



**Die Expression des Vitamin-D-Rezeptors und der 24-Hydroxylase in
Knochenmetastasen unterschiedlicher Entität**

**Vitamin-D-receptor- and CYP24A1- expression in bone metastases of
different primary origin**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin
vorgelegt von

Jonas Seiler

aus

Lich

Würzburg, 2023



Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Kastenmüller

1. Betreuerin: Prof. Dr. Regina Ebert

2. Betreuer: PD Dr. Konstantin Horas

3. Betreuerin: PD Dr. Ellen Leich-Zbat

4. Betreuerin: PD Dr. Marietta Herrmann

5. Betreuer: Dr. med. Tizian Heinz

Tag des Promotionskolloquiums: 21.06.2023

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Knochenmetastasen	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Klinik der Knochenmetastasen	2
1.1.3 Mechanismus der Knochenmetastasierung	2
1.1.4 Wachstum der Knochenmetastasen	4
1.1.5 Therapie der Knochenmetastasen	7
1.2 Vitamin D-Metabolismus und der Vitamin D-Rezeptor	9
1.2.1 Der Vitamin D-Metabolismus und Vitamin D-Mangel	9
1.2.2 Der Vitamin-D-Rezeptor	11
1.3 Vitamin D und die VDR-Expression in Bezug auf Malignome	13
1.3.1 Vitamin D als protektiver Faktor vor Tumorerkrankungen	13
1.3.2 Die Expression des VDRs und der 24-Hydroxylase in Tumoren	14
1.4 Zielsetzung der Arbeit	16
2. Materialien und Methoden	17
2.1 Materialien	17
2.1.1 Verwendete Geräte, Instrumente und Programme	17
2.1.1.1 Instrumente und Geräte	17
2.1.1.2 Relevante verwendete Programme	19
2.1.2 Antikörper	19
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	20
2.1.4 Puffer und Lösungen	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 Tumormaterial und Aufbereitung zu Paraffinschnitten	22
2.2.2 Erfassung der Patientendaten	22
2.2.3 Ethikvotum	23
2.2.4 Immunhistochemische Färbung des Vitamin D-Rezeptors	23
2.2.5 Immunhistochemische Färbung der CYP24A1-Hydroxylase	26
2.3 Auswertung	29
2.3.1 Kontrollen	29
2.3.2 Auswertung anhand des Immunoreactive Scores	29
2.4 Statistik	31
3. Ergebnisse	32
3.1 Patientenkollektiv	32
3.1.1 Geschlecht und Alter	32
3.1.2 Art des Primärtumors	33
3.1.3 TNM-Klassifikation und Grading der Tumoren	34
3.1.4 Lokalisation der Knochenmetastasen	35
3.1.5 Überlebensdaten	36
3.2 Histologische Untersuchungen der Knochenmetastasen	37
3.2.1 Auswertung der Färbung des Vitamin D-Rezeptors	37
3.2.1.1 Negativ- und Positivkontrolle	37
3.2.1.2 Auswertung der VDR-Färbung des Nukleus nach Tumorentität des Primärtumors	38

3.2.1.3	Auswertung der VDR-Expression des Zytoplasmas nach Tumorentität des Primärtumors	39
3.2.1.4	Auswertung der VDR-Expression insgesamt nach Tumorentität des Primärtumors	41
3.2.2	Auswertung der Färbung von CYP24A1	43
3.2.2.1	Positiv- und Negativkontrolle	43
3.2.2.2	Auswertung der CYP24A1-Färbung nach der Tumorentität des Primärtumors	44
3.2.3	Auswertung der Färbungen der Knochenmetastasen der Prostata	46
3.2.4	Auswertung der Färbungen der Knochenmetastasen gastrointestinaler Karzinome	48
3.2.5	Auswertung der Färbungen der Knochenmetastasen des Lungenkarzinoms	51
3.2.6	Auswertung der Färbungen des follikulären Schilddrüsenkarzinoms	53
3.2.7	Auswertung der Färbung der Knochenmetastasen des Mammakarzinoms	55
3.2.8	Auswertung der Färbung der Knochenmetastasen der Harnwege	57
3.2.9	Auswertung der Färbung der Knochenmetastasen anderer Karzinome	59
3.3	Die Auswertungen der immunhistologischen Färbungen in Bezug zu den pathohistologischen und patientenspezifischen Charakteristika	61
3.3.1	Die Expression des VDRs und CYP24A1 und der Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad der Tumoren (Grading)	61
3.3.2	Die Expression des VDRs und CYP24A1 und der Zusammenhang mit dem T-Stadium der Primärtumoren	63
3.3.3	Die Expression des VDRs und CYP24A1 und der Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus der Primärtumoren	64
4.	<i>Diskussion</i>	68
4.1	Die Vitamin D-VDR und CYP24A1-Achse und deren Auswirkungen auf das Tumorwachstum und die Prognose	68
4.1.1	Vitamin D als protektiver Faktor von Malignomen und mögliche Mechanismen	68
4.1.2	Der VDR als prognostischer Faktor von Tumoren	69
4.1.3	CYP24A1- ein Protoonkogen?	73
4.2	Der Einfluss des Vitamin D-Signalwegs auf den knöchernen Metastasierungsprozess von Tumoren	76
4.3	Limitationen der Studie	79
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick	80
5.	<i>Zusammenfassung</i>	83
5.1	Summary	84
6.	<i>Literaturverzeichnis</i>	86
Appendix		93
I.	Abkürzungsverzeichnis	
II.	Abbildungsverzeichnis	
III.	Tabellenverzeichnis	
IV.	Danksagung	
V.	Veröffentlichungen und Kongressteilnahme	
VI.	Eidesstattliche Erklärung	
VII.	Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1 Knochenmetastasen

1.1.1 Epidemiologie

Krebserkrankungen sind nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache der Bevölkerung in Deutschland. Weltweit wurden 2020 über 19 Millionen neue Krebsdiagnosen und 10 Millionen Todesfälle erfasst (1). Für das Jahr 2040 wird eine Steigerung der Krebsinzidenz auf mehr als 28 Millionen auch durch die durchschnittlich steigende Lebenserwartung der Weltbevölkerung prognostiziert (1). Im Krankheitsverlauf einer Krebserkrankung entwickeln schätzungsweise etwa 50 % der Patientinnen und Patienten Metastasen (2). Tumormetastasen sind damit eine sehr häufige Erkrankung der Weltbevölkerung.

Knochenmetastasen gehören neben Lungen- und Lebermetastasen zu den häufigsten Manifestationsorten der Metastasierung maligner Tumoren (2). Maligne Neoplasien innerhalb des Skelettes treten am häufigsten in Folge einer Metastasierung primärer solider Tumoren auf, während primäre Knochtumoren insgesamt eher selten sind. Dabei sind vor allem Patientinnen und Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumorleiden betroffen. Die Diagnose einer knöchernen Metastasierung begrenzt die Therapiemaßnahmen zudem oft auf palliative Behandlungsansätze. Die häufigsten in den Knochen metastasierenden Tumoren sind das Prostata- und Mammakarzinom, aber auch das Lungenkarzinom. In einer Studie mit Obduktionsuntersuchungen mit an Prostata- oder Mammakarzinom verstorbenen Patienten und Patientinnen wiesen etwa 70 % der Betroffenen Knochenmetastasen auf (3). Bei Patientinnen und Patienten mit Schilddrüsen-, Nieren- und pulmonalen Malignomen konnten etwa bei 30-40 % Knochenmetastasen festgestellt werden (3). Durch eine statistische Auswertung von Patientenakten konnte zudem gezeigt werden, dass die Diagnose der Knochenmetastasierung durchschnittlich 1,1 Jahre nach der Diagnose des Primärtumors erfolgt (4). Die Inzidenz von Knochenmetastasen nach 10 Jahren *Follow-up* beträgt etwa 8,4 % insgesamt für alle Tumorentitäten (4). Die meisten Knochenmetastasen sind im Achsenskelett lokalisiert, besonders die Wirbelsäule, das Becken, die Rippen, aber auch der proximale Humerus und das Femur sind betroffen (2).

1.1.2 Klinik der Knochenmetastasen

Knochenmetastasen verdrängen das hämatopoetische Knochenmark und das Knochengewebe, wodurch sogenannte *skeletal-related-events* (SREs) auftreten können. SREs sind definiert als Spinalkanalkompressionen oder pathologische Frakturen und können mit einer Hyperkalzämie und starken Schmerzen einhergehen oder stabilisierende Behandlungen wie Operationen notwendig machen (3). Die schwerwiegendste Form der Hyperkalzämie als hyperkalzämische Krise kann durch Symptome wie Übelkeit, Bewusstseinsstörungen, aber auch lebensgefährliche Herzrhythmusstörungen in Erscheinung treten. Beispielsweise leiden etwa 40 % der Patienten mit Prostata-Karzinom an SREs (5). SREs sind somit eine häufige Komorbidität von in den Knochen metastasierenden Tumoren. Diese SREs führen häufig zu einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität der Patientinnen und Patienten und zu höheren Behandlungskosten (6). Die Patientinnen und Patienten mit SREs haben im Vergleich zu Patienten ohne SREs ein zweifach erhöhtes Risiko zu versterben, insbesondere bei Vorliegen einer pathologischen Fraktur (5). Weiterhin zeigte eine Kohortenstudie von 36000 Brustkrebspatientinnen, dass Patientinnen ohne Knochenmetastasen ein durchschnittliches Überleben von 16 Monaten haben. Vergleichsweise versterben Patientinnen mit Knochenmetastasen und SREs durchschnittlich nach sieben Monaten. Auch ist das 5-Jahres-Überleben bei Patientinnen mit Knochenmetastasen deutlich reduziert (7).

1.1.3 Mechanismus der Knochenmetastasierung

Die Interaktion zwischen Knochen- und Tumorzellen ist eine notwendige Grundlage, damit bestimmte Tumoren in den Knochen metastasieren. Der Chirurg Stephen Paget postulierte durch seine „Seed-and-Soil“-Hypothese bereits 1889, dass die Metastasierungsorte „Soil“ beim Prozess der Metastasierung wie beim Wachsen von Pflanzen einen Nährboden für die Tumorzellen des Primarius „Seed“ darstellen (8). Die Metastasierung kann bereits in sehr frühen Tumorstadien stattfinden und ist bei *in situ*-Karzinomen und vor der klinischen Detektierbarkeit des Primärkarzinoms möglich (9, 10). Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark sind auch bei sehr selten in den Knochen metastasierenden Tumoren häufig (11), jedoch bilden nur die wenigsten detektierbare Knochenmetastasen.

Bereits vor der Metastasierung findet eine Interaktion zwischen den Tumorzellen und dem Knochen statt (prämetastatische Nische). Die prämetastatische Nische wird durch systemische Signale des Primärtumors vermittelt, die die Extrazellulärmatrix (EZM) über eine Interaktion mit Zellen des Knochens umbauen (12). Cox *et al.* demonstrierten

beispielsweise im Mausmodell, dass Brustkrebszellen die Lysyl-Oxidase sekretieren. Die Lysyl-Oxidase moduliert die Aktivität von Osteoklasten und bedingt osteolytische Läsionen, die dann als Absiedelungsort der disseminierten Tumorzellen dienen (13).

Bis zu der Bildung und dem Wachstum von Knochenmetastasen ist ein mehrschrittiger Prozess notwendig, der zunächst ein Verlassen des primären Tumorzellverbandes und eine Invasion der Tumorzellen in Blut- oder Lymphgefäße erfordert (14). Maßgeblich dabei ist die epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Epithelial konfigurierte Zellen verlieren epithelspezifische Eigenschaften wie bestimmte Oberflächenproteine und Zellverbindungen und bilden Eigenschaften mesenchymaler Zellen aus. Dadurch wird die Migration und Invasivität der Tumorzellen gesteigert (15). Die meisten Tumorzellen, die den Primärtumor verlassen, werden durch das Immunsystem eliminiert oder sind unter den veränderten Umweltbedingungen des Blutstroms nicht überlebensfähig. Etwa nur 0,001 % -0,02 % der disseminierten Tumorzellen bilden letztendlich wachsende Metastasen (16).

Über die Blut- oder Lymphgefäße erreichen die Tumorzellen den Knochen. Knochen enthält das Knochenmark, das der wichtigste Ort der postnatalen Hämatopoese ist. Es beheimatet u.a. hämatopoetische Stammzellen (HSCs) und mesenchymale Stromazellen (MSCs) in Stammzellnischen. Diese Stammzellnischen sind auch bei der ossären Metastasierung von Relevanz (17). Besonders Knochen, die reich an rotem Knochenmark sind und die hämatopoetischen Stammzellen beheimaten, sind von Metastasen betroffen (18). Das Netzwerk der Sinusoide des Knochenmarks vereinfacht den disseminierten Tumorzellen die Extravasation, das durch einen langsamen Blutfluss und das diskontinuierliche Epithel charakterisiert ist (19). Außerdem wird hypothesisiert, dass Tumorzellen während der Knochenmetastasierung ähnliche Mechanismen zur Interaktion mit dem Mikromilieu der Knochen wie HSCs nutzen (17). Homing beschreibt den Vorgang, bei dem Zellen durch Attraktion durch Chemokine oder Rezeptoren in ein bestimmtes Organ einwandern. Ein wichtiger Signalweg für das Homing in das Knochenmark ist die CXC-Motiv-Chemokin 12-CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4-Interaktion (CXCL-12-CXCR4-Interaktion). Rezeptoren des CXCL-12 Liganden wie der CXCR4-Rezeptor, die man auf HSCs nachweisen kann, werden ebenso auf Tumorzellen zum Beispiel des Prostatakarzinoms exprimiert (20). Durch die CXCL-12 reiche Region des Knochenmarks findet Chemotaxis und deshalb eine bevorzugte Besiedelung des Knochenmarks durch bestimmte Tumorzellen statt (21, 22).

Nachdem die Tumorzellen den Knochen erreicht haben, können diese nach Proliferation und Erreichen einer gewissen Größe detektierbare Knochenmetastasen bilden. Teilweise wachsen

die Metastasen jedoch erst nach Jahren der Erstdiagnose des Primärtumors. Diese Tumorzellen befinden sich in einer Art Ruhezustand im Zellzyklusarrest in der G0-Phase und proliferieren erst nach Jahren wieder (*tumour dormancy*). Einige Chemotherapeutika, die auf die Mitose der Tumorzellen abzielen, sind somit nicht wirksam gegen diese Tumorzellen (23). Entscheidend bei der Frage des Zeitpunktes des Wachstums der Knochenmetastasen scheinen Wechselwirkungen mit dem Mikromilieu des Knochens zu sein. Hierbei beeinflussen beispielsweise MSCs und Endothelzellen sowohl Wachstum als auch den Ruhezustand der Tumorzellen (24-26). Präklinische Studien deuten dabei auf einige wesentliche Signalwege und Wachstumsfaktoren wie Notch-1 und TGF- β 2 ((Transforming growth factor β 2) hin (27). Die auf den Ruhezustand der HSCs einwirkenden Faktoren beeinflussen ebenso den Ruhezustand der Tumorzellen (28-30). Der Knochenumbau selbst ist durch osteoklastische Resorption mit folgender Veränderung des Mikromilieus der Knochenmetastasen zudem ein Faktor der Aktivierung des Wachstums der Knochenmetastasen (siehe Abbildung 1) (31).

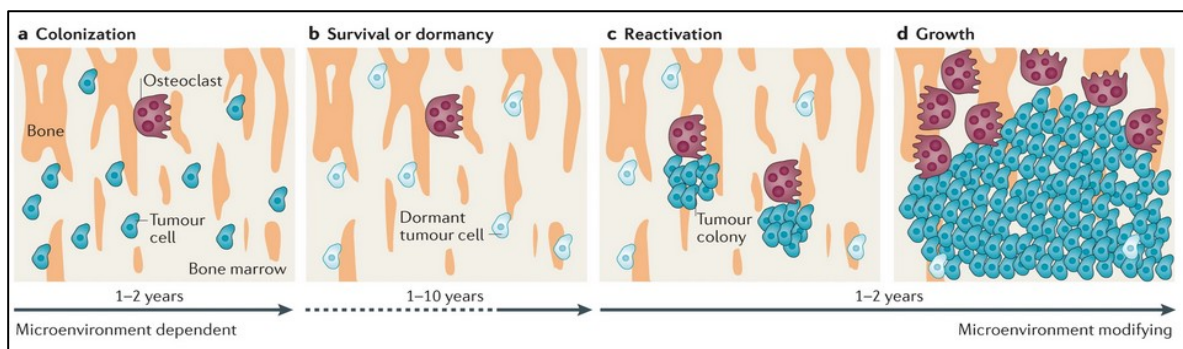


Abbildung 1 Die Wechselwirkungen von Tumorzellen und den Zellen des Knochens A: Zunächst besiedeln die Tumorzellen den Knochen und passen sich an das Knochenmilieu an. Die Tumorzellen wachsen dann je Status des Knochenumbaus oder tumorzellautonomer Regulation bzw. treten in den Ruhezustand ein (*Tumour dormancy*) B, der teilweise bis zu Jahrzehnten andauern kann. C: Einige der Tumorzellen können nach Jahren reaktiviert werden, wachsen unabhängig vom Knochenmikromilieu bzw. nutzen dieses zu ihrem Vorteil D) (31). Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.

1.1.4 Wachstum der Knochenmetastasen

Knochenmetastasen werden in einen osteolytischen und osteoplastischen Subtyp differenziert. Oftmals liegt allerdings ein Mischtyp der Knochenmetastasen vor, der osteolytische, aber auch osteoplastische Anteile umfasst. Während die Knochenmetastasen der Brust-, Lungen- und Nierentumoren vermehrt osteolytische Anteile aufweisen, werden Knochenmetastasen mit vermehrt osteoplastischen Anteilen hauptsächlich bei

Prostatakarzinomen nachgewiesen (32). Dabei führen die Wechselwirkungen der Tumorzellen und des umgebenden Knochens zu den unterschiedlichen Subtypen. Bei osteolytischen Knochenmetastasen überwiegt der Knochenabbau, bei den osteoplastischen Knochenmetastasen die Proliferation der Osteoblasten und der Knochenaufbau. Dieser resultiert jedoch in Knochen verminderter Qualität, sodass infolgedessen trotz des vermehrten Knochens das Frakturrisiko erhöht ist (32).

Die metastasierten Tumorzellen beeinflussen den Knochenstoffwechsel durch Wechselwirkungen mit dem Knochenmikromilieu. Der Knochen unterliegt physiologisch einem ständigen durch Hormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine eng regulierten Auf- und Abbauprozess (sogenanntes *Bone remodelling*) (33), der durch Wechselwirkungen von Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten maßgeblich beeinflusst wird. Eine Schlüsselfunktion des physiologischen Knochenstoffwechsels hat das Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL)- Receptor of NF-kappa B (RANK)-Osteoprotegerin (OPG) System. Die Knochen abbauenden Osteoklasten besitzen auf ihrer Zelloberfläche den aktivierenden RANK-Rezeptor, an den RANKL bindet. Osteoprotegerin bindet RANKL und verhindert so dessen Interaktion mit RANK. Das Gleichgewicht aus RANKL und OPG hat somit einen großen Einfluss auf die Knochenresorption und Knochenhomöostase (34). Zudem sind weitere Zellen wie MSCs, das Knochenmarkendothel, Adipozyten, die einen großen Teil des Knochenmarks einnehmen, und das Immunsystem an der Regulierung und Aufrechterhaltung des Knochenmilieus beteiligt (33). Außerdem wirken Hormone wie Parathormon (PTH) und 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ zur Sicherstellung der Calcium-Phosphat-Homöostase auf den Knochenmetabolismus ein. Dieses Gleichgewicht aus eng reguliertem Auf- und Abbauprozess wird durch die ossär metastasierten Tumorzellen beeinflusst (35, 36).

Tumorzellen, die insbesondere osteolytische Knochenmetastasen bilden, schütten Faktoren aus, die den Knochenabbau aktivieren. Beispielsweise induziert das Parathyroid hormone-related Protein (PTHrP) eine höhere Sekretion von RANKL durch Osteoblasten durch die Bindung an den gleichen Rezeptor wie das physiologische PTH. Dies verstärkt lokal die osteoklastäre Knochenresorption (32). Durch die aktivierten Osteoklasten werden die in der Knochenmatrix gespeicherten Wachstumsfaktoren wie TGF- β (37) oder IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) (38) freigesetzt und binden an die Rezeptoren der metastatischen Tumorzellen. Die Tumorzellen sekretieren daraufhin wiederum osteolytische Faktoren wie PTHrP und Jagged 1 (39). Jagged 1 fördert das Metastasenwachstum durch Induktion der IL-

1. Einleitung

6 Sekretion von Osteoblasten und die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten (40). Insgesamt führen diese Wechselwirkungen zu dem sogenannten *Circulus vitiosus* des Wachstums der Knochenmetastasen (41). Die aktivierten Osteoklasten bauen die Knochenmatrix ab und führen zu einer weiteren Freisetzung von Faktoren wie TGF- β , das wiederum u.a. zu einer weiteren Sekretion von Jagged 1 und PTHrP führt (siehe Abbildung 2).

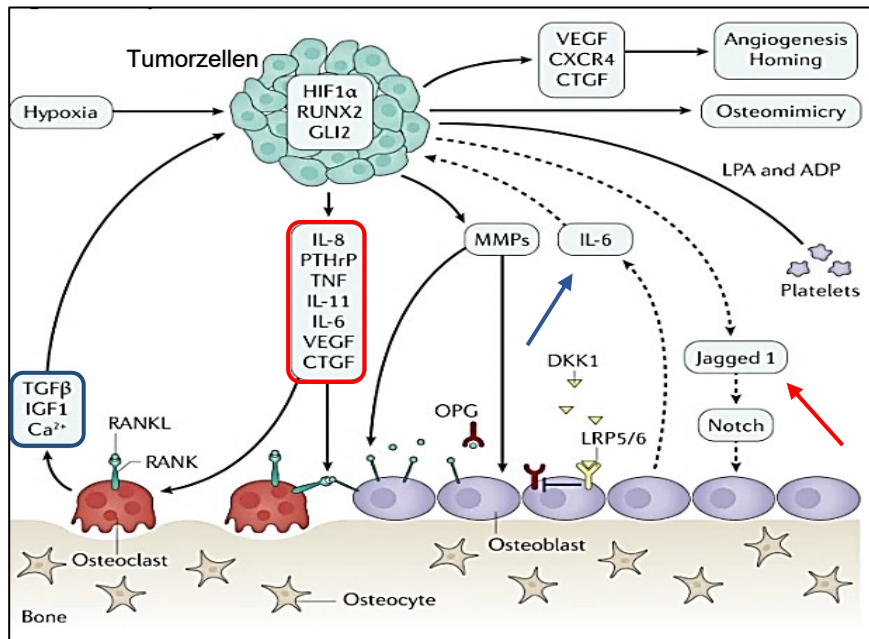


Abbildung 2 Wachstum der osteolytischen Knochenmetastasen durch Wechselwirkungen mit den Knochenzellen. Die metastatischen Tumorzellen sekretieren Faktoren wie PTHrP (siehe roter Kasten), wodurch die osteoklastäre Knochenresorption verstärkt wird und somit Wachstumsfaktoren freigesetzt werden (blauer Kasten), die dann wiederum das Tumorwachstum steigern und zur Freisetzung u.a. von Jagged 1 (roter Pfeil) führen, das die osteoblastische IL-6 Sekretion (blauer Pfeil) steigert. Modifiziert nach: *Bone metastases*, Coleman et al. (2). Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.

Auch in vorwiegend osteoplastischen Tumoren ist der Knochenabbau deutlich erhöht (42, 43). Osteoplastische Metastasen sind mit einer erhöhten tumorzellbedingten Sekretion von osteoblastischen Faktoren assoziiert, die die osteoblastische Differenzierung und Aktivität steigern (44). Dies führt zu einem Aufbau von Knochen minderwertiger Qualität mit ebenso erhöhtem Frakturrisiko.

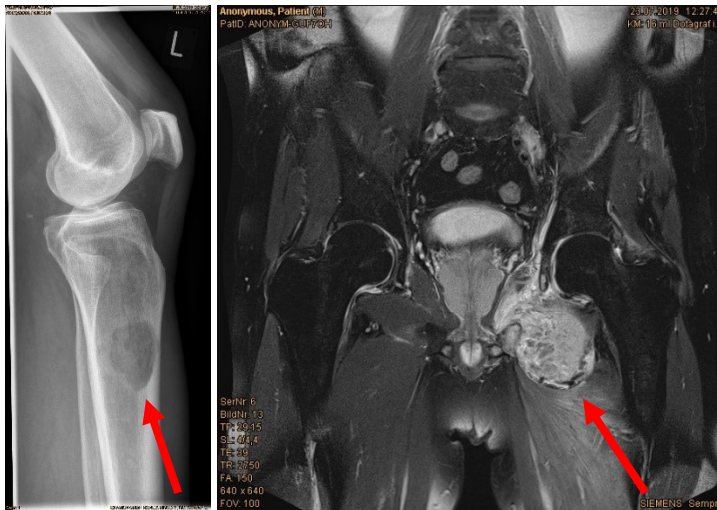


Abbildung 3 Links: Röntgenaufnahme des Kniegelenks mit proximalem Anteil des Unterschenkels, das eine osteolytische Knochenmetastase der distalen Tibia eines Nierenzellkarzinoms zeigt. Rechts: Coronalare Schnittebene einer Magnetresonanztomographie des Beckens und der Hüfte, die eine Knochenmetastase des Beckens eines Urothelkarzinoms zeigt. Mit freundlicher Genehmigung des König-Ludwig-Hauses, Würzburg.

1.1.5 Therapie der Knochenmetastasen

Die Therapie von Knochenmetastasen ist Bestandteil des Gesamtkonzeptes der Behandlung des Primärtumors und erfolgt in interdisziplinärer Zusammenarbeit etwa im Rahmen eines Tumorboards. In den letzten Jahren verbesserte sich die Behandlung von Krebspatientinnen und -patienten durch eine dem Tumor und Patienten angepassten Therapie und führte zu verbesserten Überlebensraten (45, 46).

Vor der Behandlung ist ein gründliches Staging des Tumors indiziert. Tumoren werden dabei in Rahmen der Diagnostik anhand der TNM-Klassifikation in UICC (Union Internationale Contre le Cancer) -Stadien eingeteilt. Die TNM-Klassifikation umfasst die Ausdehnung des Primärtumors (T), die Lymphknoteninvasion (N) und mögliche Fernmetastasen (M0 =keine Fernmetastasen, M1 =Fernmetastasen). Infolgedessen werden Tumoren in UICC- Stadien von 0 (kleiner Tumor ohne Lymphknoten- und Fernmetastasierung) bis IV (Tumoren jeder Größe, evtl. Lymphknotenmetastase, Fernmetastasen) eingeteilt und demnach eine leitliniengerechte Therapie eingeleitet. Durch die Diagnose einer Knochenmetastase werden Patientinnen und Patienten in UICC-Stadium IV eingeordnet. Die Behandlung der Patientinnen und Patienten ist durch die Diagnose einer Knochenmetastase (M1) bis auf wenige Ausnahmen auf palliative Maßnahmen beschränkt. Dennoch ist eine Behandlung der Knochenmetastasen gerade im Hinblick auf den Erhalt der Lebensqualität essenziell. Weitere

zentrale Ziele der Behandlung von Knochenmetastasen sind die Reduktion von Schmerzen, ein Erhalt der muskuloskelettalen Funktion und die Vermeidung von SREs (47).

Neben einer adäquaten Schmerztherapie nach WHO (world health organisation)-Stufenschema (48, 49) ist die Hemmung der Knochenresorption und des Knochenumbaus zur Inhibition des *Circulus vitiosus* des Wachstums der Knochenmetastasen Bestandteil der Basistherapie (50). Patientinnen und Patienten mit erhöhtem Knochenabbau haben durch den *Circulus vitiosus* ein höheres Risiko für ein schnelles Wachstum der Knochenmetastasen. Medikamentös werden im klinischen Alltag bei der Behandlung von Knochenmetastasen insbesondere Bisphosphonate als auch der RANKL-Antikörper Denosumab als Antiresorptiva eingesetzt (48). Bisphosphonate werden insbesondere bei bestehender Hyperkalzämie oder osteolytischen Knochenmetastasen eingesetzt, aber auch ergänzend zur Linderung bei durch Knochenmetastasen bedingten Knochenschmerzen. Bisphosphonate sind Analoga von Pyrophosphat und binden an Hydroxylapatitkristalle im Knochen. Sie induzieren die Apoptose von Osteoklasten (51). Darüber hinaus werden mögliche direkte Antitumorwirkungen durch Bisphosphonate (52, 53) und auch durch Denosumab (54) diskutiert. Der humane monoklonale Antikörper Denosumab bindet den RANK-Liganden und verhindert somit die Interaktion des RANK-Liganden mit dessen Rezeptor auf den Osteoklasten. Denosumab hemmt folglich die Differenzierung und Aktivität der Osteoklasten, wodurch der Knochenabbau vermindert wird (55). Ergänzend zu der antiresorptiven Therapie wird eine Calcium- und Vitamin-D-Supplementation angeraten (48).

Operative Eingriffe können bei durch Wirbelkörpermetastasen bedingten neurologischen Ausfällen oder bei pathologischen Frakturen notwendig sein, die unter Beachtung der Prognose stattfinden (47). In Kombination mit der operativen Stabilisierung wird ebenso die perkutane Strahlentherapie als palliative Behandlungsmethode von schmerzhaften einzelnen Knochenmetastasen, insbesondere der Wirbelkörper, eingesetzt (48).

Selten hingegen kommt als weitere Therapieoption Radium-223 bei Patienten mit Prostatakarzinom mit symptomatischen ossären Metastasen ohne Nachweis viszeraler Metastasen zum Einsatz. Als alpha-Strahler induziert es DNA-Doppelstrangbrüche und führt folgend zum Zelltod von Tumorzellen, aber auch von Osteoblasten und Osteoklasten (56).

1.2 Vitamin D-Metabolismus und der Vitamin D-Rezeptor

1.2.1 Der Vitamin D-Metabolismus und Vitamin D-Mangel

Das fettlösliche und hormonell aktive Secosteroid 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ kann in einer für den Körper ausreichenden Menge endogen synthetisiert werden, sodass die historisch geprägte Bezeichnung als „Vitamin“ nicht vollkommen korrekt ist. Aus dem Vorläufer 7-Dehydrocholesterol wird in der Epidermis durch UV-B-Strahlung Prävitamin D₃ gebildet. Dieses Prävitamin D₃ ist thermodynamisch instabil, sodass bei Körpertemperatur durch Elektronenverschiebungen Vitamin D₃ oder im Vitamin-D-Metabolismus biologisch inaktive Photoisomere entstehen (57, 58). Dabei ist die Menge der Synthese von Vitamin D₃ von der Intensität der UV-Strahlung abhängig. Die endogene Vitamin D₃-Synthese deckt etwa 90 % des gesamten Vitamin D₃-Bedarfs, während über die Nahrung zum Beispiel in Form von Milch, Fisch oder Eiern nur etwa 10 % der Vitamin D₃-Menge durchschnittlich zugeführt werden (59).

Vitamin D₃ wird im Blut vom Vitamin D bindenden Protein (VDBP) transportiert und insbesondere von Hepatozyten aufgenommen. In diesen findet aus Vitamin D₃ eine Hydroxylierung an Position 25 zu 25-OH-Vitamin D₃ im Wesentlichen über das Enzym CYP2R1 (25-Hydroxylase) statt (60). 25-OH-Vitamin D₃ stellt die an das VDBP gebundene hauptregulierende Form im Blut des Menschen dar und wird zur Vitamin D-Blutspiegelbestimmung verwendet. Als ausreichender 25-OH-Vitamin D₃-Serumspiegel wird in der Regel eine Konzentration über 30 ng/ml (75 nmol/L) angesehen (61).

25-OH-Vitamin D₃ wird vor allem in den proximalen Tubuli der Niere aufgenommen und zu der biologisch aktiven Form 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) über die 1 α -Hydroxylase (CYP27B1) katalysiert. Allerdings gibt es auch lokale Formen der 1 α -Hydroxylase, welche keine Auswirkungen auf die systemischen 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃-Spiegel haben, aber zur lokalen Aktivierung von 25-OH-Vitamin D₃ beitragen (62).

Das CYP450 Enzym 24A1 (CYP24A1, 24-Hydroxylase) ist das maßgebende Enzym des 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃-Katabolismus. Die 24-Hydroxylase ist ein mitochondriales inneres Membranprotein und wird in allen Zellen mit Vitamin-D-Rezeptor (VDR) exprimiert (63). Durch einen negativen Feedback Mechanismus ist die Expression der 24-Hydroxylase eines der durch 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃ am stärksten beeinflussten Gene, um Intoxikationen und die Folgen wie zum Beispiel eine Hyperkalzämie durch Vitamin D vorzubeugen (64). Gleichzeitig vermindert CYP24A1 lokal die intrazelluläre 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃-Konzentration. CYP24A1 hebt die biologische Aktivität von 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃ durch

1. Einleitung

Hydroxylierung an Position 24 des Secosteroidgerüsts auf. Über weitere Zwischenschritte wird mit Calcitronsäure die Hauptausscheidungsform des 1,24,25-OH₃D₃ über die Gallenblase gebildet (64).

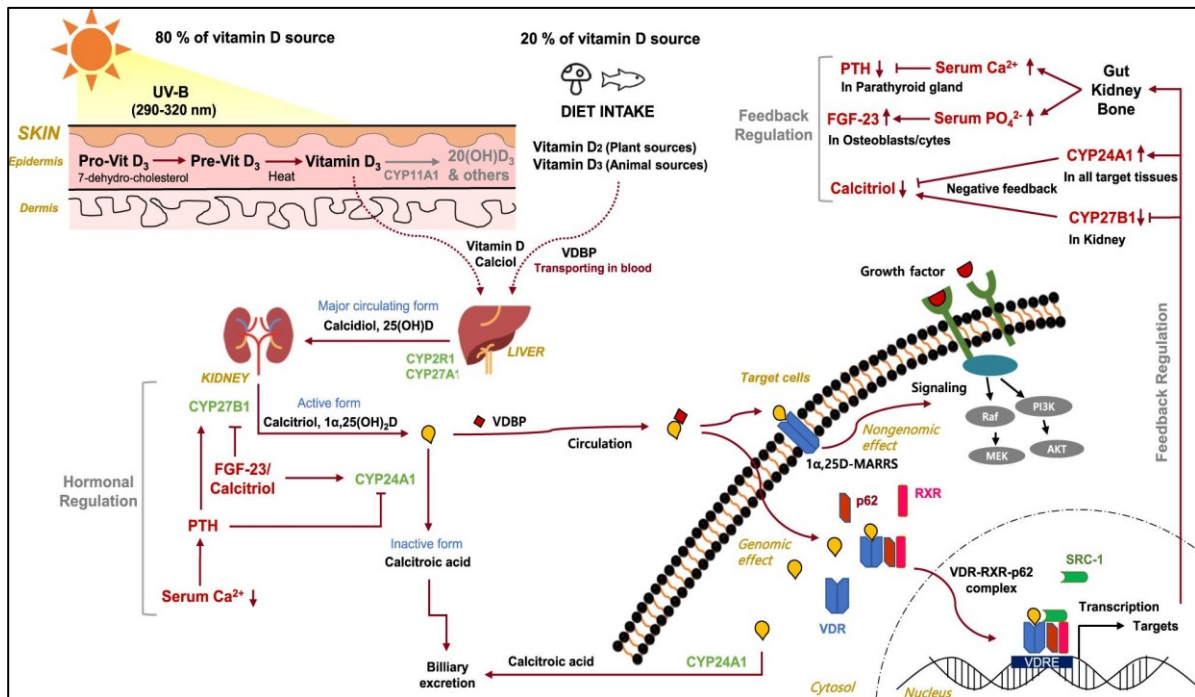


Abbildung 4 Übersicht des Vitamin D-Metabolismus und des Vitamin D-Signalweges. Aus: *Exploring vitamin D metabolism and function in cancer*, Jeon et al. (65). Als open access-Artikel/Creative Commons-Lizenz frei verwendbar: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

1,25-(OH)₂-Vitamin D₃-Mangel führt bei Kindern und Erwachsenen zu einer ungenügenden Mineralisierung der Knochen und einer Hypokalzämie. Dies kann bei sehr ausgeprägten 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃-Mangelzuständen zum Krankheitsbild der Rachitis bei Kindern bzw. der Osteomalazie bei Erwachsenen führen. Durch physiologische 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃-Spiegel wird die osteoblastische Knochenformation gesteigert. Sehr hohe 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃-Spiegel erhöhen allerdings die Freisetzung von RANKL durch Osteoblasten, wodurch dies den osteoklastischen Knochenabbau fördert (siehe Abbildung 5) (66). Durch die verminderte PTH-Freisetzung durch normwertige 25-OH-Vitamin D₃-Spiegel wird der Knochenabbau reduziert und die osteoblastische Aktivität gesteigert, weshalb insgesamt der anabole Effekt durch 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃ auf den Knochenstoffwechsel überwiegt (67).

Rezeptors (siehe Abbildung 4). Zusammen mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) oder vereinzelt mit dem Retinsäure-Rezeptor (RAR) (73) bindet der VDR als ligandengebundenes Heterodimer an sogenannte *vitamin D response elements* (VDRE) der DNA. Damit wird die Transkription nach der Rekrutierung von Coaktivatoren und basalen Transkriptionsfaktoren von über 2000 Zielgenen aktiviert. Zielgene des Heterodimers sind wichtige Proteine des Knochenmetabolismus wie RANKL (74) oder Osteocalcin (75). Zudem werden zur Regulierung des Vitamin-D-Spiegels auch den Vitamin-D-Metabolismus betreffende Enzyme wie das 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ abbauende Enzym CYP24A1 im Sinne eines negativen *feedback*-Mechanismus verstärkt exprimiert (76). Außerdem wird die Transkription auch von zellzyklusregulierende Faktoren (77) oder Kanälen, die die Calcium-Phosphat-Homöostase beeinflussen können, wie der Calciumtransporter TRPV6, (78) verstärkt. Insgesamt beeinflusst 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ damit eine Vielzahl von unterschiedlichen Zellfunktionen und -mechanismen.

1.3 Vitamin D und die VDR-Expression in Bezug auf Malignome

In den vergangenen Abschnitten wurde die Bedeutung und Biologie von Knochenmetastasen und der physiologische Vitamin-D-Stoffwechsel beschrieben. Im letzten Abschnitt der Einleitung wird die Kombination aus beiden behandelt - die Wirkung von Vitamin D und der Expression des VDRs und von CYP24A1 auf Tumorzellen, Tumorentwicklung und Knochenmetastasen.

1.3.1 Vitamin D als protektiver Faktor vor Tumorerkrankungen

Bereits vor mehr als 80 Jahren assoziierte der US-Amerikaner Frank Apperly durch Beobachtungen eine erhöhte Sonnenexposition mit einer verminderten Krebssterblichkeit (79), die jedoch erst 40 Jahre später von den Brüdern Garland erneut aufgegriffen wurden. Diese stellten die Hypothese auf, dass ein durch verminderte Sonnenexposition bedingter Vitamin D₃-Mangel den Zusammenhang zwischen dem höheren Tumorrisiko von Colon- und Mammakarzinomen und der nördlichen Hemisphäre begründet (80, 81).

Epidemiologische und klinische Studien weisen insbesondere in Form von Fall-Kontrollstudien auf höhere Inzidenzen für verschiedene Primärtumoren bei Patientinnen und Patienten mit 25-OH-Vitamin D₃-Mangel hin (82-89). 2008 veröffentlichte die International Agency for Research on Cancer (IARC) ein Review, in dem eine präventive Rolle von hohen 25-OH-Vitamin D₃-Spiegeln in Bezug auf Colorektale Karzinome beschrieben wurde (90). Hingegen bleibt die Beziehung insbesondere bei weiteren Malignomen zwischen 25-OH-Vitamin D₃-Serumspiegeln und Tumorrisiko nicht eindeutig. Für das Prostatakarzinom beispielsweise zeigen Männer mit sehr niedrigen oder sehr hohen 25-OH-Vitamin D₃-Serumspiegeln ein höheres Prostatakarzinomrisiko (91). Andere Studien hingegen weisen keinen Zusammenhang zwischen 25-OH-Vitamin D₃-Spiegeln und Prostatakarzinomrisiko nach (92).

Bei Patientinnen und Patienten mit einer bereits diagnostizierten Krebserkrankung haben die Patientinnen und Patienten in der Kohorte von hohen 25-OH-Vitamin D₃-Serumspiegeln, verglichen mit der Gruppe mit niedrigen Serumspiegeln, eine bessere Prognose (83, 85, 93, 94). Eine Vitamin D₃-Supplementierung in einer randomisierten, kontrollierten Studie wiederum konnte eine signifikante Reduktion von fortgeschrittenen und metastatischen Tumorerkrankungen zeigen, allerdings keinen Effekt einer verminderten Inzidenz von Krebserkrankungen insgesamt (95, 96). Daher ist der Zusammenhang zwischen Vitamin D₃ und Tumorerkrankungen daher nicht eindeutig. Demzufolge kann eine genauere Betrachtung

des Vitamin D₃-Signalweges und des Metabolismus in Tumorzellen zur Aufklärung des uneindeutigen Zusammenhangs beitragen.

1.3.2 Die Expression des VDRs und der 24-Hydroxylase in Tumoren

In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass ein Vitamin D-Mangel das Tumorwachstum im Knochen fördert (97, 98). Teilweise sind diese Effekte durch indirekte Effekte von 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ auf das Tumorwachstum (durch die Erhöhung des Knochenumbaus durch den 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Mangel) zu erklären (99, 100). Zudem konnte bei verschiedenen primären Tumorzellen ein direkter antiproliferativer, proapoptotischer und pro-differenzierender Effekt *in vitro* durch 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Applikation festgestellt werden (101-105). Dieser direkte Effekt auf das Tumorwachstum von 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ wird hauptsächlich durch den VDR vermittelt. Beispielsweise ist der proapoptotische und antiproliferative Effekt von 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ bei Mammakarzinomzellen abhängig von der Expression des VDRs (106).

Der VDR wird in Tumorzellen unterschiedlicher Entität häufig exprimiert (107). Interessanterweise wird der VDR in malignen Tumoren unterschiedlicher Entität im Vergleich zu benignen Veränderungen jedoch signifikant niedriger exprimiert (70, 108-110). Zudem ist eine hohe Expression des VDRs Eigenschaft weniger aggressiver Tumoren mit günstigen histopathologischen Eigenschaften (111-115). Ähnlich ist in Primärtumoren unterschiedlicher Entität eine hohe Expression des VDRs ebenso mit einem signifikant niedrigerem Tumorstadium und einem besseren Überleben assoziiert (111-115). Insgesamt weisen diese Studien auf eine Dysregulation des 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Signalwegs in aggressiven Tumorzellen hin. Hingegen konnte eine andere Studie bei Mammakarzinomen keine signifikanten Assoziationen zwischen einer niedrigen VDR-Expression und einer schlechten Prognose zeigen (113).

Präklinische Studien deuten zudem auf eine wichtige, ligandenunabhängige Rolle des VDRs in Bezug auf Tumorwachstum und -progression hin. Beispielsweise führt der Knockdown des VDRs zu einer Verminderung des Tumorwachstums von Prostatakarzinomzellen (116, 117). Andere präklinische Studien konnten außerdem zeigen, dass ein Knockdown des VDRs insbesondere während der Frühphase der Metastasierung zu einer erhöhten Migration und Invasivität der Tumorzellen führt. Neben der Metastasierung von Tumorzellen, scheint der Verlust des VDRs in Tumorzellen ebenfalls das Wachstum im Primärtumor als auch in Knochenmetastasen zu beeinflussen (116, 118). Ähnliche Resultate konnten in einer Studie an 15 Patientinnen mit einem Mammakarzinom gezeigt werden. Die Knochenmetastasen des

Mammakarzinoms exprimieren den VDR im Vergleich zu den Tumorzellen des Primärtumors signifikant niedriger (119). Zudem weisen Primärtumoren des Mammakarzinoms mit niedriger VDR-Expression statistisch eine frühere ossäre Metastasierung auf (120). Diese Ergebnisse lassen damit eine potenzielle Rolle des VDRs bei der Progression und Metastasierung von Tumorzellen vermuten.

Durch die Bindung des ligandengebundenen VDR-Komplexes wird die Transkription des 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-katabolisierenden CYP24A1 (der 24-Hydroxylase) verstärkt. Zusätzlich zu den systemischen 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Spiegeln vermindert CYP24A1 die 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Spiegel in den Zellen selbst (63). Interessanterweise wird CYP24A1 von malignen Tumorzellen des Prostata-, Lungen-, und colorektalen Karzinoms im Vergleich zu benignen Tumoren signifikant höher exprimiert (121-123). Zudem weisen schlecht differenzierte oder invasive Karzinome unterschiedlicher Tumorentitäten eine erhöhte Expression von CYP24A1 im Vergleich zu gut differenzierten Zellen auf (70, 121, 124, 125). Verschiedene Studien weisen zudem darauf hin, dass eine erhöhte CYP24A1-Expression zu einer Vitamin D-Resistenz der Tumorzellen führt (121, 126, 127). Die Inhibition des Vitamin D-katabolisierenden Enzyms CYP24A1 führt bei 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Applikation bei 1,25(OH)₂- Vitamin D₃ resistenten Tumorzellen zu einem verminderten Tumorwachstum (121, 127-129).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Zusammengefasst weisen viele wissenschaftliche Untersuchungen auf einen potenziellen Effekt des VDRs auf das Wachstum von Tumoren und Knochenmetastasen hin. Die VDR- und CYP24A1-Expression ist in Primärtumoren je nach Tumorentität teilweise gut erforscht. Jedoch gibt es kaum Informationen zur VDR- und CYP24A1-Expression in Knochenmetastasen. Auch ist bislang noch unklar, inwiefern die Tumoren der Knochenmetastasen durch bestimmte histopathologische Eigenschaften charakterisiert sind, wenn sie den VDR oder CYP24A1 exprimieren/nicht exprimieren.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Expression des VDRs und von CYP24A1 in Knochenmetastasen unterschiedlicher Primarien mittels Immunhistochemie zu bestimmen. Diese Expression wird mittels Immunhistochemie an Paraffinschnitten dieser Knochenmetastasen erfasst und ausgewertet. Außerdem wird der Zusammenhang mit dem TNM-Tumorstaging (und Gradings) mit der Expression des VDRs und von CYP24A1 untersucht.

Zusammengefasst wurden folgende Hypothesen und Fragestellungen aufgestellt:

- Wird der Vitamin-D-Rezeptor und das Vitamin-D-katabolisierende Enzym CYP24A1 von in den Knochen metastasierten Tumorzellen exprimiert?
- Zeigen sich Unterschiede in der Expression des VDRs oder von CYP24A1 zwischen den unterschiedlichen Tumorentitäten?
- Gibt es eine Korrelation zwischen dem TNM-Tumorstaging und oder dem Status von multiplen metastasierten Tumoren der Patientinnen und Patienten mit der Expression des VDRs bzw. CYP24A1?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen der VDR-Expression und CYP24A1-Expression in den Knochenmetastasen?

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verwendete Geräte, Instrumente und Programme

2.1.1.1 Instrumente und Geräte

Table 1 Tabellarische Übersicht der verwendeten Instrumente in der linken Spalte und der jeweiligen Bezugsquelle in der rechten Spalte

Instrument/Gerät	Bezugsquelle
Apothekerlöffel	Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Becherglas 1000 ml	Schott AG, Mainz, Deutschland
Deckglässchen	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
discovery comfort-Mikroliterpipette in den drei Größen 0,5-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl	HTL Lab Solutions, Warschau, Polen
Erlenmeyerkolben 1000 ml	Schott AG, Mainz, Deutschland
Färbeeinsatz aus Edelstahl	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Färbekasten nach Hellendahl	Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Farbkamera ZEISS Axiocam 305 color	Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, Deutschland
Feuchtkammer	Simport, Quebec, Kanada
Glasthermometer	Ludwig Schneider GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Magnetrührer mit Heizung	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Magnetrührstäbchen, zylindrisch	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Mit Mikroskop verknüpfter Computer	Fujitsu K.K., Minato, Japan

2. Material und Methoden

Instrument/Gerät	Hersteller
Objektträger, silanbeschichtet	Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Objektträgerkasten	Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Petrischalen aus Glas	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipettenständer	Socorex Isba SA, Ecublens, Schweiz
Plastikgefäßständer (2ml)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Reagenzglas	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäßgestell	Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Waage	früher Scaltec, heute Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG
Wägeschalen	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Zeiss Mikroskop (Axio Observer 7)	Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, Deutschland

2.1.1.2 Relevante verwendete Programme

Tabelle 2 Tabellarische Darstellung der verwendeten Programme

Programm	Bezugsquelle
EndNote 20.1	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
IBM SPSS Statistics 27	IBM, Armonk, USA
Image J	https://imagej.nih.gov/ij/ -freie Lizenz
Microsoft Excel 365	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word 365	Microsoft Corporation, Redmond, USA
ZEN - ZEISS Efficient Navigation	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

2.1.2 Antikörper

Die verwendeten primären Antikörper wurden im Antibody-Diluent der Firma Agilent Dako (Produkt-Nr.: S202230-2) verdünnt. Die Sekundärantikörper bzw. Detektionssysteme sind grau markiert.

Tabelle 3 Tabellarische Darstellung der verwendeten Antikörper mit der jeweiligen verwendeten Verdünnung und deren Bezugsquelle

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
CYP24A1-Antikörper (polyklonal, Kaninchen, Antibody HPA022261)	1:200	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (Merck KGaA) (Produkt-Nr.: HPA022261- 100UL)
Vitamin D-Rezeptor Antikörper (monoklonal, Ratte, Klon: 9A7y.E10.E4)	1:100	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland (Produkt-Nr.: DLN- 013017))
SuperVision2 (2-Schritt- Polymersystem, Kaninchen, HRP-konjugiert)	gebrauchsfertige Verdünnung	DCS-Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg, Deutschland (Produkt-Nr.: PD000POL- K)

2. Material und Methoden

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
SuperVision2 (2-Schritt-Polymersystem, Ratte, HRP-konjugiert)	gebrauchsfertige Verdünnung	DCS-Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg, Deutschland (Produkt-Nr.: PD000POL-R)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4 Tabellarische Darstellung der verwendeten Verbrauchsmaterialien in der linken Spalte und der entsprechenden Bezugsquelle in der rechten Spalte

Verbrauchsmaterialien und Lösungen	Bezugsquelle
Antibody Diluent	Agilent Dako, Santa Clara, USA (Produkt-Nr.: S202230-2)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland (Produkt-Nr.: BSA-DG-100G)
DAB-Substrat-Kit (Liquid DAB+Substrat Chromogen System)	Agilent Dako, Santa Clara, USA (Produkt-Nr.: K346811-2)
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 99,99%, vergällt	Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fettstift	Agilent Dako, Santa Clara, USA
H ₂ O ₂ (Wasserstoffperoxid), 30%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin nach Meyer	Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (Produkt-Nr.: T865.1)
Hasen-Serum	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (Merck KGaA)
Isopropanolol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
PBS-Powder (phosphate buffered saline)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ratten-Serum	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (Merck KGaA)

2. Material und Methoden

Verbrauchsmaterialien und Lösungen	Bezugsquelle
Target Retrieval Solution/Citratpuffer	Agilent Dako, Santa Clara, USA (Produkt-Nr.: S169984-2)
Triton-X-100	Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden in destilliertem Wasser angesetzt, wenn nicht anders angegeben, und die aufsteigenden und absteigenden Alkohollösungen in unterschiedlichen Konzentrationen ebenso durch destilliertes Wasser verdünnt.

Tabelle 5 Tabellarische Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
Citratpuffer/Target-Retrieval-Lösung	0,9 ml/ml H ₂ O 0,1 ml/ml Target-Retrieval-Solution pH auf 6,1 ggf. mit HCl oder NaOH einstellen
Phosphate buffered saline (PBS)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O 1,4 mM KH ₂ PO
Peroxidaseblock	0,1 ml/ml 30 % H ₂ O ₂ 0,9 ml/ml H ₂ O
Proteinblock und Detergens	In PBS: 0,05 mg/ml BSA 0,5% Triton X-100

2.2 Methoden

2.2.1 Tumormaterial und Aufbereitung zu Paraffinschnitten

Die Knochenmetastasen der Primärtumoren und das als Positivkontrolle verwendete Nierengewebe entstammten dem Archiv des Institutes für Pathologie der Universität Würzburg aus den Jahren 2000 bis 2017. Diese wurden infolge einer Biopsie oder Resektion im Universitätsklinikum Würzburg entnommen und anschließend durch Ärztinnen und Ärzte des pathologischen Institutes als Knochenmetastase oder Nierengewebe identifiziert. Dafür wurden die entnommenen Knochenmetastasen und das Nierengewebe zugeschnitten und durch Entwässerung mittels aufsteigender Alkoholreihe, Xylol und abschließender Paraffineinbettung zu Paraffinblöcken konserviert. Die angefertigten Paraffinblöcke der Patientinnen und Patienten wurden anschließend mit einem Schlittenmikrotom in der Dicke 1-3 µm geschnitten, entkalkifiziert und auf mit Silan beschichtete Objektträger aufgezogen, die dann über Nacht bei 37°C getrocknet wurden. Diese beschriebenen Vorbereitungen wurden im Institut für Pathologie der Universität Würzburg vorgenommen. Es wurden die Patientinnen und Patienten eingeschlossen, deren Paraffinschnitte der Knochenmetastasen eine deutliche mikroskopische metastatische Durchsetzung des Knochengewebes zeigten. Ursprünglich wurden 78 Patientinnen und Patienten mit Knochenmetastasen ausgewählt, allerdings zeigten 12 Paraffinschnitte der Knochenmetastasen kein identifizierbares Tumorgewebe, sodass insgesamt lediglich 66 Patientinnen und Patienten in die Untersuchungen eingeschlossen wurden.

2.2.2 Erfassung der Patientendaten

Die Patientendaten wie biometrische Daten und Eigenschaften der Tumoren wurden über das SAP-Programm des Universitätsklinikums Würzburg und Orbis der Pathologie erfasst. Tumoren wurden gemäß der TNM-Klassifikation in bestimmten Kategorien und Grade eingeteilt. Bestandteil dieser Klassifikation ist die lokale Größe des Primärtumors (T-Stadium), die Infiltration von Lymphknoten (N-Stadium) und die Metastasierung in Sekundärorgane (M-Stadium). Zusätzlich ist in dieser Untersuchung das Grading der Tumoren, das die Differenzierung anhand von bestimmten Merkmalen der Ursprungsgewebe der Tumorzellen beurteilt, wesentlich. Die Eigenschaften der Tumore der Patienten wurden dabei von Ärztinnen und Ärzten des Universitätsklinikums Würzburg bzw. der Pathologie der Universität Würzburg bei Diagnosestellung und im Verlauf bewertet. Allerdings sind die erhobenen Daten nicht vollständig, da die vorhandenen elektronischen Patientenakten nicht

alle Aufschluss über die Tumorcharakteristika gaben. Außerdem wird das Grading bei der Bewertung der Charakteristika von Schilddrüsenkarzinomen nicht angewendet und für eine Einschätzung der Differenzierung der Prostatakarzinomzellen zudem der pathologisch erfasste Gleason-Score verwendet. Das T-Stadium wurde in die wesentlichen vier Kategorien vereinfacht, um eine bessere Übersicht zu erstellen.

2.2.3 Ethikvotum

Diese Studie wurde in Übereinstimmung mit den Richtlinien des lokalen Komitees für medizinische Ethik (Ethiknummer 146/16-MK) und der Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes durchgeführt.

2.2.4 Immunhistochemische Färbung des Vitamin D-Rezeptors

Zur Orientierung wurde das Laborprotokoll zur Färbung des VDRs von Marc Abraham verwendet, der den VDR in Paraffinschnitten von Knochenmetastasen des Mammakarzinoms und des Mammakarzinoms selbst in seiner Doktorarbeit untersuchte (Veröffentlichung siehe (119)). Er verwendete den ebenso in dieser Arbeit verwendeten VDR-Antikörper (Dianova). Sein Laborprotokoll wurde an die gegenwärtigen Laborbedingungen angepasst und durch Ergänzungen (beispielsweise die Blockierung der endogenen Peroxidase durch Wasserstoffperoxid oder die Anpassung der Inkubationszeiten/Verdünnungen) ergänzt. Diese einzelnen Schritte und Ergänzungen wurden anhand von Probeparaffinschnitten unterschiedlicher Gewebe (Niere, Leber, Knochen) erprobt und evaluiert. Somit wurde das Färbeprotokoll schrittweise für die gegenwärtigen Laborbedingungen und vorliegenden Paraffinschnitte der Knochenmetastasen verbessert.

Zur immunhistochemischen Färbung des Vitamin-D-Rezeptors (VDR) wurden die in 4%-igem Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten, auf Objektträger aufgezogenen Schnitte der Knochenmetastasen in den Färbekasten nach Hellendahl angeordnet. Darin zunächst mit Xylol zwei Mal für je zwölf Minuten und anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe, die jeweils aus einem 96 %-, 80 %- und 60 %-igem Ethanolgemisch bestand, für je zwei Minuten gewaschen. Abschließend wurde das 60 %-ige Ethanolgemisch durch entmineralisiertes Wasser ersetzt. Das Ziel dabei war es, durch das Xylol eine Entparaffinisierung und durch die absteigende Alkoholreihe und Wässerung eine

Rehydrierung der Präparate zu erreichen. Hierfür wurden die Paraffinschnitte im Färbekasten nach Hellendahl belassen und lediglich die Flüssigkeiten ausgetauscht.

Zur Demaskierung der Antigene wurden die Schnitte anschließend auf einem Objektträgergestell in einer auf 95-100°C erhitzten Target-Retrieval-Lösung im Becherglas für 15 Minuten erhitzt (HIER-Methode). Diese bestand aus einem Citratpuffer- (Dako) destilliertes Wassergemisch (1:10) mit einem pH-Wert von 6,1. Dieser Schritt erfolgte, da die durch die Formalinfixierung vernetzten Proteine der Epitope der Antigene in ihrer räumlichen Struktur maskiert waren, weshalb der Antikörper -in diesem Fall gegen den VDR- nicht spezifisch an das Epitop binden konnte. Dieses Epitop ist durch eine bestimmte Aminosäuresequenz mit spezifischer dreidimensionaler Struktur charakterisiert. Durch die HIER-Methode konnte diese Vernetzung und abweichende dreidimensionale Struktur der Proteine rückgängig gemacht werden, um die Epitope der Antigene für den VDR-Primärantikörper wieder zugänglich zu machen. Die dabei freigesetzten Calcium-Ionen wurden durch den sich in der Target-Retrieval-Lösung befindenden Citratpuffer gebunden. Um die Paraffinschnitte und das Citratpuffer-Wassergemisch anschließend wieder auf etwa 40°C abzukühlen, wurden diese im Becherglas in der Target-Retrieval-Lösung in ein kühlendes Wasserbad gestellt. Folgend -um den Citratpuffer von den Proben zu entfernen- mit PBS im Färbekasten nach Hellendahl gespült.

Im nächsten Schritt wurden die Knochenschnitte mit einem Fettstift umrandet, um eine hydrophobe Begrenzung um die Präparate herum zu schaffen. Somit flossen die in den folgenden Schritten hinzugegebenen hydrophilen Lösungen nicht vom Objektträger ab und die Präparate blieben damit stets befeuchtet. Einige Zellen des Knochens und des Knochenmarks exprimieren die endogene Peroxidase. Dementsprechend würde dieses Enzym ebenfalls das Diaminobendizin (DAB) als Substrat, welches in dieser Färbung zur Visualisierung der Antigen-Antikörper-Reaktion verwendet wurde, in das farbige Produkt umwandeln. Deshalb wurde mittels der Gabe von 200 µL 3 % Wasserstoffperoxid-Wasserlösung auf die Präparate und einer Inkubation für 15 Minuten in der dunklen Umgebung der Feuchtkammer die endogene Peroxidase des Knochens und Tumorgewebes blockiert. Anschließend erfolgte ein erneutes Waschen mit PBS drei Mal für jeweils eine Minute im Färbekasten nach Hellendahl.

Nach dem Abgießen und Abklopfen der verbliebenen PBS-Lösung auf den Präparaten, um so mögliche Verdünnungseffekte auf ein Minimum zu beschränken, erfolgte das Pipettieren von jeweils 100 µL des primären monoklonalen Vitamin-D-Rezeptor-Antikörpers (Spezies

Ratte, Dianova). Dieser wurde im Verhältnis 1:100 im Antibody Diluent (Dako) auf die Paraffinschnitte gegeben. Die Primärantikörper-Antibody Diluent-Verdünnung wurde für 60 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer auf den Schnitten der Knochenmetastasen belassen. Der Antigen-spezifische Antikörper band an das Epitop des Vitamin-D-Rezeptors, wenn dieser durch die Knochenmetastasen exprimiert wurde. Die Präparate wurden anschließend zurück in den Färbekasten nach Hellendahl gestellt und drei Mal für jeweils drei Minuten PBS-Lösung hinzugegeben, um überschüssige VDR-Antikörperlösung von den Knochenmetastasen zu entfernen.

Da die Antikörper-Antigen-Reaktion selbst bei der indirekten Immunhistochemie nicht detektierbar ist, erfolgte anschließend die Hinzugabe des Sekundärantikörpers in zwei Schritten. Da der Primärantikörper durch einen konservativen, speziesspezifischen Anteil (Fc-Fragment) und den modifizierbaren, gegen das Epitop des VDR gerichteten Anteils (Fab-Fragment) charakterisiert ist, band der Sekundärantikörper an das Fc-Fragment des primären Antikörpers. Durch die Konjugation des Sekundärantikörpers mit einem Enzym, in diesem Fall der Horseradish Peroxidase (HRP), konnte somit eine höhere Sensitivität durch eine Signalverstärkung erzielt werden. Die HRP wandelte das Chromogen (hier Diaminobenzidin) in ein unlösliches und farbiges Endprodukt um, welches dann unter dem Mikroskop wahrgenommen werden kann. Als erster Bestandteil des Sekundärantikörpers wurde der Enhancer aus dem Supervision 2-Set (Anti-Ratte, DCS) für 30 Minuten mit den Knochenmetastasen in der Feuchtkammer inkubiert. Anschließend mit PBS drei Mal für jeweils drei Minuten im Färbekasten nach Hellendahl gespült. Als zweiter Bestandteil wurden die Paraffinschnitte der Knochenmetastasen mit dem Polymer HRP wiederum für 30 Minuten inkubiert. An die Polymere sind Sekundärantikörper als auch Peroxidasemoleküle gebunden, wodurch die Sensitivität und Effektivität (kürzere Inkubationszeit) der Färbung gesteigert wurde. Daraufhin wurden die Knochenmetastasen wiederum drei Mal für jeweils drei Minuten im Färbekasten nach Hellendahl mit PBS gewaschen, um den zweiten Bestandteil des DCS Supervision 2-Sets zu entfernen.

Zur Visualisierung der Antigen-Antikörper-Reaktion wurde anschließend das DAB-Substrat-Kit (Dako) mit den Paraffinschnitten der Knochenmetastasen für 10 Minuten in der Feuchtkammer inkubiert. Folgend mit PBS für drei Mal jeweils eine Minute und mit destilliertem Wasser gespült.

Zur besseren Abgrenzung VDR-negativer Zellen erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer, wobei insbesondere die Anbindung des Farbstoffes an anionische Strukturen,

zum Beispiel der Phosphatgruppen der Nukleinsäuren des Zellkerns, erfolgte. Die Färbung wurde zunächst durch Eintauchen der Präparate für drei Minuten in der Hämatoxylin-Lösung im Färbekasten nach Hellendahl durchgeführt. Anschließend fand das Wässern unter laufendem Leitungswasser zur Anhebung des pH-Wertes und somit Blaufärbung, insbesondere der Zellkerne, statt. Schließlich wurden die Präparate mit demineralisiertem Wasser gespült, um mögliche verbliebene Mineralien des Leitungswassers auszuwaschen. Die Paraffinschnitte der Knochenmetastasen wurden folgend durch die aufsteigende Alkoholreihe mit 50 %-, 70 %-, 96 %-igem Ethanolgemisch und Isopropanol für jeweils drei Minuten und Xylol 1 und 2 für jeweils fünf Minuten im Färbekasten nach Hellendahl erneut dehydriert. Abschließend wurden Deckglässchen, die mit Entellan bestrichen wurden, zur Konservierung auf die Präparate aufgebracht und die gefärbten Knochenmetastasen luftgetrocknet.

2.2.5 Immunhistochemische Färbung der CYP24A1-Hydroxylase

Da der Vorbereitung der CYP24A1-Färbung ähnliche Arbeitsschritte und Mechanismen wie der immunhistochemischen Färbung des VDR zugrunde liegen, folgt hier lediglich eine knappe Beschreibung der einzelnen vorbereitenden Arbeitsschritte. Die in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Schnitte der Knochenmetastasen wurden zur Entparaffinisierung zunächst zweimal in Xylol für jeweils zwölf Minuten eingetaucht. Dann durch eine absteigende Ethanolreihe (96 %, 80 %, 60 %) für jeweils zwei Minuten im Färbekasten nach Hellendahl teilweise rehydriert. Anschließend erfolgte die vollständige Rehydrierung mit destilliertem Wasser für zwei Minuten.

Zur Antigendemaskierung wurden die Paraffinschnitte auf einem Objektträgergestell in einem Citratpuffergemisch (Dako) in der Verdünnung 1:10 in entmineralisiertem Wasser für 15 Minuten auf 95-100°C im Becherglas gekocht. Anschließend mitsamt dem Becherglas im Wasserbad auf etwa 40°C abgekühlt. Um die Reste des Citratpuffers von den Objektträgern zu entfernen, wurden die Schnitte drei Mal für zwei Minuten in PBS im Färbekasten nach Hellendahl gewaschen. Danach erfolgte die Umrandung mit einem Fettstift. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Knochenmetastasen mit jeweils 200 µl des 3 %-igen Wasserstoffperoxid-Wassergemisches in der dunklen Feuchtkammer, um die endogene Peroxidase des Knochengewebes und der Tumorzellen zu blockieren. Anschließend wurde die verbliebene Wasserstoffperoxid-Wasserlösung mit PBS drei Mal für eine Minute abgewaschen. Zusätzlich erfolgte bei dieser Färbung ein Proteinblock mit 5 % bovinem

Serumalbumin und 0,5 % des Detergens Triton X-100 zur Permeabilitätssteigerung in PBS-Lösung. Diese wurde jeweils zu 200 µL auf die Paraffinschnitte der Knochenmetastasen gegeben und für 20 Minuten in der Feuchtkammer auf den Knochenmetastasen belassen. Dies erfolgte zur Reduzierung unspezifischer Hintergrundfärbungen, da durch Wechselwirkungen zwischen den Antikörpern und verschiedener Gewebekomponenten eine falsch positive Farbreaktion auftreten konnte. Der die Vorbereitung der Färbung abschließende Arbeitsschritt erfolgte durch dreimaliges Waschen mit PBS für eine Minute. Der polyklonale CYP24A1-Antikörper (Spezies Kaninchen, Sigma Aldrich) wurde im Antibody Diluent (Dako) in der Verdünnung 1:200 gemischt und für die Inkubationsdauer von einer Stunde auf die Paraffinschnitte der Knochenmetastasen in der Menge von 100 µL in der Feuchtkammer gegeben. Wenn CYP24A1 von den Tumorzellen exprimiert wurde, band der polyklonale Antikörper in dieser Zeit an verschiedene Epitope des Enzyms. Daraufhin wurde das verdünnte Antikörper-Gemisch durch dreimaliges Spülen mit PBS für jeweils drei Minuten im Färbekasten nach Hellendahl abgewaschen. Anschließend 100 µL des Enhancers des Supervision-2-Kits (Anti-Kaninchen, DCS), der gegen den Fc-Teil des primären Kaninchenantikörpers gerichtet ist, für eine halbe Stunde in der Feuchtkammer auf die Schnitte gegeben. Auch dieser wurde durch dreimaliges Spülen in PBS für jeweils drei Minuten im Färbekasten nach Hellendahl wieder sorgfältig abgespült.

Dann wurden 100 µL des 2. Teils des Supervision-2-Kits Anti-Kaninchen, das mit der Horseradish Peroxidase gekoppelte Polymer-System, für 30 Minuten auf die Objektträger aufgezogenen Knochenmetastasenschnitten in der dunklen Feuchtkammer gegeben. Daraufhin erfolgte das Spülen mit PBS drei Mal für drei Minuten, um zu verhindern, dass bei Zugabe des Chromogens durch Reste des Detektionssystems eine unspezifische Hintergrundfärbung entstand.

Die Paraffinschnitte wurden nach der erfolgten Antigen-Antikörper-Reaktion und Zugabe des Detektionssystems zur Visualisierung dieser Antigen-Antikörper-Reaktion durch Erzielung eines Farbumschlags mit Diaminobenzidin (Dako) für 10 Minuten in der Feuchtkammer inkubiert. Anschließend in PBS drei Mal für jeweils eine Minute gespült und mit entsalztem Wasser zur Gegenfärbung vorbereitet. Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte durch das Hämatoxylin nach Meyer. Hierzu wurden die Paraffinschnitte für 3 Minuten in das Hämatoxylin im Färbekasten nach Hellendahl gestellt und anschließend mit fließendem Leitungswasser für 10 Minuten gewässert, sodass eine Blaufärbung azider Strukturen erfolgte. Folgend wurden die Paraffinschnitte mit entsalztem Wasser gespült und die

2. Material und Methoden

gefärbten Schnitte zunächst mit der aufsteigenden Alkoholreihe in 50 %-, 70 %-, und 96 %igem Ethanolgemisch für jeweils drei Minuten entwässert. Zur Überbrückung zwischen Ethanol und Xylol in Folge für drei Minuten in Isopropanol im Färbekasten nach Hellendahl entwässert. Abschließend erfolgte das zweimalige Eintauchen in Xylol für jeweils fünf Minuten. Schließlich wurden die Deckglässchen mit Entellan bestrichen, auf die gefärbten Schnitte aufgebracht und getrocknet.

2.3 Auswertung

2.3.1 Kontrollen

Die Antikörper der immunhistochemischen Färbung können theoretisch nur an den spezifischen Epitopen der Antigene binden. Allerdings ist dies nicht immer der Fall, sodass eine Negativ- und Positivkontrolle der Färbung unabdingbar ist. Zur Qualitätssicherung wurden pro 15 gefärbter Paraffinschnitte eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt, die zudem als Orientierung für die Auswertung der Färbung dienten. Für die Positivkontrolle wurde Nierengewebe verwendet, das den VDR und CYP24A1 stark exprimiert. Als Negativkontrollen wurden Knochenmetastasen verwendet, die eine deutliche Infiltration des Knochens durch das Tumorgewebe zeigten. Dabei wurde statt des CYP24A1-Antikörpers zur Negativkontrolle Kaninchenserum (Sigma Aldrich) verwendet und in PBS verdünnt, sodass die gleiche Proteinkonzentration des Kaninchensersums wie des CYP24A1-Antikörpers vorlag. Dieses Kaninchenserum- PBS-Gemisch wurde dann in der gleichen Verdünnung (1:200) im Antibody Diluent (Dako) anstelle des CYP24A1-Antikörpers auf die Negativkontrolle der Färbung gegeben. Außerdem auf die gleiche Art und Weise vorbereitet, für die gleiche Zeit inkubiert und mit demselben Detektionssystem behandelt. Bei der Färbung des VDRs kam Rattenserum in gleicher Vorgehensweise wie bei der beschriebenen CYP24A1-Färbung zum Einsatz.

2.3.2 Auswertung anhand des Immunoreactive Scores

Für die Auswertung der gefärbten Schnitte wurde das Zeiss Mikroskop Axio Observer 7 verwendet. Charakteristische und repräsentative Stellen der Präparate (etwa 4-5) wurden mit Fotoaufnahmen der in das Mikroskop integrierten Farbkamera ZEISS AxioCam 305 color dokumentiert. Eine 5-fache Vergrößerung diente dabei für Übersichtsaufnahmen und die 20-fache Vergrößerung für Detailaufnahmen. Die Knochenmetastasen wurden durch eine Pathologin (Dr. med. Manuela Weißenberger), einen in der Auswertung von immunhistochemischen Präparaten erfahrenen Oberarzt (Priv.-Doz. Dr. med. Konstantin Horas) und mich anhand der histologischen Kriterien von Tumorzellen identifiziert und bewertet. Die Auswertung erfolgte verblindet. Die Bewertenden wussten zum Zeitpunkt der Auswertung nicht, welche Eigenschaften oder Charakteristika die Tumoren aufweisen oder welche Art von Primärtumor vorliegt.

Da der VDR-Antikörper nukleär und zytoplasmatisch detektiert wurde, wurden braune Nuklei und Zytoplasma als positives Signal bewertet, während ein blaues/graues Farbsignal

als negativ gewertet wurde. Die Färbung des Nukleus und des Zytoplasmas wurde dabei separat bewertet und zudem die VDR-Expression insgesamt evaluiert. Das CYP24A1-Enzym ist vor allem im Zytosol und in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert, weshalb eine Braunfärbung des Zytoplasmas als positiv gewertet wurde. Die Zellkerne bei dieser Färbung waren blau angefärbt. Zur Auswertung der Knochenmetastasen wurde der Immunoreactive Score (IRS) verwendet (siehe Tabelle 6), der zum einen den Anteil der positiv gefärbten Zellen und zum anderen die Intensität der Färbung bewertet. Im klinischen Alltag kommt der IRS insbesondere bei der Beurteilung von Mammakarzinomen zum Einsatz. Ebenso wurde dieses Bewertungsschema in verschiedenen Publikationen, die auch immunhistochemische Verfahren zur Bestimmung der VDR-Expression anwendeten, verwendet (113, 115, 130, 131). Der Anteil der positiven Zellen und die Intensität der Färbung wurde multipliziert, sodass ein Produkt zwischen 0 und 12 entstand. Von diesem Produkt war es dann möglich, eine Einordnung in vier unterschiedliche Kategorien (negativ, mild, moderat und stark positiv) vorzunehmen. Zusätzlich wurden die Knochenmetastasen zur Vereinfachung in eine Gruppe mit einer hohen Expression des VDRs/CYP24A1-Enzyms und einer niedrigen Expression eingeordnet. Der Schwellen-IRS-Wert lag dabei bei 5.

Tabelle 6 Tabellarische Übersicht des Immunoreactive Scores. Zum einen wurde der Anteil der positiven Zellen der Färbung beurteilt und zum anderen die Intensität der Färbung, die dann multipliziert wurden, sodass ein Produkt zwischen 0 und 12 entstand, das dann in verschiedene Kategorien der Stärke der Färbung eingestuft wurde.

A (Anteil der positiven Zellen)	B (Intensität der Färbung)	IRS-Score (Multiplikation von A und B)
0= keine positiven Zellen	0=keine Farbreaktion	0-1=negativ
1= <10% der Zellen positiv	1=milde Farbreaktion	2-3=mild
2= 10-50% der Zellen positiv	2=moderate Farbreaktion	4-8=moderat
3= 51-80% der Zellen positiv	3=intensive Farbreaktion	9-12=stark positiv
4= >80% der Zellen positiv	IRS-Score=A*B=0-12	

2.4 Statistik

Zunächst erfolgte die deskriptive Auswertung der Patientendaten und der Bewertung der gefärbten Knochenmetastasen mit Microsoft 365 Excel und SPSS 27. Der Mittelwert des Immunoreactive Scores der Auswertungen der einzelnen Bewertenden wurde gebildet, um so mögliche subjektive Einflüsse zu minimieren und eine objektivere Einschätzung der Expression des VDRs und von CYP24A1 der Knochenmetastasen zu ermöglichen. Die Mittelwerte des Immunoreactive Scores wurden in die vier unterschiedlichen Kategorien (von negativ bis stark positiv) eingeteilt (siehe Tabelle 6) und in die zwei Gruppen eingeordnet. Diese deskriptive Statistik wurde zur besseren Übersicht in tabellarischer Form oder in Grafiken mit Microsoft 365 Excel/SPSS 27 zusammengefasst. Die weitere statistische Auswertung erfolgte mit IBM SPSS Version 27. Hierbei erfolgten zunächst die Tests auf Normalverteilung von Shapiro-Wilk und Kolmogorov-Smirnov, um den geeigneten statistischen Test der jeweiligen Daten zu bestimmen. Zur Korrelation der Charakteristika der Tumoren (Grading, T-Stadium der Tumoren) wurde Pearsons Chi-quadrat-Test für nicht normalverteilte Daten und unabhängige Stichproben verwendet. Als nichtparametrisches Verfahren zwischen verschiedenen Gruppen zum Beispiel der PatientInnen mit weiteren Metastasen neben den Knochenmetastasen und Patientinnen und Patienten ohne weitere Metastasen wurde der Mann-Whitney-U-Test für nicht normalverteilte Daten verwendet. Außerdem wurde der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient zur Korrelation u.a. der VDR- und CYP24A1 Expression, also zwischen zwei mindestens ordinal skalierten Variablen, verwendet. Diese statistischen Tests wurden zudem zur graphischen Veranschaulichung als Säulen-/Balkendiagramm oder einfaches Streudiagramm mit Anpassungslinie mit Hilfe von SPSS Version 27 erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv bestand zunächst aus 78 Patientinnen und Patienten, die infolge einer Tumorerkrankung Knochenmetastasen entwickelten und in den Jahren 2000 bis 2017 aufgrund der Tumorerkrankung im Universitätsklinikum Würzburg behandelt wurden. Bei den Patientinnen und Patienten fand eine Resektion oder eine Biopsie der Knochenläsion statt, die anschließend durch immunhistochemische Untersuchungen des Pathologischen Institutes der Universität Würzburg als Knochenmetastase identifiziert wurden. Jedoch mussten zwölf Patientinnen und Patienten aufgrund einer unzureichenden Qualität der Schnitte, wodurch teilweise kein Tumormaterial auf den Paraffinschnitten vorhanden war, ausgeschlossen werden. Ziel der Auswahl der Patientinnen und Patienten war es, möglichst ein breites Spektrum von Knochenmetastasen unterschiedlicher Primarien zu untersuchen. Zunächst werden nun Charakteristika des Studienkollektives mittels deskriptiver Statistik beschrieben.

3.1.1 Geschlecht und Alter

Das Patientenkollektiv umfasste 35 (53 %) Frauen und 31 Männer (47 %). Bei Diagnosestellung des Primärkarzinoms waren die Patientinnen und Patienten im Durchschnitt 61,81 Jahre alt. Die Patientinnen und Patienten waren bei Resektion oder Biopsie der Knochenmetastase zwischen 38 und 91 Jahre alt, der Mittelwert des Patientenalters betrug 64,45 Jahre. Die Resektion oder Biopsie der Knochenmetastase erfolgte im Durchschnitt somit etwa 2,64 Jahre nach der Diagnosestellung des Primärtumors.

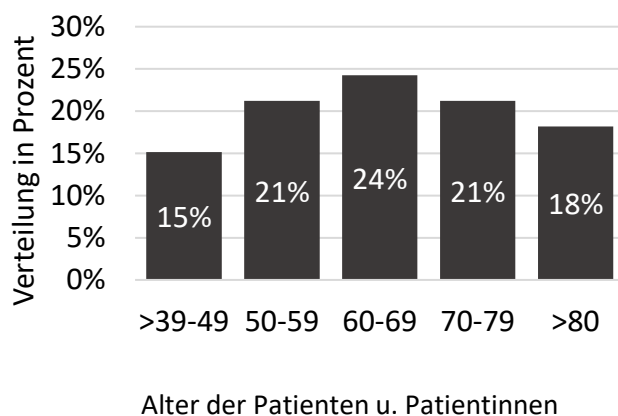


Abbildung 6 Altersverteilung bei Entnahme der Knochenmetastasen, n=66

3.1.2 Art des Primärtumors

Am häufigsten hatten 16 Patientinnen (24 %) des Patientenkollektives ein Primärkarzinom der Brust (siehe Abbildung 7). Insgesamt 13 (20 %) der Patientinnen und Patienten hatten ein Karzinom des Harntraktes, wovon elf Patientinnen und Patienten ein Nierenkarzinom und zwei ein Urothelkarzinom aufwiesen. Außerdem wurden elf Patientinnen und Patienten (17 %) mit einem Lungenkarzinom, acht mit Prostatakarzinom (12 %) und fünf mit Schilddrüsenkarzinom (8 %) in das Studienkollektiv aufgenommen. In der Kategorie gastrointestinale Karzinome (14 %) wurden fünf Patientinnen und Patienten mit colorektalem Karzinom, zwei mit Pankreaskarzinom und jeweils ein Patient mit einer malignen Neoplasie des Ösophagus und der Leber zusammengefasst. Der Gruppe andere (6 %) wurden zwei Patientinnen mit Plattenepithelkarzinom der Mundschleimhaut, ein Patient mit Parotiskarzinom und eine Patientin mit Olfactoriusneuroblastom zugeordnet.

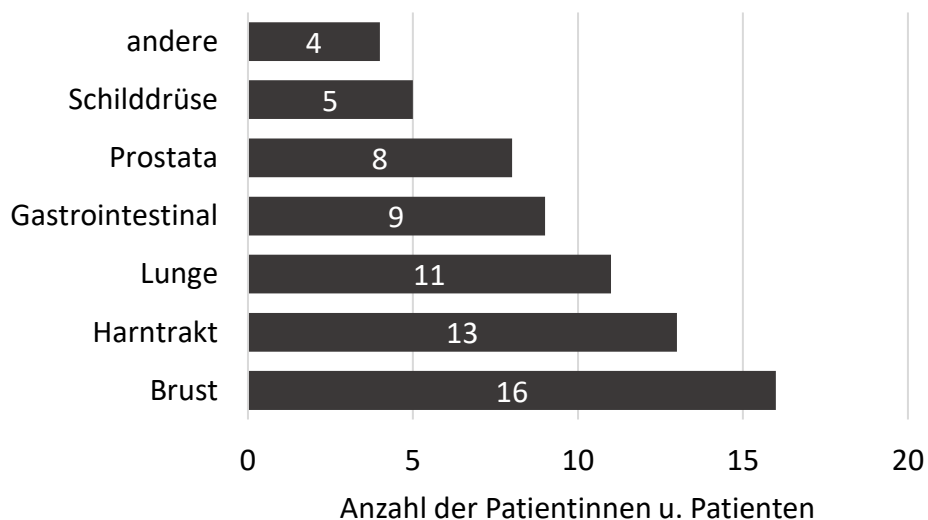


Abbildung 7 Anzahl der unterschiedlichen Primärkarzinome in der Studienpopulation.

3.1.3 TNM-Klassifikation und Grading der Tumoren

Eine Übersicht der Verteilung der TNM-Klassifikation der Primärtumoren des Patientenkollektives zeigt Tabelle 7. Da sich zwischen den Tumorentitäten die Anzahl von befallenen Lymphknoten teilweise ausgeprägt unterscheidet, um in ein bestimmtes N-Stadium der TNM-Klassifikation eingeordnet zu werden, ist das N-Stadium zwischen den unterschiedlichen Primärtumoren eingeschränkt vergleichbar. Deshalb ist hier beispielsweise beim Stadium des Lymphknotenbefalls (N-Stadium) nur angegeben, ob Lymphknotenmetastasen vorlagen (N+) oder keine diagnostiziert wurden (N0). Ebenso unterscheidet sich die Ausdehnung/Infiltrationstiefe zwischen den Tumoren in den einzelnen T-Stadien. Allerdings lässt sich auch bei unterschiedlichen Tumoren durch das T-Stadium einordnen und vergleichen, ob diese Tumoren lokal weit fortgeschritten sind (T4) oder noch sehr klein (T1), weshalb in Tabelle 7 alle T-Stadien zusammengefasst aufgeführt sind. Teilweise waren die Angaben der TNM-Stadien nicht vollständig (siehe Tabelle 7). Alle Tumoren der Patientinnen und Patienten wurden durch das Vorliegen der Knochenmetastase nach der TNM-Klassifikation als M1 klassifiziert. Diese Kategorie ist daher nicht in der Tabelle aufgeführt. Zusätzlich hatten die Patientinnen und Patienten zu 47 % neben den Knochenmetastasen weitere extraossäre Metastasen vorliegen.

Tabelle 7 Die Tabelle zeigt eine Übersicht der TNM-Klassifikation, des Gradings der Primärtumoren und die Information über extraossäre Metastasen anteilig am gesamten Studienkollektiv.

TNM	Anzahl Tumoren	
T unbekannt	11	17 %
T1	5	8 %
T2	17	26 %
T3	19	29 %
T4	14	21 %
N unbekannt	18	27 %
N0	16	24 %
N+	36	49 %
G unbekannt/nicht angewendet	13	20 %
G1	5	8 %
G2	28	42 %
G3	20	30 %
keine extraossäre Metastasen	29	43 %
extraossäre Metastasen	31	47 %
unbekannt	6	10%

3.1.4 Lokalisation der Knochenmetastasen

Die Knochenmetastasen wurden entweder durch eine Biopsie oder eine Resektion entnommen. Zu 65 % der Knochenmetastasen handelte es sich um ein Resektat der Knochenmetastase beispielsweise in Folge einer durch die Knochenmetastase bedingten Schenkelhalsfraktur. Die häufigste Lokalisation der Knochenmetastasen war in dieser Studienpopulation das Femur mit 52 %. Weitere Lokalisationen der Knochenmetastasen waren die Wirbelkörper (17 %), der Humerus (9 %) und weniger häufigere Manifestationsorte wie die Scapula oder der Radius, die unter „andere“ in Abbildung 8 zusammengefasst sind.

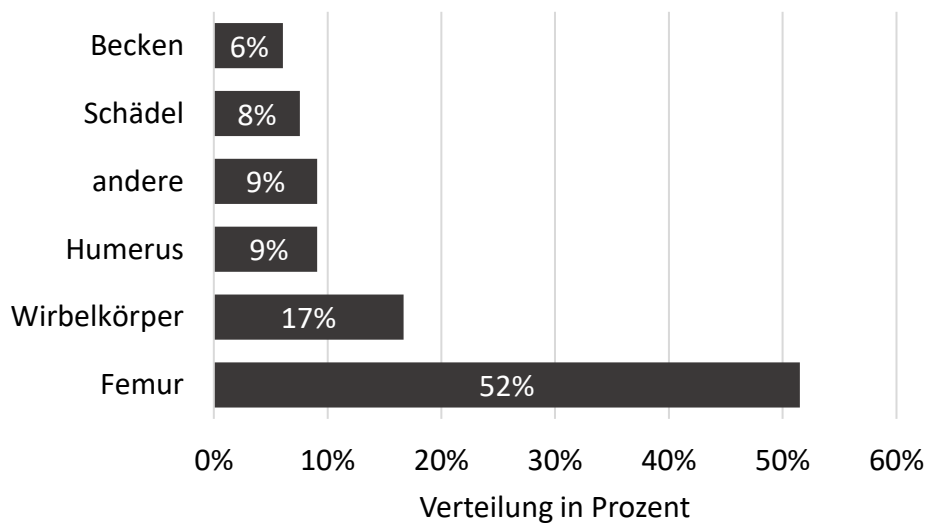


Abbildung 8 Übersicht der Lokalisation der Knochenmetastasen

3.1.5 Überlebensdaten

Der Median des Überlebens nach Diagnose der Knochenmetastase betrug 18 Monate (95 % CI 9,36 Monate-26,63 Monate) für einen Teil der Studienpopulation (n=34) mit einer Spanne von einem Monat bis 120 Monate. Die Überlebensdaten sind in der Kaplan-Meier-Kurve (Abbildung 9) als Überlebensfunktion dargestellt. Damit ist leider nur ein Teil der Überlebensdaten des gesamten Studienkollektivs von 66 Patientinnen und Patienten verfügbar. Eine weitere nähere Betrachtung der Überlebensraten des Studienkollektivs wie zum Beispiel ein Vergleich nach Tumorstadien oder Expression des VDRs erscheint aufgrund der geringen Datenmenge nicht sinnvoll.

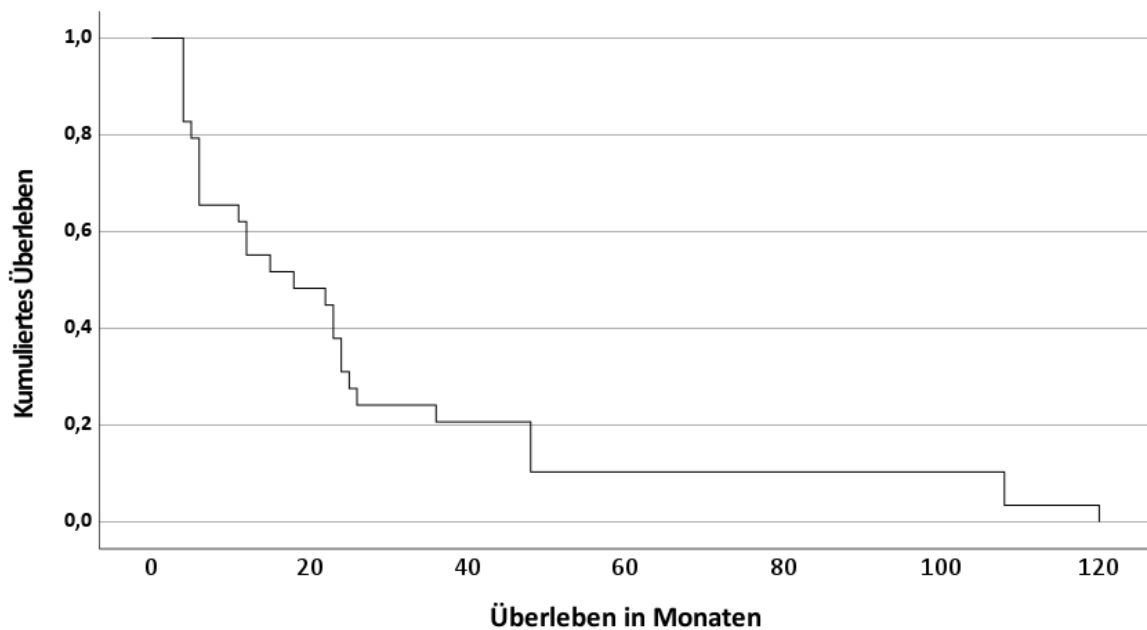


Abbildung 9 Kaplan-Meier-Kurve eines Teils des Studienkollektivs (n= 34)

3.2 Histologische Untersuchungen der Knochenmetastasen

Im folgenden Kapitel wird nun die Auswertung der Färbungen des VDRs und des CYP24A1-Enzyms zusammengefasst. Dabei wird zunächst ein Überblick der VDR- und CYP24A1-Expression der Knochenmetastasen im Allgemeinen gegeben und anschließend die Knochenmetastasen geordnet nach Primärtumorentität betrachtet.

3.2.1 Auswertung der Färbung des Vitamin D-Rezeptors

3.2.1.1 Negativ- und Positivkontrolle

Um eine Kontrolle der Färbungen zu gewährleisten und eine bessere Auswertbarkeit der VDR-Färbung zu ermöglichen, wurde als Positivkontrolle gesundes Nierengewebe aus dem pathologischen Institut der Universität Würzburg verwendet. Der VDR wird durch die Zellen der Niere insbesondere im Bereich der distalen Tubuli und Sammelrohre exprimiert (siehe Abbildung 10). Pro 15 Schnitte der Knochenmetastasen wurde im Färbeprozess jeweils eine Negativ- und eine Positivkontrolle verwendet.

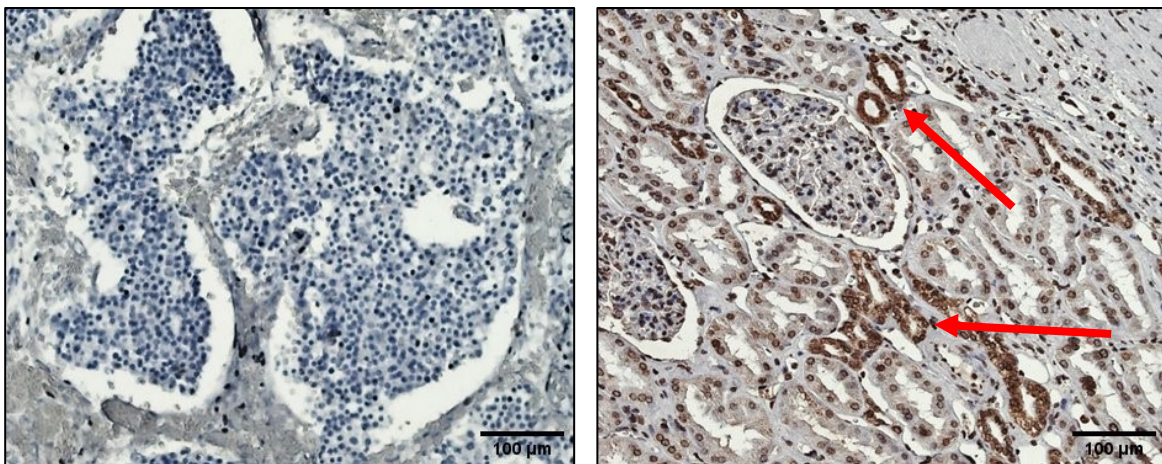


Abbildung 10 Lichtmikroskopische Aufnahmen, die mit dem 20er-Objektiv aufgenommen wurden. Links: Negativkontrolle der VDR-Färbung. Dabei wurde die Knochenmetastase eines Patienten mit Prostatakarzinom verwendet. Die Zellkerne sind blau angefärbt. Rechts: Färbung des VDRs des gesunden Nierengewebes, insbesondere die distalen Tubuli und Sammelrohre (rote Pfeile) zeigen eine intensive Anfärbung durch den VDR-Antikörper. Balken = 100 µm.

3.2.1.2 Auswertung der VDR-Färbung des Nukleus nach Tumorentität des Primärtumors

Wie im Methodenteil beschrieben, wurde zur Auswertung der VDR-Expression der IRS verwendet, der die Expression des VDRs in vier Kategorien zusammenfasst (von negativ bis stark positiv). Neben der Expression des VDRs im Nukleus der Zellen konnte dieser ebenso im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen werden. Der VDR wurde in 30,3 % der Paraffinschnitte (20 Fälle) als stark positiv bewertet, insbesondere war der VDR-Antikörper gegen die Knochenmetastasen des Prostatakarzinoms sehr stark immunoreaktiv. Weitere 41 % der Fälle wurden als moderat positiv bewertet (27 Patientinnen und Patienten), während mild positive Fälle zu 19,7 % (13 Fälle) und komplett negativ bewertete Paraffinschnitte zu 9,1 % (sechs Fälle) selten waren (siehe Tabelle 8).

***Tabelle 8** Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der VDR-Färbung des Nukleus des Immunoreactive Scores nach Primärkarzinomen geordnet. Zudem ist in der letzten Zeile eine Zusammenfassung der Expression des VDRs der Knochenmetastasen insgesamt aufgeführt, wobei der jeweilige Anteil sich auf die Gesamtzahl (66) der Knochenmetastasen bezieht.*

Primarius	Anzahl Fälle	negativ	mild positiv	moderat positiv	stark positiv
Prostata	8	0 0 %	0 0 %	3 38 %	5 63 %
Gastrointestinal	9	1 11 %	0 0 %	6 67 %	2 22 %
Lunge	11	1 9 %	4 36 %	3 27 %	3 27 %
Schilddrüse	5	0 0 %	1 20 %	3 60 %	1 20 %
Brust	16	3 19 %	5 31 %	7 44 %	1 6 %
Harnwege	13	1 8 %	3 23 %	3 23 %	6 46 %
andere	4	0 0 %	0 0 %	2 50 %	2 50 %
insgesamt	66	6 9 %	13 20 %	27 41 %	20 30 %

Nach Entität des Primärtumors hatten in diesem Studienkollektiv die Patienten mit Knochenmetastasen des Prostatakarzinoms die durchschnittlich höchste Expression des VDRs (siehe Abbildung 11). Patientinnen mit Mammakarzinom wiesen im Vergleich die niedrigste Expression des VDRs auf, wobei 19 % der Knochenmetastasen des Mammakarzinoms VDR- negativ waren. Zur besseren Übersichtlichkeit und Validität der Untersuchungen wurde die Expression des VDRs in eine Gruppe mit einer hohen Expression des VDRs und in eine Gruppe mit einer negativ bis niedrigen VDR-Expression mit Hilfe des IRS eingeteilt. Insgesamt ergab sich somit bei 71 % der Knochenmetastasen eine hohe Proteinexpression des VDRs und bei 29 % eine niedrige Expression des VDRs. Dabei hatten

insbesondere die Knochenmetastasen der Brust- und Lungenkarzinome mehr Knochenmetastasen mit einer negativ bis niedrigen VDR-Expression (siehe Abbildung 11).

Protein Expression: ■ = hoch ■ =niedrig

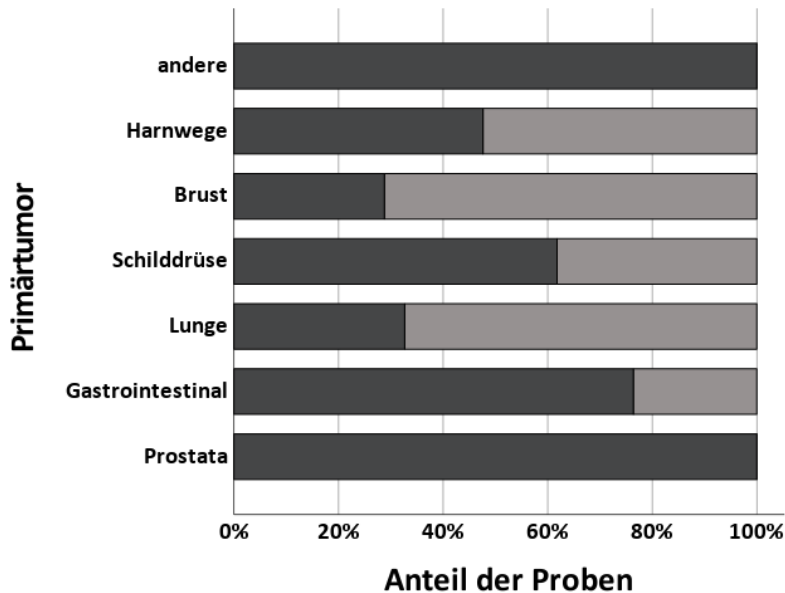


Abbildung 11 Übersicht der Proteinexpression des VDRs des Nukleus nach Gruppen eingeteilt und nach Entität des Primärtumors geordnet (hellgrau= niedrige VDR-Expression, dunkelgrau=hohe VDR-Expression). Diese Abbildung erschien ebenso in ähnlicher Form in einer eigenen Publikation (132). Als open access-Artikel/creative commons-Lizenz frei verwendbar: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

3.2.1.3 Auswertung der VDR-Expression des Zytoplasmas nach Tumorentität des Primärtumors

Interessanterweise zeigten einige Knochenmetastasen ebenso eine unterschiedliche Expression des VDRs im Zytoplasma. Deshalb wurde die Expression des VDRs im Zytoplasma der Knochenmetastasen ebenso ausgewertet und in vier Kategorien von negativ bis stark positiv eingeordnet. Insgesamt wurden zwölf der Knochenmetastasen (18 %) als negativ bewertet, während jeweils 17 als mild positiv (26 %) oder stark positiv bewertet wurden. Mit 20 (30 %) der bewerteten Knochenmetastasen wurden die meisten Knochenmetastasen in die Kategorie moderat positiv eingestuft.

3. Ergebnisse

Table 9 Übersicht der Ergebnisse der VDR-Färbung des Zytoplasmas des Immunoreactive Scores nach Primärkarzinomen geordnet.

Primarius	Anzahl Fälle	negativ	mild positiv	moderat positiv	stark positiv
Prostata	8	2 25 %	4 50 %	1 13 %	1 13 %
Gastrointestinal	9	0 0 %	1 11 %	4 44 %	4 44 %
Lunge	11	4 36 %	3 27 %	0 0 %	4 36 %
Schilddrüse	5	0 0 %	0 0 %	2 40 %	3 60 %
Brust	16	3 19 %	5 31 %	7 44 %	1 6 %
Harnwege	13	2 15 %	3 23 %	6 46 %	2 15 %
Andere	4	1 25 %	1 25 %	0 0 %	2 50 %
Insgesamt	66	12 18 %	17 26 %	20 30 %	17 26 %

Nach Primärtumor der Knochenmetastasen hatten die Tumoren der gastrointestinalen Tumore und der Schilddrüsenkarzinome die höchste Expression des VDRs im Zytoplasma. Interessanterweise zeigten hierbei die Knochenmetastasen des Prostata- und Lungenkarzinoms eine niedrige Expression des VDRs im Zytoplasma. Ebenso wie bei der Auswertung der Färbung des Nukleus wurden die nach der Expression des VDRs im Zytoplasma ausgewerteten Knochenmetastasen zur besseren Übersichtlichkeit in zwei Gruppen der Proteinexpression eingeteilt (siehe Abbildung 12). Es zeigten somit 56 % der Knochenmetastasen eine hohe Expression des VDRs im Zytoplasma.

Protein Expression: = hoch =niedrig

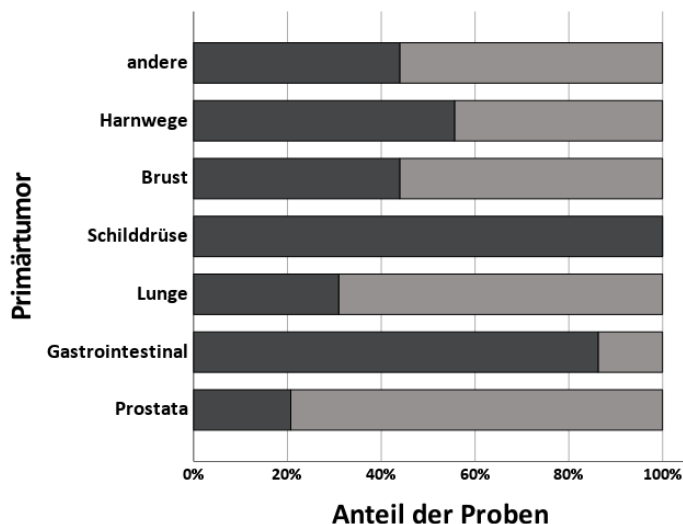


Abbildung 12 Übersicht der Proteinexpression des VDRs des Zytoplasmas nach Gruppen eingeteilt (hellgrau= niedrige VDR-Expression, dunkelgrau=hohe VDR-Expression) und nach Entität des Primärtumors geordnet. Diese Abbildung erschien ebenso in ähnlicher Form in einer eigenen Publikation (132). Als open access-Artikel/creative commons-Lizenz frei verwendbar: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

3.2.1.4 Auswertung der VDR-Expression insgesamt nach Tumorentität des Primärtumors

Auch wurde die Expression des VDRs im Zytoplasma und Nukleus insgesamt ausgewertet. Die Expression der Knochenmetastasen des VDRs insgesamt wurde ebenso in vier Kategorien von negativ bis stark positiv eingeordnet. Sieben der 66 Knochenmetastasen wurden als negativ bewertet (11 %), während 20 (30 %) als mild positiv ausgewertet wurden. Mit 25 Knochenmetastasen wurden die meisten als moderat positiv eingestuft (38 %) und 14 der 66 (21 %) ausgewerteten Knochenmetastasen als stark positiv.

Table 10 Übersicht der Ergebnisse der VDR-Proteinexpression insgesamt des Immunoreactive Scores nach Primärkarzinomen geordnet. Zudem ist in der letzten Zeile eine Zusammenfassung der Expression des VDRs der Knochenmetastasen insgesamt aufgeführt, wobei der jeweilige Anteil sich auf die Gesamtzahl (66) der Knochenmetastasen bezieht.

Primarius	Anzahl Fälle	negativ		mild positiv		moderat positiv		stark positiv	
Prostata	8	0	0%	1	13%	5	63%	2	25%
Gastrointestinal	9	0	0%	2	22%	4	44%	3	33%
Lunge	11	2	18%	4	36%	2	18%	3	27%
Schilddrüse	5	0	0%	1	20%	3	60%	1	20%
Brust	16	4	25%	6	38%	5	31%	1	6%
Harnwege	13	1	8%	4	31%	6	46%	2	15%
andere	4	0	0%	2	50%	0	0%	2	50%
Insgesamt	66	7	11%	20	30%	25	38%	14	21%

Nach Primärtumoren geordnet hatten in diesem Studienkollektiv die Patienten und Patientinnen mit Knochenmetastasen des Prostatakarzinoms die höchste Expression des VDRs (siehe Abbildung 13). Insbesondere die Knochenmetastasen der Brust- und Lungenkarzinome hatten währenddessen mehr Knochenmetastasen mit einer negativ bis niedrigen VDR-Expression. Zur besseren Übersichtlichkeit und der Untersuchungen wurde die Gesamtexpression des VDRs in eine Gruppe mit einer hohen Expression des VDRs und in eine Gruppe mit einer negativ bis niedrigen VDR-Expression mit Hilfe des IRS eingeteilt. Insgesamt konnten somit bei 59 % der Knochenmetastasen eine hohe Expression des VDRs insgesamt durch Immunhistochemie nachgewiesen werden.

3. Ergebnisse

Protein Expression: ■ = hoch ■ =niedrig

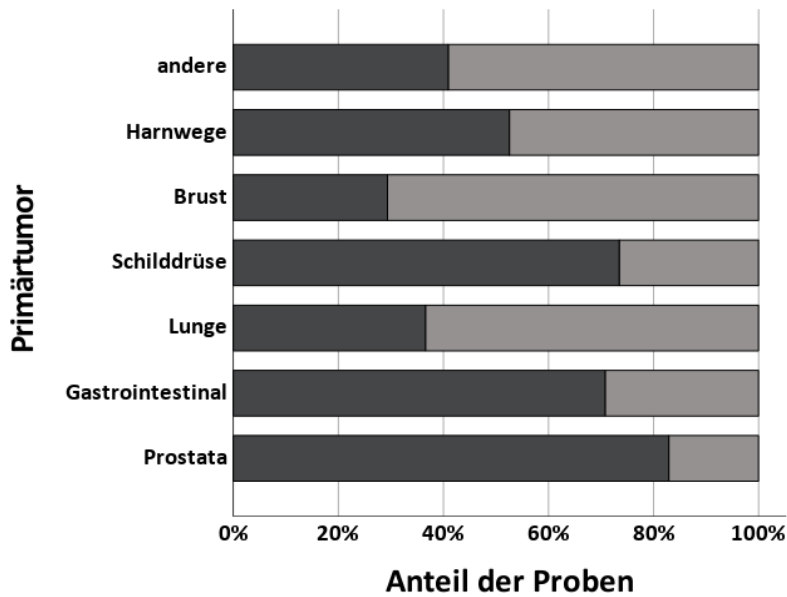


Abbildung 13 Übersicht der Proteinexpression des VDRs insgesamt nach Gruppen eingeteilt (hellgrau= niedrige VDR-Expression, dunkelgrau=hohe VDR-Expression) und nach Entität des Primärtumors geordnet. Diese Abbildung erschien ebenso in ähnlicher Form in einer eigenen Publikation (132). Als open access-Artikel/creative commons-Lizenz frei verwendbar: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

3.2.2 Auswertung der Färbung von CYP24A1

3.2.2.1 Positiv- und Negativkontrolle

Zunächst wurde das Färbeprotokoll des CYP24A1-Enzyms durch einen mehrschrittigen Prozess etabliert und anhand von Probeschnitten unterschiedlicher gesunder Gewebe wie Knochen, Leber, Darm und Niere entsprechend angepasst. Zur Qualitätskontrolle und Auswertung der Knochenmetastasen wurde bei der Färbung des CYP24A1-Enzyms gesundes Nierengewebe des Pathologischen Institutes der Universität Würzburg als Positivkontrolle verwendet, das CYP24A1 exprimiert. Pro 15 Schnitte der Knochenmetastasen wurde im Färbeprozess hierbei ebenso jeweils eine Negativ- und eine Positivkontrolle verwendet. Auch hier zeigte sich eine Färbung der distalen Tubuli und Sammelrohre der Niere, während die Glomeruli keine durch Immunhistologie nachweisbare Expression von CYP24A1 aufwiesen.

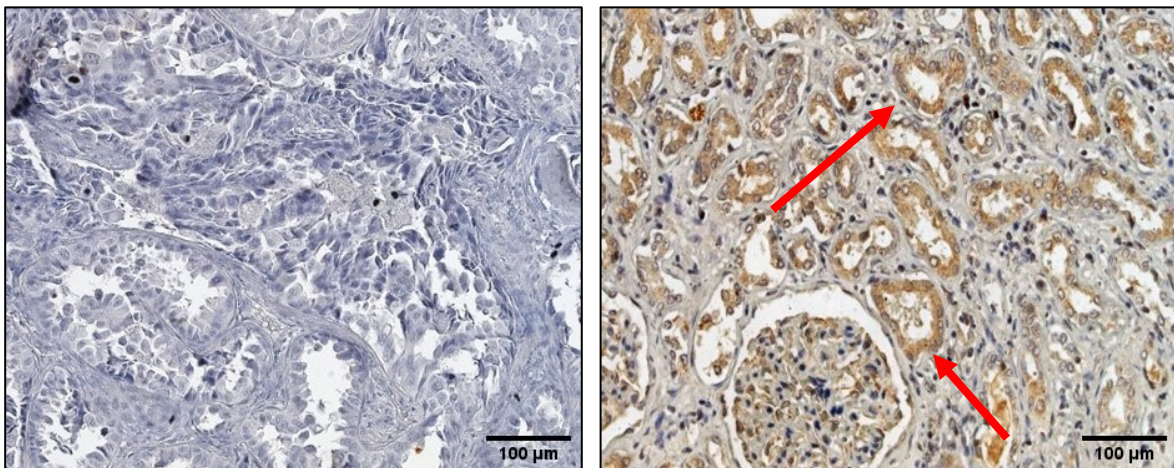


Abbildung 14 Lichtmikroskopische Aufnahmen, die mit dem 20er Objektiv aufgenommen wurden. Links: Knochenmetastase eines Nierenkarzinoms als Negativkontrolle der CYP24A1-Färbung. Deutliche Blaufärbung der Zellkerne und blaugraue Färbung des umgebenden Stromas. Rechts: gesundes Nierengewebe als Positivkontrolle der CYP24A1-Färbung. Insbesondere die distalen Tubuli der Nieren exprimieren das CYP24A1-Enzym stark. Balken = 100 µm.

3.2.2.2 Auswertung der CYP24A1-Färbung nach der Tumorentität des Primärtumors

Ähnlich wie bei der Färbung des VDR zeigte der CYP24A1-Antikörper insgesamt eine über die Knochenmetastasen der verschiedenen Primärtumoren breit verteilte, durch die Färbemethoden nachgewiesene Immunreaktivität. Insgesamt wurden 24,2 % (16) der gefärbten Knochenmetastasen als stark positiv bewertet. Am häufigsten zeigten mit 35 % (23) der Paraffinschnitte eine moderat positive Farbreaktion. Seltener wurden 28,8 % (19 Fälle) als mild positiv und acht (12 %) der ausgewerteten Knochenmetastasen als negativ bewertet.

Table 11 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der Auswertungen nach Immunoreactive Score der CYP24A1-Färbung nach Primärkarzinomen geordnet und eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Knochenmetastasen insgesamt.

Primarius	Anzahl Fälle	negativ		mild positiv		moderat positiv		stark positiv	
Prostata	8	0	0 %	2	25 %	4	50 %	2	25 %
Gastrointestinal	9	0	0 %	2	22 %	3	33 %	4	44 %
Lunge	11	3	27 %	2	18 %	4	36 %	2	18 %
Schilddrüse	5	1	20 %	1	20 %	2	40 %	1	20 %
Brust	16	2	13 %	7	44 %	4	25 %	3	19 %
Harnwege	13	2	15 %	4	31 %	4	31 %	3	23 %
andere	4	0	0 %	1	25 %	2	50 %	1	25 %
Insgesamt	66	8	12 %	19	29 %	23	35 %	16	24 %

Im Vergleich der Expression von CYP24A1 der Knochenmetastasen zwischen den Primärkarzinomen hatten in diesem Studienkollektiv die Patienten mit Knochenmetastasen des Gastrointestinaltraktes anteilig die meisten Knochenmetastasen mit einer hohen CYP24A1-Expression (siehe Abbildung 15). Ebenso hatten vergleichsweise viele Knochenmetastasen des Prostatakarzinoms ähnlich der VDR-Expression eine hohe Expression der 24-Hydroxylase. Patientinnen und Patienten mit Knochenmetastasen der Lungen- und Brusttumoren wiesen die niedrigste Expression des CYP24A1-Enzyms auf. Insgesamt zeigte sich allerdings eine recht gleichmäßig verteilte Expression des CYP24A1-Enzyms über die Knochenmetastasen der verschiedenen Primärtumoren.

3. Ergebnisse

Protein Expression: = hoch =niedrig

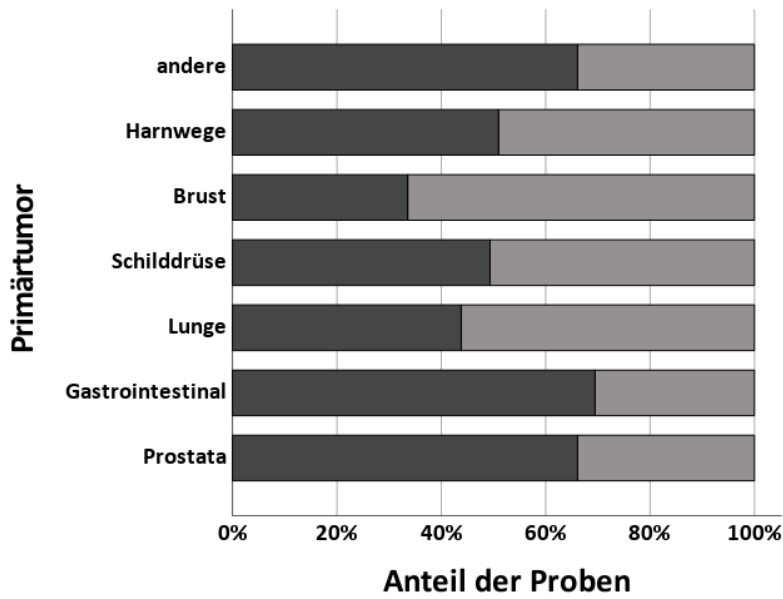


Abbildung 15 Übersicht der Proteinexpression des CYP24A1-Enzyms nach Gruppen eingeteilt (hellgrau= niedrige VDR-Expression, dunkelgrau=hohe VDR-Expression) und nach Entität des Primärtumors geordnet.

3.2.3 Auswertung der Färbungen der Knochenmetastasen der Prostata

Insgesamt wurden acht Fälle von Knochenmetastasen des Prostatakarzinoms auf das Proteinlevel des VDR- und CYP24A1 durch Immunhistochemie untersucht. Dies waren etwa zwölf Prozent der untersuchten Knochenmetastasen insgesamt. Die Auswertung der Färbung des VDRs ergab dabei, dass fünf Knochenmetastasen (62,5 %) den VDR stark positiv im Nukleus exprimieren und weitere drei Fälle (37,5 %) der Färbung den VDR moderat positiv. Das Zytoplasma der VDR-Färbung wurde in zwei Fällen (25 %) negativ, in vier (50 %) mild positiv und in jeweils einem Fall (12,5 %) moderat positiv bzw. stark positiv bewertet. Insgesamt zeigte sich eine hohe VDR-Expression bei etwa 87 % der Knochenmetastasen. Die Färbung des CYP24A1-Enzyms zeigte zwei mild positive (25 %), vier moderat positive (50 %) und zwei stark positive (25 %) Ergebnisse. Vergleichsweise exprimieren die Knochenmetastasen des Prostatakarzinoms den VDR im Zytoplasma deutlich seltener, während die VDR-Expression des Nukleus häufig als stark positiv bewertet wurde. In Abbildung 16 ist eine Übersicht der Proteinexpression des VDRs unterschiedlicher Lokalisationen und von CYP24A1 dargestellt.

Protein Expression: = hoch =niedrig

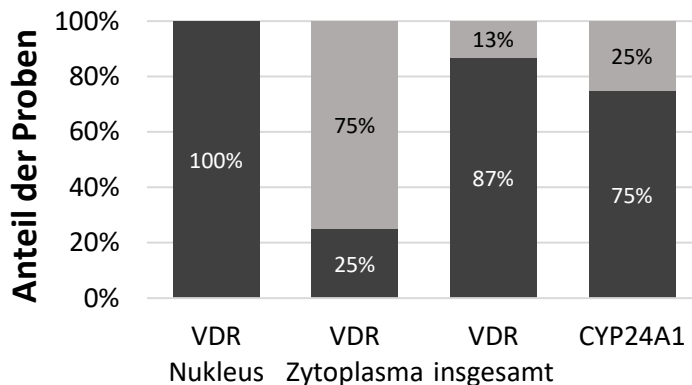


Abbildung 16 Säulendiagramm der Auswertung der VDR- (Nucleus, Zytoplasma, des VDRs insgesamt) und der CYP24A1-Färbung des Prostatakarzinoms (hellgrau= niedrige VDR-Expression, dunkelgrau= hohe VDR-Expression).

Beispielsweise sind in Abbildung 17 die lichtmikroskopischen Aufnahmen der VDR-Färbung auf der linken Seite der Abbildungen und vergleichend die CYP24A1-Färbung derselben Patientinnen und Patienten auf der rechten Seite der Abbildungen gegenübergestellt. Die Knochenmetastase des in Abbildung 17 abgebildeten Falls vier exprimiert den VDR im Nucleus hoch, während die Paraffinschnitte des Patient sieben

3. Ergebnisse

(Abbildung 18) mit Knochen- und pulmonalen Metastasen den VDR nicht in allen Nuclei exprimiert. Abbildung 18A dient als Exempel von positiven und negativen Nuclei.

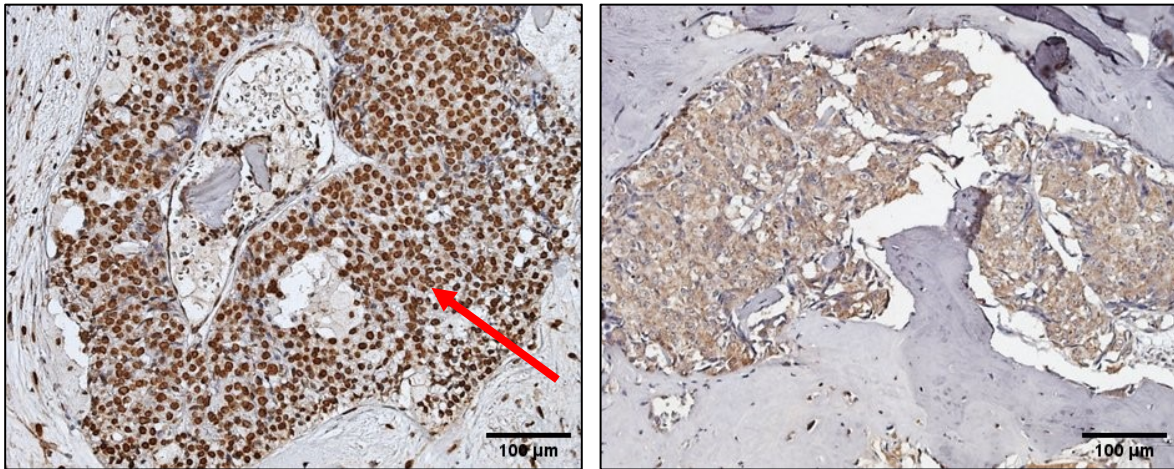


Abbildung 17 Lichtmikroskopische Aufnahmen, die mit dem 20er-Objektiv aufgenommen wurden, einer Knochenmetastase des Prostatakarzinoms des Falls 4. Links: Färbung des VDRs. Der rote Pfeil zeigt auf einen deutlich positiven Nucleus, es ist kein negativer Zellkern zu identifizieren. Rechts: Färbung von CYP24A1 derselben Knochenmetastase. Diese Abbildung erschien ebenso in einer eigenen Publikation (132). Als open access-Artikel/creative commons-Lizenz frei verwendbar: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

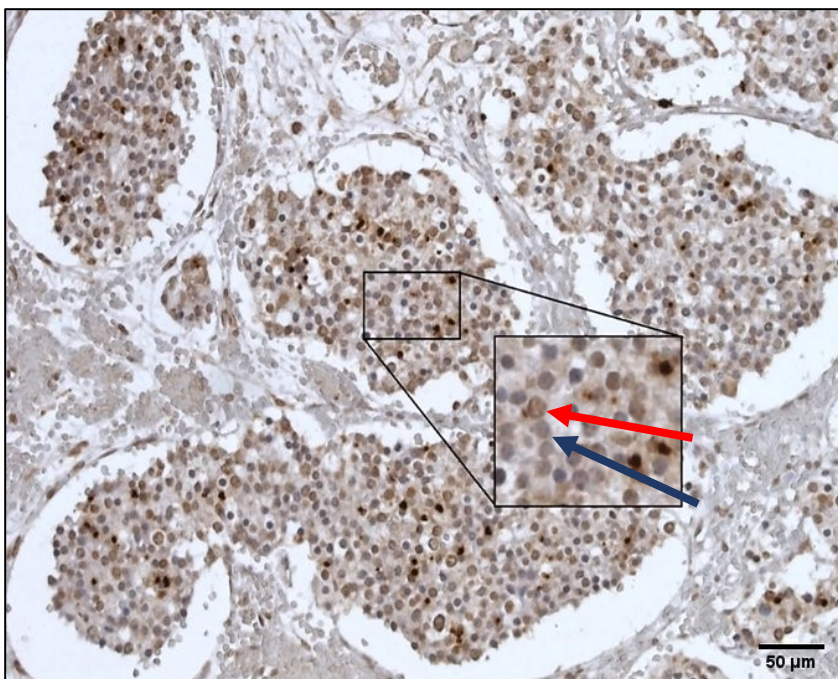


Abbildung 18A Lichtmikroskopische Aufnahme, die mit dem 20er-Objektiv aufgenommen wurde, einer Knochenmetastase des Prostatakarzinoms des Falls 7. Färbung des VDRs. Der rote Pfeil zeigt auf einen deutlich positiven Zellkern, der blaue Pfeil markiert einen negativen Zellkern. Balken = 50 µm. Der Detailausschnitt wurde lediglich digital vergrößert.

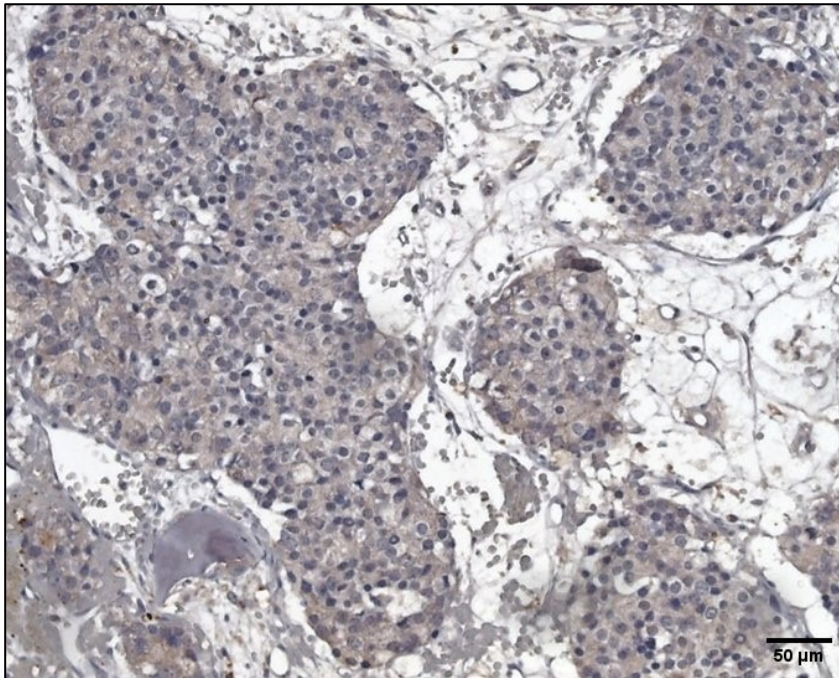


Abbildung 18B Lichtmikroskopische Aufnahme, die mit dem 20er Objektiv aufgenommen wurde, einer Knochenmetastase des Prostatakarzinoms des Falls 7. Färbung von CYP24A1 desselben Patienten wie in Abbildung 18A. Deutliche Blaufärbung der Zellkerne und CYP24A1 positiv exprimierendes Zytoplasma. Balken = 50 μm .

3.2.4 Auswertung der Färbungen der Knochenmetastasen gastrointestinaler Karzinome

Die Untersuchung der Knochenmetastasen umfasste ebenso neun Metastasen gastrointestinaler Karzinome (13,5 %). Davon hatten fünf Patientinnen oder Patienten ein colorektales Karzinom, zwei Fälle ein Pankreaskarzinom und jeweils ein Patient ein Ösophaguskarzinom und hepatozelluläres Karzinom. Die Auswertung der Expression des VDRs im Nukleus wurde in sechs Fällen (66,6 %) als moderat positiv bewertet, in zwei Fällen (22,2 %) als stark positiv und in einem Fall (11,1 %) als negativ. Die VDR-Färbung des Zytoplasmas wurde in vier Fällen (44,4 %) als stark positiv bewertet, während ebenso vier Fälle als moderat positiv und ein Fall (11,1 %) als mild positiv bewertet wurde. Insgesamt zeigte sich ein gleichmäßiges Bild der Expression des VDRs des Zytoplasmas, des Nukleus und der Auswertung der VDR-Färbung insgesamt. Ebenso konnte auch eine hohe CYP24A1-Expression in 78 % der Knochenmetastasen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19).

3. Ergebnisse

Protein Expression: ■ = hoch ■ = niedrig

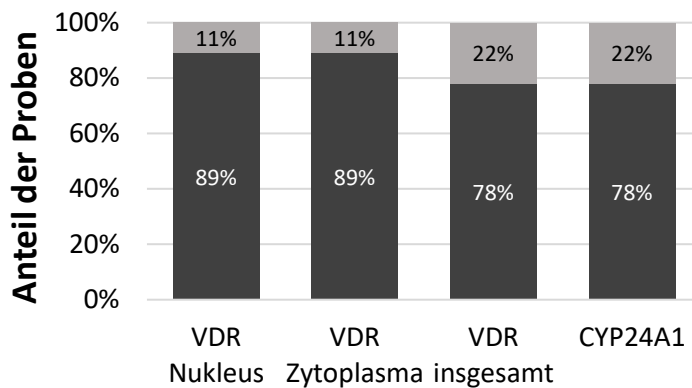


Abbildung 19 Säulendiagramm der Auswertung der VDR- (Nukleus, Zytoplasma, des VDRs insgesamt) und der CYP24A1-Färbung des Gastrointestinaltraktes (hellgrau= niedrige VDR-Expression, dunkelgrau= hohe VDR-Expression).

Als Beispiel einer Knochenmetastase der Färbung des VDRs des Zytoplasmas als auch der Nuklei wurde die Knochenmetastase des Ösophaguskarzinoms des Falls 15 ausgewählt (siehe Abbildung 20). Die Paraffinschnitte des Falls 16 (Pankreaskarzinom) waren für die Färbung des VDR und der 24-Hydroxylase im moderat positiven Bereich, wobei es stellenabhängig zu sehr unterschiedlichen Bereichen der Expression kam (Abbildung 21). Außerdem zeigt die Knochenmetastase des Patienten zwölf mit colorektalem Karzinom eine positive Färbung besonders apikaler Zellstrukturen (Abbildung 22).

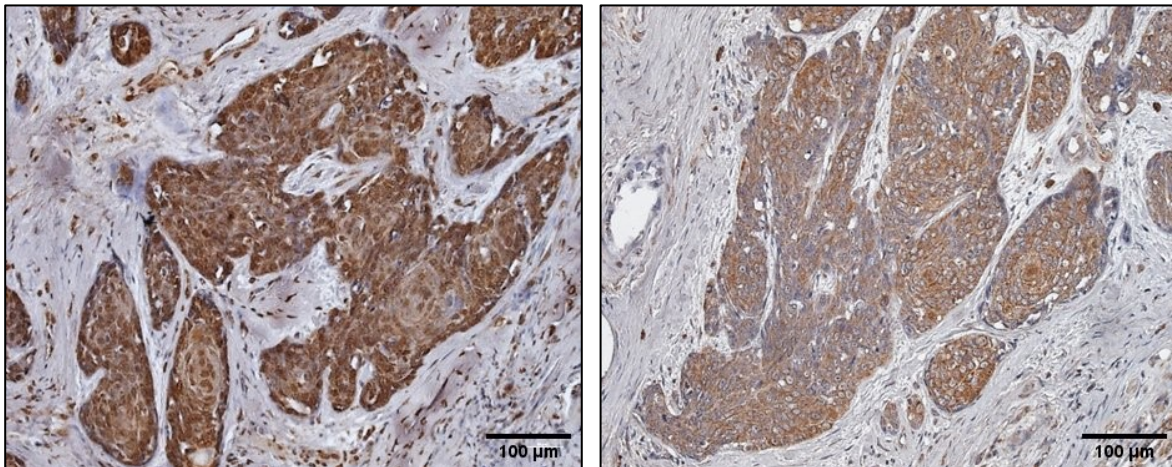


Abbildung 20 Lichtmikroskopische Aufnahme, die mit dem 20er-Objektiv aufgenommen wurde, eines Ösophaguskarzinoms des Falls 15 Links: VDR-Färbung, Die Tumorzellen sind sehr stark gefärbt und klar vom Stroma des Tumors abzugrenzen. Rechts: CYP24A1-Färbung derselben Knochenmetastase, die ebenso eine starke CYP24A1-Expression der Zellen demonstriert. Balken = 100 µm. Diese Abbildung erschien ebenso in einer eigenen Publikation (132). Als open access-Artikel/creative commons-Lizenz frei verwendbar: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

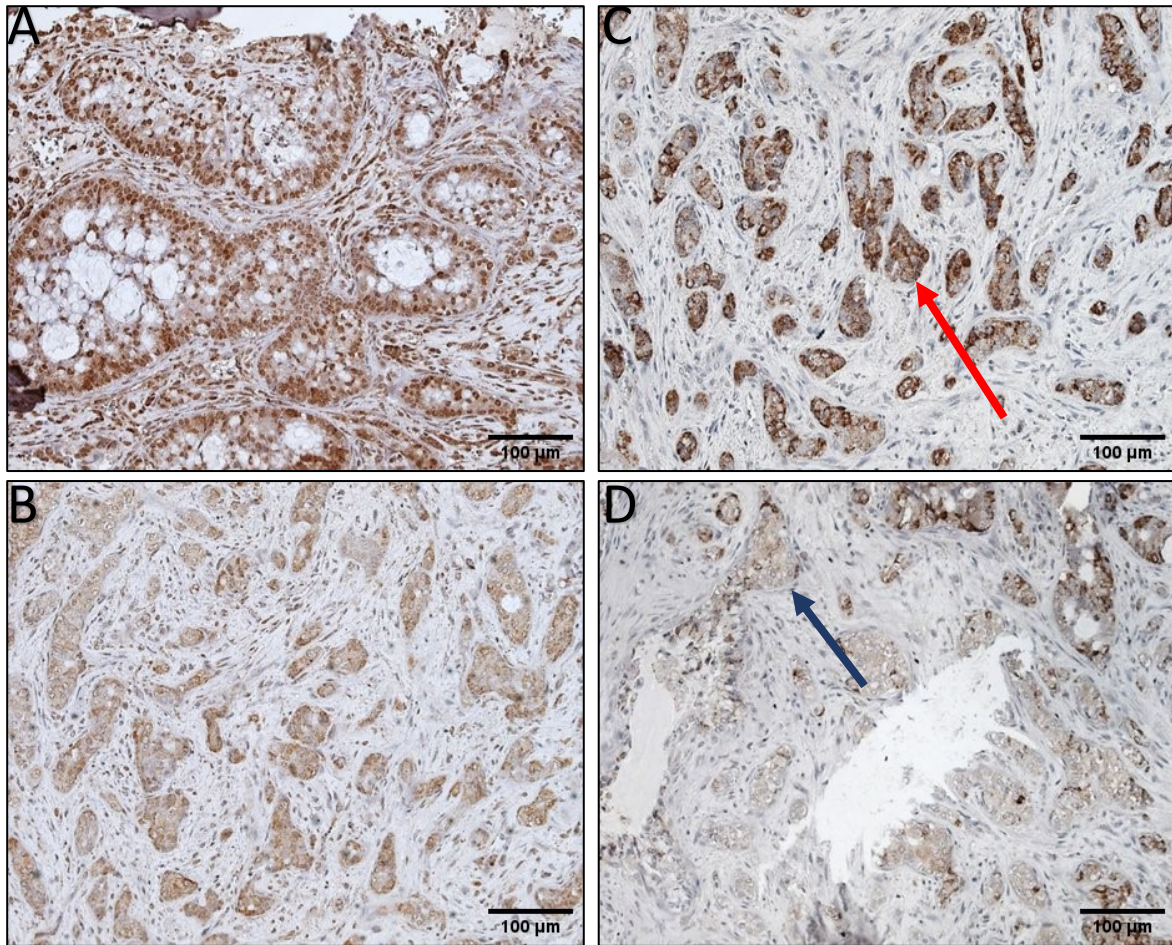


Abbildung 21 Lichtmikroskopische Aufnahme, die mit dem 20er-Objektiv aufgenommen wurde. Knochenmetastase eines Pankreaskarzinoms (Patient 16) **A und B**: VDR-Färbung; stellenweise unterschiedliche Expression des VDRs. **C und D**: CYP24A1-Färbung; stellenweise stark positive Expression (roter Pfeil), zum Teil auch negative Expression zeigt (blauer Pfeil). Balken = 100 μ m.

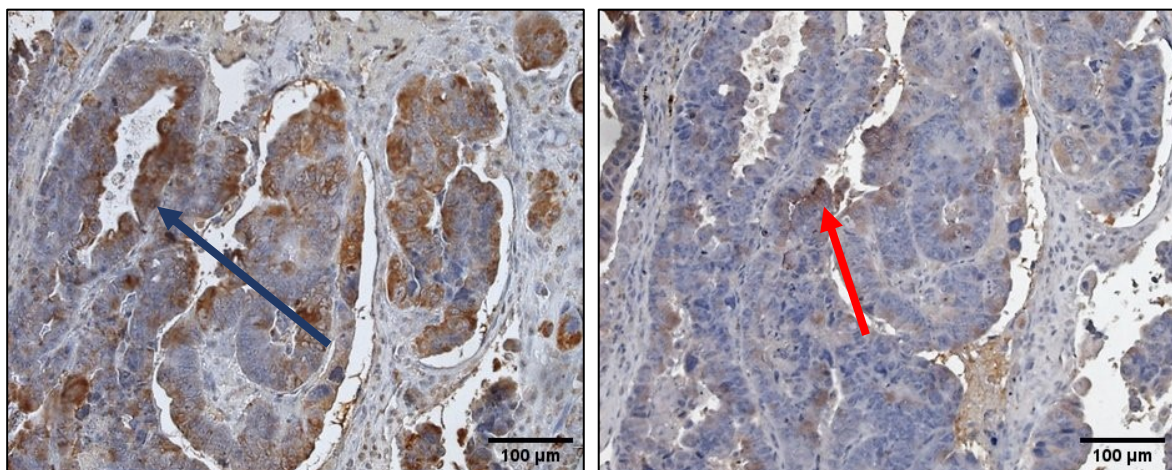


Abbildung 22 Lichtmikroskopische Aufnahmen, die mit dem 20er-Objektiv aufgenommen wurden. Knochenmetastase eines colorektalen Karzinoms (Patient 16). Links: VDR-Färbung; positive apikale Bereiche (blauer Pfeil) und negative Nuklei. Rechts: CYP24A1-Färbung, hier ebenso leicht positive apikale Färbung der Zellen (roter Pfeil). Balken = 100 μ m.

µm. Diese Abbildung erschien ebenso in einer eigenen Publikation (132). Als open access-Artikel/creative commons-Lizenz frei verwendbar: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

3.2.5 Auswertung der Färbungen der Knochenmetastasen des Lungenkarzinoms

Insgesamt konnten elf Knochenmetastasen von Lungenkarzinomen untersucht werden, von denen acht (73 %) den häufigeren nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) und drei den kleinzelligen Lungenkarzinomen (SCLC) (27 %) zugeordnet wurden. Jeweils drei der Lungenkarzinome (27 %) wurden bei der Auswertung der VDR-Färbung des Nukleus als moderat positiv oder stark positiv bewertet, vier als mild positiv (36 %) und eine Knochenmetastase als negativ (9 %) (siehe Tabelle 8). Der VDR wurde im Zytoplasma in vier Fällen (36 %) negativ, in drei Fällen (27 %) mild positiv und in vier Fällen moderat positiv exprimiert. Es wurden zudem 45 % der Knochenmetastasen als hohe insgesamt VDR-Expression ausgewertet. Bei der CYP24A1-Färbung wurden drei (27 %) der Knochenmetastasen des Lungenkarzinoms als negativ bewertet. Jeweils zwei (18 %) der Knochenmetastasen als mild bzw. stark positiv ausgewertet und die meisten als moderat positiv (vier Fälle). Vergleichsweise zeigte sich eher eine niedrige Expression insbesondere des VDRs, aber auch des CYP24A1-Enzyms (siehe Abbildung 23).

Protein Expression: = hoch =niedrig

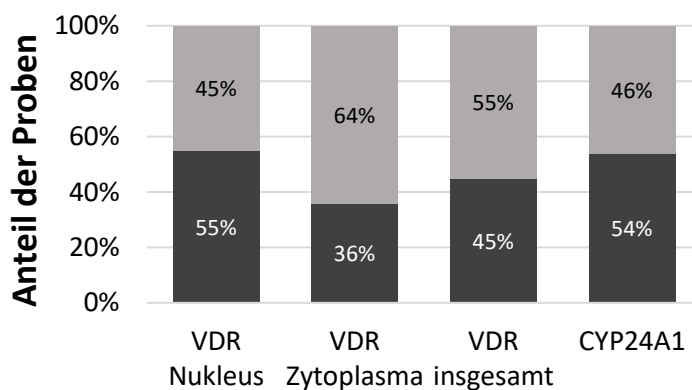


Abbildung 23 Säulendiagramm der Auswertung des Immunoreactive Scores des VDRs (Nukleus, Zytoplasma und insgesamt) und des CYP24A1-Enzyms der Lungenkarzinome (hellgrau= niedrige VDR-Expression, dunkelgrau= hohe VDR-Expression).

Als Beispielaufnahmen der Knochenmetastasen pulmonaler Karzinome wurden die Fälle 23 als Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC) und Fall 28 als Kleinzelliges Bronchialkarzinom (SCLC) ausgewählt. Während die Knochenmetastase des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms eine hohe Expression des VDRs und von CYP24A1 zeigt,

3. Ergebnisse

wurde die Knochenmetastasen des kleinzelligen Karzinoms als niedrige Proteinexpression des VDRs/CYP24A1-Enzyms eingestuft.

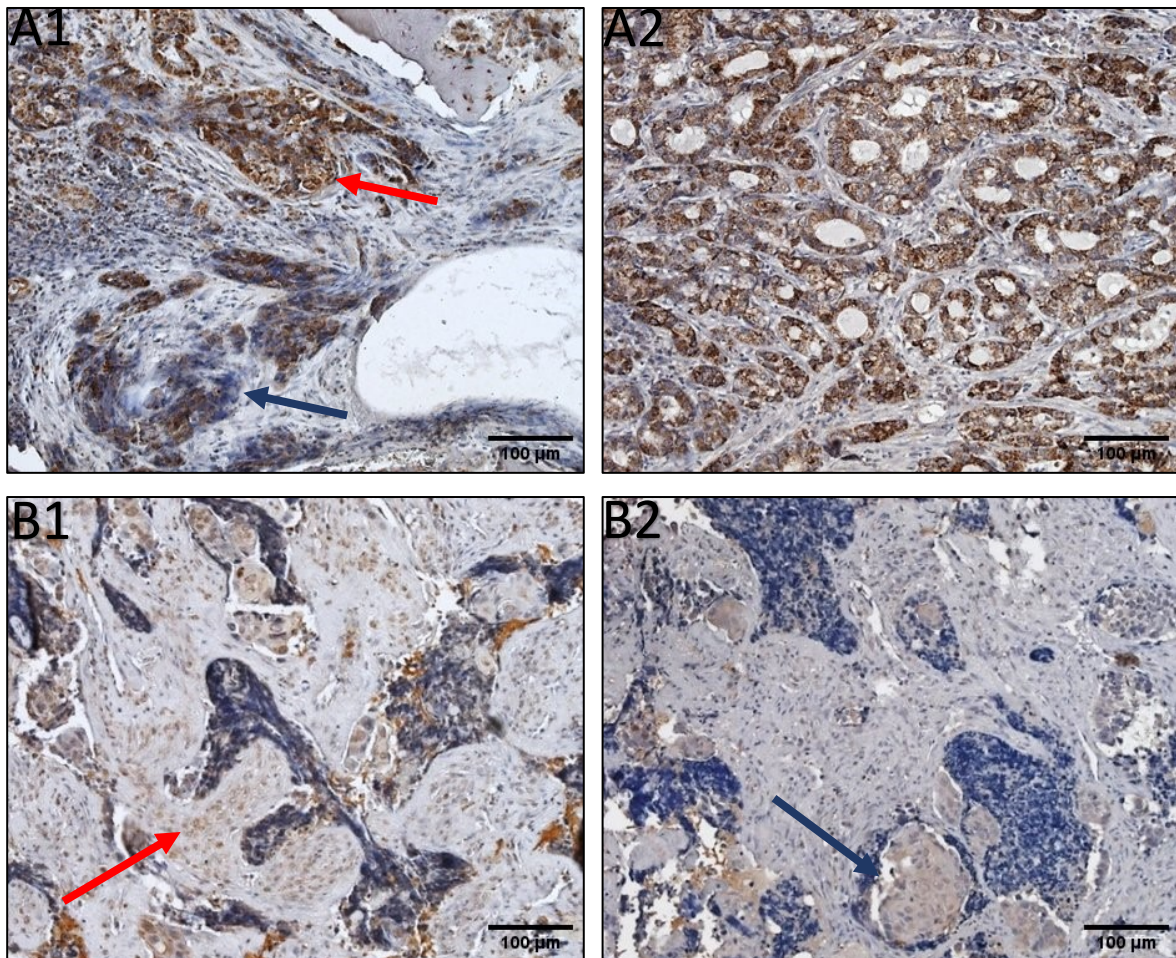


Abbildung 24 Lichtmikroskopische Aufnahmen, die mit dem 20er-Objektiv aufgenommen wurden. **A1 u. 2:** Knochenmetastase eines nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms des Falls 23. Links: Färbung des VDRs, stellenweise positive (roter Pfeil), aber auch negative Zellen (blauer Pfeil). Rechts: CYP24A1-Färbung, hier stark positive Wertung, da nahezu alle Zellen CYP24A1 stark exprimieren. **B1 u. 2:** Knochenmetastase eines kleinzelligen Lungenkarzinoms des Falls 28. Links: Färbung des VDRs, Die Aufnahme der Knochenmetastase zeigt viele negative Tumorzellen (roter Pfeil). Rechts: Färbung des CYP24A1-Enzyms, genauso wie bei der Färbung des VDRs ist hier nur eine sehr schwache (blauer Pfeil) und teilweise negative Färbung zu sehen. Balken = 100 µm.

3.2.6 Auswertung der Färbungen des folliculären Schilddrüsenkarzinoms

Fünf Knochenmetastasen von folliculären Schilddrüsenkarzinomen wurden auf die Expression des VDRs und CYP24A1 untersucht. Bei der Färbung des VDRs des Nukleus wurden drei Schilddrüsenkarzinome als moderat positiv bewertet und jeweils eine Knochenmetastase als stark positiv bzw. mild positiv. Auch war die Expression des VDRs im Zytoplasma bei allen Knochenmetastasen des Schilddrüsenkarzinoms hoch. Es zeigte sich in 80 % der Fälle eine hohe VDR-Expression insgesamt. CYP24A1 wurde jeweils von einer Knochenmetastase nicht, mild oder stark exprimiert, während zwei Knochenmetastasen als moderat positiv eingestuft wurden. Abbildung 25 zeigt eine Übersicht der VDR-Expression der verschiedenen Lokalisationen und die Expression des CYP24A1-Enzyms der folliculären Schilddrüsenkarzinome.

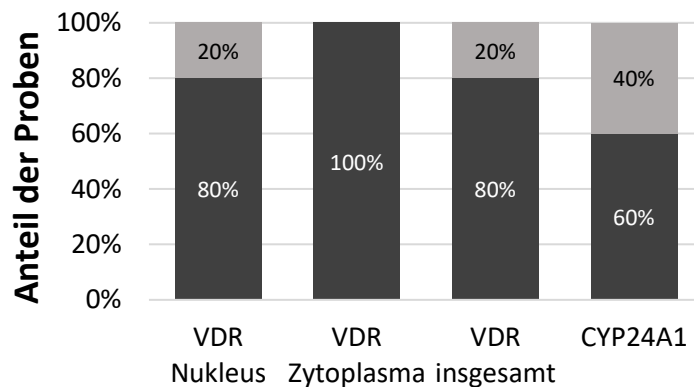


Abbildung 25 Säulendiagramm der Auswertung des Immunoreactive Scores des VDRs (Nukleus, Zytoplasma und insgesamt) und des CYP24A1-Enzyms der Lungenkarzinome (hellgrau= niedrige VDR-Expression, dunkelgrau= hohe VDR-Expression).

Als lichtmikroskopische Beispielaufnahmen der Knochenmetastasen der folliculären Schilddrüsenkarzinome wurde Fall 31 (Abbildung 26 A) durch die Abbildung des Falls 32 (Abbildung 26 B) als Vergleich zwischen den beiden Knochenmetastasen ergänzt. Während Fall 31 den VDR im Nukleus wenig exprimiert, zeigt die Knochenmetastase des Falls 32 eine deutliche Expression des Nukleus im Zytoplasma als auch im Nukleus.

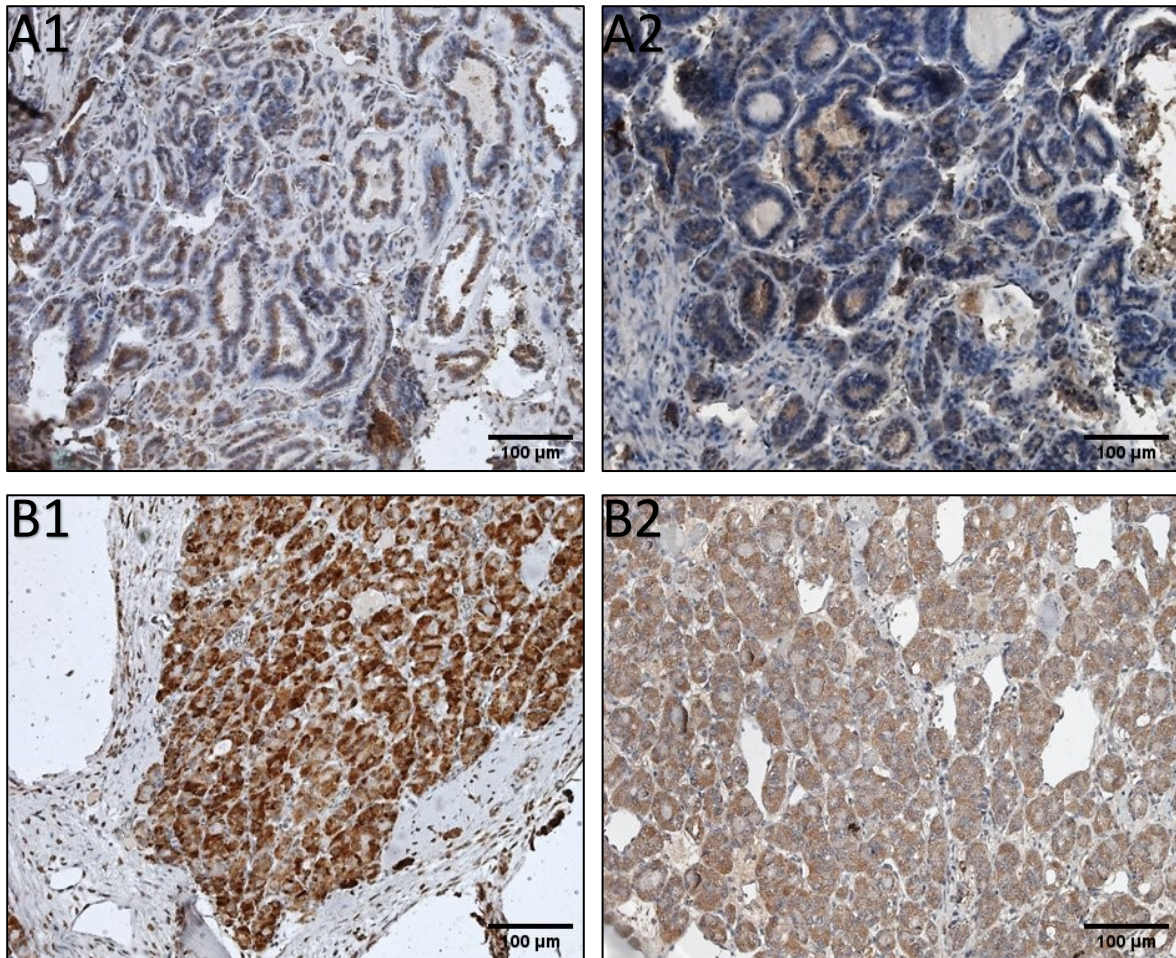


Abbildung 26 Lichtmikroskopische Aufnahmen, die mit dem 20er-Objektiv aufgenommen wurden. Rechts: Färbung von CYP24A1 **A 1 u. 2:** Knochenmetastase eines folliculären Schilddrüsenkarzinoms des Falls 31. **B 1 und 2:** Knochenmetastase eines folliculären Schilddrüsenkarzinoms des Falls 32. Während die Knochenmetastase des Falls 32 eine deutliche Färbung sowohl des VDRs als auch des CYP24A1-Enzyms zeigt, ist die Färbung des Falls 31 nur stellenweise positiv. Balken = 100 µm.

3.2.7 Auswertung der Färbung der Knochenmetastasen des Mammakarzinoms

Von den 16 Knochenmetastasen des Mammakarzinoms, die mit dem VDR-Antikörper gefärbt wurden und auf die Färbung des Nukleus ausgewertet, wurden sieben Fälle (44 %) als moderat positiv und fünf Fälle (31 %) als mild positiv bewertet. Weiterhin wurde ein Fall (6 %) als stark positiv und jeweils drei Fälle (19 %) als negativ ausgewertet. Die Expression des VDRs im Zytoplasma war in drei Fällen negativ, in fünf Fällen mild positiv, in sieben Fällen moderat positiv und in einem Fall stark positiv. Es zeigte sich bei der VDR-Gesamtauswertung in lediglich 39 % der ausgewerteten Knochenmetastasen eine hohe Expression. Zwei Fälle der Knochenmetastasen des Mammakarzinoms der CYP24A1-Färbung wurden als negativ, weitere sieben Fälle als mild positiv, vier Fälle als moderat positiv und drei als stark positiv eingestuft. Insgesamt zeigte sich eine eher schwache Expression des VDRs und des CYP24A1-Enzyms der Knochenmetastasen des Mammakarzinoms, das durch Abbildung 27 verdeutlicht wird.

Protein Expression: = hoch =niedrig

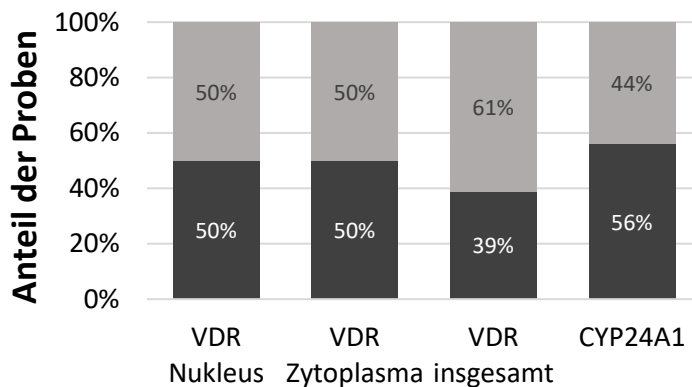


Abbildung 27 Säulendiagramm der Auswertung des Immunoreactive Scores der VDR-Färbung (Nukleus, Zytoplasma, insgesamt) und der CYP24A1-Färbung der Mammakarzinome (hellgrau= niedrige VDR-Expression, dunkelgrau= hohe VDR-Expression).

Die Abbildung 28 zeigt die lichtmikroskopischen Aufnahmen einer Patientin mit einer VDR negativen Knochenmetastase des Mammakarzinoms (Abbildung 28A1) und einer positiven Expression des VDR und CYP24A1-Enzyms der Knochenmetastase (Abbildung 28B1 und 2).

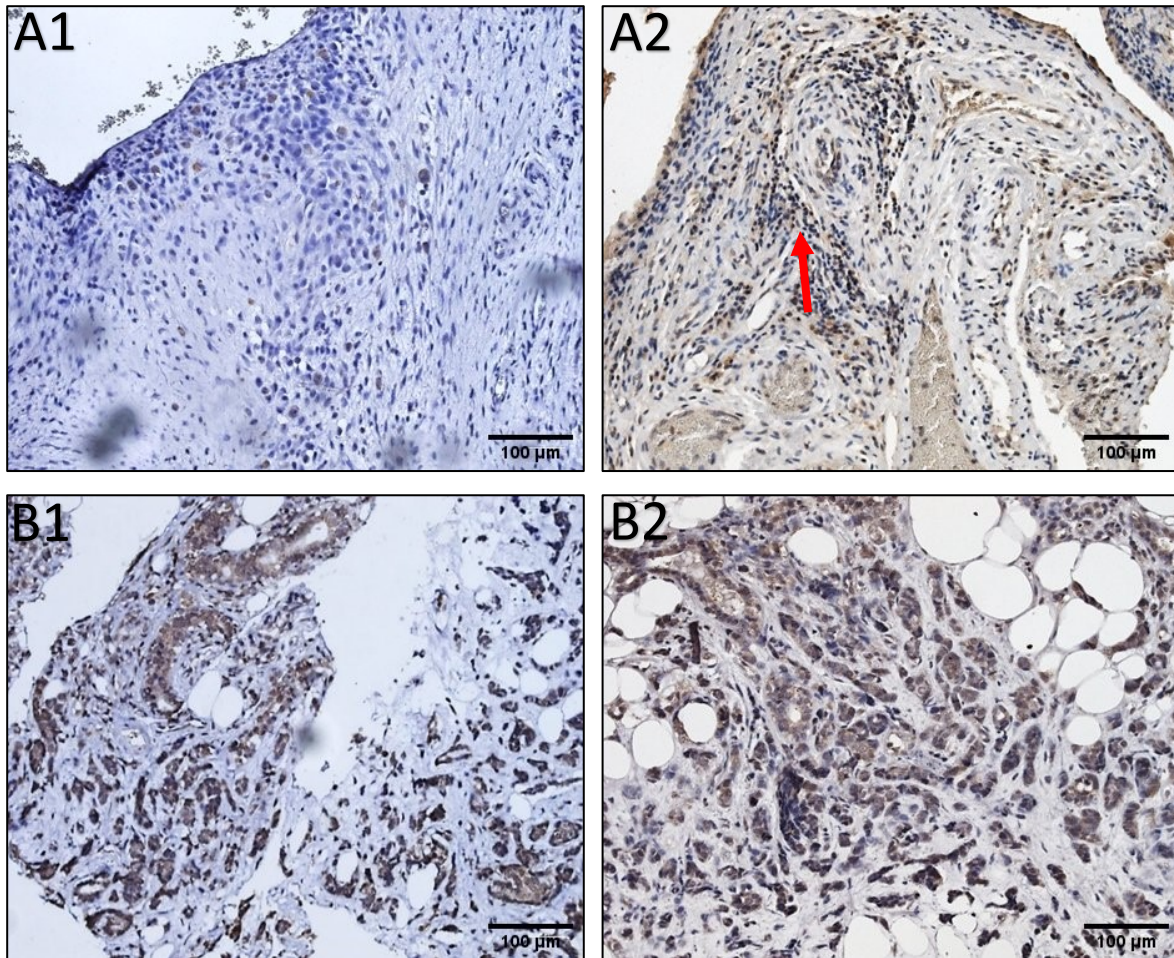


Abbildung 28 Lichtmikroskopische Aufnahmen, die mit dem 20er-Objektiv aufgenommen wurden. **A1 und 2:** Knochenmetastase eines invasiv duktales Mammakarzinoms des Falls 46. Links: Färbung des VDRs. Die Abbildung zeigt keine Expression des VDRs der Tumorzellen, sondern nur negativ blau gefärbte Zellen. Rechts: Färbung von CYP24A1. Die Abbildung der Knochenmetastase zeigt eine sehr geringe Färbung von CYP24A1 (roter Pfeil). **B1 und 2:** Knochenmetastase eines invasiv duktales Mammakarzinoms des Falls 47. Links: Färbung des VDRs, positive Expression des VDRs der Tumorzellen der Knochenmetastase; Rechts: Färbung von CYP24A1, dieselbe Knochenmetastase zeigt neben der positiven VDR-Expression auch eine positive Expression des CYP24A1-Enzyms. Balken = 100 µm. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen B1 und B2 erschienen ebenso in einer eigenen Publikation (132). Als open access-Artikel/creative commons-Lizenz frei verwendbar: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

3.2.8 Auswertung der Färbung der Knochenmetastasen der Harnwege

Von den 13 Knochenmetastasen der Harnwege wurden neun den allgemein häufigsten klarzelligen Nierenkarzinomen zugeordnet werden. Zusätzlich wurde ein Nierenbeckenkarzinom und zwei Urothelkarzinome auf die Expression des VDRs und des CYP24A1-Enzyms untersucht. Sechs (46 %) der mit der VDR-Färbung des Nukleus ausgewerteten Fälle wurden als stark positiv bewertet, jeweils drei (23,5 %) als moderat positiv bzw. mild positiv sowie eine (8 %) Knochenmetastase als negativ (siehe Tabelle 8). Die Expression des VDRs im Zytoplasma war in jeweils zwei Fällen stark positiv bzw. negativ, in drei Fällen mild positiv und in sechs Fällen moderat positiv. Der VDR insgesamt zeigte sich in 61 % mit einer starken Proteinexpression. CYP24A1 der ableitenden Harnwegkarzinome war insgesamt etwas weniger exprimiert, sodass jeweils vier (31 %) der Knochenmetastasen eine mild positive bzw. moderat positive Bewertung erlangten. Drei (31 %) zeigten eine stark positive Immunoreaktivität und ebenso zwei wurden als negativ bewertet. Insgesamt zeigte sich eine gleichmäßig verteilte Expression des VDRs als auch des CYP24A1-Enzyms, das durch Abbildung 29 verdeutlicht wird.

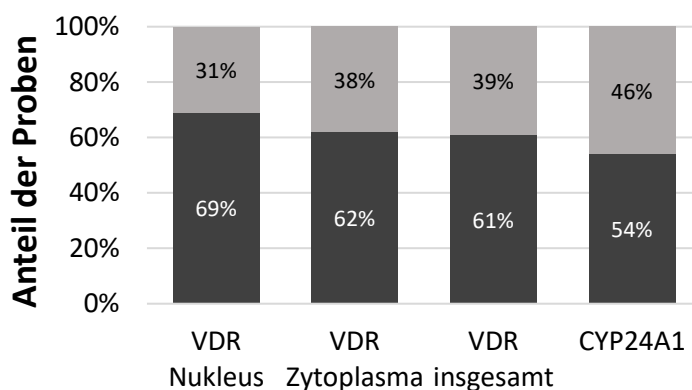


Abbildung 29 Säulendiagramm der Auswertung des Immunoreactive Scores der VDR-Färbung (Nukleus, Zytoplasma, insgesamt) und der CYP24A1-Färbung) der Tumoren der Harnwege (hellgrau= niedrige VDR-Expression, dunkelgrau= hohe VDR-Expression).

Abbildung 30 zeigt beispielsweise die lichtmikroskopischen Aufnahmen einer Knochenmetastase eines Nierenbeckenkarzinoms, eines klarzelligen Nierenkarzinoms und eines Urothelkarzinoms. Die Knochenmetastasen zeigen dabei eine unterschiedliche Expression des VDRs als auch des CYP24A1-Enzyms (Abbildung 30).

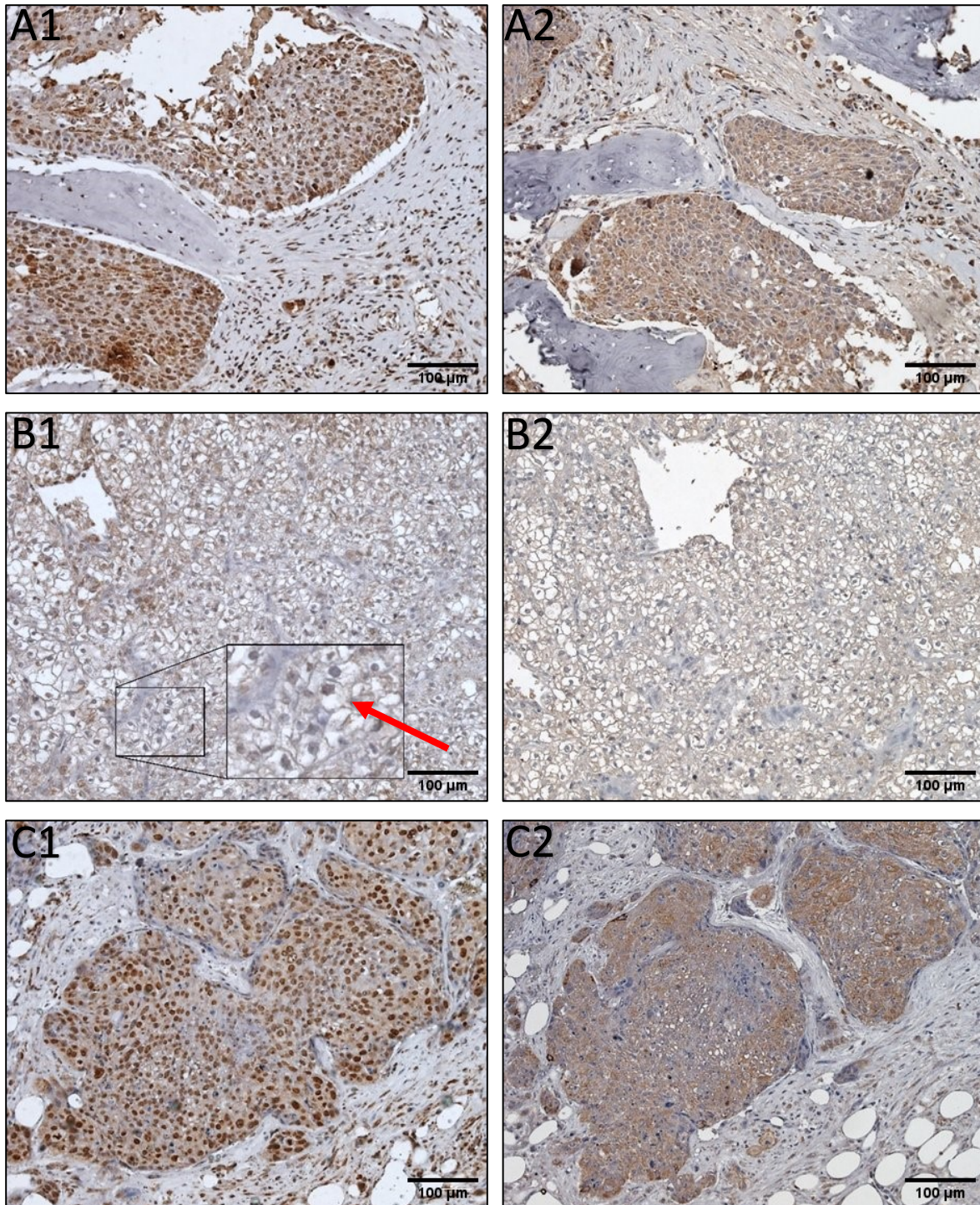


Abbildung 30 Lichtmikroskopische Aufnahmen, die mit dem 20er Objektiv aufgenommen wurden. Links: Färbung des VDRs. Rechts: Färbung von CYP24A1. **A**: Knochenmetastase eines Nierenbeckenkarzinoms des Falls 54. A1: Deutliche Färbung aller Nuklei. **B**: Knochenmetastase eines klarzelligen Nierenkarzinoms des Falls 58, die Nuklei der VDR-Färbung sind negativ (roter Pfeil). **C**: Knochenmetastase eines Urothelkarzinoms des Falls 59, deutlich positive Färbung der Zellkerne und auch Färbung des Zytoplasmas, das vom Tumorstroma umgeben wird. Ebenso ist CYP24A1 deutlich positiv exprimiert (siehe C2). Der Detailausschnitt wurde lediglich digital vergrößert. Balken = 100 µm.

3.2.9 Auswertung der Färbung der Knochenmetastasen anderer Karzinome

Vier weitere Knochenmetastasen unterschiedlicher Karzinome wurden in die Untersuchungen eingeschlossen. Davon hatten eine Patientin ein Olfactorius-Neuroblastom (Abbildung 31A), zwei Patientinnen oder Patienten ein Plattenepithelkarzinom des Mundbodens (Abbildung 31B) und ein weiterer Patient ein Parotiskarzinom. Die Färbung des VDRs bei den Knochenmetastasen der unterschiedlichen Primärkarzinome Proteinexpression zeigte stets eine hohe VDR-Proteinexpression. Insbesondere bei dem Patienten mit Parotiskarzinom ist zwischen VDR positiven und negativen Zellen gut abzugrenzen (Abbildung 32). Die Expression des CYP24A1-Enzyms war ähnlich positiv einzuordnen.

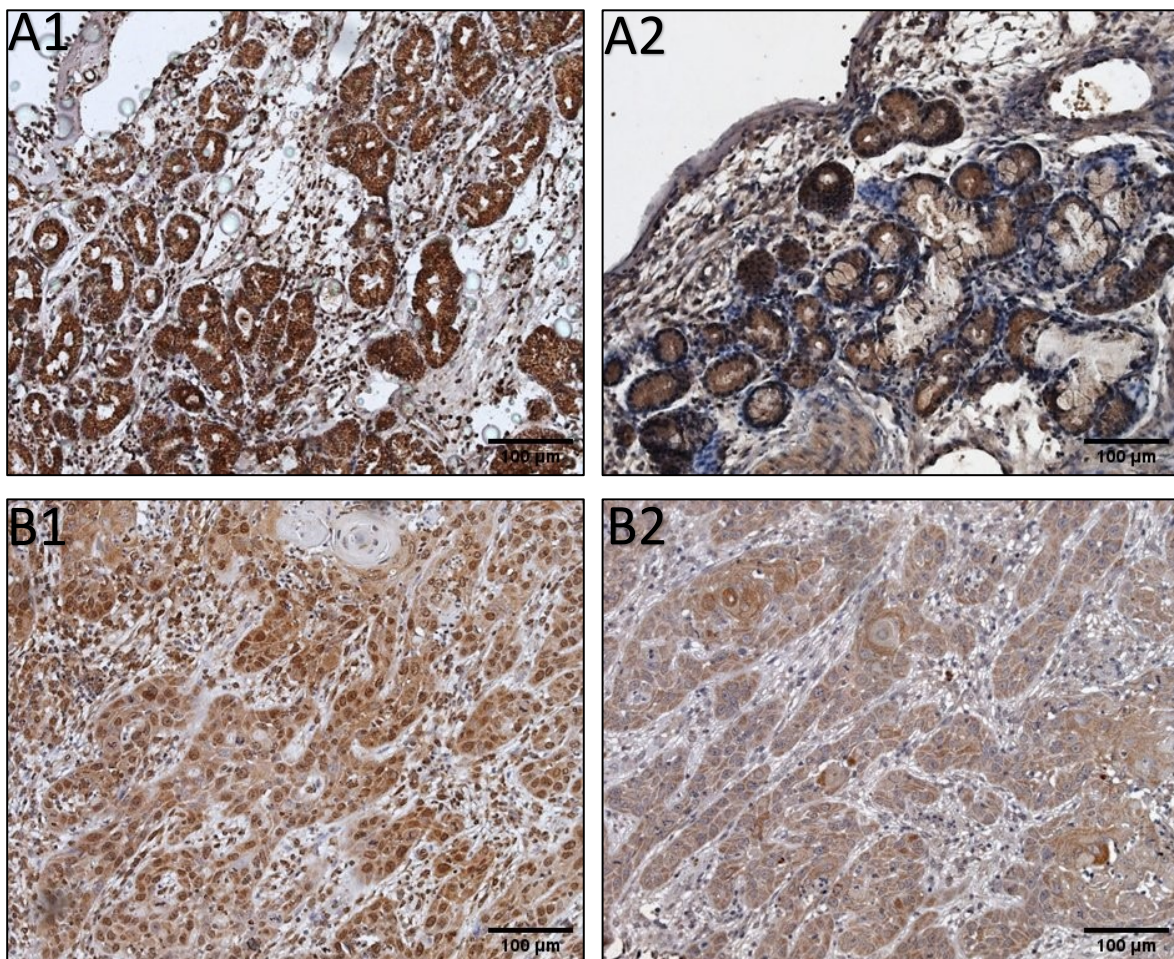


Abbildung 31 Lichtmikroskopische Aufnahmen, die mit dem 20er Objektiv aufgenommen wurden. Links: VDR-Färbung, Rechts: CYP24A1-Färbung. **A1 und 2**: Knochenmetastase eines Olfactorius-Neuroblastoms des Falls 64. Deutlich VDR-positive und CYP24A1-positive Zellen. **B1 und 2**: Knochenmetastase eines Plattenepithelkarzinoms des Falls 65. Intensive Färbung des Zellkerns und ebenso teilweise zytoplasmatischer Strukturen der Tumorzellen bei der VDR-Färbung. Balken = 100 µm.

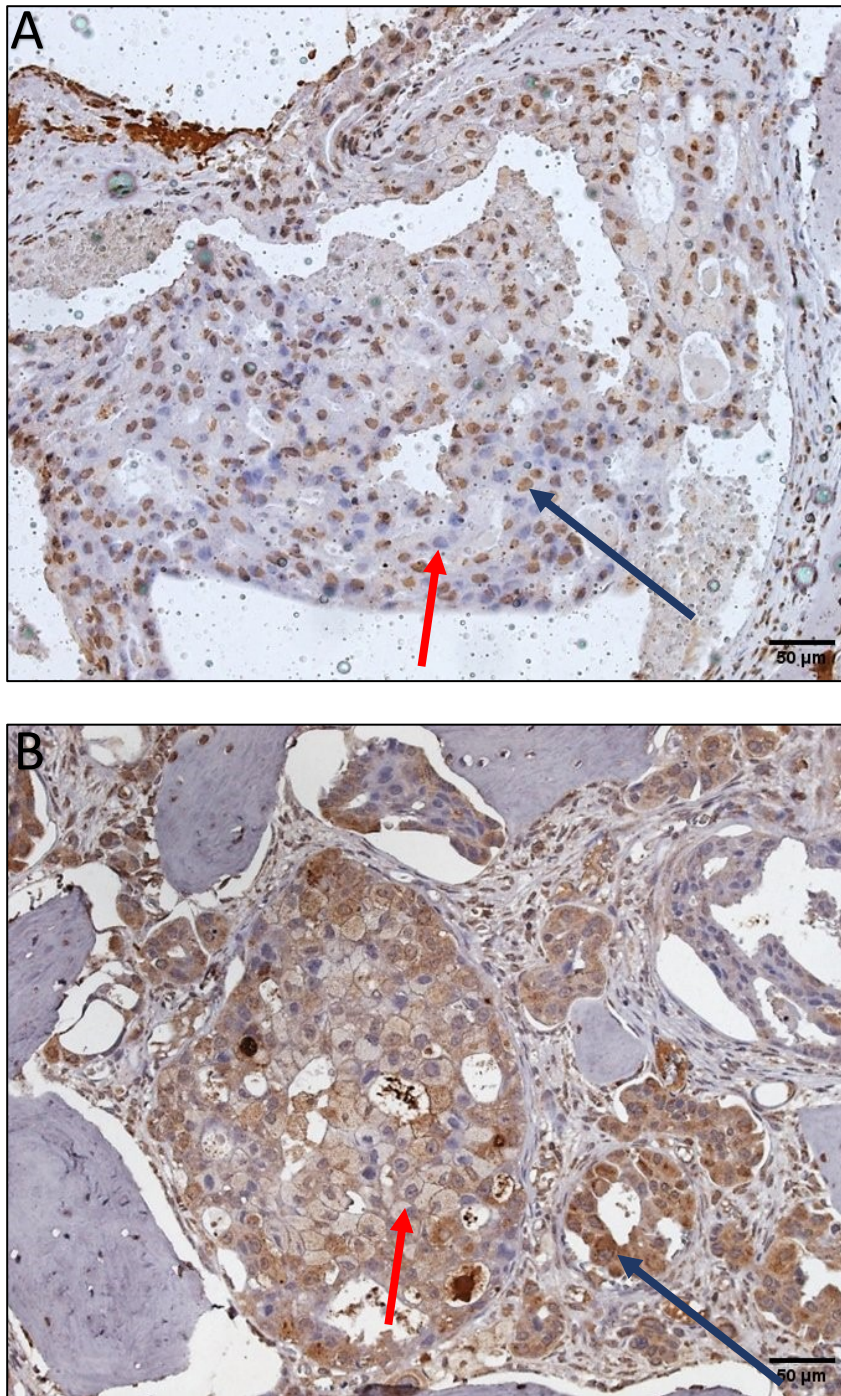


Abbildung 32 Lichtmikroskopische Aufnahmen bei 20-facher Vergrößerung. Knochenmetastase eines Parotiskarzinoms des Falls 66. **A:** VDR-Färbung. Abgrenzbarkeit der positiven und negativen Zellkerne deutlich (blauer Pfeil positiver Zellkern, roter Pfeil negativer Zellkern). **B:** Färbung der CYP24A1-Hydroxylase. Deutlich positive Zellen sind mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet, während eher negative Zellen mit einem roten Pfeil gekennzeichnet sind. Im linken Bereich und im oberen Bereich des Bildes ist Knochengewebe zu sehen. Balken = 50 µm.

3.3 Die Auswertungen der immunhistologischen Färbungen in Bezug zu den pathohistologischen und patientenspezifischen Charakteristika

Im letzten Abschnitt des Ergebnisteils wird nun untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den Proteinlevel des CYP24A1-Enzyms oder VDRs und der pathohistologischen Eigenschaften und tumorspezifischen Eigenschaften besteht. Bei der Auswertung des VDRs wurde dabei neben der gesamten Expression des VDRs ebenso die zytoplasmatische VDR-Expression und nukleäre VDR-Expression gesondert auf mögliche Zusammenhänge mit den tumorspezifischen Charakteristika untersucht. Zur statistischen Auswertung der Färbungen und Korrelation mit den Patientendaten erfolgte zunächst ein Test auf Normalverteilung, um den erforderlichen statistischen Test auszuwählen. Dies erfolgte mit den Tests auf Normalverteilung von Shapiro-Wilk und Kolmogorov-Smirnov, durch die keine Normalverteilung festgestellt wurde.

3.3.1 Die Expression des VDRs und CYP24A1 und der Zusammenhang mit dem Differenzierungsgrad der Tumoren (Grading)

Je nach Differenzierung werden Tumoren zur Einordnung der Abweichung vom normalen Gewebebild in unterschiedliche Grade eingeteilt (für die vorliegenden Primärtumoren Grad 1 (gut differenziert) - Grad 3 (schlecht differenziert)). Für Prostata Tumoren und follikuläre Schilddrüsenkarzinome wird diese Klassifikation jedoch nicht angewandt, weshalb diese nicht in die Auswertung des Differenzierungsgrades der Tumoren eingegangen sind.

Da die Immunhistochemie kein ideales Verfahren ist, um eine absolut quantitative Abgrenzung der Expression des VDRs und CYP24A1 zwischen den Knochenmetastasen zu ermöglichen, wurden die Knochenmetastasen in zwei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe der Knochenmetastasen wurde als hoch VDR/CYP24A1 exprimierend und die andere Gruppe als niedrig exprimierend klassifiziert. Als Grundlage dafür diente die Auswertung des IRS. Die Daten der Auswertung der VDR-Färbung und CYP24A1-Färbung der Knochenmetastasen und das Grading des Primärtumors wurden durch Pearsons Chi Quadrat-Test korreliert.

Durch den Pearsons Chi Quadrat-Test konnte keine signifikante Korrelation der Auswertung der VDR-Färbung und Grading festgestellt werden, jedoch nahm die VDR-Expression in schlecht differenzierten Tumoren deutlich ab (Abbildung 33). Dies war insbesondere bei der Expression des VDRs im Nukleus und des VDRs insgesamt zwischen als G2- und G3 klassifizierten Tumoren zu beobachten. Die Auswertung der CYP24A1-Färbung mit dem

3. Ergebnisse

Grading der Knochenmetastasen zeigte durch den Pearsons Chi Quadrat-Test keine signifikante Korrelation. Die Expression des CYP24A1-Enzyms war zwischen G2- und G3 klassifizierten Tumoren ähnlich. Da nur fünf Tumoren als G1-Tumor klassifiziert wurden, ist diese Auswertung weniger aussagekräftig.

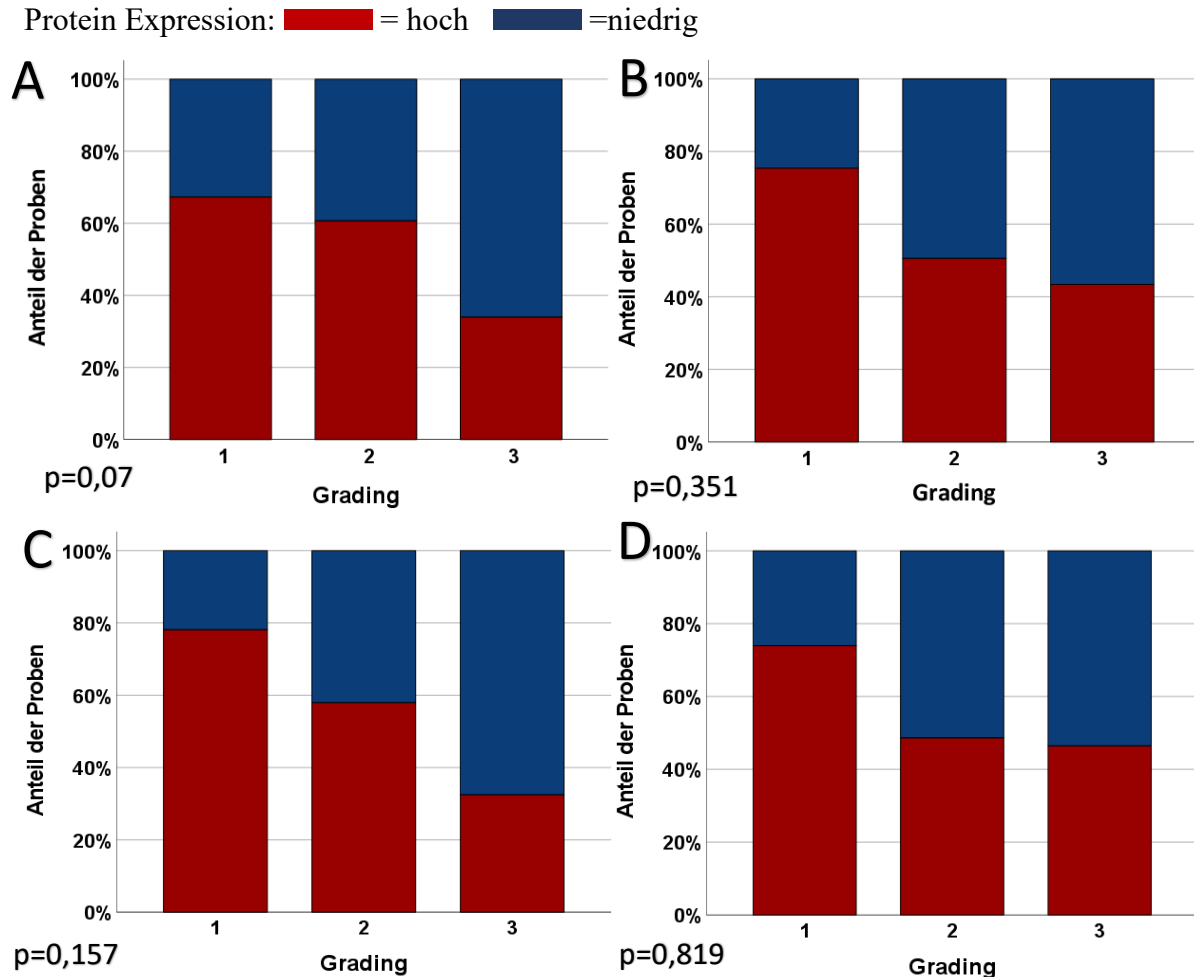


Abbildung 33 Säulendiagramm der Expression des VDRs und CYP24A1 geordnet nach dem Grading der Tumoren, Anteil der Knochenmetastasen mit hoher Proteinexpression dunkelrot und mit niedriger Proteinexpression dunkelblau, $n=53$ ($G1=5$, $G2=28$, $G3=20$) **A**: Proteinexpression des VDRs des Nukleus **B**: Proteinexpression des VDRs des Zytoplasmas, **C**: Proteinexpression des VDRs insgesamt, **D**: Proteinexpression des CYP24A1 Enzyms. Abbildung A erschien in ähnlicher Form ebenso in einer eigenen Publikation (132). Als open access-Artikel/creative commons-Lizenz frei verwendbar: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

3.3.2 Die Expression des VDRs und CYP24A1 und der Zusammenhang mit dem T-Stadium der Primärtumoren

Das T-Stadium der TNM-Klassifikation gibt die Größe und Ausdehnung des Primärtumors an. Da die T-Stadien (1=geringe Tumorausdehnung -4=größte Tumorausdehnung/Infiltration von Nachbarorganen) unterteilt werden, werden die Tumoren in die Kategorien T1-4 zusammengefasst. Da Knochenmetastasen unterschiedlicher Entität vorlagen, lässt sich das T-Stadium trotz der unterschiedlichen Kategorien des T-Stadiums der Primärtumoren zwischen lokal fortgeschrittenen Tumoren (T3-4) und begrenzten Tumoren (T1-2) zumindest begrenzt vereinfacht vergleichen. Auch bei dieser Auswertung werden die Primärtumoren in Gruppen hoher oder niedriger VDR/CYP24A1-Expression eingeteilt. Es konnte insgesamt kein Zusammenhang zwischen der Expression des VDRs/CYP24A1-Enzyms und dem T-Stadium der Primärtumoren festgestellt werden. Dies verdeutlicht Abbildung 34.

Protein Expression: ■ = hoch ■ =niedrig

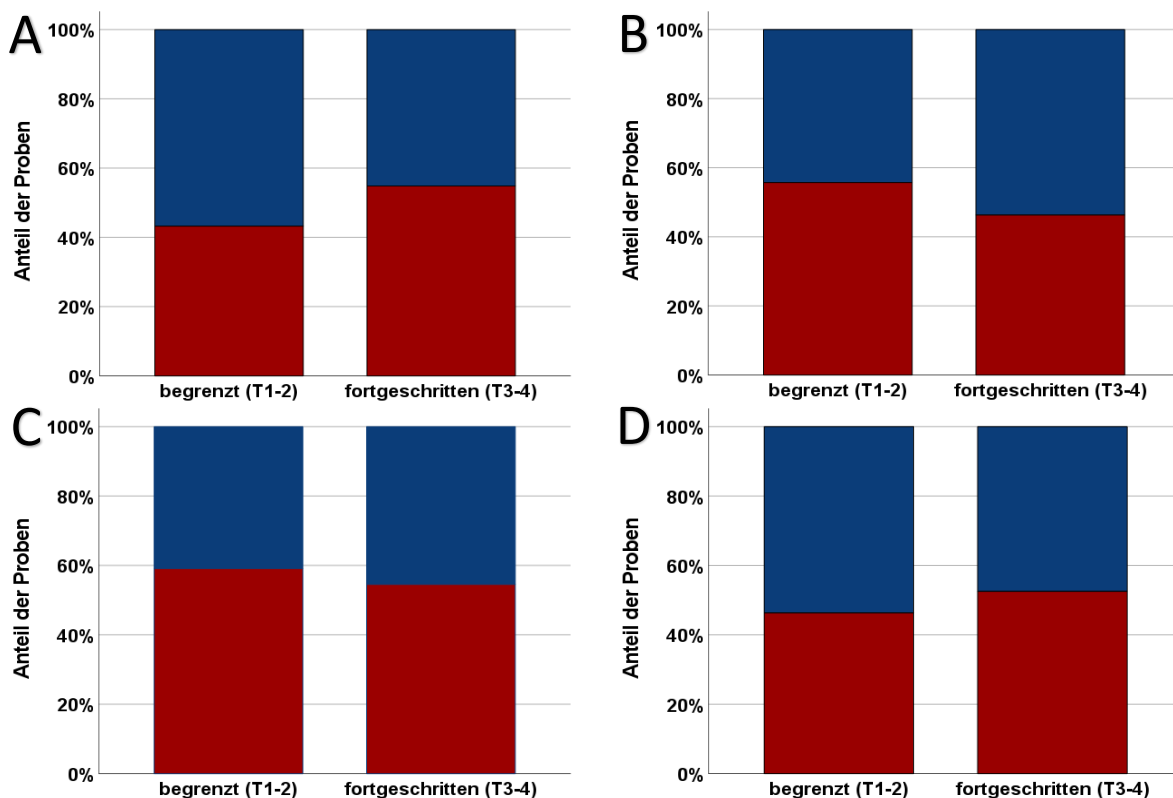


Abbildung 34 Säulendiagramm der Expression des VDRs und CYP24A1 geordnet nach der Größe/Infiltration des Primärtumors anhand des T-Stadiums. Anteil der Knochenmetastasen mit hoher Proteinexpression dunkelrot und mit niedriger Proteinexpression dunkelblau. **A**: VDR-Proteinexpression (Nukleus) **B**: VDR-Proteinexpression (Zytoplasma), **C**: VDR-Proteinexpression (insgesamt) **D**: CYP24A1-Proteinexpression.

3.3.3 Die Expression des VDRs und CYP24A1 und der Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus der Primärtumoren

Das N-Stadium der TNM-Klassifikation gibt eine Metastasierung der Primärtumoren in die Lymphknoten an. Da die TNM-Klassifikation zwischen den verschiedenen Tumorentitäten nicht identisch ist, wurden die Tumoren in Lymphknotenmetastasen positive Tumoren und Lymphknotenmetastasen negative Tumoren unterschieden. Dabei wurde der Pearsons Chi Quadrat-Test für die Auswertung der VDR-/CYP24A1-Färbung aufgrund der fehlenden Normalverteilung der Daten verwendet. Durch Pearsons Chi Quadrat-Test konnte kein signifikanter Zusammenhang aus positivem Lymphknotenstatus und niedriger VDR/CYP24A1-Expression gezeigt werden. Insgesamt zeigte sich der deutliche Trend, dass die Knochenmetastasen von Tumoren, die positiv für Lymphknotenmetastasen (N+) sind, eine eher niedrigere Expression des VDRs und von CYP24A1 aufweisen (siehe Abbildung 35).

Protein Expression: ■ = hoch ■ =niedrig

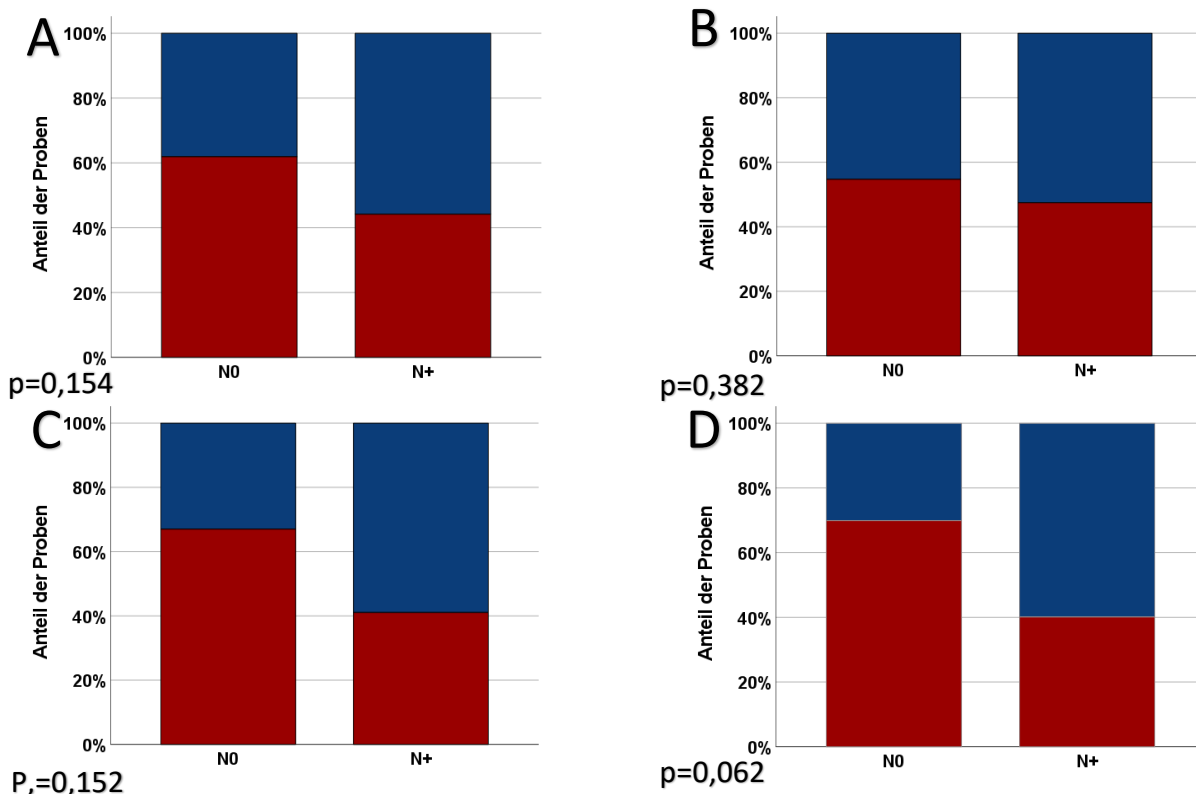


Abbildung 35 Säulendiagramm der Expression des VDRs und CYP24A1 geordnet nach dem Lymphknotenmetastasenstadium der Tumoren (N0=keine Lymphknotenmetastasen nachgewiesen, N+=Lymphknotenmetastasen nachgewiesen) für N=53, da 13 unbekannt. n(N0)=17, n(N+)=36. Anteil der Knochenmetastasen mit hoher Proteinexpression dunkelrot und mit niedriger Proteinexpression dunkelblau gefärbt. A: Proteinexpression des VDRs des Nukleus B: Proteinexpression des VDRs des Zytoplasmas, C: Proteinexpression des VDRs insgesamt, D: Proteinexpression des CYP24A1 Enzyms.

3.3.4 Korrelation aus VDR-Expression, CYP24A1 und extraossärer Metastasen

Neben Knochenmetastasen hatten 47 % der in die Untersuchungen aufgenommenen Patientinnen und Patienten zusätzlich extraossäre Metastasen. Aufgrund dieser Eigenschaft wurden die Patientinnen und Patienten in zwei Gruppen aufgeteilt, da weitere Manifestationsorte der Metastasierung oftmals mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind. Die eine Gruppe bestand aus Fällen ohne extraossäre Metastasen und die andere Gruppe aus Fällen mit extraossären Metastasen. Die Auswertung der VDR-Färbung und CYP24-Färbung wurde zwischen diesen beiden Gruppen verglichen, um so mögliche Unterschiede festzustellen. Dabei wurde als nichtparametrisches Verfahren der Pearsons Chi Quadrat-Test für die Auswertung der VDR-/CYP24A1-Färbung aufgrund der fehlenden Normalverteilung der Daten verwendet.

Es zeigte sich, dass für ein Signifikanzniveau von $p=0,03$ ($p < 0,05$) für die Auswertung des VDRs statistisch signifikant mit einer mittleren Effektstärke bei $r=0,316$ für die VDR-Färbung eine negative Korrelation zwischen VDR-Expression des Nukleus und extraossären Metastasen besteht. Zwischen der Expression des VDRs im Zytoplasma und dem Status von extraossären Metastasen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Ebenso war die Korrelation zwischen der Expression des VDRs insgesamt und extraossären Metastasen statistisch auf dem Signifikanzniveau von 0,05 signifikant (siehe Abbildung 36). Auch wurde durch Pearsons Chi Quadrat-Test der Zusammenhang zwischen der Expression des CYP24A1-Enzyms und extraossärer Metastasen untersucht. Hier zeigte sich auf dem Signifikanzniveau von $p=0,01$ ($p < 0,05$) für die Auswertung von CYP24A1 ein Unterschied der CYP24A1-Expression zwischen den beiden Gruppen. Die Effektstärke befand sich auf einem mittleren Niveau von $r > 0,3$. Abbildung 36 verdeutlicht die Unterschiede der Expression des VDR/CYP24A1 zwischen den zwei Gruppen.

3. Ergebnisse

Protein Expression: ■ = hoch ■ =niedrig

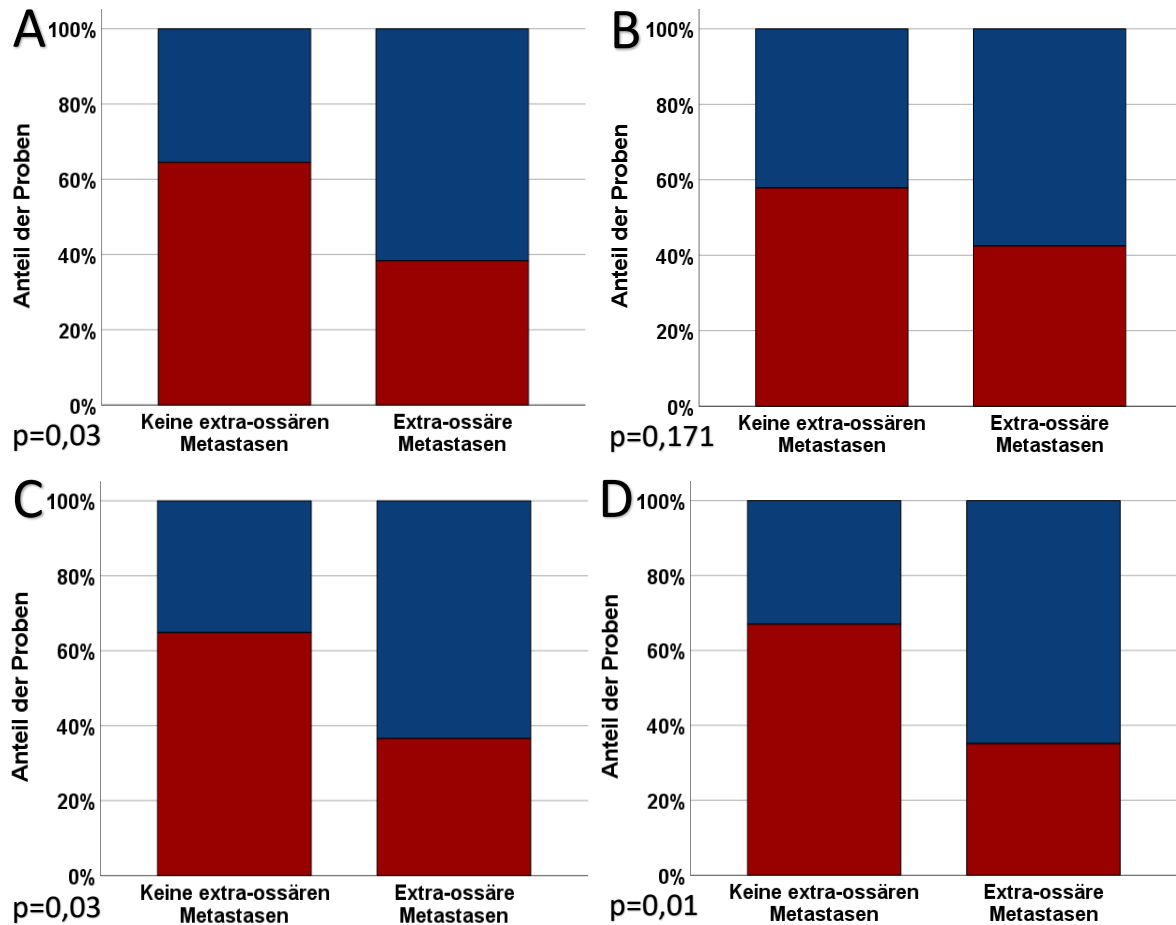


Abbildung 36 Säulendiagramm der Expression des VDRs und CYP24A1 geordnet nach extraossären Metastasen der Tumoren für n=60, da sechs unbekannt. Anteil der Knochenmetastasen mit hoher Proteinexpression dunkelrot und mit niedriger Proteinexpression dunkelblau gefärbt. **A:** Proteinexpression des VDRs des Nukleus **B:** Proteinexpression des VDRs des Zytoplasmas, **C:** Proteinexpression des VDRs insgesamt, **D:** Proteinexpression des CYP24A1 Enzyms. Abbildung A und D sind in ähnlicher Form in einer eigenen Publikation erschienen (132). Als open access-Artikel/creative commons-Lizenz frei verwendbar: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

3.3.5 Korrelation der VDR-Expression und CYP24A1-Expression

Der VDR und die CYP24A1-Expression sind nicht unabhängig voneinander. Der ligandengebundene VDR ist als Heterodimer mit dem RX-Rezeptor der stärkste Transkriptionsfaktor der CYP24A1-Expression. Der Immunoreactive Score der beiden immunhistochemischen Färbungen wurde mit dem Spearman Rho-Korrelationskoeffizienten korreliert. Dabei konnte eine positive Korrelation auf dem Signifikanzniveau von 0,001, also eine hoch signifikante positive Korrelation aus VDR-Immunoreactive Score und CYP24A1-Immunoreactive Score, berechnet werden. Abbildung 37 zeigt ein einfaches Streudiagramm mit einer Anpassungslinie, um den Zusammenhang der Auswertung des VDRs und von CYP24A1 zu verdeutlichen. Dafür wurden die ursprünglichen Wertungen des IRS verwendet.

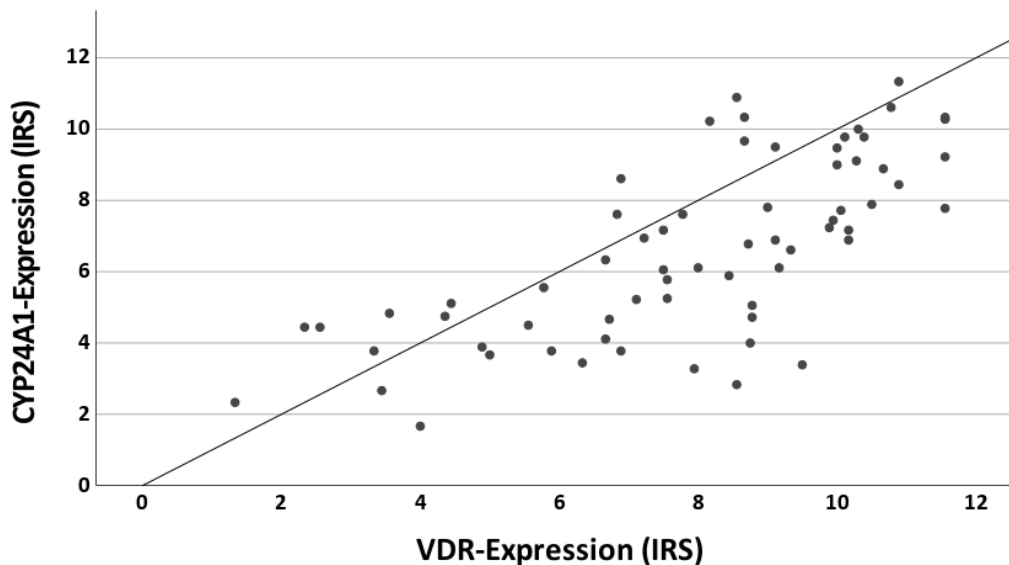


Abbildung 37 Einfaches Streudiagramm mit Anpassungslinie. Auf der x-Achse ist der IRS der VDR-Färbung insgesamt abgebildet und auf der y-Achse der IRS der CYP24A1-Färbung. Die Anpassungslinie lässt einen positiven nahezu linearen Zusammenhang vermuten. Statistisch ausgewertet ergibt sich eine signifikante positive Korrelation.

4. Diskussion

4.1 Die Vitamin D-VDR und CYP24A1-Achse und deren Auswirkungen auf das Tumorwachstum und die Prognose

4.1.1 Vitamin D als protektiver Faktor von Malignomen und mögliche Mechanismen

Ein ausgeprägter Vitamin D-Mangel führt bei Erwachsenen durch ein Ungleichgewicht der Calcium-Phosphat-Homöostase zu einer verminderten Mineralisierung der Knochen und in extremen Fällen zum Krankheitsbild der Osteomalazie. Darüber hinaus werden Antitumoreigenschaften von $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 und ein Vitamin D_3 -Mangel als Risikofaktor von Tumorerkrankungen seit einigen Jahren diskutiert (133). *In vitro*-Untersuchungen konnten bei Prostata- (101), Brust- (102), Lungen- (103), Nieren- (104) und auch in Schilddrüsenkarzinomzellen (105) wachstumsvermindernde Effekte durch $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 -Applikation zeigen. $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 erhöht in VDR-exprimierenden Tumorzellen die Expression von p21 und p27, die als Cyclin-abhängige-Kinasen (CDK)-Inhibitoren die Zellzyklusprogression an den Übergangspunkten des Zellzyklus inhibieren und so zu einem G1/G0-Zellzyklusarrest führen (134). Beispielsweise konnten in der Promotorregion des Tumorsuppressorgens p21 VDR-assoziierte Promotorbindestellen (response elements) identifiziert werden (135). Die Transkription des CDK-Inhibitors p21 wird somit durch die Bindung des ligandengebundenen Heterodimers aus VDR und RXR verstärkt (135). $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin- D_3 beeinflusst zudem das p27-Level, indem die Proteasom-abhängige Proteindegradation durch eine verminderte Phosphorylierung von p27 vermindert und damit der Zellzyklus inhibiert wird (134, 136). Darüber hinaus wird die Apoptose durch die Applikation von $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 beeinflusst. $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 führt zur Verminderung der apoptoseunterdrückenden Bcl-2-Proteine (Bax und Bad) und zu einer vermehrten Expression von proapoptotischen Faktoren *in vitro* (137, 138). Über verschiedene Mechanismen beeinflusst daher $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 das Wachstum und die Apoptose von Tumoren in präklinischen Modellen.

Diese *in vitro*-Untersuchungen schreiben $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 vielversprechende Antitumoreigenschaften zu, zudem wurden diese in den letzten Jahren vermehrt durch beobachtende epidemiologische Studien ergänzt. Durch Fallkontrollstudien oder Kohortenstudien konnten beim Mammakarzinom (82, 83), Lungenkarzinom (84, 85), Colonkarzinom (signifikant für Frauen) (86), Nierenkarzinom (87, 88) und Schilddrüsenkarzinom (89) erhöhte Tumorinzidenzen bei Patientinnen und Patienten mit niedrigen 25-OH-Vitamin D_3 -Serumspiegeln festgestellt werden. Andere Studien hingegen zeigten keinen Zusammenhang zwischen den 25-OH-Vitamin D_3 -Serumspiegeln und dem

Tumorrisiko (139, 140). Für das Prostatakarzinom wiesen verschiedene Studien uneindeutige Resultate auf. Ein hoher 25-OH-Vitamin D₃-Spiegel wurde bezüglich des Prostataumorrisikos als nicht beeinflussend (92), protektiv (141) oder als U-förmige Assoziation beschrieben (91). Männer mit sehr niedrigen oder sehr hohen 25-OH-Vitamin D₃-Serumspiegeln hatten in dieser Studie ein höheres Prostatakarzinomrisiko (91). Dies verdeutlicht die Inkonsequenz des Zusammenhangs aus 25-OH-Vitamin D₃-Spiegel und Tumorrisiko in epidemiologischen Studien. Ebenso wurde der 25-OH-Vitamin D₃-Serumspiegel in Patienten mit einer bereits diagnostizierten Krebserkrankung evaluiert. Hohe 25-OH-Vitamin D₃-Blutspiegel bei Tumorpatientinnen- und Patienten mit Mammakarzinom (83, 142), Prostatakarzinom (93, 143), Lungentumoren (85, 144) und Colonkarzinomen (94) waren mit einem signifikant besseren Überleben assoziiert. Für Patienten mit einem Prostatakarzinom wurde in einer weiteren Studie hingegen kein Zusammenhang zwischen 25-OH-Vitamin D₃-Spiegeln und der Prognose gezeigt (145).

Die inkonsequenten, aber teilweise protektiven Effekte von 1,25(OH)₂ Vitamin-D₃ auf Tumoren führte zur Anwendung von Vitamin D₃ als Präventivum in randomisiert-kontrollierten Studien. In der randomisierten, placebokontrollierten VITAL-Studie mit 25.871 Teilnehmern bekamen die Probandinnen und Probanden täglich etwa 2000 IU Vitamin D₃ und wurden im Median 5,3 Jahre beobachtet. In Subgruppenanalysen konnte dabei ein protektiver Effekt gegenüber fortgeschrittenen/metastatischen Tumoren für Personen mit BMI (Body-Mass-Index) <25 kg/m² gezeigt werden (95, 96). Ein Review von Metaanalysen der Vitamin D₃-Supplementierung fand zudem eine Risikoreduktion des Krebsmortalitätsrisikos durch Vitamin D₃-Supplementierung um 15 %. Die Mortalität insgesamt blieb jedoch unverändert (146).

4.1.2 Der VDR als prognostischer Faktor von Tumoren

Die meisten dieser beobachteten Antitumoreffekte von Vitamin D werden durch die Bindung von 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ an den VDR vermittelt. Die Expression des VDRs ist für die antiproliferative und proapoptotische Wirkung von 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ essenziell. *In vitro*-Untersuchungen zeigten beispielweise für Mammakarzinomzellen keine Wachstumsverminderung durch 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Applikation bei VDR-Knockout (106). Neben den für die Regulierung der Calcium-Phosphat-Homöostase beteiligten Organen wird der VDR unter anderem im gesunden Gewebe der Brust, der Prostata, des

Colons und in der Niere exprimiert (71). Diese nahezu ubiquitäre Verteilung des VDRs im Menschen impliziert die Bedeutung des VDRs für Zellen (71).

Die Expression des VDRs wurde ebenso in unterschiedlichen Primärtumoren untersucht. In Zellen der Prostata sank die Expression des VDRs mit fortschreitendem Alter und war bei *in vivo*-Untersuchungen mit dem Auftreten von prämaligen Prostataläsionen assoziiert (69, 108). Ähnliche Ergebnisse konnten für das Mammakarzinom gezeigt werden. Während in benignen Veränderungen der Mamma der VDR noch in 93,5 % exprimiert wurde, wurde der VDR nur in 56,2 % der invasiven Tumore nachgewiesen (70). Hingegen konnte in einer weiteren Studie kein Unterschied bezüglich der mRNA (*messenger ribonucleic acid*)-Expression des VDRs zwischen gutartigen und malignen Veränderungen der Brust festgestellt werden (147). In präkanzerösen Läsionen und Frühstadien des colorektalen Karzinoms allerdings war der VDR stark exprimiert, während in fortgeschrittenen Tumorstadien oder in Lymphknotenmetastasen dieser vermindert oder gar nicht exprimiert wurde (148). Dies konnte ebenso in Pankreaskarzinomen beobachtet werden, bei denen hochdifferenzierte Tumorgewebe zu 62,5 % eine hohe VDR-Expression aufweisen und im Vergleich mit einer besseren Prognose einhergingen. Schlecht differenzierte oder große Primärtumore des Pankreaskarzinoms hatten nur in 25 % eine hohe VDR-Expression (131). Insgesamt weisen diese Studien damit auf eine verminderte Expression des VDRs in malignen Tumoren hin. Damit ist es denkbar, dass eine verminderte Expression des VDRs die Tumorprogression beeinflusst.

Die prognostische Bedeutung ist damit jedoch noch unklar. Die Einstufung der Tumoren in die UICC-Stadieneinteilung nach der TNM-Klassifikation (Definition siehe Einleitung Abschnitt 1.1.5) erlaubt eine Abschätzung der Tumorprognose und hat unmittelbare Therapieauswirkungen. Untersuchungen der VDR-Expression und eine Korrelation mit den TNM-Stadien können daher Hinweise des Zusammenhangs zwischen der VDR-Expression und Tumorcharakteristika geben.

Das T-Stadium der TNM-Klassifikation ordnet die lokale Ausdehnung des Primärtumors ein. Die Expression des VDRs in den Knochenmetastasen dieser Untersuchung zeigte dabei keinen Zusammenhang mit der lokalen Ausdehnung der Primärtumoren (vergleiche Abbildung 34). Berger *et al.*, die die Expression des VDRs in Primärtumoren der Brust untersuchten, konnten ebenso keinen Zusammenhang zwischen der VDR-Expression und dem T-Stadium feststellen (149). In anderen Studienkollektiven hingegen wurde ein signifikanter Zusammenhang aus T-Stadium und VDR-Expression gezeigt (111, 113, 115,

131, 150) (siehe Tabelle 12). Diese Untersuchungen der VDR-Expression fanden jedoch an den Primärtumoren selbst statt und sind damit nur eingeschränkt mit den Knochenmetastasen zu vergleichen.

Ebenso konnte in dem Studienkollektiv der Patientinnen und Patienten mit Knochenmetastasen kein signifikanter Zusammenhang aus VDR-Expression und Lymphknotenmetastasen gezeigt werden. Jedoch konnte eine Tendenz festgestellt werden (Abbildung 35). Die Knochenmetastasen der Tumoren mit Lymphknotenmetastasen hatten im Vergleich zu Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen eine tendenziell niedrigere VDR-Expression. Ein signifikanter Zusammenhang von Lymphknotenmetastasen und niedriger VDR-Expression konnte hingegen für das Colonkarzinom beobachtet werden (115). Für das Brust- und Pankreaskarzinom konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang gezeigt werden (113, 131).

Das Grading der Tumoren ist kein Bestandteil der TNM-Klassifikation, dennoch ist es ein wichtiges histopathologisches Merkmal maligner Tumoren. Schlecht differenzierte Tumorgewebe haben im Allgemeinen eine schlechtere Prognose und im Vergleich zu gut differenzierten Geweben eine geringere Übereinstimmung mit dem Ausgangsgewebe. Für das Prostatakarzinom wird als Klassifikation der Differenzierung der Gleason-Score angewendet. Deshalb wurden die Knochenmetastasen des Prostatakarzinoms neben denen des follikulären Schilddrüsenkarzinoms nicht bei der statistischen Auswertung berücksichtigt. Für die Knochenmetastasen der unterschiedlichen Primärkarzinome ergab sich kein signifikanter Unterschied der VDR-Expression (Abbildung 33). Ein Trend der hohen nukleären VDR-Expression ($p=0.07$) und der VDR-Expression insgesamt ($p=0.157$) in gut-mäßig differenzierten Tumoren war zu beobachten. Diese Tendenz war hingegen für die zytoplasmatische Expression des VDRs geringer. Für die Primärtumoren des Lungenkarzinoms als auch des Colonkarzinoms konnte in anderen Studien ebenso kein signifikanter Unterschied der VDR-Expression zwischen gut und schlecht differenzierten Tumoren nachgewiesen werden (114, 115). Hingegen konnte ein Zusammenhang einer hohen VDR-Expression in gut differenzierten Tumoren für das Mammakarzinom und das Pankreaskarzinom beobachtet werden (131, 150, 151). Ebenso konnte in gut differenzierten Tumoren der Prostata (Gleason-Score) eine höhere Proteinexpression des VDRs nachgewiesen werden (111).

Zusammengefasst ist eine hohe Expression des VDRs häufig mit günstigen Tumoreigenschaften assoziiert. Eine niedrige Expression des VDRs wird in verschiedenen

Primärtumoren mit aggressiven histopathologischen Eigenschaften korreliert (111, 131, 150, 152). Patientinnen und Patienten mit Tumoren mit einer hohen VDR-Expression weisen tendenziell eine verminderte Mortalität und bessere Prognose auf (111, 114, 115, 131). Allerdings wurde dieser Zusammenhang in anderen Studien nicht bestätigt (113, 153). Hypothetisch wäre es möglich, dass Tumorzellen den VDR vermindert exprimieren, um sich damit vor den beschriebenen antiproliferativen und proapoptischen Eigenschaften von 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ zu schützen. Eine Reduktion der VDR-Expression in Tumoren vermindert die Sensitivität gegenüber den Antitumoreigenschaften von 1,25(OH)₂-Vitamin D₃. Daher erscheint es möglich, dass die Herunterregulierung der Vitamin-D-VDR-Achse in Tumorzellen zur Tumorentstehung und -progression beiträgt. Diese Hypothese unterstützt, dass maligne Tumoren unterschiedlicher Entität eine verminderte Expression des VDRs aufweisen (70, 131, 148). Zudem könnte dies auch eine Erklärung der Inkonsequenz des Zusammenhangs aus 25-OH-Vitamin D₃-Spiegeln und Tumorrisiko/Prognose darstellen. In der Nurse Health Study war eine immunhistochemisch ausgewertete hohe VDR-Expression des Nucleus in Verbindung mit hohen 25-OH-Vitamin D₃-Serumspiegeln mit einem niedrigeren Brustkrebsrisiko assoziiert (RR=0.67, CI 0.48-0.93) (112). Im Allgemeinen jedoch waren die 25-OH-Vitamin D₃-Serumspiegel nicht mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert. Allerdings sind die beschriebenen Zusammenhänge je nach Primärtumor nicht eindeutig, weshalb Tabelle 12 eine Übersicht einiger Studien gibt, die den Zusammenhang zwischen der VDR-Expression und den TNM-Stadien als auch der Prognose untersuchten.

Table 12 Tabellarische Übersicht der verfügbaren klinischen Studien, die die VDR-Expression in Primärtumoren mittels Immunhistochemie bestimmten und den Zusammenhang mit den histopathologischen bzw. patientenspezifischen Charakteristika untersuchten. *Legende:* n=Anzahl der untersuchten Patientinnen und Patienten, TNM-Stadienkategorie, pos.=signifikanter Zusammenhang aus hoher VDR-Expression und vorteilhaftem Kategoriestadium, ns=nicht signifikant, - keine Angabe

Primarius	Quelle	n (Pat.)	T	N	M	Grading	Prognose (Mortalität)
Mamma	(113)	1114	pos.	ns	-	-	ns
	(149)	136	ns	ns	-	-	pos.
	(150)	718	pos.	ns	-	pos.	pos.
	(154)	82	pos.	pos.	-	ns	pos.
Prostata	(111)	841	pos.	-	Knochen (pos.)	pos. (Gleason-Score)	pos.
Lunge	(114)	73	-	-	-	ns	pos.
	(155)	154	-	-	-	-	-
	(156)	35	-	-	-	pos.	-
Pankreas	(131)	61	pos. (mit Tumorgroße)	ns	Leber (ns)	pos.	pos.
Colon	(115)	188	pos.	ns	Pos.	ns	pos.
Ösophagus	(110)	15	-	-	-	ns	-
Harnwege	(157)	71	pos. (Expression Zytoplasma)	-	pos.	ns	pos.
	(153)	68	ns	ns	ns	ns	ns
Schilddrüse	(152)	136	-	pos.	-	ns	-

4.1.3 CYP24A1- ein Protoonkogen?

Die 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ inaktivierende 24-Hydroxylase ist ein mitochondriales inneres Membranprotein und wird in allen Zellen mit VDR exprimiert (63). Durch die Bindung des aktiven 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ an den VDR wird die Expression der 24-Hydroxylase im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus gesteigert. Auch die CYP24A1-Expression wurde in präklinischen Tumormodellen untersucht. Tumorzellen mit einer CYP24A1-Überexpression zeigten dabei ein gesteigertes Tumorstadium unabhängig von der Menge der 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Supplementierung. Eine CYP24A1-Inhibition führte hingegen zur Verminderung des Tumorstadiums (126). Eine klinische Untersuchung von Lopes *et al.* zeigte, dass CYP24A1 in invasiven Mammakarzinomtumoren deutlich häufiger hoch exprimiert ist als in benignen Veränderungen (70). Im Gegensatz dazu konnte eine weitere Studie, die die Expression der am Vitamin D-Metabolismus beteiligten Enzyme untersuchte, keine signifikanten Unterschiede der CYP24A1-Expression zwischen gutartigen und malignen Veränderungen der Brust feststellen (147). Studien, die andere Primärtumoren

untersuchten, weisen hingegen ähnliche Resultate wie Lopes *et al.* bezüglich der Expression des CYP24A1-Enzyms auf (70). Allerdings untersuchten diese Studien teilweise die mRNA-Level und nicht die Proteinexpression durch Immunhistochemie. Die CYP24A1-mRNA-Expression oder Proteinexpression war in den malignen Tumoren der Prostata (121, 158), der Lunge (122, 124), des Colons (107, 123), der Niere (159) und Schilddrüse (160) im Vergleich zu benignen Veränderungen signifikant erhöht. Eine erhöhte Expression des CYP24A1-Enzyms korrelierte ebenso mit fortgeschrittenen Tumorstadien des Prostatakarzinoms (121). CYP24A1 wird somit von verschiedenen Quellen als potentielles Protoonkogen beschrieben (121, 161).

Ähnlich der Untersuchung der VDR-Expression wurden die ausgewerteten CYP24A1-Level mit den Eigenschaften der Tumoren und Patientinnen und Patienten in Form der TNM-Klassifikation korreliert. In den Knochenmetastasen konnte kein signifikanter Unterschied der CYP24A1-Expression zwischen den T-Stadien festgestellt werden (Abbildung 34). Untersuchungen der CYP24A1-Expression in Primärtumoren zeigten, dass Tumoren mit tiefer Lokalinfiltration (fortgeschrittenem T-Stadium) der Primärtumoren der Prostata (121), der Lunge (124) und des Colons (123) eine signifikant höhere Expression des CYP24A1-Enzyms aufwiesen. Für die Primärkarzinome der Niere und der Brust korrelierte die CYP24A1-Expression hingegen nicht mit dem T-Stadium (159, 162).

Die Knochenmetastasen der Tumoren mit Lymphknoteninvasion zeigten eine nicht-signifikante Tendenz ($p=0.062$) hin zu einer niedrigeren Expression des CYP24A1-Enzyms (siehe Abbildung 35). Keine Zusammenhänge der CYP24A1-Expression und Lymphknoteninvasion konnten für das Lungenkarzinom (124), Nierenkarzinom (159) und Mammakarzinom (162) gezeigt werden. Hingegen hatten Tumoren des Colons mit Lymphknoteninvasion eine signifikant höhere Expression von CYP24A1 (123). Für das Colonkarzinom wurden von Sun *et al.* damit gegenläufige Ergebnisse zu den Knochenmetastasen der unterschiedlichen Primärtumoren beobachtet (123). Allerdings ist die Expression von CYP24A1 in den Knochenmetastasen nicht gleichbedeutend mit der Expression von CYP24A1 in den Primärtumoren, weshalb diese Ergebnisse nicht eindeutig vergleichbar sind.

Die Proteinexpression des CYP24A1-Enzyms zwischen gut-mäßig differenzierten Tumoren und schlecht differenzierten Tumoren war insbesondere zwischen Einordnung in Grading 2 und 3 nahezu identisch (siehe Abbildung 33). Lediglich bei gut differenzierten Tumoren gab es tendenziell eine höhere Expression, wobei die Anzahl der Tumoren mit Grading 1 mit fünf

Patientinnen oder Patienten nur sehr gering war. Vergleichsweise hohe Expressionen von CYP24A1 in schlecht differenzierten Tumoren konnten für das Prostatakarzinom (121) und das Lungenkarzinom (124) beobachtet werden. Hingegen gab es für das Colonkarzinom (123) und Nierenkarzinom (159) keinen signifikanten Zusammenhang der CYP24A1-Expression und der Differenzierung der Tumoren.

Zusammengefasst wird CYP24A1 im Vergleich zu benignen Veränderungen vor allem von malignen Tumoren unterschiedlicher Entität vermehrt exprimiert (121, 123, 124, 158). CYP24A1 wird deshalb als potenzielles Protoonkogen beschrieben (163). Eine hohe CYP24A1-Expression ist beispielsweise für das Prostata- und Lungenkarzinom mit einer schlechten Differenzierung und einer fortgeschrittenen Größe des Primärtumors assoziiert (121, 123, 124). Für das Colon- (123) als auch das Lungenkarzinom (124) hatten Patientinnen und Patienten mit einer hohen CYP24A1-Expression des Primärtumors eine schlechtere Prognose. Cai *et al.* hingegen untersuchten die CYP24A1-Expression bei Mammakarzinompatientinnen und korrelierten diese mit der Überlebenszeit. Dabei hatten Patientinnen mit Tumoren mit einer niedrigen CYP24A1-mRNA-Expression eine verminderte Überlebenszeit (162). Hypothetisch ist es möglich, dass insbesondere aggressive und fortgeschrittene Tumoren CYP24A1 hoch exprimieren, um das antiproliferativ wirkende 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ schneller abzubauen. Diesen Zusammenhang bzw. Hypothese können allerdings nicht alle Studien feststellen (162) (Tabelle 13). Zudem ist die Expression des CYP24A1-Enzyms nicht unabhängig von der Expression des VDRs zu bewerten. Die Knochenmetastasen der unterschiedlichen Primärkarzinome zeigten eine signifikant positive Korrelation der VDR-Expression und CYP24A1-Expression. Tumoren mit einer hohen Expression des VDRs hatten tendenziell ebenso eine hohe Expression des CYP24A1-Enzyms. In einer Untersuchung der Tumoren des papillären Schilddrüsenkarzinoms korrelierten die VDR- und CYP24A1-Level ebenso signifikant positiv (152). Daher ist ebenso eine Verminderung des kompletten Vitamin D-Signalwegs in malignen Tumoren denkbar. Auch die Expression von CYP24A1 betreffend sind die Zusammenhänge aus aggressiven Tumoreigenschaften/schlechter Prognose und verminderter CYP24A1-Expression nicht eindeutig, weshalb Tabelle 13 als Übersicht diesbezüglich dient.

Table 13 Tabellarische Übersicht der verfügbaren klinischen Studien, die die CYP24A1-Expression in Primärtumoren auswerteten und den Zusammenhang mit den histopathologischen bzw. patientenspezifischen Charakteristika untersuchten. Legende: n=Anzahl, TNM-Stadienkategorie, pos.=signifikanter Zusammenhang aus hoher CYP24A1-Expression und nachteilhaftem Kategoriestadium/fortgeschrittenem Tumor, neg. = signifikanter Zusammenhang aus nachteilhaftem Kategoriestadium und VDR-Expression, ns=nicht signifikant, - keine Angabe, OS=overall survival

Primarius	Quelle	n (Pat.)	T	N	M	Grading	Prognose
Mamma	(162)	1102	ns	ns	ns	-	CYP24A1↓ OS↓
	(164)	30	ns	ns	-	ns	-
Prostata	(121)	56	pos.	-	-	pos.	-
Lunge	(124)	187	pos.	ns	-	pos.	CYP24A1 ↑ OS ↓
Colon	(123)	99	pos.	CYP24A1 ↑ bei N+	-	ns	CYP24A1 ↑ OS ↓
Niere	(159)	30	ns	ns	ns	ns	-
Schilddrüse	(152)	136	-	CYP24A1↓ bei N+	CYP24A1 ↓ bei M1	-	-
	(160)	100	pos.	CYP24A1↑ bei N+	-	-	-

4.2 Der Einfluss des Vitamin D-Signalwegs auf den knöchernen Metastasierungsprozess von Tumoren

25-OH-Vitamin D₃-Mangel ist in Patientinnen und Patienten mit Knochenmetastasen verbreitet (165, 166) und kann das Tumorwachstum im Knochen durch indirekte und direkte Effekte beeinflussen. Durch den Einfluss auf das „bone remodelling“ erhöht ein 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Mangel den Knochenumbau, der zur Freisetzung von in der Knochenmatrix gespeicherten Wachstumsfaktoren führt (67). Dieser Knochenumbau führt einerseits zu einem erhöhten Risiko der Absiedelung von Tumormetastasen im Knochen und fördert andererseits durch die Freisetzung der gespeicherten Wachstumsfaktoren ein weiteres Tumorwachstum (indirekter Effekt) (97, 98). Dieses Tumorwachstum führt dann zum vielfach beschriebenen *Circulus vitiosus* der Knochenmetastasierung (41). Durch die immunhistochemischen Untersuchungen wurde der VDR und CYP24A1 in einer Reihe von Knochenmetastasen unterschiedlicher Entität nachgewiesen. Die Tumorzellen der Knochenmetastasen wiesen zu 59 % eine hohe VDR-Expression insgesamt und in 71 % eine hohe VDR-Expression des Nukleus auf. Damit ist es bei adäquaten 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Leveln möglich, dass 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ das Tumorwachstum der Knochenmetastasen in diesen Patientinnen und Patienten vermindert, wenn über den VDR die beschriebenen wachstumsvermindernde Effekte vermittelt werden (direkter Effekt). Häufig besteht

allerdings bei Patientinnen und Patienten mit Knochenmetastasen ein 25-OH-Vitamin D-Mangel, weshalb Patientinnen und Patienten mit Knochenmetastasen von einer Bestimmung der systemischen 25-OH-Spiegel und entsprechender Substitution profitieren könnten (166). Die ossäre Metastasierung ist durch einen komplexen Prozess charakterisiert (41). In klinischen Untersuchungen ist es nur sehr eingeschränkt möglich, die Knochenmetastasen zu besonders frühen Zeitpunkten auf die Expression des VDRs zu untersuchen. Resektionen der Knochenmetastasen finden statt, wenn diese klinische Konsequenzen beispielsweise in Form einer Schenkelhalsfraktur haben. Biopsien hingegen können bei Vorliegen einer Knochenmetastase eines unklaren Primarius zur histologischen Identifikation stattfinden.

Für die Detektion von Knochenmetastasen ist eine bestimmte Größe des Tumors und damit Zellzahl notwendig. Die Untersuchung der Expression des VDRs der Knochenmetastasen ist deshalb auf eher späte Zeitpunkte des Wachstums der Knochenmetastasen beschränkt. Präklinische Modelle könnten daher zum Verständnis der Rolle des VDRs insbesondere in Bezug auf die Liganden-unabhängige Funktion des VDRs bei der frühen ossären Metastasierung hilfreich sein. Horas *et al.* zeigten in einem präklinischen *in vivo*-Modell von Knochenmetastasen, dass der Knockdown des VDRs zu einer erhöhten Migration und Invasivität der Tumorzellen führt. Hierbei wurde ein VDR- Knockdown in der MDA-MB-231 Brustkrebszelllinie durchgeführt und diese intrakardial injiziert. Im Vergleich zu den VDR-Wildtyp-Tumorzellen kam es zu einer schnelleren Absiedelung der VDR-Knockdown-Tumorzellen im Knochen und zu einem schnelleren und größeren Wachstum der Knochenmetastasen insbesondere zu frühen Zeitpunkten (118). Ergänzende *in vitro*-Untersuchungen zeigten, dass der Knockdown des VDRs den Verlust der epithelspezifischen Proteinexpression (E-Cadherin), das als transmembranes Glykoprotein Zell-Zell-Kontakte stabilisiert, fördert. Gleichzeitig kam es durch den Knockdown des VDRs zur verstärkten Expression mesenchymaler Proteine wie Vimentin, das als Intermediärfilament als Teil des Zytoskeletts mesenchymaler Zellen fungiert (118). Diese epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist insbesondere in der frühen Phase der Knochenmetastasierung von Bedeutung, da diese einen kritischen Schritt des Prozesses der Metastasierung durch die Steigerung der Mobilität und Invasivität der Tumorzellen darstellt. Bei VDR hoch-exprimierenden Mammakarzinomzellen konnte zudem durch präklinische Untersuchungen der epithelialen Marker eine verminderte EMT festgestellt werden (130). Eine niedrige Expression des VDRs begünstigt damit vermutlich insbesondere zu frühen Zeitpunkten der Metastasierung eine Ausbreitung der Tumoren in präklinischen Modellen.

In den Untersuchungen der Knochenmetastasen wiesen Patientinnen und Patienten mit multiplen metastasierten Tumoren eine signifikant niedrigere Expression des VDRs des Nukleus ($p=0.03$) und ebenso des $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 katabolisierenden Enzyms ($p=0.01$) auf (siehe Abbildung 36). Dies unterstützt die Hypothese, dass Tumorzellen mit verminderter Expression des VDRs ein höheres Metastasierungspotential und aggressive Tumoreigenschaften aufweisen. Tumorzellen könnten damit in der Lage sein, durch Verminderung der VDR-Expression eine Dysregulation der durch $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 beeinflussten Gene zu induzieren und damit den Metastasierungsprozess voranzutreiben. Diese Hypothese unterstützt ebenso eine Studie, die die VDR-Expression in Primärtumoren der Brust untersuchte. Patientinnen mit ossär metastasierten Mammakarzinomen wiesen signifikant niedrigere VDR Protein- und mRNA-Level im Vergleich zu Patientinnen ohne Knochenmetastasen auf. Zudem war eine niedrige VDR-Expression Risikofaktor einer schlechten Prognose (167). Auch die Lungenmetastasenbildung im Mausmodell bei Brustkrebs mit hoher VDR-Expression ist im Vergleich zu Tumoren mit niedriger VDR-Expression signifikant reduziert (130). Weiterhin wurde kürzlich ein Vergleich der VDR-Expression in Knochenmetastasen des Mammakarzinoms und den Primärtumoren mit einer kleineren Probandinnengruppe mit 15 Patientinnen vorgenommen. Die Knochenmetastasen wiesen dabei eine signifikant niedrigere Expression des VDRs auf (119).

Im Vergleich zu der VDR-Expression des Nukleus konnte zwischen Patientinnen und Patienten mit multiple metastasierten und nur ossär metastasierten Tumoren kein signifikanter Unterschied der zytoplasmatischen Expression des VDRs festgestellt werden. Interessanterweise wiesen insbesondere die Knochenmetastasen des Prostatakarzinoms deutliche Unterschiede der Expression des VDRs zwischen Nukleus und Zytoplasma auf (siehe Abbildung 16). Die Bindung von $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 an den VDR geht mit der Translokation des VDRs in den Nukleus und damit erhöhten VDR-vermittelten Transkription einher (168). Dennoch bindet auch der Liganden-ungebundene VDR an DNA-Bindestellen und beeinflusst damit die Transkription (169). In einem Mausmodell von Zheng *et al.* wurde ein Knockdown des VDRs in Prostata- und Mammakarzinomzellen durchgeführt. Diese VDR-Knockdown-Zellen zeigten unabhängig von $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 bei ektooper (tibialer als auch subkutaner) Implantation ein geringeres Wachstum (117). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Tumorzellen mit VDR-Wildtyp in Abwesenheit von $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 ein höheres Tumorwachstum im Knochen und im Fettkörper der

Mamma aufweisen (170). *In vitro* wurde zusätzlich der VDR in den Tumorzellen so verändert, sodass dieser nicht in den Nukleus transloziert und im Zytoplasma verbleibt. Diese Form des nur zytoplasmatisch lokalisierten VDRs förderte dabei das Wachstum der Tumorzellen des Mammakarzinoms im Vergleich zu den VDR-Knockdown Zellen (170). Diese präklinischen Studien geben somit weitere Hinweise auf eine potenzielle Rolle des Vitamin D-Signalwegs auf die ossäre Metastasierung von Tumoren, die in klinischen Studien bislang nicht erfasst werden können.

4.3 Limitationen der Studie

Eine Limitation der Studie ist, dass der Umfang der Untersuchungen mit 66 Patientinnen und Patienten begrenzt ist, da insbesondere in den Subgruppen nach Entität des Primärtumors teilweise nur wenige Knochenmetastasen verfügbar waren. Dies reduziert die Signifikanz und Aussagekraft der Untersuchungen. Allerdings sind Resektionen oder Biopsien von Knochenmetastasen im klinischen Alltag eher selten. Eine weitere Limitation der Studie ist, dass der 25(OH)-Vitamin D₃-Spiegel, eine mögliche Vitamin D₃-Supplementierung und die PTH-Spiegel der Patientinnen und Patienten nicht erfasst wurden. Diese können sich über das Jahr allerdings je nach Jahreszeit und Sonneneinstrahlung unterscheiden (112). Mögliche Zusammenhänge mit der VDR- und CYP24A1-Expression konnten somit allerdings nicht erfasst werden. Jedoch können die lokalen 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Spiegel, die durch die Expression des 25-OH-Vitamin D₃ aktivierenden Enzyms CYP27B1 und deaktivierenden Enzyms CYP24A1 beeinflusst werden, praktisch nicht erfasst werden. Eine weitere Untersuchung des 25-OH-Vitamin D₃ aktivierenden Enzyms CYP27B1 der Knochenmetastasen wurde nicht vorgenommen, allerdings wäre dies zur vollständigen Abbildung des lokalen 25-OH-Vitamin D₃-Metabolismus hilfreich. Auch wäre eine immunhistologische Untersuchung der Primärtumoren des VDRs und von CYP24A1 interessant gewesen, um einen direkten Vergleich der Proteinexpressionen zwischen Metastasen und Primärtumor ziehen zu können. Weitere Limitationen der immunhistologischen Untersuchungen der Knochenmetastasen sind, dass keine Daten bezüglich der Größe der Knochenmetastase vorliegen. Im klinischen Alltag werden Tumoren und Metastasen erst zu späteren Zeitpunkten des Wachstums detektiert. Damit kann eine Veränderung der Expression des VDRs zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums der Tumoren und der Knochenmetastasen nicht ermittelt werden. Zudem wäre eine Untersuchung der VDR-Expression von im Blutstrom zirkulierenden Tumorzellen

(disseminated tumour cells), die sich vom Primärtumor gelöst, aber noch nicht den Metastasierungsort erreicht haben, mittels Flüssigbiopsie (liquid biopsy) interessant. Dennoch konnte zum ersten Mal eine größere Anzahl von Knochenmetastasen unterschiedlicher Herkunft insgesamt auf die VDR-Expression und das CYP24A1-Enzym untersucht werden. Damit konnten im Sinne einer Pilotstudie weitere Hinweise auf die Rolle des Vitamin D-Signalwegs bei der Tumorprogression und Bildung von Knochenmetastasen gesammelt werden.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Zahlreiche Studien konnten bislang auf einen positiven Zusammenhang zwischen höheren 25-OH-Vitamin D₃-Spiegeln, niedrigeren Tumorinzidenzen (82, 85, 88) und einer besseren Prognose von Patienten mit bereits diagnostizierten Tumoren hinweisen (85, 94, 142, 143). Ebenso konnten in präklinischen Untersuchungen mögliche Mechanismen der Antitumoreigenschaften von 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ ergründet werden (134, 135). Allerdings konnten nicht alle Studien einen signifikanten Zusammenhang zwischen hohen 25-OH-Vitamin D₃-Spiegeln und verminderter Tumorinzidenz feststellen (139, 140, 145). Die meisten Studien erfassten lediglich einen Aspekt des Zusammenhangs zwischen Vitamin D und Tumoren: den Zusammenhang des systemischen 25-OH-Vitamin D₃-Levels und der Tumorinzidenzen oder der Prognose von Tumoren. Der VDR-Status und die lokalen Vitamin D-metabolisierenden Enzyme wurden meistens nicht erfasst und somit völlig außer Acht gelassen. Das systemische 25-OH-Vitamin D₃-Level ist zudem von verschiedenen Faktoren abhängig und unterscheidet sich je nach Jahreszeit und Sonneneinstrahlung (95). Weiterhin wird das in den Tumorzellen verfügbare aktive 1,25(OH)₂ Vitamin D₃ von der Expression des CYP27B1- (Synthese) und CYP24A1 (Katabolismus)-Enzyms beeinflusst.

Interessanterweise wird das CYP24A1-Enzym in malignen Tumoren überwiegend verstärkt exprimiert (121, 123, 124, 159). Der VDR hingegen wird in malignen Tumoren im Vergleich zu benignen Veränderungen unterschiedlicher Entität vermindert exprimiert (70, 131, 148). Damit ist es möglich, dass eine verminderte Expression des VDRs zur Tumorprogression beiträgt. Die ebenso verminderte Expression des CYP24A1-Enzyms in multiplen metastasierten Tumoren lässt eine vermehrte Dysregulation des gesamten Vitamin D₃-Signalwegs und -Metabolismus in den Tumorzellen vermuten. Diese Dysregulation ermöglicht Tumorzellen möglicherweise, sich den VDR-vermittelten antiproliferativen Eigenschaften von 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ zu entziehen. Die Dysregulation der 1,25(OH)₂

Vitamin D₃-Sensibilität stellt zudem eine mögliche Ursache der inkonsequenten Resultate der beobachtenden und randomisiert kontrollierten-Studien zwischen 25-OH-Vitamin D₃-Level und Tumorinzidenzen/Progression dar.

Auch die Expression des VDRs selbst und unabhängig von seinem Liganden 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ trägt zu einer Steigerung des Invasions- und Metastasierungspotentials von Tumoren bei (117, 170). Allerdings ist die Expression des VDRs und von CYP24A1 in Knochenmetastasen bisher unklar. In dieser Studie konnte der VDR und CYP24A1 in Knochenmetastasen des Prostata-, Mamma-, Nieren-, Lungen-, colorektalen-, Schilddrüsen- und weiteren -karzinomen nachgewiesen werden. Patientinnen und Patienten mit tendenziell schlecht differenzierten (nicht signifikant) und multiple metastasierten Tumoren wiesen eine verminderte Expression des VDRs und von CYP24A1 in den Knochenmetastasen auf. Diese Ergebnisse bestätigen ein in vivo-Modell der Knochenmetastasierung, wobei eine schnellere Manifestation der Knochenmetastasen und ein vermehrtes Metastasenwachstum von Brustkrebszellen mit VDR-Knockout festgestellt wurde (118). Ebenso eine klinische Untersuchung, bei der Patientinnen mit Mammakarzinom mit einer niedrigen VDR-Expression signifikant vermehrt Knochenmetastasen aufwiesen (167). Mit dem Nachweis des VDRs und von CYP24A1 in Knochenmetastasen unterschiedlicher Entität konnte hier somit erstmals gezeigt werden, dass der gesamte Vitamin D₃-Signalweg und der Vitamin D₃-Metabolismus bei Patientinnen und Patienten mit Knochenmetastasen von Bedeutung sein könnte.

Weitere klinische Untersuchungen sind essenziell, um den Zusammenhang zwischen dem Vitamin D₃-Signalweg und -Metabolismus von Tumoren weiter zu erforschen. Dabei sollte neben den 25-OH-Vitamin D₃-Spiegeln (mehrfache Messung zu unterschiedlichen Zeitpunkten) ebenso die Expression des VDRs und der metabolisierenden Enzyme von Vitamin D₃ bestimmt werden, um so den gesamten Vitamin D-Signalweg und -Metabolismus zu erfassen. Nur dadurch wird es möglich sein, die 1,25(OH)₂- Vitamin D₃-Level und den Vitamin D-Signalweg in den Tumorzellen verbessert abzubilden. Dies ist insbesondere bei Patientinnen und Patienten mit bereits operierten Tumoren und folgenden diagnostischen immunhistologischen Untersuchungen bei einer Vitamin D₃-Substitution möglich. Denkbar wäre auch die routinemäßige Erfassung des VDR-Status von Primärtumoren im Sinne eines prognostischen Markers für Metastasen. So könnte sich die Untersuchung des VDR-Status von Primärtumoren zudem zur Identifikation von Patientinnen und Patienten mit hohem Risiko zur Ausbildung von Knochenmetastasen bei besonders niedrigem VDR-Status im

Primärtumor eignen. Dadurch ist bei diesen Patientinnen und Patienten beispielsweise an ein engmaschigeres Screening und Untersuchung auf Knochenmetastasen zu denken. Weiterhin ist es bei Patientinnen und Patienten mit Knochenmetastasen wichtig, die 25-OH-Vitamin D₃-Spiegel zu erfassen und im Falle den 25-OH-Vitamin D₃-Mangel auszugleichen, da so der Knochenabbau und mögliche indirekte Effekte auf das Wachstum von Knochenmetastasen reduziert werden (98). Dies sollte jedoch unter Beachtung der Calcium-, Phosphat- und PTH Spiegel durchgeführt werden (66). Auch eine selektive Inhibition von CYP24A1 in Tumorzellen ist zu erwägen (121), die jedoch das Risiko einer Hypercalcämie und 1,25(OH)₂- Vitamin D₃-Intoxikation birgt.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass Knochenmetastasen verschiedenen Ursprungs den VDR und CYP24A1 in unterschiedlicher Weise exprimieren. Dies verdeutlicht unter Einbezug aktueller Literatur, dass der 25-OH-Vitamin D₃-Spiegel als auch der gesamte Vitamin D-Signalweg und –Metabolismus bei Patientinnen und Patienten mit Knochenmetastasen von Bedeutung sind. Weitere größere Studien, die die Expression des VDRs und der Vitamin D-metabolisierenden Enzyme in Metastasen und Primärtumoren untersuchen, sind hilfreich, um das Verständnis der Rolle des VDRs bei der ossären Metastasierung zu erweitern.

5. Zusammenfassung

Knochenmetastasen sind unter den drei häufigsten Manifestationsorten metastatischer Absiedelungen von fortgeschrittenen Tumorerkrankungen. Dabei sind insbesondere Patientinnen und Patienten mit Prostata- und Mammakarzinom von Knochenmetastasen betroffen. Diese Knochenmetastasen führen häufig zu einer deutlichen Verschlechterung der Lebensqualität und zu einer Begrenzung der Therapieoptionen auf lediglich palliative Ansätze.

Die biologisch aktive Form von Vitamin D₃, 1,25(OH)₂-Vitamin D₃, zeigt in präklinischen Studien antiproliferative und differenzierende Effekte auf Tumorzellen (101, 102, 104), die hauptsächlich durch die Bindung an den Vitamin D-Rezeptor (VDR) vermittelt werden. Darüberhinaus konnte präklinisch gezeigt werden, dass eine niedrige Expression des VDRs, ligandenunabhängig, die Knochenmetastasierung und das Tumorwachstum begünstigt (118). Eine niedrige VDR-Expression ist in Primärtumoren in klinischen Studien mit aggressiven Tumoreigenschaften assoziiert (111, 113, 115) und kann zudem mit einer erhöhten/früheren ossären Metastasierung einhergehen (167). Zudem gibt es Hinweise auf einen dysregulierten 1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Katabolismus durch eine erhöhte Expression des 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ katabolisierenden Enzyms CYP24A1/24-Hydroxylase in primären Tumorzellen (70, 121, 122). Durch die Untersuchungen der Primärtumoren ist damit zu hypothetisieren, dass die Expression des VDRs und von CYP24A1 bei der Tumorprogression und Knochenmetastasierung von Bedeutung sein könnte. Entsprechende Untersuchungen des VDRs und der 24-Hydroxylase in Knochenmetastasen fehlen allerdings. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Expression des VDRs und von CYP24A1 in Knochenmetastasen unterschiedlicher Primärtumoren von 66 Patientinnen und Patienten untersucht und mögliche Assoziationen mit aggressiven Tumoreigenschaften analysiert.

Der VDR konnte sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus nachgewiesen werden, während CYP24A1 nur im Zytoplasma lokalisiert war. Dabei wiesen insgesamt 71 % der Knochenmetastasen eine hohe VDR-Expression im Nukleus und 56 % im Zytoplasma auf. 59 % der Knochenmetastasen wiesen eine hohe Expression des VDRs insgesamt auf. CYP24A1 war ebenso in 59 % der Knochenmetastasen hoch exprimiert. Bei der Auswertung des Zusammenhangs zwischen den TNM-Stadien und des Gradings zeigte sich ein nicht signifikanter Trend von schlecht differenzierten Tumoren hin zu einer niedrigeren nukleären VDR-Expression (p=0.07, siehe Abbildung 33). Bezüglich der T-Stadien zeigten sich keine Unterschiede der Expression des VDRs und von CYP24A1 in den Knochenmetastasen

zwischen lokal fortgeschrittenen und kleinen Primärtumoren. Weiterhin hatten Patientinnen und Patienten mit Lymphknotenmetastasen tendenziell eine verminderte VDR- und auch CYP24A1-Expression in den Knochenmetastasen im Vergleich zu Patienten und Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen ($p_{VDR}=0.15$, $p_{CYP24A1}=0.06$, siehe Abbildung 35). Außerdem hatten Patientinnen und Patienten mit multiple metastasierten Tumoren eine signifikant niedrigere nukleäre VDR- und auch CYP24A1-Expression im Vergleich zu Patientinnen und Patienten mit ausschließlich ossärer Metastasierung ($p_{VDR}=0.03$, $p_{CYP24A1}=0.01$, Abbildung 36). Die Proteinexpression des VDRs- und von CYP24A1 korrelierten signifikant ($p=0.001$).

Somit konnte mit dieser Arbeit die Proteinexpression des VDRs und von CYP24A1 in Knochenmetastasen durch Immunhistologie nachgewiesen werden. Insgesamt wurde der VDR und CYP24A1 von Knochenmetastasen diverser Entität unterschiedlich stark exprimiert. Jedoch könnten insbesondere Patienten mit VDR-exprimierenden Knochenmetastasen von einer Vitamin D₃-Supplementierung profitieren, die häufig einen 25-OH-Vitamin D₃ Mangel zeigen (165, 166). Ebenso könnte eine Untersuchung auf einen niedrigen VDR-Status in Primärtumoren dabei helfen, Krebspatienten mit einem hohen Metastasierungsrisiko zu identifizieren. Allerdings sind weitere und größere Studien insbesondere mit Evaluation des gesamten Vitamin D-Metabolismus und -Signalwegs notwendig, um diesen Zusammenhang weiter zu untersuchen.

5.1 Summary

Bone metastases are among the three most frequent sites of metastatic manifestation of late-stage cancers, particularly of prostate and breast cancers. Bone metastases often reduce patient's quality of life due to skeletal-related events. Additionally, bone metastatic tumor treatment is predominantly restricted to palliative measures.

In preclinical studies, the biologically active form of vitamin D₃, 1,25(OH)₂-vitamin D₃, has been demonstrated to have antiproliferative and differentiating effects on cancer cells (101, 102, 104), which are mostly mediated by binding to the vitamin D receptor (VDR). Moreover, the VDR expression itself may affect cancer growth and the metastatic potential to bone. For example, preclinically, it has been shown that VDR knockdown promotes bone metastases manifestation and growth (118). Furthermore, low VDR expression is associated to aggressive cancer characteristics in primary cancers (111, 113, 115) and also linked to earlier bone metastasis manifestation in breast cancer (120). In addition, there is evidence that

1,25(OH)₂-vitamin D₃- catabolism is altered in cancer cells. Thus, inactivation of local 1,25(OH)₂-vitamin D₃-levels in cancer cells may be increased (70, 121, 122). VDR and CYP24A1 expression could therefore be important concerning cancer progression and bone metastases manifestation and growth. However, there are currently no reports of studies investigating VDR expression and vitamin D-metabolism in bone metastases. The aim of this study was hence to assess VDR and CYP24A1 (vitamin D-catabolizing enzyme) expression in bone metastases of 66 patients secondary to prostate-, breast-, kidney-, lung-, follicular thyroid- and colorectal cancers using immunohistochemistry (132).

While the VDR was localised in the nucleus and cytoplasm, CYP24A1 was identified in the cytoplasm only. A high VDR nuclear protein expression was detected in 47/66 (71 %) and cytoplasmatic in 37/66 (56 %). 39/66 (59 %) of bone metastases had a high total VDR expression. CYP24A1 was also strongly expressed in 39/66 (59 %) of bone metastases. Expression levels were correlated to patient data and cancer characteristics. There was a non-significant trend of high-grade cancers towards low nuclear VDR expression ($p=0.07$, see figure 33). Additionally, patients with lymph node metastases (N-stage) tended to have a reduced bone metastatic VDR and CYP24A1 expression compared to patients without lymph node metastases ($p_{\text{VDR}}=0.15$, $p_{\text{CYP24A1}}=0.06$, see figure 35). There was no difference of VDR and CYP24A1 expression in bone metastases between locally advanced and small primary cancers (T-stage). Interestingly, patients with further metastases other than bone metastases had reduced nuclear VDR and CYP24A1 levels compared to patients without other distant metastases ($p_{\text{VDR}}=0.03$, $p_{\text{CYP24A1}}=0.01$, see figure 36). Nuclear VDR and CYP24A1 expression showed a significant positive correlation ($p=0.001$).

In conclusion, this study demonstrated that the VDR and CYP24A1 are widely expression in bone metastases of various origin. Therefore, patients with VDR-expressing bone metastases could, in particular, benefit from vitamin D₃-supplementation, as vitamin D deficiency is frequent in patients with bone metastases (165, 166). Additionally, screening for a low VDR status in primary cancers could help to identify cancer patients at a high risk of metastasis. However, further and larger studies, that evaluate the entire vitamin D metabolism and signalling pathway, are needed to investigate this association.

6. Literaturverzeichnis

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021. Epub 2021/02/05. doi: 10.3322/caac.21660. PubMed PMID: 33538338.
2. Coleman RE, Croucher PI, Padhani AR, Clezardin P, Chow E, Fallon M, et al. Bone metastases. *Nat Rev Dis Primers*. 2020;6(1):83. Epub 2020/10/17. doi: 10.1038/s41572-020-00216-3. PubMed PMID: 33060614.
3. Coleman RE. Clinical Features of Metastatic Bone Disease and Risk of Skeletal Morbidity. *Clinical Cancer Research*. 2006;12(20):6243s-9s. doi: 10.1158/1078-0432.Ccr-06-0931.
4. Hernandez RK, Wade SW, Reich A, Pirolli M, Liede A, Lyman GH. Incidence of bone metastases in patients with solid tumors: analysis of oncology electronic medical records in the United States. *BMC cancer*. 2018;18(1):44-. doi: 10.1186/s12885-017-3922-0. PubMed PMID: 29306325.
5. McDougall JA, Bansal A, Goulart BH, McCune JS, Karnopp A, Fedorenko C, et al. The Clinical and Economic Impacts of Skeletal-Related Events Among Medicare Enrollees With Prostate Cancer Metastatic to Bone. *Oncologist*. 2016;21(3):320-6. Epub 2016/02/13. doi: 10.1634/theoncologist.2015-0327. PubMed PMID: 26865591; PubMed Central PMCID: PMC4786354.
6. Pereira J, Body JJ, Gunther O, Sleeboom H, Hechmati G, Maniadakis N, et al. Cost of skeletal complications from bone metastases in six European countries. *J Med Econ*. 2016;19(6):611-8. Epub 2016/02/06. doi: 10.3111/13696998.2016.1150852. PubMed PMID: 26849381.
7. Yong M, Jensen A, Jacobsen JB, Nørgaard M, Fryzek JP, Sørensen HT. Survival in breast cancer patients with bone metastases and skeletal-related events: a population-based cohort study in Denmark (1999-2007). *Breast Cancer Res Treat*. 2011;129(2):495-503. Epub 2011/04/05. doi: 10.1007/s10549-011-1475-5. PubMed PMID: 21461730.
8. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. 1989;8(2):98-101. Epub 1989/08/01. PubMed PMID: 2673568.
9. Husemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, et al. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell*. 2008;13(1):58-68. Epub 2008/01/03. doi: 10.1016/j.ccr.2007.12.003. PubMed PMID: 18167340.
10. Hosseini H, Obradović MMS, Hoffmann M, Harper KL, Sosa MS, Werner-Klein M, et al. Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. *Nature*. 2016;540(7634):552-8. Epub 2016/12/16. doi: 10.1038/nature20785. PubMed PMID: 27974799; PubMed Central PMCID: PMC5390864.
11. Juhl H, Stritzel M, Wroblewski A, Henne-Bruns D, Kremer B, Schmiegel W, et al. Immunocytological detection of micrometastatic cells: comparative evaluation of findings in the peritoneal cavity and the bone marrow of gastric, colorectal and pancreatic cancer patients. *Int J Cancer*. 1994;57(3):330-5. Epub 1994/05/01. doi: 10.1002/ijc.2910570307. PubMed PMID: 8168992.
12. Peinado H, Zhang H, Matei IR, Costa-Silva B, Hoshino A, Rodrigues G, et al. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nature Reviews Cancer*. 2017;17(5):302-17. doi: 10.1038/nrc.2017.6.
13. Cox TR, Rumney RMH, Schoof EM, Perryman L, Høye AM, Agrawal A, et al. The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature*. 2015;522(7554):106-10. Epub 2015/05/29. doi: 10.1038/nature14492. PubMed PMID: 26017313; PubMed Central PMCID: PMC4961239.
14. Guise TA, Mundy GR. Cancer and bone. *Endocr Rev*. 1998;19(1):18-54. Epub 1998/03/12. doi: 10.1210/edrv.19.1.0323. PubMed PMID: 9494779.
15. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(2):69-84. Epub 2018/11/22. doi: 10.1038/s41580-018-0080-4. PubMed PMID: 30459476.
16. Wan L, Pantel K, Kang Y. Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic. *Nat Med*. 2013;19(11):1450-64. Epub 2013/11/10. doi: 10.1038/nm.3391. PubMed PMID: 24202397.
17. Shiozawa Y, Pienta KJ, Taichman RS. Hematopoietic stem cell niche is a potential therapeutic target for bone metastatic tumors. *Clin Cancer Res*. 2011;17(17):5553-8. Epub 2011/06/17. doi: 10.1158/1078-0432.Ccr-10-2505. PubMed PMID: 21676926; PubMed Central PMCID: PMC3593121.
18. Kakhki VR, Anvari K, Sadeghi R, Mahmoudian AS, Torabian-Kakhki M. Pattern and distribution of bone metastases in common malignant tumors. *Nucl Med Rev Cent East Eur*. 2013;16(2):66-9. Epub 2013/09/27. doi: 10.5603/NMR.2013.0037. PubMed PMID: 24068635.
19. Itkin T, Gur-Cohen S, Spencer JA, Schajnovitz A, Ramasamy SK, Kusumbe AP, et al. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature*. 2016;532(7599):323-8. Epub 2016/04/14. doi: 10.1038/nature17624. PubMed PMID: 27074509; PubMed Central PMCID: PMC6450701.
20. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res*. 2002;62(6):1832-7. Epub 2002/03/26. PubMed PMID: 11912162.
21. Sun YX, Schneider A, Jung Y, Wang J, Dai J, Wang J, et al. Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo. *J Bone Miner Res*. 2005;20(2):318-29. Epub 2005/01/14. doi: 10.1359/jbmr.041109. PubMed PMID: 15647826.
22. Shiozawa Y, Pedersen EA, Havens AM, Jung Y, Mishra A, Joseph J, et al. Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow. *J Clin Invest*. 2011;121(4):1298-312. Epub 2011/03/26. doi: 10.1172/JCI43414. PubMed PMID: 21436587; PubMed Central PMCID: PMC3069764.
23. Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(9):611-22. Epub 2014/08/15. doi: 10.1038/nrc3793. PubMed PMID: 25118602; PubMed Central PMCID: PMC4230700.
24. Bliss SA, Sinha G, Sandiford OA, Williams LM, Engelberth DJ, Guiro K, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Stimulate Cycling Quiescence and Early Breast Cancer Dormancy in Bone Marrow. *Cancer Res*. 2016;76(19):5832-44. Epub 2016/08/30. doi: 10.1158/0008-5472.Can-16-1092. PubMed PMID: 27569215.
25. Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J, et al. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol*. 2006;80(3):267-74. Epub 2005/10/11. doi: 10.1016/j.yexmp.2005.07.004. PubMed PMID: 16214129.
26. Ghajar CM, Peinado H, Mori H, Matei IR, Evason KJ, Brazier H, et al. The perivascular niche regulates breast tumour dormancy. *Nature cell biology*. 2013;15(7):807-17. Epub 2013/06/02. doi: 10.1038/ncb2767. PubMed PMID: 23728425.
27. Esposito M, Guise T, Kang Y. The Biology of Bone Metastasis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(6). Epub 2017/11/05. doi: 10.1101/cshperspect.a031252. PubMed PMID: 29101110; PubMed Central PMCID: PMC5980796.

6. Literaturverzeichnis

28. Capulli M, Hristova D, Valbret Z, Carys K, Arjan R, Maurizi A, et al. Notch2 pathway mediates breast cancer cellular dormancy and mobilisation in bone and contributes to haematopoietic stem cell mimicry. *Br J Cancer*. 2019;121(2):157-71. Epub 2019/06/27. doi: 10.1038/s41416-019-0501-y. PubMed PMID: 31239543; PubMed Central PMCID: PMC6738045.
29. Widner DB, Park SH, Eber MR, Shiozawa Y. Interactions Between Disseminated Tumor Cells and Bone Marrow Stromal Cells Regulate Tumor Dormancy. *Curr Osteoporos Rep*. 2018;16(5):596-602. Epub 2018/08/22. doi: 10.1007/s11914-018-0471-7. PubMed PMID: 30128835; PubMed Central PMCID: PMC6156930.
30. Ren D, Dai Y, Yang Q, Zhang X, Guo W, Ye L, et al. Wnt5a induces and maintains prostate cancer cells dormancy in bone. *J Exp Med*. 2019;216(2):428-49. Epub 2018/12/30. doi: 10.1084/jem.20180661. PubMed PMID: 30593464; PubMed Central PMCID: PMC6363426.
31. Croucher PI, McDonald MM, Martin TJ. Bone metastasis: the importance of the neighbourhood. *Nature Reviews Cancer*. 2016;16(6):373-86. doi: 10.1038/nrc.2016.44.
32. Fang J, Xu Q. Differences of osteoblastic bone metastases and osteolytic bone metastases in clinical features and molecular characteristics. *Clinical and Translational Oncology*. 2015;17(3):173-9. doi: 10.1007/s12094-014-1247-x.
33. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology (Bethesda, Md)*. 2016;31(3):233-45. doi: 10.1152/physiol.00061.2014. PubMed PMID: 27053737.
34. Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Frontiers in immunology*. 2014;5:511-. doi: 10.3389/fimmu.2014.00511. PubMed PMID: 25368616.
35. Ottewill PD, Wang N, Meek J, Fowles CA, Croucher PI, Eaton CL, et al. Castration-induced bone loss triggers growth of disseminated prostate cancer cells in bone. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(5):769-81. Epub 2014/07/24. doi: 10.1530/erc-14-0199. PubMed PMID: 25052474.
36. Hofbauer LC, Rachner TD, Coleman RE, Jakob F. Endocrine aspects of bone metastases. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(6):500-12. Epub 2014/06/02. doi: 10.1016/s2213-8587(13)70203-1. PubMed PMID: 24880565.
37. Buijs JT, Stayrook KR, Guise TA. TGF- β in the Bone Microenvironment: Role in Breast Cancer Metastases. *Cancer Microenviron*. 2011;4(3):261-81. Epub 2011/07/13. doi: 10.1007/s12307-011-0075-6. PubMed PMID: 21748439; PubMed Central PMCID: PMC3234330.
38. Hiraga T, Myoui A, Hashimoto N, Sasaki A, Hata K, Morita Y, et al. Bone-derived IGF mediates crosstalk between bone and breast cancer cells in bony metastases. *Cancer Res*. 2012;72(16):4238-49. Epub 2012/06/29. doi: 10.1158/0008-5472.Can-11-3061. PubMed PMID: 22738911; PubMed Central PMCID: PMC3438359.
39. Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, et al. TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest*. 1999;103(2):197-206. Epub 1999/01/23. doi: 10.1172/JCI3523. PubMed PMID: 9916131; PubMed Central PMCID: PMC407876.
40. Sethi N, Dai X, Winter CG, Kang Y. Tumor-derived JAGGED1 promotes osteolytic bone metastasis of breast cancer by engaging notch signaling in bone cells. *Cancer cell*. 2011;19(2):192-205. Epub 2011/02/03. doi: 10.1016/j.ccr.2010.12.022. PubMed PMID: 21295524.
41. Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(8):584-93. doi: 10.1038/nrc867.
42. Jiang Z, Tang E-T, Li C, Zhu L, Zhang B, Glennane T, et al. What is the relationship between bone turnover markers and skeletal-related events in patients with bone metastases from solid tumors and in patients with multiple myeloma? A systematic review and meta-regression analysis. *Bone reports*. 2020;12:100272-. doi: 10.1016/j.bonr.2020.100272. PubMed PMID: 32420416.
43. Demers LM, Costa L, Lipton A. Biochemical markers and skeletal metastases. *Cancer*. 2000;88(12 Suppl):2919-26. Epub 2000/07/18. doi: 10.1002/1097-0142(20000615)88:12+<2919::aid-cnrc7>3.0.co;2-z. PubMed PMID: 10898335.
44. Lin SC, Yu-Lee LY, Lin SH. Osteoblastic Factors in Prostate Cancer Bone Metastasis. *Curr Osteoporos Rep*. 2018;16(6):642-7. Epub 2018/09/12. doi: 10.1007/s11914-018-0480-6. PubMed PMID: 30203251; PubMed Central PMCID: PMC6234057.
45. Pulte D, Weberpals J, Jansen L, Brenner H. Changes in population-level survival for advanced solid malignancies with new treatment options in the second decade of the 21st century. *Cancer*. 2019;125(15):2656-65. Epub 2019/05/17. doi: 10.1002/cncr.32160. PubMed PMID: 31095726.
46. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer statistics, 2019*. CA: a cancer journal for clinicians. 2019;69(1):7-34.
47. Koob S, Kehrler M, Strauss A, Jacobs C, Wirtz DC, Schmolders J. Bone Metastases - Pathophysiology, Diagnostic Testing and Therapy (Part 2). *Z Orthop Unfall*. 2019;157(4):401-10. Epub 2019/01/08. doi: 10.1055/a-0762-1071. PubMed PMID: 30616258.
48. Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF. S3-Leitlinie Prostatakarzinom. 2021.
49. Wu C, Chen W, Wu J, Zhang X, Huang X, Lin R, et al. Effect of bisphosphonates on overall survival in subgroups of patients with prostate cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2019;36(3):199-209. Epub 2019/04/10. doi: 10.1007/s10585-019-09963-4. PubMed PMID: 30963355.
50. Liede A, Wade S, Lethen J, Hernandez RK, Warner D, Abernethy AP, et al. An Observational Study of Concomitant Use of Emerging Therapies and Denosumab or Zoledronic Acid in Prostate Cancer. *Clin Ther*. 2018;40(4):536-49.e3. Epub 2018/02/06. doi: 10.1016/j.clinthera.2017.12.015. PubMed PMID: 29395290.
51. Baron R, Ferrari S, Russell RG. Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects. *Bone*. 2011;48(4):677-92. Epub 2010/12/15. doi: 10.1016/j.bone.2010.11.020. PubMed PMID: 21145999.
52. Panagiotakou A, Yavropoulou M, Nasiri-Ansari N, Makras P, Basdra EK, Papavassiliou AG, et al. Extra-skeletal effects of bisphosphonates. *Metabolism*. 2020;110:154264. Epub 2020/05/24. doi: 10.1016/j.metabol.2020.154264. PubMed PMID: 32445641.
53. Jiang P, Zhang P, Mukthavaram R, Nomura N, Pingle SC, Teng D, et al. Anti-cancer effects of nitrogen-containing bisphosphonates on human cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(36):57932-42. Epub 2016/07/28. doi: 10.18632/oncotarget.10773. PubMed PMID: 27462771; PubMed Central PMCID: PMC5295401.
54. Infante M, Fabi A, Cognetti F, Gorini S, Caprio M, Fabbri A. RANKL/RANK/OPG system beyond bone remodeling: involvement in breast cancer and clinical perspectives. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):12-. doi: 10.1186/s13046-018-1001-2. PubMed PMID: 30621730.
55. Gül G, Sendur MA, Aksoy S, Sever AR, Altundag K. A comprehensive review of denosumab for bone metastasis in patients with solid tumors. *Curr Med Res Opin*. 2016;32(1):133-45. Epub 2015/10/10. doi: 10.1185/03007995.2015.1105795. PubMed PMID: 26451465.

6. Literaturverzeichnis

56. Morris MJ, Corey E, Guise TA, Gulley JL, Kevin Kelly W, Quinn DI, et al. Radium-223 mechanism of action: implications for use in treatment combinations. *Nat Rev Urol*. 2019;16(12):745-56. Epub 2019/11/13. doi: 10.1038/s41585-019-0251-x. PubMed PMID: 31712765; PubMed Central PMCID: PMC7515774.
57. Havinga E, De Kock R, Rappoldt M. The photochemical interconversions of provitamin D, lumisterol, previtamin D and tachysterol. *Tetrahedron*. 1960;11(4):276-84.
58. Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, Holick SA, Potts JT, Jr., Anderson RR, et al. Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. *Science*. 1980;210(4466):203-5. Epub 1980/10/10. doi: 10.1126/science.6251551. PubMed PMID: 6251551.
59. Wacker M, Holick MF. Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. *Dermatoendocrinol*. 2013;5(1):51-108. Epub 2014/02/05. doi: 10.4161/derm.24494. PubMed PMID: 24494042; PubMed Central PMCID: PMC3897598.
60. Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, Russell DW. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(20):7711-5.
61. Giustina A, Adler RA, Binkley N, Bollerslev J, Bouillon R, Dawson-Hughes B, et al. Consensus statement from 2(nd) International Conference on Controversies in Vitamin D. *Rev Endocr Metab Disord*. 2020;21(1):89-116. Epub 2020/03/18. doi: 10.1007/s11154-019-09532-w. PubMed PMID: 32180081; PubMed Central PMCID: PMC7113202.
62. Zehnder D, Bland R, Williams MC, McNinch RW, Howie AJ, Stewart PM, et al. Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(2):888-94. Epub 2001/02/07. doi: 10.1210/jcem.86.2.7220. PubMed PMID: 11158062.
63. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev*. 2016;96(1):365-408. Epub 2015/12/19. doi: 10.1152/physrev.00014.2015. PubMed PMID: 26681795; PubMed Central PMCID: PMC4839493.
64. Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): its important role in the degradation of vitamin D. *Arch Biochem Biophys*. 2012;523(1):9-18. Epub 2011/11/22. doi: 10.1016/j.abb.2011.11.003. PubMed PMID: 22100522.
65. Jeon S-M, Shin E-A. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Experimental & Molecular Medicine*. 2018;50(4):1-14. doi: 10.1038/s12276-018-0038-9.
66. Goltzman D. Functions of vitamin D in bone. *Histochem Cell Biol*. 2018;149(4):305-12. Epub 2018/02/13. doi: 10.1007/s00418-018-1648-y. PubMed PMID: 29435763.
67. Wacker M, Holick MF. Vitamin D - effects on skeletal and extraskelatal health and the need for supplementation. *Nutrients*. 2013;5(1):111-48. doi: 10.3390/nu5010111. PubMed PMID: 23306192.
68. Zmijewski MA, Carlberg C. Vitamin D receptor(s): In the nucleus but also at membranes? *Exp Dermatol*. 2020;29(9):876-84. Epub 2020/07/13. doi: 10.1111/exd.14147. PubMed PMID: 32654294.
69. Krill D, DeFlavia P, Dhir R, Luo J, Becich MJ, Lehman E, et al. Expression patterns of vitamin D receptor in human prostate. *J Cell Biochem*. 2001;82(4):566-72. Epub 2001/08/14. doi: 10.1002/jcb.1185. PubMed PMID: 11500934.
70. Lopes N, Sousa B, Martins D, Gomes M, Vieira D, Veronese LA, et al. Alterations in Vitamin D signalling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions. *BMC Cancer*. 2010;10:483. Epub 2010/09/14. doi: 10.1186/1471-2407-10-483. PubMed PMID: 20831823; PubMed Central PMCID: PMC2945944.
71. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? *Archives of biochemistry and biophysics*. 2012;523(1):123-33.
72. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Haussler CA, Hsieh D, Hsieh JC, et al. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcif Tissue Int*. 2013;92(2):77-98. Epub 2012/07/12. doi: 10.1007/s00223-012-9619-0. PubMed PMID: 22782502.
73. Schröder M, Bendik I, Becker-André M, Carlberg C. Interaction between retinoic acid and vitamin D signaling pathways. *J Biol Chem*. 1993;268(24):17830-6. Epub 1993/08/25. PubMed PMID: 8394351.
74. Kim S, Yamazaki M, Zella LA, Shevde NK, Pike JW. Activation of receptor activator of NF-kappaB ligand gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 is mediated through multiple long-range enhancers. *Mol Cell Biol*. 2006;26(17):6469-86. Epub 2006/08/18. doi: 10.1128/mcb.00353-06. PubMed PMID: 16914732; PubMed Central PMCID: PMC1592822.
75. Kerner SA, Scott RA, Pike JW. Sequence elements in the human osteocalcin gene confer basal activation and inducible response to hormonal vitamin D3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(12):4455-9. Epub 1989/06/01. doi: 10.1073/pnas.86.12.4455. PubMed PMID: 2786632; PubMed Central PMCID: PMC287288.
76. Zou A, Elgort MG, Allegretto EA. Retinoid X receptor (RXR) ligands activate the human 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase promoter via RXR heterodimer binding to two vitamin D-responsive elements and elicit additive effects with 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Biol Chem*. 1997;272(30):19027-34. Epub 1997/07/25. doi: 10.1074/jbc.272.30.19027. PubMed PMID: 9228086.
77. Krishnan AV, Feldman D. Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2011;51:311-36. Epub 2010/10/13. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010510-100611. PubMed PMID: 20936945.
78. Meyer MB, Watanuki M, Kim S, Shevde NK, Pike JW. The human transient receptor potential vanilloid type 6 distal promoter contains multiple vitamin D receptor binding sites that mediate activation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in intestinal cells. *Mol Endocrinol*. 2006;20(6):1447-61. Epub 2006/04/01. doi: 10.1210/me.2006-0031. PubMed PMID: 16574738.
79. Apperly FL. The relation of solar radiation to cancer mortality in North America. *Cancer Research*. 1941;1(3):191-5.
80. Garland CF, Garland FC. Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer? *International journal of epidemiology*. 1980;9(3):227-31.
81. Garland FC, Garland CF, Gorham ED, Young JF. Geographic variation in breast cancer mortality in the United States: a hypothesis involving exposure to solar radiation. *Preventive medicine*. 1990;19(6):614-22.
82. Estébanez N, Gómez-Acebo I, Palazuelos C, Llorca J, Dierssen-Sotos T. Vitamin D exposure and Risk of Breast Cancer: a meta-analysis. *Sci Rep*. 2018;8(1):9039. Epub 2018/06/15. doi: 10.1038/s41598-018-27297-1. PubMed PMID: 29899554; PubMed Central PMCID: PMC5997996.
83. Kim Y, Je Y. Vitamin D intake, blood 25(OH)D levels, and breast cancer risk or mortality: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2014;110(11):2772-84. Epub 2014/04/10. doi: 10.1038/bjc.2014.175. PubMed PMID: 24714744; PubMed Central PMCID: PMC4037823.
84. Zhang L, Wang S, Che X, Li X. Vitamin D and lung cancer risk: a comprehensive review and meta-analysis. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36(1):299-305. Epub 2015/05/15. doi: 10.1159/000374072. PubMed PMID: 25967968.

6. Literaturverzeichnis

85. Liu J, Dong Y, Lu C, Wang Y, Peng L, Jiang M, et al. Meta-analysis of the correlation between vitamin D and lung cancer risk and outcomes. *Oncotarget*. 2017;8(46):81040-51. Epub 2017/11/09. doi: 10.18632/oncotarget.18766. PubMed PMID: 29113365; PubMed Central PMCID: PMC5655260.
86. McCullough ML, Zoltick ES, Weinstein SJ, Fedirko V, Wang M, Cook NR, et al. Circulating Vitamin D and Colorectal Cancer Risk: An International Pooling Project of 17 Cohorts. *J Natl Cancer Inst*. 2019;111(2):158-69. Epub 2018/06/19. doi: 10.1093/jnci/djy087. PubMed PMID: 29912394; PubMed Central PMCID: PMC6376911.
87. Li F, Zhao H, Hou L, Ling F, Zhang Y, Tan W. A higher circulating concentration of 25-hydroxyvitamin-D decreases the risk of renal cell carcinoma: a case-control study. *Int Braz J Urol*. 2019;45(3):523-30. Epub 2019/02/21. doi: 10.1590/s1677-5538.Ibju.2018.0186. PubMed PMID: 30785699; PubMed Central PMCID: PMC6786115.
88. Wu J, Yang N, Yuan M. Dietary and circulating vitamin D and risk of renal cell carcinoma: a meta-analysis of observational studies. *Int Braz J Urol*. 2021;47(4):733-44. Epub 2020/11/05. doi: 10.1590/s1677-5538.Ibju.2020.0417. PubMed PMID: 33146974; PubMed Central PMCID: PMC8321484.
89. Hu MJ, Zhang Q, Liang L, Wang SY, Zheng XC, Zhou MM, et al. Association between vitamin D deficiency and risk of thyroid cancer: a case-control study and a meta-analysis. *J Endocrinol Invest*. 2018;41(10):1199-210. Epub 2018/02/22. doi: 10.1007/s40618-018-0853-9. PubMed PMID: 29464660.
90. IARC H. IARC working group reports. 2008.
91. Tuohimaa P, Tenkanen L, Ahonen M, Lumme S, Jellum E, Hallmans G, et al. Both high and low levels of blood vitamin D are associated with a higher prostate cancer risk: a longitudinal, nested case-control study in the Nordic countries. *Int J Cancer*. 2004;108(1):104-8. Epub 2003/11/18. doi: 10.1002/ijc.11375. PubMed PMID: 14618623.
92. Sawada N, Inoue M, Iwasaki M, Yamaji T, Shimazu T, Sasazuki S, et al. Plasma 25-hydroxy vitamin D and subsequent prostate cancer risk in a nested Case-Control study in Japan: The JPHC study. *Eur J Clin Nutr*. 2017;71(1):132-6. Epub 2016/10/21. doi: 10.1038/ejcn.2016.184. PubMed PMID: 27759068.
93. Mondul AM, Weinstein SJ, Moy KA, Männistö S, Albanes D. Circulating 25-Hydroxyvitamin D and Prostate Cancer Survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016;25(4):665-9. Epub 2016/01/27. doi: 10.1158/1055-9965.Epi-15-0991. PubMed PMID: 26809275; PubMed Central PMCID: PMC4873366.
94. Yuan C, Sato K, Hollis BW, Zhang S, Niedzwiecki D, Ou FS, et al. Plasma 25-Hydroxyvitamin D Levels and Survival in Patients with Advanced or Metastatic Colorectal Cancer: Findings from CALGB/SWOG 80405 (Alliance). *Clin Cancer Res*. 2019;25(24):7497-505. Epub 2019/09/25. doi: 10.1158/1078-0432.Ccr-19-0877. PubMed PMID: 31548349; PubMed Central PMCID: PMC6911644.
95. Manson JE, Cook NR, Lee IM, Christen W, Bassuk SS, Mora S, et al. Vitamin D Supplements and Prevention of Cancer and Cardiovascular Disease. *The New England journal of medicine*. 2019;380(1):33-44. Epub 2018/11/10. doi: 10.1056/NEJMoa1809944. PubMed PMID: 30415629.
96. Chandler PD, Chen WY, Ajala ON, Hazra A, Cook N, Bubes V, et al. Effect of Vitamin D3 Supplements on Development of Advanced Cancer: A Secondary Analysis of the VITAL Randomized Clinical Trial. *JAMA network open*. 2020;3(11):e2025850-e. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.25850. PubMed PMID: 33206192.
97. Ooi LL, Zhou H, Kalak R, Zheng Y, Conigrave AD, Seibel MJ, et al. Vitamin D deficiency promotes human breast cancer growth in a murine model of bone metastasis. *Cancer Res*. 2010;70(5):1835-44. Epub 2010/02/18. doi: 10.1158/0008-5472.Can-09-3194. PubMed PMID: 20160035.
98. Zheng Y, Zhou H, Ooi LL, Snir AD, Dunstan CR, Seibel MJ. Vitamin D deficiency promotes prostate cancer growth in bone. *Prostate*. 2011;71(9):1012-21. Epub 2011/05/05. doi: 10.1002/pros.21316. PubMed PMID: 21541977.
99. Ooi LL, Zheng Y, Zhou H, Trivedi T, Conigrave AD, Seibel MJ, et al. Vitamin D deficiency promotes growth of MCF-7 human breast cancer in a rodent model of osteosclerotic bone metastasis. *Bone*. 2010;47(4):795-803. Epub 2010/07/20. doi: 10.1016/j.bone.2010.07.012. PubMed PMID: 20638491.
100. Zheng Y, Zhou H, Dunstan CR, Sutherland RL, Seibel MJ. The role of the bone microenvironment in skeletal metastasis. *J Bone Oncol*. 2013;2(1):47-57. Epub 2013/02/01. doi: 10.1016/j.jbo.2012.11.002. PubMed PMID: 26909265; PubMed Central PMCID: PMC4723345.
101. Skowronski RJ, Peehl DM, Feldman D. Vitamin D and prostate cancer: 1,25 dihydroxyvitamin D3 receptors and actions in human prostate cancer cell lines. *Endocrinology*. 1993;132(5):1952-60. Epub 1993/05/01. doi: 10.1210/endo.132.5.7682937. PubMed PMID: 7682937.
102. Yuan L, Jiang R, Yang Y, Ding S, Deng H. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits growth of the breast cancer cell line MCF-7 and downregulates cytochrome P4501B1 through the COX-2/PGE2 pathway. *Oncol Rep*. 2012;28(6):2131-7. Epub 2012/09/14. doi: 10.3892/or.2012.2031. PubMed PMID: 22971613.
103. Higashimoto Y, Ohata M, Nishio K, Iwamoto Y, Fujimoto H, Uetani K, et al. 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and all-trans-retinoic acid inhibit the growth of a lung cancer cell line. *Anticancer Res*. 1996;16(5a):2653-9. Epub 1996/09/01. PubMed PMID: 8917365.
104. Chen Y, Liu X, Zhang F, Liao S, He X, Zhuo D, et al. Vitamin D receptor suppresses proliferation and metastasis in renal cell carcinoma cell lines via regulating the expression of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV5. *PLoS One*. 2018;13(4):e0195844. Epub 2018/04/17. doi: 10.1371/journal.pone.0195844. PubMed PMID: 29659618; PubMed Central PMCID: PMC5901920.
105. Bennett RG, Wakeley SE, Hamel FG, High RR, Korch C, Goldner WS. Gene expression of vitamin D metabolic enzymes at baseline and in response to vitamin D treatment in thyroid cancer cell lines. *Oncology*. 2012;83(5):264-72. Epub 2012/09/21. doi: 10.1159/000342093. PubMed PMID: 22992568; PubMed Central PMCID: PMC4266378.
106. Zinser GM, McEleney K, Welsh J. Characterization of mammary tumor cell lines from wild type and vitamin D3 receptor knockout mice. *Mol Cell Endocrinol*. 2003;200(1-2):67-80. Epub 2003/03/20. doi: 10.1016/s0303-7207(02)00416-1. PubMed PMID: 12644300.
107. Anderson MG, Nakane M, Ruan X, Kroeger PE, Wu-Wong JR. Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006;57(2):234-40. Epub 2005/09/24. doi: 10.1007/s00280-005-0059-7. PubMed PMID: 16180015.
108. Campolina-Silva GH, Maria BT, Mahecha GAB, Oliveira CA. Reduced vitamin D receptor (VDR) expression and plasma vitamin D levels are associated with aging-related prostate lesions. *Prostate*. 2018;78(7):532-46. Epub 2018/03/07. doi: 10.1002/pros.23498. PubMed PMID: 29508414.

6. Literaturverzeichnis

109. Gheliji T, Oskooei VK, Ashrafi Hafez A, Taheri M, Ghafouri-Fard S. Evaluation of expression of vitamin D receptor related lncRNAs in lung cancer. *Noncoding RNA Res.* 2020;5(3):83-7. Epub 2020/06/10. doi: 10.1016/j.ncrna.2020.05.001. PubMed PMID: 32514489; PubMed Central PMCID: PMC7264462.
110. Trowbridge R, Sharma P, Hunter WJ, Agrawal DK. Vitamin D receptor expression and neoadjuvant therapy in esophageal adenocarcinoma. *Exp Mol Pathol.* 2012;93(1):147-53. Epub 2012/05/02. doi: 10.1016/j.yexmp.2012.04.018. PubMed PMID: 22546272; PubMed Central PMCID: PMC3400680.
111. Hendrickson WK, Flavin R, Kasperzyk JL, Fiorentino M, Fang F, Lis R, et al. Vitamin D receptor protein expression in tumor tissue and prostate cancer progression. *J Clin Oncol.* 2011;29(17):2378-85. Epub 2011/05/04. doi: 10.1200/jco.2010.30.9880. PubMed PMID: 21537045; PubMed Central PMCID: PMC3107752 found at the end of this article.
112. Eliassen AH, Warner ET, Rosner B, Collins LC, Beck AH, Quintana LM, et al. Plasma 25-Hydroxyvitamin D and Risk of Breast Cancer in Women Followed over 20 Years. *Cancer Res.* 2016;76(18):5423-30. Epub 2016/08/18. doi: 10.1158/0008-5472.Can-16-0353. PubMed PMID: 27530324; PubMed Central PMCID: PMC5026605.
113. Al-Azhri J, Zhang Y, Bshara W, Zirpoli G, McCann SE, Khoury T, et al. Tumor Expression of Vitamin D Receptor and Breast Cancer Histopathological Characteristics and Prognosis. *Clin Cancer Res.* 2017;23(1):97-103. Epub 2016/07/14. doi: 10.1158/1078-0432.Ccr-16-0075. PubMed PMID: 27407090; PubMed Central PMCID: PMC5213876.
114. Srinivasan M, Parwani AV, Hershberger PA, Lenzner DE, Weissfeld JL. Nuclear vitamin D receptor expression is associated with improved survival in non-small cell lung cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011;123(1-2):30-6. Epub 2010/10/20. doi: 10.1016/j.jsmb.2010.10.002. PubMed PMID: 20955794; PubMed Central PMCID: PMC3010457.
115. Shi Q, Han XP, Yu J, Peng H, Chen YZ, Li F, et al. Decreased vitamin D receptor protein expression is associated with progression and poor prognosis of colorectal cancer patients. *Int J Clin Exp Pathol.* 2020;13(4):746-55. Epub 2020/05/02. PubMed PMID: 32355523; PubMed Central PMCID: PMC7191154.
116. Zhang YD, Zhao H, Li KJ, Guan RY. [Effect of silencing the VDR gene on the migration and invasion of prostate cancer cells]. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2017;23(11):969-74. Epub 2018/05/09. PubMed PMID: 29738160.
117. Zheng Y, Trivedi T, Lin RC, Fong-Yee C, Nolte R, Manibo J, et al. Loss of the vitamin D receptor in human breast and prostate cancers strongly induces cell apoptosis through downregulation of Wnt/ β -catenin signaling. *Bone Res.* 2017;5:17023. Epub 2017/09/26. doi: 10.1038/boneres.2017.23. PubMed PMID: 28944088; PubMed Central PMCID: PMC5605769.
118. Horas K, Zheng Y, Fong-Yee C, Macfarlane E, Manibo J, Chen Y, et al. Loss of the Vitamin D Receptor in Human Breast Cancer Cells Promotes Epithelial to Mesenchymal Cell Transition and Skeletal Colonization. *J Bone Miner Res.* 2019;34(9):1721-32. Epub 2019/04/18. doi: 10.1002/jbmr.3744. PubMed PMID: 30995345.
119. Horas K, Abraham M, Ebert R, Weissenberger M, Maier GS, Jakob F, et al. Vitamin D Receptor Expression Is Significantly Decreased in Bone Metastases Compared to Matched Primary Breast Cancer Tumours. *Cancer Invest.* 2022;1-11. Epub 20221104. doi: 10.1080/07357907.2022.2142604. PubMed PMID: 36314889.
120. Ding P, Du X, Wan L, Zhao X, Zhang D, Huang Z, et al. Diagnostic Value of VDR in Bone Metastasis and Prognosis of Patients with Breast Cancer and Expression Correlation between Vitamin D Receptor and Hairless Protein. *Oncol Res Treat.* 2022;45(4):166-77. Epub 2021/11/25. doi: 10.1159/000521078. PubMed PMID: 34818655.
121. Tannour-Louet M, Lewis SK, Louet JF, Stewart J, Addai JB, Sahin A, et al. Increased expression of CYP24A1 correlates with advanced stages of prostate cancer and can cause resistance to vitamin D3-based therapies. *Faseb j.* 2014;28(1):364-72. Epub 2013/10/02. doi: 10.1096/fj.13-236109. PubMed PMID: 24081904; PubMed Central PMCID: PMC6188232.
122. Parise RA, Egorin MJ, Kanterewicz B, Taimi M, Petkovich M, Lew AM, et al. CYP24, the enzyme that catabolizes the antiproliferative agent vitamin D, is increased in lung cancer. *Int J Cancer.* 2006;119(8):1819-28. Epub 2006/05/19. doi: 10.1002/ijc.22058. PubMed PMID: 16708384.
123. Sun H, Wang C, Hao M, Sun R, Wang Y, Liu T, et al. CYP24A1 is a potential biomarker for the progression and prognosis of human colorectal cancer. *Hum Pathol.* 2016;50:101-8. Epub 2016/03/22. doi: 10.1016/j.humpath.2015.11.008. PubMed PMID: 26997443.
124. Chen G, Kim SH, King AN, Zhao L, Simpson RU, Christensen PJ, et al. CYP24A1 is an independent prognostic marker of survival in patients with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2011;17(4):817-26. Epub 2010/12/21. doi: 10.1158/1078-0432.Ccr-10-1789. PubMed PMID: 21169243; PubMed Central PMCID: PMC3058389.
125. Horváth HC, Lakatos P, Kósa JP, Bácsi K, Borka K, Bises G, et al. The candidate oncogene CYP24A1: A potential biomarker for colorectal tumorigenesis. *J Histochem Cytochem.* 2010;58(3):277-85. Epub 2009/11/11. doi: 10.1369/jhc.2009.954339. PubMed PMID: 19901270; PubMed Central PMCID: PMC2825493.
126. Höbaus J, Tennakoon S, Heffeter P, Groeschel C, Aggarwal A, Hummel DM, et al. Impact of CYP24A1 overexpression on growth of colorectal tumour xenografts in mice fed with vitamin D and soy. *Int J Cancer.* 2016;138(2):440-50. Epub 2015/08/05. doi: 10.1002/ijc.29717. PubMed PMID: 26238339; PubMed Central PMCID: PMC4832261.
127. Osanai M, Lee GH. CYP24A1-induced vitamin D insufficiency promotes breast cancer growth. *Oncol Rep.* 2016;36(5):2755-62. Epub 2016/10/26. doi: 10.3892/or.2016.5072. PubMed PMID: 27600601.
128. Muindi JR, Yu W-D, Ma Y, Engler KL, Kong R-X, Trump DL, et al. CYP24A1 inhibition enhances the antitumor activity of calcitriol. *Endocrinology.* 2010;151(9):4301-12. Epub 2010/06/30. doi: 10.1210/en.2009-1156. PubMed PMID: 20591973.
129. Hu N, Zhang H. CYP24A1 depletion facilitates the antitumor effect of vitamin D3 on thyroid cancer cells. *Exp Ther Med.* 2018;16(4):2821-30. Epub 2018/09/21. doi: 10.3892/etm.2018.6536. PubMed PMID: 30233662; PubMed Central PMCID: PMC6143870.
130. Zhang Y, Guo Q, Zhang Z, Bai N, Liu Z, Xiong M, et al. VDR status arbitrates the prometastatic effects of tumor-associated macrophages. *Mol Cancer Res.* 2014;12(8):1181-91. Epub 2014/05/14. doi: 10.1158/1541-7786.Mcr-14-0036. PubMed PMID: 24821711.
131. Wang K, Dong M, Sheng W, Liu Q, Yu D, Dong Q, et al. Expression of vitamin D receptor as a potential prognostic factor and therapeutic target in pancreatic cancer. *Histopathology.* 2015;67(3):386-97. Epub 2015/02/03. doi: 10.1111/his.12663. PubMed PMID: 25641222.
132. Seiler J, Ebert R, Rudert M, Herrmann M, Leich E, Weißenberger M, et al. Bone Metastases of Diverse Primary Origin Frequently Express the VDR (Vitamin D Receptor) and CYP24A1. *J Clin Med.* 2022;11(21). Epub 20221103. doi: 10.3390/jcm11216537. PubMed PMID: 36362766; PubMed Central PMCID: PMC9658790.
133. Feldman D, Krishnan AV, Swami S, Giovannucci E, Feldman BJ. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(5):342-57. Epub 2014/04/08. doi: 10.1038/nrc3691. PubMed PMID: 24705652.

6. Literaturverzeichnis

134. Bhoora S, Punchoo R. Policing Cancer: Vitamin D Arrests the Cell Cycle. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23). Epub 2020/12/10. doi: 10.3390/ijms21239296. PubMed PMID: 33291213; PubMed Central PMCID: PMC7731034.
135. Saramäki A, Diermeier S, Kellner R, Laitinen H, Väisänen S, Carlberg C. Cyclical chromatin looping and transcription factor association on the regulatory regions of the p21 (CDKN1A) gene in response to 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *J Biol Chem.* 2009;284(12):8073-82. Epub 2009/01/06. doi: 10.1074/jbc.M808090200. PubMed PMID: 19122196; PubMed Central PMCID: PMC2658101.
136. Liu W, Asa SL, Fantus IG, Walfish PG, Ezzat S. Vitamin D arrests thyroid carcinoma cell growth and induces p27 dephosphorylation and accumulation through PTEN/akt-dependent and -independent pathways. *Am J Pathol.* 2002;160(2):511-9. Epub 2002/02/13. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64870-5. PubMed PMID: 11839571; PubMed Central PMCID: PMC1850654.
137. Blutt SE, McDonnell TJ, Polek TC, Weigel NL. Calcitriol-induced apoptosis in LNCaP cells is blocked by overexpression of Bcl-2. *Endocrinology.* 2000;141(1):10-7. Epub 1999/12/30. doi: 10.1210/endo.141.1.7289. PubMed PMID: 10614618.
138. Yang J, Zhu S, Lin G, Song C, He Z. Vitamin D enhances omega-3 polyunsaturated fatty acids-induced apoptosis in breast cancer cells. *Cell Biol Int.* 2017;41(8):890-7. Epub 2017/06/20. doi: 10.1002/cbin.10806. PubMed PMID: 28627723.
139. L'Espérance K, Datta GD, Qureshi S, Koushik A. Vitamin D Exposure and Ovarian Cancer Risk and Prognosis. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(4). Epub 2020/02/16. doi: 10.3390/ijerph17041168. PubMed PMID: 32059597; PubMed Central PMCID: PMC7068491.
140. Vanhevel J, Verlinden L, Doms S, Wildiers H, Verstuyf A. The role of vitamin D in breast cancer risk and progression. *Endocr Relat Cancer.* 2022;29(2):R33-r55. Epub 2021/12/23. doi: 10.1530/erc-21-0182. PubMed PMID: 34935629.
141. Stroomberg HV, Vojdeman FJ, Madsen CM, Helgstrand JT, Schwarz P, Heegaard AM, et al. Vitamin D levels and the risk of prostate cancer and prostate cancer mortality. *Acta Oncol.* 2021;60(3):316-22. Epub 2020/10/27. doi: 10.1080/0284186x.2020.1837391. PubMed PMID: 33103532.
142. Toriola AT, Nguyen N, Scheitler-Ring K, Colditz GA. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels and prognosis among cancer patients: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(6):917-33. Epub 2014/04/03. doi: 10.1158/1055-9965.Epi-14-0053. PubMed PMID: 24692501.
143. Song ZY, Yao Q, Zhuo Z, Ma Z, Chen G. Circulating vitamin D level and mortality in prostate cancer patients: a dose-response meta-analysis. *Endocr Connect.* 2018;7(12):R294-r303. Epub 2018/10/24. doi: 10.1530/ec-18-0283. PubMed PMID: 30352424; PubMed Central PMCID: PMC6240137.
144. Huang JD, Dong CH, Shao SW, Gu TJ, Hu ZL, Ying J, et al. Circulating 25-hydroxyvitamin D level and prognosis of lung cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Bull Cancer.* 2017;104(7-8):675-82. Epub 2017/06/08. doi: 10.1016/j.bulcan.2017.05.001. PubMed PMID: 28587766.
145. Holt SK, Kolb S, Fu R, Horst R, Feng Z, Stanford JL. Circulating levels of 25-hydroxyvitamin D and prostate cancer prognosis. *Cancer Epidemiol.* 2013;37(5):666-70. Epub 2013/08/27. doi: 10.1016/j.canep.2013.07.005. PubMed PMID: 23972671; PubMed Central PMCID: PMC3864767.
146. Zhang Y, Fang F, Tang J, Jia L, Feng Y, Xu P, et al. Association between vitamin D supplementation and mortality: systematic review and meta-analysis. *Bmj.* 2019;366:l4673. Epub 2019/08/14. doi: 10.1136/bmj.l4673. PubMed PMID: 31405892; PubMed Central PMCID: PMC6689821 www.icmje.org/coi_disclosure.pdf and declare: support from the National Natural Science Foundation of China and the National Key R&D Program of China; no financial relationships with any organisations that might have an interest in the submitted work in the previous three years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.
147. de Lyra EC, da Silva IA, Katayama ML, Brentani MM, Nonogaki S, Góes JC, et al. 25(OH)D3 and 1,25(OH)2D3 serum concentration and breast tissue expression of 1alpha-hydroxylase, 24-hydroxylase and Vitamin D receptor in women with and without breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006;100(4-5):184-92. Epub 2006/07/11. doi: 10.1016/j.jsbmb.2006.04.009. PubMed PMID: 16828283.
148. Šutalo N, Tomić S, Bevanda M, Dragišić V, Marijanović I, Petričević J, et al. Immunohistochemical Expression of Vitamin D Receptor in Development Stages of Colorectal Carcinoma. *Psychiatr Danub.* 2017;29 Suppl 4(Suppl 4):855-8. Epub 2017/12/27. PubMed PMID: 29278636.
149. Berger U, McClelland RA, Wilson P, Greene GL, Haussler MR, Pike JW, et al. Immunocytochemical determination of estrogen receptor, progesterone receptor, and 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in breast cancer and relationship to prognosis. *Cancer Res.* 1991;51(1):239-44. Epub 1991/01/01. PubMed PMID: 1846309.
150. Huss L, Butt ST, Borgquist S, Elebro K, Sandsveden M, Rosendahl A, et al. Vitamin D receptor expression in invasive breast tumors and breast cancer survival. *Breast cancer research : BCR.* 2019;21(1):84-. doi: 10.1186/s13058-019-1169-1. PubMed PMID: 31358030.
151. Soljic M, Mrklic I, Tomic S, Omrcen T, Sutalo N, Bevanda M, et al. Prognostic value of vitamin D receptor and insulin-like growth factor receptor 1 expression in triple-negative breast cancer. *J Clin Pathol.* 2018;71(1):34-9. Epub 2017/07/01. doi: 10.1136/jclinpath-2016-204222. PubMed PMID: 28663327.
152. Clinckspoor I, Hauben E, Verlinden L, Van den Bruel A, Vanwallegem L, Vander Poorten V, et al. Altered expression of key players in vitamin D metabolism and signaling in malignant and benign thyroid tumors. *J Histochem Cytochem.* 2012;60(7):502-11. Epub 2012/04/19. doi: 10.1369/0022155412447296. PubMed PMID: 22511602; PubMed Central PMCID: PMC3460353 interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.
153. Obara W, Konda R, Akasaka S, Nakamura S, Sugawara A, Fujioka T. Prognostic significance of vitamin D receptor and retinoid X receptor expression in renal cell carcinoma. *J Urol.* 2007;178(4 Pt 1):1497-503. Epub 2007/08/21. doi: 10.1016/j.juro.2007.05.119. PubMed PMID: 17707062.
154. Ditsch N, Toth B, Mayr D, Lenhard M, Gallwas J, Weissenbacher T, et al. The association between vitamin D receptor expression and prolonged overall survival in breast cancer. *J Histochem Cytochem.* 2012;60(2):121-9. Epub 2011/11/24. doi: 10.1369/0022155411429155. PubMed PMID: 22108646; PubMed Central PMCID: PMC3351121 authorship and/or publication of this article.
155. Kaiser U, Schilli M, Wegmann B, Barth P, Wedel S, Hofmann J, et al. Expression of vitamin D receptor in lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1996;122(6):356-9. Epub 1996/01/01. doi: 10.1007/bf01220803. PubMed PMID: 8642046.

6. Literaturverzeichnis

156. Menezes RJ, Cheney RT, Husain A, Tretiakova M, Loewen G, Johnson CS, et al. Vitamin D receptor expression in normal, premalignant, and malignant human lung tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(5):1104-10. Epub 2008/05/17. doi: 10.1158/1055-9965.Epi-07-2713. PubMed PMID: 18483332; PubMed Central PMCID: PMC2748868.
157. Józwicki W, Brożyna AA, Siekiera J, Slominski AT. Expression of Vitamin D Receptor (VDR) Positively Correlates with Survival of Urothelial Bladder Cancer Patients. *Int J Mol Sci.* 2015;16(10):24369-86. Epub 2015/10/27. doi: 10.3390/ijms161024369. PubMed PMID: 26501255; PubMed Central PMCID: PMC4632755.
158. Ahn J, Park S, Zuniga B, Bera A, Song CS, Chatterjee B. Vitamin D in Prostate Cancer. *Vitam Horm.* 2016;100:321-55. Epub 2016/02/02. doi: 10.1016/bs.vh.2015.10.012. PubMed PMID: 26827958.
159. Urbschat A, Paulus P, von Quernheim QF, Brück P, Badenhoop K, Zeuzem S, et al. Vitamin D hydroxylases CYP2R1, CYP27B1 and CYP24A1 in renal cell carcinoma. *Eur J Clin Invest.* 2013;43(12):1282-90. Epub 2013/11/20. doi: 10.1111/eci.12176. PubMed PMID: 24245571.
160. Balla B, Tobiás B, Kósa JP, Podani J, Horváth P, Nagy Z, et al. Vitamin D-neutralizing CYP24A1 expression, oncogenic mutation states and histological findings of human papillary thyroid cancer. *J Endocrinol Invest.* 2015;38(3):313-21. Epub 2014/09/10. doi: 10.1007/s40618-014-0165-7. PubMed PMID: 25201000.
161. Albertson DG, Ylstra B, Segraves R, Collins C, Dairkee SH, Kowbel D, et al. Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat Genet.* 2000;25(2):144-6. Epub 2000/06/03. doi: 10.1038/75985. PubMed PMID: 10835626.
162. Cai H, Jiao Y, Li Y, Yang Z, He M, Liu Y. Low CYP24A1 mRNA expression and its role in prognosis of breast cancer. *Sci Rep.* 2019;9(1):13714. Epub 2019/09/25. doi: 10.1038/s41598-019-50214-z. PubMed PMID: 31548577; PubMed Central PMCID: PMC6757028.
163. Höbaus J, Hummel DM, Thiem U, Fetahu IS, Aggarwal A, Müllauer L, et al. Increased copy-number and not DNA hypomethylation causes overexpression of the candidate proto-oncogene CYP24A1 in colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2013;133(6):1380-8. Epub 2013/03/07. doi: 10.1002/ijc.28143. PubMed PMID: 23463632; PubMed Central PMCID: PMC3807607.
164. Zhalehjoon N, Shakiba Y, Panjehpour M. Gene expression profiles of CYP24A1 and CYP27B1 in malignant and normal breast tissues. *Mol Med Rep.* 2017;15(1):467-73. Epub 2016/12/07. doi: 10.3892/mmr.2016.5992. PubMed PMID: 27922682.
165. Horas K, van Herck U, Maier GS, Maus U, Harrasser N, Jakob F, et al. Does vitamin D deficiency predict tumour malignancy in patients with bone tumours? Data from a multi-center cohort analysis. *J Bone Oncol.* 2020;25:100329. Epub 2020/12/10. doi: 10.1016/j.jbo.2020.100329. PubMed PMID: 33294316; PubMed Central PMCID: PMC7695905.
166. Horas K, Maier G, Jakob F, Maus U, Kurth A, Jakuscheit A, et al. High Prevalence of Vitamin D Deficiency in Patients with Bone Tumors. *Cancer Invest.* 2017;35(8):562-8. Epub 2017/08/12. doi: 10.1080/07357907.2017.1351985. PubMed PMID: 28799812.
167. Ding P, Du X, Wan L, Zhao X, Zhang D, Huang Z, et al. Diagnostic Value of VDR in Bone Metastasis and Prognosis of Patients with Breast Cancer and Expression Correlation between VDR and Hr. *Oncol Res Treat.* 2021. Epub 2021/11/25. doi: 10.1159/000521078. PubMed PMID: 34818655.
168. Prüfer K, Racz A, Lin GC, Barsony J. Dimerization with retinoid X receptors promotes nuclear localization and subnuclear targeting of vitamin D receptors. *J Biol Chem.* 2000;275(52):41114-23. Epub 2000/09/26. doi: 10.1074/jbc.M003791200. PubMed PMID: 11001945.
169. Pike JW, Meyer MB, Benkusky NA, Lee SM, St John H, Carlson A, et al. Genomic Determinants of Vitamin D-Regulated Gene Expression. *Vitam Horm.* 2016;100:21-44. Epub 2016/02/02. doi: 10.1016/bs.vh.2015.10.011. PubMed PMID: 26827947; PubMed Central PMCID: PMC5113140.
170. Trivedi T, Zheng Y, Fournier PGJ, Murthy S, John S, Schillo S, et al. The vitamin D receptor is involved in the regulation of human breast cancer cell growth via a ligand-independent function in cytoplasm. *Oncotarget.* 2017;8(16):26687-701. Epub 2017/05/04. doi: 10.18632/oncotarget.15803. PubMed PMID: 28460457; PubMed Central PMCID: PMC5432290.

Appendix

I. Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serumalbumin
BCL-2	B-Zell-Lymphom 2
BMI	Body-Mass-Index
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
DAB	Diaminobenzidin
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
EZM	Extrazelluläre Matrix
HIER-Methode	heat induced epitope retrieval
HRP	Horseradish Peroxidase
HSC	hämatopoetische Stammzelle
IARC	International Agency for Research on Cancer
IRS	Immunoreactive score
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleukin
mRNA	messenger ribonucleic acid
MSC	mesenchymale Stromazelle
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphat buffered saline
PDIA-3	Protein Disulfide Isomerase Family A Member 3
pH	potentia Hydrogenii
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathyroid hormone-related Protein
RANK	Receptor of NF- κ B
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
RAR	Retinsäure Rezeptor
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom
SRE	Skelektal-related-event
TGF- β	Transforming growth factor β
TRPV	Transient receptor potential cation channel
UICC-Stadien	Union Internationale Contre le Cancer) - Stadien
UV-Strahlung	ultraviolette Strahlung
VDBP	Vitamin D bindendes Protein
VDR	Vitamin D Rezeptor
VDRE	Vitamin D response elements
WHO	World health organisation

II. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1</i> Die Wechselwirkungen von Tumorzellen und den Zellen des Knochens	4
<i>Abbildung 2</i> Wachstum der <u>osteolytischen</u> Knochenmetastasen durch Wechselwirkungen mit den Knochenzellen	6
<i>Abbildung 3</i> Bildgebung von Knochenmetastasen	7
<i>Abbildung 4</i> Übersicht des Vitamin D-Metabolismus und des Vitamin D-Signalweges	10
<i>Abbildung 5</i> Auswirkungen von 1,25(OH) ₂ -Vitamin D ₃ auf die Knochenhomöostase	11
<i>Abbildung 6</i> Altersverteilung bei Entnahme der Knochenmetastasen	32
<i>Abbildung 7</i> Anzahl der unterschiedlichen Primärkarzinome in der Studienpopulation	33
<i>Abbildung 8</i> Übersicht der Lokalisation der Knochenmetastasen	35
<i>Abbildung 9</i> Kaplan-Meier-Kurve (Überlebenszeit)	36
<i>Abbildung 10</i> Lichtmikroskopische Aufnahmen der VDR-Kontrollen	37
<i>Abbildung 11</i> Übersicht der Proteinexpression des VDRs des Nukleus	39
<i>Abbildung 12</i> Übersicht der Proteinexpression des VDRs des Zytoplasmas	40
<i>Abbildung 13</i> Übersicht der Proteinexpression des VDRs insgesamt	42
<i>Abbildung 14</i> Lichtmikroskopische Aufnahmen CYP24A1-Kontrollen	43
<i>Abbildung 15</i> Übersicht der Proteinexpression von CYP24A1	45
<i>Abbildung 16</i> Säulendiagramm der Auswertung der Färbungen des Prostatakarzinoms	46
<i>Abbildung 17</i> Lichtmikroskopische Aufnahmen der Färbungen einer Knochenmetastase des Prostatakarzinoms	47
<i>Abbildung 18</i> Lichtmikroskopische Aufnahmen der Färbungen einer Knochenmetastase des Prostatakarzinoms	47
<i>Abbildung 19</i> Säulendiagramm der Auswertung der Färbungen des Gastrointestinaltraktes	49
<i>Abbildung 20</i> Lichtmikroskopische Aufnahme der Färbungen der Knochenmetastase eines Ösophaguskarzinoms	49
<i>Abbildung 21</i> Lichtmikroskopische Aufnahme der Färbungen der Knochenmetastase eines Pankreaskarzinoms	50
<i>Abbildung 22</i> Lichtmikroskopische Aufnahmen der Färbungen der Knochenmetastase eines colorektalen Karzinoms	50
<i>Abbildung 23</i> Säulendiagramm der Auswertung der Färbungen der Knochenmetastasen des Lungenkarzinoms	51
<i>Abbildung 24</i> Lichtmikroskopische Aufnahmen der Färbungen der Knochenmetastase eines nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms und kleinzelligen Lungenkarzinoms	52
<i>Abbildung 25</i> Säulendiagramm der Auswertung der Färbungen des Lungenkarzinoms	53
<i>Abbildung 26</i> Lichtmikroskopische Aufnahmen einer Knochenmetastase eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms	54
<i>Abbildung 27</i> Säulendiagramm der Auswertung der Färbungen der Knochenmetastasen des Mammakarzinoms	55
<i>Abbildung 28</i> Lichtmikroskopische Aufnahmen der Knochenmetastasen des invasiv duktales Mammakarzinoms	56
<i>Abbildung 29</i> Säulendiagramm der Auswertung der Färbungen der Tumoren der Harnwege	57
<i>Abbildung 30</i> Lichtmikroskopische Aufnahmen der Färbungen der Knochenmetastasen von Tumoren der ableitenden Harnwege	58
<i>Abbildung 31</i> Lichtmikroskopische Aufnahmen der Färbungen einer Knochenmetastase eines Olfactorius-Neuroblastoms	59
<i>Abbildung 32</i> Lichtmikroskopische Aufnahmen der Färbungen der Knochenmetastase eines Parotiskarzinoms	60
<i>Abbildung 33</i> Säulendiagramm der Expression des VDRs und CYP24A1 geordnet nach dem Grading der Tumoren	62
<i>Abbildung 34</i> Säulendiagramm der Expression des VDRs und CYP24A1 geordnet nach der Größe/Infiltration des Primärtumors anhand des T-Stadiums	63
<i>Abbildung 35</i> Säulendiagramm der Expression des VDRs und CYP24A1 geordnet nach dem Lymphknotenmetastasenstadium der Tumoren	64

Abbildung 36 Säulendiagramm der Expression des VDRs und CYP24A1 geordnet nach extraossären Metastasen der Tumoren _____ 66
Abbildung 37 Einfaches Streudiagramm mit Anpassungslinie der VDR und CYP24A1-Färbungen _____ 67

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Tabellarische Übersicht der verwendeten Instrumente und der jeweiligen _____ 17
Tabelle 2 Tabellarische Darstellung der verwendeten Programme _____ 19
Tabelle 3 Tabellarische Darstellung der verwendeten Antikörper mit der jeweiligen verwendeten Verdünnung und deren Bezugsquelle _____ 19
Tabelle 4 Tabellarische Darstellung der verwendeten Verbrauchsmaterialien und der entsprechenden Bezugsquelle _____ 20
Tabelle 5 Tabellarische Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen _____ 21
Tabelle 6 Tabellarische Übersicht des Immunoreactive Scores _____ 30
Tabelle 7 Tabellarische Übersicht der TNM-Klassifikation, des Gradings der Primärtumoren und der Information über extraossäre Metastasen anteilig am gesamten Studienkollektiv _____ 34
Tabelle 8 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der VDR-Färbung des Nukleus _____ 38
Tabelle 9 Übersicht der Ergebnisse der VDR-Färbung des Zytoplasmas _____ 40
Tabelle 10 Übersicht der Ergebnisse der VDR-Proteinexpression insgesamt. _____ 41
Tabelle 11 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der Auswertungen nach Immunoreactive Score der CYP24A1-Färbung _____ 44
Tabelle 12 Tabellarische Übersicht der verfügbaren klinischen Studien, die die VDR-Expression in Primärtumoren mittels Immunhistochemie bestimmten und den Zusammenhang mit den histopathologischen bzw. patientenspezifischen Charakteristika _____ 73
Tabelle 13 Tabellarische Übersicht der verfügbaren klinischen Studien, die die CYP24A1-Expression in Primärtumoren auswerteten und den Zusammenhang mit den histopathologischen bzw. patientenspezifischen Charakteristika untersuchten _____ 76

IV. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen beteiligten Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt und begleitet haben.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Konstantin Horas für die Möglichkeit bedanken, über dieses spannende Thema promovieren zu dürfen, das mir sehr viel Freude bereitet hat. Ich schätze seine freundschaftliche, fachliche und auch persönliche Betreuung sehr. Ich bewundere, wie er seine Leidenschaft im Bereich der Forschung mit seiner Arbeit als Oberarzt und als Familienmensch jeden Tag erhält. Ich konnte im Rahmen dieser Arbeit wissenschaftlich und ärztlich, insbesondere aber auch auf persönlicher Ebene sehr von ihm profitieren. Seine großartige Unterstützung war für mich von unschätzbarem Wert und hat mir sehr viele Möglichkeiten eröffnet.

Mein besonderer Dank gilt zudem Frau Prof. Dr. Regina Ebert, die mich insbesondere durch ihre hervorragende Expertise, aber auch finanziell, während der Laborarbeit enorm unterstützt hat. Auch darüber hinaus stand sie mir stets mit Hilfestellungen und fundierten Ratschlägen zur Seite. Zudem habe ich mich während der Laborarbeit von ihr und ihrem gesamten Team sehr gut aufgenommen und wohl gefühlt, wofür ich ihr sehr dankbar bin. In diesem Rahmen möchte ich mich außerdem bei Jutta Schneiderei herzlich bedanken, die mich in die Arbeitstechnik der Immunhistologie eingeführt hat. Die Zusammenarbeit habe ich stets als sehr hilfreich empfunden.

Auch bei Frau Priv.-Doz. Dr. Ellen Leich-Zbat möchte ich mich herzlich bedanken. Sie stellte die Ansprechpartnerin in der Pathologie dar, organisierte mir neue Gewebeproben von Knochenmetastasen und hat unter anderem damit diese Doktorarbeit überhaupt erst ermöglicht. Außerdem beeindruckte sie mich durch ihre wissenschaftliche Expertise, die sie auf herzliche Art vermittelte und ich daher sehr profitieren konnte.

Weiterhin möchte ich mich auch bei Frau Priv.-Doz. Dr. Marietta Herrmann bedanken, die durch ihre wissenschaftliche Expertise für mich stets sehr wertvolle Anregungen gab. Darüber hinaus schätze ich ihren Einsatz und ihre Bemühungen für Nachwuchswissenschaftlerinnen und Nachwuchswissenschaftler sehr. Sie ermöglicht damit sehr gute wissenschaftliche und persönliche Ausbildungsoptionen, wovon auch ich profitieren durfte.

V. Veröffentlichungen und Kongressteilnahme

Veröffentlichungen

Seiler J, Ebert R, Rudert M, Herrmann M, Leich E, Weißenberger M, Horas K. Bone Metastases of Diverse Primary Origin Frequently Express the VDR (Vitamin D Receptor) and CYP24A1. *J Clin Med.* 2022 Nov 3;11(21):6537. doi: 10.3390/jcm11216537. PMID: 36362766; PMCID: PMC9658790.

Kongressteilnahme

49th European Calcified Tissue Society Congress, Mai 2022, Helsinki, Kongressabstract:
Jonas Seiler, Regina Ebert, Marietta Herrmann, Maximilian Rudert, Manuela Weißenberger, Ellen Leich, Konstantin Horas. The vitamin D receptor (VDR) is widely expressed in bone metastases of different primary origin. *Bone Reports*, Volume 16, Supplement, 2022, 10127, ISSN 2352-1872, <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2022.101274>.

Jahreskongress DVO Osteologie (nicht selbst präsentiert), September 2022, Baden-Baden, Kongressabstract:
Seiler, J., Ebert, R., Herrmann, M., Leich, E., Manuela, W., Rudert, M., & Horas, K. (2022). The vitamin D receptor is widely expressed in bone metastases from various types of primary tumors. *Osteologie*, 31(03), P-55.

VI. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Die Expression des Vitamin-D-Rezeptors und von CYP24A1 in Knochenmetastasen unterschiedlicher Entität“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 19.03.2023

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Vitamin-D-receptor- and CYP24A1- expression in bone metastases of different primary origin” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Wuerzburg, 19/03/2023

Place, Date

Signature

VII. Lebenslauf