

Aus dem Bereich

Klinische Medizin - Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

***in-vitro* Untersuchungen zum Einfluss von Calcitriol auf die Proliferations- und
Migrationsfähigkeit von Kopf-Hals-Tumorzellen**

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

2025

Vorgelegt von: Jana Sikora, geb. Schnatmann

geb. am 14.01.1996 in Essen

Meiner Familie für ihre Liebe und Unterstützung

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
1.	Summary	2
2.	Einleitung	5
2.1	Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (head and neck squamous cell carcinomas, HNSCCs).....	5
2.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	5
2.1.2	Diagnostik, Therapie und Prognose.....	9
2.1.3	Immunonkologie.....	10
2.1.4	Prognose und Prävention.....	14
2.2	Vitamin D	15
2.2.1	Allgemein	15
2.3	Vitamin D und Krebs	20
2.3.1	Allgemein	20
2.3.2	Vitamin D und HNSCCs	24
2.4	Fragestellung.....	27
3.	Material und Methodik.....	29
3.1	Material und Herstellernachweis	29
3.1.1	Geräte und Software	29
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	30
3.1.3	Chemikalien.....	31
3.1.4	Zelllinie	33
3.1.5	Antikörper	34
3.2	Zellkultur	34
3.2.1	UM-SCC-1 Zelllinie.....	34
3.2.2	Kulturbedingungen	34
3.2.3	Passagieren	34
3.2.4	Zellzählung.....	35

Inhaltsverzeichnis

3.2.5	Kryokonservierung und Auftauen	35
3.2.6	Calcitriol-Behandlung	36
3.2.7	Proliferationsassay.....	36
3.2.8	Migrationsassay	38
3.3	Analytische Methoden der Proteinbiochemie.....	39
3.3.1	Aufbereitung der Zellproben zur Western Blot Analyse.....	39
3.3.2	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
3.3.3	Elektrotransfer von Proteinen auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Western Blot) 41	
3.3.4	Immunologische Proteindetektion.....	42
3.4	Statistik	43
4.	Ergebnisse	44
4.1	Untersuchungen zum Proliferationsverhalten.....	44
4.1.1	Die Proliferationsfähigkeit von UM-SCC-1 Zellen sinkt mit steigender Calcitriol-Konzentration bei viertägiger Behandlung.....	45
4.1.2	Die Proliferationsfähigkeit der 7 Tage behandelten UM-SCC-1 Zellen sinkt erst bei deutlich supraphysiologischer Calcitriol-Konzentration	49
4.1.3	Kein Einfluss von Behandlungsdauer mittels Calcitriol auf die Proliferationsfähigkeit von UM-SCC-1 Zellen bei eingeschränkter Beurteilungsmöglichkeit	54
4.2	Untersuchungen zum Migrationsverhalten	54
4.2.1	Etablierung des Migrationsassays	55
4.2.2	Kein eindeutiger Einfluss einer viertägigen Calcitriol-Behandlung auf die Migrationsfähigkeit von UM-SCC-1 Zellen	56
4.2.3	Kein eindeutiger Einfluss einer siebentägigen Calcitriol-Behandlung auf die Migrationsfähigkeit von UM-SCC-1 Zellen	60
4.3	Proteinbiochemische Analyse der VDR-Expression	65
4.3.1	VDR wird auf UM-SCC-1 Zellen exprimiert, jedoch zeigen verschiedene Calcitriol-Konzentrationen nach viertägiger Behandlung keinen signifikanten Einfluss auf die VDR-Expression	65
5.	Diskussion	68
5.1	Einfluss von Vitamin D auf die Proliferation von HNSCC-Zellen	68

Inhaltsverzeichnis

5.1.1	Konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferationsfähigkeit	69
5.1.2	Mögliche molekulare Mechanismen der Wirkung von Vitamin D auf Tumorzellen.....	70
5.1.3	Einfluss der Dauer der Calcitriol-Behandlung auf die Zellproliferation	74
5.2	Einfluss von Vitamin D auf die Migration von HNSCC-Zellen.....	75
5.3	Untersuchung der VDR-Expression auf UM-SCC-1 Zellen und dessen Beeinflussung durch Vitamin D.....	79
5.4	Klinische Relevanz von Vitamin D in der Kopf-Hals-Onkologie	80
5.5	Methodische Aspekte und Limitation.....	82
5.5.1	Methodische Aspekte und Limitation des Proliferationsassays	83
5.5.2	Methodische Aspekte und Limitation des Migrationsassays.....	84
5.5.3	Methodische Aspekte und Limitation des Western Blots.....	84
5.6	Fazit und Ausblick	85
6.	Literaturverzeichnis.....	86
7.	Anhang	106
8.	Publikationen.....	108
9.	Danksagung.....	109

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B
α	Signifikanzniveau
BCL	B-Zell-Lymphoma
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CC3	cleaved-caspase-3
CD	Cluster of Differentiation
cm ²	Quadratzenimeter
CT	Computertomographie
CTLA	Cytotoxic-T-Lymphocyte-associated-Protein
CYP	Cytochrom-P450
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBP	Vitamin-D-bindendes Protein
DC	dendritische Zellen
dest.	destillata
DMBA	7,12-Dimethylbenzo(a)anthracene
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (desoxyribonucleic acid)
EDTA	Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ERK	extrazelluläre-signalregulierte Kinase
et al.	und Andere
FGF	Fibroblast-Growth-Factor
FKS	fetales Kälberserum
GAL3	Galctin-3-Gen
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
HIV	Human-Immunodeficiency-Virus (humanes Immundefizienz-Virus)
HNSCCs	head and neck squamous cell carcinomas (Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs)

Abkürzungsverzeichnis

HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	Meerrettichperoxidase, engl. Horseradish Peroxidase
IE	Internationale Einheiten
IGF	Insulin-like-growth-factor
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
lncRNA	lange-nicht-kodierende Ribonukleinsäure
M	Mol
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-activated-protein-Kinase
MART-10	Vitamin-D-Analogon 19-nor-2 α -(3-hydroxypropyl)-1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$
MEG3	Maternally-expressed-gene-3
MeOH	Methanol
ml, ms	Millimeter, Millisekunden
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute(n)
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	Mammalian-Target-of-Rapamycin
μ g, μ l, μ m	Mikrogramm, Mikrolitermeter, Mikrometer
n	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Nuklear-Faktor- κ -B
ng, nm, nM	Nanogramm, Nanometer, Nanomol
NK	Natürliche Killerzellen
p	statistischer Signifikanzwert
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PD	Programmed-Cell-Death-Protein
PD-L	Programmed-cell-death-protein-ligand
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie
pg	Pikogramm
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pRb	Retinoblastomprotein
PTEN	Phosphatase-und-Tensin-Homolog

Abkürzungsverzeichnis

PTH	Parathormon
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Raf	rapidly-growing-fibrosarcoma
Ras	Rat-Sarcoma
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIPA	Radioimmunoprecipitation-Assay-Puffer
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RTCA	Real-Time Cell Analysis
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler
SP	Single Plate
STAT	Signal-Transducers-and-Activators-of-Transcription
STR	short tandem repeats
TBS	Tris-gepufferte-Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte-Salzlösung-Tween
TCR	T-Zell-Rezeptor
TERT	Telomerase-Reverse-Transkriptase
TNM	tumor-node-metastasis
T _{regs}	regulatorische T-Zellen
TRIS	Trisaminomethan
u.a.	unter anderem
V	Volt
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VEGF	Vascular-Endothelial-Growth-Factor
vgl.	vergleiche
(v/v)	Volumenprozent („volume / volume“)
(w/v)	Gewichtprozent („weight / volume“)

1. Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation mit dem Titel „*in-vitro* Untersuchungen zum Einfluss von Calcitriol auf die Proliferations- und Migrationsfähigkeit von Kopf-Hals-Tumorzellen“ beschäftigt sich mit der Untersuchung der Auswirkung von Vitamin D auf die Proliferation und Migration von Zellen des Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinoms, einer der häufigsten malignen Tumorarten im Kopf-Hals-Bereich. Das Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom ist eine aggressive Tumorentität, die häufig erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wird, was die Prognose der betroffenen Patienten erheblich verschlechtert. Trotz moderner Therapieansätze bleibt die Rezidivrate hoch und die Prognose für Patienten mit metastasiertem Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen ist nach wie vor ungünstig. Diese ungünstige klinische Situation unterstreicht die dringende Notwendigkeit, neue therapeutische Ansätze zu erforschen, die entweder als Ergänzung zu bestehenden Behandlungen oder als eigenständige Therapieoptionen eingesetzt werden können.

Vitamin D, insbesondere die bioaktive Form Calcitriol (1,25-Dihydroxyvitamin D), ist vor allem für seine Rolle im Kalzium- und Phosphatstoffwechsel bekannt. In den letzten Jahren hat jedoch eine zunehmende Zahl wissenschaftlicher Studien gezeigt, dass Vitamin D auch eine potenzielle antitumorale Wirkung besitzen könnte. Insbesondere seine Rolle als Regulator von Signalwegen, die für Zellwachstum, Differenzierung und Migration entscheidend sind, macht Vitamin D zu einem vielversprechenden Kandidaten für die Unterstützung bestehender Krebstherapien.

Im Kontext von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen wurden bisher nur wenige Studien durchgeführt, die sich mit den direkten Effekten von Vitamin D auf das Tumorverhalten, insbesondere hinsichtlich der Proliferation und Migration von Tumorzellen, befassen. Diese Dissertation zielt darauf ab, die Auswirkungen von Vitamin D auf die Proliferation und Migration von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom-Zellen systematisch zu untersuchen und dabei physiologische sowie deutlich supraphysiologische Konzentrationen von Calcitriol sowie unterschiedliche Behandlungszeiträume zu vergleichen. Besondere Aufmerksamkeit galt der Frage, ob und wie unterschiedliche Konzentrationen von Calcitriol und die Behandlungsdauer das Tumorverhalten *in-vitro* beeinflussen und ob sich hieraus neue therapeutische Perspektiven für die Behandlung von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen ableiten lassen. Des Weiteren wurde eine Beeinflussung der Vitamin-D-Rezeptor-Expression nach Calcitriol-Behandlung in ebenfalls physiologischen als auch supraphysiologischen Konzentrationen untersucht.

Zur Untersuchung der Proliferation wurde das *xCELLigence*-System verwendet, das die Proliferation durch kontinuierliche Messung des Zellindex quantifiziert. Diese Methode ermöglichte eine präzise und kontinuierliche Erfassung der Effekte von Calcitriol auf das Zellwachstum der UM-SCC-1 Zellen, einer etablierten Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom-Zelllinie. Zusätzlich wurde die Migration der Zellen mithilfe eines Transwell-Migrationsassays analysiert, der die Fähigkeit der Zellen misst, durch eine poröse Membran zu migrieren. Die Migration ist ein entscheidender Schritt im Metastasierungsprozess

und spielt eine zentrale Rolle in der Aggressivität von Krebszellen. Die Expression des Vitamin-D-Rezeptors wurde mittels Western Blot Analyse untersucht.

Die Ergebnisse der Proliferationsanalysen zeigten eine dosisabhängige Hemmung der Zellproliferation nach viertägiger Behandlung mit Calcitriol ($p < 0,0001$). Bereits bei physiologischen Konzentrationen (20 pg/ml) konnte eine signifikante Reduktion der Proliferation um 14,35 % festgestellt werden. Nach einer siebentägigen Calcitriol-Behandlung zeigte sich hingegen, dass physiologische und bis leicht supraphysiologische Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die Zellproliferation hatten. Erst bei deutlich supraphysiologischen Konzentrationen (50.000 pg/ml) konnte eine signifikante Reduktion der Proliferationsfähigkeit um 34,56 % nachgewiesen werden ($p < 0,0001$).

Die Untersuchung der Zellmigration ergab hingegen keinen eindeutigen Einfluss einer viertägigen oder siebentägigen Calcitriol-Behandlung. Während sich nach vier Tagen bei physiologischen Calcitriol-Konzentrationen (60 pg/ml) ein leichter Anstieg der Migration zeigte, normalisierte sich das Migrationsverhalten bei höheren Konzentrationen auf das Niveau der Dimethylsulfoxid-Kontrolle. Erst bei deutlich supraphysiologischen Konzentrationen ließ sich eine leichte Reduktion der Migration erkennen, jedoch ohne klare statistische Signifikanz. Nach sieben Tagen Behandlung blieb der Einfluss von Calcitriol auf die Migration uneinheitlich. Zwar zeigten einzelne Replikate eine gewisse Tendenz zur Reduktion der Migration bei supraphysiologischen Konzentrationen (2.000 pg/ml), jedoch waren die Schwankungen zwischen den Versuchen so groß, dass kein statistisch signifikanter Effekt nachgewiesen werden konnte.

Zudem konnte kein Einfluss einer Calcitriol-Behandlung auf die Vitamin-D-Rezeptor-Expression nachgewiesen werden. Auffällig war, dass die UM-SCC-1 Zellen im Vergleich zu anderen Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom-Zelllinien eine deutlich geringere Anzahl an Vitamin-D-Rezeptoren aufwiesen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass Vitamin D eine signifikante Hemmung der Zellproliferation bewirken kann, insbesondere in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und der Konzentration. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Vitamin D potenziell als unterstützender therapeutischer Ansatz bei Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen eingesetzt werden könnte. Weitere Studien sind erforderlich, um die zugrundeliegenden Mechanismen detaillierter zu untersuchen und die klinische Relevanz der Befunde zu evaluieren.

1. Summary

This Doctor of Medicine thesis, entitled “*In-vitro* Investigations on the Impact of Calcitriol on the Proliferation and Migration Ability of Head and Neck Tumor Cells”, investigates the effects of vitamin D on the proliferation and migration of head and neck squamous cell carcinoma cells, the most common malignant tumor types in the head and neck region. Head and neck squamous cell carcinoma is an aggressive tumor entity that is often diagnosed at an advanced stage, significantly worsening the prognosis of affected patients. Despite modern therapeutic approaches, the recurrence rate remains high,

and the prognosis for patients with metastatic head and neck squamous cell carcinoma is still unfavorable. This challenging clinical situation highlights the urgent need to explore new therapeutic approaches that could either complement existing treatments or serve as independent therapy options.

Vitamin D, particularly its bioactive form calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D), is primarily known for its role in calcium and phosphate metabolism. However, in recent years, an increasing number of scientific studies have suggested that vitamin D may also have potential antitumor effects. In particular, the role of vitamin D as a regulator of signaling pathways is crucial for the processes of cell growth, differentiation, and migration. This makes vitamin D a promising candidate for supporting existing cancer therapies.

To date, only a few studies have investigated the direct effects of vitamin D on tumor behavior in head and neck squamous cell carcinoma, particularly regarding cell proliferation and migration. The present dissertation has been designed to systematically examine the effect of vitamin D on the proliferation and migration of head and neck squamous cell carcinoma cells, comparing physiological and distinctly supraphysiological concentrations of calcitriol as well as different treatment durations. A particular focus was placed on the investigation of the influence of varying concentrations of calcitriol and treatment duration on tumor behavior *in-vitro*, with the aim of ascertaining whether these findings may offer new therapeutic perspectives for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. Furthermore, the impact of calcitriol treatment on vitamin D receptor expression was examined at both physiological and supraphysiological concentrations.

To assess proliferation, the *xCELLigence* system was used, which quantifies proliferation by continuously measuring the cell index. This method enabled precise and real-time monitoring of the effects of calcitriol on the cell growth of UM-SCC-1 cells, a well-established head and neck squamous cell carcinoma cell line. Additionally, cell migration was analyzed using a Transwell migration assay, which measures the ability of cells to migrate through a porous membrane. Migration is a crucial step in the metastatic process and plays a central role in cancer cell aggressiveness. The expression of the vitamin D receptor was analyzed using Western blot analysis.

The proliferation analysis results demonstrated a dose-dependent inhibition of cell proliferation after four days of calcitriol treatment ($p < 0,0001$). Even at physiological concentrations (20 pg/ml), a significant reduction in proliferation of 14,35 % was observed. In contrast, after seven days of calcitriol treatment, physiological and mildly supraphysiological concentrations had no significant effect on cell proliferation. A significant reduction in proliferation by 34,56 % was only observed at markedly supraphysiological concentrations (50.000 pg/ml; $p < 0,0001$).

In contrast, the investigation of cell migration did not reveal a clear effect of either four-day or seven-day calcitriol treatment. After four days, a marginal increase in migration was observed at physiological calcitriol concentrations (60 pg/ml), but at higher concentrations, migration returned to the level of the dimethyl sulfoxide control. A slight reduction in migration was detected only at distinctly

supraphysiological concentrations, but without clear statistical significance. After seven days of treatment, the effect of calcitriol on migration remained inconsistent. While individual replicates showed a trend toward reduced migration at supraphysiological concentrations (2.000 pg/ml), the variations between experiments were substantial, preventing the confirmation of statistically significant effect.

Calcitriol treatment did not result in any detectable changes in vitamin D receptor expression. Notably, UM-SCC-1 cells exhibited a significantly lower number of vitamin D receptors compared to other head and neck squamous cell carcinoma cell lines.

The results of the study demonstrate that vitamin D can significantly inhibit cell proliferation, particularly in a concentration- und time-dependent manner. These findings support the hypothesis that vitamin D could potentially serve as a supportive therapeutic approach in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. Further studies are required to investigate the underlying mechanisms in more detail und to evaluate the clinical relevance of these findings.

2. Einleitung

2.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (head and neck squamous cell carcinomas, HNSCCs)

2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCCs) repräsentieren eine heterogene Gruppe maligner Tumore, die sich in den Schleimhäuten der Mundhöhle, des Oropharynx, Hypopharynx, Nasopharynx und Larynx (vgl. Abb. 1) entwickeln. Im Jahr 2018 stellten sie mit 890.000 Neuerkrankungen und einer Mortalität von 450.000 Patienten die achthäufigste Neoplasie weltweit dar. Eine Prognose deutet auf einen weiteren Anstieg um 30 % bis 2030 hin (Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2019).

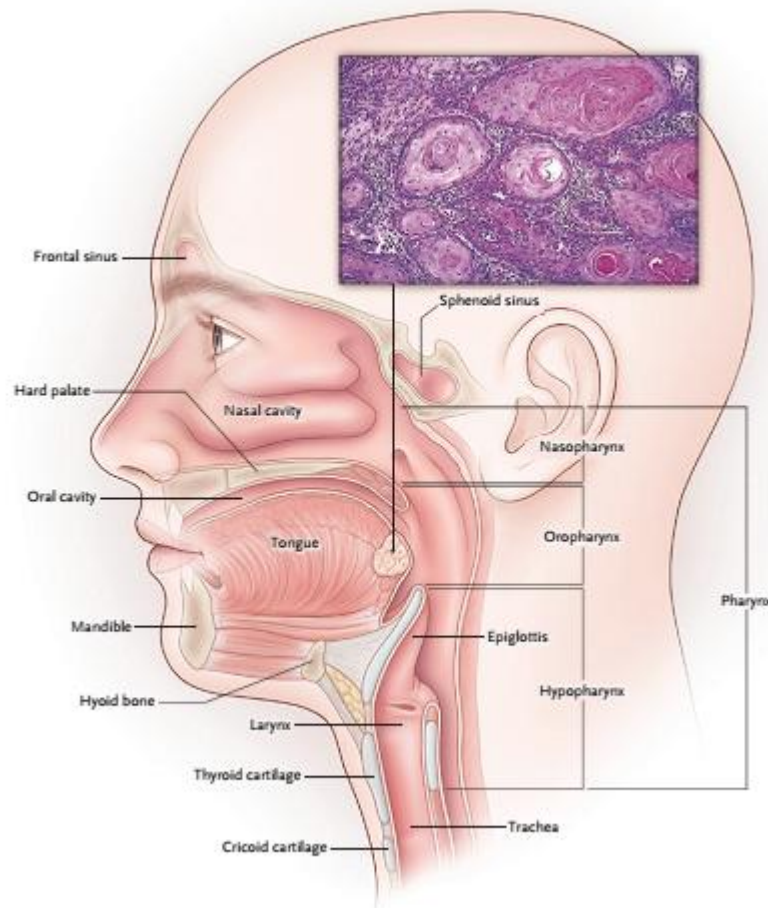


Abb. 1: Anatomie von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs. HNSCCs werden anhand ihres Ursprungsortes in verschiedene Subtypen unterteilt, darunter oral, oropharyngeal, nasopharyngeal, hypopharyngeal und laryngeal. Diese Unterscheidung ist von klinischer Relevanz, da sie Einfluss auf die Therapieentscheidung und die Prognose hat (siehe Kapitel 2.1.2) (modifiziert aus Longo & Chow, 2020).

Hinsichtlich der Ätiologie lassen sich HNSCCs in HPV-assoziierte und Noxen-assoziierte HNSCCs unterteilen. HPV-assoziierte HNSCCs manifestieren sich als vielschichtiger Prozess, dessen Grundlage die Infektion mit humanen Papillomviren (HPV) bildet. Relevant hinsichtlich der Prävalenz ist hierbei hauptsächlich der HPV high-risk Subtypen Typ 16, sowie in einer geringeren Relevanz 18, 31, 33 oder 52. HPV-assoziierte HNSCCs zeigen eine deutliche Präferenz für den Oropharynx und werden vermutlich durch oralen sexuellen Kontakt übertragen (Isayeva et al., 2012; Stein et al., 2015).

Die zweite Hauptgruppe der HNSCCs entsteht durch die Exposition gegenüber bestimmten Noxen. Mit zusammengekommenen 72 % der Fälle stellen langjähriger Tabak- und übermäßiger Alkoholkonsum die Hauptrisikofaktoren für die Entstehung der Noxen-assoziierten HNSCCs dar (Hashibe et al., 2009). Die kombinatorische Exposition für diese beiden Noxen wirkt synergistisch und erhöht das Risiko für die Entwicklung von HNSCCs erheblich. Im Fall von Larynxkarzinomen entsteht durch chronischen Alkoholkonsum ein 6-fach, durch Nikotinkonsum ein 20-fach und bei kombiniertem Konsum sogar ein 30-fach erhöhtes Risiko zu erkranken. (Altieri et al., 2002; Talamini et al., 2002). Auch in Bezug auf Mundhöhlen- und Pharynxkarzinome konnte bei kombiniertem Konsum ein 35-facher Anstieg des Risikos nachgewiesen werden (Blot et al., 1988). Wie in Abb. 2 gezeigt, ist der Pathomechanismus von Noxen-assoziierten HNSCCs komplex und beinhaltet mehrere Schritte. Die in Tabakrauch enthaltenen karzinogenen Substanzen interagieren direkt mit den Schleimhäuten und verursachen dort *desoxyribonucleic-acid* (DNA)-Schäden. Alkohol verstärkt die Wirkung von Karzinogenen, indem es die Absorption erleichtert und die Barrierefunktion der Schleimhaut beeinträchtigt. Dies erhöht die Konzentration von toxischen Substanzen im Gewebe. Des Weiteren beeinträchtigt Alkohol die Fähigkeit der Zellen zur Reparatur von DNA-Schäden. Dies führt zu einer Kumulation von genetischen Mutationen und erhöht das Risiko für Neoplasien. Darüber hinaus schaffen chronische Entzündungsreaktionen ein mikroumgebendes Milieu, das die Karzinogenese fördert, indem es das Wachstum von mutierten Zellen begünstigt.

Der Konsum von Areca-Nuss-Produkten (insbesondere in Indien und Asien), welche von der IARC als karzinogen eingestuft wurden, stellt ebenfalls ein Risikofaktor dar (IARC, 2004, 2020; International Agency for Research on Cancer, 2020). Weitere potenzielle Risikofaktoren wie eine Epstein-Barr-Virus (EBV) -, Human-Immunodeficiency-Virus (HIV) - oder Hepatitis-C-Infektion, mangelnde Mundhygiene, karzinogene Luftschadstoffe und Mangelernährung konnten identifiziert werden, spielen jedoch im europäischen und angloamerikanischen Raum eine deutlich untergeordnete Rolle (D'Souza et al., 2014; Freedman et al., 2008; Guha et al., 2007; International Agency for Research on Cancer, 2020; Mahale et al., 2016).

Einleitung

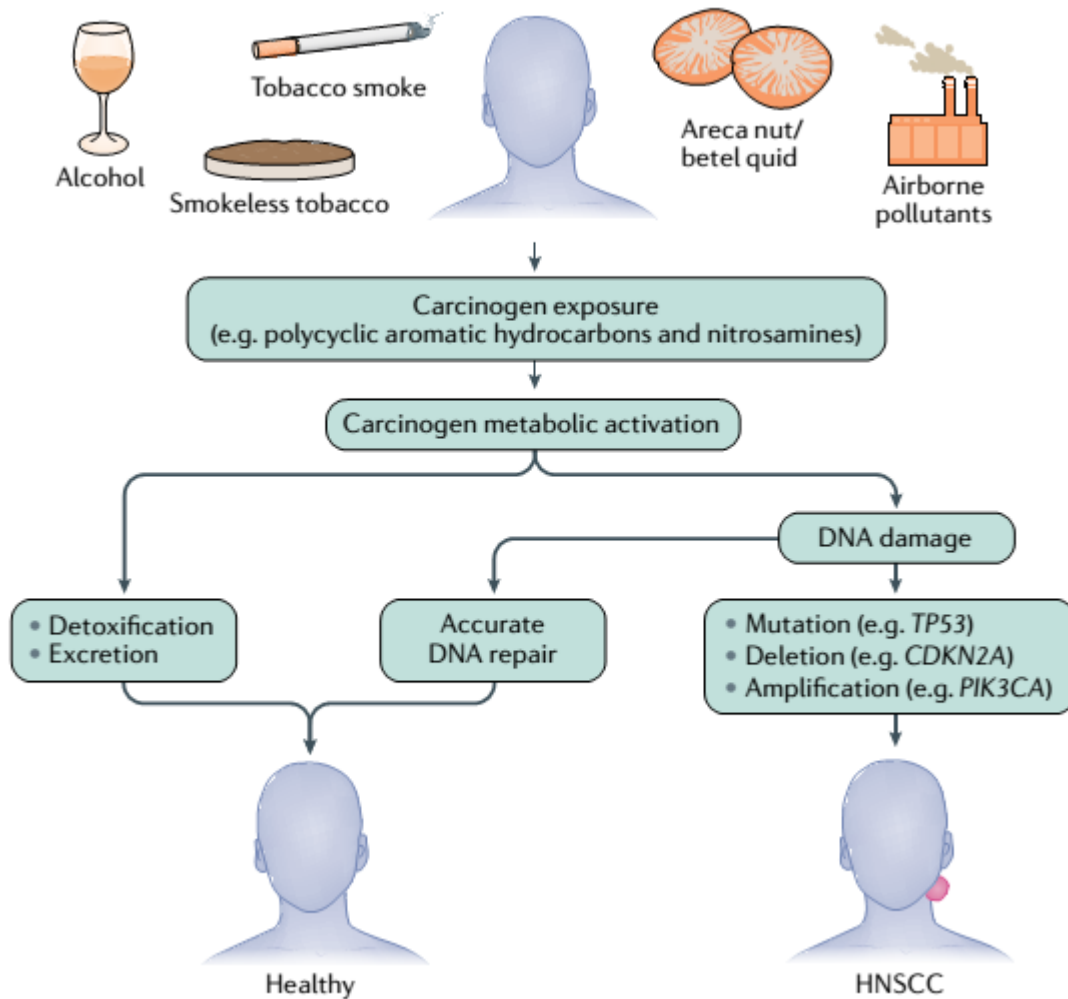


Abb. 2: Pathomechanismus der Entstehung von Noxen-assoziierten HNSCCs: Der Konsum von Noxen, die karzinogene Substanzen beinhalten, verursacht DNA-Schäden und beeinträchtigt die Fähigkeit der Zellen zur Reparatur von DNA-Schäden. Dies führt zu einer Kumulation von genetischen Mutationen und erhöht das Risiko für Neoplasien. (modifiziert aus D. E. Johnson et al., 2020).

Die kumulative Exposition gegenüber diesen Noxen führt zu genetischen Mutationen und erhöht das Risiko für Neoplasien. Darüber hinaus schaffen chronische Entzündungsreaktionen ein mikroumgebendes Milieu, das die Karzinogenese fördert, indem es das Wachstum von mutierten Zellen begünstigt. Bis zur vollständigen Entwicklung eines invasiven HNSCCs müssen mehrere Mutationsschritte erfolgen (vgl. Abb. 3). In der Frühphase sind die histologischen Veränderungen oft subtil. Mikroskopisch können leichte Atypien und Veränderungen der Zellmorphologie erkennbar sein. Initiierende Ereignisse können Punktmutationen in bestimmten Genen umfassen, die die Zellzyklusregulation beeinflussen. Dies kann zu einer frühen genetischen Instabilität führen. Genetische Veränderungen in Tumorsuppressorgenen wie TP53 und CDKN2A können auftreten und zum Progress der epithelialen Dysplasie führen. Durch die weitere Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wird die Zellzykluskontrolle gestört und die regelhafte Apoptose verhindert. Die genetischen Veränderungen und kumulative Exposition können zur Progression von normalen

Zellen zu präkanzerösen Läsionen, zur unkontrollierten Proliferation der Zellen und schließlich zu invasiven Karzinomen wie HNSCCs führen (D. E. Johnson et al., 2020).

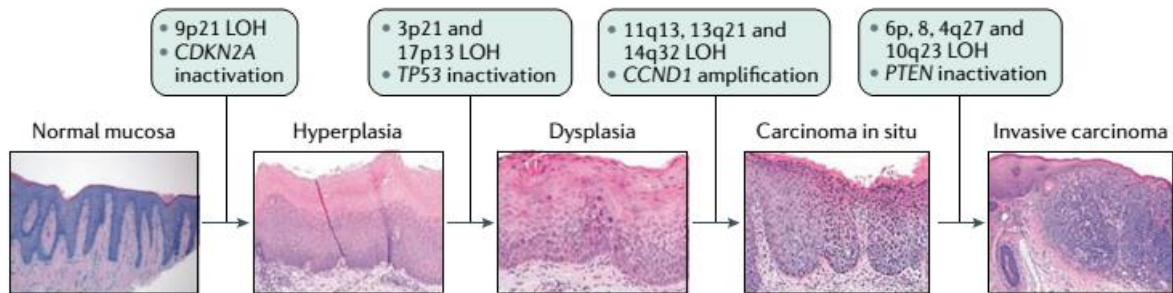


Abb. 3: Mutationsschritte bis zur vollständigen Entwicklung eines HNSCCs: Die histopathologischen Veränderungen im Verlauf der Entwicklung eines HNSCCs basieren auf mehreren genetischen Mutationsschritten. Nach initialer genetischer Instabilität folgen Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. Das anschließende Voranschreiten der epithelialen Dysplasie und Störungen im Zellzyklus können zu einem invasivem Karzinom führen (modifiziert aus D. E. Johnson et al., 2020).

Die Prävalenz von HNSCCs variiert in Abhängigkeit von geografischen Regionen und kulturellen Angewohnheiten. In Asien dominieren durch einen auf teilweise kulturelle Praktiken wie Tabak- und Alkoholkonsum sowie Rauchgewohnheiten im Rahmen von Traditionen zurückzuführender hoher Konsum karzinogener Produkte die Noxen-assoziierten Karzinome. In den USA und Westeuropa hingegen zeigen die HPV-assoziierten HNSCCs durch eine hohe Rate an oropharyngealen HPV-Infektionen eine deutlich höhere Inzidenz und machen fast 50 % aller HNSCCs aus (Guha et al., 2014; H. Mehanna et al., 2013; Stein et al., 2015). Der Anteil der Noxen-assoziierten Erkrankungen sank in den letzten Jahren leicht, entgegen dem deutlichen Inzidenzanstieg der HPV-assoziierten Oropharynxkarzinome (Blomberg et al., 2011; Chaturvedi et al., 2011; de Souza et al., 2012; Forte et al., 2012; Hammarstedt et al., 2007; Hocking et al., 2011; Reddy et al., 2010).

Auch die geschlechtsspezifische Verteilung von HNSCCs zeigt, dass Männer im Allgemeinen bei einem 2- bis 4-fach höheren Risiko eine gesteigerte Prävalenz im Vergleich zu Frauen aufweisen, da das männliche Geschlecht mit einer erhöhten Exposition von Risikofaktoren assoziiert ist. Weiter variiert die Lokalisation der HNSCCs zwischen den Geschlechtern: Männer erkranken primär an Oropharynxkarzinomen, bei Frauen dominieren hingegen Karzinome der Mundhöhle und der Lippen (Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2019).

Die Patienten mit HPV-assoziierten HNSCCs unterscheiden sich von denjenigen mit Noxen-assoziierten HNSCCs in einigen epidemiologischen und klinischen Merkmalen. So ist das Durchschnittsalter der HPV-assoziierten HNSCC-Patienten mit 53 Jahren deutlich niedriger als das der Noxen-assoziierten HNSCC-Patienten mit 66 Jahren. Allerdings weist das Durchschnittsalter der HPV-assoziierten HNSCC-Patienten eine ansteigende Dynamik auf, während das Durchschnittsalter der Noxen-assoziierten HNSCC-Patienten stabil bleibt (Windon et al., 2018). HPV-assoziierte HNSCCs zeigen oft eine geringere Tumorgröße jedoch vergleichbar ausgeprägte Lymphknotenmetastasierung.

Dies kann darauf hindeuten, dass die HPV-assoziierten HNSCCs im Krankheitsverlauf eine frühere lymphogene Metastasierung aufweisen (Hafkamp et al., 2008). Bezüglich der Fernmetastasierung zeigten HPV-assoziierte HNSCCs eine geringe Prävalenz (Duprez et al., 2017). Zudem konnten Unterschiede bezüglich der Prävalenz der Metastasierung innerhalb der HNSCCs nachgewiesen werden. Während Hypopharynx-HNSCCs bis zu 20 % metastasieren, weisen lediglich 9 % der Larynxkarzinome Filiae auf. Die Hauptlokalisationen der Metastasen sind zunächst die zervikalen Lymphknoten gefolgt von Lunge, Knochen sowie Leber (Duprez et al., 2017).

2.1.2 Diagnostik, Therapie und Prognose

Die klinische Präsentation von HNSCCs kann vielfältig sein, wobei Symptome sowohl lokal als auch systemisch auftreten können. Außerdem variieren sie je nach anatomischer Lage des Tumors. Die lokale Tumorausbreitung kann zu Schmerzen im betroffenen Bereich führen. Wenn Tumorzellen das umgebene Gewebe infiltrieren, kann dies zu schmerzhaften Ulzerationen oder Geschwüren führen, die Blutungen verursachen können. Die Vergrößerung von regionalen Lymphknoten ist häufig und resultiert aus der lymphatischen Ausbreitung des Tumors. Dies hat tastbare Schwellungen im Halsbereich zur Folge. Darüber hinaus können funktionelle Symptome auftreten. Tumore im Kehlkopfbereich können die Stimmbänder beeinträchtigen und zu Heiserkeit oder Veränderungen der Stimmqualität führen. Tumore, die die Atemwege beeinträchtigen, können durch eine partielle oder vollständige Obstruktion der Atemwege Atembeschwerden verursachen. Dysphagie kann durch die Behinderung des normalen Schluckmechanismus verursacht werden und in der Folge zu systemischen Symptomen wie Gewichtsverlust und Mangelernährung beitragen. Die metabolischen Anforderungen des Tumors können zudem den Energieverbrauch erhöhen. Allgemeine Symptome wie Ermüdung und Schwäche sind ebenfalls möglich. Neurologische Symptomatik wie Schmerzen, Taubheit oder Beeinträchtigung des Schluckreflexes kann durch Tumore verursacht werden, die nervale Strukturen beeinträchtigen (D. E. Johnson et al., 2020).

Für die Diagnose eines HNSCCs sind eine klinische HNO-Untersuchung, inklusive Panendoskopie (Naso-/Oro-/Hypopharyngoskopie, Tracheobronchoskopie, Ösophagogastroskopie, Mikrolaryngoskopie) in Kombination mit einer Bildgebung erforderlich, um das Ausmaß der Tumorerkrankung zu erfassen, simultane Zweitumore auszuschließen und mögliche Metastasen mittels Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) oder Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zu detektieren. Im Rahmen der Panendoskopie erfolgt zudem eine Probenentnahme aus dem suspekten Gewebeareal zur histopathologischen Diagnosesicherung sowie Bestimmung des Differenzierungsgrades und das Vorhandensein spezifischer Marker. Molekulardiagnostische Tests helfen bei der Identifizierung von genetischen Veränderungen und ermöglichen personalisierte Therapieansätze. Das *Staging* erfolgt nach der *Tumor-Node-Metastasis* (TNM)-Klassifikation der *Union internationale contre le cancer* (UICC, aktuell 8. Version), bei der Tumorgöße, Lymphknotenbeteiligung und Fernmetastasen berücksichtigt werden. Bei Oropharynxkarzinomen ist

zudem die Bestimmung des HPV-Status mittels p16-Immunhistochemie obligat zur Bestimmung des korrekten TNM-Stadiums (Lewis et al., 2018).

In der Therapieplanung werden Faktoren wie Patientenalter, Lokalisation, TNM-Stadium, histopathologischer Subtyp und Differenzierungsgrad, Begleiterkrankungen, HPV-Status, funktionelle Erwägungen und die Wünsche des Patienten berücksichtigt. Hieraus ergibt sich ein individuelles, fächerübergreifendes Therapiekonzept, das in gemeinsamer Diskussion der beteiligten Fachdisziplinen in einer interdisziplinären Tumorkonferenz erarbeitet wird. Neben der onkologisch optimalen Therapie stehen dabei der Funktionserhalt der betroffenen Organe und die damit verbundene Lebensqualität im Vordergrund. In frühen Stadien kann die chirurgische Resektion oder eine alleinige Radiotherapie ausreichend sein (Lee et al., 2018; Pfister et al., 2014). In fortgeschrittenen Fällen erfordert eine operative Therapie häufig eine adjuvante, kombinierte Radio- und Chemotherapie. Alternativ ist bei lokal fortgeschrittenen HNSCCs auch eine primäre Radiochemotherapie möglich, die bezüglich der Prognose in retrospektiven Studien gleichwertig mit einer primär chirurgischen Therapie ist. Bei rezidivierender oder metastasierter Erkrankung (RM-HNSCC), für die keine chirurgischen oder strahlentherapeutischen Behandlungsoptionen bestehen, können als Erstlinientherapie eine platinbasierte Kombinationstherapie nach dem EXTREME-Protokoll (Cetuximab, Cisplatin, 5-FU) oder TPEX-Protokoll (Cetuximab, Cisplatin, Docetaxel) angewendet werden. Goldstandard in der Erstlinientherapie des RM-HNSCC stellt jedoch eine Immuntherapie mit dem Anti-*Programmed-Cell-Death-Protein* (PD)-1-Antikörper Pembrolizumab alleine oder in Kombination mit einer platinbasierten Chemotherapie dar (Burtneß et al., 2019; Cohen et al., 2019; Vermorken et al., 2008). Ein weiterer Antikörper gegen den PD-1-Rezeptor - Nivolumab - kann ebenso wie eine alleinige Gabe von Pembrolizumab in der *second-line* Therapie bei rezidierten und/oder metastasierten HNSCCs verwendet werden (Cohen et al., 2019; Ferris et al., 2016). Da der Fokus der vorgelegten Arbeit auf Möglichkeiten einer medikamentösen Stimulation des Immunsystems zur verbesserten Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen liegt, wird im Folgenden auf die Immuntherapie bei Kopf-Hals-Tumorzellen detaillierter eingegangen.

2.1.3 Immunonkologie

Die Grundprinzipien der Immunonkologie basieren auf der Erkenntnis, dass das Immunsystem eine zentrale Rolle bei der Identifikation und Eliminierung maligner Zellen spielt. Ein grundlegendes Merkmal der Tumorentwicklung stellt jedoch das Phänomen der Immunflucht (engl. „Immune-escape“), dar. Es beschreibt die Fähigkeit maligner Zellen, sich der Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem zu entziehen. Dies geschieht sowohl durch eine verminderte Immunerkennung als auch durch eine erhöhte Resistenz gegenüber Immunzellen oder durch eine aktive Immunsuppression durch die Krebszellen selbst. Infolgedessen kommt es zu einer erschwerten Immunüberwachung und Begünstigung der Tumorprogression.

Einleitung

In den vergangenen Jahren wurden bei Patienten mit HNSCCs verschiedene Mechanismen der Immunflucht identifiziert. Hierzu gehören unter anderem (u.a.) eine Lymphopenie, die eingeschränkte Funktion von Natürlichen-Killerzellen (NK-Zellen), eine verminderte Antigenpräsentation und eine gestörte Funktionalität von T-Lymphozyten, die den Tumor infiltrieren (Bauernhofer et al., 2003; Dasgupta et al., 2005; Kuss et al., 2004; López-Albaitero et al., 2006). Zudem gibt es Hinweise auf einen möglichen Einfluss des HPV auf diese Immunregulationsmechanismen. Bei Patienten mit HPV-assoziierten HNSCCs wurden vermehrt tumorinfiltrierende T-Lymphozyten und eine damit einhergehende verstärkte Immunreaktion beobachtet. Dies könnte potenziell zu einer günstigeren Prognose bei dieser Untergruppe von HNSCC-Patienten beitragen (Ward et al., 2014). Auch das Ansprechen auf eine Immuntherapie war in den Zulassungsstudien bei der Gruppe der HPV-assoziierten HNSCC-Patienten tendenziell besser, wenn auch ohne statistische Signifikanz (Burtness et al., 2019; Cohen et al., 2019; Ferris et al., 2016).

Die verminderte Immunerkennung erfolgt hauptsächlich aufgrund der Herabregulation der Antigen-verarbeitenden Prozesse und des *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-1 beziehungsweise (bzw.) des humanen Leukozyten Antigens (HLA)-1. Der MHC-1 ist bei gesunden Zellen für die Antigenpräsentation verantwortlich und ist auf jeder Zelle, ausgenommen Erythrozyten und Zellen des Trophoblasten, vorhanden. T-Zellen können über MHC-1-Moleküle Virenpartikel und entartete Zellen erkennen und gegebenenfalls eine Zerstörung der Zelle einleiten. Wenn die MHC-1-Moleküle vollständig fehlen, werden die NK-Zellen aktiviert und zerstören die betreffende Zelle. Diese Prozesse sind entscheidend für die Bekämpfung von Infektionen und die Überwachung der Zellgesundheit. Um eine Immunreaktion und den eigenen Zelltod zu vermeiden, verarbeitet die Tumorzelle, wie in Abb. 4 dargestellt, endogene Antigene zu Peptiden und koppelt sie an MHC-1. Dadurch werden genügend MHC-1-Moleküle gebildet, um die NK-Zellen nicht zu aktivieren, es kommt jedoch trotzdem zu einer geringeren T-Zell-Aktivierung (Cancer Genome Atlas Network, 2015; Ferris, 2015; T. Ogino et al., 2006).

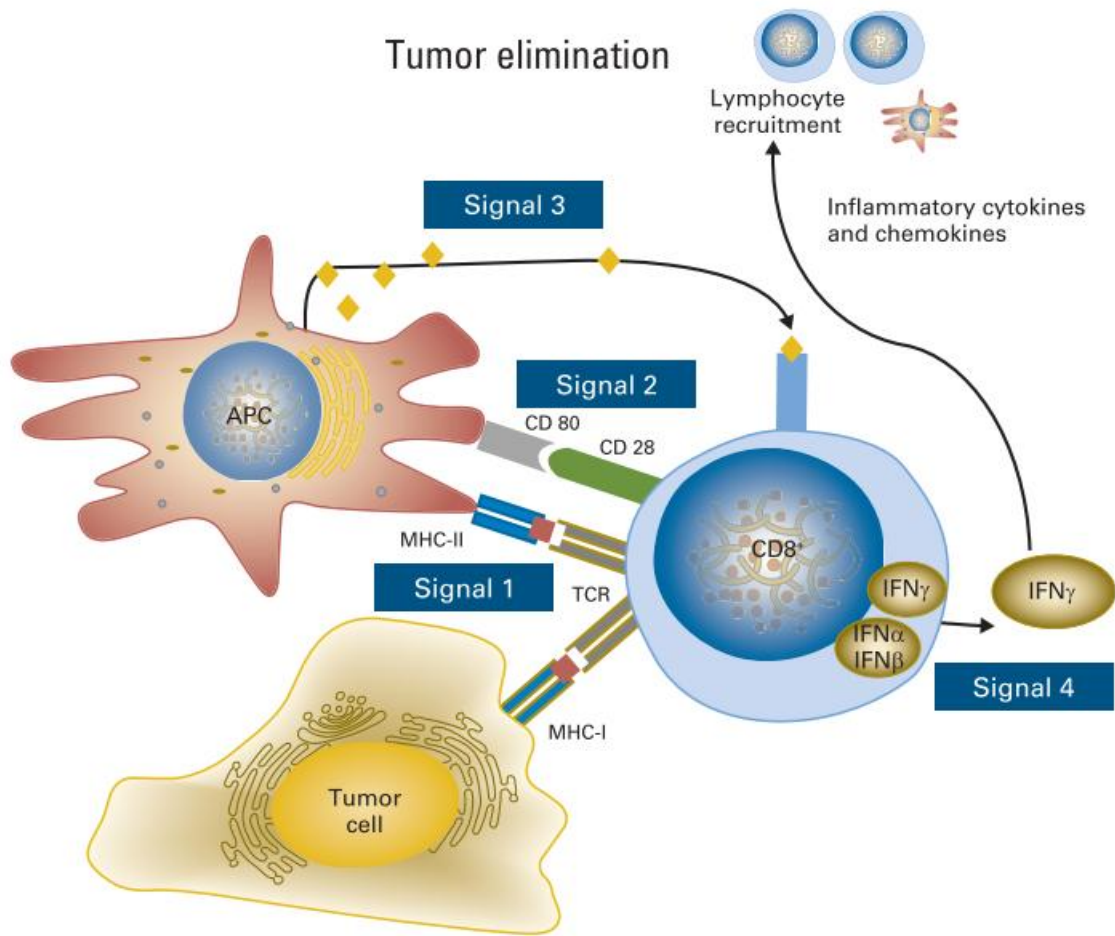


Abb. 4: Die antitumorale Abwehr des Immunsystems. Signal 1 repräsentiert die Wechselwirkung zwischen dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und einem spezifischen Antigen, das von der Tumorzelle mittels MHC-I präsentiert wird. Anschließend folgen kostimulierende/inhibitorische Signale, die die Aktivierung/Hemmung der T-Zell-Antwort regulieren (Signal 2). Signal 3 bezieht sich auf die Freisetzung von Zytokinen, die die Immunantwort beeinflussen. Diese Zytokine können inflammatorisch sein und die T-Zell-Antwort verstärken oder das Tumorstadium begünstigen. Des Weiteren rekrutieren extrinsische Chemokinsignale Immunzellen in das Tumormikromilieu (Signal 4) (modifiziert aus Ferris, 2015).

Die aktive Herabregulation des Immunsystems erfolgt zudem durch die Sezernierung von immunsuppressiven Zytokinen. Die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) sind bei HNSCC-Patienten erhöht vorhanden und bewirken eine Tumorstadium mittels einer Hemmung der Funktion von dendritischen Zellen (DC), NK-Zellen und B-Lymphozyten (Ferris, 2015). Darüber hinaus erhöhen sie die Produktion von Interleukin (IL)-10 und führen zu vermehrten Zell-Zell-Kontakten, was wiederum in Anergie, Apoptose und Zellzyklusstillstand von aktivierten T-Zellen resultiert (Alhamarneh et al., 2008; Kammertoens et al., 2005). Des Weiteren inhibiert IL-6 über den Transkriptionsfaktor *Signal-Transducers-and-Activators-of-Transcription* (STAT)-3 die Reifung von dendritischen Zellen und die Aktivierung von NK-Zellen, T-Zellen, Neutrophilen und Makrophagen (Cheng et al., 2003). Eine hohe Konzentration von IL-6 korreliert mit einer schlechten Prognose der Erkrankung (Duffy et al., 2008). Zusätzlich dazu ist in 90 % der HNSCCs die Expression des *Vascular-Endothelial-Growth-Factor*

(VEGF) erhöht, was zu einer vermehrten Anzahl von unreifen DCs in der direkten Tumorumgebung führt (B. F. Johnson et al., 2007).

Darüber hinaus spielen Immun-Checkpoint-Rezeptoren eine entscheidende Rolle in der Interaktion zwischen Tumor- und Immunzellen. Physiologisch sind sie Teil eines fein abgestimmten Regulationssystems des Immunsystems, das die Balance zwischen einer wirksamen Immunantwort und der Vermeidung von übermäßigen Schäden an gesundem Gewebe aufrechterhält. Durch Modulation der Immunzellen mindern diese Checkpoints eine überschießende Immunreaktion ab und wirken so einer potenziellen Autoimmunität entgegen. Im Kontext von Tumorerkrankungen existiert die höchste Evidenz und beste Datenlage für das *Cytotoxic-T-Lymphocyte-associated-Protein* (CTLA)-4 und das PD-1. CTLA-4 wird u.a. von *Cluster-of-Differentiation* (CD)-4 und CD8-positiven T-Zellen sowie den T_{regs} produziert und führt über eine Bindung an CD80 und CD86 auf antigenpräsentierenden Zellen zu einem suppressiven Effekt auf die aktivierte T-Zelle (Strauss et al., 2007; Walunas et al., 1994). PD-1 ist ein Transmembranprotein, das zur CD28 Familie gehört und vorrangig auf T-Zellen, B-Zellen und myeloischen Zellen exprimiert wird. Tumorzellen produzieren den *Programmed-Cell-Death-Protein-Ligand* (PD-L)-1, der die T-Zell-Aktivierung reduziert, indem er einerseits die Apoptose der antigenspezifischen T-Zellen in Lymphknoten fördert und andererseits den Zelltod der T_{regs} reduziert (Dong et al., 2002; Zou & Chen, 2008). In vielen Karzinomtypen, einschließlich HNSCCs, wurde bereits eine erhöhte Expression von PD-L1 nachgewiesen (Zandberg & Strome, 2014).

Resümierend ergibt sich aus den oben genannten Mechanismen eine immunsuppressive Mikroumgebung der HNSCCs. In der Immuntherapie wird dieses Wissen genutzt. In den letzten Jahren wurden Antikörper mit unterschiedlichen Angriffspunkten entwickelt, um der Herabregulation des Immunsystems durch die Krebserkrankung entgegenzuwirken. Aktuell zugelassen für die Immuntherapie bei HNSCCs sind die PD-1-Antikörper Nivolumab und Pembrolizumab. Beide Antikörper binden an PD-1 und verhindern dadurch die Inhibierung dieses Checkpoint-Rezeptors durch das PD-L1 der Tumorzellen. Dadurch wird eine gesteigerte Immunantwort gegen den Tumor ausgelöst.

Die Zulassungsstudie KEYNOTE-048 für Pembrolizumab war eine randomisierte, offene klinische Phase-3-Studie. Sie untersuchte die Wirksamkeit von Pembrolizumab als Erstlinientherapie für Patienten mit rezidivierendem oder metastasiertem HNSCC im Vergleich zu Standardtherapien. Außerdem wurde die Kombinationstherapie von Pembrolizumab mit Chemotherapie im Vergleich zum damaligen Goldstandard (EXTREME-Therapie, Cetuximab + Chemotherapie) bewertet. Die Ergebnisse zeigten signifikante Überlebensvorteile für Pembrolizumab, entweder als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapie, im Vergleich zur EXTREME-Therapie bei bestimmten Patientengruppen. Allerdings betragen die Ansprechraten bei Monotherapie lediglich 18-26 %. Bei Patienten, die Pembrolizumab in Kombination mit Platin und 5-FU erhielten, wurden höhere Ansprechraten beobachtet (Burtneß et al., 2019). In der CheckMate-141-Studie zur Zulassung von Nivolumab in der Zweitlinientherapie von RM-HNSCCs (bei Progress oder Rezidiv während oder innerhalb von 6 Monaten nach Platin-basierter Therapie) konnte ebenfalls eine statistisch signifikante

Verbesserung des Gesamtüberlebens im Vergleich zur Standardtherapie gezeigt werden. Die Ansprechrate betrug hier jedoch lediglich 13 % (Ferris et al., 2016).

Zusammenfassend hat die Immuntherapie in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte in der Behandlung verschiedener Krebserkrankungen erzielt, u.a. auch bei HNSCCs. Trotz dieser Erfolge bleibt jedoch die Herausforderung bestehen, dass die hohen Kosten der Immuntherapie oft in keinem Verhältnis zu den erzielten Ansprechraten stehen. Obwohl viele Patienten von Immuntherapien profitieren, spricht die große Mehrzahl der Patienten nicht ausreichend auf diese Behandlungen an. Um diese Herausforderung zu bewältigen, bedarf es weiterer intensiver Forschung. Ein vielversprechender Ansatz besteht darin, neue Zielstrukturen für eine gezielte Immuntherapie zu identifizieren. Hierfür ist ein vertieftes Verständnis der komplexen Interaktionen zwischen Tumorzellen und dem Immunsystem erforderlich. Es gilt, neuartige Zielstrukturen zu detektieren, die spezifisch von Krebszellen exprimiert werden oder die tumorinhibitorische Immunantwort modulieren. Darüber hinaus ist es von entscheidender Bedeutung, prädiktive Marker zu identifizieren, die vorhersagen können, welche Patienten am wahrscheinlichsten auf Immuntherapien ansprechen. Solche Marker könnten dazu beitragen, die Patientenauswahl zu optimieren und sicherzustellen, dass die richtigen Patienten die entsprechende Behandlung erhalten. Durch die Entwicklung und Validierung prädiktiver Marker kann die Personalisierung der Behandlung vorangetrieben werden. Dies könnte die Entwicklung innovativer Therapien mit verbesserter Wirksamkeit und breiteren Ansprechraten ermöglichen. Da Vitamin D die Aktivität des Immunsystems steigert, könnte eine ausreichende Vitamin D Versorgung bzw. ergänzende Vitamin D Therapie zu einer höheren Ansprechrate einer Immuntherapie führen. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die diesbezügliche Forschung voranzutreiben.

2.1.4 Prognose und Prävention

Trotz neuerer Therapiekonzepte konnte die Prognose von HNSCC-Patienten in den letzten Jahren nur geringfügig verbessert werden. Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate lag zwischen 1992 und 1996 bei 55 %, konnte jedoch zwischen 2002 und 2006 nur geringfügig auf 66 % verbessert werden (Pulte & Brenner, 2010). Im Jahr 2018 lag die Sterblichkeitsrate immer noch bei etwa 50 % (Arbyn et al., 2020; Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2019). Im Krankheitsverlauf entwickeln weiterhin mehr als 65 % der Patienten Fernmetastasen oder Rezidive (Argiris et al., 2008). Die leichte Besserung der Prognose ist weniger auf eine Verbesserung der Therapiemodalitäten zurückzuführen als auf den deutlichen prozentualen Anstieg der HPV-assoziierten HNSCCs im Vergleich zu den Noxen-induzierten HNSCCs, die ohnehin eine bessere Prognose aufweisen (Ang et al., 2010). Unter Berücksichtigung dieses Effektes ergeben sich keine relevanten Änderungen in der Prognose der Überlebensrate (Chaturvedi et al., 2011).

In Bezug auf die Lebensqualität nach der Therapie bilden sich viele Symptome wie orale Funktionsstörungen, Schluck- und Sprachprobleme innerhalb eines halben Jahres nach Beendigung der Therapie teilweise oder vollständig zurück. Innerhalb von 10 Jahren nach Ende der Therapie kommt es

jedoch zu einer Reduktion der gesundheitsbezogenen Lebensqualität um 11 %. Eine herabgesetzte Lebensqualität ist zudem signifikant mit einer Reduktion der Lebenserwartung verbunden (Hammerlid et al., 2001; H. M. Mehanna & Morton, 2006; Quinten et al., 2009; Rettig et al., 2016). Darüber hinaus ist bei Überlebenden eine hohe Selbstmordrate mit 63,4/100.000 auffällig. Damit steht die Erkrankung in Bezug auf Suizide an zweiter Stelle nach dem Pankreaskarzinom. Bei anderen Krebserkrankungen liegt der Durchschnitt bei 23,6/100.000. Es wird vermutet, dass die Gründe hierfür in der eingeschränkten Lebensqualität, beeinflusst durch die Erkrankung selbst, der nebenwirkungsreichen Therapie und der erhöhten psychischen Belastung auch durch häufig stigmatisierende Krankheits- und Behandlungsfolgen wie eine Tracheotomie oder Rekonstruktion im Gesichtsbereich liegen (Osazuwa-Peters et al., 2018).

Zur Prävention von Noxen-assoziierten HNSCCs nehmen der Verzicht von risikobehafteten Konsumgütern, wie Nikotin, Alkohol und Areca-Nuss-Produkten den höchsten Stellenwert ein. Präventionsstrategien, wie eine höhere Besteuerung von Tabakerzeugnissen, große grafische Warnhinweise auf Verpackungen, das Verbot von Tabakwerbung und das Rauchverbot im öffentlichen Raum zeigen erste Erfolge. Diese sind erkennbar an dem sinkenden Anteil der rauchenden Bevölkerung und hat auch in den letzten Jahren zu einer Stabilisierung der Inzidenz von Noxen-assoziierten HNSCCs Jahren beigetragen.

Da sich die Risikofaktoren von HPV-assoziierten HNSCCs vorrangig auf die HPV-Infektion beschränken, wird hier als Präventionsstrategie auf die HPV-Impfung gesetzt. Die HPV-Impfung wird seit 2007 für Mädchen und seit 2018 auch für Jungen zwischen dem 9. und 14. Lebensjahr von der STIKO in Deutschland empfohlen. Alle zugelassenen Impfstoffe decken den für die Kopf-Hals-Onkologie relevanten Subtyp 16 ab. Der tatsächliche Nutzen der HPV-Impfung für Jungen und Mädchen hinsichtlich des Auftretens von HPV-induzierten HNSCCs, muss die Zukunft zeigen. Es wird vermutet, dass flächendeckende HPV-Impfungen potenziell zu einem signifikanten Rückgang der Inzidenz von durch HPV-assoziierten HNSCCs führen könnten, indem die Übertragung und Prävalenz der relevanten HPV-Subtypen effektiv reduziert werden.

2.2 Vitamin D

2.2.1 Allgemein

Vitamin D (Calciferol) gehört zur Stoffklasse der Steroide und ist ein fettlösliches Vitamin. Es existieren unterschiedliche Formen von Vitamin D. Zu diesen Formen zählen u.a. die inaktiven Vorstufen Ergosterol (Provitamin D₂) und 7-Dehydrocholesterin (Provitamin D₃), die chemischen Leitstrukturen Ergocalciferol (Vitamin D₂) und Cholecalciferol (Vitamin D₃), sowie die aktiven Formen 1,25-Dihydroxyergocalciferol (aktiviertes Vitamin D₂) und 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol, aktiviertes Vitamin D₃). Vitamin D ist das einzige Vitamin, das der Körper selbst herstellen kann. Die körpereigene Synthese umfasst mehrere Transformationen und Transportschritte, welche in Abb. 5

Einleitung

dargestellt sind. Die Grundlage bildet Cholesterin, das entweder aus der Nahrung aufgenommen oder vom Körper synthetisiert wird. In der Leber wird Cholesterin zu 7-Dehydrocholesterin umgewandelt. Als nächstes wird 7-Dehydrocholesterin in der Haut mittels UV-B-Strahlen mit einer Wellenlänge zwischen 270 und 300 nm in Prävitamin D₃ umgewandelt. Anschließend erfolgt eine temperaturabhängige Isomerisierung zu Cholecalciferol oder es wird als 7-Dehydrocholesterin in der Haut gespeichert. In der Leber wird das Cholecalciferol durch das Cytochrom-P450 (CYP)-2R1 (CYP2R1), auch bekannt als 25-Hydroxylase, zu 25-Hydroxycholecalciferol (Calcidiol) hydroxyliert. Im letzten Schritt wird das 25-Hydroxycholecalciferol in der Niere mithilfe der 1- α -Hydroxylase in den Mitochondrien in aktives 1,25-Dihydroxycholecalciferol umgewandelt (Holick, 2003). Die 1- α -Hydroxylase stellt dabei das Schlüsselenzym zur Regulation der Synthese von 1,25-Dihydroxycholecalciferol dar. Das Parathormon und cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) erhöhen die Enzymaktivität, während Calcium, Phosphat und der *Fibroblast-Growth-Factor* (FGF)-23 eine hemmende Wirkung aufweisen. Das Vitamin-D-bindende Protein (DBP) ist für den Transport zu den jeweiligen Zielorten verantwortlich. Vitamin D wird hauptsächlich in Form von 25-Hydroxycholecalciferol im Fettgewebe gespeichert. Die Reserve als 7-Dehydrocholesterin in der Haut dient als weitere Speicherform. Eine 24-Hydroxylierung mittels CYP24A1 inaktiviert Vitamin D, welches dann über die Galle ausgeschieden wird (Heinrich et al., 2014).

Tierische Quellen, wie Fisch mit hohem Fettgehalt oder Eier enthalten hauptsächlich die inaktive Vorstufe Cholecalciferol. Auch pflanzliche Produkte wie Pilze sowie einige Nahrungsergänzungspräparate enthalten die Vorstufe Ergocalciferol (Heinrich et al., 2014). Diese Vorstufen werden im beschriebenen Syntheseprozess ab den entsprechenden Zwischenschritten vom Körper weiterverarbeitet und in die aktiven Hormonformen umgewandelt.

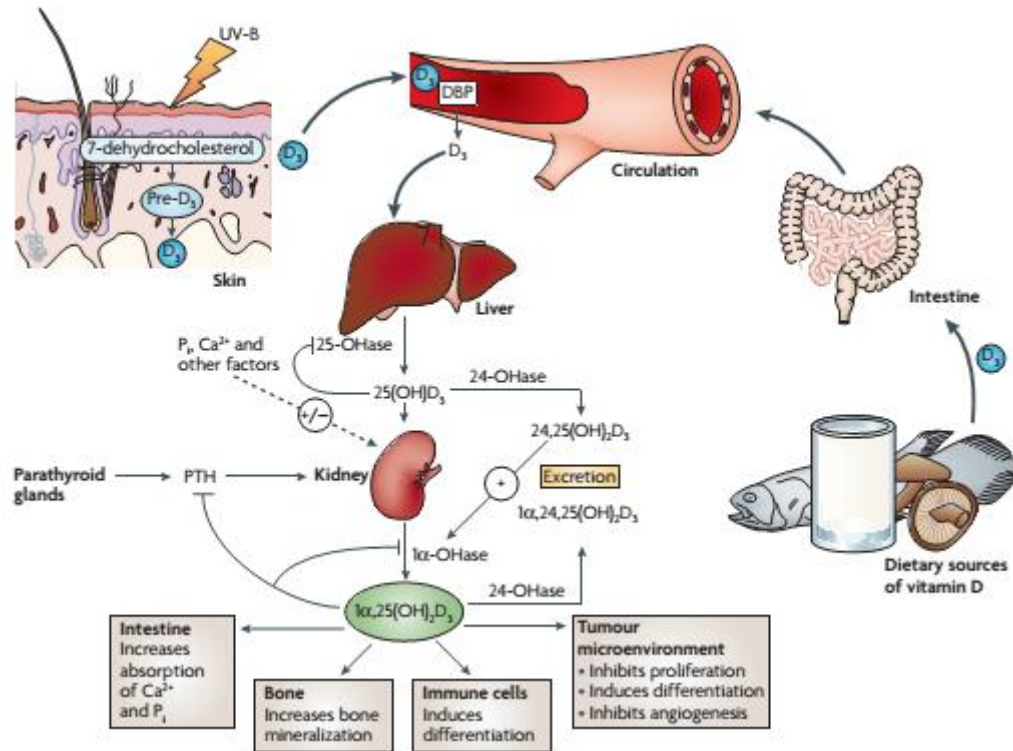


Abb. 5: Synthese und Regulation von Vitamin D. Die Synthese von aktivem Vitamin D erfolgt in einem mehrstufigen Prozess an dem u.a. die Leber und Niere beteiligt sind. Zunächst wird das 7-Dehydrocholesterol der Haut durch UV-B-Strahlung in Prävitamin D₃ umgewandelt. Im Anschluss erfolgt eine spontane und temperaturabhängige Isomerisierung zu Cholecalciferol, welches daraufhin in der Leber durch die 25-Hydroxylase zu 25-Hydroxycholecalciferol hydroxyliert wird. Zuletzt erfolgt eine weitere Hydroxylierung in der Niere in die aktive Form 1,25-Dihydroxycholecalciferol. Faktoren wie Parathormon (PTH), Calcium- und Phosphatspiegel sowie das Hormon FGF-23 können die Synthese und Metabolisierung regulieren und gewährleisten somit eine angemessene Aufnahme, Synthese und Verwertung von Vitamin D₃ im Körper (modifiziert aus Deeb et al., 2007).

Vitamin D ist an verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt, was zu pleiotropen Effekten auf den Körper führt. Unter anderem wird die Expression einer Vielzahl von Genen reguliert, die beispielsweise (bspw.) den Calcium- und Phosphatstoffwechsel beeinflussen oder die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen modulieren (DeLuca, 2004; Heinrich et al., 2014).

In den letzten Jahren fokussiert sich die Forschung zunehmend auf den Einfluss von Vitamin D auf das Immunsystem. Mediziner erhoffen sich dadurch neue Therapieansätze in der Onkologie. Eine Erkenntnis ist die Fähigkeit von Vitamin D, die Aktivierung und Funktion von T-Zellen zu modulieren. Forschungsergebnisse legen nahe, dass Vitamin D die Differenzierung von T-Zellen in Richtung des regulatorischen T-Zell-Phänotyps T_{reg} fördern kann. Dies kann zu einer Suppression von inflammatorischen Immunreaktionen führen. Es wurde gezeigt, dass die Supplementation mit Vitamin D bei gesunden Probanden zu einer signifikanten Zunahme der T_{reg}-Zellzahl führt. Zusätzlich kann Vitamin D die Produktion entzündungshemmender Zytokine wie IL-10 und die Expression von TCRs beeinflussen, was zu einer verminderten Aktivierung von T-Zellen führt (Prietl et al., 2013).

Einleitung

Es beeinflusst auch die Funktion anderer Immunzellen, wie dendritischer Zellen, indem es die Expression von Molekülen, die für die Antigenpräsentation erforderlich sind, reguliert. Eine Studie von Penna et al aus dem Jahr 2007 unterstützt diese Ergebnisse, indem sie zeigt, dass Vitamin D die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf dendritischen Zellen reduziert. Darüber hinaus kann Vitamin D die Produktion von antimikrobiellen Peptiden in Makrophagen und natürlichen Killerzellen erhöhen, was zu einer verstärkten Abwehr von Infektionen führen kann (Hansdottir et al., 2010). Eine Vielzahl von klinischen Studien hat demnach eine Assoziation zwischen niedrigen Vitamin-D-Spiegeln und einem erhöhten Risiko für Infektionen, Autoimmunerkrankungen und entzündlichen Erkrankungen gezeigt. Eine Meta-Analyse von Autier et al., 2014 ergab einen Zusammenhang zwischen niedrigen Vitamin-D-Spiegeln und einem erhöhten Risiko für Atemwegsinfektionen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung wichtig ist, um ein gesundes Immunsystem aufrechtzuerhalten und das Risiko für immunvermittelte Erkrankungen zu verringern. Trotz der Fortschritte in der Forschung bleiben viele Fragen zur genauen Rolle und den Mechanismen von Vitamin D im Immunsystem ungeklärt. Zukünftige Studien sind erforderlich, um die komplexen Wechselwirkungen zwischen Vitamin D und dem Immunsystem besser zu verstehen und potenzielle therapeutische Anwendungen von Vitamin D zur Regulation der Immunantwort weiter zu erforschen.

Die zuvor dargestellten Wirkungen von Vitamin D werden primär über den Vitamin-D-Rezeptor (VDR) vermittelt, welcher zu den nuklearen Rezeptoren gehört. Wie Abb. 6 verdeutlicht, erstreckt sich die Wirkung über verschiedene Gewebe und Organe im Körper und die genaue Funktion des VDRs wird derzeit in vielen Studien untersucht. In den Nieren reguliert Vitamin D neben dem Calcium- und Phosphathaushalt auch das renale Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Es hilft dadurch den Blutdruck zu regulieren und die Flüssigkeits- und Elektrolythomöostase aufrechtzuerhalten. Im Pankreas trägt Vitamin D über den VDR zur Insulinsekretion und -sensitivität bei und spielt eine Rolle bei der Regulation des Blutzuckerspiegels. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass der Rezeptor auch in Östrogen- und in *insulin-like-growth-factor* (IGF)-vermittelten Signalwegen eine Rolle spielt. Ebenfalls scheint er Entzündungsprozesse zu modulieren und Einfluss auf fibrotische Vorgänge zu haben. Eine hohe VDR-Expression korreliert darüber hinaus mit einem geringeren Auftreten von diabetischer Nephropathie, Proteinurie, Hypertonie und Atherosklerose (Valdivielso & Fernandez, 2006; L. Yang et al., 2012). Des Weiteren kann Vitamin D über den VDR das Zellwachstum und die Differenzierung regulieren, die Zellproliferation hemmen und das Risiko für die Entwicklung von Krebs in u.a. Brust, Darm und Prostata senken (siehe Kapitel 2.3).

Der primär zytosolisch lokalisierte VDR und der Retinoid-X-Rezeptor (RXR) dimerisieren durch die Bindung von Calcitriol an den VDR. Dies führt zur Komplexbildung mit Vitamin-D-Reaktionselementen. Diese Elemente steuern die Transkriptionsaktivität der Zelle. Infolgedessen wird durch die Aktivierung des VDR durch Vitamin D die Transkription einer Vielzahl von Genen entweder gesteigert oder reduziert.

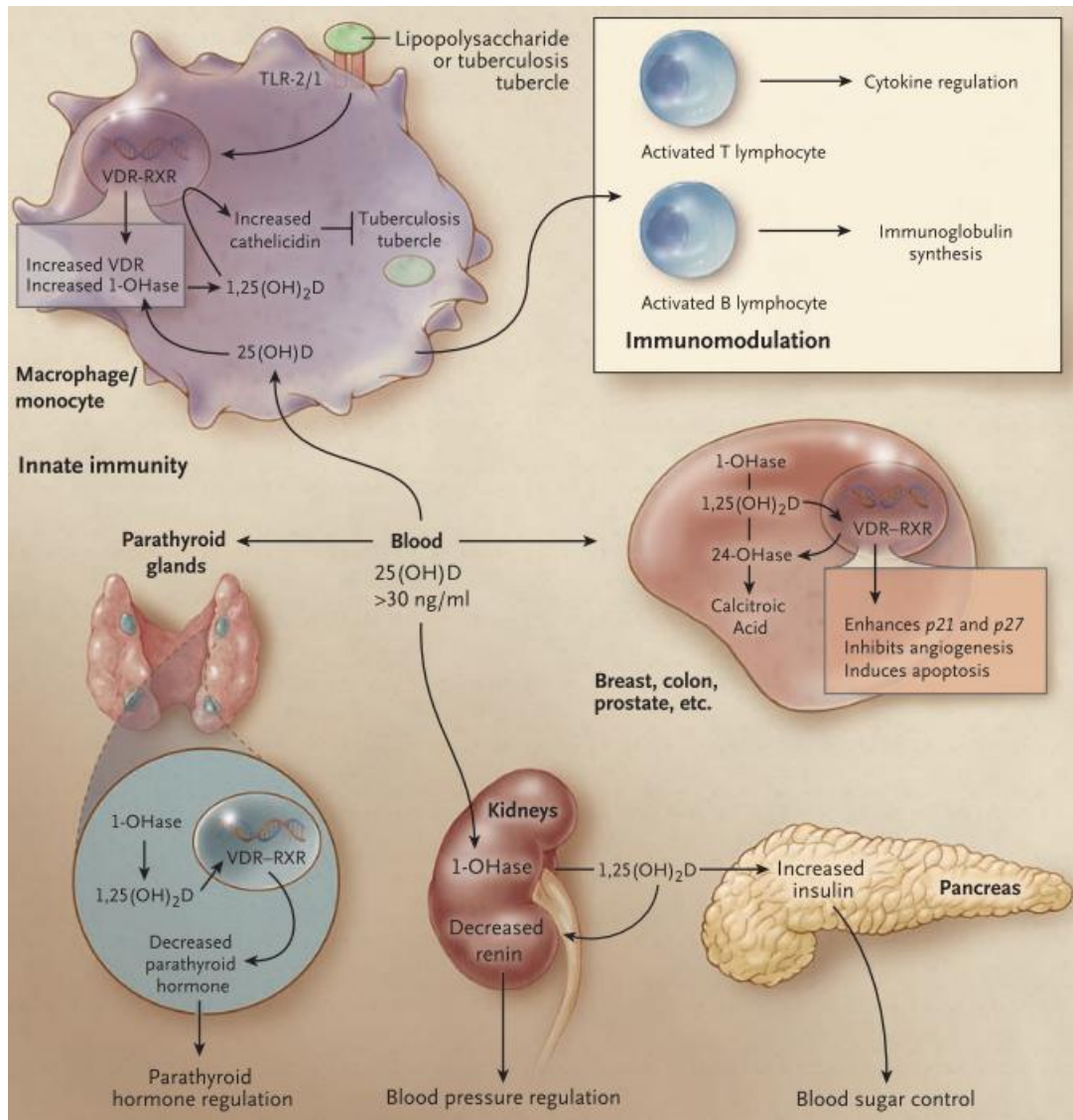


Abb. 6: VDR-vermittelte Wirkungen neben dem Knochenstoffwechsel. Die VDR-vermittelte Wirkung von Vitamin D ist vielfältig und betrifft verschiedene Gewebe und Körperorgane. Es reguliert u.a. den Calcium- und Phosphathaushalt, das renale Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), die Insulinsekretion und -sensitivität, die Aktivität von Makrophagen und anderen Immunzellen sowie das Zellwachstum und die Differenzierung (modifiziert aus Holick, 2007).

Die Regulation der VDR-Expression wird neben der Vitamin-D-Versorgung des Körpers auch durch viele weitere Komponenten gesteuert. Dazu gehören Genetik und Epigenetik, sowie Umwelteinflüsse wie Ernährung, Sonnenexposition, Infektionen und Umweltverschmutzung. Allerdings haben auch viele Hormone, wie Retinsäure, Parathormon und Glukokortikoide einen Einfluss auf die Expression des Rezeptors (Fathi et al., 2019; Pike & Meyer, 2012).

2.3 Vitamin D und Krebs

2.3.1 Allgemein

Eine wachsende Anzahl von Studien deutet darauf hin, dass Vitamin D eine wichtige Rolle bei der Prävention und Behandlung von Krebserkrankungen spielen könnte. Zahlreiche epidemiologische Studien haben eine inverse Korrelation zwischen der Vitamin-D-Versorgung und dem Risiko für verschiedene Krebsarten gezeigt. Eine kleine Studie von Garland et al., 1989 ergab eine inverse Korrelation zwischen der Sonnenlichtexposition und einem verringerten Risiko für Kolonkarzinome. Es wurde nachgewiesen, dass ab einem Serumlevel von über 20 ng/ml 25-Hydroxycholecalciferol eine statistisch signifikante Risikoreduktion um 80 % besteht, an einem Kolonkarzinom zu erkranken. In einer größeren prospektiven Studie von Giovannucci et al., 2006 wurden potenzielle Prädiktoren des Vitamin-D-Status untersucht sowie deren Zusammenhang mit der Inzidenz und Mortalität von Krebserkrankungen bei Männern. Diese Studie basierte auf Daten aus der *Health-Professionals-Follow-up-Study*, einer großen Kohortenstudie, die 51.529 Männer im Alter zwischen 40 und 75 Jahren umfasst. Es konnte gezeigt werden, dass ab einem 25-Hydroxycholecalciferol-Serumlevel von 25 nmol/L eine Reduktion der totalen Krebsinzidenz um 17 %, eine Reduktion der karzinombedingten Mortalität um 29 % und Reduktion der Mortalität der Magen-Darm-assoziierten Karzinome um 45 % erreicht werden konnte. Eine norwegische Studie hat gezeigt, dass ein hohes Vitamin-D-Serumlevel zum Zeitpunkt der Krebsdiagnose bei Brust-, Kolon- und Prostatakarzinomen mit einer besseren Prognose der Erkrankungen einhergeht (Robsahm et al., 2004). Viele weitere Studien schlossen sich diesen an, wodurch das wissenschaftliche Interesse an der Rolle von Vitamin D als möglicher Präventions- und Therapieansatz für Krebserkrankungen verstärkt wurde (Ahonen et al., 2000; Engel et al., 2010; Lamberg-Allardt et al., 2001; Ma et al., 2001; Tretli et al., 2009). Im Folgenden werden Signalwege in der humanen Tumorzellbiologie dargestellt und näher erläutert, auf die Vitamin D nach der aktuellen Studienlage potenziell Einfluss nehmen kann.

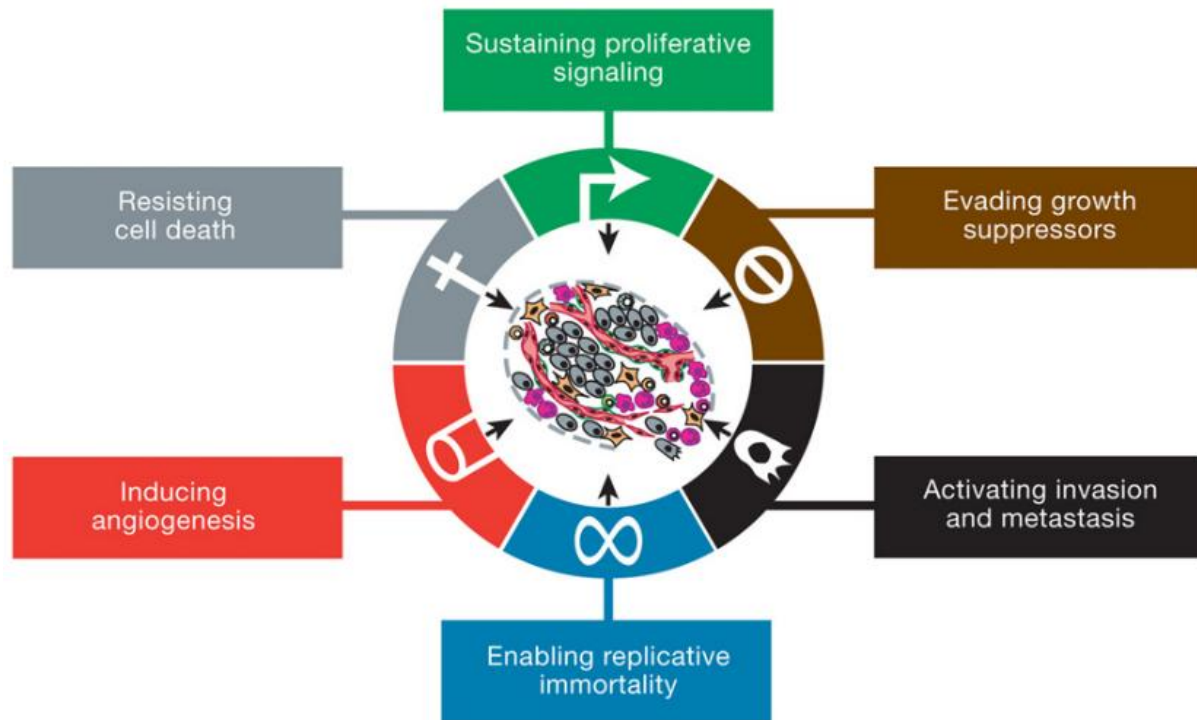


Abb. 7: Charakteristische Merkmale von Krebszellen – „Hallmarks of Cancer“. Die charakteristischen Merkmale von Karzinomzellen umfassen u.a. eine anhaltende Proliferationsfähigkeit durch den Verlust der Zellzykluskontrolle, die Ausschaltung/Umgehung von Wachstumshemmungssignalen, die Resistenz gegenüber Apoptose, die Fähigkeit zur Immunevasion, indem sich die Zellen vor Immunerkennung und -eliminierung schützen. Des Weiteren verfügen Krebszellen über die Fähigkeit Angiogenese zu induzieren, um die Versorgung mit ausreichend Nährstoffen und Sauerstoff sicherzustellen und die Fähigkeit zur Invasion und somit Metastasierung in umliegendes Gewebe. Die gezielte Beeinflussung dieser Merkmale kann potenziell die Effektivität von antitumoralen Therapien verbessern und die Prognose von Karzinompatienten positiv beeinflussen (modifiziert aus Hanahan & Weinberg, 2011).

Krebszellen zeichnen sich durch eine Vielzahl charakteristischer Merkmale aus, von denen einige beteiligte Signalwege durch Vitamin D beeinflusst werden können. Eine unkontrollierte Proliferation ist eines der grundlegenden Merkmale von Krebszellen (Hanahan & Weinberg, 2011) (siehe Abb. 7). Ein zentraler Faktor hierfür ist die Dysregulation des Zellzyklus, der physiologisch den Zellteilungsprozess reguliert. Tumorzellen können Mutationen in Onkogenen, die für Wachstumsförderungssignale kodieren, oder in Tumorsuppressorgenen, die physiologisch das Zellwachstum unterdrücken, aufweisen. Diese Mutationen führen zu einem unkontrollierten Zellwachstum. Vitamin D greift regulierend in diesen Prozess ein, indem es die Expression von CDK-Inhibitoren *p21* und *p27* fördert. Diese stabilisieren den E2F-Retinoblastomprotein (pRb)-Komplex und verhindern so den Übergang der Zelle aus der G1- in die S-Phase, wodurch die Zellteilung gehemmt wird (K. C. Chiang, Yeh, Hsu, Chen, et al., 2013; Dyson, 1998; Samuel & Sitrin, 2008; Weinberg, 1995). Zusätzlich inhibiert Vitamin D die Telomerase-Aktivität (siehe Kapitel 2.3.2) (K. C. Chiang, Yeh, Hsu, Chen, et al., 2013). Die Telomerase ist ein Enzym, das die Länge der Telomere auf den Chromosomen aufrechterhält und ist daher mitentscheidend für die Zellteilung und die Immortalisierung

von Karzinomzellen. Die Hemmung dieses Enzyms führt zu einer Verkürzung der Telomere und einer Hemmung der Zellproliferation. Des Weiteren kann Vitamin D die Expression des Proto-Onkogens *MYC* regulieren, welches bei vielen Karzinomen überexprimiert ist und das Tumorentstehen fördert. Vitamin D kann die Expression von *MYC* herabregulieren, indem es direkt an die Promotorregionen des *MYC*-Gens bindet und so die Transkription dieses Onkogens hemmt. In der Folge wird die Proliferation von Karzinomzellen gehemmt (Jensen et al., 2001; Rohan & Weigel, 2009).

Eine weitere Wirkung entfaltet Vitamin D im Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (Akt)/Mammalian-Target-of-Rapamycin (mTOR)-Signalweg, indem es die Expression des Tumorsuppressors Phosphatase-und-Tensin-Homolog (PTEN) fördert und so diesen wachstumsfördernden Signalweg unterdrückt (siehe Abb. 8) (Pan et al., 2010).

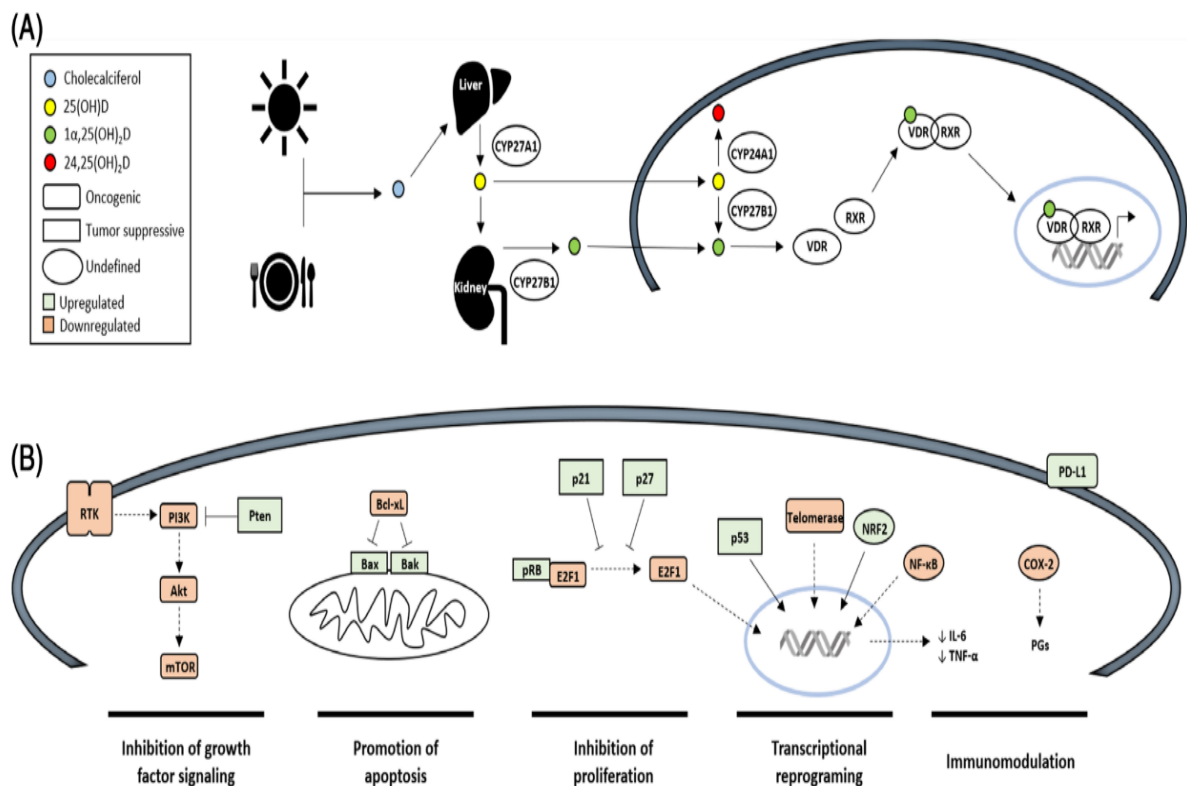


Abb. 8: Vitamin D Stoffwechsel (A) und Beeinflussung der Karzinomaktivität (B). (A) Der Vitamin-D-Stoffwechsel umfasst mehrere enzymatische Zwischenschritte (vgl. Abb. 5), wobei in der Niere die aktive Form Calcitriol entsteht. Dieses bindet an den VDR, der mit RXR heterodimerisiert und in den Zellkern transloziert, um die Genexpression zu beeinflussen. (B) Vitamin D moduliert karzinomrelevante Signalwege, indem es u.a. den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg antagonisiert, *PTEN* sowie die CDK-Inhibitoren *p21* und *p27* hochreguliert und die Telomerase-Aktivität unterdrückt. Es fördert die pro-apoptotischen Faktoren (Bax, Bak), hemmt überlebensfördernde Proteine (Bcl-XL) sowie proinflammatorische Zytokine (IL-6, TNF-α) durch die Hemmung von Nuklear-Faktor-κ-B (NF-κB). Zudem reduziert es die Prostaglandin-Synthese durch die Hemmung von COX-2. Insgesamt resultiert eine geringere Proliferation und Tumorentwicklung (modifiziert aus Izreig et al., 2020).

Im Verlauf ihrer malignen Transformation entwickeln Tumorzellen verschiedene Mechanismen, um der Apoptose, einem programmierten Zelltod, zu entgehen. Dies ermöglicht ihnen, unkontrolliert zu proliferieren und zu überleben, was zur Tumorbildung und Progression beiträgt. Tumorzellen besitzen

genauso viele Onkogene, um sich noch dem Immunsystem zu entziehen. Eine abnorme Onkogenerhöhung der Zelle würde das Immunsystem aktivieren und eine Apoptose induzieren. Tumorzellen können Onkogene besitzen, die die Deaktivierung der Apoptose aktiv bewirken. Vitamin D beeinflusst diese Charakteristik, indem es die Expression des Tumorsuppressors *p53* induziert (Swami et al., 2003).

Ein Schlüsselmechanismus ist zudem die Regulation der B-Zell-Lymphoma (BCL)-2-Protein-Familie, die eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der mitochondrialen Apoptose spielen. Vitamin D kann die Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie BCL-2 und BCL-XL reduzieren und gleichzeitig die Expression von pro-apoptotischen Proteinen wie Bax, Bak und Bad erhöhen. Dieser Mechanismus führt zu einem ausgewogeneren Verhältnis zwischen anti-apoptotischen und pro-apoptotischen Proteinen. Dadurch wird die Tumorzelle für apoptotische Signale empfänglicher und ihre Fähigkeit zur Vermeidung der Apoptose beeinträchtigt (Díaz et al., 2000).

Neben dem Umgehen von Wachstumssuppressoren spielt die Angiogenese, der Prozess der Bildung neuer Blutgefäße, eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression, da sie die Versorgung des Tumorgewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff unterstützt. Auf zellulärer Ebene gibt es Hinweise, dass Vitamin D einen direkten proliferations-supprimierenden Effekt auf die Tumorendothelzellen, die die innerste Schicht der Blutgefäße bilden und an der Bildung neuer Gefäße beteiligt sind, besitzt. Vitamin D hemmt die Proliferation, Migration und Überlebensfähigkeit von Endothelzellen und reduziert darüber hinaus die Expression von Angiogenesefaktoren wie VEGF, IL-8 und COX2 in Tumorzellen, wodurch die Bildung neuer Blutgefäße eingeschränkt wird. Außerdem gibt es Hinweise auf eine VDR-abhängige Regulation der Reduktion der Angiogenese (Ben-Shoshan et al., 2007; Chung et al., 2009; Fukuda et al., 2003; Rosli et al., 2013).

Ein weiteres Charakteristikum von Tumorzellen ist ihre Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung. Vitamin D beeinflusst hierbei mehrere Schlüsselmoleküle, die zur Hemmung der Tumorprogression beitragen können (Welsh, 2012). Es hemmt die Expression des extrazellulären Matrixproteins Tenascin C und von Lamininrezeptoren, die für die Tumorzellinvasion wichtig sind, sowie die Aktivität der Matrix-Metallproteinase (MMP)-9, die physiologisch den Abbau der extrazellulären Matrix fördert und somit die Tumordinvasion erleichtert (Bao et al., 2006; González-Sancho et al., 1998; Morini et al., 2000; Sung & Feldman, 2000). Zudem kann Vitamin D die Expression von E-Cadherin steigern, was die Adhäsion zwischen den Zellen stärkt und die Fähigkeit der Tumorzellen zu metastasieren verringert (Campbell et al., 1997). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Vitamin D den mitogenen Signaltransfer, vermittelt durch IGF, hemmt (Boyle et al., 2001).

Neben diesen direkten Einflüssen von Vitamin D auf entscheidende molekulare Prozesse in der Tumorzellbiologie zeigt sich Vitamin D, insbesondere in seiner aktiven Form Calcitriol auch als Immunmodulator wirksam (vgl. Abb. 26 im Anhang), indem es die Interaktion zwischen dem Immunsystem und dem Tumor beeinflusst. Die immunmodulierenden Effekte machen Vitamin D zu

einem präventiven Faktor bei Krebserkrankungen mit hohen lymphozytären Infiltraten (S. Ogino et al., 2018; Song et al., 2016). Diese Effekte sind von besonderem Interesse in der Tumorummunologie, da sie potenziell zur Tumorkontrolle und -elimination beitragen können. Vitamin D wirkt u.a. direkt auf T-Zellen und moduliert deren Differenzierung und Funktion. Des Weiteren fördert Calcitriol die Entwicklung von T_{regs} , welche eine immunsuppressive Umgebung schaffen und somit die Immunüberwachung des Tumors unterdrücken können (siehe Kapitel 2.1.3). Darüber hinaus verstärkt Calcitriol die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch Makrophagen und reduziert gleichzeitig die Expression von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6 und TNF- α , während die Produktion antiinflammatorischer Zytokine, wie IL-10, erhöht wird. Diese Veränderungen können das Tumormikromilieu beeinflussen und eine Immunantwort gegen den Tumor verhindern (Di Rosa et al., 2011; Smolders et al., 2009; Zhang et al., 2012).

Darüber hinaus beeinflusst Vitamin D die Funktion von DCs, die als *Antigen-presenting-cells* (APC) eine Schlüsselrolle in der Initiierung und Regulation von Immunantworten spielen. Calcitriol reduziert die Reifung und Aktivierung von DCs, was zu einer verminderten Expression von MHC-II-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 führt. Diese Reduktion kann zu einer tolerogenen Immunantwort führen, welche das Immunsystem daran hindert, Tumorzellen effektiv zu erkennen und anzugreifen (Penna & Adorini, 2000). Diese Wirkung könnte unter Umständen die Tumorprogression begünstigen und steht daher den zuvor beschriebenen Effekten entgegen. Weitere Studien sind erforderlich, um die genaue Wirkweise von Vitamin D auf die antitumorale Aktivität des Immunsystems zu untersuchen.

In klinischen Studien zeigt sich bisher eine uneindeutige Datenlage. Manson et al. konnten im Jahre 2019 nach erhöhter Gabe von Vitamin D keinen Einfluss auf die Inzidenz oder den Tod durch jegliche Karzinomart feststellen. Auch Kuznia et al. konnte 2023 keine statistisch signifikante reduzierende Wirkung von Vitamin D auf die Mortalität von Karzinompatienten nachweisen. Diese Ergebnisse wurden in anderen Studien bestätigt (Lappe et al., 2017; Scragg et al., 2018). Eine mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse könnte in der Reaktion der Tumorzellen auf die antitumoralen Vitamin D-vermittelten Effekte liegen. Diese reagieren auf die antitumoralen Effekte, indem sie über die Hochregulation von CYP24A1 den Abbau von Calcitriol beschleunigen und die VDR-Expression herunterregulieren (Lopes et al., 2010; Zeljic et al., 2012).

Um die genauen molekularen Mechanismen insbesondere hinsichtlich der klinischen Übertragbarkeit zu verstehen, bedarf es weiterer Forschung.

2.3.2 Vitamin D und HNSCCs

Eine Vielzahl an Studien unterstützt die These, dass die antitumoralen Effekte von Vitamin D, die sich bei anderen Tumorentitäten (siehe Kapitel 2.3.1) abzeichnen, auch bei HNSCCs nachweisbar sind.

Im Jahr 2011 sowie im Jahr 2014 wurden zwei skandinavische Studien publiziert, in welchen der Vitamin-D-Status sowie die Inzidenz von HNSCCs in der Bevölkerung untersucht wurden. Beide Untersuchungen konnten jedoch keinen signifikanten Zusammenhang feststellen, wobei bedauerlicherweise keine Analyse des Gesamtüberlebens von HNSCC-Patienten in Abhängigkeiten vom Vitamin-D-Status durchgeführt wurde (Arem et al., 2011; Skaaby et al., 2014). Ähnlich ergaben Studien von Meyer et al. im Jahr 2011 keine Korrelation zwischen dem Vitamin-D-Status und dem *Outcome* von HNSCC-Patienten.

Im Gegensatz dazu zeigte die *Copenhagen-City-Heart-Study* (CCHS), dass eine geringere Vitamin-D-Versorgung das Risiko erhöht, an tabakassoziierten Krebsarten, einschließlich HNSCC, zu erkranken (Afzal et al., 2013). Im Rahmen einer weiteren großangelegten Studie, der *European-Pro prospective-Investigation-into-Cancer-and-Nutrition* (EPIC)-Studie, konnte eine Risikoreduktion von 42 % bei einer Verdopplung des zirkulierenden 25-Hydroxycholecalciferols von 25 nmol/l auf 50 nmol/l nachgewiesen werden. Bei Larynx- und Hypopharynxkarzinomen konnte sogar eine Risikoreduktion von 58 % festgestellt werden. Allerdings stieg oberhalb einer Konzentration von 50 nmol/l das Mortalitätsrisiko wieder an (Fanidi et al., 2016; Riboli et al., 2002).

Diese klinischen Beobachtungen werden durch präklinische Studien unterstützt. Tierversuche zeigten eine inverse Korrelation zwischen der Inzidenz von HNSCCs und der Vitamin-D-Versorgung. In einer Studie von Meier et al. im Jahre 2007 mit Goldhamstern führte eine Behandlung mit Vitamin D zu einer signifikanten Reduktion der Tumorbildung nach Exposition mit dem Karzinogen 7,12-Dimethylbenzo(a)anthracen (DMBA). Nach 14 Wochen entwickelte nur eines der mit Vitamin D behandelten Tiere einen Tumor, im Vergleich zu sieben Tieren der unbehandelten Kontrollgruppe.

Auch *in-vitro* Studien bestätigen die protektiven Effekte von Vitamin D. Satake et al. (2003) konnten eine reduzierte Zellproliferation, eine gesteigerte Apoptose und vermehrten Zellzyklusarrest sowie eine erhöhte Sensitivität von Chemotherapeutika feststellen. Im Konsens mit diesen Ergebnissen konnte auf zellulärer Ebene eine durch Vitamin D bedingte Hochregulation von Zellzyklus-Checkpoint-Inhibitoren wie *p18*, *p21* und *p27* in HNSCC-Zellen festgestellt werden (siehe Kapitel 2.3.1, siehe Abb. 8) (Gedlicka et al., 2006; Hager et al., 2001, 2004). Zudem konnte eine Vitamin-D-vermittelte verminderte Expression des katalytischen Subkomplexes Telomerase-Reverse-Transkriptase (TERT) von HNSCC-Zellen nachgewiesen werden. Unter physiologischen Bedingungen ist diese in HNSCCs häufig hochreguliert und verhindert die Verkürzung der Enden der Chromosomen, die durch die Replikation entstehen. Dies resultiert in einer Verzögerung der Apoptose-Induktion.

Des Weiteren konnten die bereits in Kapitel 2.3.1 beschriebenen, durch Vitamin D hochregulierten proapoptotischen Signalwege, vermittelt über die Caspasen-2 und 8 sowie die BAX-Gene, auch in den oralen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien SCC15, SCC25 und CAL27 nachgewiesen werden (Kingsley et al., 2013).

Vitamin D beeinflusst auch das immunologische Tumorumfeld, welches insbesondere bei HNSCCs von einem immunsupprimierten Umfeld gekennzeichnet ist (Pu et al., 2021). Bochen et al. konnten 2018 zum einen, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der CCHS- und EPIC-Studie, einen Zusammenhang zwischen einer erniedrigten Vitamin-D-Serumkonzentration und der lymphogenen Metastasierung, einem negativen HPV-Status und einem erniedrigten Gesamtüberleben feststellen. Zum anderen konnte eine verminderte intra- und peritumorale Immunzellinfiltration mit T-Zellen (CD3), T-Helferzellen (CD4), zytotoxischen T-Zellen (CD8), NK-Zellen (CD56), Makrophagen (CD68) und M1-Makrophagen nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte nach einer erhöhten Vitamin-D-Substitution über einen Zeitraum von 3 Monaten ein Anstieg der zytotoxischen NK-Zellaktivität festgestellt werden. In der Studie von Lathers et al. (2004) konnte durch eine erhöhte Zufuhr von Vitamin D eine Erhöhung der Expression von HLA-DR, IL-12, Interferon- γ sowie eine gesteigerte T-Zell-Blastogenese und eine verminderte Anzahl von immunsupprimierenden CD34⁺-Zellen im Blut von HNSCC-Patienten nachgewiesen werden. Zudem konnte eine Vitamin-D-bedingte Aktivierung von T-Zellen nachgewiesen werden (Von Essen et al., 2010). Eine erhöhte Zahl von infiltrierenden Immunzellen ist dabei mit einer verbesserten Prognose assoziiert (Badoual et al., 2006). Klinische Studien unterstreichen ebenfalls das immunstimulierende Potenzial von Vitamin D. Eine Behandlung mit Calcitriol bei HNSCC-Patienten führte zu einer verstärkten Aktivierung von Immunzellen und einer niedrigeren Rezidivrate, wobei die Fallzahlen limitiert waren (Walsh et al.).

Es lässt sich folgern, dass Vitamin D durch seine immunstimulierenden Effekte dazu beitragen könnte, die antitumorale Aktivität des Immunsystems zu stimulieren und somit eine effektive Immunreaktion auf den Tumor zu induzieren.

Auf molekularer Ebene ist der VDR von zentraler Bedeutung für diese durch Vitamin D vermittelten Effekte. Dieser wurde sowohl in Tumor- als auch in Immunzellen nachgewiesen. Die Präsenz auf Immunzellen deutet auf eine direkte Vitamin-D-bedingte Beeinflussung hin, was derzeit weiter untersucht wird. Des Weiteren wird von einer Beteiligung an der Karzinogenese ausgegangen. Jedoch scheint der VDR ebenfalls einen protektiven Faktor zu repräsentieren, da eine niedrige VDR-Expression ein prognostisch ungünstiges Zeichen für das Überleben von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle darstellt (Kongsbak et al., 2013; Sarkar et al., 2016; Vaughan-Shaw et al., 2017). Außerdem ergaben sich Hinweise auf eine Beeinflussung genetischer Sequenzvarianten des Vitamin-D-Stoffwechsels hinsichtlich der Prognose von HNSCC-Patienten. Eine herabregulierte Transkriptionsfähigkeit des aktivierten VDR-Komplexes korrelierte mit einem verkürzten progressionsfreien Überleben. Die geringe Größe der Studienpopulation verhinderte jedoch eine signifikante Aussage (Arai et al., 1997; Hama et al., 2011).

Vitamin D scheint darüber hinaus antiangiogene Eigenschaften zu besitzen, indem es NF- κ B und HBp17/FGFBP-1-Signalkaskaden hemmt (Rosli et al., 2013). Zudem gibt es Anzeichen dafür, dass Vitamin D die Sensitivität von HNSCCs gegenüber Immuntherapeutika erhöht, bspw. gegenüber dem

selektiven Tyrosinkinase-Inhibitor des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) Erlotinib (Bothwell et al., 2015).

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die Forschung im Bereich des Kopf-Hals-Karzinoms in den vergangenen Jahren signifikante Fortschritte erzielt hat. Dies betrifft insbesondere das Verständnis der molekularen Mechanismen sowie Umweltfaktoren, die zur Entstehung und Progression dieser Tumorart beitragen. Unter den verschiedenen Faktoren, die untersucht wurden, zeigt Vitamin D eine vielversprechende Rolle in der Beeinflussung von HNSCCs. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass der VDR in den Zellen des Kopf-Hals-Gewebes vorhanden ist und eine regulierende Funktion bei verschiedenen zellulären Prozessen ausübt, darunter Zellzyklusregulation, Zellproliferation und Apoptose. Eine unzureichende Vitamin-D-Versorgung wurde mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von HNSCCs sowie mit einer schlechteren Prognose für die betroffenen Patienten in Verbindung gebracht. Darüber hinaus deuten präklinische Studien darauf hin, dass Vitamin D durch seine immunmodulatorischen Eigenschaften das Tumorwachstum hemmen und die Sensitivität gegenüber Therapien erhöhen könnte. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass Vitamin D eine Rolle bei der Hemmung der Invasion und Metastasierung von HNSCCs spielen könnte. Dennoch sind weitere klinische Studien erforderlich, um die genauen Mechanismen und den potenziellen therapeutischen Nutzen von Vitamin D bei HNSCCs zu klären. Es ist wichtig zu beachten, dass die Wirkung von Vitamin D auf HNSCCs im Kontext verschiedener Einflussfaktoren zu betrachten ist, darunter genetische Variationen, Umweltfaktoren und der individuelle Vitamin D-Status.

2.4 Fragestellung

Die aktuelle Forschung identifiziert vielversprechende Ansätze für die Bedeutung von Vitamin D in Bezug auf das Kopf-Hals-Karzinom. Um die genauen Zusammenhänge zu verstehen und potenzielle therapeutische Anwendungen zu entwickeln, sind jedoch weitere Untersuchungen zwingend erforderlich.

Das Ziel dieser Dissertation besteht in der Schaffung einer verbesserten Datenlage hinsichtlich der spezifischen Auswirkungen von Vitamin D auf die Tumorzellen des Kopf-Hals-Karzinoms. Im Fokus steht dabei, inwiefern Vitamin D direkt auf Tumorzellen Einfluss nimmt. Die Erfassung dieser Effekte wird dazu beitragen, das Verständnis der Wechselwirkung zwischen Vitamin D und HNSCCs sowie der Differenzierung der direkten und indirekten (bspw. über Immunmodulation) generierten Wirkungen von Vitamin D zu vertiefen. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Dissertation liegt auf der Bestimmung der optimalen Vitamin-D-Konzentration, die erforderlich ist, um einen signifikanten Einfluss auf die Proliferations- und Migrationsfähigkeit von HNSCC-Zellen zu erzielen. Dabei soll eruiert werden, ob bestimmte Dosierungen von Vitamin D für eine effektive Tumorchemmung erforderlich sind.

Die Dissertation strebt an, Einblicke in die komplexen Interaktionen zwischen Vitamin D und Tumorzellen zu gewinnen, die Grundlagen für innovative Strategien zur gezielten Beeinflussung der

Einleitung

Proliferations- und Migrationsfähigkeit dieser Tumoren zu schaffen und einen Beitrag zur Weiterentwicklung von präzisen Therapieansätzen für HNSCCs zu leisten. Des Weiteren zielt diese Arbeit darauf ab, das Verständnis für die potenzielle Bedeutung von Vitamin D als prädiktiven Marker für das Therapieansprechen bei HNSCC-Patienten zu vertiefen und somit zu einem individualisierten Therapieansatz beizutragen. Dadurch könnten unnötige Therapien vermieden und die Wirksamkeit der Behandlung für diejenigen, die am wahrscheinlichsten davon profitieren, maximiert werden.

3. Material und Methodik

3.1 Material und Herstellernachweis

3.1.1 Geräte und Software

Die im Rahmen der durchgeführten Versuche verwendeten Geräte und Software sind in der nachfolgenden Tabelle 1 zusammen mit dem Herstellernachweis aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Software unter Angabe des Herstellers

Beschreibung	Hersteller/Herkunft
Carl Zeiss Invertoscope Inverted Microscope	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Chemostar ECL & Fluorescence Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Durchlichtmikroskop, 4316184	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Electrophoresis Power Supply – EPS 601	GE Healthcare, IL, USA
Forma™ Series II 3110 CO ₂ -Inkubatoren	Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA
Hamilton® syringe, 710N, volume 100 µl, ga22s, 51 mm/pts2	80600/00, Hamilton Central Europe S.R.L., Ghiroda, Rumänien
ImageJ Software	https://imagej.net/ij/ , 22.04.2025
Invitrogen™ Countness™ Automated Cell Counter	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
LUNA™ Automated Cell Counter L10001	Logos Biosystems, Annandale, Virginia, USA
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Nikon Digital Sight	Nikon Corporation, Tokio, Japan
Nikon HB-10101AF Super High Pressure Mercury Lamp Power Supply	Nikon Corporation, Tokio, Japan
Nikon Inverted Microscope Eclipse TE-2000-S	Nikon Corporation, Tokio, Japan
Nikon NIS-Elements Software	Nikon Corporation, Tokio, Japan

Nikon transmission-light source	Nikon Corporation, Tokio, Japan
Pipetboy acu	Integra Biosciences, Biebertal, Deutschland
Thermos shaker TS-100	Biosan, Riga, Lettland
Tischzentrifuge (Centrifuge 5415)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex-Mixer (Genie2TM)	Scientific Industries, Bohemie New York, USA
Wärmeschrank, Incucell	MMM, Medcenter Einrichtungen GmbH, Planegg, Deutschland
Wasserbad, Medax Typ WB24	Medax Nagel GmbH, Kiel, Deutschland
xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) Single Plate (SP)	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
xCELLigence RTCA Software, Version 2.0	Acea Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die im Rahmen der durchgeführten Versuche verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in der nachfolgenden Tabelle 2 zusammen mit dem Herstellernachweis aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien unter Angabe des Herstellers

Beschreibung	Hersteller/Herkunft
24 Well Cell Culture Multiwell Plate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-Well-E-Plate	Acea Biosciences Inc./Roche, San Diego, CA, USA
CELLSTAR® K75, K175 Zellkultur-Flaschen	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Corning® FluoroBlok™ Cell Culture Insert System	Corning B.V. Life Science, Amsterdam, Niederlande
CryoPure Tube 1,8 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Falcon Gefäße (15 ml, 50 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Gilson-Pipetten	Abimed, Düsseldorf, Deutschland
Invitrogen™ Countness™ Automated Cell Counter Slides	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

LUNA™ Cell Counting Slides L12001	Logos Biosystems, Annandale, Virginia, USA
Neubauerzellzählkammer	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Objektträger	R. Langenbrinck GmbH Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Pasteur-Pipetten	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Petrischale 6cm	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Puderfreie, medizinische Nitrileinmalhandschuhe	Abena A/S, Aabenraa, Dänemark
Reagenzien Reservoir 30 ml	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 20 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Whatman FP30/0.2 CA-S rotrand (0.2 µm)	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland

3.1.3 Chemikalien

Die im Rahmen der durchgeführten Versuche verwendeten Chemikalien sind in der nachfolgenden Tabelle 3 zusammen mit dem Herstellernachweis aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien unter Angabe des Herstellers

Beschreibung	Hersteller/Herkunft
1,25-Dihydroxyvitamin D3; Art. D1530-1MG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Aqua destillata (dest.)	
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Material und Methodik

Dithiothreitol	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) GlutaMAX™	GIBCO® Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS) LOT BCCB3111	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glycerin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Glycin	VWR International, Radnor, PA, USA
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Magermilchpulver Serva	42590.01; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Methanol (MeOH)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	2438-1KG Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	20765.03; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	26616; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pepstatin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pierce™ ECL Western Blotting-Substrat	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Ponceau S	33429.01; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Protease-Inhibitor Mix M	39102.01; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

Proteinmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Radioimmunoprecipitation-Assay-Puffer (RIPA)	39244.02; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
TGX Stain-Free Fast Cast Kit 10 % (1610183)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Trisaminomethan (TRIS)/Chlorwasserstoff (HCl)	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trisaminomethan (TRIS)-Base (Trizma® Base)	T1503-1KG; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trisaminomethan (TRIS)-Hydrochlorid	9090.2; CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Invitrogen™ Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Deutschland

3.1.4 Zelllinie

Die im Rahmen der durchgeführten Versuche verwendete Zelllinie ist in der nachfolgenden Tabelle 4 zusammen mit dem Herstellernachweis aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Zelllinie unter Angabe des Herstellers

Beschreibung	Hersteller/Herkunft
UM-SCC-1; Art. SCC070	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Die Zelllinie UM-SCC-1 ist als Modell für Noxen-assoziierte HNSCCs herangezogen worden, da diese Subgruppe der HNSCCs eine ungünstige Prognose aufweist und weniger empfindlich auf vorhandene Therapien reagiert. Die Verwendung dieser spezifischen Zelllinie zielt darauf ab, Erkenntnisse zu gewinnen, die auf klinische Relevanz und potenzielle therapeutische Ansätze für eine besonders herausfordernde HNSCC-Subpopulation hinweisen. Zudem wurden in der Arbeitsgruppe bereits *in-vivo* Modelle mit dieser Zelllinie etabliert, so dass eine direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf und eine Überprüfung der Ergebnisse in Tierversuche möglich ist.

3.1.5 Antikörper

Die im Rahmen der durchgeführten Versuche verwendeten Antikörper sind in der nachfolgenden Tabelle 5 zusammen mit dem Herstellernachweis aufgelistet.

Tabelle 5: Verwendete Antikörper unter Angabe des Herstellers

Beschreibung	Hersteller/Herkunft
VDR-Antikörper	ab109234; Abcam, Cambridge, UK
β -Aktin-Antikörper	A5441_2ML; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

3.2 Zellkultur

3.2.1 UM-SCC-1 Zelllinie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die HNSCC-Zelllinie UM-SCC-1 (Sigma-Aldrich, Bestellnummer: SCC070) verwendet. Die Zellen wurden aus einem Plattenepithelkarzinom des Mundbodens eines zuvor chirurgisch und strahlentherapeutisch behandelten 73-jährigen Patienten isoliert. Sie wurden im Labor von Dr. Thomas Carey an der Universität von Michigan gewonnen und mittels *short-tandem-repeats* (STR)-Analyse genotypisiert. Die Zellen sind für HPV-16, HPV-18, Hepatitis A/B/C, HIV-1 und HIV-2 negativ und wurden negativ auf Mykoplasmen getestet (Datenblatt von Merck, abrufbar unter <https://www.merckmillipore.com/DE/de>, 22.04.2025). Die Zelllinie wurde unmittelbar vor Beginn der experimentellen Arbeiten im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit vom Hersteller bezogen, sodass auf eine erneute Authentifizierung mittels STR-Analyse verzichtet wurde.

3.2.2 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden in einem Zellkulturmedium bestehend aus Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle's Kulturmedium (DMEM) mit GlutaMAX™ Supplement, versetzt mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FKS) und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin Antibiotikallösung (P/S), in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Zellwachstumsfläche kultiviert. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 5 % (v/v) CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % im Brutschrank. Die Zellen wurden nach dem Auftauen zunächst für 1,5 Wochen in Kultur gehalten, sodass sie sich in ihrem Metabolismus akklimatisieren konnten, bevor sie in den Versuch genommen wurden. Die maximale Kulturdauer betrug 6 Wochen. Die Arbeiten wurden unter Sterilwerkbänken ausgeführt.

3.2.3 Passagieren

Die Zellen wurden alle 3 bis 4 Tage ab Erreichen einer Konfluenz von mindestens 90 % subpassagiert. Dazu wurde zunächst das Medium entfernt und eine mit Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) zur

Spülung der Zellen eingesetzt. Die enzymatische Ablösung der adhären Zellen erfolgte durch Bedecken mit 1 ml einer auf 37 °C vorgewärmten Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung und Inkubation für circa (ca.) 10 min im Brutschrank. Im Anschluss wurde die Trypsin-vermittelte Dissoziation mit einem drei- bis fünffachen Anteil an FKS-haltigem Kulturmedium gestoppt. Nachfolgend wurden die Zellen zur mechanischen Vereinzelung mehrfach resuspendiert und nach entsprechend gewünschtem Passagierverhältnis neu ausgesät. Im Anschluss wurde die Zellkulturflasche mit frischem, auf 37 °C vorgewärmtem Kulturmedium auf etwa 15 ml Endvolumen aufgefüllt.

3.2.4 Zellzählung

Die Zellen wurden zunächst durch die enzymatische Wirkung von Trypsin abgelöst (siehe Kapitel 3.2.3). Nach Beendigung der Reaktion durch Zugabe von FKS-haltigem Kulturmedium wurden 10 µl Zellsuspension und 10 µl Trypanblau miteinander vermischt und 10 µl dieser Mischung in eine Einwegzählkammer (Luna™ Cell Counting Slides oder Invitrogen™ Countness™ Automated Cell Counter Slides) pipettiert. Die folgende Zellzählung erfolgte je nach Verfügbarkeit durch den Luna™ Automated Cell Counter oder den Invitrogen™ Countness™ Automated Cell Counter. Die Zellzählgeräte gaben die Gesamtzahl, die Anzahl an toten und lebenden Zellen sowie die Vitalität an.

Standen beide Zellzählgeräte nicht zur Verfügung, wurde die Neubauerzählkammer verwendet. Hierzu wurden ebenfalls 10 µl des oben genannten Reaktionsgemisches aus Zellsuspension und Trypanblau in die Neubauerzählkammer pipettiert. Da Trypanblau nur von abgestorbenen oder perforierten Zellen aufgenommen wird, konnte so, unter Berücksichtigung der Verdünnung, lichtmikroskopisch der prozentuale Anteil von ungefärbten und damit lebenden Zellen ermittelt werden. Die lebenden Zellen wurden in allen 4 Quadranten gezählt und die Summe durch 64 geteilt, um die mittlere Zellzahl pro 25 cm² zu ermitteln. Für die Berechnung der Zellzahl x 10³ pro ml wurde die mittlere Zellzahl/25 cm² mit 160 und aufgrund der Verdünnung nochmal mit 2 multipliziert.

3.2.5 Kryokonservierung und Auftauen

Um einen Erhalt der kultivierten Zellen für das Labor dauerhaft sicherzustellen, wurden im Verlauf Zellen kryokonserviert und bei Bedarf wieder aufgetaut.

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst abgeerntet und gezählt (siehe Kapitel 3.2.4). Daraufhin wurden 2-4x10⁶ Zellen bei 2000 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das übrig gebliebene Zellpellet in 500 µl DMEM mit GlutaMAX™ Supplement, versetzt mit 40 % (v/v) FKS und 1 % (v/v) P/S, gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 2 ml Kryoröhrchen überführt und mit 500 µl DMEM mit GlutaMAX™ Supplement, versetzt mit 20 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO), gemischt. DMSO vermindert die Bildung von Eiskristallen und Dehydrierung der Zellen und damit die mechanische Zerstörung der Zellen beim Einfrierprozess. Im nächsten Schritt wurde die Zellsuspension zunächst in einem mit 99,9 % Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter für 1 h bei -20 °C gekühlt und

anschließend für 24 h bei -80 °C aufbewahrt. Im Anschluss wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die kryokonservierten Zellen in einem 37 °C warmen Wasserbad für ca. 30 s aufgetaut und anschließend in 5 ml, auf 37 °C temperiertes Kulturmedium überführt. Daraufhin wurde die Zellsuspension bei 1300 rpm für 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Auflösung des Zellpellet in 1 ml Kulturmedium wurde die Zellsuspension in eine vorbereitete 75 cm² Zellkulturflasche mit 15 ml Kulturmedium übertragen. Die Zellen wurden frühestens 10 Tage nach Auftauen für die Versuche verwendet.

3.2.6 Calcitriol-Behandlung

Die Zellen wurden sowohl für 4 als auch für 7 Tage in verschiedenen Konzentrationen mit in DMSO gelöstem Calcitriol behandelt.

Hierfür wurden 650.000 lebende Zellen in 6 cm Petrischalen ausgesät und das Gesamtvolumen mithilfe von Kulturmedium auf 4 ml aufgefüllt. Nun wurden 4 µl DMSO bzw. in DMSO gelöstes Calcitriol in der entsprechenden Konzentration der jeweiligen Interventionsgruppe hinzugefügt, sodass die DMSO-Gesamtkonzentration nicht 0,1 % (v/v) überstieg. Dies war erforderlich, um einen durch DMSO verursachten Effekt auf die Zellbiologie zu vermeiden.

Das Medium wurde alle 24 h gewechselt. Das Calcitriol wurde lichtgeschützt gelagert. Die Behandlung erfolgte vor der Durchführung des Proliferations- und Migrationsassays.

3.2.7 Proliferationsassay

Die Proliferationsfähigkeit wurde durch das *xCELLigence Real-Time Cell Analysis* (RTCA) *Single Plate* (SP) System (Acea Biosciences Inc./Roche, San Diego, CA, USA) analysiert. Hierbei handelt es sich um einen Echtzeit-Biosensor, der mithilfe von Goldelektroden auf dem Boden einer speziell entwickelten *96-Well-E-Plate* die Zelladhäsion misst (siehe Abb. 9). Das Anheften der Zellen an der Plattenoberfläche führt zu einer Beeinflussung der elektrischen Impedanz. Diese wird von der RTCA-Software gemessen und die Werte werden in einen einheitslosen Parameter namens Zell-Index (Zell-Index = (Impedanz zum Zeitpunkt n - Impedanz in Abwesenheit von Zellen) / Nominalimpedanzwert) umgewandelt. Eine Erhöhung der Impedanz durch steigende Zelladhäsion geht mit einer Steigerung des Zell-Index einher. Dies kann zum Einen durch eine Änderung der Zellzahl oder aber der Zellmorphologie bedingt sein (Kho et al., 2015). Die weitere Datenanalyse erfolgte über die RTCA-Software (Version 2.0, Acea Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA).

Cellular Impedance

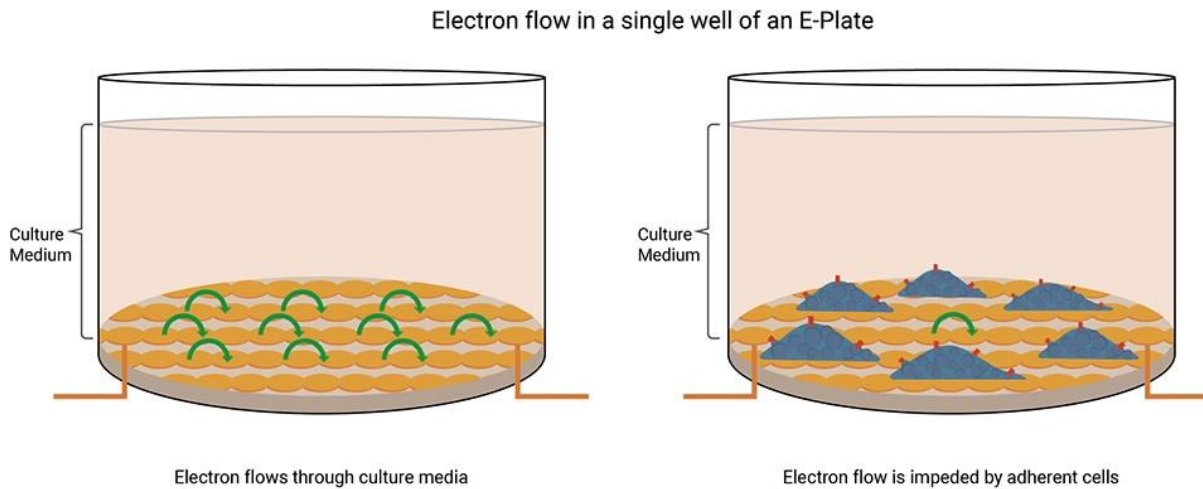


Abb. 9: Schematische Darstellung des *xCELLigence* RTCA SP Systems. Dieses System ist ein Instrument zur Messung der Zellproliferation in Echtzeit. Es basiert auf der Impedanzmessung und ermöglicht eine kontinuierliche Überwachung der Zellaktivität in einem Kulturgefäß. Durch die Verwendung von Elektroden auf dem Boden der Kulturgefäße kann das *xCELLigence* System Änderungen des elektrischen Widerstands erfassen, der auf eine gesteigerte Zellproliferation schließen lässt (modifiziert aus <https://www.agilent.com/en/product/cell-analysis/real-time-cell-analysis/rtca-analyzers/xcelligence-rtca-sp-single-plate-741232>, 15.08.2024).

Im Rahmen des Assays wurden die Zellen zunächst mithilfe von Trypsin abgeerntet und gezählt (siehe Kapitel 3.2.4). Anschließend wurden jeweils 75.000 lebende Zellen mit 1,5 µl DMSO bzw. in DMSO gelöstem Calcitriol versetzt und das Gesamtvolumen unter Verwendung von Kulturmedium auf 500 µl aufgefüllt mit dem Ziel den Effekt der vorangegangenen Calcitriol-Behandlung möglichst lange zu erhalten.

Nun wurde jedes Well einer *96-Well-E-Plate* mit 100 µl Kulturmedium befüllt und nach der Leermessung 50 µl Zellsuspension hinzugefügt. Die Zellen sinken nach der Aussaat zunächst langsam ab und haften sich an den Boden der *96-Well-E-Plate* an. Für diesen Prozess wurde die *96-Well-E-Plate* vor dem Messbeginn in der *xCELLigence* RTCA SP Station für 30 min auf einer, auf 37 °C vorgewärmten und mit Wasser gefüllten Kulturflasche äquilibriert. Nach Messbeginn wurde der Zellindex jedes Wells alle 15 min gemessen. Die Versuchsdauer betrug eine Woche, sodass insgesamt 672 Messwerte des Zell-Index pro Well und Versuch resultierten. Je Bedingung (Konzentration sowie Behandlungsdauer) wurden jeweils sechs technische Replikate pro Assay erstellt. Nach dem Start der Messungen wurde das Medium und somit auch das Calcitriol nicht mehr erneuert. Dies ist aufgrund der Messempfindlichkeit des Geräts und des Versuchsaufbaus nicht anders umsetzbar.

3.2.8 Migrationsassay

Die Migrationsfähigkeit der Zellen wurde mittels eines Trans-well-Migrationsassays nach dem Boyden-Chamber-Prinzip (Boyden & Ph, 1962) untersucht. Dazu wurde das *Corning® FluoroBlok™ Cell Culture Insert System* (8 µm Poren) verwendet. Der Aufbau dieses Systems basiert, wie in Abb. 10 dargestellt, auf zwei durch eine mikroporöse Membran getrennten Kammern, wobei eine Kammer die Zellsuspension enthält und die andere Kammer eine mit Medium und einem Chemoattraktivum befüllt ist. Um einen Anreiz für die gerichtete Migration zu erzeugen, wird zwischen der oberen und der unteren Kammer ein Konzentrationsgradient eines Chemoattraktivums erzeugt (z. B. FKS) (Mastyugin et al., 2004). Die Zellen migrieren entlang dieses FKS-Gradienten durch die 8 µm großen Poren der Membran. An der Unterseite der Membran werden die Zellen nach einer zuvor etablierten Zeit, in diesem Versuch 72 h, fixiert, gefärbt und quantifiziert.

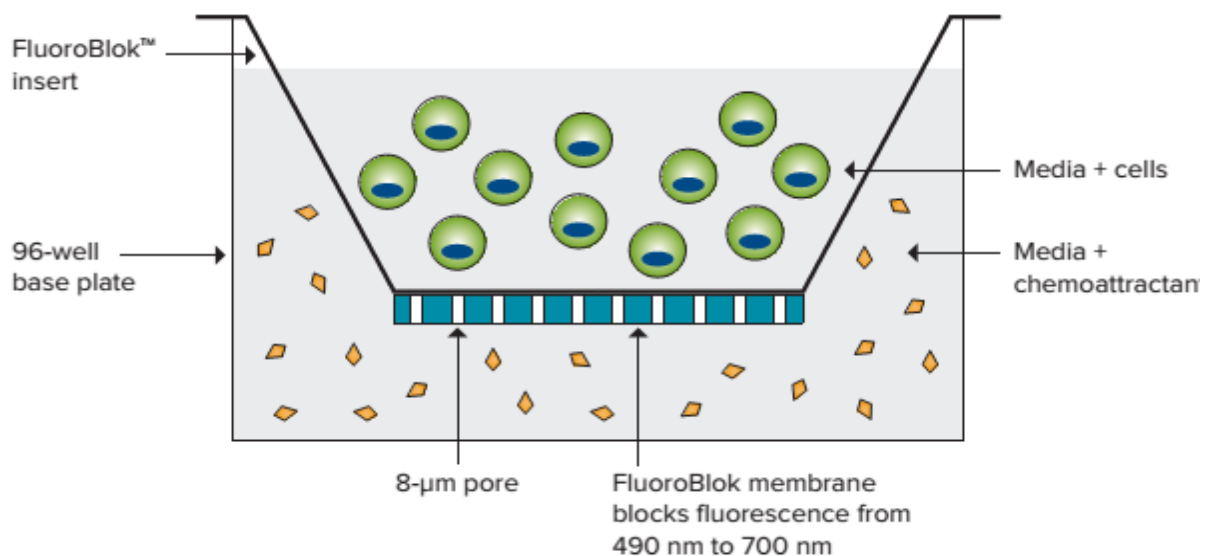


Abb. 10: Schematische Darstellung des Corning FluoroBlok Cell Culture Insert Systems. Dieses System ermöglicht die Untersuchung der Zellmigration und -invasion *in-vitro*. Es besteht aus transparenten Membraneinsätzen, die in speziellen Zellkulturplatten platziert werden. Die Membranen sind mit 8 µm Poren versehen, die den Durchtritt von Zellen ermöglichen. Während der Zellmigration durch die Poren der Membran wandern die Zellen in Richtung einer chemotaktischen Quelle. Nach dem Prozess der Migration können die durch die Poren gewanderten Zellen durch einen Fluoreszenzfarbstoff (DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindol) auf der Unterseite der Membran sichtbar gemacht und somit detektiert werden (modifiziert aus <https://www.moleculardevices.com/en/assets/app-note/br/evaluate-cell-migration-with-fluoroblok-inserts-on-the-spectramax-minimax-cytometer#gre>, 15.08.2024).

Für den Migrationsassay wurden jeweils 200.000 Zellen bei 3.000 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das verbliebene Zellpellet in 1,2 ml Migrationskulturmedium (entspricht DMEM mit GlutaMAX™ Supplement, versetzt mit 1 % FKS (v/v) – „Mangelmedium“) resuspendiert. Im Anschluss wurde eine 24-Well Companion Zellkulturplatte vorbereitet, indem jedes Well mit 1,4 ml Kulturmedium (10 % FKS – „Anreizmedium“) befüllt wurde und die Zellkultur-Einsätze platziert wurden. Nach ausgiebigem Mischen wurden jeweils 300 µl der Zellsuspensionen in die Einsätze hinein pipettiert und nachfolgend mit Mangelmedium (1 % FKS) auf 500 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Um

eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu gewährleisten, wurde die Platte in langsamen, liegenden achtförmigen Bewegungen geschwenkt. Nun wurde die Zellkulturplatte für 72 h unter Kulturbedingungen (siehe Kapitel 3.2.2) inkubiert.

Nach 72 h wurde der Assay gestoppt. Dazu wurde zunächst das Medium vollständig entfernt und die Zellkultur-Einsätze mit PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurde das PBS erneut entfernt und die Einsätze in jeweils -20 °C kaltes Methanol getaucht und befüllt. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei -20 °C. Daraufgehend wurde das Methanol entfernt und die Inserts einem dreimaligen Waschvorgang mit PBS für jeweils 3 min unterzogen. Im Anschluss wurden die Zellkerne der fixierten Zellen mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Dafür wurden die Einsätze für 7 min in PBS, versetzt mit 0,1 % DAPI, inkubiert. Ab diesem Schritt wurde möglichst lichtgeschützt gearbeitet. Danach wurden die Einsätze erneut dreimalig für jeweils 3 min mit PBS gespült. Bis zur mikroskopischen Betrachtung wurde der Assay bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

Für die mikroskopische Analyse wurde das inverse Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE2000-S mit einer Nikon Corporation DS-5Mc Kamera (Nikon Corporation, Tokio, Japan) verwendet. Durch das Einstellen des Lichts auf eine Wellenlänge von 358 nm wurden die mit DAPI gefärbten Zellkerne detektierbar. Die Belichtung wurde auf 333 ms festgelegt bei einfacher Lichtempfindlichkeit. Die Quantifizierung erfolgte mittels der Nis Elements Software der Nikon Corporation durch eine semiautomatisierte Zählung der gefärbten Zellkerne ab einem Äquivalentdurchmesser von 11 µm pro Gesichtsfeld. Die Software-Einstellungen „Clean“ und „Separate“ wurden auf 5x und 4x gesetzt. Die Auswertung erfolgte pro Well, wobei drei Gesichtsfelder bei einer zehnfachen Vergrößerung ausgezählt wurden. Der Mittelwert pro Well wurde für die statistische Auswertung verwendet.

Im Rahmen der Etablierung wurde durch Variieren des FKS-Konzentrationsgradienten und der Dauer des Assays eine Belegung der Poren der Membran von 60 % angestrebt.

Je Bedingung (Konzentration und Behandlungsdauer) wurden drei technische Replikate pro Assay erstellt.

3.3 Analytische Methoden der Proteinbiochemie

Zum Nachweis und zur Quantifizierung des VDR auf den UM-SCC-1 Zellen erfolgte eine Analyse mittels Western Blot. Dieser wurde mit den für 4 Tage mit DMSO sowie 60 pg/ml, 200 pg/ml und 2.000 pg/ml Calcitriol behandelten UM-SCC-1 Zellen durchgeführt (vgl. Kapitel 3.2.6). Die proteinbiochemische Analyse wurde gemeinsam mit Dr. rer. nat. Sandrina Körner (HNO-Forschungslabor, Uds) durchgeführt.

3.3.1 Aufbereitung der Zellproben zur Western Blot Analyse

5X-Lämmli-Probenpuffer: 500 mM Dithiothreitol

Material und Methodik

300 mM	Tris(hydroxymethyl)amino- methan (TRIS)/HCl, pH 6,8
0,01 % (w/v)	Bromphtonolblau
10 % (w/v)	Natriumdodecylsulfat (SDS)
50 % (v/v)	Glycerin

Die Western Blot Analyse zellulärer Proteine erfordert die Lyse der Zellen und die damit verbundene Proteinfreisetzung. Hierfür erfolgten zunächst das Abernten und Zählen der Zellen (vgl. Kapitel 3.2.4). 3×10^6 Zellen wurden bei 2.000 rpm für 3 min zentrifugiert und der Überstand anschließend entfernt. Das verbliebene Zellpellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Im nächsten Schritt erfolgte die chemische Lyse des Zellpellets. Hierbei wurden die Zellpellets aufgetaut, jedoch während des gesamten Lyseprozesses zur Vermeidung des Proteinabbaus auf Eis gehalten. Zur Verhinderung der zelleigenen enzymatischen Aktivität wurde dem Radioimmunprecipitation-Assay-Puffer (RIPA) ein Protease-Inhibitor-Mix M im Verhältnis 1:100 zugesetzt. In diesem Gemisch wurde das Zellpellet resuspendiert bis das Pellet vollständig gelöst war. Für die vollständige Lyse der Zellmembran erfolgte eine Inkubationszeit von 15 min unter ständigem Schütteln mittels eines Thermomix bei 4 °C. Im Anschluss wurde die Zellsuspension für 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um so die freigesetzten Proteine von den restlichen Zellbestandteilen, vor allem den lysierten Zellmembrantrümmern, zu trennen. Nach dieser Zellfraktionierung befanden sich die zu analysierenden Proteine im Überstand. Dieser Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und zur weiteren Auflösung der Quartär- und Tertiärstrukturen der Proteine mit 5X-Lämmli-Puffer (Laemmli, 1970) versetzt, resuspendiert und anschließend für 2 min bei 95 °C inkubiert. Der Lämmli-Puffer besteht aus Natriumdodecylsulfat (SDS) zur Denaturierung, aus Dithiothreitol als Reduktionsmittel für Disulfidgruppen, aus Glycerin zum Beschweren der Proben und aus Bromphenolblau als Farbstoff zur besseren Sichtbarkeit der Proben in der nachfolgenden Auftrennung des Proteingemisches. Darüber hinaus erfolgte in diesem Schritt die negative Beladung der Polypeptidketten durch das SDS, welche für die Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (vgl. Kapitel 3.3.2) von entscheidender Bedeutung ist. Die Eigenladungen der Polypeptide werden dadurch ausgeglichen und eine Auftrennung nach ihrem reinen Molekulargewicht kann erfolgen.

Der vollständige Lysepuffer bestand somit aus 80 % RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitor und 20 % 5X-Lämmli-Puffer. Bis zur weiteren Nutzung wurde die Proteinlösung bei -20 °C gelagert.

3.3.2 Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

<u>SDS-Laufpuffer (Elektrodenpuffer):</u>	0,25 M (w/v)	TRIS-Base
	1,924 M (w/v)	Glycin

0,03 M (w/v) SDS

Die SDS-PAGE stellt ein analytisches Verfahren zur Auftrennung von Proteinen oder Proteinfragmenten nach ihrer molekularen Masse dar. Die Trennung erfolgt in einem Polyacrylamidgel durch den Anschluss an ein elektrisches Spannungsfeld. Voraussetzung ist eine einheitlich negative Beladung der Proteine mittels SDS, welches an die Polypeptidketten bindet und die intrinsische Eigenladung der Proteine ausgleicht. Die negative Ladung korreliert mit dem Molekulargewicht der Proteine, sodass nach Anschluss an eine Spannungsquelle größere und damit vermehrt negativ geladene Proteine langsamer und weniger weit und kleinere weniger negativ geladene Proteine schneller und weiter in der Trennmatrix vom Minus- zum Pluspol wandern.

Der SDS-Laufpuffer wurde nach der oben beschriebenen Zusammensetzung angesetzt. Für die Herstellung der Polyacrylamidgele wurde das TGX Stain-Free Fast Cast Kit 10 % (1610183) von Bio-Rad verwendet. Anschließend wurde die Elektrophoresekammer zusammengesetzt. Die inneren und äußeren Pufferkammern wurden mit dem Laufpuffer befüllt. Jede Geltasche wurde nach vorheriger Spülung mittels einer Hamiltonpipette mit 100.000 Zellen beladen. Für eine klare Zuordnung der Proteinbanden wurde neben den Proben ein Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) mit aufgetragen. Die Range des Molekulargewichts der enthaltenen Proteine dieses Markers beträgt 15 und 180 kDa. Anschließend wurde die Elektrophoresekammer an eine Spannungsquelle bei 150-180 V für ca. 60 min angeschlossen.

3.3.3 Elektrotransfer von Proteinen auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Western Blot)

<u>Transferpuffer:</u>	1,45 g → 0,05 M (w/v)	Tris-Base
	0,7 g → 0,04 M (w/v)	Glycin
	37,5 ml → 15 % (v/v)	Methanol (MeOH)
	250 µl → 10% (v/v)	SDS
	Ad 250 ml Aqua destillata (dest.)	

Zur Vorbereitung für die immunologische Detektion der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden diese auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) bestehende Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm in semi-dry Technik transferiert. Hierzu wurde ein Sandwich bestehend aus 2 Schichten Filterpapier, das mit Transferpuffer getränkt ist, der zuvor durch Methanol (MeOH) aktivierten und in Transferpuffer äquilibrierten PDVF-Membran, dem SDS-PAGE und nochmals 2 Schichten Filterpapier gebildet. Dieses Sandwich befindet sich zwischen zwei Elektrodenplatten, an die Strom angelegt wurde, sodass die sich im SDS-PAGE befindlichen Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Membran übertragen wurden (vgl. Abb. 11). Der angelegte Strom ist abhängig von der Membrangröße (9 cm x 6 cm = 54 cm², entsprechend 54 mA/h). Der Transferprozess dauert ca. 1 h.

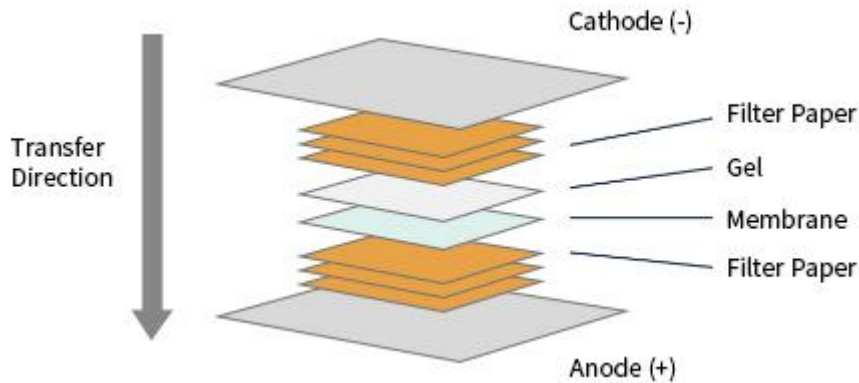


Abb. 11: Schematische Darstellung des Elektrotransfers von Proteinen auf eine PVDF-Membran. Durch das elektrische Feld wandern die negativ geladenen Proteine aus dem Gel in Richtung der positiv geladenen Anode und binden die hydrophobe Membranoberfläche (modifiziert aus <https://www.sinobiological.com/category/wb-semi-dry-transfer>, 10.03.2025)

3.3.4 Immunologische Proteindetektion

Die immunologische Proteindetektion erfolgte zur Darstellung der zuvor aufgetrennten und auf eine PVDF-Membran übertragenen Proteine (vgl. Kapitel 3.3.3). Hierfür erfolgte zunächst die Färbung aller Proteinbanden durch die Ponceau-S-Färbung. Die Membran mit den übertragenen Proteinen wurde mit Ponceau S bedeckt und für 20 s leicht geschwenkt. Im Anschluss wurde die Membran mehrmals mit Aqua destillata (dest.) gespült, bis die einzelnen Banden sichtbar wurden. Zur Vermeidung von unspezifischen Antikörper-Bindungen an freie Bindungsstellen der Membran selbst, wurde diese geblockt. Dafür wurde eine 5 % Milch-TRIS-gepufferte-Salzlösung (TBS)-Lösung hergestellt (2,5 g Magermilchpulver Serva in 50 ml TBS) und die Membran für mindestens 30 min mit dieser Lösung inkubiert.

Für den Nachweis des VDR nutzten wir die immunologische Detektion unter Verwendung eines für VDR spezifischen primären Antikörpers, der wiederum durch einen spezies-spezifischen sekundären Antikörper detektiert wurde. Der primäre Antikörper bindet hierbei direkt an das nachzuweisende Protein, während der sekundäre Antikörper daraufhin mit diesem primären Antikörper interagiert, um ein optisches Signal zu erzeugen. Dies gelingt durch das Enzym Meerrettichperoxidase (engl. Horseradish Peroxidase, HRP), welches an dem sekundären Antikörper gekoppelt ist und unter Verwendung des zugehörigen Substrats eine Chemilumineszenz katalysiert. So kann das Zielprotein indirekt nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wurde das Protein β -Aktin unter Verwendung der entsprechenden Antikörper nachgewiesen. Man geht davon aus, dass dieses Protein in jeder Zelle gleichermaßen vorhanden ist, unabhängig einer potenziell vorausgegangenen Behandlung der Zellen. β -Aktin dient daher als interne Ladekontrolle (sogenanntes „Housekeeping-Protein“).

Der primäre Antikörper gegen VDR wurden mit 15 ml 5 % Milch-TBS im Verhältnis 1:1.000, der primäre Antikörper gegen β -Aktin 1:5.000 verdünnt und anschließend auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Membran für jeweils 5 min mit TBS, zweimal mit TBS-Tween (TBS-T) und abschließend erneut mit TBS gewaschen. Der HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper wurde hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 60 min inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Waschung nach den schon oben genannten Schritten. Die Membran wurde im Anschluss direkt mit der entsprechenden HRP-Substratlösung (Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrat, #32132, Thermo Scientific) überschichtet und mittels Chemielumineszenz-Detektion analysiert. Hier wurde der Chemostar ECL & Fluorescence Imager von Intas Science Imaging Instruments GmbH (Göttingen) verwendet. Es wurden insgesamt drei biologische Replikate erstellt. Anschließend wurde jedes detektierte Signal mit der Software ImageJ (<https://imagej.net/ij/>, 22.04.2025; Schindelin et al., 2009) dreimal quantifiziert und der Mittelwert aus allen Werten berechnet. Die Mittelwerte wurden für die weiteren statistischen Analysen verwendet. Um Schwankungen in der Beladung der Geltaschen zu überprüfen, wurde die Ponceau-Färbung ebenfalls ausgewertet und mit den VDR-Ergebnissen verglichen.

3.4 Statistik

Die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen in den Migrations- und Proliferationsanalysen erfolgte mittels Microsoft Excel 2019. Für die statistischen Analysen wurde das Programm GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) unter Vorgabe eines Signifikanzniveaus von 5 % ($\alpha=0,05$) und einer statistischen Power von 80 % ($\beta=0,8$) verwendet. Die Überprüfung der Daten auf eine Normalverteilung erfolgte mittels Shapiro-Wilk-Tests, wobei bei einer Anzahl von mehr als vier Werten zusätzlich der Kolmogorov-Smirnov-Test zum Einsatz kam. Im Rahmen der Gesamtauswertung wurden darüber hinaus der Anderson-Darling-Test sowie der D'Agostino & Pearson-Test durchgeführt. Die Voraussetzung der Normalverteilung war erfüllt, wenn drei der vier Tests auf eine Normalverteilung hinwiesen. Sofern die Voraussetzung einer Normalverteilung erfüllt war, erfolgte zum Vergleich der Mittelwerte mehrerer unverbundener Stichproben in den Migrations- und Proliferationsassays der ANOVA-Test (Varianzanalyse). Darüber hinaus wurden die einzelnen Behandlungsgruppen mittels t-Tests direkt miteinander verglichen. Im Falle einer nicht gegebenen Normalverteilung wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Zur statistischen Analyse der Western Blots wurde das Verhältnis des Signals VDR zum Signal von β -Aktin mittels der zuvor errechneten Mittelwerte berechnet.

4. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Calcitriol auf die Proliferations- und Migrationsfähigkeit humaner HNSCC Zelllinien untersucht. Die Versuche wurden *in-vitro* durchgeführt. Im Nachfolgenden werden zunächst die Versuche zum Proliferationsverhalten und anschließend die Versuche zum Migrationsverhalten dargestellt.

4.1 Untersuchungen zum Proliferationsverhalten

Das Proliferationsverhalten der UM-SCC-1 Zellen wurde bezüglich des Einflusses unterschiedlicher Calcitriol-Konzentrationen als auch unterschiedlicher Behandlungszeiträume mittels Calcitriol untersucht. Die Analyse der Proliferationsfähigkeit erfolgte durch das *xCELLigence* RTCA SP System. Für die Wirkung der variablen Konzentrationen wurden zwei physiologische (20 pg/ml und 60 pg/ml), zwei leicht bis mäßig supraphysiologische (200 pg/ml und 2.000 pg/ml) und eine deutlich supraphysiologische Konzentration (50.000 pg/ml), jeweils bezogen auf die entsprechenden Serumlevel beim Menschen, gewählt (Souberbielle et al., 2015). Um eine mögliche zeitliche Beeinflussung zu erfassen, wurde eine Behandlungsdauer von 4 und 7 Tagen unterschieden. Die Behandlung erfolgte vor der eigentlichen Durchführung des Proliferationsassays, indem das mit Calcitriol-versetzte Kulturmedium alle 24 h gewechselt wurde. Um einen Effekt dieser Calcitriol-Vorbehandlung möglichst lange zu erhalten, wurde den Zellen bei der Aussaat in die *96-Well-E-Plate* letztmalig frisches Calcitriol zugesetzt. Nach Einsetzen der *E-Plate* in das *xCELLigence* System wurde das Medium und somit auch das Calcitriol versuchsbedingt nicht mehr gewechselt.

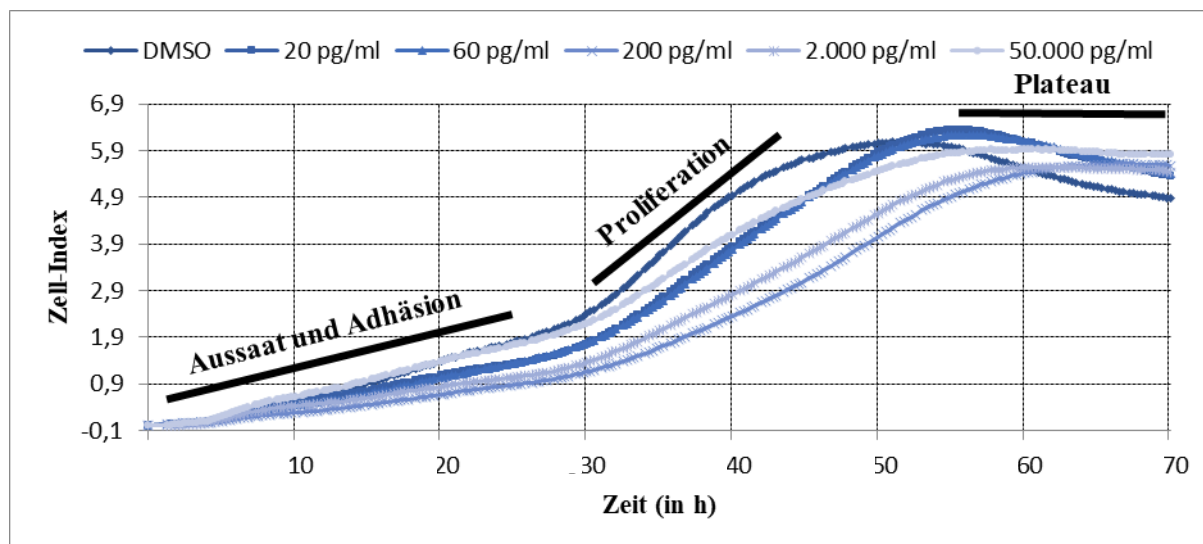


Abb. 12: Exemplarische Verlaufskurven des gemessenen Zell-Index nach viertägiger Behandlung in Abhängigkeit der Zeit in h im *xCELLigence* System. Der Zell-Index (y-Achse) ist als einheitsloser Parameter in Abhängigkeit von der Zeit (x-Achse) in h dargestellt. Nach der Aussaat kommt es zur Adhäsion an den Boden der E-Plate. Im Anschluss folgt die exponentielle Wachstumsphase (Proliferation) gefolgt von der Plateauphase. Die einzelnen Behandlungsgruppen sind durch die unterschiedlich farblichen Kurven abgebildet, die jeweilige Calcitriol-Konzentration (entspricht der Endkonzentration im Zellkulturmedium) ist in der Abbildung angegeben.

Die durch das *xCELLigence* System gemessenen Zell-Index Werte wurden durch die RTCA-Software in einem Graphen dargestellt (siehe Abb. 12). Die Zellen setzen sich zunächst nach der Aussaat auf den Boden der *96-Well-E-Plate* ab und heften sich an, ab dem Zeitpunkt des Anheftens steigt der Zellindex und kann somit Rückschlüsse auf die Proliferationsrate zulassen. Anschließend beginnt die exponentielle Wachstumsphase der Zellen, bis je nach Konzentration nach 48 h bis 144 h ein Plateau erreicht wird. Die Auswertung des Assays erfolgte in der exponentiellen Wachstumsphase (entspricht dem Bereich der linearen Steigung (Kho et al., 2015)). Hierfür wurde die lineare Steigung in dieser Phase bestimmt und gemittelt, sodass die Ergebnisse der relativen Zellproliferation entsprechen.

4.1.1 Die Proliferationsfähigkeit von UM-SCC-1 Zellen sinkt mit steigender Calcitriol-Konzentration bei viertägiger Behandlung

Die Analyse der Proliferationsfähigkeit nach viertägiger Behandlung mit Calcitriol erfolgte mittels des *xCELLigence* RTCA SP Systems. Die Verlaufskurven der gemessenen Zell-Indices sind exemplarisch in Abb. 12 dargestellt. Wie bereits in Kapitel 4.1 erläutert, erfolgte die Auswertung ausschließlich bezogen auf die exponentielle Wachstumsphase. Diese unterlag zeitlichen Schwankungen auch innerhalb der unterschiedlichen Behandlungsgruppen, sodass die Analyse-Zeiträume individuell angepasst wurden. Die gewählten Analyse-Zeiträume lagen zwischen 30 h und 151 h.

Es wurden insgesamt vier biologische Replikate mit jeweils sechs technischen Replikaten erstellt. Drei der biologischen Replikate wurden vollständig ausgewertet. Es konnte eine breite Streuung zwischen den einzelnen Assays detektiert werden. Daher wurde zunächst jeder Assay separat analysiert, sodass die Daten auf die Assay-eigene DMSO-Kontrolle bezogen wurden.

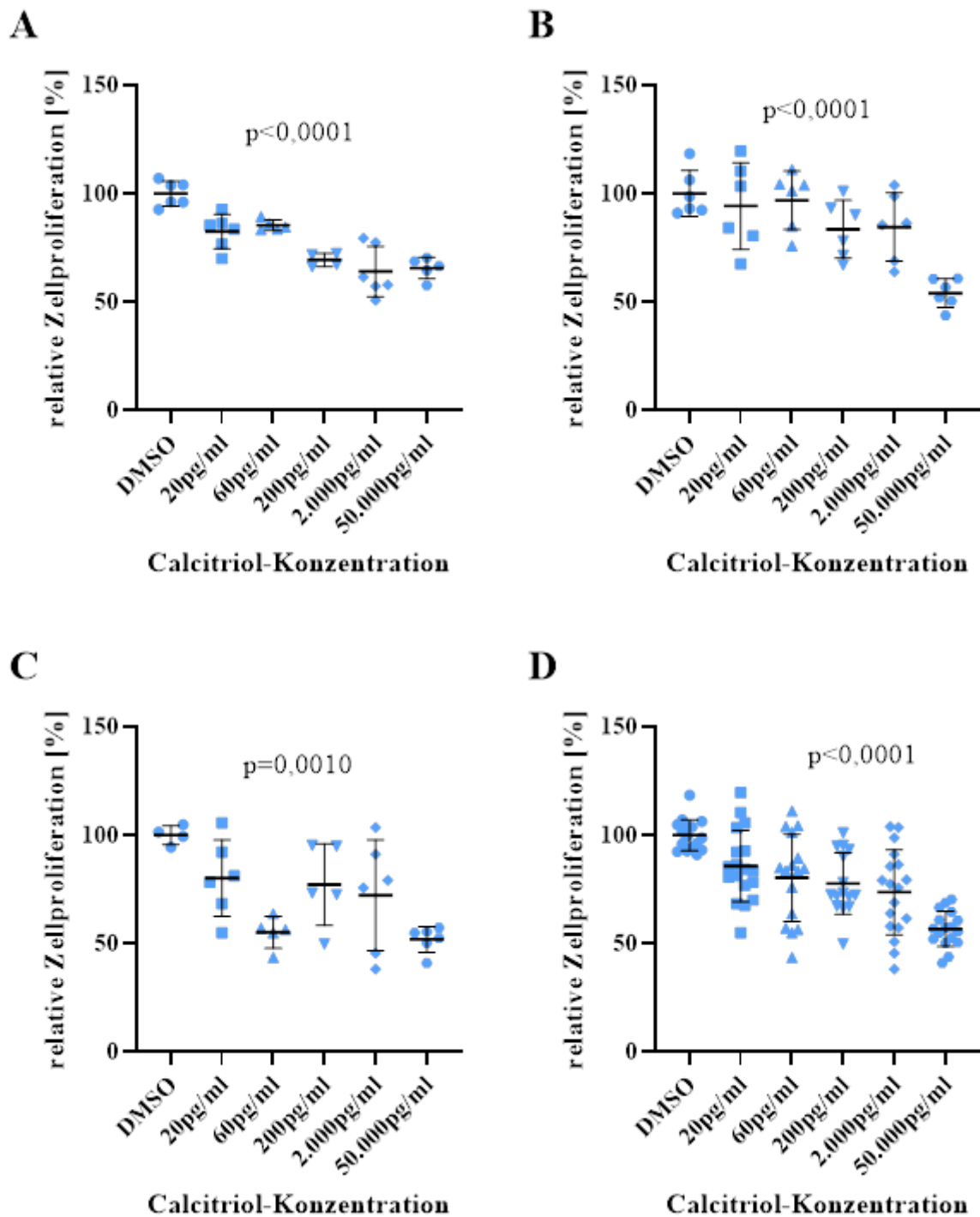


Abb. 13: Analyse der Proliferation abhängig von der Calcitriol-Konzentration bei 4 Tagen Behandlungsdauer. Die Graphen A-C stellen die einzelnen ausgewerteten biologischen Replikate dar, Graph D die Gesamtauswertung aller in A bis C gezeigten Versuche. Auf der x-Achse sind die angewendeten Konzentrationen angegeben, die y-Achse beschreibt die gemittelte Steigung der Wachstumskurve für die einzelnen Behandlungsgruppen, bezogen auf die jeweilige DMSO-Kontrolle als 100 %-Referenzwert. Die gemittelten Messwerte der einzelnen technischen Replikate (blaue Punkte), die Mittelwerte (langer schwarzer Balken) und die Standardabweichungen (Fehlerbalken) sind abgebildet. Die p-Werte der ANOVA-Analyse sind in den jeweiligen Graphen angegeben.

Nach viertägiger Applikation von Calcitriol konnte bei fortlaufenden ansteigenden Konzentrationen eine kontinuierlich zunehmende Hemmung der Proliferationsfähigkeit der UM-SCC-1 Zellen

Ergebnisse

nachgewiesen werden. Die statistische Signifikanz dieses Effektes in Bezug auf alle Konzentrationen konnte sowohl in den einzelnen Assays als auch in der Gesamtauswertung belegt werden (Abb. 13 A, B, D: $p < 0,0001$; C: $p = 0,0010$). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass durch die Applikation von 20 pg/ml bereits eine signifikante Einschränkung um 14,35 % (Standardfehler (SEM) $\pm 4,268$ %) in der Proliferationsfähigkeit der verwendeten UM-SCC-1 Zellen erzeugt werden konnte (Abb. 13 D $p = 0,0026$). Darüber hinaus ist eine nur geringe Streuung der mit DMSO und 50.000 pg/ml behandelten UM-SCC-1 Zellen gegenüber den anderen Behandlungsgruppen auffällig. Ebenso weist Graph A insgesamt eine geringere Streuung aller gemessenen Zell-Index Werte auf verglichen mit den anderen Replikaten. In der folgenden Tabelle 6 sind die statistischen Vergleiche zwischen allen einzelnen Behandlungsgruppen in allen durchgeführten Versuchen aufgeführt.

Tabelle 6: Tabellarische Übersicht der durchgeführten statistischen Tests zum Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Behandlungsgruppen nach viertägiger Calcitriol-Behandlung hinsichtlich der Proliferationsfähigkeit. Die einzelnen biologischen Replikate (A-C), sowie die Gesamtauswertung (D) sind aufgeführt. Zunächst wurde überprüft, ob eine Normalverteilung vorlag. Nachdem daraufhin der ANOVA-Test erfolgte, wurden die einzelnen Behandlungsgruppen untereinander mithilfe des t-Tests verglichen. Die Normalverteilung, sowie ein signifikanter ANOVA-Test lag bei allen biologischen Replikaten und der Gesamtauswertung vor.

Assay	Normalverteilung	ANOVA-Test ($p < 0,05$, Signifikanz, p-Wert)	Vergleich	$p < 0,05$	Signifikanz	t-Test
1. Assay (A)	ja	ja	DMSO vs. 20pg/ml	ja	**	0,0018
		****	DMSO vs. 60pg/ml	ja	***	0,0008
		$< 0,0001$	DMSO vs. 200pg/ml	ja	****	$< 0,0001$
			DMSO vs. 2.000pg/ml	ja	***	0,0002
			DMSO vs. 50.000pg/ml	ja	****	$< 0,0001$
			20pg/ml vs. 60pg/ml	nein	-	0,4238
			20pg/ml vs. 200pg/ml	ja	**	0,0084
			20pg/ml vs. 2.000pg/ml	ja	*	0,0110
			20pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	**	0,0023
			60pg/ml vs. 200pg/ml	ja	***	0,0002
			60pg/ml vs. 2.000pg/ml	ja	**	0,0056
			60pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	***	0,0002
			200pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,3256
			200pg/ml vs. 50.000pg/ml	nein	-	0,2007
			2.000pg/ml vs. 50.000pg/ml	nein	-	0,7804
2. Assay (B)	ja	ja	DMSO vs. 20pg/ml	nein	-	0,5546
		****	DMSO vs. 60pg/ml	nein	-	0,6696
		$< 0,0001$	DMSO vs. 200pg/ml	ja	*	0,0414
			DMSO vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,0799
			DMSO vs. 50.000pg/ml	ja	****	$< 0,0001$
			20pg/ml vs. 60pg/ml	nein	-	0,7956

Ergebnisse

			20pg/ml vs. 200pg/ml	nein	-	0,3040
			20pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,3742
			20pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	**	0,0033
			60pg/ml vs. 200pg/ml	nein	-	0,1156
			60pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,1775
			60pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	***	0,0002
			200pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,9068
			200pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	**	0,0017
			2.000pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	**	0,0037
3. Assay (C)	ja	ja	DMSO vs. 20pg/ml	ja	*	0,0399
		***	DMSO vs. 60pg/ml	ja	****	<0,0001
		0,001	DMSO vs. 200pg/ml	nein	-	0,0525
			DMSO vs. 2.000pg/ml	ja	*	0,0442
			DMSO vs. 50.000pg/ml	ja	****	<0,0001
			20pg/ml vs. 60pg/ml	ja	*	0,0166
			20pg/ml vs. 200pg/ml	nein	-	0,7984
			20pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,5489
			20pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	**	0,0098
			60pg/ml vs. 200pg/ml	nein	-	0,0576
			60pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,1696
			60pg/ml vs. 50.000pg/ml	nein	-	0,4505
			200pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,7196
			200pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	*	0,0378
			2.000pg/ml vs. 50.000pg/ml	nein	-	0,1108
Gesamt (D)	ja	ja	DMSO vs. 20pg/ml	ja	**	0,0026
		****	DMSO vs. 60pg/ml	ja	**	0,0016
		<0,0001	DMSO vs. 200pg/ml	ja	****	<0,0001
			DMSO vs. 2.000pg/ml	ja	****	<0,0001
			DMSO vs. 50.000pg/ml	ja	****	<0,0001
			20pg/ml vs. 60pg/ml	nein	-	0,4053
			20pg/ml vs. 200pg/ml	nein	-	0,1451
			20pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,0537
			20pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	****	<0,0001
			60pg/ml vs. 200pg/ml	nein	-	0,6792
			60pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,3370
			60pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	***	0,0003
			200pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,4971
			200pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	****	<0,0001
			2.000pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	**	0,0026

In Tabelle 6 wird deutlich, dass der erste Assay die meisten und der zweite Assay die wenigsten statistisch signifikanten Ergebnisse aufweist. In der Gesamtauswertung weist jede Calcitriol-Behandlung einen statistisch signifikanten Unterschied zur DMSO-Kontrollgruppe auf. In der Gesamtauswertung aller Wiederholungsversuche führte innerhalb der Behandlungsgruppen eine Steigerung der Calcitriol-Konzentration währenddessen zu keinem statistisch signifikanten Unterschied. Lediglich eine Behandlung mit der höchsten Konzentration von 50.000 pg/ml Calcitriol weist im Vergleich zu allen anderen Behandlungsgruppen eine statistisch signifikante stärkere Reduktion der Proliferationsfähigkeit auf. Ein Vergleich mit der zweithöchsten Calcitriol-Behandlung von 2.000 pg/ml zeigt in der Gesamtauswertung eine Reduktion um 16,92 % ($\text{SEM} \pm 5,008 \%$; $p=0,0026$).

4.1.2 Die Proliferationsfähigkeit der 7 Tage behandelten UM-SCC-1 Zellen sinkt erst bei deutlich supraphysiologischer Calcitriol-Konzentration

Neben einer viertägigen Behandlung der UM-SCC-1 Zellen wurde des Weiteren auch eine siebentägige Behandlung der Zellen durchgeführt. Der genaue Versuchsablauf erfolgte analog zu den viertägig behandelten Zellen (siehe Kapitel 4.1.1). Da auch hier die exponentielle Wachstumsphase zeitlichen Schwankungen unterlag, wurden für eine genauere Auswertung individuelle Analyse-Zeiträume je nach Behandlungsgruppe gewählt. Diese lagen zwischen 37 h und 116 h. Wie in Abb. 14 ersichtlich, war hierbei ein verzögerter Beginn sowie eine Verlängerung der exponentiellen Wachstumsphase der mit 50.000 pg/ml Calcitriol behandelten Zellen auffällig.

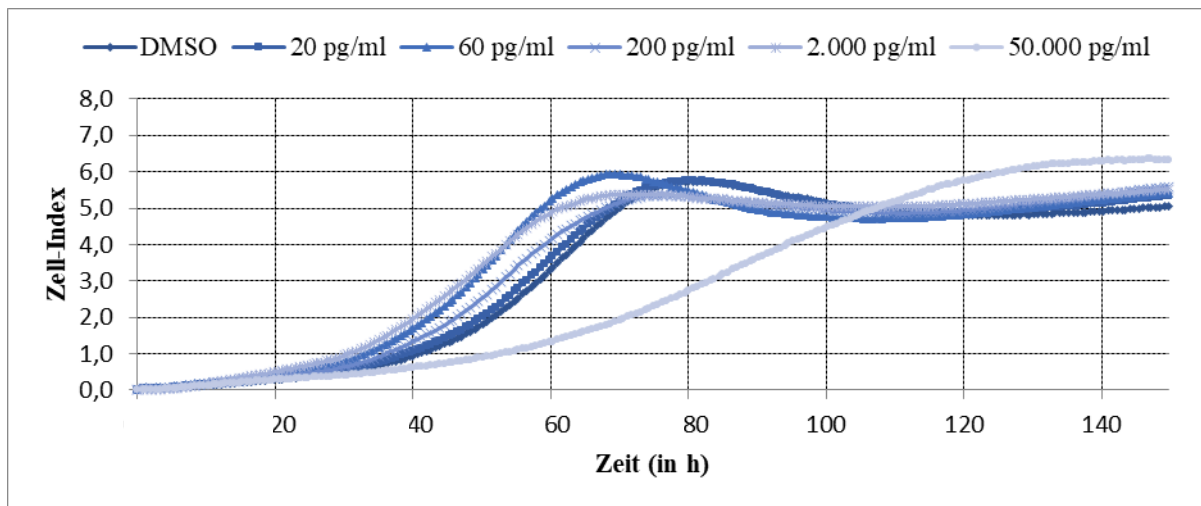
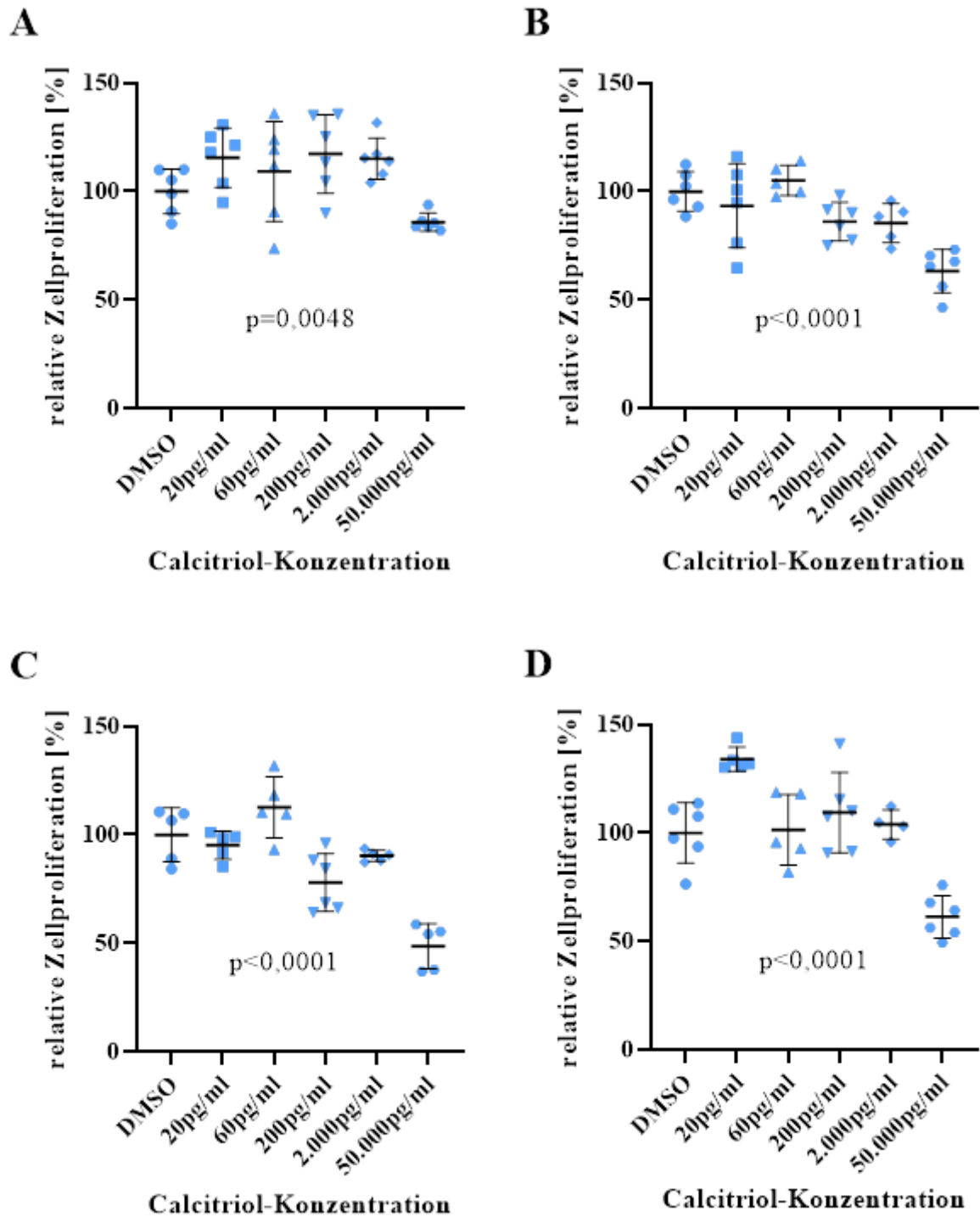


Abb. 14: Verzögerte beginnende sowie insgesamt verlängerte exponentielle Wachstumsphase der UM-SCC-1 Zellen nach siebentägiger Behandlung mit 50.000 pg/ml Calcitriol im *xCELLigence* System. Der Zell-Index (y-Achse) ist als einheitsloser Parameter in Abhängigkeit von der Zeit (x-Achse) in h dargestellt. Die einzelnen Behandlungsgruppen sind durch die unterschiedlich farblichen Kurven abgebildet.

Es wurden insgesamt vier biologische Replikate mit jeweils sechs technischen Replikaten erstellt. Es konnte, wie schon bei den viertägig behandelten Zellen, eine breite Streuung zwischen den einzelnen Assays detektiert werden. Daher wurde zunächst jeder Assay einzeln analysiert, sodass die Daten auf die Assay-eigene DMSO-Kontrolle bezogen wurden. Danach erfolgte die Analyse aller Einzelreplikate

zusammen. Die statistischen Analysen wurden wie in Kapitel 4.1.1 für die viertägige Behandlung beschrieben durchgeführt.



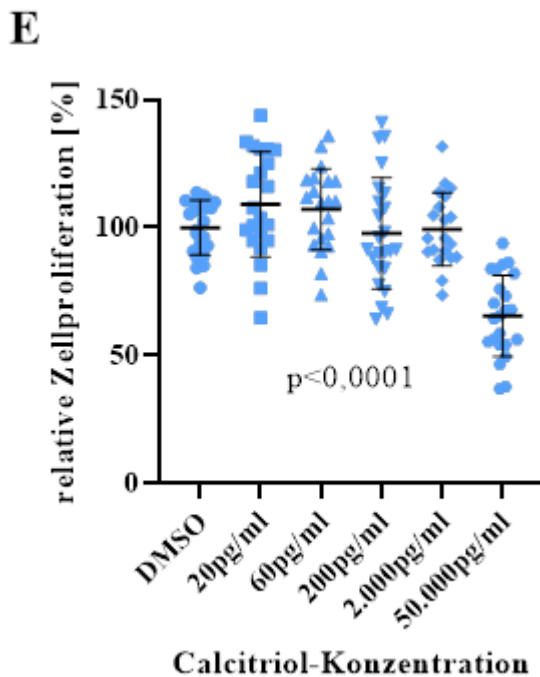


Abb. 15: Analyse der Proliferation von UM-SCC-1 Zellen abhängig von der Calcitriol-Konzentration bei 7 Tagen Behandlungsdauer. Die Graphen A-D stellen die ausgewerteten einzelnen biologischen Replikate dar, Graph E zeigt die Gesamtauswertung aller biologischen Replikate. Auf der x-Achse sind die angewendeten Konzentrationen angegeben, die y-Achse beschreibt die gemittelte Steigung der Wachstumskurve für die einzelnen Behandlungsgruppen, bezogen auf die jeweilige DMSO-Kontrolle als 100 %-Referenzwert. Die gemittelten Messwerte der einzelnen technischen Replikate (blaue Punkte), die Mittelwerte (langer schwarzer Balken) und die Standardabweichungen (Fehlerbalken) sind abgebildet. Die p-Werte der ANOVA-Analyse sind in den jeweiligen Graphen angegeben.

Die ANOVA-Analyse (siehe Abb. 15) zeigte bei siebentägiger Calcitriol-Behandlung in physiologischen und leicht bis mäßig supraphysiologischen Konzentrationen (200 pg/ml und 2.000 pg/ml), bezogen auf analoge humane Serumwerte, außer kleinen natürlichen Schwankungen keinen signifikanten Einfluss auf den gemessenen Zell-Index. Erst eine deutlich supraphysiologische Konzentration von 50.000 pg/ml Calcitriol bewirkte im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe in der Gesamtauswertung (Abb. 15 E) eine Reduktion der Proliferationsfähigkeit der UM-SCC-1 Zellen um 34,56 % (SEM $\pm$ 4,001 %, $p < 0,0001$).

Tabelle 7: Tabellarische Übersicht der durchgeführten statistischen Tests zum Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Behandlungsgruppen nach siebentägiger Calcitriol-Behandlung hinsichtlich der Proliferationsfähigkeit. Die einzelnen biologischen Replikate (A-D), sowie die Gesamtauswertung (E) sind aufgeführt. Sofern die Voraussetzung einer Normalverteilung vorlag, erfolgte der ANOVA-Test und für den Vergleich der einzelnen Behandlungsgruppen der t-Test. War dies nicht erfüllt, erfolgte anstelle des t-Tests der Mann-Whitney-U-Test.

Assay	Normalverteilung	ANOVA-Test ($p < 0,05$, Signifikanz, p-Wert)	Vergleich	$p < 0,05$	Signifikanz	t-Test	Mann-Whitney-U-Test
1. Assay (A)	ja	ja	DMSO vs. 20pg/ml	nein	-	0,0517	

Ergebnisse

		**	DMSO vs. 60pg/ml	nein	-	0,4011	
		0,0048	DMSO vs. 200pg/ml	nein	-	0,0763	
			DMSO vs. 2.000pg/ml	ja	*	0,0259	
			DMSO vs. 50.000pg/ml	ja	*	0,0186	
			20pg/ml vs. 60pg/ml	nein	-	0,5763	
			20pg/ml vs. 200pg/ml	nein	-	0,8542	
			20pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,9363	
			20pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	**	0,0023	
			60pg/ml vs. 200pg/ml	nein	-	0,5139	
			60pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,5872	
			60pg/ml vs. 50.000pg/ml	nein	-	0,0553	
			200pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,7897	
			200pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	**	0,0072	
			2.000pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	***	0,0003	
2. Assay (B)	ja	ja	DMSO vs. 20pg/ml	nein	-	0,4732	
		****	DMSO vs. 60pg/ml	nein	-	0,3176	
		<0,0001	DMSO vs. 200pg/ml	ja	*	0,0229	
			DMSO vs. 2.000pg/ml	ja	*	0,0273	
			DMSO vs. 50.000pg/ml	ja	*	<0,0001	
			20pg/ml vs. 60pg/ml	nein	-	0,2136	
			20pg/ml vs. 200pg/ml	nein	-	0,4323	
			20pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,4049	
			20pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	*	0,0107	
			60pg/ml vs. 200pg/ml	ja	**	0,0032	
			60pg/ml vs. 2.000pg/ml	ja	**	0,0055	
			60pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	****	<0,0001	
			200pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,9142	
			200pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	**	0,0019	
			2.000pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	**	0,0038	
3. Assay (C)	ja	ja	DMSO vs. 20pg/ml	nein	-	0,4710	
		****	DMSO vs. 60pg/ml	nein	-	0,1722	
		<0,0001	DMSO vs. 200pg/ml	ja	*	0,0201	
			DMSO vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,1575	
			DMSO vs. 50.000pg/ml	ja	***	0,0001	
			20pg/ml vs. 60pg/ml	ja	*	0,0482	
			20pg/ml vs. 200pg/ml	ja	*	0,0255	
			20pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,1783	
			20pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	****	<0,0001	
			60pg/ml vs. 200pg/ml	ja	**	0,0028	
			60pg/ml vs. 2.000pg/ml	ja	*	0,0228	

Ergebnisse

			60pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	****	<0,0001	
			200pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,0734	
			200pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	**	0,0027	
			2.000pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	***	0,0006	
4. Assay (D)	ja (außer 20pg/ml)	ja	DMSO vs. 20pg/ml	ja	**		0,0043
		****	DMSO vs. 60pg/ml	nein	-	0,8784	
		<0,0001	DMSO vs. 200pg/ml	nein	-	0,3438	
			DMSO vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,5614	
			DMSO vs. 50.000pg/ml	ja	***	0,0004	
			20pg/ml vs. 60pg/ml	ja	**		0,0079
			20pg/ml vs. 200pg/ml	nein	-		0,0519
			20pg/ml vs. 2.000pg/ml	ja	*		0,0159
			20pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	**		0,0043
			60pg/ml vs. 200pg/ml	nein	-	0,4668	
			60pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,7622	
			60pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	**	0,0025	
			200pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,5339	
			200pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	***	0,0006	
			2.000pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	****	<0,0001	
Gesamt (E)	ja	ja	DMSO vs. 20pg/ml	nein	-	0,0749	
		****	DMSO vs. 60pg/ml	nein	-	0,0898	
		<0,0001	DMSO vs. 200pg/ml	nein	-	0,6493	
			DMSO vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,8521	
			DMSO vs. 50.000pg/ml	ja	****	<0,0001	
			20pg/ml vs. 60pg/ml	nein	-	0,7382	
			20pg/ml vs. 200pg/ml	nein	-	0,0758	
			20pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,0786	
			20pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	****	<0,0001	
			60pg/ml vs. 200pg/ml	nein	-	0,1000	
			60pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,1002	
			60pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	****	<0,0001	
			200pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,7781	
			200pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	****	<0,0001	
			2.000pg/ml vs. 50.000pg/ml	ja	****	<0,0001	

Tabelle 7 zeigt, dass der erste Assay und die Gesamtauswertung die wenigsten und der dritte Assay die meisten statistisch signifikanten Ergebnisse der t-Tests aufweist. In der Gesamtschau aller Ergebnisse ergibt die Behandlung mit der deutlich supraphysiologischen Calcitriol-Konzentration von 50.000 pg/ml sowohl im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe als auch zu den anderen Behandlungsgruppen einen hochsignifikanten Unterschied hinsichtlich der Proliferationsfähigkeit ($p < 0,0001$). Außerdem zeigt sich eine Tendenz, dass physiologische Calcitriol-Konzentrationen im

Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe zu einer leichten Steigerung der Proliferation führen, ohne jedoch statistisch signifikant zu sein ($p=0,0749$; $p=0,0898$).

4.1.3 Kein Einfluss von Behandlungsdauer mittels Calcitriol auf die Proliferationsfähigkeit von UM-SCC-1 Zellen bei eingeschränkter Beurteilungsmöglichkeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem der Einfluss divergierender Behandlungszeiträume mittels Calcitriol auf die Proliferationsfähigkeit von UM-SCC-1 Zellen eruiert. Bei einer Behandlungsdauer von 4 Tagen ist eine kontinuierliche Abnahme bei ansteigender Calcitriol-Konzentration zu beobachten. Demgegenüber zeigt sich bei den 7 Tage behandelten Zellen unter der Verwendung von physiologischen Calcitriol-Konzentrationen zunächst keine signifikante Veränderung des Proliferationsverhaltens. Erst bei der Verwendung der deutlich supraphysiologischen Calcitriol-Konzentration zeigt sich ebenfalls eine Abnahme der Proliferation, die jedoch mit 34,56 % ($\text{SEM} \pm 4,001 \%$, $p<0,0001$) im Vergleich zur viertägigen Behandlungsdauer eine geringere Intensität aufweist (43,29 % Abnahme, $\text{SEM} 2,682 \%$, $p<0,0001$).

Des Weiteren ist bei der siebentägigen Behandlung mit der deutlich supraphysiologischen Calcitriol-Konzentration eine Verzögerung und Verlängerung der exponentiellen Wachstumsphase zu beobachten (vgl. Kapitel 4.1.2). Diese ist bei der viertägigen Behandlungsdauer nicht zu beobachten (vgl. Abb. 12 und Abb. 14).

Allerdings lassen sich aufgrund von zeitlichen Schwankungen und individueller Anpassung der Analyse-Zeiträume (vgl. Kapitel 4.1.1 und 4.1.2) eine Abhängigkeit der Proliferationsfähigkeit von einer zeitlichen Behandlungsdauer nur eingeschränkt beurteilen.

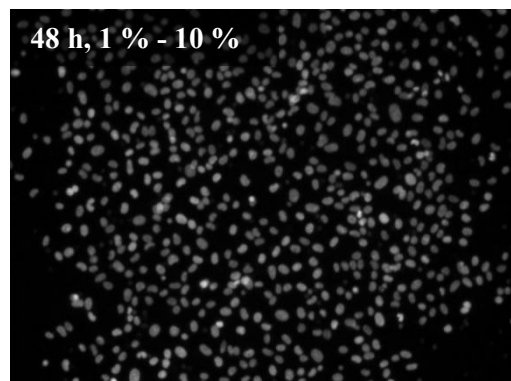
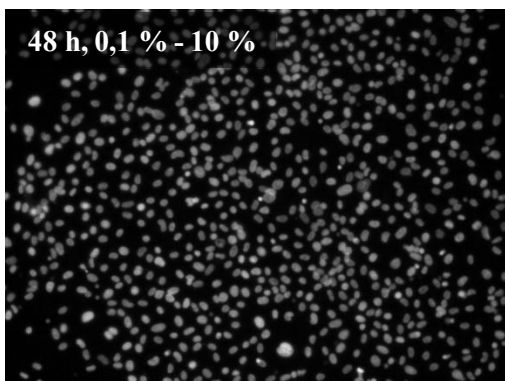
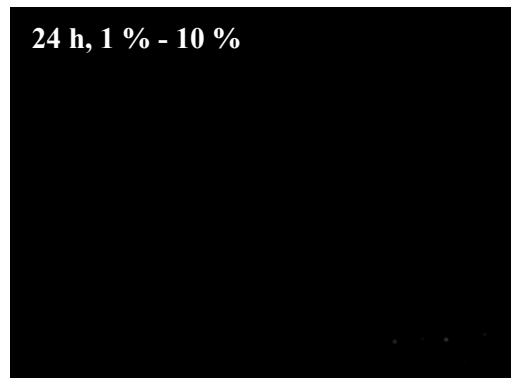
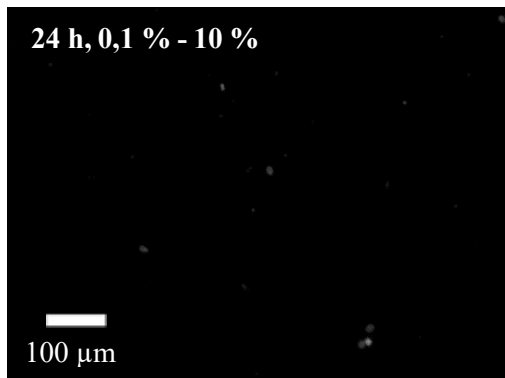
4.2 Untersuchungen zum Migrationsverhalten

Neben der Auswirkung unterschiedlich hoher Calcitriol-Konzentrationen und einer unterschiedlichen Behandlungsdauer auf die Proliferationsfähigkeit von UM-SCC-1 Zellen, wurde auch der Einfluss einer physiologischen (60 pg/ml) und zweier supraphysiologischen Calcitriol-Konzentrationen (200 pg/ml und 2.000 pg/ml) auf die Migrationsfähigkeit dieser Zelllinie untersucht. Die deutlich supraphysiologische Konzentration wurde bewusst nicht mit untersucht, da die hier wie zuvor beschriebene Hemmung der Zellproliferation die Ergebnisse des nach dem Boyden-Chamber-Prinzip funktionierenden Migrationsassays verfälscht hätte. Als Kontrolle wurden mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen verwendet. Außerdem wurde zwischen einer vier- und siebentägigen Behandlungsdauer der Zellen unterschieden. Die Behandlung der Zellen mit Calcitriol und DMSO fand vor der eigentlichen Durchführung des Migrationsassays statt. Zur Untersuchung der Migrationsfähigkeit wurde ein Transwell-Migrationsassay verwendet, der auf dem Prinzip der Boyden-Chamber (Boyden & Ph, 1962) beruht. Die durch die 8 μm großen Poren einer fluoreszenzichten Membran migrierten Zellen wurden

nach 72 h fixiert, die Zellkernfärbung mit DAPI durchgeführt und anschließend die Anzahl der migrierten Zellen mit Hilfe eines inversen Fluoreszenz-Mikroskops ausgewertet. Die Auswertung erfolgte durch das Erstellen von drei Bildern pro Well aus unterschiedlichen Regionen, die die gesamte Fläche des Wells repräsentativ darstellen. Anschließend wurden die Zellen auf diesen Bildern durch die NIS Elements Software semiautomatisiert gezählt und der Mittelwert für jedes Well berechnet.

4.2.1 Etablierung des Migrationsassays

Zur optimierten Anwendung des Transwell-Migrationsassays für das eigentliche Versuchsprotokoll war zunächst eine Etablierung bezüglich der anzunehmenden Migrationsdauer, der auszusäenden Zellmenge und des anzuwendenden FKS-Konzentrationsgradienten erforderlich. Um sowohl eine Steigerung als auch eine Inhibition der Migration erfassen zu können, wurde eine Zelldichte auf der Unterseite der mit Poren durchsetzten Membran von ca. 60 % in der Kontrollgruppe angestrebt. Es wurden 50.000 Zellen pro Well ausgesät, anschließend wurde der Assay jeweils nach 24 h, 48 h und 72 h gestoppt. Für jede Versuchsdauer wurden zwei verschiedene FKS-Konzentrationsgradienten getestet (1 % zu 10 % bzw. 0,1 % zu 10 %, jeweils bezogen auf die FKS-Konzentration oberhalb bzw. unterhalb der mit Poren durchsetzten Membran). Es wurden jeweils drei technische Replikate pro Versuchsbedingung getestet.



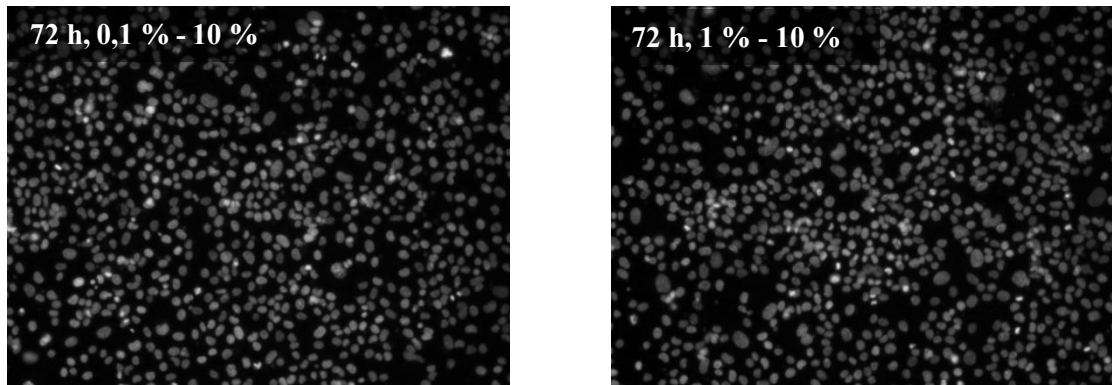
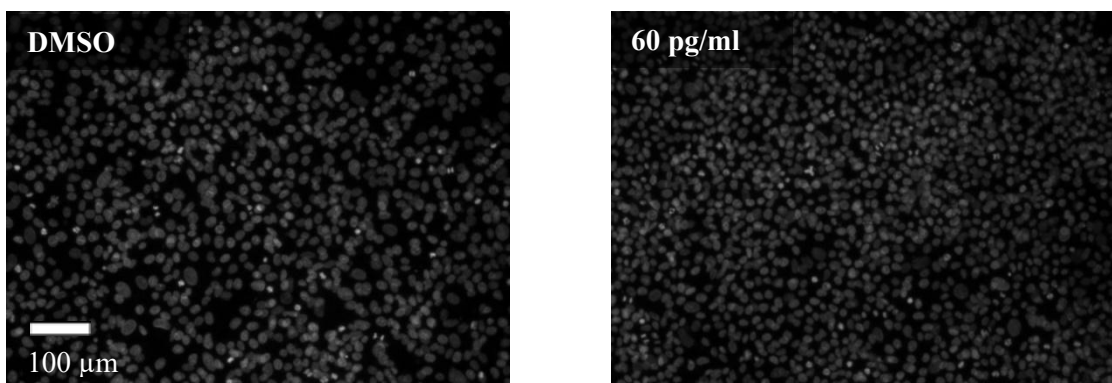


Abb. 16: Etablierung des TransWell-Migrationsassays mit UM-SCC-1 Zellen. Ziel der Etablierung war eine Zelldichte von ca. 60 % auf der Unterseite der Migrationsinserts. Hierfür wurde die optimale Kombination zwischen den Modalitäten Zeit (24 h, 48 h, 72 h) und FKS-Konzentrationsgradient (0,1 % und 1 % zu 10 % FKS) untersucht. Die Belegung von annähernd 60 % der Membranporen wurde unter den Bedingungen Konzentrationsgradienten von 1 % zu 10 % FKS und einer Migrationsdauer von 72 h erreicht.

Die Auswertung erfolgte nach dem in Kapitel 4.2 erläuterten Prinzip. Nach erfolgter Analyse wurde eine Migrationszeit von 72h in Kombination mit 1 % FKS zu 10 % FKS als geeignete Bedingung für alle nachfolgenden Assays gewählt (vgl. Abb. 16).

4.2.2 Kein eindeutiger Einfluss einer viertägigen Calcitriol-Behandlung auf die Migrationsfähigkeit von UM-SCC-1 Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses einer zunächst viertägigen Behandlung mit Calcitriol auf die Migration von UM-SCC-1 Zellen wurden mit dem zuvor beschriebenen und etablierten Versuchsprotokoll vier biologische Replikate mit jeweils drei technischen Replikaten angefertigt (siehe Abb. 17).



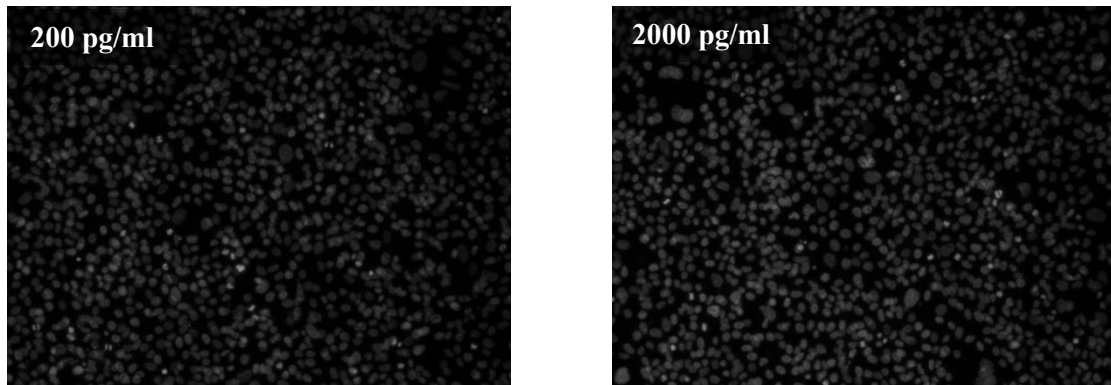
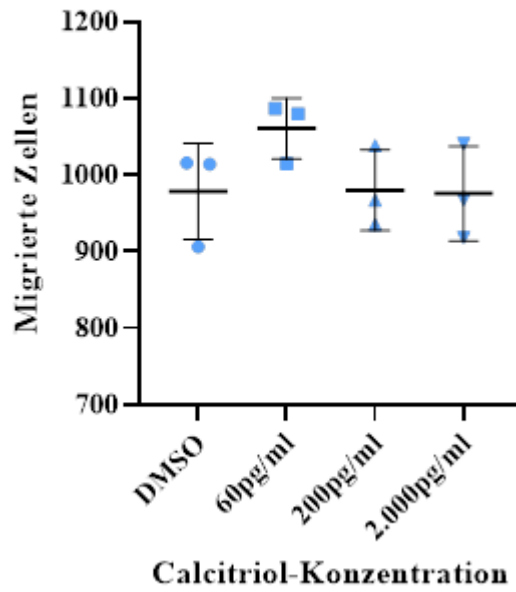


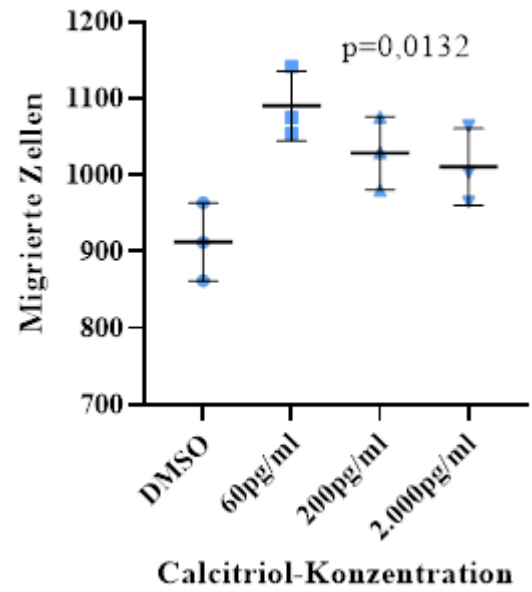
Abb. 17: Migrierte UM-SCC-1 Zellen nach viertägiger Behandlung mit Calcitriol. UM-SCC-1 Zellen migrieren innerhalb von 8 μm große Poren der verwendeten Membran der Migrationsinserts. Die Zellen wurden zuvor 4 Tage mit unterschiedlich hohen Calcitriol-Konzentrationen behandelt. Nach Fixierung mit Methanol und Anfärbung der Zellkerne durch DAPI wurden mittels eines inversen Fluoreszenz-Mikroskops Bilder der Zellen erstellt. Die Zählung der Zellen erfolgte semiautomatisiert durch die NIS Elements Software. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte aus den jeweiligen Wells unter den verschiedenen Versuchsbedingungen.

Nach der mikroskopischen Analyse der Inserts, der Erstellung der Bilder (drei pro Well), der Auszählung der migrierten Zellen pro Gesichtsfeld eines Wells sowie die Berechnung der Mittelwerte der migrierten Zellen pro well, erfolgte die statistische Analyse. Zunächst wurde auf Normalverteilung getestet. Da bei der Analyse der einzelnen Assays die Anzahl der zu analysierenden Werte die Zahl 4 unterschritt, wurde hierfür der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Für die Gesamtanalyse erfolgte die Überprüfung auf eine Normalverteilung zusätzlich mittels Anderson-Darling-Test, D'Agostino & Pearson Test und Kolmogorov-Smirnov-Test. Hierbei wurde von einer Normalverteilung ausgegangen, wenn drei der vier Tests eine Normalverteilung ergaben. War die Voraussetzung einer Normalverteilung erfüllt, wurde ein ANOVA-Test durchgeführt. Darüber hinaus erfolgten die direkten Vergleiche der Behandlungsgruppen untereinander mithilfe des t-Tests oder bei nicht vorhandener Normalverteilung mittels Mann-Whitney-U-Tests.

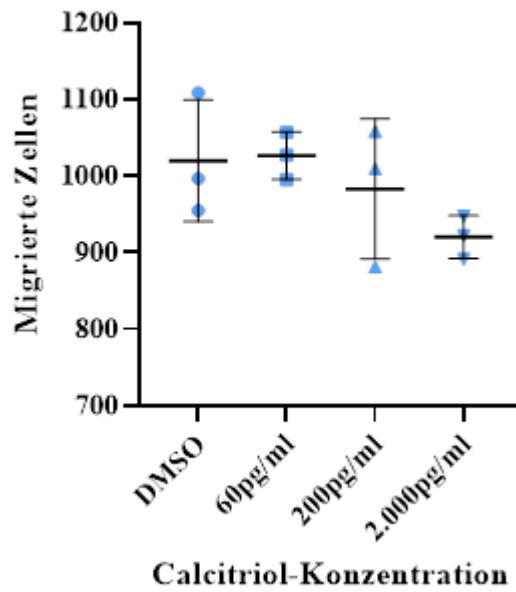
A



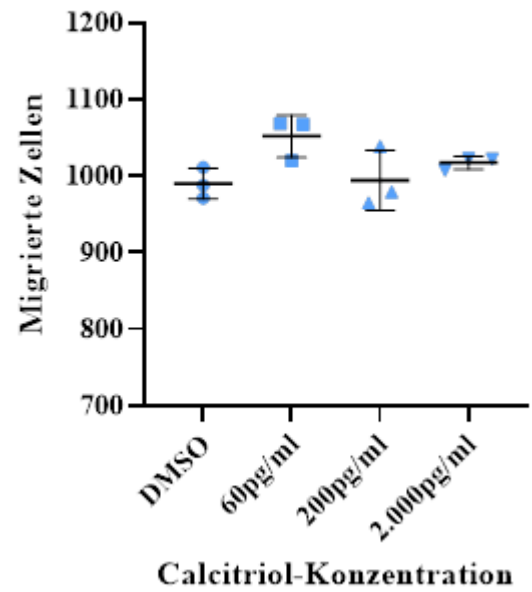
B



C



D



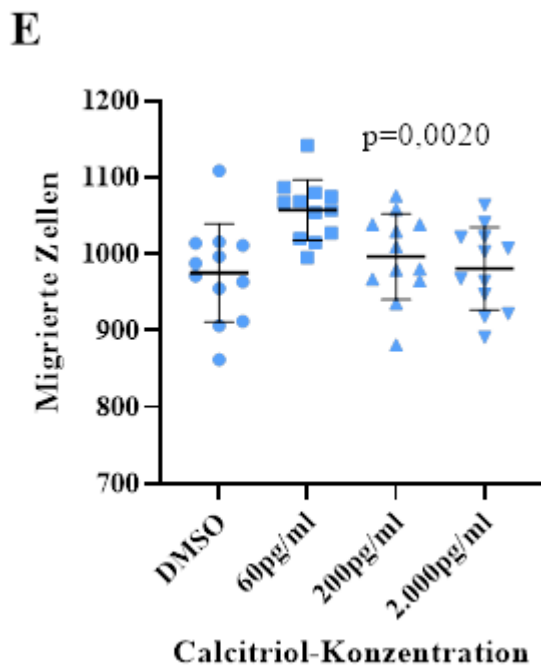


Abb. 18: ANOVA-Analyse der migrierten Zellen abhängig von der Calcitriol-Konzentration 4 Tage behandelter Zellen. Die Graphen A-D stellen die ausgewerteten einzelnen biologischen Replikate dar, der Graph E die Gesamtauswertung. Auf der x-Achse sind die angewendeten Konzentrationen angegeben, die y-Achse beschreibt die Anzahl der durch die fluoreszenzdichte Membran migrierten Zellen am Boden der Migrationseinsätze. Die gemittelten Messwerte der einzelnen technischen Replikate (blaue Punkte), die Mittelwerte (langer schwarzer Balken) und die Standardabweichungen (Fehlerbalken) sind abgebildet. Die p-Werte der ANOVA-Analysen sind in den jeweiligen Graphen angegeben.

In der ANOVA-Testung (siehe Abb. 18) konnten nur im zweiten Assay (B) und in der Gesamtauswertung (E) statistisch signifikante Unterschiede der Migrationsfähigkeit gezeigt werden (Abb. 18 B: $p=0,0132$; E: $p=0,0020$). Zunächst kam es bei einer Calcitriol-Konzentration von 60 pg/ml zu einer leichten Steigerung der Zellmigration, bei höheren Konzentrationen normalisierte sich jedoch das Migrationsverhalten wieder auf das Niveau der DMSO-Kontrolle und nahm erst bei deutlich supraphysiologischer Konzentration leicht ab.

Tabelle 8: Tabellarische Übersicht der durchgeführten statistischen Tests zum Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Behandlungsgruppen nach viertägiger Calcitriol-Behandlung hinsichtlich der Migrationsfähigkeit. Es sind die einzelnen biologischen Replikate (A-D), sowie die Gesamtauswertung (E) aufgeführt. Wenn die Voraussetzung einer Normalverteilung vorlag, erfolgte der ANOVA-Test und für den Vergleich der einzelnen Behandlungsgruppen der t-Test. War dies nicht erfüllt, erfolgte anstelle des t-Tests der Mann-Whitney-U-Test.

Assay	Normalverteilung	ANOVA-Test ($p<0,05$, Signifikanz, p-Wert)	Vergleich	$p<0,05$	Signifikanz	t-Test	Mann-Whitney-U-Test
1. Assay (A)	ja, außer DMSO	nein	DMSO vs. 60pg/ml	nein	-		0,2000
		-	DMSO vs. 200pg/ml	nein	-		>0,9999

Ergebnisse

		0,2470	DMSO vs. 2.000pg/ml	nein	-		>0,9999
			60pg/ml vs. 200pg/ml	nein	-	0,1076	
			60pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,1281	
			200pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,9327	
2. Assay (B)	ja	ja	DMSO vs. 60pg/ml	ja	*	0,0111	
		*	DMSO vs. 200pg/ml	ja	*	0,0451	
		0,0132	DMSO vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,0764	
			60pg/ml vs. 200pg/ml	nein	-	0,1817	
			60pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,1129	
			200pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,6760	
3. Assay (C)	ja	nein	DMSO vs. 60pg/ml	nein	-	0,9039	
		-	DMSO vs. 200pg/ml	nein	-	0,6246	
		0,2364	DMSO vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,1514	
			60pg/ml vs. 200pg/ml	nein	-	0,5018	
			60pg/ml vs. 2.000pg/ml	ja	*	0,0117	
			200pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,3573	
4. Assay (D)	DMSO und 200pg/ml ja	nein	DMSO vs. 60pg/ml	ja	*		0,1000
	60pg/ml und 2.000pg/ml nein	-	DMSO vs. 200pg/ml	nein	-	0,8789	
		0,0716	DMSO vs. 2.000pg/ml	nein	-		0,2000
			60pg/ml vs. 200pg/ml	nein	-		0,2000
			60pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-		0,4000
			200pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-		0,7000
Gesamt (E)	ja	ja	DMSO vs. 60pg/ml	ja	**	0,0013	
		**	DMSO vs. 200pg/ml	nein	-	0,3989	
		0,0020	DMSO vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,8179	
			60pg/ml vs. 200pg/ml	ja	**	0,0059	
			60pg/ml vs. 2.000pg/ml	ja	***	0,0008	
			200pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,4981	

Tabelle 8 bestätigt, dass die Ergebnisse im Vergleich einzelner Behandlungsgruppen überwiegend nicht statistisch signifikant waren. Lediglich in der Behandlungsgruppe 60 pg/ml konnten im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe in der Hälfte der Assays (Tabelle 8 B und D) und in der Gesamtauswertung (Tabelle 8 E) relevante Unterschiede detektiert werden (B: $p=0,111$; D: $p=0,100$; E: $p=0,0013$).

4.2.3 Kein eindeutiger Einfluss einer siebentägigen Calcitriol-Behandlung auf die Migrationsfähigkeit von UM-SCC-1 Zellen

Die Migrationsfähigkeit der UM-SCC-1 Zellen nach siebentägiger Behandlung wurde ebenfalls mithilfe eines Transwell-Migrationsassays untersucht. Es wurden vier biologische Replikate mit jeweils drei technischen Replikaten durchgeführt (siehe Abb. 19).

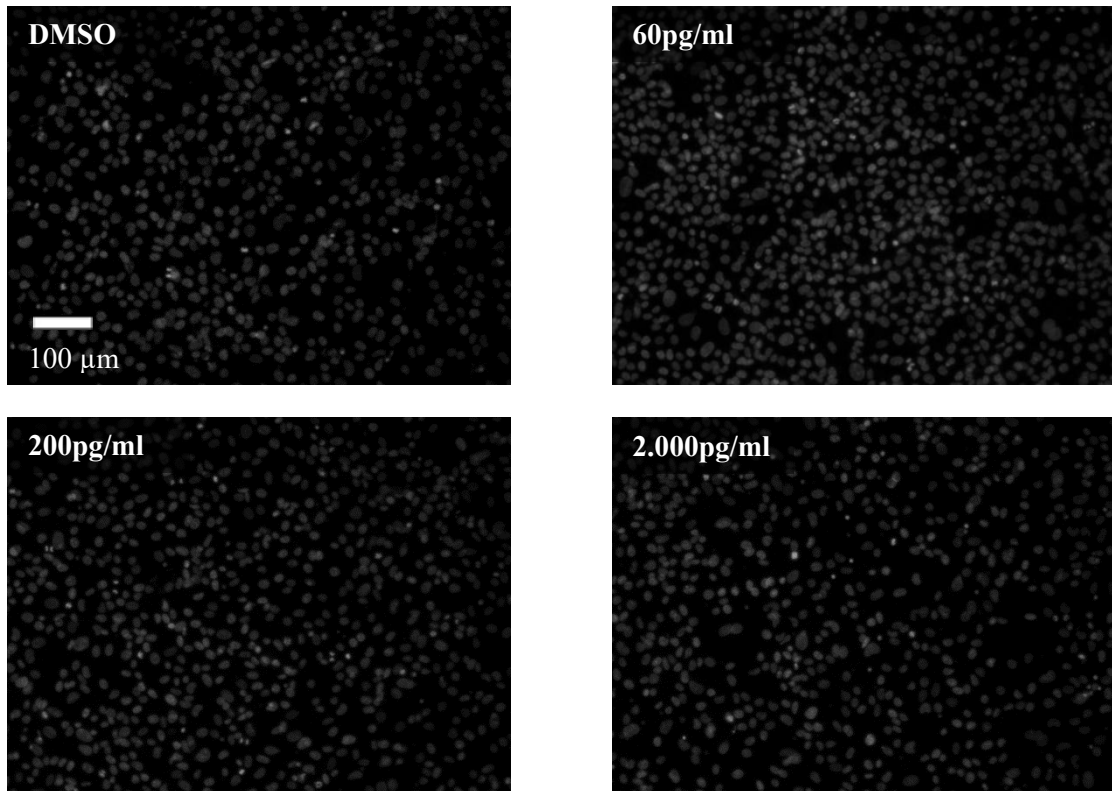
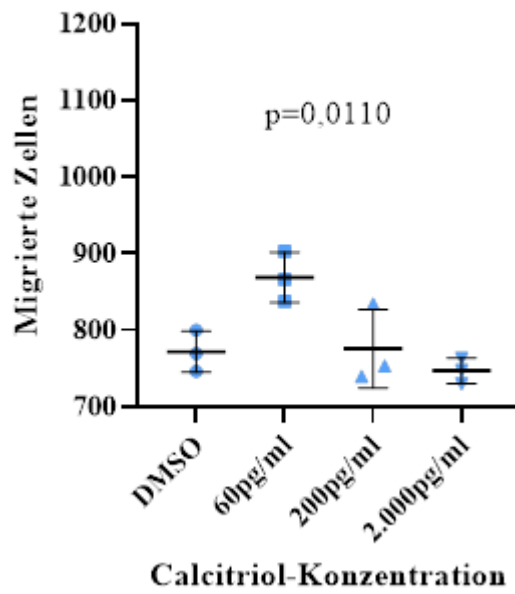


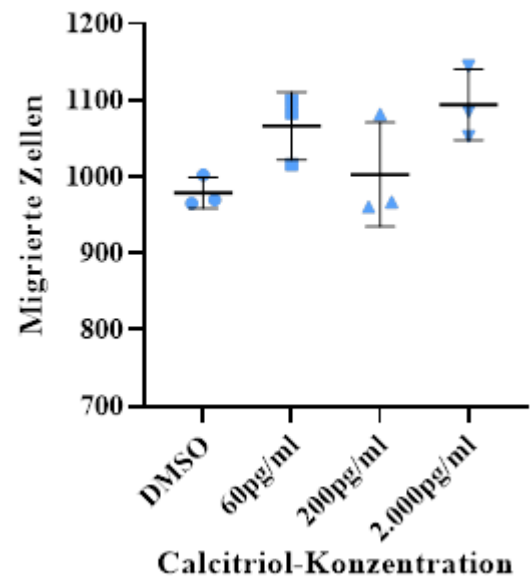
Abb. 19: Migrierte UM-SCC-1 Zellen nach siebentägiger Behandlung mit Calcitriol. UM-SCC-1 Zellen migrieren durch 8 µm große Poren der verwendeten Membran des Transwells. Diese wurden zuvor 7 Tage mit unterschiedlich hohen Calcitriol-Konzentrationen behandelt. Nach Fixierung mit Methanol und Anfärbung der Zellkerne durch DAPI wurden mittels eines inversen Fluoreszenz-Mikroskops Bilder der Zellen erstellt. Die Zählung der Zellen erfolgte semiautomatisiert durch die NIS Elements Software.

Nach der Analyse der Migrationsinserts durch das inverse Fluoreszenz-Mikroskop, der Erstellung der Bilder und der Berechnung der Mittelwerte der migrierten Zellen pro Insert, erfolgte die statistische Analyse analog zu dem bereits in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Protokoll.

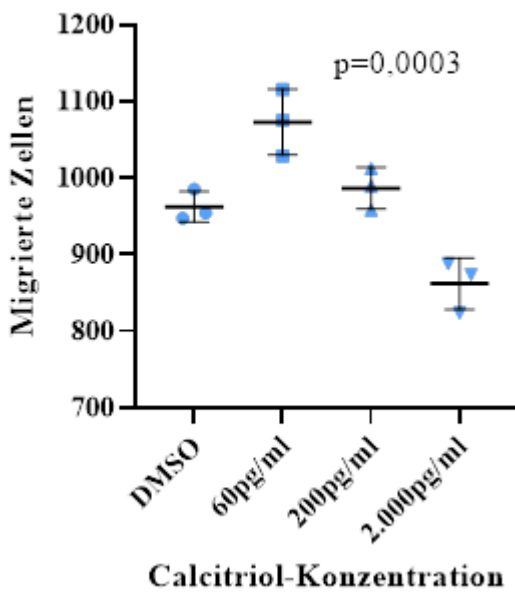
A



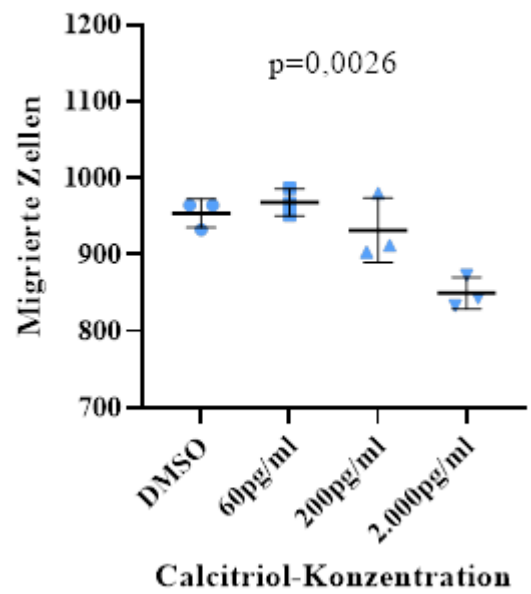
B



C



D



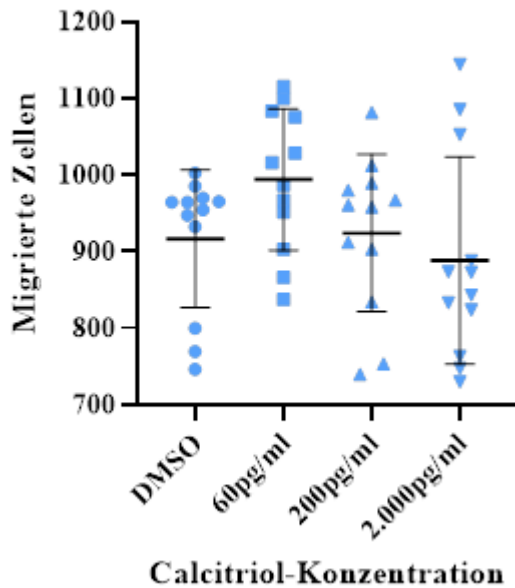
E

Abb. 20: Analyse der migrierten Zellen abhängig von der Calcitriol-Konzentration bei siebentägiger Behandlungsdauer. Die Graphen A-D stellen die ausgewerteten einzelnen biologischen Replikate dar, der Graph E die Gesamtauswertung. Auf der x-Achse sind die angewendeten Konzentrationen angegeben, die y-Achse beschreibt die Anzahl der durch die Inserts des Transwell-Migrationsassays migrierten Zellen. Die gemittelten Messwerte der einzelnen technischen Replikate (blaue Punkte), die Mittelwerte (langer schwarzer Balken) und die Standardabweichungen (Fehlerbalken) sind abgebildet. Die p-Werte der ANOVA-Analysen sind in den jeweiligen Graphen angegeben.

Insgesamt ließ sich nach einer siebentägigen Behandlung kein statistisch signifikanter Effekt von Calcitriol auf die Zellmigration nachweisen. Es fällt auf, dass der erste Assay (Abb. 20 A) im Vergleich zu den anderen biologischen Replikaten (Abb. 20 B, C, D) Konzentrations-übergreifend weniger migrierte Zellen zeigte. Hinzu kommt, dass die erhaltenen Werte nach einer siebentägigen Calcitriol-Behandlung in der Gesamtauswertung eine sehr große Standardabweichung als Zeichen deutlicher Schwankungen im Migrationsverhalten zwischen den einzelnen Replikaten aufweisen. Bezüglich der erhaltenen Daten lässt sich jedoch ein Trend zur Abnahme der Migrationsfähigkeit zwischen der Kontrollgruppe und den mit 2.000 pg/ml Calcitriol behandelten Zellen feststellen. Ebenso konnte wie auch schon bei den 4 Tage behandelten UM-SCC-1 Zellen der Trend einer Steigerung der Migrationsfähigkeit der mit 60 pg/ml Calcitriol behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe festgestellt werden. Im 4. Assay (Abb. 20 D) und in der Gesamtauswertung (Abb. 20 E) waren die Ergebnisse der DMSO-Kontrollgruppe nicht normalverteilt, daher wurde hier im direkten Vergleich mit den anderen Behandlungsgruppen der Mann-Whitney U-Test verwendet.

Tabelle 9: Tabellarische Übersicht der durchgeführten statistischen Tests zum Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Behandlungsgruppen nach siebentägiger Calcitriol-Behandlung hinsichtlich der Migrationsfähigkeit. Es sind die einzelnen biologischen Replikate (A-D), sowie die Gesamtauswertung (E) aufgeführt. Zunächst wurde überprüft, ob eine Normalverteilung vorlag. Dies erfolgte in der Auswertung der einzelnen Assays A-D mittels Shapiro-Wilk-Test (da $n=3$). In der

Ergebnisse

Gesamtauswertung wurden zusätzlich der Kolmogorov-Smirnov-Test, Anderson-Darling-Test und D'Agostino & Pearson-Test durchgeführt. Die Voraussetzung der Normalverteilung waren erfüllt, wenn hier drei der vier Tests auf eine Normalverteilung hinwiesen. Nachdem daraufhin der ANOVA-Test erfolgte, wurden die einzelnen Behandlungsgruppen untereinander mithilfe des t-Tests bzw. einen Mann-Whitney-U-Test bei fehlender Normalverteilung verglichen.

Assay	Normalverteilung	ANOVA-Test (p<0,05, Signifikanz, p-Wert)	Vergleich	p<0,05	Signifikanz	t-Test	Mann-Whitney-U-Test
1. Assay (A)	ja	ja	DMSO vs. 60pg/ml	ja	*	0,0179	
		*	DMSO vs. 200pg/ml	nein	-	0,9145	
		0,0110	DMSO vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,2585	
			60pg/ml vs. 200pg/ml	nein	-	0,0669	
			60pg/ml vs. 2.000pg/ml	ja	-	0,0106	
			200pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,4368	
2. Assay (B)	ja	nein	DMSO vs. 60pg/ml	nein	-	0,0582	
		-	DMSO vs. 200pg/ml	nein	-	0,6109	
		0,0594	DMSO vs. 2.000pg/ml	ja	*	0,0347	
			60pg/ml vs. 200pg/ml	nein	-	0,2585	
			60pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,4954	
			200pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,1372	
3. Assay (C)	ja	ja	DMSO vs. 60pg/ml	ja	*	0,0309	
		***	DMSO vs. 200pg/ml	nein	-	0,2865	
		0,0003	DMSO vs. 2.000pg/ml	ja	*	0,0183	
			60pg/ml vs. 200pg/ml	nein	-	0,0529	
			60pg/ml vs. 2.000pg/ml	ja	**	0,0032	
			200pg/ml vs. 2.000pg/ml	ja	**	0,0086	
4. Assay (D)	ja, außer DMSO	ja	DMSO vs. 60pg/ml	nein	-		0,4000
		**	DMSO vs. 200pg/ml	nein	-		0,6000
		0,0026	DMSO vs. 2.000pg/ml	ja/nein	**		0,1000
			60pg/ml vs. 200pg/ml	nein	-	0,2678	
			60pg/ml vs. 2.000pg/ml	ja	**	0,0018	
			200pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,0582	
Gesamt (E)	ja, außer DMSO	nein	DMSO vs. 60pg/ml	ja	*		0,0499
		-	DMSO vs. 200pg/ml	nein	-		0,8313
		0,1099	DMSO vs. 2.000pg/ml	nein	-		0,3695
			60pg/ml vs. 200pg/ml	nein	-	0,0941	
			60pg/ml vs. 2.000pg/ml	ja	*	0,0371	
			200pg/ml vs. 2.000pg/ml	nein	-	0,4708	

Die Übersicht in Tabelle 9 belegt eine überwiegende nicht statistische Relevanz der Ergebnisse der siebentägigen Calcitriol-Behandlung in Bezug auf die Migrationsfähigkeit. Die Ergebnisse der mit 60 pg/ml Calcitriol behandelten UM-SCC-1 Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe zeigten

jedoch im ersten (Tabelle 9 A) und dritten Assay (Tabelle 9 C) sowie in der Gesamtauswertung (Tabelle 9 E) einen statistisch signifikanten Unterschied (A: $p=0,0179$; C: $p=0,0309$; E: $p=0,0499$). Außerdem wurden im zweiten (Tabelle 9 B) und dritten Assay (Tabelle 9 C) ebenfalls p-Werte unter 0,05 zwischen der DMSO-Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe mit 2.000 pg/ml Calcitriol nachgewiesen (Tabelle 9 B: $p=0,0347$; C: $p=0,0183$). Darüber hinaus konnte sowohl in drei biologischen Replikaten (Tabelle 9 A, C, D) als auch in der Gesamtauswertung (Tabelle 9 E) ein relevanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen mit 60 pg/ml und 2.000 pg/ml Calcitriol festgestellt werden (Tabelle 9 A: $p=0,0106$; C: $p=0,0032$; D: $p=0,0018$; E: $p=0,0371$).

4.3 Proteinbiochemische Analyse der VDR-Expression

Neben einer funktionellen Analyse der Auswirkungen einer Calcitriol-Behandlung auf UM-SCC-1 Zellen, wurden diese zusätzlich auf proteinbiochemischer Ebene analysiert. Mittels Western Blot Analyse wurde der Einfluss von Calcitriol auf die VDR-Expression der UM-SCC-1 Zellen untersucht.

4.3.1 VDR wird auf UM-SCC-1 Zellen exprimiert, jedoch zeigen verschiedene Calcitriol-Konzentrationen nach viertägiger Behandlung keinen signifikanten Einfluss auf die VDR-Expression

Die VDR-Expression der UM-SCC1 Zellen wurde nach viertägiger Calcitriol-Behandlung in physiologischer Konzentration (60 pg/ml) als auch supraphysiologischen (200 pg/ml und 2.000 pg/ml) Konzentrationen mithilfe eines Western Blots untersucht. Hierzu wurden die UM-SCC-1 Zellen nach einer vorausgegangenen viertägigen Calcitriol-Behandlung geerntet und nach Aufbereitung der Proben die freigesetzten Proteine mittels SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Nach dem Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran und der anschließenden immunologischen Proteindetektion mittels Chemilumineszenz erfolgte die Auswertung der Intensität der entstandenen Banden. Hiernach wurde die Normalisierung der Zielproteine in Bezug auf die Ladekontrolle β -Aktin durchgeführt und die relative Expression zwischen den Behandlungsgruppen verglichen. Es wurden drei biologische Replikate mit jeweils drei technischen Replikaten erstellt.

Wie in Abb. 21 gezeigt, konnte der VDR zunächst in UM-SCC-1 Zellen nachgewiesen werden als Grundvoraussetzung für zellbiologische Effekte von Calcitriol auf UM-SCC-1 Zellen. Allerdings ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der VDR-Expression durch die Calcitriol-Behandlung, sowohl in physiologischen als auch supraphysiologischen Konzentrationen (vgl. Abb. 21 und Abb. 22). Im Vergleich zu den mit Calcitriol behandelten Zellen fällt allenfalls eine leichte Schwächung des β -Aktin Signals in der DMSO-Kontrolle auf.

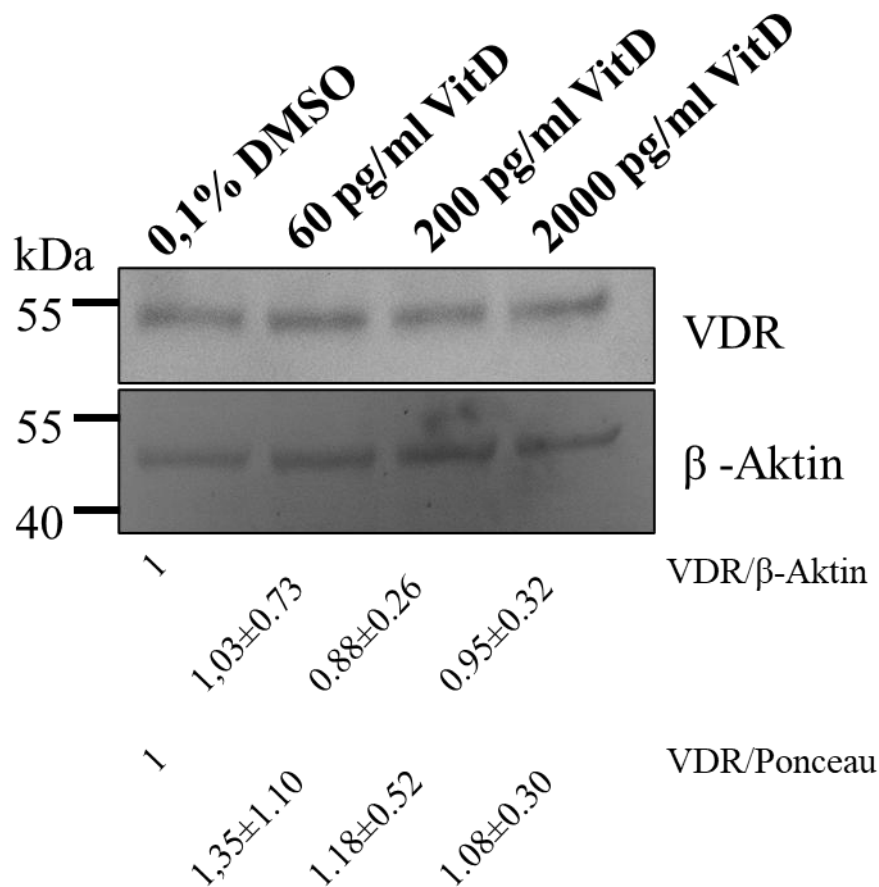


Abb. 21: VDR-Expression in UM-SCC-1 Zellen nach viertägiger Calcitriol-Behandlung unterschiedlich hoher Konzentrationen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. Es fällt lediglich eine leichte Schwächung des β-Aktin Signals in der DMSO-Kontrolle auf.

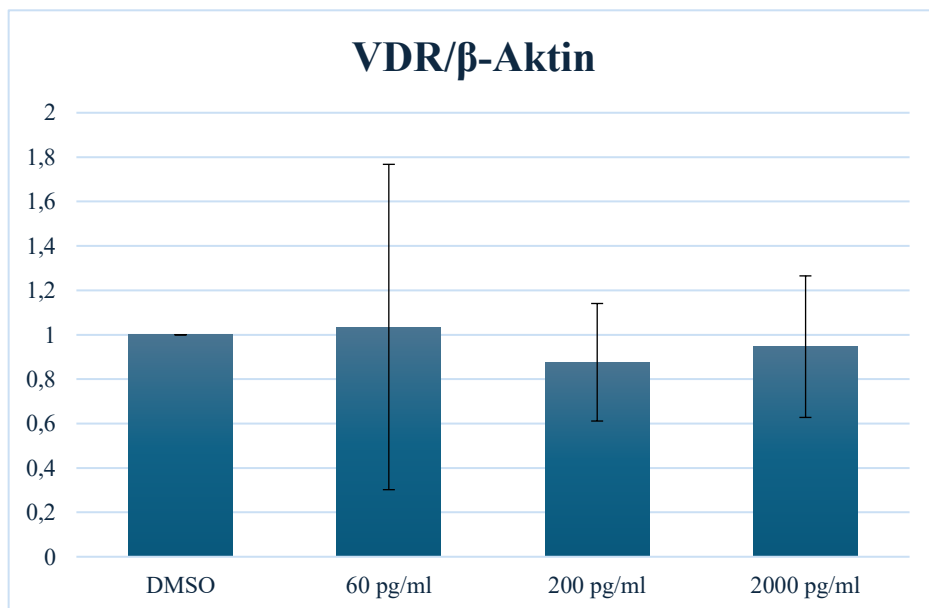


Abb. 22: Analyse des VDR/β-Aktin-Verhältnisses bezogen auf die DMSO-Kontrolle nach viertägiger Behandlung mit Calcitriol in unterschiedlich hohen Konzentrationen. Auf der x-Achse sind die unterschiedlichen Behandlungen dargestellt. Die y-Achse zeigt den prozentualen Wert des

Ergebnisse

VDR/ β -Aktin-Verhältnisses bezogen auf die DMSO-Kontrolle. Die Standardabweichungen (Fehlerbalken) sind ebenfalls angegeben. Es konnten keine statistisch signifikanten Änderungen festgestellt werden.

Generell lässt sich feststellen, dass UM-SCC-1 Zellen über vergleichsweise wenig VDR verfügen im Vergleich zu anderen HNSCC-Zelllinien, bspw. der HNSCC-Zelllinie FaDu (persönliche Mitteilung, Dr. rer. nat. Sandrina Körner, HNO-Forschungslabor, UdS).

Um Schwankungen in der Beladung der Geltaschen sowie eine Beeinflussung von Calcitriol auf das β -Aktin zu prüfen, wurden die VDR-Ergebnisse ebenfalls mit den Ponceau-Ergebnissen verglichen (vgl. Abb. 21 und Abb. 23). Auch hierbei konnte keine statistisch signifikante Beeinflussung der VDR-Expression durch die Calcitriol-Behandlung festgestellt werden.

Des Weiteren ist eine auffällige breite Streuung der Ergebnisse sowohl in der Analyse bezogen auf die β -Aktin-Proben als auch auf die Ponceau-Proben auffällig. Dies ist am ehesten im Rahmen der Mittelung aller drei biologischen Replikate zu interpretieren.

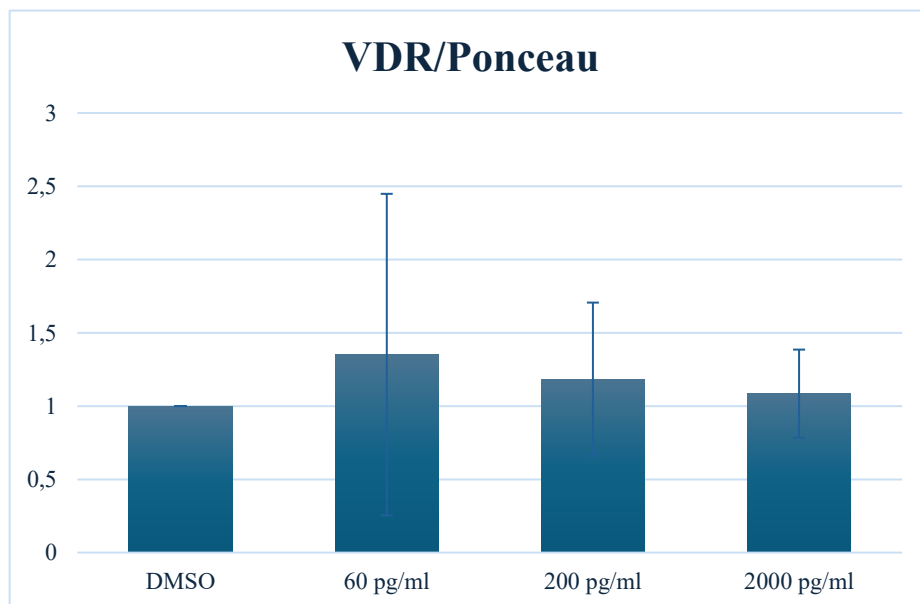


Abb. 23: Analyse des VDR/Ponceau-Verhältnisses bezogen auf die DMSO-Kontrolle nach viertägiger Behandlung mit Calcitriol in unterschiedlich hohen Konzentrationen. Auf der x-Achse sind die unterschiedlichen Behandlungen dargestellt. Die y-Achse zeigt den prozentualen Wert des VDR/Ponceau-Verhältnisses bezogen auf die DMSO-Kontrolle. Die Standardabweichungen (Fehlerbalken) sind ebenfalls angegeben. Es konnten keine statistisch signifikanten Änderungen festgestellt werden.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Vitamin D auf die Proliferation und Migration von UM-SCC-1 Zellen untersucht. Diese Untersuchungen sollten die bisher veröffentlichten vielversprechenden Ergebnisse zu einem möglichen antiproliferativen und migrationshemmenden Effekt von Vitamin D auf humane Tumorzellen anderer Entitäten auch für Kopf-Hals-Karzinome versuchen nachzuweisen und so einen potenziellen neuen Therapieansatz in der Behandlung von HNSCC-Patienten aufzeigen, der langfristig in weiterführenden *in-vivo* Experimenten validiert werden soll. Die physiologische Calcitriol-Konzentration im menschlichen Körper diente der Orientierung, um mögliche Effekte einer ausreichenden Vitamin D Versorgung auf die Karzinomzelllinien zu untersuchen. Da jedoch viele Studien darauf hinwiesen, dass erst höhere Konzentrationen einen Effekt zeigen, wurden neben den zwei physiologischen Konzentrationen (20 pg/ml und 60 pg/ml) im unteren und oberen Bereich ebenfalls zwei hyperphysiologische (200 pg/ml und 2.000 pg/ml) und eine supraphysiologische Konzentration (50.000 pg/ml) gewählt.

5.1 Einfluss von Vitamin D auf die Proliferation von HNSCC-Zellen

Im Fokus der vorgelegten Arbeit stand u.a. die Untersuchung des Einflusses von Vitamin D auf die Proliferationsfähigkeit der HNSCC Zelllinie UM-SCC-1. Dabei wurde insbesondere die Fragestellung behandelt, ob und in welchen Konzentrationen Vitamin D diese Zellen in ihrer Proliferationsfähigkeit beeinflusst und ob die vorangegangene Behandlungsdauer einen Unterschied bewirkt. Zur Durchführung der Proliferations-Experimente wurde das *xCELLigence* RTCA SP System verwendet. Die erzielten Ergebnisse zeigten eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferationsrate nach einer Behandlungsdauer von 4 Tagen. Bereits bei einer Calcitriol-Konzentration von 20 pg/ml, welche die untere physiologische Grenze darstellt, zeigte sich eine signifikante Einschränkung der Tumorzell-Proliferation verglichen zur Kontroll-Behandlung. Es konnte weiterhin eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der Proliferationshemmung und der verwendeten Konzentration von Calcitriol festgestellt werden, wobei die größte Einschränkung durch die Höchstkonzentration von 50.000 pg/ml Calcitriol beobachtet werden konnte. Bei einer siebentägigen Behandlungsdauer konnte ebenfalls für die höchste Behandlungsgruppe (50.000 pg/ml) ein statistisch bedeutsamer antiproliferativer Effekt nachgewiesen werden.

Verschiedene Studien konnten bereits einen antiproliferativen Einfluss von Vitamin D auf HNSCC-Zellen, aber auch auf andere Karzinomtypen, nachweisen (K. C. Chiang, Yeh, Hsu, Chen, et al., 2013; Díaz et al., 2000; Dyson, 1998; Gedlicka et al., 2006; Hager et al., 2001; Jensen et al., 2001; Kingsley et al., 2013; Meier et al., 2007; Pan et al., 2010; Rohan & Weigel, 2009; Samuel & Sitrin, 2008; Satake et al., 2003; Swami et al., 2003; Weinberg, 1995). Sie unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Darüber hinaus wurden bereits einige durch Calcitriol beeinflussbare molekulare Mechanismen

untersucht, welche Erklärungsansätze für die antiproliferative Wirkung von Calcitriol liefern. Im Folgenden soll auf diese Studien näher eingegangen werden.

5.1.1 Konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferationsfähigkeit

Wie zuvor geschildert, konnte in der vorliegenden Arbeit eine positive Korrelation zwischen der verwendeten Calcitriol-Konzentration und der Hemmung der Proliferationsfähigkeit der HNSCC Zelllinie UM-SCC-1 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass Calcitriol als potenzieller Wirkstoff in der Krebstherapie genutzt werden könnte.

Vergleichbare Ergebnisse konnten ebenfalls in anderen Studien unter Verwendung verschiedener HNSCC-Zelllinien mittels verschiedener Proliferationsassays erzielt werden. Im Vergleich zu früheren Arbeiten, wie bspw. von Enepekides et al. aus dem Jahre 1999, die die Proliferationshemmung an der SCC-25-Zelllinie untersuchten, wurden in der vorliegenden Arbeit ein breiteres Spektrum von Calcitriol-Konzentrationen eingesetzt. Während in der Studie von Enepekides höhere Konzentrationen von Calcitriol verwendet wurden (10^{-9} M bis 10^{-7} M, entsprechend ca. 417 bis 41664 pg/ml), konnten in der vorliegenden Arbeit bereits bei vergleichsweise niedrigeren Konzentrationen (20 und 60 pg/ml) eine signifikante Wirkung nachgewiesen werden. Dies gibt Hinweise auf eine gewisse Relevanz von Zelllinien-spezifischen Unterschieden und die Notwendigkeit, diese bei der Evaluierung von Wirkstoffen zu berücksichtigen.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit ein Proliferationsassay verwendet, der es ermöglichte, die Zellantwort präzise zu quantifizieren und mit früheren Studien zu vergleichen. Ein direkter Vergleich mit der Studie von Sundaram et al. aus dem Jahre 2014, die ebenfalls UM-SCC-1 Zellen untersuchten, zeigt ähnliche konzentrationsabhängige Effekte bei Calcitriol-Konzentrationen im Bereich von 10^{-8} M (ca. 4.166 pg/ml). Die vorliegende Arbeit erweitert diese Erkenntnisse, indem sie niedrigere Konzentration evaluiert und deren Effekt auf die Zellproliferation präzise quantifiziert. Zudem ergänzen die Resultate dieser Studie auch die Beobachtungen von Jin et al. (2020), die antiproliferative Wirkungen bei den HNSCC-Zelllinien SCC-9 und CAL-27 zeigten.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit ist die Stabilität der Zellvitalität trotz der hemmenden Wirkung auf die Proliferation. Ähnlich wie in der Arbeit von Kornfehl et al., 1996 blieb die Zellvitalität auch bei höheren Calcitriol-Konzentrationen mit $\geq 82\%$ erhalten. Diese Beobachtungen untermauern die Annahme einer selektiven Beeinflussung der Zellteilungsrate ohne direkte zytotoxische Effekte.

Der Unterschied in der Sensitivität zwischen den untersuchten Zelllinien, wie bspw. die unterschiedliche Reaktion der LF-FR- und JP-PA-Zelllinien auf Calcitriol in Kornfehls Studie, gibt Hinweise auf Zelllinien-spezifische Unterschiede und verdeutlicht die Notwendigkeit, die Ergebnisse in Bezug auf spezifische Zelltypen zu interpretieren. Dies wird ebenfalls von der Studie von K. C. Chiang, Yeh, Hsu, Chen, et al., 2013 untermauert, die im Vergleich zur vorliegenden Arbeit erst bei vergleichsweise höheren Calcitriol-Konzentrationen (10^{-8} M, entspricht ca. 4.166 pg/ml) signifikante antiproliferative

Effekte nachweisen konnten. Auch in nachfolgenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergaben sich vermehrt Hinweise auf Zelllinien-spezifische Unterschiede (Brust et al., 2024).

Zusätzlich zur Proliferationshemmung durch Calcitriol wurden im Kontext dieser Arbeit mögliche zukünftige Ansätze evaluiert, einschließlich der potenziellen Anwendung von Vitamin D-Analoga. Die in Studien wie von K. C. Chiang, Yeh, Hsu, Chen, et al. im Jahre 2013 nachgewiesene potentere antiproliferative Wirkung des Vitamin-D-Analogons 19-nor-2 α -(3-hydroxypropyl)-1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$, auch MART-10 genannt, gegenüber Calcitriol bieten neue Perspektiven für die Optimierung von Vitamin D basierten Therapien. Die hier gewonnenen Erkenntnisse bilden eine Grundlage, um den Einsatz von Calcitriol in der Tumorthherapie von Kopf-Hals-Tumoren weiter zu erforschen.

Zusammengefasst stehen damit die Ergebnisse der bisherigen Studien zum Thema der antiproliferativen Effekte von Calcitriol auf HNSCC-Zelllinien im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Es konnte eine positive Korrelation zwischen verwendeter Calcitriol-Konzentration und antiproliferativer Wirkung auf verschiedene HNSCC-Zelllinien mit einer zunehmenden Proliferationshemmung bei ansteigenden Konzentrationen nachgewiesen werden. Es ergeben sich Hinweise auf eine Zelllinien-spezifische Abhängigkeit hinsichtlich der Calcitriol-Konzentration und der ersten feststellbaren Effekte. Insgesamt konnte in physiologischen Calcitriol-Konzentrationen ein nur geringer Effekt nachgewiesen werden, während mit steigenden, supraphysiologischen Konzentrationen eine deutliche Inhibierung der Zellproliferation beobachtet werden konnte.

5.1.2 Mögliche molekulare Mechanismen der Wirkung von Vitamin D auf Tumorzellen

Die vorliegende Arbeit erweitert das Wissen um die Wirkung von Calcitriol auf die Proliferationsfähigkeit von HNSCC-Zellen und liefert wertvolle Hinweise auf mögliche zugrundeliegende molekulare Mechanismen. Einige der in der Literatur beschriebenen Mechanismen, die mit antiproliferativen Effekten von Calcitriol assoziiert sind, konnten in der vorliegenden Studie in den UM-SCC-1 Zellen nicht nur bestätigt, sondern um neue Befunde ergänzt werden. Die Ergebnisse stärken die Relevanz der untersuchten Zelllinie als Modellsystem für die Erforschung Zelllinien-spezifischer Effekte.

Verschiedene frühere Studien, wie die von Jin et al., 2020, zeigten bereits, dass Calcitriol regulatorische Effekte auf 1045 lange-nicht-kodierende Ribonukleinsäuren (lncRNA), insbesondere LUCAT1, ausüben kann. Sie wiesen eine Überexpression von LUCAT1 in bestimmten HNSCC-Zelllinien wie CAL-27 und SCC-9 nach, während UM-SCC-1 Zellen vergleichsweise niedrigere LUCAT1-Expressionsniveaus aufwiesen. Diese Unterschiede korrelierten mit der Tumorgröße der Patient*innen und der Proliferationsfähigkeit, was auf eine potenzielle Rolle von LUCAT1 als therapeutisches Ziel hindeutet. Auch Zheng et al., 2018 konnten in klarzelligen Nierenzellkarzinomzellen durch das Ausschalten von LUCAT1 einen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhten Anteil von Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus detektieren. Zudem wurde eine erniedrigte Expression der Zellzyklus-

Checkpoint-Proteine Cyclin D1, CDK4 und pRb in den LUCAT1-knock-out Zellen festgestellt. Die vorliegende Arbeit ergänzt diese Erkenntnisse durch die detaillierte Analyse der Proliferationshemmung unter Calcitriol-Behandlung und hebt hervor, dass die Effekte sowohl Konzentrations-als auch Zelllinien-abhängig sind.

Die Beobachtung von Jin et al., 2020, dass die Vitamin D vermittelte Suppression von LUCAT1 den Mitogen-activated-protein-Kinase (MAPK)-Signalweg hemmt könnten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen. Die MAPK-Signaltransduktionskaskade, insbesondere der extrazellulär-signalregulierte-Kinase (ERK)-Weg, spielt eine zentrale Rolle bei der Proliferation von Karzinomzellen (Dhillon et al., 2007). Der MAPK-Signalweg wird durch verschiedene extrazelluläre Signale, wie Wachstumsfaktoren oder Hormone aktiviert. Diese binden an den entsprechenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Wie in Abb. 24 gezeigt, wird durch verschiedene Phosphorylierungsschritte das *rapidly-growing-fibrosarcoma* (Raf)-Protein aktiviert, welches wiederum über die MEK-Kinase die ERK1/2-Kinasen aktiviert. Die aktiven ERK1/2-Kinasen wandern in den Zellkern und phosphorylieren dort Transkriptionsfaktoren (wie ELK-1, c-Fos und c-Jun), Enzyme (bspw. die Ribosomen-S6-Kinase), Zellzyklusregulatoren (wie Cycline und CDKs) und Strukturproteine (wie das Cytoskelettprotein Vimentin) (Cruzalegui et al., 1999; Gille et al., 1992; Murphy et al., 2002; Perlson et al., 2005; Richards et al., 1999; Weber et al., 1997). Eine anhaltende Aktivierung des ERK-Wegs führt zu einer Hemmung von antiproliferativen Prozessen und zu einer erhöhten Zellzyklus-Aktivität (Yamamoto et al., 2006). Die Beeinflussung des MAPK-Signalwegs und somit der ERK1/2-Kinasen durch Vitamin D konnte auch bereits in anderen Zelltypen, wie Osteosarkomazellen und *in-vivo* Modellen mit Ratten gezeigt werden (El-din et al., 2020; Wu et al., 2007).

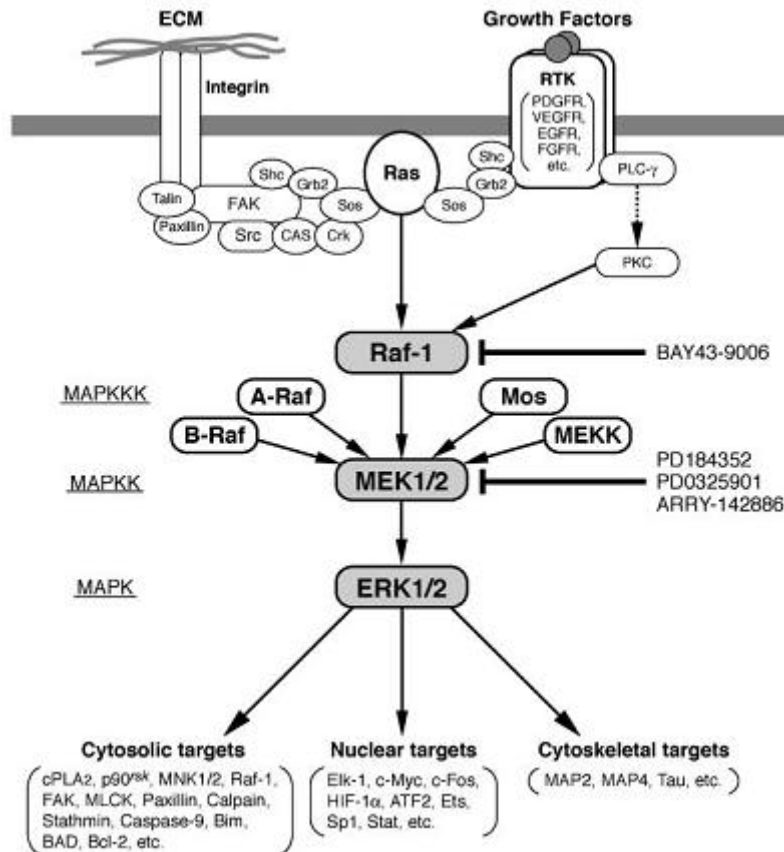


Abb. 24: Schematische Darstellung des ERK-Signalwegs als Bestandteil der MAPK-Signalkaskade. Verschiedene extrazelluläre Signalmoleküle, wie Hormone und Wachstumsfaktoren, führen über Phosphorylierungen, das GTP-bindende Protein *Rat-Sarcoma* (Ras), Raf1 und MEK1/2 zur Aktivierung von ERK1/2. Die ERK1/2 Kinasen beeinflussen im Zellkern diverse Transkriptionsfaktoren, Enzyme, Zellzyklusregulatoren sowie Strukturproteine, welche eine wichtige Rolle in der Proliferationsdynamik der Zelle spielen. Jin et al., 2020 konnten eine Vitamin D vermittelte Hemmung der Phosphorylierung von ERK1/2 feststellen (modifiziert aus Kohno & Pouyssegur, 2006).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen zudem im Einklang mit den Arbeiten von (Gedlicka et al., 2006; Hager et al., 2001; Kornfehl et al., 1996), die eine Calcitriol-induzierte Überexpression von *p21* und *p27* als wichtige Mediatoren des Zellzyklus in verschiedenen HNSCC-Zelllinien nachwiesen. Die Cyclin-abhängigen-Kinase-Inhibitoren verhindern die Phosphorylierung von pRb und führen zu einem Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase (Toyoshima & Hunter, 1994; Xiong et al., 1993).

Ein weiterer Hinweis auf einen durch Calcitriol-beeinflussten molekularen Prozess lieferten Kasiappan et al., 2012. Sie konnten eine durch Calcitriol-induzierte „messenger“-Ribonukleinsäure (mRNA)-vermittelte Reduktion der Telomerase Expression nachweisen. Die Telomerase ist ein Enzymkomplex, der die Länge der Telomere auf den Chromosomen reguliert. Telomere werden während des Zellteilungsprozesses allmählich verkürzt. Erreichen die Telomere eine kritische Länge, stoppt die Zellteilung und die Zelle tritt in eine Phase der Seneszenz oder Apoptose ein (sogenannte Hayflick-Grenze). Neben anderen Karzinomarten zeichnen sich auch HNSCCs durch eine erhöhte Aktivität der Telomerase aus (Shay & Bacchetti, 1997). Durch die verstärkte Aktivierung der Telomerase ist es den Tumorzellen möglich ihre Telomerlänge aufrechtzuerhalten und die Zellteilung fortzusetzen, ohne in

Seneszenz oder Apoptose eintreten zu müssen. Dies ermöglicht eine unkontrollierte Vermehrung und ein fortschreitendes Wachstum des Tumors (Collins & Mitchell, 2002; Hanahan & Weinberg, 2011; Kim et al., 1994). K. C. Chiang, Yeh, Hsu, Chen, et al., 2013 konnten hingegen kein Einfluss auf die Telomerase der FaDu-Zellen (humane Hypopharynxkarzinom-Zelllinie) feststellen. Diese Ergebnisse stärken die Annahme, dass die antiproliferative Wirkung Zelllinien-spezifisch ist und bieten eine Grundlage für zukünftige Untersuchungen, um die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen weiter zu charakterisieren.

Darüber hinaus konnte in dieser Dissertation, ähnlich wie bei K. C. Chiang, Yeh, Hsu, Chen, et al., 2013, kein signifikanter Einfluss von Calcitriol auf die Apoptose der Zellen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der antiproliferative Effekt von Calcitriol primär durch Zellzyklusarrest und Telomerase-Hemmung vermittelt wird, weniger jedoch durch direkte Induktion von Apoptose, wie sie bei anderen Karzinomtypen, wie bspw. Östrogen-Rezeptor positive (ER+) Mammakarzinomzellen, beobachtet wurde (K.-C. Chiang et al., 2012).

Die induzierte Expression von *p21* und *p27* sowie die Hemmung der Telomerase konnte ebenfalls bei der Verwendung des Vitamin-D-Analogons MART-10 gezeigt werden. Zudem wies MART-10 im Vergleich zu Calcitriol einen potenteren Effekt bei niedrigeren Konzentrationen auf (K. C. Chiang, Yeh, Hsu, Chen, et al., 2013). Dies bietet eine interessante Grundlage, um die in dieser Arbeit untersuchten Effekte von Calcitriol auf das Proliferations- und Migrationsverhalten von UM-SCC-1 Zellen weiter einordnen zu können. Die stärkeren Effekte von MART-10 im Vergleich zu Calcitriol bei niedrigeren Konzentrationen liefern Hinweise auf potenzielle therapeutische Ansätze, die in zukünftigen Studien an UM-SCC-1 Zellen geprüft werden sollten.

Über die genannten Arbeiten hinaus konnten weitere Studien eine Beeinflussung von Vitamin D auf die Expression einer Vielzahl verschiedener proliferationsrelevanter Gene in anderen Karzinomtypen nachweisen, wodurch sich weitere molekulare Erklärungsansätze für die beobachteten Effekte von Calcitriol auf die in der vorliegenden Arbeit untersuchten UM-SCC-1 Zellen ergeben. Vermutlich liegen der proliferationshemmenden Wirkung von Calcitriol auf HNSCC-Zellen in Zusammenschau dieser Studien damit wohl pleiotrope Effekte vermittelt durch den aktivierten VDR als Transkriptionsfaktor zugrunde.

Erwähnenswert ist, dass die Expression des Galectin-3-Gens (GAL3), welches in anderen Studien als Ziel für die antiproliferative Wirkung von Calcitriol identifiziert wurde, auch in HNSCC-Zellen eine Rolle spielen könnte. GAL3 ist u.a. an verschiedenen Prozessen im Tumorstoffwechsel beteiligt, begünstigt die Progression verschiedener Tumorerkrankungen, darunter auch die von HNSCCs (Stiasny et al., 2017), und ist mit einer schlechteren Prognose der betroffenen Patienten assoziiert. Ji et al., 2020 konnten eine Suppression der GAL3-Expression und eine damit einhergehende sinkende Proliferationsrate unter einer Calcitriol-Behandlung feststellen. Angesichts der Tatsache, dass GAL3 auch in HNSCCs exprimiert wird, besteht die Möglichkeit, dass der beobachtete Effekt auf die

Proliferation in der vorgelegten Arbeit ebenfalls u.a. durch GAL3 vermittelt wird (Aggarwal et al., 2015; Delorge et al., 2000; Plzák et al., 2004). Hieraus ergibt sich ein möglicher Ansatz für zukünftige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, um diese Hypothese näher in HNSCC-Zellen zu untersuchen.

Zhu et al., 2018 konnten den stimulierenden Einfluss von Vitamin D auf die Expression des Gens *Maternally-expressed-gene-3* (MEG3), das für eine lncRNA kodiert, in kolorektalen Karzinomzellen nachweisen. Die Ergebnisse belegen eine inverse Beziehung zwischen der MEG3-Expression und dem Tumorwachstum, sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo*. Dies legt nahe, dass MEG3 ein wichtiger Faktor u.a. für das Tumorwachstum ist. Darüber hinaus konnte in der gleichen Studie nachgewiesen werden, dass Vitamin D in Kombination mit dem VDR durch direkte Bindung an den Promoter die Expression von MEG3 stimuliert und somit das Tumorwachstum hemmen kann.

Die Arbeit von Sundaram et al., 2014 ergänzt diese Perspektive durch die Hypothese, dass Tumorzellen selbstständig Calcitriol synthetisieren und auf diese Weise ihr Wachstum autokrin regulieren können. Diese zelleigene Produktion von Calcitriol zur eigenen Wachstumsregulation konnte zuvor in Prostatakarzinom-Zellen nachgewiesen werden (Schwartz et al., 1998). In der Tat konnte von der Arbeitsgruppe neben der autologen Vitamin D Synthese in HNSCC-Zellen auch eine Überexpression von CYP2R1 in diesen Zellen und damit deren gesteigerte Kapazität zur Umwandlung von Calcidiol in Calcitriol nachgewiesen werden. Inwiefern dieser Mechanismus der Autoregulation der Proliferation durch von den Tumorzellen selbst synthetisiertes Vitamin D auch *in-vivo* eine relevante Rolle spielt, wird derzeit in weiteren Studien dieser Arbeitsgruppe untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde zwar nicht explizit die Expression von MEG3 oder CYP2R1 untersucht, allerdings könnte die hier beobachtete zwar nicht-signifikante jedoch durchaus auffällige Tendenz der leichten Steigerung von Proliferation und Migration nach Behandlung mit physiologischen Vitamin D Konzentrationen zumindest teilweise durch solche Mechanismen erklärt werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die Relevanz von UM-SCC-1 Zellen als Modellsystem, um zellspezifische Wirkmechanismen von Vitamin D weiter zu erforschen. Es scheint vielversprechend, zukünftig zu untersuchen, ob eine Vitamin D vermittelte Regulation von Faktoren wie MEG3 oder CYP2R1 auch in HNSCC-Zellen zur Proliferationskontrolle beitragen könnte.

Insgesamt zeigen die aufgeführten Studien somit verschiedene Vitamin D vermittelte molekulare Mechanismen, die eine eingeschränkte Proliferationsfähigkeit bewirken können. Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, um die Relevanz dieser Mechanismen in der in dieser Arbeit untersuchten UM-SCC-1 Zelllinie näher zu analysieren und zu evaluieren, welche Mechanismen in der Calcitriol-vermittelten Hemmung der HNSCC-Zellproliferation dominierend sind.

5.1.3 Einfluss der Dauer der Calcitriol-Behandlung auf die Zellproliferation

In dieser Arbeit wurde ebenfalls die Abhängigkeit des proliferationshemmenden Effekts von Calcitriol auf UM-SCC-1 Zellen von der Behandlungsdauer untersucht. Hierfür wurden zwei unterschiedliche

Behandlungszeiträume von 4 und 7 Tagen gewählt. Die Ergebnisse zeigen, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Hemmung der Proliferationsrate und der ansteigenden Calcitriol-Konzentration nach 4 Tagen Behandlung besteht. Im Gegensatz dazu war bei einer Behandlung über 7 Tage ein Effekt erst bei supraphysiologischen Konzentrationen zu beobachten. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Behandlungsdauer nichtlinear mit der Effektivität von Calcitriol korreliert. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass sowohl die Behandlungsdauer als auch die eingesetzte Konzentration entscheidende Faktoren für die antiproliferative Wirkung von Calcitriol sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen in Übereinstimmung mit früheren Studien wie der von Kornfehl et al., 1996 die eine zeitliche Abhängigkeit des antiproliferativen Effektes von Calcitriol auf HNSCC-Zellen dokumentierten. Kornfehl et al., 1996 konnten eine signifikante Hemmung der Proliferation bei einer Behandlungsdauer von 4 Tagen nachweisen. Ähnlich zeigte Enepekides et al., 1999 eine exponentielle Abnahme der Zellproliferation von SCC-25 Zellen, wobei die größte Abnahme bis zum 4. Tag auftrat, unabhängig von der verwendeten Calcitriol-Konzentration. Dies bestätigt die hier beobachtete potenzielle Hemmung nach 4 Tagen und deutet darauf hin, dass sich der antiproliferative Effekt von Calcitriol im frühen Behandlungsverlauf am deutlichsten manifestiert. Zudem legen diese Ergebnisse nahe, dass die Behandlungsdauer nicht isoliert betrachtet werden kann, sondern in Kombination der zelllinien-spezifischen Eigenschaften beurteilt werden muss.

Die vorliegenden Daten verdeutlichen zudem, dass UM-SCC-1 Zellen eine hohe Sensitivität gegenüber Calcitriol aufweisen. Dies bestätigt und ergänzt frühere Erkenntnisse, wie jene von Sundaram et al., 2014, die eine signifikante Hemmung der Proliferation dieser Zelllinien bereits nach einer 24-stündigen Calcitriol-Behandlung dokumentierten. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Sensitivität der UM-SCC-1 Zellen über mehrere Tage hinweg erhalten bleibt bei jedoch längerfristiger Anwendung abnimmt. Stattdessen scheint es eine zeitliche Dynamik mit einem Zeitfenster der optimalen Behandlungsdauer vorzuliegen, bei der die zellulären Mechanismen sensibel auf das Molekül reagieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bei UM-SCC-1 Zellen eine längere Behandlung nicht zwangsläufig mit einer verstärkten Wirkung einhergeht. Dies könnte auf eine zeitliche Anpassung der Zellen an das Calcitriol hinweisen, möglicherweise durch eine veränderte Expression von Zellzyklusproteinen, wie sie in den Studien von Hager et al., 2001 beschrieben wurde. Hier wurden zyklische Schwankungen der durch Calcitriol-induzierten erhöhten Expression von *p21* festgestellt.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Arbeit darauf hin, dass die Behandlungsdauer einen entscheidenden Einfluss auf die antitumorale Wirkung von Calcitriol hat und eine zeitliche Anpassung der Zellen an die zellbiologischen Effekte im Verlauf der Behandlung möglich ist.

5.2 Einfluss von Vitamin D auf die Migration von HNSCC-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben der Proliferationsfähigkeit auch die Migrationsfähigkeit von UM-SCC-1 Zellen unter einem konzentrations- und zeitabhängigen Einfluss einer Calcitriol-

Behandlung untersucht. In physiologischen Konzentrationen (60 pg/ml) konnte zunächst eine Steigerung der Migration detektiert werden, während in den supraphysiologischen Konzentrationen (200 pg/ml und 2.000 pg/ml) die Migration unbeeinflusst blieb. Diese Ergebnisse unterstreichen die Komplexität des Migrationsverhaltens in Abhängigkeit von der Calcitriol-Konzentration und heben die Notwendigkeit einer differenzierten Betrachtung der Wirkungen im physiologischen und supraphysiologischen Bereich hervor.

Die vorliegenden Ergebnisse unterscheiden sich von den Studien von S. W. Yang et al., 2016, die einen konzentrationsabhängigen migrationshemmenden Effekt von Calcitriol auf die HNSCC-Zelllinien FaDu und SCC-25 beschrieben. Dabei wurden jedoch deutlich höhere Konzentrationen von Calcitriol (10^{-7} und 10^{-8} M, entsprechen 4.166 und 41.664 pg/ml) über 2 Tage eingesetzt. Dies führte zu einer signifikanten Reduktion der Migration, die in der vorliegenden Arbeit mit niedrigeren Konzentrationen von Calcitriol nicht erreicht wurde. Die Diskrepanz lässt sich möglicherweise auf die Konzentrationsunterschiede zurückführen, da selbst bei einer vergleichsweise hohen Konzentration von 4.166 pg/ml in der Studie von S. W. Yang et al., 2016 lediglich eine moderate Reduktion der Migration um 8 % dokumentiert wurde. Es wird somit deutlich, dass migrationshemmende Effekte von Calcitriol bei UM-SCC-1 Zellen möglicherweise erst bei supraphysiologischen Konzentrationen auftreten, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden. Erneut sollten an dieser Stelle Zelllinien-spezifische Effekte als mögliche Ursache für die Diskrepanz der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Darüber hinaus wurden in S. W. Yang et al., 2016 umfangreiche Versuche im Hinblick auf den Einfluss von Calcitriol auf die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) durchgeführt. Die EMT beschreibt, wie in Abb. 25 gezeigt, einen zentralen Prozess u.a. in der Tumorprogression, der eine erhöhte Zellmigration und -invasion fördert. Die EMT ist gekennzeichnet durch molekulare Veränderungen wie die Herabregulierung des epithelialen Markers E-Cadherin, die gleichzeitige Hochregulieren von N-Cadherin (Cadherin-Switch) sowie die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Snail, Slug und Twist (Derycke et al., 2004; Kalluri & Weinberg, 2009). Diese Faktoren modulieren die Zell-Zell-Adhäsion und tragen zur erhöhten Mobilität von Tumorzellen bei. S. W. Yang et al., 2016 konnte eine durch Calcitriol vermittelte Stimulation von E-Cadherin und eine Suppression von N-Cadherin sowie der Transkriptionsfaktoren wie Snail und Twist in der FaDu-Zelllinie nachweisen. Vergleichbare Mechanismen wurden in der vorliegenden Arbeit mit UM-SCC-1 Zellen nicht untersucht und bleiben daher ein interessanter Ansatzpunkt für zukünftige Experimente.

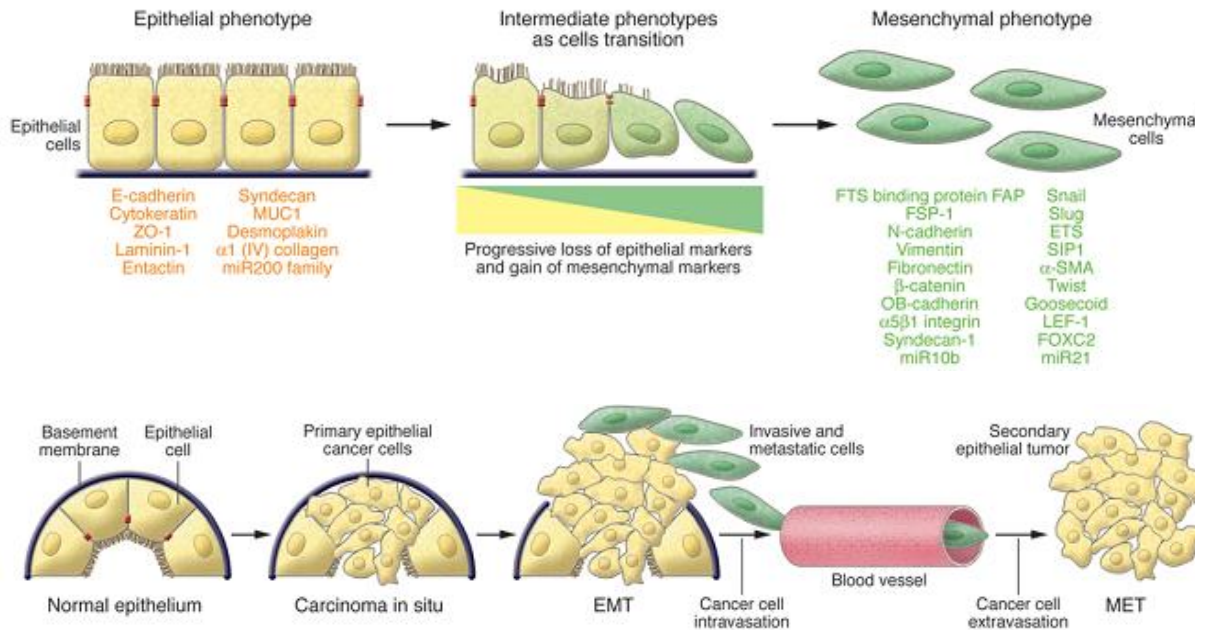


Abb. 25: Die molekularen Prozesse der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition und die Rolle von EMT bei der Karzinomprogression. Während der EMT unterziehen sich Epithelzellen phänotypischen und funktionellen Veränderungen. Zunächst verlieren sie ihre charakteristische apikal-basolaterale Polarität, und die Zell-Zell-Verbindungen werden aufgelöst. Diese strukturellen Veränderungen führen zur Dissoziation der geordneten epithelialen Architektur. Gleichzeitig erfolgt die Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts, was den Zellen eine erhöhte Flexibilität und Mobilität verleiht. Infolgedessen erwerben sie mesenchymale Eigenschaften, die durch eine gesteigerte Beweglichkeit und Invasivität charakterisiert sind. Die EMT spielt eine zentrale Rolle in der Karzinogenese, insbesondere bei der Progression und Metastasierung. Sie ermöglicht den Zellen, sich von der Primärtumormasse zu lösen und befähigt sie, in benachbartes Gewebe einzudringen und sich durch die extrazelluläre Matrix zu bewegen. Diese Fähigkeit ist entscheidend für die Bildung von Metastasen. Für die EMT sind verschiedene molekulare Prozesse erforderlich, die u.a. auf der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren beruhen (modifiziert aus Kalluri & Weinberg, 2009).

Darüber hinaus beobachteten S. W. Yang et al., 2016 eine reduzierte Expression der MMP-9 unter Calcitriol, ein Effekt, der bereits in früheren Studien beschrieben wurde (Bao et al., 2006; Koli & Keski-Oja, 2000; Schwartz et al., 1997; Timms et al., 2002). MMP-9 trägt zur Förderung der EMT und der mit verbundenen Migration und Invasion von Karzinomzellen bei (Farina & Mackay, 2014). Da erhöhte MMP-9 Serumlevel bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren nachgewiesen wurden (Lotfi et al., 2015), erscheint eine Hemmung von MMP-9 auch für UM-SCC-1 Zellen als potenziell relevanter Mechanismus. Dies eröffnet vielversprechende Perspektiven für zukünftige Untersuchungen.

S. W. Yang et al., 2016 konnte den migrationsreduzierenden Einfluss über die Hemmung der EMT ebenfalls bei Verwendung von MART-10 nachweisen. Auch in K. C. Chiang et al., 2014 konnte dieser Effekt bei Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen werden. Obwohl Calcitriol-Analoga in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden, bleibt die Regulation der EMT ein zentraler Mechanismus, der auch bei UM-SCC-1 Zellen relevant sein könnte. Die in der Literatur beschriebenen Zusammenhänge legen nahe, dass sich eine vertiefte molekulare Untersuchung dieses Prozesses lohnen könnte.

Eine weitere potenzielle migrationshemmende Wirkung von Calcitriol wurde in der Studie von Zhu et al., 2018 beschrieben, die eine direkte Abhängigkeit der Zellmigration von der MEG3-Expression bei kolorektalen Karzinomzellen aufzeigte (siehe Kapitel 5.1.2). Es wurde beobachtet, dass eine Überexpression von MEG3 die Migrationsfähigkeit hemmte, während der knock-out von MEG3 zu einer verstärkten Migration führte. Zudem wurde *in-vivo* eine verminderte Metastasierung bei Mäusen nach Injektion von MEG3-positiven Karzinomzellen nachgewiesen. Besonders relevant für die vorliegende Arbeit ist die Feststellung, dass eine Calcitriol-Behandlung mit einer erhöhten MEG3-Expression korreliert war, da dies einen möglichen molekularen Mechanismus für die Migrationshemmung durch Calcitriol darstellen könnte. Dieser Mechanismus könnte auch bei UM-SCC-1 Zellen eine Rolle spielen.

Ji et al., 2020 berichteten von einer Hemmung der Migrationsfähigkeit von Ovarialkarzinomzellen nach Behandlung mit 10^{-7} M Calcitriol (entspricht 41.664 pg/ml). In derselben Studie wurden auch ein hemmender Effekt von Calcitriol auf die Expression von GAL3 festgestellt. Die Überexpression von GAL3 erhöht die Zellmigration, wohingegen die Kombination einer Vitamin-D-Behandlung mit einer Reduktion der GAL3-Expression die ausgeprägteste Hemmung der Zellmigration bewirkte. Diese Beobachtungen unterstreichen die Rolle spezifischer molekularer Zielstrukturen, wie GAL3, bei der Migration. Dieser Mechanismus könnte auch bei UM-SCC-1 Zellen zur migrationshemmenden Wirkung von Calcitriol beitragen und wäre daher ein lohnender Fokus für weiterführende Studien.

Darüber hinaus wiesen Jin et al., 2020, wie bereits in Kapitel 5.1.2 erwähnt, eine Vitamin-D-vermittelte Suppression des ERK-Zweigs des MAPK-Signalwegs nach. Dieser Signalweg reguliert sowohl die Zellproliferation als auch die Zellmigration, u.a. durch Phosphorylierung struktureller Proteine wie des Cytoskelettproteins Vimentin (Perlson et al., 2005; Zamoner et al., 2007). Die Regulation von Signalwegen wie ERK stellt eine potenzielle Grundlage für die in anderen Zelllinien beobachteten migrationshemmenden Effekten von Calcitriol dar. Die Rolle von ERK bei der Migration von UM-SCC-1 Zellen bleibt jedoch experimentell zu klären.

Zudem konnten Zheng et al., 2018 eine LUCAT1-vermittelte Steigerung der Zellmobilität nachweisen. Da Jin et al., 2020 ein Einfluss von Vitamin D auf u.a. LUCAT1 feststellen konnten, ist davon auszugehen, dass neben den antiproliferativen Effekten (siehe Kapitel 5.1.2) auch eine Vitamin D vermittelte Suppression von LUCAT1 in einer migrationshemmenden Wirkung resultieren könnte. Angesichts der literaturgestützten Relevanz von LUCAT1 könnte auch dieser Mechanismus bei zukünftigen Untersuchungen von UM-SCC-1 Zellen berücksichtigt werden.

Zusammenfassend konnten in den genannten Studien Vitamin-D-induzierte migrationshemmende Effekte in verschiedenen Karzinomzelltypen, darunter auch FaDu Zellen, nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung von UM-SCC-1 Zellen nicht bestätigt werden. Ein möglicher Erklärungsansatz stellen Zelllinien-spezifische Effekte von Calcitriol dar, was durch die Beobachtung gestützt wird, dass wie in den voranstehenden Studien dargestellt je nach

Zelllinie die migrationshemmenden Effekte von Calcitriol unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Auch in anschließenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergaben sich hierfür Hinweise (Brust et al., 2024). Zudem wurden in der vorliegenden Arbeit vergleichsweise geringe Konzentrationen an Calcitriol verwendet mit einer Tendenz zu einem Rückgang in den höheren Konzentrationen verglichen mit der hoch-physiologischen Konzentration (60 pg/ml). Somit deutete sich tendenziell ein Rückgang der Migration auch von UM-SCC-1 Zellen bei weiter steigenden Konzentrationen an Calcitriol an, was allerdings einer experimentellen Bestätigung bedarf. In der vorliegenden Arbeit wurden tendenziell niedrigere Calcitriol-Konzentrationen gewählt, um keine Konzentrationen weit außerhalb des physiologischen Bereichs beim Menschen zu untersuchen und so auch eine gute Übertragbarkeit auf die klinische Situation und einen möglichen therapeutischen Ansatz gewährleisten zu können.

5.3 Untersuchung der VDR-Expression auf UM-SCC-1 Zellen und dessen Beeinflussung durch Vitamin D

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit konnte VDR auf UM-SCC-1 Zellen mittels Western Blot Analyse nachgewiesen werden. Daher ist anzunehmen, dass die in dieser Arbeit nachgewiesenen Calcitriol-induzierten Effekte auf die Proliferation und Migration von UM-SCC-1 Zellen durch den VDR vermittelt werden. In anderen Arbeiten wurde ebenfalls VDR in verschiedenen HNSCC-Zelllinien einschließlich FaDu und SCC-25 nachgewiesen (K. C. Chiang, Yeh, Hsu, Chen, et al., 2013). Allerdings scheinen UM-SCC-1 Zellen im Vergleich zu FaDu Zellen, die ebenfalls in unserem Forschungslabor regelmäßig in *in-vitro* und *in-vivo* Experimenten genutzt werden, weit weniger VDR zu exprimieren (persönliche Mitteilung, Dr. rer. nat. Sandrina Körner, HNO-Forschungslabor, UdS).

Es konnten keine Veränderungen in der VDR-Expression durch eine viertägige Calcitriol Behandlung mit 60 pg/ml, 200 pg/ml und 2.000 pg/ml gezeigt werden. Abweichend davon wurde in einigen Studien der letzten Jahre jedoch eine vermehrte Expression von VDR nach Calcitriol-Behandlung bei anderen HNSCC-Zelllinien im Sinne einer VDR-Induktion gezeigt. Allerdings erfolgten die Nachweise größtenteils mittels VDR-mRNA Messung mittels real-time reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) oder Messung der β -Galaktosidase-Aktivität (Enepekides et al., 1999; Gedlicka et al., 2006; Kornfehl et al., 1996; Sundaram et al., 2014). Zudem wurden vergleichsweise hohe Calcitriol-Konzentrationen verwendet (10^{-7} - 10^{-9} M, entspricht ca. 417 - 41.664 pg/ml). Daher ist es möglich, dass durch die geringe Menge an VDR auf den UM-SCC-1 Zellen eine Vitamin D vermittelte Steigerung der VDR-Expression nicht detektierbar war. Außerdem könnten die im Vergleich geringeren Mengen an Calcitriol ausschlaggebend für diese abweichende Beobachtung gewesen sein. Zudem liefert die VDR-mRNA Messung lediglich eine Aussage über die mRNA-Expression eines Proteins, während der Western Blot direkt den Proteingehalt, der letztlich für die zellulären Effekte entscheidend ist, nachweist. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen Studien, die eine VDR-Induktion nach Calcitriol-Behandlung zeigen, und den hier erzielten Ergebnissen könnte sein, dass Calcitriol zwar die mRNA-Expression von VDR steigert, dies jedoch nicht zwangsläufig zu einer

erhöhten Proteinproduktion führt. Posttranskriptionale Regulationsmechanismen oder eine erhöhte Proteinabbau-Rate könnten verhindern, dass die gesteigerte mRNA-Expression mit einer messbaren Zunahme des Proteins einhergeht. Dies könnte insbesondere bei UM-SCC-1 Zellen von Bedeutung sein, da diese ohnehin eine geringe VDR-Expression aufweisen.

Neben den bekannten immunmodulierenden VDR-vermittelten Effekten von Vitamin D (vgl. Kapitel 2.3.1), konnte in vorausgegangenen Studien eine Vitamin-D-vermittelte Stimulation zur Differenzierung von Tumorzellen nachgewiesen werden (Gocek & Studzinski, 2009). Eine reduzierte Anzahl an VDR-Rezeptoren wurde dabei mit schlecht differenzierten und aggressiveren Tumorentitäten in Zusammenhang gebracht. Einige Krebszellen durchlaufen unter dem Einfluss von Calcitriol einen Differenzierungsprozess und zeigen sich biologisch letztlich weniger aggressiv (Hendrickson et al., 2011; Lopes et al., 2010; Thill et al., 2010; Zhang et al., 2014). In Anbetracht der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen geringen VDR-Expression auf UM-SCC-1 Zellen könnte dieser Mechanismus hier jedoch nur eingeschränkt wirksam sein.

5.4 Klinische Relevanz von Vitamin D in der Kopf-Hals-Onkologie

Die Verwendung von Vitamin D zur Prävention und Therapie in der Onkologie ist in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus der Forschung gerückt. Insbesondere in der Kopf-Hals-Onkologie besteht ein wachsendes Interesse daran, den potenziellen Einfluss von Vitamin D auf die Entstehung und den Verlauf von Tumoren in diesem Bereich zu untersuchen. Auch die vorliegende Arbeit liefert einen weiteren Hinweis auf einen potenziellen Nutzen von Vitamin D in der Therapie von HNSCCs. In anderen weiteren präklinischen Modellen konnten ebenfalls eine Vielzahl von Vitamin D vermittelten Wirkmechanismen gezeigt werden. Allerdings müssen einige Punkte für die Translation in die klinische Praxis beachtet werden, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

In bisherigen Studien konnten bereits durch eine ausgewogene Vitamin D Versorgung sowohl eine Reduktion der Prävalenz von HNSCCs als auch ein positiver Effekt auf das Immunsystem von onkologischen Patienten nachgewiesen werden (Afzal et al., 2013; Bochen et al., 2018; Fanidi et al., 2016). Dem gegenüber stehen Studien, die keinen Zusammenhang zwischen dem Vitamin D Serum-Spiegel und einem erhöhten Karzinomrisiko des Ösophagus, Magen, Oropharynx und Larynx nachweisen konnten (Abnet et al., 2010; Arem et al., 2011). Bei jedoch zusätzlicher Relevanz von Vitamin D im Knochen- und Calciumstoffwechsel und bei guter Verträglichkeit einer medikamentösen Substitution ist bis zur abschließenden Klärung ohnehin eine ausgewogene Vitamin D Versorgung in der Bevölkerung und insbesondere bei onkologischen Patienten anzustreben.

Die Zusammenschau vieler präklinischer Studien ergab (siehe Kapitel 5.1.1), dass ein Vitamin D vermittelter antiproliferativer Effekt vor allem bei Verwendung hoher Konzentrationen nachgewiesen werden konnte (Enepekides et al., 1999; Sundaram et al., 2014). Klinische Studien gibt es hinsichtlich Vitamin D und HNSCCs kaum, jedoch wurden in anderen onkologischen Fachbereichen

Untersuchungen dazu durchgeführt. Arnaout et al., 2019 untersuchten den Einfluss von Vitamin D auf die Proliferation und Apoptose von Mammakarzinomzellen nach zwei- bis sechswöchiger Vitamin D Einnahme von Brustkrebspatientinnen vor einer ablativen Brust-OP. Die Proliferation wurde mittels des Ki67-Indexes und die Apoptose durch die Messung der *cleaved-caspase-3* (CC3) ermittelt. Hierbei konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden. In einer ähnlichen Studie mit ebenfalls Brustkrebspatientinnen konnten ebenfalls keine relevanten Effekte von Vitamin D auf die Mammakarzinomzellen gezeigt werden (Urata et al., 2014). Zeichner et al., 2015 konnten zwar keinen signifikanten Einfluss einer Vitamin D Behandlung hinsichtlich des Gesamtüberlebens der nicht-metastasierten Brustkrebspatientinnen zeigen, jedoch ergaben die Untersuchungen ein verbessertes krankheitsfreies Überleben der Patientinnen unter einer parallel zur Behandlung durchgeführten Vitamin D Behandlung. Wagner et al., 2013 behandelten Prostatakarzinompatienten mit unterschiedlich hohen Dosen von Vitamin D (400-40.000 IE/Tag; aktuelle Tagesdosis-Empfehlung 800 IE/Tag). Es konnte hierbei kein signifikanter Unterschied der Expression des Proliferationsmarkers Ki67 im Prostatakarzinomgewebe zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen gezeigt werden, allerdings wurde eine inverse Korrelation zwischen dem Calcitriol-Serumspiegel der Patienten und Ki67 sowohl in gesundem Gewebe als auch im Prostatakarzinomgewebe gezeigt.

All diese klinischen Studien weisen auf die noch weit unzureichende Datenlage und potenziellen Schwierigkeiten hinsichtlich einer klinischen Translation der präklinischen Ergebnisse hin. Obwohl im Vergleich zur empfohlenen Tagesdosis hohe Vitamin D Konzentrationen verwendet wurden, konnten teilweise keine oder nur geringe Auswirkungen auf insbesondere die Proliferation der Karzinomzellen festgestellt werden. Möglicherweise wäre es für zukünftige Studien sinnvoll, eine Kombination aus Vitamin D und anderen antitumoralen Substanzen, bspw. Immuntherapeutika einschließlich Checkpoint-Inhibitoren zu untersuchen. Potenzielle synergistische Effekte sind hier vor dem Hintergrund der bekannten immunstimulierenden Wirkung von Vitamin D denkbar.

Eine weitere Problematik der Verwendung hoch- bis supraphysiologischer Vitamin D Konzentrationen ergibt sich aus der maßgeblichen Beteiligung von Vitamin D am Calcium-Phosphat-Stoffwechsel des Menschen. Zum Erreichen solch hoher Calcitriol-Konzentrationen, wie sie teilweise in den zuvor dargestellten *in-vitro* Untersuchungen verwendet wurden, wäre eine teils deutliche Überdosierung notwendig, welche jedoch das Risiko einer Hyperkalzämie mit sich bringt. Dies kann zu Herzrhythmusstörungen, Hypertonie, einem erhöhten Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, einer Beeinträchtigung des Nervensystems mit Verwirrtheit, Gedächtnisstörungen, Müdigkeit und Schlafstörungen, einer Schädigung der Nierenfunktion bis hin zum Nierenversagen, Nierensteinen, Osteoporose sowie Problemen im Verdauungssystem mit Symptomen wie Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen und Obstipation führen. Dies unterstreicht die Schwierigkeit der vergleichsweise geringen therapeutischen Breite von Vitamin D im Vergleich zu anderen Vitaminen und Hormonen, was in der Planung von klinischen Studien unbedingt berücksichtigt werden müsste.

Diese potenzielle Problematik wurde von Swami et al., 2012 untersucht. Sie wiesen in einem *in-vivo* Modell eine Vitamin D bedingte Reduktion des Tumorwachstums von Mamma- und Prostatakarzinomen in Mäusen nach. Es wurden sowohl Vitamin D₃ Supplemente als auch Calcitriol verwendet. Während die Behandlung mit Calcitriol zu einem leichten Anstieg des Calciumserumspiegels führte, blieb der Calciumserumspiegel bei der Verabreichung von Vitamin D₃ (5.000 IE/kg) konstant. Dies spricht gegen eine befürchtete Vitamin D induzierte Hyperkalzämie auch bei deutlich höheren Dosierungen der Supplementation als in der klinischen Praxis üblich und deutet an, dass die Gefahr einer Hypervitaminose möglicherweise weniger hoch ist als allgemein angenommen.

Eine weitere Möglichkeit zur Umgehung einer Hyperkalzämie wäre die Verwendung von Vitamin-D-Analoga, bspw. MART-10. MART-10 hat in bisherigen Studien überwiegend bei potenterer antiproliferativer und migrationshemmender Wirkung keinen Effekt auf den Calciumstoffwechsel gezeigt (K. C. Chiang, Yeh, Hsu, Yeh, et al., 2013).

Zudem konnte hier auch ein Unterschied in dem Effekt auf Mamma- und Prostatakarzinome detektiert werden. Mammakarzinomzellen reagierten mit einer ausgeprägteren Hemmung in der Proliferation als Prostatakarzinomzellen. Dies unterstützt die Annahme, dass die Vitamin D induzierten Effekte sich je nach Zelllinie und Karzinomart unterscheiden. Ein möglicher Grund wäre eine unterschiedliche Expression von VDR der Zellen. Dennoch handelt es sich um eine *in-vivo* Studie an Mäusen, die natürlich nur eingeschränkte Rückschlüsse auf den menschlichen Organismus zulässt und erneut auf die Notwendigkeit klinischer Studien hinweist.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, inwiefern auch gesundes Gewebe von den antiproliferativen Effekten beeinträchtigt wäre. Die Studien weisen, wie bereits in Kapitel 5.1.2 und 5.2 ausgeführt, darauf hin, dass sich Vitamin D hinsichtlich seiner Proliferations- und potenziell Migrations-hemmenden Effekte vor allem auf sich schnell und häufig teilende Zellen auswirkt und daher vor allem Karzinomzellen betroffen wären. Smith et al., 1986 konnten allerdings auch eine antiproliferative Wirkung auf Keratinozyten nachweisen. Es besteht also die Gefahr, dass durch eine Vitamin D Überversorgung auch andere physiologisch sich schnell und häufig teilende Zellen beeinträchtigt werden könnten.

Zusammenfassend braucht es auf Basis der bisher noch deutlich eingeschränkten Evidenz und Datengrundlage weitere, insbesondere *in-vivo* Untersuchungen sowie klinische Studien um die klinische Translation von Vitamin D als Präventionsmaßnahme oder Therapiemöglichkeit in der Kopf-Hals-Onkologie zu überprüfen.

5.5 Methodische Aspekte und Limitation

Um eine umfassende Interpretation der Ergebnisse zu ermöglichen, ist es von entscheidender Bedeutung, die verwendeten Methoden sowie ihre möglichen Einschränkungen zu betrachten. Insgesamt wurden in dieser Arbeit vergleichsweise geringe Calcitriol-Konzentrationen verwendet. In

den bisherigen Studien konnten antiproliferative und migrationshemmende Effekte in weit über dem physiologischen Calcitriol-Serumspiegel gemessen werden.

Auch muss die biologische Stabilität des Calcitriols unter den in unserer Arbeitsgruppe verwendeten Zellkulturbedingungen betrachtet werden. K. C. Chiang, Yeh, Hsu, Chen, et al., 2013 konnten einen Abfall der biologischen Calcitriol-Effekte durch das Messen von der CYP24A1 nach erst 36 h feststellen. Der Mediumwechsel, inklusive des Calcitriols, nach 24 h, wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, ist daher eine sinnvolle Maßnahme gewesen. Jedoch bleibt die Frage, wie thermostabil Calcitriol ist und wie groß der Einfluss kleinster Temperaturschwankungen, ausgelöst bspw. durch das Öffnen und Schließen des Wärmeschanks, ist. Zusätzlich ist Calcitriol lichtsensibel. Auch hier könnte es durch die Arbeit unter der Sterilwerkbank, durch das Öffnen des Wärmeschrankes, und Ähnlichem zu einem Wirkverlust des Calcitriols gekommen sein.

Zudem wurden die Versuche nur mit einer Zelllinie durchgeführt. Dies basierte auf der ausgeprägten Erfahrung mit der Zelllinie UM-SCC-1 und den bereits mit dieser Zelllinie in unserer Arbeitsgruppe etablierten *in-vivo* Modellen, die in nachfolgenden Untersuchungen eingesetzt werden sollen. Die ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe häufig genutzte FaDu-Zelllinie kann basierend auf Voruntersuchungen in Boyden-Chamber-Migrationsassays nur wenig sinnvoll analysiert werden, so dass auf Untersuchungen mit dieser zweiten Zelllinie in der vorliegenden Arbeit bewusst verzichtet wurde. Da, wie bereits in der Diskussion geschildert, die Effekte von Calcitriol zelllinienspezifisch gewisse Unterschiede aufweisen, wäre es sicherlich sinnvoll weitere HNSCC-Zelllinien neben den beiden zuvor genannten in vergleichbaren Experimenten zu untersuchen.

Dabei sollten insbesondere auch HPV-positive HNSCC-Zelllinien, wie bspw. UM-SCC-47 oder 93-VU-147 Zelllinie verwendet werden, um der biologischen und molekularen Vielfalt der HNSCCs des Menschen gerecht zu werden.

5.5.1 Methodische Aspekte und Limitation des Proliferationsassays

Durch die Vorbehandlung mit Calcitriol der Zellen und der einmaligen Zugabe zu Beginn des Proliferationsassays konnten nur die nachhallenden Effekte auf die Proliferation im von uns verwendeten *xCELLigence* System gemessen werden. Ein Mediumwechsel einschließlich des Calcitriols während der laufenden Proliferationsmessung konnte nicht durchgeführt werden, da hierfür die Zellen aus dem RTCA-Messsystem entnommen werden müssten, was erfahrungsgemäß mit einer deutlichen passageren Beeinflussung des Proliferationsverhaltens einhergeht. Dies erschwert die Aussagekraft bezüglich des direkten Vitamin D Einflusses. Die Sensitivität macht das *xCELLigence* System ebenfalls sehr anfällig für Pipettierfehler kleinsten Ausmaßes. Dies liefert einen möglichen Erklärungsansatz für die teilweise recht große Streuung der technischen Replikate.

Wie in Kapitel 3.2.7 näher geschildert, basiert das *xCELLigence* System auf der Messung von elektrischen Impedanzänderungen, die durch die Adhäsion von Zellen an eine Oberfläche entstehen.

Jedoch ist zu beachten, dass nicht alle Zelltypen die gleiche Adhäsionseffizienz aufweisen. Einige Zellen können nicht gut auf den Elektroden haften oder zeigen unterschiedliche Adhäsionsmuster, was zu unzuverlässigen oder ungenauen Messungen führen kann. Darüber hinaus ist das *xCELLigence* System von der Zellmorphologie abhängig. Durch eine reine Vergrößerung der Auflagefläche der Zellen kann es zu einer Erhöhung des Zellindex kommen, obwohl die Proliferationsrate stagniert. Dies wurde bereits bei den verwendeten UM-SCC-1 Zellen beobachtet (persönliche Mitteilung, Dr. rer. nat. Florian Bochen, HNO-Forschungslabor, UdS). Dies könnte eine Erklärung für die teilweise statistisch nicht signifikanten Ergebnisse der siebentägig behandelten Zellen sein.

Außerdem waren die genauen zeitlichen Phasen des exponentiellen Wachstums der Zellen sowohl innerhalb der technischen als auch zwischen den biologischen Replikaten teilweise unterschiedlich und zeitlich verschoben. Es wurden daher individuell die Zeiten der exponentiellen Proliferationsphase bestimmt und diese für die Quantifizierung der Proliferationsfähigkeit über die Steigung der Zellwachstumskurve genutzt. Dies erfolgte manuell und ist daher prinzipiell anfällig für jegliche Manipulation.

5.5.2 Methodische Aspekte und Limitation des Migrationsassays

Bei der Auswertung der Migrationsassays konnte kein statistisch signifikanter Calcitriol-induzierter migrationshemmender Effekt erfasst werden. Da der antiproliferative Effekt ebenfalls erst in hoher Dosierung erreicht werden konnte und im Hinblick auf die schon vorhandenen Studien mit ebenfalls sehr hohen Calcitriol-Konzentrationen, wäre es sinnvoll nachfolgende migrationsanalysierende Versuche mit höheren Calcitriol-Konzentrationen, beginnend ab bspw. 50.000 pg/ml, durchzuführen.

Die Auswertung der Migrationsassays basiert auf der manuellen Aufnahme von drei repräsentativen Bildern der migrierten Zellen. Da sich die Zellen bevorzugt in der Mitte sowie am Rand der Membran anlagern, kann die Auswahl geeigneter Bildausschnitte mitunter herausfordernd sein. Ein Vorteil dieses Verfahrens liegt jedoch in der objektiven, semiautomatisierten Zellzählung, die eine zuverlässige Quantifizierung ermöglicht. Für zukünftige Studien wäre es ggfs. empfehlenswert, verschiedene Methoden zur Analyse der Zellmigration zu evaluieren, wie bspw. neben den Boyden-Chamber-Assays auch Scratch-Assays oder das RTCA-CIM-Plate-System zum *real-time*-Migrationsmonitoring.

5.5.3 Methodische Aspekte und Limitation des Western Blots

Die UM-SCC-1 Zellen besitzen im Vergleich zu anderen HNSCC Zelllinien basierend auf den Experimenten in unserer Arbeitsgruppe relativ wenig VDR. Daher wäre es interessant, die Versuche mit einer anderen HNSCC-Zelllinie mit einer höheren Expression von VDR durchzuführen. Es ist denkbar, dass bei diesen Zelllinien Vitamin D eine noch ausgeprägtere Wirkung zeigen könnte. Ebenfalls ist es fraglich, ob die hier verwendeten Calcitriol-Konzentrationen überhaupt ausreichen, um einen Effekt über den eher niedrigen VDR-Proteinlevel zu erzielen. In anderen Studien wurden vergleichsweise höhere Calcitriol-Konzentrationen verwendet (vgl. Kapitel 5.3).

Allgemein zeichnet sich der Western Blot durch eine hohe Spezifität aus, da durch den Einsatz von Primär- und Sekundärantikörpern gezielt einzelne Proteine identifiziert werden können. Zudem erlaubt diese Methode eine semi-quantitative Analyse der Proteinexpression, indem die Signalintensität mit Referenzproteinen oder Loading-Kontrollen wie bspw. β -Aktin verglichen wird. Jedoch ist die Quantifizierung der Proteine nur bedingt genau, da das Signal durch verschiedene Faktoren wie Sättigungseffekte oder Unterschiede in der Antikörperbindung beeinflusst werden kann und eine damit verbundene geringere Sensitivität aufweist. Darüber hinaus ist der Western Blot vergleichsweise zeitaufwendig und erfordert mehrere experimentelle Schritte, die jeweils potenzielle Fehlerquellen darstellen.

5.6 Fazit und Ausblick

Zusammengefasst konnten in dieser Arbeit konzentrationsabhängige antiproliferative Effekte durch Calcitriol auf die humane HNSCC-Zelllinie UM-SCC-1 festgestellt werden, ohne dass ein signifikanter Effekt auf das Migrationsverhalten dieser Zellen gezeigt werden konnte. Wesentliche Unterschiede zwischen einer vier- und siebentägigen Behandlung zeigten sich nicht. Erste Hinweise auf einen migrationshemmenden Effekt bedürfen weiterer Untersuchungen. Zudem sollte der Fokus in zukünftigen Untersuchungen hinsichtlich einer Vitamin-D-Behandlung in der Onkologie vermehrt auf supraphysiologischen Calcitriol-Konzentrationen liegen.

Darüber hinaus gibt es Hinweise auf Vitamin D Analoga mit einer höheren antiproliferativen und antiinvasiven Wirksamkeit, ohne das Risiko einer Hyperkalzämie zu erhöhen. Diese Analoga sollten in zukünftige Studien einbezogen werden (K. C. Chiang, Yeh, Hsu, Chen, et al., 2013).

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben somit vor dem Hintergrund der vorhandenen Literatur weitere Hinweise für eine potenziell antitumorale Wirkweise von Vitamin D. Da es sich hierbei um ein vergleichsweise günstig verfügbares Medikament handelt, für das eine ausgeprägte Erfahrung in der Therapie am Menschen besteht, lohnt es sich alleine vor dem Hintergrund der zunehmenden ökonomischen Probleme in der Gesundheitsversorgung das Thema weiter zu bearbeiten. Um die ersten Hinweise auf diese Wirkweise auf Grundlage der vorliegenden Arbeit näher zu untersuchen und so bessere Rückschlüsse auf eine mögliche klinische Translation ziehen zu können, sind weitergehende *in-vitro*, *in-vivo* und klinische Studien erforderlich, um die vorhandenen Evidenzlücken weiter zu schließen.

6. Literaturverzeichnis

1. Abnet, C. C., Chen, Y., Chow, W. H., Gao, Y. T., Helzlsouer, K. J., Le Marchand, L., McCullough, M. L., Shikany, J. M., Virtamo, J., Weinstein, S. J., Xiang, Y. B., Yu, K., Zheng, W., Albanes, D., Arslan, A. A., Campbell, D. S., Campbell, P. T., Hayes, R. B., Horst, R. L., ... Shu, X. O. (2010). Circulating 25-hydroxyvitamin D and risk of esophageal and gastric cancer: Cohort Consortium Vitamin D Pooling Project of Rarer Cancers. *American Journal of Epidemiology*, 172(1), 94–106. <https://doi.org/10.1093/aje/kwq121>
2. Afzal, S., Bojesen, S. E., & Nordestgaard, B. G. (2013). Low plasma 25-hydroxyvitamin D and risk of tobacco-related cancer. *Clinical Chemistry*, 59(5), 771–780. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.201939>
3. Aggarwal, S., Sharma, S. C., & Das, S. N. (2015). Galectin-1 and galectin-3: Plausible tumour markers for oral squamous cell carcinoma and suitable targets for screening high-risk population. *Clinica Chimica Acta*, 442, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.12.038>
4. Ahonen, M. H., Tenkanen, L., Teppo, L., Hakama, M., & Tuohimaa, P. (2000). Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25-hydroxyvitamin D levels (Finland). *Cancer Causes and Control*, 11(9), 847–852. <https://doi.org/10.1023/A:1008923802001>
5. Alhamarneh, O., Amarnath, S. M. P., Stafford, N. D., & Greenman, J. (2008). Regulatory T cells: what role do they play in antitumor immunity in patients with head and neck cancer? *Head & Neck*, 30(2), 251–261. <https://doi.org/10.1002/hed.20739>
6. Altieri, A., Bosetti, C., Talamini, R., Gallus, S., Franceschi, S., Levi, F., Dal Maso, L., Negri, E., & La Vecchia, C. (2002). Cessation of smoking and drinking and the risk of laryngeal cancer. *British Journal of Cancer*, 87(11), 1227–1229. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600638>
7. Ang, K. K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D. I., Nguyen-Tân, P. F., Westra, W. H., Chung, C. H., Jordan, R. C., Lu, C., Kim, H., Axelrod, R., Silverman, C. C., Redmond, K. P., & Gillison, M. L. (2010). Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 363(1), 24–35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0912217>
8. Arai, H., Miyamoto, K. I., Taketani, Y., Yamamoto, H., Iemori, Y., Morita, K., Tonai, T., Nishisho, T., Mori, S., & Takeda, E. (1997). A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: Effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *Journal of Bone and Mineral Research*, 12(6), 915–921. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.6.915>
9. Arbyn, M., Weiderpass, E., Bruni, L., de Sanjosé, S., Saraiya, M., Ferlay, J., & Bray, F. (2020). Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *The Lancet Global Health*, 8(2), e191–e203. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30482-6](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30482-6)
10. Arem, H., Weinstein, S. J., Horst, R. L., Virtamo, J., Yu, K., Albanes, D., & Abnet, C. C. (2011). Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of oropharynx and larynx cancers in finnish men. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 20(6), 1178–1184. <https://doi.org/10.1158/1055->

9965.EPI-11-0153

11. Argiris, A., Program, N. C., Karamouzis, M. V., Program, N. C., Raben, D., Ferris, R. L., Program, N. C., Immunology, C., & Program, I. (2008). Head and neck cancer. *Lancet*, 371(9625), 1695–1709. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60728-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60728-X).Head
12. Arnaout, A., Robertson, S., Pond, G. R., Vieth, R., Jeong, A., Hilton, J., Ramsey, T., & Clemons, M. (2019). Randomized window of opportunity trial evaluating high-dose vitamin D in breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 178(2), 347–356. <https://doi.org/10.1007/s10549-019-05392-9>
13. Autier, P., Boniol, M., Pizot, C., & Mullie, P. (2014). Vitamin D status and ill health: a systematic review. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2(1), 76–89. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(13\)70165-7](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70165-7)
14. Badoual, C., Hans, S., Rodriguez, J., Peyrard, S., Klein, C., Agueznay, N. E. H., Mosseri, V., Laccourreye, O., Bruneval, P., Fridman, W. H., Brasnu, D. F., & Tartour, E. (2006). Prognostic value of tumor-infiltrating CD4⁺ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clinical Cancer Research*, 12(2), 465–472. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1886>
15. Bao, B. Y., Yeh, S. Der, & Lee, Y. F. (2006). 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits prostate cancer cell invasion via modulation of selective proteases. *Carcinogenesis*, 27(1), 32–42. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi170>
16. Bauernhofer, T., Kuss, I., Henderson, B., Baum, A. S., & Whiteside, T. L. (2003). Preferential apoptosis of CD56dim natural killer cell subset in patients with cancer. *European Journal of Immunology*, 33(1), 119–124. <https://doi.org/10.1002/immu.200390014>
17. Ben-Shoshan, M., Amir, S., Dang, D. T., Dang, L. H., Weisman, Y., & Mabjeesh, N. J. (2007). 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol) inhibits hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor pathway in human cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(4), 1433–1439. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0677>
18. Blomberg, M., Nielsen, A., Munk, C., & Kjaer, S. K. (2011). Trends in head and neck cancer incidence in Denmark, 1978-2007: Focus on human papillomavirus associated sites. *International Journal of Cancer*, 129(3), 733–741. <https://doi.org/10.1002/ijc.25699>
19. Blot, W. J., McLaughlin, J. K., Winn, D. M., Austin, D. F., Greenberg, R. S., Susan, S., Preston, M., Bernstein, L., Schoenberg, J. B., Stemhagen, A., & Fraumeni, J. F. (1988). Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer. *Cancer Research*, 48(11), 3282–3287.
20. Bochen, F., Balensiefer, B., Körner, S., Bittenbring, J. T., Neumann, F., Koch, A., Bumm, K., Marx, A., Wemmert, S., Papaspyrou, G., Zuschlag, D., Kühn, J. P., Al Kadah, B., Schick, B., & Linxweiler, M. (2018). Vitamin D deficiency in head and neck cancer patients—prevalence, prognostic value and impact on immune function. *OncoImmunology*, 7(9), 1–10. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1476817>
21. Bothwell, K. D., Shaurova, T., Merzianu, M., Suresh, A., Kuriakose, M. A., Johnson, C. S.,

- Hershberger, P. A., & Seshadri, M. (2015). Impact of short-term 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the chemopreventive efficacy of erlotinib against oral cancer. *Cancer Prevention Research*, 8(9), 765–776. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0454>
22. Boyden, B. S., & Ph, D. (1962). THE CHEMOTACTIC E F F E C T OF MIXTURES OF ANTIBODY AND ANTIGEN ON POLYMORPHONUCLEAR LEUCOCYTES (From the Department of Experimental Pathology , John Curtin School of Medical Research , Australian National University , Canberra) Materials and Methods. *Assessment*, 453–466.
 23. Boyle, B. J., Zhao, X. Y., Cohen, P., & Feldman, D. (2001). Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates 1 alpha,25-dihydroxyvitamin d(3) growth inhibition in the LNCaP prostate cancer cell line through p21/WAF1. *The Journal of Urology*, 165(4), 1319–1324. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257709>
 24. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (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), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
 25. Brust, L. A., Linxweiler, M., Schnatmann, J., Kühn, J. P., Knebel, M., Braun, F. L., Wemmert, S., Menger, M. D., Schick, B., Holick, M. F., Kuo, F., Morris, L. G. T., & Körner, S. (2024). Effects of Vitamin D on tumor cell proliferation and migration, tumor initiation and anti-tumor immune response in head and neck squamous cell carcinomas. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 180. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117497>
 26. Burtneß, B., Harrington, K. J., Greil, R., Soulières, D., Tahara, M., de Castro, G., Psyrri, A., Basté, N., Neupane, P., Bratland, Å., Fuereder, T., Hughes, B. G. M., Mesía, R., Ngamphaiboon, N., Rordorf, T., Wan Ishak, W. Z., Hong, R. L., González Mendoza, R., Roy, A., ... Yorio, J. (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. *The Lancet*, 394(10212), 1915–1928. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32591-7)
 27. Campbell, M. J., Elstner, E., Holden, S., Uskokovic, M., & Koeffler, H. P. (1997). Inhibition of proliferation of prostate cancer cells by a 19-nor-hexafluoride vitamin D3 analogue involves the induction of p21waf1, p27kip1 and E-cadherin. *Journal of Molecular Endocrinology*, 19(1), 15–27. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0190015>
 28. Cancer Genome Atlas Network. (2015). Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, 517(7536), 576–582. <https://doi.org/10.1038/nature14129>
 29. Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Hernandez, B. Y., Xiao, W., Kim, E., Jiang, B., Goodman, M. T., Sibug-Saber, M., Cozen, W., Liu, L., Lynch, C. F., Wentzensen, N., Jordan, R. C., Altekruse, S., Anderson, W. F., Rosenberg, P. S., & Gillison, M. L. (2011). Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *Journal of Clinical*

- Oncology*, 29(32), 4294–4301. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.4596>
30. Cheng, F., Wang, H. W., Cuenca, A., Huang, M., Ghansah, T., Brayer, J., Kerr, W. G., Takeda, K., Akira, S., Schoenberger, S. P., Yu, H., Jove, R., & Sotomayor, E. M. (2003). A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity*, 19(3), 425–436. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00232-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00232-2)
 31. Chiang, K.-C., Yeh, C.-N., Chen, S.-C., Shen, S.-C., Hsu, J.-T., Yeh, T.-S., Pang, J.-H. S., Su, L.-J., Takano, M., Kittaka, A., Juang, H.-H., & Chen, T. C. (2012). *MART-10, a New Generation of Vitamin D Analog, Is More Potent than 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D 3 in Inhibiting Cell Proliferation and Inducing Apoptosis in ER+ MCF-7 Breast Cancer Cells*. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/310872>
 32. Chiang, K. C., Yeh, C. N., Hsu, J. Te, Chen, L. W., Kuo, S. F., Sun, C. C., Huang, C. C., Pang, J. H. S., Flanagan, J. N., Takano, M., Kittaka, A., Juang, H. H., Yang, S. W., & Chen, T. C. (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. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 138(222), 427–434. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.09.002>
 33. Chiang, K. C., Yeh, C. N., Hsu, J. Te, Jan, Y. Y., Chen, L. W., Kuo, S. F., Takano, M., Kittaka, A., Chen, T. C., Chen, W. T., Pang, J. H. S., Yeh, T. Sen, & Juang, H. H. (2014). The vitamin D analog, MART-10, represses metastasis potential via downregulation of epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Cancer Letters*, 354(2), 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.08.019>
 34. Chiang, K. C., Yeh, C. N., Hsu, J. Te, Yeh, T. Sen, Jan, Y. Y., Wu, C. Te, Chen, H. Y., Jwo, S. C., Takano, M., Kittaka, A., Juang, H. H., & Chen, T. C. (2013). Evaluation of the potential therapeutic role of a new generation of vitamin D analog, MART-10, in human pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Cell Cycle*, 12(8), 1316–1325. <https://doi.org/10.4161/cc.24445>
 35. Chung, I., Han, G., Seshadri, M., Gillard, B. M., Yu, W. D., Foster, B. A., Trump, D. L., & Johnson, C. S. (2009). Role of vitamin D receptor in the antiproliferative effects of calcitriol in tumor-derived endothelial cells and tumor angiogenesis in vivo. *Cancer Research*, 69(3), 967–975. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2307>
 36. Cohen, E. E. W., Soulières, D., Le Tourneau, C., Dinis, J., Licitra, L., Ahn, M. J., Soria, A., Machiels, J. P., Mach, N., Mehra, R., Burtness, B., Zhang, P., Cheng, J., Swaby, R. F., Harrington, K. J., Acosta-Rivera, M., Adkins, D. R., Aghmesheh, M., Airolidi, M., ... Zandberg, D. (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. *The Lancet*, 393(10167), 156–167. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31999-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31999-8)
 37. Collins, K., & Mitchell, J. R. (2002). Telomerase in the human organism. *Oncogene*, 21(4), 564–579. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205083>

38. Cruzalegui, F. H., Cano, E., & Treisman, R. (1999). ERK activation induces phosphorylation of Elk-1 at multiple S/T-P motifs to high stoichiometry. *Oncogene*, 18(56), 7948–7957. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203362>
39. D’Souza, G., Carey, T. E., William, W. N., Nguyen, M. L., Ko, E. C., Riddell, J., Pai, S. I., Gupta, V., Walline, H. M., Lee, J. J., Wolf, G. T., Shin, D. M., Grandis, J. R., & Ferris, R. L. (2014). Epidemiology of head and neck squamous cell cancer among HIV-infected patients. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 65(5), 603–610. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000000083>
40. Dasgupta, S., Bhattacharya-Chatterjee, M., O’Malley, B. W., & Chatterjee, S. K. (2005). Inhibition of NK cell activity through TGF-beta 1 by down-regulation of NKG2D in a murine model of head and neck cancer. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 175(8), 5541–5550. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.8.5541>
41. de Souza, D. L. B., de Camargo Cancela, M., Pérez, M. M. B., & Curado, M.-P. (2012). Trends in the incidence of oral cavity and oropharyngeal cancers in Spain. *Head & Neck*, 34(5), 649–654. <https://doi.org/10.1002/hed.21793>
42. Deeb, K. K., Trump, D. L., & Johnson, C. S. (2007). Vitamin D signalling pathways in cancer: Potential for anticancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, 7(9), 684–700. <https://doi.org/10.1038/nrc2196>
43. Delorge, S., Saussez, S., Pelc, P., Devroede, B., Marchant, H., Burchert, M., Zeng, F. Y., Danguy, A., Salmon, I., Gabius, H. J., Kiss, R., & Hassid, S. (2000). Correlation of galectin-3/galectin-3-binding sites with low differentiation status in head and neck squamous cell carcinomas. *Otolaryngology--Head and Neck Surgery: Official Journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 122(6), 834–841. <https://doi.org/10.1016/S0194-59980070010-6>
44. DeLuca, H. F. (2004). Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(6 Suppl), 1689S–1696S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.6.1689s>
45. Derycke, L. D. M., Bracke, M. E., & Bracke, M. (2004). Ncadherin in the spotlight of cellcell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling Migration and invasion. *Int. J. Dev. Biol*, 48, 463–476.
46. Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O., & Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26(22), 3279–3290. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210421>
47. Di Rosa, M., Malaguarnera, M., Nicoletti, F., & Malaguarnera, L. (2011). Vitamin D3: A helpful immuno-modulator. *Immunology*, 134(2), 123–139. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03482.x>
48. Díaz, G. D., Paraskeva, C., Thomas, M. G., Binderup, L., & Hague, A. (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), 2304–2312.
49. Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., Roche, P. C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V. A., Cells, E., & Chen, L. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine*, 8(8), 793–800. <https://doi.org/10.1038/nm730>
 50. Duffy, S. A., Taylor, J. M. G., Terrell, J. E., Islam, M., Li, Y., Fowler, K. E., Wolf, G. T., & Teknos, T. N. (2008). Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. *Cancer*, 113(4), 750–757. <https://doi.org/10.1002/cncr.23615>
 51. Duprez, F., Berwouts, D., De Neve, W., Bonte, K., Boterberg, T., Deron, P., Huvenne, W., Rottey, S., & Mareel, M. (2017). Distant metastases in head and neck cancer. *Head & Neck*, 39(9), 1733–1743. <https://doi.org/10.1002/hed.24687>
 52. Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes and Development*, 12(15), 2245–2262. <https://doi.org/10.1101/gad.12.15.2245>
 53. El-din, S. S., Rashed, L., Medhat, E., Emad, B., Desoky, A., Mohammed, A., & Abdelgwad, M. (2020). Active form of vitamin D analogue mitigates neurodegenerative changes in Alzheimer ' s disease in rats by targeting Keap1 / Nrf2 and MAPK-38p / ERK signaling pathways. *Steroids*, 156(April 2019), 108586. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2020.108586>
 54. Enepekides, D. J., Black, M. J., & White, J. H. (1999). The independent and combined effects of RAR-, RXR-, and VDR-selective ligands on the growth of squamous cell carcinoma in vitro. *Journal of Otolaryngology*, 28(2).
 55. Engel, P., Fagherazzi, G., Boutten, A., Dupré, T., Mesrine, S., Boutron-Ruault, M. C., & Clavel-Chapelon, F. (2010). Serum 25(OH) vitamin D and risk of breast cancer: A nested case-control study from the French E3N cohort. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 19(9), 2341–2350. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0264>
 56. Fanidi, A., Muller, D. C., Midttun, Ø., Ueland, P. M., Vollset, S. E., Relton, C., Vineis, P., Weiderpass, E., Skeie, G., Brustad, M., Palli, D., Tumino, R., Grioni, S., Sacerdote, C., Bueno-De-Mesquita, H. B., Peeters, P. H., Boutron-Ruault, M. C., Kvaskoff, M., Cadeau, C., ... Johansson, M. (2016). Circulating Vitamin D in relation to cancer incidence and survival of the head and neck and oesophagus in the EPIC cohort. *Scientific Reports*, 6(October), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep36017>
 57. Farina, A. R., & Mackay, A. R. (2014). Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression. *Cancers*, 6, 240–296. <https://doi.org/10.3390/cancers6010240>
 58. Fathi, N., Ahmadian, E., Shahi, S., Roshangar, L., Khan, H., Kouhsoltani, M., Maleki Dizaj, S., & Sharifi, S. (2019). Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 109(October 2018), 391–401. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.102>
 59. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., &

- Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, 144(8), 1941–1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
60. Ferris, R. L. (2015). Immunology and immunotherapy of head and neck cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 33(29), 3293–3304. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.1509>
 61. Ferris, R. L., Blumenschein, G., Fayette, J., Guigay, J., Colevas, A. D., Licitra, L., Harrington, K., Kasper, S., Vokes, E. E., Even, C., Worden, F., Saba, N. F., Iglesias Docampo, L. C., Haddad, R., Rordorf, T., Kiyota, N., Tahara, M., Monga, M., Lynch, M., ... Gillison, M. L. (2016). Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine*, 375(19), 1856–1867. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1602252>
 62. Forte, T., Niu, J., Lockwood, G. A., & Bryant, H. E. (2012). Incidence trends in head and neck cancers and human papillomavirus (HPV)-associated oropharyngeal cancer in Canada, 1992-2009. *Cancer Causes and Control*, 23(8), 1343–1348. <https://doi.org/10.1007/s10552-012-0013-z>
 63. Freedman, N. D., Park, Y., Subar, A. F., Hollenbeck, A. R., Leitzmann, M. F., Schatzkin, A., & Abnet, C. C. (2008). Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a large United States prospective cohort study. *International Journal of Cancer*, 122(10), 2330–2336. <https://doi.org/10.1002/ijc.23319>
 64. Fukuda, R., Kelly, B., & Semenza, G. L. (2003). Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Research*, 63(9), 2330–2334.
 65. Garland, C. F., Garland, F. C., Shaw, E. K., Comstock, G. W., Helsing, K. J., & Gorham, E. D. (1989). Serum 25-Hydroxyvitamin D and Colon Cancer: Eight-Year Prospective Study. *The Lancet*, 334(8673), 1176–1178. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)91789-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(89)91789-3)
 66. Gedlicka, C., Hager, G., Weissenböck, M., Gedlicka, W., Knerer, B., Kornfehl, J., & Formanek, M. (2006). 1,25(OH)₂Vitamin D₃ induces elevated expression of the cell cycle inhibitor p18 in a squamous cell carcinoma cell line of the head and neck. *Journal of Oral Pathology & Medicine : Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 35(8), 472–478. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2006.00407.x>
 67. Gille, H., Sharrocks, A. D., & Shaw, P. E. (1992). Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature*, 358(6385), 414–417. <https://doi.org/10.1038/358414a0>
 68. Giovannucci, E., Liu, Y., Rimm, E. B., Hollis, B. W., Fuchs, C. S., Stampfer, M. J., & Willett, W. C. (2006). Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(7), 451–459. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj101>
 69. Gocek, E., & Studzinski, G. P. (2009). Vitamin D and differentiation in cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 46(4), 190–209. <https://doi.org/10.1080/10408360902982128>

70. González-Sancho, J. M., Alvarez-Dolado, M., & Muñoz, A. (1998). 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits tenascin-C expression in mammary epithelial cells. *FEBS Letters*, 426(2), 225–228. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00348-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00348-2)
71. Guha, N., Boffetta, P., Wünsch Filho, V., Eluf Neto, J., Shangina, O., Zaridze, D., Curado, M. P., Koifman, S., Matos, E., Menezes, A., Szeszenia-Dabrowska, N., Fernandez, L., Mates, D., Daudt, A. W., Lissowska, J., Dikshit, R., & Brennan, P. (2007). Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: Results of two multicentric case-control studies. *American Journal of Epidemiology*, 166(10), 1159–1173. <https://doi.org/10.1093/aje/kwm193>
72. Guha, N., Warnakulasuriya, S., Vlaanderen, J., & Straif, K. (2014). Betel quid chewing and the risk of oral and oropharyngeal cancers: A meta-analysis with implications for cancer control. *International Journal of Cancer*, 135(6), 1433–1443. <https://doi.org/10.1002/ijc.28643>
73. Hafkamp, H. C., Manni, J. J., Haesevoets, A., Voogd, A. C., Schepers, M., Bot, F. J., Hopman, A. H. N., Ramaekers, F. C. S., & Speel, E. J. M. (2008). Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. *International Journal of Cancer*, 122(12), 2656–2664. <https://doi.org/10.1002/ijc.23458>
74. Hager, G., Formanek, M., Gedlicka, C., Thurnher, D., Knerer, B., & Kornfehl, J. (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), 103–109. <https://doi.org/10.1080/000164801300006353>
75. Hager, G., Kornfehl, J., Knerer, B., Weigel, G., & Formanek, M. (2004). Molecular Analysis of p21 Promoter Activity Isolated from Squamous Carcinoma Cell Lines of the Head and Neck under the Influence of 1,25(OH)₂ Vitamin D₃ and its Analogs. *Acta Oto-Laryngologica*, 124(1), 90–96. <https://doi.org/10.1080/00016480310015353>
76. Hama, T., Norizoe, C., Suga, H., Mimura, T., Kato, T., Moriyama, H., & Urashima, M. (2011). Prognostic significance of vitamin d receptor polymorphisms in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS ONE*, 6(12), 8–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029634>
77. Hammarstedt, L., Dahlstrand, H., Lindquist, D., Onelöv, L., Ryott, M., Luo, J., Dalianis, T., Ye, W., & Munck-Wikland, E. (2007). The incidence of tonsillar cancer in Sweden is increasing. *Acta Oto-Laryngologica*, 127(9), 988–992. <https://doi.org/10.1080/00016480601110170>
78. Hammerlid, E., Silander, E., Hörnemark, L., & Sullivan, M. (2001). Health-related quality of life three years after diagnosis of head and neck cancer - A longitudinal study. *Head and Neck*, 23(2), 113–125. [https://doi.org/10.1002/1097-0347\(200102\)23:2<113::AID-HED1006>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-0347(200102)23:2<113::AID-HED1006>3.0.CO;2-W)
79. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
80. Hansdottir, S., Monick, M. M., Lovan, N., Powers, L., Gerke, A., & Hunninghake, G. W. (2010). Vitamin D Decreases Respiratory Syncytial Virus Induction of NF-κB-Linked Chemokines and Cytokines in Airway Epithelium While Maintaining the Antiviral State. *The Journal of*

- Immunology*, 184(2), 965–974. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902840>
81. Hashibe, M., Brennan, P., Chuang, S., Boccia, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M. P., Maso, L. D., Daudt, A. W., Fabianova, E., Fernandez, L., Wu, V., Franceschi, S., Hayes, R. B., Herrero, R., Kelsey, K., Koifman, S., Vecchia, C. La, Lazarus, P., ... Ferro, G. (2009). *Interaction between Tobacco and Alcohol Use and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium*. 18(February), 541–551. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0347>
 82. Heinrich, P. C., Müller, M., & Graeve, L. (2014). *Löffler/ Petrides Biochemie und Pathobiochemie*.
 83. Hendrickson, W. K., Flavin, R., Kasperzyk, J. L., Fiorentino, M., Fang, F., Lis, R., Fiore, C., Penney, K. L., Ma, J., Kantoff, P. W., Stampfer, M. J., Loda, M., Mucci, L. A., & Giovannucci, E. (2011). Vitamin D receptor protein expression in tumor tissue and prostate cancer progression. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(17), 2378–2385. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.9880>
 84. Hocking, J. S., Stein, A., Conway, E. L., Regan, D., Grulich, A., Law, M., & Brotherton, J. M. L. (2011). Head and neck cancer in Australia between 1982 and 2005 show increasing incidence of potentially HPV-associated oropharyngeal cancers. *British Journal of Cancer*, 104(5), 886–891. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6606091>
 85. Holick, M. F. (2003). Vitamin D: A millenium perspective. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88(2), 296–307. <https://doi.org/10.1002/jcb.10338>
 86. Holick, M. F. (2007). Vitamin D deficiency. *The New England Journal of Medicine*, 357(3), 266–281. <https://doi.org/10.1056/NEJMr070553>
 87. IARC. (2004). Betel-quid and areca-nut chewing and some areca-nut derived nitrosamines. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer*, 85, 1–334.
 88. IARC. (2020). *List of Classifications by cancer sites with sufficient or limited evidence in humans , Volumes 1 to 113 * Cancer site Carcinogenic agents with sufficient evidence in humans Agents with limited evidence in humans Lip , oral Cavity , and pharynx List of Cl.* 1–12. <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>
 89. International Agency for Research on Cancer. (2020). *List of Classifications by cancer sites with sufficient or limited evidence in humans , Volumes 1 to 113 * Cancer site Carcinogenic agents with sufficient evidence in humans Agents with limited evidence in humans Lip , oral Cavity , and pharynx List of Cl.* 1–12. <https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>
 90. Isayeva, T., Li, Y., Maswahu, D., & Brandwein-Gensler, M. (2012). Human Papillomavirus in Non-Oropharyngeal Head and Neck Cancers: A Systematic Literature Review. *Head and Neck Pathology*, 6(SUPPL. 1), 104–120. <https://doi.org/10.1007/s12105-012-0368-1>
 91. Izreig, S., Hajek, M., Edwards, H. A., Mehra, S., Sasaki, C., Judson, B. L., & Rahmati, R. W. (2020). The role of vitamin D in head and neck cancer. *Laryngoscope Investigative Otolaryngology*,

- 5(6), 1079–1088. <https://doi.org/10.1002/lio2.469>
92. Jensen, S. S., Madsen, M. W., Lukas, J., Binderup, L., & Bartek, J. (2001). Inhibitory effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) on the G(1)-S phase-controlling machinery. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 15(8), 1370–1380. <https://doi.org/10.1210/mend.15.8.0673>
 93. Ji, J., Cheng, X., Wang, W., & Zhang, J. (2020). Vitamin D regulates cell viability, migration and proliferation by suppressing galectin-3 (Gal-3) gene in ovarian cancer cells. *Journal of Biosciences*, 45(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12038-020-00038-1>
 94. Jin, T., Guo, Y., Huang, Z., Zhang, Q., Huang, Z., Zhang, Y., & Huang, Z. (2020). Vitamin D inhibits the proliferation of Oral Squamous Cell Carcinoma by suppressing lncRNA LUCAT1 through the MAPK pathway. *Journal of Cancer*, 11(20), 5971–5981. <https://doi.org/10.7150/jca.45389>
 95. Johnson, B. F., Clay, T. M., Hobeika, A. C., Lyerly, H. K., & Morse, M. A. (2007). Vascular endothelial growth factor and immunosuppression in cancer: Current knowledge and potential for new therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 7(4), 449–460. <https://doi.org/10.1517/14712598.7.4.449>
 96. Johnson, D. E., Burtneß, B., Leemans, C. R., Lui, V. W. Y., Bauman, J. E., & Grandis, J. R. (2020). Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00224-3>
 97. Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
 98. Kammertoens, T., Schöler, T., & Blankenstein, T. (2005). Immunotherapy: Target the stroma to hit the tumor. *Trends in Molecular Medicine*, 11(5), 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2005.03.002>
 99. Kasiappan, R., Shen, Z., Tse, A. K. W., Jinwal, U., Tang, J., Lungchukiet, P., Sun, Y., Kruk, P., Nicosia, S. V., Zhang, X., & Bai, W. (2012). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses telomerase expression and human cancer growth through microRNA-498. *Journal of Biological Chemistry*, 287(49), 41297–41309. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.407189>
 100. Kho, D., MacDonald, C., Johnson, R., Unsworth, C. P., O'Carroll, S. J., du Mez, E., Angel, C. E., & Graham, E. S. (2015). Application of xCELLigence RTCA biosensor technology for revealing the profile and window of drug responsiveness in real time. *Biosensors*, 5(2), 199–222. <https://doi.org/10.3390/bios5020199>
 101. Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L. C., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., & Shay, J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 266(5193), 2011–2015. <https://doi.org/10.1126/science.7605428>
 102. Kingsley, K., Keiserman, M. A., & Bergman, C. J. (2013). Interactive effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and soy protein extract (SPE) on oral cancer growth in vitro: Evidence for

- potential functional relationships. *Functional Foods in Health and Disease*, 3(6), 183–202. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v3i6.54>
103. Kohno, M., & Pouyssegur, J. (2006). Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. *Annals of Medicine*, 38(3), 200–211. <https://doi.org/10.1080/07853890600551037>
 104. Koli, K., & Keski-Oja, J. (2000). 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogues down-regulate cell invasion-associated proteases in cultured malignant cells. *Cell Growth and Differentiation*, 11(4), 221–229.
 105. Kongsbak, M., Levring, T. B., Geisler, C., & von Essen, M. R. (2013). The vitamin D receptor and T cell function. *Frontiers in Immunology*, 4(JUN), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00148>
 106. Kornfehl, J., Formanek, M., Temmel, A., Knerer, B., & Willheim, M. (1996). Antiproliferative effects of the biologically active metabolite of vitamin D3 (1,25 [OH]₂ D3) on head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 253(6), 341–344. <https://doi.org/10.1007/BF00178289>
 107. Kuss, I., Hathaway, B., Ferris, R. L., Gooding, W., & Whiteside, T. L. (2004). Decreased absolute counts of T lymphocyte subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical Cancer Research*, 10(11), 3755–3762. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0054>
 108. Kuznia, S., Zhu, A., Akutsu, T., Buring, J. E., Camargo, C. A., Cook, N. R., Chen, L. J., Cheng, T. Y. D., Hantunen, S., Lee, I. M., Manson, J. A. E., Neale, R. E., Scragg, R., Shadyab, A. H., Sha, S., Sluyter, J., Tuomainen, T. P., Urashima, M., Virtanen, J. K., ... Schöttker, B. (2023). Efficacy of vitamin D3 supplementation on cancer mortality: Systematic review and individual patient data meta-analysis of randomised controlled trials. *Ageing Research Reviews*, 87(March). <https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.101923>
 109. Lamberg-Allardt, C. J. E., Outila, T. A., Kärkkäinen, M. U. M., Rita, H. J., & Valsta, L. M. (2001). Vitamin D deficiency and bone health in healthy adults in Finland: Could this be a concern in other parts of Europe? *Journal of Bone and Mineral Research*, 16(11), 2066–2073. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.11.2066>
 110. Lappe, J., Watson, P., Travers-Gustafson, D., Recker, R., Garland, C., Gorham, E., Baggerly, K., & McDonnell, S. L. (2017). Effect of Vitamin D and Calcium Supplementation on Cancer Incidence in Older Women: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 317(12), 1234–1243. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.2115>
 111. Lathers, D. M. R., Clark, J. I., Achille, N. J., & Young, M. R. I. (2004). Phase 1B study to improve immune responses in head and neck cancer patients using escalating doses of 25-hydroxyvitamin D3. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 53(5), 422–430. <https://doi.org/10.1007/s00262-003-0459-7>
 112. Lee, N. C. J., Kelly, J. R., Park, H. S., An, Y., Judson, B. L., Burtneess, B. A., & Husain, Z. A.

- (2018). Patterns of failure in high-metastatic node number human papillomavirus-positive oropharyngeal carcinoma. *Oral Oncology*, 85(April), 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.08.001>
113. Lewis, J. S., Beadle, B., Bishop, J. A., Chernock, R. D., Colasacco, C., Lacchetti, C., Moncur, J. T., Rocco, J. W., Schwartz, M. R., Seethala, R. R., Thomas, N. E., Westra, W. H., & Faquin, W. C. (2018). Human papillomavirus testing in head and neck carcinomas guideline from the college of American pathologists. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 142(5), 559–597. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0286-CP>
114. Longo, D. L., & Chow, L. Q. M. (2020). Head and Neck Cancer. *N Engl J Med*, 382, 60–72. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1715715>
115. Lopes, N., Sousa, B., Martins, D., Gomes, M., Vieira, D., Veronese, L. A., Milanezi, F., Paredes, J., Costa, J. L., & Schmitt, F. (2010). Alterations in Vitamin D signalling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions. *BMC Cancer*, 10, 483. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-483>
116. López-Albaitero, A., Nayak, J. V., Ogino, T., Machandia, A., Gooding, W., DeLeo, A. B., Ferrone, S., & Ferris, R. L. (2006). Role of Antigen-Processing Machinery in the In Vitro Resistance of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Cells to Recognition by CTL. *The Journal of Immunology*, 176(6), 3402–3409. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.6.3402>
117. Lotfi, A., Mohammadi, G., Saniee, L., Mousaviagdas, M., Chavoshi, H., & Tavassoli, A. (2015). Serum level of matrix metalloproteinase-2 and -9 in patients with laryngeal squamous cell carcinoma and clinical significance. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(15), 6749–6751. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.15.6749>
118. Ma, J., Giovannucci, E., Pollak, M., Chan, J. M., Gaziano, J. M., Willett, W., & Stampfer, M. J. (2001). Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *Journal Of The National Cancer Institute*, 98(7), 451–459. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16595781>
119. Mahale, P., Sturgis, E. M., Tweardy, D. J., Ariza-Heredia, E. J., & Torres, H. A. (2016). Association between hepatitis C virus and head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 108(8), 1–10. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw035>
120. Manson, J. E., Cook, N. R., Lee, I.-M., Christen, W., Bassuk, S. S., Mora, S., Gibson, H., Gordon, D., Copeland, T., D’Agostino, D., Friedenberg, G., Ridge, C., Bubes, V., Giovannucci, E. L., Willett, W. C., & Buring, J. E. (2019). Vitamin D Supplements and Prevention of Cancer and Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine*, 380(1), 33–44. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1809944>
121. Mastuyugin, V., McWhinnie, E., Labow, M., & Buxton, F. (2004). A quantitative high-throughput endothelial cell migration assay. *Journal of Biomolecular Screening*, 9(8), 712–718. <https://doi.org/10.1177/1087057104269495>

122. Mehanna, H., Beech, T., Nicholson, T., El-Hariry, I., McConkey, C., Paleri, V., & Roberts, S. (2013). Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer - Systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head and Neck*, 35(5), 747–755. <https://doi.org/10.1002/HED.22015>
123. Mehanna, H. M., & Morton, R. P. (2006). Deterioration in quality-of-life of late (10-year) survivors of head and neck cancer. *Clinical Otolaryngology*, 31(3), 204–211. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4486.2006.01188.x>
124. Meier, J. D., Enepekides, D. J., Poirier, B., Bradley, C. A., Albala, J. S., & Farwell, D. G. (2007). Treatment with 1-alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (vitamin D3) to inhibit carcinogenesis in the hamster buccal pouch model. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 133(11), 1149–1152. <https://doi.org/10.1001/archotol.133.11.1149>
125. Meyer, F., Liu, G., Douville, P., Samson, É., Xu, W., Adjei, A., & Bairati, I. (2011). Dietary vitamin D intake and serum 25-hydroxyvitamin D level in relation to disease outcomes in head and neck cancer patients. *International Journal of Cancer*, 128(7), 1741–1746. <https://doi.org/10.1002/ijc.25496>
126. Morini, M., Mottotese, M., Ferrari, N., Ghiorzo, F., Buglioni, S., Mortarini, R., Noonan, D. M., Natali, P. G., & Albini, A. (2000). The $\alpha 3 \beta 1$ integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (MMP-9) activity. *International Journal of Cancer*, 87(3), 336–342. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(20000801\)87:3<336::AID-IJC5>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20000801)87:3<336::AID-IJC5>3.0.CO;2-3)
127. Murphy, L. O., Smith, S., Chen, R. H., Fingar, D. C., & Blenis, J. (2002). Molecular, interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nature Cell Biology*, 4(8), 556–564. <https://doi.org/10.1038/ncb822>
128. Ogino, S., Nowak, J. A., Hamada, T., Phipps, A. I., Peters, U., Milner, D. A., Giovannucci, E. L., Nishihara, R., Giannakis, M., Garrett, W. S., & Song, M. (2018). Integrative analysis of exogenous, endogenous, tumour and immune factors for precision medicine. *Gut*, 67(6), 1168–1180. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315537>
129. Ogino, T., Shigyo, H., Ishii, H., Katayama, A., Miyokawa, N., Harabuchi, Y., & Ferrone, S. (2006). HLA class I antigen down-regulation in primary laryngeal squamous cell carcinoma lesions as a poor prognostic marker. *Cancer Research*, 66(18), 9281–9289. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0488>
130. Osazuwa-Peters, N., Simpson, M. C., Zhao, L., Boakye, E. A., Olomukoro, S. I., Deshields, T., Loux, T. M., Varvares, M. A., & Schootman, M. (2018). Suicide risk among cancer survivors: Head and neck versus other cancers. *Cancer*, 124(20), 4072–4079. <https://doi.org/10.1002/cncr.31675>
131. Pan, L., Matloob, A. F., Du, J., Pan, H., Dong, Z., Zhao, J., Feng, Y., Zhong, Y., Huang, B., & Lu, J. (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. *FEBS Journal*, 277(4), 989–999. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07542.x>

132. Penna, G., & Adorini, L. (2000). 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(5), 2405–2411. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.5.2405>
133. Penna, G., Amuchastegui, S., Giarratana, N., Daniel, K. C., Vulcano, M., Sozzani, S., & Adorini, L. (2007). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(1), 145–153. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.1.145>
134. Perlson, E., Hanz, S., Ben-Yaakov, K., Segal-Ruder, Y., Seger, R., & Fainzilber, M. (2005). Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron*, 45(5), 715–726. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.023>
135. Pfister, D. G., Spencer, S., Brizel, D. M., Burtness, B., Busse, P. M., Caudell, J. J., Cmelak, A. J., Colevas, A. D., Dunphy, F., Eisele, D. W., Gilbert, J., Gillison, M. L., Haddad, R. I., Haughey, B. H., Hicks, W. L., Hitchcock, Y. J., Jimeno, A., Kies, M. S., Lydiatt, W. M., ... Hughes, M. (2014). Head and neck cancers, version 2.2014. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 12(10), 1454–1487. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2014.0142>
136. Pike, J. W., & Meyer, M. B. (2012). The Vitamin D Receptor: New Paradigms for the Regulation of Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D 3. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 38(1), 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2012.03.004>
137. Plzák, J., Betka, J., Smetana, K., Chovanec, M., Kaltner, H., André, S., Kodet, R., & Gabius, H. J. (2004). Galectin-3 - An emerging prognostic indicator in advanced head and neck carcinoma. *European Journal of Cancer*, 40(15), 2324–2330. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.06.025>
138. Prietl, B., Treiber, G., Pieber, T. R., & Amrein, K. (2013). Vitamin D and immune function. *Nutrients*, 5(7), 2502–2521. <https://doi.org/10.3390/nu5072502>
139. Pu, Y., Zhu, G., Xu, Y., Zheng, S., Tang, B., Huang, H., Wu, I. X. Y., Huang, D., Liu, Y., & Zhang, X. (2021). Association Between Vitamin D Exposure and Head and Neck Cancer: A Systematic Review With Meta-Analysis. *Frontiers in Immunology*, 12(February), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.627226>
140. Pulte, D., & Brenner, H. (2010). Changes in Survival in Head and Neck Cancers in the Late 20th and Early 21st Century: A Period Analysis. *The Oncologist*, 15(9), 994–1001. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2009-0289>
141. Quinten, C., Coens, C., Mauer, M., Comte, S., Sprangers, M. A., Cleeland, C., Osoba, D., Bjordal, K., & Bottomley, A. (2009). Baseline quality of life as a prognostic indicator of survival: a meta-analysis of individual patient data from EORTC clinical trials. *The Lancet Oncology*, 10(9), 865–871. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70200-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70200-1)
142. Reddy, V. M., Cundall-Curry, D., & Bridger, M. W. M. (2010). Trends in the incidence rates of tonsil and base of tongue cancer in England, 1985-2006. *Annals of the Royal College of Surgeons*

- of England*, 92(8), 655–659. <https://doi.org/10.1308/003588410X12699663904871>
143. Rettig, E. M., D’Souza, G., Thompson, C. B., Koch, W. M., Eisele, D. W., & Fakhry, C. (2016). Health-related quality of life before and after head and neck squamous cell carcinoma: Analysis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results-Medicare Health Outcomes Survey linkage. *Cancer*, 122(12), 1861–1870. <https://doi.org/10.1002/cncr.30005>
 144. Riboli, E., Hunt, K., Slimani, N., Ferrari, P., Norat, T., Fahey, M., Charrondière, U., Hémon, B., Casagrande, C., Vignat, J., Overvad, K., Tjønneland, A., Clavel-Chapelon, F., Thiébaud, A., Wahrendorf, J., Boeing, H., Trichopoulos, D., Trichopoulou, A., Vineis, P., ... Saracci, R. (2002). European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): study populations and data collection. *Public Health Nutrition*, 5(6b), 1113–1124. <https://doi.org/10.1079/phn2002394>
 145. Richards, S. A., Fu, J., Romanelli, A., Shimamura, A., & Blenis, J. (1999). Ribosomal S6 kinase 1 (RSK1) activation requires signals dependent on and independent of the MAP kinase ERK. *Current Biology*, 9(15), 810–820. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80364-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80364-9)
 146. Robsahm, T. E., Tretli, S., Dahlback, A., & Moan, J. (2004). Vitamin D3 from sunlight may improve the prognosis of breast-, colon- and prostate cancer (Norway). *Cancer Causes and Control*, 15(2), 149–158. <https://doi.org/10.1023/B:CACO.0000019494.34403.09>
 147. Rohan, J. N. P., & Weigel, N. L. (2009). 1 α , 25-dihydroxyvitamin D 3 reduces c-Myc expression, inhibiting proliferation and causing G 1 accumulation in C4-2 prostate cancer cells. *Endocrinology*, 150(5), 2046–2054. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1395>
 148. Rosli, S. N. Z., Shintani, T., Hayashido, Y., Toratani, S., Usui, E., & Okamoto, T. (2013). 1 α ,25(OH)2D3 down-regulates HBp17/FGFBP-1 expression via NF- κ B pathway. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 136(1), 98–101. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.10.011>
 149. Samuel, S., & Sitrin, M. D. (2008). Vitamin D’s role in cell proliferation and differentiation. *Nutrition Reviews*, 66(SUPPL.2). <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2008.00094.x>
 150. Sarkar, S., Hewison, M., Studzinski, G. P., Li, Y. C., & Kalia, V. (2016). Role of Vitamin D in cytotoxic T lymphocyte immunity to pathogens and cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 53(2), 132–145. <https://doi.org/10.3109/10408363.2015.1094443>
 151. Satake, K., Takagi, E., Ishii, A., Kato, Y., Imagawa, Y., Kimura, Y., & Tsukuda, M. (2003). Anti-tumor effect of vitamin A and D on head and neck squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx*, 30(4), 403–412. [https://doi.org/10.1016/S0385-8146\(03\)00091-9](https://doi.org/10.1016/S0385-8146(03)00091-9)
 152. Schindelin, J., Arganda-Carrera, I., Frise, E., Verena, K., Mark, L., Tobias, P., Stephan, P., Curtis, R., Stephan, S., Benjamin, S., Jean-Yves, T., Daniel, J. W., Volker, H., Kevin, E., Pavel, T., & Albert, C. (2009). Fiji - an Open platform for biological image analysis. *Nature Methods*, 9(7). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019.Fiji>
 153. Schwartz, G. G., Wang, M. H., Zang, M., Singh, R. K., & Siegal, G. P. (1997). 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D (calcitriol) inhibits the invasiveness of human prostate cancer cells. *Cancer*

- Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 6(9), 727–732.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9298581>
154. Schwartz, G. G., Whitlatch, L. W., Chen, T. C., Lokeshwar, B. L., & Holick, M. F. (1998). Human prostate cells synthesize 1,25-dihydroxyvitamin D₃ from 25-hydroxyvitamin D₃. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 7(5), 391–395.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9610788>
 155. Scragg, R., Khaw, K., Toop, L., Sluyter, J., Lawes, C. M. M., Waayer, D., Giovannucci, E., & Camargo, C. A. (2018). Monthly High-Dose Vitamin D Supplementation and Cancer Risk: A Post Hoc Analysis of the Vitamin D Assessment Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology*, 4(11), e182178. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.2178>
 156. Shay, J. W., & Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer*, 33(5), 787–791. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(97\)00062-2](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(97)00062-2)
 157. Skaaby, T., Husemoen, L. L. N., Thuesen, B. H., Pisinger, C., Jørgensen, T., Roswall, N., Larsen, S. C., & Linneberg, A. (2014). Prospective population-based study of the association between serum 25-hydroxyvitamin-D levels and the incidence of specific types of cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 23(7), 1220–1229. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0007>
 158. Smith, E. L., Walworth, N. C., & Holick, M. F. (1986). Effect of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ on the Morphologic and Biochemical Differentiation of Cultured Human Epidermal Keratinocytes Grown in Serum-Free Conditions. *Journal of Investigative Dermatology*, 86(6), 709–714.
<https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12276343>
 159. Smolders, J., Thewissen, M., Peelen, E., Menheere, P., Tervaert, J. W. C., Damoiseaux, J., & Hupperts, R. (2009). Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis. *PLoS ONE*, 4(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006635>
 160. Song, M., Nishihara, R., Wang, M., Chan, A. T., Qian, Z. R., Inamura, K., Zhang, X., Ng, K., Kim, S. A., Mima, K., Sukawa, Y., Nosho, K., Fuchs, C. S., Giovannucci, E. L., Wu, K., & Ogino, S. (2016). Plasma 25-hydroxyvitamin D and colorectal cancer risk according to tumour immunity status. *Gut*, 65(2), 296–304. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308852>
 161. Souberbielle, J., Cavalier, E., Delanaye, P., Massart, C., Brailly-Tabard, S., Cormier, C., Borderie, D., Benachi, A., & Chanson, P. (2015). Serum calcitriol concentrations measured with a new direct automated assay in a large population of adult healthy subjects and in various clinical situations. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 451(Pt B), 149–153.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.09.021>
 162. Stein, A. P., Saha, S., Kraninger, J. L., Swick, A. D., Yu, M., Lambert, P. F., & Kimple, R. J. (2015). Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal cancer. *Cancer Journal (United*

- States*), 21(3), 138–146. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000115>
163. Stiasny, A., Freier, C. P., Kuhn, C., Schulze, S., Mayr, D., Alexiou, C., Janko, C., Wiest, I., Dannecker, C., Jeschke, U., & Kost, B. P. (2017). The involvement of E6, p53, p16, MDM2 and Gal-3 in the clinical outcome of patients with cervical cancer. *Oncology Letters*, 14(4), 4467–4476. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6752>
 164. Strauss, L., Bergmann, C., Gooding, W., Johnson, J. T., & Whiteside, T. L. (2007). The frequency and suppressor function of CD4+CD25 highFoxp3+ T cells in the circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical Cancer Research*, 13(21), 6301–6311. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1403>
 165. Sundaram, K., Sambandam, Y., Tsuruga, E., Wagner, C. L., & Reddy, S. V. (2014). 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ Modulates CYP2R1 Gene Expression in Human Oral Squamous Cell Carcinoma Tumor Cells. *Hormones and Cancer*, 5(2), 90–97. <https://doi.org/10.1007/s12672-014-0170-5>
 166. Sung, V., & Feldman, D. (2000). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ decreases human prostate cancer cell adhesion and migration. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 164(1–2), 133–143. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(00\)00226-4](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(00)00226-4)
 167. Swami, S., Krishnan, A. V., Wang, J. Y., Jensen, K., Horst, R., Albertelli, M. A., & Feldman, D. (2012). Dietary vitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol) exhibit equivalent anticancer activity in mouse xenograft models of breast and prostate cancer. *Endocrinology*, 153(6), 2576–2587. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1600>
 168. Swami, S., Raghavachari, N., Muller, U. R., Bao, Y. P., & Feldman, D. (2003). Vitamin D growth inhibition of breast cancer cells: Gene expression patterns assessed by cDNA microarray. *Breast Cancer Research and Treatment*, 80(1), 49–62. <https://doi.org/10.1023/A:1024487118457>
 169. Talamini, R., Bosetti, C., La Vecchia, C., Dal Maso, L., Levi, F., Bidoli, E., Negri, E., Pasche, C., Vaccarella, S., Barzan, L., & Franceschi, S. (2002). Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: A case-control study. *Cancer Causes and Control*, 13(10), 957–964. <https://doi.org/10.1023/A:1021944123914>
 170. Thill, M., Fischer, D., Kelling, K., Hoellen, F., Dittmer, C., Hornemann, A., Salehin, D., Diedrich, K., Friedrich, M., & Becker, S. (2010). Expression of vitamin D receptor (VDR), cyclooxygenase-2 (COX-2) and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) in benign and malignant ovarian tissue and 25-hydroxycholecalciferol (25(OH)₂D₃) and prostaglandin E₂ (PGE₂) serum level in ovarian cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 121(1–2), 387–390. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.03.049>
 171. Timms, P. M., Mannan, N., Hitman, G. A., Noonan, K., Mills, P. G., Syndercombe-Court, D., Aganna, E., Price, C. P., & Boucher, B. J. (2002). Circulating MMP9, vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: Mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders? *QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians*, 95(12), 787–796.

<https://doi.org/10.1093/qjmed/95.12.787>

172. Toyoshima, H., & Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*, 78(1), 67–74. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90573-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90573-8)
173. Tretli, S., Hernes, E., Berg, J. P., Hestvik, U. E., & Røksahm, T. E. (2009). Association between serum 25(OH)D and death from prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 100(3), 450–454. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604865>
174. Urata, Y. N., Lyra, E. C. de, Katayama, M. L. H., Basso, R. A., Assis, P. E. Z. de, Cardoso, A. P. T., Roela, R. A., Nonogaki, S., Sampaio Góes, J. C. G., Brentani, M. M., & Figueira, M. A. A. K. (2014). Calcitriol supplementation effects on Ki67 expression and transcriptional profile of breast cancer specimens from post-menopausal patients. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 33(1), 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.04.001>
175. Valdivielso, J. M., & Fernandez, E. (2006). Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clinica Chimica Acta*, 371(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.02.016>
176. Vaughan-Shaw, P. G., O’Sullivan, F., Farrington, S. M., Theodoratou, E., Campbell, H., Dunlop, M. G., & Zgaga, L. (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), 1095–1110. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.44>
177. Vermorken, J. B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kawecki, A., Rottey, S., Erfan, J., Zabolotnyy, D., Kienzer, H.-R., Cupissol, D., Peyrade, F., Benasso, M., Vynnychenko, I., De Raucourt, D., Bokemeyer, C., Schueler, A., Amellal, N., & Hitt, R. (2008). Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*, 359(11), 1116–1127. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0802656>
178. Von Essen, M. R., Kongsbak, M., Schjerling, P., Olgaard, K., Ødum, N., & Geisler, C. (2010). Vitamin D controls T cell antigen receptor signaling and activation of human T cells. *Nature Immunology*, 11(4), 344–349. <https://doi.org/10.1038/ni.1851>
179. Wagner, D., Trudel, D., Van der Kwast, T., Nonn, L., Giangreco, A. A., Li, D., Dias, A., Cardoza, M., Laszlo, S., Hersey, K., Klotz, L., Finelli, A., Fleshner, N., & Vieth, R. (2013). Randomized Clinical Trial of Vitamin D3 Doses on Prostatic Vitamin D Metabolite Levels and Ki67 Labeling in Prostate Cancer Patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(4), 1498–1507. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-4019>
180. Walsh, J. E., Clark, A. M., Day, T. A., Gillespie, M. B., & Young, M. R. I. (2010). Use of α ,25-Dihydroxyvitamin D3 treatment to stimulate immune infiltration into head and neck squamous cell carcinoma. *Human Immunology*, 71(7), 659–665. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2010.04.008>
181. Walunas, T. L., Lenschow, D. J., Bakker, C. Y., Linsley, P. S., Freeman, G. J., Green, J. M., Thompson, C. B., & Bluestone, J. A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, 1(5), 405–413. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90071-x](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90071-x)
182. Ward, M. J., Thirdborough, S. M., Mellows, T., Riley, C., Harris, S., Suchak, K., Webb, A.,

- Hampton, C., Patel, N. N., Randall, C. J., Cox, H. J., Jogai, S., Primrose, J., Piper, K., Ottensmeier, C. H., King, E. V., & Thomas, G. J. (2014). Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer. *British Journal of Cancer*, *110*(2), 489–500. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.639>
183. Weber, J. D., Raben, D. M., Phillips, P. J., & Baldassare, J. J. (1997). Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *Biochemical Journal*, *326*(1), 61–68. <https://doi.org/10.1042/bj3260061>
184. Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, *81*(3), 323–330. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90385-2)
185. Welsh, J. (2012). Cellular and molecular effects of vitamin D on carcinogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *523*(1), 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.10.019>
186. Windon, M. J., D'Souza, G., Rettig, E. M., Westra, W. H., van Zante, A., Wang, S. J., Ryan, W. R., Mydlarz, W. K., Ha, P. K., Miles, B. A., Koch, W., Gourin, C., Eisele, D. W., & Fakhry, C. (2018). Increasing prevalence of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancers among older adults. *Cancer*, *124*(14), 2993–2999. <https://doi.org/10.1002/cncr.31385>
187. Wu, W., Zhang, X., & Zanello, L. P. (2007). 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 antiproliferative actions involve vitamin D receptor-mediated activation of MAPK pathways and AP-1/p21waf1 upregulation in human osteosarcoma. *Cancer Letters*, *254*(1), 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.02.013>
188. Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., & Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, *366*(6456), 701–704. <https://doi.org/10.1038/366701a0>
189. Yamamoto, T., Ebisuya, M., Ashida, F., Okamoto, K., Yonehara, S., & Nishida, E. (2006). Continuous ERK Activation Downregulates Antiproliferative Genes throughout G1 Phase to Allow Cell-Cycle Progression. *Current Biology*, *16*(12), 1171–1182. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.044>
190. Yang, L., Ma, J., Zhang, X., Fan, Y., & Wang, L. (2012). Protective role of the vitamin D receptor. *Cellular Immunology*, *279*(2), 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.10.002>
191. Yang, S. W., Tsai, C. Y., Pan, Y. C., Yeh, C. N., Pang, J. H. S., Takano, M., Kittaka, A., Juang, H. H., Chen, T. C., & Chiang, K. C. (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*, 1995–2002. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S107256>
192. Zamoner, A., Barreto, K. P., Filho, D. W., Sell, F., Woehl, V. M., Guma, F. C. R., Silva, F. R. M. B., & Pessoa-Pureur, R. (2007). Hyperthyroidism in the developing rat testis is associated with oxidative stress and hyperphosphorylated vimentin accumulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *267*(1–2), 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.01.005>
193. Zandberg, D. P., & Strome, S. E. (2014). The role of the PD-L1:PD-1 pathway in squamous cell

- carcinoma of the head and neck. *Oral Oncology*, 50(7), 627–632. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.04.003>
194. Zeichner, S. B., Koru-Sengul, T., Shah, N., Liu, Q., Markward, N. J., Montero, A. J., Glück, S., Silva, O., & Ahn, E. R. (2015). Improved clinical outcomes associated with vitamin D supplementation during adjuvant chemotherapy in patients with HER2+ nonmetastatic breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 15(1), e1-11. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2014.08.001>
195. Zeljic, K., Supic, G., Stamenkovic Radak, M., Jovic, N., Kozomara, R., & Magic, Z. (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), 779–787. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2012.01164.x>
196. Zhang, Y., Guo, Q., Zhang, Z., Bai, N., Liu, Z., Xiong, M., Wei, Y., Xiang, R., & Tan, X. (2014). VDR status arbitrates the prometastatic effects of tumor-associated macrophages. *Molecular Cancer Research : MCR*, 12(8), 1181–1191. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0036>
197. Zhang, Y., Leung, D. Y. M., Richers, B. N., Liu, Y., Remigio, L. K., Riches, D. W., & Goleva, E. (2012). Vitamin D Inhibits Monocyte/Macrophage Proinflammatory Cytokine Production by Targeting MAPK Phosphatase-1. *The Journal of Immunology*, 188(5), 2127–2135. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102412>
198. Zheng, Z., Zhao, F., Zhu, D., Han, J., Chen, H., Cai, Y., Chen, Z., & Xie, W. (2018). Long Non-Coding RNA LUCAT1 Promotes Proliferation and Invasion in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Through AKT/GSK-3 β Signaling Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 48(3), 891–904. <https://doi.org/10.1159/000491957>
199. Zhu, Y., Chen, P., Gao, Y., Ta, N., Zhang, Y., Cai, J., Zhao, Y., Liu, S., & Zheng, J. (2018). MEG3 Activated by Vitamin D Inhibits Colorectal Cancer Cells Proliferation and Migration via Regulating Clusterin. *EBioMedicine*, 30, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.03.032>
200. Zou, W., & Chen, L. (2008). Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology*, 8(6), 467–477. <https://doi.org/10.1038/nri2326>

7. Anhang

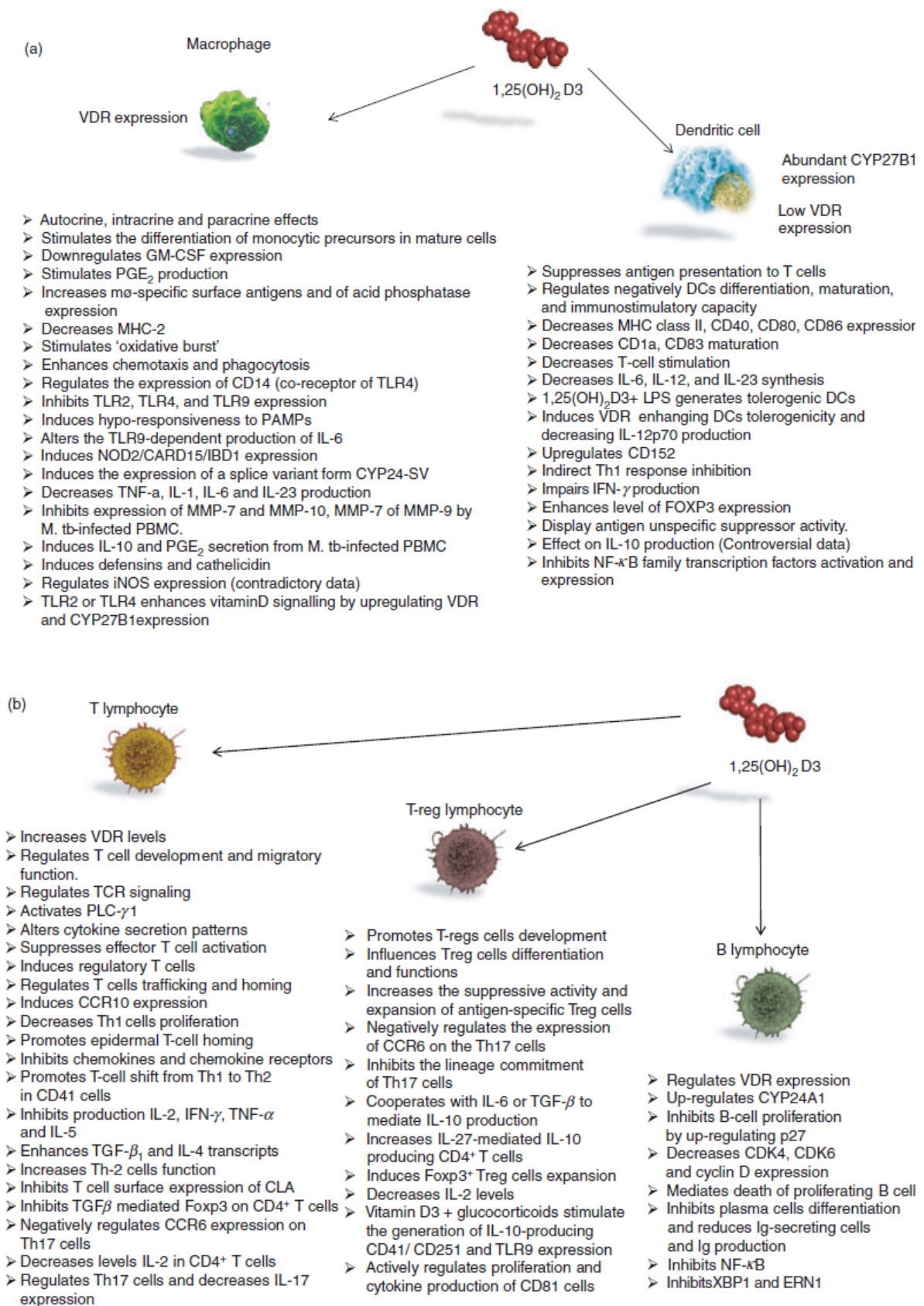


Abb. 26: Immunmodulierende Wirkung von Calcitriol: Calcitriol weist immunmodulatorische Eigenschaften mit potenziell antitumoraler Wirkung auf. Es fördert die Differenzierung naiver T-Zellen zu T_{regs} und unterstützt so die Immunhomöostase. Darüber hinaus induziert Calcitriol eine tolerogene Polarisierung von DCs, wodurch die Expression proinflammatorischer Zytokine gehemmt wird. In Makrophagen und Monozyten resultiert die Wirkung von Calcitriol in einer verminderten Produktion proinflammatorischer Zytokine sowie einer verstärkten Expression antiinflammatorischer Zytokine. Diese Veränderungen tragen zur Modulation der entzündlichen Tumormikroumgebung bei und können die Tumorprogression hemmen. Zudem inhibiert Calcitriol die Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen, wodurch die Immunglobulinproduktion reduziert und autoimmunen Reaktionen vorgebeugt wird. NK-Zellen zeigen unter dem Einfluss von Calcitriol eine verringerte Zytotoxizität, was die durch den Tumor induzierte Immunflucht erschweren kann (modifiziert aus Di Rosa et al., 2011).

8. Publikationen

Paper: Brust, L. A., Linxweiler, M., **Schnatmann, J.**, Kühn, J. P., Knebel, M., Braun, F. L., Wemmert, S., Menger, M. D., Schick, B., Holick, M. F., Kuo, F., Morris, L. G. T., & Körner, S. (2024). **Effects of Vitamin D on tumor cell proliferation and migration, tumor initiation and anti-tumor immune response in head and neck squamous cell carcinomas.**

Biomedicine and Pharmacotherapy, 180. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117497>

Poster: **Jana Schnatmann**, Dr. rer. nat. Florian Bochen, Sandrina Körner M. Sc., Dr. med. Jan-Philipp Kühn, Prof. Dr. med. Bernhard Schick, Priv.-Doz. Dr. med. Maximilian Linxweiler MHBA. **Proliferations- und migrationshemmende Wirkung von Calcitriol auf Kopf-Hals-Karzinom-Zellen – ein neuer Therapieansatz zur Behandlung von Kopf-Hals-Tumorpatienten?**

Präsentiert auf der DGHNO-Jahrestagung 2022, 25.05.2022 bis 28.05.2022, Berlin

9. Danksagung

Der erfolgreiche Abschluss dieser Arbeit war nur durch das Engagement und die vielfältige Unterstützung zahlreicher Menschen möglich – ihnen gilt mein aufrichtiger Dank.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Max Linxweiler (Klinik für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar), der mir durch seine große Geduld, fachliche Kompetenz und sein Vertrauen den Raum gegeben hat, mich wissenschaftlich weiterzuentwickeln. Für seine schnelle Hilfe bei Fragen und die exzellente Betreuung danke ich ihm sehr.

Ein besonderer Dank geht an Dr. rer. nat. Sandrina Körner (Klinik für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar), die mich über die gesamte Promotionszeit hinweg mit bemerkenswerter Hingabe begleitet hat. Ihre fachliche Kompetenz, ihr unermüdlicher Einsatz, ihre Geduld und ihr offenes Ohr haben mir nicht nur inhaltlich, sondern auch menschlich enorm geholfen. Für ihre Unterstützung in jeder Hinsicht bin ich ihr zutiefst verbunden.

Ebenso danke ich Dr. rer. nat. Florian Bochen, der mir den Einstieg mit großer Sorgfalt und Geduld erleichtert hat. Für seine engagierte Anleitung, die stetige Diskussionsbereitschaft und seinen kollegialen Austausch bin ich ihm sehr dankbar.

Für das stets angenehme Arbeitsklima und die kontinuierliche Hilfsbereitschaft im Laboralltag spreche ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Forschungslabors der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde meinen herzlichen Dank aus. Besonders danke ich Carolin Bick, die mich mit ihrer fachlichen Kompetenz und Geduld in die Laborarbeit eingewiesen und mich in den Prozessen wertvoll unterstützt hat.

Zudem danke ich Prof. Dr. Schick (Klinik für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar), für die Möglichkeit meine Dissertation an seiner Klinik anfertigen zu dürfen, für die freundliche Aufnahme sowie die Bereitstellung der notwendigen Arbeitsmittel und der nötigen Ressourcen.

Mein Dank gilt ebenfalls den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie für die Bereitstellung der technischen Geräte und Ausstattung sowie für die stete Hilfsbereitschaft.

Meiner Familie – insbesondere meinem Ehemann, meinen Eltern und meinem Bruder– danke ich von Herzen für ihre Rückendeckung, ihr Verständnis und ihre beständige Unterstützung während dieser Zeit.

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 2

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommene Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir **die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:**

1. Anleitung und Hilfestellungen in der Zellkultur erfolgten durch Dr. Florian Bochen, Dr. Sandrina Körner und Carolin Bick (Klinik für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar).
2. Die Western Blot Versuche wurden gemeinsam mit Dr. Sandrina Körner (Klinik für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar) durchgeführt.
3. Bei wissenschaftlichen Fragestellungen wurden Prof. Dr. Maximilian Linxweiler, Dr. Florian Bochen und Dr. Sandrina Körner (Klinik für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar) um Rat gebeten.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen.

Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Die Bedeutung der eidesstattlichen Erklärung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Erklärung sind mir bekannt.

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

Tag der Promotion: 12. Februar 2026

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Maximilian Linxweiler

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Kolja Freier