

Aus der Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten  
der Universitätsklinik des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Vogt

**Einzelnukleotidpolymorphismen des Vitamin-D-Systems sind  
nicht assoziiert mit Auftreten und Prognose des Malignen  
Melanoms**

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

**an der medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2023**

vorgelegt von: Marc Jérôme Schwingel

geb. am 26.09.1991 in St. Wendel



Die folgende Dissertation wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Jörg Reichrath an der Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten der Fakultät II der Universität des Saarlandes erarbeitet.

Datum des Kolloquiums: 03. November 2023

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Michael Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jörg Reichrath  
Prof. Dr. med. Lorenz Thurner



# Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
1.1. Zusammenfassung.....	1
1.2. Abstract.....	2
2. Einleitung.....	3
2.1. Das Maligne Melanom.....	4
2.1.1. Eine häufige Erkrankung mit ernster Prognose.....	4
2.1.2. Klinik und Staging.....	4
2.2. Vitamin D.....	7
2.2.1. Synthese und Funktion.....	7
2.2.2. Das endokrine Vitamin-D-System in seinen hier relevanten Aspekten.....	9
2.2.2.1. Vitamin D als Steroidhormon mit mehreren Funktionen.....	9
2.2.2.2. Die Proteine des Vitamin-D-Systems.....	10
2.2.2.2.1. Der Vitamin-D-Rezeptor.....	10
2.2.2.2.2. Das Vitamin-D-Bindungsprotein.....	10
2.2.2.3. Einzelnukleotidpolymorphismen im Vitamin-D-System.....	10
3. Material und Methoden.....	12
3.1. Studiendesign und Patientenkollektiv.....	12
3.2. Bestimmung der Polymorphismen.....	12
3.2.1. Vorbereitung der Proben zur Genotypisierung.....	13
3.2.2. Genotypisierung.....	13
3.3. Statistische Auswertung.....	15
4. Ergebnisse.....	17
4.1. Kein Unterschied in der Allelhäufigkeit von SNPs im Vitamin-D-System bei Melanompatienten und Kontrollen.....	17
4.2. Mögliche Assoziation zwischen Tumordicke und SNPs im Vitamin-D-System.....	18
4.2.1. Keine Normalverteilung für die Tumordicke nach Breslow.....	18
4.2.2. Signifikante Assoziation mit der Tumordicke für rs757343 und rs11574143.....	21
4.3. Keine Assoziation zwischen Tumorstadien und SNPs im Vitamin-D-System.....	25
4.3.1. Geringe Anzahl fortgeschrittener Maligner Melanome.....	25
4.3.2. Gleichverteilung der Allele über die Tumorstadien.....	26
4.4. Keine Assoziation zwischen Gesamtüberleben und SNPs im Vitamin-D-System.....	27
4.4.1. Deskriptive Auswertung.....	27
4.4.2. Auswertung der Einzelnukleotidpolymorphismen.....	28
5. Diskussion.....	31
6. Anhang.....	35
6.1. Material und Methoden.....	35
6.2. Vergleich mit der Normalbevölkerung.....	36
6.3. Tumordicke nach Breslow.....	40
6.4. Tumorstadien.....	46
6.5. Überlebenszeitanalyse.....	49
7. Literaturverzeichnis.....	56
8. Abbildungsverzeichnis.....	62
9. Tabellenverzeichnis.....	66
10. Danksagung.....	68
11. Publikationen.....	69
12. Lebenslauf.....	70



# 1. Zusammenfassung

## 1.1. Zusammenfassung

*Hintergrund:* Das Maligne Melanom ist ein aggressiver Tumor mit hoher Mortalität in fortgeschrittenen Stadien. Ein Zusammenhang zwischen Auftreten und Prognose des Malignen Melanoms und dem Vitamin-D-Status ist bekannt. Neben weiteren Faktoren beeinflussen Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) der für den klassischen Vitamin-D-Rezeptor (VDR) oder für andere wichtige Komponenten des endokrinen Vitamin-D-Systems codierenden Gene (u.a. VDBP, CYP27B1, CYP24A1) die effektive Vitamin-D-Wirkung in Zielzellen. Da die mögliche Bedeutung vieler dieser Einzelnukleotidpolymorphismen auf den klinischen Verlauf des Malignen Melanoms noch unbekannt ist, wurde in dieser Arbeit die mögliche Assoziation von neun SNPs des endokrinen Vitamin-D-Systems mit bekannten Prognosefaktoren des Melanoms und mit dessen Gesamtüberleben untersucht.

*Material & Methoden:* In dieser nicht-interventionellen Fall-Kontroll-Studie wurden in einem historischen Kollektiv die Allelfrequenzen von neun Einzelnukleotidpolymorphismen (rs731236, rs757343, rs2107301, rs7975232, rs11574143, rs7041, rs1155563, rs4646536 und rs927650) des endokrinen Vitamin-D-Systems (VDR, VDBP, CYP27B1, CYP24A1) von 339 Melanom- mit 375 nicht-onkologischen Hautpatienten verglichen und anschließend auf eine mögliche Assoziation mit der Tumordicke nach Breslow, dem Tumorstadium und dem Gesamtüberleben untersucht.

*Ergebnis:* Die Allele der neun Polymorphismen waren bei Melanompatienten und der Kontrollgruppe gleich verteilt. Bei rs757343 (A/A) und rs11574143 (A/A) zeigte sich im robusten Regressionsmodell für die Tumordicke eine Assoziation. Aufgrund der niedrigen Fallzahl der betroffenen Allele kann diese Assoziation nicht als gesichert angenommen werden. Für die übrigen Polymorphismen zeigten sich keine Assoziationen mit der Tumordicke. Auch bei Tumorstadium und Gesamtüberleben konnte kein Hinweis auf einen Zusammenhang gefunden werden.

*Schlussfolgerung:* Die Untersuchungen zeigten keine signifikanten Assoziationen, die Anlass zu gezielter weiterer Erforschung einzelner Polymorphismen als Prognosefaktor geben. Die geringe Frequenz einzelner Allele stellt ein grundsätzliches Problem der Analyse von Einzelnukleotidpolymorphismen dar, das nur mit einem erheblich aufwändigeren Studiendesign vermieden werden könnte, ohne dass damit sichergestellt wäre, weiterführende Ergebnisse erzielen zu können.

## **1.2. Abstract**

### **Single-nucleotide polymorphisms of the vitamin D system are not associated with incidence and prognosis of malignant melanoma**

*Background:* Malignant melanoma is an aggressive cancer with dismal prognosis in advanced disease. An association between incidence and prognosis of malignant melanoma and vitamin D serum levels is well established. Besides serum levels, the endocrine vitamin D system is a crucial factor of hormonal impact. Single-nucleotide polymorphisms, an integral part of genetic variability, contribute markedly to alterations in the endocrine vitamin D system. The impact of single-nucleotide polymorphisms on prognostic factors is inconsistent, the impact on overall survival is unknown. In this study, nine single-nucleotide polymorphisms of the endocrine vitamin D system were investigated for changes in allele frequency and associations with prognostic factors in malignant melanoma to find pointers to possible causation.

*Material & methods:* In this non-interventional case-control study on a historic patient population of 339 melanoma patients and 375 non-oncological dermatological patients, allele frequencies for rs731236, rs757343, rs2107301, rs7975232, rs11574143, rs7041, rs1155563, rs4646536 and rs927650 were compared and then analysed for associations with Breslow's depth, cancer stage and overall survival.

*Results:* Alleles of these nine polymorphisms were uniformly distributed between cases and controls. In the robust regression model of Breslow's depth, an association was found for rs757343 (A/A) and rs11574143 (A/A). Due to the low number of cases for those alleles an association cannot be considered proven. For the other polymorphisms no association with Breslow's depth was found. For cancer stage and overall survival no association was found for any allele.

*Conclusion:* The study does not yield significant associations, that suggest further investigation of any polymorphism as a prognostic factor. The low allele frequency in some single-nucleotide polymorphisms is a fundamental problem in their analysis, that could only be solved with more effortful study design, without certainty of conclusive results.



## 2. Einleitung

Die Sonne hat zentralen Einfluss auf das Leben und die menschliche Gesundheit. Der Haut kommt dabei eine besondere Bedeutung zu, da sie in intensivem Kontakt zur Sonnenstrahlung steht. Einerseits ist sie daran beteiligt, mit dem Vitamin D ein wichtiges Hormon sonnenabhängig zu produzieren, andererseits führt eine Überexposition zu chronischen Hautschäden, bis hin zur malignen Entartung. Für den Vitamin-D-Spiegel sind Assoziationen mit Prognosefaktoren und dem Überleben beim Malignen Melanom bekannt [45].

Aufgrund dieser mannigfaltigen Verbindung rücken Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP) im sogenannten endokrinen Vitamin-D-System zunehmend ins Interesse der Forschung. Insbesondere beim Vitamin-D-Rezeptor (VDR) handelt es sich um ein Molekül, das tumorsuppressive Wirkung hat [6].

In der vorgelegten Arbeit werden an 339 Melanompatienten neun SNPs im endokrinen Vitamin-D-System auf Assoziationen mit Prognosefaktoren und Gesamtüberleben beim Malignen Melanom untersucht. Darüber hinaus wird die Verteilung dieser Polymorphismen zwischen den Melanompatienten und 375 nicht tumorerkrankten dermatologischen Patienten verglichen. Damit sollen folgende Hypothesen überprüft werden:

H<sub>1</sub>: Die Häufigkeit einzelner SNP-Ausprägungen unterscheidet sich zwischen nicht-onkologischen Patienten und Melanompatienten.

H<sub>2</sub>: Zwischen den Varianten eines SNP gibt es Unterschiede in der Tumordicke maligner Melanome.

H<sub>3</sub>: Zwischen den Varianten eines SNP gibt es Unterschiede in der Stadienverteilung bei Erstdiagnose.

H<sub>4</sub>: Zwischen den Varianten eines SNP gibt es Unterschiede in der Mortalität beim malignen Melanom.

## **2.1. Das Maligne Melanom**

### **2.1.1. Eine häufige Erkrankung mit ernster Prognose**

Die Bedeutung der Fragestellung ergibt sich daraus, dass es sich beim Malignen Melanom um einen häufigen Hauttumor mit hoher Sterblichkeit beim Vorliegen von Fernmetastasen handelt.

Mit 23.340 Neuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2017 ist das Maligne Melanom die vierthäufigste bösartige Erkrankung bei Frauen und die fünfthäufigste bei Männern [52].

Bei der Melanomentstehung interagieren genetische Faktoren und Sonnenexposition abhängig von der Körperregion. Während im Kopf-Hals-Bereich Melanome als Ausdruck einer chronischen UV-Belastung verstanden werden [63], sind Rumpfmelanome mit der Neigung zu Naevi assoziiert, die vor allem genetisch determiniert ist [13, 34]. Genomweite Analysen fördern dabei immer neue Einzelnukleotidpolymorphismen ans Licht, die das Auftreten von Malignen Melanomen begünstigen [2, 4, 9]. Die Großzahl liegt auf Genen, die unter anderem Haarfarbe und Hauttyp mitbestimmen.

Es wurde außerdem in Metaanalysen gezeigt, dass ein erniedrigter Vitamin-D-Spiegel im Zusammenhang mit malignen Melanomen, insbesondere mit der Tumordicke bei Erstdiagnose, steht [10, 11].

### **2.1.2. Klinik und Staging**

Die Sterblichkeit beim Malignen Melanom bedingt sich durch die frühe lymphogene Metastasierung. Um das Krankheitsstadium korrekt zu erfassen und angemessene diagnostische und therapeutische Konsequenzen zu ziehen, werden mehrere Prognosefaktoren verwendet.

Die Diagnosesicherung erfolgt histologisch. An diesem Präparat wird die Eindringtiefe bestimmt und als absolute Tumordicke vom Stratum granulosum aus angegeben (Tumordicke nach Breslow). Liegen keine Lymphknotenmetastasen vor, kommt der Tumordicke entscheidende prognostische Bedeutung zu.

Die Tumordicke nach Breslow ist ein Bestandteil der TNM-Klassifikation (siehe Tabelle 1), wie sie von dem American Joint Committee on Cancer (AJCC) beschrieben wird. Die Patientendaten wurden bis zum Jahr 2005 erhoben. Da zum Zeitpunkt der Datenerhebung die sechste Auflage der TNM-Klassifikation gültig war, wird im Folgenden stets auf diese Bezug genommen. In der Zuordnung der TNM-Klassifikation zum Tumorstadium unterscheiden sich beide Klassifikationen nicht. Bei der Bewertung der einzelnen TNM-Kategorien haben sich insbesondere bei den Lymphknotenmetastasen feinere Einteilungen herauskristallisiert, denen für die hier verwendeten Analysen jedoch keine Bedeutung zukommt, weil für die Unterkategorien keine Daten vorliegen. Gleich geblieben ist die Unterscheidung in Mikro- und Makrometastasen. Makrometastasen sind solche, die bereits klinisch oder radiologisch nachweisbar sind, wohingegen Mikrometastasen nur histologisch nachgewiesen werden können.

T	Tumordicke nach Breslow	Ulzerationsstatus
T1	Bis 1,0 mm	a: Ohne Ulzerationen b: Mit Ulzerationen
T2	1,01 bis 2 mm	a: Ohne Ulzerationen b: Mit Ulzerationen
T3	2,01 mm bis 4 mm	a: Ohne Ulzerationen b: Mit Ulzerationen
T4	Über 4 mm	a: Ohne Ulzerationen b: Mit Ulzerationen
N	Anzahl betroffener Lymphknoten	Art der Lymphknotenmetastasen
N1	1 Lymphknoten	a: Mikrometastasen b: Makrometastasen
N2	2-3 Lymphknoten	a: Mikrometastasen b: Makrometastasen c: In-transit Metastasen ohne befallene Lymphknoten
N3	Über 3 Lymphknoten oder Lymphknotenkonglomerat oder In-transit-Metastasen mit befallenen Lymphknoten	
M	Metastasenlokalisation	Laktatdehydrogenase im Serum
M1a	Entfernte Hautmetastasen, subkutanes Gewebe oder nicht-regionäre Lymphknoten	Normwertig
M1b	Lungenmetastasen	Normwertig
M1c	Sonstige Metastasen	Erhöht

*Tabelle 1: TNM-Klassifikation nach der zum Zeitpunkt der Datenerhebung gültigen 6. Auflage der AJCC (2002) Quelle: AJCC Cancer Staging Manual, 6th edition [19]*

Stadium	T	N	M
0	Tis	0	0
IA	T1a	0	0
IB	T1b oder T2a	0	0
IIA	T2b oder T3a	0	0
IIB	T3b oder T4a	0	0
IIC	T4b	0	0
IIIA	T1-4a	N1a oder N2a	0
IIIB	T1-4a	N1b oder N2b oder N2c	0
	T4b	N1a oder N2a	
IIIC	T4b	N1b, N2b, N2c	0
	Jedes T	N3	
IV	Jedes T	Jedes N	M1

*Tabelle 2: Die aus Tabelle 1 hervorgehende Einteilung in die Tumorstadien. Quelle: AJCC Cancer Staging Manual, 6th edition [19]*

## 2.2. Vitamin D

Der Vitamin-D-Mangel ist endemisch, sodass seine Auswirkungen gut untersucht sind. Assoziationen mit einem Vitamin-D-Defizit sind für viele unterschiedliche Erkrankungen beschrieben. Die Bandbreite reicht dabei von Autoimmunerkrankungen über Malignome bis zur Rachitis. Für die Rachitis ist auch der therapeutische Effekt von Vitamin-D-Substitution gesichert.

Die vielfältigen Verstrickungen des Vitamin D sind in seinen zahlreichen unterschiedlichen Funktionen begründet, die weit über die Regulation des Calcium-Phosphat- und Knochenstoffwechsels hinausgehen. Im Folgenden werden die wesentlichen Aspekte des endokrinen Vitamin-D-Systems, die für die vorgelegte Arbeit relevant sind, dargestellt.

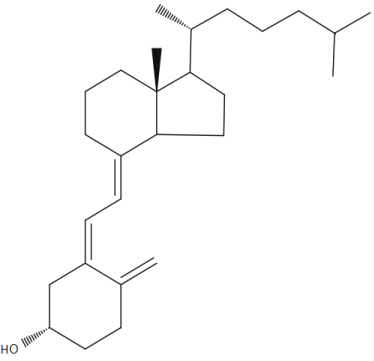
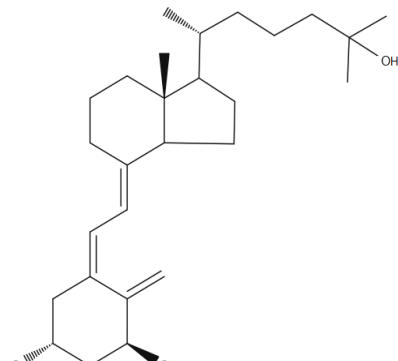
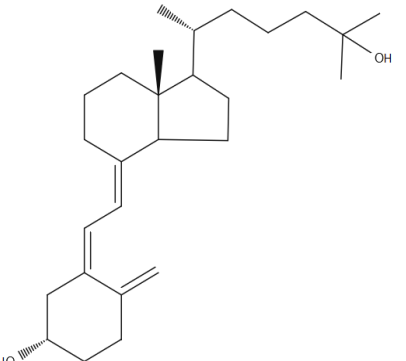
### 2.2.1. Synthese und Funktion

Anders als der Name verspricht, ist Vitamin D kein Vitamin, da der Körper in der Lage ist, es selbst zu synthetisieren. Vitamin D ist ein Prohormon, das durch mehrere Syntheseschritte zu aktivem Vitamin D wird: Die Synthese beginnt in der Haut mit 7-Dehydrocholesterol, das aus Cholesterin, der Grundsubstanz aller Steroidhormone im Körper, gebildet wird. Durch UVB-Strahlung im Bereich von 290 bis 310 nm kommt es zur photolytischen Spaltung des 7-Dehydrocholesterol [22]. Das entstehende Provitamin D<sub>3</sub> isomerisiert aufgrund seiner thermodynamischen Instabilität zu Vitamin D<sub>3</sub>, dem *Colecalciferol*. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Vitamin-D-Synthese ist dabei das UV-Licht, sodass die UV-Exposition eine entscheidende Rolle in der Herstellung spielt. Gebunden an das Vitamin-D-Bindungsprotein (VDBP) wird Colecalciferol in die Leber transportiert. Dort findet die Hydroxylierung am 25-C-Atom statt. Es entsteht 25(OH)-Vitamin D<sub>3</sub>, *Calcidiol*, die Speicherform des Vitamin D. Dieser Schritt wird von der 25-Hydroxylase katalysiert, die vom Gen CYP2R1 codiert wird. Calcidiol wird wieder an VDBP gebunden und erreicht durch das Blut die Nieren. Dort wird es in den Glomeruli filtriert und in die Zellen des proximalen Tubulus durch den Megalinrezeptor aufgenommen [61], vom VDBP getrennt und durch die 1 $\alpha$ -Hydroxylase zu 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>-Dihydroxycolecalciferol, *Calcitriol*, umgesetzt. Dieses Enzym wird durch das Gen CYP27B1 codiert.

Außer den Zellen des proximalen Tubulus sind es unter anderem Zellen des Immunsystems, die über eine Vitamin-D-bezogene Enzym- und Rezeptorausstattung verfügen [59]. Aber auch die Keratinozyten decken den Löwenanteil ihres Vitamin-D-Bedarfs durch eigene Synthese [35]. Die Bereitstellung von Vorstufen erfolgt auch durch das umgebende Bindegewebe. Dies ermöglicht die lokale Regulation der Vitamin-D-Wirkung [1], während die renale Synthese am stärksten vom Calcium- und Phosphathaushalt reguliert wird.

Bei Intensivierung der Sonneneinstrahlung entstehen aus Prävitamin-D<sub>3</sub> immer mehr bioinerte Produkte, also solche, die nicht in aktives Hormon umgesetzt werden können. Die Synthesefähigkeit der Haut von Colecalciferol ist also selbstlimitierend. Dadurch wird einer endogenen Überdosierung mit Vitamin D entgegengewirkt [23].

Calcitriol wird durch die 24-Hydroxylase zu 1,24,25(OH)<sub>3</sub>-Colecalciferol abgebaut. Dieses ist hydrophil und wird mit der Galle ausgeschieden. Die 24-Hydroxylase wird vom Gen CYP24A1 kodiert [27]. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Nomenklatur der aktiven Vitamin-D-Stufen.

Colecalciferol	Calcidiol	Calcitriol
		

*Tabelle 3: Nomenklatur der Formen des Vitamin D; Keilstrichformeln nach Holick [25]*

## **2.2.2. Das endokrine Vitamin-D-System in seinen hier relevanten Aspekten**

### **2.2.2.1. Vitamin D als Steroidhormon mit mehreren Funktionen**

Die klassische Funktion des Vitamin D ist die Regulation des Knochenstoffwechsels. Die antiinfektive Wirkung des Vitamin D machte man sich bereits bei der Phototherapie der Tuberkulose im 19. Jahrhundert zu Nutze. Die antimykobakteriellen Effekte werden durch die Induktion von Peptiden aus der Cathelicidin-Familie vermittelt [39].

Neben dem Effekt auf die angeborene Immunantwort beeinflusst Vitamin D ebenso das erworbene Immunsystem. Durch Inhibition der Ausreifung dendritischer Zellen ist es ein Teil des komplexen Systems der Regulation der Immunantwort [20].

Diese Erkenntnisse werden auch durch klinische Untersuchungen gestützt, in denen gezeigt wurde, dass ein Vitamin-D-Mangel ein Risikofaktor für Autoimmunerkrankungen darstellt, denen eine Störung der Immuntoleranz zugrunde liegt [56].

Die Wirkung von Vitamin D auf die Haut ist eng verknüpft mit dem Wissen um die therapeutische Wirkung von Vitamin D bei Hauterkrankungen. Diese Entdeckung war eine zufällige, als auffiel, dass bei Psoriasis-erkrankten, denen eine Substitutionstherapie aus anderen Gründen verordnet wurde, Eruptionsdruck und die Plaquedichte abnahmen [42].

Um sich dies zu Nutze zu machen, wurden synthetische Vitamin-D-Derivate entwickelt, die nach Resorption durch die Haut rasch zu unwirksamen Metaboliten verstoffwechselt werden. Damit ist das Risiko einer Hypercalciämie deutlich reduziert. Der am weitesten verbreitete Vertreter dieser Gruppe ist *Calcipotriol*, das als topische Therapie der Psoriasis vulgaris zugelassen ist. Es beeinflusst die entscheidenden Faktoren der Pathogenese der Psoriasis und stellt damit die Wirkung des Vitamin D auf die Haut anschaulich dar. Durch Induktion der Keratinozytendifferenzierung wird der Überschuss an Hautzellen, der zur Akanthose führt, reduziert und die Architektur der Epidermis wieder hergestellt [32].

Die Pathophysiologie der Psoriasis ist im Wesentlichen eine inflammatorische. Auch hier greifen die Vitamin-D-Derivate ein. Dabei werden proinflammatorische Zytokine wie IL-2 und IL-6 gehemmt, wobei ersteres direkt T-Zellen aktiviert und zweiteres unspezifische Entzündungsreaktionen entfacht. Außerdem wird über eine G-CSF-Inhibition die Proliferation von Granulozyten gehemmt. Alle drei sind Mechanismen, die bei der Schuppenflechte eine Rolle spielen [31].

## **2.2.2.2. Die Proteine des Vitamin-D-Systems**

### **2.2.2.2.1. Der Vitamin-D-Rezeptor**

Diese vielfältigen Effekte vermittelt das Vitamin D primär über einen nukleären Steroidrezeptor, den Vitamin-D-Rezeptor. Hat der VDR das entsprechende Hormon gebunden, so bildet er ein Heterodimer mit dem Retinoid-X-Rezeptor, der unter anderem auch an der Aktivierung anderer nukleärer Rezeptoren beteiligt ist. Dieser Komplex bindet nun in der Promoterregion der Zielgene an ein sogenanntes *response element*, um dadurch die Expression zu regulieren. Auch posttranskriptionelle Effekte, die über micro-RNA vermittelt werden, wurden für VDR und den Retinoid-X-Rezeptor nachgewiesen [38, 65].

### **2.2.2.2.2. Das Vitamin-D-Bindungsprotein**

Steroidhormone sind hydrophobe Moleküle und liegen daher auf dem Weg zu ihren Rezeptoren an Transportproteine gebunden vor. Geringe Mengen liegen an Albumin gebunden vor, der Löwenanteil wird jedoch am Vitamin-D-Bindungsprotein transportiert.

Neben seiner Transportfunktion verfügt das VDBP über zwei weitere Bindungsdomänen. Eine zweite Domäne ist in der Lage, Aktin zu binden und macht das VDBP zu einem Teil des sogenannten *scavenger pathway* [21]. Die dritte Domäne ermöglicht die Nutzung von VDBP als Makrophagen aktivierender Faktor [64]. Es wirkt dann als Chemokin auf neutrophile Granulozyten und als Aktivator des Komplementsystems [7]. Das Bindungsprotein ist damit eine wichtige Schnittstelle für die Vermittlung der vielfältigen Aufgaben des Vitamin D.

Da die Rezeptorbindung freies Calcitriol erfordert, dient das VDBP auch als Calcitriol-Puffer. Die Halbwertszeit im Serum erhöht sich dadurch deutlich. Damit spielt das Bindungsprotein auch eine Rolle in der Regulation der Serumspiegel.

### **2.2.2.3. Einzelnukleotidpolymorphismen im Vitamin-D-System**

Einzelnukleotidpolymorphismen sind Polymorphismen in einem einzigen Basenpaar. Polymorphismen sind Veränderungen eines Genabschnittes, die mit einer relativ großen Häufigkeit in der Bevölkerung vorkommen. In der Regel wird als Grenze 1% für die seltenere Genausprägung angesetzt, die Polymorphismen von Mutationen abgrenzt. Letztere bezeichnen Veränderungen, die entsprechend seltener sind. Beide besitzen nicht zwangsläufig Krankheitswert. Dies liegt einerseits daran, dass der genetische Code degeneriert ist, also unterschiedliche Basentriplets für die gleiche Aminosäure codieren, und folglich eine genetische Veränderung nicht zwangsläufig eine Veränderung des Genprodukts bewirkt, andererseits daran, dass die Veränderung des Produkts nicht notwendigerweise pathologische Bedeutung hat.



Es liegt nahe, dass bei etwa  $3 \times 10^9$  Basenpaaren sehr viele SNPs bekannt sind und immer wieder neue entdeckt werden. Um diese Fülle an Information zugänglich und nutzbar zu machen, sammelt die Datenbank dbSNP Daten von Forschenden, die SNPs entdecken. Jedem SNP wird dabei eine *reference SNP cluster ID* (*rsid*) zugeordnet. Diese Nomenklatur findet auch in dieser Arbeit Verwendung. In dieser Arbeit werden neun SNPs im endokrinen Vitamin-D-System untersucht, eine Übersicht gibt Tabelle 4.

Genprodukt	rsid	Homozygote Varianten
VDR	rs731236	T/T, C/C
	rs757343	G/G, A/A
	rs2107301	T/T, C/C
	rs7975232	A/A, C/C
	rs11574143	G/G, A/A
VDBP	rs7041	T/T, G/G
	rs1155563	T/T, C/C
1 $\alpha$ -Hydroxylase	rs4646536	T/T, C/C
24-Hydroxylase	rs927650	C/C, T/T

*Tabelle 4: Übersicht über die Genprodukte, die rsids und ihre jeweiligen Allelvarianten*

## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Studiendesign und Patientenkollektiv**

Bei der vorgelegten Arbeit handelt es sich um eine monozentrische, nicht randomisierte, unverblindete und pseudonymisierte Fall-Kontroll-Studie an einem historischen Kollektiv. An 160 weiblichen und 180 männlichen Melanompatienten im Alter von 22 bis 92 Jahren (Median 61 Jahre) soll untersucht werden, ob Polymorphismen im Vitamin-D-System mit Prognosefaktoren und dem Gesamtüberleben des Malignen Melanoms assoziiert sind. Als Kontrollgruppe dienen 187 weibliche und 188 männliche dermatologische Patienten ohne Malignes Melanom.

Die Daten wurden vom 17.07.1999 bis zum 11.05.2005 in der dermatologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Regensburg erhoben. Für die onkologischen Patienten wurden Alter, Geschlecht und der Zeitpunkt des Versterbens erfasst, in der Kontrollgruppe ist ausschließlich das Geschlecht bekannt. Zur ethnischen Herkunft liegen für beide Gruppen keine Informationen vor. An onkologischen Parametern wurden die Tumordicke in cm, das TNM-Stadium und der Erkrankungsstatus erfasst.

Ein positives Votum der Ethikkommission an der Ärztekammer des Saarlandes liegt unter dem Aktenzeichen 247/12 vor.

### **3.2. Bestimmung der Polymorphismen**

Es wurden die Einzelnukleotidpolymorphismen rs731236, rs757343, rs 2107301, rs7975232 und rs11574143 des Vitamin-D-Rezeptors, rs7041 und rs1155563 des Vitamin-D-Bindungsproteins, sowie rs4646536 der 1 $\alpha$ -Hydroxylase und rs927650 der 24-Hydroxylase untersucht. Die *Real Time Polymerasekettenreaktion (PCR)* der Blutproben wurde von Annett Weinhold und Heike Palm im dermatologischen Forschungslabor am Universitätsklinikum des Saarlandes im Jahr 2010 durchgeführt.

### 3.2.1. Vorbereitung der Proben zur Genotypisierung

Die Isolation der Desoxyribonukleinsäure (DNA) erfolgte aus Vollblut, das mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) antikoaguliert wurde. Zur Isolation und Aufreinigung wurde das *High Pure PCR Template Preparation Kit* der Firma Roche verwendet: Nach der Zugabe von 200 µl *Binding Buffer* und 40 µl Proteinase K zu 200 µl EDTA-Blut wurde die Lösung für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließende Zugabe von 100 µl Isopropanol und Zentrifugation bei 8000 g ( $1\text{ g} = 9,81\text{ m/s}^2$ ) auf der *High Purification Filter Tube* für eine Minute. Darauffolgend wurden zwei Waschstritte durchgeführt: Mit 500 µl *Inhibitor Removal Buffer* und danach mit 500 µl Waschpuffer. Nach erneuter Zentrifugation mit 13000 g für eine Minute wurde die DNA mit 100 µl Elutionspuffer bei 8000 g für eine Minute aus der Filtersäule ausgewaschen. Der Schritt wurde nach erneuter Aufbringung auf die Filtersäule wiederholt um die DNA-Konzentration zu steigern. Die DNA-Isolate wurden bei -70°C gelagert. Der *TaqMan® GTXpress™ Master Mix* benötigt für die Genotypisierung eine DNA-Konzentration zwischen 1 und 10 ng/µl. Die DNA-Konzentration der Isolate wurde mit dem *NanoVue Spektro-/Photometer* (Kalibrierung mit dem Elutionspuffer des *High Pure PCR Template Preparation Kit*) bestimmt, dazu wurde die optische Dichte bei 260 nm in 1 µl Eluat bestimmt. Zum Erreichen der Zielkonzentration von 10 ng/µl wurde anschließend mit sterilem Wasser verdünnt und auf eine 96 Well MicroAmp-Platte pipettiert, die bis zur PCR erneut bei -70°C gelagert wurde.

### 3.2.2. Genotypisierung

Die Genotypisierung wurde mit TaqMan Assays der Firma *Applied Biosystems* durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine *Real Time PCR*, bei der Amplifikation und Analyse in einem einzelnen Probengefäß durchgeführt werden können. Für die Genotypisierung werden zwei unterschiedliche fluorogene Oligonukleotidsonden verwendet, die je an nur eines der beiden möglichen Allele binden können. Die beiden Sonden sind an den 5'-Enden mit unterschiedlichem Farbstoff markiert und ermöglichen so die Differenzierung. Die benutzten Farbstoffe sind 2'-Chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein (VIC) und 6-Carboxyfluorescein (FAM); die jeweilige Zuordnung findet sich, zusammen mit den übrigen Merkmalen der Primer, in Tabelle 15 im Anhang. Die Kontextsequenzen sind je nach Produktart teilweise gegensinnig zur DNA, wodurch sich die nicht immer deckungsgleichen Basen in der Tabelle erklären.

Unter der in Tabelle 5 angegebenen Matrix wurden 4 µl Reagenz hergestellt, denen 1 µl Proben-DNA in der Konzentration von 10 ng/µl zugefügt wurde. Die insgesamt 5 µl Ansatz wurden mit zwei NaCl-Proben als Negativkontrolle auf eine *Fast Optical 96-Well Reaction Plate* pipettiert.

Produkt	Menge in $\mu\text{l}$
TaqMan GTXpress™ Master Mix (2 x)	2,5
TaqMan Genotyping Assay Mix (20 x)	0,25
DNAse-freies Wasser	1,25
Gesamtvolumen	4

*Tabelle 5: Matrix zur Herstellung des Genotypisierungs-Reagenz*

Tabelle 6 zeigt das Protokoll, nach dem die Amplifikation im *StepOnePlus™ Real-Time PCR Cycler* durchgeführt wurde. Zum Abschluss der Amplifikation wurde in jedem Well eine Fluoreszenzmessung durchgeführt und mit der *TaqMan® Genotyper Software* von *Applied Biosystems* ausgewertet. Der Genotyp wird entsprechend dem VIC- und FAM- Signal festgestellt und in eine *Excel*-Tabelle übertragen.

Stage	Temperatur	Dauer
Pre PCR read	25 °C	30 s
Holding	95 °C	20 s
Denaturierung	95 °C	3 s
Annealing	60 °C	20 s
Post PCR read	25 °C	30 s

*Tabelle 6: PCR Protokoll für die Genotypisierung mit dem StepOnePlus™ Real-Time PCR Cycler*

### 3.3. Statistische Auswertung

Alle Grafiken, Tabellen und Berechnungen wurden mit *IBM SPSS Statistics 23* erstellt. Lediglich die Berechnungen zur Robusten Regression wurden mit dem Paket *robustbase v0.92-7* [40] in R durchgeführt und in SPSS übertragen. Die Auswahl der Methoden und deren Durchführung fand unter der Beratung von Jakob Schöpe, M.Sc. am Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik der Universitätsklinik des Saarlandes statt.

Die prozentuale Verteilung der SNPs wurde im Vergleich zwischen Kontrollen und Fällen in gestapelten Säulendiagrammen dargestellt. Die Signifikanztestung wurde mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton [17], einer Erweiterung des Exakten Tests nach Fisher [16] für nicht-dichotome Variablen durchgeführt. Diesem wurde gegenüber dem  $\chi^2$ -Test[49] der Vorzug gegeben, da er keine Anforderungen an den Stichprobenumfang stellt und in der vorgelegten Arbeit in einigen Feldern geringe Fallzahlen auftauchen.

Wegen der hohen Zahl an Ausreißern wurden als Lagemaß für die Tumordicke in allen Fällen der Median und der Interquartilabstand (IQR) gewählt. Die grafische Darstellung erfolgte als Boxplot. Für alle gezeigten Boxplots gilt, dass die Box vom Median sowie der 25%- und 75%-Perzentile markiert wurden. Ausreißer, die außerhalb der Whiskers (1,5 IQR) lagen, wurden als Punkte abgebildet. Wichen sie um mehr als drei IQR von den Grenzperzentilen ab, wurden sie durch Sterne markiert. Des Weiteren wurden die Werte zur besseren Übersicht nach AJCC kategorisiert dargestellt.

Zur Analyse wurden die Tumordicken für jeden SNP als Boxplots über die einzelnen Verteilungen aufgetragen. Zur Testung wurde aufgrund der sich darstellenden Verteilung der Tumordicken eine robuste Regression durchgeführt, da sie weniger empfindlich gegenüber der Vielzahl an Ausreißern ist. Die Regressionskoeffizienten wurden stets korrigiert für Alter und Geschlecht der Patienten.

Die Tumorstadien bei Erstdiagnose wurden in einer Tabelle gegen die SNP-Ausprägungen aufgetragen. Auch hier kam wegen der oft geringen Fallzahl pro Feld der Exakte Test nach Freeman-Fisher-Halton zur Anwendung.

In einer Kaplan-Meier-Kurve [29] wird die Überlebenszeit auf der Abszisse gegen die Überlebenswahrscheinlichkeit auf der Ordinate aufgetragen. Als Ereignis ist in dieser Studie der Tod definiert. Scheidet ein Patient aus anderen Gründen, zum Beispiel dem Nicht-Erscheinen zu Nachsorgeterminen, aus der Studie aus, so wird der Wert zensiert und in der Grafik als  $x$  markiert. Eine Aussage zum Überleben des Patienten ist damit nicht mehr möglich. Patienten, bei denen am Ende der Beobachtungsdauer kein Ereignis eingetreten ist, werden zum Ende der Beobachtungsdauer ebenfalls zensiert. Darüber hinaus wurden vier stark nach oben abweichende Überlebensdauern zur besseren Darstellbarkeit auf 100 Monate zensiert.

Da bei keiner der Kurven die Verteilung der Hazards proportional war, wurde zur Überlebenszeitanalyse eine Cox-Regression [12] durchgeführt und die entsprechenden Hazard Ratios berechnet. Trotz der nicht-proportionalen Hazards war es aufgrund des Kurvenverlaufes in keinem der Fälle notwendig, die Beobachtungsdauer in mehrere Hazard Ratios aufzuteilen.

Als Signifikanzniveau wurde in der vorgelegten Arbeit stets 5% gewählt. Aufgrund der Vielzahl der untersuchten Größen besteht durch die multiple Testung eine Kumulation der  $\alpha$ -Fehlerwahrscheinlichkeit. Dieser wird bei Bedarf mit der Bonferroni-Korrektur entgegengewirkt [62].

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Kein Unterschied in der Allelhäufigkeit von SNPs im Vitamin-D-System bei Melanompatienten und Kontrollen

Keiner der untersuchten SNPs in Genen mit Bezug zum Vitamin-D-Stoffwechsel zeigte einen Unterschied in der Häufigkeit seines Auftretens zwischen Fällen und Kontrollen. Somit ergeben sich aus diesen Resultaten keine Hinweise für eine mögliche Bedeutung dieser SNPs als Risikofaktor für das Auftreten des Malignen Melanoms oder für deren Beteiligung an dessen Pathogenese.

In gestapelten Balkendiagrammen wurden die Häufigkeiten der SNPs von Melanompatienten und nicht erkrankten Individuen gegenübergestellt. In Abbildung 1 ist das Säulendiagramm zu rs731236 dargestellt, das graphisch die Gleichverteilung der Allele in beiden Gruppen belegt.

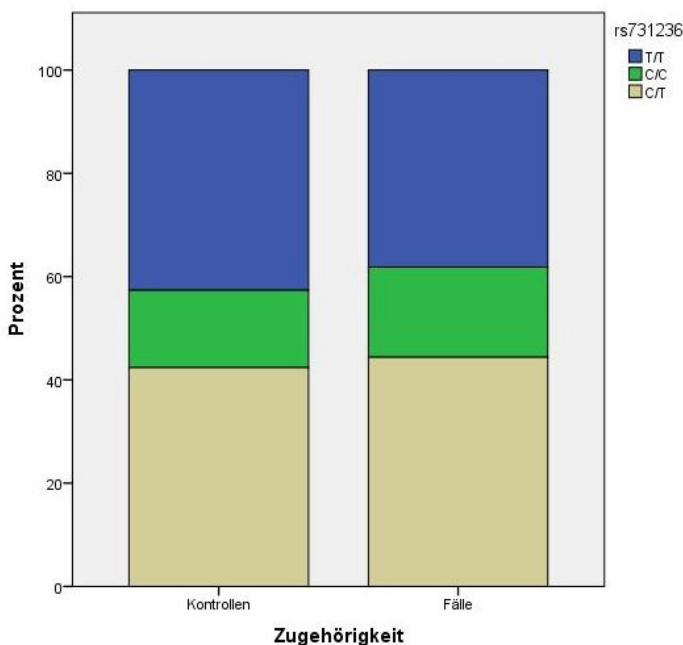


Abbildung 1: Die Allele von rs731236 sind zwischen 347 Kontrollen (T/T: 148, C/C: 52, C/T: 147) und 338 Fällen (T/T: 129, C/C: 59, C/T: 150) gleichverteilt. Darstellung in gestapelten Säulendiagrammen, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton,  $p = 0,448$

Eine rechnerische Prüfung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton ergab einen p-Wert von  $p = 0,448$ , sodass die Nullhypothese nicht verworfen werden konnte. Da die Testung für keinen der untersuchten SNPs einen signifikanten Unterschied in der Allelverteilung zeigt, finden sich die übrigen Balkendiagramme im Anhang, Tabelle 7 gibt einen Überblick über die zugehörigen p-Werte.

Einzelnukleotidpolymorphismus	p-Wert
rs731236	0,448
rs757343	0,109
rs2107301	0,721
rs7975232	0,277
rs11574143	0,277
rs7041	0,443
rs1155563	0,289
rs4646536	0,767
rs927650	0,569

*Tabelle 7: P-Werte zum Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton für die einzelnen SNPs. Keiner der Werte unterschreitet die Signifikanzgrenze, daher Gleichverteilung von bis zu 339 Fällen und bis zu 375 Kontrollen; die jeweiligen Säulendiagramme finden sich im Anhang.*

## **4.2. Mögliche Assoziation zwischen Tumordicke und SNPs im Vitamin-D-System**

Für einen der untersuchten SNPs im Vitamin-D-Bindungsprotein-Gen und einen im Vitamin-D-Rezeptor-Gen lässt sich eine signifikante Assoziation mit der Tumordicke nach Breslow nachweisen. Die Bedeutung dieser Polymorphismen als Prognosefaktoren bleibt aufgrund der niedrigen Fallzahl der entsprechenden SNPs zweifelhaft.

### **4.2.1. Keine Normalverteilung für die Tumordicke nach Breslow**

Die Tumordicke nach Breslow ist der erste Stagingparameter, der nach der Exzision eines Malignen Melanoms erhoben wird. Die Tumordicke ist stark variabel. In der untersuchten Stichprobe liegen zahlreiche Ausreißer nach oben vor, sodass sich bereits am Boxplot in Abbildung 2 zeigt, dass die Größe nicht normalverteilt ist. Auf eine statistische Validierung mittels Kolmogorov-Smirnoff-Test wurde daher verzichtet.



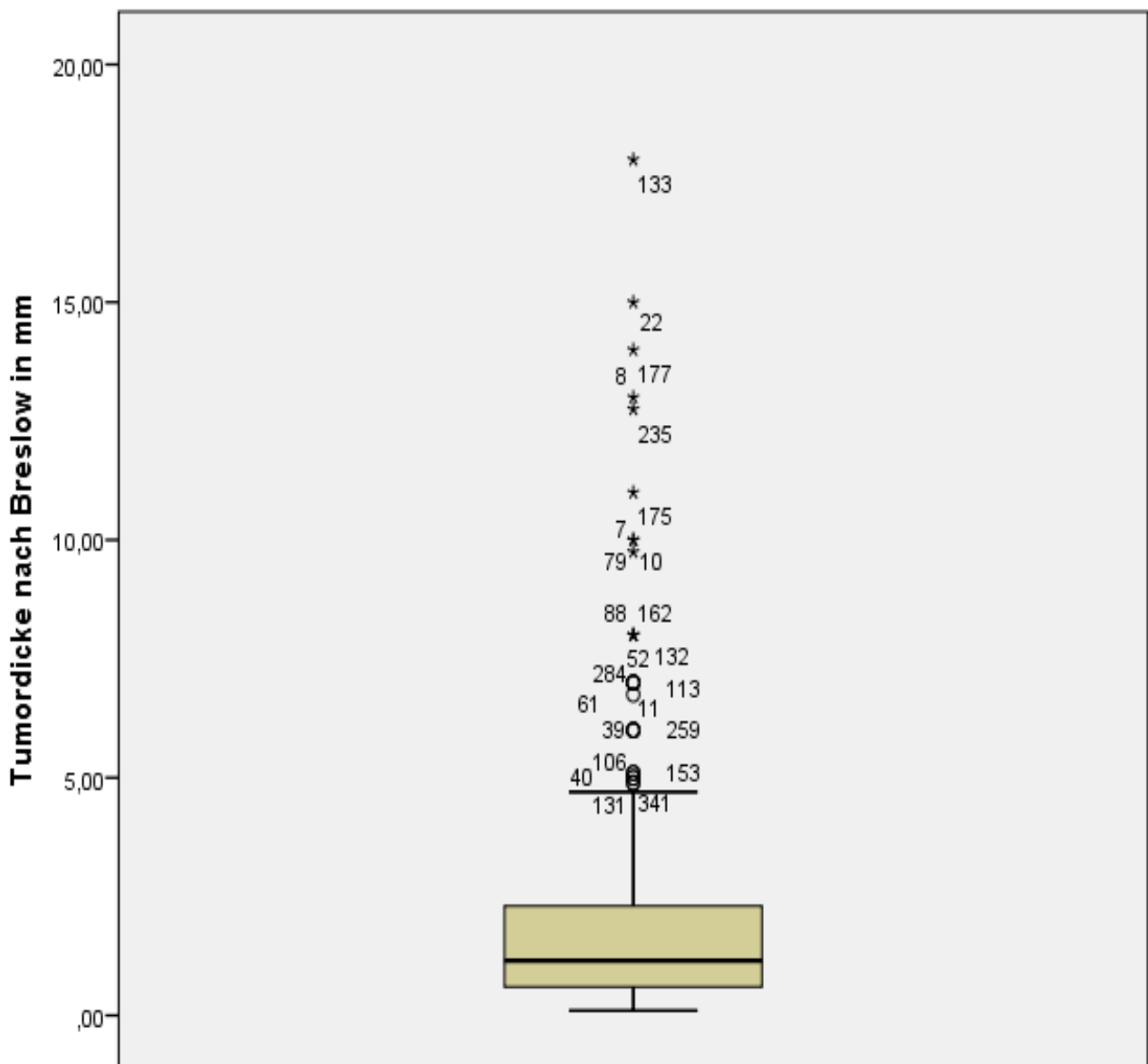


Abbildung 2: Tumordicke nach Breslow in mm, dargestellt als Boxplot für die gesamte Studienpopulation von 339 Patienten (Median 1,15 mm, Interquartilabstand 1,70 mm). Es liegt keine Normalverteilung vor.

Im Rahmen der TNM-Klassifikation wird die Tumordicke in prognostische Kategorien eingeteilt. Die entsprechende Verteilung wird in Tabelle 8 dargestellt. Mit knapp 45% liegen die meisten Melanome unter einem Millimeter Dicke, lediglich 11,8% liegen im Stadium T4 und damit oberhalb von 4 mm. Aufgrund der fehlenden Obergrenze ist diese Kategorie heterogen. Elf Werte liegen mehr als 3 IRR vom 75%-Perzentil entfernt, sind also 7,95 mm oder größer. Der Median liegt bei 1,15 mm, wobei die Tumordicke von 0,1 bis 18 mm reicht.

T	Häufigkeit	Prozente
T1: < 1 mm	152	44,8
T2: 1 – 2 mm	88	26,0
T3: 2 – 4 mm	59	17,4
T4: > 4 mm	40	11,8
gesamt	339	100,0

*Tabelle 8: Die T-Kategorien nach AJCC und die entsprechenden Häufigkeiten für 339 Patienten. Es überwiegen frühe Melanome.*

#### 4.2.2. Signifikante Assoziation mit der Tumordicke für rs757343 und rs11574143

Neben der graphischen Darstellung wurde mittels robuster Regression ein Regressionskoeffizient ermittelt. In Abbildung 3 ist exemplarisch rs731236 abgebildet. Sowohl die Boxens als auch die Whiskers unterscheiden sich graphisch nicht wesentlich für die einzelnen SNP-Ausprägungen. Lediglich Anzahl und Streubreite der Ausreißer sind unterschiedlich. Die mediane Tumordicke liegt für T/T und C/C bei 1,2 mm und für C/T bei 1,1 mm.

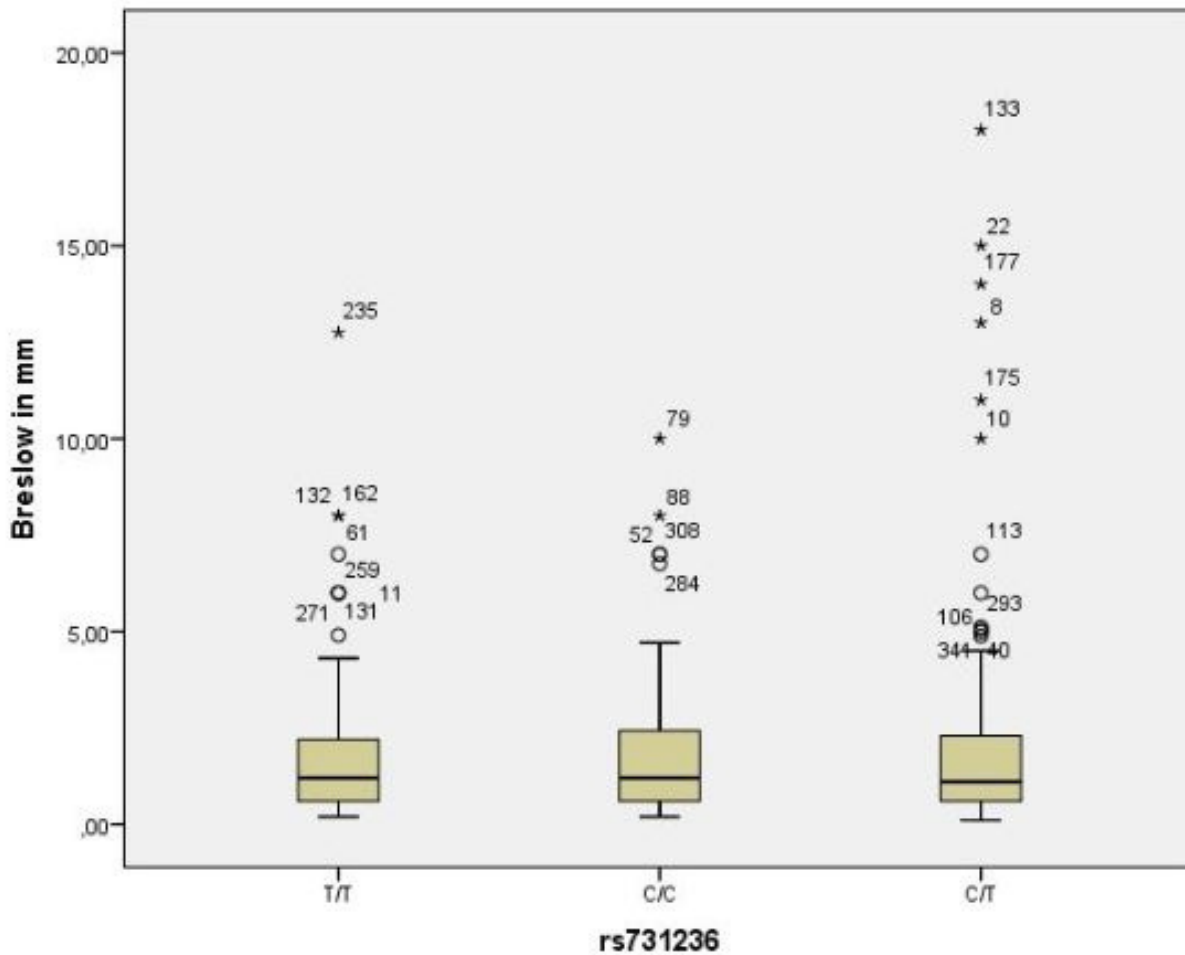


Abbildung 3: Gleichverteilung der Tumordicke nach Breslow in mm für rs731236 (T/T: 129, C/C: 59, C/T: 150). Im robusten Regressionsmodell gegenüber dem Allel T/T ergeben sich die Regressionskoeffizienten  $\beta(C/C) = -0,061$  und  $\beta(C/T) = -0,038$ , sowie die p-Werte  $p(C/C) = 0,689$  und  $p(C/T) = 0,759$ .

Rechnerisch ergeben sich für die Regressionskoeffizienten  $\beta(C/T) = -0,038$  und  $\beta(C/C) = -0,061$ . Diese bestätigen den graphischen Eindruck, dass sich die drei Ausprägungen nicht unterscheiden.

Die entsprechenden p-Werte  $p(C/T) = 0,759$  und  $p(C/C) = 0,689$  liegen über dem geforderten Signifikanzniveau von  $p = 0,05$ . Damit kann die Nullhypothese nicht verworfen werden. Die Tumordicke nach Breslow ist also unabhängig von der Ausprägung des SNP rs731236.

Da sich für die übrigen SNPs bis auf zwei Ausnahmen das gleiche Bild zeigt, finden sich die zugehörigen Graphiken im Anhang. Tabelle 9 fasst die errechneten Regressionskoeffizienten und p-Werte der Analyse der Tumordicke nach Breslow zusammen.

Modell		Regressionskoeffizient $\beta$	p-Wert
rs731236 T/T	C/C	-0,061	0,689
	C/T	-0,038	0,759
rs757343 G/G	A/A	-0,612	0,006
	A/G	-0,017	0,903
rs2107301 T/T	C/C	0,219	0,314
	C/T	0,134	0,531
rs7975232 A/A	C/C	-0,047	0,761
	A/C	-0,104	0,423
rs11574143 G/G	A/A	-0,636	0,004
	A/G	-0,087	0,525
rs7041 G/G	T/T	0,183	0,278
	G/T	0,166	0,280
rs1155563 T/T	C/C	-0,141	0,400
	C/T	0,015	0,901
rs4646536 T/T	C/C	0,147	0,452
	C/T	0,067	0,628
rs927650 C/C	T/T	0,125	0,445
	C/T	-0,024	0,861

*Tabelle 9: Regressionskoeffizienten  $\beta$  für die Tumordicke nach Breslow mit den zugehörigen p-Werten, berechnet mittels robuster Regression. In der linken Spalte sind die als Bezugsgröße gewählten Allele angegeben, denen die beiden anderen gegenüber gestellt werden. Es liegen signifikante Assoziationen für rs757343 (A/A) ( $\beta = -0,612$ ,  $p = 0,006$ ) und rs11574143 (A/A) ( $\beta = -0,636$ ,  $p = 0,004$ ) vor.*

Für rs757343(A/A) und rs11574143(A/A) ergeben sich signifikante Koeffizienten. Die zugehörigen Graphen in 5 und 4 zeigen den Grund: Bei beiden SNP liegt für die betroffene Ausprägung nur eine geringe Fallzahl vor.

Bei rs11574143 wurden drei Fälle mit dem Allel A/A untersucht, wobei für G/G 199 und für A/G 45 Patienten erfasst wurden. Im Fall von rs757343 liegen für das Allel A/A ebenfalls nur drei Fälle vor, wohingegen für G/G 184 und für A/G 58 Patienten untersucht wurden. Durch diese geringen Fallzahlen lässt sich auch erklären, warum genau in einigen dieser Fälle p-Werte unter der angesetzten Signifikanzgrenze von  $p < 0,05$  erreicht werden. Dies muss in der Bewertung und Diskussion der berechneten Ergebnisse entsprechend berücksichtigt werden.

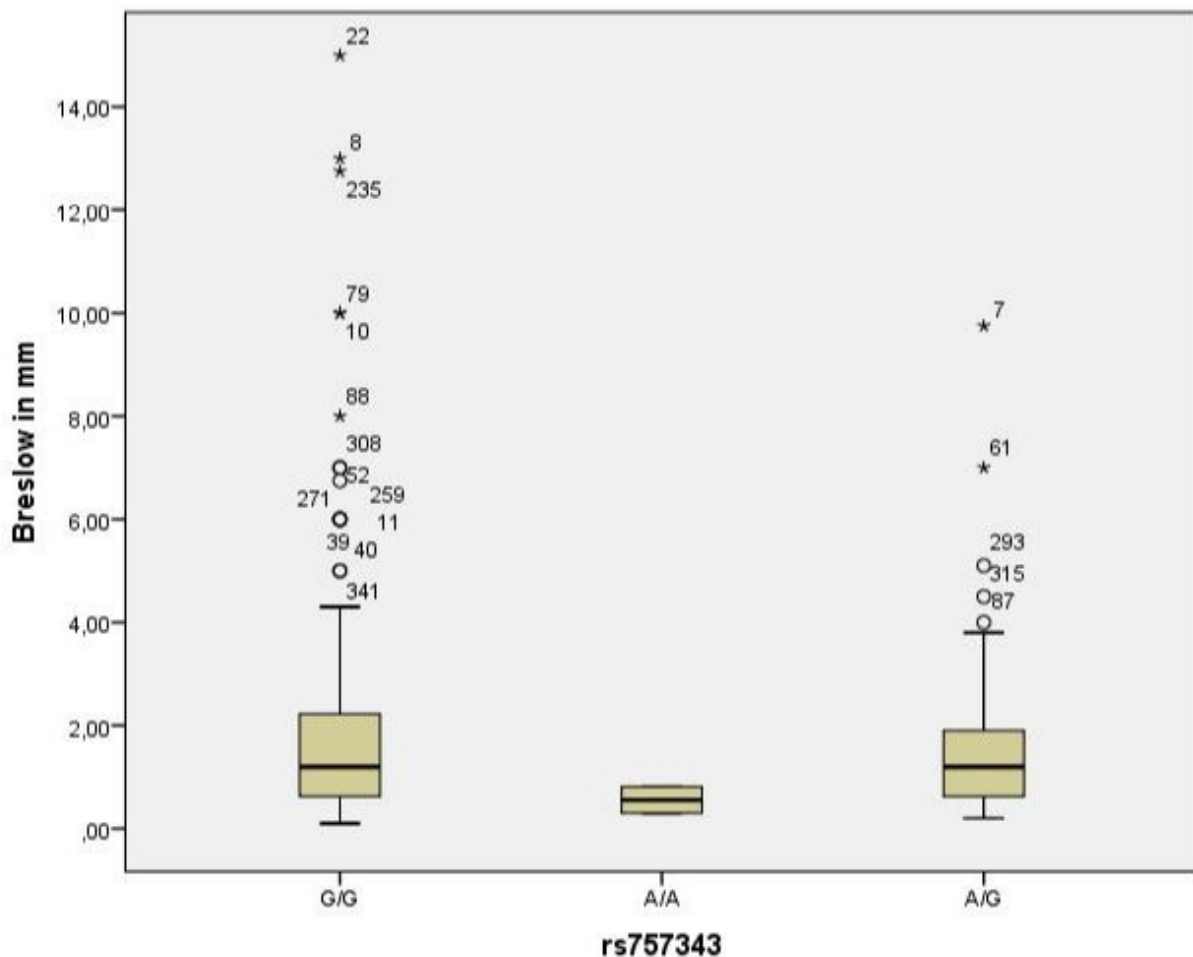


Abbildung 4: Ungleichverteilung der Tumordicke nach Breslow in mm für rs757343 (G/G: 184, A/A: 3, A/G: 58). Im robusten Regressionsmodell gegenüber dem Allel G/G ergeben sich die Regressionskoeffizienten  $\beta(A/A) = -0,612$  und  $\beta(A/G) = -0,017$ , sowie die p-Werte  $p(A/A) = 0,006$  und  $p(A/G) = 0,903$ . Die signifikant geringere Tumordicke für A/A kann in der geringen Fallzahl begründet liegen.

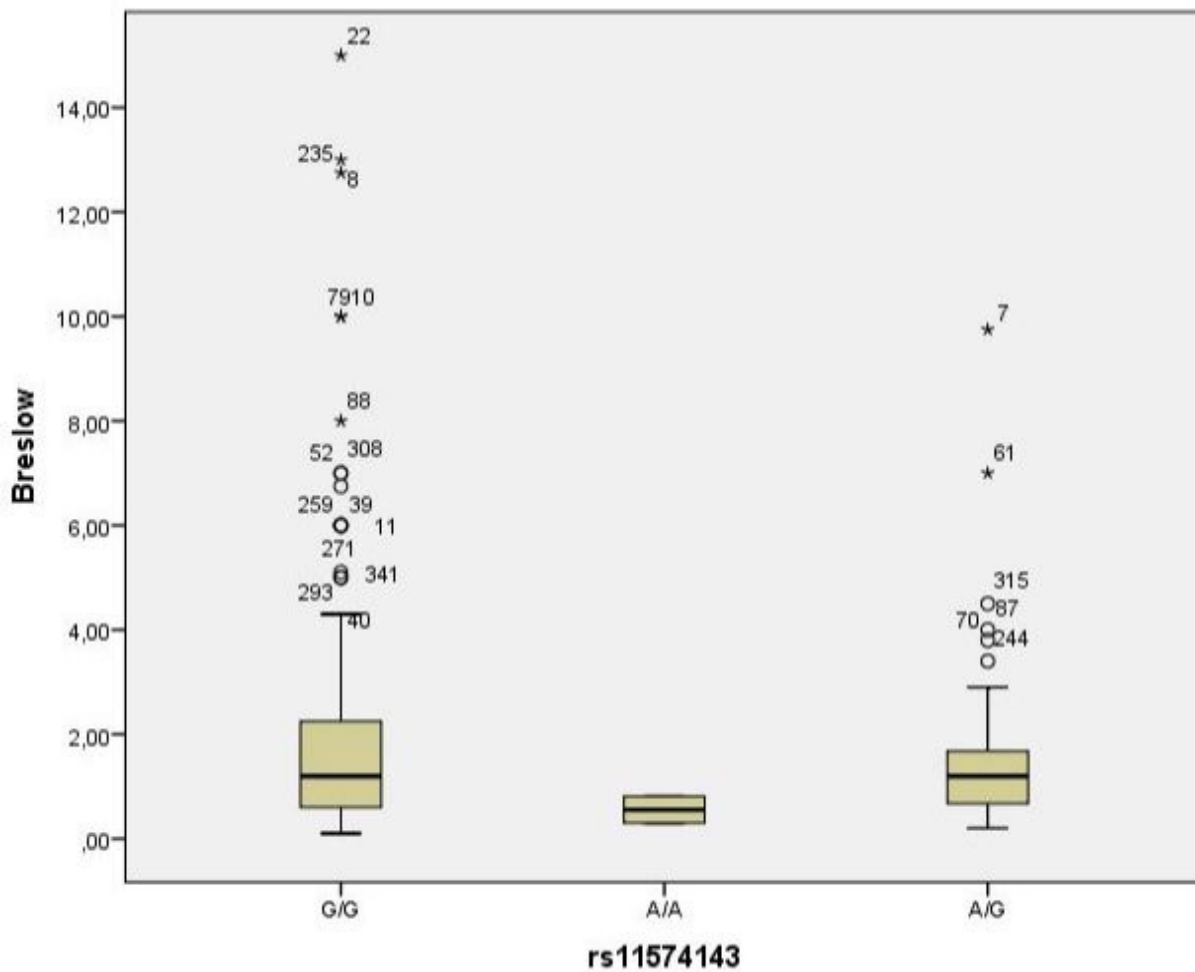


Abbildung 5: Ungleichverteilung der Tumordicke nach Breslow in mm für rs11574143 (G/G: 199, A/A: 3, A/G: 45). Im robusten Regressionsmodell gegenüber dem Allel G/G ergeben sich die Regressionskoeffizienten  $\beta(A/A) = -0,646$  und  $\beta(A/G) = -0,087$ , sowie die p-Werte  $p(A/A) = 0,004$  und  $p(A/G) = 0,525$ . Die signifikant geringere Tumordicke für A/A kann in der geringen Fallzahl begründet liegen.

### **4.3. Keine Assoziation zwischen Tumorstadien und SNPs im Vitamin-D-System**

Alle untersuchten SNPs in Genen des endokrinen Vitamin-D-Systems zeigten keine Assoziation zum Tumorstadium, sodass sich keine Hinweise auf eine mögliche Bedeutung dieser Allele als Prognosefaktoren beim Malignen Melanom ergeben.

#### **4.3.1. Geringe Anzahl fortgeschrittener Maligner Melanome**

Nach der Bestimmung des T-Stadiums in der Histologie werden klinisch und radiologisch Lymphknoten- und Fernmetastasen gesucht. Die drei Kategorien werden, wie in der Einleitung detailliert beschrieben, in Tumorstadien eingeteilt, die von der AJCC vorgegeben sind. Das Tumorstadium lässt ein Abschätzen der Prognose, basierend auf tumoreigenen Informationen, zu.

Tabelle 10 zeigt die Häufigkeit der Tumorstadien in der untersuchten Stichprobe. Analog zum T-Stadium liegt eine geringe Anzahl fortgeschrittener Erkrankungen vor. Lediglich bei neun Patienten traten Fernmetastasen auf. Aufgrund der geringen Zahl der fortgeschrittenen Stadien wurde auf eine Einteilung in Unterstadien verzichtet.

Stadium	Häufigkeit	Prozente
I	202	59,59
II	104	30,68
III	24	7,08
IV	9	2,65
gesamt	339	100

*Tabelle 10: Die Tumorstadien nach AJCC und die entsprechenden Häufigkeiten für 339 Patienten. Es überwiegen frühe Tumorstadien, Metastasen fehlen bei 97,35%.*

Im Datensatz, der der Auswertung zugrunde liegt, sind die Patientendaten und damit die Informationen zu den Tumorstadien vollständig. Jedoch fehlen regelmäßig einzelne SNP-Ergebnisse bei einzelnen Patienten, sodass die Summe der ausgewerteten Patienten in den folgenden Tabellen nicht denen aus Tabelle 10 entspricht.

### 4.3.2. Gleichverteilung der Allele über die Tumorstadien

In Tabelle 11 werden Tumorstadien bei Erstdiagnose und die Ausprägung des SNP rs731236 gegenübergestellt.

		Stadium nach AJCC				Gesamt
		I	II	III	IV	
rs731236	T/T	76	42	8	3	129
	C/C	34	18	6	1	59
	C/T	92	43	10	5	150
Gesamt		202	103	24	9	338

*Tabelle 11: Tabellarische Darstellung des Tumorstadiums nach AJCC für rs731236. Die Tumorstadien sind über die Allele von rs731236 gleichverteilt, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton,  $p = 0,935$ .*

Zur statistischen Testung auf Unabhängigkeit der beiden Variablen „Ausprägung von rs731236“ und „Tumorstadium nach AJCC bei Erstdiagnose“ wurde der Exakte Test nach Freeman-Fisher-Halton angewandt. Es konnten alle 338 Fälle gültig ausgewertet werden und es ergab sich dabei ein p-Wert von  $p = 0,935$ . Da dieser Wert nicht unter dem angenommenen Signifikanzniveau von 0,05 liegt, kann die Nullhypothese nicht verworfen werden. Die beiden Variablen sind also unabhängig.

Für die übrigen SNPs wurde die gleiche Analyse durchgeführt. Die entsprechenden Tabellen finden sich im Tabellenverzeichnis. Tabelle 12 gibt einen Überblick über die entsprechenden p-Werte. Für keinen der SNPs kann eine Abhängigkeit der Variablen nachgewiesen werden. Damit muss davon ausgegangen werden, dass die Ausprägung der einzelnen SNPs keinen Einfluss auf das Tumorstadium hat.

Einzelnukleotidpolymorphismus	p-Wert
rs731236	0,935
rs757343	0,971
rs2107301	0,504
rs7975232	0,814
rs11574143	0,957
rs7041	0,346
rs1155563	0,957
rs4646536	0,316
rs927650	0,344

*Tabelle 12: p-Werte zum Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton für die einzelnen SNPs. Für keinen SNP zeigt sich eine Ungleichverteilung der Allele über die Tumorstadien.*



## 4.4. Keine Assoziation zwischen Gesamtüberleben und SNPs im Vitamin-D-System

Keiner der untersuchten SNPs in Genen des endokrinen Vitamin-D-Systems zeigte eine Assoziation mit einer Veränderung des Gesamtüberlebens. Es ergeben sich damit auch hier keine Hinweise auf eine Bedeutung der entsprechenden Allele als Prognosefaktoren beim Malignen Melanom.

### 4.4.1. Deskriptive Auswertung

Für die Auswertung der Überlebenszeit wurde das Gesamtüberleben in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Für drei Patienten liegen Überlebensdaten über 100 Monate vor, die zur besseren Auswertbarkeit auf 100 Monate zensiert wurden.

Tabelle 13 gibt eine Übersicht über das mittlere Gesamtüberleben für die einzelnen Ausprägungen der SNPs. Die mittlere Überlebenszeit liegt zwischen 56,8 und 91,2 Monaten und schwankt für einzelne SNPs um weniger als 20 Monate. Für rs757343 und rs11574143 ist keine Berechnung möglich, da alle Fälle vor Erreichen der 100 Monate zensiert wurden.

Modell		Mittlere Überlebenszeit in Monaten
rs731236	C/C	75,4 KI: [63,9; 87,0]
	T/T	76,1 KI: [69,7; 82,5]
	C/T	73,0 KI: [68,0; 78,8]
rs2107301	C/C	78,0 KI: [69,3; 86,6]
	T/T	81,5 KI: [76,6; 86,4]
	C/T	70,0 KI: [63,6; 76,4]
rs7975232	C/C	70,8 KI: [64,7; 77,0]
	A/A	78,7 KI: [70,9; 86,5]
	A/C	78,3 KI: [72,1; 84,5]
rs7041	T/T	79,6 KI: [72,6; 86,7]
	G/G	83,6 KI: [73,7; 93,5]
	G/T	69,2 KI: [63,9; 74,5]
rs1155563	C/C	91,2 KI: [80,8; 101,7]
	T/T	77,6 KI: [71,8; 83,5]
	C/T	75,6 KI: [68,4; 82,8]
rs4646536	C/C	56,8 KI: [46,8; 66,7]
	T/T	71,1 KI: [65,3; 76,7]
	C/T	76,6 KI: [68,0; 83,5]

rs927650	C/C	70,3 KI: [64,4; 76,3]
	T/T	73,2 KI: [65,4; 81,0]
	C/T	78,1 KI: [72,4; 81,0]

*Tabelle 13: Tabellarische Darstellung der mittleren Überlebenszeit mit 95%-Konfidenzintervall für jeden Einzelnukleotidpolymorphismus. Die Überlappung der Konfidenzintervalle für einzelne SNPs machen einen klinisch relevanten Zusammenhang unwahrscheinlich.*

#### 4.4.2. Auswertung der Einzelnukleotidpolymorphismen

In Abbildung 6 ist die Kaplan-Meier-Kurve für rs731236 abgebildet. Es zeigt sich bereits graphisch, dass bis etwa 80 Monate keine größeren Abweichungen bestehen, wobei die Nordvariante T/T mit 76,1 Monaten (KI 69,7 bis 82,5) medianem Überleben stets die oben liegende Kurve ist. Die Ausprägung C/C mit 75,4 Monaten (KI 63,9 bis 87,0) und C/T mit 73,0 Monaten (KI 68,0 bis 78,8) weichen dem obigen Bild entsprechend kaum ab.

Die rechnerische Analyse mittels Cox-Regression wurde für die Ausprägungen T/T und C/C gegenüber T/C als Vergleichsgröße durchgeführt. Hier ergaben sich die Hazard Ratios  $h(T/T) = 1,010$  und  $h(C/C) = 1,071$ .

Die entsprechenden p-Werte  $p(T/T) = 0,968$  und  $p(C/C) = 0,829$  liegen beide über dem geforderten Signifikanzniveau von  $p = 0,05$ . Damit kann die Nullhypothese nicht verworfen werden. Die Überlebenszeit beim Malignen Melanom ist also unabhängig von der Ausprägung des SNP rs731236.

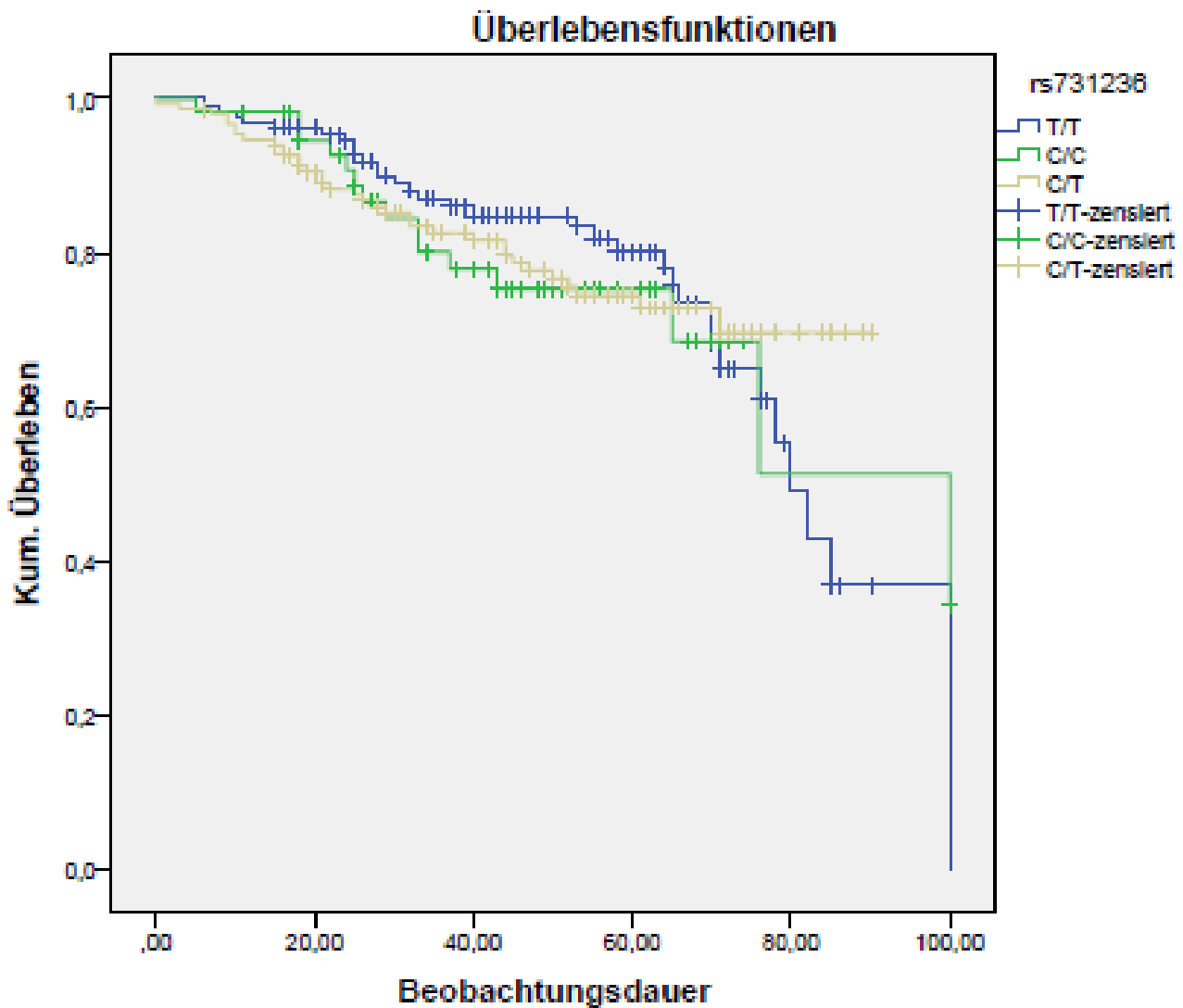


Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve für die Allele von rs731236 mit einer Beobachtungszeit von 100 Monaten. Es zeigt sich kein Unterschied im Gesamtüberleben (Medianes Überleben 75,4 Monate für C/C, 76,1 Monate für T/T und 73,0 Monate für C/T).

Für die übrigen SNP ergibt sich prinzipiell das gleiche Bild, sodass die Überlebenskurven für diese im Anhang zu finden sind. Tabelle 14 gibt eine Übersicht über die Hazard Ratios und p-Werte aus den zugehörigen Regressionsrechnungen.

Modell		Hazard Ratio $h$	p-Wert
rs731236 C/T	T/T	1,010	0,968
	C/C	1,071	0,829
rs757343 A/G	A/A	0,000	0,966
	G/G	1,017	0,958
rs2107301 C/T	T/T	0,217	0,134
	C/C	0,867	0,614
rs7975232 A/C	A/A	0,982	0,945
	C/C	1,101	0,723
rs11574143 A/G	G/G	0,963	0,912
	A/A	0,000	0,967
rs7041 G/T	T/T	0,730	0,224
	G/G	0,529	0,103
rs1155563 C/T	T/T	0,901	0,653
	C/C	0,252	0,059
rs4646536 C/T	T/T	1,140	0,659
	C/C	1,415	0,491
rs927650 C/T	C/C	0,962	0,889
	T/T	1,099	0,722

*Tabelle 14: Hazard Ratio  $h$  für die einzelnen Allele ermittelt mit Cox-Regression. Das Bezugsallel ist in der linken Spalte angegeben. Für kein Allel zeigt sich ein signifikantes Hazard Ratio.*

Die geringe Fallzahl für rs757343 (A/A) und rs11574143, (A/A) zeigt sich auch in den zugehörigen Kaplan-Meier-Kurven. In Abbildung 7 ist rs757343 dargestellt; das gleiche Bild zeigt sich für rs11574143. Da keiner der drei Patienten verstirbt, ergibt sich für beide SNPs ein Hazard Ratio von 0,000. Anders als bei der Tumordicke nach Breslow führt die geringe Fallzahl hier jedoch nicht zu einem Fehler 1. Art.

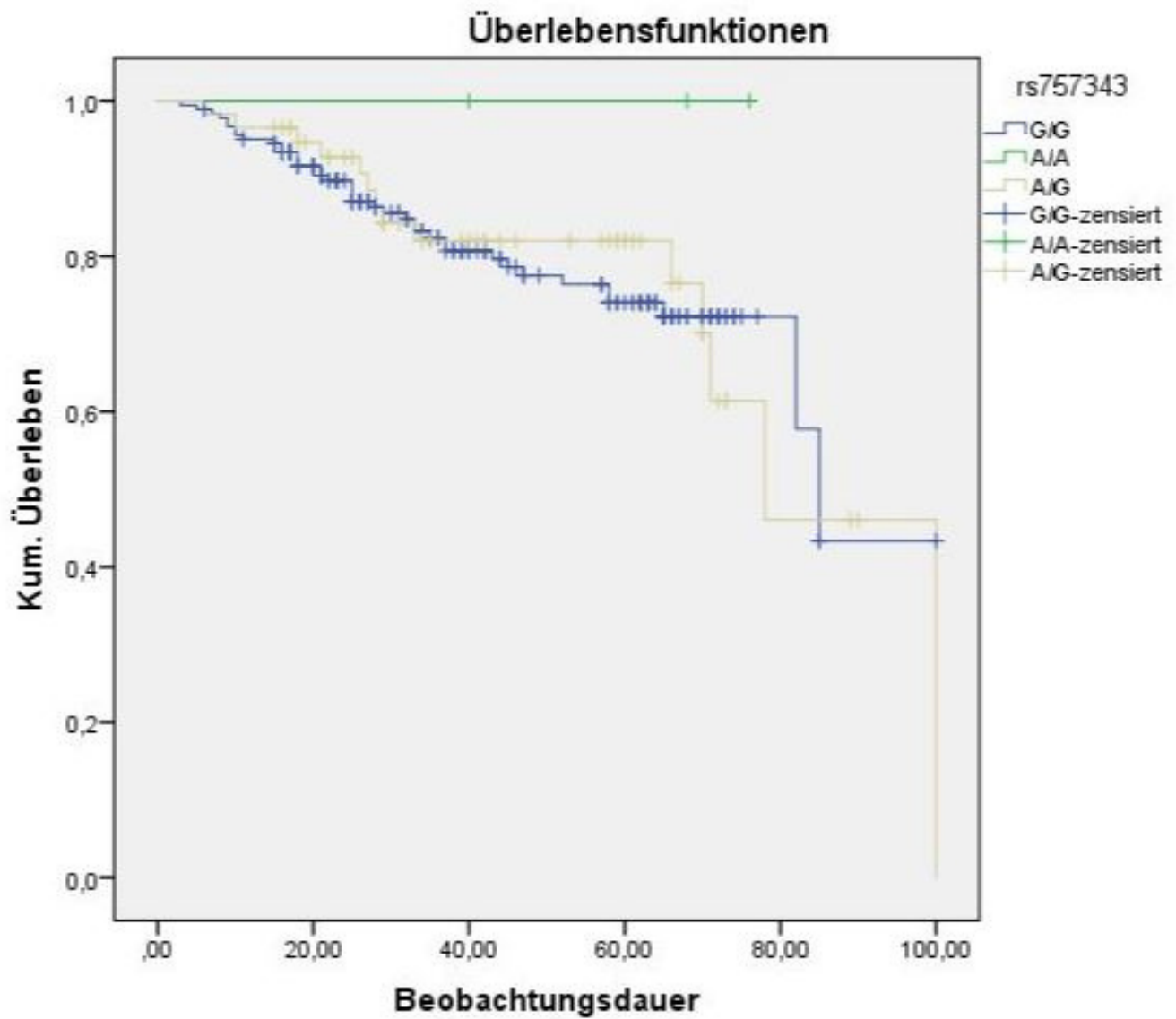


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve für die Allele von rs757343 für einen Beobachtungszeitraum von 100 Monaten. Die fehlenden Ereignisse für A/A machen die Berechnung der mittleren Überlebensdauer unmöglich.

## 5. Diskussion

Der Zusammenhang zwischen den Vitamin-D-Serumspiegeln und dem Malignen Melanom ist gut untersucht. In retrospektiven Studien zeigt sich eine Assoziation zwischen Vitamin-D-Spiegel bei Diagnose einerseits und der Tumordicke nach Breslow [37] beziehungsweise der Melanom-bezogenen Mortalität bei metastasierter Erkrankung andererseits [58].

Eine randomisierte kontrollierte Studie, die den Effekt der Vitamin-D-Substitution bei Melanompatienten untersucht, wird aktuell an mehreren europäischen Zentren durchgeführt [15]. In einer Metaanalyse mehrerer randomisierter kontrollierter Studien konnte für die Vitamin-D-Substitution, über verschiedene Tumorerkrankungen hinweg, ein positiver Einfluss auf die Mortalität, nicht jedoch auf die Inzidenz von Malignomen gezeigt werden [30]. Untersuchungen über die Verhinderung von tumorbedingten Todesfällen in der gesunden Normalbevölkerung sind Gegenstand aktueller Forschungen [33, 55].

Die biologische Wirksamkeit eines Hormons ist nicht nur vom Serumspiegel und seiner Verfügbarkeit abhängig [67], sie bedarf auch einer Vermittlung an die Zielzellen. Daher steht neben den Serumspiegeln das endokrine Vitamin-D-System im Fokus der Forschung. Insbesondere die tumorsuppressive Wirkung des VDR ist auch auf molekularer Ebene verstanden [6, 38]. In mehreren Metaanalysen, die auf kleineren Kohortenstudien basieren, zeigt sich eine Assoziation verschiedener SNPs des VDR mit Prognosefaktoren des Malignen Melanoms [26, 46, 60]. Auch das Erkrankungsrisiko zeigt eine Assoziation mit einzelnen SNPs im VDR-Gen, hierunter auch rs7975232 [8].

Für das VDBP konnte eine Assoziation mit dem Auftreten bzw. der Prognose von Melanomen sowohl phänotypisch [44] als auch genotypisch [53] in einzelnen Studien gezeigt werden. Die Rolle der untersuchten Cyclooxygenasen ist vor allem für andere Tumorerkrankungen untersucht worden, zum Melanom liegen keine größeren Studien vor.

Die Assoziation zwischen SNPs im endokrinen Vitamin-D-System und Prognosefaktoren des Malignen Melanoms ist also gut untersucht und gibt nach wie vor Anlass zu aktiver klinischer und grundlegender Forschung. Überlebensdaten liegen zwar vor, konnten bisher jedoch keine eindeutigen Zusammenhänge darlegen [14].

Von den neun hier untersuchten SNPs lassen sich in der Literatur bereits Daten für rs731236 [24, 5, 32, 45, 18, 41, 36, 43] und rs7975232 [51] finden. Darüber hinaus untersucht die Arbeit von Schäfer et al. [54] die gleichen SNPs, die auch dieser Arbeit zugrunde liegen, ausgenommen rs11574143.

In keiner der Arbeiten konnte für einen der hier untersuchten SNPs ein signifikanter Zusammenhang mit Überleben oder der Tumordicke nach Breslow nachgewiesen werden.

Einzigste Ausnahme bildet rs731236, bei dem in drei Arbeiten eine Assoziation gezeigt werden konnte: Zeljic [66] zeigt für die homozygote Ausprägung von Tyrosin ein erhöhtes Risiko für das Auftreten maligner Melanome, und Orlow konnte in zwei Analysen [47, 48] eine Assoziation mit der Prognose zeigen.

Die vorgelegte Arbeit möchte hier anknüpfen und untersucht für vier Proteine des endokrinen Vitamin-D-Systems insgesamt neun SNPs (siehe Tabelle 4). Diese werden auf Assoziationen zu den üblichen Prognosefaktoren wie Tumordicke nach Breslow und das Tumorstadium untersucht. Zu den Patienten liegen Überlebensdaten über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 100 Monaten vor.

Die untersuchten SNPs decken sich insbesondere beim VDR mit bereits ausgiebig untersuchten, nämlich rs731236 und rs7975232. Bei rs4646536 und rs927650, den SNPs der Vitamin-D-assoziierten Cyclooxygenasen, liegen derartige Untersuchungen nach bestem Wissen noch nicht vor.

Im ersten Schritt wurden für die untersuchten Allele die Häufigkeiten der einzelnen Ausprägungen zwischen den Melanompatienten und den nicht-onkologischen Probanden verglichen. Dabei zeigt sich, dass in beiden Gruppen keine Unterschiede in der Allelfrequenz vorliegen. Damit kann ein Hinweis darauf, dass ein einzelnes Allel das Auftreten von malignen Melanomen begünstigt oder verhindert, nicht abgeleitet werden.

Die weiteren Untersuchungen beschränken sich auf das Kollektiv der Melanompatienten. Die Untersuchung der Tumordicke nach Breslow zeigt für fast alle Allele Regressionskoeffizienten von geringem Betrag, was einem schwachen Einfluss der SNP-Ausprägung auf die Tumordicke entspricht.

Bei den SNPs rs757343 und rs11574143, die beide auf dem Vitamin-D-Rezeptor-Gen liegen, ergeben sich signifikante p-Werte von  $p = 0,006$  und  $p = 0,004$ . Beide Ergebnisse müssen aus mehreren Gründen kritisch betrachtet werden: Einerseits sind für die beiden signifikanten Allele rs757343(A/A) und rs11574143(A/A) nur jeweils drei Patienten im Kollektiv. Bei allen sechs Fällen handelt es sich um Melanome mit geringer Tumordicke, was aufgrund der insgesamt großen Häufigkeit dünner Melanome nicht weiter überrascht. Durch die fehlenden fortgeschrittenen Tumore kommt es jedoch zu einer deutlichen Ergebnisverzerrung.

Andererseits wurden für die Tumordicke nach Breslow 18 statistische Analysen durchgeführt. Mit einem p-Wert von  $p < 0,05$  wird eine Wahrscheinlichkeit von 5% für ein falsch-positives Ergebnis pro Analyse festgelegt. Bei den achtzehn Untersuchungen entspricht dies einer Wahrscheinlichkeit von 60% mindestens eine Nullhypothese fälschlicherweise zu verwerfen.

Aus der Literatur liegen für Polymorphismen des VDR die meisten Daten vor, insbesondere die Korrelation mit der Tumordicke nach Breslow ist ausgiebig untersucht. Für rs757343 wurde in einer anderen Studie kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen [54]. In der gleichen Studie wurden bis auf rs11574143 auch die anderen hier analysierten SNPs untersucht und für keinen konnte ein signifikanter Zusammenhang mit der Tumordicke nach Breslow nachgewiesen werden.

In Zusammenschau dieser Sachverhalte kann man trotz signifikanter p-Werte für diese beiden SNPs nicht von einer tatsächlichen Assoziation ausgehen. Deshalb wurde auch auf eine Korrektur der Alphafehlerkumulierung verzichtet.

Bei der Untersuchung der Tumorstadien nach AJCC zeigte sich für keinen SNP ein Allel, für das die Tumorstadien signifikant unterschiedlich verteilt waren. Dies unterstützt auch die Einschätzung, dass es sich bei den Tumordicken für rs757343 und rs11574143 nicht um einen tatsächlichen Unterschied handelt, da sich dieser in den Tumorstadien, die die Tumordicke kategorisieren, nicht mehr abbilden lässt.

Die Überlebensraten für die einzelnen Allele schwanken pro SNP unterschiedlich stark, ein signifikanter Unterschied der Hazard Ratios konnte jedoch bei keinem SNP nachgewiesen werden. Einzig bei rs1155563 liegt für das homozygote Cytosin ein grenzwertiger p-Wert von 0,059 vor. Mit einem Hazard Ratio von 0,252 handelt es sich hier auch um ein deutlich reduziertes Risiko im Vergleich zur Referenzausprägung. Ähnlich wie bei der Auswertung der Tumordicke nach Breslow muss einschränkend darauf hingewiesen werden, dass dieses Allel nur bei 22 von 333 Patienten auftritt und lediglich ein einziges Stadium III und keine metastasierten Tumorerkrankungen vorlagen.

Dieses Ergebnis lässt sich aufgrund der geringen Zahl fortgeschrittener Tumorleiden nicht als Hinweis auf eine Assoziation interpretieren.

Insgesamt lässt sich somit anhand der analysierten Daten für keines der untersuchten Allele eine Assoziation mit der Tumordicke nach Breslow, dem Tumorstadium bei Erstdiagnose oder dem Gesamtüberleben nachhaltig begründen. Die Ergebnisse reihen sich damit in die verfügbare Literatur ein. Für rs731236 liegen scheinbar widersprüchliche Ergebnisse vor – einerseits soll die Ausprägung T/T einen Risikofaktor für das Auftreten von Malignen Melanomen darstellen, andererseits soll die Prognose günstig beeinflusst werden. Trotz recht hoher Fallzahlen für alle drei Ausprägungen der SNPs zeigt sich in der vorliegenden Studie kein Trend.

Zwar reiht sich die Arbeit in den Ergebnissen gut in die vorliegende Literatur ein, doch sind einige Schwächen der Untersuchung augenscheinlich: Einige Allele sind so selten, dass ihre statistische Auswertung fehleranfällig ist, weil bereits einzelne Ausreißer das Ergebnis stark verzerren. Ein Großteil der analysierten Patienten wurde kurativ behandelt, sodass die Ereigniswahrscheinlichkeit in der Überlebenszeitanalyse gering ist. Um die Zusammenhänge zwischen der Prognose des Malignen Melanoms und Polymorphismen im endokrinen Vitamin-D-System gezielt zu untersuchen, müssten diese Schwächen durch ein angepasstes Studiendesign ausgeglichen werden. Hierzu müsste einerseits die Gesamtfallzahl erhöht werden, andererseits wäre sicherzustellen, dass für alle Allele eine vergleichbare Fallzahl vorliegt. Ob der damit verbundene logistische Aufwand gerechtfertigt ist, kann anhand der vorliegenden Literatur nicht beantwortet werden. Die Ergebnisse der vorgelegten Untersuchung geben jedoch keinen Ansatzpunkt für gezielte Anschlussuntersuchungen.



Das Vitamin-D-System hat aufgrund seiner Komplexität und seiner vielseitigen biologischen Effekte zu Recht das Interesse der Forschung geweckt. Neben den tumorsuppressiven und antiproliferativen Effekten des Vitamin D, insbesondere bei Hauterkrankungen, interagiert es auch auf vielfältige Weise mit dem Immunsystem [3].

Seit 2011 stehen mit den sogenannten Checkpoint-Inhibitoren Tumorthérapien zur Verfügung, die an der immunologischen Eigentoleranz atypischer Zellen ansetzen. Zum Einfluss des endokrinen Vitamin-D-Systems auf das Therapieansprechen der Checkpoint-Inhibitoren gibt es bisher noch keine größeren Untersuchungen, es gibt jedoch Hinweise auf den positiven Effekt von Vitamin D [28, 52]. Neben dem Ansprechen und der Effektivität sind auch die häufigen unerwünschten Arzneimittelwirkungen der Checkpoint-Inhibitoren im Fokus [57].

Das endokrine Vitamin-D-System bleibt damit aus vielen Gründen Teil der aktuellen Forschung beim Malignen Melanom.

## 6. Anhang

### 6.1. Material und Methoden

rsid	VIC	FAM	Reportersequenz
rs731236	A	G	A: TGGACAGGCGGTCCTGGATGGCCTC G: ATCAGCGCGGCGTCCTGCACCCCAG
rs757343	C	T	C: CTCACCTCTAACCAGCGGAAGAGGT T: AAGGGTCACTGCACATTGCCTCCAA
rs2107301	A	G	A: CTTGCTGAGTGTGAAATAATTTTGC G: CAAGTTATTCCCATGCAAGACATGT
rs7975232	A	C	A: AAGGCACAGGAGCTCTCAGCTGGGC C: CCTCACTGCTCAATCCCACCACCCC
rs11574143	C	T	C: TTTGTAATCCTCCAGGTCACTGGCA T: AGCCGCCATCTCTAATGGCAGACAC
rs7041	A	C	A: GCTTTGCCAGTTCCGTGGGTGTGGC C: TCAGGCAATTTTGCTTTTAGTCGCT
rs1155563	C	T	C: ACTGTGATTTTTTTATCTGTAAA T: CTGTGATTTTTTTATCTATAAA
rs4646536	A	G	A: GGTTGCAAAGCACAAAATGGAGACA G: CAAGATGAGGCTAGGGGCTGCAGCC
rs927650	C	T	C: CAGCCTTTGTAGGCAGAATAACAGA T: CTCCTAAAATGTGAATGCCCTAATC

Tabelle 15: Übersicht über die Reportersequenzen der verwendeten Primer

## 6.2. Vergleich mit der Normalbevölkerung

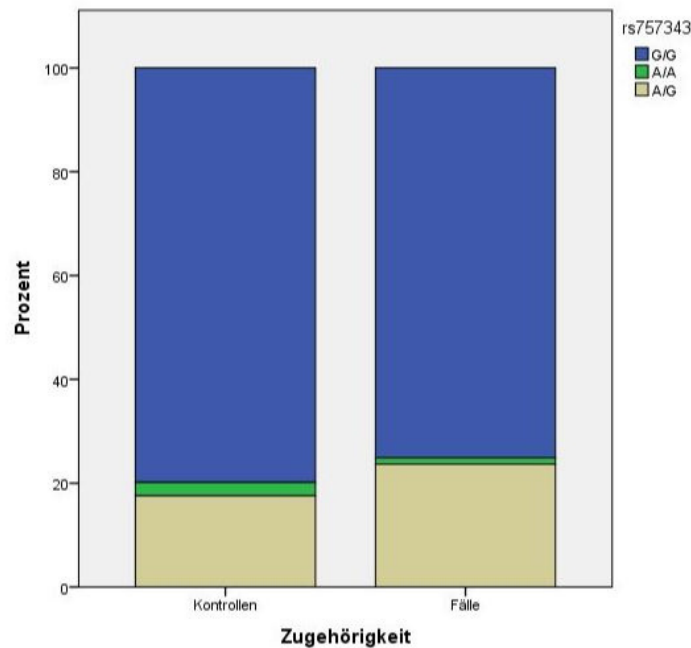


Abbildung 8: Die Allele von rs757343 sind zwischen 347 Kontrollen (G/G: 277, A/A: 9, A/G: 61) und 245 Fällen (G/G: 184, A/A: 3, A/G: 58) gleichverteilt. Darstellung in gestapelten Säulendiagrammen, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton,  $p = 0,109$

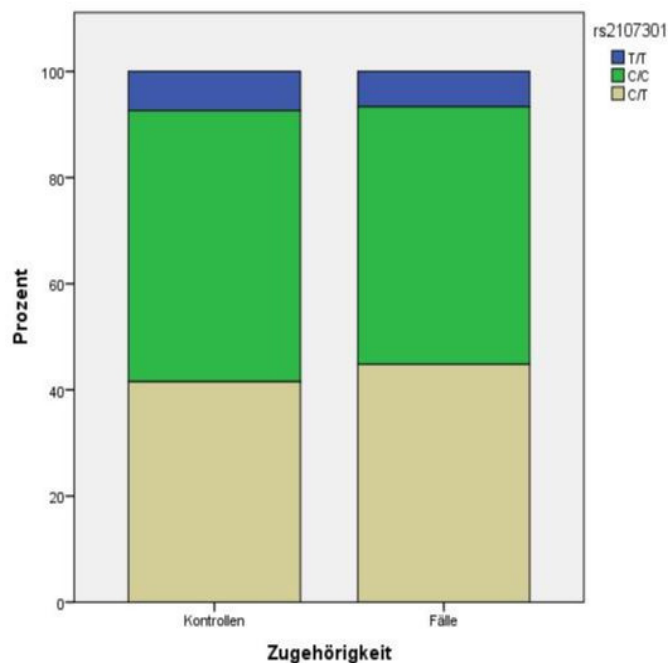


Abbildung 9: Die Allele von rs2107301 sind zwischen 366 Kontrollen (T/T: 27, C/C: 187, C/T: 152) und 241 Fällen (T/T: 16, C/C: 117, C/T: 108) gleichverteilt. Darstellung in gestapelten Säulendiagrammen, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton,  $p = 0,721$

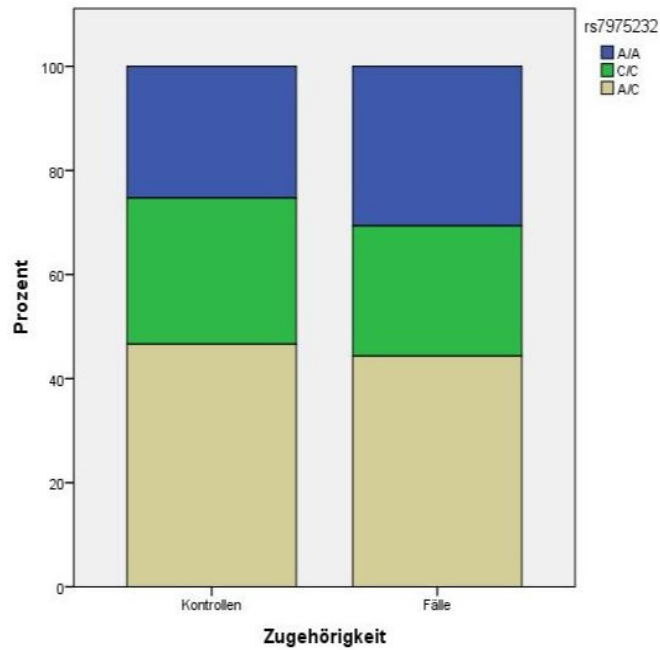


Abbildung 10: Die Allele von rs7975232 sind zwischen 366 Kontrollen (A/A: 90, C/C: 100, A/C: 166) und 336 Fällen (A/A: 103, C/C: 84, A/C: 149) gleichverteilt. Darstellung in gestapelten Säulendiagrammen, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton,  $p = 0,277$

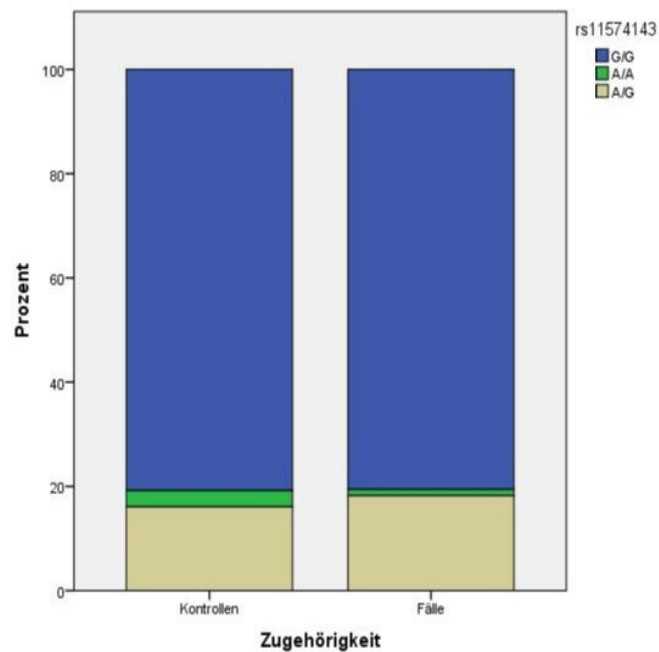


Abbildung 11: Die Allele von rs11574143 sind zwischen 345 Kontrollen (G/G: 286, A/A: 11, A/G: 57) und 247 Fällen (G/G: 199, A/A: 3, A/G: 45) gleichverteilt. Darstellung in gestapelten Säulendiagrammen, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton,  $p = 0,277$

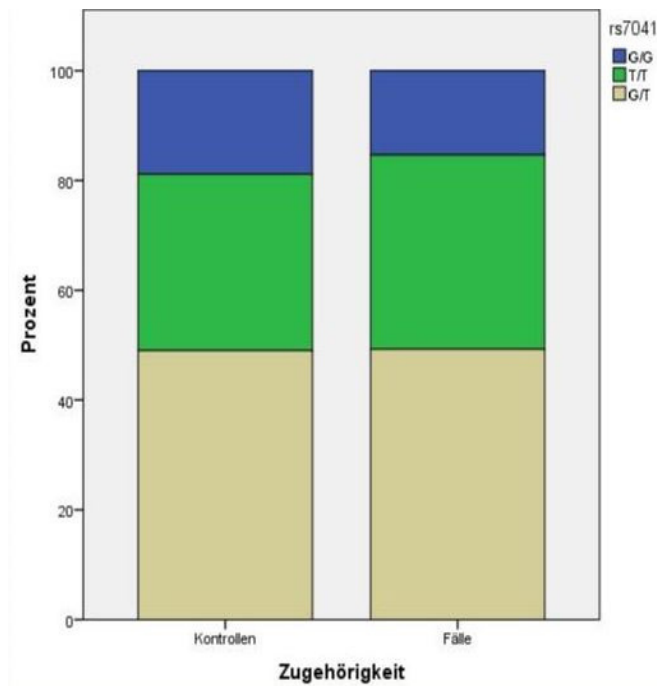


Abbildung 12: Die Allele von rs7041 sind zwischen 361 Kontrollen (G/G: 68, T/T: 116, G/T: 177) und 274 Fällen (G/G: 42, T/T: 97, G/T: 135) gleichverteilt. Darstellung in gestapelten Säulendiagrammen, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton,  $p = 0,443$

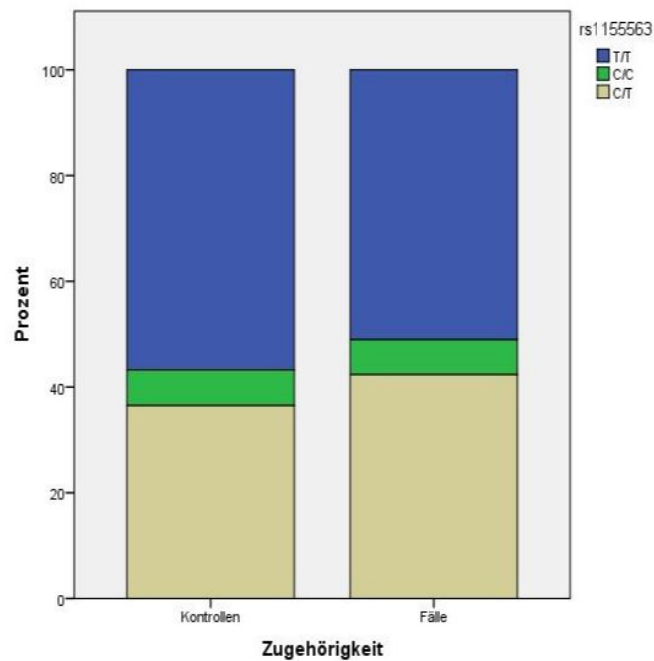


Abbildung 13: Die Allele von rs115563 sind zwischen 340 Kontrollen (T/T: 193, C/C: 23, C/T: 124) und 333 Fällen (T/T: 170, C/C: 22, C/T: 141) gleichverteilt. Darstellung in gestapelten Säulendiagrammen, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton,  $p = 0,289$

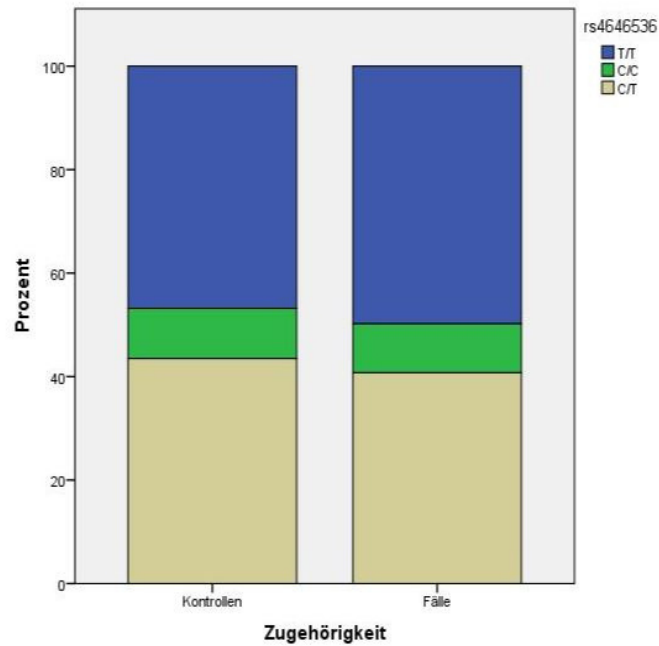


Abbildung 14: Die Allele von rs4646536 sind zwischen 361 Kontrollen (T/T: 169, C/C: 35, C/T: 157) und 243 Fällen (T/T: 121, C/C: 23, C/T: 99) gleichverteilt. Darstellung in gestapelten Säulendiagrammen, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton,  $p = 0,767$

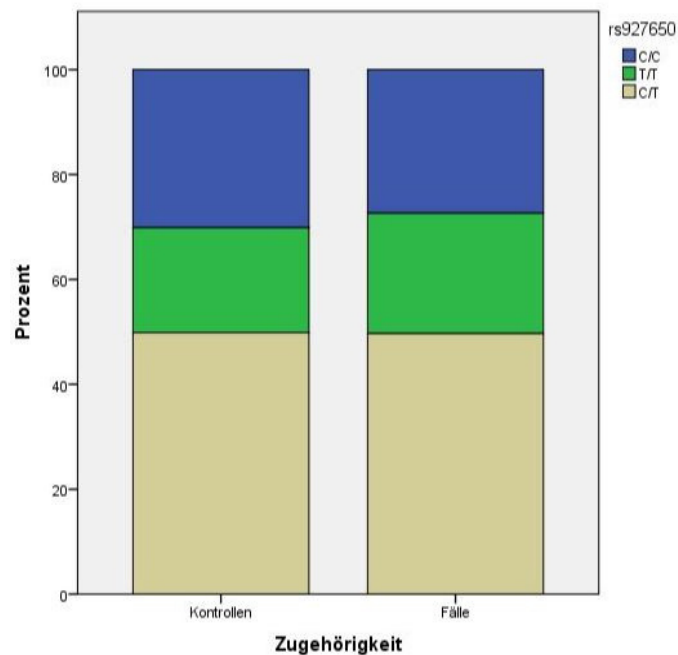


Abbildung 15: Die Allele von rs927650 sind zwischen 355 Kontrollen (C/C: 107, T/T: 71, C/T: 177) und 339 Fällen (C/C: 92, T/T: 78, C/T: 169) gleichverteilt. Darstellung in gestapelten Säulendiagrammen, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton,  $p = 0,569$

### 6.3. Tumordicke nach Breslow

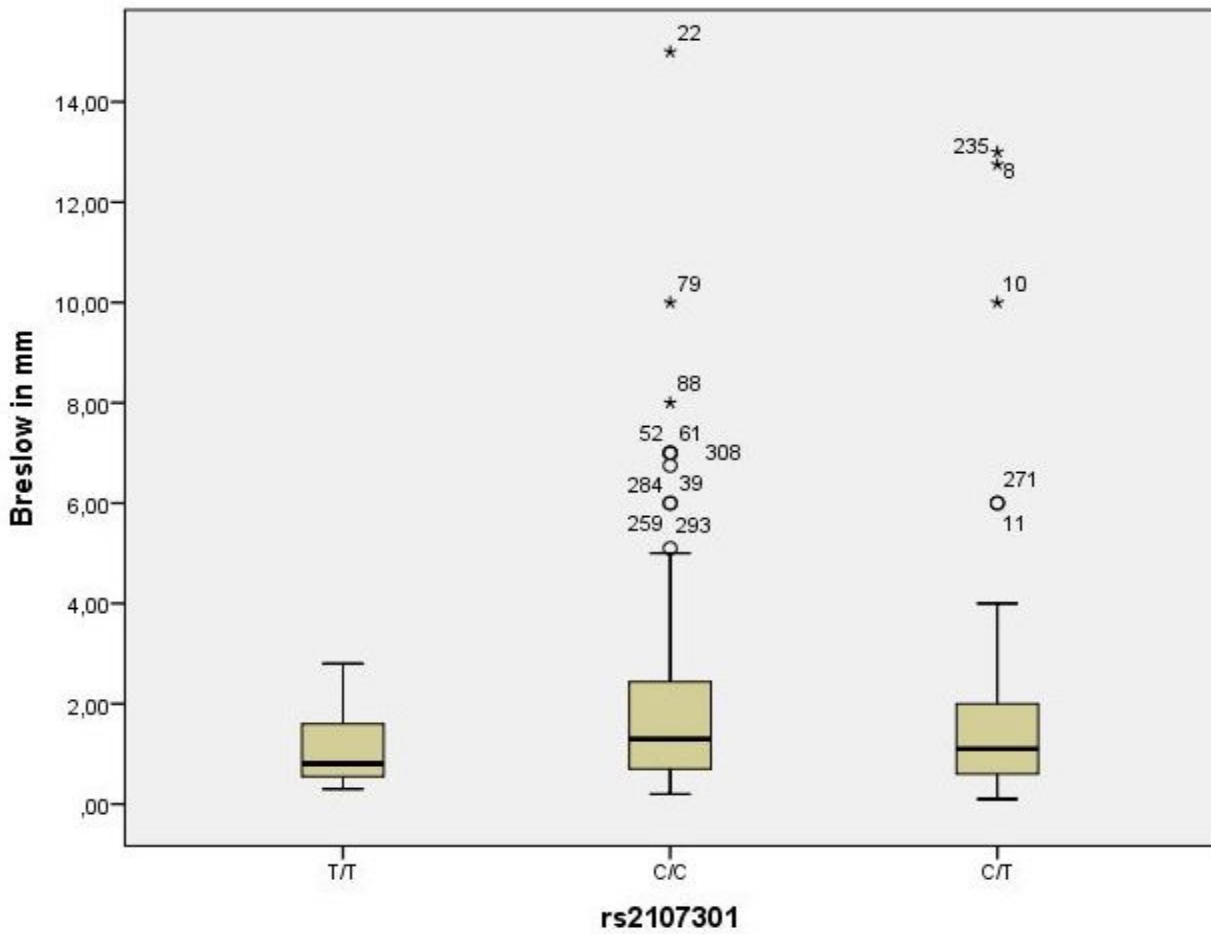


Abbildung 16: Gleichverteilung der Tumordicke nach Breslow in mm für rs2107301 (T/T: 16, C/C: 117, C/T: 108). Im robusten Regressionsmodell gegenüber dem Allel T/T ergeben sich die Regressionskoeffizienten  $\beta(C/C) = 0,219$  und  $\beta(C/T) = 0,134$ , sowie die p-Werte  $p(C/C) = 0,314$  und  $p(C/T) = 0,531$ .

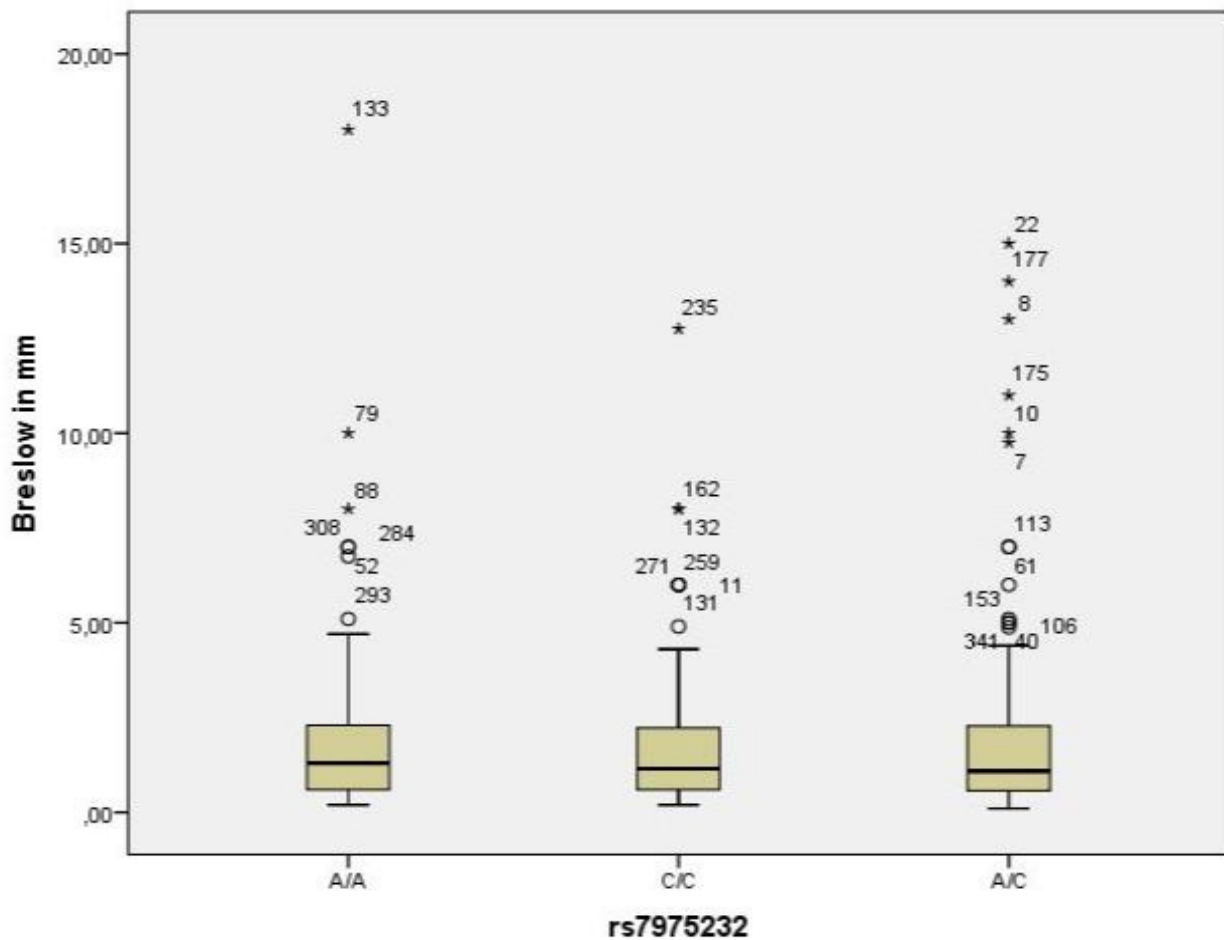


Abbildung 17: Gleichverteilung der Tumordicke nach Breslow in mm für rs7975232 (A/A: 103, C/: 84, A/C: 149). Im robusten Regressionsmodell gegenüber dem Allel A/A ergeben sich die Regressionskoeffizienten  $\beta(C/C) = -0,047$  und  $\beta(A/C) = -0,104$ , sowie die p-Werte  $p(C/C) = 0,761$  und  $p(A/C) = 0,423$ .



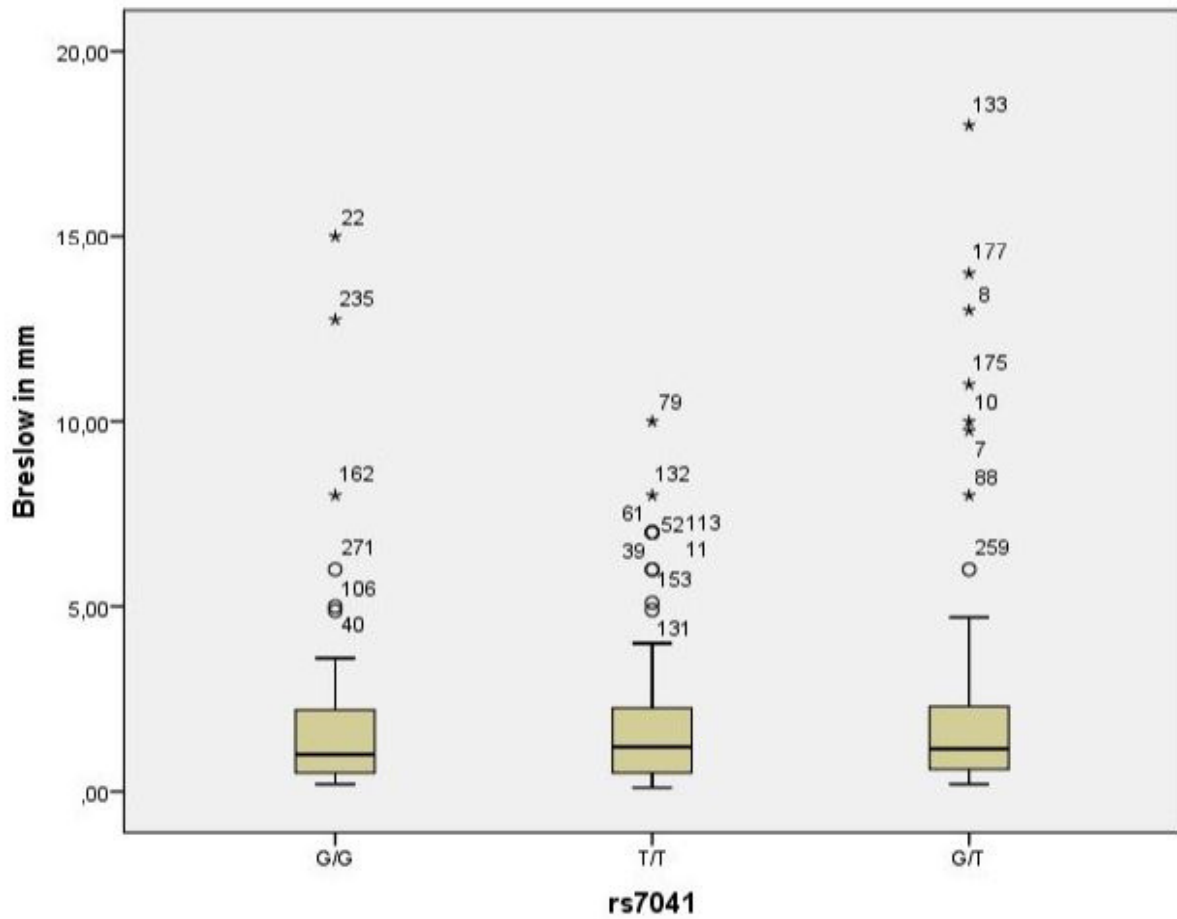


Abbildung 18: Gleichverteilung der Tumordicke nach Breslow in mm für rs7041 (G/G: 42, T/T: 97, G/T: 135). Im robusten Regressionsmodell gegenüber dem Allel G/G ergeben sich die Regressionskoeffizienten  $\beta(T/T) = 0,183$  und  $\beta(G/T) = 0,166$ , sowie die p-Werte  $p(C/C) = 0,278$  und  $p(C/T) = 0,280$ .

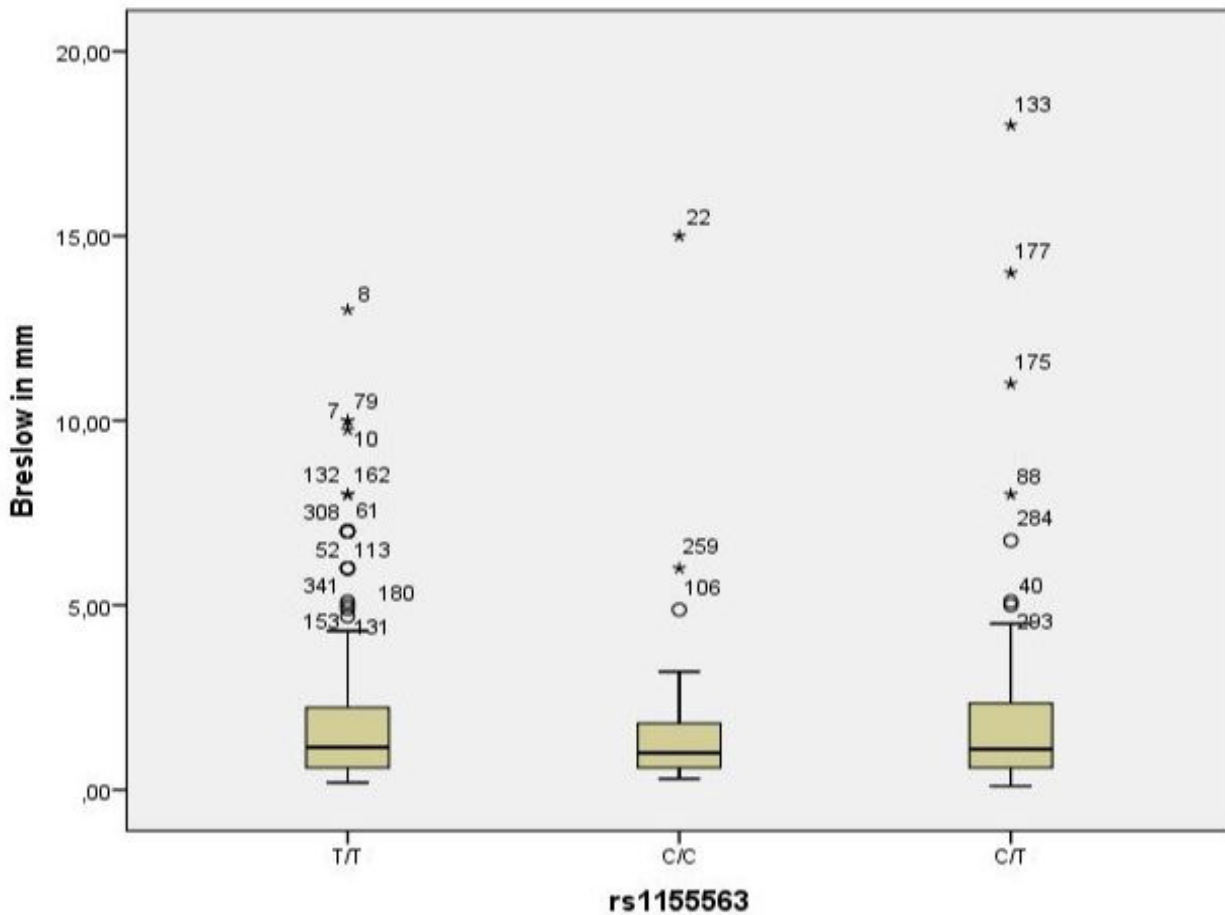


Abbildung 19: Gleichverteilung der Tumordicke nach Breslow in mm für rs1155563(T/T: 170, C/C: 22, C/T: 141). Im robusten Regressionsmodell gegenüber dem Allel T/T ergeben sich die Regressionskoeffizienten  $\beta(C/C) = -0,141$  und  $\beta(C/T) = 0,015$ , sowie die p-Werte  $p(C/C) = 0,400$  und  $p(C/T) = 0,901$ .

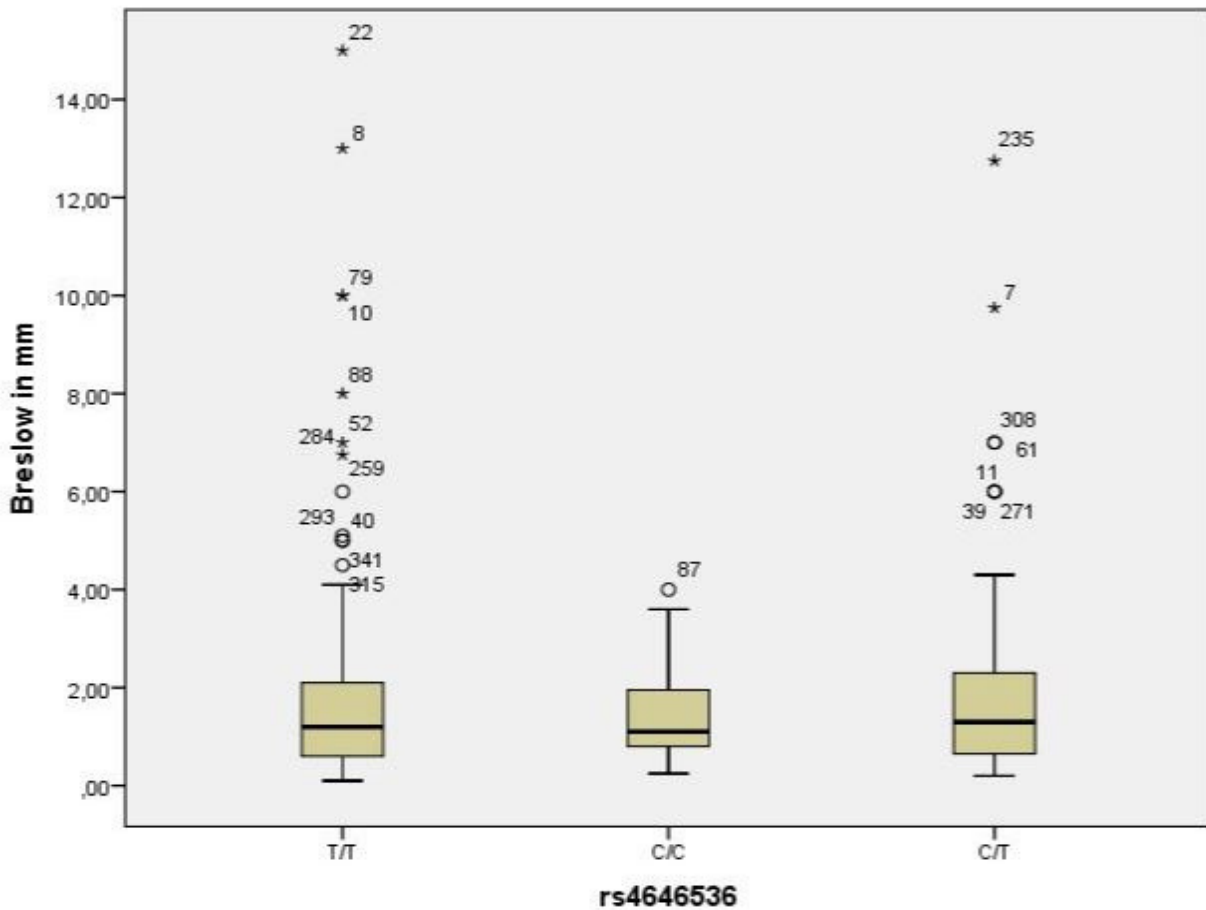


Abbildung 20: Gleichverteilung der Tumordicke nach Breslow in mm für rs4646536 (T/T: 121, C/C: 23, C/T: 99). Im robusten Regressionsmodell gegenüber dem Allel T/T ergeben sich die Regressionskoeffizienten  $\beta(C/C) = 0,147$  und  $\beta(C/T) = -0,067$ , sowie die p-Werte  $p(C/C) = 0,452$  und  $p(C/T) = 0,628$ .

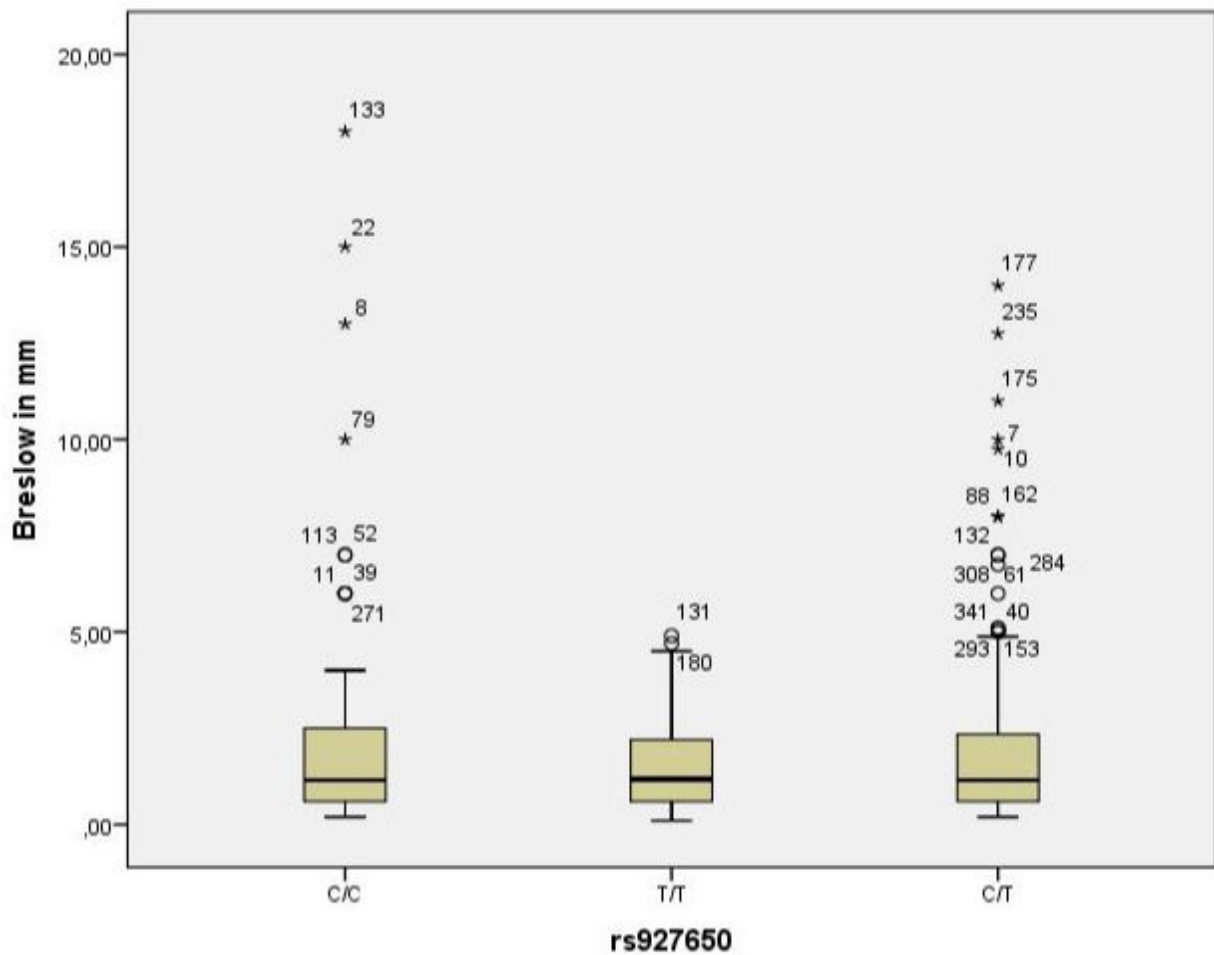


Abbildung 21: Gleichverteilung der Tumordicke nach Breslow in mm für rs927650 (C/C: 92, T/T: 78, C/T: 169). Im robusten Regressionsmodell gegenüber dem Allel C/C ergeben sich die Regressionskoeffizienten  $\beta(T/T) = 0,125$  und  $\beta(C/T) = -0,024$ , sowie die p-Werte  $p(T/T) = 0,445$  und  $p(C/T) = 0,861$ .

## 6.4. Tumorstadien

		Stadium nach AJCC				Gesamt
		I	II	III	IV	
rs757343	G/G	111	51	15	7	184
	A/A	2	1	0	0	3
	A/G	35	18	4	1	58
Gesamt		148	70	19	8	245

Tabelle 16: Tabellarische Darstellung des Tumorstadiums nach AJCC für rs757343. Die Tumorstadien sind über die Allele von rs757343 gleichverteilt, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton,  $p = 0,971$ .

		Stadium nach AJCC				Gesamt
		I	II	III	IV	
rs2107301	T/T	13	3	0	0	16
	C/C	65	35	11	6	117
	C/T	67	32	7	2	108
Gesamt		145	70	18	8	241

Tabelle 17: Tabellarische Darstellung des Tumorstadiums nach AJCC für rs2107301. Die Tumorstadien sind über die Allele von rs2107301 gleichverteilt, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton,  $p = 0,504$ .

		Stadium nach AJCC				Gesamt
		I	II	III	IV	
rs7975232	A/A	59	34	9	1	103
	C/C	49	28	6	1	84
	A/C	92	43	9	5	149
Gesamt		200	105	24	7	336

Tabelle 18: Tabellarische Darstellung des Tumorstadiums nach AJCC für rs7975232. Die Tumorstadien sind über die Allele von rs7975232 gleichverteilt, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton,  $p = 0,814$ .

		Stadium nach AJCC				Gesamt
		I	II	III	IV	
rs11574143	G/G	117	58	17	7	199
	A/A	2	1	0	0	3
	A/G	29	13	2	1	45
Gesamt		148	72	19	8	247

*Tabelle 19: Tabellarische Darstellung des Tumorstadiums nach AJCC für rs11574143. Die Tumorstadien sind über die Allele von rs11574143 gleichverteilt, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton,  $p = 0,957$ .*

		Stadium nach AJCC				Gesamt
		I	II	III	IV	
rs7041	G/G	28	9	5	0	42
	T/T	53	36	5	3	97
	G/T	78	45	7	5	135
Gesamt		159	90	17	8	274

*Tabelle 20: Tabellarische Darstellung des Tumorstadiums nach AJCC für rs7041. Die Tumorstadien sind über die Allele von rs7041 gleichverteilt, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton,  $p = 0,346$ .*

		Stadium nach AJCC				Gesamt
		I	II	III	IV	
rs1155563	T/T	103	52	10	5	170
	C/C	14	7	1	0	22
	C/T	83	44	11	3	141
Gesamt		200	103	22	8	333

*Tabelle 21: Tabellarische Darstellung des Tumorstadiums nach AJCC für rs1155563. Die Tumorstadien sind über die Allele von rs1155563 gleichverteilt, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton,  $p = 0,957$ .*

		Stadium nach AJCC				Gesamt
		I	II	III	IV	
rs4646536	T/T	76	33	8	4	121
	C/C	17	3	3	0	23
	C/T	53	35	8	3	99
Gesamt		146	71	19	7	243

*Tabelle 22: Tabellarische Darstellung des Tumorstadiums nach AJCC für rs4646536. Die Tumorstadien sind über die Allele von rs4646536 gleichverteilt, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton,  $p = 0,316$ .*

		Stadium nach AJCC				Gesamt
		I	II	III	IV	
rs927650	C/C	58	22	10	2	92
	T/T	42	31	3	2	78
	C/T	102	51	11	5	169
Gesamt		202	104	24	9	339

*Tabelle 23: Tabellarische Darstellung des Tumorstadiums nach AJCC für rs927650. Die Tumorstadien sind über die Allele von rs927650 gleichverteilt, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton,  $p = 0,344$ .*

## 6.5. Überlebenszeitanalyse

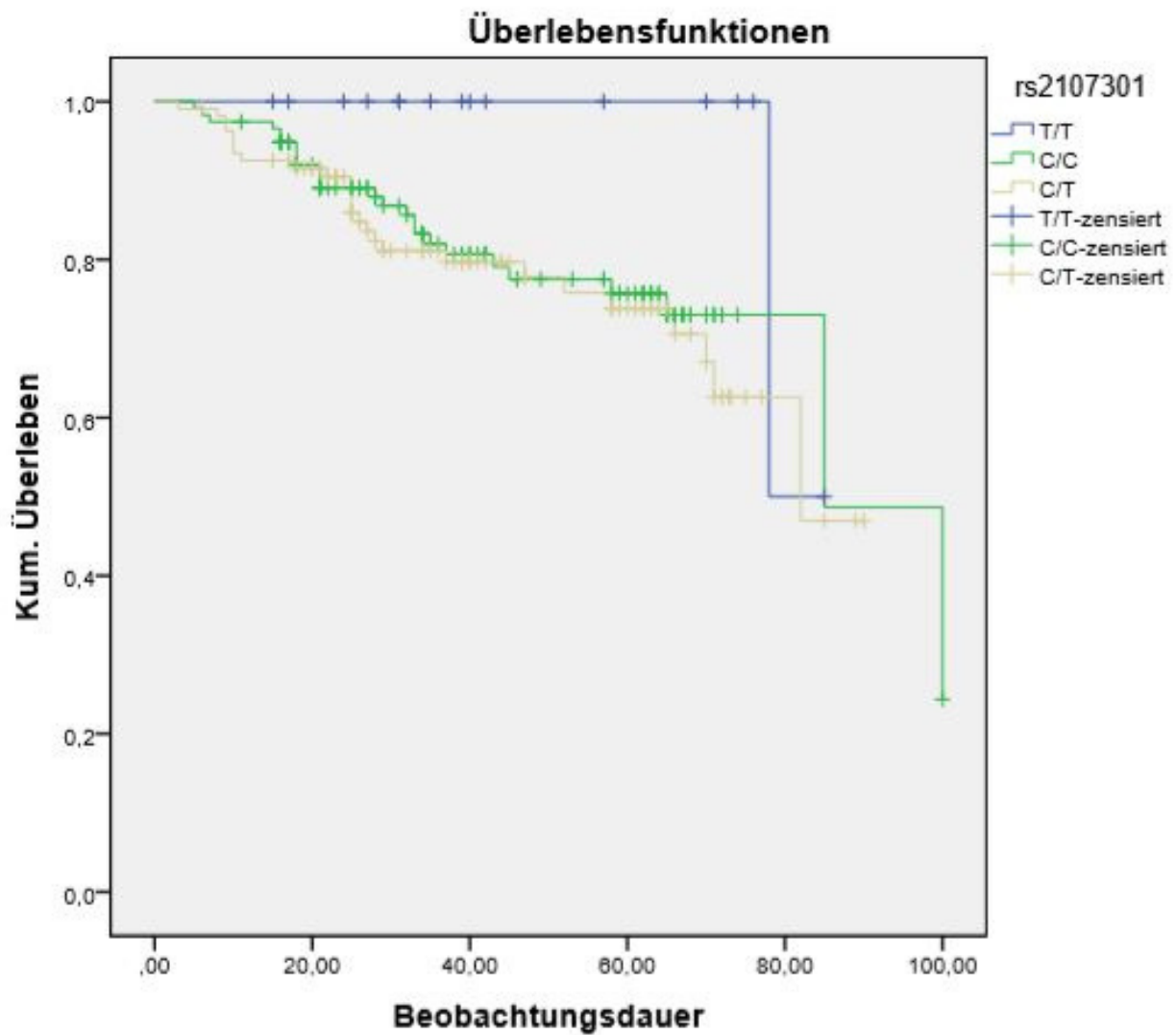


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve für die Allele von rs2107301 mit einer Beobachtungszeit von 100 Monaten. Es zeigt sich kein Unterschied im Gesamtüberleben (Medianes Überleben 78,0 Monate für C/C, 81,5 Monate für T/T und 70,0 Monate für C/T).



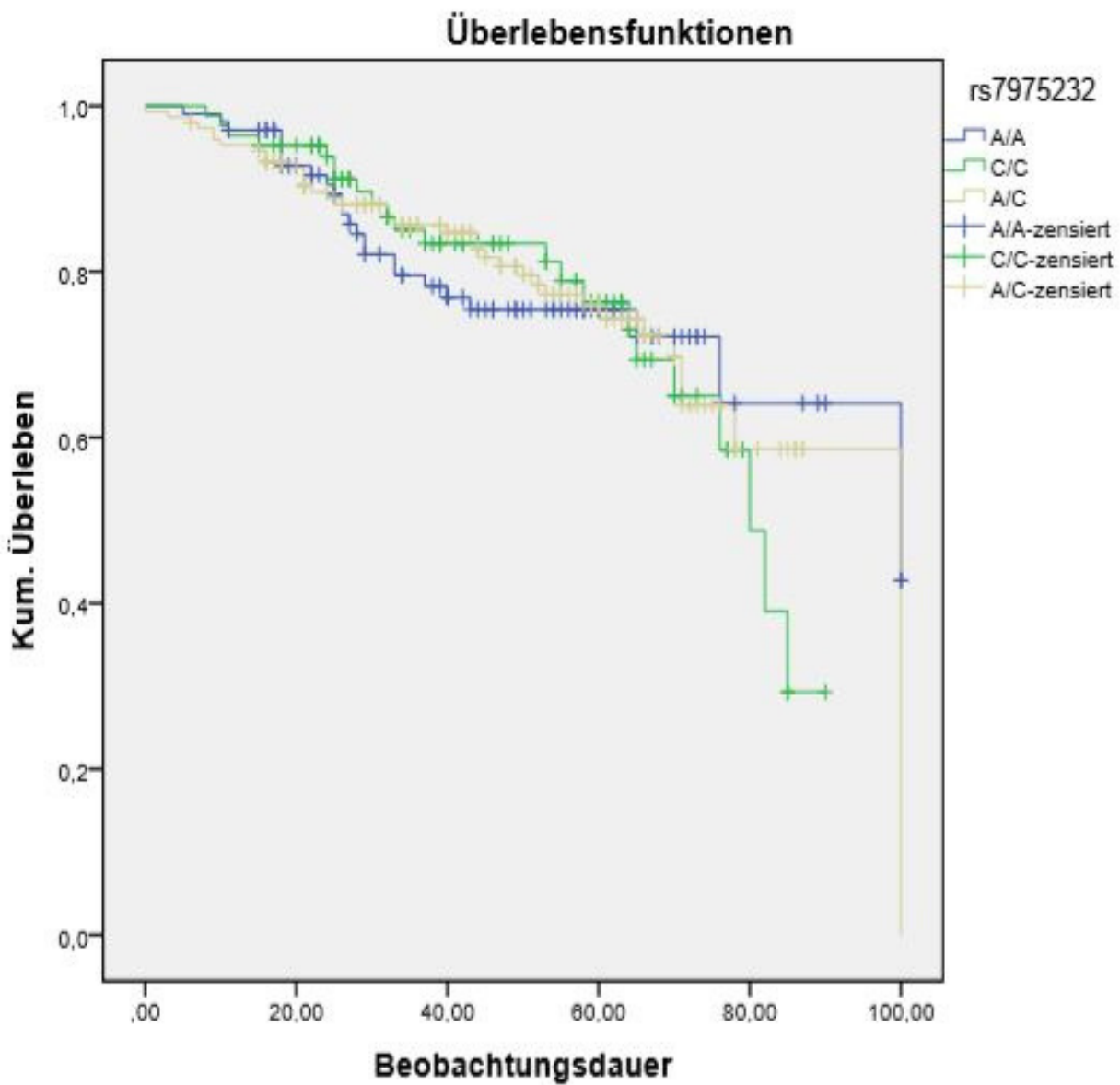


Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurve für die Allele von rs7975232 mit einer Beobachtungszeit von 100 Monaten. Es zeigt sich kein Unterschied im Gesamtüberleben (Medianes Überleben 70,8 Monate für C/C, 78,7 Monate für A/A und 78,3 Monate für A/C).

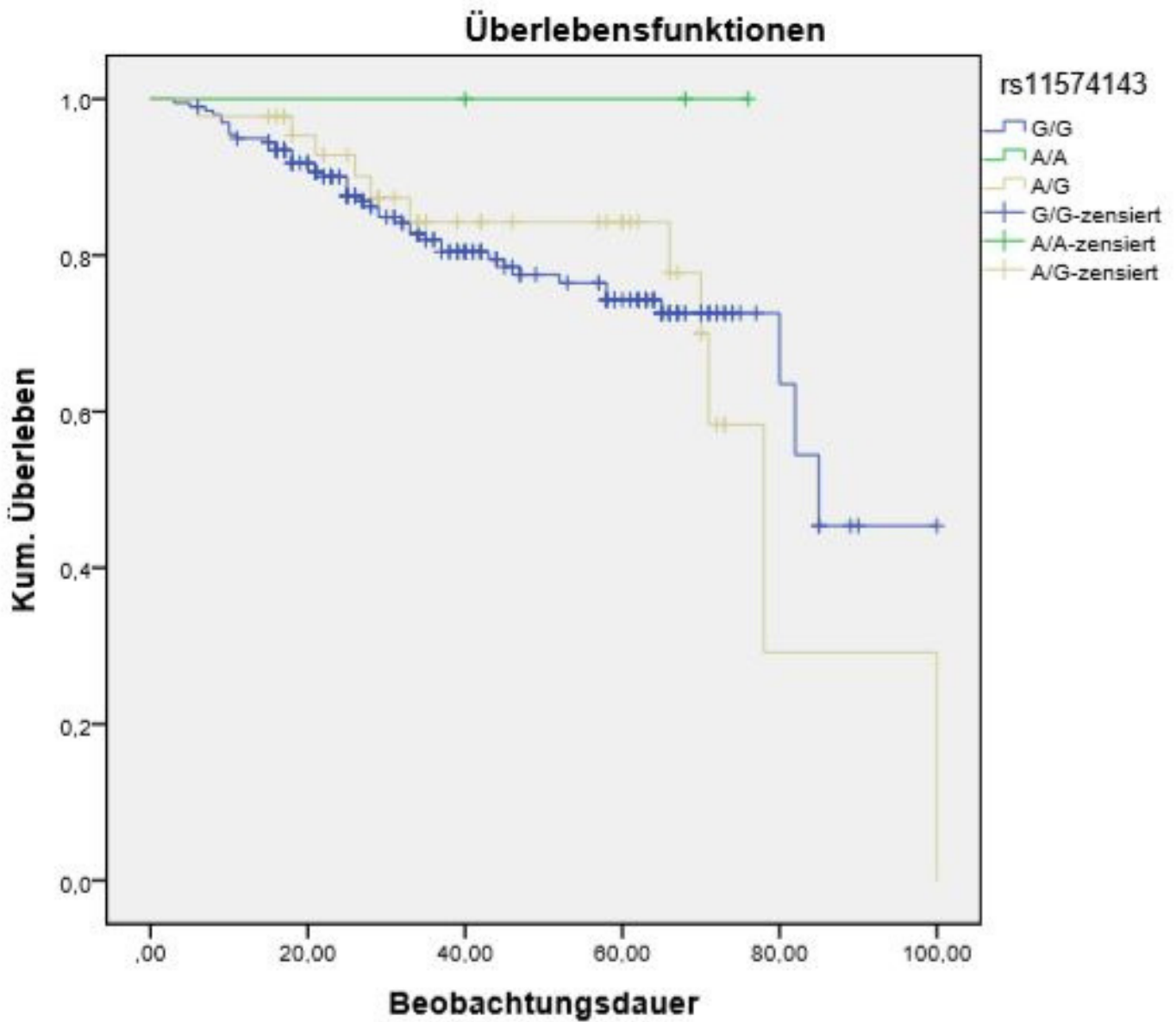


Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurve für die Allele von rs11574143 mit einer Beobachtungszeit von 100 Monaten. Die fehlenden Ereignisse für A/A machen die Berechnung der mittleren Überlebenszeiten unmöglich.

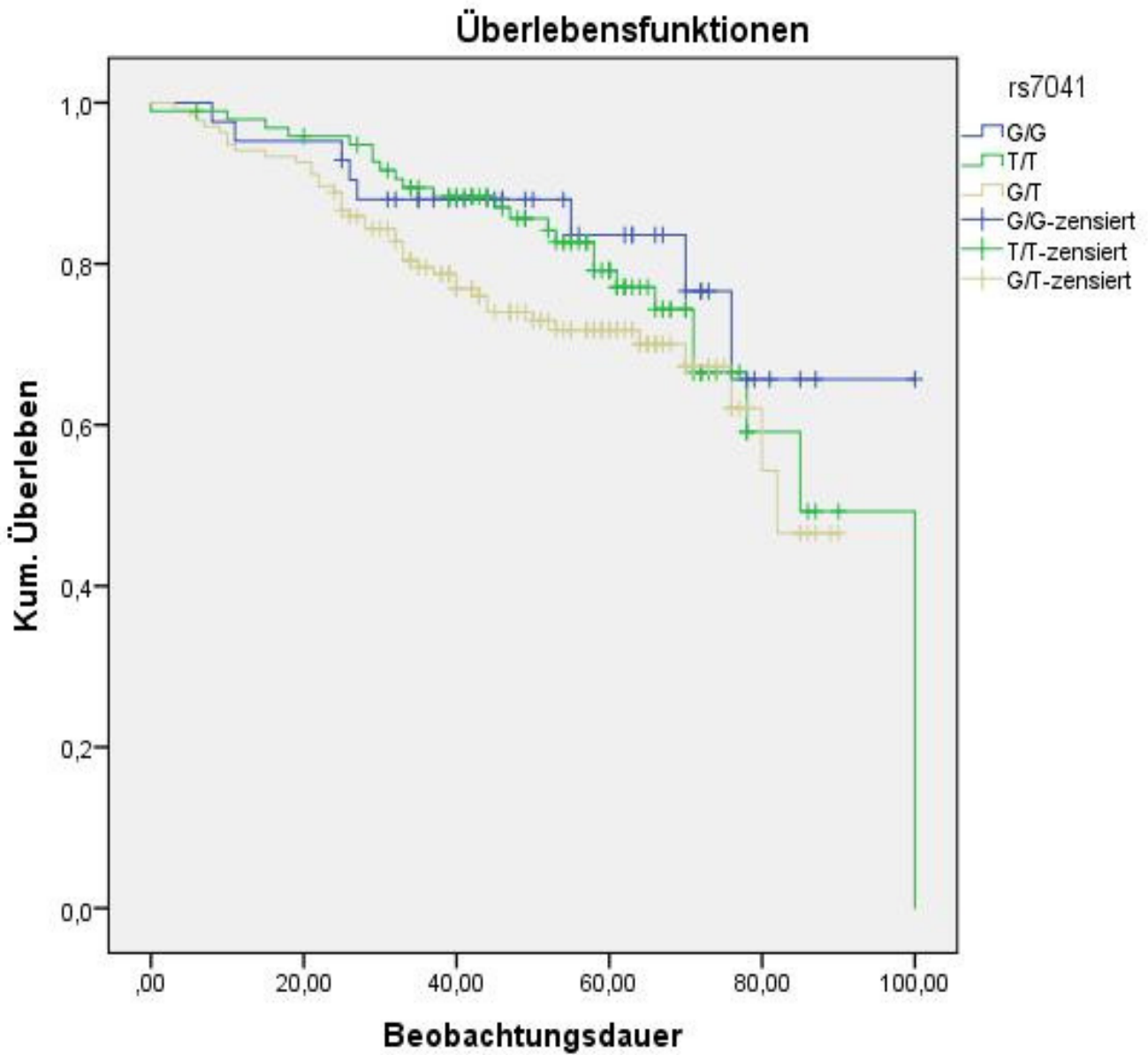


Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurve für die Allele von rs7041 mit einer Beobachtungszeit von 100 Monaten. Es zeigt sich kein Unterschied im Gesamtüberleben (Medianes Überleben 79,6 Monate für T/T 83,6 Monate für G/G und 69,2 Monate für G/T).

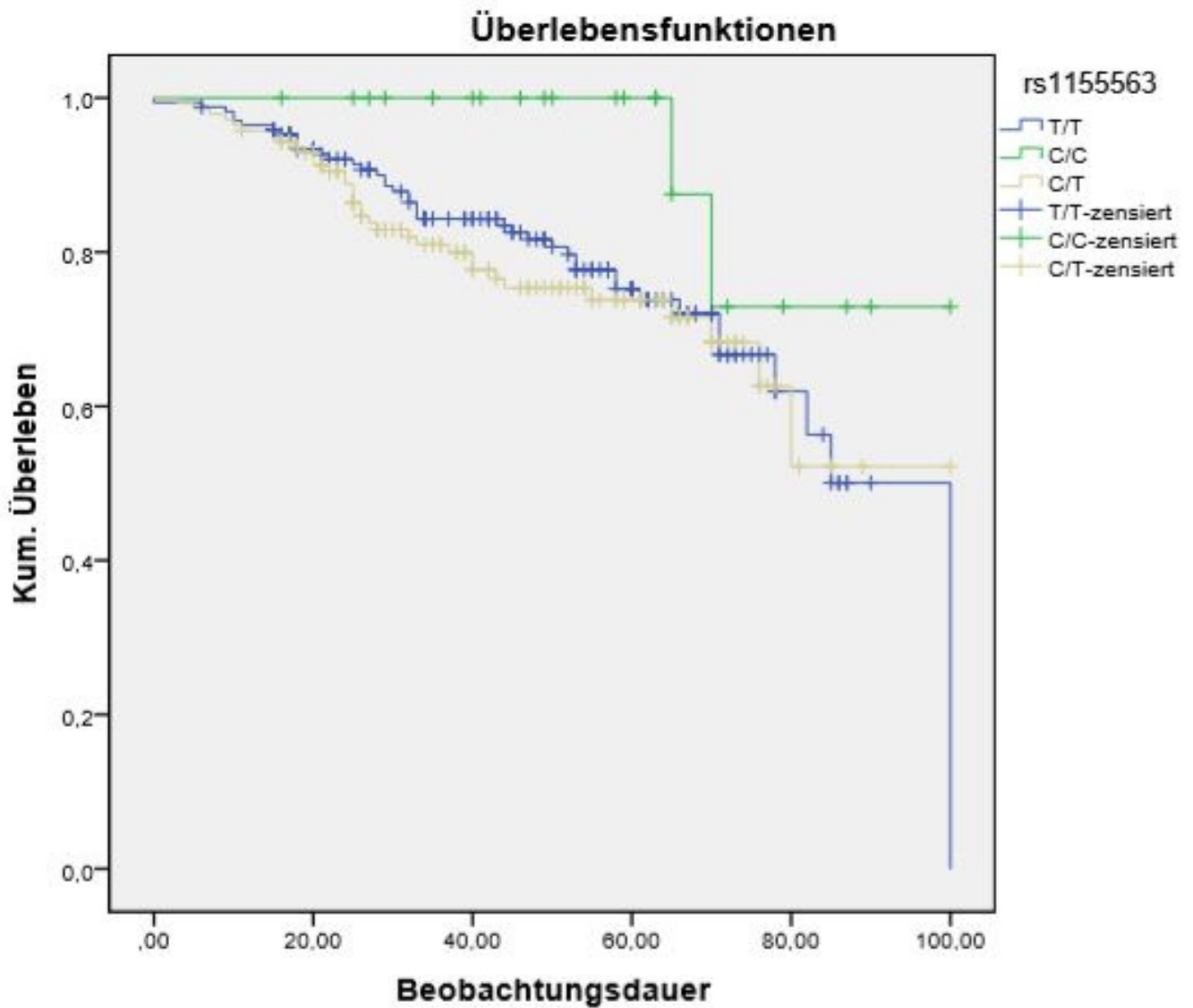


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve für die Allele von rs115563 mit einer Beobachtungszeit von 100 Monaten. Es zeigt sich kein Unterschied im Gesamtüberleben (Medianes Überleben 91,2 Monate für C/C, 77,6 Monate für T/T und 75,6 Monate für C/T). Beobachtungsdauer von 100 Monaten.

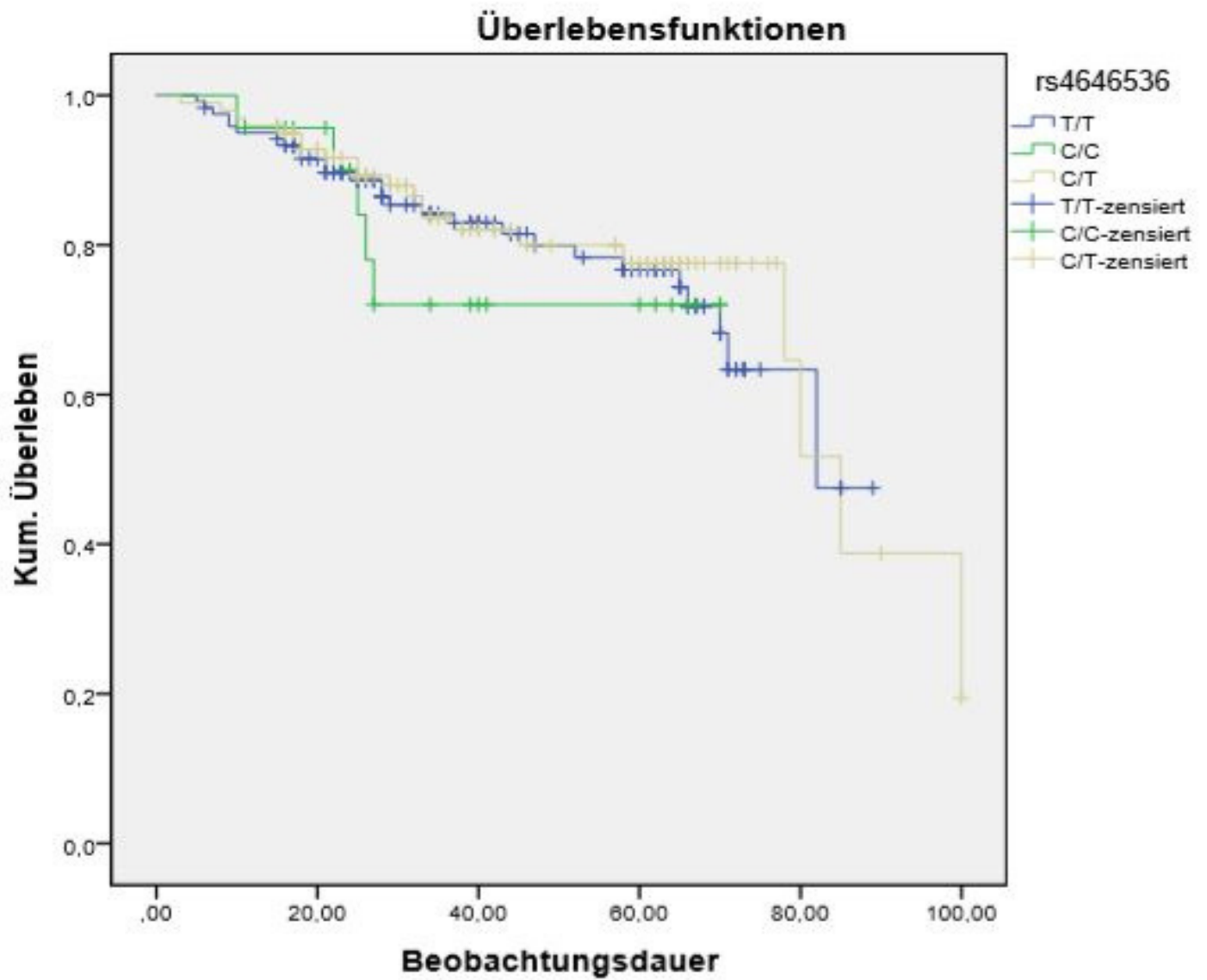


Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurve für die Allele von rs4646536 mit einer Beobachtungszeit von 100 Monaten. Es zeigt sich kein Unterschied im Gesamtüberleben (Medianes Überleben 56,8 Monate für C/C, 71,1 Monate für T/T und 76,6 Monate für C/T).

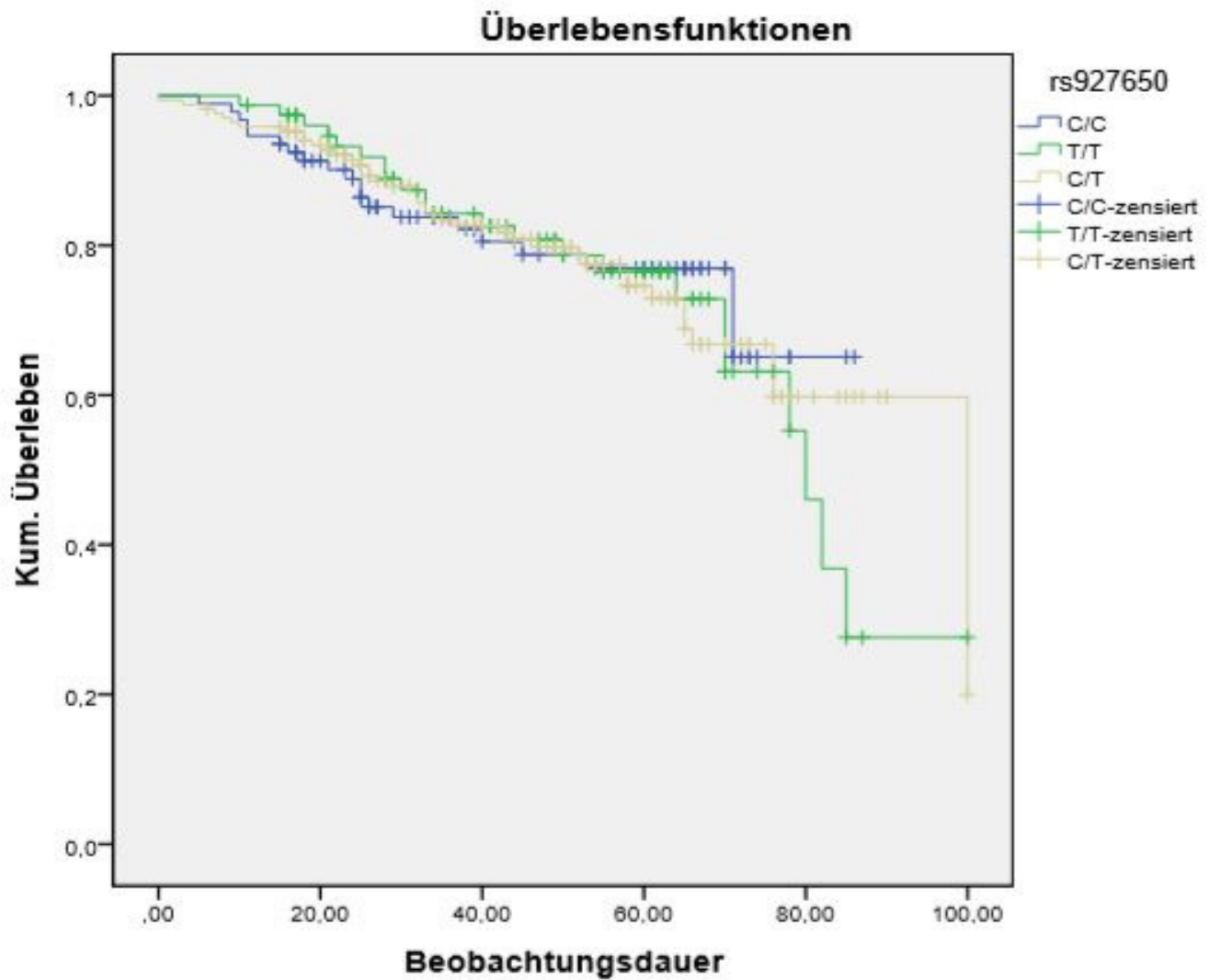


Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurve für die Allele von rs927650 mit einer Beobachtungszeit von 100 Monaten. Es zeigt sich kein Unterschied im Gesamtüberleben (Medianes Überleben 70,3 Monate für C/C, 73,2 Monate für T/T und 78,1 Monate für C/T).

## 7. Literaturverzeichnis

1. Adorini L, Penna G, Giarratana N, Uskokovic M (2003) Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases. *Journal of Cellular Biochemistry* 88:227–233
2. Amos CI, Wang L-E, Lee JE, Gershenwald JE, Chen WV, Fang S, Kosoy R, Zhang M, Qureshi AA, Vattathil S, Schacherer CW, Gardner JM, Wang Y, Tim Bishop D, Barrett JH, MacGregor S, Hayward NK, Martin NG, Duffy DL, Mann GJ, Cust A, Hopper J, Brown KM, Grimm EA, Xu Y, Han Y, Jing K, McHugh C, Laurie CC, Doheny KF, Pugh EW, Seldin MF, Han J, Wei Q (2011) Genome-wide association study identifies novel loci predisposing to cutaneous melanoma. *Human Molecular Genetics* 20:5012–5023
3. Aranow C (2011) Vitamin D and the Immune System. *Journal of Investigative Medicine* 59:881–886
4. Barrett JH, Iles MM, Harland M, Taylor JC, Aitken JF, Andresen PA, Akslen LA, Armstrong BK, Avril M-F, Azizi E, Bakker B, Bergman W, Bianchi-Scarrà G, Bressac-de Paillerets B, Calista D, Cannon-Albright LA, Corda E, Cust AE, Dębniak T, Duffy D, Dunning AM, Easton DF, Friedman E, Galan P, Ghiorzo P, Giles GG, Hansson J, Hocevar M, Höiom V, Hopper JL, Ingvar C, Janssen B, Jenkins MA, Jönsson G, Kefford RF, Landi G, Landi MT, Lang J, Lubiński J, Mackie R, Malvey J, Martin NG, Molven A, Montgomery GW, van Nieuwpoort FA, Novakovic S, Olsson H, Pastorino L, Puig S, Puig-Butlle JA, Randerson-Moor J, Snowden H, Tuominen R, Van Belle P, van der Stoep N, Whiteman DC, Zelenika D, Han J, Fang S, Lee JE, Wei Q, Lathrop GM, Gillanders EM, Brown KM, Goldstein AM, Kanetsky PA, Mann GJ, MacGregor S, Elder DE, Amos CI, Hayward NK, Gruis NA, Demenais F, Bishop JAN, Bishop DT (2011) Genome-wide association study identifies three new melanoma susceptibility loci. *Nat Genet* 43:1108–1113
5. Barroso E, Fernandez LP, Milne RL, Pita G, Sendagorta E, Floristan U, Feito M, Aviles JA, Martin-Gonzalez M, Arias JI, Zamora P, Blanco M, Lazaro P, Benitez J, Ribas G (2008) Genetic analysis of the vitamin D receptor gene in two epithelial cancers: melanoma and breast cancer case-control studies. *BMC Cancer* 8:385
6. Bikle DD (2020) The Vitamin D Receptor as Tumor Suppressor in Skin. *Adv Exp Med Biol* 1268:285–306
7. Binder R, Kress A, Kan G, Herrmann K, Kirschfink M (1999) Neutrophil priming by cytokines and vitamin D binding protein (Gc-globulin): impact on C5a-mediated chemotaxis, degranulation and respiratory burst. *Mol Immunol* 36:885–892
8. Birke M, Schöpe J, Wagenpfeil S, Vogt T, Reichrath J (2020) Association of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms With Melanoma Risk: A Meta-analysis and Systematic Review. *Anticancer Res* 40:583–595
9. Bishop DT, Demenais F, Iles MM, Harland M, Taylor JC, Corda E, Randerson-Moor J, Aitken JF, Avril M-F, Azizi E, Bakker B, Bianchi-Scarrà G, Bressac-de Paillerets B, Calista D, Cannon-Albright LA, Chin-A-Woeng T, Dębniak T, Galore-Haskel G, Ghiorzo P, Gut I, Hansson J, Hočevár M, Höiom V, Hopper JL, Ingvar C, Kanetsky PA, Kefford RF, Landi MT, Lang J, Lubiński J, Mackie R, Malvey J, Mann GJ, Martin NG, Montgomery GW, van Nieuwpoort FA, Novakovic S, Olsson H, Puig S, Weiss M, van Workum W, Zelenika D, Brown KM, Goldstein AM, Gillanders EM, Boland A, Galan P, Elder DE, Gruis NA, Hayward NK, Lathrop GM, Barrett JH, Newton Bishop JA (2009) Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk. *Nat Genet* 41:920–925

10. Caini S, Boniol M, Tosti G, Magi S, Medri M, Stanganelli I, Palli D, Assedi M, Marmol VD, Gandini S (2014) Vitamin D and melanoma and non-melanoma skin cancer risk and prognosis: A comprehensive review and meta-analysis. *European Journal of Cancer* 50:2649–2658
11. Candy W, Hurst C, Kimlin M, Lucas R (2015) Vitamin D Deficiency at Melanoma Diagnosis Is Associated with Higher Breslow thickness. *PLOS ONE (Public Library of Science)*
12. Cox DR (1972) Regression Models and Life-Tables. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 34:187–220
13. Cust AE, Drummond M, Bishop DT, Azizi L, Schmid H, Jenkins MA, Hopper JL, Armstrong BK, Aitken JF, Kefford RF, Giles GG, Demenais F, Goldstein AM, Barrett JH, Kanetsky PA, Elder DE, Mann GJ, Newton-Bishop JA (2019) Associations of pigmentary and naevus phenotype with melanoma risk in two populations with comparable ancestry but contrasting levels of ambient sun exposure. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 33:1874–1885
14. Davies JR, Field S, Randerson-Moor J, Harland M, Kumar R, Anic GM, Nagore E, Hansson J, Höiom V, Jönsson G, Gruis NA, Park JY, Guan J, Sivaramakrishna Rachakonda P, Wendt J, Pjanova D, Puig S, Schadendorf D, Okamoto I, Olsson H, Affleck P, García-Casado Z, Puig-Butille JA, Stratigos AJ, Kodela E, Donina S, Sucker A, Hosen I, Egan KM, Barrett JH, van Doorn R, Bishop DT, Newton-Bishop J (2014) An inherited variant in the gene coding for vitamin D-binding protein and survival from cutaneous melanoma: a BioGenoMEL study. *Pigment Cell & Melanoma Research* 27:234–243
15. De Smedt J, Van Kelst S, Boecxstaens V, Stas M, Bogaerts K, Vanderschueren D, Aura C, Vandenberghe K, Lambrechts D, Wolter P, Bechter O, Nikkels A, Strobbe T, Emri G, Marasigan V, Garmyn M (2017) Vitamin D supplementation in cutaneous malignant melanoma outcome (ViDMe): a randomized controlled trial. *BMC Cancer* 17:1–10
16. Fisher RA (1922) On the Interpretation of  $\chi^2$  from Contingency Tables, and the Calculation of P. *Journal of the Royal Statistical Society* 85:87–94
17. Freeman GH, Halton JH (1951) Note on an exact treatment of contingency, goodness of fit and other problems of significance. *Biometrika* 38:141–149
18. Gapska P, Scott RJ, Serrano-Fernandez P, Mirecka A, Rassoud I, Górski B, Cybulski C, Huzarski T, Byrski T, Nagay L, Maleszka R, Sulikowski M, Lubinski J, Debniak T (2009) Vitamin D receptor variants and the malignant melanoma risk: a population-based study. *Cancer Epidemiol* 33:103–107
19. Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M (2002) *AJCC Cancer Staging Manual*. 6. edition. Springer, New York, NY, New York
20. Griffin MD, Lutz W, Phan VA, Bachman LA, McKean DJ, Kumar R (2001) Dendritic cell modulation by  $1\alpha,25$  dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its analogs: A vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. *PNAS* 98:6800–6805
21. Haddad JG, Hu YZ, Kowalski MA, Laramore C, Ray K, Robzyk P, Cooke NE (1992) Identification of the sterol- and actin-binding domains of plasma vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Biochemistry* 31:7174–7181
22. Holick MF (1987) Photosynthesis of vitamin D in the skin: effect of environmental and life-style variables. *Fed Proc* 46:1876–1882



23. Holick MF (2003) Vitamin D: A millenium perspective. *Journal of Cellular Biochemistry* 88:296–307
24. Holick MF, Biancuzzo RM, Chen TC, Klein EK, Young A, Bibuld D, Reitz R, Salameh W, Ameri A, Tannenbaum AD (2008) Vitamin D2 Is as Effective as Vitamin D3 in Maintaining Circulating Concentrations of 25-Hydroxyvitamin D. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93:677–681
25. Holick MF (2010) *Vitamin D: Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications*. 2nd edition. Humana Press
26. Hutchinson PE, Osborne JE, Lear JT, Smith AG, Bowers PW, Morris PN, Jones PW, York C, Strange RC, Fryer AA (2000) Vitamin D receptor polymorphisms are associated with altered prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 6:498–504
27. Jones G (2008) Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *The American Journal of Clinical Nutrition* 88:582S-586S
28. Joshi S, Pantalena L-C, Liu XK, Gaffen SL, Liu H, Rohowsky-Kochan C, Ichiyama K, Yoshimura A, Steinman L, Christakos S, Youssef S (2011) 1,25-dihydroxyvitamin D(3) ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. *Mol Cell Biol* 31:3653–3669
29. Kaplan EL, Meier P (1958) Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association* 53:457–481
30. Keum N, Lee DH, Greenwood DC, Manson JE, Giovannucci E (2019) Vitamin D supplementation and total cancer incidence and mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Oncol* 30:733–743
31. Kim GK (2010) The rationale behind topical vitamin d analogs in the treatment of psoriasis: where does topical calcitriol fit in? *J Clin Aesthet Dermatol* 3:46–53
32. Koli K, Keski-Oja J (1993) Vitamin D3 and calcipotriol decrease extracellular plasminogen activator activity in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 101:706–712
33. Kuznia, Sabine, Zhu, Anna, Schöttker, Ben, Brenner, Hermann (2022) Efficacy of vitamin D 3 supplementation on cancer mortality in the general population and the prognosis of patients with cancer: protocol of a systematic review and individual patient data meta-analysis of randomised controlled trials [abstract]. In: *Vitamin D in Prevention and Therapy*; 2022 May 4-6, Homburg, Abstract nr 21
34. Lee S, Duffy DL, McClenahan P, Lee KJ, McEniery E, Burke B, Jagirdar K, Martin NG, Sturm RA, Soyer HP, Schaidler H (2016) Heritability of naevus patterns in an adult twin cohort from the Brisbane Twin Registry: a cross-sectional study. *Br J Dermatol* 174:356–363
35. Lehmann B, Sauter W, Knuschke P, Dreßler S, Meurer M (2003) Demonstration of UVB-induced synthesis of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol) in human skin by microdialysis. *Arch Dermatol Res* 295:24–28
36. Li C, Liu Z, Wang LE, Gershenwald JE, Lee JE, Prieto VG, Duvic M, Grimm EA, Wei Q (2008) Haplotype and genotypes of the VDR gene and cutaneous melanoma risk in non-Hispanic whites in Texas: A case–control study. *International Journal of Cancer* 122:2077–2084

37. Lim A, Shayan R, Varigos G (2018) High serum vitamin D level correlates with better prognostic indicators in primary melanoma: A pilot study. *Australasian Journal of Dermatology* 59:182–187
38. Lisse TS, Chun RF, Rieger S, Adams JS, Hewison M (2013) Vitamin D activation of functionally distinct regulatory miRNAs in primary human osteoblasts. *J Bone Miner Res* 28:1478–1488
39. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, Schaubert J, Wu K, Meinkens C, Kamen DL, Wagner M, Bals R, Steinmeyer A, Zügel U, Gallo RL, Eisenberg D, Hewison M, Hollis BW, Adams JS, Bloom BR, Modlin RL (2006) Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response. *Science* 311:1770–1773
40. Maronna RA, Martin DR, Yohai VJ (2006) *Robust Statistics: Theory and Methods*. 1. edition. John Wiley & Sons, New Jersey
41. Morgese F, Soldato D, Pagliaretta S, Giampieri R, Brancorsini D, Torniai M, Rinaldi S, Savini A, Onofri A, Scarpelli M, Berardi R (2017) Impact of phosphoinositide-3-kinase and vitamin D3 nuclear receptor single-nucleotide polymorphisms on the outcome of malignant melanoma patients. *Oncotarget* 8:75914–75923
42. Morimoto S, Kumahara Y (1985) A patient with psoriasis cured by 1 alpha-hydroxyvitamin D3. *Med J Osaka Univ* 35:51–54
43. Muralidhar S, Filia A, Nsengimana J, Poźniak J, O’Shea SJ, Diaz JM, Harland M, Randerson-Moor JA, Reichrath J, Laye JP, van der Weyden L, Adams DJ, Bishop DT, Newton-Bishop J (2019) Vitamin D-VDR Signaling Inhibits Wnt/ $\beta$ -Catenin-Mediated Melanoma Progression and Promotes Antitumor Immunity. *Cancer Res* 79:5986–5998
44. Navarrete-Dechent C, Puerto C del, Molgó M, González S, Pérez-Mateluna G, Uribe P, Camargo CA, Borzutzky A (2017) Circulating vitamin D-binding protein and free 25-hydroxyvitamin D concentrations in patients with melanoma: A case-control study. *Journal of the American Academy of Dermatology* 77:575–577
45. Newton-Bishop JA, Beswick S, Randerson-Moor J, Chang Y-M, Affleck P, Elliott F, Chan M, Leake S, Karpavicius B, Haynes S, Kukalich K, Whitaker L, Jackson S, Gerry E, Nolan C, Bertram C, Marsden J, Elder DE, Barrett JH, Bishop DT (2009) Serum 25-Hydroxyvitamin D3 Levels Are Associated With Breslow Thickness at Presentation and Survival From Melanoma. *JCO* 27:5439–5444
46. Orlow I, Roy P, Reiner AS, Yoo S, Patel H, Paine S, Armstrong BK, Kricker A, Marrett LD, Millikan RC, Thomas NE, Gruber SB, Anton-Culver H, Rosso S, Gallagher RP, Dwyer T, Kanetsky PA, Busam K, From L, Begg CB, Berwick M, Group for the GS (2012) Vitamin D receptor polymorphisms in patients with cutaneous melanoma. *International Journal of Cancer* 130:405–418
47. Orlow I, Reiner AS, Thomas NE, Roy P, Kanetsky PA, Luo L, Paine S, Armstrong BK, Kricker A, Marrett LD, Rosso S, Zanetti R, Gruber SB, Anton-Culver H, Gallagher RP, Dwyer T, Busam K, Begg CB, Berwick M, for the GEM Study Group (2016) Vitamin D receptor polymorphisms and survival in patients with cutaneous melanoma: a population-based study. *Carcinogenesis* 37:30–38
48. Orlow I, Shi Y, Kanetsky PA, Thomas NE, Luo L, Corrales-Guerrero S, Cust AE, Sacchetto L, Zanetti R, Rosso S, Armstrong BK, Dwyer T, Venn A, Gallagher RP, Gruber SB, Marrett LD, Anton-Culver H, Busam K, Begg CB, Berwick M, Group the GS (2018) The interaction

between vitamin D receptor polymorphisms and sun exposure around time of diagnosis influences melanoma survival. *Pigment Cell & Melanoma Research* 31:287–296

49. Pearson K (1900) X. On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 50:157–175
50. Randerson-Moor JA, Taylor JC, Elliott F, Chang Y-M, Beswick S, Kukulizch K, Affleck P, Leake S, Haynes S, Karpavicius B, Marsden J, Gerry E, Bale L, Bertram C, Field H, Barth JH, Silva IDS, Swerdlow A, Kanetsky PA, Barrett JH, Bishop DT, Bishop JAN (2009) Vitamin D receptor gene polymorphisms, serum 25-hydroxyvitamin D levels, and melanoma: UK case-control comparisons and a meta-analysis of published VDR data. *Eur J Cancer* 45:3271–3281
51. Reichrath J, Biersack F, Wagenpfeil S, Schöpe J, Pföhler C, Saternus R, Vogt T (2022) Low Vitamin D Status Predicts Poor Clinical Outcome in Advanced Melanoma Treated With Immune Checkpoint or BRAF/MEK Inhibitors: A Prospective Non-Interventional Side-by-Side Analysis. *Front Oncol* 12:839816
52. Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (eds) (2021) *Krebs in Deutschland für 2017/2018*. Robert-Koch-Institut, Berlin
53. Rozmus D, Ciesielska A, Płomiński J, Grzybowski R, Fiedorowicz E, Kordulewska N, Savelkoul H, Kostyra E, Cieślińska A (2020) Vitamin D Binding Protein (VDBP) and Its Gene Polymorphisms—The Risk of Malignant Tumors and Other Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 21:7822
54. Schäfer A, Emmert S, Kruppa J, Schubert S, Tzvetkov M, Mössner R, Reich K, Berking C, Volkenandt M, Pföhler C, Schön MP, Vogt T, König IR, Reichrath J (2012) No association of vitamin D metabolism-related polymorphisms and melanoma risk as well as melanoma prognosis: a case–control study. *Arch Dermatol Res* 304:353–361
55. Schöttker B, Kuznia S, Brenner H (2021) Efficacy of vitamin D3 supplementation on cancer mortality in the general population and the prognosis of patients with cancer: protocol of a systematic review and individual patient data meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open* 11:e041607
56. Simpson S, Blizzard L, Otahal P, Mei IV der, Taylor B (2011) Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 82:1132–1141
57. Sun L, Arbesman J, Piliang M (2021) Vitamin D, autoimmunity and immune-related adverse events of immune checkpoint inhibitors. *Arch Dermatol Res* 313:1–10
58. Timerman D, McEnery-Stonelake M, Joyce CJ, Nambudiri VE, Hodi FS, Claus EB, Ibrahim N, Lin JY (2017) Vitamin D deficiency is associated with a worse prognosis in metastatic melanoma. *Oncotarget* 8:6873–6882
59. van Etten E, Decallonne B, Verlinden L, Verstuyf A, Bouillon R, Mathieu C (2003) Analogs of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 as pluripotent immunomodulators. *Journal of Cellular Biochemistry* 88:223–226
60. Vasilovici AF, Grigore LE, Ungureanu L, Fechete O, Candrea E, Trifa AP, Vişan S, Şenilă S, Cosgarea R (2019) Vitamin D receptor polymorphisms and melanoma (Review). *Oncology Letters* 17:4162–4169

61. Verroust PJ, Christensen EI (2002) Megalin and cubilin—the story of two multipurpose receptors unfolds. *Nephrology Dialysis Transplantation* 17:1867–1871
62. Victor A, Elsässer A, Hommel G, Blettner M (2010) Wie bewertet man die p-Wert-Flut? Hinweise zum Umgang mit dem multiplen Testen – Teil 10 der Serie zur Bewertung wissenschaftlicher Publikationen. *Dtsch Arztebl Int* 107:50–56
63. Whiteman DC, Watt P, Purdie DM, Hughes MC, Hayward NK, Green AC (2003) Melanocytic Nevi, Solar Keratoses, and Divergent Pathways to Cutaneous Melanoma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 95:806–812
64. Yamamoto N, Homma S (1991) Vitamin D3 binding protein (group-specific component) is a precursor for the macrophage-activating signal factor from lysophosphatidylcholine-treated lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:8539–8543
65. Yang Z, Wang L (2011) Regulation of microRNA expression and function by nuclear receptor signaling. *Cell Biosci* 1:31
66. Zeljic K, Kandolf-Sekulovic L, Supic G, Pejovic J, Novakovic M, Mijuskovic Z, Magic Z (2014) Melanoma risk is associated with vitamin D receptor gene polymorphisms. *Melanoma Research* 24:273–279
67. Zhu A, Kuznia S, Niedermaier T, Holleczeck B, Schöttker B, Brenner H (2022) Vitamin D-binding protein, total, „nonbioavailable,“ bioavailable, and free 25-hydroxyvitamin D, and mortality in a large population-based cohort of older adults. *J Intern Med* online ahead of print

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Allele von rs731236 sind zwischen 347 Kontrollen (T/T: 148, C/C: 52, C/T: 147) und 338 Fällen (T/T: 129, C/C: 59, C/T: 150) gleichverteilt. Darstellung in gestapelten Säulendiagrammen, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton, $p = 0,448$ .....	17
Abbildung 2: Tumordicke nach Breslow in mm, dargestellt als Boxplot für die gesamte Studienpopulation von 339 Patienten (Median 1,15 mm, Interquartilabstand 1,70 mm). Es liegt keine Normalverteilung vor.....	19
Abbildung 3: Gleichverteilung der Tumordicke nach Breslow in mm für rs731236 (T/T: 129, C/C: 59, C/T: 150). <i>Im robusten Regressionsmodell gegenüber dem Allel T/T ergeben sich die Regressionskoeffizienten <math>\beta(C/C) = -0,061</math> und <math>\beta(C/T) = -0,038</math>, sowie die p-Werte <math>p(C/C) = 0,689</math> und <math>p(C/T) = 0,759</math>.</i> .....	21
Abbildung 4: <i>Ungleichverteilung der Tumordicke nach Breslow in mm für rs757343 (G/G: 184, A/A: 3, A/G: 58). Im robusten Regressionsmodell gegenüber dem Allel G/G ergeben sich die Regressionskoeffizienten <math>\beta(A/A) = -0,612</math> und <math>\beta(A/G) = -0,017</math>, sowie die p-Werte <math>p(A/A) = 0,006</math> und <math>p(A/G) = 0,903</math>. Die signifikant geringere Tumordicke für A/A kann in der geringen Fallzahl begründet liegen.</i> .....	23
Abbildung 5: <i>Ungleichverteilung der Tumordicke nach Breslow in mm für rs11574143 (G/G: 199, A/A: 3, A/G: 45). Im robusten Regressionsmodell gegenüber dem Allel G/G ergeben sich die Regressionskoeffizienten <math>\beta(A/A) = -0,646</math> und <math>\beta(A/G) = -0,087</math>, sowie die p-Werte <math>p(A/A) = 0,004</math> und <math>p(A/G) = 0,525</math>. Die signifikant geringere Tumordicke für A/A kann in der geringen Fallzahl begründet liegen.</i> .....	24
Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve für die Allele von rs731236 mit einer Beobachtungszeit von 100 Monaten. Es zeigt sich kein Unterschied im Gesamtüberleben (Medianes Überleben 75,4 Monate für C/C, 76,1 Monate für T/T und 73,0 Monate für C/T).....	29
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve für die Allele von rs757343 für einen Beobachtungszeitraum von 100 Monaten. Die fehlenden Ereignisse für A/A machen die Berechnung der mittleren Überlebensdauer unmöglich.....	30
Abbildung 8: Die Allele von rs757343 sind zwischen 347 Kontrollen (G/G: 277, A/A: 9, A/G: 61) und 245 Fällen (G/G: 184, A/A: 3, A/G: 58) gleichverteilt. Darstellung in gestapelten Säulendiagrammen, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton, $p = 0,109$ .....	36

Abbildung 9: Die Allele von rs2107301 sind zwischen 366 Kontrollen (T/T: 27, C/C: 187, C/T: 152) und 241 Fällen (T/T: 16, C/C: 117, C/T: 108) gleichverteilt. Darstellung in gestapelten Säulendiagrammen, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton, $p = 0,721$ .....	36
Abbildung 10: Die Allele von rs7975232 sind zwischen 366 Kontrollen (A/A: 90, C/C: 100, A/C: 166) und 336 Fällen (A/A: 103, C/: 84, A/C: 149) gleichverteilt. Darstellung in gestapelten Säulendiagrammen, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton, $p = 0,277$ .....	37
Abbildung 11: Die Allele von rs11574143 sind zwischen 345 Kontrollen (G/G: 286, A/A: 11, A/G: 57) und 247 Fällen (G/G: 199, A/A: 3, A/G: 45) gleichverteilt. Darstellung in gestapelten Säulendiagrammen, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton, $p = 0,277$ .....	37
Abbildung 12: Die Allele von rs7041 sind zwischen 361 Kontrollen (G/G: 68, T/T 116, G/T: 177) und 274 Fällen (G/G: 42, T/T: 97, G/T: 135) gleichverteilt. Darstellung in gestapelten Säulendiagrammen, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton, $p = 0,443$ .....	38
Abbildung 13: Die Allele von rs1155563 sind zwischen 340 Kontrollen (T/T: 193, C/C: 23, C/T: 124) und 333 Fällen (T/T: 170, C/C: 22, C/T: 141) gleichverteilt. Darstellung in gestapelten Säulendiagrammen, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton, $p = 0,289$ .....	38
Abbildung 14: Die Allele von rs4646536 sind zwischen 361 Kontrollen (T/T: 169, C/C: 35, C/T: 157) und 243 Fällen (T/T: 121, C/C: 23, C/T: 99) gleichverteilt. Darstellung in gestapelten Säulendiagrammen, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton, $p = 0,767$ .....	39
Abbildung 15: Die Allele von rs927650 sind zwischen 355 Kontrollen (C/C: 107, T/T: 71, C/T: 177) und 339 Fällen (C/C: 92, T/T: 78, C/T: 169) gleichverteilt. Darstellung in gestapelten Säulendiagrammen, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton, $p = 0,569$ .....	39
Abbildung 16: Gleichverteilung der Tumordicke nach Breslow in mm für rs2107301 (T/T: 16, C/C: 117, C/T: 108). Im robusten Regressionsmodell gegenüber dem Allel T/T ergeben sich die Regressionskoeffizienten $\beta(C/C) = 0,219$ und $\beta(C/T) = 0,134$ , sowie die p-Werte $p(C/C) = 0,314$ und $p(C/T) = 0,531$ .....	40
Abbildung 17: Gleichverteilung der Tumordicke nach Breslow in mm für rs7975232 (A/A: 103, C/: 84, A/C: 149). Im robusten Regressionsmodell gegenüber dem Allel A/A ergeben	

sich die Regressionskoeffizienten $\beta(C/C) = -0,047$ und $\beta(A/C) = -0,104$ , sowie die p-Werte $p(C/C) = 0,761$ und $p(A/C) = 0,423$ .....	41
Abbildung 18: Gleichverteilung der Tumordicke nach Breslow in mm für rs7041 (G/G: 42, T/T: 97, G/T: 135). Im robusten Regressionsmodell gegenüber dem Allel G/G ergeben sich die Regressionskoeffizienten $\beta(T/T) = 0,183$ und $\beta(G/T) = 0,166$ , sowie die p-Werte $p(C/C) = 0,278$ und $p(C/T) = 0,280$ .....	42
Abbildung 19: Gleichverteilung der Tumordicke nach Breslow in mm für rs1155563(T/T: 170, C/C: 22, C/T: 141). Im robusten Regressionsmodell gegenüber dem Allel T/T ergeben sich die Regressionskoeffizienten $\beta(C/C) = -0,141$ und $\beta(C/T) = 0,015$ , sowie die p-Werte $p(C/C) = 0,400$ und $p(C/T) = 0,901$ .....	43
Abbildung 20: Gleichverteilung der Tumordicke nach Breslow in mm für rs4646536 (T/T: 121, C/C: 23, C/T: 99). Im robusten Regressionsmodell gegenüber dem Allel T/T ergeben sich die Regressionskoeffizienten $\beta(C/C) = 0,147$ und $\beta(C/T) = -0,067$ , sowie die p-Werte $p(C/C) = 0,452$ und $p(C/T) = 0,628$ .....	44
Abbildung 21: Gleichverteilung der Tumordicke nach Breslow in mm für rs927650 (C/C: 92, T/T: 78, C/T: 169). Im robusten Regressionsmodell gegenüber dem Allel C/C ergeben sich die Regressionskoeffizienten $\beta(T/T) = 0,125$ und $\beta(C/T) = -0,024$ , sowie die p-Werte $p(T/T) = 0,445$ und $p(C/T) = 0,861$ .....	45
Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurve für die Allele von rs2107301 mit einer Beobachtungszeit von 100 Monaten. Es zeigt sich kein Unterschied im Gesamtüberleben (Medianes Überleben 78,0 Monate für C/C, 81,5 Monate für T/T und 70,0 Monate für C/T). .....	49
Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurve für die Allele von rs7975232 mit einer Beobachtungszeit von 100 Monaten. Es zeigt sich kein Unterschied im Gesamtüberleben (Medianes Überleben 70,8 Monate für C/C, 78,7 Monate für A/A und 78,3 Monate für A/C). .....	50
Abbildung 24: Kaplan-Meier-Kurve für die Allele von rs11574143 mit einer Beobachtungszeit von 100 Monaten. Die fehlenden Ereignisse für A/A machen die Berechnung der mittleren Überlebenszeiten unmöglich.....	51
Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurve für die Allele von rs7041 mit einer Beobachtungszeit von 100 Monaten. Es zeigt sich kein Unterschied im Gesamtüberleben (Medianes Überleben 79,6 Monate für T/T 83,6 Monate für G/G und 69,2 Monate für G/T).....	52
Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurve für die Allele von rs1155563 mit einer Beobachtungszeit von 100 Monaten. Es zeigt sich kein Unterschied im Gesamtüberleben	

(Medianes Überleben 91,2 Monate für C/C, 77,6 Monate für T/T und 75,6 Monate für C/T).  
 Beobachtungsdauer von 100 Monaten.....53

Abbildung 27: Kaplan-Meier-Kurve für die Allele von rs4646536 mit einer  
 Beobachtungszeit von 100 Monaten. Es zeigt sich kein Unterschied im Gesamtüberleben  
 (Medianes Überleben 56,8 Monate für C/C, 71,1 Monate für T/T und 76,6 Monate für C/T).  
 ..... 54

Abbildung 28: Kaplan-Meier-Kurve für die Allele von rs927650 mit einer Beobachtungszeit  
 von 100 Monaten. Es zeigt sich kein Unterschied im Gesamtüberleben (Medianes  
 Überleben 70,3 Monate für C/C, 73,2 Monate für T/T und 78,1 Monate für C/T).....55



## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation nach der zum Zeitpunkt der Datenerhebung gültigen 6. Auflage der AJCC (2002) Quelle: AJCC Cancer Staging Manual, 6th edition [19].....	5
Tabelle 2: Die aus Tabelle 1 hervorgehende Einteilung in die Tumorstadien. Quelle: AJCC Cancer Staging Manual, 6th edition [19].....	6
Tabelle 3: Nomenklatur der Formen des Vitamin D; Keilstrichformeln nach Holick [25].....	8
Tabelle 4: Übersicht über die Genprodukte, die rsids und ihre jeweiligen Allelvarianten.....	11
Tabelle 5: Matrix zur Herstellung des Genotypisierungs-Reagenz.....	14
Tabelle 6: PCR Protokoll für die Genotypisierung mit dem StepOnePlus™ Real-Time PCR Cycler .....	14
Tabelle 7: P-Werte zum Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton für die einzelnen SNPs. Keiner der Werte unterschreitet die Signifikanzgrenze, daher Gleichverteilung von bis zu 339 Fällen und bis zu 375 Kontrollen; die jeweiligen Säulendiagramme finden sich im Anhang.....	18
Tabelle 8: Die T-Kategorien nach AJCC und die entsprechenden Häufigkeiten für 339 Patienten. Es überwiegen frühe Melanome.....	20
Tabelle 9: Regressionskoeffizienten $\beta$ für die Tumordicke nach Breslow mit den zugehörigen p-Werten, berechnet mittels robuster Regression. In der linken Spalte sind die als Bezugsgröße gewählten Allele angegeben, denen die beiden anderen gegenüber gestellt werden. Es liegen signifikante Assoziationen für rs757343 (A/A) ( $\beta = -0,612$ , $p = 0,006$ ) und rs11574143 (A/A) ( $\beta = -0,636$ , $p = 0,004$ ) vor.....	22
Tabelle 10: Die Tumorstadien nach AJCC und die entsprechenden Häufigkeiten für 339 Patienten. Es überwiegen frühe Tumorstadien, Metastasen fehlen bei 97,35%.....	25
Tabelle 11: Tabellarische Darstellung des Tumorstadiums nach AJCC für rs731236. Die Tumorstadien sind über die Allele von rs731236 gleichverteilt, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton, $p = 0,935$ .....	26
Tabelle 12: p-Werte zum Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton für die einzelnen SNPs. Für keinen SNP zeigt sich eine Ungleichverteilung der Allele über die Tumorstadien.....	26
Tabelle 13: Tabellarische Darstellung der mittleren Überlebenszeit mit 95%-Konfidenzintervall für jeden Einzelnukleotidpolymorphismus. Die Überlappung der Konfidenzintervalle für einzelne SNPs machen einen klinisch relevanten Zusammenhang unwahrscheinlich.....	28
Tabelle 14: Hazard Ratio $h$ für die einzelnen Allele ermittelt mit Cox-Regression. Das Bezugsallel ist in der linken Spalte angegeben. Für kein Allel zeigt sich ein signifikantes Hazard Ratio.....	30
Tabelle 15: Übersicht über die Reportersequenzen der verwendeten Primer.....	35

Tabelle 16: Tabellarische Darstellung des Tumorstadiums nach AJCC für rs757343. Die Tumorstadien sind über die Allele von rs757343 gleichverteilt, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton, $p = 0,971$ .....	46
Tabelle 17: Tabellarische Darstellung des Tumorstadiums nach AJCC für rs2107301. Die Tumorstadien sind über die Allele von rs2107301 gleichverteilt, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton, $p = 0,504$ .....	46
Tabelle 18: Tabellarische Darstellung des Tumorstadiums nach AJCC für rs7975232. Die Tumorstadien sind über die Allele von rs7975232 gleichverteilt, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton, $p = 0,814$ .....	46
Tabelle 19: Tabellarische Darstellung des Tumorstadiums nach AJCC für rs11574143. Die Tumorstadien sind über die Allele von rs11574143 gleichverteilt, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton, $p = 0,957$ .....	47
Tabelle 20: Tabellarische Darstellung des Tumorstadiums nach AJCC für rs7041. Die Tumorstadien sind über die Allele von rs7041 gleichverteilt, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton, $p = 0,346$ .....	47
Tabelle 21: Tabellarische Darstellung des Tumorstadiums nach AJCC für rs1155563. Die Tumorstadien sind über die Allele von rs1155563 gleichverteilt, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton, $p = 0,957$ .....	47
Tabelle 22: Tabellarische Darstellung des Tumorstadiums nach AJCC für rs4646536. Die Tumorstadien sind über die Allele von rs4646536 gleichverteilt, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton, $p = 0,316$ .....	48
Tabelle 23: Tabellarische Darstellung des Tumorstadiums nach AJCC für rs927650. Die Tumorstadien sind über die Allele von rs927650 gleichverteilt, statistische Testung mit dem Exakten Test nach Freeman-Fisher-Halton, $p = 0,344$ .....	48

## **10. Danksagung**

Ich danke Prof. Reichrath für die Überlassung des Themas und seine medizinische und wissenschaftliche Ausbildung.

Ich danke meinen Eltern für die untrübliche Unterstützung.

## 11. Publikationen

1. Müller CSL, **Schwengel J**, Reichrath J, Vogt T, Pföhler C (2016) Report of a case of a familial mediterranean fever with special emphasis on histopathological characteristics. *Glob Derm* 3:375-8
2. Saternus R, **Schwengel J**, Müller CSL, Vogt T, Reichrath J (2020) Ancient friends, revisited: Systematic review and case report of pyoderma gangrenosum-associated autoinflammatory syndromes. *J Transl Autoimmun* 20:100071. doi: 10.1016/j.jtauto.2020.100071
3. Lutz MP, **Schwengel J**, Decker M (2021) Pankreaskarzinom – Neue systemische Therapien. *Der Privatarzt* 3: 8-10
4. **Schwengel J**, Hüttinger S, Lutz MP (2021) Acute pancreatitis following insertion of a gastric balloon – an unusual cause. *Dtsch Arztebl Int* 118. doi: 10.3238/arztebl.m2021.0086 (online first)
5. **Schwengel J**, Decker M, Schneider L, Stürmer CJ, Lutz MP (2023) Early detection of pancreatic cancer. *Oncol Res Treat* doi: 10.1159/000530790 (online first)

## **12. Lebenslauf**

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