgeführten Versuche in Abbildung 26 und 28 abgebildet.

Materialien und Methoden

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,82509995	2,02130008	0,56489998	0,54119998	0,0839	0,0837	0,0923	0,0992	0,1004	0,0841	0,1124	0,1063
B	1,44149995	1,755	0,7184	0,66159999	0,1006	0,0968	0,104	0,112	0,0905	0,0871	0,1109	0,1176
C	0,95130002	1,15209997	0,66659999	0,6591	0,0923	0,0916	0,1312	0,1188	0,0906	0,0876	0,13259999	0,14139999
D	1,31719995	1,40289998	0,71859998	0,69330001	0,0873	0,0853	0,12540001	0,14049999	0,0991	0,0985	0,1065	0,114
E	0,2615	0,2471	0,82029998	1,00929999	0,13789999	0,13689999	0,1463	0,1525	0,15970001	0,1699	0,16859999	0,1665
F	0,1214	0,12729999	0,76950002	0,7705	0,1367	0,13339999	0,1382	0,1472	0,2748	0,28169999	0,2277	0,2411
G	1,17700005	1,31060004	0,87080002	0,8829	0,15369999	0,1543	0,1354	0,138	0,1441	0,1534	0,1408	0,1399
H	0,31650001	0,3926	0,8355	0,75459999	0,1227	0,1166	0,193	0,1841	0,24789999	0,2297	0,2437	0,27379999

Abbildung 26: Spektrophotometrische Messung der Absorption bei 450 nm, Gruppe 200.000 IU/Kg und 50.000 IU/Kg

Analog der Pippetierschemata sind nun die relativen Absorptionen der Proben aufgetragen. Diese Datentabelle entspricht dem Versuch 1 und damit den Proben von Hochdosis-Vitamin D₃-Behandlungen mit 200.000 IU/Kg und 50.000 IU/Kg. Spalte 1 und 2 entsprechen den Kalibrierungs-Lösungen und den Kontrollen.

Mit Hilfe der erhaltenen Kalibratorwerte musste man für jedes ‚Mouse/Rat 25-OH-Vitamin D ELISA Assay Kit‘ eine neue Kalibrierungskurve erstellen. Dazu trug man die einzelnen Punktwerte auf und näherte diese mit einer geeigneten mathematischen Gleichung an. Die mitgegebenen Kontrollen dienten als Referenzwerte und sollten möglichst nahe an der angenäherten Kurve liegen. Für die Kontrolllösungen waren jeweils Bereiche angegeben, welche tolerierbar sind. In Abbildung 27 erkennt man, dass Kontrolllösung 1 genau innerhalb der vorgegebenen *Range* lag, während Kontrolle 2 leicht abweichend oberhalb der angegebenen *Range* lag. Insgesamt eignete sich die Kurve dennoch gut zur Ermittlung der Vitamin D₃-Spiegel. Abbildung 29 zeigt die Kalibrierungskurve für die 0 IU/Kg Behandlungsgruppe.

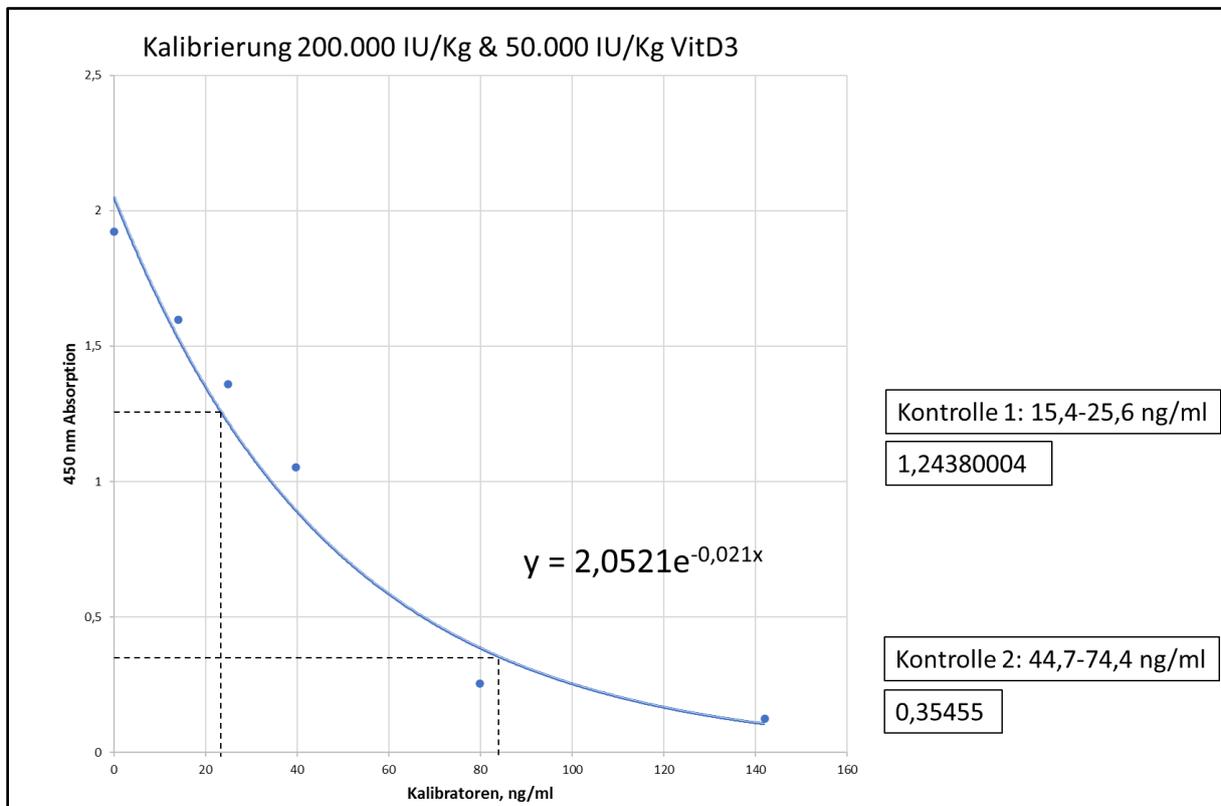


Abbildung 27: Kalibrierungskurve für Serumproben der Gruppe 200.000 IU/Kg und 50.000 IU/Kg Vitamin D₃

Der Graph stellt eine mathematisch angenäherte Exponentialfunktion zur Kalibrierung der Proben dar. Auf der Y-Achse ist die relative einheitslose Absorption bei 450 nm aufgetragen. Auf der x-Achse befindet sich die 25-OH Vitamin D₃-Konzentration der Kalibrator-Lösungen in ng/ml.

Das gleiche Analyseverfahren wurde für die Low-Dose Behandlungsgruppe durchgeführt. Das Prozedere wird an dieser Stelle nicht erneut erläutert. Die Extinktionen und die Kalibrierungskurve sind dennoch auch für diese Behandlungsgruppe zum Nachvollziehen der Werte dargestellt.

<>	1	2	3	4	5	6	7
A	2,35170007	2,37080002	0,89889997	1,47130001	1,17610002	1,3326	1,79610002
B	1,82130003	1,94379997	0,92210001	1,51400006	1,18490005	1,29610002	1,85259998
C	1,47370005	1,32239997	1,60710001	0,8301	1,94519997	1,29869998	2,10689998
D	1,39979994	1,22099996	1,54449999	0,83950001	1,77939999	1,27760005	2,13840008
E	0,33930001	0,29370001	1,40180004	1,12870002	0,91390002	1,60880005	2,0079999
F	0,1163	0,1089	1,69669998	1,33150005	1,0474	1,87940001	2,10050011
G	1,78989995	1,76929998	1,92279994	1,27740002	1,2493	0,96740001	1,7802
H	0,50199997	0,52689999	1,95659995	1,16289997	1,15999997	0,96210003	1,78900003

Abbildung 28: Spektrophotometrische Messung der Absorption bei 450 nm Low-Dose Gruppe

Analog zum oben gezeigten Pippetierschema sind die Proben paarweise aufgetragen und die relative Absorption wurde bei 450 nm gemessen. Spalte 1 und 2 entsprechen Kalibrierung und Kontrolllösung. Die Werte entsprechen denen des Auftragungsschemas.

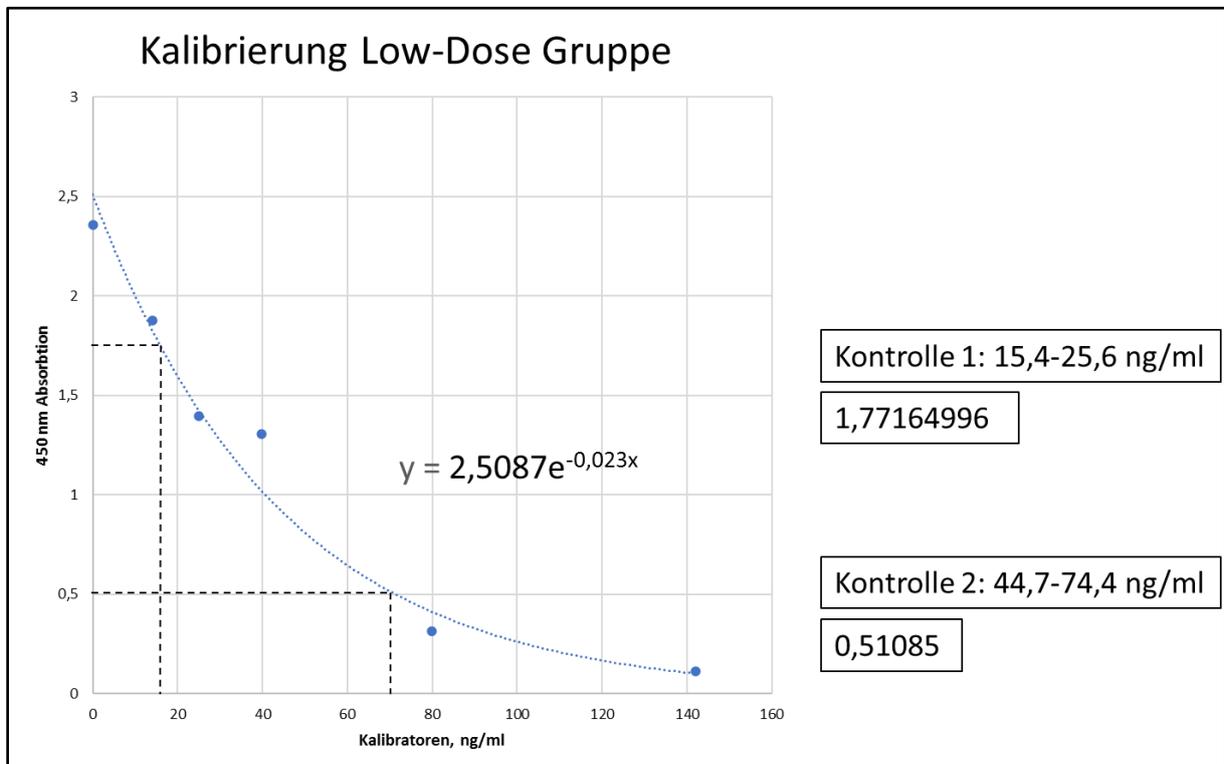


Abbildung 29: Kalibrierungskurve für Serumproben der Low-Dose Gruppe

Der Graph stellt eine mathematisch angenäherte Exponentialfunktion zur Kalibrierung der Proben dar. Auf der Y-Achse ist die relative einheitslose Absorption bei 450 nm aufgetragen. Auf der x-Achse befindet sich die 25-OH Vitamin D₃ Konzentration der Kalibrator-Lösungen in ng/ml.

Man erkennt, dass Kontrolllösung 1 und 2 innerhalb der vorgegebenen *Range* lag. Die Annäherung eignete sich daher gut zur Ermittlung der Vitamin D₃-Serumwerte.

3.9 Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen wurde die Software Prism 9 (GraphPad Software Inc., Boston MA, USA) verwendet. Die zu analysierenden Werte wurden initial auf Gaußsche-Normalverteilung überprüft. Dazu wurde der Anderson-Darling-Test, der D'Agostino & Pearson-Test, der Shapiro-Wilk-Test und der Kolmogorov-Smirnov-Test verwendet. Wenn die ausgewerteten Daten in ≥ 2 der oben genannten Tests eine Normalverteilung aufwiesen, wurden parametrische Tests als statistische Tests verwendet (ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur bzw. einseitiger ANOVA-Test). Wenn die Daten ≥ 2 der oben genannten Normalitätstests nicht bestanden, wurden nicht-parametrische Tests verwendet (Mann-Whitney-U-Test bzw. Kruskal-Wallis-Test). P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen ($\alpha = 0,05$). Statistisch signifikante Ergebnisse sind in den Abbildungen mit Sternchen gekennzeichnet: (*) entspricht $p < 0,05$, (**) entspricht $p < 0,01$, (***) entspricht $p < 0,005$. Nicht signifikante Ergebnisse sind mit n.s. gekennzeichnet. Die statistischen Tests, die für die jeweiligen Versuche verwendet wurden, sind jeweils in den Legenden der Abbildungen angegeben.

4. Ergebnisse

4.1 Zellkulturversuche: Behandlung von UM-SCC1-Zellen mit 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃

Im Rahmen von Zellkulturversuchen wurden die molekularen Wirkweisen einer Vitamin D₃ Gabe in humanen HNSCC-Zelllinien untersucht. Dabei wurden UM-SCC1-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃ über den Zeitraum von 96 Stunden behandelt. Im Anschluss wurden die behandelten Zellen einer Western-Blot Analyse und einer RNA-Sequenzierung zugeführt. Zur Untersuchung antiproliferativer Effekte von Vitamin D₃ in HNSCC-Zellen wurde ein Migrations- und Proliferationsassay durchgeführt.

4.1.1 Western-Blot Analyse

Zur internen Validierung der suffizienten 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Zellbehandlung im Sinne der spezifischen Beeinflussung der Expression von Vitamin-D₃-Reportergenen wurde ein Western-Blot durchgeführt. Der Western-Blot diente somit als Behandlungskontrolle vor der sich anschließenden RNA-Sequenzierung.

Im initialen Versuchsdurchgang wurden neben der 0,1 % DMSO-Kontrollgruppe und 50.000 pg/ml Vitamin D₃-Behandlungsgruppe zwei Replikate der 60 pg/ml Vitamin D₃-

Ergebnisse

Behandlungsgruppen untersucht. Es zeigte sich in allen untersuchten Proben eine Laufbandenfront des VDR-Signals bei 48 kDa und eine Laufbandenfront des β -Aktin-Signals bei 42 kDa, wie in Abbildung 30 dargestellt. Die Banden der untersuchten Moleküle liefen in der zu erwartenden Laufhöhe. Die initiale visuelle Beurteilung zeigte in allen 4 Replikaten eine deutliche Zunahme der Signalintensität von VDR in der 50.000 IU/Kg Behandlungsgruppe im Vergleich zur DMSO-Kontrolle und 60 pg/ml Vitamin D₃-Behandlungsgruppe. In der rein visuellen Beurteilung konnte keine Aussage über eine potenzielle gesteigerte Expression von VDR in der 60 pg/ml Vitamin D₃-Behandlungsgruppe gegenüber der 0,1 % DMSO-Kontrollgruppe beobachtet werden. Die Beurteilung des β -Aktin-Signals zeigte in den jeweiligen Replikaten 1 und 2 der verschiedenen Behandlungsgruppen recht heterogene Signalintensitäten, was auf unterschiedliche Probenauftragungsmengen zurückzuführen war. Die Replikate 3 und 4 zeigten in Verum- und Kontrollgruppe jedoch recht homogene Signalintensitäten von β -Aktin. Es zeigte sich auch in diesen Replikaten eine deutliche Zunahme des VDR-Signals in der 50.000 pg/ml Vitamin D₃-Behandlungsgruppe.

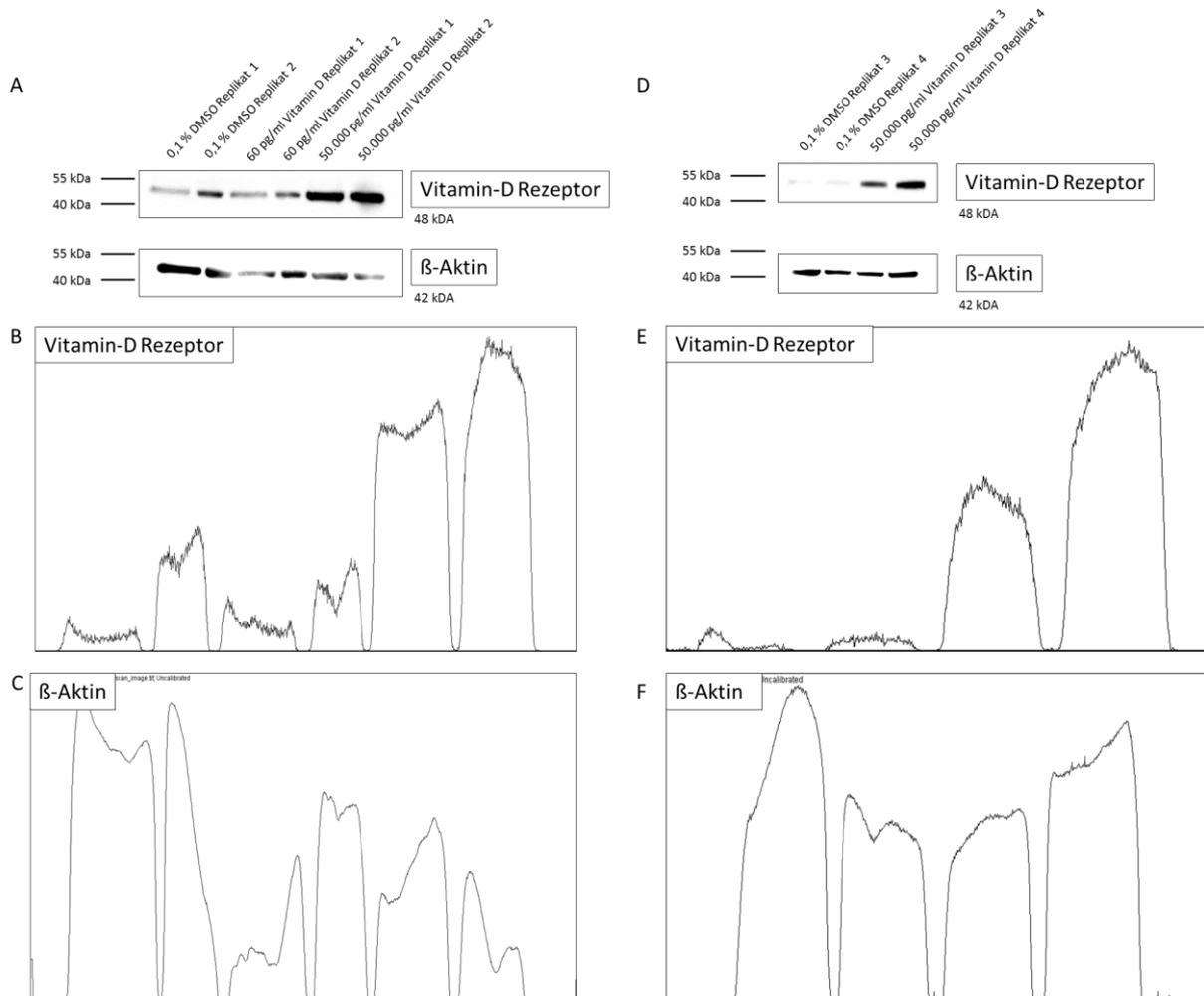


Abbildung 30: Western-Blot der Replikate 1-4 nach 96-stündiger 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Behandlung

(A) Das Bänderungsmuster der Replikate 1 und 2 zeigt eine deutlich gesteigerte Signalintensität des VDR in den 50.000 pg/ml 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Behandlungsgruppen. Zur Normalisierung der

Ergebnisse

Auftragungsmenge wurde das β -Aktin Signal erhoben. **(B)** und **(C)** zeigen die grafische Auswertung der Signalintensitäten der jeweiligen Proben mit Hilfe der *Area under the curve* (AUC). Dabei entspricht jede Kurve der darüberliegenden Bande. **(D)** Replikate 3 und 4 zeigten in den 50.000 pg/ml 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Behandlungsgruppen eine deutliche Steigerung des VDR-Signals im Vergleich zur 0,1 % DMSO-Kontrolle. **(E)** und **(F)** zeigen die grafische Auswertung der Probensignale mit Hilfe von *Area under the curve*. Jede Kurve entspricht der darüber liegenden Bande.

Nach erfolgter Detektion mit dem ChemoCam Imager (Intas Science Imaging) erhielt man das in Abbildung 30 (A) und (D) dargestellte Bänderungsmuster der Zielproteine. Zu erkennen ist eine deutliche Signalzunahme der Intensität von VDR auf Höhe von 48 kDa ausgehend von Kontrollbehandlung zur Behandlungsgruppe mit 50.000 pg/ml 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃. Im Sinne der Ladekontrolle wurde das β -Aktin Signal erhoben, welches auf der Laufhöhe bei 42 kDa zu detektieren ist. Zur konsekutiven quantitativen Datenerhebung wurden die Signale grafisch ausgewertet und mit Hilfe von ImageJ als isolierte Kurven dargestellt. Die *Area under the curve* war proportional zur quantitativen Proteinexpression. Es zeigte sich, wie auch bereits die rein visuellen Beurteilung vermuten ließ, eine deutliche Steigerung des VDR-Signals in der 50.000 pg/ml 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Behandlungsgruppe. Das β -Aktin Signal schien recht inhomogen in den Replikaten 1 und 2 zu sein, während sich die Kurven und die entsprechende *Area under the curve* in Replikaten 3 und 4 recht ähnlich waren. Zur direkten Vergleichbarkeit der Signalintensitäten von VDR wurden die Absorptionswerte auf die jeweiligen β -Aktin Absorptionswerte normiert.

Die erhaltenen Quotienten dienten der nachfolgenden statistischen Analyse. Zur Analyse wurde initial eine Testung auf Normalverteilung der Werte durch die Tests nach D'Agostino & Pearson, Anderson-Darling, Shapiro-Wilk und Kolmogorov-Smirnov durchgeführt. Es zeigte sich bei nicht vorhandener Normalverteilung der Wertegruppen statistische Unterschiede im Expressionsniveau von VDR (s. Abbildung 31 (A)). Zur weiteren Analyse wurde somit der Mann-Whitney Test bei nicht parametrischen Werten durchgeführt.

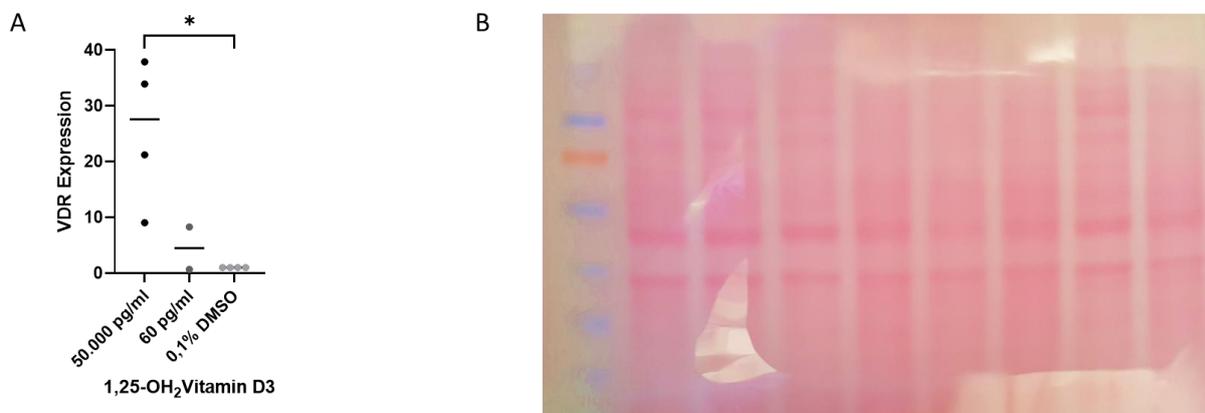


Abbildung 31: VDR-Expressionen nach 96-stündiger Vitamin D₃-Behandlung

(A) Darstellung der relativen Absorption der verschiedenen Behandlungsgruppen: Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der VDR-Expression in der 50.000 pg/ml Behandlungsgruppe. **(B)** Färbung nach Ponceau: Zur quantitativen Probenauswertung wurde die Ponceau-Färbung durchgeführt.

Es zeigte sich ein signifikanter ($p=0,0286$) Unterschied im Expressionsniveau von VDR zwischen der 50.000 pg/ml Vitamin D₃-Verumgruppe und der 0,1 % DMSO-Kontrollgruppe. Die Expression wurde dabei durchschnittlich in der Behandlungsgruppe mit 50.000 pg/ml um das 25,51-fache gesteigert. Ebenfalls konnte eine Steigerung der Expression in der Behandlungsgruppe mit 60 pg/ml um den Faktor 4,47 gemessen werden. Es konnte aufgrund der geringen Probenzahl jedoch in der 60 pg/ml Behandlungsgruppe im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung 50.000 pg/ml und 60 pg/ml 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃ festgestellt werden ($p=0,13$). Als Referenz der relativen Absorption und damit des Expressionsniveaus diente jeweils die 0,1 % DMSO-Kontrollgruppe, die relative VDR-Expression wurde dabei auf 1 gesetzt.

Abbildung 31 (B) bildet die Darstellung des Bandenmusters nach Ponceau-Färbung ab. Durch die Farbintensität der Bänderung ließ sich auf die quantitative Probenauftragung schließen. Damit konnte eine Normalisierung der Proben und der zu untersuchenden Zielbanden erfolgen. Die Anwendung der Ponceau S-Färbung wurde in anschließenden Western-Blot Protokollen zur Probennormierung herangezogen.

Nach der internen Validierung der Probenbehandlung (s. Material und Methoden, Kapitel 3.2) wurden jeweils 4 Replikate der UM-SCC1-Zelllinie und 2 Replikate der FaDu-Zelllinie mit jeweils Zellklonen aus der 50.000 pg/ml 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Behandlungsgruppe und der 0,1 % DMSO-Kontrollgruppe zur RNA-Sequenzierung an die Firma GENEWIZ Germany GmbH (Leipzig) gesendet.

4.1.2 Ergebnisse der RNA-Sequenzierung

4.1.2.1 FaDu-Zelllinie

Zur qualitativen und quantitativen Auswertung der RNA-Sequenzierung wurden die durch die 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Behandlung regulierten Gene betrachtet. Nach vorangegangener biostatistischer Datenaufbereitung wie zuvor beschrieben konnte eine Aussage über das Expressionsniveau der Proben erfolgen. Die HNSCC-Zelllinien UM-SCC1 und FaDu wurden zuvor nach oben beschriebenem Protokoll (s. Behandlung der UM-SCC1-Zellen mit Vitamin D₃ über 4 Tage) behandelt. Die gezeigten Daten der FaDu-Zelllinie wurden zur Vervollständigung dieser Promotionsarbeit mit aufgenommen. Die zuvor durchgeführte Zellbehandlung der FaDu-Zelllinie wurde von Frau Dr. Sandrina Körner durchgeführt und in ihrer eigenen Dissertationsarbeit an der Universität des Saarlandes beschrieben.

Vorab wurde zur internen Probenvalidität die Probenähnlichkeit betrachtet. Zu diesem Zweck wurden Datenqualitätsbewertungen durchgeführt, um Proben zu erkennen, die für die jeweilige Gruppe nicht repräsentativ waren und daher die Qualität der Analyse beeinträchtigen könnten.

Ergebnisse

Die Gesamtähnlichkeit zwischen den Proben wurde durch den euklidischen Abstand zwischen den jeweiligen Proben bewertet. Diese Methode wurde verwendet, um zu untersuchen, welche Proben einander ähnlich/unterschiedlich sind und ob sie den Erwartungen aus dem Versuchsdesign entsprachen. Je kürzer der Abstand, desto enger waren die Proben verwandt. Die Proben wurden dann unter Verwendung des Abstands geclustert. Die Probenähnlichkeit wird in den Abbildungen 32 und 33 in (C) durch *Heatmaps* für die jeweiligen Versuche dargestellt. Bei maximaler Probenähnlichkeit zwischen Proben der gleichen Behandlungsgruppe war eine gute Datenqualität vorhanden.

Die Auswertung der *Clustering-Heatmap* lieferte ein sehr gutes Ergebnis im Sinne einer homogenen Probenähnlichkeit. Es zeigten sich für Replikate der gleichen Behandlungsgruppen geringe geclusterte Abstände, die durch ähnliche farbliche Blau-Kodierung dargestellt wurden. Dabei zeigte tiefblau den geringsten Probenabstand und weiß den größten Probenabstand an. Entsprechend der Auftragung zeigte sich zwischen Proben der gleichen Behandlung ein sehr geringer Abstand der Probenähnlichkeit (tiefblau, dunkle Farben) und zwischen Proben unterschiedlicher Behandlungsgruppen zeigte sich ein großer Probenabstand (weiße, helle Farben). Ein Dendrogramm an den entsprechenden Achsen stellte die Probenbeziehung zueinander dar. Folglich bestand in der Probenbiologie der jeweiligen Behandlungsgruppe und im Versuchsdesign eine gute Reliabilität. Anhand derer war die Voraussetzung zur Betrachtung der jeweiligen Gene und deren Expressionsniveaus gegeben. Nach Betrachtung der Probenvalidität im Sinne einer internen Qualitätskontrolle folgte die qualitative und quantitative Ergebnisdarstellung für die Einzelgene bzw. *-pathways*.

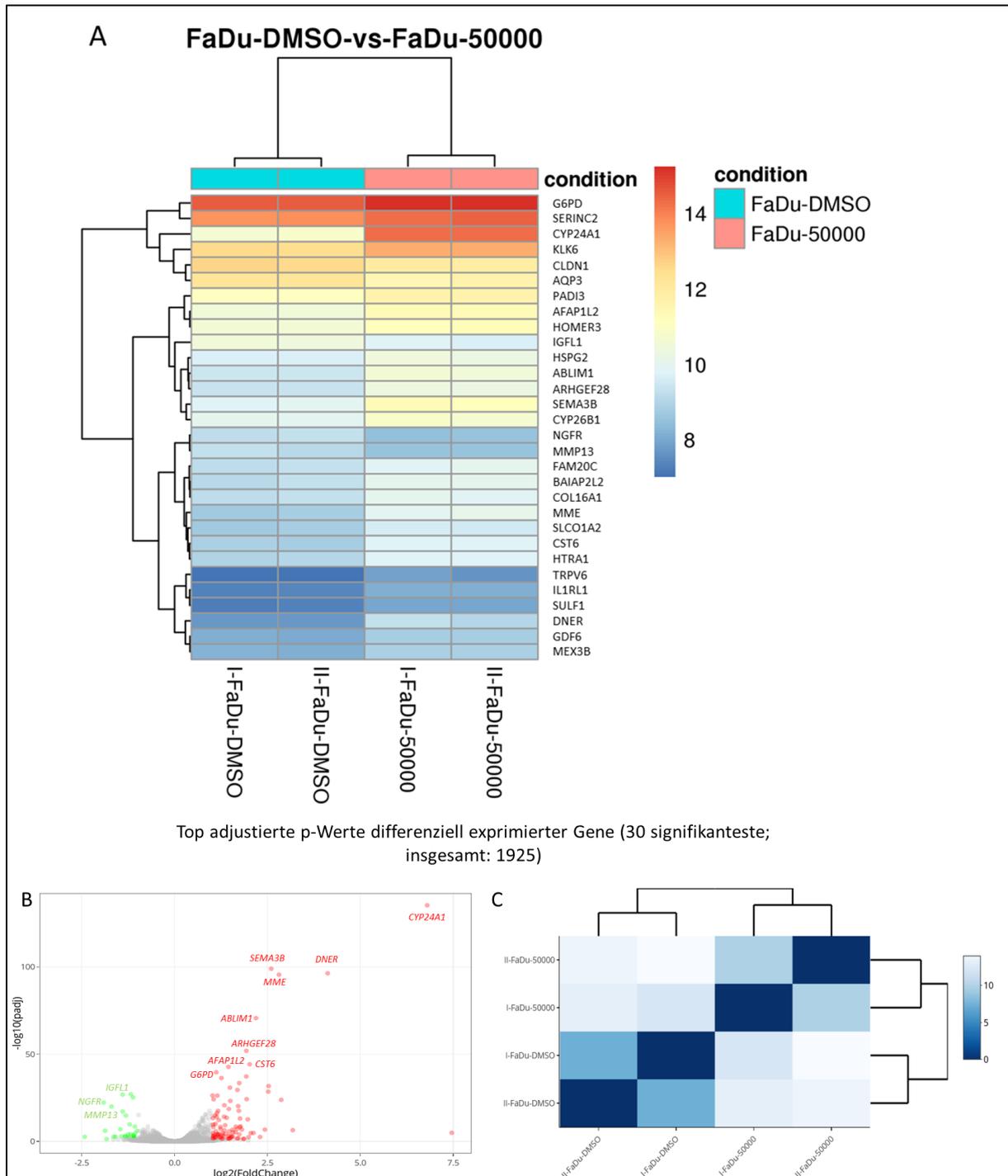


Abbildung 32: RNA-Sequenzierung der FaDu-Zelllinie

(A) Heatmap-Darstellung der Genexpression von 50.000 pg/ml 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Behandlung und DMSO-Kontrolle. **(B)** Volcano-Plot der signifikant regulierten Gene. **(C)** Heatmap zur internen Validierung der Probenähnlichkeit.

Eine *Bi-Clustering-Heatmap* (A) wurde verwendet, um das Expressionsprofil der 30 am stärksten differenziell exprimierten Gene zu visualisieren. Die Aufreihung von oben nach unten sortiert die Gene nach ihrem adjustierten p-Wert, indem ihre log₂-transformierten Expressionswerte aufgetragen wurden. Die *Heatmap* (A) in Abbildung 32 zeigte zwischen den Replikaten der FaDu-Zelllinie innerhalb einer Behandlungsgruppe eine sehr ähnliche Ausprägung der Genexpression, was für eine hohe interne Behandlungsvalidität sprach. Die

Ergebnisse

Analyse der RNA-Sequenzierung zeigte in der FaDu-Zelllinie insgesamt 1925 signifikant differenziell regulierte Gene durch die Behandlung mit 50.000 pg/ml 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃ im Vergleich zu der DMSO-Kontrollgruppe. Zu den 30 am signifikantesten regulierten Genen gehörten die in der Grafik rechts der *Heatmap* aufgelisteten Gene. Rot entsprach hierbei einem hohen Expressionslevel, blau entsprach einem niedrigen Expressionslevel. Nachfolgend sind die Gene nach dem adjustierten p-Wert der differentiellen Expression in der Vitamin D₃ Behandlungsgruppe absteigend aufgezählt: *G6PD*, *SERINC2*, *CYP24A1*, *KLK6*, *CLDN1*, *AQP3*, *PADI3*, *AFAP1L2*, *HOMER3*, *IGFL1*, *HSPG2*, *ABLIM1*, *ARHGEF28*, *SEMA3B*, *CY26B1*, *NGFR*, *MMP13*, *FAM20C*, *BAIAP2L2*, *COL16A1*, *MME*, *SLCO1A2*, *CST6*, *HTRA1*, *TRPV6*, *IL1RL1*, *SULF1*, *DNER*, *GDF6* und *MEX3B*.

Die differentiellen Expressionsmuster in der Vitamin D₃-Behandlungsgruppe im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe konnte zusätzlich mit einem *Volcano-Plot* in Abbildung 32 (B) visualisiert werden. Dabei repräsentiert jeder Datenpunkt im Streudiagramm ein Gen. Die log₂-fache Änderung des Expressionsniveaus eines Gens unter Vitamin D₃-Behandlung wird auf der x-Achse gezeigt. Die y-Achse zeigt den log₁₀ des adjustierten p-Werts. Gene mit einem adjustierten p-Wert von <0.05 wurden als signifikant reguliert betrachtet und farblich kodiert. Rot markierte Gene zeigten eine log₂-fache Änderung von >1 und zeigen damit eine verstärkte Genexpression. Grün markierte Gene zeigten eine log₂-fache Änderung von <-1 und damit signifikant herunterregulierte Genexpression. Besonders signifikante und stark regulierte Gene sind beschriftet. Hierbei zeigten sich die Gene *CYP24A1*, *DNER*, *SEMA3B*, *MME*, *ABLIM1*, *ARHGEF28*, *AFAP1L2*, *CST6*, *G6PD* durch die Vitamin D₃-Behandlung als am stärksten und am signifikantesten in der FaDu-Zelllinie gesteigert exprimiert. *IGFL1*, *NGFR*, *MMP13* zeigten sich hingegen am stärksten und am signifikantesten herunterreguliert. Insgesamt wurden deutlich mehr Gene in ihrem mRNA-Expressionslevel durch die Behandlung mit Vitamin D₃ induziert als herunterreguliert.

4.1.2.2 UM-SCC1-Zelllinie

Die RNA-Sequenzierung der UM-SCC1-Zelllinie bot insgesamt ein ähnliches Ergebnis-Bild. Initial wurde auch hier die Probenqualität durch die Probenähnlichkeits-Clusterung evaluiert. Die *Clustering Heatmap* (Abbildung 33 C) zeigt zur Analyse der Probenähnlichkeit innerhalb der Behandlungsgruppen eine große Homogenität. Die Auftragung mit Proben der gleichen Behandlungsreihe zeigte einen geringen Probenabstand zueinander und wurde farblich blau gekennzeichnet. Ein großer Probenabstand, wie es zwischen den verschiedenen Behandlungsreihen zu sehen war, stellte sich weiß dar. Insgesamt zeigte sich eine große

Ergebnisse

Probenähnlichkeit innerhalb der Behandlungsgruppen, was für eine hohe interne Reliabilität des Behandlungsprotokolls spricht.

Die *Heatmap* in Abbildung 33 (A) zeigte zwischen den Replikaten der UM-SCC1-Zelllinie innerhalb der Behandlungsgruppe eine sehr ähnliche Ausprägung der Genexpression, was für eine hohe interne Behandlungsvalidität sprach. Die Analyse der RNA-Sequenzierung zeigte in der UM-SCC1-Zelllinie insgesamt 591 signifikant differenziell regulierte Gene durch die Behandlung mit 50.000 pg/ml 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃ im Vergleich zu der DMSO-Kontrollgruppe. Zu den 30 am signifikantesten regulierten Genen gehörten die in der Grafik rechts der *Heatmap* aus Abbildung 33 (A) aufgelisteten Gene. Die am signifikantesten differentiell durch die Vitamin D₃-Behandlung regulierten Gene sind nach absteigender Signifikanz aufgelistet: *CYP24A1*, *SERINC2*, *SEMA3B*, *HTRA1*, *HSPG2*, *NCOA7*, *AKR1B1*, *LTBP2*, *DNER*, *CAMP*, *SPOCD1*, *CYP26B1*, *ELFN2*, *LINCO1605*, *CREG2*, *CD14*, *COL16A1*, *LAMP3*, *BIRC3*, *DENND6B*, *TMP4*, *C6ORF141*, *ELF1*, *CASP14*, *CA2*, *LOX*, *AFAP1L2* und *ARHGEF28*.

Der *Volcano-Plot* zeigte für die UM-SCC1-Zelllinie (vgl. Abbildung 33 (B)) insgesamt ein ähnliches Bild wie bereits für die FaDu-Zelllinie beschrieben. Besonders signifikant verstärkte Gene wurden zusätzlich beschriftet. Zu den am stärksten und signifikantesten gesteigert exprimierten Genen gehörten *CYP24A1*, *CA2*, *CD14*, *LOX*, *COL16A1*, *AFAP1L2*, *HTRA1*, *SEMA3B*. Die signifikantesten, gemindert exprimierten Gene waren *GBP4*, *TNFS18*, *OASL*. Es zeigte sich auch hier ein deutliches Überwiegen gesteigert exprimierter Gene durch die Vitamin D₃-Behandlung.

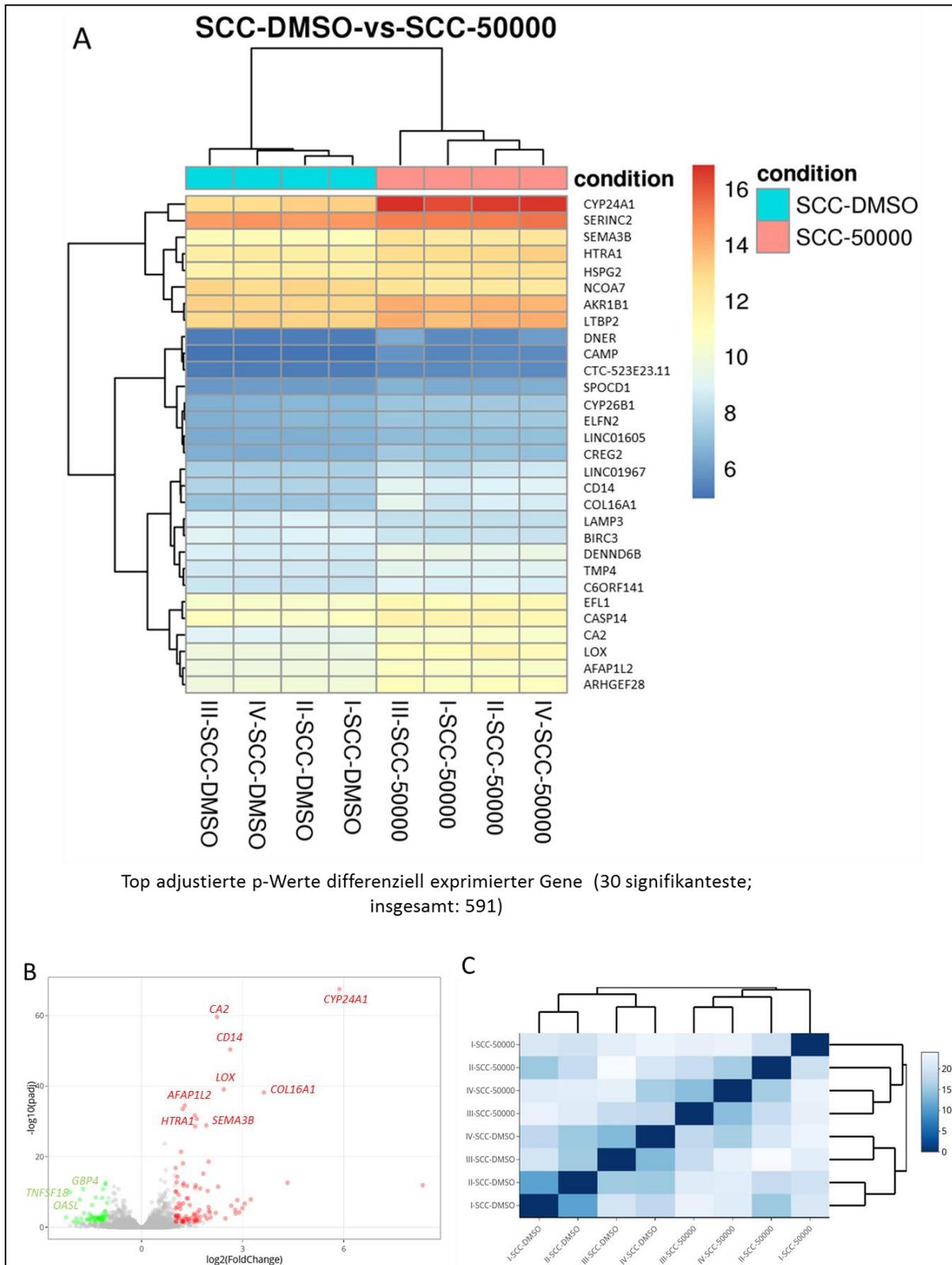


Abbildung 33: RNA-Sequenzierung der UM-SCC1-Zelllinie

(A) *Heatmap*-Darstellung der Genexpression von 50.000 pg/ml 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Behandlung und DMSO-Kontrolle. (B) *Volcano-Plot* der signifikant regulierten Gene. (C) *Heatmap* zur internen Validierung der Probenähnlichkeit.

Zur weiteren Interpretation des Expressionsmusters wurde die Analyse im Folgenden auf jene Gene beschränkt, die in beiden Zelllinien zu den am signifikantesten regulierten Genen gehörten und zusätzlich in beiden Versuchen in gleicher Weise heraufreguliert wurden. Zu diesen Genen gehörte *SERINC2- serine incorporator 2*, was in der Elongation und Metabolisierung von Peptidketten beteiligt ist. Daneben war *CYP24A1- cytochrom p450 24A1* stark hochreguliert, was im Metabolismus von Steroidhormonen und insbesondere am Abbau von Vitamin D₃ beteiligt ist. *AFAP1L2- actin filament associated protein 1 like 2* ist assoziiert mit cartilaginären Neoplasien und besitzt Funktionen in Zytoskelett-Signalwegen sowie in der Regulation des Zellzyklus. *HSPG2- heparan sulfate proteoglykan 2* kodiert für Perlecan, welches zu der Familie der Proteoglykane gehört und durch die Basallamina und Endothelzellen gebildet wird. Durch seine anionische Ladung trägt es zur selektiven Filterfunktion dieser Strukturen bei. Weiterhin wurde das Gen *ARHGEF28- rho guanine nucleotide exchange factor 28* verstärkt exprimiert, welches mit neurofilamentärer RNA interagiert. *SEMA3B- semaphorin 3B* ist ein Apoptose-induzierender Tumorsuppressor, welcher axonales Wachstum hemmt. Daneben gab es eine starke Regulierung von *CYP26B1- cytochrom P450 26B1*, einem Gen, welches ein wesentlicher Regulator des Steroidhormon-Metabolismus ist. *COL16A1- collagen type 16A1* kodiert für wesentliche Bestandteile der extrazellulären Matrix und ist hauptsächlich in Fibroblasten und glatten Muskelzellen aktiv. Zusätzlich wurde das Gen *HTRA1- HtrA serine peptidase 1* hochreguliert, welches das Zellwachstum und die IGF1 Aktivität reguliert. Zuletzt wurde die Überexpression von *DNER- delta/notch like EGF repeat containing* beobachtet, was ein Regulator der Calciumhomöostase ist. Im Rahmen der Diskussion wird auf die hier genannten Gene und mögliche Rückschlüsse auf eine potenzielle antineoplastische Wirkung von Vitamin D₃ näher Stellung genommen.

4.1.2.3 Genontologische Signalwege

Nach Analyse der regulierten Einzelgene der mit Vitamin D₃ behandelten FaDu- und UM-SCC1-Zellen wurden genontologische Signalwege betrachtet. Auch hier wurden nur Signalwege untersucht, die signifikant in beiden Zelllinien reguliert waren.

Die Genontologie (GO) ist die formale Darstellung der Beziehungssystematik innerhalb der molekularen Genetik. Dabei bildet die GO drei wesentliche biologische Aspekte ab: Die molekulare Funktion, der biologische Prozess und die zelluläre Komponente. Es werden also funktionell und strukturell gekoppelte Strukturen in Gruppen zusammengefasst.

Durch die Analyse mit dem exakten Fisher-Test mit einem adjustierten p-Wert <0,05 konnten signifikant regulierte Gene genontologischen Gruppen zugeordnet werden. Bei ≥3 signifikant regulierten Genen innerhalb einer GO-Einheit wurde dieser Signalweg nach Prüfung der statistischen Signifikanz als reguliert angesehen. Dabei war die Regulation unabhängig davon, ob eine Über- oder Unterexpression vorlag. Es wurden nur GO-Signalwege betrachtet, die in beiden Zelllinien signifikant differenziell exprimiert wurden. Ein GO-Signalweg wurde als

Ergebnisse

gesteigert exprimiert bezeichnet, wenn >50 % der signifikant regulierten Gene dieses GO-Signalwegs verstärkt induziert wurden. Bei >50 % verminderter Expression der signifikant regulierten Gene wurde dieser GO-Signalweg als vermindert exprimiert bezeichnet.

Die signifikant regulierten Prozesse ließen sich funktionell in 2 Gruppen einteilen: Die erste Gruppe bestand aus Prozessen, die nicht direkt an neoplastischen, immunmodulierenden und antioxidativen Mechanismen beteiligt waren. Dazu gehörten die Prozesse *Signal transduction*, *Response to lipopolysaccharide*, *Response to drug*, *Cell-cell signaling*, *Response to Ethanol*, *Cellular response to lipopolysaccharide* und *Positive regulation of GTPase activity*. Es zeigte sich somit eine umfassende metabolische Antwort auf die 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Behandlung in beiden Zelllinien, worauf in der Diskussion näher eingegangen wird. Die zweite Gruppe bestand aus Prozessen, die direkt an neoplastischen, immunmodulierenden und antioxidativen Prozessen beteiligt sind. Dazu gehörten die genetologischen Prozesse *Oxidation-reduction process*, *Positive regulation of cell migration*, *Inflammatory response*, *Immune response*, *Positive regulation of cell proliferation* und *Wnt signaling pathway*. Eine Übersicht über die signifikant regulierten Signalwege zeigt Abbildung 34.

Im Folgenden werden die signifikant regulierten Signalwege mit Relevanz für Neoplasien grob in ihrem Expressionsmuster beschrieben. Bei *Oxidation reduction process* zeigte sich eine überwiegende Steigerung der Expression von Genen. Für die FaDu-Zelllinie konnte zum Beispiel eine stärkere Expression von *G6PD* nachgewiesen werden. Dieses Gen ist an der Bildung von NADPH beteiligt was als Elektronendonator wirkt und damit die Reduktion von oxidativem Stress induziert. Weitere gesteigerte Gene dieser Gruppe waren *AKR1C2*, *CYP24A1*, *SH3PXD2A*, *CREG2* und *CYP26B1*. In der UM-SCC1-Zelllinie zeigte sich für diesen GO-Prozess ebenfalls die überwiegende gesteigerte Expression von Genen. Unter anderem waren *HR*, *CYP19A1*, *AKR1B1*, *LOX*, *CYP24A1*, *CREG2*, *NOX5* und *CYP26B1* überexprimiert.

Im Rahmen von *Inflammatory response* und *Immune response* zeigte sich in beiden Zelllinien ein heterogenes Muster aus teils vermehrt und teils vermindert exprimierten Genen unter Vitamin D₃-Behandlung. So konnte zum Beispiel für beide Zelllinien gezeigt werden, dass bei *Inflammatory response* *CD14* hochreguliert wurde, ein Gen das für Oberflächenmoleküle auf Monozyten/Makrophagen codiert. *CD14* ist damit wesentlich an der Stimulation der angeborenen Immunantwort beteiligt. *NGFR* codiert für einen transmembranständigen Rezeptor, welcher die Zielstruktur für *Nerve-Growth Factor* ist und auch am NF-κB Signalweg beteiligt ist. Im Rahmen beider GO-Prozesse *Inflammatory response* und *Immune response* zeigte sich dieses Gen als deutlich herunterreguliert in der FaDu-Zelllinie. Für die UM-SCC1 Zellen zeigte sich für diese immunmodulatorischen GO-Prozesse ebenfalls eine *CD14* Überexpression. Gleichzeitig wurden die Gene *C4A* und *C4B* vermindert exprimiert. Diese codieren jeweils für die azidophile/basophile Unterform von Komplement 4 und vermitteln die

Ergebnisse

Interaktion zwischen Antigen-Antikörper-Komplexen und anderen Komplementfaktoren. Zusätzlich stimuliert es die lokale Inflammation durch Chemotaxis. Weitere signifikant regulierte Gene innerhalb von *Immune response* waren *IFI6*, *CSF3*, *IL7R*, *GEM*, *CCL20*, *TRIM22*, *CCL28* und *APLN*.

Im Rahmen der GO-Prozesse *Positive regulation of cell migration* und *Positive regulation of cell proliferation* zeigte sich ebenfalls ein gemischtes Bild von hoch- und herunterregulierten Genen. Für die FaDu-Zelllinie zeigte sich beispielsweise für beide Prozesse eine Herunterregulation von *F2R*. Dieses Gen codiert für einen Transmembranrezeptor und ist beteiligt an der Thrombozytenaggregation und der vaskulären Entwicklung. In beiden Prozessen ist dieses Gen deutlich herunterreguliert. Zusätzlich konnte man beobachten, dass *SEMA3B* deutlich überexprimiert wurde. *SEMA3B* ist an der Inhibition von axonalem Wachstum beteiligt. Es fungiert ebenfalls über Apoptose-Induktion als Tumorsuppressor.

Bei dem GO-Prozess *Positive regulation of cell proliferation* zeigte sich ebenfalls eine stärkere Expression von *FN1*, was mit Zelladhäsion und Migration assoziiert ist. Weitere regulierte Gene waren *CEACAM6*, *CD86* und *AKR1C2*. Für Die UM-SCC1-Zelllinie zeigte sich im Rahmen der GO-Prozesse *Positive regulation of cell migration* und *Positive regulation of cell proliferation* ebenfalls eine gemischte Verteilung hoch- und herunterregulierter Gene. So konnte eine Überexpression von *CSF3* nachgewiesen werden, was die Differenzierung von Granulozyten und deren Funktion im Rahmen der angeborenen Immunantwort stimuliert. Weiterhin war das Gen *AREG* deutlich überexprimiert. Es codiert für einen autokrinen Wachstumsfaktor sowie ein Mitogen für Astrozyten, Schwann-Zellen und Fibroblasten. Das Protein interagiert mit dem EGF/TGF- α -Rezeptor, um das Wachstum normaler Epithelzellen zu fördern und es hemmt das Wachstum bestimmter aggressiver Karzinomzelllinien. *SEMA3B* konnte ebenfalls wie in der FaDu-Zelllinie als überexprimiert nachgewiesen werden und damit tumorsuppressive Eigenschaften ausüben. Weitere signifikant regulierte Gene waren *GRK5*, *TGFB2*, *ST8SIA1*, *CLCF1*, *APLN*.

Bezüglich des *Wnt signaling pathway* zeigte sich in beiden Zelllinien eine heterogene Induktion von Stimulatoren und Inhibitoren des Wnt-Signalweges. Der Wnt-Signalweg ist essenziell für die normale Embryogenese und ist auch wesentlicher Antreiber der Karzinogenese bei bestimmten Krebsformen. In der FaDu-Zelllinie zeigte sich eine gesteigerte Expression von *TLE4*, einem Wnt-Inhibitor und die Steigerung von *CPZ* und *AMOTL1*, die jeweils Wnt-stimulatorisch wirksam sind. Für die UM-SCC1-Zelllinie zeigte sich ebenfalls die Induktion der beiden Wnt-Stimulatoren *CPZ* und *GRK5*, aber auch die Induktion von *DACT1*, einem Wnt-Inhibitor. Dazu wurde eine verminderte Expression von *WNT16* beobachtet, was ein Reporter gen für diesen Signalweg darstellt und somit insgesamt eine deutlich reduzierte Aktivität in diesem Signalweg signalisiert. Die dargestellten, in beiden Zelllinien signifikant

regulierten Gene bilden die Grundlage für potenzielle antineoplastische Wirkweisen von Vitamin D₃, die in der Diskussion näher erläutert werden.

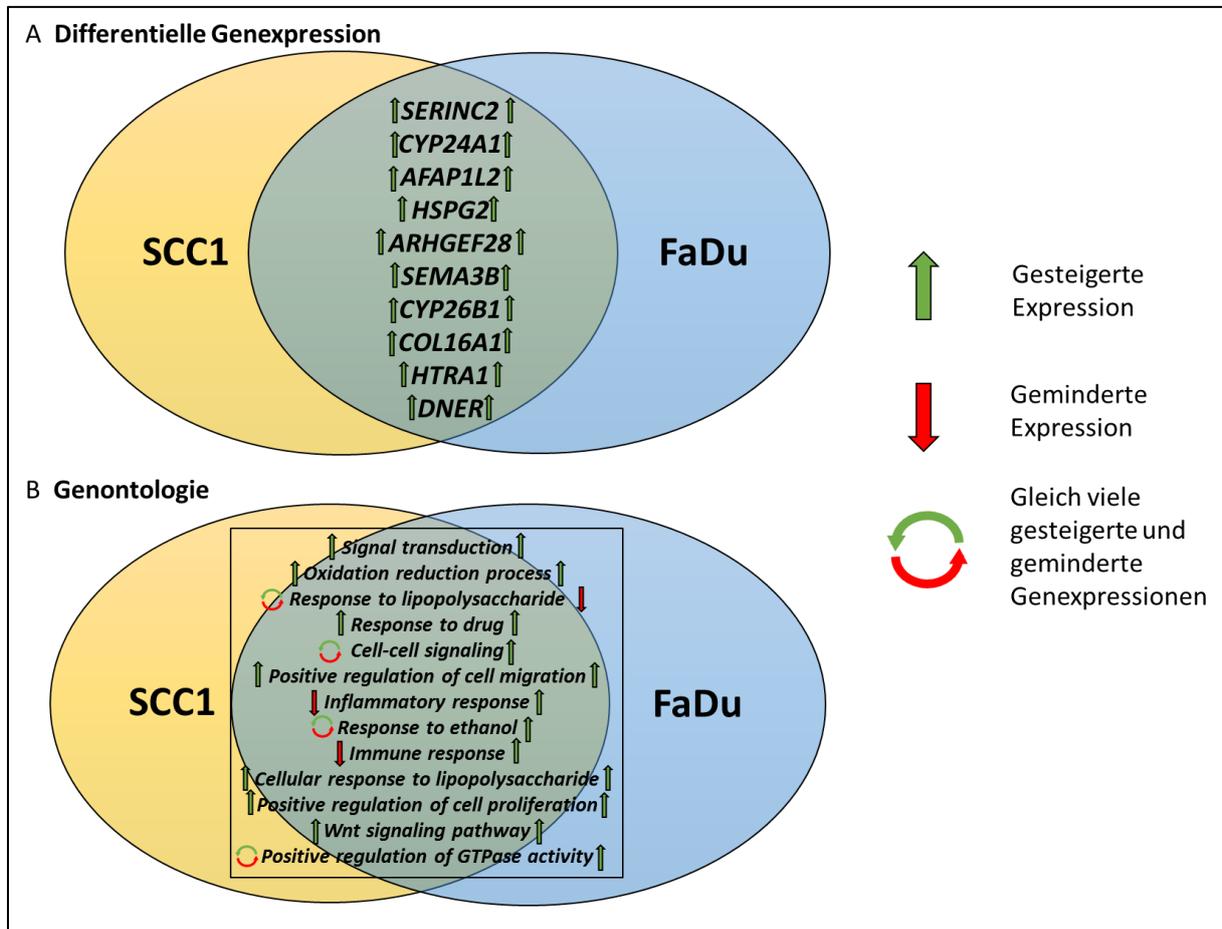


Abbildung 34: Signifikant regulierte Gene und GO-Pathways in beiden Zelllinien

(A) Darstellung der Schnittmenge der in beiden Zelllinien hochsignifikant überexprimierten Gene. (B) Darstellung der Schnittmenge von signifikant regulierten genontologischen Signalwegen in beiden Zelllinien. Die beigefügte Legende zeigt die Änderung des Expressionsniveaus durch eine 96-stündige Vitamin D₃-Behandlung auf.

4.1.3 Proliferations- und Migrations-Analyse der FaDu-Zelllinie

Nach Behandlung der FaDu-Zelllinie mit unterschiedlichen 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Konzentrationen in den einzelnen Wells der E-Plate des xCELLigence-Systems zur real-time Proliferationsanalyse zeigte sich eine konzentrationsabhängige Inhibition der Zellproliferation, welche in dem xCELLigence-System als einheitsloser Zellindex bestimmt wurde. Wie in Abbildung 35 (A) dargestellt zeigte sich, dass in der DMSO-Kontrollgruppe wie auch in den Behandlungsgruppen mit Vitamin D₃-Konzentrationen zwischen 20 pg/ml und 2000 pg/ml ein nahezu exponentielles Wachstumsverhalten aufgetreten ist, was der physiologischen Dynamik entsprach. Die Zellen der 50.000 pg/ml 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Behandlungsgruppe unterschieden sich deutlich von dieser Wachstumsdynamik und zeigten ein eher lineares und somit über die Beobachtungszeit von 50 Stunden deutlich langsames Wachstumsverhalten.

Ergebnisse

Die DMSO-Kontrollgruppe erreichte nach 34 Stunden bereits ein Plateau bei einem Zellindex von 6. Davor zeigte sich in dieser Gruppe ein steiler Anstieg der Zellproliferation. Die mit 20 pg/ml, 60 pg/ml und 200 pg/ml 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃ behandelten Zellen zeigten tendenziell eine ähnliche Kurvendynamik und erreichten nach ca. 38 Stunden ihr Proliferationsplateau. Man konnte jedoch auch hier leichte Unterschiede der Dynamik erkennen. Die 20 pg/ml, 60 pg/ml und 200 pg/ml mit Vitamin D₃ behandelten Zellklone zeigten ab Stunde 4 nach Aufzeichnungsbeginn eine im Vergleich zur DMSO-Kontrolle verlangsamte Proliferationsdynamik. Dies zeigte sich durch eine leichte Rechtsverschiebung der Kurve. Man konnte folglich Unterschiede im Sinne einer Verzögerung der Proliferation und einer verzögerten Wachstumsdynamik erkennen. Die 2.000 pg/ml 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Behandlung zeigte eine deutliche Inhibition der Wachstumsdynamik und erreichte das Plateau erst nach 50 Stunden. Diese Behandlungsgruppe zeigte bis 20 Stunden nach Versuchsbeginn einen sehr trägen Anstieg des Zellindex. Die 50.000 pg/ml Behandlung wies den deutlichsten Behandlungseffekt auf. Die Proliferationsdynamik wurde im gesamten Behandlungszeitraum deutlich verzögert. Bis 30 Stunden nach Versuchsbeginn zeigte sich ein sehr träger Anstieg des Zellindex auf lediglich 1,5. Anschließend kam es zu einer leichten Proliferationssteigerung. Die typische exponentielle Wachstumsdynamik wurde nicht erreicht. Auch ein Plateau wurde im Beobachtungszeitraum von 50 Stunden nicht erreicht. Der nach 50-stündigem Wachstum gemessene Zellindex betrug 3. Es zeigte sich somit eine deutliche und im Zeitverlauf zunehmende Reduktion des Zellindex bei gesteigerten Vitamin D₃-Behandlungskonzentrationen.

Die Ergebnisse der Zellmigrations-Analysen im Boyden-Chamber-Assay für die gleichen Behandlungsgruppen, wie bereits für die Proliferationsassays dargestellt, ist in Abbildung 35 (B-G) abgebildet. Vergleichbar mit der Zellproliferation zeigte sich auch hier eine konzentrationsabhängige Inhibition der Tumorzellmigration. Der Beobachtungszeitraum betrug für diesen Versuch 72 Stunden. Zur Auswertung des Migrationsverhalten wurden die mit DAPI blau gefärbten Zellkerne semiautomatisiert gezählt und zwischen den Behandlungsgruppen verglichen. Je stärker die Zellen migrierten, desto mehr blau gefärbte Zellkerne ließen sich mikroskopisch an der Unterseite der verwendeten Transwell FluoroBlock™ Inserts nachweisen.

Es zeigten sich bei visueller Betrachtung keine relevanten Unterschiede zwischen dem Migrationsverhalten der DMSO-Kontrolle, der 20 pg/ml und der 60 pg/ml Vitamin D₃-Behandlungsgruppe. Es konnte für diese Behandlungsgruppen keine Reduktion der Migration gezeigt werden. Ab 200 pg/ml zeigte sich hingegen eine deutlich reduzierte Anzahl migrierter Zellen im Gesichtsfeld. Der stärkste Effekt zeigte sich in den Behandlungsgruppen mit 2.000 pg/ml und 50.000 pg/ml 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃. In diesen Gruppen konnten lediglich vereinzelte migrierte Zellen in der DAPI-Färbung nachgewiesen werden. Es zeigte sich mit

Ergebnisse

diesen Behandlungskonzentrationen eine signifikante Inhibition der Migration verglichen mit den anderen Behandlungsgruppen. Auch im Kontext der Migration konnte somit eine konzentrationsabhängige Inhibition durch eine Vitamin D₃-Behandlung in der Tumorzelllinie FaDu gezeigt werden.

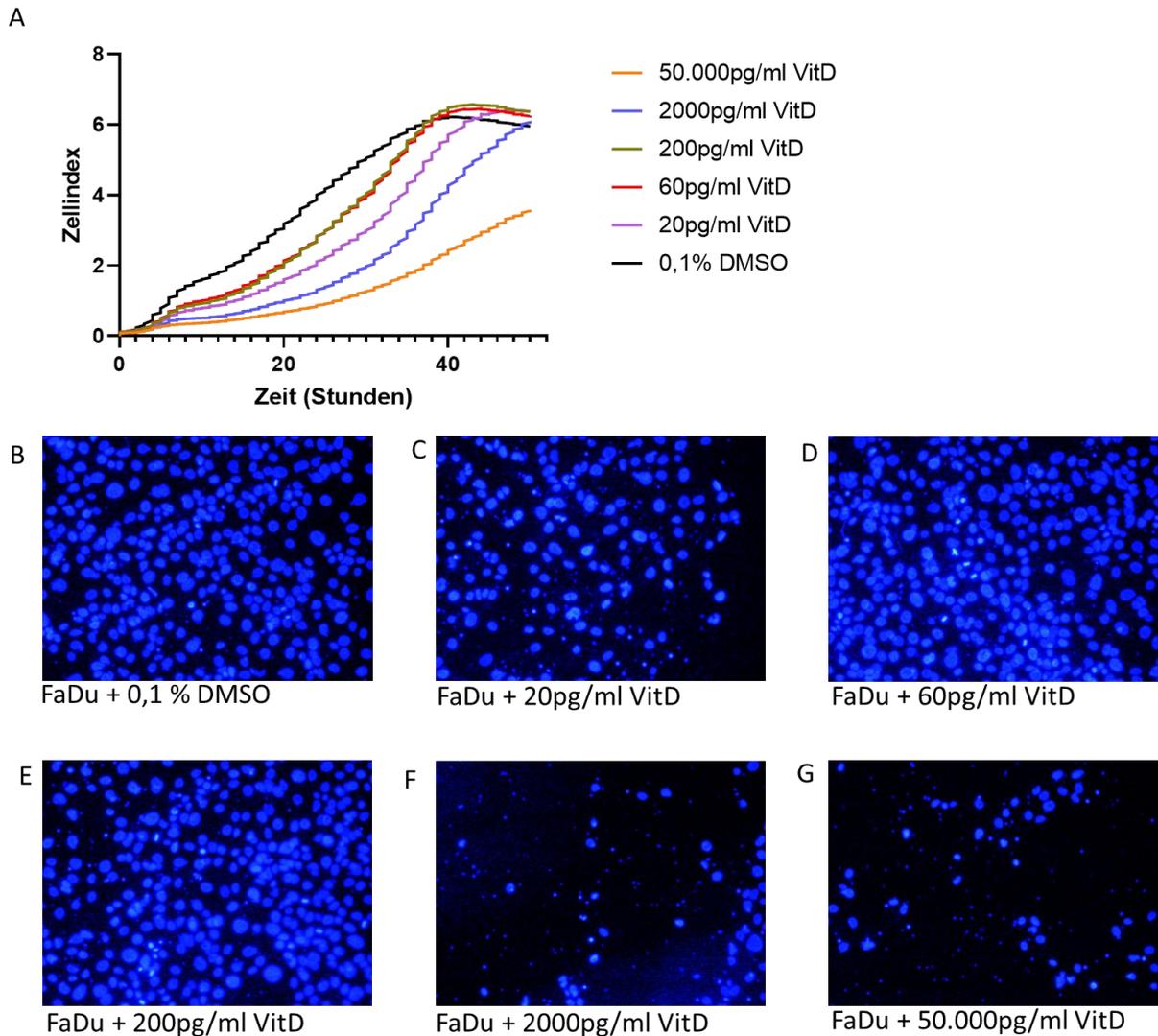


Abbildung 35: 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃ abhängige Hemmung der Tumorzellproliferation und Tumorzellmigration bei FaDu-Zellen

(A) Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Proliferationshemmung durch die Vitamin D₃-Behandlung über den Zeitraum von 48 Stunden. (B-G) Abgebildet sind repräsentative Bildausschnitte migrierter Zellen der jeweiligen Behandlungsgruppen. Es zeigte sich eine deutliche konzentrationsabhängige Reduktion der Zellmigration durch die Behandlung mit 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃ in den 2.000 pg/ml und 50.000 pg/ml Vitamin D₃-Behandlungsgruppen über den Zeitraum von 72 Stunden.

Abbildung 36 zeigt die Übersicht der statistischen Auswertung der Proliferations- und Migrationsassays der FaDu-Zelllinie. Zur Aussage über das Proliferationsverhalten der untersuchten Behandlungsgruppen wurde die Steigung des Zellindex pro Stunde verglichen. Dazu wurden Mittelwerte von 3 Replikaten gebildet. Der untersuchte Zeitraum

Ergebnisse

bildete exponentielles Wachstum in allen Untersuchungsgruppen ab und lag zwischen Stunde 16 und 40. Die Steigung des Zellindex ist ein guter Indikator für das Proliferationsverhalten. Es zeigte sich in allen untersuchten Werten Normalverteilung, sodass ein ungepaarter t-Test mit ggf. Welch-Korrektur zur statistischen Analyse verwendet wurde. Zur statistischen Auswertung der migrierten Zellen wurde die semi-automatisierte Analyse der Software NIS elements AR 3.0 (Nikon Corporation, Tokio, Japan) verwendet. Diese zählte die Anzahl migrierter Zellen in 3 repräsentativen Gesichtsfeldern aus.

Es zeigte sich im Proliferationsassay eine Zellindex-Steigung der 0,1 % DMSO-Kontrolle von $0,140 \pm 0,03$. Die 20 pg/ml Vitamin D₃-Behandlungsgruppe zeigte eine Zellindex-Steigung von $0,183 \pm 0,026$. In der 60 pg/ml Vitamin D₃-Behandlungsgruppe wurde eine Zellindex-Steigung von $0,178 \pm 0,033$ erreicht. Im oben genannten Zeitraum erreichte die 200 pg/ml Vitamin D₃-Behandlungsgruppe eine Zellindex-Steigung von $0,199 \pm 0,03$. In der 2.000 pg/ml Vitamin D₃-Behandlungsgruppe konnte eine Zellindex-Steigung von $0,173 \pm 0,047$ beobachtet werden. Das Steigungsverhalten des Zellindex der bisher beschriebenen Gruppen unterschied sich mit $p > 0,05$ (ungepaarter t-Test mit ggf. Welch-Korrektur) nicht signifikant. Die 50.000 pg/ml Vitamin D₃-Behandlungsgruppe erreichte lediglich eine Zellindex-Steigung von $0,007 \pm 0,02$. Es zeigte sich mit $p = 0,037$ (ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur) eine signifikante Reduktion der Zellindex-Steigung und somit eine Reduktion der Proliferation in dieser Behandlungsgruppe.

Die statistische Auswertung des Migrationsassays bot insgesamt ein ähnliches Bild: Die zunehmende Konzentration der Vitamin D₃-Behandlung führte zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl migrierter HNSCC-Zellen. In der 0,1 % DMSO-Kontrollgruppe migrierten in dem Versuchszeitraum von 72 Stunden durchschnittlich $269,6 \pm 54,2$ Zellen in 3 untersuchten Bildausschnitten durch die semipermeable Membran des Boyden-Chamber Assays. Die 20 pg/ml Vitamin D₃-Behandlungsgruppe zeigte lediglich $203,2 \pm 73,9$ migrierte Zellen. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion migrierter Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0,047$, ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur). Die 60 pg/ml Vitamin D₃-Behandlungsgruppe zeigte insgesamt $259,4 \pm 39,6$ migrierte Zellen. Die 200 pg/ml Vitamin D₃-Behandlungsgruppe zeigte durchschnittlich $267,2 \pm 57,6$ migrierte Zellen. Für beide Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl migrierter Zellen ($p = 0,6559$, $p = 0,9263$, ungepaarter t-Test mit ggf. Welch-Korrektur). Die 2.000 pg/ml Vitamin D₃-Behandlungsgruppe zeigte durchschnittlich $192,1 \pm 55,7$ migrierte Zellen. Es zeigte sich mit $p = 0,0087$ (ungepaarter t-Test) eine hochsignifikante Reduktion der Anzahl migrierter Zellen. In der 50.000 pg/ml Vitamin D₃-Behandlungsgruppe zeigten sich durchschnittlich lediglich $131,5 \pm 105,7$ migrierte Zellen. Auch hier konnte eine statistisch hochsignifikante Reduktion

der Zellmigration mit $p=0,0045$ (ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur) nachgewiesen werden.

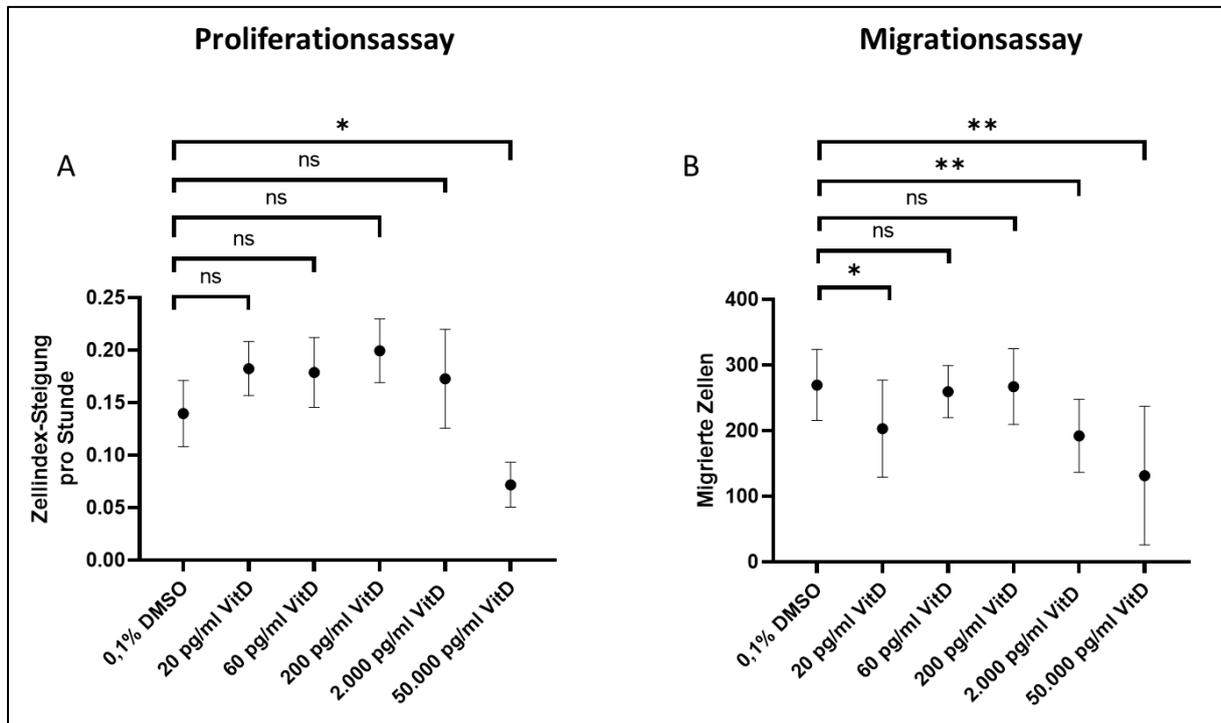


Abbildung 36: Statistische Auswertung des Proliferations- und Migrationsassays

(A) Zur statistischen Auswertung wurde die Steigung des Zellindex im Versuchszeitraum zwischen Stunde 16 und Stunde 40 verglichen. Der Proliferationsassay zeigte eine signifikante Reduktion der Proliferation in der 50.000 IU/Kg Vitamin D₃-Behandlungsgruppe. **(B)** Die semi-automatisierte Zellzählung definierte die Anzahl migrierter Zellen in 3 definierten Gesichtsfeldern innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppen. Der Migrationsassay zeigte eine konzentrationsabhängige Reduktion der Tumorzellmigration durch eine steigende Vitamin D₃-Behandlungskonzentration.

4.2 Tierexperimenteller Versuchsteil

4.2.1 Mausvorversuche

4.2.1.1 Klinische Evaluation

Aufgrund der bekannten potenziell toxischen Wirkung einer Langzeit 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Behandlung wurden Vorversuche zur generellen Verträglichkeit verschiedener 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Futterkonzentrationen und zu den potenziell durch diese Form der oralen Substitution zu erreichenden Serumspiegel in dem verwendeten Mausstamm durchgeführt. Zu den Hauptsymptomen einer manifesten Intoxikation mit 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃ bei Labortieren und auch Mäusen gehören Verwirrung, Apathie, abdominale Beschwerden, Polyurie, Polydipsie, Dehydratation und bei chronischer Belastungszeichen eines Nierenversagens (Safadi *et al.*, 1999). Ähnliche Kardinalsymptome der Intoxikation sind ebenfalls bei Menschen beschrieben (Marcinowska-Suchowierska *et al.*, 2018).

Ergebnisse

Vor dem Hintergrund der diversen Manifestationsmöglichkeiten einer Vitamin D₃-Intoxikation wurde täglich der Allgemeinzustand, der Zustand des Fells, das Fress- und Trinkverhalten sowie das Sozialverhalten in der Gruppe über den Versuchszeitraum von 22 Wochen unter oraler Vitamin D₃-Substitution in verschiedenen Konzentrationen beurteilt. Es zeigte sich hierbei, dass die Tiere, die mit 50.000 IU/Kg und Low-Dose 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃ gefüttert wurden, keine Auffälligkeiten in oben erwähnten Kriterien aufwiesen. In der Verum-Gruppe mit 200.000 IU/Kg konnte man diverse Manifestationen erkennen, die auf eine klinische Vitamin D₃-Intoxikation hinwiesen: Insgesamt imponierten die Tiere aus dieser Versuchsgruppe sehr träge und zeitweise lethargisch. Bei der täglichen Routineuntersuchung erwiesen sich die Tiere ebenfalls als sehr schreckhaft, zeigten also zusammenfassend deutliche Veränderungen in ihrem Verhalten. Die klinisch sichtbaren Zeichen zeigten sich erstmals ab Woche 8 und nahmen im weiteren Versuchszeitraum zu. Das Fress- und Trinkverhalten bot neben subjektiven auch quantifizierbaren, objektiven Veränderungen. Insgesamt war die Trinkmenge in dieser Versuchsgruppe um ca. 30 % im Vergleich zu der Kontroll- und 50.000 IU/Kg- Gruppe gesteigert, was auf eine Polydipsie mit konsekutiver Polyurie hindeutete. Auch war die Futteraufnahme deutlich reduziert, der Futtermittelverbrauch wurde durch das wöchentliche Wiegen der Restfuttermengen bei standardisierter Ausgangs-Futtermenge ermittelt. Neben den deutlich erhöhten Restfuttermengen nach einer definierten Zeit spiegelte sich dies ebenfalls in der Gewichtsdocumentation der einzelnen Tiere wider.

Der quantifizierbare und damit vergleichbare Parameter des Mausegewichtes wurde einmal wöchentlich erhoben. Er diente zur Beurteilung des Fressverhaltens und war damit ein wichtiger Indikator für das Allgemeinbefinden der Tiere. Es zeigte sich, dass alle Versuchsgruppen mit durchschnittlich zwischen 23,1 g bis 23,4 g pro Tier bei Woche 0 in den Versuch starteten und die Tiere mit voranschreitendem Versuchsablauf an Gewicht zunahmten. Es bestand jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Die Verum-Gruppe mit 50.000 IU/Kg Vitamin D₃ und die Kontrollgruppe mit Low-Dose Vitamin D₃ zeigen eine stetige Zunahme des Durchschnittsgewichts im Versuchsverlauf. Wie in Abbildung 37 (A) zu erkennen, war rhythmisch alle 5 Wochen ein kleiner Abfall oder eine Stagnation des Gewichts zu verzeichnen, was am Ehesten auf die zu diesen Zeitpunkten durchgeführten Blutentnahmen zurückzuführen war. Das durchschnittlich erreichte Endgewicht der 0 IU/Kg Kontrollgruppe betrug 36,4 g mit einer Standardabweichung (SD) von 4,27 g, in der 50.000 IU/Kg Behandlungsgruppe betrug dieser Wert 34,6 g ± 1,28 g. In der Verum-Gruppe mit 200.000 IU/Kg Vitamin D₃ zeigte sich eine deutlich unterschiedliche Dynamik im Beobachtungszeitraum. Bereits ab Woche 2 stellte sich eine mehrwöchige Stagnation der Gewichtsentwicklung in dieser Behandlungsgruppe ein. Die Gewichts Differenz zu den anderen Gruppen nahm kontinuierlich bis zum Versuchsende zu. Ein Tier musste wegen den vor Versuchsbeginn festgelegten Abbruchkriterien bei kontinuierlichem Gewichtsverlust

Ergebnisse

bis unter 20 % des erreichten Maximalgewichtes vorzeitig getötet werden. Das Durchschnittsendgewicht der 0 IU/Kg Versuchsgruppe betrug nach 22 Wochen $27,4 \text{ g} \pm 5,5 \text{ g}$. Das Signifikanzniveau zur Feststellung eines Unterschiedes zwischen der Low-Dose und der 50.000 IU/Kg Behandlungsgruppe lag bei $p < 0,0001$. Zwischen Low-Dose und 200.000 IU/Kg Behandlungsgruppe betrug dieser Wert ebenfalls $p < 0,0001$. Beide Ergebnisse sind damit hochsignifikant. Einen statistischen Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen mit 50.000 IU/Kg und 200.000 IU/Kg Vitamin D₃ konnte man mit $p = 0,61$ nicht feststellen. Zur Berechnung von Signifikanzen wurde bei Normalverteilung der Werte ein ungepaarter t-Test ggf. mit Welch-Korrektur bei Vorliegen unterschiedlicher Standardabweichungen durchgeführt.

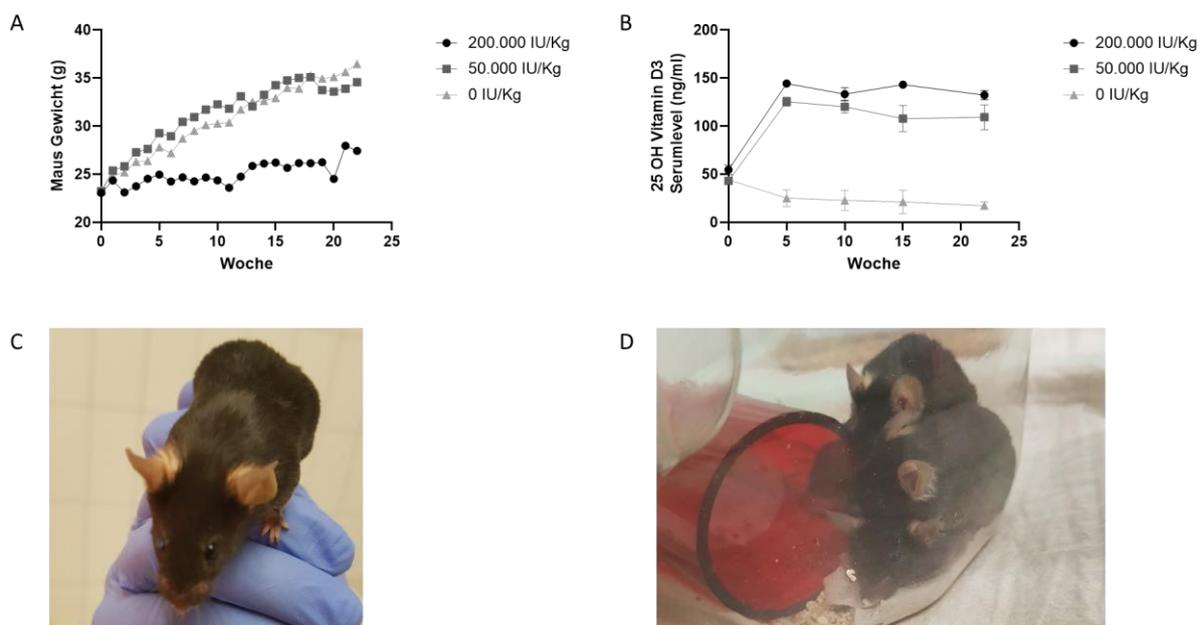


Abbildung 37: Mausgewicht, 25-OH Vitamin D₃-Serumlevel und klinische Mausuntersuchung (A) Es zeigte sich eine deutlich reduzierte, abweichende Gewichtszunahme der 200.000 IU/Kg Versuchsgruppe im Vergleich zu 50.000 IU/Kg und 0 IU/Kg. (B) Die 25-OH Vitamin D₃-Serumlevel zeigten deutliche Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Es stellte sich in der 0 IU/Kg Kontrolle nach 22 Wochen eine Vitamin D₃-Defizienz ein. (C) Die klinische Evaluation des Allgemeinzustands und Beurteilung der Fellpflege diente als Indikator für den Allgemeinzustand. (D) Die Beobachtung der Gruppendynamik der Tiere diente der Evaluation der Interaktion unter den Tieren und des Sozialverhaltens.

Parallel zu der Erhebung klinisch-physiologischer Parameter erfolgte alle 5 Wochen eine Blutentnahme aus der *V. facialis*. Durch die Serumanalyse mittels dem ELISA-Verfahren konnte der 25-OH Vitamin D₃-Spiegel in den Versuchsgruppen dokumentiert werden. Es zeigte sich, dass initial die Tiere aller Gruppen mit einem 25-OH Vitamin D₃-Serumspiegel zwischen 43,2 ng/ml und 54,7 ng/ml bei Woche 0 starteten. Zuvor erhielten alle Tiere dasselbe Standardfutter mit 1.500 IU/Kg Vitamin D₃ bis zu unserem Versuchsbeginn. Zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme, 5 Wochen nach Versuchsbeginn, zeigten sich bereits signifikante Unterschiede in den verschiedenen Behandlungs- und Kontrollgruppen. In der Low-Dose Kontrollgruppe zeigte sich ein signifikanter Abfall der 25-OH Vitamin D₃-Serumkonzentration

Ergebnisse

auf Werte knapp oberhalb von 20 ng/ml, was auf eine gerade noch ausreichende Vitamin D₃-Versorgung hindeutet. In der Behandlungsgruppe von 200.000 IU/Kg Vitamin D₃ zeigte sich ein steiler Anstieg auf Werte von über 140 ng/ml 25-OH Vitamin D₃, für die Tiere der 50.000 IU/Kg Vitamin D₃-Futtergruppe zeigte sich ein paralleler Verlauf, jedoch stiegen die Werte weniger stark auf ca. 120 ng/ml 25-OH Vitamin D₃. Im folgenden Zeitabschnitt zeigte sich für alle Versuchsreihen eine tendenzielle, jedoch insgesamt geringe Abnahme der 25-OH Vitamin D₃-Serumspiegel. Die Serumkonzentration von 25-OH Vitamin D₃ betrug nach 22 Wochen in der 200.000 IU/kg Verum-Gruppe 132,39 ng/ml ± 4,81 ng/ml. Die 50.000 IU/kg Verum-Gruppe erreichte einen Wert von 109,45 ng/ml ± 12,94 ng/ml und die Low-Dose Kontrollgruppe erreichte einen Endwert von 17,46 ng/ml ± 4,04 ng/ml. Das Signifikanzniveau zur Feststellung eines Unterschiedes der 25-OH Vitamin D₃-Serumendwerte zwischen der Low-Dose und der 50.000 IU/Kg Behandlungsgruppe lag bei $p=0,0003$. Zwischen Low-Dose und 200.000 IU/Kg Behandlungsgruppe betrug dieser Wert $p<0,0001$. Beide Ergebnisse sind damit hochsignifikant. Einen statistischen Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen mit 50.000 IU/Kg und 200.000 IU/Kg Vitamin D₃ konnte man ebenfalls mit $p=0,031$ feststellen. Zur Berechnung von Signifikanzen wurde bei Normalverteilung der Werte ein ungepaarter T-test ggf. mit Welch-Korrektur bei Vorliegen unterschiedlicher Standardabweichungen durchgeführt.

4.2.1.2 Makroskopische und mikroskopische Evaluation der Mausorgane

Zum Zeitpunkt der Dissektion wurden makroskopisch auffällige Organe und Strukturen Fotodokumentiert. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf Organe gelegt, die bei einer Vitamin D₃-Intoxikation besonders betroffen sind. Hauptmanifestationsorte der Intoxikation sind Nieren, Gastrointestinaltrakt, ZNS und Herz (Safadi *et al.*, 1999; Marcinowska-Suchowierska *et al.*, 2018). Es zeigte sich für sämtliche Tiere der 200.000 IU/Kg 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Gruppe, dass mindestens eine der Nieren zystisch verändert und auf ein Vielfaches des Ausgangsvolumens erweitert war. Im Versuchstier K1M3 der 200.000 IU/Kg 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Gruppe kam bei der Dissektion eine Niere zur Darstellung, die nahezu 50 % des Gesamtkörpergewichtes des Tieres ausgemachte (s. Abbildung 38 (A)). Neben den Nieren erschienen die Lebern der Tiere dieser Gruppe teilweise verändert. Das parenchymatöse Organ wurde durch die abdominale Raumforderung der Nieren lokal verdrängt und zeigte teilweise Einblutungen. Die Beurteilung des intraabdominellen Fetts und der Darmfüllung zeigte insgesamt eine defizitäre Nahrungsaufnahme in dieser Behandlungsgruppe. In der Verum-Gruppe mit 50.000 IU/Kg 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃ und der Low-Dose Kontrolle zeigten sich keine vergleichbaren Befunde. Weder Niere noch Leber wiesen bei klinischer Untersuchung makroskopische Veränderungen oder abnormale Ausdehnungen auf.

Ergebnisse

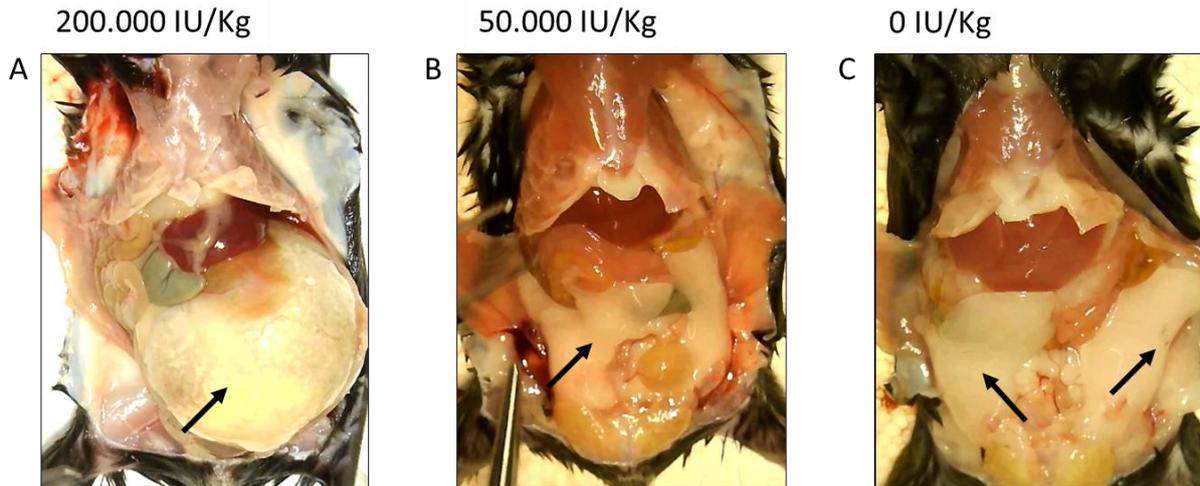


Abbildung 38: Abdominaler Situs bei der Sektion der Tiere

Bei der Präparation ließen sich zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen makroskopische Veränderungen der Bauchorgane nachweisen. **(A)** zeigt eine deutlich geringere Darmfüllung bei gleichzeitiger Minderung von mesenterialen Fettreserven. Dazu imponiert die linke Niere massiv zystisch erweitert, gekennzeichnet durch den schwarzen Pfeil. Die natürliche tiefrote Farbe des Nierenparenchyms ist im Bild nur noch als kleine Auflagerung auf der zystischen Organerweiterung zu erkennen. Weiterhin fällt auf, dass die Leber insgesamt volumengemindert erscheint und teilweise hämorrhagische Abschnitte aufweist. **(B)** und **(C)** wiesen bei dieser Untersuchung keine vergleichbaren Befunde auf. Sämtliche Organe erschienen makroskopisch unauffällig. Dazu fiel auf, dass die Leber im Vergleich zu der 200.000 IU/Kg 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Gruppe deutlich unter dem Rippenbogen zum Vorschein kam und eine homogene Parenchymfärbung aufzeigte. Darüber hinaus lagen insgesamt deutlich bessere Ernährungszustände vor, die durch ausgeprägtere Darmfüllung und intraabdominelle Fettreserven makroskopisch sichtbar wurden. Diese sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Im Rahmen der darauffolgenden histologischen Aufarbeitung der Organe wurden beide Nieren, Leber und Milz bei jedem Tier entnommen. In jeder Versuchsgruppe wurden weiterhin bei jeweils einem Tier Herz, Lunge und Gehirn entnommen. Es zeigte sich in HE-gefärbten Gewebeschnitten, dass bereits makroskopisch veränderte Organe auch mikroskopisch die eindrucklichsten Veränderungen aufwiesen. Besonders veränderte Parenchymstrukturen zeigten Leber, Milz und Niere in der 200.000 IU/Kg 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃ Behandlungsgruppe. In den Nieren wurden hierbei jeweils nicht zystische, solide Gewebeareale beurteilt. Zur strukturierten Beurteilung der Organe in den HE-gefärbten mikroskopischen Präparaten wurden diese initial in einer Übersichtsaufnahme bei niedriger Vergrößerung begutachtet, morphologische Veränderungen wurden Foto-dokumentiert. Dann erfolgte die Beurteilung bei 10-facher sowie bei 40-facher Vergrößerung. In der Verum-Gruppe mit 200.000 IU/Kg 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃ zeigten sich deutliche histopathologische Veränderungen im funktionellen Parenchym in der Leber, Milz und Niere, die im Folgenden näher beschrieben werden. Im Präparat der Leber zeigten sich inselartig angeordnete Gewebeveränderungen. Der Großteil des Organparenchyms imponierte jedoch überwiegend physiologisch. Innerhalb der makroskopisch veränderten Leberareale stellte sich das Gewebe wie in Abb. 39 dar. In diesen auffälligen Arealen der Leber erkannte man bereits bei 10-facher Vergrößerung eine deutliche Abnahme der Zahl der Zellkerne bei massiver Erweiterung der Zellzwischenräume.

Ergebnisse

Gleichzeitig indizierten die häufig vorkommenden intraparenchymatösen Erythrozyten eine Gewebe-Hyperämie. Bei 40-facher Vergrößerung zeigte sich eine deutliche Kernabblassung und eine zytoplasmatische Volumenminderung. Zusätzlich war die typische polygonale Form der Hepatozyten verstrichen. Diese Veränderungen kommen besonders eindrücklich zur Geltung bei vergleichender Betrachtung der physiologischen Leber aus Abb. 40.

In der gleichen Behandlungsgruppe zeigte die Milz einen atypischen Parenchymaufbau. Bei grober Durchmusterung zeigte das gesamte intrakapsuläre Parenchym keine Gliederung in rote oder weiße Pulpa. Es war lediglich eine massive Zellinfiltration mit Leukozyten erkennbar. Die rote Pulpa sollte normalerweise mit Sinusoiden und Erythrozyten klar abgrenzbar zur weißen Pulpa mit Lymphfollikeln und PALS (Periarterielle lymphatische Scheide) sein (Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas, Piper M. Treuting DVM MS Diplomate ACVP, Suzanne M. Dintzis MD PhD, Kathleen S. Montine). Bei 40-facher Vergrößerung schien ebenfalls ein atypischer Aufbau der Lymphfollikel vorzuliegen. Der physiologische Aufbau in Keimzentrum, Lymphozytenmantel, Mantelzone und perifollikuläre Zone war in diesem Präparat nicht erkennbar. Es zeigte sich im kompletten Präparat eine zellreiche homogene Lymphozyten-Infiltration.

Bei Betrachtung der nicht zystisch veränderten Nierenareale fiel bereits bei 10-facher Vergrößerung eine deutlich veränderte Parenchymstruktur auf. Im Bereich der Nierenrinde zeigte sich das Tubulussystem deutlich entzündlich verändert. Man erkannte starke leukozytäre Infiltrate. Die Integrität des Tubulussystems war stellenweise durch intraluminalen, eosinophile Einschlüsse zerstört, die am ehesten pathologischen Calciumphosphat-Kristallen entsprachen. Das Parenchym erschien weiterhin bei grober Betrachtung deutlich aufgelockert und weniger dicht als in der physiologischen Darstellung aus Abbildung 39 (E, F). In der 40-fachen Vergrößerung bestätigte sich das Bild der massiven Immuninfiltration. Die Tubuli wiesen peritubulär deutliche Erythrozyten Anreicherungen auf, was für eine Hyperämie sprach. Darüber hinaus erkannte man in dieser Vergrößerung, dass die Tubuli mit oben erwähnten intraluminalen Einschlüssen häufig zelluläre Schäden und Risse in der umgebenden Basalmembran aufwiesen. Die Glomeruli schienen insgesamt in der Anzahl deutlich gemindert. Die histologische Analyse zystischer Areale wies lediglich gekammerte Hohlräume auf. Es war kein Parenchym mehr erkennbar. Durch das Fixationsprotokoll und die anschließende Färbung wurde sämtliche Flüssigkeit ausgewaschen und diese Areale erschienen in der histologischen Analyse entsprechend als gewebeleerer Raum.

Ergebnisse

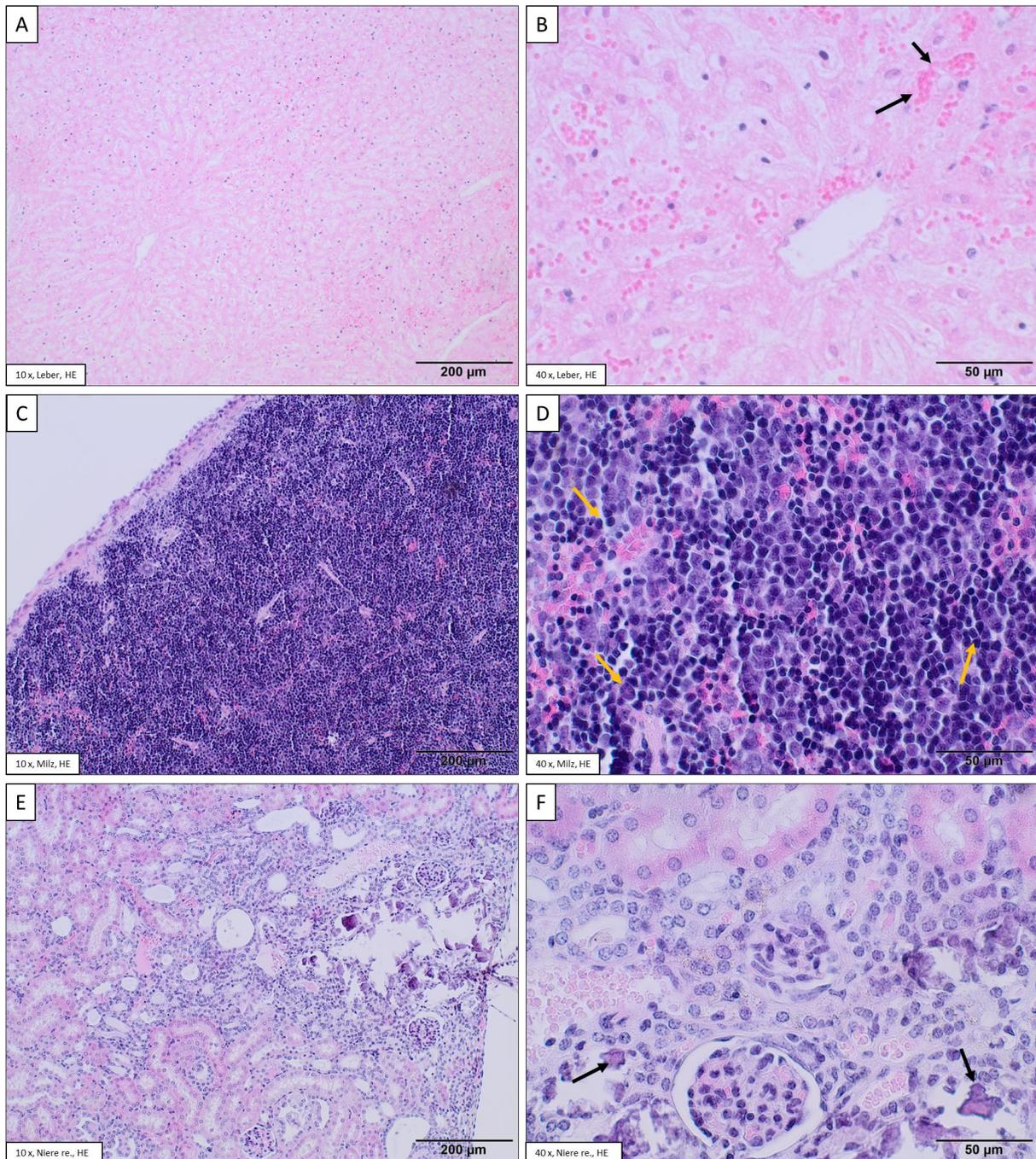


Abbildung 39: Histologische Aufarbeitung der Leber, Milz und Niere der 200.000 IU/Kg 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Behandlungsgruppe

Zur Darstellung kommen repräsentative Organgewebeschnitte aus der 200.000 IU/Kg 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Behandlungsgruppe. Die beschriebenen Veränderungen in den dargestellten Organen konnte für Milz und Niere bei 100 % der Tiere gezeigt werden. Die Veränderungen in der Leber konnte nur bei einem von 4 Tieren nachgewiesen werden. HE-Färbung, 10x Vergrößerung links, 40x Vergrößerung rechts (**A, B**) zeigen Veränderungen der Leber, die schwarzen Pfeile zeigen auf Erythrozytenkonzentrate im Parenchym. (**C, D**) zeigen die Veränderung der Milz. Es stellt sich eine diffuse lymphozytäre Infiltration des Milzparenchyms dar. Die gelben Pfeile weisen auf einzelne Lymphozyten im Parenchym. (**E, F**) zeigen die Veränderungen innerhalb des Nierenkortex. Ausgedehnte leukozytäre Infiltrate stellten sich im Parenchym dar, zusätzlich zeigen die schwarzen Pfeile aus (**F**) auf eosinophile Konglomerate, welche am ehesten Calciumkristallen entsprachen.

Abbildung 40 zeigt den histologischen Befund einer Maus aus der 50.000 IU/Kg Vitamin D₃-Behandlungsgruppe. Es stellten sich allseits physiologische anatomische Verhältnisse in den

Ergebnisse

untersuchten Organen dar. Die 0 IU/Kg Vitamin D₃-Kontrollgruppe bot ein vergleichbares Bild der histologischen Organdarstellung.

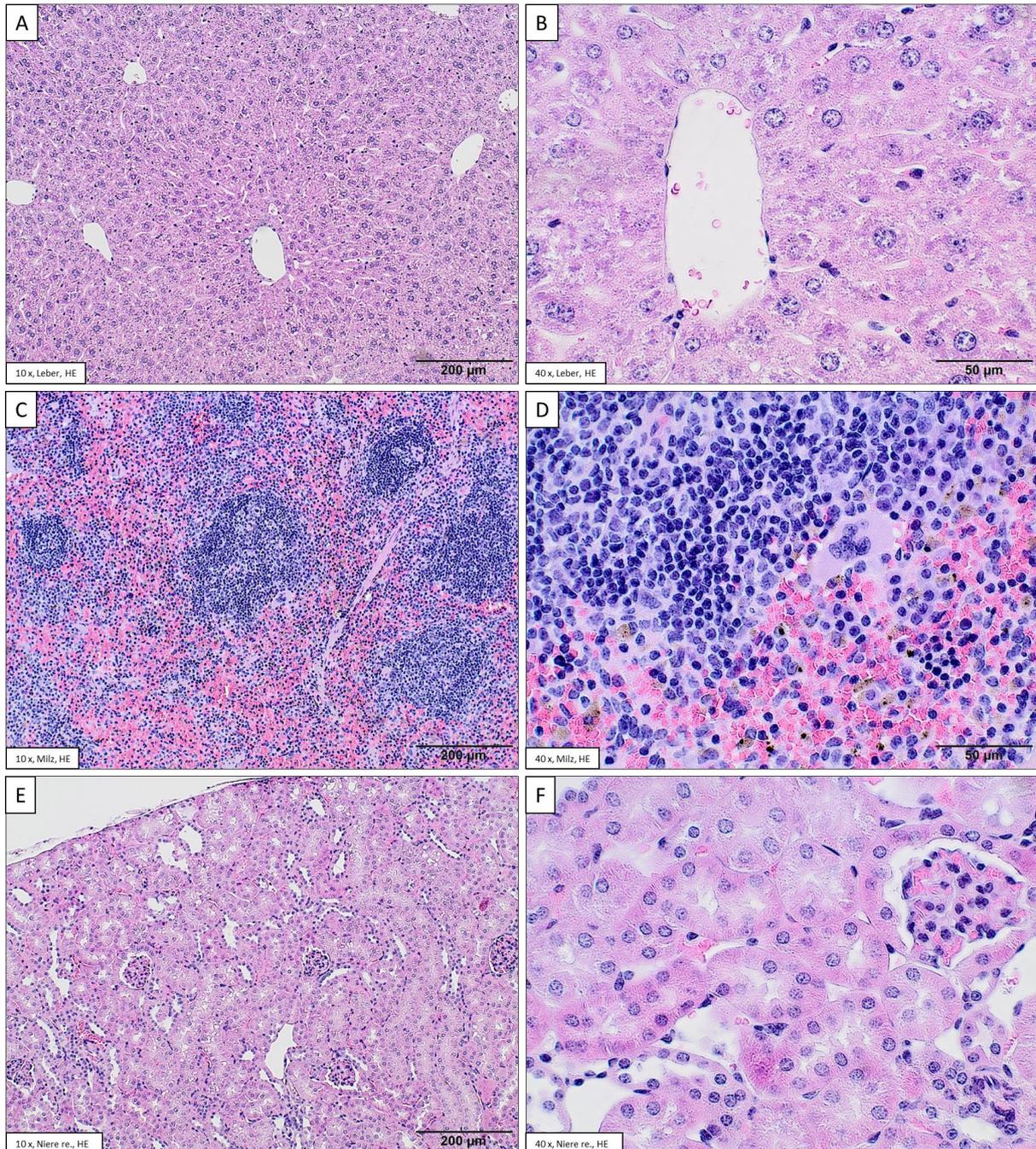


Abbildung 40: Histologische Aufarbeitung der Leber, Milz und Niere der 50.000 IU/Kg 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Behandlungsgruppe

Zur Darstellung kommen repräsentative Organgewebeschnitte aus der 50.000 IU/Kg 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Behandlungsgruppe. Es zeigt sich für alle oben gezeigten Organe eine physiologische Konfiguration. Die Darstellung der Organe war in Low-Dose Kontrollgruppe und der 50.000 IU/Kg 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Behandlungsgruppe identisch. HE-Färbung, 10x Vergrößerung links, 40x Vergrößerung rechts. (A-F) Es zeigen sich allseits physiologische Darstellungen der histologisch untersuchten Organe.

4.2.2 Maushauptversuch

4.2.2.1 Mausgewicht, klinische Evaluation, makroskopische Tumoranalyse

Im Maushauptversuch wurde der Einfluss der im Vorversuch etablierten oralen Vitamin D₃-Konzentrationen auf die Tumorinduktion und Tumorprogression *in vivo* unter Verwendung des 4NQO-induzierten oralen Karzinogenese-Modells in C57BL/6NRj-Mäusen untersucht. Hierbei wurden die Tiere der verschiedenen Behandlungszweige bezüglich des Gewichts, des 25-OH Vitamin D₃-Serumspiegels, des klinischen Allgemeinzustands, der Tumoranzahl und des Tumorumfanges ausgewertet und miteinander verglichen. Die gemessenen Endergebnisse sind in Abbildung 41 zusammengefasst.

Bzgl. des **Mausgewichts** zeigte sich, dass sämtliche 8 Wochen alte Tiere mit einem Initialgewicht zwischen 22 g und 26 g in den Versuch starteten. Nach der initialen Blutentnahme zum Zeitpunkt Null erkannte man eine kurzzeitige Stagnation der Gewichtszunahme in allen Behandlungsgruppen. Anschließend erfolgte eine regelrechte, nahezu parallel verlaufende Gewichtszunahme in allen 3 Behandlungsgruppen bis Woche 15. Das Gewicht betrug zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich 31,4 g ± 1,4 g für die 7.500 IU/Kg Behandlungsgruppe, 30,4 g ± 2,8 g für die 50.000 IU/Kg Behandlungsgruppe und 29,6 ± 1,4 g für die Low-Dose Gruppe. Eine kurze Stagnation der Gewichtszunahme war wie bereits im Mausvorversuch zeitlich mit den venösen Blutentnahmen assoziiert. Ebenfalls konnte man eine kurvenschneidende Gewichtszunahme für die 7.500 IU/Kg Behandlungsgruppe erkennen, die ab Woche 5 signifikant über den Durchschnittsgewichten der anderen Gruppen lag. Ab Woche 15 stagnierte in allen Gruppen die kontinuierliche Gewichtszunahme. Für die 50.000 IU/Kg Behandlungsgruppe erfolgte ab diesem Beobachtungszeitpunkt eine kontinuierliche Gewichtsabnahme auf ein durchschnittliches Endgewicht auf von 27,6 g mit ± 2,6 g. Eine vergleichbare Gewichtsabnahme erfolgte in der 7.500 IU/Kg Behandlungsgruppe und in der Low-Dose Gruppe erst ab Woche 20. Die Endgewichte unterschieden sich in allen 3 Versuchsgruppen und waren am höchsten in der 7.500 IU/Kg Behandlungsgruppe mit 31,5 g ± 3,2 g. Die Low-Dose Kontrollgruppe erreichte ein Endgewicht von 29,2 g ± 2,8 g.

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Endgewicht zwischen 50.000 IU/Kg und 7.500 IU/Kg Vitamin D₃-Behandlungsgruppe mit p=0,004. Zwischen 50.000 IU/Kg Vitamin D₃-Behandlung und der 0 IU/Kg Kontrollgruppe zeigte sich mit p=0,18 kein signifikanter Unterschied. Auch zwischen 0 IU/Kg Kontrollgruppe und 7.500 IU/Kg Vitamin D₃-Behandlungsgruppe zeigte sich mit p=0,09 kein signifikanter Unterschied im Endgewicht, jedoch eine klare Tendenz dahingehend, dass die 7.500 IU/Kg Vitamin D₃-Behandlungsgruppe das höchste Endgewicht zum Versuchende erreichte. Zur Anwendung der statistischen Analyse wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test mit ggf. Welch-Korrektur bei Normalverteilung der Daten durchgeführt.

Ergebnisse

Der **25-OH Vitamin D₃-Spiegel** wurde zu Beginn des Versuchs, im weiteren Versuchsverlauf alle 5 Wochen und schließlich bei Dissektion der Tiere durch Blutentnahmen mit nachfolgender ELISA-Analyse bestimmt. Die 8 Wochen alten Tiere erhielten vor Versuchsbeginn eine Standarddiät, sodass sich für alle Behandlungsgruppen eine initiale Serumkonzentration zwischen 36 ng/ml und 42 ng/ml 25-OH Vitamin D₃ einstellte. Zum zweiten Messzeitpunkt in Woche 5 zeigten sich bereits deutliche Unterschiede zwischen den gemessenen 25-OH Vitamin D₃-Serumwerten. Die 50.000 IU/Kg Behandlungsgruppe erreichte in Woche 5 einen Durchschnittswert von 129,8 ng/ml \pm 9,4 ng/ml, welcher im zeitlichen Versuchsverlauf langsam auf 120,2 ng/ml \pm 5 ng/ml in Woche 22 gefallen war. Die 7.500 IU/Kg Behandlungsgruppe stieg innerhalb der ersten 5 Wochen auf einen Serumwert von 60,1 ng/ml. Dieser Wert blieb über den gesamten Versuchsverlauf weitgehend konstant und betrug bei Versuchsende 53,5 ng/ml \pm 4,8 ng/ml. Die Low-Dose Kontrollgruppe startete mit einer initialen Serumkonzentration von 38,2 ng/ml \pm 5,1 ng/ml. Diese fiel kontinuierlich auf 20,9 ng/ml \pm 5,4 ng/ml in Woche 22 ab. Zur weiteren statistischen Analyse der Serumendwerte wurde bei Normalverteilung der Daten ein ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur durchgeführt. Es zeigte sich zwischen 50.000 IU/Kg Vitamin D₃-Behandlungsgruppe und den beiden anderen Gruppen hochsignifikante Unterschiede in den Serumendwerten mit jeweils $p < 0,0001$. Auch zwischen 7.500 IU/Kg Vitamin D₃-Behandlungsgruppe und 0 IU/Kg Kontrollgruppe zeigte sich mit $p < 0,0001$ ein hochsignifikanter Unterschied in den durchschnittlichen 25-OH Vitamin D₃-Serumendwerten der Mäuse.

Die **Anzahl makroskopisch sichtbarer intraoraler Tumore** wurde intraoperativ in regelmäßigen klinischen Untersuchungen der Maulregion der Tiere in Isoflurannarkose bestimmt. Dazu wurden systematisch Zunge, Zahnfleisch, harter Gaumen, weicher Gaumen, Zungengrund, Rachen und Mundboden nach exophytischen Läsionen untersucht. Zur statistischen Analyse hinsichtlich potenzieller signifikanter Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der durch 4NQO induzierten Tumore zwischen den Behandlungsgruppen wurde initial der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Dieser war mit $p = 0,0006$ hochsignifikant hinweisend auf statistische Unterschiede bezüglich der Tumoranzahl in den verschiedenen Behandlungsgruppen. Es zeigte sich, dass in der 50.000 IU/Kg Behandlungsgruppe zwischen minimal 0 und maximal 2 Tumoren pro Tier auftraten. Dabei wurden bei 25 % ($n = 3$) der Tiere in dieser Gruppe gar keine intraoralen Tumoren festgestellt. Der Mittelwert innerhalb dieser Gruppe betrug 1,25 Tumoren pro Tier nach 22 Wochen. In der 7.500 IU/Kg Behandlungsgruppe zeigte sich eine weitere Spannweite der Tumoranzahl zwischen 1 bis 6 Tumoren pro Tier. Der Mittelwert der Tumoranzahl betrug in dieser Gruppe 3. Die Tumoranzahl unterschied sich zwischen den Gruppen 7.500 IU/Kg und 50.000 IU/Kg hochsignifikant mit $p = 0,0014$. Die 0 IU/Kg Behandlungsgruppe zeigte die höchste Tumoranzahl, mit einer Spannweite zwischen minimal 2 und maximal 7 Tumoren pro Tier. Die durchschnittliche

Ergebnisse

Tumorlast betrug 3,636 Tumoren pro Tier. Es bestanden zwischen den Gruppen 0 IU/Kg und 7.500 IU/Kg mit $p=0,3180$ keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Tumoranzahl pro Tier. Ein hochsignifikanter Unterschied zeigte sich jedoch zwischen den Behandlungsgruppen 0 IU/Kg und 50.000 IU/Kg mit $p<0,0001$. Zur statistischen Analyse wurde der Mann-Whitney-Test bei nicht parametrischer Datenverteilung verwendet.

Die **extralinguale Tumormanifestation** wurde ebenfalls untersucht. Dazu wurden alle Tumoren gezählt, die nicht an Zunge, Zungengrund oder Zungenunterseite auftraten. Der Kruskal-Wallis Test zeigt für die nicht parametrisch angeordneten Werte signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ($p=0,0413$). In der 50.000 IU/Kg Gruppe zeigte sich für alle Tiere 0 extralinguale Tumor-Manifestationen. Für die Gruppen mit 7.500 IU/Kg und 0 IU/Kg Vitamin D₃-Behandlung zeigte sich eine Spanne zwischen 0 und maximal 2 extralingualen Tumoren pro Tier. Der Mittelwert extralingualer Tumore in der 7.500 IU/Kg Gruppe betrug 0,33 Tumore pro Tier. Für die 0 IU/Kg Gruppe betrug dieser Wert 0,55 Tumore pro Tier. Die beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant in der Auftretenshäufigkeit extralingualer Tumore mit $p=0,4733$. Verglich man hingegen die 0 IU/Kg Kontrolle gegen die 50.000 IU/Kg Behandlungsgruppe, so konnte man mit $p=0,0137$ signifikante Unterschiede in der extralingualen Tumormanifestation feststellen mit einer geringeren Anzahl extralingualer Tumormanifestationen in der 50.000 IU/Kg Behandlungsgruppe.

Das **kumulierte Tumolvolumen pro Tier** wurde durch die intraoperative Vermessung der einzelnen Tumore mit anschließender Errechnung des Gesamtvolumens erhoben. Es zeigte sich initial bei der Anwendung des Kruskal-Wallis Test mit $p=0,5075$ keine signifikanten Unterschiede innerhalb der drei Behandlungsgruppen. Die Behandlungsgruppe mit 50.000 IU/Kg Vitamin D₃ zeigte die größte Spannweite der Volumina zwischen 0 μL und 39,5 μL pro Tier. Der Mittelwert des Tumolvolumens betrug 5,843 $\mu\text{L} \pm 11,3 \mu\text{L}$. Die 7.500 IU/Kg Vitamin D₃-Behandlungsgruppe zeigte eine interindividuelle Tumolvolumen-Spannbreite zwischen 0,05 μL und 36,65 μL . Der Mittelwert betrug in dieser Gruppe 5,828 $\mu\text{L} \pm 10,7 \mu\text{L}$. Bei nicht parametrischer Werteverteilung in allen Behandlungsgruppen zeigte der Mann-Whitney-U Test zwischen 50.000 IU/Kg und 7.500 IU/Kg mit $p=0,3449$ keine statistische Signifikanz. Die Tumorumfänge in der 0 IU/Kg Kontrollgruppe reichten von 0,22 μL bis 15,58 μL . Das mittlere Tumolvolumen betrug in dieser Gruppe 3,694 $\mu\text{L} \pm 4,4 \mu\text{L}$ pro Tier. Zwischen 0 IU/Kg und 7.500 IU/Kg wurde mit $p=0,4134$ keine statistische Signifikanz festgestellt. Dies galt ebenfalls für den Vergleich zwischen 0 IU/Kg und 50.000 IU/Kg mit $p=0,4465$.

Ergebnisse

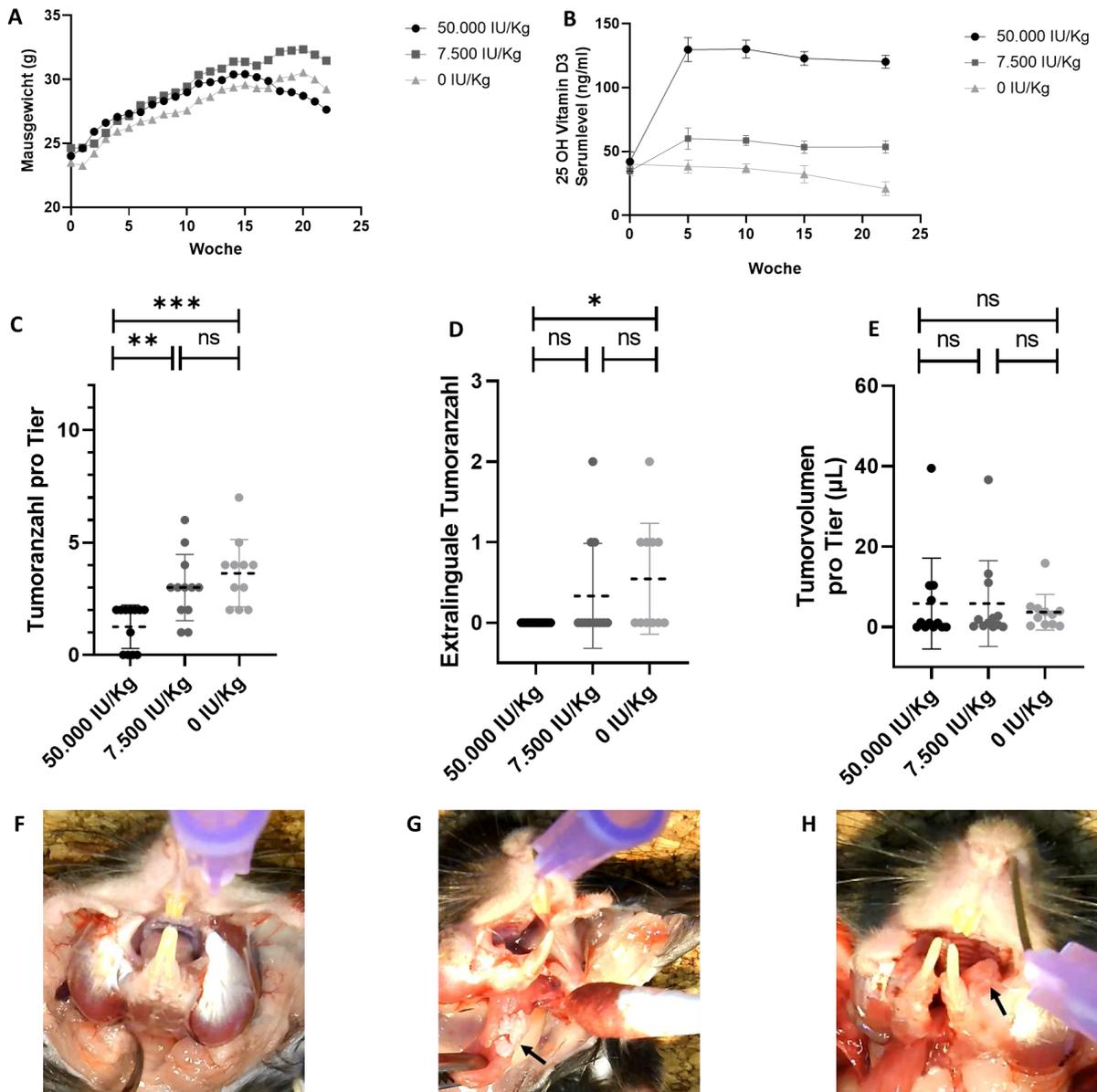


Abbildung 41: 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Supplementation reduziert Tumoranzahl und extralinguale Tumormanifestationen

(A) Das durchschnittliche Mausgewicht der 7.500 IU/Kg Behandlungsgruppe ist bei Versuchsende am höchsten. **(B)** Die ermittelten 25-OH Vitamin D₃-Serumspiegel entsprechen dem Versuchsdesign und erzielen supraphysiologische, hochphysiologische und insuffiziente Vitamin D₃-Versorgungsstatus in den entsprechenden Behandlungsgruppen. **(C)** Die Tumoranzahl pro Tier zeigte in der 50.000 IU/kg Vitamin D₃-Behandlungsgruppe eine hochsignifikante Reduktion makroskopisch sichtbarer Tumoren. **(D)** Es zeigte sich für extralinguale Tumormanifestationen einschließlich Manifestationen an Gingiva, Pharynx, hartem Gaumen, weichem Gaumen und Mundboden eine signifikante Reduktion in der 50.000 IU/Kg Vitamin D₃-Behandlungsgruppe. **(E)** Das kumulierte Tumorummen pro Tier zeigte keine statistischen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. **(F)** Dissektion und klinische Untersuchung der Mundhöhle vor Unterkieferspaltung. **(G)** Intraoperative Darstellung des Operationssitus. Der Pfeil zeigt auf einen exophytisch wachsenden Zungentumor einer Maus aus der 0 IU/Kg Behandlungsgruppe. **(H)** Intraoperative Darstellung des Operationssitus, der Pfeil weist auf eine extralinguale Tumormanifestation.

4.2.2.2 Immunologisches Tumormikromilieu

Nach Auswertung der makroskopischen Tumoranalyse erfolgte die immunhistochemische Aufarbeitung der Tumorpräparate und des peritumoralen Stromas. Analysiert wurden die folgenden 5 Immunzellpopulationen: CD3+ T-Zellen, CD8+ T-Zellen, NK-Zellen, CD168+ Makrophagen und FOXP3+ T_{reg}-Zellen.

In jedem Färbeprotokoll wurde die Milz eines repräsentativen Tiers aus dem Mausvorversuch als Positivkontrolle verwendet. Jede Probe wurde auf die Anzahl und Größe von mikroskopisch sichtbaren Tumoren untersucht. Diese wurden als zusammenhängender Tumor definiert bei einer Größe von mindestens 3 Gesichtsfeldern in 40-facher Vergrößerung. Die höchste Immunzellinfiltration fand sich intratumoral nahe der Tumorbasis und direkt im peritumoralen Stroma (s. Abbildung 42). Es zeigten sich für alle Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl mikroskopisch sichtbarer Tumoren ($p=0,1091$, Kruskal-Wallis Test). Jedoch zeigte sich eine vergleichbare Tendenz wie für die Anzahl makroskopisch sichtbarer Tumore, dass die Vitamin D₃-Behandlungsgruppen weniger mikroskopische Tumoren entwickelten. Die durchschnittliche Anzahl der Tumoren betrug für die 50.000 IU/Kg und 7.500 IU/Kg Behandlungsgruppe 1,75 Tumoren pro Tier und für die 0 IU/Kg Gruppe 2,636 Tumoren pro Tier.

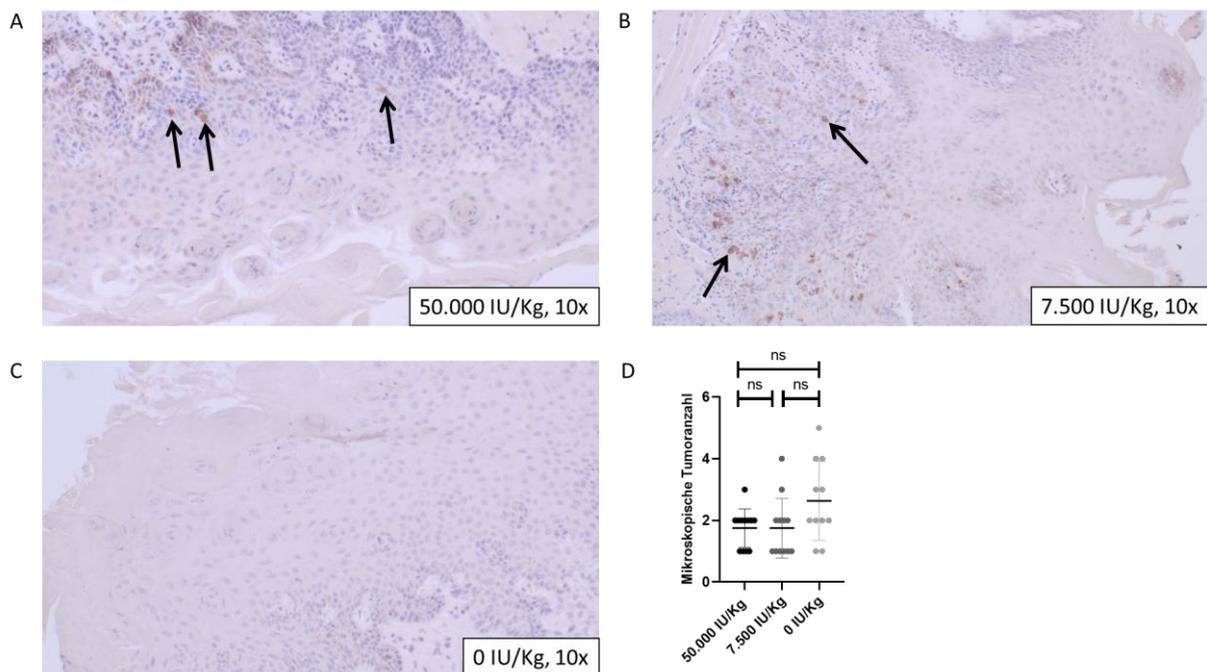


Abbildung 42: Repräsentative Tumorauschnitte nach immunhistochemischer CD8-Färbung
(A-C) Darstellung der mikroskopischen Tumorausdehnung in 10-facher Vergrößerung: Es zeigt sich deutlich, dass die höchste Immunzellinfiltration am basalen Tumorpole stattfand. Es zeigte sich zudem die stärkste Immuninfiltration in den mit Vitamin D₃ behandelten Gruppen. **(D)** Die mikroskopische Tumorzählung zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Tendenziell zeigt sich eine reduzierte Tumorraten in den Vitamin D₃-Behandlungsgruppen. Die schwarzen Pfeile zeigen auf CD8+ Immunzellen.

Ergebnisse

Im Folgenden ist die Analyse der einzelnen Immunzellpopulationen innerhalb der Tumoren und des peritumoralen Stromas im Detail beschrieben. Abbildung 43 zeigt eine Übersicht der untersuchten Immunzellpopulationen und deren Immunzellinfiltrationen.

Die Analyse der Immunzellen der Tumordinfiltration mit dem Marker **CD3** zeigte hochsignifikante ($p < 0,0001$, Ordinary One way ANOVA) Unterschiede in der Anzahl der intra- und peritumoralen Zellen gemessen zwischen den Versuchsgruppen. Die 7.500 IU/Kg Testgruppe zeigte die stärkste CD3+ Zellansammlung mit einem Median von 48 Zellen pro Sichtfeld bei 40-facher Vergrößerung. Es folgte die 50.000 IU/Kg-Behandlungsgruppe mit durchschnittlich 33 Zellen pro Tumorgesichtsfeld. Der Unterschied war statistisch signifikant ($p = 0,0167$, Mann-Whitney-Test). Die Kontrollgruppe mit 0 IU/Kg zeigte die schwächste Immuninvasion mit einem Median von 26 CD3+ Zellen pro 40x Gesichtsfeld Tumor. Die Vitamin D₃-Behandlungsgruppen zeigten daher beide eine hochsignifikant erhöhte intratumorale CD3+ Immunzellinfiltration im Vergleich zur 0 IU/Kg Vitamin D₃-Kontrolle.

Ein ähnliches Ergebnis zeigt sich bei der Analyse der Immuninfiltrate mit den **CD8+ zytotoxischen T-Zellen**: Die Behandlungsgruppen unterschieden sich insgesamt signifikant ($p = 0,0105$, Ordinary One way ANOVA). Es zeigte sich im Detail eine signifikant höhere Anzahl von intratumoralen CD8+ T-Zellen in der 7.500 IU/Kg Behandlungsgruppe bei medianer Immuninfiltration von vier CD8+ Zellen pro Gesichtsfeld Tumor, verglichen mit der 50.000 IU/Kg Behandlungsgruppe ($p = 0,0189$) und der 0 IU/Kg Behandlungsgruppe ($p = 0,0123$). Zwischen 0 IU/Kg und 50.000 IU/Kg Behandlungsgruppe zeigte sich kein statistischer Unterschied in der Anzahl CD8+ Immunzellen mit $p = 0,57$ (zweiseitiger ungepaarter t-Test).

Ein paralleler Trend wurde bei **NKRP16+ T-Zellen (NK-Zellen)** beobachtet. Die Behandlungsgruppe mit 7.500 IU/Kg zeigte die stärkste Infiltration mit dieser Immunzellpopulation. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur 0 IU/Kg Kontrollgruppe mit $p = 0,0249$ (Mann-Whitney-Test). Es konnte kein signifikanter Unterschied der NK-Zell-Population zwischen 50.000 IU/Kg und 7.500 IU/Kg Behandlung mit $p = 0,62$ (Mann-Whitney-Test) festgestellt werden. Ebenso zeigte die statistische Analyse, dass kein signifikanter Unterschied des NK-Zellinfiltrates zwischen 0 IU/Kg und 50.000 IU/Kg Behandlung bestand ($p = 0,27$, Mann-Whitney-Test).

Die Analyse von **C163+ M2-Makrophagen** zeigte keine statistischen Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen ($p = 0,187$, Ordinary one way ANOVA). Anhand der visuellen Darstellung lässt sich ein leichter Trend beschreiben, der zeigt, dass in den Vitamin D₃-Behandlungsgruppen insgesamt weniger intratumorale M2-Makrophagen vorhanden waren.

Im Gegensatz zu den bisherigen Trends zeigte die Analyse der **FOXP3+ T_{reg}-Zellen** eine hochsignifikant gesteigerte Immuninfiltration durch FOXP3+ Zellen in der 0 IU/Kg Kontrolle. Die statistischen Analysen ergaben signifikante Unterschiede zwischen den 0 IU/Kg und 7.500 IU/Kg Behandlungsgruppen ($p = 0,0111$, Mann-Whitney-Test) und zwischen den 0 IU/Kg und

Ergebnisse

50.000 IU/Kg Behandlungsgruppen ($p=0,0006$, Mann-Whitney-Test) mit der jeweils höheren Immunzellinfiltration in der 0 IU/Kg Gruppe.

Insgesamt zeigte sich damit eine stärkere Immuninfiltration für die immunstimulierenden bzw. eine gesteigerte Immunaktivität anzeigenden CD3+, CD8+ und NRKP16+ Zellen in den Vitamin D₃-Behandlungsgruppen. Eine gesteigerte Immuninfiltration mit den immunsuppressiv bzw. immunregulatorisch wirkenden FOXP3+ Zellen innerhalb des intra- und peritumoralen Gewebes kam in der Kontrollgruppe zur Darstellung. Es konnte keine signifikante Regulation immunsuppressiver CD163+ Zellen durch eine Vitamin D₃-Behandlung festgestellt werden

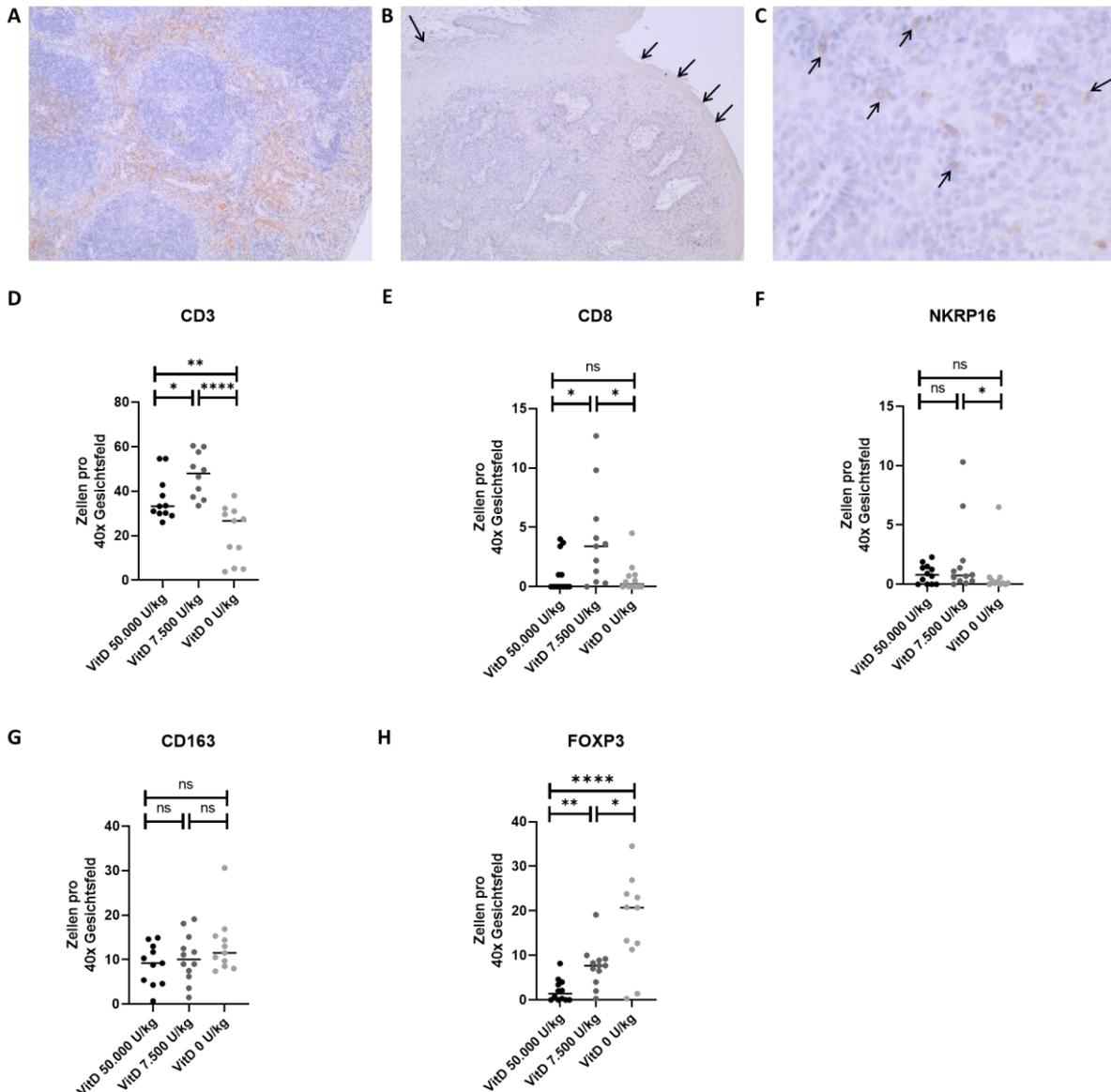


Abbildung 43: Die immunhistochemische Färbung zeigt eine höhere Immuninfiltration von Tumoren innerhalb der mit Vitamin D₃ behandelten Gruppen

(A) Darstellung von physiologischem Milzgewebe in 10-facher Vergrößerung als Referenzgewebe für die Immunfärbung. (B) 10-fach vergrößertes Tumorgewebe. Der Tumor nimmt eine kreisförmige Form an. Die Pfeile deuten auf die apikale Grenze. (C) 40-fach vergrößertes Tumorgewebe. CD8+ Immunzellen können eindeutig identifiziert und gezählt werden. Die Pfeile zeigen auf einzelne CD8+ Zellen. (D-H) Anzahl der gekennzeichneten Immunzellen intratumoral und peritumoral in einem Gesichtsfeld bei 40-facher Vergrößerung innerhalb der verschiedenen Kontrollgruppen.

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Effekte von Vitamin D₃ auf Tumorinitiation, Tumorprogression und antitumorale Immunantwort sowie die molekularen Wirkweisen von Vitamin D₃ auf HNSCCs im immunkompetenten Mausmodell sowie in HNSCC-Zelllinien diskutiert. Folgend werden diese Ergebnisse im Kontext therapeutischer Ansätze für Kopf-Hals-Tumoren aufgegriffen.

5.1 Einfluss von Vitamin D₃ auf die Entstehung und Progression von HNSCCs

Im Rahmen der **Zellkulturversuche** zeigte sich eine ausgeprägte antitumorale Wirkweise von Vitamin D₃ im Sinne einer dosisabhängigen Inhibition der Tumorzellproliferation und -migration *in vitro*. Hierzu wurde das Proliferations- und Migrationsverhalten von HNSCC-Zelllinien unter Verwendung des xCELLigence Proliferationsassays und eines Boyden-Chamber-Migrationsassays bei Zugabe von verschiedenen Vitamin D₃-Behandlungskonzentrationen untersucht. Besonders ausgeprägt war die **Inhibition der Zellproliferation** bei höheren Behandlungskonzentrationen. Die stärksten antiproliferativen Effekte konnten in der 50.000 pg/ml Behandlungsgruppe nach 50 Stunden nachgewiesen werden. Auch konnte eine **hochsignifikante Reduktion der Tumorzellmigration** nach 72 Stunden in der 50.000 und 2.000 pg/ml Behandlungsgruppe beobachtet werden.

Wir konnten somit die vielfach in der Literatur für andere Tumorentitäten beschriebene antineoplastische Wirkung von Vitamin D₃ *in vitro* für Kopf-Hals-Karzinome rekapitulieren.

Die Progression von HNSCCs beinhaltet genetische und epigenetische Modifikationen in Protoonkogenen und Tumorsuppressoren (Molinolo *et al.*, 2009). Die Identifikation von Schlüsselmutationen im molekularen Mechanismus der HNSCC-Entstehung ermöglichte eine biologische Modellierung dieser Prozesse. Dabei war es entscheidend, die komplexe molekulare Tumorsignatur von HNSCCs des Menschen in immunkompetenten Mäusen abzubilden. Der Entstehung von HNSCCs liegt häufig die chronische Noxen-Exposition mit Zigarettenrauch und Alkohol zugrunde.

Um diesen Prozess zu simulieren, wurden viele Tumorinduktionsmodelle in der Literatur beschrieben und verglichen. Das **orale Karzinogenese-Modell** durch das wasserlösliche, chemisch hergestellte Molekül **4NQO** konnte diesen Anforderungen am besten gerecht werden und simulierte die molekulare Karzinogenese von HNSCCs am besten. Das Modell wird daher seit 1960 für die Induktion oraler Karzinome im immunkompetenten Mausmodell von mehreren Kopf-Hals-onkologischen, wissenschaftlichen Arbeitsgruppen weltweit angewendet (Vitale-Cross *et al.*, 2009). Dabei bildet 4NQO DNA-Addukte, modifiziert Basen und induziert intrazellulären oxidativen Stress. Diese Mechanismen ähneln den genetischen Veränderungen, die durch eine Tabakkarzinogene hervorgerufen werden. Somit dient 4NQO

als Ersatz der Tabakexposition durch Zigarettenrauchen (Kanojia and Vaidya, 2006). Die längere Exposition (16 Wochen) mit hohen Dosen (50 µg/mL) von 4NQO in Trinkwasser zeigte, dass in 100 % der Fälle orale Läsionen verursacht wurden. Viele der Läsionen evolvierten im weiteren spontanen Verlauf innerhalb kurzer Zeit zu invasiven Plattenepithelzellkarzinomen (Tang *et al.*, 2004).

Die oralen Tumoraläsionen der mit 4NQO behandelten Mäuse spiegeln Veränderungen in menschlichen HNSCCs hinreichend wider. Wesentliche Schlüsselveränderungen sind veränderte Differenzierungsmarker, Inhibierung von Tumorsuppressoren wie p16 und p53 und veränderte Wachstumsfaktoren wie VEGF (Vitale-Cross *et al.*, 2009). Das Modell bietet somit reproduzierbare Tumorinitiationsprozesse ab, die denen im menschlichen Organismus sehr nahe kommen, sodass Ergebnisse *in vivo* unter Verwendung dieses Tiermodells, wenn auch mit Einschränkungen, Rückschlüsse auf die Situation im Menschen erlauben. Zusätzlich wurden entsprechend der Geschlechtsverteilung bei humanen HNSCC-Patienten in den Tierversuchen im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich männliche Tiere untersucht.

Im Rahmen der *in vivo* Untersuchungen zeigte sich, dass die Vitamin D₃-Behandlung in der 50.000 IU/Kg Verumgruppe eine **hochsignifikante Reduktion der makroskopisch sichtbaren Tumoren** erzielte ($p < 0,0001$). Gleiches galt für die **Manifestation von Tumoren im extralingualen Bereich** ($p = 0,0413$). Die mikroskopische Tumoranalyse zeigte mit $p = 0,1091$ keine signifikanten Unterschiede in der Tumorzahl. Jedoch wird damit die starke Tendenz deutlich, dass durch die Vitamin D₃-Behandlung auch die **mikroskopisch nachweisbare Tumorzahl gesenkt** wurde. Im kumulierten Gesamttumorvolumen pro Tier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,5075$). Eine Tumorzahlen-reduzierende Wirkung von Vitamin D₃ konnte in diesem Versuchsdesign also nicht gezeigt werden. Die klinische Gesamtsituation gemessen am Gesamtgewicht wies darauf hin, dass eine Vitamin D₃-Supplementation zu keinem verschlechterten **Allgemeinzustand** nach 22 Wochen führte.

Vergleichbare Studien im Hamstermodell zur Untersuchung der tumorprotektiven Wirkung von Vitamin D₃ haben eine starke Reduktion der Tumorzahl durch eine intraperitoneale Vitamin D₃-Gabe hervorrufen können. Lediglich ein Tier von insgesamt 10 mit Vitamin D₃ behandelten Tieren zeigte eine Tumorentwicklung, in der Kontrollgruppe hingegen 7 von 10 Tieren (Meier *et al.*, 2007). Zur Induktion der Tumore wurde das bekannte Karzinogen 7,12-Dimethylbenzanthracen (DMBA) in die Wangentasche von insgesamt 40 Hamstern injiziert. Durch die lokale Injektion entstehen Nekroseareale mit entsprechender inflammatorischer Komponente. Die unterschiedliche Methodik und die unterschiedliche Tumormutationssignatur durch DMBA machen eine direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dieser Studie jedoch nur eingeschränkt möglich.

Zur Untersuchung der Wirkung von Vitamin D₃ im immunkompetenten 4NQO-Mausmodell über die Karzinogenese von HNSCCs gibt es bisher lediglich zwei veröffentlichte Arbeiten (Vincent-Chong *et al.*, 2019; Verma *et al.*, 2020): Vincent-Chong *et al.* setzten dazu C57BL/6NRj-Mäuse über 16 Wochen dem Karzinogen 4NQO im Trinkwasser aus. Es gab insgesamt 3 Behandlungsarme, die in unterschiedlicher zeitlicher Ausdehnung und zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine i.p. 0,1 µg 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃-Gabe an 3 definierten Wochentagen erhielten. Die erste Behandlungsgruppe wurde parallel zur 4NQO-Exposition i.p. mit Calcitriol injiziert, die zweite Gruppe 10 Wochen nach Beendigung der 4NQO-Exposition und die letzte Gruppe wurde über den gesamten Versuchszeitraum von 26 Wochen mit 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃ i.p. injiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die parallele Verabreichung von Calcitriol und 4NQO über 16 Wochen die Zahl der prämaligen Läsionen signifikant um 57 % verringerte. Die durchgehende Gabe von Calcitriol schien hingegen das Risiko invasiver HNSCCs zu erhöhen. Aufgrund sehr geringer Tierzahlen zwischen 4 und 5 Tieren pro Gruppe konnten keine signifikanten Aussagen bezüglich der Karzinomentwicklung getroffen werden.

Verma *et al.* untersuchten ausschließlich weibliche C57BL/6NRj-Mäuse. Diese wurden mit einer von drei Vitamin D₃-Diäten (25 IU/Kg, 100 IU/Kg, 10.000 IU/Kg) gefüttert und 16 Wochen lang mit 4NQO im Trinkwasser behandelt. Es zeigte sich in der mittleren Behandlungsgruppe mit 100 IU/Kg eine geringere Inzidenz von HNSCCs, diese Gruppe wies auch eine gesteigerte Anzahl intraläsionaler CD3+ T-Zellen auf. Die 10.000 IU/Kg Behandlungsgruppe zeigte bei Versuchende die höchste Inzidenz invasiver Karzinome. In diesem Versuch wurden lediglich 6 Tiere pro Versuchsgruppe untersucht. Die beschriebenen Ergebnisse zeigen keine statistische Signifikanz. Weiterhin wurde lediglich nur eine Immunzellpopulation intraläsional untersucht, sodass auch die Aussagen bezüglich der antitumoralen Immunantwort stark eingeschränkt ist.

Die Interpretation der Ergebnisse ist aufgrund teils widersprüchlicher Ergebnisse erschwert. Zusätzlich ist eine signifikante Aussage bei jeweils sehr geringer Tierzahl nicht möglich. Unser Versuchsdesign hingegen konnte aufgrund ausreichend großer Tierzahlen hochsignifikante Ergebnisse bezüglich einer Tumorreduktion durch Vitamin D₃ aufzeigen. Darüberhinaus zeigte unsere detaillierte immunhistologische Analyse der Tumorpräparate für verschiedene Immunpopulationen signifikant gesteigerte intraläsionale Immuninfiltrationen.

Der **Vitamin D₃-Serumausgangswert** scheint relevant zu sein, da in unserem Mausmodell höhere Vitamin D₃-Serumspiegel nachweislich mit der stärksten Reduktion der Tumorlast der Tiere einhergingen.

Mögliche *Confounder* bezüglich der systemischen Effekte müssen jedoch beachtet werden. Es ist kritisch zu diskutieren, ob diese Effekte durch eine lokale Akkumulation von Vitamin D₃

verstärkt wurden. Im Rahmen der Tierversuche erhielten sämtliche Tiere das modifizierte Futter *ad libidum* und *per os*, sodass die lokale Wirkung ebenfalls eine relevante Rolle spielen könnte. Die Noxen-Zufuhr von 4NQO erfolgte als Zusatz zum Trinkwasser *ad libidum*, sodass Noxen und Vitamin D₃ lokal im anatomischen Raum der Mundhöhle in enger räumlicher Beziehung standen. Möglicherweise konnte die starke Vitamin D₃-Exposition zusätzliche lokale antioxidative Effekte neben den systemischen Wirkweisen hervorrufen.

Um systemische Wechselwirkungen mit den unterschiedlichen Vitamin D₃-Serumkonzentrationen in einen Gesamtkontext einzuordnen, sind generelle Empfehlungen von Wirkspiegeln zu betrachten. Stark von der Norm abweichende 25-OH Vitamin D₃-Serumspiegel könnten, unabhängig von der antitumoralen Wirkung, Einfluss auf den Allgemeinzustand der Tiere nehmen und somit die gezeigten Ergebnisse mitbeeinflussen.

Aktuell werden dezidierte Definitionen über den Versorgungsstatus stark diskutiert. Ein Vitamin D₃-Mangel wird im Allgemeinen als ein 25-OH Vitamin D₃-Spiegel von unter 20 ng/ml definiert (Holick, 2007). Unterhalb dieses Wertes können Patienten einem erhöhten Risiko für Muskelschwäche, Knochenschmerzen und Fragilitätsfrakturen ausgesetzt sein. Vitamin D₃-Insuffizienz wurde definiert als ein 25-OH Vitamin D₃-Spiegel von 21 bis 29 ng/ml ohne offensichtliche klinische Symptome (Holick *et al.*, 2011). Eine Übertragbarkeit der Definitionen auf das Tiermodell erscheint nach aktuellen Studien plausibel.

Der 22-wöchige Vorversuch zur Toxizitätsbestimmung bezüglich zu hoher Vitamin D₃-Behandlungskonzentrationen zeigte für die Behandlungsgruppe mit über 140 ng/ml 25-OH Vitamin D₃-Serumspiegel massive systemischen Organtoxizität vor allem an Niere, Milz und Leber. Daher wurden zur anschließenden Evaluation antiproliferativer Effekte angepasste Dosierungen ohne systemische Toxizität von Vitamin D₃ verwendet. Zu niedrige 25-OH Vitamin D₃-Spiegel (Insuffizienz oder leichter Mangel) blieben ohne offenkundig nachweisbare klinische Symptome im Tiermodell (Mallya *et al.*, 2016). Die gemessenen Vitamin D₃-Serumspiegel des Maushauptversuchs scheinen somit keinen negativen Einfluss auf den Allgemeinzustand genommen zu haben.

Im Mausversuch zeigte sich zu Beginn für alle Versuchstiere ein initialer Startwert zwischen 40-50 ng/ml 25-OH Vitamin D₃. Im Rahmen der Folgeuntersuchung nach 5 Wochen zeigte sich ein rasches Einpendeln auf Serumniveaus für die 50.000 IU/Kg Tiere bei ca. 120 ng/ml, für die 7.500 IU/Kg Behandlungsgruppe bei 50-60 ng/ml und für die 0 IU/Kg Behandlungsgruppe bei 20 ng/ml. Für die weitere Diskussion werden deshalb die Begriffe supraphysiologisch (50.000 IU/Kg), hochphysiologisch (7.500 IU/kg) und defizient (0 IU/Kg) für den Serumstatus verwendet. Der Vitamin D₃-Serumstatus der Tiere lag jedoch selbst in der 0 IU/Kg Kontrollgruppe während des gesamten Zeitraumes knapp um 20 ng/ml. Damit lag der Vitamin D₃-Versorgungsstatus dieser Versuchgruppe zwischen einer gerade noch physiologischen Versorgung bis zu einer Defizienz. Häufig beobachtet man in Patienten mit

HNSCCs deutlich niedrigere Werte (<10 ng/ml). Bei dieser ausgeprägten Vitamin D₃-Mangelsituation könnte folglich ein noch besserer antineoplastischer Effekt einer Vitamin D₃ Substitution zu erwarten sein.

5.2 Einfluss von Vitamin D₃ auf antitumorale Aktivität des Immunsystems

Im Rahmen von Kopf-Hals-Tumoren zeigt sich, dass spezifische Zellgruppen des Immunsystems das Tumorgeschehen wesentlich beeinflussen. Das intra- und peritumorale Immunzellinfiltrat nimmt entscheidenden Einfluss auf die Tumor-Invasivität, Rezidivierung und Metastasierung. Dabei ist das komplexe Gefüge der Tumormikroumgebung und die Interaktion der verschiedenen Mediatoren und Immunzellpopulationen untereinander entscheidend.

Für HNSCCs zeigte sich vornehmlich eine gesteigerte antineoplastische Aktivität durch T_{eff}-Zellen, M1-Makrophagen und NK-Zellen, wohingegen eine immunsupprimierende Umgebung durch T_{reg}-Zellen, MDSCs und M2-Makrophagen induziert wird (Peltanova, Raudenska and Masarik, 2019; Economopoulou, Kotsantis and Psyri, 2020).

Da NK-Zellen und CD8+ T-Effektorzellen eine direkte antineoplastische, zytotoxische Wirkweise erzielen wird durch das vermehrte Vorliegen dieser Zellen innerhalb der TME ein verbessertes Ansprechen der Immuntherapie und ein verbessertes Gesamtüberleben in Verbindung gebracht (Nguyen *et al.*, 2016; Vassilakopoulou *et al.*, 2016). CD3+ T-Zellen scheinen ebenfalls mit einer verbesserten Gesamtprognose assoziiert zu sein (Starska-Kowarska, 2023). Eine gesteigerte Konzentration von T_{reg}-Zellen, MDSCs und M2-Makrophagen in der TME war mit einer schlechten Prognose und fortgeschrittenen Tumorstadien assoziiert (Peltanova, Raudenska and Masarik, 2019). M2-Makrophagen scheinen durch Interleukine wie IL-10 und TGF-β immunsuppressiv zu wirken und somit ein schlechteres Ansprechen der Immuntherapie zu bedingen (Li *et al.*, 2019). Ein ähnlich immunsuppressiver Effekt ist für FOXP3+ T_{reg}-Zellen beschrieben, die unter anderem die Aktivierung weiterer Immunzellen in der TME unterdrücken können (Starska-Kowarska, 2023).

Die immunhistochemische Untersuchung der intra- und peritumoralen Immunzellinfiltrate unserer Tierversuchsgruppen zeigte für alle untersuchten Immunzellpopulationen signifikant differenziell ausgeprägte Infiltrationen abhängig von der Vitamin D₃-Behandlungskonzentration. Dabei zeigte sich eine hochsignifikante Steigerung der verschiedenen Immunzellpopulationen durch eine Vitamin D₃-Substitution. Intra- und peritumorale CD3+ T-Zellen waren durch die Vitamin D₃-Behandlung hochsignifikant gesteigert (p<0,0001). Ein ähnliches Bild zeigte sich für CD8+ T-Zellen (p=0,0105). Die Immuninfiltration der NK-Zellen war mit p=0,0249 ebenfalls gesteigert in der 7.500 IU/Kg Vitamin D₃-Behandlungsgruppe. Eine Ausnahme bildete hierbei die Auswertung für CD163+ Makrophagen. Hierbei gab es mit p=0,187 keine statistisch signifikanten Unterschiede

zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen. Die Analyse von FOXP3+ T_{reg}-Zellen zeigte ein hochsignifikant gesteigertes Vorkommen in der 0 IU/Kg Kontrollgruppe ($p < 0,0001$). Wir wiesen somit durch die Vitamin D₃-Behandlung im immunkompetenten Mausmodell eine **Steigerung prognostisch günstiger Immunzellen** und eine **Minderung immunsupprimierender Zellen in der TME *in vivo*** nach.

Tierexperimentelle **Studien** konnten auch in anderen Tumorentitäten den gleichen Zusammenhang bezüglich Vitamin D₃ Gabe, Tumoringhibition und einer gesteigerten intratumoralen Immuninfiltration mit CD8+ T-Zellen zeigen (Karkeni *et al.*, 2019). Eine systematische Übersichtsarbeit von Maturana-Ramirez *et al.* zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen oralen Plattenepithelkarzinomen und niedrigen 25-OH Vitamin D₃-Spiegeln konnte zeigen, dass eine hohe Vitamin D₃-Versorgung den Gehalt an entzündungshemmenden Mediatoren, CD4+ T-Lymphozyten, CD8+ T-Lymphozyten und CD3+ T-Lymphozyten im intratumoralen Gewebe erhöht. Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine Normalisierung des Vitamin D₃-Serumstatus die antitumorale Immunantwort durch Verbesserung der zytotoxischen NK-Zellaktivität steigert (Bochen *et al.*, 2018). Gleichzeitig konnte eine Vitamin D₃-Supplementierung die mit einer Chemotherapie assoziierten Nebenwirkungen wie Mukositis oder Schmerzen reduzieren (Anand *et al.*, 2017).

Im Kontext des **Vitamin D₃-Serumstatus** zeigte sich in weiteren klinischen Studien, dass Patienten mit defizitären Vitamin D₃-Serumspiegeln intratumoral eine geringere Immunzellinfiltration aufwiesen als Patienten mit adäquatem Vitamin D₃-Versorgungsstatus. Zusätzlich waren niedrige 25-OH Vitamin D₃-Serumspiegel mit einem fortgeschrittenen Stadium und einer insgesamt schlechteren Prognose assoziiert (Bochen *et al.*, 2018; Maturana-Ramírez *et al.*, 2022). Diese Beobachtungen konnten vielfach *in vitro* belegt werden und bestätigten sich ebenfalls durch retrospektive klinische Datenanalysen.

Es ist von großem Interesse, das therapeutische Ansprechen durch potenzielle Immunmodulatoren zu verbessern und somit einen weiteren Überlebensvorteil des Patientenkollektivs zu erreichen. Vor diesem Hintergrund scheint eine **Vitamin D₃-Behandlung** in der medikamentösen Therapie von Tumorpatienten zukünftig potenziell eine wichtige Rolle einnehmen zu können. Ein wichtiges Element könnte die pleiotrope Induktion verschiedener molekularer Prozesse sein, welche die **antitumorale Immuninfiltration verstärken**. Bezogen auf die immunsupprimierende Mikroumgebung von HNSCCs ist diese Wirkweise von besonderer Relevanz, da dort die komplexen interzellulären Wechselwirkungen das Therapieansprechen prägen. Auch ist davon auszugehen, dass bei immunkompetenten Patienten durch die Steigerung der Immuninfiltration auch eine Prognoseverbesserung

erreicht werden kann. Die tierexperimentelle Analyse zeigte ebenfalls neben der gesteigerten Immuninfiltration auch eine signifikante Reduktion der Tumorlast.

Die signifikante Steigerung der CD8+ Immunzellinfiltration peri- und intratumoral durch die Vitamin D₃-Behandlung könnte daher im Kontext neuer Immuntherapien eine wichtige Rolle spielen. Insbesondere im Hinblick auf die Wirkweisen Immuncheckpoint-Inhibitoren oder CAR-T-Zellen sind die durch Vitamin D₃ erzielten Effekte potenziell in der Lage, Ansprechen und Wirkweise zu optimieren. Auch die Fähigkeit von Vitamin D₃, die Expression von Immun-Checkpoint-Rezeptoren auf Tumorzellen zu regulieren (Dimitrov *et al.*, 2017) und den Grad der Immuninfiltration in das Tumorstroma zu steigern, macht Vitamin D₃ damit zu einem potenziellen adjuvanten Molekül zur Steigerung der Immuncheckpoint-Inhibitor-Ansprechraten. Eine therapeutische Anwendung bei bereits vorhandener Tumorerkrankung könnte durch die Immunstimulation einen positiven Effekt erzielen.

Die adjuvante Gabe in Kombination mit weiteren Immuntherapeutika lässt durch die synergistischen Wirkweisen ebenfalls potenzielle klinisch relevante Effekte erwarten. Um dieser Frage nachzukommen, wurden bereits dezidierte Behandlungsprotokolle und Versuchsreihen an immunkompetenten Mäusen *in vivo* etabliert. Diese untersuchen die Effekte einer adjuvanten Gabe von Vitamin D₃ in Kombination Immuncheckpoint-Inhibitoren im Mausmodell in gegenwärtigen Projekten unserer Arbeitsgruppe.

Bezüglich Gesamtüberleben und Prognose kann bei unserem Versuchsdesign keine Aussage getroffen werden, da für alle Versuchsgruppen der festgelegte Zeitrahmen bis zur Dissektion gleich war. Eine Aussage über die optimale Vitamin D₃-Konzentration zur Prognoseverbesserung, Tumorreduktion und Immunstimulation ist mit diesen Ergebnissen nicht zu treffen. Es ist weiterhin fraglich, ob die gemessenen Serumkonzentrationen der Versuchstiere eine direkte Übertragbarkeit auf den Menschen ermöglichen. Unterschiedliche Wirkweisen im komplexen Gefüge der Immunantwort zwischen verschiedenen Organismen sind möglich. Es ist unter kritischer Betrachtung der Ergebnisse dennoch davon auszugehen, dass hochphysiologische bis supraphysiologische 25-OH Vitamin D₃-Werte die stärksten Wirkeffekte bezüglich antineoplastischer Immunaktivität und Inhibition der Tumorentstehung und -progression haben.

Die Surrogatparameter (hohe Immuninfiltration, prognostisch günstige Immunzellen) bezüglich eines guten Ansprechens der Immuntherapie zeigen in letzter Konsequenz auch nur bedingt reliable Ergebnisse. Auch in Tumorentitäten mit hoher Tumor-Lymphozyteninfiltration zeigte sich in einigen Fällen eine Resistenz gegenüber der Immuntherapie (Y.-P. Chen *et al.*, 2019). Ein ebenfalls relevanter Faktor scheint die Stromakomponente der TME zu sein, die durch komplexe Modellierung des Tumorstromas möglicherweise die Invasion von Lymphozyten verhindern könnte.

5.3 Einfluss von Vitamin D₃ auf molekulare *Pathways* von HNSCCs

Die **molekulare Genese von HNSCCs** ist komplex und durch zahlreiche Schlüsselmutationen gekennzeichnet, die sich auch abhängig von dem Weg der Karzinogenese (Noxen- versus HPV-induzierte HNSCCs) unterscheiden können. Während zu Beginn der Tumorinitiation in Noxen-induzierten HNSCCs die Inaktivierung diverser Tumorsuppressoren wie *CDKN2A* und *PTEN* eine zentrale Rolle spielen, wird die neoplastische Entartung im fortgeschrittenen Stadium durch Protoonkogene wie den PI3K-Signalweg vorangetrieben (Johnson *et al.*, 2020). Diese Veränderungen entstehen durch die chronische Exposition gegenüber exogenen Noxen wie den gesellschaftlichen Hauptrisikofaktoren Zigarettenrauch und Alkohol. Weitere Risikofaktoren für diese Mutationen sind alle Schleimhaut-labilisierenden Effekte sowie eine high-risk HPV-Infektion. Wesentliche Mechanismen, die den genetischen Mutationen zu Grunde liegen sind oxidativer Stress und DNA-Addukte. Bei Überschreiten der kompensatorischen, körpereigenen DNA-Reparaturmechanismen akkumulieren die DNA-Veränderungen. Damit beginnt eine Dysregulation des Zellzyklus und folglich die Initiation von invasiven Karzinomen.

Vitamin D₃ entwickelt seine vielfältigen Wirkweisen hauptsächlich durch die Aktivierung des nukleären Rezeptors VDR. Über direkte Induktionsprozesse werden diverse Gene reguliert. So übernimmt VDR beispielsweise eine wichtige Rolle in der Regulation des Energiestoffwechsels (Carlberg and Muñoz, 2022). Immunzellen sind die sich am schnellsten teilenden Zellen des Körpers. Durch die hohe zelluläre Aktivität nimmt das Immunsystem einen wesentlichen Anteil am Gesamtstoffwechsel ein. In diesem Kontext hat Vitamin D₃ vermutlich einen signifikanten Einfluss auf den Immunmetabolismus evolviert (Müller *et al.*, 2018). Mit zunehmender Komplexität des Immunsystems im Kontext der Evolution nahm auch der Einfluss auf das Immunsystem zu. Vitamin D₃ hat in diesem Kontext komplexe Wirkweisen auf die zelluläre Proliferation, Differenzierungsprozesse und Apoptose (Cortes *et al.*, 2016).

Zur Analyse der molekular ablaufenden Prozesse, die durch Vitamin D₃ in Kopf-Hals Karzinomzelllinien beeinflusst werden, erfolgte eine molekulare Analyse durch eine **RNA-Sequenzierung** von zwei Kopf-Hals-Karzinomzelllinien (UM-SCC1 und FaDu) mit anschließender bioinformatischer Auswertung. Diese identifizierte signifikant regulierte molekulare Prozesse und Einzelgene, die durch die Vitamin D₃-Behandlung differenziell reguliert wurden.

In der nachfolgenden Diskussion werden nur die Gene und *Pathways* näher betrachtet, die signifikant in beiden Zelllinien reguliert wurden. Die RNA-Sequenzierung zeigte umfangreiche Regulationen in diversen Prozessen.

Bei Betrachtung der 30 am signifikantesten regulierten Einzelgene in der UM-SCC1- und FaDu-Zelllinie zeigte sich in beiden Zelllinien eine Steigerung der Genexpression folgender

Gene: *SERINC2*, *CYP24A1*, *AFAP1L2*, *HSPG2*, *ARHGEF28*, *SEMA3B*, *CYP26B1*, *COL16A1*, *HTRA1* und *DNER*. *CYP24A1* als Schlüsselmolekül wurde am stärksten hochsignifikant heraufreguliert, was im Rahmen eines negativen *Feedback-Loop* aufgrund des Vitamin D₃-Metabolismus zu erwarten war. Dies konnte als Validitätsnachweis einer Vitamin D₃-Behandlung dienen.

Darüber hinaus zeigte sich, dass Vitamin D₃ über diverse genontologische *Pathways* hochsignifikant in beiden untersuchten Zelllinien verschiedene Prozesse differenziell beeinflusste. Zu diesen gehörten: *Signal transduction*, ***Oxidation reduction process***, *Response to lipopolysaccharide*, ***Response to drug***, *Cell-cell signaling*, ***Positive regulation of cell migration***, ***Inflammatory response***, ***Response to ethanol***, ***Immune response***, *Cellular response to lipopolysaccharide*, ***Positive regulation of cell proliferation***, ***Wnt signaling pathway*** und *Positive regulation of GTPase activity*. Es zeigte sich folglich eine umfangreiche metabolische Induktion, eine Steigerung der antioxidativen Prozesse sowie die verstärkte Induktion von Alkohol- und Pharmaka-abbauenden Prozessen. Im Kontext der aktuellen Studienlage zeigen sich große Überschneidungen mit den Signalwegen, die Vitamin D₃ auch in anderen Tumoren und Zelllinien reguliert (Carlberg and Muñoz, 2022). Für die Karzinogenese unmittelbar relevante onkogene sowie immunmodulierende Signalwege sind fett markiert und werden im onkologischen Kontext von HNSCCs nachfolgend weiter besprochen. Die Funktionen der Einzelgene wurden der Datenbank „GeneCards®: The Human Gene Database“ entnommen.

Oxidative reduction process: Oxidativer Stress ist einer der Hauptrisikofaktoren der Entstehung von Krebs (Jelic *et al.*, 2021). Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind in der Lage funktionelle Moleküle irreversibel zu schädigen und somit auch DNA-Schäden zu verursachen. Eine Akkumulation dieser Schäden entsteht im Rahmen einer Dysbalance zwischen ROS und antioxidativen Prozessen. Durch die 96-stündige Vitamin D₃-Behandlung *in vitro* konnten wir in beiden Zelllinien (UM-SCC1, FaDu) eine signifikante Steigerung antioxidativer Prozesse in den Tumorzellen nachweisen. Die Behandlung könnte somit die Dysbalance zwischen ROS und Antioxidantien partiell ausgleichen, was ein Mechanismus der antineoplastischen Wirkweise von Vitamin D₃ sein könnte. Im Kontext von Hochrisikopatienten (starke chronische Noxen-Exposition) könnte die Anwendung zur Reduktion von oxidativem Stress prophylaktisch erfolgen. Einzelgene, die in beiden Zelllinien diesem *GO-Pathway* zugeordnet und durch die Vitamin D₃-Behandlung signifikant induziert wurden sind unter anderem *CYP24A1*, *CYP26B1* und *CREG2*. Diese Gene kodieren für die Expression von Enzymen der CYP450-Monooxygenasen Superfamilie, die wesentlich bei der Metabolisierung von Medikamenten, Cholesterolsynthese, Steroidsynthese und Abbau weiterer Lipide beteiligt sind.

Response to drug: Die endogene Metabolisierung von exogen zugeführten Medikamenten und Noxen wird wesentlich durch die Enzymausstattung beeinflusst (Urquhart, Tirona and Kim, 2007). Eine wesentlicher mutagener Antreiber der Tumorinitiation von HNSCCs ist die Akkumulation von mutagenen Noxen-Metaboliten (Kleier, Werkmeister and Joos, 1998). Die toxischen Metabolite der Karzinogene führen zur kovalenten DNA-Wechselwirkungen und induzieren eine Tumorinitiation durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Leemans, Snijders and Brakenhoff, 2018). Im Rahmen der umfassenden metabolischen Antwort der Vitamin D₃-Behandlung ließ sich in diversen Genen aus diesem *GO-Pathway* eine signifikante differenzielle Regulation nachweisen. Zu diesen Genen gehörte *CA9*, das in beiden Zelllinien reguliert war. Ein möglicher Mechanismus zur Reduktion der Akkumulation toxischer Metabolite könnte die Induktion diverser metabolisierender Enzyme sein. Es scheint plausibel, dass Vitamin D₃ durch die Regulation auf die enzymatische Metabolisierung exogener Stoffe einen positiven antineoplastischen Effekt ausübt. Dies könnte ein Mechanismus der vielfältigen antineoplastischen Wirkweisen von Vitamin D₃ sein.

Positive regulation of cell migration: Die Beeinflussung der Zellmigration könnte ebenfalls einen wichtigen Aspekt der antineoplastischen Wirkweise von Vitamin D₃ darstellen. Ein Schlüsselgen, welches in beiden Zelllinien signifikant heraufreguliert wurde, ist *SEMA3B*. Dieses Gen kodiert für ein Protein der Klasse-3 Semaphorin/collapsin Familie, welches eine wichtige Funktion in der Wachstumskegelführung im Rahmen neuronaler Entwicklung übernimmt. Dieses Protein inhibiert axonales Wachstum und wirkt als **Tumorsuppressorgen** durch die Induktion von Apoptose. Im Rahmen der antitumoralen Wirkungsweisen von Vitamin D₃ könnte die Induktion von Tumorsuppressoren einen wichtigen Mechanismus darstellen und durch die Regulation der Zellmigration die Formierung der TME positiv beeinflussen. Ebenfalls erwähnenswert ist, dass im Rahmen der Tumorinitiation von HNSCCs häufig eine *Loss of Heterozygosity* von Tumorsuppressoren ursächlich ist. Mit der verstärkten Aktivierung von Tumorsuppressoren könnte der Tumorinitiation entgegengewirkt werden. Diese Beobachtung könnte eine der Mechanismen sein, weshalb die mit Vitamin D₃ behandelten Versuchstiere signifikant weniger Tumoren entwickelten. Eine zumindest teilweise proonkogene Wirkung ist durch die Regulation dieses *GO-Pathways* jedoch nicht auszuschließen. Es zeigten sich in der FaDu-Zelllinie insgesamt 4 differenziell exprimierte Gene (*F2R*, *CEACAM6*, *SEMA3B*, *SEMA3C*) während die UM-SCC1-Zelllinie 3 differenziell regulierte Gene zeigte (*SNAI1*, *CCL5*, *SEMA3B*). *CEACAM6* codiert für ein Zelloberflächen-Glykoprotein, das eine Rolle bei der Zelladhäsion und der Tumorprogression spielt, während *SEMA3B* für ein Protein codiert, welches eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Entwicklungsprozessen spielt. *SNAI1* codiert für einen Zinkfinger-Transkriptionsrepressor, der die Expression von ektodermalen Genen im Mesoderm herunterreguliert. *CCL5* codiert für ein Chemokin, das zur CC-Unterfamilie gehört und als Chemoattraktor für Blutmonozyten, T-Helferzellen und Eosinophile

Zellen wirkt. Die gezeigte komplexe Regulation diverser migrationsbeeinflussender Gene lässt folglich keine pauschale Aussage über die resultierenden Effekte der Vitamin D₃-Behandlung zu. Mögliche migrationsfördernde Effekte von Tumorzellen durch eine Vitamin D₃-Behandlung können nicht ausgeschlossen werden. Es benötigt weitere Untersuchungen, um eine definitive Aussage zum Migrationsverhalten von Tumorzellen durch Vitamin D₃ zu treffen. Unsere *in vitro* Versuche zum Migrationsverhalten von HNSCCs-Zellen zeigten jedoch hochsignifikant eine konzentrationsabhängige Inhibition der Zellmigration. Das beobachtete Migrationsverhalten der Tumorzellen könnte durch oben genannte Mechanismen erklärt werden.

Inflammatory response: Dieser *GO-Pathway* bezeichnet die unmittelbare Abwehrreaktion auf eine Infektion oder Verletzung, die durch chemische oder physikalische Einwirkungen verursacht wird. Der Prozess ist gekennzeichnet durch lokale Vasodilatation, Extravasation von Plasma in Interzellularräume und eine Akkumulation von Leukozyten und Makrophagen. Bei der Tumorentstehung von HNSCCs zeigt sich häufig ein chronisch entzündlich verändertes Mikromilieu, das durch reaktive Sauerstoffspezies und Zytokine eine lokal fortschreitende Gewebestrukturdestruktion hervorruft. Nach der aktuellen Studienlage scheint die chronische Entzündung ein Hauptfaktor für die Initiierung der Tumorentstehung zu sein (Mantovani *et al.*, 2008). Es zeigte sich in der RNA-Sequenzierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine in Summe geminderte Inflammation für die UM-SCC1-Zelllinie. Die Interpretation der Einzelgene erlaubt neben einer generellen Aussage über den *GO-Pathway* eine Aussage über die spezifischen Wirkungsweisen der Gene auf die Immunantwort. In beiden Zelllinien signifikant gesteigert exprimierte Gene sind *CD14* und *AFAP1L2*. *CD14* codiert für ein Oberflächenprotein auf Monozyten und Makrophagen. Es ist ein wichtiges Molekül, welches in Interaktion mit weiteren Zellsignalgebern die angeborene antibakterielle und antivirale Immunantwort stimuliert. Somit ist das Protein ein wichtiger Stimulus zur unspezifischen Aktivierung von Makrophagen und damit ein immuninduktiver Prozess. Dieser Induktionsprozess und die Aktivierung des angeborenen Immunsystems sind bereits in diversen Publikationen beschrieben (Gombart, 2009; Zanoni and Granucci, 2013). Im Rahmen der SARS-CoV-2 Pandemie wurde *CD14* als potenzielles *Target-Molekül* identifiziert, um die überschießende Immunantwort zu inhibieren. *AFAP1L2* ist ein Gen, welches in diversen Prozessen beteiligt ist. Dazu gehören Regulation des epidermalen Wachstumsfaktors, Regulation der Genexpression und Regulation des Zellzyklus. Die Summe der induzierten Prozesse aus diesem *GO-Pathway* macht eine Modulierung der inflammatorischen Immunantwort deutlich. Die mikroskopische Evaluation der intratumoralen Immuninfiltration bestätigte diesen Effekt. Eine Diskrepanz zeigte sich jedoch für die Immuninfiltration von CD163+ Makrophagen, bei der in der histologischen Untersuchung kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen nachgewiesen werden konnte. CD163+ Makrophagen zählen wie in der Einleitung beschrieben zu M2-Makrophagen, die durch die

Sekretion diverser Interleukine insgesamt eine antiinflammatorische Rolle einnehmen. M2-Makrophagen sind ebenfalls mit einer schlechteren Prognose von HNSCCs assoziiert. Die Interpretation der Ergebnisse aus diesem *GO-Pathway* scheint insgesamt eine immunmodulierende Wirkung zu erzielen, die einen proinflammatorischen Effekt durch *CD14* Steigerung hervorruft. Es erfolgte keine Analyse der Infiltration von MDSC (CD14-CD11+), die ebenfalls intratumoral eine immunsupprimierende Wirkung zeigen. Es ist daher in Folgeuntersuchung sinnvoll, eine Analyse der Immuninfiltration dieser Zellpopulation zu untersuchen.

Response to ethanol: Im Kontext der zellulären Anpassung auf einen Ethanolreiz zeigte sich durch die Vitamin D₃-Behandlung eine metabolische Antwort mit Induktion von *G6PD* (FaDu). Dieses Gen kodiert für ein Enzym, welches NADPH produziert und somit einen Elektronendonator darstellt. Es reduziert oxidativen Stress. Weiterhin zeigte sich eine Steigerung von *CSF3* (UM-SCC1), einem Gen, das für ein Zytokin der proinflammatorischen IL-6 Superfamilie codiert. In beiden Zelllinien zeigte sich eine reduzierte Expression von *CLDN1*. Dieses Gen kodiert für einen Proteinbestandteil von *Tight-junctions*. Im Kontext von zellulären Barrieren spielt die Zusammensetzung der interagierenden Moleküle und deren Expression eine Rolle bei der Permeabilität von Epithelien. Das Gen nimmt ebenfalls eine wichtige Rolle im Kontext von Signalwegen der Immunzelltransmigration ein. Die Analyse der Ergebnisse aus diesem *GO-Pathway* machen deutlich, dass die Vitamin D₃-Behandlung neben der metabolischen Enzymaktivierung und den damit einhergehenden antioxidativen Prozessen ebenfalls eine proinflammatorische Antwort stimuliert. Gleichzeitig wird durch die Modulierung der interzellulären *Tight-junctions* die Permeabilität für kleinere Moleküle verändert. Dieser Mechanismus könnte bei der gesteigerten intratumoralen Immunzellinfiltration durch Vitamin D₃ ebenfalls eine Rolle spielen.

Immune response: Dieser *GO-Pathway* bezeichnet sämtliche Prozesse des Immunsystems, die in einem Organismus auf eine potenzielle interne oder invasive Bedrohung ablaufen. Im Kontext dieser Dissertation zur Untersuchung der immunologischen Wirkweisen von Vitamin D₃ und dessen Wirkung auf HNSCCs ist dieser Signalweg von besonderer Wichtigkeit. Es zeigten sich insgesamt 8 signifikant regulierte Gene in der UM-SCC1-Zelllinie und 5 signifikant regulierte Gene in der FaDu-Zelllinie. Innerhalb der differenziell exprimierten Gene zeigte sich keine Überschneidung, sodass auf die relevantesten Einzelgene aus beiden Zelllinien eingegangen wird. In der UM-SCC1-Zelllinie zeigte sich eine sehr heterogene Expression mit 3 induzierten Genen (*CSF3*, *GEM*, *APLN*) und 5 reduziert exprimierten Genen (*IFI6*, *IL7R*, *CCL20*, *TRIM22*, *CCL28*). *CSF3* kodiert für ein Zytokin der proinflammatorischen IL-6 Superfamilie und wirkt damit stark proinflammatorisch. Durch geminderte Expression von *TRIM22* wird die angeborene Immunantwort moduliert. Die FaDu-Zelllinie zeigte insgesamt 5 differenziell regulierte Gene, von denen 3 gesteigert (*CD86*, *IL1RL1*, *SEMA3C*) und 2

gemindert (*NGFR*, *SECTM1*) exprimiert waren. Während *CD86* für das gleichnamige kostimulatorische Oberflächenmolekül zur T-Zelldeaktivierung kodiert, ist *IL1RL1* ein Gen, welches für ein Protein der proinflammatorischen IL-1 Rezeptor Familie codiert.

Die exemplarische Darstellung der Einzelgene aus den jeweiligen Zelllinien zeigt, dass die komplexe Regulation der immunologischen Signalwege durch Vitamin D₃ nicht einfach pauschal als immunstimulatorisch zu bezeichnen ist. Vielmehr zeigt sich eine komplizierte Regulation diverser Gene, die unterschiedliche Funktionen im Rahmen der antitumoralen Immunantwort einnehmen. Die komplexe Regulierung der immunologischen Prozesse auf molekularer Ebene ist vielfältig und durch die RNA-Sequenzierung allein schwer zu deuten. Das Zusammenwirken der Einzelgene im Gesamtgefüge der antitumoralen Immunantwort ist nur durch die Analyse des Expressionsniveaus nicht exakt vorherzusagen. Die Analyse der Sequenzierungsergebnisse zeigen somit nur mögliche Mechanismen auf, die ursächlich für die antineoplastischen Wirkweisen und Immunstimulation sein könnten. Daher ist in diesem Kontext die mikroskopische Analyse der intratumoralen Immuninfiltrate wegweisend und aussagekräftig zur Beurteilung der antitumoralen Immunaktivität. Es zeigen sich neben antiinflammatorischen, immunsupprimierenden Effekten auch immunstimulatorische, proinflammatorische Effekte von Vitamin D₃, die im immunkompetenten Organismus in Summe zu einer deutlichen Steigerung der antineoplastischen Immunantwort führten. Diese Ergebnisse decken sich auch weitgehend mit den Beobachtungen aus klinischen Studien zur antineoplastischen immunologischen Aktivität von Vitamin D₃ (Bochen *et al.*, 2018; Karkeni *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2022).

Positive regulation of cell proliferation: Dieser *GO-Pathway* beschreibt Prozesse, welche die Rate oder das Ausmaß der Zellproliferation aktivieren oder erhöhen. Im Kontext von Neoplasien ist die Mutation von Zellzyklus-Kontrollmechanismen entscheidend zur ungehinderten Proliferation. Durch die *in vitro* Vitamin D₃-Behandlung der Tumorzelllinien zeigte sich bei den FaDu-Zellen insgesamt 5 differenziell regulierte Gene, bei den UM-SCC1-Zellen 7 differenziell regulierte Gene. Es wurde keine gemeinsamen Gene im Rahmen dieses *GO-Pathways* in beiden Zelllinien differenziell reguliert. Daher erfolgt die exemplarische Darstellung von relevanten Genen aus den jeweiligen Zelllinien. Im Rahmen der FaDu-Zelllinie waren 4 der 5 Gene (*FN1*, *CEACAM6*, *CD86*, *AKR1C2*) gesteigert exprimiert, während *F2R* gemindert exprimiert wurde. *F2R* ist ein Protein-kodierendes Gen, welches eine Rolle bei der Plättchen-Aktivierung und bei der Neovaskularisierung einnimmt. *FN1* codiert für Fibronectin, ein Glycoprotein, welches in Zelladhäsion, Zellmotilität, Opsonierung, Wundheilung und Erhaltung des Zellform involviert ist. In der UM-SCC1-Zelllinie wurden 6 Gene (*CSF3*, *AREG*, *GRK5*, *TGFB2*, *ALCF1*, *APLM*) gesteigert reguliert und *ST8SIA1* gemindert exprimiert. *AREG* codiert für ein Protein aus der Familie des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF). Als Mitogen stimuliert es unter anderem das Wachstum von Epithelzellen und Fibroblasten. Darüber hinaus

verhindert das Protein das Wachstum von invasiven Karzinomzelllinien. Ein weiteres Gen von Interesse stellt *TGFB2* dar. Das entsprechende Protein entspricht einem Liganden von TGF-beta und reguliert die Expression von diversen Genen. Eine Funktionsstörung im TGF-beta/SMAD Signalweg ist mit einer Vielzahl von Krebsentitäten assoziiert. Das durch die Vitamin D₃-Behandlung signifikant reduzierte Gen *ST8SIA1* codiert für ein membran-gebundenes Glycosphingolipid welches für die Zelladhäsion und das Wachstum maligner Zellen in Kulturmedien relevant ist.

Die Gesamtbeurteilung der involvierten Gene zur Zellproliferation zeigt deutlich eine **antiproliferative Wirkweise** von Vitamin D₃ in den untersuchten Kopf-Hals-Tumorzelllinien auf. Neben modulierenden Prozessen der TME durch mögliche neovaskularisationshemmende Mechanismen zeigen direkt wachstumshemmende Faktoren von malignen Zellen mögliche Mechanismen, welche die antineoplastische Wirkweise von Vitamin D₃ erklären könnten. Ebenfalls scheint die Reduktion von onkogen wirksamen Signalpfaden ursächlich für die antitumorale Wirkweise von Vitamin D₃ zu sein. Da es eine Vielzahl von regulierten Genen gibt, die im Rahmen der Zellproliferation differenziell durch Vitamin D₃ reguliert wurden, jedoch nicht in beiden Zelllinien gleichermaßen signifikant beeinflusst wurden, sind zur definitiven Aussage über die regulierten Mechanismen weitere Untersuchungen nötig. In der Zusammenschau der Wirkung von Vitamin D₃ auf Tumorentstehung und Tumorprogression von HNSCCs im murinen Modell könnten diese regulierten Wege jedoch hinweisend auf die molekularen Prozesse im Gesamtorganismus sein. Die antiproliferative Wirkung von Vitamin D₃ könnte somit die reduzierte Tumorlast der mit Vitamin D₃ behandelten Tiere erklären.

Wnt signaling pathway: Dieser *GO-Pathway* definiert jene molekularen Signale, die durch die Bindung des Wnt-Proteins an einen Rezeptor der Frizzled-Familie auf der Oberfläche der Zielzelle eine Signalkaskade induzieren. Die Wnt-Signalkaskade ist entscheidend für die embryonale Entwicklung und Wachstum. Im Kontext von Neoplasien beeinflusst der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine Vielzahl von zellulären Prozessen und ermöglicht es Tumorzellen, einen stammzellähnlichen Phänotyp zu erhalten, sich zu vermehren, das Überleben zu verlängern und Invasivität zu erlangen. Eine abnormale Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs wurde als einer der prädisponierenden Faktoren für viele Krebsarten festgestellt (Taciak *et al.*, 2018). Genomstudien von Kopf-Hals-Tumoren haben gezeigt, dass genetische Defekte und epigenetischen Modifikationen des Wnt-Signalwegs migrations-, proliferations- und invasivitätsfördernde Effekte zeigten (Xie *et al.*, 2020). In beiden Zelllinien war dieser *GO-Pathway* durch die Vitamin D₃-Behandlung signifikant reguliert. Ebenfalls zeigte sich in beiden Zelllinien eine signifikante Steigerung des Gens *CPZ*. Dieses Gen kodiert für eine Metalloprotease und stellt wahrscheinlich ein Modulator des Wnt-Signalweges dar. In der FaDu-Zelllinie zeigten sich weiterhin die Gene *TLE4* und *AMOTL1* gesteigert. *TLE4*

codiert für einen Transkriptions-Korepressor. Es ist involviert in der Negativ-Regulation des Wnt-Signalsweges. *AMOTL1* codiert für ein peripheres Membranprotein als Komponente von *tight junctions*. Auch diesem Genprodukt wird eine Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalsweges zugeschrieben. Die UM-SCC1-Zelllinie zeigte eine gesteigerte Expression der Gene *GRK5*, *DACT1*. *WNT16* hingegen zeigte sich gemindert exprimiert. *DACT1* könnte eine wichtige Rolle bei der Modulierung des Wnt-Signalsweges spielen und ebenfalls inhibitorisch wirken. Je nach Phosphorylierungsstatus des kodierten Proteins kann es den Signalweg aktivieren oder inhibieren. *WNT16* codiert für ein Protein der Wnt-Signalmoleküle. Es ist wie die weiteren Signalmoleküle der Wnt-Familie in der Kaskade für Wachstum und Entwicklung beteiligt. Die durch Vitamin D₃ verminderte Expression dieses Gens spricht wie die weiteren beschriebenen Effekte für eine Repression des Wnt-Signalsweges. Neben der **Steigerung von modulierenden Faktoren** zeigte sich eine signifikante **Steigerung von direkten Wnt-Inhibitoren**, sowie die **reduzierte Expression von direkten Wnt-Signalmolekülen**. *WNT-16* kann in diesem Kontext als Reporter gen für den Signalweg herangezogen werden. Eine Inhibition deutet also auf eine insgesamt reduzierte Aktivität des Signalweges hin. Eine direkte Wirkung bezüglich der quantifizierbar, messbaren Inhibition des Signalweges innerhalb der Tumorzellen ist mit der Analyse der RNA-Sequenzierung nicht möglich. Zu diesem Zwecke wurden Western-Blot Analysen von mit Vitamin D₃ behandelten HNSCC-Zellen zur objektiven Quantifizierung der Zielmoleküle und Indikatormetabolite des Wnt/ β -Catenin-Signalsweges auf Proteinebene begonnen. Die Ergebnisse des Western-Blots stehen zum aktuellen Zeitpunkt noch aus.

Mit der Inhibition des *Wnt-Pathways* konnte ein potenzieller, entscheidender Mechanismus der antineoplastischen Wirkweise von Vitamin D₃ aufgezeigt werden. Neben der antineoplastischen Wirkweise von Vitamin D₃ in HNSCCs kann so potenziell auch die Wirkung in anderen Tumorentitäten erklärt werden. Vermutlich zeigen sich unterschiedliche Effektstärken aufgrund unterschiedlicher Expressions- und Mutationsraten.

Die vielfältigen molekularen Wirkweisen von Vitamin D₃ können die komplexe antineoplastische und immunstimulatorische Funktion im Kontext von Tumoren und insbesondere HNSCCs erklären. Neben einer umfangreichen metabolischen Antwort werden antioxidative Prozesse induziert, die die mutagene Wirkung von Kanzerogenen deutlich reduzieren könnten. Weiterhin werden Enzyme aus dem Spektrum der CYP450-Monooxygenasen vielfältig reguliert, was den Metabolisierungsprozess von diversen Medikamenten und extern zugeführten Stoffen und somit auch potenziellen Noxen beschleunigen könnte. Auch hiermit könnte den toxischen Zwischenprodukten aus Zigarettenrauch entgegengewirkt werden. Die Wirkung auf das Immunsystem ist sehr komplex. Neben proinflammatorischen Prozessen und Rekrutierungsförderung von

Diskussion

Immunzellen zeigten sich auch immunmodulierende Prozesse. Die Summe der Gesamtwirkung lässt sich mit der Betrachtung der Immunzellinfiltrate im immunhistochemischen, experimentellen Teil dieser Arbeit interpretieren. Es zeigte sich eine gesteigerte Immuninfiltration von antitumoral wirkenden CD3+, CD8+ und NK-Zellen, während immunsupprimierende FOXP3+ Zellen reduziert vorlagen. Für CD163+ Makrophagen zeigten sich keine signifikanten Effekte durch eine Vitamin D₃ Behandlung. Im Rahmen migrations- und proliferationsfördernder Mechanismen zeigte sich ebenfalls eine komplexe Wirkung. Es scheint, dass Vitamin D₃ in bestimmten Zellen eine Förderung der Proliferation und Migration hervorruft. Im Kontext der intratumoralen Immuninfiltrate könnte dies ebenfalls ein wichtiger Mechanismus der gesteigerten Immunantwort sein. Bezüglich des Wnt-Signalweges zeigte sich deutlich in diversen Genen die gleichgerichtete Reduktion der Expression. Dies mündet in die verminderte Expression des Reportergens *WNT16* in der UM-SCC1-Zelllinie.

Die durch die RNA-Sequenzierung detailliert aufgeschlüsselten, differentiell in den beiden untersuchten Zelllinien durch Vitamin D₃ regulierten Mechanismen zeigen ein breites Spektrum an antineoplastischen und potenziell antineoplastischen Effekten auf. Es wird zudem deutlich, dass ein Teil dieser Mechanismen nur einen Nutzen im Kontext von einer exogenen Noxen-Zufuhr erbringen. Dies gilt beispielsweise für die antioxidativen Prozesse oder die metabolischen Adaptationen. Diese postulierten Resultate zeigten sich ebenfalls in Studien, die zeigen konnte, dass Raucher und ehemalige Raucher am ehesten von hohen Serum Vitamin D₃-Serumspiegeln profitieren konnten (Afzal, Bojesen and Nordestgaard, 2013). Dennoch wird durch die Vielzahl der antineoplastischen Mechanismen von Vitamin D₃ verdeutlicht, dass trotz der vielfältigen und unterschiedlichen Tumorbiologie, Tumorhistologie und Tumorimmunologie von HNSCCs dennoch signifikant positive Effekte für den Patienten resultieren können.

Möglicherweise könnte die spezifische Analyse bezüglich der veränderten molekularen Mechanismen, die Tumorbiologie und Immunzellinfiltrat sowie TME von jeder einzelnen Tumorentität den Nutzen einer Vitamin D₃-Behandlung vorhersagen. Im Umkehrschluss könnte damit auch die Effektivität der Vitamin D₃-Gabe in Bezug auf die variablen Faktoren evaluiert werden. Vor dem Hintergrund einer immer stärker personalisierten und zielgerichteten antineoplastischen Therapie könnte somit die adjuvante Gabe von Vitamin D₃ ein wichtiges Element der medikamentösen Tumorbehandlung von HNSCC-Patienten sein.

5.4 Vitamin D₃ im Kontext therapeutischer Ansätze für Kopf-Hals-Tumoren

Bereits vor 40 Jahren konnten epidemiologische Studien zeigen, dass **Vitamin D₃** möglicherweise protektiv in Bezug auf kolorektale Karzinome wirkt (Garland and Garland, 1980). Ebenfalls konnten zur gleichen Zeit antiproliferative Effekte in Melanom-Zellen beschrieben werden (Colston, Colston and Feldman, 1981). In der darauffolgenden Zeit erschienen eine Vielzahl von Publikationen, die die antiproliferative Wirkung von Vitamin D₃ in diversen Tumorentitäten *in vitro* zeigten. Dazu gehörten unter anderem Prostata- und Brustkrebs sowie Leukämien und Lymphome (Garland *et al.*, 2006). Die antiproliferative Wirkung von Vitamin D₃ scheint seit langer Zeit umfassend *in vitro* belegt zu sein. *In vivo* Studien wurden deutlich seltener durchgeführt mit einer entsprechend deutlich geringeren Validität hinsichtlich des Nachweises einer potenziellen antiproliferativen Wirkweise. Zur Schließung dieser Wissenslücke erfolgte eine große randomisierte Kontrollstudie, die VITAL Studie, welche die Wirkung von Vitamin D₃ zur Primärprävention untersuchte. Obwohl initial kein signifikanter Effekt bezüglich der Krebsreduktion nachweislich war, zeigte sich ein signifikanter Nutzen bezüglich Krebsinzidenz und Krebssterblichkeit in verschiedenen Untergruppen (Manson *et al.*, 2019).

Mit zunehmendem Verständnis über die intratumoral ablaufenden molekularen Prozesse und die immunologische antineoplastische Aktivität hat sich das therapeutische Regime der medikamentösen Tumorbehandlung massiv erweitert. Viele solide Tumoren können durch das Prinzip der **Immunecheckpoint-Inhibition** in der Progression gehemmt werden. Diese Immuntherapie ermöglicht als neue revolutionäre Therapiemöglichkeit einen beispiellosen synergistischen Überlebensvorteil bei mehreren Krebsentitäten (Seiwert *et al.*, 2016).

Mit der Einführung der PD-1-Antikörper Pembrolizumab und Nivolumab in der first- und second-line-Behandlung von rekurrenden und/oder metastasierten HNSCC-Patienten hat sich das Behandlungsspektrum für diese schwer zu behandelnde Tumorentität deutlich verbessert. Bei vielen Patienten kann so eine signifikante Prognoseverbesserung erreicht werden ohne eine wesentliche Beeinflussung der Lebensqualität. Das bisher jedoch noch sehr geringe Therapieansprechen bei gerade einmal ca. 15 % der behandelten Patienten und das Auftreten von Therapieresistenzen im Behandlungsverlauf stellen große Herausforderungen im klinischen Management dieser Patienten dar und zeigen, dass weiterhin großer Forschungsbedarf auf diesem Gebiet besteht.

Es ist daher von besonderer Wichtigkeit, prognostische Marker zum Ansprechen der Therapie zu bestimmen. So gibt es derzeit bis auf die PD-L1-Expression der Tumor- und Immunzellen keine validen Biomarker, die das Ansprechen der immunmodulierenden Therapie vorhersagen könnten. In diesem Kontext konnte die KEYNOTE-040-Studie (Cohen, Soulières, *et al.*, 2019) zeigen, dass Patienten mit hohen PD-L1-Expressionsraten von ≥ 50 % der Tumorzellen einen deutlichen Überlebensvorteil gegenüber Tumoren mit niedrigen PD-L1-Expressionsraten

hatten. In der neuen Ära der individualisierten Medizin ist es daher von großer Bedeutung ein genaueres Verständnis über die intratumoralen molekularen Mechanismen sowie die Mechanismen der Tumor-Immunzell-Interaktion zu gewinnen.

Neben ICI stellen neuere Zelltransfertherapien von gentechnisch modifizierten CD8⁺ Zellen mit chimären Antigenrezeptoren (CAR) eine weitere immunologische Therapiemethode dar. Der CAR-T-Zellprozess umfasst die Konstruktion eines synthetischen CAR-T-Zellrezeptor durch Fusion des variablen Fragments und eines tumorspezifischen Immunglobulins aus Patienten eigenen Immunzellen. Diese modifizierten CD8⁺ T-Zellen werden *in vitro* stark vermehrt und dem Patienten reinfundiert. Die T-Zellen können unabhängig von Antigen-präsentierenden Zellen oder MHC-Präsentation aktiviert werden und jede Oberflächenstruktur von Krebszellen erkennen (Singh and McGuirk, 2020). In dem Versuchsansatz der CAR-T-Zellen sind CD8⁺ zytotoxische T-Zellen die wichtigsten Effektoren. Auch im Kontext der antitumoralen Immunantwort spielen CD8⁺ T-Zellen eine der wichtigsten Rollen (Raskov *et al.*, 2021).

In der **immunhistochemischen Analyse** wiesen wir eine signifikante Steigerung der CD8⁺, CD3⁺ und NK-Zell-Immunzellinfiltration peri- und intratumoral durch eine Vitamin D₃-Behandlung nach. Dies könnte im Gesamtkontext neuer Immuntherapien eine wichtige Rolle spielen. Da zytotoxische CD8⁺ T-Zellen in der antitumoralen Abwehrreaktion die entscheidende Rolle übernehmen und die hochphysiologische Vitamin D₃-Versorgung eine gesteigerte CD8⁺ T-Zellinfiltration induzierte, ist es denkbar, dass Vitamin D₃ den Behandlungseffekt von Zelltransfertherapien sowie ICI positiv beeinflussen könnte.

Angesichts der Fähigkeit von Vitamin D₃, die **Expression von Immun-Checkpoint-Rezeptoren** auf Tumorzellen zu regulieren (Dimitrov *et al.*, 2017) und den **Grad der Immuninfiltration** in das Tumorstroma zu steigern, ist Vitamin D₃ damit ein potenzielles adjuvantes Molekül zur Steigerung der antitumoralen Immunantwort. Insbesondere scheint dieses Vorgehen vor dem Hintergrund erfolgsversprechend, dass HNSCCs zu den am stärksten immunsuppressiven Tumorentitäten zählen.

Im Zusammenhang mit der Anwendung von Immuncheckpoint-Inhibitoren könnte Vitamin D₃ eine entscheidende, adjuvante, wirkungsverstärkende Rolle übernehmen. Mit der spezifischen immunmodulierenden Wirkweise von Vitamin D₃ könnte ein synergistischer Effekt mit einer PD1-Immuntherapie oder auch mit weiteren, gegenwärtig noch in Phase-III-Studien untersuchten Immuntherapeutika erreicht werden. Vitamin D₃ kann die Expression von PD-L1 modulieren, was in anderen Krebsentitäten zu einer Reduktion der Sterblichkeit führte (Morita *et al.*, 2021).

Bezüglich der *in vivo* Wirkweise einer kombinierten Gabe von Vitamin D₃ zusammen mit PD-L1-Inhibitoren werden aktuell tierexperimentelle Studien unter Verwendung des 4NQO-C57BL/6NRj-Modells zur oralen Karzinogenese von HNSCCs durchgeführt.

Die Vitamin D₃-Behandlung führte zu einer signifikanten Steigerung antitumoraler Immunzellen mit günstiger Prognose (CD3+ T-Zellen, CD8+ T-Zellen und NK-Zellen), während es zu einer hochsignifikanten Reduktion prognostisch ungünstiger FOXP3+ T_{reg}-Zellen kam. Die Ergebnisse lassen somit auf eine Verbesserung der Gesamtprognose in Kopf-Hals-Tumor-Patienten durch die gezeigte **Modulation des intratumoralen Immuninfiltrates** schließen. Insbesondere HNSCC-Patienten mit defizitären Vitamin D₃-Serumspiegeln weisen intratumoral eine geringere Immunzellinfiltration auf (Bochen *et al.*, 2018). Vor diesem Hintergrund scheinen diese Patienten durch eine Verstärkung der antitumoralen Immuninfiltration besonders von einer Vitamin D₃-Substitution zu profitieren.

Die Ergebnisse dieser Dissertation lassen weiterhin darauf schließen, dass Vitamin D₃ neben immunmodulatorischen auch **durch direkte antitumorale Wirkweisen** einen wesentlichen Beitrag leisten könnte. Die RNA-Sequenzierung wies insbesondere folgende molekulare antitumorale Wirkweisen als wesentliche Mechanismen nach: antioxidative Enzyminduktionen, Induktion von Tumorsuppressoren eine gesteigerte antitumorale Immunantwort und die Inhibition des *Wnt-Pathways*. Die direkten antineoplastischen Eigenschaften von Vitamin D₃ konnten ebenfalls in unseren Migrations- und Proliferationsassays bei HNSCC-Zelllinien gezeigt werden.

Klinische Studien zeigten, dass ein erheblicher Teil von HNSCC-Patienten einen signifikant reduzierten zirkulierenden Vitamin D₃-Serumspiegel aufweist und HNSCCs häufig mit niedrigen Vitamin D₃-Serumspiegeln assoziiert sind. Zudem sind niedrige Vitamin D₃-Serumspiegel mit erhöhter lymphogener Metastasierung und negativem HPV-Status assoziiert, was als signifikanter Prädiktor für ein schlechtes Outcome hinweisend ist. Somit kann der Vitamin D₃-Serumspiegel als zuverlässiger Surrogatparameter für die Prognose dienen (Orell-Kotikangas *et al.*, 2012; Bochen *et al.*, 2018).

Eine groß angelegte, 2021 publizierte Metaanalyse untersuchte den Zusammenhang zwischen Vitamin D₃-Versorgung und dem Auftreten und der Prognose von HNSCCs (Pu *et al.*, 2021). Dazu wurden Beobachtungsstudien analysiert, die einen Zusammenhang zwischen 25-OH Vitamin D₃-Versorgungsstatus, Genpolymorphismen und Vitamin D₃-Zufuhr mit HNSCCs-Inzidenz und -Prognose untersuchten. Insgesamt wurden 81.908 Teilnehmer in die Metaanalyse eingeschlossen. Es zeigte sich, dass ein hochphysiologischer 25-OH Vitamin D₃-Versorgungsstatus mit einer verringerten HNSCC-Inzidenz und einer verbesserten HNSCC-Gesamtüberlebensrate während eines 5-jährigen Follow-ups assoziiert ist. Zusätzlich führten hohe Konzentrationen von zirkulierendem 25-OH Vitamin D₃ bei Kopf-Hals-Tumor-Patienten

zu einem Rückgang des Sterberisikos bei einer Nachbeobachtungszeit von 8-12 Jahren. Die Ergebnisse lassen somit schlussfolgernd darauf schließen, dass eine hochphysiologischer Vitamin D₃ Versorgungsstatus einen präventiven und therapeutischen Nutzen im Kontext von HNSCCs erbringen kann.

Die Aufnahme von Vitamin D₃ insbesondere zeitgleich zur Risikoexposition verursachte in den *in vivo* Versuchen dieser Arbeit eine hochsignifikante Reduktion invasiver Karzinome. Daher scheint insbesondere eine **prophylaktische, kontinuierliche Gabe** von Vitamin D₃ während der Noxen-Exposition zur Reduktion oxidativer Prozesse und zur Immunstimulation sowie aufgrund antiproliferativer Effekte plausibel. Eine prophylaktische Einnahme kann somit eine sinnvolle Strategie im Sinne einer Primärprävention von Kopf-Hals-Tumoren darstellen (Giovannucci *et al.*, 2006; Afzal, Bojesen and Nordestgaard, 2013; Pu *et al.*, 2021).

Frühe orale präkanzeröse Läsionen exprimieren größere Mengen an VDR als invasive Karzinome (Grimm *et al.*, 2015). Die Effektivität einer Vitamin D₃-Behandlung könnte also abhängig von dem jeweiligen Tumorentwicklungsstadium sein. Die therapeutische Vitamin D₃-Supplementation scheint somit insbesondere in frühen Tumorstadien den größten direkten antineoplastischen Effekt erzielen zu können. Karzinome könnten im Sinne eines *Escape-Mechanismus* der Wirkweise von Vitamin D₃ durch reduzierte Expression von VDR entgehen. In diesem Zusammen konnte Horváth *et al.*, 2010 zeigen, dass kolorektale Karzinome das Vitamin D₃ abbauende Gen *CYP24A1* verstärkt exprimieren, und somit effektiv die lokale Vitamin D₃-Wirkung negieren können.

Mit den *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen ist eine deutliche Tendenz der **konzentrationsabhängigen Tumoringhibition durch Vitamin D₃** zu erkennen:

Bei den *in vivo* Versuchen erreichte die Behandlungsgruppe mit 50.000 IU/Kg supraphysiologische Vitamin D₃-Serumspiegel über durchschnittlich 120 ng/ml. Diese Gruppe zeigte somit gemessen an makroskopisch nachweisbaren Tumoren den stärksten Effekt mit der stärksten Reduktion der Tumorlast. Die 7.500 IU/Kg Vitamin D₃-Gruppe erreichte physiologische Werte um 60 ng/ml, was einer ausreichenden, hochphysiologischen Versorgung entsprach. Diese Gruppe hatte zwar makroskopisch signifikant mehr Tumoren im Vergleich zur 50.000 IU/Kg Behandlungsgruppe, jedoch zeigten diese Tiere den besten klinischen Allgemeinzustand und auch die stärkste antineoplastische Immuninfiltration.

Betrachtet man ergänzend die Behandlungskonzentrationen auf zellulärer Ebene bei den *in vitro* Versuchen, so zeigt sich eine deutliche direkte konzentrationsabhängige Reduktion der Tumorzellproliferation und der Zellmigration. Die Übertragbarkeit auf die möglichen systemischen Effekte der Vitamin D₃-Behandlung im Gesamtorganismus sind durch die Zellversuche jedoch nur eingeschränkt möglich. Durch die komplexe Tumormikroumgebung

und das Immunsystem kommen weitere wesentliche Faktoren hinzu, welche die Tumorprogression beeinflussen.

Folglich zeigten sich für die Ausprägung der maximalen Wirkweise die stärksten antitumoralen Effekte *in vivo* und *in vitro* bei supraphysiologischen Vitamin D₃-Serumkonzentrationen, während die stärkste antitumorale Immuninfiltration bei hochphysiologischen Konzentrationen erreicht wurde. Es erscheint somit möglich, dass es für eine optimale Wirkverstärkung verschiedener Mechanismen (direkte antitumorale Wirkweise, Immunstimulation, Allgemeinzustand, Metabolismus) unterschiedliche 25-OH Vitamin D₃-Serumkonzentrationen gibt.

Es ist denkbar, regelhaft bei Tumorpatienten den 25-OH Vitamin D₃-Serumspiegel zu bestimmen, um eine defizitäre Versorgung erkennen und ausgleichen zu können. Eine hochdosierte Supplementation bis hin zu hochphysiologischen Werten könnte im Gesamtkontext der Behandlung potenziell zu einem verbesserten Therapieansprechen und zu direkten antineoplastischen Effekten führen und damit letztlich in einer verbesserten Gesamtprognose resultieren.

Die Frage über eine optimale Behandlungskonzentration und die damit zu erreichenden 25-OH Vitamin D₃-Ziel-Serumkonzentration zur Optimierung antineoplastischer Wirkungsweisen bleibt zunächst ungeklärt. Die Bestimmung der optimalen Konzentration zur Optimierung des Gesamt-*Outcomes*, zur Prognoseverbesserung und zum Therapieansprechen erfordert diesbezüglich weitere Studien zur dezidierten Beantwortung über die genauen 25-OH Vitamin D₃-Zielserumspiegel.

Die sachgemäße Dosierung und die Vermeidung von Überdosierungen sind aufgrund der zu erwartenden systemischen Effekte hinsichtlich der Frage einer klinischen Translation der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse von großer Wichtigkeit. Eine unreflektierte Supplementation von Vitamin D₃ in hohen Dosierungen für alle HNSCC-Patienten ist unabhängig von deren 25-OH Vitamin D₃-Serumspiegel kritisch zu betrachten. Die vielfältigen toxischen Wirkweisen einer systemischen Vitamin D₃-Überdosierung sind ausführlich in der Literatur beschrieben und seit vielen Jahrzehnten bekannt und konnten auch in den *in vivo* Vorversuchen nachvollzogen werden (Taylor and Davies, 2018). Zu den klinischen Hauptsymptomen zählen Verwirrtheit, Apathie, wiederkehrendes Erbrechen, Bauchschmerzen, Polyurie, Polydipsie und Dehydratation (Marcinowska-Suchowierska *et al.*, 2018). Mit einer zunehmenden medialen Präsenz und einer starken publiken Resonanz nehmen die Fälle akuter Vitamin D₃-Intoxikationen mit den konsekutiven lebensbedrohlichen Stoffwechselentgleisungen in den letzten Jahren stetig zu (Taylor and Davies, 2018).

5.5 Fazit und Ausblick

HNSCCs gehören zu den sechs häufigsten Tumorentitäten und sind weltweit jährlich für 890.000 Neuerkrankungen und 450.000 Tode verantwortlich. Es ist mit einer relevanten Zunahme der Inzidenz um 30 % bis 2030 zu rechnen (Bray *et al.*, 2018; Johnson *et al.*, 2020). Das Therapieregime im lokal fortgeschrittenen Stadium oder bei bereits erfolgter Metastasierung ist stark beschränkt und häufig nicht kurativ intendiert. Zudem sind die meist multimodalen Therapien mit chirurgischer Exzision, Radiotherapie und Chemotherapie häufig mit extremer Belastung und funktionellen, ästhetischen und psychologischen Einschränkungen verbunden. Die Prognose ist weiterhin nahezu unverändert schlecht, was sich in einer 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate zwischen 40-50 % zeigt (Bean *et al.*, 2019). In diesem Zusammenhang weist ein erheblicher Teil von HNSCC-Patienten einen signifikant reduzierten zirkulierenden Vitamin D₃-Serumspiegel auf. Niedrige Vitamin D₃-Serumspiegel sind mit erhöhter lymphogener Metastasierung und schlechtem Outcome assoziiert.

Im Rahmen innovativer Therapiemöglichkeiten erfolgte im Jahr 2006 die Zulassung von dem Tyrosinkinase-Inhibitor Cetuximab zur zielgerichteten Therapie von HNSCCs (Kitamura *et al.*, 2020). Im Jahr 2016 wurden die Immuncheckpoint-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab als PD-1-Inhibitoren bei Platin-refraktären HNSCC-Patienten mit Tumorrezidiv und/oder Fernmetastasen im europäischen Raum zugelassen. Die Zulassung von Pembrolizumab wurde in den Folgejahren rasch erweitert auf den Einsatz in der Erstlinientherapie bei metastasierten oder nicht-resektablen, rezidivierten HNSCC-Entitäten bei definierten PD-L1-Expressionsraten (Cohen, Bell, *et al.*, 2019).

Die Ansprechraten der immunonkologischen, zielgerichteten Therapie zeigen dabei weiterhin interindividuell starke Unterschiede aufgrund differierender Immunogenität des jeweiligen Tumors sowie aufgrund von im Verlauf auftretenden Resistenzen (Burtness *et al.*, 2019). Zusätzlich besteht in der Tumormikroumgebung häufig ein ausgeprägt immunsuppressives Milieu, welches durch die vorherrschenden Immunzellpopulationen entscheidend mitbestimmt wird. Die starke peritumorale Immunsuppression wird hauptsächlich in Noxen-induzierten HNSCCs beobachtet (Canning *et al.*, 2019a) und wird für die bisher deutlich beschränkten Ansprechraten der Immuncheckpoint-Inhibitoren in dieser Entität von ca. 15-20 % mitverantwortlich gemacht. Im Kontext HPV-positiver HNSCCs konnte die im Vergleich zu Noxen-induzierten HNSCCs eine deutlich gesteigerte Immunzellinfiltration als wesentlicher günstiger prognostischer Faktor identifiziert werden (Ward *et al.*, 2014). Es ist jedoch von besonderer Wichtigkeit, weitere prognostische Marker zum Ansprechen der Therapie zu bestimmen.

Wir konnten die umfassenden, viel zitierten antitumoralen Wirkweisen von 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃ in unseren Versuchen *in vitro* rekapitulieren. Bei der Durchführung von Migrations- und Proliferationsassays mit HNSCC-Zelllinien zeigte sich eine signifikante konzentrationsabhängige Reduktion von Zellmigration- und proliferation der durch Vitamin D₃. Die konsekutive RNA-Sequenzierung in verschiedenen HNSCC-Zelllinien zeigte eine signifikante Regulation verschiedener Signalwege durch eine Vitamin D₃-Behandlung auf. Übereinstimmend mit dem bisherigen Kenntnisstand der aktuellen Literatur beeinflusste Vitamin D₃ in Karzinomzellen eine Vielzahl von antineoplastischen und immunmodulierenden Genen und Signalwegen. Dazu gehörten unter anderem eine antioxidative Enzyminduktion, Induktion von Tumorsuppressoren, gesteigerte antitumorale Immunantwort und Inhibition des onkogenen *Wnt-Pathways*. Eine Validierung dieser Ergebnisse auf Proteinebene in Form von Western-Blot Untersuchungen wird gegenwärtig durchgeführt, wobei der Fokus insbesondere auf dem *Wnt-Pathway* liegt.

Im immunkompetenten 4NQO-C57BL/6NRj murinen HNSCC-Modell konnten wir durch eine supraphysiologische Vitamin D₃-Behandlung eine hochsignifikante Reduktion der Gesamtumoranzahl und extralingualer Tumormanifestationen zeigen. Dies spricht für eine Suppression der Tumorinitiation durch eine Vitamin D₃-Behandlung.

Vitamin D₃ konnte in diesem Modell eine gesteigerte antitumorale Immunantwort induzieren. Im Rahmen der immunhistochemischen Analyse verschiedener Immunpopulationen zeigte sich eine signifikante Steigerung prognostisch günstiger, antitumoraler Immunzellen (CD3+ T-Zellen, CD8+ T-Zellen, NK-Zellen). Gleichzeitig wurde das intra- und peritumorale Vorkommen prognostisch ungünstiger, immunsuppressiver Immunzellen (FOXP3+ T_{reg}-Zellen) hochsignifikant durch eine Vitamin D₃-Behandlung reduziert. Die stärkste Immunmodulation wurde durch hochphysiologische 25-OH Vitamin D₃-Serumwerte erreicht.

Zusammenfassend konnten im Rahmen der Dissertation antineoplastische Eigenschaften und molekulare Wirkmechanismen von Vitamin D₃ *in vitro* dargestellt werden. Zudem wurden *in vivo* antitumorale und immunmodulierende Effekte von Vitamin D₃ bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals Bereiches aufgezeigt. Damit konnte ein wichtiger Beitrag zur Schließung dieser Evidenzlücke geleistet werden.

Zukünftig könnte Vitamin D₃ eine bedeutende Rolle sowohl in der Prophylaxe als auch in der Therapie von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereich spielen.

Bei Betrachtung der **präventiven Eigenschaften** könnten insbesondere die gezeigten antioxidativen Effekten wichtig sein. Sie könnten im Zusammenspiel mit metabolischen Wirkungen wie der Reduktion der Akkumulation toxischer Metabolite, Modulation der

Inflammation sowie der Reduktion von Migration und Proliferation den kanzerogenen Effekten von Noxen entgegenwirken.

Im Rahmen **therapeutischer Anwendungen** scheinen die gezeigten antineoplastischen Eigenschaften, wie beispielsweise die Aktivierung von Tumorsuppressoren oder die Hemmung des Wnt-Signalwegs, von entscheidender Bedeutung zu sein. Ebenso sind die immunmodulierenden Effekte von Vitamin D₃ relevant, da sie zu einer gesteigerten antitumoralen Immunfiltration und antineoplastischen Immunantwort gegen HNSCCs beitragen. Insbesondere scheinen diese Effekte vor dem Hintergrund erfolgsversprechend, dass HNSCCs zu den am stärksten immuninfiltrierenden Tumorentitäten zählen und HNSCC-Patienten mit defizitären Vitamin D₃-Serumspiegeln intratumoral eine geringere Immuneinfiltration aufweisen. Die jeweiligen erforderlichen 25-OH Vitamin D₃-Serumkonzentrationen für die Optimierung zur antineoplastischen Wirkweise und Immunstimulation scheinen jedoch zu divergieren. Während supraphysiologische Serumspiegel die stärkste antineoplastische Wirkweise erreichten, wurde die stärkste antineoplastische Immunantwort und der beste Allgemeinzustand mit hochphysiologischen 25-OH Vitamin D₃-Serumwerten erreicht. Zur abschließenden Beantwortung bezüglich der optimalen 25-OH Vitamin D₃-Zielserumwerte für eine Tumorreduktion und Immunstimulation sowie folgend für einen gesteigerten Behandlungserfolg und Prognoseverbesserung von Kopf-Hals-Tumor-Patienten sind weitere Studien notwendig.

Im Kontext einer zunehmend personalisierten immunmodulierenden Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren könnte durch die immunmodulierenden Eigenschaften von Vitamin D₃ ein verbessertes Therapieansprechen erreicht werden. Die Beeinflussung der Tumormikroumgebung ist ein vielversprechender therapeutischer Ansatz, der neben einem verbesserten Ansprechen auch eine gesteigerte Effektstärke der Therapie erwarten lässt.

Mechanistisch könnte eine zusätzliche Gabe von Vitamin D₃ neben einer parallel durchgeführten Applikation von Immuncheckpoint-Inhibitoren die intratumorale Konzentration von antitumoralen zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen erhöhen. Die gleichzeitige Modulation der tumoralen PD-L1-Expression durch Vitamin D₃ sowie die parallele Reduktion immunsuppressiver intratumoraler Immuneinfiltration wirken in diesem Kontext synergistisch. Diese Mechanismen lassen neben einem gebessertem Therapieansprechen eine Verbesserung der Gesamtprognose von Kopf-Hals-Tumor-Patienten erwarten.

Zurzeit werden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Linxweiler tierexperimentelle Untersuchungen mit dem 4NQO-C57BL/6NRj-Modell zur oralen Karzinogenese von HNSCCs durchgeführt, um die *in vivo* Wirkweise einer kombinierten Verabreichung von Vitamin D₃ und PD-L1-Inhibitoren zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Studien werden wegweisend sein und möglicherweise Aufschluss darüber geben, ob es sinnvoll und vielversprechend ist, diesen therapeutischen Ansatz in klinischen Studien weiter zu verfolgen.

6. Literaturverzeichnis (in alphabetischer Reihenfolge)

Afzal, S., Bojesen, S.E. and Nordestgaard, B.G. (2013) 'Low plasma 25-hydroxyvitamin D and risk of tobacco-related cancer', *Clinical Chemistry*, 59(5), pp. 771–780. Available at: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.201939>.

Aleksic, M. *et al.* (2012) 'Different affinity windows for virus and cancer-specific T-cell receptors: Implications for therapeutic strategies: Cellular immune response', *European Journal of Immunology*, 42(12), pp. 3174–3179. Available at: <https://doi.org/10.1002/eji.201242606>.

Allen, C.T. *et al.* (2015) 'Anti-Tumor Immunity in Head and Neck Cancer: Understanding the Evidence, How Tumors Escape and Immunotherapeutic Approaches', *Cancers*, 7(4), pp. 2397–2414. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers7040900>.

Almand, B. *et al.* (2001) 'Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 166(1), pp. 678–689. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.1.678>.

Alsahafi, E. *et al.* (2019) 'Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges', *Cell Death & Disease*, 10(8), p. 540. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1769-9>.

Anand, A. *et al.* (2017) 'Expression of vitamin D receptor and vitamin D status in patients with oral neoplasms and effect of vitamin D supplementation on quality of life in advanced cancer treatment', *Contemporary Oncology (Poznan, Poland)*, 21(2), pp. 145–151. Available at: <https://doi.org/10.5114/wo.2017.68623>.

Anand, R. *et al.* (2014) 'Betel nut chewing and its deleterious effects on oral cavity', *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 10(3), pp. 499–505. Available at: <https://doi.org/10.4103/0973-1482.137958>.

Bao, B.-Y. *et al.* (2008) 'Protective role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells', *International Journal of Cancer*, 122(12), pp. 2699–2706. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.23460>.

Bauman, J.E. and Ferris, R.L. (2014) 'Integrating novel therapeutic monoclonal antibodies into the management of head and neck cancer', *Cancer*, 120(5), pp. 624–632. Available at: <https://doi.org/10.1002/cncr.28380>.

Bean, M.B. *et al.* (2019) 'Small Cell and Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck: Comparing Incidence and Survival Trends Based on Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Data', *The Oncologist*, 24(12), pp. 1562–1569. Available at: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2018-0054>.

Bendik, I. *et al.* (2014) 'Vitamin D: a critical and essential micronutrient for human health', *Frontiers in Physiology*, 5, p. 248. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00248>.

Bergstrom, R.T. *et al.* (2004) 'CD40 monoclonal antibody activation of antigen-presenting cells improves therapeutic efficacy of tumor-specific T cells', *Otolaryngology--Head and Neck Surgery: Official Journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 130(1), pp. 94–103. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.otohns.2003.09.007>.

Bikle, D.D. (2016) 'Extraskeletal actions of vitamin D', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1376(1), pp. 29–52. Available at: <https://doi.org/10.1111/nyas.13219>.

Blomberg Jensen, M. *et al.* (2010) 'Expression of the vitamin D receptor, 25-hydroxylases, 1alpha-hydroxylase and 24-hydroxylase in the human kidney and renal clear cell cancer', *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 121(1–2), pp. 376–382. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.03.069>.

Bochen, F. *et al.* (2018) 'Vitamin D deficiency in head and neck cancer patients - prevalence, prognostic value and impact on immune function', *Oncoimmunology*, 7(9), p. e1476817. Available at: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1476817>.

Bray, F. *et al.* (2018) 'Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), pp. 394–424. Available at: <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.

Bruni, D., Angell, H.K. and Galon, J. (2020) 'The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy', *Nature Reviews Cancer*, 20(11), pp. 662–680. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0285-7>.

Buchbinder, E.I. and Desai, A. (2016) 'CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition', *American Journal of Clinical Oncology*, 39(1), pp. 98–106. Available at: <https://doi.org/10.1097/COC.0000000000000239>.

Burtneess, B. *et al.* (2019) 'Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study', *Lancet (London, England)*, 394(10212), pp. 1915–1928. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32591-7).

Califano, J.A. *et al.* (2015) 'Tadalafil Augments Tumor Specific Immunity in Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma', *Clinical Cancer Research*, 21(1), pp. 30–38. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1716>.

Cancer Genome Atlas Network (2015) 'Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas', *Nature*, 517(7536), pp. 576–582. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature14129>.

Canning, M. *et al.* (2019a) 'Heterogeneity of the Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Immune Landscape and Its Impact on Immunotherapy', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, p. 52. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00052>.

Canning, M. *et al.* (2019b) 'Heterogeneity of the Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Immune Landscape and Its Impact on Immunotherapy', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, p. 52. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00052>.

Carlberg, C. (2014) 'The physiology of vitamin D-far more than calcium and bone', *Frontiers in Physiology*, 5, p. 335. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00335>.

Carlberg, C. and Muñoz, A. (2022) 'An update on vitamin D signaling and cancer', *Seminars in Cancer Biology*, 79, pp. 217–230. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.05.018>.

Chamorro Petronacci, C.M. *et al.* (2020) 'Identification of Prognosis Associated microRNAs in HNSCC Subtypes Based on TCGA Dataset', *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 56(10), p. E535. Available at: <https://doi.org/10.3390/medicina56100535>.

Chen, D.S. and Mellman, I. (2017) 'Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point', *Nature*, 541(7637), pp. 321–330. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature21349>.

Chen, S.Y. *et al.* (2020) 'The association of smoking and outcomes in HPV-positive oropharyngeal cancer: A systematic review', *American Journal of Otolaryngology*, 41(5), p. 102592. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2020.102592>.

Chen, Y. *et al.* (2013) 'Vitamin D receptor inhibits nuclear factor κ B activation by interacting with I κ B kinase β protein', *The Journal of Biological Chemistry*, 288(27), pp. 19450–19458. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.467670>.

Chen, Y. *et al.* (2021) 'An Immune-Related Gene Prognostic Index for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma', *Clinical Cancer Research*, 27(1), pp. 330–341. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-2166>.

Chen, Y.-P. *et al.* (2019) 'Identification and validation of novel microenvironment-based immune molecular subgroups of head and neck squamous cell carcinoma: implications for immunotherapy', *Annals of Oncology*, 30(1), pp. 68–75. Available at: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy470>.

Chen, Yu-Pei *et al.* (2019) 'Nasopharyngeal carcinoma', *Lancet (London, England)*, 394(10192), pp. 64–80. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30956-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30956-0).

Chen, Z. *et al.* (1999) 'Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 5(6), pp. 1369–1379.

Chiang, K.-C. *et al.* (2013) 'MART-10, a novel vitamin D analog, inhibits head and neck squamous carcinoma cells growth through cell cycle arrest at G0/G1 with upregulation of p21 and p27 and downregulation of telomerase', *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 138, pp. 427–434. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.09.002>.

Cillo, A.R. *et al.* (2020) 'Immune Landscape of Viral- and Carcinogen-Driven Head and Neck Cancer', *Immunity*, 52(1), pp. 183-199.e9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.11.014>.

Clinckspoor, I. *et al.* (2012) 'Altered expression of key players in vitamin D metabolism and signaling in malignant and benign thyroid tumors', *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 60(7), pp. 502–511. Available at: <https://doi.org/10.1369/0022155412447296>.

Cohen, E.E.W., Soulières, D., *et al.* (2019) 'Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study', *Lancet (London, England)*, 393(10167), pp. 156–167. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31999-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31999-8).

Cohen, E.E.W., Bell, R.B., *et al.* (2019) 'The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC)', *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 7(1), p. 184. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0662-5>.

Colston, K., Colston, M.J. and Feldman, D. (1981) '1,25-DIHYDROXYVITAMIN D₃ AND MALIGNANT MELANOMA: THE PRESENCE OF RECEPTORS AND INHIBITION OF CELL GROWTH IN CULTURE', *Endocrinology*, 108(3), pp. 1083–1086. Available at: <https://doi.org/10.1210/endo-108-3-1083>.

Cordes, T. *et al.* (2012) 'Correlation of prostaglandin metabolizing enzymes and serum PGE2 levels with vitamin D receptor and serum 25(OH)2D3 levels in breast and ovarian cancer', *Anticancer Research*, 32(1), pp. 351–357.

Cortes, M. *et al.* (2016) 'Developmental Vitamin D Availability Impacts Hematopoietic Stem Cell Production', *Cell Reports*, 17(2), pp. 458–468. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.012>.

Cramer, J.D., Burtness, B. and Ferris, R.L. (2019) 'Immunotherapy for head and neck cancer: Recent advances and future directions', *Oral Oncology*, 99, p. 104460. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.104460>.

Curry, J.M. *et al.* (2014) 'Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma', *Seminars in Oncology*, 41(2), pp. 217–234. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.03.003>.

Dalgleish, A. and Pandha, H. (2007) 'Tumor antigens as surrogate markers and targets for therapy and vaccines', *Advances in Cancer Research*, 96, pp. 175–190. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(06\)96009-6](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(06)96009-6).

Davis, R.J., Ferris, R.L. and Schmitt, N.C. (2016) 'Costimulatory and coinhibitory immune checkpoint receptors in head and neck cancer: unleashing immune responses through therapeutic combinations', *Cancers of the Head & Neck*, 1(1), p. 12. Available at: <https://doi.org/10.1186/s41199-016-0013-x>.

Davis, R.J., Van Waes, C. and Allen, C.T. (2016) 'Overcoming barriers to effective immunotherapy: MDSCs, TAMs, and Tregs as mediators of the immunosuppressive microenvironment in head and neck cancer', *Oral Oncology*, 58, pp. 59–70. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.05.002>.

DeNardo, D.G. and Ruffell, B. (2019) 'Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy', *Nature Reviews Immunology*, 19(6), pp. 369–382. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0127-6>.

Díaz, G.D. *et al.* (2000) 'Apoptosis is induced by the active metabolite of vitamin D3 and its analogue EB1089 in colorectal adenoma and carcinoma cells: possible implications for prevention and therapy', *Cancer Research*, 60(8), pp. 2304–2312.

Dimitrov, V. *et al.* (2017) 'Hormonal vitamin D up-regulates tissue-specific PD-L1 and PD-L2 surface glycoprotein expression in humans but not mice', *The Journal of Biological Chemistry*, 292(50), pp. 20657–20668. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.793885>.

Drake, C.G., Jaffee, E. and Pardoll, D.M. (2006) 'Mechanisms of immune evasion by tumors', *Advances in Immunology*, 90, pp. 51–81. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(06\)90002-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(06)90002-9).

Dusso, A.S., Brown, A.J. and Slatopolsky, E. (2005) 'Vitamin D', *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 289(1), pp. F8-28. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00336.2004>.

Economopoulou, P., Kotsantis, I. and Psyrris, A. (2020) 'Tumor Microenvironment and Immunotherapy Response in Head and Neck Cancer', *Cancers*, 12(11). Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers12113377>.

- Fathi, N. *et al.* (2019) 'Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer', *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 109, pp. 391–401. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.102>.
- Fedirko, V. *et al.* (2010) 'Effects of supplemental vitamin D and calcium on oxidative DNA damage marker in normal colorectal mucosa: a randomized clinical trial', *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 19(1), pp. 280–291. Available at: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0448>.
- Feldman, D. *et al.* (2014) 'The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression', *Nature Reviews. Cancer*, 14(5), pp. 342–357. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc3691>.
- Ferris, R.L. *et al.* (2016) 'Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck', *The New England Journal of Medicine*, 375(19), pp. 1856–1867. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602252>.
- Foy, J.-P. *et al.* (2015) 'New DNA methylation markers and global DNA hypomethylation are associated with oral cancer development', *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 8(11), pp. 1027–1035. Available at: <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0179>.
- Garland, C.F. *et al.* (2006) 'The role of vitamin D in cancer prevention', *American Journal of Public Health*, 96(2), pp. 252–261. Available at: <https://doi.org/10.2105/AJPH.2004.045260>.
- Garland, C.F. and Garland, F.C. (1980) 'Do Sunlight and Vitamin D Reduce the Likelihood of Colon Cancer?', *International Journal of Epidemiology*, 9(3), pp. 227–231. Available at: <https://doi.org/10.1093/ije/9.3.227>.
- Genchi, G. *et al.* (2020) 'The Effects of Cadmium Toxicity', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(11), p. E3782. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijerph17113782>.
- Ghanizada, M. *et al.* (2019) 'The effects of checkpoint inhibition on head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review', *Oral Oncology*, 90, pp. 67–73. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.01.018>.
- Gillison, M.L. *et al.* (2015) 'Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma', *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(29), pp. 3235–3242. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.6995>.
- Gillison, M.L. *et al.* (2018) 'CheckMate 141: 1-Year Update and Subgroup Analysis of Nivolumab as First-Line Therapy in Patients with Recurrent/Metastatic Head and Neck Cancer', *The Oncologist*, 23(9), pp. 1079–1082. Available at: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0674>.
- Giovannucci, E. *et al.* (2006) 'Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men', *Journal of the National Cancer Institute*, 98(7), pp. 451–459. Available at: <https://doi.org/10.1093/jnci/djj101>.
- Gold, R. *et al.* (2012) 'Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis', *The New England Journal of Medicine*, 367(12), pp. 1098–1107. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1114287>.

- Gombart, A.F. (2009) 'The vitamin D–antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection', *Future Microbiology*, 4(9), pp. 1151–1165. Available at: <https://doi.org/10.2217/fmb.09.87>.
- Gorman, S. *et al.* (2013) 'Reversible control by vitamin D of granulocytes and bacteria in the lungs of mice: an ovalbumin-induced model of allergic airway disease', *PloS One*, 8(6), p. e67823. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067823>.
- Göttgens, E.-L. *et al.* (2019) 'HPV, hypoxia and radiation response in head and neck cancer', *The British Journal of Radiology*, 92(1093), p. 20180047. Available at: <https://doi.org/10.1259/bjr.20180047>.
- Grimm, M. *et al.* (2015) 'Serum vitamin D levels of patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC) and expression of vitamin D receptor in oral precancerous lesions and OSCC', *Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal*, 20(2), pp. e188-195. Available at: <https://doi.org/10.4317/medoral.20368>.
- Gu, Z. *et al.* (2017) 'USP19 suppresses cellular type I interferon signaling by targeting TRAF3 for deubiquitination', *Future Microbiology*, 12, pp. 767–779. Available at: <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0006>.
- Gugatschka, M. *et al.* (2011) 'Vitamin D status is associated with disease-free survival and overall survival time in patients with squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract', *European archives of oto-rhino-laryngology: official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS): affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, 268(8), pp. 1201–1204. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00405-010-1481-y>.
- Hager, G. *et al.* (2001) '1,25(OH)₂ vitamin D₃ induces elevated expression of the cell cycle-regulating genes P21 and P27 in squamous carcinoma cell lines of the head and neck', *Acta Oto-Laryngologica*, 121(1), pp. 103–109. Available at: <https://doi.org/10.1080/000164801300006353>.
- Hama, T. *et al.* (2011) 'Prognostic significance of vitamin D receptor polymorphisms in head and neck squamous cell carcinoma', *PloS One*, 6(12), p. e29634. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029634>.
- Han, J. *et al.* (2019) '25-Hydroxyvitamin D and Total Cancer Incidence and Mortality: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies', *Nutrients*, 11(10), p. E2295. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu11102295>.
- Han, Y., Liu, D. and Li, L. (2020) 'PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer', *American Journal of Cancer Research*, 10(3), pp. 727–742.
- Hashim, D. *et al.* (2016) 'The role of oral hygiene in head and neck cancer: results from International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium', *Annals of Oncology*, 27(8), pp. 1619–1625. Available at: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw224>.
- Hecht, S.S. (1999) 'Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer', *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 91(14), pp. 1194–1210. Available at: <https://doi.org/10.1093/jnci/91.14.1194>.
- Hendry, S. *et al.* (2017) 'Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinomas, Non-Small Cell Lung Carcinoma and Mesothelioma, Endometrial and

Ovarian Carcinomas, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, Genitourinary Carcinomas, and Primary Brain Tumors', *Advances in Anatomic Pathology*, 24(6), pp. 311–335. Available at: <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000161>.

Herbst, R.S. *et al.* (2014) 'Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients', *Nature*, 515(7528), pp. 563–567. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature14011>.

Hewison, M. (2011) 'Vitamin D and innate and adaptive immunity', *Vitamins and Hormones*, 86, pp. 23–62. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386960-9.00002-2>.

Hoffmann, T.K. *et al.* (2001) 'Proinflammatory cytokines and CD40 ligand enhance cross-presentation and cross-priming capability of human dendritic cells internalizing apoptotic cancer cells', *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, 24(2), pp. 162–171.

Holick, M.F. (2007) 'Vitamin D Deficiency', *New England Journal of Medicine*, 357(3), pp. 266–281. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMra070553>.

Holick, M.F. (2009) 'Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application', *Annals of Epidemiology*, 19(2), pp. 73–78. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2007.12.001>.

Holick, M.F. *et al.* (2011) 'Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(7), pp. 1911–1930. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2011-0385>.

Horváth, H.C. *et al.* (2010) 'The candidate oncogene CYP24A1: A potential biomarker for colorectal tumorigenesis', *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 58(3), pp. 277–285. Available at: <https://doi.org/10.1369/jhc.2009.954339>.

Huang, S.H. *et al.* (2015) 'Refining American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control TNM stage and prognostic groups for human papillomavirus-related oropharyngeal carcinomas', *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(8), pp. 836–845. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.6412>.

Izreig, S. *et al.* (2020) 'The role of vitamin D in head and neck cancer', *Laryngoscope Investigative Otolaryngology*, 5(6), pp. 1079–1088. Available at: <https://doi.org/10.1002/lio2.469>.

Jelic, M.D. *et al.* (2021) 'Oxidative stress and its role in cancer', *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 17(1), pp. 22–28. Available at: https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_862_16.

Jeon, S.-M. and Shin, E.-A. (2018) 'Exploring vitamin D metabolism and function in cancer', *Experimental & Molecular Medicine*, 50(4), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0038-9>.

Jethwa, A.R. and Khariwala, S.S. (2017) 'Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer', *Cancer Metastasis Reviews*, 36(3), pp. 411–423. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9689-6>.

Johnson, D.E. *et al.* (2020) 'Head and neck squamous cell carcinoma', *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1), p. 92. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00224-3>.

Jones, G., Prosser, D.E. and Kaufmann, M. (2014) 'Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D', *Journal of Lipid Research*, 55(1), pp. 13–31. Available at: <https://doi.org/10.1194/jlr.R031534>.

Kállay, E. *et al.* (2002) 'Vitamin D receptor activity and prevention of colonic hyperproliferation and oxidative stress', *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 40(8), pp. 1191–1196. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(02\)00030-3](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(02)00030-3).

Kalluri, R. (2016) 'The biology and function of fibroblasts in cancer', *Nature Reviews Cancer*, 16(9), pp. 582–598. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73>.

Kaneda, M.M. *et al.* (2016) 'PI3K γ is a molecular switch that controls immune suppression', *Nature*, 539(7629), pp. 437–442. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature19834>.

Kanellopoulou, A. *et al.* (2021) 'Dietary Supplement Use after Cancer Diagnosis in Relation to Total Mortality, Cancer Mortality and Recurrence: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Nutrition and Cancer*, 73(1), pp. 16–30. Available at: <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1734215>.

Kanojia, D. and Vaidya, M.M. (2006) '4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis', *Oral Oncology*, 42(7), pp. 655–667. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2005.10.013>.

Karkeni, E. *et al.* (2019) 'Vitamin D Controls Tumor Growth and CD8⁺ T Cell Infiltration in Breast Cancer', *Frontiers in Immunology*, 10, p. 1307. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01307>.

Kitamura, N. *et al.* (2020) 'Current Trends and Future Prospects of Molecular Targeted Therapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), p. 240. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22010240>.

Kleier, C., Werkmeister, R. and Joos, U. (1998) 'Zink- und Vitamin-A-Mangel bei Mundschleimhautrekrankungen', *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*, 2(6), pp. 320–325. Available at: <https://doi.org/10.1007/s100060050080>.

Koufman, J.A. and Burke, A.J. (1997) 'The etiology and pathogenesis of laryngeal carcinoma', *Otolaryngologic Clinics of North America*, 30(1), pp. 1–19.

Krishnamurthy, S. *et al.* (2010) 'Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells', *Cancer Research*, 70(23), pp. 9969–9978. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1712>.

Lechner, M. *et al.* (2019) 'Gender-neutral HPV vaccination in the UK, rising male oropharyngeal cancer rates, and lack of HPV awareness', *The Lancet. Infectious Diseases*, 19(2), pp. 131–132. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30802-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30802-8).

Lee, N.C.J. *et al.* (2018) 'Patterns of failure in high-metastatic node number human papillomavirus-positive oropharyngeal carcinoma', *Oral Oncology*, 85, pp. 35–39. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.08.001>.

Leemans, C.R., Snijders, P.J.F. and Brakenhoff, R.H. (2018) 'The molecular landscape of head and neck cancer', *Nature Reviews. Cancer*, 18(5), pp. 269–282. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc.2018.11>.

Literaturverzeichnis (in alphabetischer Reihenfolge)

- Lehmann, U. *et al.* (2013) 'Bioavailability of vitamin D(2) and D(3) in healthy volunteers, a randomized placebo-controlled trial', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(11), pp. 4339–4345. Available at: <https://doi.org/10.1210/jc.2012-4287>.
- Lewis, A. *et al.* (2015) 'The New Face of Head and Neck Cancer: The HPV Epidemic', *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 29(9), pp. 616–626.
- Li, B. *et al.* (2019) 'The Immune Subtypes and Landscape of Squamous Cell Carcinoma', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 25(12), pp. 3528–3537. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-4085>.
- Li, P. *et al.* (2022) '1 α ,25(OH)2D3 reverses exhaustion and enhances antitumor immunity of human cytotoxic T cells', *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 10(3), p. e003477. Available at: <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-003477>.
- Lu, H. *et al.* (2012) 'VTX-2337 is a novel TLR8 agonist that activates NK cells and augments ADCC', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(2), pp. 499–509. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1625>.
- Lynch, D.H. (2008) 'The promise of 4-1BB (CD137)-mediated immunomodulation and the immunotherapy of cancer', *Immunological Reviews*, 222, pp. 277–286. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00621.x>.
- Maalmi, H. *et al.* (2014) 'Serum 25-hydroxyvitamin D levels and survival in colorectal and breast cancer patients: systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies', *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 50(8), pp. 1510–1521. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.02.006>.
- Mallya, S.M. *et al.* (2016) 'Modeling vitamin D insufficiency and moderate deficiency in adult mice via dietary cholecalciferol restriction', *Endocrine Research*, 41(4), pp. 290–299. Available at: <https://doi.org/10.3109/07435800.2016.1141937>.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. (2001) 'To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer', *Nature Reviews Cancer*, 1(3), pp. 222–231. Available at: <https://doi.org/10.1038/35106065>.
- Mandal, R. *et al.* (2016) 'The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications', *JCI insight*, 1(17), p. e89829. Available at: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89829>.
- Manson, J.E. *et al.* (2019) 'Vitamin D Supplements and Prevention of Cancer and Cardiovascular Disease', *The New England Journal of Medicine*, 380(1), pp. 33–44. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809944>.
- Mantovani, A. *et al.* (2008) 'Cancer-related inflammation', *Nature*, 454(7203), pp. 436–444. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature07205>.
- Mao, X. *et al.* (2021) 'Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives', *Molecular Cancer*, 20(1), p. 131. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01428-1>.
- Marcinowska-Suchowierska, E. *et al.* (2018) 'Vitamin D Toxicity—A Clinical Perspective', *Frontiers in Endocrinology*, 9, p. 550. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00550>.

Marur, S. and Forastiere, A.A. (2008) 'Head and Neck Cancer: Changing Epidemiology, Diagnosis, and Treatment', *Mayo Clinic Proceedings*, 83(4), pp. 489–501. Available at: <https://doi.org/10.4065/83.4.489>.

Marur, S. and Forastiere, A.A. (2016) 'Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment', *Mayo Clinic Proceedings*, 91(3), pp. 386–396. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.12.017>.

Maturana-Ramírez, A. *et al.* (2022) 'Hypovitaminosis D, oral potentially malignant disorders, and oral squamous cell carcinoma: a systematic review', *Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal*, 27(2), pp. e135–e141. Available at: <https://doi.org/10.4317/medoral.25049>.

Matusiak, D. and Benya, R.V. (2007) 'CYP27A1 and CYP24 expression as a function of malignant transformation in the colon', *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 55(12), pp. 1257–1264. Available at: <https://doi.org/10.1369/jhc.7A7286.2007>.

McCullough, M.L. *et al.* (2019) 'Circulating Vitamin D and Colorectal Cancer Risk: An International Pooling Project of 17 Cohorts', *Journal of the National Cancer Institute*, 111(2), pp. 158–169. Available at: <https://doi.org/10.1093/jnci/djy087>.

McDermott, J.D. and Bowles, D.W. (2019) 'Epidemiology of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: Impact on Staging and Prevention Strategies', *Current Treatment Options in Oncology*, 20(5), p. 43. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11864-019-0650-5>.

Meier, J.D. *et al.* (2007) 'Treatment with 1-alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (vitamin D3) to inhibit carcinogenesis in the hamster buccal pouch model', *Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery*, 133(11), pp. 1149–1152. Available at: <https://doi.org/10.1001/archotol.133.11.1149>.

Michaud, D.S. *et al.* (2014) 'High-risk HPV types and head and neck cancer', *International Journal of Cancer*, 135(7), pp. 1653–1661. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.28811>.

Molinolo, A.A. *et al.* (2009) 'Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis', *Oral Oncology*, 45(4–5), pp. 324–334. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.07.011>.

Morita, M. *et al.* (2021) 'Vitamin D Supplementation Regulates Postoperative Serum Levels of PD-L1 in Patients with Digestive Tract Cancer and Improves Survivals in the Highest Quintile of PD-L1: A Post Hoc Analysis of the AMATERASU Randomized Controlled Trial', *Nutrients*, 13(6), p. 1987. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu13061987>.

Müller, V. *et al.* (2018) 'An evolutionary perspective on the systems of adaptive immunity: Evolution of adaptive immunity', *Biological Reviews*, 93(1), pp. 505–528. Available at: <https://doi.org/10.1111/brv.12355>.

Nasser, H. and St John, M. (2018) 'Immunotherapeutic Approaches to Head and Neck Cancer', *Critical Reviews in Oncogenesis*, 23(3–4), pp. 161–171. Available at: <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.2018027641>.

Nejatinamini, S. *et al.* (2018) 'Poor Vitamin Status is Associated with Skeletal Muscle Loss and Mucositis in Head and Neck Cancer Patients', *Nutrients*, 10(9), p. 1236. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu10091236>.

Ness, R.A., Miller, D.D. and Li, W. (2015) 'The role of vitamin D in cancer prevention', *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13(7), pp. 481–497. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(15\)30043-1](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(15)30043-1).

Nguyen, N. *et al.* (2016) 'Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma: Tumor infiltrating lymphocytes', *Head & Neck*, 38(7), pp. 1074–1084. Available at: <https://doi.org/10.1002/hed.24406>.

Nishikawa, H. and Sakaguchi, S. (2014) 'Regulatory T cells in cancer immunotherapy', *Current Opinion in Immunology*, 27, pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.12.005>.

Oh, D.Y. and Fong, L. (2021) 'Cytotoxic CD4+ T cells in cancer: Expanding the immune effector toolbox', *Immunity*, 54(12), pp. 2701–2711. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.11.015>.

Orell-Kotikangas, H. *et al.* (2012) 'High prevalence of vitamin D insufficiency in patients with head and neck cancer at diagnosis', *Head & Neck*, 34(10), pp. 1450–1455. Available at: <https://doi.org/10.1002/hed.21954>.

O'Sullivan, B. *et al.* (2013) 'Deintensification Candidate Subgroups in Human Papillomavirus–Related Oropharyngeal Cancer According to Minimal Risk of Distant Metastasis', *Journal of Clinical Oncology*, 31(5), pp. 543–550. Available at: <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.44.0164>.

Pai, S.I. *et al.* (2019) 'Comparative analysis of the phase III clinical trials of anti-PD1 monotherapy in head and neck squamous cell carcinoma patients (CheckMate 141 and KEYNOTE 040)', *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 7(1), p. 96. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0578-0>.

Pai, S.I. and Westra, W.H. (2009) 'Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment', *Annual Review of Pathology*, 4, pp. 49–70. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092158>.

Pan, L. *et al.* (2010) 'Vitamin D stimulates apoptosis in gastric cancer cells in synergy with trichostatin A /sodium butyrate-induced and 5-aza-2'-deoxycytidine-induced PTEN upregulation', *The FEBS journal*, 277(4), pp. 989–999. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07542.x>.

Peltanova, B., Raudenska, M. and Masarik, M. (2019) 'Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review', *Molecular Cancer*, 18(1), p. 63. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0983-5>.

Pfister, D.G. *et al.* (2020) 'Head and Neck Cancers, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology', *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, 18(7), pp. 873–898. Available at: <https://doi.org/10.6004/jnccn.2020.0031>.

Posner, M.R. *et al.* (2011) 'Survival and human papillomavirus in oropharynx cancer in TAX 324: a subset analysis from an international phase III trial', *Annals of Oncology*, 22(5), pp. 1071–1077. Available at: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr006>.

Pu, Y. *et al.* (2021) 'Association Between Vitamin D Exposure and Head and Neck Cancer: A Systematic Review With Meta-Analysis', *Frontiers in Immunology*, 12, p. 627226. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.627226>.

Pynnonen, M.A. *et al.* (2017) 'Clinical Practice Guideline: Evaluation of the Neck Mass in Adults', *Otolaryngology--Head and Neck Surgery: Official Journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 157(2_suppl), pp. S1–S30. Available at: <https://doi.org/10.1177/0194599817722550>.

- Quail, D.F. and Joyce, J.A. (2013) 'Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis', *Nature Medicine*, 19(11), pp. 1423–1437. Available at: <https://doi.org/10.1038/nm.3394>.
- Raskov, H. *et al.* (2021) 'Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy', *British Journal of Cancer*, 124(2), pp. 359–367. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01048-4>.
- Reidy, J., McHugh, E. and Stassen, L.F.A. (2011) 'A review of the relationship between alcohol and oral cancer', *The Surgeon: Journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland*, 9(5), pp. 278–283. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.surge.2011.01.010>.
- Rivera, C. (2015) 'Essentials of oral cancer', *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(9), pp. 11884–11894.
- Romualdo, G.R. *et al.* (2017) 'Vitamin D3 supplementation attenuates the early stage of mouse hepatocarcinogenesis promoted by hexachlorobenzene fungicide', *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 107(Pt A), pp. 27–36. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.030>.
- de Ruiter, E.J. *et al.* (2017) 'The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis', *Oncoimmunology*, 6(11), p. e1356148. Available at: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1356148>.
- Safadi, F.F. *et al.* (1999) 'Osteopathy and resistance to vitamin D toxicity in mice null for vitamin D binding protein', *Journal of Clinical Investigation*, 103(2), pp. 239–251. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI5244>.
- Samuel, S. and Sitrin, M.D. (2008) 'Vitamin D's role in cell proliferation and differentiation', *Nutrition Reviews*, 66(10 Suppl 2), pp. S116-124. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2008.00094.x>.
- Sathawane, D. *et al.* (2013) 'Monocyte CD40 expression in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)', *Human Immunology*, 74(1), pp. 1–5. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.09.004>.
- Scheffner, M. *et al.* (1993) 'The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53', *Cell*, 75(3), pp. 495–505. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90384-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90384-3).
- Schmitz, S. and Machiels, J.-P. (2016) 'Targeting the Tumor Environment in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck', *Current Treatment Options in Oncology*, 17(7), p. 37. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11864-016-0412-6>.
- Sckisel, G.D. *et al.* (2015) 'Out-of-Sequence Signal 3 Paralyzes Primary CD4(+) T-Cell-Dependent Immunity', *Immunity*, 43(2), pp. 240–250. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.023>.
- Seiwert, T.Y. *et al.* (2016) 'Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial', *The Lancet. Oncology*, 17(7), pp. 956–965. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30066-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30066-3).

Shah, F.D. *et al.* (2011) 'A Review on Salivary Genomics and Proteomics Biomarkers in Oral Cancer', *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 26(4), pp. 326–334. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12291-011-0149-8>.

Sharma, K. *et al.* (2014) 'A novel cytostatic form of autophagy in sensitization of non-small cell lung cancer cells to radiation by vitamin D and the vitamin D analog, EB 1089', *Autophagy*, 10(12), pp. 2346–2361. Available at: <https://doi.org/10.4161/15548627.2014.993283>.

Sherr, C.J. and Roberts, J.M. (2004) 'Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases', *Genes & Development*, 18(22), pp. 2699–2711. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.1256504>.

Simard, E.P., Torre, L.A. and Jemal, A. (2014) 'International trends in head and neck cancer incidence rates: Differences by country, sex and anatomic site', *Oral Oncology*, 50(5), pp. 387–403. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.01.016>.

Singh, A.K. and McGuirk, J.P. (2020) 'CAR T cells: continuation in a revolution of immunotherapy', *The Lancet. Oncology*, 21(3), pp. e168–e178. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30823-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30823-X).

Singh, N. *et al.* (2019) 'Inflammation and cancer', *Annals of African Medicine*, 18(3), pp. 121–126. Available at: https://doi.org/10.4103/aam.aam_56_18.

Spence, T. *et al.* (2016) 'HPV Associated Head and Neck Cancer', *Cancers*, 8(8), p. 75. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers8080075>.

Spranger, S. *et al.* (2013) 'Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells', *Science Translational Medicine*, 5(200), p. 200ra116. Available at: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006504>.

Srinivasan, M. *et al.* (2011) 'Nuclear vitamin D receptor expression is associated with improved survival in non-small cell lung cancer', *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 123(1–2), pp. 30–36. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.10.002>.

Starska-Kowarska, K. (2023) 'The Role of Different Immunocompetent Cell Populations in the Pathogenesis of Head and Neck Cancer—Regulatory Mechanisms of Pro- and Anti-Cancer Activity and Their Impact on Immunotherapy', *Cancers*, 15(6), p. 1642. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers15061642>.

Stein, A.P. *et al.* (2015) 'Prevalence of Human Papillomavirus in Oropharyngeal Cancer: A Systematic Review', *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 21(3), pp. 138–146. Available at: <https://doi.org/10.1097/PPO.000000000000115>.

Strauss, L. *et al.* (2007) 'The frequency and suppressor function of CD4+CD25highFoxp3+ T cells in the circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(21), pp. 6301–6311. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1403>.

Suski, J.M. *et al.* (2021) 'Targeting cell-cycle machinery in cancer', *Cancer Cell*, 39(6), pp. 759–778. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.03.010>.

Swami, S. *et al.* (2003) 'Vitamin D growth inhibition of breast cancer cells: gene expression patterns assessed by cDNA microarray', *Breast Cancer Research and Treatment*, 80(1), pp. 49–62. Available at: <https://doi.org/10.1023/A:1024487118457>.

- Taberna, M. *et al.* (2017) 'Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer', *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 28(10), pp. 2386–2398. Available at: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx304>.
- Taberna, M., Oliva, M. and Mesía, R. (2019) 'Cetuximab-Containing Combinations in Locally Advanced and Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma', *Frontiers in Oncology*, 9, p. 383. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00383>.
- Taciak, B. *et al.* (2018) 'Wnt signaling pathway in development and cancer', *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 69(2). Available at: <https://doi.org/10.26402/jpp.2018.2.07>.
- Takiishi, T. *et al.* (2014) 'Dietary supplementation with high doses of regular vitamin D3 safely reduces diabetes incidence in NOD mice when given early and long term', *Diabetes*, 63(6), pp. 2026–2036. Available at: <https://doi.org/10.2337/db13-1559>.
- Taylor, P.N. and Davies, J.S. (2018) 'A review of the growing risk of vitamin D toxicity from inappropriate practice: Vitamin D toxicity', *British Journal of Clinical Pharmacology*, 84(6), pp. 1121–1127. Available at: <https://doi.org/10.1111/bcp.13573>.
- Teichgräber, V. *et al.* (2015) 'Specific inhibition of fibroblast activation protein (FAP)-alpha prevents tumor progression in vitro', *Advances in Medical Sciences*, 60(2), pp. 264–272. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.advms.2015.04.006>.
- Tomaić, V. (2016) 'Functional Roles of E6 and E7 Oncoproteins in HPV-Induced Malignancies at Diverse Anatomical Sites', *Cancers*, 8(10), p. E95. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers8100095>.
- Tsang, C.M. *et al.* (2020) 'Translational genomics of nasopharyngeal cancer', *Seminars in Cancer Biology*, 61, pp. 84–100. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.09.006>.
- Urquhart, B.L., Tirona, R.G. and Kim, R.B. (2007) 'Nuclear Receptors and the Regulation of Drug-Metabolizing Enzymes and Drug Transporters: Implications for Interindividual Variability in Response to Drugs', *The Journal of Clinical Pharmacology*, 47(5), pp. 566–578. Available at: <https://doi.org/10.1177/0091270007299930>.
- Van Coillie, S., Wiernicki, B. and Xu, J. (2020) 'Molecular and Cellular Functions of CTLA-4', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1248, pp. 7–32. Available at: https://doi.org/10.1007/978-981-15-3266-5_2.
- Vassilakopoulou, M. *et al.* (2016) 'Evaluation of PD-L1 Expression and Associated Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 22(3), pp. 704–713. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1543>.
- Vaughan-Shaw, P.G. *et al.* (2017) 'The impact of vitamin D pathway genetic variation and circulating 25-hydroxyvitamin D on cancer outcome: systematic review and meta-analysis', *British Journal of Cancer*, 116(8), pp. 1092–1110. Available at: <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.44>.
- Verma, A. *et al.* (2020) 'Impact of dietary vitamin D on initiation and progression of oral cancer', *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 199, p. 105603. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105603>.

Vincent-Chong, V.K. *et al.* (2019) 'Preclinical Prevention Trial of Calcitriol: Impact of Stage of Intervention and Duration of Treatment on Oral Carcinogenesis', *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 21(4), pp. 376–388. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neo.2019.02.002>.

Vitale-Cross, L. *et al.* (2009) 'Chemical Carcinogenesis Models for Evaluating Molecular-Targeted Prevention and Treatment of Oral Cancer: Table 1.', *Cancer Prevention Research*, 2(5), pp. 419–422. Available at: <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-09-0058>.

Wagner, S. *et al.* (2018) 'Das HPV-getriebene Oropharynxkarzinom – Inzidenz, Trends, Diagnose und Therapie', *Der Urologe*, 57(12), pp. 1457–1463. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00120-018-0810-4>.

Ward, M.J. *et al.* (2014) 'Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer', *British Journal of Cancer*, 110(2), pp. 489–500. Available at: <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.639>.

Weinberg, A.D. *et al.* (2000) 'Engagement of the OX-40 receptor in vivo enhances antitumor immunity', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 164(4), pp. 2160–2169. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.4.2160>.

Wilson, E.N. *et al.* (2011) 'A switch between cytoprotective and cytotoxic autophagy in the radiosensitization of breast tumor cells by chloroquine and vitamin D', *Hormones & Cancer*, 2(5), pp. 272–285. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12672-011-0081-7>.

Xie, J. *et al.* (2020) 'Roles of the Wnt Signaling Pathway in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma', *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, p. 590912. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.590912>.

Yang, S.-W. *et al.* (2016) 'MART-10, a newly synthesized vitamin D analog, represses metastatic potential of head and neck squamous carcinoma cells', *Drug Design, Development and Therapy*, 10, pp. 1995–2002. Available at: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S107256>.

Yi, C.-H., Jim Zhai, Q. and Wang, B.Y. (2017) 'Updates on Immunohistochemical and Molecular Markers in Selected Head and Neck Diagnostic Problems', *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 141(9), pp. 1214–1235. Available at: <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0245-RA>.

Yokosawa, E.B. *et al.* (2018) 'Vitamin D intake and survival and recurrence in head and neck cancer patients', *The Laryngoscope*, 128(11), pp. E371–E376. Available at: <https://doi.org/10.1002/lary.27256>.

Yu, J. *et al.* (2013) 'Myeloid-Derived Suppressor Cells Suppress Antitumor Immune Responses through IDO Expression and Correlate with Lymph Node Metastasis in Patients with Breast Cancer', *The Journal of Immunology*, 190(7), pp. 3783–3797. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201449>.

Zanoni, I. and Granucci, F. (2013) 'Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00032>.

Zeljic, K. *et al.* (2012) 'Vitamin D receptor, CYP27B1 and CYP24A1 genes polymorphisms association with oral cancer risk and survival', *Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 41(10), pp. 779–787. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2012.01164.x>.

7. Publikationen

Paper: **The effect of Calcitriol on tumor cell biology, tumor initiation and progression and anti-tumor immune response in head and neck squamous cell carcinomas**

Lukas A. Brust, Sandrina Körner, Jan Philipp Kühn, Moritz Knebel, Felix L. Braun Silke Wemmert, Michael D. Menger, Bernhard Schick, Michael F. Holick, Luc G. T. Morris, Maximilian Linxweiler

Molecular Cancer, Manuscript submitted

Prognostic impact of intra- and peritumoral immune cell subpopulations in head and neck squamous cell carcinoma – comprehensive analysis of the TCGA-HNSC cohort and immunohistochemical validation on 101 patients

Moritz Knebel, Sandrina Körner, Jan Philipp Kühn, Silke Wemmert, **Lukas A. Brust**, Sigrun Smola, Mathias Wagner, Rainer M. Bohle, Luc G. T. Morris, Abhinav Pandey, Maximilian Linxweiler

Frontiers in Immunology

Vortrag: **Einfluss von Calcitriol auf die Karzinogenese und Tumorprogression von Kopf-Hals-Karzinomen im immunkompetenten in vivo Mausmodell**

Lukas A. Brust, Sandrina Körner, Jan Philipp Kühn, Silke Wemmert, Bernhard Schick, Maximilian Linxweiler

Präsentiert auf der DGHNO-Jahrestagung 2023, 17.05.2023-20.05.2023, Leipzig

8. Danksagung

Ich möchte diese Gelegenheit nutzen, um meinen tief empfundenen Dank an alle Personen auszudrücken, die mich bei der Erstellung meiner Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, **Prof. Dr. med. Maximilian Linxweiler**, der mir die Durchführung des umfassenden Projektes ermöglicht hat. Während des gesamten Prozesses wurde ich durch seine wissenschaftlichen Anregungen gefördert und unterstützt.

Ebenfalls gilt meiner Betreuerin **Dr. rer. nat. Sandrina Körner** ein besonderer Dank, die mir während meiner Forschungsarbeit als methodische Aufsicht zur Seite stand. Sie hat mich in diversen labortechnischen Methoden geschult, ihre stetige Hilfsbereitschaft und ihre wissenschaftliche Reflexion waren mir eine große Hilfe.

Ich danke auch **Prof. Dr. med. Bernhard Schick**, dem Direktor der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Dissertation in seiner Klinik zu schreiben.

Den medizinisch-technischen Assistenten **Ulrike Bechtel** und **Caroline Bick** möchte ich für deren methodische Unterstützung und der Anleitung in das labortechnische Arbeiten danken.

Ich bedanke mich ebenfalls bei **Dr. rer. nat. Silke Wemmert**, die mich mit wissenschaftlichen Ratschlägen unterstützt hat.

Dr. med. Jan-Phillip Kühn gebührt mein Dank für seine unterstützenden Anregungen und der wissenschaftlichen Begleitung.

An dieser Stelle möchte ich meiner Partnerin **Viola Katharina Merk** danken. Sie hat mich während meiner gesamten Promotionszeit begleitet, Ideen und fachliche Einwände eingebracht und stand mir stets zur Seite.

Auch meiner **Familie und meinen Freunden** möchte ich danken, dass sie mich während dieser anspruchsvollen Zeit unterstützt haben.

Ich bedanke mich von Herzen bei allen Personen, die dazu beigetragen haben, dass ich meine Dissertation erfolgreich abschließen konnte.

9. Lebenslauf

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