

Aus der Klinik für Innere Medizin I,  
Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie und Rheumatologie,  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. Lorenz Thurner

# **Der Einfluss von Vitamin D auf die Genexpression aktivierter und nicht aktivierter natürlicher Killerzellen**

Transkriptomanalyse mittels RNA-Sequenzierung

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

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2024

vorgelegt von Franziska Julia Reichenbach

geb. am 31.01.1992 in Freiburg im Breisgau

Tag der Promotion: 18.11.2024

Dekan: Prof. Dr. Matthias Hannig

1. Berichterstatter: PD Dr. Frank Neumann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Hoth

# Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	7
1.1	Summary	9
2	Einleitung	11
2.1	Vitamin D	11
2.1.1	Vitamin D-Stoffwechsel	11
2.1.2	Vitamin D-Mangel	13
2.1.3	Der Einfluss von Vitamin D auf die Inzidenz und Prognose maligner Neoplasien	14
2.1.3.1	Solide Tumore	14
2.1.3.2	Hämatologische Neoplasien	14
2.1.4	Der Einfluss von Vitamin D auf die Therapie hämatologischer Neoplasien	15
2.1.5	Vitamin D und die Immunabwehr	17
2.1.5.1	Der Einfluss von Vitamin D auf das angeborene Immunsystem	17
2.1.5.2	Der Einfluss von Vitamin D auf das adaptive Immunsystem	18
2.2	Natürliche Killerzellen	19
2.2.1	Die Rolle natürlicher Killerzellen im Immunsystem	19
2.2.2	Rezeptoren und Funktionen der natürlichen Killerzellen	20
2.2.3	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität	22
2.3	Der Einfluss von Vitamin D auf natürliche Killerzellen	22
2.4	Genexpressionsanalyse mittels RNA-Sequenzierung	24
2.4.1	RNA-Sequenzierung	24
2.4.2	RNA-seq-Analyse	25
2.5	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	28
3	Probanden, Material und Methoden	29
3.1	Probanden	29
3.2	Material	29
3.2.1	Vitamin D-Präparat	29
3.2.2	Tumorzelllinie	29
3.2.3	Chemikalien, Lösungen, Medien und Puffer	30

	4	
3.2.4	Antikörper	31
3.2.5	Verbrauchsgegenstände	31
3.2.6	Geräte	32
3.3	Methoden	33
3.3.1	Vitamin D-Supplementation und Bestimmung des Vitamin D-Spiegels	33
3.3.2	Bestimmung der Zellzahl	33
3.3.3	Isolierung der peripheren mononukleären Zellen aus dem Vollblut	34
3.3.4	Isolierung der natürlichen Killerzellen	34
3.3.5	Durchflusszytometrie	35
3.3.6	Kultur der DAUDI-Zellen	35
3.3.7	Bereitstellung und Aktivierung der natürlichen Killerzellen	36
3.3.8	Bestimmung der ADCC-Aktivität	38
3.3.9	RNA-Isolierung	39
3.3.9.1	Isolierung der RNA	39
3.3.9.2	RNA-Gelelektrophorese	40
3.3.9.3	Quantitative RNA-Messung	40
3.3.10	RNA-Sequenzierung	40
3.3.11	Bioinformatische Auswertung	41
3.3.11.1	Differentielle Genexpression	41
3.3.11.2	Qualitätskontrolle der RNA-Sequenzierungsdaten	42
3.3.11.3	Pathway Analyse	42
3.4	Probengruppen und Vergleiche für die differentielle Genexpressionanalyse	43
3.4.1	Probengruppen	43
3.4.2	Vergleiche für die differentielle Genexpressionsanalyse	44
4	Ergebnisse	45
4.1	Probandendaten	45
4.2	Vitamin D-Spiegel	46
4.2.1	Vitamin D-Spiegel vor Supplementation	46
4.2.2	Vitamin D-Spiegel nach Supplementation	46
4.3	ADCC-Aktivität	47

	5
4.4 RNA-Ausbeute	50
4.5 Qualitätskontrolle der RNA-Sequenzierungsdaten	51
4.5.1 Qualitätskontrolle der Reads mittels Phred Score	51
4.5.2 Qualitätskontrolle des Mappings	52
4.5.3 Hauptkomponentenanalyse	57
4.6 Differentielle Genexpression	59
4.6.1 Differentielle Genexpression in Abhängigkeit des Vitamin D-Spiegels	59
4.6.1.1 Differentielle Genexpression der passiven NK-Zellen nach versus vor Vitamin D-Supplementation – Vergleich 1	59
4.6.1.2 Differentielle Genexpression der aktivierten NK-Zellen nach versus vor Vitamin D-Supplementation – Vergleich 2	61
4.6.2 Differentielle Genexpression aktivierter versus passiver NK-Zellen	63
4.6.2.1 Differentielle Genexpression aktivierter versus passiver NK-Zellen vor Vitamin D-Supplementation – Vergleich 3	63
4.6.2.2 Differentielle Genexpression aktivierter versus passiver NK-Zellen nach Vitamin D-Supplementation – Vergleich 4	65
4.6.3 Schnittmengen der unter Vitamin D differentiell exprimierten Gene in den einzelnen Vergleichen	67
4.6.4 Differentielle Expression ausgewählter Gene unter Vitamin D	68
4.6.4.1 Vergleich 1 – differentielle Expression ausgewählter Gene	68
4.6.4.2 Vergleich 2 – differentielle Expression ausgewählter Gene	68
4.6.4.3 Vergleich 3 – differentielle Expression ausgewählter Gene	69
4.6.4.4 Vergleich 4 – differentielle Expression ausgewählter Gene	70
4.7 Genmengen Anreicherungsanalyse	71
4.7.1 GSEA - Vergleich 1	72
4.7.2 GSEA - Vergleich 2	73
4.7.3 GSEA - Vergleich 3	74
4.7.4 GSEA - Vergleich 4	75
4.7.5 Natural killer cell mediated cytotoxicity Pathway	76
5 Diskussion	77
5.1 Bewertung der Methoden	77

	6
5.2 Vergleich zu Microarray-Analysen	78
5.3 Einordnung der Ergebnisse	79
5.3.1 Vitamin D-Supplementation und der Einfluss auf die ADCC	79
5.3.2 Genexpressionsanalyse	81
5.4 Bewertung der einzelnen Vergleiche	82
5.4.1 Passive NK-Zellen nach versus vor Vitamin D-Supplementation – Vergleich 1	82
5.4.2 Aktivierte NK-Zellen nach versus vor Vitamin D-Supplementation – Vergleich 2	83
5.4.3 Vergleich 3 und Vergleich 4	84
5.5 Ausblick	85
6 Anhang	86
6.1 Abkürzungsverzeichnis	86
6.2 Abbildungsverzeichnis	88
6.3 Tabellenverzeichnis	89
6.4 Literaturverzeichnis	90
6.5 Danksagung	97

# 1 Zusammenfassung

Vitamin D nimmt nicht nur eine wichtige Funktion im Knochenstoffwechsel ein, es spielt darüber hinaus eine bedeutende Rolle bei der angeborenen und adaptiven Immunabwehr<sup>3</sup> und auch bei malignen Neoplasien ist der Vitamin D-Serumspiegel der Patienten von prognostischer Relevanz<sup>7,37</sup>. Bei B-Zell-Lymphomen konnte gezeigt werden, dass ein höherer Vitamin D-Spiegel mit einem besseren Überleben assoziiert ist, vor allem wenn die Patienten mit dem monoklonalen Antikörper Rituximab behandelt wurden<sup>6</sup>. Die Wirkung monoklonaler Antikörper, die heute in der Tumorthherapie routinemäßig eingesetzt werden, ist von der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität der natürlichen Killerzellen abhängig<sup>60,75</sup>. Basierend auf den Ergebnissen der Ricover-60 Studie konnten Bittenbring et al. bei sieben Probanden nach Supplementation von Vitamin D und Normalisierung des 25-Hydroxyvitamin-D-Spiegels eine signifikant höhere antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität nachweisen<sup>6</sup>.

Für die vorliegende Arbeit wurden zehn Probanden (fünf Frauen und fünf Männer) mit einem Vitamin D-Mangel beziehungsweise einer Vitamin D-Insuffizienz rekrutiert. Nach erfolgter Vitamin D-Supplementation lag der Vitamin D-Serumspiegel aller zehn Probanden im suffizienten Bereich (71,48 ng/ml  $\pm$  9,47 ng/ml). Die Aktivität der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität stieg bei allen Probanden nach Supplementation an, ein signifikanter Anstieg konnte bei acht von zehn Probanden nachgewiesen werden.

Es muss folglich angenommen werden, dass die Supplementation von Vitamin D Einfluss auf die Transkription von Genen der natürlichen Killerzellen nimmt, die für die Abwehrfunktion ausschlaggebend sind. Deshalb wurde in dieser Studie die Genexpression an Target-Zellen aktivierter und nicht aktivierter (passiver) natürlicher Killerzellen vor und nach in vivo Vitamin D-Supplementation mittels RNA-Sequenzierung untersucht.

Diese Arbeit konnte sowohl bei passiven als auch bei aktivierten natürlichen Killerzellen nach im Vergleich zu vor in vivo Vitamin D-Supplementation Veränderungen im Transkriptom nachweisen, insbesondere aber bei aktivierten natürlichen Killerzellen. Auch bei den zusätzlich durchgeführten Vergleichen aktivierter versus passiver natürlicher Killerzellen jeweils vor und nach Vitamin D-Supplementation zeigten sich zahlreiche Gene differentiell exprimiert. Wobei bei diesen beiden Vergleichen viele der hoch- und runterregulierten Gene unabhängig vom Vitamin D-Status übereinstimmen und somit auf die Aktivierung der natürlichen Killerzellen zurückzuführen sind. 2.440 Gene wiesen jedoch eine signifikante Änderung der Expression nach Aktivierung der natürlichen Killerzellen nur nach Vitamin D-Supplementation auf, diese Gene könnten von besonderem Interesse sein.

Da nicht einzelne differenziell exprimierte Gene die Funktion einer Zelle ausmachen, sondern das Zusammenspiel vieler Transkripte, die sich innerhalb einer Zelle unter verschiedenen

Bedingungen zu biologischen Pfaden (engl. Pathways) organisieren, erfolgte zudem eine Genmengen Anreicherungsanalyse. Damit konnte nachgewiesen werden, dass zentrale Pfade der Immunabwehr und der Signaltransduktion bei den verschiedenen Vergleichen angereichert werden. Hervorzuheben ist, dass sowohl bei passiven als auch bei aktivierten natürlichen Killerzellen nach Vitamin D-Supplementation der "Cytokine-cytokine receptor interaction" Pathway signifikant stärker exprimiert wird. Dieser Pathway ist entscheidend für die intrazelluläre Regulation von Zellen, die an der angeborenen und der adaptiven Immunabwehr beteiligt sind <sup>17</sup>. Bereits bei peripheren mononukleären Zellen konnte eine Anreicherung des "Cytokine-cytokine receptor interaction" Pathways nach ex vivo Vitamin D-Supplementation nachgewiesen werden <sup>24</sup>.

Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Pathway "natural killer cell mediated cytotoxicity" bei passiven und aktivierten natürlichen Killerzellen nach Vitamin D-Supplementation angereichert wird. Dieser biologische Pfad beinhaltet sowohl die Kaskaden der aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren von natürlichen Killerzellen im Allgemeinen, als auch die der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität im Speziellen <sup>47</sup>.



## 1.1 Summary

Vitamin D not only plays an important role in bone metabolism, but is also crucial for the innate and adaptive immune system<sup>3</sup>. Furthermore, a patient's vitamin D serum level is of prognostic relevance in cancer<sup>7,37</sup>. In B-cell lymphomas, it has been shown that a higher vitamin D level is associated with better survival, especially when patients were treated with the monoclonal antibody rituximab<sup>6</sup>. The effect of monoclonal antibodies, which nowadays are routinely used in tumor therapy, is dependent on the antibody-dependent cellular cytotoxicity of the natural killer cells<sup>60,75</sup>. Based on the results of the Ricover-60 study, Bittenbring et al. were able to demonstrate a significantly higher antibody-dependent cellular cytotoxicity after supplementation of vitamin D and normalization of the 25-hydroxyvitamin D level in seven patients<sup>6</sup>.

For the present work, ten volunteers (five women and five men) with a vitamin D deficiency or vitamin D insufficiency were recruited. After supplementation, the vitamin D serum levels of all participants were measured in the sufficient range ( $71.48 \text{ ng/ml} \pm 9.47 \text{ ng/ml}$ ). Antibody-dependent cellular cytotoxicity increased in all study participants after supplementation; a significant increase was detected in eight out of ten volunteers.

It must therefore be assumed that vitamin D supplementation influences the transcription of the genes of natural killer cells that are important for defense function. Thus, in this study we investigate the gene expression of natural killer cells, that were activated on target cells (activated natural killer cells) or not activated (passive natural killer cells), before and after in vivo vitamin D supplementation using RNA sequencing.

We were able to detect changes in the transcriptome of passive and activated natural killer cells after compared to before in vivo vitamin D supplementation, but especially in activated NK cells. In the additional comparisons of activated versus passive natural killer cells before and after vitamin D supplementation, numerous genes were found to be expressed differentially. In these two comparisons, many of the up- and down-regulated genes match regardless of vitamin D status and can therefore be attributed to the activation of natural killer cells. However, a total of 2.440 genes showed a significant change in expression after natural killer cell activation only after vitamin D supplementation. These genes may be of particular interest.

Not individual differentially expressed genes determine the function of a cell, but rather the interaction of many transcripts organizing themselves into biological pathways within a cell under different conditions. For this reason, we conducted a gene set enrichment analysis (GSEA). Using GSEA, it was demonstrated that central pathways of immune defense and signaling were enriched in the various comparisons. It should be highlighted that the "cytokine-cytokine receptor interaction" pathway is significantly more expressed in both passive and

activated natural killer cells after vitamin D supplementation. This pathway is important for the intracellular regulation of cells involved in the innate and adaptive immune system <sup>17</sup>. An enrichment of the “cytokine-cytokine receptor interaction” pathway after ex vivo vitamin D supplementation has already been demonstrated in peripheral mononuclear cells <sup>24</sup>.

Furthermore, this study showed that the “natural killer cell mediated cytotoxicity” pathway is enriched in passive and activated natural killer cells after vitamin D supplementation. This biological pathway includes both the cascades of activating and inhibiting receptors of natural killer cells in general, as well as those of antibody-dependent cellular cytotoxicity in particular <sup>47</sup>.

## 2 Einleitung

### 2.1 Vitamin D

#### 2.1.1 Vitamin D-Stoffwechsel

Das fettlösliche Vitamin D nimmt eine besondere Stellung innerhalb der Vitamine ein, da es mit Hilfe von Sonnenlicht körpereigen in der Haut produziert werden kann und somit eher einem Hormon als einem Vitamin gleicht<sup>28, 68</sup>. Die Quellen für Vitamin D sind neben dem Sonnenlicht, Nahrung und Nahrungsergänzungsmittel<sup>74</sup>.

In der Haut befindliches 7-Dehydrocholesterol wird durch Sonnenlicht (UV-B Strahlung, Wellenlänge 290-315 nm) zu Prävitamin D metabolisiert, das sich thermisch unmittelbar zu Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) umwandelt. Vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol) wird aus Ergosterol ebenfalls mit Hilfe von UV-B Strahlung gebildet, Ergosterol muss jedoch zuvor über die Nahrung aufgenommen werden. Sowohl Vitamin D<sub>2</sub> als auch Vitamin D<sub>3</sub> können dem Körper direkt mit der Nahrung oder auch über Nahrungsergänzungsmittel zugeführt werden. Das in der Haut gebildete beziehungsweise mit der Nahrung aufgenommene Vitamin D (Vitamin D<sub>2</sub> und Vitamin D<sub>3</sub>) wird gebunden an das Vitamin D-bindende Protein (DBP) zur Leber transportiert und dort zu 25-Hydroxyvitamin-D hydroxyliert. Nachfolgend wird 25-Hydroxyvitamin-D in der Niere durch das Enzym 1- $\alpha$ -Hydroxylase zu 1,25-Dihydroxyvitamin-D (Calcitriol) hydroxyliert. Calcitriol stellt die aktive Form von Vitamin D dar<sup>26</sup>. Das Enzym 1- $\alpha$ -Hydroxylase konnte nicht nur in der Niere, sondern auch in vielen anderen Geweben und in Tumorverbänden nachgewiesen werden, dementsprechend kann lokal 1,25-Dihydroxyvitamin-D gebildet werden<sup>19</sup>.

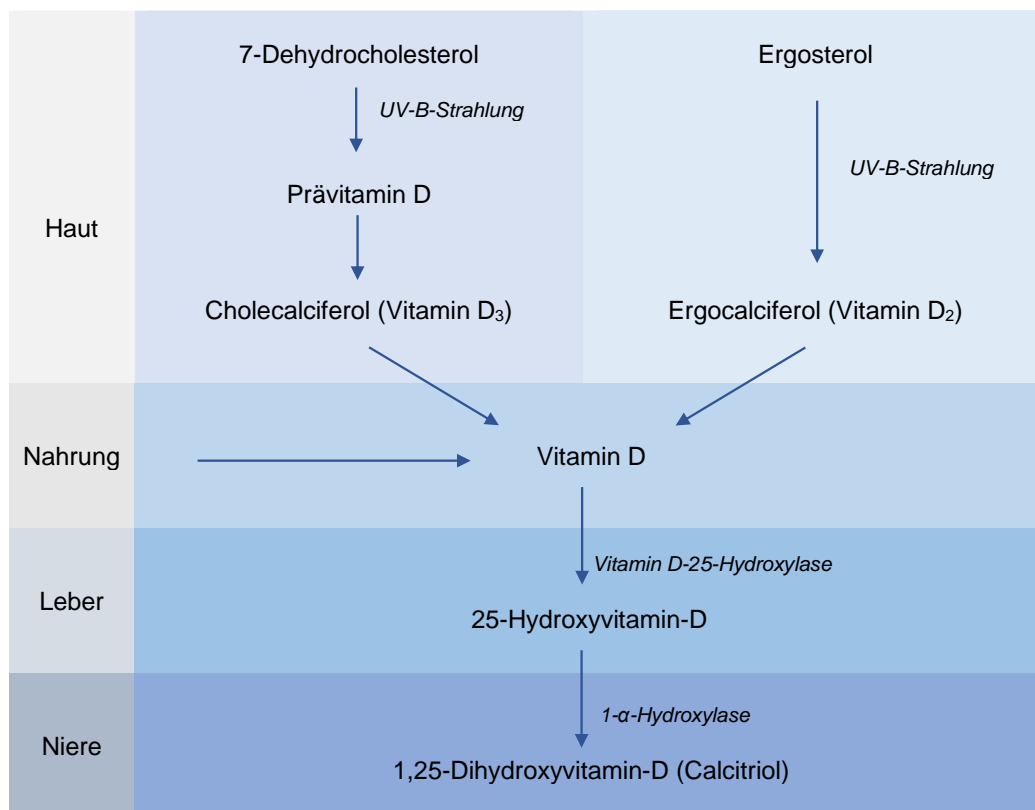
Aktives Vitamin D bindet an den Vitamin D-Rezeptor (VDR) unter anderem im Dünndarm, in der Niere und den Osteoblasten. Im Darm führt die Bindung von Calcitriol an den Vitamin D-Rezeptor zu einer gesteigerten intestinalen Aufnahme von Calcium. Die Rezeptorbindung beeinflusst zudem die Resorption von Calcium und Phosphat in den Nieren und die Bereitstellung von Calcium und Phosphat aus dem Knochen<sup>26</sup>. So trägt Vitamin D dazu bei, einen angemessenen Gehalt von Calcium und Phosphat für den Stoffwechsel und die Knochenmineralisierung sicherzustellen<sup>74</sup>.

Der Vitamin D-Rezeptor gehört zu den Kernrezeptoren und fungiert zusammen mit dem Retinoid X-Rezeptor (RXR) als heterodimerer Komplex. Dieser Komplex interagiert mit spezifischen DNA-Sequenzen, den sogenannten Vitamin D-Antwortelementen, wodurch die Transkription von Vitamin D-sensitiven Genen beeinflusst wird<sup>5</sup>. Vitamin D wirkt unter anderem auf die Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Apoptose und Angiogenese<sup>19</sup>.

Die Bildung von 1,25-Dihydroxyvitamin-D steht unter dem ständigen Einfluss von Serum-Calcium, Serum-Phosphat und Parathormon (PTH) <sup>26</sup>. Das Parathormon stimuliert in der Niere die Produktion von Calcitriol. Im Sinne eines Regelkreises hemmt 1,25-Dihydroxyvitamin-D wiederum die Bildung und Sekretion von PTH <sup>5</sup>.

Da die Halbwertszeit von Calcitriol mit vier bis sechs Stunden nur sehr kurz ist, eignet es sich nicht, um den Vitamin D-Spiegel zu messen. Mit einer Halbwertszeit von zwei bis drei Wochen stellt 25-Hydroxyvitamin-D die stabilere Vitamin D-Verbindung dar und wird somit zur Messung der Vitamin D-Reserve genutzt <sup>27</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wird der Vitamin D-Spiegel wie zumeist in der Literatur in ng/ml angegeben, jedoch kann auch die SI-Einheit nmol/l benutzt werden (Umrechnungsfaktor:  $\text{ng/ml} \times 2,5 = \text{nmol/l}$ ) <sup>58</sup>.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Vitamin D-Stoffwechsels.

### 2.1.2 Vitamin D-Mangel

Eine Unterversorgung mit Vitamin D ist sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen häufig. Es wird angenommen, dass weltweit eine Milliarde Menschen an einer Vitamin D-Insuffizienz oder sogar an einem Vitamin D-Mangel leiden <sup>26</sup>.

Als einen manifesten Vitamin D-Mangel beschreibt die Endocrine Society ein 25-Hydroxyvitamin-D-Spiegel kleiner 20 ng/ml, wohingegen im Bereich von 21 bis 29 ng/ml eine Vitamin D-Insuffizienz besteht. Erst ein 25-Hydroxyvitamin-D-Spiegel über 30 ng/ml wird als ausreichender Spiegel angesehen, eine Vitamin D-Intoxikation ist definiert ab einem Vitamin D-Spiegel von über 150 ng/ml <sup>28</sup>. Man muss jedoch beachten, dass es bezüglich dieser Einteilung keinen allgemein gültigen Konsensus gibt und diese Grenzen in Hinblick auf einen normalen Knochenstoffwechsel gesetzt wurden <sup>27</sup>.

Ein Mangel kann neben erblichen Erkrankungen wie zum Beispiel Mutationen des Vitamin D-Rezeptors und erworbenen Erkrankungen wie dem primären Hyperparathyreoidismus vor allem durch eine ungenügende Bildung entstehen. So sind eine ausreichende Sonnenlichtexposition und gegebenenfalls auch die Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln notwendig, um den Bedarf an Vitamin D zu decken. Ein Mangel kann beim Erwachsenen nicht nur zu Osteomalazie und dadurch zur Begünstigung von Frakturen führen, sondern auch zu muskulärer Schwäche. Eine Supplementation von Vitamin D hingegen kann das Risiko reduzieren an multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis und Diabetes mellitus Typ 1 zu erkranken <sup>26</sup>.

In Europa leiden nach Auswertung einer gepoolten Gesamtschätzung unabhängig von der Altersgruppe, der ethnischen Zugehörigkeit und des Breitengrades 13 % der Bevölkerung an einem Vitamin D-Mangel (25-Hydroxyvitamin D < 30 nmol/l) <sup>9</sup>. Auch in Deutschland ist ein niedriger 25-Hydroxyvitamin-D-Spiegel weit verbreitet, vor allem in den Winter- und Frühlingsmonaten und in höheren Breitengraden. Im Rahmen einer Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland wurde zwischen 2008 und 2011 bei 6.995 Deutschen der Vitamin D-Spiegel bestimmt. 30,2 % der Erwachsenen zwischen 18 und 79 Jahren litten an einem Vitamin D-Mangel (25-Hydroxyvitamin-D < 30 nmol/l), bei 38,4 % der Teilnehmenden konnte ein ausreichender Vitamin D-Spiegel > 50 nmol/l nachgewiesen werden. Der Vitamin D-Spiegel zeigte sich von der Jahreszeit abhängig, so wurde im Sommer ein Mangel bei nur 8,3 % der Erwachsenen beobachtet. Vor allem Frauen wiesen mit höherem Alter eine Zunahme der mangelhaften Vitamin D-Versorgung auf <sup>55</sup>.

Insgesamt wird die Vitamin D-Versorgung mit zunehmendem Alter schlechter. Von Juli 2009 bis März 2011 wurden in Deutschland in einer geriatrischen Rehabilitationsklinik bei 1.578 Patienten mit einem Durchschnittsalter von 82 Jahren der 25-Hydroxyvitamin-D-Spiegel gemessen. Der Mittelwert lag bei 10,2 ng/ml, lediglich 4 % der Patienten hatten einen

suffizienten Vitamin D-Spiegel (25-Hydroxyvitamin-D > 30 ng/ml), 96 % wiesen eine Insuffizienz beziehungsweise einen Mangel auf. Bei 67 % konnte sogar ein schwerer Mangel (< 10 ng/ml) nachgewiesen werden <sup>58</sup>.

## 2.1.3 Der Einfluss von Vitamin D auf die Inzidenz und Prognose maligner Neoplasien

### 2.1.3.1 Solide Tumore

Das Risiko an Brust-, Dickdarm-, Pankreas- oder Prostatakrebs zu erkranken steigt in höheren Breiten an. Verschiedene Studien konnten nachweisen, dass ein Vitamin D-Spiegel < 20 ng/ml zu einer Zunahme der Inzidenz und Mortalität dieser genannten Krebsleiden führt. Es wird angenommen, dass Brust-, Dickdarm-, Prostata- und auch anderes Gewebe selbst Calcitriol produzieren, um über die Kontrolle von Zellproliferation und Zelldifferenzierung eine Entartung zu verhindern <sup>26</sup>. In einer Meta-Analyse konnte bei Brustkrebs eine signifikant inverse Korrelation zwischen im Serum gemessenem Vitamin D-Spiegel und der Erkrankung dargestellt werden. Außerdem beobachtete man ein verringertes Brustkrebsrisiko bei der regelmäßigen Einnahme von Vitamin D <sup>12</sup>. Es zeigte sich auch, dass ein Anstieg des 25-Hydroxyvitamin-D-Spiegels über 20 ng/ml mit einem deutlich reduzierten Risiko an Kolon- und Rektumkarzinomen zu erkranken assoziiert ist <sup>73</sup>.

Bei Kopf-Hals-Tumoren wurde bei den Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe ein signifikant niedriger Vitamin D-Spiegel nachgewiesen (25-Hydroxyvitamin-D 11,1 ng/ml vs. 21,8 ng/ml). Lediglich 15 von 231 Patienten wiesen einen suffizienten Vitamin D-Spiegel auf (25-Hydroxyvitamin-D 30-100 ng/ml). Zudem zeigte sich ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben (engl. overall survival, OS) bei Patienten mit niedrigerem Vitamin D-Spiegel verglichen zu Patienten mit höherem Spiegel <sup>7</sup>.

Niedermaier et al. postulieren sogar, dass eine bevölkerungsweite Ergänzung von Vitamin D bei älteren Erwachsenen in Deutschland fast 30.000 Krebstodesfälle pro Jahr verhindern könnte. Dies wäre folglich enorm kostensparend, da die medizinische Versorgung von Krebspatienten am Lebensende die Kosten für eine bevölkerungsweite Supplementation mit Vitamin D deutlich übersteigt <sup>50</sup>.

### 2.1.3.2 Hämatologische Neoplasien

Thomas et al. konnten nachweisen, dass ein niedriger Vitamin D-Spiegel mit einer erhöhten Krebsinzidenz und einer erhöhten Mortalität bei Männern einhergehen kann und ein 25-Hydroxyvitamin-D-Spiegel über 25 nmol/l mit einer Reduktion der Gesamtkrebsinzidenz um 17 % und einer Verringerung der Gesamtkrebssterblichkeit um 29 % verbunden ist.

Insbesondere scheint aber ein höherer Vitamin D-Spiegel bei Männern auch mit einem verringerten Auftreten von Leukämien assoziiert zu sein <sup>21</sup>.

Bei Frauen ließ sich ebenfalls eine protektive Wirkung von Vitamin D auf das hämatologische Krebsrisiko nachweisen. In einer großen randomisierten kontrollierten Studie mit 36.282 Frauen über einen Beobachtungszeitraum von zehn Jahren bei derer die Gabe von Vitamin D und Calcium gegenüber der Gabe von Placebo getestet wurde, konnte gezeigt werden, dass in der Vitamin D- / Calcium-Gruppe ein signifikant geringeres Risiko für hämatologische Neoplasien, insbesondere lymphoiden Ursprungs, bestand. Jedoch konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Gabe von Vitamin D / Calcium und der hämatologischen krebsspezifischen Mortalität erbracht werden <sup>2</sup>.

Eine Vitamin D-Insuffizienz (25-Hydroxyvitamin D < 25 ng/ml) ist bei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) mit einem unterlegenen OS assoziiert und somit könnte eine bestehende Vitamin D-Insuffizienz ein möglicher beeinflussbarer Prognosefaktor der CLL sein <sup>61</sup>. Drake et al. konnten auch beim diffus großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL) bei Vitamin D-insuffizienten Patienten (25-Hydroxyvitamin D < 25 ng/ml), nach Justierung des internationalen prognostischen Index (IPI), ein signifikant schlechteres Ereignis-freies Überleben (engl. event-free survival, EFS) und OS beobachten <sup>19</sup>.

Beim folliculären Lymphom gibt es derzeit noch divergente Ergebnisse hinsichtlich des Therapieerfolges bei Patienten mit Vitamin D-Mangel im Vergleich zu Patienten mit suffizientem Vitamin D-Spiegel. In zwei Studien (SWOG und LYSA) wurden bei Vitamin D-defizienten Patienten, die an einem folliculären Lymphom litten und mit einer Immuno-Chemotherapie behandelt wurden, ein signifikant schlechteres progressionsfreies Überleben (engl. progression-free survival, PFS) beobachtet, das OS war jedoch nur in einer der Studien signifikant unterlegen <sup>32</sup>.

Insgesamt ist bei hämatologischen Neoplasien ein niedrigerer 25-Hydroxyvitamin-D-Serumspiegel mit einer höheren Last maligner Zellen, einem schlechteren Therapieansprechen, einem kürzeren Gesamtüberleben und einem kürzeren rezidivfreien Überleben verbunden <sup>37</sup>.

#### 2.1.4 Der Einfluss von Vitamin D auf die Therapie hämatologischer Neoplasien

Vitamin D scheint antiproliferative Effekte auf Tumorzellen zu haben, es kann Mediatoren des programmierten Zelltodes beeinflussen und die Angiogenese von Tumoren hemmen. Insbesondere zeigte sich, dass aktives Vitamin D synergistisch mit Chemotherapeutika wirkt. Zum Beispiel erhöht es die Wirkung von Platin-Derivaten und Taxanen, wenn es während oder vor der Chemotherapie appliziert wird <sup>69</sup>.

Es konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit Hodgkin-Lymphomen, die an einem Vitamin D-Mangel (25-Hydroxyvitamin D < 30 nmol/l) litten, ein reduziertes PFS und OS aufwiesen. Bei in vivo Modellen zeigte sich, dass die Kombination aus Doxorubicin, einem Chemotherapeutikum das in der Erstlinientherapie von Hodgkin-Lymphomen eingesetzt wird, und der Supplementierung von Vitamin D eine bessere Tumorkontrolle im Vergleich zur Placebogruppe und im Vergleich zur Monotherapie mit Vitamin D oder Doxorubicin erzielte. Deshalb postulierten die Autoren einen synergistischen Effekt von Vitamin D und bei Hodgkin-Lymphom etablierten Chemotherapeutika <sup>8</sup>.

Auch bei der Behandlung von Hochrisikopatienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) mit dem Erstlinien-Chemotherapeutikum Azacitidin ist ein höherer Vitamin D-Spiegel mit einem Überlebensvorteil verbunden. Darüber hinaus wurden im Hinblick auf die Toxizität unter der Behandlung mit Azacitidin signifikant weniger fieberhafte Neutropenien bei Patienten mit einem höherem Vitamin D-Spiegel beobachtet. Behandelt man in vitro myeloische Zelllinien mit Azacitidin und Vitamin D (25-Hydroxyvitamin-D und 1,25-Dihydroxyvitamin-D), führten die Kombinationstherapien zu einer verstärkten antiproliferativen Wirkung im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien <sup>56</sup>.

Innerhalb der RICOVER-60 Studie, in der sechs versus acht Zyklen zweiwöchentlichem CHOP mit oder ohne Hinzunahme von Rituximab (R-CHOP) bei älteren Patienten mit einem DLBCL verglichen wurden, konnte bei Patienten mit einem Vitamin D-Mangel (25-Hydroxyvitamin-D < 8 ng/ml) ein schlechteres Therapieansprechen nachgewiesen werden <sup>6</sup>. CHOP ist ein Chemotherapie-Regime bestehend aus den Substanzen Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon <sup>25</sup>. Jedoch zeigte sich ein signifikant schlechteres EFS, PFS und OS nur bei Patienten, die zusätzlich mit Rituximab behandelt wurden. Im Studienarm ohne Rituximab konnte lediglich ein besseres OS bei Patienten mit einem Vitamin D-Spiegel > 8 ng/ml beobachtet werden, es gab jedoch keinen Unterschied beim EFS und PFS. Es wird deshalb angenommen, dass ein Vitamin D-Mangel (25-Hydroxyvitamin D < 8 ng/ml) einen negativen Einfluss auf die Rituximab-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (RMCC) nimmt <sup>6</sup>.

Auch Hohaus et al. gingen der Frage nach, welcher Einfluss eine Vitamin D-Ergänzung bei DLBCL-Patienten während der Behandlung mit einer Immuno-Chemotherapie (R-CHOP) hat. Insgesamt konnte in dieser Studie beobachtet werden, dass ein 25-Hydroxyvitamin-D-Spiegel kleiner 20 ng/ml zu einem signifikant niedrigeren ereignisfreien Überleben führt. Zudem wiesen Patienten mit einem nach Supplementierung normalisiertem Vitamin D-Spiegel ein besseres EFS auf, als Patienten mit einem anhaltenden Vitamin D-Mangel, beziehungsweise einer Vitamin D-Insuffizienz (Cut-off-Wert 25-Hydroxyvitamin-D 20 ng/ml). Dabei erwies sich die Supplementation als nebenwirkungsarm, es traten keine Hyperkalzämien und Hypervitaminosen auf <sup>25</sup>. Zeitnah wird auch die endgültige Auswertung der Optimal Studie



erwartet. In dieser Studie wird unter anderem als sekundärer Endpunkt die Auswirkungen einer Vitamin D-Supplementation auf den Therapieerfolg von Patienten mit DLBCL untersucht <sup>14</sup>.

### 2.1.5 Vitamin D und die Immunabwehr

Obgleich unwissend über den zu Grunde liegenden Mechanismus, wurde Vitamin D schon früh zu Behandlung von Infektionen eingesetzt. So wurden Tuberkulose-Erkrankte im Rahmen ihrer Behandlungen in Sanatorien dem Sonnenlicht ausgesetzt <sup>3, 59</sup>.

Im Allgemeinen treten akute virale Atemwegserkrankungen wie die Grippe bei uns im Winter häufiger auf, zeitgleich wenn auch der Vitamin D-Spiegel wegen der geringen Sonnenstrahlung am niedrigsten ist <sup>59</sup>. Es konnte nachgewiesen werden, dass ein höherer Vitamin D-Spiegel bei gesunden Erwachsenen das Risiko an einer akuten viralen Atemwegsinfektion insbesondere Influenza zu erkranken, reduziert <sup>3, 57</sup>. Zudem zeigten zahlreiche Studien in den letzten Jahren, dass eine Nahrungsergänzung mit Vitamin D vor akuten Atemwegsinfektionen schützt und das bei einem nur seltenen Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen <sup>41</sup>.

Auch bei einer Covid-19-Infektion reduziert ein suffizienter Vitamin D-Serumspiegel (25-Hydroxyvitamin-D > 30 ng/ml) das Risiko eines schweren Verlaufs und die Mortalität, sodass eine Supplementation empfohlen wird <sup>11, 39</sup>.

Ferner weisen Patienten, die an Autoimmunerkrankungen leiden, einen niedrigeren Vitamin D-Spiegel im Vergleich zu Gesunden auf. Darüber hinaus ist die Krankheitsaktivität bei diesen Patienten höher, wenn ein niedriger Vitamin D-Spiegel vorliegt <sup>18</sup>.

Nachweislich exprimieren Immunzellen wie natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen, B- und T-Zellen den Vitamin D-Rezeptor <sup>3</sup>. Viele dieser Immunzellen einschließlich Monozyten, Makrophagen, B- und T-Zellen können 25-Hydroxyvitamin-D zu aktivem 1,25-Dihydroxyvitamin-D umwandeln, da sie das Enzym 1- $\alpha$ -Hydroxylase exprimieren. Dadurch wird eine selbstständige Regulation der lokalen 1,25-Dihydroxyvitamin-D-Konzentration ermöglicht <sup>18, 54</sup>.

Vitamin D spielt somit eine wichtige Rolle sowohl im angeborenen als auch im adaptiven Immunsystem, wobei es teils hemmenden als auch aktivierenden Einfluss nehmen kann <sup>3, 5</sup>.

#### 2.1.5.1 Der Einfluss von Vitamin D auf das angeborene Immunsystem

Makrophagen, die zentralen Zellen des angeborenen Immunsystems, exprimieren nicht nur den Vitamin D-Rezeptor, sondern auch das Enzym 1- $\alpha$ -Hydroxylase. Dadurch können sie eigenständig aktives Vitamin D synthetisieren. Während in der Niere die Hydroxylierung von 25-Hydroxyvitamin-D zu 1,25-Dihydroxyvitamin-D durch das Parathormon reguliert wird, wird

in Makrophagen die 1- $\alpha$ -Hydroxylase durch den 25-Hydroxyvitamin-D-Spiegel im Serum und durch Zytokine wie Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) beeinflusst<sup>3</sup>. Von Makrophagen produzierte antimikrobielle Peptide spielen in der angeborenen Immunabwehr eine wichtige Rolle. Aktives Vitamin D fördert die Freisetzung von Cathelicidin, eines dieser antimikrobiellen Peptide, aus Makrophagen<sup>5, 59</sup>. Das angeborene Immunsystem wird bei Kontakt mit sogenannten pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs) über Toll-like Rezeptoren auf Makrophagen aktiviert, diese wiederum aktivieren die 1- $\alpha$ -Hydroxylase. Wenn genügend 25-Hydroxyvitamin-D zur Verfügung steht, können Makrophagen so aktives Vitamin D herstellen, welches dann die Bildung von Cathelicidin hochreguliert. Cathelicidin hat eine herausragende Bedeutung in der Abwehr von Tuberkulosebakterien, zeigt aber auch Effektivität gegenüber dem Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*<sup>59</sup>. In einer Querschnittsanalyse wurde festgestellt, dass bei kritisch kranken septischen Patienten der 25-Hydroxyvitamin-D-Serumspiegel signifikant erniedrigt war und dies mit einer verminderten Cathelicidin-Konzentration korrelierte<sup>54</sup>.

Zu Beginn einer Infektion stimuliert Calcitriol zudem die Differenzierung von Monozyten zu reifen Makrophagen. Näher betrachtet können Makrophagen in M1- und M2-Makrophagen unterteilt werden. Wobei M1-Makrophagen proinflammatorische Mediatoren wie zum Beispiel Stickoxide, TNF- $\alpha$  und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) produzieren und dadurch Krankheitserreger abtöten und die Differenzierung von T-Helferzellen positiv beeinflussen. M2-Makrophagen sezernieren hingegen antiinflammatorische Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10). Die antiinflammatorische Wirkung von Calcitriol auf Makrophagen ist durch eine verminderte Produktion entzündungsfördernder Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  und einer erhöhten Produktion antiinflammatorischem IL-10 gekennzeichnet. Es liegt nahe, dass aktives Vitamin D ein Gleichgewicht zwischen M1- und M2-Makrophagen und somit zwischen antiinflammatorisch und proinflammatorisch Effekten herstellt<sup>18</sup>.

Der Einfluss von Vitamin D auf natürliche Killerzellen wird in Kapitel 2.3 (Seite 22) näher beleuchtet.

#### 2.1.5.2 Der Einfluss von Vitamin D auf das adaptive Immunsystem

Sowohl T- als auch B-Zellen exprimieren den Vitamin D-Rezeptor, wobei die Expression bei ruhenden Zellen gering ist. Während der Aktivierung und Proliferation regulieren diese Zellen dann aber die Expression des Vitamin D-Rezeptors signifikant hoch, dadurch können Vitamin D-abhängige Gene reguliert werden, welche wiederum die Proliferation und Differenzierung der Zellen beeinflussen<sup>54</sup>.

Die Wirkung von Calcitriol auf die Zellen des adaptiven Immunsystems variiert bei den verschiedenen Zelltypen, insbesondere die Untergruppen der T-Zellen sprechen

unterschiedlich auf Calcitriol an <sup>37</sup>. Aktives Vitamin D unterdrückt die Proliferation und Differenzierung von T-Helfer-Zellen und beeinflusst deren Zytokinproduktion. Die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  wird gehemmt. Die Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen (IL-3, IL-5, IL-10) wird gefördert. Regulatorische T-Zellen, welche unter anderem entzündungsfördernde Reaktionen anderer Immunzellen und eine erhöhte Autoimmunität unterdrücken, werden durch Calcitriol positiv beeinflusst <sup>5, 54</sup>.

Betrachtet man den Einfluss von Calcitriol auf B-Zellen, so hemmt es unter anderem die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen, die Bildung von Immunglobulinen und die B-Zell-Proliferation <sup>5, 42</sup>. Werden B-Zellen mit Calcitriol behandelt, wird darüber hinaus die Apoptose von aktivierten B-Zellen gefördert und auch die Generierung von Gedächtniszellen unterdrückt <sup>37, 54</sup>. Zudem weisen B-Zellen nach Behandlung mit Calcitriol eine reduzierte Expression von stimulierenden Molekülen auf, dies führt zu einer eingeschränkten Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren und dadurch zu einer verringerten Produktion von T-Zell-Zytokinen und Proliferation von T-Zellen <sup>37</sup>.

## 2.2 Natürliche Killerzellen

### 2.2.1 Die Rolle natürlicher Killerzellen im Immunsystem

Natürliche Killerzellen sind ein zentraler Bestandteil des Immunsystems. Sie fungieren als Wächter der angeborenen Immunantwort und sind an der frühen Abwehr von virusinfizierten und entarteten Zellen beteiligt. Da sie von lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark abstammen und viele lymphoide Marker exprimieren, zählen NK-Zellen zur Gruppe der Lymphozyten <sup>44, 72</sup>. Sie machen bis zu 15 % aller zirkulierender Lymphozyten aus <sup>16</sup>.

Klassischerweise wird das Immunsystem in eine angeborene und eine adaptive Immunabwehr unterteilt. Da NK-Zellen keine antigenspezifischen Rezeptoren besitzen, wurden sie ursprünglich als Bestandteil des angeborenen Immunsystems angesehen. Jedoch weisen sie aufgrund ihrer biologischen Funktion sowohl Charaktereigenschaften des angeboren als auch des adaptiven Immunsystems auf <sup>72</sup>. Normalerweise befinden sich NK-Zellen im peripheren Blut, im Knochenmark und in der Milz. Sie können, wenn notwendig, in entzündetes Gewebe einwandern <sup>43</sup>. Die Rekrutierung von NK-Zellen in entzündetes Gewebe wird unter anderem durch chemotaktische Botenstoffe gesteuert <sup>44</sup>.

NK-Zellen werden durch Zytokine oder direkt durch die Begegnung mit ihren Zielzellen aktiviert <sup>44</sup>. Im Gegensatz zu zytotoxischen T-Zellen können sie Zielzellen, wie virusinfizierte Zellen und Tumorzellen, ohne vorherige spezifische Sensibilisierung abtöten, diese Fähigkeit

war namensgebend. Sie sind zudem Hauptproduzenten von Zytokinen wie IFN- $\gamma$ , IL-10 und TNF- $\alpha$  <sup>72</sup>.

NK-Zellen können mit vielen anderen Zellen des Immunsystems interagieren. Die NK-Zellen vermittelte Zytotoxizität und die Produktion von Zytokinen wirkt sich auf dendritische Zellen, Makrophagen und Neutrophile aus. Wenn NK-Zellen mit dendritischen Zellen (DC) Kontakt haben, reifen die DC nach Antigenaufnahme aus und setzen Zytokine frei, welche wiederum das Verhalten von NK-Zellen prägen. So erhöht zum Beispiel das von dendritischen Zellen gebildete IL-12 die Zytotoxizität von NK-Zellen und fördert die Freisetzung von IFN- $\gamma$ .

IFN- $\gamma$  und auch TNF- $\alpha$  wiederum fördern die Reifung dendritischer Zellen, was zu einer besseren Antigenpräsentation für T-Zellen führt. Somit besitzen NK-Zellen eine regulatorische Funktion, die die nachgeordneten Instanzen des adaptiven Immunsystems beeinflusst <sup>44, 72</sup>. Es wird angenommen, dass NK-Zellen auch eine Art Gedächtnisfunktion besitzen. Sie nehmen nach Aktivierung stabile vererbare Eigenschaften an, welche ihr Verhalten bei nachfolgenden Infektionen steuert <sup>72</sup>.

Phänotypisch werden NK-Zellen durch ihre Expression von CD56 und mangelnde Expression von CD3 definiert. Man unterscheidet CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim/-</sup>-NK-Zellen und CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>-NK-Zellen. CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>-Zellen machen etwa 90 % aller NK-Zellen aus und finden sich vor allem im peripheren Blut und in entzündetem Gewebe. Sie besitzen eine besonders hohe Zytotoxizität, produzieren jedoch wenige Zytokine. CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim/-</sup>-NK-Zellen sind weniger zytotoxisch aktiv, setzen aber mehr Zytokine frei. Sie sind vor allem in Lymphknoten zu finden und machen nur etwa 10 % aller NK-Zellen aus <sup>16, 44</sup>.

## 2.2.2 Rezeptoren und Funktionen der natürlichen Killerzellen

Zur Ausübung ihrer Funktionen sind NK-Zellen mit einer Vielzahl von Rezeptoren ausgestattet, die entweder die Aktivität der NK-Zellen stimulieren (aktivierende Rezeptoren) oder dämpfen (inhibierenden Rezeptoren). Dadurch wird sowohl die Selbsttoleranz sichergestellt, als auch die Abwehr gegen virusinfizierte und entartete Zellen. Zur Interaktion mit anderen Zellen binden NK-Zellen mit ihren Rezeptoren an die entsprechenden Liganden auf der Zelloberfläche der sogenannten Zielzellen (engl. Target) <sup>72</sup>.

NK-Zell-Rezeptoren sind Keimbahn kodiert und unterliegen nicht der somatischen Rekombination wie die Gene der Antigenrezeptoren von B- und T-Zellen. Es ist das mehr oder weniger ausgeprägte Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren, welches die Zellfunktion und die Aktivität von NK-Zellen bestimmt <sup>16, 44</sup>.

Zu den **aktivierenden Rezeptoren** gehören die natürlichen zytotoxischen Rezeptoren (NCR), sowie die NKG2D- und Fcγ-Rezeptoren<sup>72</sup>. Natürliche zytotoxische Rezeptoren sind spezifisch für NK-Zellen und spielen eine wichtige Rolle in der Tumorerkennung und der Lyse der Tumorzellen. Zu ihnen zählen NKp30 (CD337), NKp44 (CD336) und NKp46 (CD335)<sup>43</sup>. Verantwortlich für die Erkennung von Tumoren ist neben den natürlichen zytotoxischen Rezeptoren auch der NKG2D-Rezeptor. Zielzellliganden für den NKG2D-Rezeptor sind stressinduzierbare MICA-, MICB10- und ULBP11-Proteine. Diese werden auf Zellen nach Proliferation und Zelltransformation, somit bei zellulärem Stress, exprimiert und hochreguliert<sup>43,72</sup>. Mittels Fcγ-Rezeptoren können NK-Zellen außerdem Antikörper-markierte Zellen erkennen und die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität einleiten, siehe Seite 22<sup>72</sup>.

Zudem exprimieren NK-Zellen Rezeptoren für Zytokine wie IFN-α, IL-12, IL-15. Diese Zytokine werden in der frühen Phase einer Infektion hochreguliert und spielen eine entscheidende Rolle für die Aktivierung der NK-Zellen<sup>22</sup>. Viele dieser Zytokine werden von Monozyten ausgeschüttet, sodass NK-Zellen die frühesten Aktivierungssignale von Monozyten erhalten<sup>16</sup>.

Zu den **inhibierenden Rezeptoren** gehören auch einige der sogenannten killer cell immunoglobulin-like Rezeptoren (KIR). Deren Liganden sind bestimmte Klasse I-Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC)<sup>22</sup>. NK-Zellen erkennen Zellen mit verminderter oder fehlender Expression von MHC-I-Molekülen, zum Beispiel auf Zellen nach Virusinfektion oder deren zellulärer Transformation („missing self hypothesis“)<sup>67,72</sup>. Für die Erkennung und folgende Abtötung sind jedoch auch aktivierende Signale seitens der Zielzellen erforderlich<sup>67</sup>. Gesunde Zellen, die genügend MHC-I-Molekülen und wenige stressinduzierte Moleküle exprimieren werden verschont, während gestresste Zielzellen mit wenigen MHC-I-Molekülen und vielen stressinduzierten Molekülen auf der Zelloberfläche lysiert werden<sup>72</sup>.

Bei der Ligandenbindung aktivierender Rezeptoren kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung nachgeschalteter Kinasen. Im Folgenden führt dies zur Degranulation der NK-Zelle und Zytokinfreisetzung. Werden dagegen inhibierende Rezeptoren aktiviert, deaktivieren sie Signalkinasen durch Rekrutierung von Phosphatasen. Sobald NK-Zellen aktiviert sind, können sie Synapsen mit der Zielzelle bilden durch die dann Perforine und Granzyme zur Lyse der Target-Zellen freigesetzt werden<sup>75</sup>.

NK-Zellen enthalten zytotoxische Granula, welche komplexe Organellen mit spezialisierten Speicher- und Sekretionsfunktionen darstellen. Granzyme und Perforin sind Bestandteile dieser zytotoxischen Granula. Während Perforin ein Membran-zerstörendes Protein ist, gehören Granzyme zur Familie der Serinproteasen und induzieren Apoptose. Neben der Exozytose durch zytotoxische Granula, töten NK-Zellen ihre Zielzellen auch mittels Signalübertragung über TNF-Todesrezeptoren<sup>63</sup>.

### 2.2.3 Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität

NK-Zellen erkennen und lysieren ihre Zielzellen auch dann, wenn an diese Antigen-spezifische Antikörper gebunden sind <sup>67</sup>. Dazu exprimieren NK-Zellen Fcγ-Rezeptoren wie FcγRIIIA (CD16a) und/oder FcγRIIC (CD32c), diese binden die FC-Domänen von Immunglobulinen. Wenn die Immunglobuline an Zielzellen angelagert sind, können NK-Zellen ohne Priming diese markierten Zielzellen lysieren. Zudem sezernieren sie im Verlauf Zytokine wie IFN-γ, um das adaptive Immunsystem zu rekrutieren. Dieser Vorgang wird als antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (engl. antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) bezeichnet <sup>72, 75</sup>.

FcγRIIIA-Rezeptoren sind mit intrazellulären Aktivierungsmotiven (ITAMs) verbunden. Diese werden bei der Ligandenbindung an den Rezeptor phosphoryliert. Es erfolgt dann im Sinne einer Signaltransduktion die Aktivierung von PI3K-, NF-κb- und ERK-Signalwegen. In der Folge kommt es zur Degranulation der NK-Zellen, zur Sekretion von Zytokinen und schlussendlich zur Lyse der Zielzelle. Die ADCC-vermittelte Apoptose der Zielzelle kann direkt über Aufnahme von zytotoxischen Granula und über Signale der TNF-Todesrezeptoren erfolgen, sowie indirekt über die Aktivierung des adaptiven Immunsystems durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine <sup>75</sup>.

Monoklonale Antikörper (mAbs), die heute in der Tumorthherapie vielfältig eingesetzt werden, erkennen tumorselektive Antigene auf der Oberfläche der entarteten Zellen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die therapeutische Wirkung der mAbs von NK-Zellen und vor allem von deren ADCC-Potential abhängig ist. So ist die ADCC ein wesentlicher Mechanismus der Tumorthherapie und spielt bei der Behandlung verschiedener Krebsarten mit mAbs eine wichtige Rolle, insbesondere wenn die Tumorzellen bestimmte Antigene überexprimieren. Herausragendes Beispiel für solch einen monoklonalen Antikörper ist Rituximab, der das B-Zell-Antigen CD20 erkennt <sup>60, 75</sup>.

## 2.3 Der Einfluss von Vitamin D auf natürliche Killerzellen

Die Literatur zum Einfluss von Vitamin D auf NK-Zellen ist spärlich und widersprüchlich <sup>37</sup>. Die bisher veröffentlichten Ergebnisse variieren stark und reichen von einer gesteigerten Proliferation und Zytotoxizität der NK-Zellen unter dem Einfluss von Vitamin D bis zur Hemmung dieser <sup>77</sup>.

Weeres et al. beobachteten, dass aktives Vitamin D die Entwicklung von NK-Zellen negativ beeinflusst. Unter Bedingungen, die für die Entwicklung von NK-Zellen optimal sind, differenzierten sich Stammzellen unter dem Einfluss von Calcitriol entlang des myeloischen Weges vor allem zu Monozyten anstatt zu NK-Zellen. Darüber hinaus zeigten die NK-Zellen,

die sich unter dem Einfluss von Calcitriol entwickelten, eine signifikante Funktionsminderung mit verminderter Zytotoxizität und verminderter Zytokinproduktion insbesondere von IFN- $\gamma$ . Einen Unterschied bei der Expression von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren wie NKp30, NKp46 und NKG2D wurde nicht beobachtet. Und auch ein Einfluss von Calcitriol auf die Zytotoxizität oder die Zytokinproduktion reifer NK-Zellen konnte nicht nachgewiesen werden<sup>77</sup>.

Frauen mit wiederkehrenden Schwangerschaftsverlusten weisen eine signifikant höhere NK-Zell-Zytotoxizität auf. Bei eben diesen Patientinnen inhibiert eine Supplementation mit Calcitriol *in vitro* die NK-Zell-Zytotoxizität. Die Inkubation von aktivem Vitamin D mit den überaktiven NK-Zellen *in vitro* beeinflusst jedoch nicht nur die Zytotoxizität, sondern auch die Rezeptorexpression. So ließ sich eine Abnahme der Expression von CD69, CD107a und der natürlichen zytotoxischen Rezeptoren NKp30 und NKp44 nachweisen. Für die Expression von NKp46 und NKG2D wurde kein Unterschied beobachtet. Die Expression von CD158a und CD158b, beides inhibierende KIRs, stieg nach der *in vitro* Supplementation von Calcitriol deutlich an. Insgesamt legen diese Ergebnisse nahe, dass Calcitriol immunregulatorische Effekte auf die Zytotoxizität von NK-Zellen nimmt<sup>52</sup>.

Im Gegensatz dazu stehen die Beobachtungen von Al-Jaderi et al.. Sie zeigten, dass aktives Vitamin D die NK-Zell-abhängige Lyse von hämatologischen Tumorzellen signifikant verstärkt. Zudem wiesen sie bei NK-Zellen eine erhöhte Expression aktivierender Rezeptoren wie NKp30, NKp44 sowie NKG2D unter einer Supplementation mit Calcitriol in verschiedenen Konzentrationen nach. Auch beobachtete diese Arbeitsgruppe, dass die Inkubation von NK-Zellen mit aktivem Vitamin D die Expression von CD158 runterregulierte<sup>1</sup>.

Fußend auf den Ergebnissen der Ricover-60 Studie untersuchten Bittenbring et al. den Einfluss eines Vitamin D-Mangels auf die Rituximab-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (RMCC = Rituximab-vermittelte ADCC). Der unterschiedliche Effekt des Vitamin D-Mangels bei Patienten, die innerhalb der Ricover-60 Studie mit oder ohne Rituximab behandelt wurden, deutet auf einen Zusammenhang zwischen einem Vitamin D-Mangel und den Rituximab-Effektormechanismen insbesondere der ADCC als Hauptwirkmechanismus der Antikörperwirkung hin. *In vitro* wurde daraufhin die RMCC von acht gesunden Probanden gegen eine CD20-positive Tumorzelllinie (DAUDI) vor und nach Supplementation mit Vitamin D untersucht. Nach der Supplementation und Normalisierung des 25-Hydroxyvitamin D-Spiegels (> 30 ng/ml) konnte bei sieben Probanden eine signifikant höhere ADCC gemessen werden. Ein Proband erreichte keinen normalen Vitamin D-Spiegel und wurde deshalb von der Analyse ausgeschlossen<sup>6</sup>.

Auch bei Kopf-Hals-Karzinom (engl. head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) konnte die Abhängigkeit der zytotoxischen Aktivität vom Vitamin D-Spiegel festgestellt werden.

Wiesen HNSCC-Patienten einen Vitamin D-Spiegel  $> 10$  ng/ml auf, wurde eine Verbesserung der zytotoxischen NK-Zell-Aktivität gegenüber einer hypopharyngealen Krebszelllinie (FaDu-Zelllinie) *in vitro* beobachtet. Die verstärkte Zytotoxizität war unabhängig von der Hinzunahme von Cetuximab, einem für die Behandlung von lokal fortgeschrittenen und metastasierten HNSCC zugelassenen Anti-EGFR-Antikörper. Außerdem förderte ein höherer Vitamin D-Spiegel bei HNSCC-Patienten die peri- und intratumorale NK-Zell-Infiltration und führt so zu einer signifikanten Verbesserung der Prognose <sup>7</sup>.

## 2.4 Genexpressionsanalyse mittels RNA-Sequenzierung

### 2.4.1 RNA-Sequenzierung

Die biologische Aktivität von Zellen wird durch die Transkription von Genen in komplementäre RNA reguliert <sup>36</sup>. Das Transkriptom ist der vollständige Satz von Transkripten in einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt. Es ist für die Interpretation der funktionellen Elemente des Genoms von wesentlicher Bedeutung <sup>36, 76</sup>. Die Expression von Genen ist unter anderem abhängig vom Zelltyp, dem Zeitpunkt und verschiedenen Reizen. Viele Genloci werden nur unter ganz bestimmten Bedingungen exprimiert <sup>23</sup>. Das Ziel von Genexpressionsanalysen ist es, die sich ändernden Expressionsniveaus des Transkriptoms unter verschiedenen Bedingungen zu quantifizieren <sup>76</sup>.

In den letzten Jahren wurden Methoden entwickelt, die eine solche Quantifizierung der Genexpression ermöglichen, wie zum Beispiel die hybridisierungsbasierte RNA-Microarray-Technologie. Diese ist zwar mittlerweile kostengünstig, weist jedoch mehrere Limitationen auf <sup>36</sup>. Mikroarrays verwenden je nach Fragestellung vorgewählte Nukleinsäuresonden (Zielsequenzen), die kovalent an Glasobjektträger gebunden sind. Fluoreszenz-markierte RNA wird dann auf den Objektträger aufgebracht, hybridisiert an den Sonden und wird gescannt. Die Bilder werden in Signalintensitäten umgewandelt und die Daten werden unter Verwendung einer Array-spezifischen Software verarbeitet <sup>40</sup>.

Basierend auf der Sequenzierung der nächsten Generation (engl. next generation sequencing, NGS) wurde es dann möglich, RNA durch die Sequenzierung von komplementärer DNA (cDNA) zu analysieren. Diese als RNA-Sequenzierung (RNA-seq) bezeichnete Methode bietet eine detaillierte und quantitative Ansicht der Genexpression und somit einen Einblick in das Transkriptom einer Zelle <sup>36</sup>. RNA-seq wurde erstmals 2008 eingeführt <sup>35</sup> und wird mittlerweile am häufigsten zur Analyse der differentiellen Genexpression (DGE) verwendet <sup>64</sup>.

Die RNA-seq ermöglicht die Häufigkeit oder relativen Veränderungen jedes Transkriptes unter bestimmten Bedingungen zu messen <sup>23</sup>. Im Vergleich zu früheren Möglichkeiten, wie der Microarray-basierten Methoden, weist die RNA-seq eine höhere Auflösung und größere



Abdeckung des Transkriptoms auf und bietet deshalb eine genauere Messung der Transkriptmenge <sup>36, 76</sup>.

Die RNA-seq beginnt mit der Isolation der Gesamt-RNA aus einer Probe <sup>36</sup>. Es kann in der Folge die gesamte RNA oder nach Aufbereitung isolierte Messenger-RNA (mRNA) verwendet werden <sup>35</sup>. Die mRNA-Isolation erfolgt entweder durch eine Poly(a)-Selektion oder durch die Entfernung der ribosomalen RNA (rRNA) <sup>15</sup>. Anschließend wird eine Sequenzierungsbibliothek hergestellt, diese variiert je nach Auswahl der RNA-Spezies und nach den NGS-Plattformen. Die Konstruktion einer Sequenzierungsbibliothek umfasst hauptsächlich das Umschreiben der RNA in cDNA, das Fragmentieren und Amplifizieren der cDNA-Moleküle und das Ligieren von Sequenzierungsadaptern. Die Bibliothek wird dann auf einer Hochdurchsatzplattform sequenziert <sup>36, 64</sup>. Es entstehen Millionen von kurzen Lesevorgängen (engl. Reads).

#### 2.4.2 RNA-seq-Analyse

Nach der Sequenzierung werden die resultierenden Reads auf ein Referenzgenom oder auf Referenz-Transkripte ausgerichtet <sup>51</sup>. Die RNA-seq steht schließlich vor der Herausforderung, die entstandenen Datenmengen zu verarbeiten <sup>76</sup>.

Aufgrund der zunehmenden Beliebtheit der RNA-seq wurde ein rasch wachsender Bedarf an bioinformatischem Verständnis und Rechenressourcen zur RNA-Sequenzierungsanalyse notwendig <sup>35</sup>. Es bedurfte so nach der Entwicklung von NGS-Verfahren neue statistische Methoden zur Bewertung quantitativer Unterschiede zwischen den Proben <sup>38</sup>.

Die Analyse der Daten umfasst viele Schritte von der Verarbeitung der rohen Sequenzierungsdaten über die Quantifizierung der Genexpression, der Prüfung der Datenqualität bis hin zur Identifizierung und Organisation der differentiell exprimierten Gene. Für solche Sequenzierungsanalyse werden spezielle Software-Tools, wie zum Beispiel bcbioRNASeq, eingesetzt <sup>65</sup>.

Um Daten der RNA-seq zum Vergleich der Genexpression zwischen zwei Proben zu nutzen, müssen die entstanden Reads quantifiziert werden. Dazu ist zunächst die Kartierung der Reads (engl. Mapping) notwendig. Die Aufgabe des Mapping besteht darin, die Stelle zu finden, an der die Reads am besten mit der Referenz übereinstimmt <sup>51</sup>.

Ein wesentlicher Schritt bei der Analyse der RNA-seq-Daten ist die Normalisierung. Diese ermöglicht die Quantifizierung der Expressionsniveaus jedes Gens relativ zu anderen Genen der Probe. Da längere Transkripte eine höhere Anzahl an Reads, bei jedoch gleichem Expressionsniveau, aufweisen, ist es eine gängige Methode, die Anzahl der Reads durch die Länge des Gens zu dividieren <sup>51</sup>.

Schließlich ist das Ziel der Differenzialexpressionsanalyse Gene hervorzuheben, die sich unter verschiedenen Bedingungen signifikant verändert haben. Dazu ist es notwendig, statistische Tests zwischen den Proben durchzuführen<sup>51</sup>. Am häufigsten wird bei der vergleichenden Analyse der Transkripte die Nullhypothese getestet, sodass der logarithmische fold change (LFC) zwischen zwei Proben für die Expression eines Genes genau Null ist. Dies bedeutet, dass das Gen unter einer geänderten Bedingung nicht beeinflusst wurde<sup>38</sup>. Dieser paarweise Vergleich testet die Nullhypothese für jedes Gen mit der Annahme, dass die beiden Gruppen eine gleiche Expressionsverteilung aufweisen. Das heißt, das Gen wird nicht unterschiedlich exprimiert. Die Hypothese wird verworfen, wenn die beiden Gruppen signifikant Expressionsunterschiede aufweisen, somit das Gen unterschiedlich exprimiert wird. Die resultierende Datentabelle bestimmt p-Werte, angepasste p-Werte (adj. p-Wert) und den log<sub>2</sub> fold change für jedes Gen. Der angepasste p-Wert wird mit der Methode der Falscherkennungsrate (FDR) nach Benjamini-Hochberg zur Anpassung für das Testen mehrerer Hypothesen bestimmt<sup>35</sup>.

Während der Analyse der RNA-seq Daten sind mehrere Qualitätskontrollschritte notwendig, gegebenenfalls werden dabei auch Ausreißer erkannt, die aufgrund ihrer schlechten Qualität nicht für die weiteren Analysen berücksichtigt werden sollen<sup>35</sup>.

Die Qualität der RNA-seq kann bei der Auswertung unter verschiedenen Aspekten bewertet und kontrolliert werden. So dienen die Gesamtzahl der Reads pro Probe und die Mapping-Rate dazu, Ungleichgewichte in der Sequenzierungstiefe zu identifizieren. Die Mapping-Rate spiegelt den Prozentsatz der Reads wider, die auf das Referenzgenom abgebildet werden konnten. Niedrige Mapping-Raten weisen auf eine Kontamination der Probe und eine schlechte Sequenzierungsqualität hin, deshalb sollte eine Mapping-Rate von mehr als 75 % erreicht werden. Die Mehrheit der Reads sollte Exons und nicht Introns zugeordnet werden, so sollten mindestens 60 % aller Reads Exons entsprechen. Die Proben sollten zudem eine Kontamination von rRNA unter 10 % aufweisen. Auch die Anzahl der nachgewiesenen Gene im Verhältnis zur Anzahl der kartierten Gene dient dazu, die Probenqualität zu beurteilen. Im Idealfall weisen alle Proben eine ähnliche Anzahl von nachgewiesenen Genen auf<sup>65</sup>.

Zumeist wird außerdem eine Hauptkomponentenanalyse (engl. principal component analysis, PCA) durchgeführt, diese dient dazu die Variation der Daten zu visualisieren. Die PCA reduziert die Dimensionalität der Daten und beschreibt die Variation anhand von Hauptkomponenten. Die Expressionsniveaus für Gene werden in den Hauptkomponentenraum transformiert, wobei jede Probe auf einen einzelnen Punkt reduziert wird<sup>65</sup>. Dabei beschreibt PC1 die größte Variation innerhalb der Daten, PC2 die zweithäufigste Variation. Auf diese Weise kann eine Hauptkomponentenanalyse helfen, die Gruppierung zu visualisieren und technische oder biologische Ausreißer zu identifizieren. Diese werden von weiteren Analysen ausgeschlossen<sup>35</sup>.

Der letzte Schritt der RNA-seq-Analyse ist die Charakterisierung der molekularen Funktionen oder biologischen Pfade (engl. Pathways), an denen die differentiell exprimierte Gene beteiligt sind <sup>15</sup>. Innerhalb einer Zelle stellen biologische Pfade eine Reihe molekularer Interaktionen unter verschiedenen Bedingungen dar, die zu Endpunkten biologischer Funktionen führen. In den letzten zehn Jahren wurden viele experimentelle und computergestützte Ansätze entwickelt, um solche Pathways zu entschlüsseln <sup>30</sup>. Die Pathway Analyse versucht das Problem der Genexpressionsanalyse zu überwinden, nämlich nur riesige Listen wichtiger aber isolierter Gene losgelöst vom biologischen Kontext zu generieren, indem sie relevante Gruppen verwandter Gene erkennt, die in den Probenkohorten unterschiedlich exprimiert sind <sup>20</sup>. Eine Möglichkeit der Pathway Analyse ist die Genmengen Anreicherungsanalyse (engl. gene set enrichment analysis, GSEA), die auf einem Ranking der differentiell exprimierten Gene basiert <sup>15</sup>. Die Genexpressionswerte werden nach bestimmten Vorgaben sortiert. GSEA prüft dann, wo die Gene in der sortierten Eingabeliste akkumulieren. Dabei wird sich auf Gruppen von Genen fokussiert, die eine gemeinsame biologische Funktion teilen und die entweder hochreguliert (engl. enriched, angereichert) oder runterreguliert (engl. depleted, abgereichert) sind <sup>4, 70</sup>.

Zahlreiche Datenbanken stehen für solche Pathway Analysen zur Verfügung wie zum Beispiel KEGG, Reactome und WikiPathways. Die Datenbanken unterscheiden sich jedoch generell in den darin enthaltenen biologischen Pfaden, darüber hinaus beinhalten sie unterschiedliche Darstellungen der eigentlich gleichen Pathways <sup>45</sup>.

## 2.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die bisherigen Ergebnisse zum Einfluss von Vitamin D auf NK-Zellen sind spärlich und variieren stark <sup>37</sup>. Nichtsdestotrotz konnten Bittenbring et al. bei sieben Probanden nach Supplementation von Vitamin D und Normalisierung des 25-Hydroxyvitamin D-Spiegels eine signifikant höhere NK-Zell vermittelte ADCC feststellen <sup>6</sup>. Und auch bei Kopf-Hals-Karzinomen wurde eine stärkere zytotoxische NK-Zell-Aktivität bei höherem Vitamin D-Spiegel (Vitamin D-Spiegel > 10 ng/ml) nachgewiesen <sup>7</sup>. Es muss davon ausgegangen werden, dass der Vitamin D-Serumspiegel beziehungsweise eine Vitamin D-Supplementation Einfluss auf die Transkription von Genen der NK-Zellen nimmt, die an der ADCC und im Allgemeinen an der Abwehr von entarteten und virusinfizierten Zellen beteiligt sind.

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Genexpression passiver NK-Zellen, das heißt nicht an Target-Zellen aktivierter NK-Zellen und NK-Zellen, die durch den Kontakt mit Target-Zellen aktiviert wurden, jeweils vor und nach Vitamin D-Supplementation mittels RNA-seq zu vergleichen und so die sich ändernden Expressionsniveaus des NK-Zell-Transkriptoms unter verschiedenen Bedingungen zu messen.

Es sollten bei passiven und aktivierten NK-Zellen die Gene identifiziert werden, die nach im Vergleich zu vor Vitamin D-Supplementation differenziell mehr exprimiert (hochreguliert) beziehungsweise differenziell weniger exprimiert (herunterreguliert) werden.

Schließlich sollten mittels Pathway Analyse die differenziell exprimierten Gene in den biologischen Kontext der NK-Zell-Funktion gebracht werden. Von besonderem Interesse war es dabei, den Einfluss von Vitamin D auf biologische Wege mit Bezug zum angeboren und adaptivem Immunsystem, sowie auf die Signaltransduktion innerhalb der NK-Zellen herauszuarbeiten.

Sekundäres Ziel dieser Arbeit war es, das Ergebnis von Bittenbring et al. bezüglich des positiven Einflusses einer Vitamin D-Supplementation auf die ADCC der NK-Zellen zu reproduzieren.

## 3 Probanden, Material und Methoden

### 3.1 Probanden

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt zehn freiwillige gesunde Probanden mit einem vorbestehenden Vitamin D-Mangel beziehungsweise einer Vitamin D-Insuffizienz rekrutiert. Ein Proband wies bei Studieneinschluss bereits einen niedrig normalen Vitamin D-Spiegel auf. Einschlusskriterien waren ein Mindestalter von 40 Jahren und das Unterzeichnen einer Einverständniserklärung, nach zuvor erfolgter Aufklärung über unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Cholecalciferol 20.000 IE sowie mögliche Komplikationen einer venösen Blutentnahme. Ausschlusskriterien waren eine schon erfolgte Vitamin D-Supplementation, eine hämato-onkologische Grunderkrankung, Einnahme von Glukokortikoiden oder eine Immunsuppression.

Den Probanden und den einzelnen Proben wurden Identifikationsnummern zugewiesen, um im Folgenden die Privatsphäre zu schützen und dem Datenschutz gerecht zu werden.

Die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes bewilligte die Durchführung der Studie (Ethiknummer 178/17). Die Studie erfolgte gemäß der Deklaration von Helsinki.

### 3.2 Material

#### 3.2.1 Vitamin D-Präparat

Die Vitamin D-Supplementation der Probanden erfolgte mit Dekristol® (Cholecalciferol) 20.000 IE der mibe GmbH Arzneimittel (Brehna, Deutschland).

#### 3.2.2 Tumorzelllinie

Als Target-Zellen für die Untersuchung der Aktivität der NK-Zellen vor und nach Supplementation in den Zytotoxassays wurde die CD20-positive Tumorzelllinie DAUDI eingesetzt. Die Zelllinie wurde vom Leibniz-Institut „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zelllinien“ (DSMZ, Braunschweig, Deutschland, Katalognummer ACC 78) bezogen.

## 3.2.3 Chemikalien, Lösungen, Medien und Puffer

**Tabelle 1:** In der Arbeit eingesetzte Chemikalien, Lösungen, Medien und Puffer

Bezeichnung	Hersteller/Herstellung
ADCC-Medium	X-Vivo™ 15 2 mM L-Glutamin 2% humanes Serumalbumin 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
Agarose 1 % NEEQ Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Germany Artikelnummer 2267.1
Aqua	Braun GmbH Kronberg im Taunus, Deutschland Artikelnummer 113328002
CD19 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec GmbH Bergisch-Gladbach, Deutschland Artikelnummer 130-050-301
Cell Wash	BD GmbH Heidelberg, Deutschland Artikelnummer 349524
Cytotoxicity Detection Kit <sup>PLUS</sup> (LDH) mit Catalyst, Dye Solution, Stop Solution und Lysis Solution	Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Deutschland Artikelnummer 04744926001
Ethanol absolut	Merck KGaA Darmstadt, Germany Artikelnummer K49631383743
Ethidiumbromidlösung 1 %	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Germany Artikelnummer 2218.1
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA 0,5)	Life Technologies Europe BV Bleiswijk, Niederlande Artikelnummer 15575020
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland Artikelnummer F0804-500ML
Humanes Serumalbumin 20% salzarm	CSL Behring GmbH Marburg, Deutschland Zulassungsnummer 10530a/96
L-Glutamin 200 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland Artikelnummer G7513-100ML
MACS® NK Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec GmbH Bergisch-Gladbach, Deutschland Artikelnummer 130-092-657
MACS®-Puffer	0,5 % FCS 2 mM EDTA in 15 ml PBS
miRNeasy®Mini Kit	Qiagen N.V. Venlo, Holland Artikelnummer 217004
MOPS-Puffer 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure	Calbiochem San Diego, USA Artikelnummer B32914
Pancoll human (Dichte 1,077 g/ml)	PAN Biotech GmbH

	Aidenbach, Deutschland Artikelnummer P04-60500
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin in 0,9% NaCl)	Sigma Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland Artikelnummer P0781-100ML
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland Artikelnummer D8537-1L
RPMI-1640	PAN Biotech GmbH Aidenbach, Deutschland Artikelnummer P04-16516
Trizol® Reagenz	Invitrogen Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA Artikelnummer 15596-026
Trypanblau-Lösung 0,4 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland Artikelnummer T8154
X-Vivo™ 15	Lonza SPRL Verviers, Belgien Artikelnummer BE02-061Q

### 3.2.4 Antikörper

**Tabelle 2:** *In der Arbeit eingesetzte Antikörper*

Name	Hersteller
Anti CD16-FITC	BD GmbH Heidelberg, Deutschland Artikelnummer 656146
Anti CD56-PE	BD GmbH Heidelberg, Deutschland Artikelnummer 345812
Rituximab (MabThera®)	Roche Pharma AG Grenzach-Wyhlen, Deutschland

### 3.2.5 Verbrauchsgegenstände

**Tabelle 3:** *In der Arbeit verwendete Verbrauchsgegenstände*

Name	Hersteller
0,5 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt AG & Co KG Nümbrecht, Deutschland
1,5 ml Reaktionsgefäß	
2 ml Reaktionsgefäß	
Diverse Pipettenspitzen	
Mikrotiterplatten (F-Boden)	
Mikrotiterplatten (U-Boden)	
MACS® LS-Säulen	Miltenyi Biotec GmbH Bergisch-Gladbach, Deutschland Artikelnummer 130-042-401
MACS® MS-Säulen	Miltenyi Biotec GmbH

	Bergisch-Gladbach, Deutschland Artikelnummer 130-042-201
QIAshredder® Column	Qiagen N.V. Venlo, Holland Artikelnummer 79654
RNase-freie Zentrifugenröhrchen 2,0 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA Artikelnummer AM12425
RNase-freie Zentrifugenröhrchen 1,5 mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA Artikelnummer AM12400
RNase-freie Zentrifugenröhrchen 0,5 mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA Artikelnummer AM12300
Serologische Pipetten 10 ml	Corning GmbH Kaiserslautern, Deutschland
Serologische Pipetten 5 ml	Sarstedt AG & Co KG Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 25 ml	
Zentrifugenröhrchen 15 ml	
Zentrifugenröhrchen 50 ml	

### 3.2.6 Geräte

**Tabelle 4:** *In der Arbeit eingesetzte Geräte*

Name	Hersteller
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5415 D	
CO <sub>2</sub> -Inkubator HERAcell™ 150	Life Technologies GmbH / Thermo Fisher Scientific Darmstadt, Deutschland
Durchflusszytometer FACSCalibur™	BD Biosciences GmbH Heidelberg, Deutschland Artikelnummer 342975
Handdispenser Multipette® M4	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
MACS® MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotec GmbH Bergisch-Gladbach, Deutschland Artikelnummer 130-042-302
Microplate Reader Wallac 1420 Victor2	PerkinElmer Cellular Technologies Germany GmbH Hamburg, Deutschland
NanoDrop 1000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pipette Research® 10-100 µl	
Pipette Research® 100-1.000 µl	
Sicherheitswerkbank für steriles Arbeiten HERAsafe™ HSP 18	Life Technologies GmbH / Thermo Fisher Scientific Darmstadt, Deutschland
Spektralphotometer Varioskan® LUX	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
UV-Transilluminator TFS-20, 25 Watt, 254 nm UV	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA Artikelnummer P/N 95-0319-02



Vortexmischer Heidolph REAX top	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG Schwabach, Deutschland
---------------------------------	---

Aufgelistet sind nur solche Geräte, die nicht zur Standard-Ausstattung eines jeden Labors zählen.

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Vitamin D-Supplementation und Bestimmung des Vitamin D-Spiegels

Die Bestimmung des 25-Hydroxyvitamin-D-Serumspiegels wurde vor und nach der Supplementation mit Cholecalciferol vom Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes (Homburg) durchgeführt.

Die Vitamin D-Supplementation erfolgte mit dem Cholecalciferol-Präparat Dekristol® 20.000 IE (mibe GmbH Arzneimittel). Da in einer vorherigen Studie bei einem Vitamin D-Spiegel von 65 ng/ml eine maximale NK-Zellaktivität und ADCC beobachtet wurde<sup>49</sup>, wurde diese Serumkonzentration auch in der vorliegenden Arbeit als Vitamin D-Zielspiegel in eben diesem mittleren Normalbereich avisiert. Zur Berechnung der dazu nötigen Einheiten an Cholecalciferol wurde ein ebenfalls in der Vorgängerstudie modifiziertes Schema verwendet, das auf einer von van Groningen<sup>71</sup> etablierten Formel basiert:

$$\text{Supplementations-Bedarf [IE]} = \Delta \text{ 25-Hydroxyvitamin-D (ng/ml)} \times \text{Körpergewicht (kg)} \times 200$$

Wobei  $\Delta$  25-Hydroxyvitamin-D der Differenz zwischen dem vor Supplementation gemessenen und dem angestrebten 25-Hydroxyvitamin-D-Serumspiegel entspricht.

Die Probanden nahmen das Vitamin D-Präparat über drei bis fünf Tage ein. Die Messung der ADCC wurde zwischen dem dritten bis fünften Tag nach erfolgter Supplementation durchgeführt.

#### 3.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Zellquantifizierungen erfolgten nach dem folgenden Protokoll:

Das zur Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension obligate Volumen der Suspension wurde zunächst mit einer Messpipette bestimmt. Danach wurden 5  $\mu$ l der Zellsuspension entnommen und mit 45 ml PBS verdünnt. Im Verhältnis 1:1 wurde dann die verdünnte Zellsuspension mit 50  $\mu$ l Trypanblau vermischt. Für die Zellzählungen wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Da Trypanblau nekrotische und apoptotische Zellen anfärbt, wurden die gefärbten Zellen nicht gezählt.

### 3.3.3 Isolierung der peripheren mononukleären Zellen aus dem Vollblut

Die Isolierung der peripheren mononukleären Zellen (engl. peripheral blood mononuclear cells, PBMC) erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation aus dem Vollblut, das den Probanden in EDTA-Blutröhrchen (Sarstedt AG & Co KG) zuvor abgenommen wurde. Der Dichtegradient entsteht dabei mit Hilfe des synthetischen Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymers (Pancoll®) und trennt Zellen mit einer Dichte von  $> 1,077$  g/ml von denen mit einer geringeren Dichte. Jeweils 4 ml Pancoll® wurden in Zentrifugenröhrchen mit 11 ml Vollblut überschichtet. Die Röhrchen wurden dann für 30 min bei Raumtemperatur mit 500 g zentrifugiert. Dabei wurden Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer Dichte von  $> 1,077$  g/ml zentrifugal von den PBMC abgetrennt. Es war darauf zu achten, dass die Zentrifuge langsam ausläuft, damit die entstandenen Phasen sich nicht wieder miteinander vermischen. Nach der Zentrifugation wurde aus allen Proben die Phase der PBMC geerntet. Um die PBMC von restlichem Pancoll® und Serum zu reinigen, wurden sie danach mit 4 °C kaltem PBS gewaschen und anschließend wieder 10 min bei ebenfalls 4 °C und 300 g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Der Waschschrift wurde unter gleichen Bedingungen wiederholt. Abschließend wurde das Zellpellet wieder in PBS resuspendiert und die Zellzahl wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben bestimmt.

### 3.3.4 Isolierung der natürlichen Killerzellen

Zur Isolierung der natürlichen Killerzellen aus den PBMC wurde eine magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS) durchgeführt. Dabei werden Zellen mit einem zu ihrem zelltypischen Phänotyp (CD-Molekül) passenden spezifischen MicroBead-gekoppelten Antikörper markiert und anschließend im magnetischen Feld einer Trennsäule zurückgehalten und somit von den nicht markierten Zellen selektiv getrennt. Um die NK-Zellen nicht mit einem MicroBead-Antikörper zu besetzen, wurden alle anderen Zellen außer den NK-Zellen mit einem Gemisch aus spezifischen Antikörpern markiert und im magnetischen Feld depletiert. Dadurch konnten die NK-Zellen „unberührt“ von den übrigen Zellen getrennt werden. Dazu wurde das NK Cell Isolation Kit human (Miltenyi Biotec GmbH) verwendet. Die dabei verwendeten Trennsäulen haben Bindungskapazität von maximal  $1 \times 10^8$  PBMCs. Das reichte zur Auftrennung der typischerweise aus dem Vollblut isolierten PBMC-Zahl aus.

Die PBMC/PBS-Suspension wurde zunächst für 15 min bei 4 °C und 200 g zentrifugiert und der flüssige Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend in 40 µl MACS-Puffer und 10 µl Antikörpergemisch pro  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert. Die einzelnen Antikörper dieses Cocktails sind biotinyliert. Nach dem Durchmischen wurde die Suspension bei 4 °C für 5 min inkubiert. Dann wurden weitere 30 µl MACS-Puffer und zudem 20 µl MicroBeads pro  $1 \times 10^7$  Zellen hinzugefügt. Die MicroBeads markieren die zuvor an allen Nicht-NK-Zellen

gebundenen Antikörper. Schließlich wurde nach 10-minütiger Inkubation bei 4 °C die Zellsuspension auf die MACS LS-Säule gegeben, die zuvor ins Magnetfeld gehängt und mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert worden war. Alle mit MicroBeads markierten Nicht-NK-Zellen wurden im Magnetfeld in der Säule gebunden, die NK-Zellen selbst passierten die Säule und befanden sich schlussendlich im Durchlauf. Die Säule wurde nach dem Durchlaufen der Zellsuspension einmal mit 3 ml MACS-Puffer gespült und konnte dann verworfen werden. Um den MACS-Puffer von den im Durchlauf suspendierten NK-Zellen zu entfernen, wurde die Probe für 10 min bei 4 °C und 300 g zentrifugiert. Schließlich wurde das NK-Zell-Pellet in 500 µl ADCC-Medium resuspendiert. Die NK-Zellen wurden gezählt und die Reinheit wie im nächsten Kapitel beschrieben gemessen.

### 3.3.5 Durchflusszytometrie

Wie beschrieben (siehe Seite 20) werden NK-Zellen in die Subtypen CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> (90 % aller NK-Zellen) und CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim/-</sup> (10 % aller NK-Zellen) unterteilt. Da die CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>-Zellen eine deutlich höhere Zytotoxizität besitzen<sup>16, 44</sup>, war dieser NK-Zell-Subtyp in der vorliegenden Arbeit von zentralem Interesse. Deshalb wurde der Anteil dieses NK-Zell-Subtyps durchflusszytometrisch bestimmt und zur Berechnung des Suspensionsvolumens verwendet, um die zum ADCC-Test und zur RNA-Gewinnung benötigten NK-Zellen bereitzustellen. Zudem dient dieses Verfahren der Qualitätskontrolle, nach der zuvor durchgeführten MACS-Anreicherung der NK-Zellen.

Für die fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie wurden 80 µl der NK-Zell-Suspension nach der Isolierung mittels MACS in ein Reaktionsgefäß gegeben und für 2 min bei 400 g zentrifugiert, der Überstand wurde daraufhin verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde in 50 µl PBS resuspendiert und dann mit je 2,5 µl fluoreszenzmarkierten CD16-FITC und CD56-PE-Antikörpern lichtgeschützt für 15 min inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte für weitere 2 min und bei 400 g eine Zentrifugation. Der Überstand wurde danach verworfen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Das Zellpellet wurde in 120 µl Cell Wash resuspendiert und die Zellen schließlich durchflusszytometrisch gemessen. Als Durchflusszytometer wurde ein FACSCalibur™ (BD Biosciences) eingesetzt und die damit erhobenen Daten wurden mit der CellQuest-Software (BD Biosciences) ausgewertet.

### 3.3.6 Kultur der DAUDI-Zellen

Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen wurde gegen sogenannte Target-Zellen getestet, dazu dienten die CD20-positiven Zellen der Linie DAUDI, die 1967 aus dem EBV-positiven Burkitt-Lymphom eines 16-jährigen Patienten abgeleitet wurde<sup>34, 46</sup>. Aufgrund

eines Defekts im  $\beta$ 2-Mikroglobulin exprimieren DAUDI-Zellen keine MHC-I-Moleküle<sup>56.1</sup>. MHC-I-Moleküle beeinflussen normalerweise ganz entscheidend, sowohl aktivierend als auch inhibierend, die Interaktion von NK-Zellen mit potentiellen Target-Zellen. Verantwortlich für diese Interaktion sind aufseiten der NK-Zellen deren killer cell immunoglobulin-like Rezeptoren (KIR)<sup>22</sup>. Bei DAUDI-Zellen entfällt somit die für normale Target-Zellen wichtige Einflussnahme auf die NK-Zellaktivität und der in dieser Arbeit im Mittelpunkt stehende Einfluss von Vitamin D auf die NK-Zellaktivität konnte davon unabhängig untersucht werden.

Die DAUDI-Zellen wurden in einer durchschnittlichen Zelldichte von  $2\text{-}3 \times 10^5$  Zellen/ml Suspension in Erhaltungskultur gehalten. Als Medium wurde RPMI-1640 verwendet, ergänzt mit 20 % FCS und 2 nM L-Glutamin. Zur Kontaminationsprophylaxe wurden 100 U/ml Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin zugesetzt. Dabei wurde die Zelldichte in der Erhaltungskultur so eingestellt, dass die Zellen einen Tag vor der Verwendung (ADCC-Test beziehungsweise RNA-Gewinnung) frisch gesplittet werden konnten. Dadurch befanden sich die Zellen am Tag ihrer Verwendung überwiegend in der log-Phase mit exponentiellem Wachstum.

### 3.3.7 Bereitstellung und Aktivierung der natürlichen Killerzellen

Die NK-Zellen wurden nahezu zeitgleich wie die DAUDI-Zellen vorbereitet und dienten als Effektor-Zellen im ADCC-Test. Pro Spender wurden insgesamt  $6 \times 10^6$  CD16<sup>+</sup> NK-Zellen in 4 ml ADCC-Medium benötigt.

Die aus den PBMC angereicherten NK-Zellen (siehe 3.3.4) wurden in zwei Fraktionen zu je  $3 \times 10^6$  CD16<sup>+</sup> NK-Zellen aufgeteilt. Die eine Fraktion der NK-Zellen verblieb dabei ohne Kontakt mit Target-Zellen. Zur Vereinfachung werden sie in der vorliegenden Arbeit fortan als *passive* NK-Zellen bezeichnet.

Die zweite Fraktion wurde dagegen für vier Stunden mit Target-Zellen ko-kultiviert. Die dazu benötigte Zahl an Target-Zellen musste zunächst aus der Zellkultur geerntet und aufbereitet werden. Dazu wurde die Zellzahl der DAUDI-Erhaltungskultur nach Neubauer bestimmt (siehe 3.3.2) und damit das Volumen der DAUDI-Suspension mit der benötigten Zellzahl ( $5 \times 10^6$  in 4,1 ml ADCC-Medium) berechnet. Dieses Volumen wurde der DAUDI-Kultur entnommen, für 4 min bei 240 g und Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend das Pellet in 1,5 ml ADCC-Medium resuspendiert und zwei weitere Male gewaschen (zentrifugieren, resuspendieren) und letztlich in den 4,3 ml ADCC-Medium gegeben. Zur Bindung der Target-Zellen an die NK-Zellen wurden die DAUDI-Zellen zunächst mit 0,1  $\mu$ g/ml des anti-CD20-Antikörpers Rituximab (vor-) inkubiert.

Im Folgenden wurden Well Platten mit U-Boden benutzt. Zur Bestimmung der Spontan-Lyse der DAUDI-Zellen während der vierstündigen Inkubationszeit, wurde ein Well nur mit

DAUDI-Zellen (ohne Effektor-Zellen) angelegt. Da später die Bestimmung der ADCC-Aktivität der NK-Zellen relativ zur maximalen Lyse der Target-Zellen berechnet werden sollte, wurde zudem ein weiteres Well nur mit DAUDI-Zellen angelegt, in welchem die Maximal-Lyse induziert wurde. Dazu wurden in dieses Well 20 min vor Ablauf der vier Stunden eine Lyse-Reagenz (Detergenz) hinzugegeben. Pro Well wurden jeweils  $6 \times 10^5$  DAUDI-Zellen eingesetzt.

Danach wurden die NK-Zellen ( $1,5 \times 10^6$ /Well) alleine oder zusammen mit den Rituximab-behandelten DAUDI-Zellen jeweils in einem Effektor/Target-Verhältnis von 2,5:1 gemischt. Um eine synchrone Sedimentierung der Suspensionszellen und somit deren Kontakt untereinander schnellstmöglich zu gewährleisten, wurde die 6 Well-Platte für 1 min bei 200 g und Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend vier Stunden lang im Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Zur Vereinfachung werden sie in der vorliegenden Arbeit fortan als *aktive* NK-Zellen bezeichnet.

Nach der vierstündigen Aktivierung der NK-Zellen durch die DAUDI-Zellen wurden zuerst 500 µl des Kultur-Überstands von den für die ADCC relevanten Wells (NK/DAUDI-Ansatz) sowie den Wells zur Bestimmung der Spontan- und Maximal-Lyse der DAUDI-Zellen vorsichtig abgehoben. Danach wurden auch die Zellen selbst, sowohl des reinen NK-Zell-Ansatzes als auch des Effektor/Target-Ansatzes, für die RNA-Isolierung geerntet.

Aus der Ko-Kultur der NK- und DAUDI-Zellen mussten dann die Target-Zellen entfernt werden, um möglichst nur NK-Zellen für die Isolierung der RNA zu erhalten. Dazu wurden die geernteten Zellen in 5 ml MACS-Puffer gewaschen, für 10 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Das NK/DAUDI-Zell-Pellet wurde dann in 50 µl MACS-Puffer und 50 µl antiCD19-Beads (Miltenyi Biotec) resuspendiert. Die Suspension wurde 15 min im Kühlschrank gelagert, danach wurde 5 ml MACS-Puffer hinzugegeben und die Suspension bei 300 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, anschließend wurde das Pellet in 200 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde dann über eine mit 500 µl MACS-Puffer äquilibrierte MACS-Säule im MS-Format (Miltenyi Biotec) gegeben und in CD19-positive DAUDI-Zellen, die im magnetischen Feld in der Säule zurückgehalten wurden, und in CD19-negative NK-Zellen im durchfließenden Puffer getrennt. Zur durchflusszytometrischen Kontrolle der Reinheit wurden vom Durchlauf 20 µl entnommen und die Expression von CD16/CD56 (NK-Zellen) und CD19 (DAUDI-Zellen) mit je 5 µl des entsprechenden fluoreszenz-markierten Antikörper (BD biosciences) gefärbt und anschließend gemessen.

Die restliche Suspension wurde zentrifugiert, das Pellet in 700 µl Trizol (Invitrogen) resuspendiert und bis zur Durchführung der RNA-Isolierung bei - 75 °C archiviert.

Die  $3 \times 10^6$  passiven NK-Zellen wurden wie eingangs beschrieben nicht aktiviert, das heißt sie hatten keinen Kontakt zu Target-Zellen. Trotzdem wurden auch diese passiven NK-Zellen mit

je  $1,5 \times 10^6$  Zellen ohne Zusätze im Well einer 6 Well Platte angesetzt und verblieben zeitgleich zu den aktivierten NK-Zellen vier Stunden im Brutschrank. Danach wurden auch sie geerntet, in 5 ml MACS-Puffer gewaschen, bei 300 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und schließlich das Pellet in 700 µl Trizol gegeben und wie die aktivierten NK-Zellen bis zur Verwendung bei - 75 °C aufbewahrt.

### 3.3.8 Bestimmung der ADCC-Aktivität

Zur Kontrolle, ob die Vitamin D-Supplementation auch zu einer verbesserten ADCC-Aktivität der NK-Zellen geführt hatte, wurde die lytische Aktivität der NK-Zellen bestimmt.

Dazu wurden 50 µl der Zellkultur-Überstände aus den ADCC-relevanten Wells und den Wells, die zur Bestimmung der spontanen sowie der maximalen DAUDI-Lyse angelegt worden waren (siehe 3.3.7), vorsichtig abgehoben und mit 450 µl ADCC-Medium 1:10 verdünnt. Von diesem 500 µl Überstand wurde die Konzentration an Laktatdehydrogenase (LDH) bestimmt, die während der vierstündigen Inkubation (a) durch die ADCC-Aktivität der NK-Zellen, (b) spontan und (c) maximal aus den Target-Zellen freigesetzt worden war.

Zur Messung der LDH-Konzentration wurden davon je 50 µl in drei Well einer 96 Well-Flachboden-Platte pipettiert, das heißt jeder ADCC-Ansatz wurde als Triplet gemessen. Der LDH-Nachweis erfolgte unter Verwendung des Cytotoxicity Detection Kit<sup>PLUS</sup> (Roche Diagnostics). Die Nachweis-Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl/Well Dye Solution (Tetrazolium-Salz INT) und Katalysator induziert und 30 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Das INT/Katalysator-Gemisch wurde unmittelbar vor Gebrauch gemäß Anbieter-Protokoll vorbereitet.

Die in den Überstand freigesetzte LDH katalysiert unter Freisetzung von NADH/H<sup>+</sup> die Oxidation von Laktat zu Pyruvat. Dabei nutzt der Katalysator das dabei freigesetzte NADH/H<sup>+</sup>, um Tetrazolium-Salz INT zu Formazan-Salz zu reduzieren<sup>10</sup>. Nach 30 min wurde die Reaktion mit 25 µl salzsäurehaltiger Stop Solution pro Well beendet. Da Formazan-Salz Licht mit Wellenlängen zwischen 480 und 520 nm absorbiert, konnte die LDH-Aktivität indirekt photometrisch bestimmt werden. Dazu wurde die Absorption bei 492 nm im Spektralphotometer (Varioskan<sup>®</sup> LUX, Thermo Fisher Scientific) gemessen.

Von allen Absorptionswerten wurde zunächst die gemittelte Hintergrund-Absorption (reines ADCC-Medium) abgezogen. Die relative Lyse eines ADCC-Ansatzes wurde wie folgt berechnet:

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

### 3.3.9 RNA-Isolierung

#### 3.3.9.1 Isolierung der RNA

Für die Isolierung der RNA wurde das miRNeasy Mini Kit™ (Qiagen N.V) verwendet.

Um das Aufbrechen der Zellen zu erreichen und die gesamte RNA aus den NK-Zellen freizusetzen, war (wie zuvor beschrieben) das Pellet der jeweiligen NK-Zell-Fraktion in 700 µl QIAzol Lysis Reagenz resuspendiert worden. Mittels QIAshredder homogener erfolgte dann die Homogenisierung. Das Lysat wurde in den dazu vorgesehenen QIAshredder gegeben und für 2 min bei Raumtemperatur und maximaler G-Zahl zentrifugiert. Die Säule des QIAshredders wurde anschließend entfernt. Das Lysat wurde, während es durch die Säule wanderte, homogenisiert, dadurch reduzierte sich die Viskosität des Lysats. Nach einer Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur erfolgte die Hinzugabe von 140 µl Chloroform und dann eine erneute Inkubation für 3 min. Daraufhin wurde für 15 min bei 4 °C und 1200 g zentrifugiert. Es entstanden drei Phasen, von denen die oberste farblose und wässrige Phase die RNA enthielt. Diese Phase musste behutsam abpipettiert und dann in ein 1,5 ml Eppendorf Rörchen überführt werden. 500 µl 100 % Ethanol wurde hinzugefügt und mit einer Pipette gemischt. 700 µl der Probe wurde in das RNeasyMINI spin column gegeben und für 60 s bei Raumtemperatur und 8000 g zentrifugiert. Der entstandene Durchfluss wurde verworfen, die RNA wurde bei diesem Arbeitsschritt im RNeasyMINI spin column gebunden. Mit dem Rest der Probe wurde ebenso verfahren.

Da kein DNase-Verdau durchgeführt wurde, musste 700 µl RWT-Buffer in das RNeasyMINI spin column gegeben werden. Es erfolgte eine Zentrifugation für 60 s bei Raumtemperatur und 8000 g, der Durchfluss wurde verworfen. Insgesamt zweimal wurde 500 µl RPE-Buffer hinzugegeben, zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um die Membran zu trocknen erfolgte eine erneute Zentrifugation für 2 min bei Raumtemperatur und maximaler G-Zahl. Das RNeasyMINI spin column wurde anschließend in ein neues 1,5 ml Eppendorf überführt. 30 µl RNase freies Wasser musste dann direkt auf die Membran gegeben werden. Es erfolgte eine letzte Zentrifugation für 1 min bei Raumtemperatur und 8000 g. Durch diesen Schritt wurde die RNA aus der Membran des RNeasyMINI spin column herausgelöst. Der Filter konnte verworfen werden, da sich die RNA nun gelöst in RNase-freiem Wasser befand.

Die Probe musste sofort auf Eis gestellt werden und wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -70 °C gelagert.

### 3.3.9.2 RNA-Gelelektrophorese

Mittels RNA-Gelelektrophorese erfolgte eine Qualitätskontrolle der RNA. Dazu war zunächst die Herstellung eines Agarosegels notwendig. 1,5 g Agarose wurde mit Aqua zunächst auf ein Gesamtvolumen von 60 g aufgefüllt und in einer Mikrowelle erhitzt. Danach wurde wiederrum mit Aqua auf insgesamt 139,5 g aufgefüllt. Nachdem die Suspension auf Zimmertemperatur abgekühlt war, wurden 15 ml MOPS-Puffer und schließlich 750 µl Ethidiumbromidlösung hinzugegeben. Die Lösung wurde in eine Form gegossen und für 30 min ruhen gelassen. Als Elektrophoresepuffer (Laufpuffer) wurden 30 ml MOPS-Puffer mit 270 ml Aqua verdünnt.

1 µg RNA pro Probe und 5 µl Puffer wurden in ein 0,5 l Röhrchen gegeben. Die Probe wurde für 5 min auf 65 °C erwärmt und dann direkt wieder auf Eis gestellt, um sie schließlich auf das Gel zu laden. Für 30 Minuten lief die Probe bei 80 Watt durch das Gel. Mit einem UV-Transluminator wurde schließlich das Ergebnis abgelesen.

### 3.3.9.3 Quantitative RNA-Messung

Die Quantität der isolierten RNA wurde mittels Spektrometrie gemessen, dafür wurde das NanoDrop 1000-Spektralphotometer verwendet. Um das Gerät zu eichen, wurde vor jedem Messvorgang 2 µl RNase-freies Wasser genutzt. Erst dann wurde je 2 µl einer Probe auf das Spektrometer geladen und die RNA quantifiziert.

### 3.3.10 RNA-Sequenzierung

*Das Zentrum für Human- und Molekularbiologie, Molekulare Zelldynamik der Universität des Saarlandes* führte die RNA-Sequenzierung durch.

Für die Herstellung der Sequenzierungsbibliothek zur Analyse der Gesamtheit aller polyadenylierten messenger RNAs (mRNA) wurde das NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina® (New England Biolabs) verwendet.

Aus 250 ng Gesamt-RNA der jeweiligen Probe mussten zunächst die polyadenylierten mRNAs von anderen Nukleinsäuren abgetrennt werden, was unter Verwendung des NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs) erfolgte. Hierbei banden die mRNAs über ihren PolyA-Schwanz an oligod(T) beads, welche im Anschluss magnetisch separiert wurden. Die isolierte mRNA wurde im Anschluss fragmentiert und unter Zuhilfenahme von zufällig generierten Primern in komplementäre DNA umgeschrieben. Nach der Ligation von Adapttern wurde die cDNA in einer Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) mit insgesamt 11 Zyklen amplifiziert, wobei über Primer für jede Probe ein spezifischer Index eingeführt wurde, welcher die genaue Zuordnung nach dem Sequenzieren ermöglichte.

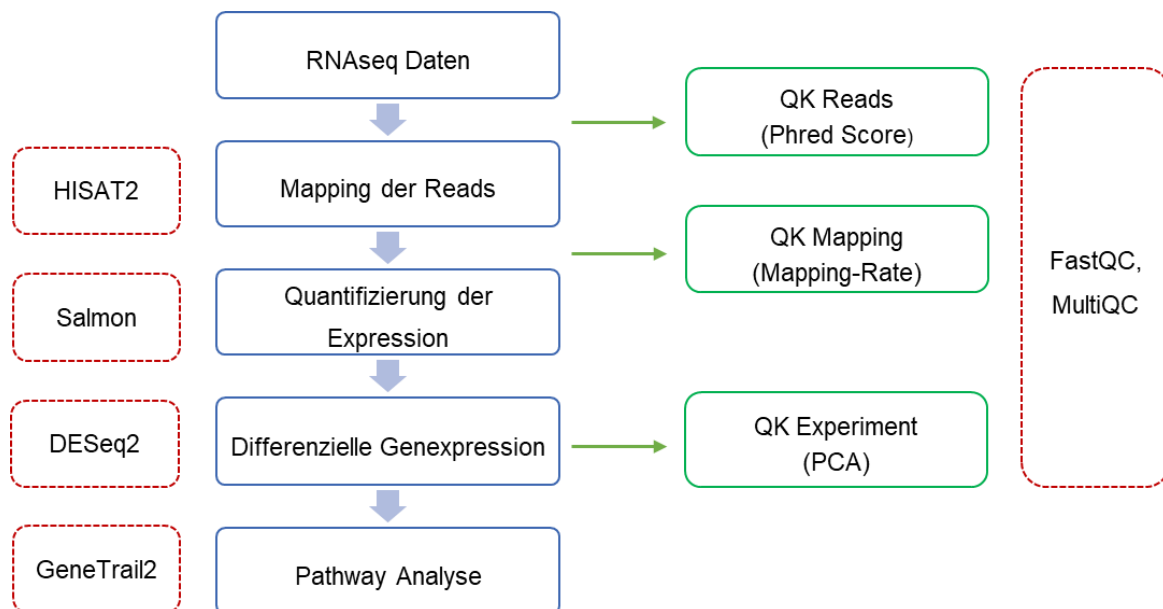


Die generierten Sequenzierungsbibliotheken wurden am Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) quantifiziert und die Größenverteilung auf einem High Sensitivity DNA Chip am Bioanalyzer 2100 (Agilent) überprüft. Die Sequenzierung der Proben erfolgte nach der Sequencing by Synthesis Methode auf der Illumina HiSeq2500 Plattform im High Output Run Mode mit 100 Zyklen.

### 3.3.11 Bioinformatische Auswertung

Die bioinformatische Auswertung der RNA-Sequenzierungsdaten erfolgte in Zusammenarbeit mit dem *Zentrum für Bioinformatik der Universität des Saarlandes*.

Die folgende Abbildung veranschaulicht die einzelnen Arbeitsschritte und die dafür genutzten Tools.



**Abbildung 2:** Workflow der bioinformatischen Auswertung.

Die einzelnen Arbeitsschritte sind *blau* umrahmt, die dabei genutzten Tools *rot*. Es erfolgten zu verschiedenen Zeitpunkten Qualitätskontrollen (QK) der Daten (*grün* umrahmt).

#### 3.3.11.1 Differentielle Genexpression

Um die Sequenzierungsdaten zu verarbeiten wurde die bcbio-nextgen Pipeline (<https://github.com/bcbio/bcbio-nextgen>) genutzt. bcbio ist ein Open-Source-Framework, das RNA-seq-Methoden anbietet.

In dieser bioinformatischen Pipeline wurden die Daten zuerst mit HISAT2, einem Programm das zum Mapping der Reads dient, auf das humane Referenzgenom hg38 abgebildet <sup>33</sup>.

Anschließend wurde die Genexpression mit Salmon, einer Methode zur Quantifizierung der Transkripthäufigkeit aus RNA-seq-Reads, quantifiziert <sup>53</sup>.

Die differentielle Genexpression wurde ebenso mit einem speziellen Tool (DESeq2 <sup>38</sup>) analysiert. Die Analyse wurde mit einem BH-angepassten p-Wert (padj) von 0,05 und einem log fold change (LFC) von 0 beziehungsweise 2 durchgeführt.

Die Erstellung der Volcano Plots erfolgte mit ggplot2 (<https://usegalaxy.eu>), einem Paket zur Grafikerstellung.

### 3.3.11.2 Qualitätskontrolle der RNA-Sequenzierungsdaten

Mittels FastQC und MultiQC, Tools zur Qualitätskontrolle von RNA-Sequenzierungsdaten, erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten der Analyse eine Prüfung der Daten.

Noch vor Bearbeitung der Sequenzierungsdaten wurde die *Qualität* der Reads mit Hilfe des sogenannten Phred Scores kontrolliert. Dieser ist ein Maß für die Güte der Basen-Erkennung und gibt die Wahrscheinlichkeit einer falschen Basen-Erkennung wieder; je höher der Phred Score, desto besser ist die Erkennung der Basen <sup>19,1</sup>.

Die RNA-Sequenzierungsdaten wurden bei den weiteren Schritten der RNA-seq-Analyse auf ihre Qualität hin überprüft. Dafür wurde unter anderem die Anzahl der Reads, die Mapping-Rate, die Exon-Rate und die rRNA-Mapping-Rate bestimmt. Zur Qualitätskontrolle der differentiellen Genexpression diente die Hauptkomponentenanalyse.

### 3.3.11.3 Pathway Analyse

Um den Einfluss der differenziell exprimierten Gene auf die Anreicherung biologischer Pfade zu analysieren, wurde das Online-Tool GeneTrail2 (<https://genetrail2.bioinf.uni-sb.de>) verwendet. GeneTrail2 führt eine Gen-Set-Anreicherungsanalyse auf der Grundlage der Datenbanken KEGG, Reactome, WikiPathways, GO und BioCarta durch (siehe Seite 27) <sup>4,66</sup>.

Für die Pathway Analyse wurden die je nach Fragestellung sortierte Genlisten in GeneTrail2 hochgeladen. Eine FDR nach Benjamini und Yekutieli mit einem Signifikanzniveau von 0,05 wurden gewählt.

### 3.4 Probengruppen und Vergleiche für die differentielle Genexpression-Analyse

#### 3.4.1 Probengruppen

Insgesamt wurden von den zehn Probanden vierzig Proben untersucht, je Proband vier Einzelproben. Sowohl vor als auch nach erfolgter Vitamin D-Supplementation wurde die Hälfte der NK-Zelle mittels Target-Zellen aktiviert, die andere Hälfte der NK-Zellen verblieb ohne Kontakt mit Target-Zellen (passive NK-Zellen). Insgesamt entstanden somit zwanzig Proben vor Vitamin D-Supplementation und zwanzig Proben nach Supplementation, davon jeweils zehn Proben mit aktivierten und zehn mit passiven NK-Zellen.

Vor der Vitamin D-Supplementation wurde den Identifikationsnummern der Proben das Suffix a zugeordnet, nach der Supplementation das Suffix b. Zur weiteren Verschlüsselung, ob es sich um passive oder aktivierte NK-Zellen handelt, wurden die IDs um eine zusätzliche Zahl ergänzt.

**Tabelle 5:** Übersicht der Proben und deren IDs

<b>vor Vitamin D-Supplementation (Suffix a)</b>				<b>nach Vitamin D-Supplementation (Suffix b)</b>			
<b>passive NK-Zellen</b>		<b>aktivierte NK-Zellen</b>		<b>passive NK-Zellen</b>		<b>aktivierte NK-Zellen</b>	
<i>weiblich</i>	<i>männlich</i>	<i>weiblich</i>	<i>männlich</i>	<i>weiblich</i>	<i>männlich</i>	<i>weiblich</i>	<i>männlich</i>
1a_10	2a_11	1a_19	2a_20	1b_37	2b_38	1b_46	2b_47
4a_13	3a_12	4a_22	3a_21	4b_40	3b_39	4b_49	3b_48
5a_14	7a_16	5a_23	7a_25	5b_41	7b_43	5b_50	7b_52
6a_15	8a_17	6a_24	8a_26	6b_42	8b_44	6b_51	8b_53
9a_18	10a_56	9a_27	10a_57	9b_45	10b_59	9b_54	10b_60

### 3.4.2 Vergleiche für die differentielle Genexpressionsanalyse

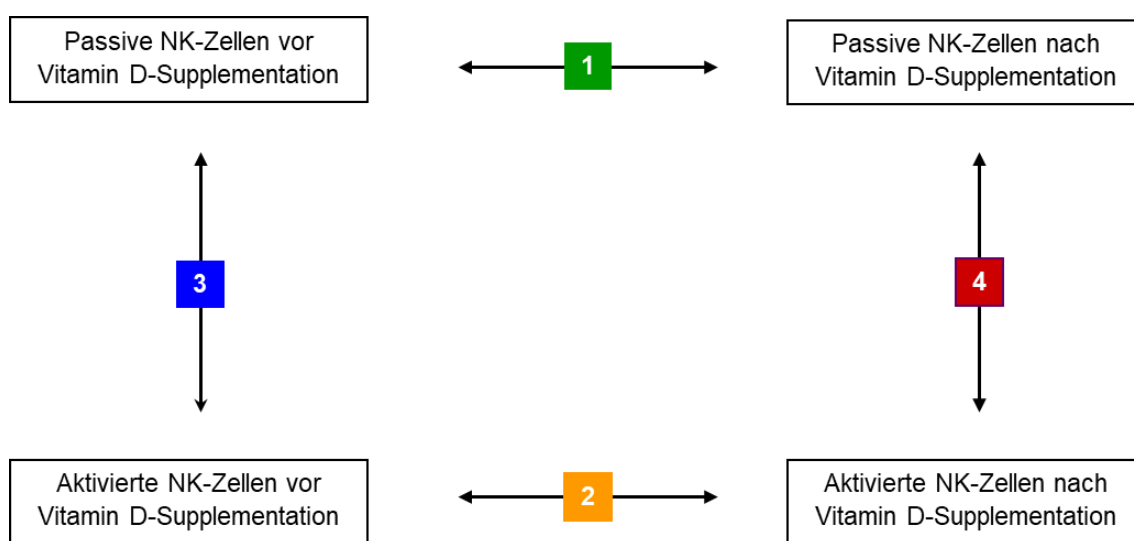
Für die differentielle Genexpressionsanalyse wurden mit Hilfe der Probengruppen insgesamt vier Vergleiche gebildet:

**Vergleich 1:** passive NK-Zellen nach versus vor Vitamin D-Supplementation

**Vergleich 2:** aktivierte NK-Zellen nach versus vor Vitamin D-Supplementation

**Vergleich 3:** aktivierte versus passive NK-Zellen vor Vitamin D-Supplementation

**Vergleich 4:** aktivierte versus passive NK-Zellen nach Vitamin D-Supplementation



**Abbildung 3:** Probengruppen und Vergleiche für die differentielle Genexpression.

## 4 Ergebnisse

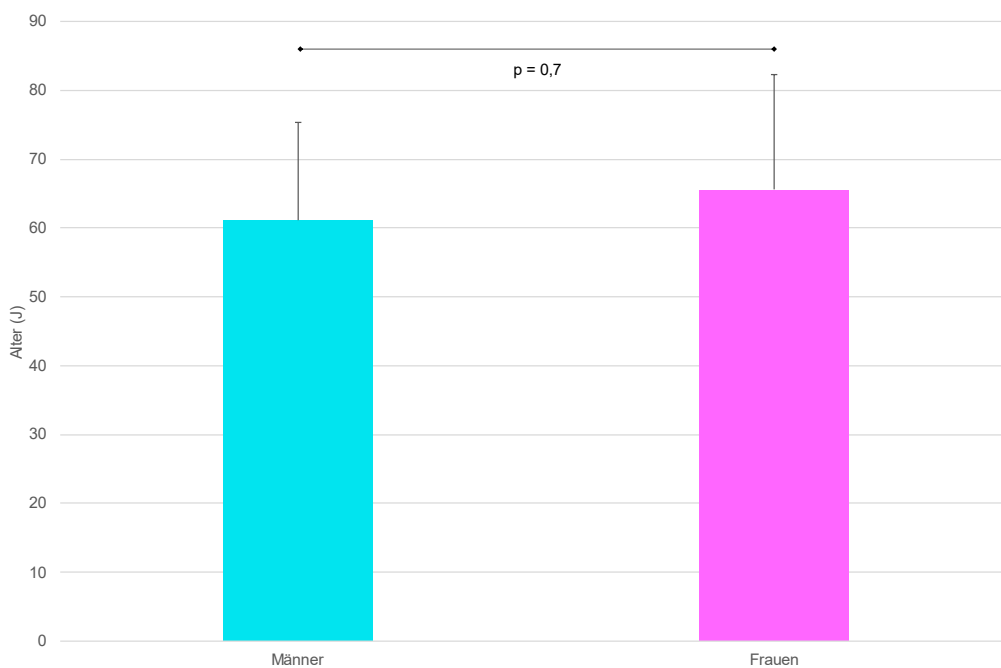
### 4.1 Probandendaten

Für die vorliegende Arbeit wurden zehn Probanden rekrutiert, das Geschlechterverhältnis war ausgeglichen mit je fünf Frauen und fünf Männern. Bei Studieneinschluss lag das mittlere Alter der Probanden bei  $63,4 \pm 15,6$  Jahren.

**Tabelle 6:** *Charakteristika der Probanden*

Probanden ID	Geschlecht	Alter (a)
1	weiblich	85
2	männlich	60
3	männlich	52
4	weiblich	48
5	weiblich	44
6	weiblich	80
7	männlich	81
8	männlich	72
9	weiblich	71
10	männlich	41

Wie in Abbildung 4 dargestellt, unterschieden sich die männlichen Probanden ( $61,2 \pm 14,1$  Jahre) und die weiblichen Probanden ( $65,6 \pm 16,7$  Jahre) bezüglich ihres Alters nicht signifikant ( $p = 0,7$ ; p-Wert mittels F- und T-Test).



**Abbildung 4:** *Alter der Probanden.*

## 4.2 Vitamin D-Spiegel

### 4.2.1 Vitamin D-Spiegel vor Supplementation

Vor der Vitamin D-Supplementation betrug der mittlere Vitamin D-Spiegel der Probanden 20,31 ng/ml. Nach der Definition der Endocrine Society <sup>28</sup> wiesen fünf von den zehn eingeschlossenen Probanden einen Vitamin D-Mangel mit einem Serumspiegel kleiner 20 ng/ml auf. Bei vier Probanden lag eine Vitamin D-Insuffizienz (Vitamin D-Spiegel 21 bis 29 ng/ml) vor und ein Proband erreichte schon vor der Supplementation einen niedrig normalen Vitamin D-Spiegel (33,7 ng/ml), siehe Tabelle 7.

Es gab vor der Nahrungsergänzung mit Vitamin D keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,38$ ;  $p$ -Wert mittels F- und T-Test) zwischen dem Vitamin D-Spiegel der weiblichen Probanden ( $22,5 \text{ ng/ml} \pm 8,16 \text{ ng/ml}$ ) und dem der männlichen Probanden ( $18,1 \text{ ng/ml} \pm 4,68 \text{ ng/ml}$ ), wie Abbildung 5 veranschaulicht.

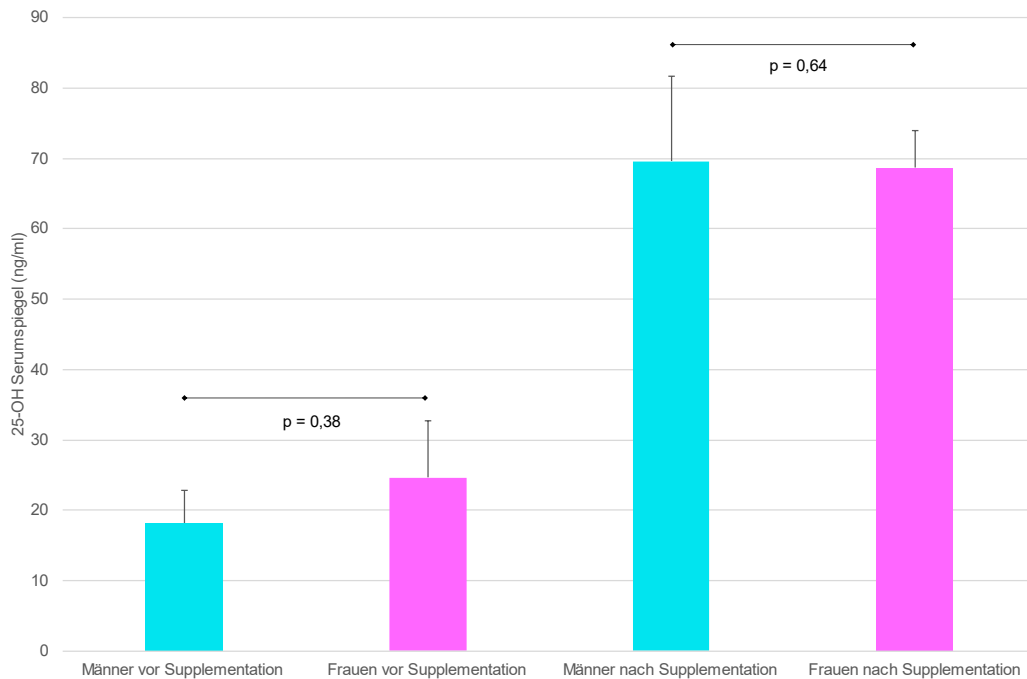
### 4.2.2 Vitamin D-Spiegel nach Supplementation

Nach der oben beschriebenen Supplementation mit Cholecalciferol (Dekristol 20.000 IE) lag der Vitamin D-Spiegel aller zehn Probanden im suffizienten Bereich und betrug im Mittel  $71,48 \text{ ng/ml} \pm 9,47 \text{ ng/ml}$ .

Auch hinsichtlich des erreichten Vitamin D-Spiegels nach der Supplementation unterschieden sich die Probandinnen ( $69,8 \text{ ng/ml} \pm 5,28 \text{ ng/ml}$ ) und männlichen Probanden ( $73,1 \text{ ng/ml} \pm 12,10 \text{ ng/ml}$ ) nicht signifikant ( $p = 0,64$ ;  $p$ -Wert mittels F- und T-Test), siehe Abbildung 5.

**Tabelle 7:** *Vitamin D-Spiegel vor und nach Supplementation*

Proband	Vitamin D-Spiegel vor Supplementation (ng/ml)	Vitamin D-Spiegel nach Supplementation (ng/ml)
1	14,5	77,8
2	22,5	69,6
3	23,2	95,5
4	33,7	67,1
5	24,6	62,4
6	27,9	68,7
7	10,3	62,5
8	16,3	63,0
9	12,0	73,3
10	18,1	74,9
<b>Mittelwert →</b>	<b>20,31</b>	<b>71,48</b>

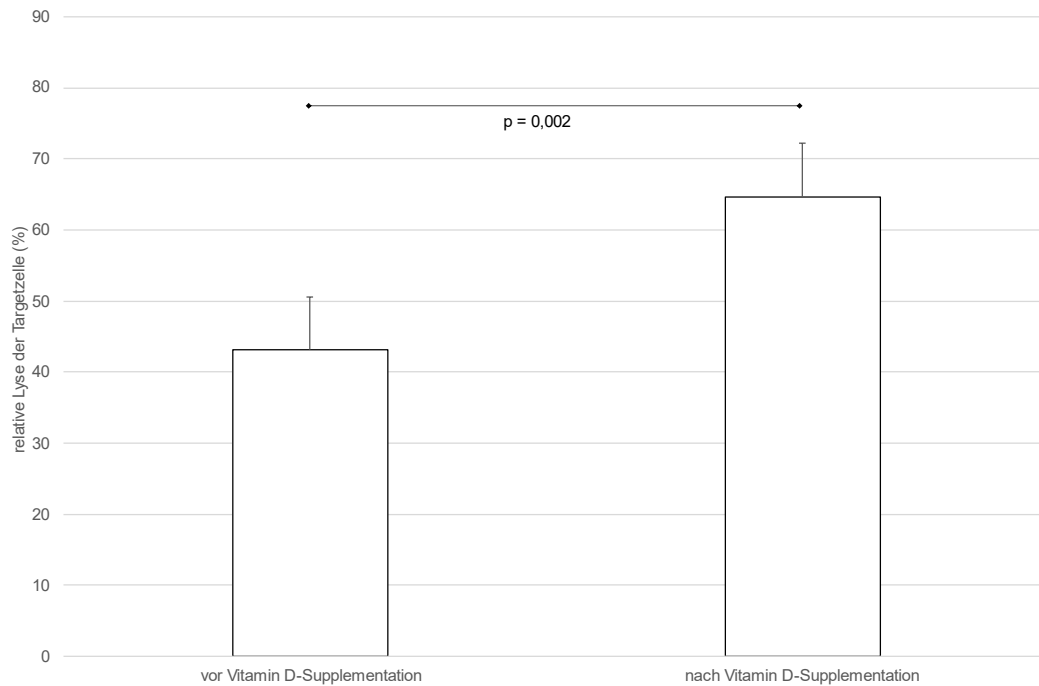


**Abbildung 5:** Vitamin D-Spiegel vor und nach Vitamin D-Supplementation getrennt dargestellt für weibliche und männliche Probanden.

### 4.3 ADCC-Aktivität

Die ADCC-Aktivität der aktivierten NK-Zellen aller Probanden, gemessen als relative Lyse der Target-Zellen, lag vor Vitamin D-Supplementation bei  $43,11 \% \pm 7,47 \%$  und nach Supplementation bei  $64,58 \% \pm 7,68 \%$ . Es zeigte sich somit ein signifikanter Anstieg ( $p = 0,002$ ; p-Wert mittels F- und T-Test) der ADCC-Aktivität nach Vitamin D-Supplementation, wie in Abbildung 6 dargestellt. Die relative Lyse der Target-Zellen wurde bei einem Effektor/Target-Verhältnis von 2,5:1 und mit einer Rituximab-Konzentration von  $0,1 \mu\text{g/ml}$  bestimmt, siehe 3.3.7.

Betrachtet man die einzelnen Probanden für sich so stieg bei allen die ADCC-Aktivität nach Vitamin D-Supplementation an. Ein signifikanter Anstieg konnte bei acht von zehn Probanden nachgewiesen werden. Eine Beziehung zwischen der Höhe des Anstiegs des Vitamin D-Spiegels und Anstieg der ADCC-Aktivität konnte nicht beobachtet werden, wie Tabelle 8 veranschaulicht.



**Abbildung 6:** ADCC-Aktivität der NK-Zellen aller Probanden vor und nach Vitamin D-Supplementation.

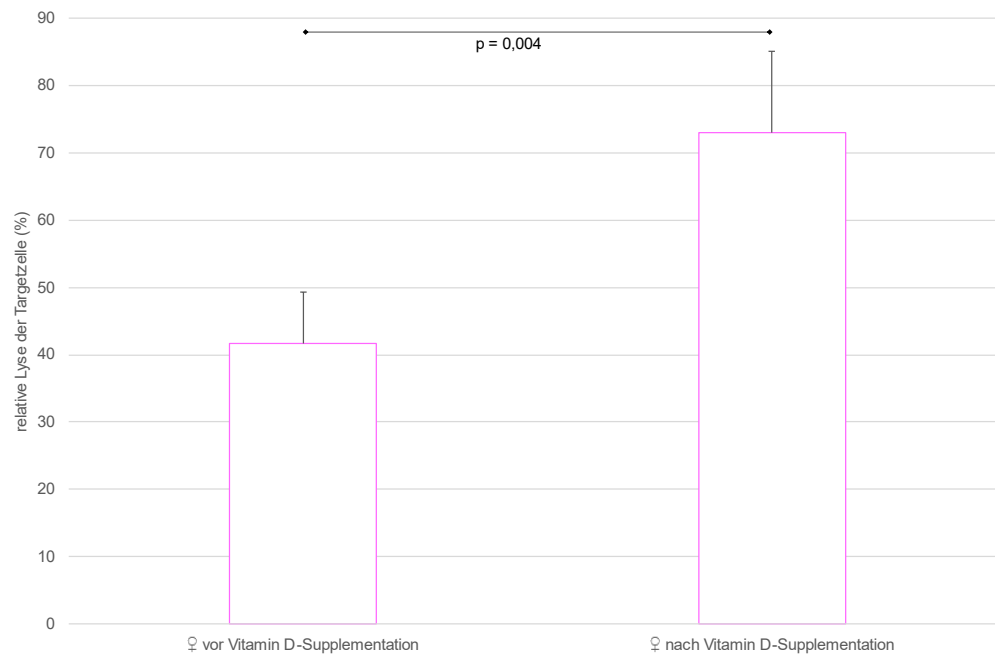
**Tabelle 8:** ADCC-Aktivität in Abhängigkeit des Vitamin D-Spiegels und der Patientencharakteristika

Proband	Geschlecht	Alter (a)	Vor Vitamin D-Supplementation		Nach Vitamin D-Supplementation	
			25-OH-Spiegel (ng/ml)	ADCC (%)	25-OH-Spiegel (ng/ml)	ADCC (%)
1	weiblich	85	14,5	<b>39,7</b>	77,8	<b>81,9</b>
2	männlich	60	22,5	<b>42,1</b>	69,6	<b>45,8</b>
3	männlich	52	23,5	<b>36,5</b>	95,5	<b>41,0</b>
4	weiblich	48	33,7	<b>35,65</b>	67,1	<b>49,2</b>
5	weiblich	44	24,6	<b>32,6</b>	62,4	<b>77,4</b>
6	weiblich	80	27,9	<b>54,1</b>	68,7	<b>74,9</b>
7	männlich	81	10,3	<b>57,2</b>	62,5	<b>82,1</b>
8	männlich	72	16,3	<b>45,8</b>	63,0	<b>52,6</b>
9	weiblich	71	12,0	<b>46,0</b>	73,0	<b>81,4</b>
10	männlich	41	18,1	<b>41,3</b>	74,9	<b>59,4</b>

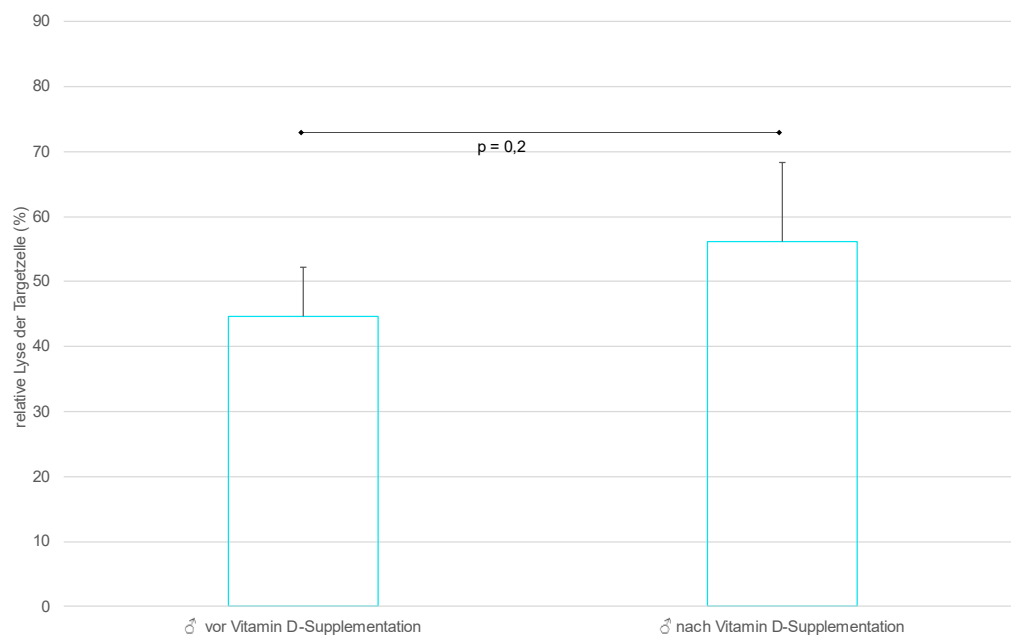
Signifikante Änderungen der ADCC-Aktivität sind grau hinterlegt.

Die aktivierten NK-Zellen aller fünf *Probandinnen* zeigten nach Erreichen mittel-normaler Vitamin D-Serumwerte eine signifikant höhere ADCC-Aktivität. Bei den *männlichen Probanden* konnte eine signifikante Steigerung bei drei Probanden nachgewiesen werden. Insgesamt wiesen die *Probandinnen* nach Supplementation eine höhere relative Lyse auf im Vergleich zu den *männlichen Probanden* (72,97 % ± 12,15 % vs. 56,18 % ± 14,38 %).





**Abbildung 7:** ADCC-Aktivität der NK-Zellen der fünf Probandinnen vor und nach Supplementation mit Vitamin D ( $p = 0,004$ ;  $p$ -Wert mittels F- und T-Test).



**Abbildung 8:** ADCC-Aktivität der NK-Zellen der fünf Probanden vor und nach Supplementation mit Vitamin D ( $p = 0,2$ ;  $p$ -Wert mittels F- und T-Test).

Die bisherigen Ergebnisse konnten bei aktivierten NK-Zellen eine Änderung der ADCC im Vergleich nach versus vor Vitamin D-Supplementation nachweisen. Somit müssen sich zumindest bei aktivierten NK-Zellen nach im Vergleich zu vor Supplementation auch differenziell exprimierte Gene beobachten lassen.

#### 4.4 RNA-Ausbeute

Die Menge der isolierten RNA je Probe wurde mittels Spektrometrie gemessen (siehe Seite 40). Die RNA-Ausbeute war bei allen Proben für die folgende RNA-Sequenzierung ausreichend.

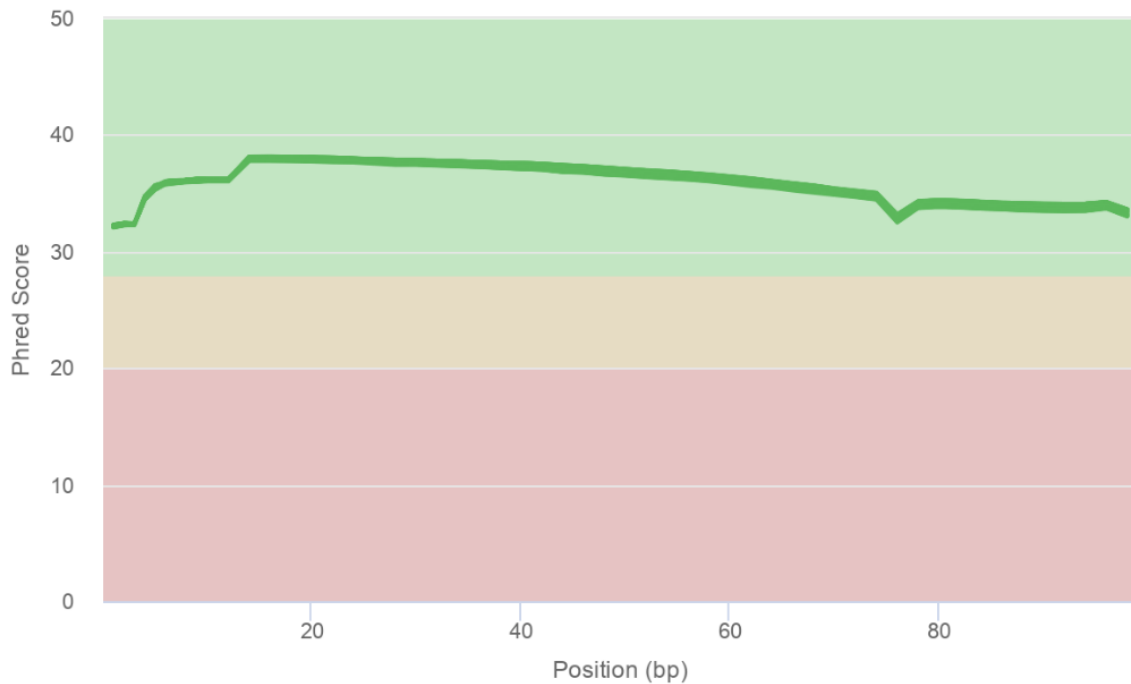
**Tabelle 9:** *RNA-Ausbeute*

<b>Vor Vitamin D-Supplementation</b>				<b>Nach Vitamin D-Supplementation</b>			
<b>Passive NK- Zellen</b>		<b>Aktivierete NK-Zellen</b>		<b>Passive NK-Zellen</b>		<b>Aktivierete NK-Zellen</b>	
<b>ID</b>	<b>RNA (ng/µl)</b>	<b>ID</b>	<b>RNA (ng/µl)</b>	<b>ID</b>	<b>RNA (ng/µl)</b>	<b>ID</b>	<b>RNA (ng/µl)</b>
1a-10	<b>34,7</b>	1a-19	<b>36,4</b>	1b-37	<b>44,6</b>	1b-46	<b>55,5</b>
2a-11	<b>33,9</b>	2a-20	<b>30,0</b>	2b-38	<b>33,5</b>	2b-47	<b>67,7</b>
3a-12	<b>31,5</b>	3a-21	<b>34,5</b>	3b-39	<b>12,3</b>	3b-48	<b>62,2</b>
4a-13	<b>19,6</b>	4a-22	<b>39,7</b>	4b-40	<b>27,5</b>	4b-49	<b>64,1</b>
5a-14	<b>26,5</b>	5a-23	<b>155,5</b>	5b-41	<b>31,1</b>	5b-50	<b>68,0</b>
6a-15	<b>14,0</b>	6a-24	<b>45,3</b>	6b-42	<b>17,8</b>	6b-51	<b>56,2</b>
7a-16	<b>44,0</b>	7a-25	<b>20,5</b>	7b-43	<b>27,2</b>	7b-52	<b>57,9</b>
8a-17	<b>30,0</b>	8a-26	<b>16,4</b>	8b-44	<b>31,8</b>	8b-53	<b>81,2</b>
9a-18	<b>32,1</b>	9a-27	<b>55,0</b>	9b-45	<b>62,4</b>	9b-54	<b>45,7</b>
10a-56	<b>8,7</b>	10a-57	<b>52,2</b>	10b-59	<b>14,6</b>	10b-60	<b>51,6</b>

## 4.5 Qualitätskontrolle der RNA-Sequenzierungsdaten

### 4.5.1 Qualitätskontrolle der Reads mittels Phred Score

Es konnte eine sehr gute Qualität der Reads, gemessen mittels Phred Score, und somit eine geringe Wahrscheinlichkeit der Erkennung falscher Basen nachgewiesen werden, wie Abbildung 9 veranschaulicht.

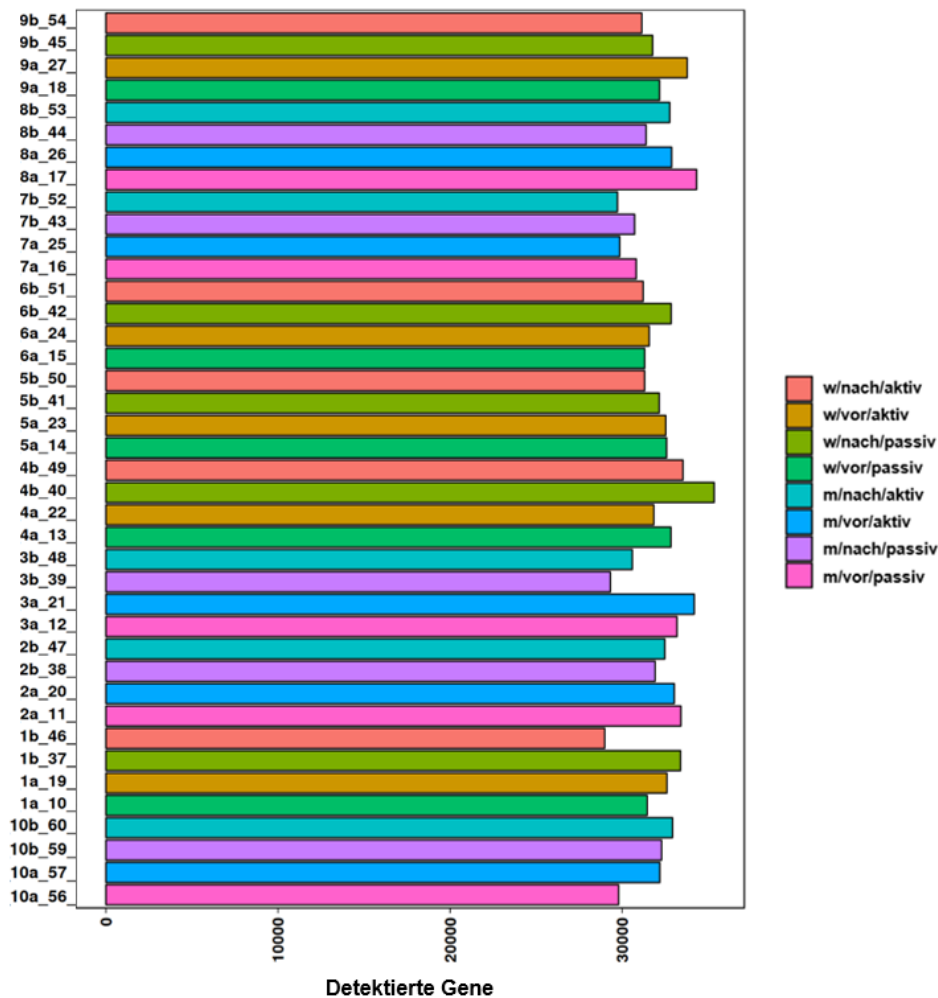


**Abbildung 9:** Qualitätskontrolle der Reads.

Die x-Achse stellt die Basen-Position der Reads dar, die y-Achse repräsentiert den Phred Score. Der Hintergrund des Diagramms unterteilt die y-Achse in sehr guter Qualität (grün), angemessene Qualität (orange) und schlechte Qualität (rot) der Basen-Erkennung. Je höher der Phred Score desto besser ist die Erkennung der Basen. Die Ergebnisse all unserer Proben lagen so eng beieinander, dass sie in einer Kurve dargestellt werden konnten.

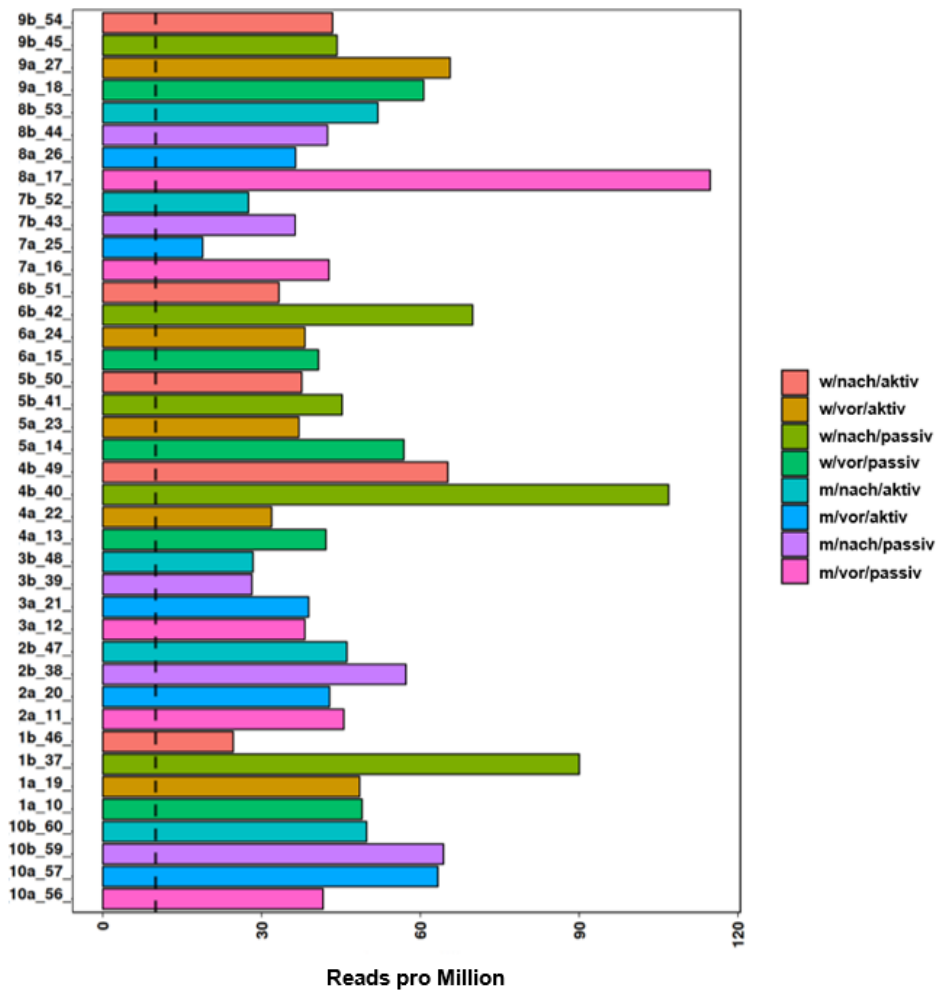
#### 4.5.2 Qualitätskontrolle des Mappings

In der durchgeführten Qualitätskontrolle der RNA-Sequenzierungsdaten konnte bezüglich der Gesamtzahl der Anzahl der detektierten Gene, der Reads pro Probe und der Mapping-Rate, sowie der Exon- und rRNA-Mapping-Rate eine insgesamt gute Qualität der Sequenzierungsdaten nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Qualitätskontrolle werden in den folgenden Abbildungen veranschaulicht.



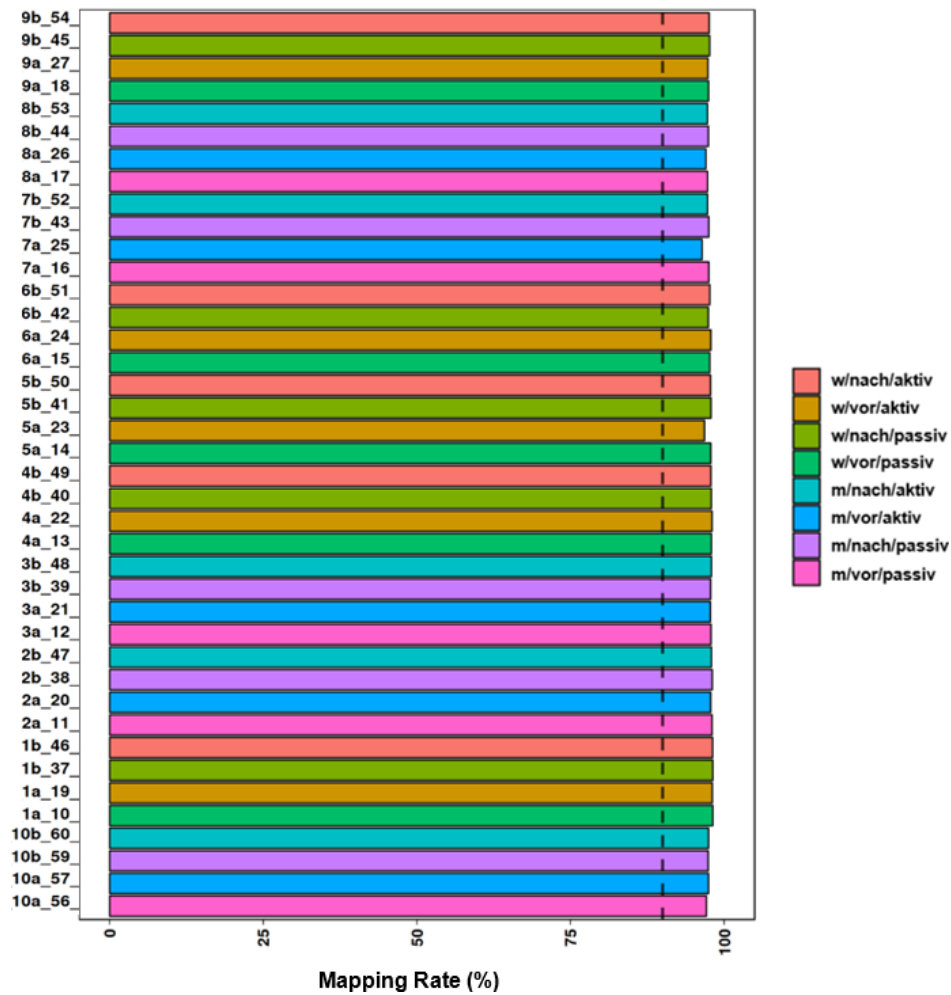
**Abbildung 10:** Anzahl der detektierten Gene pro Probe.

Die Anzahl der nachgewiesenen Gene lag bei allen Proben im Bereich von etwa 30.000. Die x-Achse stellt die Anzahl der detektierten Gene dar, die y-Achse die einzelnen Proben mit Identifikationsnummer. Im Idealfall weisen alle Proben eine ähnliche Anzahl von nachgewiesenen Genen auf<sup>65</sup>, wie es hier der Fall ist.



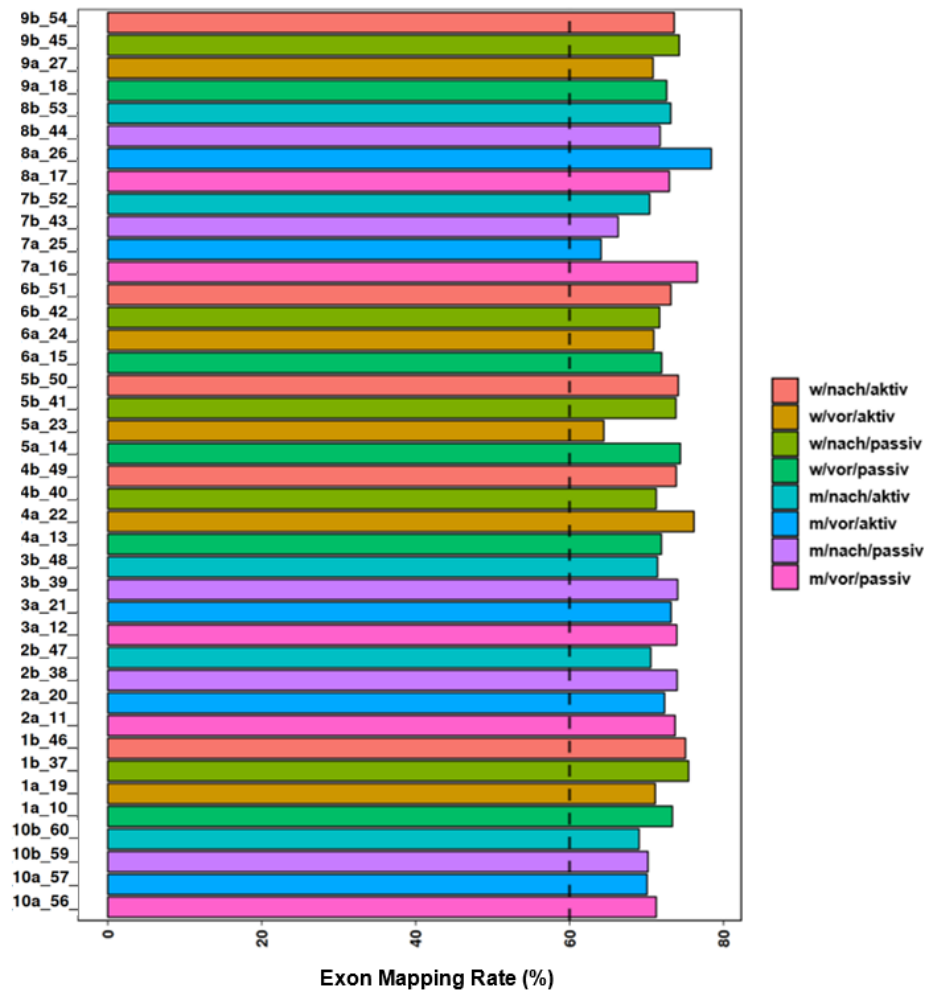
**Abbildung 11:** Gesamtzahl der gelesenen Reads pro Probe.

RNA-seq-Proben mit hoher Qualität sollten mindestens 10 Mio. Reads pro Probe aufweisen<sup>65</sup>. Trotz einer gewissen Variabilität erfüllten alle Proben dieses Kriterium. Die x-Achse stellt die Reads pro Million dar, die y-Achse die einzelnen Proben.



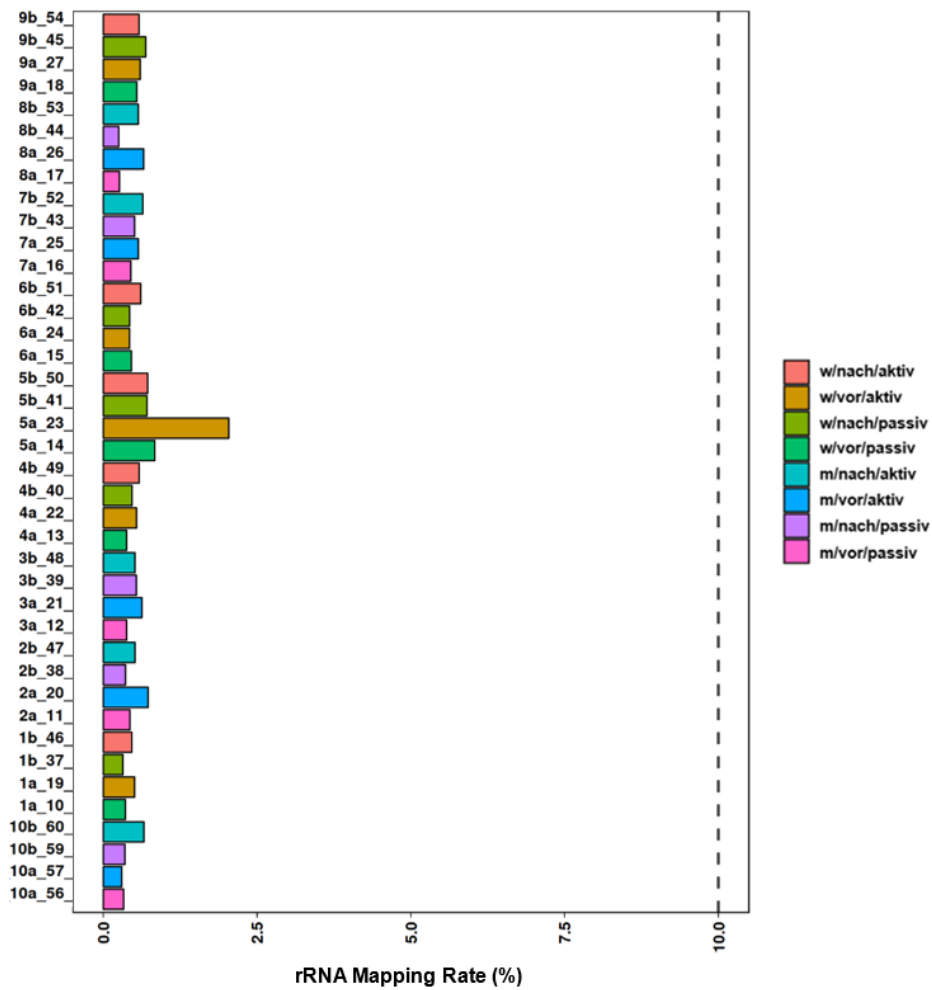
**Abbildung 12:** Mapping-Rate

Die Mapping-Rate betrug für alle Proben kumulativ 97,7%. Sie repräsentiert den Prozentsatz der Reads, die auf das Referenzgenom kartiert werden konnten, laut Literatur sollte eine Mapping-Rate von mehr als 75 % erreicht werden<sup>65</sup>. Die x-Achse stellt die Mapping-Rate, die y-Achse die einzelnen Proben dar.



**Abbildung 13:** Exon Mapping-Rate

Deutlich mehr als 60 % der Reads konnten Exons zugeordnet werden. Idealerweise sollten nach Angaben der Literatur mindestens 60 % aller Reads Exons entsprechen<sup>65</sup>. Die y-Achse entspricht den einzelnen Proben.



**Abbildung 14:** *rRNA Mapping-Rate*

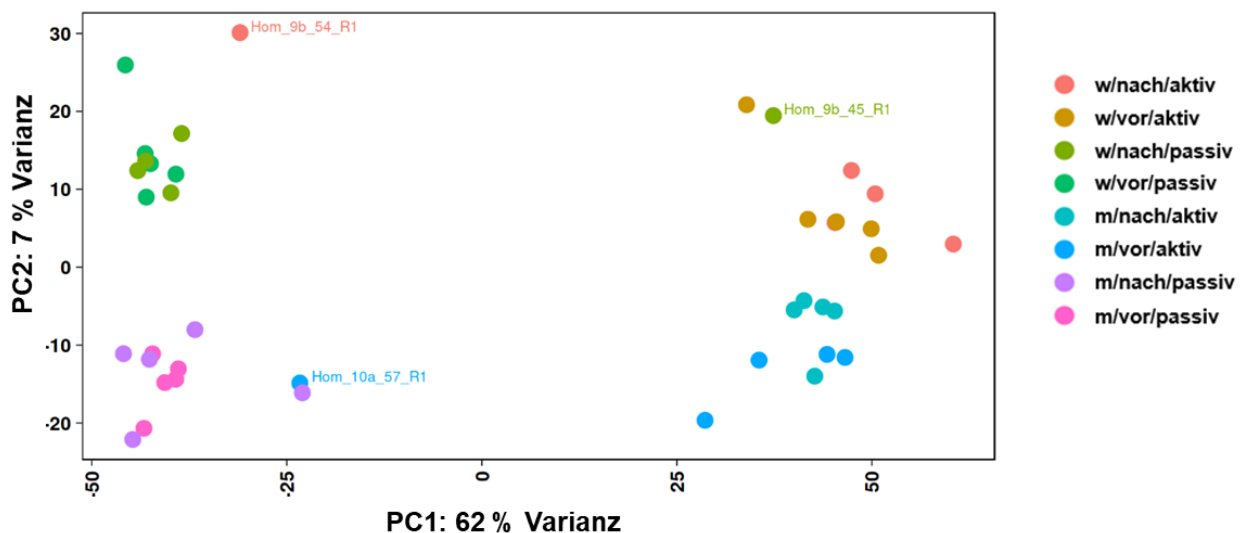
Die rRNA Mapping-Rate lag bei allen 40 Proben weit unter der Ausschlussgrenze von 10 %<sup>65</sup>. Die y-Achse entspricht den einzelnen Proben mit Identifikationsnummer.



### 4.5.3 Hauptkomponentenanalyse

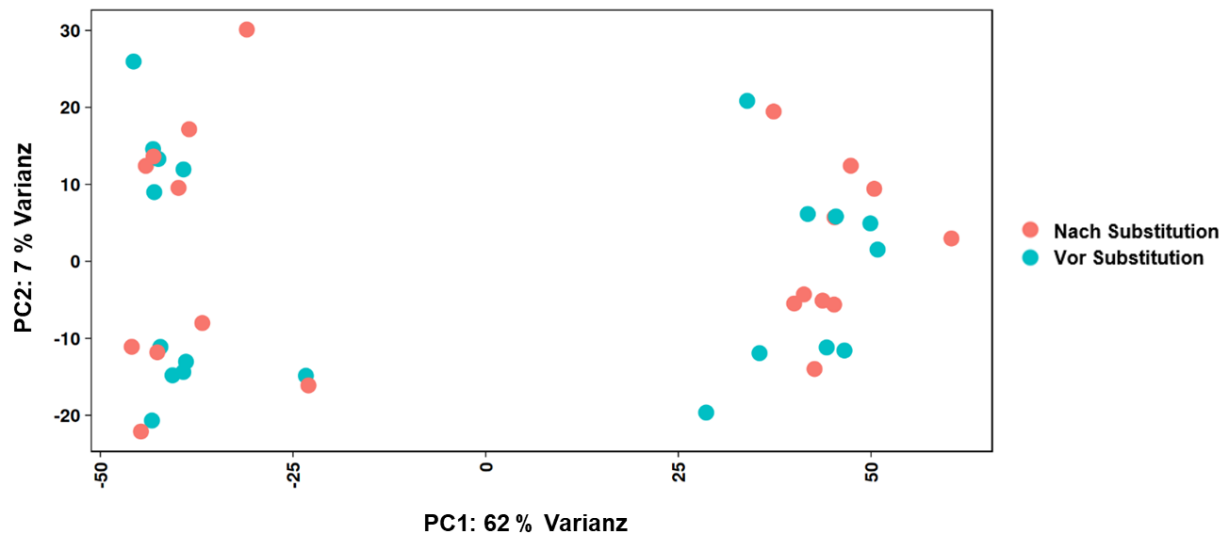
Mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse, bei der die 500 Gene mit der größten Varianz betrachtet wurden, konnte nach erfolgter RNA-seq drei Proben als Ausreißer identifiziert werden. So passen die Proben mit den IDs 9b\_54, 9b\_45 und 10a\_57 nicht in die Gesamtverteilung. Es stellte sich heraus, dass die Proben 9b\_54 und 9b\_45 zuvor bei der RNA-Sequenzierung vertauscht worden sind, sie wurden für die weiteren Analysen zurückgetauscht. Probe 10a\_57, die ebenfalls ein Ausreißer darstellt, wurde für die nachgeschalteten Analysen nicht mit einbezogen.

Der Hauptkomponentenanalyse nach zuzufolge, scheint der stärkste Einfluss der Verteilung darin zu liegen, ob die NK-Zellen aktiviert wurden oder nicht, siehe Abbildung 15. Außerdem teilen sich die Proben nach dem Geschlecht auf. Der Supplementationstyp (vor oder nach Vitamin D-Ergänzung) weist kein klares Verteilungsmuster auf, wie Abbildung 16 veranschaulicht.



**Abbildung 15:** Hauptkomponentenanalyse

Bei Betrachtung von 500 Genen mit der größten Varianz enthält PC1 62 % der Gesamtvarianz und teilt die Daten fast vollständig in zwei Gruppen auf. In der linken Bildhälfte gruppieren sich die Proben der passiven NK-Zellen und in der rechten Bildhälfte die der aktivierten NK-Zellen. PC2 macht 7 % der Varianz aus und teilt die Proben nach dem Geschlecht auf (obere Bildhälfte Proben der weiblichen Probandinnen, untere Bildhälfte Proben der männlichen Probanden). Deutlich zu erkennen sind die oben beschriebenen Ausreißer.



**Abbildung 16:** Hauptkomponentenanalyse Aufteilung in vor und nach Supplementation.

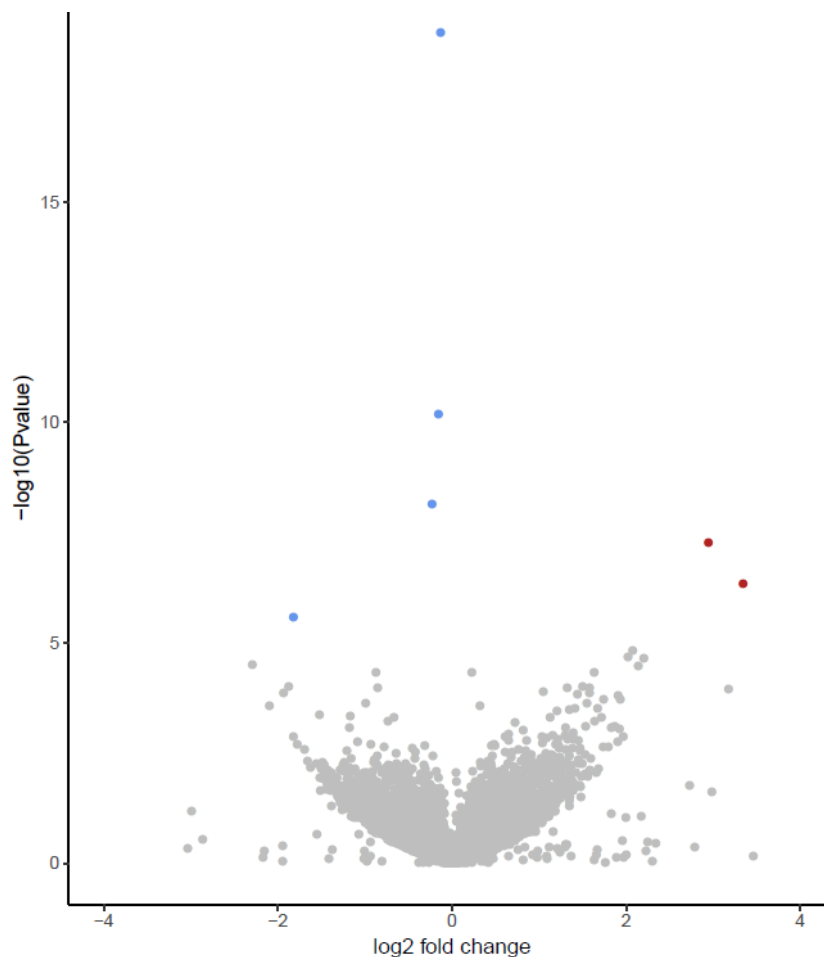
Der Supplementationstyp (vor oder nach Vitamin D-Ergänzung) weist kein klares Verteilungsmuster auf.

## 4.6 Differentielle Genexpression

### 4.6.1 Differentielle Genexpression in Abhängigkeit des Vitamin D-Spiegels

#### 4.6.1.1 Differentielle Genexpression der passiven NK-Zellen nach versus vor Vitamin D-Supplementation – **Vergleich 1**

Beim Vergleich der passiven NK-Zellen nach versus vor Vitamin D-Supplementation konnte eine signifikante differentielle Genexpression lediglich bei sechs Genen nachgewiesen werden. Zwei Gene wiesen nach Supplementation eine signifikant erhöhte Expression auf ( $\log_2 \text{FC} > 0$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ), siehe Tabelle 10. Vier Gene waren nach der Supplementation signifikant herunterreguliert ( $\log_2 \text{FC} < 0$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ), siehe Tabelle 11. Keines dieser signifikant veränderten Gene hat nach bisherigem Wissenstand einen Bezug zur Funktion der NK-Zellen oder der Immunabwehr.



**Abbildung 17:** Volcano Plot der DGE - Vergleich 1.

Die x-Achse zeigt den  $\log_2 \text{FC}$  der Genexpression und die y-Achse den  $-\log_{10} p\text{-Wert}$ . Die roten Punkte spiegeln die nach Vitamin D-Supplementation signifikant hochregulierten ( $\text{LFC} > 0$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ) wider, die blauen Punkte die signifikant nach Vitamin D-Supplementation herunterregulierten Gene ( $\text{LFC} < 0$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ). Die grauen Punkte repräsentieren nicht signifikant veränderte Gene.

**Tabelle 10:** Nach Vitamin D-Supplementation **hochregulierte** Gene bei Vergleich 1

Gen	Ensembl	log2 FC	p-Wert	adj. p-Wert
<i>MYT1</i>	ENSG00000196132	2,94	$5,53 \times 10^{-8}$	$5,5 \times 10^{-4}$
<i>FAM19A1</i>	ENSG00000183662	3,34	$4,56 \times 10^{-7}$	$3,6 \times 10^{-3}$

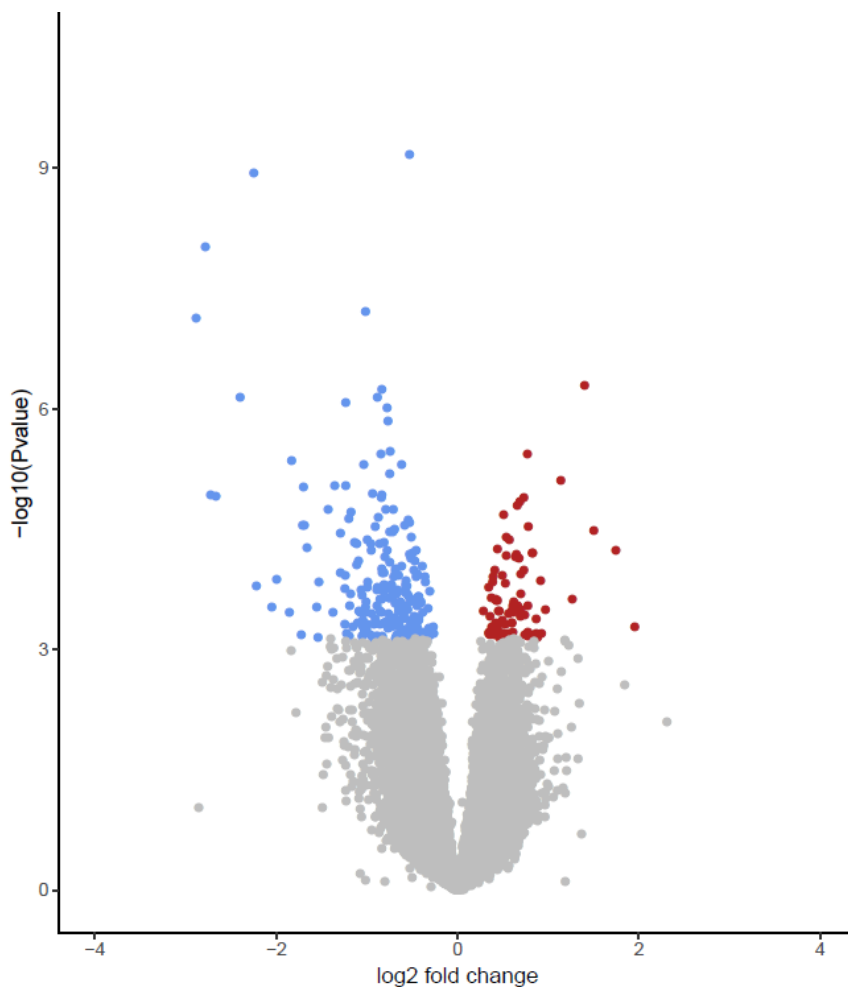
**Tabelle 11:** Nach Vitamin D-Supplementation **herunterregulierte** Gene bei Vergleich 1

Gen	Ensembl	log2 FC	p-Wert	adj. p-Wert
<i>ABHD16B</i>	ENSG00000183260	-0,13	$1,40 \times 10^{-19}$	$5,64 \times 10^{-15}$
<i>RF00100</i>	ENSG00000202198	-0,16	$6,59 \times 10^{-11}$	$1,32 \times 10^{-6}$
<i>AL358472.7</i>	ENSG00000285779	-0,23	$7,30 \times 10^{-9}$	$9,78 \times 10^{-5}$
<i>PCGF2</i>	ENSG00000277258	-1,82	$2,66 \times 10^{-6}$	0,02

#### 4.6.1.2 Differentielle Genexpression der aktivierten NK-Zellen nach versus vor Vitamin D-Supplementation – **Vergleich 2**

Bei den aktivierten NK-Zellen wurden nach im Vergleich zu vor Vitamin D-Supplementation insgesamt 307 Gene als signifikant verändert identifiziert. Signifikant hochreguliert mit einer  $\log_2 FC > 0$  und einem  $p$ -Wert  $< 0,05$  waren 84 Gene, wovon wiederum 75 Gene (89,3 %) Protein-codierende Gene darstellten. Die anderen 10,7 % hochregulierten Gene entsprachen Pseudogenen oder Antisense-Genen.

223 Gene zeigten sich nach Vitamin D-Supplementation signifikant herunterreguliert ( $\log_2 FC < 0$ ,  $p$ -Wert  $< 0,05$ ), davon stellten 101 Gene (45,3 %) Protein-codierende Gene dar. 122 Gene (54,7 %) waren Pseudogene oder Antisense-Gene.



**Abbildung 18:** Volcano Plot der DGE - Vergleich 2.

Die x-Achse stellt den  $\log_2 FC$  der Genexpression und die y-Achse den  $-\log_{10} p$ -Wert dar. Rote Punkte entsprechen den nach Vitamin D-Supplementation signifikant hochregulierten Genen ( $LFC > 0$ ,  $p$  Wert  $< 0,05$ ). Die blauen Punkte zeigen die signifikant nach Vitamin D-Supplementation herunterregulierten Gene ( $LFC < 0$ ,  $p$ -Wert  $< 0,05$ ). Nicht signifikant veränderte Gene sind durch graue Punkte dargestellt.

**Tabelle 12:** Die 15 am signifikantesten *hochregulierten Gene* bei Vergleich 2

Gen	Ensembl	log2 FC	p-Wert	adj. p-Wert
<i>TMEM189-UBE2V1</i>	ENSG00000124208	1,40	$5,18 \times 10^{-7}$	0,002
<i>HEATR1</i>	ENSG00000119285	0,77	$3,64 \times 10^{-6}$	0,005
<i>AL662797.1</i>	ENSG00000272540	1,14	$7,88 \times 10^{-6}$	0,008
<i>AL163051.2</i>	ENSG00000276182	0,73	$1,26 \times 10^{-5}$	0,009
<i>THAP6</i>	ENSG00000174796	0,69	$1,44 \times 10^{-5}$	0,010
<i>PLA2G15</i>	ENSG00000103066	0,66	$1,60 \times 10^{-5}$	0,017
<i>NOL9</i>	ENSG00000162408	0,51	$2,12 \times 10^{-5}$	0,012
<i>LRRC37A17P</i>	ENSG00000263142	0,78	$2,97 \times 10^{-5}$	0,014
<i>LRRC37A6P</i>	ENSG00000230445	1,50	$3,27 \times 10^{-5}$	0,014
<i>VPS53</i>	ENSG00000141252	0,53	$4,01 \times 10^{-5}$	0,016
<i>AREL1</i>	ENSG00000119682	0,57	$4,26 \times 10^{-5}$	0,016
<i>DDI2</i>	ENSG00000197312	0,44	$5,72 \times 10^{-5}$	0,019
<i>RHOBTB1</i>	ENSG00000072422	1,75	$5,78 \times 10^{-5}$	0,019
<i>MYO9A</i>	ENSG00000066933	0,82	$6,20 \times 10^{-5}$	0,019
<i>RBM12B</i>	ENSG00000183808	0,83	$6,27 \times 10^{-5}$	0,019

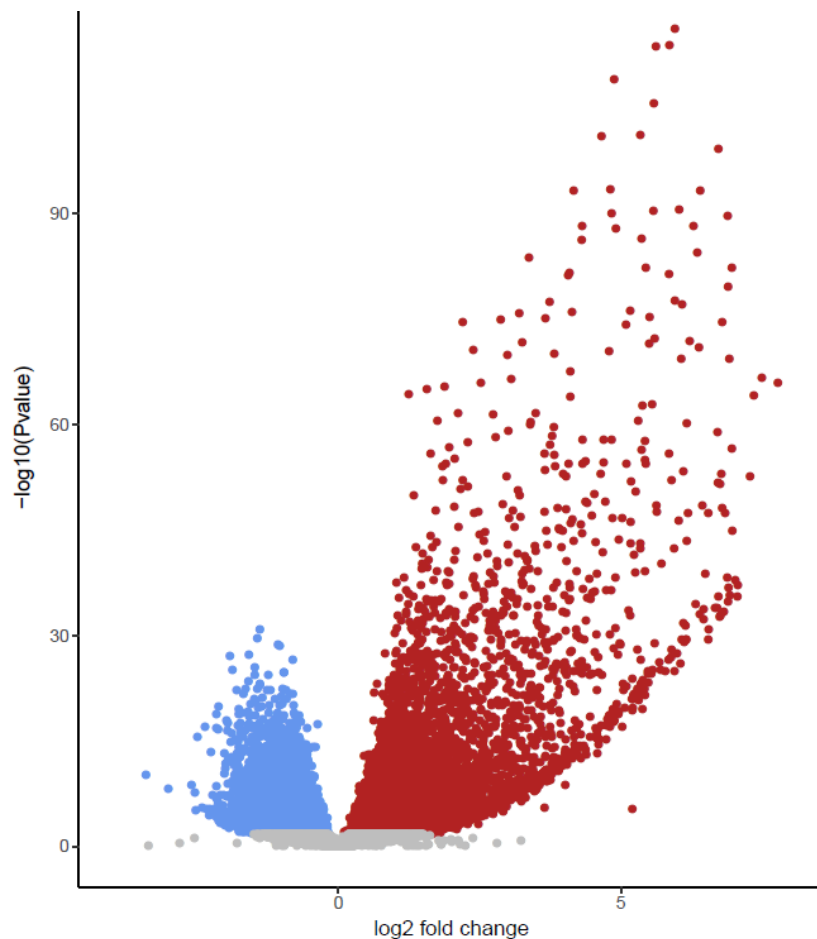
**Tabelle 13:** Die 15 am signifikantesten *herunterregulierten Gene* bei Vergleich 2

Gen	Ensembl	log2 FC	p-Wert	adj. p-Wert
<i>AC087190.3</i>	ENSG00000263244	-0,53	$6,84 \times 10^{-10}$	$1,18 \times 10^{-5}$
<i>AC008264.2</i>	ENSG00000273489	-2,25	$1,14 \times 10^{-9}$	$1,18 \times 10^{-5}$
<i>AC020978.5</i>	ENSG00000262160	-2,78	$9,54 \times 10^{-9}$	$6,58 \times 10^{-5}$
<i>AC104758.2</i>	ENSG00000259792	-2,89	$7,53 \times 10^{-8}$	$3,11 \times 10^{-4}$
<i>AC018904.1</i>	ENSG00000259250	-1,02	$6,25 \times 10^{-8}$	$3,11 \times 10^{-4}$
<i>AC024940.5</i>	ENSG00000275097	-2,40	$7,29 \times 10^{-7}$	0,0017
<i>FLJ45513</i>	ENSG00000204584	-0,88	$7,30 \times 10^{-7}$	0,0017
<i>KDM4A-AS1</i>	ENSG00000236200	-0,84	$5,83 \times 10^{-7}$	0,0017
<i>AL035071.1</i>	ENSG00000260257	-1,23	$8,47 \times 10^{-7}$	0,0018
<i>CXorf65</i>	ENSG00000204165	-0,78	$9,73 \times 10^{-7}$	0,0018
<i>EGFL8</i>	ENSG00000241404	-0,77	$1,44 \times 10^{-6}$	0,0025
<i>AC040977.1</i>	ENSG00000262089	-0,85	$3,67 \times 10^{-6}$	0,0051
<i>AC005606.1</i>	ENSG00000260107	-0,74	$3,43 \times 10^{-6}$	0,0051
<i>AC096558.1</i>	ENSG00000228655	-1,83	$4,40 \times 10^{-6}$	0,0057
<i>AC084824.5</i>	ENSG00000276148	-1,04	$4,95 \times 10^{-6}$	0,0057
<i>POMGNT1</i>	ENSG00000085998	-0,62	$4,90 \times 10^{-6}$	0,0057

## 4.6.2 Differentielle Genexpression aktivierter versus passiver NK-Zellen

### 4.6.2.1 Differentielle Genexpression aktivierter versus passiver NK-Zellen vor Vitamin D-Supplementation – **Vergleich 3**

Die differentielle Genexpressionsanalyse der durch den Kontakt mit Target-Zellen aktivierten versus der passiven NK-Zellen vor Vitamin D-Ergänzung ergab 13.261 signifikant veränderte Gene ( $\log_2 FC \neq 0$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ). Davon waren 7.401 (55,8 %) Gene hochreguliert ( $\log_2 FC > 0$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ) und 5.860 (44,2 %) Gene herunterreguliert ( $\log_2 FC < 0$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ). Aufgrund der hohen Anzahl veränderter Gene erfolgte eine weitere Analyse mit einem  $\log_2 FC$  von 2 mit dem Resultat, dass immer noch insgesamt 1.546 Gene signifikant differentiell exprimiert waren. 1.501 (97,1 %) Gene zeigten sich signifikant hochreguliert ( $\log_2 FC > 2$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ), wobei 856 Gene Protein-codierenden Gene entsprachen. Signifikant herunterreguliert mit einem  $\log_2 FC < 2$  waren 45 (2,9 %) Gene, alle davon Protein-codierend.



**Abbildung 19:** Volcano Plot der DGE - Vergleich 3.

Die x-Achse stellt den  $\log_2 FC$  der Genexpression und die y-Achse den  $-\log_{10} p$ -Wert dar. Rote Punkte entsprechen den nach Vitamin D-Supplementation signifikant hochregulierten Genen ( $LFC > 0$ ,  $p$  Wert  $< 0,05$ ), die blauen Punkte den signifikant nach Vitamin D-Supplementation herunterregulierten Genen ( $LFC < 0$ ,  $p$ -Wert  $< 0,05$ ). Die grauen Punkte entsprechen nicht signifikanten Genen.

**Tabelle 14:** Die 15 am signifikantesten *hochregulierten Gene* bei Vergleich 3 ( $\log_2 FC > 2$ )

Gen	Ensembl	log2 FC	p-Wert	Adj. p-Wert
<i>MME</i>	ENSG00000196549	5,95	$5,64 \times 10^{-117}$	$2,09 \times 10^{-112}$
<i>ANKRD36BP2</i>	ENSG00000230006	5,62	$2,55 \times 10^{-114}$	$3,15 \times 10^{-110}$
<i>ELL3</i>	ENSG00000128886	5,86	$1,77 \times 10^{-114}$	$3,15 \times 10^{-110}$
<i>IGF2BP3</i>	ENSG00000136231	4,88	$1,08 \times 10^{-109}$	$9,96 \times 10^{-106}$
<i>LHFPL6</i>	ENSG00000183722	5,58	$2,79 \times 10^{-106}$	$2,07 \times 10^{-102}$
<i>POU2AF1</i>	ENSG00000110777	5,34	$1,02 \times 10^{-101}$	$6,28 \times 10^{-98}$
<i>AC104823.1</i>	ENSG00000224099	4,65	$1,36 \times 10^{-101}$	$7,20 \times 10^{-98}$
<i>PITX1</i>	ENSG00000069011	6,73	$7,05 \times 10^{-100}$	$3,27 \times 10^{-97}$
<i>ASZ1</i>	ENSG00000154438	4,82	$4,01 \times 10^{-94}$	$1,65 \times 10^{-90}$
<i>PSAT1</i>	ENSG00000135069	4,17	$7,08 \times 10^{-94}$	$2,57 \times 10^{-90}$
<i>PYCR1</i>	ENSG00000183010	6,40	$7,64 \times 10^{-94}$	$2,57 \times 10^{-90}$
<i>SIT1</i>	ENSG00000137078	6,03	$3,40 \times 10^{-91}$	$1,05 \times 10^{-87}$
<i>SOBP</i>	ENSG00000112320	5,57	$4,60 \times 10^{-91}$	$1,31 \times 10^{-87}$
<i>DEPTOR</i>	ENSG00000155792	4,83	$9,62 \times 10^{-91}$	$2,55 \times 10^{-87}$
<i>KCNN3</i>	ENSG00000143603	6,89	$2,77 \times 10^{-90}$	$6,84 \times 10^{-87}$

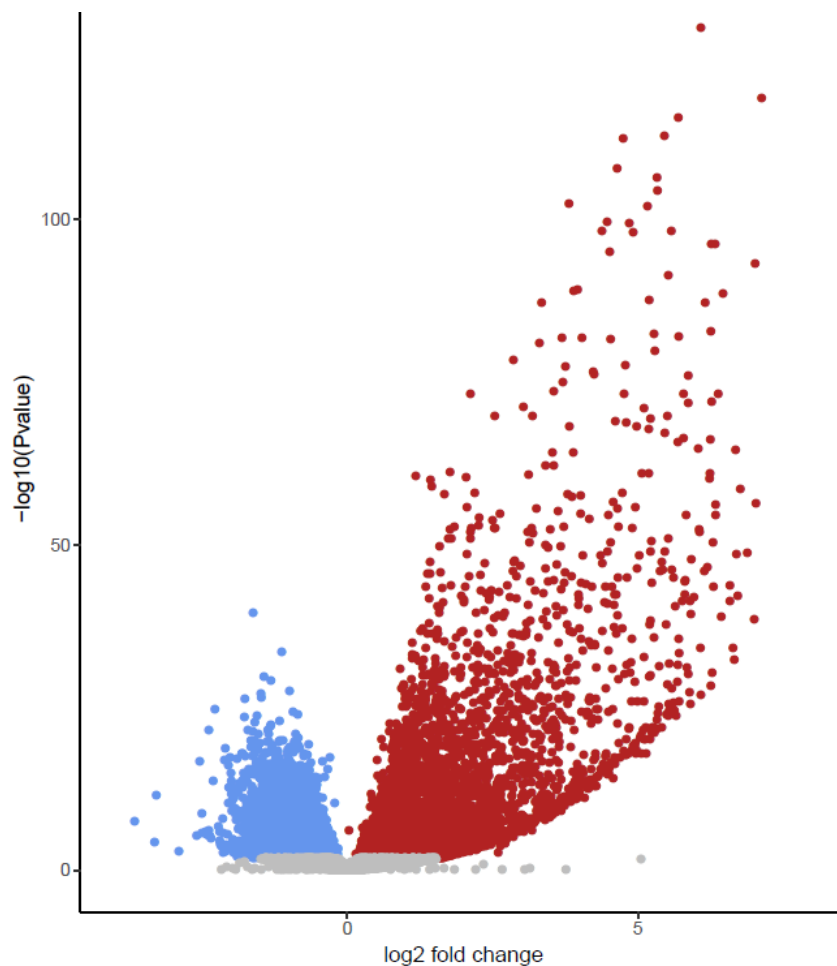
**Tabelle 15:** Die 15 am signifikantesten *herunterregulierten Gene* bei Vergleich 3 ( $\log_2 FC < 2$ )

Gen	Ensembl	log2 FC	p-Wert	adj. p-Wert
<i>CMKLR1</i>	ENSG00000174600	-2,13	$1,46 \times 10^{-20}$	$6,65 \times 10^{-19}$
<i>RASSF1-AS1</i>	ENSG00000281358	-2,16	$1,59 \times 10^{-19}$	$6,75 \times 10^{-18}$
<i>RIMBP3</i>	ENSG00000275793	-2,36	$1,09 \times 10^{-17}$	$3,86 \times 10^{-16}$
<i>PCDH1</i>	ENSG00000156453	-2,16	$1,86 \times 10^{-17}$	$6,37 \times 10^{-16}$
<i>TXNIP</i>	ENSG00000265972	-2,13	$2,65 \times 10^{-17}$	$8,94 \times 10^{-16}$
<i>CXCR1</i>	ENSG00000163464	-2,50	$3,47 \times 10^{-16}$	$1,03 \times 10^{-14}$
<i>TTC38</i>	ENSG00000075234	-2,26	$3,70 \times 10^{-14}$	$8,82 \times 10^{-13}$
<i>CAPN5</i>	ENSG00000149260	-2,02	$7,12 \times 10^{-14}$	$1,64 \times 10^{-12}$
<i>PLEKHG3</i>	ENSG00000126822	-2,00	$1,94 \times 10^{-12}$	$3,72 \times 10^{-11}$
<i>NHSL2</i>	ENSG00000204131	-2,00	$8,08 \times 10^{-12}$	$1,43 \times 10^{-10}$
<i>FCRL6</i>	ENSG00000181036	-2,02	$5,48 \times 10^{-11}$	$8,71 \times 10^{-10}$
<i>HMGB1P6</i>	ENSG00000259781	-3,41	$7,18 \times 10^{-11}$	$1,12 \times 10^{-9}$
<i>AP001972.2</i>	ENSG00000254963	-2,61	$1,92 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$
<i>AC005532.2</i>	ENSG00000244167	-2,16	$2,83 \times 10^{-9}$	$3,51 \times 10^{-8}$
<i>ZSCAN10</i>	ENSG00000130182	-3,01	$8,05 \times 10^{-9}$	$9,28 \times 10^{-8}$



#### 4.6.2.2 Differentielle Genexpression aktivierter versus passiver NK-Zellen nach Vitamin D-Supplementation – **Vergleich 4**

Nach Vitamin D-Supplementation zeigten sich bei den aktivierten NK-Zellen gegenüber den passiven NK-Zellen 11.643 Gene signifikant verändert ( $\log_2 \text{FC} \neq 0$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ), von diesen waren 7.401 Gene signifikant hochreguliert ( $\log_2 \text{FC} > 0$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ) und 5.860 Gene signifikant herunterreguliert ( $\log_2 \text{FC} < 0$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ). Auch bei diesem Vergleich wurde in der Folge ein strengerer  $\log_2 \text{FC}$  von 2 verwendet. Dadurch konnten immerhin noch 1.356 signifikant hochregulierte Gene ( $\log_2 \text{FC} > 2$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ), davon 811 Protein-codierende Gene und 38 signifikant herunterregulierte Gene ( $\log_2 \text{FC} < 2$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ), davon 20 Protein-codierende Gene, identifiziert werden.



**Abbildung 20:** Volcano Plot DEG - Vergleich 4.

Die x-Achse stellt den  $\log_2 \text{FC}$  der Genexpression und die y-Achse den  $-\log_{10} p\text{-Wert}$  dar. Rote Punkte entsprechen den nach Vitamin D-Supplementation signifikant hochregulierten Genen ( $LFC > 0$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ), die blauen Punkte den signifikant nach Vitamin D-Supplementation herunterregulierten Genen ( $LFC < 0$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ). Gene, deren Expression nicht signifikant von Vitamin D beeinflusst wurde, sind grau abgebildet.

**Tabelle 16:** Die 15 am signifikantesten *hochregulierten Gene* bei Vergleich 4  
( $\log_2 FC > 2$ )

Gen	Ensembl	$\log_2 FC$	p-Wert	adj. p-Wert
<i>MME</i>	ENSG00000196549	6,08	$2,68 \times 10^{-130}$	$9,93 \times 10^{-126}$
<i>AICDA</i>	ENSG00000111732	7,13	$1,84 \times 10^{-119}$	$3,40 \times 10^{-115}$
<i>ELL3</i>	ENSG00000128886	5,69	$1,74 \times 10^{-116}$	$2,15 \times 10^{-112}$
<i>ANKRD36BP2</i>	ENSG00000230006	5,45	$1,30 \times 10^{-113}$	$1,21 \times 10^{-109}$
<i>IGF2BP3</i>	ENSG00000136231	4,75	$4,10 \times 10^{-113}$	$3,04 \times 10^{-109}$
<i>AC104823.1</i>	ENSG00000224099	4,64	$1,69 \times 10^{-108}$	$1,04 \times 10^{-104}$
<i>POU2AF1</i>	ENSG00000110777	5,33	$3,97 \times 10^{-107}$	$2,10 \times 10^{-103}$
<i>LHFPL6</i>	ENSG00000183722	5,34	$3,85 \times 10^{-105}$	$1,78 \times 10^{-101}$
<i>LINC01694</i>	ENSG00000233922	3,81	$3,12 \times 10^{-103}$	$1,28 \times 10^{-99}$
<i>SPIB</i>	ENSG00000269404	5,17	$1,03 \times 10^{-102}$	$3,81 \times 10^{-99}$
<i>BCL7A</i>	ENSG00000110987	4,47	$2,20 \times 10^{-100}$	$7,40 \times 10^{-97}$
<i>ASZ1</i>	ENSG00000154438	4,85	$3,74 \times 10^{-100}$	$1,15 \times 10^{-96}$
<i>ENAH</i>	ENSG00000154380	5,58	$5,13 \times 10^{-99}$	$1,46 \times 10^{-95}$
<i>AFAP1-AS1</i>	ENSG00000272620	4,38	$6,81 \times 10^{-99}$	$1,80 \times 10^{-95}$
<i>DEPTOR</i>	ENSG00000155792	4,92	$8,17 \times 10^{-99}$	$2,02 \times 10^{-95}$

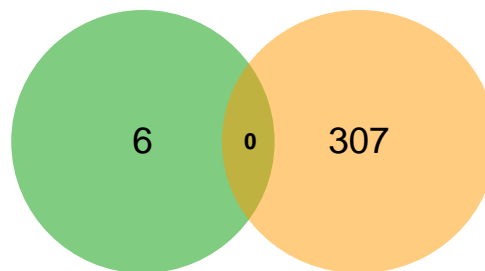
**Tabelle 17:** Die 15 am signifikantesten *herunterregulierten Gene* bei Vergleich 4  
( $\log_2 FC < 2$ )

Gen	Ensembl	$\log_2 FC$	p-Wert	adj. p-Wert
<i>PLEKHF1</i>	ENSG00000166289	-2,28	$2,13 \times 10^{-25}$	$1,47 \times 10^{-23}$
<i>NMUR1</i>	ENSG00000171596	-2,39	$3,05 \times 10^{-22}$	$1,67 \times 10^{-20}$
<i>RASSF1-AS1</i>	ENSG00000281358	-2,10	$2,09 \times 10^{-19}$	$9,15 \times 10^{-18}$
<i>OSBPL5</i>	ENSG00000021762	-2,02	$5,12 \times 10^{-18}$	$1,96 \times 10^{-16}$
<i>KLF2</i>	ENSG00000127528	-2,12	$1,12 \times 10^{-17}$	$4,21 \times 10^{-16}$
<i>CXCR1</i>	ENSG00000163464	-2,54	$1,72 \times 10^{-17}$	$6,36 \times 10^{-16}$
<i>TXNIP</i>	ENSG00000265972	-2,05	$6,78 \times 10^{-17}$	$2,37 \times 10^{-15}$
<i>LINC002481</i>	ENSG00000246526	-2,01	$1,38 \times 10^{-15}$	$4,17 \times 10^{-14}$
<i>FCRL6</i>	ENSG00000181036	-2,31	$1,72 \times 10^{-14}$	$4,62 \times 10^{-13}$
<i>PLEKHG3</i>	ENSG00000126822	-2,05	$1,77 \times 10^{-13}$	$4,23 \times 10^{-12}$
<i>HMGB1P6</i>	ENSG00000259781	-3,30	$2,76 \times 10^{-12}$	$5,64 \times 10^{-11}$
<i>C20orf197</i>	ENSG00000176659	-2,05	$5,56 \times 10^{-11}$	$9,52 \times 10^{-10}$
<i>LCNL1</i>	ENSG00000214402	-2,51	$1,78 \times 10^{-9}$	$2,42 \times 10^{-8}$
<i>AC104634.1</i>	ENSG00000231494	-2,15	$1,05 \times 10^{-8}$	$1,28 \times 10^{-7}$
<i>FAM19A1</i>	ENSG00000183662	-3,67	$2,95 \times 10^{-8}$	$3,35 \times 10^{-16}$

#### 4.6.3 Schnittmengen der unter Vitamin D differentiell exprimierten Gene in den einzelnen Vergleichen

##### ▪ Vergleich 1 und 2

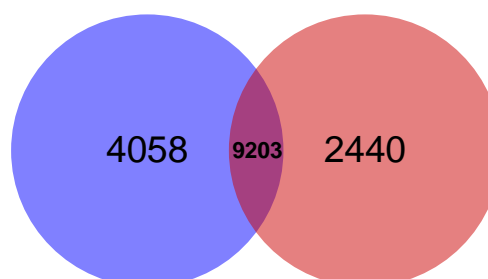
Von den 6 signifikant ( $\log_2 \text{FC} \neq 0$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ) differentiell exprimierten Genen im Vergleich 1 und den 307 signifikant ( $\log_2 \text{FC} \neq 0$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ) differentiell exprimierten Genen bei Vergleich 2 ließen sich keine Gene nachweisen, die bei beiden Vergleichen differentiell exprimiert wurden (Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Schnittmenge der unter Vitamin D differentiell exprimierten Gene in den Vergleichen 1 und 2.

##### ▪ Vergleich 3 und 4

Wie in den Tabellen 14 bis 17 deutlich wird, gleichen sich viele der hoch- und runterregulierten Gene in den Vergleichen aktivierter versus passiver NK-Zellen unabhängig vom Vitamin D-Status. Von den 13.261 signifikant ( $\log_2 \text{FC} \neq 0$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ) differentiell exprimierten Genen im Vergleich 3 und den 11.643 signifikant ( $\log_2 \text{FC} \neq 0$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ) differentiell exprimierten Genen im Vergleich 4 stimmen 9.203 Gene überein, wie in Abbildung 22 dargestellt. Somit sind 2.440 Gene alleine im Vergleich aktivierter versus passiver NK-Zellen nach der Vitamin D-Supplementation signifikant differentiell verändert.



**Abbildung 22:** Schnittmenge der unter Vitamin D differentiell exprimierten Gene in den Vergleichen 3 und 4.

#### 4.6.4 Differentielle Expression ausgewählter Gene unter Vitamin D

Von den 40.182 bei der RNA-Sequenzierung nachgewiesenen Genen werden in den folgenden Abschnitten Gene aufgeführt, die wesentlich an der Regulierung der NK-Zellaktivität oder dem Vitamin D-Stoffwechsel beteiligt sind.

In den Vergleichen 1 und 2 sind diese Gene jedoch nicht signifikant differentiell exprimiert.

##### 4.6.4.1 Vergleich 1 – differentielle Expression ausgewählter Gene

**Tabelle 18:** Auswahl **hochregulierter** Gene bei Vergleich 1

	Gen	Ensembl	log2 FC	p-Wert	adj. p-Wert
Vitamin D-Stoffwechsel	<i>CYP27B1</i>	ENSG00000111012	0,52	0,25	1
	<i>VDR</i>	ENSG00000111424	0,31	0,31	1
Aktivierender Einfluss auf die NK-Zell-Funktion	<i>TNF</i>	ENSG00000232810	0,44	0,28	1
	<i>CD69</i>	ENSG00000110848	0,38	0,095	1
	<i>IFNG</i>	ENSG00000111537	0,28	0,48	1
	<i>NCR1</i>	ENSG00000189430	0,13	0,46	1
	<i>FCGR3A</i>	ENSG00000203747	0,04	0,81	1
Inhibierender Einfluss auf die NK-Zell-Funktion	<i>KIR3DL3</i>	ENSG00000242019	0,40	0,39	1
	<i>KIR2DL1</i>	ENSG00000125498	0,22	0,52	1
	<i>KIR2DL3</i>	ENSG00000243772	0,19	0,57	1
	<i>KIR2DL4</i>	ENSG00000189013	0,09	0,79	1
	<i>KIR3DL1</i>	ENSG00000167633	0,05	0,90	1
	<i>KIR3DL2</i>	ENSG00000240403	0,04	0,93	1

**Tabelle 19:** Auswahl **herunterregulierter** Gene bei Vergleich 1

	Gen	Ensembl	log2 FC	p-Wert	adj. p-Wert
Aktivierender Einfluss auf die NK-Zell-Funktion	<i>KLRK1</i>	ENSG00000213809	-0,07	0,63	1
	<i>LAMP1</i>	ENSG00000185896	-0,01	0,97	1

##### 4.6.4.2 Vergleich 2 – differentielle Expression ausgewählter Gene

**Tabelle 20:** Auswahl **hochregulierter** Gene bei Vergleich 2

	Gen	Ensembl	log2 FC	p-Wert	adj. p-Wert
Vitamin D-Stoffwechsel	<i>VDR</i>	ENSG00000111424	0,22	0,49	0,74
	<i>CYP27B1</i>	ENSG00000111012	0,17	0,79	0,91
Aktivierender Einfluss auf die NK-Zell-Funktion	<i>IFNG</i>	ENSG00000111537	0,28	0,53	0,77
	<i>TNF</i>	ENSG00000232810	0,18	0,70	0,87
	<i>NCR1</i>	ENSG00000189430	0,09	0,61	0,82
	<i>LAMP1</i>	ENSG00000185896	0,08	0,61	0,82

**Tabelle 21:** Auswahl *herunterregulierter* Gene bei Vergleich 2

	Gen	Ensembl	log2 FC	p-Wert	adj. p-Wert
Aktivierender Einfluss auf die NK-Zell-Funktion	<i>FCGR3A</i>	ENSG00000203747	-0,16	0,30	0,59
	<i>CD69</i>	ENSG00000110848	-0,12	0,60	0,82
	<i>KLRK1</i>	ENSG00000213809	-0,11	0,49	0,74
Inhibierender Einfluss auf die NK-Zell-Funktion	<i>KIR3DL3</i>	ENSG00000242019	-0,73	0,12	-
	<i>KIR3DL1</i>	ENSG00000167633	-0,38	0,33	0,61
	<i>KIR2DL4</i>	ENSG00000189013	-0,29	0,37	0,65
	<i>KIR3DL2</i>	ENSG00000240403	-0,26	0,48	0,74
	<i>KIR2DL1</i>	ENSG00000125498	-0,19	0,59	0,81
	<i>KIR2DL3</i>	ENSG00000243772	-0,14	0,68	0,86

4.6.4.3 **Vergleich 3** – differentielle Expression ausgewählter Gene**Tabelle 22:** Auswahl *hochregulierter* Gene bei Vergleich 3

	Gen	Ensembl	log2 FC	p-Wert	adj. p-Wert
Vitamin D-Stoffwechsel	<i>CYP27B1</i>	ENSG00000111012	3,78	$1,35 \times 10^{-14}$	$3,39 \times 10^{-13}$
	<i>VDR</i>	ENSG00000111424	0,17	0,60	0,74
Aktivierender Einfluss auf die NK-Zell-Funktion	<i>CD69</i>	ENSG00000110848	1,35	$4,71 \times 10^{-9}$	$5,61 \times 10^{-8}$
	<i>IFNG</i>	ENSG00000111537	2,36	$1,23 \times 10^{-8}$	$1,38 \times 10^{-7}$
	<i>TNF</i>	ENSG00000232810	1,95	$5,35 \times 10^{-6}$	$3,77 \times 10^{-5}$
Inhibierender Einfluss auf die NK-Zell-Funktion	<i>KIR2DL4</i>	ENSG00000189013	1,60	$8,06 \times 10^{-7}$	$6,61 \times 10^{-6}$
	<i>KIR2DL1</i>	ENSG00000125498	1,40	$8,07 \times 10^{-5}$	$4,38 \times 10^{-4}$
	<i>KIR2DL3</i>	ENSG00000243772	1,16	$6,83 \times 10^{-4}$	0,0030
	<i>KIR3DL3</i>	ENSG00000242019	1,52	0,0015	0,0059
	<i>KIR2DP1</i>	ENSG00000242473	1,09	0,0025	0,0094
	<i>KIR3DL1</i>	ENSG00000167633	0,92	0,0172	0,049
	<i>KIR3DL2</i>	ENSG00000240403	0,89	0,0199	0,055

Grau hinterlegte Gene sind signifikant hochreguliert ( $\log_2 FC > 0$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ).

**Tabelle 23:** Auswahl *herunterregulierter* Gene bei Vergleich 3

	Gen	Ensembl	log2 FC	p-Wert	adj. p-Wert
Aktivierender Einfluss auf die NK-Zell-Funktion	<i>NCR1</i>	ENSG00000189430	-1,11	$1,45 \times 10^{-10}$	$2,18 \times 10^{-9}$
	<i>FCGR3A</i>	ENSG00000203747	-0,85	$1,42 \times 10^{-8}$	$1,57 \times 10^{-7}$
	<i>KLRK1</i>	ENSG00000213809	-0,61	$6,97 \times 10^{-5}$	$3,84 \times 10^{-4}$
	<i>LAMP1</i>	ENSG00000185896	-0,38	0,0199	0,055

Grau hinterlegte Gene sind signifikant herunterreguliert ( $\log_2 FC < 0$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ).

4.6.4.4 **Vergleich 4** – differentielle Expression ausgewählter Gene**Tabelle 24:** Auswahl **hochregulierter** Gene bei Vergleich 4

	Gen	Ensembl	log2 FC	p-Wert	adj. p-Wert
Vitamin D-Stoffwechsel	<i>CYP27B1</i>	ENSG00000111012	3,44	$1,72 \times 10^{-12}$	$3,62 \times 10^{-11}$
	<i>VDR</i>	ENSG00000111424	0,07	0,815	0,898
Aktivierender Einfluss auf die NK-Zell-Funktion	<i>IFNG</i>	ENSG00000111537	2,36	$7,04 \times 10^{-9}$	$8,80 \times 10^{-8}$
	<i>TNF</i>	ENSG00000232810	1,68	$6,48 \times 10^{-5}$	$4,02 \times 10^{-4}$
	<i>CD69</i>	ENSG00000110848	0,86	$1,4 \times 10^{-4}$	$8,06 \times 10^{-4}$
	<i>NCR1</i>	ENSG00000189430	0,13	0,46	1
	<i>FCGR3A</i>	ENSG00000203747	0,04	0,81	1
Inhibierender Einfluss auf die NK-Zell-Funktion	<i>KIR2DL4</i>	ENSG00000189013	1,23	$1,04 \times 10^{-4}$	$6,19 \times 10^{-4}$
	<i>KIR2DL1</i>	ENSG00000125498	0,99	0,004	0,017
	<i>KIR2DP1</i>	ENSG00000242473	0,92	0,009	0,03
	<i>KIR2DL3</i>	ENSG00000243772	0,83	0,013	0,042
	<i>KIR3DL2</i>	ENSG00000240403	0,59	0,115	0,244
	<i>KIR3DL1</i>	ENSG00000167633	0,50	0,192	0,356
	<i>KIR3DL3</i>	ENSG00000242019	0,39	0,406	0,592

Grau hinterlegte Gene sind signifikant hochreguliert ( $\log_2 FC > 0$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ).

**Tabelle 25:** Auswahl **herunterregulierter** Gene bei Vergleich 4

	Gen	Ensembl	log2 FC	p-Wert	adj. p-Wert
Aktivierender Einfluss auf die NK-Zell-Funktion	<i>FCGR3A</i>	ENSG00000203747	-1,04	$9,76 \times 10^{-13}$	$2,13 \times 10^{-11}$
	<i>NCR1</i>	ENSG00000189430	-1,15	$9,87 \times 10^{-12}$	$1,87 \times 10^{-10}$
	<i>KLRK1</i>	ENSG00000213809	-0,64	$1,61 \times 10^{-5}$	$1,13 \times 10^{-4}$
	<i>LAMP1</i>	ENSG00000185896	-0,29	0,068	0,164

Grau hinterlegte Gene sind signifikant herunterreguliert ( $\log_2 FC < 0$ ,  $p\text{-Wert} < 0,05$ ).

## 4.7 Genmengen Anreicherungsanalyse

Um bei den vier Vergleichen signifikant angereicherte Pathways zu identifizieren, erfolgte eine Analyse mittels GeneTrail2. GeneTrail2 führt eine „gene set enrichment“-Analyse (GSEA) auf der Grundlage der Datenbanken KEGG, WikiPathways, Reactome, BioCarta und GO durch. Pathways mit einem Signifikanzniveau von  $< 0,05$  (FDR nach Benjamini und Yekutieli) werden als signifikant angereichert betrachtet.

Die Anzahl signifikant angereicherter Pathways unterscheidet sich deutlich bei den einzelnen Vergleichen, wobei sich bei dem Vergleich aktivierter versus passiver NK-Zellen nach Vitamin D-Supplementation (Vergleich 4) die meisten signifikant angereicherten Signalwege ergaben, siehe Tabelle 26.

Viele der nachgewiesenen Pathways scheinen nach derzeitigem Wissensstand irrelevant für die Funktion von NK-Zellen. Deshalb wurden für die einzelnen Vergleiche im Folgenden nur ausgewählte biologische Wege ausgesucht. Auswahlkriterien für die Pathways waren Zugehörigkeit zum angeboren aber auch zum adaptiven Immunsystem, zentrale Bedeutung für die Signaltransduktion und Bedeutung im Zellzyklus und dessen Regulation.

**Tabelle 26:** Anzahl signifikant angereicherter Pathways

Datenbank	Anzahl signifikant angereicherter Pathways			
	Vergleich 1	Vergleich 2	Vergleich 3	Vergleich 4
KEGG	23	50	19	27
WikiPathways	5	30	13	17
Reactome	19	11	110	160
BioCarta	-	4	4	1
GO - Cellular Component	-	25	98	90
GO - Biological Process	38	20	1	165
GO - Molecular Function	2	12	12	20
<b>Gesamt</b>	<b>87</b>	<b>152</b>	<b>257</b>	<b>480</b>

#### 4.7.1 GSEA - Vergleich 1

Beim *Vergleich der passiven NK-Zellen vor versus nach Vitamin D-Supplementation* wurden insgesamt 87 Pathways identifiziert, die sich nach Vitamin D-Supplementation als signifikant angereichert erwiesen. In Tabelle 27 sind ausgewählte angereicherte Pathways der verschiedenen Datenbanken aufgelistet.

Hervorzuheben sind insbesondere die in der Datenbank GO-Biological Process nachgewiesenen biologischen Pfade "innate immune response activating cell surface receptor signaling pathway", "positive regulation of inflammatory response", "fever generation" und "positive regulation of cytokine secretion".

**Tabelle 27:** Auswahl angereicherter Pathways bei Vergleich 1

KEGG	
	adj. P-Wert
Antigen processing and presentation	$3,07 \times 10^{-4}$
Cytokine-cytokine receptor interaction	$6,94 \times 10^{-4}$
WikiPathways	
Type II interferon signaling (IFNG)	$7,25 \times 10^{-4}$
Reactome	
MAPK6/MAPK4 signaling	$1,48 \times 10^{-2}$
Downstream TCR signaling	$3,49 \times 10^{-2}$
Chemokine receptors bind chemokines	$3,72 \times 10^{-2}$
Antigen processing: Ubiquitination & Proteasome degradation	$3,76 \times 10^{-2}$
GO-Biological Process	
fever generation	$4,59 \times 10^{-2}$
innate immune response activating cell surface receptor signaling pathway	$4,86 \times 10^{-2}$
positive regulation of inflammatory response	$2,06 \times 10^{-3}$
positive regulation of cytokine secretion	$4,12 \times 10^{-2}$
positive regulation of leukocyte chemotaxis	$4,44 \times 10^{-4}$
positive regulation of leukocyte migration	$4,44 \times 10^{-4}$
regulation of leukocyte migration	$4,30 \times 10^{-2}$
regulation of leukocyte chemotaxis	$1,08 \times 10^{-3}$
humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin	$6,14 \times 10^{-3}$
positive regulation of alpha beta T cell activation	$2,71 \times 10^{-2}$
complement activation classical pathway	$3,49 \times 10^{-2}$
antigen receptor mediated signaling pathway	$4,12 \times 10^{-2}$
myeloid leukocyte activation	$4,30 \times 10^{-2}$
complement activation	$4,40 \times 10^{-2}$
granulocyte chemotaxis	$4,40 \times 10^{-2}$
T cell receptor signaling pathway	$4,86 \times 10^{-2}$
GO-Molecular Function	
MHC class II receptor activity	$2,30 \times 10^{-2}$



#### 4.7.2 GSEA - **Vergleich 2**

Wie in Tabelle 26 dargestellt sind beim **Vergleich aktivierte NK-Zellen vor versus nach Vitamin D-Supplementation** deutlich mehr Pathways (insgesamt 152) nach Vitamin D-Gabe angereichert als bei Vergleich 1.

Viele dieser angereicherten Pathways sind an der Signaltransduktion beteiligt. Zudem ist hervorzuheben, dass der Pathway "Control of Gene Expression by Vitamin D Receptor" bei diesem Vergleich angereicht ist (BioCarta-Datenbank).

**Tabelle 28:** Auswahl angereicherter Pathways bei Vergleich 2

KEGG	
Pathway	adj. P-Wert
NF-kappa B signaling pathway	$1,47 \times 10^{-4}$
TNF signaling pathway	$4,14 \times 10^{-4}$
Chemokine signaling pathway	$5,64 \times 10^{-4}$
Toll-like receptor signaling pathway	$3,99 \times 10^{-3}$
RIG-I-like receptor signaling pathway	$1,10 \times 10^{-2}$
T cell receptor signaling pathway	$1,58 \times 10^{-2}$
ErbB signaling pathway	$1,69 \times 10^{-2}$
Cytokine-cytokine receptor interaction	$2,24 \times 10^{-2}$
mTOR signaling pathway	$3,14 \times 10^{-2}$
Ras signaling pathway	$3,85 \times 10^{-2}$
PI3K-Akt signaling pathway	$4,22 \times 10^{-2}$
Jak-STAT signaling pathway	$4,95 \times 10^{-2}$
WikiPathways	
MAPK Signaling Pathway	$3,44 \times 10^{-5}$
TGF-beta Signaling Pathway	$5,01 \times 10^{-5}$
B Cell Receptor Signaling Pathway	$1,09 \times 10^{-4}$
EGF/EGFR Signaling Pathway	$1,98 \times 10^{-3}$
IL-1 signaling pathway	$1,98 \times 10^{-3}$
Toll-like Receptor Signaling Pathway	$2,70 \times 10^{-3}$
TNF alpha Signaling Pathway	$2,89 \times 10^{-2}$
Type II interferon signaling (IFNG)	$3,84 \times 10^{-2}$
BioCarta	
Control of Gene Expression by Vitamin D Receptor	$2,60 \times 10^{-2}$

GO-Biological Process	
MyD88 dependent toll like receptor signaling pathway	$1,18 \times 10^{-2}$
toll like receptor 2 signaling pathway	$3,06 \times 10^{-2}$

#### 4.7.3 GSEA - **Vergleich 3**

Insgesamt 257 Pathways sind beim **Vergleich aktivierter versus passiver NK-Zellen vor Vitamin D-Supplementation** angereichert. Im Gegensatz zu den Vergleichen 1 und 2 stimmen einige dieser Pathways in den unterschiedlichen Datenbanken überein. Vor allem biologische Pfade die eine Rolle im Zellzyklus einnehmen, sind angereichert. Außerdem werden bei diesem Vergleich signifikant vermehrt Pathways beschrieben, die im Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B enden (Datenbank Reactome).

**Tabelle 29:** Auswahl angereicherter Pathways bei Vergleich 3

KEGG	
Pathway	adj. P-Wert
Cytokine-cytokine receptor interaction	0,035
Ribosome	$1,94547 \times 10^{-34}$
Ribosome biogenesis in eukaryotes	$3,46 \times 10^{-7}$
DNA replication	$3,32 \times 10^{-6}$
Oxidative phosphorylation	$6,93 \times 10^{-8}$
WikiPathways	
Oxidative phosphorylation	$2,72 \times 10^{-6}$
DNA Replication	$2,46 \times 10^{-4}$
Cell Cycle	$1,61 \times 10^{-2}$
Reactome	
NIK-->noncanonical NF- $\kappa$ B signaling	$2,95 \times 10^{-6}$
Dectin-1 mediated noncanonical NF- $\kappa$ B signaling	$6,93 \times 10^{-6}$
Activation of NF- $\kappa$ B in B cells	$1,48 \times 10^{-4}$
TNFR2 non-canonical NF- $\kappa$ B pathway	$2,45 \times 10^{-4}$
MAPK6/MAPK4 signaling	$5,17 \times 10^{-3}$
Downstream TCR signaling	$4,54 \times 10^{-2}$
GO-Cellular Component	
immunoglobulin complex circulating	$1,55 \times 10^{-4}$

immunoglobulin complex	$6,42 \times 10^{-3}$
GO-Biological Process	
signal transduction involved in cell cycle checkpoint	$3,47 \times 10^{-5}$
signal transduction involved in DNA integrity checkpoint & signal transduction involved in DNA damage checkpoint	$5,75 \times 10^{-5}$
oxidative phosphorylation	$1,76 \times 10^{-4}$
DNA damage response signal transduction by p53 class mediator resulting in cell cycle arrest	$6,66 \times 10^{-4}$

#### 4.7.4 GSEA - **Vergleich 4**

Bei Vergleich 4, **aktivierte versus passive NK-Zellen nach Vitamin D-Supplementation**, wurde die größte Anzahl angereicherter Pathways nachgewiesen. Wie schon bei Vergleich 3 stimmen dabei in den verschiedenen Datenbanken einige dieser Pfade überein. Auch bei Vergleich 4 reicherten sich mehrere Pathways des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B signifikant an (Datenbanken Reactome und GO-Biological Process).

**Tabelle 30:** Auswahl angereicherter Pathways im Vergleich 4

KEGG	
Pathway	adj. P-Wert
Ribosome	$1,15382 \times 10^{-29}$
DNA replication	$2,83 \times 10^{-7}$
Oxidative phosphorylation	$2,64 \times 10^{-6}$
WikiPathways	
Translation Factors	$5,11 \times 10^{-7}$
DNA Replication	$2,27 \times 10^{-5}$
Oxidative phosphorylation	$9,55 \times 10^{-5}$
Reactome	
Dectin-1 mediated noncanonical NF- $\kappa$ B signaling	$1,85 \times 10^{-6}$
Activation of NF- $\kappa$ B in B cells	$5,33 \times 10^{-5}$
TNFR2 non-canonical NF- $\kappa$ B pathway	$5,34 \times 10^{-4}$
Regulation of RAS by GAPs	$1,77 \times 10^{-3}$
Downstream TCR signaling	$1,96 \times 10^{-3}$
Antigen processing: Ubiquitination & Proteasome degradation	$2,30 \times 10^{-3}$

Cross-presentation of soluble exogenous antigens (endosomes)	$2,81 \times 10^{-3}$
MAPK6/MAPK4 signaling	$3,50 \times 10^{-3}$
TNFs bind their physiological receptors	$2,64 \times 10^{-2}$
FCERI mediated NF- $\kappa$ B activation	$3,59 \times 10^{-2}$
<b>GO-Cellular Component</b>	
immunoglobulin complex circulating	$5,88 \times 10^{-5}$
immunoglobulin complex	$4,61 \times 10^{-3}$
DNA repair complex	$4,70 \times 10^{-2}$
<b>GO-Molecular Function</b>	
structural constituent of ribosome	$9,50 \times 10^{-31}$
translation factor activity RNA binding	$3,51 \times 10^{-9}$
<b>GO-Biological Process</b>	
ribosome biogenesis	$1,42 \times 10^{-31}$
signal transduction involved in cell cycle checkpoint	$8,49 \times 10^{-5}$
oxidative phosphorylation	$4,98 \times 10^{-4}$
DNA damage response signal transduction by p53 class mediator resulting in cell cycle arrest	$1,10 \times 10^{-3}$
NIK NF- $\kappa$ B signaling	$3,32 \times 10^{-3}$
positive regulation of cell cycle arrest	$1,27 \times 10^{-2}$
regulation of response to DNA damage stimulus	$4,29 \times 10^{-2}$

#### 4.7.5 Natural killer cell mediated cytotoxicity Pathway

Der Pathway "natural killer cell mediated cytotoxicity" der KEGG-Datenbank beinhaltet sowohl die in Abschnitt 2.2.2 erläuterten Kaskaden der aktivierenden und inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren generell als auch die der ADCC im Speziellen <sup>47</sup>.

Mittels GSEA konnte nachgewiesen werden, dass dieser Pathway bei passiven und aktivierten NK-Zellen nach Vitamin D-Supplementation (Vergleichen 1 und 2) für sich betrachtet angereichert wird. Bei diesen beiden Vergleichen jedoch nicht signifikant.

Bei den Vergleichen 3 und 4 (aktivierte versus passive NK-Zellen jeweils vor beziehungsweise nach Vitamin D-Supplementation) zeigte sich dieser Pathway hingegen abgeschwächt (depleted), wiederum nicht signifikant.

## 5 Diskussion

### 5.1 Bewertung der Methoden

Die geringe Anzahl von nur zehn Probanden stellt sicherlich eine Einschränkung der vorliegenden Arbeit dar. Diese ist jedoch auch den Kosten der RNA-seq geschuldet. In der Literatur fällt bei bisherigen Transkriptomanalysen mittels RNA-seq deshalb immer wieder eine ebenso kleine Probandenzahl auf.

Die geschlechtsspezifische Analyse in der zuvor wiederholt zitierten Studie von Bittenbring et al. <sup>6</sup> ergab, dass nur Patientinnen bei einem erhöhten Vitamin D-Serumspiegel von einer Rituximab-Therapie profitierten, sprich ein vermeintlich besseres ADCC-Potential entwickelten. Männliche Probanden unter sonst gleichen medizinischen Rahmenbedingungen (Vitamin D-Spiegel) dagegen nicht. Es wurde daher in der vorliegenden Arbeit bei der Auswahl der Probanden auf ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis geachtet, um geschlechtsspezifische Veränderungen in der Genexpressionanalyse, vor allem nach Vitamin D-Supplementation, zu vermeiden. Eine geschlechtsspezifische Auswertung der Genexpressionsdaten in den vier angestellten Vergleichen im Rahmen dieser Studie hätte jedoch bei der, nach Auftrennung der Geschlechter noch geringen Anzahl von jeweils nur fünf Probandinnen und Probanden, keine statistisch belastbaren Ergebnisse ergeben, deshalb wurde darauf verzichtet.

Das durchschnittliche Alter der Probanden von 63,4 Jahren entspricht in etwa dem Durchschnittsalter der Probanden anderer Studien, die ebenfalls den Einfluss von Vitamin D auf die zytotoxischen NK-Zell-Aktivität untersucht haben <sup>6, 7</sup>. Darüber hinaus entspricht es in etwa auch dem mittleren Alter der Patienten mit B-Zell-Neoplasien unter Antikörpertherapie. Im Vergleich zu anderen Transkriptomanalysen, die den Einfluss einer Vitamin D-Supplementation auf periphere mononukleäre Zellen und somit einem Gemisch aus Immunzellen untersuchten (siehe 5.3.2), nutzten wir mit den NK-Zellen einen einzelnen Zelltyp.

Die Qualität der verwendeten Methoden wurde bei vielen der einzelnen Analyseschritte kontrolliert. So wurde bereits die Qualität und Menge der RNA, die anschließend zur Sequenzierung verwendet wurde, durch RNA-Gelelektrophorese und Spektrometrie überprüft. Die durch die RNA-seq entstanden Reads wurden auf ihre Güte hin mittels Phred Score kontrolliert. Und auch die Qualität des Read-Mappings wurde unter verschiedenen Aspekten überprüft. Insgesamt erwies sich die Qualität der Ergebnisse hinsichtlich der einzelnen Arbeitsschritte als sehr gut. In der Hauptkomponentenanalyse musste jedoch eine Probe (Identifikationsnummer 10a\_57) als Ausreißer identifiziert werden. Weshalb diese Probe aus der Gesamtverteilung herausfiel, konnte nicht eruiert werden. Sie wurde, wie es bei RNA-seq-Analysen empfohlen wird, von den weiteren Analyseschritten ausgeschlossen.

Vor- und Nachteil der RNA-seq zugleich ist die riesige Datenmenge, die sie generiert. Unzählige differentiell exprimierte Gene wurden bei unseren Analysen identifiziert. Viele dieser Gene haben nach heutigem Wissenstand allerdings keinerlei Relevanz für die biologische Funktion einer Zelle.

Jedoch machen nicht die einzelnen differentiell exprimierten Gene die Funktion einer Zelle aus, sondern das Zusammenspiel vieler Gene, die innerhalb einer Zelle unter verschiedenen Bedingungen aktiv sind. Deshalb ist die Pathway Analyse für die Transkriptomik bedeutsamer als die Betrachtung einzelner Gene. Ein Problem der Pathway Analyse in vielen Studien wiederum ist, dass oft nur eine einzige Datenbank genutzt wird, die durch die Präferenzen und den bisherigen Erfahrungen der Untersucher ausgewählt wurde. Die Datenbanken unterscheiden sich jedoch erheblich in ihren Pathways und deshalb auch die daraus gewonnenen Ergebnisse <sup>45</sup>. Aufgrund dessen wurden in der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse mehrerer Datenbanken berücksichtigt und dadurch die Signifikanz der Resultate erhöht.

## 5.2 Vergleich zu Microarray-Analysen

Mit Hilfe von Microarray-Analysen wurde bereits der Einfluss von Vitamin D auf die Genexpression von Leukozyten und NK-Zellen analysiert <sup>13, 29</sup>.

Bei Leukozyten konnten Hossein-nezhad et al. nachweisen, dass eine Verbesserung des Vitamin D-Spiegels die Expression von Genen, die mit einer Vielzahl von biologischen Funktionen verbunden sind, signifikant beeinflusst <sup>29</sup>. Dabei wurde mittels Microarray-Analyse in einer randomisierten doppelblinden Studie bei acht gesunden Erwachsenen die Wirkung des Vitamin D-Status und der anschließenden Vitamin D-Supplementation mit 400 IE (n = 3) oder 2000 IE (n = 5) Vitamin D täglich über zwei Monate auf die Genexpression weißer Blutkörperchen untersucht. Schon zu Studienbeginn zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Expression von 66 Genen zwischen Probanden mit einem Vitamin D-Mangel (Vitamin D-Serumspiegel < 20 ng/ml) und Probanden mit einem Vitamin D-Serumspiegel > 20 ng/ml. Nach Nahrungsergänzung mit Vitamin D war die Genexpression dieser 66 Gene für beide Gruppen ähnlich. Zudem konnte nach suffizienter Supplementierung eine Veränderung der Genexpression von 291 Genen nachgewiesen werden, davon war die Expression von 82 Genen herunter- und von 209 Genen hochreguliert <sup>29</sup>.

Auch bei ruhenden, nicht mit Target-Zellen in Kontakt gebrachten, NK-Zellen wurde mit einer Microarray-Analyse der Einfluss einer Vitamin D-Supplementierung auf die Genexpression untersucht. Es zeigte sich, dass die signifikantesten überexprimierten Gene IFN- $\alpha$ -Subtypen sowie IFN- $\kappa$  sind <sup>13</sup>.

Die Microarray-Technologie basiert auf Hybridisierung mit vorselektierten Oligonukleotidproben und beschränkt sich auf die an die Array-Objektträger gebundenen Transkripte<sup>40, 48</sup>. Dadurch sind Microarrays darauf begrenzt, nur die Gene zu detektieren für die Sonden entworfen wurden. Somit sind sie nur so gut, wie die bereits bestehenden bioinformatischen Daten zum Genom des Modellorganismus<sup>40, 78</sup>.

Die Methode weist durch die Hybridisierungstechnik noch mehr Limitationen auf. So reduziert die Hintergrundhybridisierung die Genauigkeit von Expressionsmessungen, insbesondere für Transkripte, die in geringer Häufigkeit vorhanden sind. Es kann nicht zwischen keiner und niedriger Expression unterschieden werden<sup>78</sup>.

Für eine quantitativ genauere Messung und um eine absolute Transkripthäufigkeit zu erhalten, hat sich die RNA-seq zur bevorzugten Technik entwickelt<sup>40</sup>. Sie ist durch die direkte Sequenzierung von Transkripten nicht von einer vorherigen Auswahl von Sonden abhängig und leidet nicht an einer Verzerrung durch die Hintergrundhybridisierung<sup>78</sup>. Die RNA-Expressionsniveaus werden mit RNA-seq genauer bestimmt als mit Microarray. Mittels RNA-seq kann somit eine höhere Auflösung von differentiell exprimierten Genen erreicht werden<sup>40, 76</sup>. Aus diesen Gründen wurde die Microarray-Analyse in den letzten Jahren weitestgehend durch die RNA-Sequenzierung ersetzt<sup>48</sup>. Jedoch ist die RNA-seq deutlich teurer als der Mikroarray, zudem ist die Datenspeicherung und Analyse der riesigen entstehenden Datenmengen komplexer<sup>78</sup>. Abschließend muss gesagt werden, dass Ergebnisse von Microarray-basierten Genexpressionanalysen nur unter Vorbehalt mit den Ergebnissen von Analysen mittels RNA-Sequenzierung verglichen werden können, da die RNA-seq die deutlich genauere Methode darstellt.

## 5.3 Einordnung der Ergebnisse

### 5.3.1 Vitamin D-Supplementation und der Einfluss auf die ADCC

Ein niedriger Vitamin D-Serumspiegel ist bei Tumorerkrankungen mit einem schlechteren Therapieansprechen, einem kürzeren Gesamtüberleben sowie einem kürzeren rezidivfreien Überleben verbunden<sup>37</sup>. Es wird angenommen, dass fast 30.000 Krebstodesfälle pro Jahr durch eine Vitamin D-Supplementation kostensparend verhindert werden könnten<sup>50</sup>. Vitamin D spielt sowohl bei der angeborenen als auch der adaptiven Immunabwehr eine entscheidende Rolle<sup>3</sup>. So beeinflusst der Vitamin D-Serumspiegel die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität von NK-Zellen<sup>6</sup>. Natürliche Killerzellen sind ein zentraler Bestandteil des Immunsystems und an der frühen Abwehr von Virusinfektionen und entarteten Zellen beteiligt<sup>44</sup>. Die ADCC der NK-Zellen stellt dafür einen wesentlichen Mechanismus dar, dieser wird unter anderem von monoklonalen Antikörpern, die heute in der Tumorthherapie vielfältig eingesetzt werden, genutzt<sup>60</sup>.

Der Einfluss von Vitamin D auf NK-Zellen, insbesondere auf die ADCC, ist deshalb für uns von großem Interesse, jedoch ist die Datenlage bis dato noch eher spärlich. Darüber hinaus ist der Einfluss einer in vivo Vitamin D-Supplementation auf die Genexpression der NK-Zellen bisher weitgehend unerforscht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die bereits von Bittenbring et al.<sup>6</sup> nachgewiesene Abhängigkeit der ADCC-Aktivität vom Vitamin D-Serumspiegel.

Die ADCC, gemessen als relative Lyse der Target-Zellen, stieg in der vorliegenden Arbeit nach in vivo Vitamin D-Supplementation und dem Erreichen mittlerer- bis hoch-normaler Vitamin D-Serumwerte bei allen Probanden an. Ein signifikanter Anstieg der ADCC konnte bei insgesamt acht von zehn Probanden nachgewiesen werden. Wie auch bei Neumann et al.<sup>49</sup> war ein signifikanter Anstieg der ADCC vor allem bei den weiblichen Probanden zu beobachten.

Die in vivo Supplementation von Vitamin D erfolgte dabei mit Hilfe eines modifizierten Schemas nach von Groning<sup>71</sup>. Dadurch konnte zielsicher und innerhalb weniger Tage der Vitamin D-Serumspiegel der zehn Probanden in einen suffizienten Bereich (25-Hydroxyvitamin-D-Spiegel ca. 65 ng/ml) angehoben werden. Nach Ergebnissen einer vorausgegangenen experimentellen Arbeit wird bei einem Vitamin D-Serumwert von 65 ng/ml eine maximale ADCC-Aktivität gemessen<sup>49</sup>. Dieser Zielspiegel wurde in unserer Arbeit nach Vitamin D-Supplementation erreicht, mit einem mittlerer Vitamin D-Serumspiegel von 71,48 ng/ml  $\pm$  9,47 ng/ml. Die Nahrungsergänzung mit Vitamin D erwies sich dabei als sicher und frei von unerwünschten Arzneimittelwirkungen.

Das Erreichen mittlerer- bis hoch-normaler Vitamin D-Serumwerte erhöht die ADCC-Aktivität und steigert dementsprechend die durch NK-Zellen vermittelte Abwehr gegenüber entarteten Zellen. Über die Steigerung der ADCC kann die Nahrungsergänzung mit Vitamin D auch zur Wirkungsverstärkung von Immuntherapien führen.

Um die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen zu messen, wurden in der vorliegenden Arbeit wie auch bei Bittenbring et al. NK-Zellen mit einer CD20-positiven Tumorzelllinie und dem CD20-Antikörper Rituximab in Kontakt gebracht. Bochen et al. konnten darüber hinaus nachweisen, dass eine Vitamin D-Supplementation zu einem signifikanten Anstieg der zytotoxischen NK-Zell-Aktivität gegenüber einer HNSCC-Zelllinie sogar unabhängig von der Zugabe eines Immuntherapeutikums führt<sup>7</sup>.

Eine Vitamin D-Supplementation kann somit die Prognose von Tumorerkrankungen maßgeblich verbessern und dies praktikabel und kostengünstig. Zudem sicher und zumeist ohne das Auftreten von Nebenwirkungen.



### 5.3.2 Genexpressionsanalyse

Um die grundlegenden Mechanismen der gesteigerten NK-Zell-Aktivität nach Vitamin D-Supplementation auf Gen-Ebene zu untersuchen, führten wir mittels RNA-seq eine Genexpressionsanalyse durch.

Ziel der Genexpressionsanalysen ist es, die sich ändernden Expressionsniveaus des Transkriptoms unter verschiedenen Bedingungen zu quantifizieren <sup>76</sup>. RNA-seq ist gegenwärtig die am häufigsten genutzte Methode, die zur Analyse der differentiellen Genexpression verwendet wird <sup>64</sup>. Sie hat die früheren Technologien der Transkriptomik wie zum Beispiel Microarray abgelöst <sup>62</sup>.

Diese Arbeit konnte sowohl bei passiven als auch bei aktivierten NK-Zellen nach im Vergleich zu vor in vivo Vitamin D-Supplementation (Vergleich 1 und 2) Veränderungen im Transkriptom nachweisen. Wie zu erwarten, waren Veränderungen der Genexpression vor allem bei aktivierten NK-Zellen zu beobachten.

Auch bei den Vergleichen aktivierter versus passiver NK-Zellen jeweils vor als auch nach Vitamin D-Supplementation (Vergleich 3 und 4) zeigten sich zahlreiche Gene differentiell exprimiert. Wobei bei diesen beiden Vergleichen viele der hoch- und runterregulierten Gene unabhängig vom Vitamin D-Status übereinstimmen und somit auf die Aktivierung der NK-Zellen zurückzuführen sind.

Für die NK-Zell-Funktion wichtige Gene zeigten bei keinem der vier angestellten Vergleiche (siehe 4.6.4) ein definiertes Muster beziehungsweise eine bestimmte Richtung. So waren zum Beispiel einige eigentlich inhibierende Rezeptoren sowohl bei NK-Zellen ohne (passiv) als auch nach Target-Kontakt (aktiviert) vor Vitamin D-Supplementation schwächer exprimiert als nach Supplementation. Umgekehrt zeigten sich einige aktivierende Rezeptoren passiver wie auch aktivierter NK-Zellen nach Supplementation herunterreguliert im Vergleich zu niedrigen Vitamin D-Serumspiegeln. Beides sind Resultate, die aufgrund der in vitro gemessenen ADCC-Aktivität so zunächst nicht zu erwarten waren.

Gene, deren Transkripte wesentlich am Vitamin D-Stoffwechsel beteiligt sind, wie *VDR* und *CYP27B1*, sind bei passiven wie auch bei aktivierten NK-Zellen nach Vitamin D-Supplementation (Vergleich 1 und 2) hochreguliert, wenn auch nicht immer streng signifikant. Dies belegt die Qualität der hier angewandten Genexpressionsanalyse, da diese Gene nach Vitamin D-Gabe hochreguliert sein müssen. Aber auch beim Vergleich aktivierter versus passiver NK-Zellen vor Vitamin D-Supplementation (Vergleich 3), sind *VDR* und *CYP27B1* hochreguliert. Dies bedeutet, dass allein die Aktivierung der NK-Zellen an den Target-Zellen zu einer Steigerung der Expression von Genen führt, die am Vitamin D-Stoffwechsel beteiligt sind. Es ist bereits bekannt, dass auch andere

Transkriptionsfaktoren die Aktivität des Vitamin D-Rezeptors beeinflussen und zum Beispiel Monozyten, die durch mykobakterielle Lipopeptide aktiviert wurden, CYP27B1 exprimieren <sup>5</sup>.

Mittels GSEA stellte sich heraus, dass zentrale Pathways der Immunabwehr und der Signaltransduktion bei den verschiedenen Vergleichen angereichert werden. Eine ausführliche Bewertung der Vergleiche wird in Kapitel 5.4 dargelegt.

Neme et al. untersuchten mithilfe der RNA-seq bereits bei peripheren mononukleären Zellen (PBMC) den Effekt einer in vivo Vitamin D-Supplementation. Die Supplementation erfolgte bei fünf Probanden als Vitamin D-Bolusgabe (einmalig 2.000 µg) und fiel somit deutlich geringer aus als die Supplementation in unserer Arbeit. Neme et al. konnten nachweisen, dass 702 Gene der mononukleären Zellen signifikant von der Vitamin D-Supplementation beeinflusst werden, davon wurden 501 Gene hoch- und 201 Gene herunterreguliert. Mittels Pathway Analyse konnte dabei gezeigt werden, dass der "Ribosome-Pathway" (KEGG Datenbank) der am signifikantesten angereicherte biologische Pfad nach Vitamin D-Bolusgabe darstellt. Die GSEA legt nahe, dass die Vitamin D-Supplementation zu einer allgemeinen Steigerung der ribosomalen Aktivität und der Proteintranslation führt <sup>48</sup>.

Der Einfluss einer längerfristigen in vivo Vitamin D-Supplementation auf die Genexpression von PBMCs wurde mittels Microarray bei 30 gesunden Probanden, die einen Vitamin D-Mangel beziehungsweise eine Vitamin D-Insuffizienz aufwiesen, analysiert. Dabei erhielten die Probanden entweder 600, 4.000 oder 10.000 IE Vitamin D am Tag für sechs Monate. Es zeigte sich eine dosisabhängige Änderung der Genexpression mit 162, 320 beziehungsweise 1.289 veränderten Genen <sup>62</sup>.

Nach aktuellem Kenntnisstand wurde noch keine Transkriptomanalyse mittels RNA-seq bei NK-Zellen in Abhängigkeit des Vitamin D-Spiegels durchgeführt. Es wurde jedoch bereits mit Hilfe der Microarray-Technologie der Einfluss von Vitamin D auf die Genexpression von nicht aktivierten NK-Zellen untersucht <sup>13</sup>.

## 5.4 Bewertung der einzelnen Vergleiche

### 5.4.1 Passive NK-Zellen nach versus vor Vitamin D-Supplementation – Vergleich 1

Bei passiven NK-Zellen ist von einer geringen Aktivität auch auf Ebene der Gene auszugehen, da sie noch keinen Kontakt mit einer Target-Zelle hatten und somit biologisch ruhenden Zellen entsprechen. Es erstaunt somit nicht, dass bei diesem Vergleich nach der Vitamin D-Supplementation lediglich sechs Gene signifikant differentiell exprimiert werden.

Nach heutigem Kenntnisstand spielen diese veränderten Gene weder eine Rolle innerhalb des Vitamin D-Stoffwechsels noch bei der biologischen Funktion der NK-Zelle.

Jedoch konnten bei diesem Vergleich mittels GSEA in den verschiedenen Datenbanken viele Pathways nachgewiesen werden, die bei der Immunabwehr von Bedeutung sind. So sind bei passiven NK-Zellen nach der Supplementation mit Vitamin D unter anderem die Pathways “Cytokine-cytokine receptor interaction“ (KEGG), “Downstream TCR signaling“ (Reactome), “innate immune response-activating cell surface receptor signaling pathway“, “positive regulation of inflammatory response“ und “fever generation“ (GO-Biological process) signifikant angereichert.

Auch der Pathway “natural killer cell mediated cytotoxicity“ (KEGG), der unter anderem auch Komponenten der ADCC beinhaltet, ist stärker ausgeprägt, wenn gleich nicht signifikant.

Dies macht deutlich, dass selbst passive NK-Zellen nach einer Vitamin D-Supplementation über die Anreicherung solcher Pathways eine erhöhte Abwehrfunktion entwickeln können.

#### 5.4.2 Aktivierte NK-Zellen nach versus vor Vitamin D-Supplementation – Vergleich 2

Bei Vergleich 2 sind nach Erreichen mittel-normaler Vitamin D-Serumspiegel bei aktivierten NK-Zellen insgesamt 307 Gene signifikant differentiell exprimiert, davon 84 Gene hochreguliert und 223 Gene signifikant herunterreguliert. Auch wenn keines der veränderten Gene augenscheinlich bedeutsam für die eigentliche Abwehrfunktion der NK-Zellen ist, zeigt es doch den Einfluss der Vitamin D-Supplementation auf das Transkriptom aktivierter NK-Zellen.

Mittels GSEA konnten viele angereichert Pathways identifiziert werden, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, wie zum Beispiel der “Jak-STAT signaling pathway“ und “TNF signaling pathway“ (KEGG). Der “Jak-STAT signaling“ Pathway ist ein wichtiger Signalweg für eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren <sup>31</sup>. Demnach reguliert Vitamin D mutmaßlich vor allem die zellulären Signalkaskaden und dadurch die Abwehrfunktion aktivierter NK-Zellen hoch.

Bei diesem Vergleich ist außerdem der Pathway “Control of Gene Expression by Vitamin D Receptor“ (BioCarta) signifikant angereichert. Somit konnte nachgewiesen werden, dass auf Gen-Ebene der intrazelluläre Vitamin D-Rezeptor über die Supplementation von Vitamin D bei NK-Zellen hochreguliert wird und dadurch Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose beeinflusst werden können. Auch ist, wie bei Vergleich 1, der “natural killer cell mediated cytotoxicity“ Pathway der KEGG-Datenbank verstärkt exprimiert, allerdings wiederum nicht signifikant.

Herausragend ist, dass bei Vergleich 1 und 2 und somit sowohl bei passiven als auch bei aktivierten NK-Zellen nach Vitamin D-Supplementation der “Cytokine-cytokine receptor interaction“ Pathway (KEGG) signifikant stärker exprimiert wird. Dieser Pathway ist

entscheidend für die intrazelluläre Regulation von Zellen, die sowohl an der angeborenen als auch der adaptiven Immunabwehr beteiligt sind<sup>17</sup>.

Auch bei peripheren mononukleären Zellen konnten Hanel et al. mittels GSEA eine Anreicherung des "Cytokine-cytokine receptor interaction" Pathways nach ex vivo Vitamin D-Supplementation nachweisen. In dieser Studie wurden isolierte PBMCs von fünf gesunden Personen mit verschiedenen Vitamin D-Konzentrationen und Formulierungen (1000 nmol/l 25-Hydroxyvitamin-D, 10.000 nmol/l 25-Hydroxyvitamin-D und 10 nM Calcitriol) in vitro für 24 h stimuliert<sup>24</sup>.

All diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass nach Erreichen mittel-normaler Vitamin D-Serumspiegel NK-Zellen vor allem über die Steigerung der Signaltransduktion effektiver arbeiten.

#### 5.4.3 Vergleich 3 und Vergleich 4

Bei diesen beiden Vergleichen wurden die NK-Zellen der Probanden durch den Kontakt mit Target-Zellen und Antikörpern aktiviert und mit passiven NK-Zellen jeweils vor und nach Vitamin D-Supplementation verglichen.

Es muss davon ausgegangen werden, dass viele Gene alleine durch Aktivierung der NK-Zellen an ihren Target-Zellen und unabhängig von der Vitamin D-Supplementation differenziell exprimiert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass sich bei Vergleich 3 und 4 viele der hoch- und herunterregulierten Gene unabhängig vom Vitamin D-Spiegel gleichen und somit die differenzielle Genexpression auf die Aktivierung der NK-Zellen zurückzuführen ist. 2.440 Gene weisen jedoch eine signifikante Änderung der Expression nach Aktivierung der NK-Zellen nur nach Vitamin D-Supplementation auf. Diese Gene könnten von besonderem Interesse sein. Aufgrund der großen Anzahl ist deren Differenzierung in weiteren Untersuchungen in einer gesonderten wissenschaftlichen Arbeit notwendig.

Fußend aus den Ergebnissen der differenziellen Genexpression stimmen bei beiden Vergleichen auch viele der angereicherten biologischen Pfade überein und sind folglich ebenfalls durch die Aktivierung induziert. Aber auch bei der GSEA wird deutlich, dass nach Vitamin D-Supplementation bei Vergleich 4 nochmals mehr Pathways verstärkt angereichert werden als bei Vergleich 3 vor Supplementation (480 vs. 257 Pathways). Auch hier gilt es in einer anschließenden Arbeit die unterschiedlich angereicherten biologischen Pfade zu analysieren und in einen biologischen Kontext zu setzen. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sprechen für einen kumulativen Effekt bei NK-Zellen aus einer Target-induzierten differenziellen Genexpression verstärkt und ergänzt durch Vitamin D.

## 5.5 Ausblick

Aufgrund der Ergebnisse von Neumann et al. <sup>49</sup> und Bittenbring et al. <sup>6</sup>, die nun unterstützt werden durch die Resultate der hier vorliegenden Arbeit, wird in der OPTIMAL>60-Studie bei Patienten mit aggressivem B-Zell-Lymphom im Alter von 61 bis 80 Jahren der Stellenwert einer Vitamin D-Supplementation als sekundärer Endpunkt untersucht. Die Ergebnisse dieser großen klinischen Studie sind zum jetzigen Zeitpunkt noch ausstehend.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit insbesondere die Pathway Analysen können die Grundlage für weitere (in vitro) Untersuchungen mit NK-Zellen sein, um die molekularen Mechanismen zwischen Vitamin D und der NK-Zellen-vermittelten ADCC zu untersuchen.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Erläuterung</b>
ADCC	engl. antibody-dependent cellular cytotoxicity; antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
BH	Benjamini-Hochberg
CD	engl. cluster of differentiation; immunphänotypische Merkmale auf Zelloberflächen
cDNA	komplementäre DNA
CHOP	Chemotherapie-Protokoll bestehend aus Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
DBP	Vitamin D-bindendes Protein
DC	engl. dendritic cell; dendritische Zelle
DGE	differentiellen Genexpression
DLBCL	engl diffuse large B-cell lymphoma; diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DNA	engl. deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
EFS	engl. event-free survival; Ereignis-freies Überleben
FC	engl. fold change
FDR	Falscherkennungsrate
GSEA	engl. gene set enrichment analysis; Genmengen Anreicherungsanalyse
hg	engl. human reference genome
HNSCC	engl. head and neck squamous cell carcinoma; Kopf-Hals-Karzinom
ID	Identifikationsnummer
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IPI	internationaler prognostischer Index
ITAM	engl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif; intrazelluläres Aktivierungsmotiv
KEGG	engl. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Datenbank für Stoffwechselwege und Gene u.a
KIR	engl. killer cell immunoglobulin-like receptor
LDH	Laktatdehydrogenase
LFC	logarithmischer fold change
mAb	engl. monoclonal antibodies; Monoklonaler Antikörper
MACS	magnetisch aktivierte Zellsortierung
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MHC	engl. major histocompatibility complex; Haupthistokompatibilitätskomplexes
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid; Boten-RNA
NCR	natürlicher zytotoxischer Rezeptor
NK-Zelle	natürliche Killerzelle

NGS	engl. next generation sequencing; Sequenzierung der nächsten Generation
OS	engl. overall survival; Gesamtüberleben
PAMP	pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBMC	engl. peripheral blood mononuclear cell; periphere mononukleäre Zelle
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PC	engl. principal component; Hauptkomponente
PCA	engl. principal component analysis; Hauptkomponentenanalyse
PCR	engl. polymerase chain reaction Polymerase-Kettenreaktion
PFS	engl. progression-free survival; progressionsfreies Überleben
PTH	Parathormon
R-CHOP	Immunochemotherapie bestehend aus Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison
RNA	englisch ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
RNA-seq	RNA-Sequenzierung
RMCC	Rituximab-vermittelte zelluläre Zytotoxizität
rRNA	Ribosomale RNA
RXR	Retinoid X-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
UV	Ultraviolett
VDR	Vitamin D-Rezeptor

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung des Vitamin D-Stoffwechsels.	12
<b>Abbildung 2:</b> Workflow der bioinformatischen Auswertung.	41
<b>Abbildung 3:</b> Probengruppen und Vergleiche für die differentielle Genexpression.	44
<b>Abbildung 4:</b> Alter der Probanden.	45
<b>Abbildung 5:</b> Vitamin D-Spiegel vor und nach Vitamin D-Supplementation getrennt dargestellt für weibliche und männliche Probanden.	47
<b>Abbildung 6:</b> ADCC-Aktivität der NK-Zellen aller Probanden vor und nach Vitamin D-Supplementation.	48
<b>Abbildung 7:</b> ADCC-Aktivität der NK-Zellen der fünf Probandinnen vor und nach Supplementation mit Vitamin D.	49
<b>Abbildung 8:</b> ADCC-Aktivität der NK-Zellen der fünf Probanden vor und nach Supplementation mit Vitamin D.	49
<b>Abbildung 9:</b> Qualitätskontrolle der Reads.	51
<b>Abbildung 10:</b> Anzahl der detektierten Gene pro Probe.	52
<b>Abbildung 11:</b> Gesamtzahl der gelesenen Reads pro Probe.	53
<b>Abbildung 12:</b> Mapping-Rate	54
<b>Abbildung 13:</b> Exon Mapping-Rate	55
<b>Abbildung 14:</b> rRNA Mapping-Rate	56
<b>Abbildung 15:</b> Hauptkomponentenanalyse	57
<b>Abbildung 16:</b> Hauptkomponentenanalyse Aufteilung in vor und nach Supplementation.	58
<b>Abbildung 17:</b> Volcano Plot der DGE - Vergleich 1.	59
<b>Abbildung 18:</b> Volcano Plot der DGE - Vergleich 2.	61
<b>Abbildung 19:</b> Volcano Plot der DGE - Vergleich 3.	63
<b>Abbildung 20:</b> Volcano Plot DEG - Vergleich 4.	65
<b>Abbildung 21:</b> Schnittmenge der unter Vitamin D differentiell exprimierten Gene in den Vergleichen 1 und 2.	67
<b>Abbildung 22:</b> Schnittmenge der unter Vitamin D differentiell exprimierten Gene in den Vergleichen 3 und 4.	67



### 6.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> In der Arbeit eingesetzte Chemikalien, Lösungen, Medien und Puffer	30
<b>Tabelle 2:</b> In der Arbeit eingesetzte Antikörper	31
<b>Tabelle 3:</b> In der Arbeit verwendete Verbrauchsgegenstände	31
<b>Tabelle 4:</b> In der Arbeit eingesetzte Geräte	32
<b>Tabelle 5:</b> Übersicht der Proben und deren IDs	43
<b>Tabelle 6:</b> Charakteristika der Probanden	45
<b>Tabelle 7:</b> Vitamin D-Spiegel vor und nach Supplementation	46
<b>Tabelle 8:</b> ADCC-Aktivität in Abhängigkeit des Vitamin D-Spiegels und der Patientencharakteristika	48
<b>Tabelle 9:</b> RNA-Ausbeute	50
<b>Tabelle 10:</b> Nach Vitamin D-Supplementation hochregulierte Gene bei Vergleich 1	60
<b>Tabelle 11:</b> Nach Vitamin D-Supplementation herunterregulierte Gene bei Vergleich 1	60
<b>Tabelle 12:</b> Die 15 am signifikantesten hochregulierten Gene bei Vergleich 2	62
<b>Tabelle 13:</b> Die 15 am signifikantesten herunterregulierten Gene bei Vergleich 2	62
<b>Tabelle 14:</b> Die 15 am signifikantesten hochregulierten Gene bei Vergleich 3	64
<b>Tabelle 15:</b> Die 15 am signifikantesten herunterregulierten Gene bei Vergleich 3	64
<b>Tabelle 16:</b> Die 15 am signifikantesten hochregulierten Gene bei Vergleich 4	66
<b>Tabelle 17:</b> Die 15 am signifikantesten herunterregulierten Gene bei Vergleich 4	66
<b>Tabelle 18:</b> Auswahl hochregulierter Gene bei Vergleich 1	68
<b>Tabelle 19:</b> Auswahl herunterregulierter Gene bei Vergleich 1	68
<b>Tabelle 20:</b> Auswahl hochregulierter Gene bei Vergleich 2	68
<b>Tabelle 21:</b> Auswahl herunterregulierter Gene bei Vergleich 2	69
<b>Tabelle 22:</b> Auswahl hochregulierter Gene bei Vergleich 3	69
<b>Tabelle 23:</b> Auswahl herunterregulierter Gene bei Vergleich 3	69
<b>Tabelle 24:</b> Auswahl hochregulierter Gene bei Vergleich 4	70
<b>Tabelle 25:</b> Auswahl herunterregulierter Gene bei Vergleich 4	70
<b>Tabelle 26:</b> Anzahl signifikant angereicherter Pathways	71
<b>Tabelle 27:</b> Auswahl angereicherter Pathways bei Vergleich 1	72
<b>Tabelle 28:</b> Auswahl angereicherter Pathways bei Vergleich 2	73
<b>Tabelle 29:</b> Auswahl angereicherter Pathways bei Vergleich 3	74
<b>Tabelle 30:</b> Auswahl angereicherter Pathways im Vergleich 4	75

## 6.4 Literaturverzeichnis

- [1] Al-Jaderi Zaidoon, Maghazachi Azzam A. (2013). *Effects of vitamin D3, calcipotriol and FTY720 on the expression of surface molecules and cytolytic activities of human natural killer cells and dendritic cells*. *Toxins* 5(11): 1932–1947.
- [2] Ammann EM, Drake MT, Haraldsson B, et al. (2017). *Incidence of hematologic malignancy and cause-specific mortality in the Women's Health Initiative randomized controlled trial of calcium and vitamin D supplementation*. *Cancer* 123(21): 4168-4177.
- [3] Aranow C. (2011). *Vitamin D and the immune system*. *J Investig Med*. 59(6): 881-6.
- [4] Backes Christina, Keller Andreas, Kuentzer Jan, Kneissl Benny, Comtesse Nicole, Elnakady Yasser A. et al. (2007). *GeneTrail--advanced gene set enrichment analysis*. *Nucleic acids research* 35: W186-92.
- [5] Bikle Daniel (2009). *Nonclassic actions of vitamin D*. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94(1): 26–34.
- [6] Bittenbring Jörg Thomas, Neumann Frank, Altmann Bettina, Achenbach Marina; Reichrath Jörg, Ziepert Marita et al. (2014). *Vitamin D deficiency impairs rituximab-mediated cellular cytotoxicity and outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with but not without rituximab*. *Journal of clinical oncology* 32(29): 3242–3248.
- [7] Bochen Florian, Balensiefer Benedikt, Körner Sandrina, Bittenbring Jörg Thomas, Neumann Frank, Koch Armand et al. (2018). *Vitamin D deficiency in head and neck cancer patients - prevalence, prognostic value and impact on immune function*. *Oncoimmunology* 7(9): e1476817.
- [8] Borchmann S., Cirillo M., Goergen H., et al. (2019). *Pretreatment Vitamin D Deficiency Is Associated With Impaired Progression-Free and Overall Survival in Hodgkin Lymphoma*. *J Clin Oncol*. 37(36): 3528-3537.
- [9] Cashman Kevin D., Dowling Kirsten G., Škrabáková Zuzana, et al. (2016). *Vitamin D deficiency in Europe: pandemic?* *The American journal of clinical nutrition* 103(4): 1033–1044.
- [10] Chan FK, Moriwaki K, De Rosa MJ. (2013). *Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity*. *Methods Mol. Biol.* 979: 65-70.
- [11] Charoenngam Nipith, Shirvani Arash, Holick Michael F. (2021). *Vitamin D and Its Potential Benefit for the COVID-19 Pandemic*. *Endocrine practice: official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists* 27 (5), 484–493.

- [12] Chen Peizhan, Hu Pingting, Xie Dong, Qin Ying, Wang Fudi, Wang Hui (2010). *Meta-analysis of vitamin D, calcium and the prevention of breast cancer*. *Breast cancer research and treatment* 121(2): 469–477.
- [13] Christofyllakis Konstantinos, Neumann Frank, Stilgenbauer Stephan, Kaddu-Mulindwa Dominic, Regitz Evi et al. *Gene Set Enrichment Analysis Suggests That Increased Rituximab-Mediated NK Cell Cytotoxicity after Vitamin D Substitution Is Driven By Upregulation of Interferon Alpha (IFN- $\alpha$ ) Isoforms*. *Blood* 2018; 132 (Supplement 1), 3696.
- [14] ClinicalTrials.gov. National Library of Medicine (U.S.). *OPTIMAL>60 / DR. CHOP, Improvement of Therapy of Elderly Patients With CD20+ DLBCL Using Rituximab Optimized and Liposomal Vincristine (OPTIMAL>60)*. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01478542. URL: <https://clinicaltrials.gov/show/NCT01478542>.
- [15] Conesa Ana, Madrigal Pedro, Tarazona Sonia, Gomez-Cabrero David, Cervera Alejandra, McPherson Andrew et al. (2016). *A survey of best practices for RNA-seq data analysis*. *Genome biology* 17:13.
- [16] Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. (2001) *The biology of human natural killer-cell subsets*. *Trends Immunol.* 22(11): 633-40.
- [17] Cytokine-cytokine receptor interaction, KEGG. URL: <https://www.genome.jp/entry/map04060>
- [18] Dankers Wendy, Colin Edgar M., van Hamburg Jan Piet, Lubberts Erik (2016). *Vitamin D in Autoimmunity: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential*. *Frontiers in immunology* 7: 697.
- [19] Drake Matthew T., Maurer Matthew J., Link Brian K., et al. (2010). *Vitamin D insufficiency and prognosis in non-Hodgkin's lymphoma*. *Journal of clinical oncology* 28(27): 4191–4198.
- [19.1] Ewing B., Hillier L., Wendl MC., Green P. (1998). *Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment*. *Genome Res.* 8(3):175-85.
- [20] García-Campos Miguel A., Espinal-Enríquez Jesús, Hernández-Lemus Enrique (2015). *Pathway Analysis: State of the Art*. *Frontiers in physiology* 6:383.
- [21] Giovannucci Edward, Liu Yan, Rimm Eric B., Hollis Bruce W., Fuchs Charles S., Stampfer Meir J., Willett Walter 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.
- [22] Hammer Quirin, Rückert Timo, Romagnani Chiara (2018). *Natural killer cell specificity for viral infections*. *Nat. Immunol* 19(8): 800–808.

- [23] Han, Yixing; Gao, Shouguo; Muegge, Kathrin; Zhang, Wei; Zhou, Bing (2015). *Advanced Applications of RNA Sequencing and Challenges*. *Bioinformatics and biology insights* 9 (Suppl 1), 29–46.
- [24] Hanel Andrea; Bendik Igor; Carlberg Carsten (2021). *Transcriptome-Wide Profile of 25-Hydroxyvitamin D3 in Primary Immune Cells from Human Peripheral Blood*. *Nutrients* 13 (11), 4100.
- [25] Hohaus Stefan, Tisi Maria Chiara, Bellesi Silvia, Maiolo Elena Alma Eleonora, Tartaglia Germana et al. (2018). *Vitamin D deficiency and supplementation in patients with aggressive B-cell lymphomas treated with immunochemotherapy*. *Cancer medicine* 7(1): 270–281.
- [26] Holick Michael F. (2007). *Vitamin D deficiency*. *The New England Journal of Medicine* 357: 266–281.
- [27] Holick Michael F. (2009). *Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application*. *Annals of epidemiology* 19(2): 73–78.
- [28] Holick Michael F., Binkley Neil C., Bischoff-Ferrari Heike A., et al. (2011). *Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline*. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96(7): 1911–1930.
- [29] Hossein-nezhad Arash, Spira Avrum, Holick Michael F. (2013). *Influence of vitamin D status and vitamin D3 supplementation on genome wide expression of white blood cells: a randomized double-blind clinical trial*. *PloS one* 8 (3).
- [30] Hou Jie, Acharya Lipi, Zhu Dongxiao, Cheng Jianlin (2016). *An overview of bioinformatics methods for modeling biological pathways in yeast*. *Briefings in functional genomics* 15 (2), 95–108.
- [31] JAK-STAT signaling pathway - Homo sapiens (human); KEGG.  
URL: [https://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?hsa04630](https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?hsa04630)
- [32] Kelly Jennifer L., Salles Gilles, Goldman Bryan, Fisher Richard I., Brice Pauline, Press Oliver et al. (2015). *Low Serum Vitamin D Levels Are Associated With Inferior Survival in Follicular Lymphoma: A Prospective Evaluation in SWOG and LYSA Studies*. *Journal of clinical oncology* 33(13): 1482–1490.
- [33] Kim D., Paggi J.M., Park C. et al. (2019). *Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype*. *Nat Biotechnol* 37: 907–915.
- [34] Klein, E., et al. (1968). *Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines*. *Cancer Res* 28(7): 1300-10.

- [35] Koch Clarissa M., Chiu Stephen F.; Akbarpour Mahzad, et al. (2018): *A Beginner's Guide to Analysis of RNA Sequencing Data*. American journal of respiratory cell and molecular biology 59 (2), 145–157.
- [36] Kukurba Kimberly R., Montgomery Stephen B. (2015). *RNA Sequencing and Analysis*. Cold Spring Harbor protocols 2015(11): 951–969.
- [37] Kulling Paige M., Olson Kristine C., Olson Thomas L., Feith David J., Loughran Thomas P. (2017). *Vitamin D in hematological disorders and malignancies*. European journal of haematology 98(3): 187–197.
- [38] Love MI., Huber W., Anders S. (2014). *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. Genome Biology 15(12): 550.
- [39] Maghbooli Zhila, Mohammad Ali, Ebrahimi Mehdi, Pazoki Marzieh, Kafan Samira, Tabriz Hedieh Moradi et al. (2020). *Vitamin D sufficiency, a serum 25-hydroxyvitamin D at least 30 ng/mL reduced risk for adverse clinical outcomes in patients with COVID-19 infection*. PloS one 15 (9), e0239799.
- [40] Mantione Kirk J., Kream Richard M., Kuzelova Hana, Ptacek Radek, Raboch Jiri, Samuel Joshua M., Stefano George B. (2014). *Comparing bioinformatic gene expression profiling methods: microarray and RNA-Seq*. Medical science monitor basic research 20, 138–142.
- [41] Martineau Adrian R., Jolliffe David A., Hooper Richard L., Greenberg Lauren, Aloji John F., Bergman Peter et al. (2017). *Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data*. BMJ (Clinical research ed.) 356: i6583.
- [42] Medrano Mayte, Carrillo-Cruz Estrella, Montero Isabel, Perez-Simon Jose A. (2018). *Vitamin D: Effect on Haematopoiesis and Immune System and Clinical Applications*. International journal of molecular sciences 19(9): 2663.
- [43] Moretta A, Bottino C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. (2002). *What is a natural killer cell?* Nat Immunol. 3: 6-8.
- [44] Moretta A., Marcenaro E., Parolini S., et al. (2008). *NK cells at the interface between innate and adaptive immunity*. Cell Death Differ 15: 226–233.
- [45] Mubeen Sarah, Hoyt Charles Tapley, Gemünd André, et al. (2019). *The Impact of Pathway Database Choice on Statistical Enrichment Analysis and Predictive Modeling*. Frontiers in genetics 10: 1203.

- [46] Nadkarni, J.S., et al. (1969). *Characteristics of new cell lines derived from Burkitt lymphomas*. *Cancer* 23(1): 64-79.
- [47] Natural killer cell mediated cytotoxicity Pathway, KEGG.  
URL: [https://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?map04650](https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?map04650)
- [48] Neme Antonio, Seuter Sabine, Malinen Marjo, et al. (2019). *In vivo transcriptome changes of human white blood cells in response to vitamin D*. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 188, S. 71–76.
- [49] Neumann F., Acker F., Schormann C. et al. (2018). *Determination of optimum vitamin D3 levels for NK cell-mediated rituximab- and obinutuzumab-dependent cellular cytotoxicity*. *Cancer Immunol Immunother* 67: 1709–1718.
- [50] Niedermaier T., Gredner T., Kuznia S., Schöttker B., Mons U., Brenner H. (2021). *Vitamin D supplementation to the older adult population in Germany has the cost-saving potential of preventing almost 30 000 cancer deaths per year*. *Mol Oncol*. 2021 Aug;15(8):1986-1994.
- [51] Oshlack A., Robinson M.D., Young M.D. (2010). *From RNA-seq reads to differential expression results*. *Genome Biol* 11, 220.
- [52] Ota Kuniaki, Dambaeva Svetlana, Kim Michael Woo-II et al. (2015). *1,25-Dihydroxy-vitamin D3 regulates NK-cell cytotoxicity, cytokine secretion, and degranulation in women with recurrent pregnancy losses*. *European journal of immunology* 45(11): 3188–3199.
- [53] Patro R., Duggal G., Love M. I., Irizarry R. A., Kingsford C. (2017). *Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression*. *Nature Methods* 14(4):417-419.
- [54] Prietl Barbara, Treiber Gerlies, Pieber Thomas R., Amrein Karin (2013). *Vitamin D and immune function*. *Nutrients* 5(7): 2502–2521.
- [55] Rabenberg Martina, Scheidt-Nave Christa, Busch Markus A., Rieckmann Nina, Hintzpeter Birte, Mensink Gert B. M. (2015). *Vitamin D status among adults in Germany--results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)*. *BMC public health* 15: 641.
- [56] Radujkovic Aleksandar, Schnitzler Paul, Ho Anthony D., Dreger Peter, Luft Thomas (2017). *Low serum vitamin D levels are associated with shorter survival after first-line azacitidine treatment in patients with myelodysplastic syndrome and secondary oligoblastic acute myeloid leukemia*. *Clinical nutrition* 36(2): 542–551.
- [56.1] Rothenfusser, S., et al. (2002). *Missing HLA class I expression on Daudi cells unveils cytotoxic and proliferative responses of human gammadelta T lymphocytes*. *Cell Immunol*, 215(1): 32-44.

- [57] Sabetta James R., DePetrillo Paolo, Cipriani Ralph J., Smardin Joanne, Burns Lillian A., Landry Marie L. (2010). *Serum 25-hydroxyvitamin d and the incidence of acute viral respiratory tract infections in healthy adults*. PloS one 5 (6): e11088.
- [58] Schilling Stefan (2012). *Epidemic vitamin D deficiency among patients in an elderly care rehabilitation facility*. Deutsches Arzteblatt international 109(3): 33–38.
- [59] Schwalfenberg Gerry K. (2011). *A review of the critical role of vitamin D in the functioning of the immune system and the clinical implications of vitamin D deficiency*. Molecular nutrition & food research 55(1): 96–108.
- [60] Seidel Ursula J.E., Schlegel Patrick, Lang Peter (2013). *Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies*. Frontiers in immunology 4: 76.
- [61] Shanafelt Tait D., Drake Matthew T., Maurer Matthew J., Allmer Cristine, Rabe Kari G., Slager Susan L. et al. (2011). *Vitamin D insufficiency and prognosis in chronic lymphocytic leukemia*. Blood 117(5): 1492–1498.
- [62] Shirvani Arash, Kalajian Tyler Arek, Song Anjeli, Holick Michael F. (2019). *Disassociation of Vitamin D's Calcemic Activity and Non-calcemic Genomic Activity and Individual Responsiveness: A Randomized Controlled Double-Blind Clinical Trial*. Scientific reports 9 (1), 17685.
- [63] Smyth Mark J., Cretne Erika, Kelly Janice M., Westwood Jennifer A. Street Shayna E.A., Yagit Hideo et al. (2005). *Activation of NK cell cytotoxicity*. Molecular Immunology 42(4): 501–510.
- [64] Stark Rory, Grzelak Marta, Hadfield James (2019). *RNA sequencing: the teenage years*. Nature reviews. Genetics 20(11): 631–656.
- [65] Steinbaugh MJ, Pantano L, Kirchner RD, et al. (2018). *bcBioRNASeq: R package for bcBio RNA-seq analysis*. F1000Research 6:1976.
- [66] Stöckel Daniel, Kehl Tim, Trampert Patrick, Schneider Lara, Backes Christina, Ludwig Nicole et al. (2016). *Multi-omics enrichment analysis using the GeneTrail2 web service*. Bioinformatics (Oxford, England) 32(10): 1502–1508.
- [67] Terunuma Hiroshi, Deng Xuewen, Dewan Zahidunnabi, Fujimoto Shigeyoshi, Yamamoto Naoki (2008). *Potential role of NK cells in the induction of immune responses: implications for NK cell-based immunotherapy for cancers and viral infections*. International Reviews of Immunology 27 (3): 93–110.

- [68] Thacher Tom D., Clarke Bart L. (2011). *Vitamin D insufficiency*. Mayo Clinic proceedings 86(1): 50–60.
- [69] Trump Donald L., Deeb Kristin K., Johnson Candace S. (2010). *Vitamin D: considerations in the continued development as an agent for cancer prevention and therapy*. Cancer journal (Sudbury, Mass.) 16(1):1-9.
- [70] Subramanian Aravind, Tamayo Pablo, Mootha Vamsi K. et al. (2005). *Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(43): 15545–15550.
- [71] van Groningen Lenneke, Opdenoordt Susanne, van Sorge Adrian, Telting Darryl, Giesen Astrid, Boer Hans (2010). *Cholecalciferol loading dose guideline for vitamin D-deficient adults*. European journal of endocrinology 162 (4): 805–811.
- [72] Vivier Eric, Raulet David H., Moretta Alessandro, et al. (2011). *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells*. Science 331(6013): 44–49.
- [73] Yin L., Grandi N., Raum E., Haug U., Arndt V., Brenner H. (2009). *Meta-analysis: longitudinal studies of serum vitamin D and colorectal cancer risk*. Alimentary pharmacology & therapeutics 30(2): 113–125.
- [74] Wacker Matthias, Holick Michael F. (2013). *Vitamin D - effects on skeletal and extraskkeletal health and the need for supplementation*. Nutrients 5(1): 111–148.
- [75] Wang Wei, Erbe Amy K., Hank Jacquelyn A., Morris Zachary S., Sonde Paul M. (2015). *NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy*. Frontiers in immunology 6: 368.
- [76] Wang Zhong, Gerstein Mark, Snyder Michael (2009). *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics*. Nature reviews. Genetics 10(1): 57–63.
- [77] Weeres Matthew A., Robien Kim, Ahn Yong-Oon, Neulen Marie-Luise, Bergerson Rachel, Miller Jeffery S., Verneris Michael R. (2014). *The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on in vitro human NK cell development from hematopoietic stem cells*. Journal of immunology 193 (7): 3456–3462.
- [78] Zhao Shanrong, Fung-Leung Wai-Ping, Bittner Anton, Ngo Karen, Liu Xuejun (2014). *Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells*. PloS one 9 (1).



## 6.5 Danksagung

In ehrenvoller Erinnerung möchte ich Herrn Prof. Dr. Michael Pfreundschuh danken. Er gab mir wenige Monate vor seinem Tod die Möglichkeit diese Arbeit durchzuführen. Seine Art war prägend für meinen beruflichen Werdegang.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. Frank Neumann. Ihm gilt für all seine Unterstützung, seine fortwährende Hilfe und seine Geduld mein aller größter Dank.

Prof. Dr. Lorenz Thurner danke ich, dass ich die Möglichkeit hatte diese Arbeit in seiner Abteilung fortzusetzen.

Einen herzlichen Dank an Evi Regitz und Claudia Schormann sowie allen Mitarbeitern des José-Carreras-Zentrums Homburg für Ihre große Hilfe.

Ein großes Dankeschön an Prof. Dr. Martin Simon und Dr. Franziska Drews, sowie Prof. Dr. Andreas Keller und Dr. Christina Backes für die gute Zusammenarbeit.

Herzlichen Dank an alle Probanden, dass Sie mir Ihr Vertrauen geschenkt haben.

Danken möchte ich Daniela Kampe, die seit der Schulzeit eine großartige Freundin ist und mich auch bei dieser Arbeit unterstützte.

Ich möchte mich an dieser Stelle auch bei Dr. Nicole Adrian bedanken. Sie ist ein großes Vorbild für mich und hat mir das wichtigste der ärztlichen Tätigkeit gelehrt: den wertschätzenden und ehrlichen Umgang mit den Patienten.

Meinen Geschwistern und ihren Familien danke ich dafür, dass Sie mich stets unterstützen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern Heinrich und Barbara bedanken, die mich mit ihrer Lebensgeschichte und ihrer täglichen Arbeit in der Landwirtschaft außerordentlich geprägt haben. *Meinen Eltern ist diese Arbeit gewidmet.*

Zuletzt darf ich meinem Ehemann Florian von ganzem Herzen danken. Danke, dass du immer für mich da bist und mich bei allem was ich tue unterstützt.