

Aus der Abteilung Humangenetik  
(Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Engel)

Schwerpunktprofessur Molekulare Entwicklungs-genetik  
(Prof. Dr. med. H. Hahn)

im Zentrum Hygiene und Humangenetik  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**1alpha,25-Dihydroxy-VitaminD<sub>3</sub> hemmt das Wachstum von  
*Patched*-assoziierten Rhabdomyosarkomen und Basaliomen**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Iris Bérénice Lammering

aus Soest

**Göttingen 2011**

**Dekan:** **Prof. Dr. med. C. Frömmel**

**I. Berichterstatterin:** **Prof. Dr. med. H. Hahn**

**II. Berichterstatter/in:** **PD Dr. med. Dipl. Phys. R. Mößner**

**Tag der mündlichen Prüfung:** **02. November 2011**

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Uhmann A, Niemann H, Lammering B, Henkel C, Fritsch A, Prüfer N, Heb I, Nitzki F, Rosenberger A, Dullin C, Schraepler A, Reifenberger PD, Schweyer S, Pietsch T, Strutz F, Schulz-Schaeffer W, Hahn H (2011): Antitumoral effects of calcitriol in basal cell carcinomas involve inhibition of Hedgehog-signaling and induction of vitamin D receptor-signaling and differentiation. *Mol Cancer Ther.* 10, 2179-2188.

Teile dieser Arbeit wurden zum Druck eingereicht:

Uhmann A, Niemann H, Lammering B, Henkel C, Heß I, Rosenberger A, Dullin C, Schraepler A, Schulz-Schaeffer W, Hahn H: Calcitriol inhibits Hedgehog signaling and induces vitamin D receptor-signaling and differentiation in the *Patched* mouse model of embryonal rhabdomyosarcoma. Zum Zeitpunkt der Abgabe der Doktorarbeit bei Sarcoma in Revision.

---

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Bösartige Tumorerkrankungen und ihre Entstehung	1
1.2	Die Hedgehog/Patched (Hh)-Signalkaskade	2
1.3	Tumorentstehung durch <i>Ptch</i> -Mutationen sowie <i>Ptch</i> -knock-out-Maus-Modellsysteme für <i>Ptch</i> -assoziierte Tumore	4
1.3.1	Das <i>Ptch</i> <sup>neo67/+</sup> -knock-out-Maus-Modellsystem	5
1.3.2	Die konditionelle <i>Ptch</i> <sup>flox/flox</sup> -knock-out-Maus	6
1.4	Modelle zur Interaktion zwischen Ptch und Smo	7
1.5	Die Vitamin-D-Rezeptor (Vdr)-Signalkaskade	8
1.6	Die Vdr-Signalkaskade und Tumorentstehung	10
1.7	Interaktion zwischen den Hh- und Vdr-Signalwegen	11
1.8	Zielsetzung dieser Arbeit	13
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1	Statistische Auswertungsverfahren	16
2.2	Software	16
2.3	Datenbanken	17
2.4	Laborgeräte	17
2.5	Gebrauchswaren	18
2.6	Chemikalien und Reagenzien	20
2.7	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	21
2.8	Stammlösungen	21
2.9	Medien und Reagenzien für die Kultur eukaryotischer Zellen	23
2.10	Biologisches Material	24
2.10.1	Eukaryotische Zelllinien	24
2.10.2	Mauslinien	24
2.10.2.1	<i>Ptch</i> <sup>neo67/+</sup> -Mauslinie	24
2.10.2.2	<i>Ptch</i> <sup>flox/flox</sup> <i>Rosa26ERT2</i> <sup>+/-</sup> -Mauslinie	24
2.11	Synthetische DNA-Oligonukleotide	25
2.11.1	DNA-Oligonukleotide zur Genotypisierung von Mäusen	25
2.11.2	DNA-Oligonukleotide für die qRT-PCR	26
2.12	Antikörper	27
2.12.1	Primäre Antikörper	27
2.12.2	Sekundäre Antikörper	27
2.13	Sonden	28

---

2.14	Enzyme	28
2.15	Molekularbiologische Methoden	29
2.15.1	Isolierung von genomischer DNA (gDNA) aus Schwanzbiopsien zur Genotypisierung von Mäusen	29
2.15.2	Isolierung von Gesamt-RNA	29
2.15.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten eukaryotischen Zellen	29
2.15.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe	30
2.15.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
2.15.4	PCR	31
2.15.4.1	PCR an gDNA	31
2.15.4.2	Reverse Transkription	33
2.15.4.3	qRT-PCR an cDNA	33
2.15.4.3.1	Endogene Kontrolle	34
2.15.4.3.2	Ablauf der qRT-PCR	35
2.15.4.3.3	Auswertung nach der Standardkurvenmethode	37
2.15.5	Agarosegelelektrophorese	38
2.16	Zellbiologische Methoden	39
2.16.1	Kultivierung von Zellen	39
2.16.2	Anlegen von MB-Primärkulturen	39
2.16.3	Anlegen von <i>in-vitro</i> -Hautkulturen von <i>Mus musculus</i>	40
2.16.4	Behandlung von Zellen und Hautkulturen mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bzw. Cyclopamin (CP)	40
2.16.5	BrdU-Inkorporationsassay	41
2.17	Histologische und immunhistologische Methoden	42
2.17.1	Einbettung von Gewebe und Anfertigung von Gewebeschnitten	42
2.17.2	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung von Paraffinschnitten	42
2.17.3	Immunhistologische Färbungen (IHC) von Paraffinschnitten	42
2.17.4	<i>In-situ</i> -Hybridisierung (ISH) von Paraffinschnitten	43
2.17.4.1	Herstellung Digoxigenin-markierter <i>in-situ</i> -Sonden	43
2.17.4.2	Durchführung der ISH	45
2.18	Tierexperimentelle Methoden	47
2.18.1	Zucht und Haltung von <i>Mus musculus</i>	47
2.18.1.1	Schwanzbiopsie und Ohrlochcode	47
2.18.1.2	Genotypisierung	47
2.18.2	Injektionen und Blutabnahme zur Serumanalyse	47
2.18.2.1	Intraperitoneale Injektion von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	47
2.18.2.2	Intramuskuläre Injektion von Tamoxifen	48
2.18.2.3	Blutabnahmen aus dem retrobulbären Venenplexus und Gewinnung von Serum zur Bestimmung der Serum-Kalzium-Konzentration	48

	2.18.2.4	Perfusion von Mäusen mit PFA	48
	2.18.3	Sichtung von Tumoren und Präparation von Gewebe	49
	2.18.4	Bestimmung des Tumolvolumens mittels Volumencomputertomographie (VCT)	50
	2.18.5	Statistische Auswertung der $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ - Behandlungsstudien an RMS-tragenden Mäusen	50
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>		<b>51</b>
3.1	Expressionsanalysen und Proliferationsverhalten von Tumorzelllinien und Primärkulturen von Tumoren nach $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung		52
	3.1.1	Analysen von murinen RMS-Zelllinien	52
	3.1.2	Analysen von murinen MB-Zelllinien	55
	3.1.3	Analysen von MB-Primärkulturen aus <i>Ptch</i> <sup>neo67/+</sup> -Mäusen	57
	3.1.4	Analysen der BCC-Zelllinie ASZ001	58
	3.1.5	Analysen von murinen BCC-Hautkulturen	61
	3.1.5.1	Etablierung von <i>in-vitro</i> -Hautkulturen	61
	3.1.5.2	$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung von BCC- und Normalhautkulturen	61
3.2	<i>In-vivo</i> -Behandlung von RMS- oder BCC-tragenden Mäusen mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$		66
	3.2.1	Bestimmung der Dosierung von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an <i>Mus musculus</i>	66
	3.2.2	$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung von RMS-tragenden Mäusen	68
	3.2.3	$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung von BCC-tragenden Mäusen	73
	3.2.3.1	Makroskopische und histologische Analysen	74
	3.2.3.2	Expressions-, Proliferations- und Apoptoseanalysen mittels <i>in-situ</i> -Hybridisierungen und immunhistologischer Antikörperfärbungen	76
	3.2.3.3	Expressionsanalysen mittels qRT-PCR	79
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>		<b>82</b>
4.1	Analysen zur Wirkung von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf RMS, MB und BCC <i>in vitro</i>		83
4.2	Behandlung von RMS- oder BCC-tragenden Mäusen mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$		87
	4.2.1	Dosisfindungsstudie für $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an <i>Mus musculus</i>	87
	4.2.2	Behandlung von RMS-tragenden Mäusen mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	89
	4.2.3	Behandlung von BCC-tragenden Mäusen mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	92
4.3	Ausblick		94

<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>8.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>102</b>
<b>9.</b>	<b>Formelverzeichnis</b>	<b>102</b>
<b>10.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>103</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Bösartige Tumorerkrankungen und ihre Entstehung

Nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind bösartige Tumorerkrankungen die zweithäufigste Todesursache in der westlichen Welt. Heutzutage ist man der Ansicht, dass es sich bei Krebs um eine Erkrankung der DNA handelt. Dies resultiert aus der Erkenntnis, dass es in der Krebszelle zu einer Akkumulation von Genveränderungen kommt, welche zu einem Verlust des physiologischen Proliferationsgleichgewichts bzw. zu einer Störung des Verhältnisses von Zellneubildung und Zelltod führt.

Die klassischen Mechanismen, die zu Malignom-induzierenden Genveränderungen führen, sind Mutation, Amplifikation oder Translokation von Genen bzw. Genomabschnitten. Gene, die solche „genetischen Unfälle“ erleiden und somit über eine Störung ihrer Funktion zum malignen Geschehen beitragen, sind Teil spezifischer zellulärer Signalwege, von denen heute einige als Schlüsselwege für die maligne Transformation identifiziert wurden. Zu diesen Genen gehören u.a. Protoonkogene, Tumorsuppressorgene und „DNA-Damage-Response“-Gene. Protoonkogene sind von herausragender Bedeutung für das normale Zellwachstum. Sie kodieren Proteine mit der Funktion von stimulierenden Wachstumsfaktoren und deren zellulären Rezeptoren, welche wiederum die Expression von Genen steuern, die in das Zellwachstum eingreifen. Kommt es durch eine Mutation zu einer verstärkten Expression oder konstitutiven Aktivierung eines Protoonkogens, spricht man von Onkogenen. Dabei ist schon ein betroffenes Allel ausreichend, um entscheidend zur Tumorgenese beizutragen (Hanahan und Weinberg 2000). Tumorsuppressorgene übernehmen die Rolle der physiologischen Inhibition des Zellwachstums. Ein Verlust dieser Funktion aufgrund biallelischer Veränderungen (Zwei-Treffer-Theorie) (Knudson Jr 1971) stört das normale Proliferationsverhalten der Zelle. Die Gengruppe der „DNA-Damage-Response“-Gene repräsentieren letztendlich ebenfalls Tumorsuppressorgene, welche in der Lage sind, DNA-Schäden zu reparieren.

Auch das *Patched1* (*Ptch*)-Gen wurde als ein Tumorsuppressorgen klassifiziert. Bereits 1996 zeigten Hahn *et al.*, dass Keimbahnmutationen von *Ptch* zur Entwicklung von Basalzellkarzinomen (= Basaliom; aus dem Englischen: Basal Cell Carcinoma, BCC) prädisponieren. Entsprechend der von Knudson postulierten Zwei-



---

Treffer-Theorie, sollten daher BCC durch Ausfall beider *Ptch*-Allele entstehen. Tatsächlich zeigen auch sporadische BCC teilweise biallelische *Ptch*-Mutationen (Gailani *et al.* 1996; Hahn *et al.* 1996). Neben der Entstehung von BCC spielt *Ptch* auch eine entscheidende Rolle in der Genese von Rhabdomyosarkomen (RMS) (Bridge *et al.* 2000; Tostar *et al.* 2006) und Medulloblastomen (MB) (Unden *et al.* 1996). Diese Tumore treten relativ häufig im Kindes- und Jugendalter auf (Fletcher, 1995; Dagher und Helman 1999; Scotting *et al.* 2000).

## 1.2 Die Hedgehog/Patched (Hh)-Signalkaskade

Bereits 1980 beschrieben Nusslein-Volhard und Wieschaus die Gene *Hedgehog* (*Hh*) und *Patched* (*Ptch*) in *Drosophila melanogaster* (Nusslein-Volhard und Wieschaus 1980). In Vertebraten wurden drei *Hh*-Homologe identifiziert. Zu diesen gehören *Desert hedgehog* (*Dhh*), *Indian Hedgehog* (*Ihh*) und *Sonic hedgehog* (*Shh*) (Echelard *et al.* 1993). Des Weiteren wurden drei homologe Gene zum *D. melanogaster Ptch* gefunden: *Ptch*, *Patched 2* (*Ptch2*) und *Translocation in renal carcinoma on chromosome 8* (*Trc8*) (Smyth *et al.* 1999; Frohlich *et al.* 2002). *Shh* und *Ptch* sind die wichtigsten Homologe im Vertebraten und am besten charakterisiert. Marigo *et al.* sowie Stone *et al.* belegten 1996, dass *Ptch* der Rezeptor für den Liganden *Shh* ist und beide somit in einen gemeinsamen Signalweg involviert sind (Marigo *et al.* 1996a; Stone *et al.* 1996).

Dieser Signalweg, der Hh-Signalweg, spielt eine bedeutende Rolle bei der Embryonalentwicklung verschiedener Gewebe und Organe, da er das Überleben, die Proliferation und Differenzierung von Zellen sowie die Musterbildung reguliert (Hooper und Scott 2005). Dieser in Abbildung 1 dargestellte Signalweg ist zwischen Vertebraten und Invertebraten stark konserviert (Goodrich *et al.* 1997; Ruiz i Altaba 1999).

In der Signal sendenden Zelle wird *Shh* durch autokatalytische Spaltung des primären Hh-Proteins sowie die anschließende Modifizierung der aminoterminalen (N-terminalen) Domäne durch Cholesterol und Palmitoylierung der carboxyterminalen (C-terminalen) Region aktiviert (Porter *et al.* 1996; Pepinsky *et al.* 1998; Chamoun *et al.* 2001). Die Freisetzung dieses aktiven Liganden in den extrazellulären Raum wird durch das Membranprotein Dispatched (*Disp*) bewirkt (Burke *et al.* 1999). *Shh* wirkt somit autokrin und parakrin auf das Gewebe.

---

Der Hh-Rezeptor Ptch besteht aus 12 hydrophoben membranständigen Domänen, intrazellulären C- und N-terminalen Regionen und zwei großen extrazellulären Schleifen, die die Shh Ligandenbindung vermitteln (Hooper und Scott 1989; Marigo *et al.* 1996b). Außerdem besitzt das Ptch-Protein eine für seine Aktivität essentielle „sterol sensing domain“ (SSD), die die Region zwischen der zweiten und sechsten transmembranen Domäne umfasst (Kuwabara und Labouesse 2002).

Ohne die Bindung von Shh blockiert Ptch die Aktivität des 7-Transmembranproteins Smoothened (Smo) und dadurch die gesamte Hh-Signalkaskade. Diese Hemmung bewirkt, dass die Transkriptionsfaktoren der Gli (gliom-associated oncogene homolog)-Familie über eine Reihe zytoplasmatischer Proteine (z.B. Costal 2; Fused; Suppressor of fused) im Zytoplasma gebunden bleiben und keine transkriptionelle Funktion ausüben können (Robbins *et al.* 1997; Ruiz i Altaba 1997; Monnier *et al.* 1998; Wang *et al.* 2000; Ingham und McMahon 2001; Mullor *et al.* 2002; Nybakken und Perrimon 2002).

Durch die Bindung von Hh an Ptch wird die hemmende Wirkung von Ptch auf Smo aufgehoben. Die Gli-Proteine werden im Zytoplasma freigesetzt und in den Nukleus transportiert. Die Familie der Gli-Proteine umfasst die drei Transkriptionsfaktoren Gli1, Gli2, und Gli3. Diese Proteine sind durch stark konservierte C2H2-Zinkfingerdomänen gekennzeichnet (Ruppert *et al.* 1988; Pavletich und Pabo, 1993). Bei Säugern fungieren Gli1 und Gli2 als hauptsächliche Aktivatoren der Hh-Signalkaskade. Gli3 hingegen übt eine repressorische Aktivität auf die Kaskade aus, die durch das Hh-Signal aufgehoben wird. Das Hh-Signal aktiviert die Transkription von *Gli1*, die von funktionellen Gli2- und Gli3-Proteinen abhängig ist (Kasper *et al.* 2006). Da Gli-Proteine wiederum die *Ptch*-Transkription durch autoregulatorische Rückkopplung stimulieren, gehört neben *Gli1* auch *Ptch*, dessen Expression somit im Rahmen einer negativen Rückkopplung reguliert wird, zu den heute bekannten Zielgenen der aktivierten Hh-Signalkaskade (Robbins *et al.* 1997; Ruiz i Altaba 1997; Monnier *et al.* 1998; Wang *et al.*, 2000; Ingham und McMahon 2001; Mullor *et al.* 2002; Nybakken und Perrimon 2002; Bai *et al.* 2002; Bai *et al.* 2004; Katoh Y und Katoh M, 2006).

Ptch und Gli1 sind daher zuverlässige Marker einer aktiven Hh-Signalkaskade.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des inaktiven und des physiologisch aktivierten sowie des pathologisch aktivierten Hh-Signalweges. Gezeigt ist der inaktive (links) und durch die Bindung des Liganden Hh physiologisch aktivierte Hh-Signalweg (Mitte) einer normalen Zelle im Vergleich zu einer Zelle mit einem pathologisch aktivierten Signalweg (rechts). Der inaktive Zustand der Signalkaskade beruht auf der Inhibition der Aktivität von Smo durch Ptch. Ausgelöst durch die Bindung des Liganden Hh an Ptch vermittelt Smo die Translokation von Gli-Transkriptionsfaktoren in den Nucleus. Dort wird die Transkription von Zielgenen, darunter *Ptch* und *Gli1*, ausgelöst. Die pathologische Aktivierung des Signalweges kann z.B. durch eine *Ptch*-inaktivierende Mutation (roter Stern) verursacht werden und führt zu einer unregulierten Überexpression der Gli-Zielgene.

Der Hh-Signalweg ist in die Regulation des Zellzyklus involviert. Dies wird zum einen über die Aktivierung der Expression von *Cyclin D1* und *D2* durch Gli1 (Duman-Scheel *et al.* 2002; Mill *et al.* 2003), und zum anderen über direkte Interaktion von Ptch mit Cyclin B1 bewirkt (Barnes *et al.* 2001). Außerdem beeinflusst die Hh-regulierte p21-vermittelte Hemmung des Zellzyklusarrests direkt die Aktivität von Cyclinen (Fan und Khavari 1999).

Diese Erkenntnisse zeigen, dass die Hh-Signalkaskade eine essentielle Funktion in der Regulation des Zellzyklus besitzt. Eine Deregulation der Kaskade, z.B. durch *Ptch*-Mutationen, führt daher zu Veränderungen des Proliferationsverhaltens von Zellen.

### 1.3 Tumorentstehung durch *Ptch*-Mutationen sowie *Ptch*-knock-out-Maus-Modellsysteme für *Ptch*-assoziierte Tumore

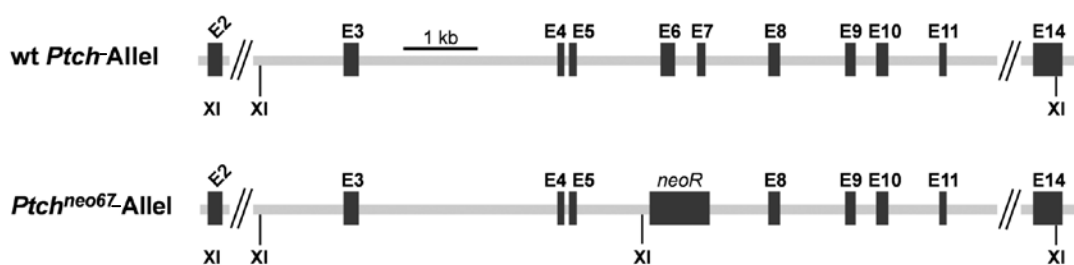
Eine pathologische Aktivierung der Hh-Signalkaskade kann durch mutationsbedingte Inaktivierung von Ptch oder aber durch Aktivierung von Hh oder Smo entstehen (Abb.1 rechts) (Roberts *et al.* 1989; Lam *et al.* 1999). Dies führt zu einer verstärkten Expression der *Gli*-Zielgene und zur Entstehung von Tumoren.

1996 wurden angeborene heterozygote *Ptch*-Mutationen als Ursache für das autosomal-dominant vererbte Gorlin-Goltz-Syndrom identifiziert (Hahn *et al.* 1996; Johnson *et al.* 1996). Patienten mit dieser Erkrankung weisen neben Entwicklungsstörungen auch eine erhöhte Prädisposition für Tumore wie BCC, MB und RMS auf (Gorlin 1987). Die Symptomatik der Gorlin-Goltz-Patienten spiegelt hierbei die duale Funktion der Signalkaskade während der Embryogenese und im adulten Organismus sehr deutlich wider. Da auch in sporadischen BCC, RMS und MB des Menschen teilweise biallelische *Ptch*-Mutationen nachgewiesen werden konnten, wird das *Ptch*-Gen der Gruppe der Tumorsuppressorgene zugeordnet (Gailani *et al.* 1996; Hahn *et al.* 1996; Unden *et al.* 1996; Bridge *et al.* 2000; Tostar *et al.* 2006).

In dieser Arbeit wurden zwei Mausmodelle verwendet, bei denen *Ptch* durch homologe Rekombination mutiert bzw. ausgeschaltet wurde. Hierbei handelte es sich um das *Ptch*<sup>neo67/+</sup>- und *Ptch*<sup>flox/flox</sup>-Maus-Modell.

### 1.3.1 Das *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-knock-out-Maus-Modellsystem

Um die *Ptch*-knock-out-Mauslinie *Ptch*<sup>neo67/+</sup> zu generieren, wurden die Exone 6 und 7 von *Ptch* gegen eine Neomycin-Resistenzkassette ausgetauscht. Dieser Austausch bewirkt nach Translation des *Ptch*<sup>neo67</sup>-Allels den Verlust von Teilen der wichtigen SSD (siehe Kapitel 1.2) im *Ptch*-Protein und führt damit zum Verlust der Funktionalität des *Ptch*-Proteins. Abbildung 2 zeigt die schematische Darstellung des genomischen *Ptch*<sup>neo67</sup>-Lokus im Vergleich zum Wildtyp (wt) *Ptch*-Lokus in *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen (Hahn *et al.* 1998).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des *Ptch*<sup>neo67</sup>-Lokus.** Dargestellt sind das wt *Ptch*- und das mutante *Ptch*<sup>neo67</sup>-Allel von *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen. Anstelle der Exone 6 und 7 enthält das *Ptch*<sup>neo67</sup>-Allel eine Neomycin-Resistenzkassette (*neoR*) (aus Hahn *et al.* 1998). Abkürzungen: E, Exon; XI, *XhoI*

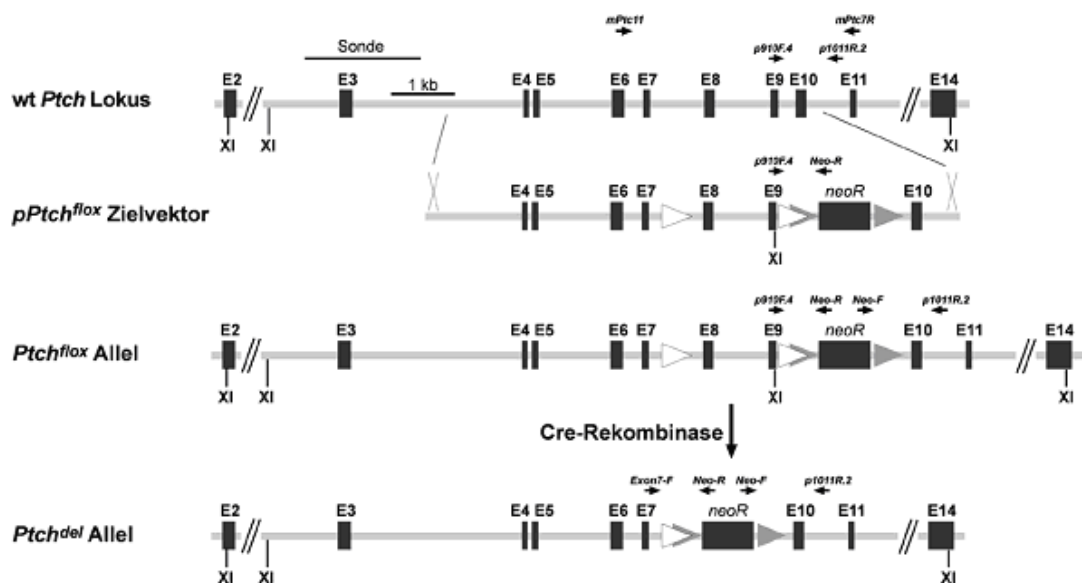
---

Homozygot mutante  $Ptch^{neo67/neo67}$ -Embryonen sterben aufgrund von Neuralrohr- und Herzdefekten schon zwischen dem Tag 9,5 und 10 während der Embryonalentwicklung (Hahn *et al.* 1998). Heterozygote  $Ptch^{neo67/+}$ -Mäuse zeigen ähnliche Symptome, wie Patienten mit Gorlin-Goltz-Syndrom. So zeigen diese Tiere neben Entwicklungsdefekten eine hohe Inzidenz für MB und RMS. Durch Röntgenbestrahlung kann in diesen Mäusen auch die Entstehung von BCC hervorgerufen werden (Mancuso *et al.* 2004).

### 1.3.2 Die konditionelle $Ptch^{flox/flox}$ -knock-out-Maus

Der Vorteil des konditionellen  $Ptch^{flox/flox}$ -knock-out gegenüber den konventionellen  $Ptch^{neo67/+}$ -Mäusen ist die Möglichkeit zur Induktion einer mono- oder biallelischen  $Ptch$ -Mutation zu einem gewünschten Zeitpunkt und/oder an einer gewünschten Lokalisation.

In Abbildung 3 sind das wt  $Ptch$ -Allel, der für die Generierung der Mauslinie  $Ptch^{flox}$  verwendete Zielvektor ( $pPtch^{flox}$ ) sowie das  $Ptch^{flox}$ - und das  $Ptch^{del}$ -Allel dargestellt. Der  $Ptch^{flox}$ -Lokus ist durch zwei  $loxP$ -Konsensussequenzen in Intron 7 und Intron 9 charakterisiert, die eine Cre-Rekombinase-vermittelte Deletion der Exone 8 und 9 des  $Ptch$ -Gens ermöglichen. Die resultierende Leserasterverschiebung führt zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation der  $Ptch^{del}$ -mRNA. Die im Intron 9 liegende Neomycin-Resistenzkassette ist durch  $frt$ -Konsensussequenzen flankiert, die eine Deletion der Resistenzkassette mit Hilfe einer speziellen Rekombinase (FLPase) ermöglichen, falls die Resistenzkassette die korrekte Transkription des  $Ptch^{flox}$ -Allels stören sollte (Uhmann *et al.* 2007).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Strategie zur Herstellung einer konditionalen *Ptch*-Deletion.** Dargestellt sind die wt *Ptch*-, *Ptch<sup>flox</sup>*- und *Ptch<sup>del</sup>*-Allele sowie der für die homologe Rekombination verwendete *pPtch<sup>flox</sup>*-Zielvektor. Das *Ptch<sup>flox</sup>*-Allel verfügt in den Introns 7 und 9 über je eine *loxP*-Sequenz und im Intron 9 über eine *frt*-Sequenz-flankierte Neomycin-Resistenzkassette (*neoR*). Durch die Cre-Rekombinase-vermittelte Rekombination der *loxP*-Sequenzen erfolgt eine Deletion der Exone 8 und 9 (*Ptch<sup>del</sup>*-Allel). Für Genotypisierungen und RealTime-PCR-Analysen benutzte Oligonukleotide (Pfeile) und die Lokalisation der für Southern-Blot-Analysen verwendeten Sonde sind eingezeichnet. Abkürzungen: E, Exon; XI, *XhoI* (aus Uhmann *et al.* 2007, Seite 1816).

### 1.4 Modelle zur Interaktion zwischen Ptch und Smo

Zurzeit werden zwei Modelle der Ptch-Smo-Interaktion diskutiert (Rohatgi und Scott 2007). Die einfachste Erklärung für die Hemmung von Smo durch Ptch ist ein „stöchiometrisches“ Modell. Dieses Modell beruht auf der Hypothese, dass Ptch direkt an Smo bindet und die inaktive Form von Smo stabilisiert. Diese Vorstellung ist jedoch widersprüchlich zu den Beobachtungen, dass ein Ptch-Molekül mehrere Smo-Proteine inaktivieren kann (Taipale *et al.* 2002). Das zweite Modell wird als „katalytisches“ Modell bezeichnet (Taipale *et al.* 2002). Die Aminosäuresequenz des Ptch-Proteins zeigt Ähnlichkeiten mit den bakteriellen Resistance-Nodulation-Division (RND)-Pumpen, die kleine Moleküle transportieren (Davies *et al.* 2000). Die Verbindung zum RND stärkt die Auffassung, dass Ptch die Funktion einer Pumpe übernimmt und durch Sekretion eines Botenstoffes Smo hemmt (Taipale *et al.* 2002). Bijlsma *et al.* zeigten kürzlich durch Zellkulturexperimente, dass das membranständige Ptch-Protein in der Lage ist, ein Oxysterolmolekül mit Smo-inhibitorischer Funktion in den interzellulären Raum zu transportieren; bei diesem

Oxysterol handelt es sich eventuell um ein Vitamin-D<sub>3</sub>-Derivat (Bijlsma *et al.* 2006). Die Arbeitsgruppe (AG) Hahn untermauerte diese Annahmen durch Mediumtransferexperimente in Zellkulturexperimenten. Durch den Mediumtransfer von wt *Ptch*-Zelllinien wurde eine Hemmung von Smo und damit der Hh-Signalkaskade in *Ptch*-defizienten Zellen (*Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen) hervorgerufen. Dagegen bewirkte das Medium von *Ptch*<sup>-/-</sup>-Zellen keine Inhibition des Hh-Signalweges auf *Ptch*<sup>-/-</sup>-Zellen (Uhmann *et al.* zum Zeitpunkt der Abgabe der Doktorarbeit bei J Invest Dermatol in Revision).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass in Folge einer mutationsbedingten Inaktivierung des *Ptch*-Gens die postulierte Pumpfunktion von Ptch gestört sein könnte. Hierdurch würde kein Oxysterol mehr in den interzellulären Raum transportiert werden und Smo folglich nicht mehr effizient gehemmt werden. Diese pathologische Aktivierung der Hh-Signalkaskade begünstigt, wie oben beschrieben, wiederum die Tumorentstehung.

### 1.5 Die Vitamin-D-Rezeptor (Vdr)-Signalkaskade

Zu den Oxysterolen gehört Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>). Vitamin D<sub>3</sub> ist das physiologisch im Menschen vorkommende Vitamin D. In der Haut wird die Synthese von Vitamin D<sub>3</sub> aus 7-Dehydrocholesterol durch UVB-Licht induziert. Vitamin D<sub>3</sub> kann aber auch direkt im Darm aus der Nahrung ins Blut aufgenommen werden und gelangt danach gebunden an das Vitamin-D-bindende Protein (DBP) in die Leber. In der Leber wird es von den Cytochromen P450 27a1 (Cyp27a1, 25-Hydroxylase) in den Mitochondrienmembranen und den Cytochromen P450 2r1 (Cyp2r1, 25-Hydroxylase) in den Mikrosomen zu Calcidiol (25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>; 25(OH)D<sub>3</sub>) hydroxyliert (Cheng JB *et al.* 2003).

Dieses wird in DBP-gebundener Form wieder in das Blut abgegeben und gelangt so zu seinen Zielgeweben, wie zum Beispiel zu den Nieren, wo es dann durch die mitochondriale 1 $\alpha$ -Hydroxylase (Cyp27b1) zum biologisch aktiven Metaboliten Calcitriol (1-alpha,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>; 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) aktiviert wird (Jones *et al.* 1998). Auch in anderen Geweben, wie der Haut, Prostata oder Brust, wurde Cyp27b1 nachgewiesen. Daraus lässt sich schließen, dass 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auch lokal in Geweben synthetisiert werden kann (Hollis 2005; Schwartz 2005). 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>

wirkt negativ regulatorisch auf die Expression und die Aktivität des Cyp27b1 und hemmt somit seine eigene Synthese (Lechner *et al.* 2007).

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ist ein Steroidderivat, das seine Wirkung über den nukleären Vitamin-D-Rezeptor (Vdr) entfaltet, welcher in nahezu allen Organen exprimiert wird (Darm, Knochen, Niere, Haut, Dickdarm, Brust, Herz, Skelettmuskel, Gehirn, Monozyten, aktivierten B- und T-Zellen) (Stumpf *et al.* 1979).  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  bindet in den Zellen der Zielorgane an den intrazellulären Vdr. Im Zellkern dimerisiert dieser Komplex mit dem Retinoid-X-Rezeptor- $\alpha$  (RXR $\alpha$ ). Als Heterodimer bindet der  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /Vdr-RXR $\alpha$ -Komplex an die DNA. Die entsprechende Konsensussequenz wird „*vitamin D response element*“ (VDRE) genannt. Die Assoziation des Heterodimers an das VDRE bewirkt eine Stimulation der Transkription der Vdr-Zielgene und reguliert somit deren Expression (DeLuca 2004). Intrazellulär wird  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  durch die 25-HydroxyvitaminD<sub>3</sub>-24-Hydroxylase (25(OH)D<sub>3</sub>-24-Hydroxylase; Cyp24a1) zu einem 24-hydroxylierten Metaboliten abgebaut (Makin *et al.* 1989; Lohnes und Jones 1992). Die Expression der Cyp24a1 wird positiv über die VDRE-Sequenz gesteuert (Lechner *et al.* 2007). Daher wird die Aktivität des Vdr-Signalweges im Rahmen eines negativen Rückkoppelungsmechanismus gehemmt.

Neben der Beeinflussung des Kalzium- und Phosphathaushalts sowie der Mineralisierung von Knochen reguliert die Vdr-Signalkaskade die Proliferation, die Apoptoserate und die Differenzierung von Zellen. Eine Hemmung der Proliferation wird hierbei über die Vdr-Zielgene  $p21^{\text{WAF1}}$  und  $p27^{\text{kip1}}$  vermittelt, welches Zellzyklusinhibitoren sind (Lin *et al.* 2003; Yang und Burnstein 2003; Li P *et al.* 2004; Cheng HT *et al.* 2006). Weiterhin werden das antiapoptotische Protein Bcl2 und das proapoptotische Protein Bax über den Vdr-Signalweg reguliert. Die Konzentration von Bax-Proteinen in  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten Zellen steigt, während die Konzentration von Bcl2 fällt, was folglich zum programmierten Zelltod (Apoptose) führt (Wagner *et al.* 2003). Eine Aktivierung des Vdr-Signalwegs kann auch die Differenzierung von Zellen hervorrufen (Miller 1999; Zhao und Feldman 2001). Auch die Expression des Tumorsuppressorgens *E-cadherin* (Campbell *et al.* 1997) wird durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  erhöht. Weiterhin wird durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die Angiogenese inhibiert (Majewski *et al.* 1996).



## 1.6 Die Vdr-Signalkaskade und Tumorentstehung

Da die Vdr-Signalkaskade für die Homöostase des Kalzium- und Phosphathaushaltes unerlässlich ist (Holick *et al.* 1973), ist es nicht verwunderlich, dass eine Vdr-Defizienz zu Erkrankungen wie Rachitis und Osteomalazie, welche die Störung der Knochenmineralisierung widerspiegeln, führt (Li YC *et al.* 1997; Shimada *et al.* 2005). Interessanterweise ist die Vdr-Signalkaskade auch in die Tumorgenese involviert. So sensibilisiert eine Vdr-Defizienz in *Vdr*<sup>-/-</sup>-knock-out-Mäusen zur chemisch-induzierten Tumorgenese (Zinser *et al.* 2002; Zinser *et al.* 2005).

Daneben werden durch Vitamin-D<sub>3</sub>-Derivate und somit durch Aktivierung der Vdr-Signalkaskade in Xenograft- und transgenen Tumortiermodellen die Angiogenese, Metastasierung und Progression von Tumoren inhibiert, (Colston *et al.* 1981; Oikawa *et al.* 1991; Skowronski *et al.* 1993; Feldman *et al.* 2000; Mantell *et al.* 2000; Holick 2004).

Eine antitumorale Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub> und seinen Derivaten sowie die Aktivierung der Vdr-Signalkaskade werden auch beim Menschen beobachtet. Schon 1941 berichtete Apperley (Apperley 1941), dass die Bevölkerung der Nordstaaten der USA ein höheres Risiko besaß, an Krebs zu versterben, als die Bevölkerung der Südstaaten. Aber erst in den 1980ern wurde diese Beobachtung von Garland *et al.* aufgenommen. Durch ihre Studien zeigten sie im Speziellen, dass sich sowohl das Risiko an Dickdarm- als auch an Brustkrebs zu erkranken invers zum 25(OH)D<sub>3</sub> Serumspiegel verhält (Garland C *et al.* 1985; Garland CF *et al.* 1989; Garland FC *et al.* 1990). Des Weiteren zeigten Albertson *et al.*, dass eine Genamplifikation von *Cyp24a1* (siehe Kapitel 1.5), die folglich zu einem beschleunigten Abbau von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> führt, mit Tumorentwicklung und -progression korreliert (Albertson *et al.* 2000). Umgekehrt zeigte Chen kürzlich an kultivierten Prostatakrebszellen, dass der Ausfall von *Cyp27b1*, der eine verringerte 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Synthese bedingt, die Zellproliferation, Metastasierung und Invasivität beschleunigt. Es handelt sich daher bei *Cyp27b1* um ein Tumorsuppressorgen (Chen 2008).

Einen weiteren Hinweis auf den Zusammenhang von Vitamin D<sub>3</sub>, Vdr und Tumorgenese erbrachten Shabahang *et al.*; sie zeigten, dass das *Vdr*-Gen in Tumorzellen häufig überexprimiert ist, welche auf die Behandlung mit 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> mit verminderter Proliferation reagieren (Shabahang *et al.* 1996). Zudem führt eine durch 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> aktivierte Vdr-Signalkaskade zur

Differenzierung von humanen Tumorzellen (Tanaka *et al.* 1982; Munke *et al.* 1996; Prudencio *et al.* 2001; Akutsu *et al.* 2001).

Seit Jahren wird die Wirkung von Vitamin-D<sub>3</sub>-Derivaten in klinischen Studien am Patienten untersucht. Hansen *et al.* zeigten in ihrer klinischen Studie, dass EB 1089 (Seocalcitol), einem 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Derivat, zur kompletten Remission von hepatozellulären Karzinomen führt (Hansen *et al.* 2000). Außerdem wurde in einer doppelblinden, randomisierten Prostatakrebstudie von Beer *et al.* gezeigt, dass durch eine Kombinationstherapie von Docetaxel (Mitosehemmer) und hoch dosiertem 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> eine verlängerte Überlebenszeit erreicht wird (Beer *et al.* 2007).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Stimulation des Vdr-Signalweges durch Vitamin-D<sub>3</sub>-Derivate eine tumorsuppressorische Wirkung auf eine Vielzahl von murinen und humanen Tumoren ausübt.

## 1.7 Interaktion zwischen den Hh- und Vdr-Signalwegen

Wie in Kapitel 1.4 bereits beschrieben, handelt es sich bei Ptch um eine Oxysterolpumpe (Bijlsma *et al.* 2006), welche höchstwahrscheinlich Vitamin-D<sub>3</sub>-Derivate in den Extrazellulärraum pumpt. Es ist möglich, dass durch Ptch nicht nur der potente Smo-Inhibitor Vitamin D<sub>3</sub> gepumpt wird (Bijlsma *et al.* 2006), sondern auch 25-Hydroxycholesterol, welches als Stimulator (Corcoran und Scott 2006) der Hh-Signalkaskade identifiziert wurde. Durch Mutationen im *Ptch*-Gen kann es zum Verlust der aktiven Exportfunktion von Oxysterolen kommen. Die Aktivität von Smo wird somit nicht mehr moduliert.

Durch die fehlende Pumpfunktion von Ptch, z.B. durch Mutationen oder in *Ptch*-defizienten Mäusen, kann man vermuten, dass Vitamin D<sub>3</sub> und seine Derivate intrazellulär akkumulieren. Da das Schlüsselenzym der Cholesterol- und Oxysterolsynthese, die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), jedoch durch Feedbackinhibition reguliert wird, sollte eine erhöhte Oxysterolkonzentration zur verminderten Aktivität der HMG-CoA-Reduktase und somit zur sinkenden Cholesterolkonzentration führen. Des Weiteren wird die Expression und Aktivität der 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-synthetisierenden Enzyme Cyp27a1 und Cyp27b1 negativ, und diejenigen der 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-abbauenden Enzyme wie

---

Cyp24a1 positiv durch die erhöhte intrazelluläre  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration reguliert (siehe auch Kapitel 1.6).

Darüber hinaus lässt sich ein weiterer Zusammenhang zwischen dem Vdr- und dem Hh-Signalweg durch die Betrachtung von BCC verdeutlichen. In Kapitel 1.3 wurde bereits der Zusammenhang zwischen der Tumorgenese von BCC und der Hh-Signalkaskade geschildert. Interessanterweise zeigen die meisten BCC eine erhöhte Vdr-Expression (Mitschele *et al.* 2004). Majewski *et al.* zeigten, dass eine Kombinationstherapie von Vitamin-D<sub>3</sub>-Derivaten und Retinoiden einen antiproliferativen Effekt auf BCC ausübt (Majewski *et al.* 1994). Da viele BCC durch Mutationen in *Ptch* zustande kommen, kann man daher vermuten, dass in diesen Tumoren der aktive Transport von Vitamin-D<sub>3</sub>-Derivaten aufgrund von mutantern *Ptch* nicht mehr möglich ist. Dies könnte einerseits zur fehlenden Blockade von Smo führen, und andererseits den verstärkten Abbau von intrazellulären Vitamin-D<sub>3</sub>-Derivaten durch erhöhte *Cyp24a1*-Expression (siehe Kapitel 1.5) bewirken. Durch die sinkende intrazelluläre Vitamin-D<sub>3</sub>-Konzentration sollte der Vdr-Signalweg in diesen Tumoren weniger aktiv sein und eine verstärkte Proliferation der Tumorzellen bedingen.

Tatsächlich lassen Vorarbeiten von Uhmann (AG Hahn) an *Ptch*-assoziierten RMS von mutanten *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen vermuten, dass die intrazelluläre  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration der Tumorzellen sehr niedrig und die Vdr-Signalkaskade trotz der Überexpression des Vdr-Gens nicht aktiv ist. Hierzu hat Uhmann den Aktivitätsstatus der  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Vdr-Achse durch die Expression von *Myogenin* und *p27<sup>kip1</sup>* bestimmt. Während die *Myogenin*-Expression durch die Vdr-Aktivierung gehemmt wird (Endo *et al.* 2003), wird *p27<sup>kip1</sup>* dagegen verstärkt transkribiert (Lin *et al.* 2003; Cheng HT *et al.* 2006; Yang und Burnstein 2003; Li P *et al.* 2004). Abbildung 4 zeigt die quantitative Expressionsanalyse dieser beiden Gene: *Myogenin* wird in RMS stärker und *p27<sup>kip1</sup>* schwächer als im normalen Skelettmuskel (SM) exprimiert. Dies bedeutet, dass die Vdr-Signalkaskade im *Ptch*-assoziierten RMS weniger aktiv ist als im SM.

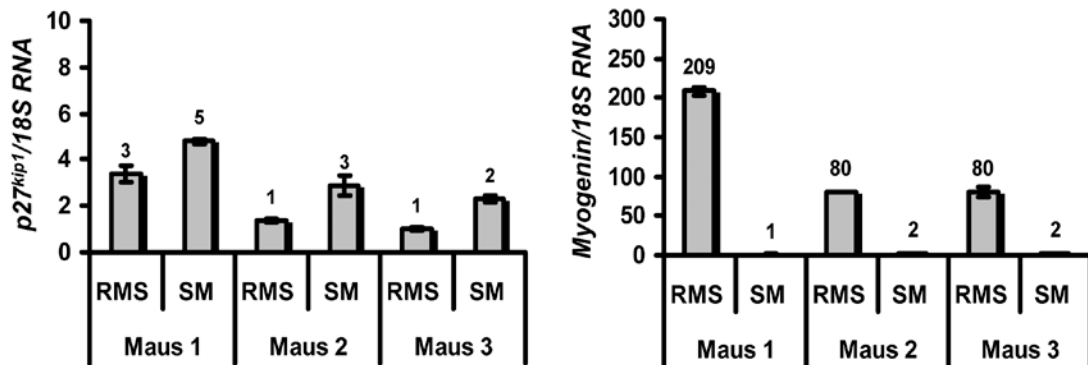


Abbildung 4: Relative Quantifizierung der Expressionslevel der Vdr-Zielgene *p27<sup>kip1</sup>* und *Myogenin* zur Bestimmung der Aktivität des Vdr-Signalweges in RMS und SM. Die gemessenen Werte wurden auf die endogene Expression der 18S RNA normalisiert.

Eine Expressionsanalyse von *Gli1*, *Cyp27b1* und *Cyp24a1* zeigte, dass die Expression von *Gli1* (und damit die Aktivität des Hh-Signalweges) und *Cyp27b1* durch die  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung gehemmt, und die Transkription von *Cyp24a1* gesteigert werden kann. Diese Daten lassen daher stark vermuten, dass die Tumorentstehung aus *Ptch*-defizienten Zellen auf dem Verlust der Vitamin-D<sub>3</sub>-Transportfunktion beruht.

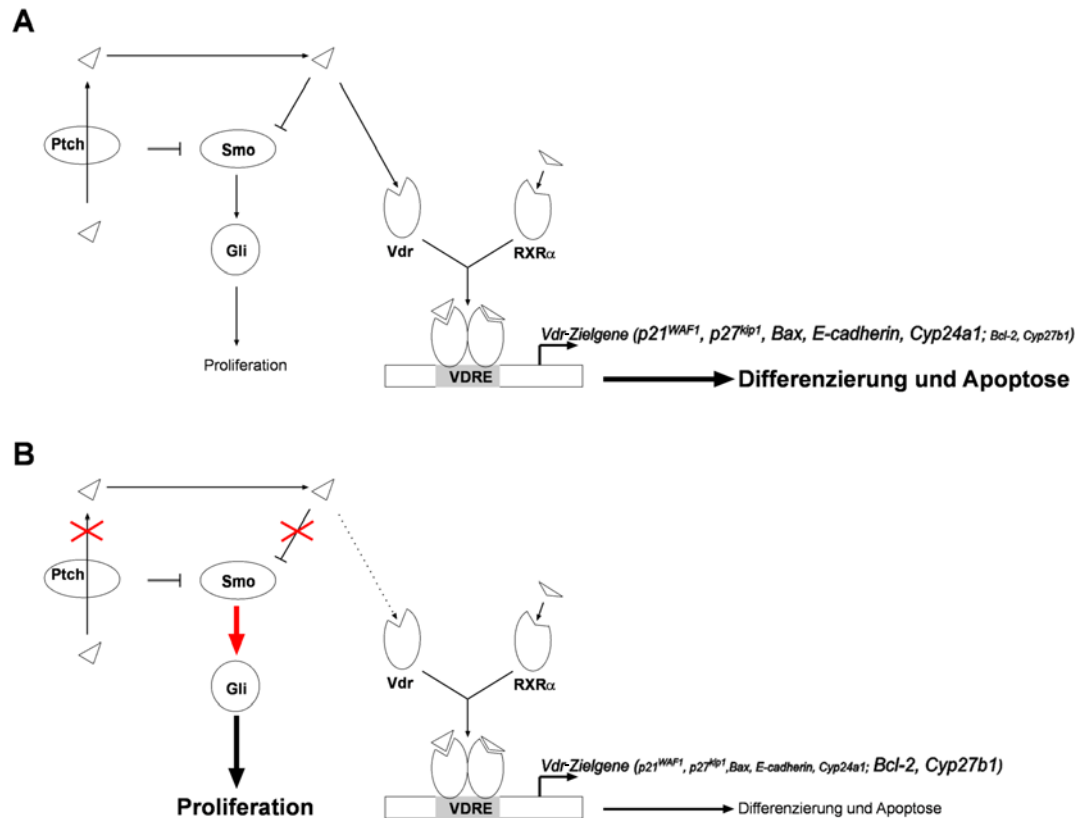
## 1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Hypothese, die dieser Arbeit zugrunde liegt, sei an dieser Stelle nochmals zusammengefasst (Abbildung 5):

Das *Ptch*-Protein transportiert normalerweise  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in den Extrazellulärraum, das in auto- und parakriner Art und Weise den Smo-Rezeptor blockiert. Dadurch wird die Hh-Signalkaskade gehemmt.

Durch eine Mutation in *Ptch* kommt es zum Verlust der Transportfunktion des Proteins. Hierdurch kann  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  nicht mehr in den Extrazellulärraum transportiert werden und Smo kann nicht mehr gehemmt werden. Die Hh-Signalkaskade ist aktiv.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sammelt sich durch den verminderten extrazellulären Transport intrazellulär an. Hierdurch wird *Cyp27b1* vermindert und *Cyp24a1* vermehrt exprimiert, was wiederum eine verminderte Synthese und einen vermehrten Abbau von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zur Folge hat. Die verminderte Vdr-Signalwegsaktivität und die vermehrte Aktivität der Hh-Signalkaskade führen dazu,

dass die Zellen anstatt in Richtung Differenzierung in Richtung Proliferation und Antiapoptose gelenkt werden. Hierdurch entstehen Tumore, wie MB, RMS und BCC.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der möglichen Verknüpfung zwischen der Vdr- und der Hh-Signalkaskade.** Dargestellt ist die Situation in normalen Geweben (A). Der Transmembrantransporter Ptch exportiert aktiv ein  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Molekül (Dreieck) in den extrazellulären Raum. Durch Bindung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  an Smo wird der Hh-Signalweg inhibiert, wodurch die Gli-Transkriptionsfaktoren im Cytosol gebunden bleiben und die Proliferation gehemmt wird.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  führt weiterhin dazu, dass der Vdr aktiviert wird. Die Vdr-Zielgene  $p21^{\text{WAF1}}$ ,  $p27^{\text{kip1}}$ , *Bax*, *E-cadherin* und *Cyp24a1* werden vermehrt exprimiert, während *Bcl-2* und *Cyp27b1* weniger transkribiert werden, so dass es zur Differenzierung bzw. Apoptose des Gewebes kommt. Daneben ist die postulierte Situation in *Ptch*-assoziierten Tumoren dargestellt (B). Das  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wird nicht mehr effizient in den extrazellulären Raum abgegeben und kann somit Smo nicht mehr inhibieren. Dies führt zur verstärkten Aktivierung der Gli-Transkriptionsfaktoren und zur Proliferation. Durch den defekten Export von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sammelt sich nun dieses intrazellulär an und führt durch eine negative Rückkopplung zu seinem eigenen Abbau durch das Enzym Cyp24a1. Dadurch sinkt die  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration ab und der Vdr wird weniger aktiviert. Als Folge der Aktivierung der Hh-Signalkaskade und des inaktiven Vdr werden proliferative Prozesse stimuliert und Differenzierungsprozesse blockiert, was zur Tumorentstehung führt.

In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob *Ptch*-assoziierte Tumore sensitiv gegenüber einer Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  reagieren. Hierzu habe ich zunächst

die Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf die Proliferation und Differenzierung von *Ptch*-defizienten RMS-, BCC- und MB-Tumorzelllinien sowie primären MB-Zellkulturen untersucht (siehe Kapitel 3.1). Hierzu wurden 5-Bromo-2-Deoxyuridin-Inkorporationsassays (BrdU-Assay, siehe Kapitel 2.16.5) und quantitative *real-time*-Polymerase-Kettenreaktion (aus dem Englischen: „polymerase chain reaction“, qRT-PCR; siehe Kapitel 2.15.4.3)-Analysen durchgeführt.

Darüber hinaus wurde basaliomtragende Schwanzhaut von *Ptch*<sup>fl<sup>ox</sup>/fl<sup>ox</sup></sup>-Mäusen in Kultur genommen (siehe Kapitel 2.16.3), um auch am isolierten Organ die Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zu überprüfen. Die Effekte wurden durch histologische Methoden (siehe Kapitel 2.17) und qRT-PCR (siehe Kapitel 2.15.4.3) analysiert.

Dann wurde die Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf das Tumorstadium im Tiermodell überprüft. Zunächst habe ich eine bereits begonnene Toxizitäts- und Dosisfindungsstudie an *Ptch*<sup>+/+</sup>-Tieren vollendet (siehe Kapitel 3.2.1). Basierend auf den ermittelten Daten habe ich RMS-tragende *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäuse mit einer Dosis von 50 ng/kg/d über einen Zeitraum von acht Wochen mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelt (siehe Kapitel 3.2.2). Um die antitumorale Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zu dokumentieren, wurde das Tumorstadium mittels Volumencomputertomographie (VCT) bestimmt (siehe Kapitel 2.18.3). Nach Ende der Behandlung wurde der Tumor isoliert und mittels histologischer und molekularbiologischer Methoden untersucht.

Des Weiteren wurden in *Ptch*<sup>fl<sup>ox</sup>/fl<sup>ox</sup></sup>-Mäusen BCC induziert. Diese Tiere wurden mit einer Dosis von 40 ng/kg/d von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelt (siehe Kapitel 3.2.3). In diesem Modell bestand zusätzlich die Möglichkeit einer Untersuchung der antitumoralen Effekte von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vergleichend zwischen Tumorstadium und Tumorstadium.

Durch diese Untersuchungen soll die Grundlage für den rationalen Einsatz von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  als innovatives Therapeutikum für Tumore, die aufgrund von *Ptch*-Mutationen entstehen, eröffnet werden.

---

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Statistische Auswertungsverfahren

Die statistischen Auswertungen von qRT-PCRs (siehe Kapitel 3.1 und 3.2.3.3) und von Auszählungen der Ki67- und aktiven Caspase-3-Antikörperfärbungen (siehe Kapitel 3.2.2 und 3.2.3.2) wurden mit Hilfe der Software Statistica (StatSoft GmbH, Hamburg) durchgeführt. Dabei wurde die Signifikanz von Unterschieden und Gleichheit der einzelnen Datengruppen mit Hilfe eines t-Tests für unabhängige Gruppen (Mann-Whitney-U-Test) getestet. Das Signifikanzniveau  $\alpha$  wurde auf 5 % festgelegt, d.h. p-Werte von  $p < 0,05$  wurden als signifikant und p-Werte  $> 0,05$  als nicht signifikant gewertet.

### 2.2 Software

Software	Bezugsquelle
Cell <sup>F</sup>	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster
EXCEL	Microsoft Co., Redmond, USA
Free Hand MX	Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA
Intas GDS	Intas, Göttingen
Modular Analytics für die Serum Work Area (SWA)	Roche Diagnostics GmbH/Hitachi, Mannheim
Photoshop 6.0	Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA
SDS 2.1	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Simplicity 2.1	Berthold detection systems GmbH, Pforzheim
Statistica	StatSoft GmbH, Hamburg
voxtools v5.5.4	GE HealthCare, München
WORD	Microsoft Co., Redmond, USA
Randomizer.org	<a href="http://www.random.org">www.random.org</a>

---

### 2.3 Datenbanken

Datenbank	Bezugsquelle
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Mouse Genome Informatics	<a href="http://www.informatics.jax.org/">http://www.informatics.jax.org/</a>
Fachinformationsverzeichnis Deutschland (Rote Liste® Service GmbH)	<a href="http://www.fachinfo.de/">http://www.fachinfo.de/</a>

### 2.4 Laborgeräte

Laborgeräte	Bezugsquelle
-80 °C Schrank (MDF-U71V)	Sanyo Electric co., Ltd., Japan
Agarosegelelektrophorese-Kammern	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Autoklav	W. Krannich GmbH & Co. K.G.
Automat zur biochemischen Serumanalyse (MODULAR P)	Roche Diagnostics GmbH/Hitachi, Mannheim
AW 4.2 GE Healthcare	GE Healthcare, München
Brutschränke; Begasungsbrutschränke (6000, BBD 6220)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Color View II (Farbcamera für Mikroskop)	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster
Dampfgarer (multiGourmet FS20)	Braun, Kronberg
Einkanal-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Feinwaagen (Sartorius Basic plus)	Sartorius AG, Göttingen
flat panel Volumetric Computed Tomograph (fpVCT)	GE Global Research, Niskayuna, USA
Fluoreszenzmikroskop (BX60F5)	Olympus Optical Co. Ltd., Japan
Gewebeeinbett- und -entwässerungsautomat (TP 1020)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Heizblöcke (Thermomixer)	Eppendorf, Hamburg
Heizrührer (MR 3000/3001)	Heidolph Instruments, Schwabach
Homogenisator (Micra D-1)	ART- moderne Labortechnik e.K., Mülheim
Hybridisierungsöfen (HB-1000 Hybridizer)	UVP, Inc., Upland, USA
Inverses Mikroskop mit Fluoreszenzfilter (Axiovert 25, Filterset 43, 01, 09)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Kühlschrank (4 °C)	Robert Bosch GmbH, Stuttgart
Luminometer (MPL-3 (2 Injektoren))	Berthold detection systems GmbH, Pforzheim
MilliQ-Anlage	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH, Karlsruhe



<b>Laborgeräte</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Paraffinspender, Ausgießstation (Tissue Block Dispenser PAG 12)	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
PCR-Gerät (Mastercycler epgradients)	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter (inoLab pH Level 1)	WTW GmbH, Wien, Österreich
Photometer, Thermodrucker (Biophotometer 6131 Thermodrucker DPU-414)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe (Accu-jet)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Präparierbesteck	Karl Hammacher GmbH, Solingen
Schlittenmikrotom (HN 40)	Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Schüttelwasserbad (1083)	GFL mbH, Burgwedel
Schwenktische (Unimax 1010 und Polymax 1040)	Heidolph Instruments, Schwabach
Sequence Detection System (ABI Prism 7900HT)	Applied Biosystems, Darmstadt
Sterilbank (Euroflow Klasse IIA)	Clean Air Technik bv, Woerden, Niederlande
Stromquellen für Elektrophorese	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Tiefkühlschränke (-20 °C)	Liebherr Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen und Robert Bosch GmbH, Stuttgart
UV-Dokumentation (digital monochrome printer P91DW(E))	Mitsubishi, Ratingen
UV-Transilluminator / Software	Intas, Göttingen
Vortexer (Vortexer-Genie 2)	Scientific Industries, Inc., Wobum, USA
Zählkammer nach Neubauer (Assistent)	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
Zentrifugen (Biofuge pico, fresco, Multifuge 3L-R)	Heraeus Holding GmbH, Hanau

## 2.5 Gebrauchswaren

<b>Gebrauchswaren</b>	<b>Bezugsquelle</b>
1,5-ml-Reaktionsgefäße	Ochs GmbH, Bovenden/ Lenglern
1,5-ml-Reaktionsgefäße (safe lock)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
15-ml-Röhrchen Cellstar®	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
2,0-ml-Reaktionsgefäße (safe lock)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
384-Loch-Platten (384-well Optical Reaction Plate)	ABgene® Ltd. Epsom, UK

<b>Gebrauchswaren</b>	<b>Bezugsquelle</b>
50-ml-Röhrchen Cellstar®	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
6-Loch-Platten (Tissue culture plate 6-well)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
24-Loch-Platten (Tissue culture plate 24-well)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
96-Loch-Luminometer Messplatten (96 well assay plate)	Costar, Corning Incorporated, Corning USA
Deckgläser	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Dispensionspipetten (Combitips plus)	Eppendorf, Hamburg
Einwegspritzen (BD Plastipak)	BD GmbH, Heidelberg
Faltenfilter	Sartorius AG, Göttingen
Glaswaren	Schott AG, Mainz und Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Kanülen (Sterican Ø 0,45 x 12 mm)	B. Braun Medical AG, Emmenbrücke
Küvetten (UVette)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Haematokrit-Kapillaren (Na-Heparin)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Infusionsgerät (Perfudrop®-Air P)	clinico®, Bad Hersfeld
Milliporefilter (Nuclepore Track-Etch Membran)	Whatman GmbH, Dassel
Nitrozellulosemembran (Hybond-XL)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Objektträger (SuperFrost Plus)	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
PCR-Reaktionsgefäße und Deckel (ThermoFast 96, nonskirted natural domed cap strips, natural)	4titude® Ltd., Berlin
Petrischalen	Ochs GmbH, Bovenden/Lenglern
Pipettenspitzen, gestopft (10 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen, gestopft (100 µl, 200 µl, 1000 µl)	G.Kisker GbR, Steinfurt
Pipettenspitzen, ungestopft (10 µl, 200 µl)	Ochs GmbH, Bovenden/Lenglern
Pipettenspitzen, ungestopft (1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Siegelfolie für 384-Loch-Platten (QPCR Adhesive Clear Seal)	4titude® Ltd., Berlin
Skalpellschneidmesser (#10, #24)	Aesulap AG & Co. KG, Tuttlingen
Steriles Blutentnahme-Set für S-Monovette®	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Sterilfilter	schuett24 GmbH, Göttingen
Zellkulturschalen; 100 mm, 35 mm (Nunclon Surface)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Zellsiebe (BD Falcon™)	BD Biosciences, Bedford, USA

## 2.6 Chemikalien und Reagenzien

Die im Folgenden nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von der Carl Roth GmbH, Karlsruhe, und von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, bezogen.

Chemikalie/Reagenz	Bezugsquelle
100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Agarose	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
BM Purple	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Borsäure	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
Cyclopamin (CP)	Toronto Research Chemicals Inc., North York, Kanada
Deoxyribonukleotidtriphosphat (dNTP)	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld
Dig RNA Labeling Mix, 10 x conc.	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Enthaarungscreme "rilanja body"	MAXIM Markenprodukte GmbH & Co. KG, Pulheim
Ethanol 99%ig	J.T.Baker B.V., Deventer, Holland
Ethanol 99%ig vergällt	GeReSo mbH, Einbeck
Ethidiumbromid (0,07 %)	inna-TRAIN-Diagnostics. Kronberg
fötales Kälberserum (fetal calf serum; FCS; für Immunhistochemie)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Glycergel-Montagemedium	Dako GmbH, Hamburg
I-Block (0,2 % in PBS; Blockierung bei Antikörperfärbungen)	Tropix, Bedford, USA
Isofluran (FORENE®)	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Ketanest (25 mg/ml)	Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe
Mayers Hämalaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
NBT/BCIP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PBS-Tablets	GIBCO Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Pertex-Montagemedium	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
Primer random p(dN) <sub>6</sub>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ringer-Lactat (nach Hartman)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
RNase-, DNase-freies destilliertes Wasser	GIBCO Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Rompun (2 %)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Salzsäure rauchend 37%	Merck KGaA, Darmstadt
Transkriptionspuffer (5 x)	Promega GmbH, Mannheim
TriFast	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Tween-20	Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain
Ultravist 150 und 300	Bayer Schering Pharma AG, Berlin

Chemikalie/Reagenz	Bezugsquelle
Wasser für Injektionszwecke (Ampuwa)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck KGaA, Darmstadt
Xylol	J.T. Baker B.V., Deventer, Holland

## 2.7 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Soweit im Text nicht anders erwähnt, wurde bei der Verwendung von gebrauchsfertigen Reaktionssystemen nach den Angaben des Herstellers gearbeitet.

Gebrauchsfertige Reaktionssystem	Bezugsquelle
Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dako REAL™ EnVision™ Detection System	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
QuantiTect SYBR green PCR	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy Fibrous Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden

## 2.8 Stammlösungen

Soweit im Text nicht anders erwähnt, wurde für alle Stammlösungen in der MilliQ-Anlage aufbereitetes doppelt-destilliertes Wasser verwendet.

Stammlösung	Inhaltsstoffe, Konzentration und pH
Citratpuffer pH 6,0	3,6 % (v/v) 0,1 M Zitronensäure 16,4 % (v/v) 0,1 M tri-Natriumcitrat
Collagenase H-Lösung	2 mg/ml Clostridiopeptidase A (Collagenase H aus Clostridium histolyticum; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) sterilfiltriert
Cresol	0,1 % (w/v) Cresol gesättigte Sukrose-Lösung
Deoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP-Mix)	10 mM dATP 10 mM dTTP 10 mM dGTP 10 mM dCTP
Eosin, 1 %	1 % (w/v) Eosin Y (wasserlöslich) 80 % (v/v) Ethanol

Stammlösung	Inhaltsstoffe, Konzentration und pH
Glutaraldehyd/1 x PBS	0,2 % (v/v) Glutaraldehyd 1 x PBS
Hämalaun nach Meyer	0,1 % (w/v) Hämatoxylin 5 % (w/v) Kaliumaluminiumsulfat 0,015 % (w/v) Natriumjodat 5 % (w/v) Trichloracetaldehydhydrat 1 % (w/v) Zitronensäure
Hybridisierungspuffer	50 % (v/v) Formamid 0,3 M NaCl 20 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 8,0 (93 % (v/v) 0,5 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 7 % (v/v) NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 10 % (w/v) Dextransulfat 1 x Denhardt's 0,5 mg/ml Hefe t-RNA
MBSTL-Puffer pH 7,5	0,15 M NaCl 0,1 M Maleinsäure 2 mM Levamisol 0,1 % Tween-20
NT-Puffer	0,15 M NaCl 0,1 M Tris/HCl pH 7,5
NTM-Puffer	0,1 M NaCl 0,1 M Tris/HCl pH 9,5 50 mM MgCl <sub>2</sub>
NTMLT-Puffer	0,1 M NaCl 0,1 M Tris/HCl pH 9,5 50 mM MgCl <sub>2</sub> 2 mM Levamisol 0,1 % Tween-20
Paraformaldehyd (PFA)	4 % (w/v) Paraformaldehyd 1 x PBS
Phosphat-gepufferte Natriumchlorid-Lösung (PBS), 10 x, pH 7,4	Stammlösung, die für alle Anwendungen 1:10 verdünnt wurde. 1,4 M NaCl 27 mM KCl 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 65 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Proteinase-K-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0 5 mM EDTA 40 µg/ml Proteinase K
Saures Hämalaun nach Mayer	0,1 % (w/v) Hämatoxylin 5 % (w/v) Aluminiumammoniumsulfat 0,02 % (w/v) Natriumjodat 5 % (w/v) Chloralhydrat 0,1 % (w/v) Zitronensäure
Standard-Natriumcitrat-Lösung (SSC), 20 x pH 7,0 bzw. 6,4	0,3 M Natriumcitrat 3 M NaCl
STE- <i>in-situ</i> -Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 5 mM EDTA pH 8,0 0,5 M NaCl

Stammlösung	Inhaltsstoffe, Konzentration und pH
STE-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % (w/v) SDS
Stop-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8 1 mM EDTA
Tris-Borsäure-EDTA-Lösung, 10 x (TBE)	Stammlösung, die für alle Anwendungen 1:10 verdünnt wurde. 890 mM Tris/HCl pH 8,0 730 mM Borsäure 12,5 mM EDTA
Tris-gepufferte Natriumchlorid-Lösung, 10 x (TBS)	Stammlösung, die für alle Anwendungen 1:10 verdünnt wurde. 0,5 M Tris/HCl pH 7,4 1,5 M NaCl

## 2.9 Medien und Reagenzien für die Kultur eukaryotischer Zellen

Medium	Bezugsquelle
154CF Medium	Cascade Biologics™, Portland, USA
Chelex 100 Resin Chelating Ion Exchanger Resin	BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA
DMEM	GIBCO Invitrogen™, Auckland, Neuseeland
FCS (fötale Kälberserum)	GIBCO Invitrogen™, Auckland, Neuseeland
Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml) (P/S)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
RPMI-1640	GIBCO Invitrogen™, Auckland, Neuseeland
Trypsin/EDTA (TrypLE™ Express)	GIBCO Invitrogen™, Auckland, Neuseeland

Herstellung von Ca<sup>2+</sup>-chelatiertem und hitzeinaktiviertem FCS für 154CF Medium: 50 ml FCS wurden für 30 Minuten (min) in einem 56 °C warmen Wasserbad hitzeinaktiviert. Anschließend wurden 10 g *Chelex 100 Resin Chelating Ion Exchange Resin* hinzugefügt und das FCS für 60 min bei Raumtemperatur (RT) auf dem Magnetrührer gerührt. Hierdurch wurden dem FCS Kalzium-Ionen entzogen. Danach wurde die Mischung über einen UV-Licht-sterilisierten Faltenfilter und anschließend über einen 0,2 µm Sterilfilter filtriert. Zur Aufbewahrung wurde das hitzeinaktivierte und Ca<sup>2+</sup>-chealatierte FCS in 1 ml Aliquots bei -20 °C gelagert.

## 2.10 Biologisches Material

### 2.10.1 Eukaryotische Zelllinien

Folgende Eukaryotische Zelllinien wurden verwendet:

1	2	3	4	5
ASZ001	Stabile BCC-Zelllinie aus <i>Ptch</i> <sup>neo12/+</sup> -Mäusen	154CF	1% P/S	So <i>et al.</i> 2006
MB627	Stabile MB-Zelllinien aus <i>Ptch</i> <sup>neo67/+</sup> <i>CD1</i> -Mäusen	DMEM	1% P/S	Etabliert von Pablo Hernaiz Driever; Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie/Hämatologie, Charité Virchow-Klinikum Universitätsmedizin Berlin
MB723				
MB794				
TP1588	Stabile RMS-Zelllinie aus <i>Ptch</i> <sup>neo12/+</sup> -Mäusen	RPMI	1% P/S	Etabliert vom Labor von Prof. Dr. Torsten Pietsch; Institut für Neuropathologie, Universität Bonn
TP5014				

**Tabelle 1: Auflistung der verwendeten eukaryotischen Zellen.** Spalte 1: Bezeichnung der Zelllinie, Spalte 2: Ursprungsspezies und Zelltyp, Spalte 3: verwendetes Medium (siehe Kapitel 2.9), Spalte 4: verwendete Antibiotika und eingesetzte Konzentrationen, Spalte 5: Hersteller/Literaturreferenz; Abkürzungen: BCC, Basalzellkarzinom; MB Medulloblastom, P/S Penicillin/Streptomycin, RMS, Rhabdomyosarkom; TP Torsten Pietsch.

### 2.10.2 Mauslinien

#### 2.10.2.1 *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mauslinie

Für die Tierexperimente zur  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Dosisfindungsstudie und zur Behandlung von RMS mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.2) wurden *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäuse (Hahn *et al.* 1998) mit einem gemischten genetischen C57BL6/N x Balb/c Hintergrund verwendet (Hahn *et al.* 2004). Zur Generierung dieser Mauslinie wurden männliche *Ptch*<sup>neo67/+</sup>C57BL6/N-Mäuse mit weiblichen Tieren der Inzuchtlinie BALB/c (Charles River Laboratories, L'Arbresle, Frankreich) am Institut für Humangenetik, Universität Göttingen, verpaart.

#### 2.10.2.2 *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*Rosa26ERT2*<sup>+/-</sup>-Mauslinie

Zur Untersuchung der Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf *Ptch*-abhängige BCC (siehe Kapitel 3.1.5 und 3.2.3) wurden *Ptch*<sup>flox/flox</sup> mit *Rosa26ERT2*<sup>+/-</sup> (*ERT2*<sup>+/-</sup>; Hameyer *et*

al. 2007)-Mäusen verpaart. Die resultierenden  $Ptch^{flox/+}ERT2^{+/-}$ -Nachkommen wurden mit  $Ptch^{flox/flox}$ -Tieren gekreuzt um  $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ -Mäuse zu generieren.  $ERT2^{+/-}$ -Mäuse exprimieren ein Fusionsprotein aus einer Cre-Rekombinase und einem genetisch veränderten, Tamoxifen-bindenden Östrogenrezeptor (CreERT2) unter der Kontrolle des endogenen *ROSA26*-Promotor. Da die Cre-Rekombinaseaktivität des CreERT2-Enzyms erst durch die Bindung des Medikamentes Tamoxifen aktiviert wird, kann der Zeitpunkt der Induktion der  $Ptch^{del}$ -Mutation beliebig gewählt werden.

Um BCC zu induzieren, wurden  $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ -Mäuse im Alter von 10 Wochen einmalig von 100 µg/10 µl Tamoxifen (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) intramuskulär (i.m.) (in den *Musculus soleus*) injiziert (siehe Kapitel 2.18.2.2; Zibat *et al.* 2009). Mikroskopisch sind BCC schon ab dem 45. Tag nach Induktion detektierbar. Am 90. Tag erreichen die Tumoren die volle Ausprägung (siehe Kapitel 3.1.5; Zibat *et al.* 2009).

Die Zucht und Haltung der Tiere als auch tierexperimentelle Methoden sind in Kapitel 2.18 beschrieben.

## 2.11 Synthetische DNA-Oligonukleotide

Synthetischen DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Qiagen GmbH, Hilden, bezogen. Die Stammkonzentration der DNA-Oligonukleotide von 100 µM wurde mit Ampuwa eingestellt. Für PCR-Reaktionen wurden Arbeitslösungen mit einer Konzentration von 10 µM verwendet.

### 2.11.1 DNA-Oligonukleotide zur Genotypisierung von Mäusen

Die Genotypisierung von  $Ptch^{neo67/+}$ - und  $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ -Mäusen ist in Kapitel 2.15.4.1 beschrieben. Hierzu wurde mit den in Tabelle 2 aufgelisteten DNA-Oligonukleotiden gearbeitet.

1	2	3	4	5	6
$Ptch^{+/+}$	60°C	400 bp	<i>neo-L</i>	AGTGCCAGCGGGGCTGCTAAA	Hahn <i>et al.</i> 1998
$Ptch^{neo67}$		635 bp	<i>mPTC11R3</i>	CTGCCTGTTATGTGGTTCAAACCG	
			<i>Pst4KF</i>	GGGAGGGGATTTTCAGCAGAATGTT	



1	2	3	4	5	6
<i>Ptch</i> <sup>+/+</sup>	60°C	1401 bp <sup>wt</sup>	<i>p910F.4</i>	AGCACCTGGACGACATCCTAAA	Uhmann <i>et al.</i> 2007
<i>Ptch</i> <sup>lox/+</sup>			<i>p1011R.2</i>	TCTGTCCTGTTTCACTGAATGCATGG	
<i>Ptch</i> <sup>del/+</sup>					
<i>Ptch</i> <sup>lox/+</sup>	60°C	843 bp	<i>p910F.4</i>	AGCACCTGGACGACATCCTAAA	Uhmann <i>et al.</i> 2007
<i>Ptch</i> <sup>lox/lox</sup>			<i>Neo-R</i>	GCATCAGAGCAGCCGATTGTCTG	
<i>Ptch</i> <sup>del/+</sup>	60°C	950 bp	<i>Exon7-F</i>	AGGAAGTATATGCATTGGCAGGAG	Uhmann <i>et al.</i> 2007
<i>Ptch</i> <sup>del/del</sup>			<i>Neo-R</i>	GCATCAGAGCAGCCGATTGTCTG	

**Tabelle 2: Auflistung der verwendeten DNA-Oligonukleotide für die Genotypisierung von Mäusen.** Spalte 1: Bezeichnung der getesteten Genotypen; Spalte 2: Verwendete Anlagerungstemperatur bei der PCR; Spalte 3: amplifizierte Fragmentgröße; Spalte 4: Bezeichnung des DNA-Oligonukleotids; Spalte 5: DNA-Oligonukleotidsequenz (5' → 3'); Spalte 6: Literaturreferenz.

### 2.11.2 DNA-Oligonukleotide für die qRT-PCR

Die Genexpressionsanalyse mit Hilfe der qRT-PCR ist in Kapitel 2.15.4.3 beschrieben. Die verwendeten DNA-Oligonukleotide für qRT-PCR in SYBR Green-basierten Assays (Quantitect SYBR Green; siehe Kapitel 2.7) an cDNA zur Quantifizierung von Genexpressionsniveaus sind in Tabelle 3 aufgeführt.

1	2	3	4	5
<i>18S rRNA</i>	81 bp	<i>18S-fwd</i>	CGCAAATTACCCACTCCCG	Ecke <i>et al.</i> 2008
		<i>18S-rev</i>	TTCCAATTACAGGGCCTCGAA	
<i>Gli1</i>	115 bp	<i>Gli1-tq-f</i>	TACATGCTGGTGGTGACATG	Ecke <i>et al.</i> 2008
		<i>Gli1-tq-r</i>	ACCGAAGGTGCGTCTTGAGG	
<i>Cyp24a1</i>	166 bp	<i>Cyp24a1-F</i>	GTGTGGCAAGCGCACACGCT	Niemann 2010
		<i>Cyp24a1-R</i>	CCGTGACAGCAGCGTACAGT	
<i>K1</i>	232 bp	<i>mK1-F</i>	TCAACGTTGAGGTTGACCCTC	Nitzki <i>et al.</i> 2010
		<i>mK1-R</i>	ACCTTCCTTCTGAGGATGCTG	
<i>K10</i>	190 bp	<i>mK10-F</i>	GGATGCTGAAGAGTGGTTCAA	Nitzki <i>et al.</i> 2010
		<i>mK10-R</i>	TCTGTTTCTGCCAAGGAGGCT	

**Tabelle 3: Auflistung der für die qRT-PCR verwendeten DNA-Oligonukleotide.** Spalte 1: Bezeichnung der quantifizierten Gentranskripte; Spalte 2: amplifizierte Fragmentgröße; Spalte 3: Bezeichnung des DNA-Oligonukleotids; Spalte 4: DNA-Oligonukleotidsequenz (5' → 3'); Spalte 5: Literaturreferenz. Die Anlagerungstemperatur bei der qRT-PCR betrug stets 60 °C.

**2.12 Antikörper**

**2.12.1 Primäre Antikörper**

Die für immunhistochemische Methoden (siehe Kapitel 2.17.3) verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 4 aufgelistet.

1	2	3	4
anti-Ki67	1:50	Maus monoklonal	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
anti-Aktive-Caspase-3	1:50	Kaninchen polyklonal	Zytomed Systems GmbH, Berlin

**Tabelle 4: Auflistung der verwendeten primären Antikörper.** Spalte 1: Bezeichnung des Antikörpers; Spalte 2: Verdünnung; Spalte 3: Ursprungsspezies; Spalte 4: Hersteller.

**2.12.2 Sekundäre Antikörper**

Die für immunhistochemische Methoden (siehe Kapitel 2.17.3) und *In-situ*-Hybridisierung (ISH; siehe Kapitel 2.17.4.2) verwendeten sekundären Antikörper sind in Tabelle 5 aufgelistet.

1	2	3	4	5
Anti-Maus IgHRP-konjugiert**	Maus	Ziege	IHC: lag als Antikörperlösung vor	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Anti-Digoxigenin (Dig)-Fab AP-konjugiert	Digoxigenin	Schaf	ISH: 1:500 in 0,02% I-Block in MBSTL	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

**Tabelle 5: Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper.** Spalte 1: Bezeichnung des Antikörpers; Spalte 2: Antigen; Spalte 3: Ursprungsspezies; Spalte 4: Eingesetzte Antikörperverdünnung und Verdünnungsmedium, Spalte 5: Hersteller. Abkürzung: IHC Immunhistochemie; ISH *in-situ*-Hybridisierung.

\*\*Teil des REAL™ EnVision™ Detection System (siehe Kapitel 2.7)

### 2.13 Sonden

Die im Rahmen dieser Arbeit für ISH (siehe Kapitel 2.17.4) verwendeten Sonden sind in Tabelle 6 angegeben.

1	2	3	4	5
<i>Gli1</i> antisense	pmGli1	Not I	T7	M. Wijgerde, Rotterdam, Niederlande
<i>Gli1</i> sense	pmGli1	Hind III	T3	M. Wijgerde, Rotterdam, Niederlande
<i>Wnt5a</i> antisense	pBS-Wnt5A No121	Hind III	T7	M. Wijgerde, Rotterdam, Niederlande
	pBS-Wnt5a No122	Hind III	T7	M. Wijgerde, Rotterdam, Niederlande
<i>Wnt5a</i> sense	pBS-Wnt5A No121	BamH	T3	M. Wijgerde, Rotterdam, Niederlande
	pBS-Wnt5a No122	BamH	T3	M. Wijgerde, Rotterdam, Niederlande

**Tabelle 6: Auflistung der verwendeten *in-situ*-Hybridisierungssonden.** Spalte 1: Sonde; Spalte 2: Plasmid; Spalte 3: Restriktionsenzym; Spalte 4: RNA-Polymerase; Spalte 5: Hersteller.

### 2.14 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in Tabelle 7 aufgelistet.

1	2	3
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	PCR	Molzym GmbH Co.KG, Bremen
Collagenase H (Clostridiopeptidase A aus <i>Clostridium histolyticum</i> )	Primäre Kultivierung von MB und RMS Zellen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Proteinase K	DNA-Isolierung und <i>in-situ</i> -Hybridisierung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Reverse Transkriptase SuperScriptII (SSII)	cDNA-Synthese	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNA-Polymerase T3	Herstellung von Sonden für <i>in-situ</i> -Hybridisierung	Promega GmbH, Mannheim
RNA-Polymerase T7	Herstellung von Sonden für <i>in-situ</i> -Hybridisierung	Promega GmbH, Mannheim
RNase A	<i>In-situ</i> -Hybridisierung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

**Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Enzyme.** Spalte 1: Bezeichnung des Enzyms, Spalte 2: Anwendung des Enzyms, Spalte 3: Hersteller; Abkürzungen: cDNA copy-DNA, MB Medulloblastom, PCR Polymerase chain reaction/Kettenreaktion, RMS Rhabdomyosarkom, *Taq Thermus aquaticus*.

## **2.15 Molekularbiologische Methoden**

### **2.15.1 Isolierung von genomischer DNA (gDNA) aus Schwanzbiopsien zur Genotypisierung von Mäusen**

Die frischen Schwanzbiopsien wurden zunächst in 400 µl 1 x STE Puffer und 20 µl Proteinase K (25 mg/ml) aufgenommen und über Nacht bei 55 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Proben für 3 min bei 13.000 Umdrehungen pro Minute (rounds per minute, rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde in 1 ml 99%igem vergälltem Ethanol (EtOH) überführt. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Im darauf folgenden Schritt wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 µl 70%igem vergälltem EtOH gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 4 °C, 13.000 rpm) wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet für 10 min bei 55 °C getrocknet. Danach wurde das Pellet in 125 µl Ampuwa aufgenommen und für 15 min bei 42 °C und 14.000 rpm geschüttelt und anschließend kurz abzentrifugiert. Für die PCR zur Genotypisierung (siehe Kapitel 2.15.4.1) wurde 1,25 µl der Probe verwendet.

### **2.15.2 Isolierung von Gesamt-RNA**

Die Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde im Folgenden zur copyDNA (cDNA)-Synthese (siehe Kapitel 2.15.4.2) und zur Analyse von Gentranskripten (qRT-PCR an cDNA, siehe Kapitel 2.15.4.3) verwendet.

#### **2.15.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten eukaryotischen Zellen**

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkultur wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen in 5 ml 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml TriFast versetzt, um die Zellen zu lysieren und die RNA zu stabilisieren. Das Lysat wurde in sterile 2-ml-Reaktionsgefäße überführt und für 60 Sekunden (sek) homogenisiert (Vortexer). Danach wurden die Proben für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und Homogenisierung für 15 sek wurden die Proben erneut für 3 min bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurden die Proben für 5 bis 10 min bei 4 °C und 12.000 rpm zentrifugiert und

anschließend die obere Phase in ein steriles 2-ml-Reaktionsgefäße überführt. Es folgte die Zugabe von 0,5 ml Isopropanol. Die Präzipitation der RNA erfolgte bei -20 °C für 10 min bis mehrere Stunden (h). Nach erneuter Zentrifugation (10 bis 30 min, 4 °C, 12.000 rpm) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml 70%igem EtOH durch Zentrifugation (5 min, 4 °C, 12.000 rpm) gewaschen, der Überstand verworfen und das Pellet bei RT getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in 15 bis 20 µl RNase- und DNase-freiem destilliertem Wasser aufgenommen. Die RNA-Konzentration wurde, wie in Kapitel 2.15.3 beschrieben, bestimmt.

### **2.15.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe**

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe mit TriFast wurde die Gewebeprobe mit einem Skalpell zerkleinert und in TriFast überführt. Anschließend wurde das Gewebe für 60 sek auf Eis mit einem Homogenisator homogenisiert, für 5 min bei RT inkubiert und mit 200 µl Chloroform versetzt. Die nachfolgenden Schritte zur Aufreinigung der RNA wurden, wie unter 2.15.2.1 beschrieben, durchgeführt.

RNA aus Hautproben zur Durchführung von qRT-PCR wurde mit Hilfe des RNeasy Fibrous Tissue Kit (siehe Kapitel 2.7) nach Herstellerangaben isoliert. Anschließend folgte eine zusätzliche Behandlung mit der in dem gebrauchsfertigen Reaktionssystem enthaltenen DNase I und dem zugehörigen Puffer (RDD-Puffer). Dazu wurden 20 µl Eluat mit 10 % (v/v) RDD-Puffer und 2,7 Unit (U) DNase I versetzt, für 1 h bei 37 °C und danach für 15 min bei 75 °C inkubiert. Die RNA wurde mit 99%igem EtOH über Nacht bei -20 °C gefällt, bei 12.000 rpm für 35 min abzentrifugiert und mit 70 %igem EtOH gewaschen. Das Pellet wurde in 20 µl RNase- und DNase-freiem destilliertem Wasser aufgenommen und die RNA-Konzentration am Photometer bestimmt (Kapitel 2.15.3).

### **2.15.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Nukleinsäuren weisen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm auf. Die photometrische Konzentrationsbestimmung erfolgte daher bei der Messung der Extinktion bei 260 nm gegenüber einem Leerwert (destilliertes Wasser). Die Extinktion bei 320 nm

ist ein Maß für die Verunreinigung mit Schwebstoffen. Für die Konzentrationsbestimmung wurden die Nukleinsäuren 1:100 in destilliertem Wasser verdünnt und 100 µl im Photometer vermessen. Die Nukleinsäurekonzentration C berechnet sich aus folgender Formel 1:

$$C [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (E_{260}-E_{320}) \cdot f \cdot c$$

**Formel 1: Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.** mit: C = gemessene Konzentration in µg/µl; E = Extinktion; f = Verdünnungsfaktor; c = nukleinsäurespezifischer Koeffizient in µg/µl;  $c_{\text{DNA}} = 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ;  $c_{\text{RNA}} = 0,04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm gibt die Verunreinigung der Nukleinsäuren mit Proteinen wieder und sollte idealer Weise bei in Wasser gelöster DNA zwischen 1,6 und 1,8 liegen, während für in Wasser gelöster RNA das Verhältnis zwischen 1,9 und 2,1 liegen sollte.

## 2.15.4 PCR

### 2.15.4.1 PCR an gDNA

Zur *in-vitro*-Vervielfältigung von DNA-Abschnitten zur Genotypisierung der Versuchstiere (siehe Kapitel 2.10.2) wurde die Methode der PCR eingesetzt. Dabei synthetisiert das thermostabile *Taq*-Polymeraseenzym des Bakteriums *Thermus aquaticus* in mehreren Zyklen das zu amplifizierende Fragment. Dieses wird von zwei Oligonukleotidprimern begrenzt.

Für *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Genotypisierung setzt sich der Reaktionsansatz (10 µl) wie folgt zusammen:

10-100 ng	Matrizen-DNA
0,45 µM	sequenzspezifisches Vorwärts-DNA-Oligonukleotid (siehe Kapitel 2.11.1)
0,45 µM	sequenzspezifisches Rückwärts-DNA-Oligonukleotid (siehe Kapitel 2.11.1)
0,2 mM	dNTP's
1 x	Cresol
1 x	Polymerase-Puffer
0,1 U	<i>Taq</i> -Polymerase.

Für *Ptch*<sup>lox/lox</sup>-Genotypisierung setzt sich der Reaktionsansatz (10 µl) wie folgt zusammen:

10-100 ng	Matrizen-DNA
0,45 µM	sequenzspezifisches Vorwärts-DNA-Oligonukleotid (siehe Kapitel 2.11.1)
0,45 µM	sequenzspezifisches Rückwärts-DNA-Oligonukleotid (siehe Kapitel 2.11.1)
0,2 mM	dNTP's
1 %	DMSO (N.N.-Dimethylsulfoxid)
1 x	Cresol
1 x	Polymerase-Puffer
0,1 U	<i>Taq</i> -Polymerase.

Für die PCR wurde folgendes Programm erstellt: Zunächst wurde die DNA denaturiert. Darauf folgte die Anlagerung der DNA-Oligonukleotide (Annealing), die das zu amplifizierende Fragment flankierten. Im dritten Reaktionsabschnitt wird der zur einzelsträngigen DNA-Matrize komplementäre Strang gebildet. Dazu polymerisiert das *Taq*-Polymeraseenzym ausgehend vom gebundenen DNA-Oligonukleotid dNTPs am 3'-Ende, so dass die Elongation vom 5'- zum 3'-Ende stattfindet.

Jeder Reaktionsabschnitt wird bei einer bestimmten Reaktionstemperatur durchgeführt: Beginnend mit einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 4 bis 10 min wurden 25 bis 35 Zyklen mit jeweils drei Temperaturstufen durchgeführt. Jeder Zyklus umfasste einen Denaturierungsschritt (95 °C für 30 bis 60 sek), einen Anlagerungsschritt bei 50 bis 80 °C (30 sek bis 2 min) und einen Elongationsschritt bei 68 bis 72 °C für 1 bis 10 min. Nach Ablauf dieses Reaktionsprogramms wurde ein finaler Elongationsschritt von 5 bis 30 min Dauer bei 72 °C angefügt.

Die PCR-Amplifikate wurden im Anschluss mittels Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.15.5) analysiert.

#### 2.15.4.2 Reverse Transkription

Die Methode der reversen Transkription dient der Synthese von cDNA aus RNA-Matrizen. Das Enzym Reverse Transkriptase katalysiert die Synthese eines mRNA-komplementären cDNA-Strangs.

Es wurde mit der Reverse Transkriptase SSII (siehe Kapitel 2.14) und den mitgelieferten Reagenzien gearbeitet. Das Ansatzvolumen betrug 20  $\mu\text{l}$ . Es wurden 2  $\mu\text{g}$  RNA mit 40 U/ $\mu\text{l}$  SSII (für die cDNA-Synthese an mRNA aus *in-vitro*-Hautkulturen [siehe 2.16.3] wurden 1  $\mu\text{g}$  und 80 U/ $\mu\text{l}$  eingesetzt) umgeschrieben. Das entsprechende RNA-Volumen wurde zunächst mit RNase- und DNase-freiem destilliertem Wasser auf 7  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Danach wurden 250 ng DNA-Hexamere (Primer random, p(dN)<sub>6</sub>) hinzugefügt und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Daran anschließend wurden weitere Reagenzien in folgenden Endkonzentrationen hinzugefügt:

1 x	1 <sup>st</sup> strand buffer
10 mM	DTT (Dithiothreitol)
0,5 mM	dNTP-Mix.

Die Proben wurden für 10 min bei RT und dann weitere 2 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde unter vorsichtigem Mischen 40 U SSII (1:5 in RNase-freiem Wasser) hinzugefügt. Die Reverse Transkription erfolgte für 1 h bei 42 °C. Zum Abstoppen der Transkription wurden die Proben für 10 min bei 70 °C inkubiert.

Zur Kalkulation der cDNA-Konzentration wurde die Annahme zugrunde gelegt, dass die Effizienz der cDNA-Synthese 50% beträgt. Folglich wird bei der reversen Transkription von 2  $\mu\text{g}$  RNA eine Menge von 1  $\mu\text{g}$  cDNA synthetisiert. Bei einem Reaktionsvolumen von 20  $\mu\text{l}$  ergibt dies eine Endkonzentration von 50 ng/ $\mu\text{l}$  cDNA.

#### 2.15.4.3 qRT-PCR an cDNA

Die qRT-PCR wurde zur Quantifizierung von Genexpressionsprofilen von Zellkulturen (siehe Kapitel 3.1) und Gewebeproben aus Mäusen (siehe Kapitel 3.1.5 und 3.2.3) angewandt. Bei dieser Methode wird die Zunahme von spezifisch-amplifizierter DNA des Zielgens in jedem Reaktionszyklus der PCR bestimmt. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit SYBR-Green (QuantiTect SYBR Green)-basierten Assays (siehe Kapitel 2.7) gearbeitet. Für die Analysen wurde die isolierte



RNA aus den Zellen oder dem Gewebe in cDNA umgeschrieben (siehe Kapitel 2.15.2 und 2.15.4.2). Als Matrize wurden für die Amplifikation des Zielgens bei Zellkulturexperimenten 5 ng cDNA und bei Gewebeproben 50 ng cDNA eingesetzt. Durch die Bindung von SYBR-Green-Molekülen an doppelsträngige DNA wird ein Fluoreszenzsignal einer Wellenlänge von 494 bis 521 nm emittiert. Während des gesamten PCR-Programms wird die Zunahme der Fluoreszenzintensität gemessen, welche exponentiell mit der Akkumulation von doppelsträngigem PCR-Amplifikat korreliert. SYBR-Green lagert sich jedoch unspezifisch an doppelsträngige DNA und Oligonukleotid-Dimere an, so dass die Bestimmung der Amplifikatspezifität durch eine finale Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden muss. Die Schmelzkurvenanalyse erfolgt durch einen kontinuierlichen Temperaturanstieg, so dass sich doppelsträngige DNA-Moleküle auftrennen und einzelsträngige DNA-Moleküle entstehen. SYBR-Green-Moleküle werden nun freigesetzt und die dadurch abnehmende Fluoreszenzintensität wird registriert. Da spezifisch amplifizierte PCR-Produkte eine höhere Schmelztemperatur besitzen als unspezifisch PCR-Produkten und Oligonukleotid-Dimere, können sie von einander unterschieden werden.

Die Fluoreszenz-Emission ( $R_n$ ) wird während der gesamten PCR detektiert und auf eine interne Referenz (ROX) normalisiert ( $\Delta R_n$ ). Die normalisierte Fluoreszenz-Emission ( $\Delta R_n$ ) wird gegen die Zykluszahl aufgetragen, so dass eine sigmoide Amplifikationskurve entsteht. Diese Kurve zeigt dann die exponentielle Korrelation zwischen Fluoreszenz-Emission und Zykluszahl. Für die exponentielle Phase der Amplifikationskurve gilt somit, dass die Zunahme der Fluoreszenzintensität in jedem Zyklus direkt die Zunahme des spezifisch amplifizierten PCR-Produkts darstellt. Durch die Wahl eines Schwellenwertes (Threshold) wird jeder Probe eine Zykluszahl (Ct-Wert) zugeordnet, in welcher dessen Amplifikationskurve den Schwellenwert schneidet. Der Ct-Wert verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der eingesetzten Matrizen-Molekülzahl, d.h. je früher der exponentielle Anstieg der Fluoreszenzintensität erfolgt, desto höher ist die Matrizen-Molekülzahl der nachzuweisenden Sequenz der Probe.

#### **2.15.4.3.1 Endogene Kontrolle**

Als endogene Kontrolle wurde das Expressionsniveau des *18S*-ribosomale-RNA (*18S* rRNA)-Gens jeder untersuchten cDNA-Probe bestimmt. Da die *18S* rRNA ein

Haushaltsgen ist und in unterschiedlichen Geweben des Organismus nahezu konstant exprimiert werden sollte, kann es für die Normalisierung und damit zur Vergleichbarkeit der Expression verschiedener anderer Gene aus dem Probenmaterial verwendet werden.

#### 2.15.4.3.2 Ablauf der qRT-PCR

Für jeden qRT-PCR-Assay wurde ein einheitliches Pipettierschema durchgeführt mit je 3 Negativkontrollen ohne Zugabe von Matrizen-cDNA (ntc, no template control), je 3 Replikaten der jeweils 7 Verdünnungsstufen (1:5 Verdünnungen von S1 bis S7) zur Erstellung der Standardkurve und der zu vermessenden cDNA-Proben in jeweils 3 Replikaten.

Die RNA zur Herstellung der cDNA-Verdünnung für die Erstellung der Standardkurven wurde aus Geweben gewonnen, in denen die zu untersuchenden Gene exprimiert werden (siehe Tabelle 8). Die Expression der *18S* rRNA wurde als endogene Kontrolle zur Analyse der cDNA-Proben bestimmt. Die Verdünnungsreihe zur Erstellung der *18S*-rRNA-Standardkuve erfolgte aus cDNA mit einer Ausgangskonzentration (S1) von 0,04 ng/µl. Die S1-Konzentrationen der cDNA zur Erstellung der Standardkurven anderer Assays betragen 25 ng/µl.

Die cDNA-Proben wurden für den *18S*-rRNA-Assay in einer Konzentration von 1,6 pg/µl und der anderen Assays in einer Konzentration von 25 ng/µl eingesetzt.

Die Kalkulation der cDNA-Konzentrationen ist in Abschnitt 2.15.3 erläutert.

Assay	Gewebe zur Synthese der Standard-cDNA
<i>18S</i>	Embryo
<i>Cyp24a1</i>	Niere
<i>Gli1</i>	Embryo
<i>Zytokeratin1 (K1)</i>	Haut
<i>Zytokeratin10 (K10)</i>	Haut

**Tabelle 8: Verwendete Gewebe zur Synthese der Standard-cDNA.** Zusammenstellung der qRT-PCR-Assays und der jeweils verwendeten cDNAs synthetisiert aus RNA muriner Gewebe.

Für die Analyse der Genexpression wurden die cDNA-Proben in einer 384-Loch-Platte überführt. Das Gesamtvolumen von 12 µl pro Einzelansatz der qRT-PCR beinhaltete folgende Komponenten:

5 µl	SYBR <sup>®</sup> -Green (Qiagen)
0,45 µl	Vorwärts-DNA-Oligonukleotid (10µM)
0,45 µl	Rückwärts-DNA-Oligonukleotid (10µM)
4,1 µl	RNAse-freies Wasser (Invitrogen)
2 µl	Matrizen-cDNA.

Die SYBR<sup>®</sup>-Green-Lösung setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Hot Star Taq<sup>™</sup> DNA Polymerase  
 QuantiTect SYBR Green PCR Buffer  
 dNTP Mix inklusive dUTPs  
 SYBR Green I  
 ROX (passive reference dye)  
 5 mM MgCl<sub>2</sub>.

Mit Hilfe eines Dispensors wurden 10 µl dieses Reaktionsansatzes bestehend aus den Primern, dem SYBR<sup>®</sup>-Green und dem RNAse-freiem Wasser pro Loch der 384-Loch-Platte vorgelegt und je 2 µl der zu vermessenden cDNA-Probe zugefügt. Die Endkonzentrationen der Matrizen-cDNA der zu vermessenden Proben betrug folglich pro Loch 3,2 pg bei dem *18S*-rRNA-Assay und 50 ng bei allen anderen Assays (siehe oben).

Abschließend wurde die 384-Loch-Platte mit einer Folie (QPCR Adhesive Clear Seals) versiegelt und kurz abzentrifugiert.

Die Messung erfolgte am „ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System“ mit der SDS2.1 Software (PE Applied Biosystems, Foster City, USA).

Nach zwei initialen Schritten (2 min bei 50 °C und 15 min bei 95 °C) erfolgten 40 Zyklen mit jeweils folgenden Temperaturstufen:

95 °C	15 sek
60 °C	30 sek
72 °C	30 sek.

### 2.15.4.3.3 Auswertung nach der Standardkurvenmethode

Für die Auswertung der qRT-PCR-Messung wurde die Microsoft Software EXCEL hinzugezogen.

Anhand der seriellen Verdünnungsreihen wurde zunächst die Standardkurven für jeden Assay erstellt: der Ct-Wert (y-Achse), bei der die Amplifikationskurve den Schwellenwert schneidet, wird gegen den Logarithmus der eingesetzte Probenmenge (x-Achse) aufgetragen.

Sofern die Übereinstimmung der eingesetzten Replikate in einer Standardkurve bei über 99 % liegt ( $R^2 > 0,99$ ), ist die Steigung der sich ergebenden Geraden ein Ausdruck der Amplifikationseffizienz.

Mit einer Verdopplung der Zielsequenz in jedem Zyklus entsprechend einer Effizienz von 100 %, erhält man für eine serielle Fünffach-Verdünnung eine Differenz von 2,32 Zyklen zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen S1 bis S7 ( $2^{2,32}=5$ ). Das bedeutet, dass eine Steigung von  $m = 2,32$  der Geraden einer Amplifikationseffizienz von 100 % entspricht.

Da sich der Ct-Wert umgekehrt proportional zur eingesetzten Molekülzahl verhält, ergibt sich eine negative Steigung der Standardkurven, welche die Amplifikationseffizienz der entsprechenden qRT-PCR widerspiegelt.

Die lineare Regression mit Hilfe von Standardkurven unterschiedlicher Steigung ermöglicht die Quantifizierung der ursprünglichen Konzentration der Matrizen-cDNA anhand des bestimmten Ct-Wertes der Probe. Daher wurde mittels linearer Regression der Ct-Werte unbekannter cDNA-Proben die Quantität der ursprünglichen Matrizen-cDNA bestimmt.

Um die Daten untereinander vergleichen zu können, erfolgte anschließend die Normalisierung der jeweiligen Quantität einer Probe auf die entsprechende Quantität der Probe aus der Vermessung der endogenen Kontrolle (*18S* rRNA) (siehe Formel 2).

$$\text{normalisierte Expression des Zielgens} = \frac{\text{Expression des Zielgens}}{\text{Expression der endogenen Kontrolle}}$$

**Formel 2: Bestimmung der normalisierten Genexpression.** Die normalisierte Genexpression entspricht der gemessenen Quantität der Genexpression dividiert durch die gemessene Quantität der Genexpression der endogenen Kontrolle *18S* rRNA.

Die normalisierte Expression der mit Lösungsmittel (EtOH) behandelten Probe einer Messreihe wurde zur relativen Quantifizierung der Daten einer Messreihe verwendet. Durch die Berechnung der Quotienten der normalisierten Genexpression einer Probe und der normalisierten Genexpression der Lösungsmittel-Probe einer Messreihe wurden die Daten relativ quantifiziert (siehe Formel 3). Die Lösungsmittelprobe nimmt dabei den Wert = 1 an.

$$\text{relative Genexpression} = \frac{\text{normalisierte Genexpression}}{(\text{normalisierte Genexpression})_{\text{Lösungsmittelprobe}}}$$

**Formel 3: Bestimmung der relativen Genexpression.** Die relativierte Genexpression entspricht der normalisierten Genexpression dividiert durch die normalisierte Genexpression der Lösungsmittelprobe.

### 2.15.5 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten (z.B. zur Genotypisierung; siehe Kapitel 2.15.4.1) erfolgte mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese. Je nach Größe des DNA-Fragmentes wurde mit Gelen von 0,7 bis 2,5 % (w/v) Agaroseanteil in 1 x TBE gearbeitet. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren wurde dem noch flüssigen Gel unter Schwenken Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,2 µg/ml) zugegeben. Die Auftrennung erfolgte in einer mit 1 x TBE gefüllten Gelelektrophoresekammer bei einer konstanten Spannung von 30 bis 120 V. Dabei läuft die negativ geladene DNA im Spannungsfeld von der Kathode (Minuspol) zur Anode (Pluspol). Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe des UV-Transilluminators. Die Größe der Nukleinsäure-Fragmente bei der Gelelektrophorese wurden durch paralleles Mitführen des DNA-Längenstandard „100bp DNA Ladder plus“ ermittelt.

---

## **2.16 Zellbiologische Methoden**

### **2.16.1 Kultivierung von Zellen**

Eukaryotischen MB-Zelllinien (MB627, MB723, MB794) wurden in DMEM mit 10 % FCS und 1 % Antibiotika P/S kultiviert. Die murinen RMS-Zelllinien (TP1588, TP5014) wurden in RPMI-1640 mit 10 % FCS und 1 % Antibiotika P/S kultiviert. Für die Kultivierung der BCC-Zelllinie ASZ001 wurde 154CF Medium mit 2 %  $\text{Ca}^{2+}$ -chelatiertem, hitzeinaktiviertem FCS, 1% P/S und 0,05 mM  $\text{CaCl}_2$  verwendet. Bei einigen Experimenten wurde mit abweichenden Serum-Konzentrationen gearbeitet, welche bei der Beschreibung der jeweiligen Experimente angegeben sind. Die Zelllinien wurden in Zellkulturschalen bei 37 °C in einer konstanten  $\text{CO}_2$ -haltigen Atmosphäre (5 %  $\text{CO}_2$ ) mit 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert

### **2.16.2 Anlegen von MB-Primärkulturen**

Zur Kultivierung von primären MB-Zellkulturen wurde der Tumor zunächst möglichst steril aus der Maus herauspräpariert. Ein Teil des Tumors wurde für die histologische Begutachtung in 4 % Paraformaldehyd (PFA) konserviert, der andere Teil in sterilem 1 x PBS gewaschen und danach mit dem Skalpell zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wurde für 30 min bei 37 °C und 1.000/min auf dem Schüttler mit Collagenase H (2 mg/ml in DMEM gelöst, frisch angesetzt) inkubiert. Weiteres Dissoziieren der Gewebefragmente erfolgte durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren.

Anschließend folgte die Abreinigung durch ein Zellsieb und Spülung mit sterilem 1 x PBS. Das Filtrat wurde in ein steriles Gefäß überführt und für 5 min bei 4 °C und 2.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml DMEM mit 10 % FCS und 1 % P/S resuspendiert und auf eine Collagen-beschichtete 6-Loch-Platte bzw. 96-Loch-Luminometer-Messplatte ausgesät. Zur besseren Anzucht der Zellen folgte der erste Mediumswechsel bereits nach 4 bis 6 h, danach täglich. Die Zellen wurden maximal 72 h vor Versuchsstart angelegt.

### 2.16.3 Anlegen von *in-vitro*-Hautkulturen von *Mus musculus*

Um eine keimfreie Kultivierung von Hautstücken aus muriner Schwanzhaut zu gewährleisten, wurden die Mäuse mit Ketanest S (25,7 µl/10g Körpergewicht) und Rompun (5 µl/10g Körpergewicht) narkotisiert. Dann wurde Enthaarungscreme auf die Schwanzhaut der Mäuse appliziert. Nach einer Inkubation von 20 min wurden die Haare und die Enthaarungscreme mit Leitungswasser abgespült und die Haut mit 70 % EtOH getrocknet. 24 h nach Depilierung wurde 70 µl des Antimykotikums Nystatin (1,2 mg/ml gelöst in 99 %igem EtOH) (N3503; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) auf die Schwanzhaut aufgetragen. Nach weiteren 24 h Einwirkungszeit wurde das Tier schmerzfrei getötet.

Die Schwanzhaut wurde mit 70 %igem EtOH desinfiziert, das zu präparierende Hautareal mit einem sterilem Skalpell (# 10) in den Schwanz eingeschnitten und dann vorsichtig vom subkutanen Binde- und Stützgewebe abgetragen. Das Hautstück wurde mit der Dermis nach unten in einer Petrischale mit 1 x PBS überführt. Zur Kultivierung wurde das Hautstück in 2 bis 4 mm große Quadrate geschnitten und diese auf sterile Milliporefilter mit der Dermis nach unten aufgebracht. Die Filter mit den Biopsien wurden in 24-Loch-Platten mit 2 ml DMEM (2 % FCS, 1 % P/S) überführt, so dass sie auf der Oberfläche des Mediums schwammen.

Nach 24 h wurde 1 ml des Mediums abgenommen und durch 1 ml frisches Medium ersetzt. Dies erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Die Dauer der Kultivierung ist bei der Beschreibung der jeweiligen Experimente angegeben (siehe Kapitel 3.1.5). Nach Ende der Kultivierung wurden die Biopsien histologisch und molekularbiologisch analysiert.

### 2.16.4 Behandlung von Zellen und Hautkulturen mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bzw. Cyclopamin (CP)

Zur Überprüfung der Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) wurden die Zellen in 96-Loch-Luminometer-Messplatten zur Proliferationsanalyse (siehe Kapitel 2.16.5) und in 6-Loch-Platten zur Expressionsanalyse (siehe Kapitel 2.15.4.2 und 2.15.4.3) für 48 h mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (5 nM, 10 nM) oder CP (5 µM) kultiviert. Die Hautkulturen wurden in 24-Loch-

---

Platten angelegt und für 10 Tage mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (5 nM, 10 nM) oder CP (10  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Da diese Substanzen in EtOH gelöst sind, wurden als Kontrollen weitere Zellen bzw. Hautkulturen mit EtOH kultiviert. Dabei wurden immer normierte Volumina der zugefügten Substanzen in Zellkulturmedien mit 2 % FCS und 1 % P/S zugegeben.

### 2.16.5 BrdU-Inkorporationsassay

Um die Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf das Proliferationsverhalten von Zelllinien (siehe Kapitel 2.10.1) und primären MB-Zellkulturen (siehe Kapitel 2.16.1) zu beobachten, wurde ein BrdU-Inkorporationsassay durchgeführt (siehe Kapitel 2.7).

Auf eine 96-Loch-Luminometer-Messplatte wurden 4.000 Zellen/Loch in dem entsprechenden Medium (siehe Kapitel 2.10.1) ausgesät und über Nacht kultiviert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , wie es in Kapitel 2.16.4 beschrieben wurde. Als Kontrollen wurden Zellen nur mit dem Lösungsmittel EtOH behandelt. Als zusätzliche Kontrolle wurden Zellen mit CP behandelt oder in Serum-freiem Medium gehalten (beides hemmt die Zellproliferation). Ansätze mit in Normalmedium gehaltenen Zellen ohne BrdU, und Ansätze ohne Zellen, aber mit BrdU, wurden zur Messung unspezifischer Hintergrundsignale verwendet.

Die Zellen wurden in Tripletten vermessen. 26 h nach Beginn der Behandlung wurden pro Loch 10  $\mu\text{l}$  BrdU (10  $\mu\text{M}$  in 1 x PBS) hinzugefügt und für weitere 22 h inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen - wie vom Hersteller beschrieben - für 30 min bei RT fixiert und die genomische DNA denaturiert, um das inkorporierte BrdU für die Immunodetektion zugänglich zu machen. Anschließend folgte die Inkubation für 1 h bei RT mit dem Peroxidase-konjugiertem Anti-BrdU-Antikörper (Anti-BrdU-POD 1:100 in Antibody Dilution Solution). Nun erfolgten drei Waschungen für je 5 min mit 1 x Waschpuffer, der anschließend sorgfältig entfernt wurde. Für die Messung im Luminometer wurde dann das Peroxidase-Substrat aus den im Reaktionssystem mitgelieferten Substratkomponenten A (Luminol/4-Iodophenol) und B (enthält eine stabilisierte Form von  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) gemischt (Verhältnis 100:1).



## **2.17 Histologische und immunhistologische Methoden**

### **2.17.1 Einbettung von Gewebe und Anfertigung von Gewebeschnitten**

Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurden die zu analysierenden Gewebe routinemäßig für zwei Tage bei RT in PFA fixiert. Vor der Paraffineinbettung wurden die Gewebe und Organe mit Hilfe eines Gewebeeinbett- und -entwässerungsautomaten entwässert und anschließend manuell in Paraffin eingegossen (Paraffinspender und Ausgießstation Tissue Block Dispenser PAG 12).

Paraffinschnitte von ca. 3 µm Dicke wurden am Schlittenmikrotom angefertigt und auf Superfrost Objektträger aufgezogen. Für HE-Färbungen wurden die Paraffinschnitte für 20 min bei 80 °C inkubiert, für immunhistologische Antikörperfärbungen und *in-situ*-Hybridisierungen über Nacht bei 37 °C getrocknet.

### **2.17.2 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung von Paraffinschnitten**

Vor einer HE-Färbung wurden Paraffinschnitte zweimal 10 min in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden EtOH-Reihe rehydriert. Die Objektträger wurden 8 min in Hämatoxylin-Lösung inkubiert und 5 min in warmem Leitungswasser gebläut. Danach wurden die Schnitte 5 min in Eosin-Lösung inkubiert und in einer aufsteigenden EtOH-Reihe dehydriert. Anschließend wurden die Präparate in Xylol überführt und mit Pertex-Montagemedium eingedeckt.

### **2.17.3 Immunhistologische Färbungen (IHC) von Paraffinschnitten**

Für diese Methode wurden auf Superfrost Objektträger aufgezogene Paraffinschnitte verwendet, die nach Anfertigung über Nacht bei 37 °C getrocknet wurden. Die Paraffinschnitte wurden anschließend in Xylol für zweimal 10 min und anschließend in einer absteigenden EtOH-Reihe und Inkubation unter fließendem destilliertem Wasser entparaffiniert und rehydriert. Zur Demaskierung der Oberflächenantigene erfolgte eine Vorbehandlung im Dampfgarer für 45 bis 60 min in Citratpuffer (pH 6,0). Dann wurden die Schnitte für 20 min bei RT abgekühlt und für zweimal 2 min in TBS-Puffer gewaschen. Im SM- und RMS-Gewebe ist die Aktivität der endogenen Peroxidasen sehr hoch. Da zur Entwicklung ein HRP (Meerrettich-Peroxidase; aus dem Englischen: horse radish peroxidase)-gekoppeltes System

verwendet wurde, wurden die endogenen Peroxidasen zunächst inhibiert. Dafür wurden die Gewebeschnitte für 20 min mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf dem Schüttler inkubiert. Die Reaktion wurde für 5 min unter fließendem destilliertem Wasser gestoppt, die Schnitte anschließend in TBS gespült und für 20 min mit 5 % FCS / 10 % BSA (Rinderserumalbumin, aus dem Englischen: bovin serum albumine; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) geblockt. Die verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 4 (siehe Kapitel 2.12.1) mit den jeweils eingesetzten Verdünnungen aufgeführt. Die primären Antikörper wurden in TBS verdünnt und die Schnitte für 1 h in einer feuchten Kammer mit der Antikörperlösung inkubiert. Zur Visualisierung wurde das EnVision Polyclonal rabbit/mouse HRP von Dako (siehe Kapitel 2.7) verwendet. Hierzu wurden die Schnitte für 30 min mit dem im EnVision Kit enthaltenen sekundären Antikörper (siehe Tabelle 5, Kapitel 2.12.2) inkubiert, anschließend zweimal für 2 min in TBS gewaschen und für etwa 10 min mit 1:50 verdünntem DAB (3,3' Diaminobenzidin)-Chromogen entwickelt. Zur besseren Übersicht wurde mit Hämalaun gegengefärbt.

#### **2.17.4 *In-situ*-Hybridisierung (ISH) von Paraffinschnitten**

Alle verwendeten Puffer, Lösungen (mit Ausnahme von TEA, STE-*in-situ*-Puffer, MBSTL und NTMLT), Pinzetten und Küvetten wurden mit Diethylpyrocarbonat (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DEPC) versetzt oder mit RNaseZap (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) behandelt.

##### **2.17.4.1 Herstellung Digoxigenin-markierter *in-situ*-Sonden**

Für die Herstellung Digoxigenin (Dig)-markierter *in-situ*-Sonden wurden 10 µg des als Sondenmatrize dienenden Plasmids mit 20 U eines geeigneten Restriktionsenzym in einem 50 µl Ansatz für 2 h bei 37 °C linearisiert. Die DNA wurde mit dem Sechsfachen an 99 %igem EtOH für 30 min bei 13.000 rpm und 4 °C gefällt, das Pellet mit 70 %igem EtOH gewaschen und in 20 µl RNase- und DNase-freiem destilliertem Wasser aufgenommen. Zur Konzentrationsabschätzung wurden 2 µl linearisierte Plasmid-DNA auf ein Agarosegel aufgetragen.

Die Markierungsreaktion mit Dig erfolgte in zwei Stufen. Zunächst wurde etwa 1 µg

---

linearisiertes Plasmid in einem 20 µl Ansatz mit 40 U der entsprechenden RNA-Polymerase, 10 x Dig RNA Labelling Mix, 5x Transkriptionspuffer und 10 mM DTT in RNase- und DNase-freiem destilliertem Wasser für 2 h bei 37 °C in RNA umgeschrieben und markiert. Zur Erhöhung der RNA-Ausbeute wurden nochmals 20 U RNA-Polymerase (T3 zur Herstellung der antisense-Sonde bzw. T7 zur Herstellung der sense-Sonde) zugesetzt, mit 10 x Dig RNA Labelling Mix, 5 x Transkriptionspuffer, 10 mM DTT und RNase- und DNase freiem destilliertem Wasser auf 30 µl aufgefüllt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 1,5 µl 0,4 M EDTA, 3,75 µl 4 M LiCl und 112,5 µl 99 %igem EtOH wurde die RNA für mindestens 30 min bei -80 °C oder über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Die durch Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C gefällte RNA wurde mit 70 %igem EtOH gewaschen und in 110 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Mittels 12,5 µl 4 M LiCl und 250 µl 99 %igem EtOH erfolgte ein zusätzlicher Fällungs- und Aufreinigungsschritt für mindestens 30 min bei -80 °C oder über Nacht bei -20 °C. Nach Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C wurde mit 70 %igem EtOH gewaschen und das Pellet in 25 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Zur Überprüfung der Transkription der Plasmid-DNA wurde 1 µl Sonde für 45 min bei 37 °C mit 1 µl RNase A (10 mg/ml) verdaut und neben 1 µl unverdauter RNA-Sonde auf ein Agarosegel aufgetragen.

Um sicher zu stellen, dass die Markierungsreaktion mit dem Dig erfolgreich war, wurde ein Dot Blot durchgeführt. Hierfür wurde eine serielle, zehnfache Verdünnung der Sonde (1 µl) mit 6 x SSC (je 9 µl) hergestellt. Je 1 µl der Verdünnungen wurde auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond-XL) aufgetragen und mittels UV-Licht fixiert. Überschüssige Bindungsstellen der Membran wurden für 5 min in 55 °C warmen 4 % BSA in Puffer-1 blockiert. Nach kurzem Waschen der Membran in NT-Puffer erfolgte die Inkubation mit der anti-Dig/AP-Antikörperlösung (1:500 in NT-Puffer) (siehe Tabelle 5 Kapitel 2.12.2) für 7 min. Die Membran wurde dreimal für 2 min in NT-Puffer gewaschen und anschließend für 3 min in NTM-Puffer umgepuffert. Die Entwicklung erfolgte mit NBT/BCIP im Dunkeln bis zur gewünschten Farbintensität (10-20 min).

Nach erfolgreichem Testen wurde der Sondenansatz mit 100 µl RNase-freiem Wasser und 100 µl Formamid zur Stabilisierung aufgefüllt. Die verwendeten *in-situ*-Sonden sind in Tabelle 6 (siehe Kapitel 2.13) aufgelistet.

#### 2.17.4.2 Durchführung der ISH

Für diese Methode wurden auf Superfrost Objektträger aufgezoogene Paraffinschnitte verwendet, die nach Anfertigung über Nacht bei 37 °C getrocknet wurden. Nach einer Inkubation der Objektträger bei 65 °C für 30 min, wurden die Paraffinschnitte in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden EtOH-Reihe rehydriert. Es folgten 5 min Inkubation in 0,83 % NaCl und PBS sowie eine Fixierung in 4 % PFA/PBS für 20 min auf Eis. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Gewebeschnitte mit Proteinase-K-Puffer für 7,5 min permeabilisiert, um der Sonde Zugang zum gesamten Gewebepräparat zu ermöglichen. Die Schnitte wurden kurz in PBS geschwenkt, erneut in 4 % PFA/PBS für 5 min auf Eis fixiert und in 0,1 M Triethanolamin, pH 8,0 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), überführt. Zur Neutralisierung freier Aminogruppen, die ein unspezifisches Binden der Sonde durch elektrostatische Wechselwirkungen vermitteln können, wurde Essigsäureanhydrid eingesetzt. Essigsäureanhydrid vermittelt die Acetylierung der Aminogruppen. Das Essigsäureanhydrid wurde in einer Konzentration von 0,25 % (v/v) hinzugefügt und die Schnitte für 10 min inkubiert. Anschließend folgten Waschungen mit 0,83 % NaCl und PBS. Als letzter Schritt vor der Hybridisierung wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden EtOH-Reihe dehydriert und an der Luft getrocknet. Die Gewebeschnitte auf einem Objektträger wurden mit Hilfe eines Barrier-Markers (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) eingegrenzt um zu verhindern, dass sich bei der Hybridisierungsreaktion die sense- und antisense- Sonden vermischen.

Die sense- und antisense-Sonden wurden 1:1.000 in Hybridisierungspuffer verdünnt, für 2 min bei 80 °C denaturiert und auf Eis gestellt. Der Hybridisierungspuffer wurde auf das Gewebe pipettiert und luftblasenfrei mit einem sauberen Deckgläschen abgedeckt. Für die Hybridisierung wurden die Gewebeschnitte in eine feuchte Kammer mit 50 % Formamid, 5 x SSC überführt und über Nacht bei 59 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger in eine Küvette mit 5 x SSC (pH 6,4) gestellt, um die Deckgläschen zu entfernen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 30 min in 5 x SSC (pH 6,4) bei 55 °C inkubiert und für 30 min in 50 % Formamid, 2 x SSC (pH 6,4) bei 63 °C gewaschen. Es folgten ein Waschschrift bei RT und 3 Waschschriftte bei 37 °C in STE-*in-situ*-Puffer für jeweils 10 min. Für die Restriktion einzelsträngiger RNA-Moleküle wurden die Schnitte mit 8 ng/ml RNase A in STE-*in-situ*-Puffer für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für

15 min mit STE-*in-situ*-Puffer bei 37 °C gespült. Danach erfolgte eine erneute Inkubation für 30 min in 50 % Formamid, 2 x SSC (pH 6,4) bei 63 °C. Dann wurden die Objektträger für 15 min bei RT in 2 x SSC (pH 6,4) und anschließend für 10 min bei RT in NT-Puffer überführt. Die Gewebeschnitte wurden 3 x 5 min mit MBSTL-Puffer gespült. Danach wurde 0,2 % I-Block/PBS zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen auf die Gewebeproben gegeben und die Objektträger für 1 h in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Anti-Dig-Fab-fragments/AP wurden 1:500 in 0,02 % I-Block in MBSTL-Puffer verdünnt und auf die Gewebeschnitte pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer.

Am folgenden Tag wurden die Objektträger 6 x für 20 min bei RT in MBSTL und 3 x 5 min in NTMLT-Puffer gewaschen. Anschließend wurden sie in eine feuchte Kammer überführt und mit BM-Purple bedeckt. Die Objektträger wurden dann bei RT so lange im Dunkeln gelagert, bis eine ausreichende Signalintensität erreicht wurde (meist für mehrere Tage). Dabei wurde täglich frisches BM-Purple auf die Gewebeschnitte gegeben. Zum Abstoppen der Färbereaktion wurden die Objektträger in Stop-Puffer und danach in PBS überführt. Zuletzt wurden sie für 1 h in 4 % PFA/0,2 % Glutaraldehyd in PBS inkubiert, mit PBS gewaschen und mit Glycergel eingedeckt.

## **2.18 Tierexperimentelle Methoden**

### **2.18.1 Zucht und Haltung von *Mus musculus***

Die verwendeten Mauslinien (siehe Kapitel 2.10.2) wurden im institutseigenen Tierstall (Gentechnischer Arbeitsbereich S1; Institut für Humangenetik, Universität Göttingen) in Makrolonkäfigen Typ I und II bei einem zwölfstündigen Hell-Dunkelrhythmus, einer Temperatur von  $20 \pm 2$  °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $50 \pm 10$  % gehalten. Pelletiertes Trockenfutter (Alleinfutter für Mäusezucht, Ssniff Spezialdiät GmbH, Soest) sowie Wasser (Leitungswasser) standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Die mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  bzw. Lösungsmittel behandelten Tieren erhielten ein spezielles Vitamin-D<sub>3</sub>-freies sowie kalzium- und phosphatreduziertes pelletiertes Trockenfutter (ssniff Experimentalfutter; E15312-14).

#### **2.18.1.1 Schwanzbiopsie und Ohrlochcode**

Schwanzbiopsien (ca. 0,2 cm der Schwanzspitze) und gleichzeitige Ohrlochmarkierungen zur Kennzeichnung von vier Wochen alten Mäusen wurden vom Tierstallpersonal im institutseigenen Tierstall vorgenommen.

#### **2.18.1.2 Genotypisierung**

Standardmäßig erfolgte die Genotypisierung von Mäusen durch PCR an gDNA (siehe Kapitel 2.15.4.1) aus Schwanzbiopsien. Die verwendeten DNA-Oligonukleotide und Konditionen sind in Kapitel 2.11.1 sowie 2.15.1 und 2.15.4.1 aufgeführt.

## **2.18.2 Injektionen und Blutabnahme zur Serumanalyse**

### **2.18.2.1 Intraperitoneale Injektion von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$**

Für die tierexperimentellen Studien (siehe Kapitel 3.2) wurde den Mäusen  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  intraperitoneal (i.p.) injiziert.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wurde in einer Konzentration von 10 µM in 99 %igem EtOH gelöst. Entsprechend dem jeweiligen Körpergewicht der Maus wurde die 10 µM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Stocklösung in einer Konzentration von 50 ng/kg bzw. 40 ng/kg pro 50 µl Injektionsvolumen in Sonnenblumenöl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) emulgiert. Diese Injektionslösung wurde bei -20 °C für maximal 1 Woche gelagert. Jeder zu

behandelnden Maus wurde täglich ein Volumen von 50 µl  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Emulsion i.p. injiziert. Für die Verabreichung wurden die Mäuse im Genick und am Rücken fixiert und 50 µl der Lösung i. p. injiziert. Für die Injektion von Kontrolltieren wurde eine entsprechende Öl-EtOH-Emulsion ohne Zugabe von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  eingesetzt.

#### **2.18.2.2 Intramuskuläre Injektion von Tamoxifen**

Um BCC in *Ptch<sup>flx/flx</sup>ERT2*-Mäusen (siehe Kapitel 2.10.2.2) zu induzieren (siehe Kapitel 3.1.5.2 und 3.2.3), wurde den Mäusen Tamoxifen i.m. injiziert. Eine Lösung von 100 mg Tamoxifen pro ml 99 %igem EtOH wurde mit sterilem Sonnenblumenöl 1:10 verdünnt, so dass die Endkonzentration 10 mg/ml betrug. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Für die Verabreichung wurden die Mäuse im Genick fixiert und 10 µl (100 µg Tamoxifen) i.m. in den *Musculus soleus* injiziert.

#### **2.18.2.3 Blutabnahmen aus dem retrobulbären Venenplexus und Gewinnung von Serum zur Bestimmung der Serum-Kalzium-Konzentration**

Die Blutabnahmen aus dem retrobulbären Venenplexus erfolgten mit angebrochenen Mikro-Hämatokrit-Kapillaren durch den Tierpflegermeister Stefan Wolf des Instituts für Humangenetik, Universität Göttingen. Die Blutproben wurden in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt und für 2 h bei 4 °C koaguliert. Anschließend wurde das Blut bei 5.000 rpm für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Serum-Überstand wurde vorsichtig abgenommen, in ein frisches 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

Von dem isolierten Serum wurde anschließend in der Abteilung Klinische Chemie, Universitätsmedizin Göttingen, mit Hilfe des Automaten zur biochemischen Serumanalyse die freie Kalziumkonzentration bestimmt.

#### **2.18.2.4 Perfusion von Mäusen mit PFA**

Die Betäubung der Maus erfolgte mit einer letalen Dosis Ketanest S (4 mg) und Rompun (0,9 mg). Zur Freilegung des Herzens wurde der Brustraum geöffnet. Das rechte Atrium wurde zur Eröffnung des Blutkreislaufs punktiert. Dann wurde der linke Ventrikel mit Hilfe eines Blutentnahme-Sets punktiert und die Blutgefäße 10 min mit Ringer-Lactat gespült. Danach wurde die Maus 10 min mit 4 % PFA

---

fixiert. Die perfundierten Mäuse wurden 2 Wochen in 4 % PFA bei 4 °C nachfixiert und bis zur Analyse bei 4 °C in 1 x PBS gelagert.

### 2.18.3 Sichtung von Tumoren und Präparation von Gewebe

Mäuse mit einer erhöhten Tumorprädisposition wurden engmaschig auf die Entstehung von Tumoren überwacht. Zur Erfassung von RMS und anderen Weichteiltumoren wurden der Rumpf und die Extremitäten zwei bis dreimal wöchentlich abgetastet, da sich die Mehrheit der RMS an den Extremitäten manifestiert. Weiterhin wurden die Tiere auf typische Symptome von MB hin untersucht. Hierzu gehören Ataxie, Abmagerung, Lethargie oder Entwicklung eines Hydrozephalus. Beim Verdacht auf ein MB wurden die Tiere umgehend schmerzfrei mittels CO<sub>2</sub>-Narkose getötet.

Bei Verdacht auf RMS wurde das Datum vermerkt und das Tier in die 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Behandlungsstudie (siehe Kapitel 3.2) aufgenommen. Am Ende der Studie oder aber bei Erreichen einer Tumorgröße von 1 cm Durchmesser wurden die Tiere schmerzfrei durch CO<sub>2</sub>-Narkose oder zervikaler Dislokation getötet.

Nach der Tötung wurde die Maus auf dem Präparationstisch fixiert und mit 70 %igem EtOH desinfiziert. Für die Entnahme des Kleinhirns wurde die Kopfhaut entfernt, die Schädelkalotte vom *Foramen magnum* ausgehend geöffnet und das Kleinhirn entnommen. Bei Weichteiltumoren wurde der Tumor freipräpariert und isoliert. Zudem wurde normales Referenzgewebe entnommen.

Für die Untersuchung von BCC (siehe Kapitel 3.1.5.2) wurden die mit Tamoxifen induzierten *Ptch*<sup>lox/flox</sup>*ERT2*-Mäuse ab dem 45. Tag nach der Induktion jeden zweiten Tag auf Tumore hin untersucht. Der Grad der Tumorausprägung wurde dokumentiert. Am 90. Tag nach Induktion, als die Tumore ihr voll ausgeprägtes Bild erreicht hatten, wurde die Maus - wie in Kapitel 2.18.2.4 beschrieben - betäubt und perfundiert.

Die histologische Abklärung aller Tumoren erfolgte anhand von HE-gefärbten Gewebeschnitten durch einen erfahrenen Pathologen (Privatdozent Dr. med. Schweyer).

Des Weiteren wurde allen mit 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> bzw. Lösungsmittel behandelten Tieren eine Niere entnommen. Die entsprechenden HE-gefärbten Schnitte wurden einem



---

Nephrologen (Prof. Dr. med. Strutz) zur Abklärung von pathologischen Veränderungen vorgelegt.

#### **2.18.4 Bestimmung des Tumorumens mittels Volumencomputertomographie (VCT)**

Das Tumorumen der RMS in der  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlungsstudie (siehe Kapitel 3.2.2) wurde mittels eines fpVCT (siehe Kapitel 2.4) für kleine Tiere wie Nager bestimmt. Die mit Isofluran (1,5 – 2 %) narkotisierten Tiere wurden mit 125 Bildern/s gescannt (Dullin *et al.* 2007). Das Vorgehen erfolgte wie bei Missbach-Guentner *et al.* (2007) beschrieben. Zur Visualisierung der Weichgewebstumoren gegenüber dem umliegenden Gewebe wurde den Tieren 30 s vor der Bildaufnahme 200  $\mu\text{l}$  des Kontrastmittels Ultravist-300 in die Schwanzvene bzw. 175  $\mu\text{l}$  Ultravist-150 in den retrobulbären Venenplexus verabreicht.

Die Auswertung und Bestimmung der Tumorumgröße wurde an einer AW4.2 workstation mit der voxtools v5.5.4 Software durchgeführt. Hierfür wurde die Methode „Segmentierung und Volumetrie“ benutzt, bei dem es sich um eine Variante des „Region-Growing“-Algorithmus handelt.

Zur Bestimmung der Tumorumwachstumsrate wurde das Tumorumen der einzelnen Tiere vor, während und am Ende des Behandlungszeitraumes und in den Beobachtungskohorten nach einem therapiefreien Beobachtungszeitraum vermessen.

#### **2.18.5 Statistische Auswertung der $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlungsstudie an RMS-tragenden Mäusen**

Das Tumorumwachstum von RMS *in vivo* (siehe Kapitel 3.2.2) wurde als Logarithmus der Tumorumgröße am Ende des Behandlungs- oder Beobachtungszeitraumes relativ zur Ausgangsgröße vor Therapiebeginn definiert. Der Effekt der applizierten Substanzen ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder Lösungsmittel) auf die Größenprogression wurden berechnet und innerhalb des ANOVA Modells getestet. Signifikanzwerte (p-Werte) für die Gruppeneffekte wurden mit multiplen Testen nach Tukeys Methode adjustiert. Das Signifikanzniveau  $\alpha$  wurde auf 5 % festgelegt. Die statistischen Analysen wurden von Herrn Rosenberger, Genetische Epidemiologie der Universität Göttingen, durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

Entsprechend der in Kapitel 1.3 beschriebenen Hypothese ist es möglich, dass *Ptch*-mutante Zellen  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  nicht mehr in den extrazellulären Raum transportieren können. Dadurch kann Smo nicht mehr inhibiert werden, wodurch der Hh-Signalweg aktiviert wird. Dies führt zu einer starken Zellproliferation und zur Tumorigenese. Falls diese Hypothese zutrifft, dann sollte es möglich sein, den Hh-Signalweg durch exogene Gabe von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zu inhibieren. Weiterhin sollte die exogene Gabe von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zur Aktivierung von Vdr-Zielgenen führen. Hierdurch sollten Proliferation von Zellen unterdrückt und eventuell die Zelldifferenzierung und Apoptose gefördert werden (siehe Kapitel 1.7).

Niemann (AG Hahn) konnte bereits zeigen, dass die Hh-Signalkaskade in RMS-Primärkulturen von *Ptch*-mutanten Mäusen tatsächlich durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  gehemmt wird. Dies wurde durch die verminderte Transkription eines der Zielgene der aktiven Hh-Signalkaskade, *Gli1*, deutlich. Dieser inhibierende Effekt von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ist ähnlich dem des Smo-Inhibitors CP. Weiterhin konnte Niemann zeigen, dass die Aktivität der Vdr-Signalkaskade in RMS-Primärkulturen durch eine Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , wie erwartet, aktiviert wird. Dies wurde deutlich durch eine erhöhte *Cyp24a1*-Expression, welches ein Zielgen der Vdr-Signalkaskade ist. Des Weiteren wurde gezeigt, dass sowohl  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  als auch Vitamin  $\text{D}_3$ , welches eine Vorstufe von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ist, die Proliferation von kultivierten RMS Zellen hemmen.

Unklar war jedoch, ob  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auch in anderen *Ptch*-assoziierten Tumorzellen eine Blockade der Hh-Signalkaskade und eine Aktivierung der Vdr-Signalkaskade und damit verbundenen Änderungen von Proliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose hervorruft.

Diese Untersuchungen wurden nun im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Hierzu wurden die RMS-Zelllinien TP1588 und TP5014, sowie die MB-Zelllinien MB627, MB723 und MB794 als auch die BCC-Zelllinie ASZ001 verwendet. Zusätzlich dazu wurde auch der Effekt einer  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung an *in-vitro*-kultivierten MB-Zellen aus *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen und BCC- sowie Normalhautkulturen von *Ptch*<sup>flax/flax</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Mäusen analysiert.

Im Anschluss folgten Behandlungsstudien mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  an RMS- und BCC-tragenden Mäusen, um die Wirkung *in vivo* zu analysieren.

---

### 3.1 Expressionsanalysen und Proliferationsverhalten von Tumorzelllinien und Primärkulturen von Tumoren nach $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung

#### 3.1.1 Analysen von murinen RMS-Zelllinien

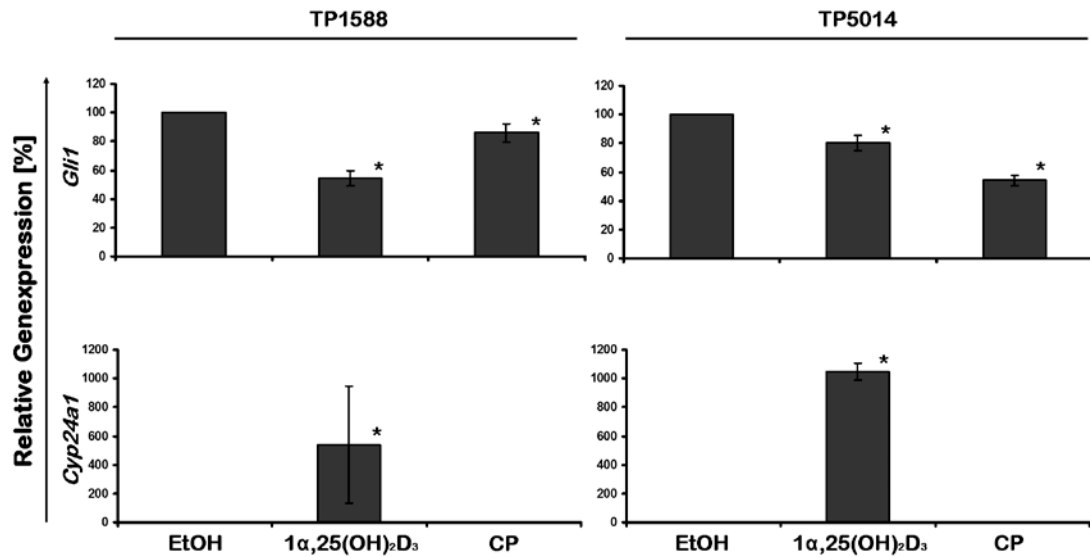
Die RMS-Zelllinien, TP1588 und TP5014, wurden von T. Pietsch (Institut für Neuropathologie, Universität Bonn) aus RMS von *Ptch*<sup>neo12/+</sup>-Mäusen (Goodrich *et al.* 1997) generiert. Diese Zellen sind ein gutes Modell für *Ptch*-assoziierte RMS und sind wesentlich einfacher zu handhaben als RMS-Primärkulturen.

Zunächst wurde untersucht, ob  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , wie bereits für RMS-Primärkulturen gezeigt, auch in den TP1588 und TP5014 Zellen die Hh-Signalkaskade blockiert und den Vdr-Signalweg aktiviert.

Um den Aktivierungsstatus der Hh-Signalkaskade zu untersuchen, wurde die Expression von *Gli1* bestimmt. Hierzu wurden TP1588 und TP5014 Zellen mit 10 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelt. Als Kontrollen wurden 5  $\mu\text{M}$  CP, ein anerkannter Inhibitor der Hh-Signalkaskade, oder das Lösungsmittel eingesetzt. Nach Ablauf von 48 h wurde die RNA der Zellen isoliert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR die *Gli1*-Expression quantifiziert.

Die Zellen wurden für jedes Einzelexperiment in Doppelansätzen mit den Substanzen inkubiert. Die Expression von *Gli1* jedes Ansatzes wurde in Triplikaten vermessen. Insgesamt wurden die Analysen in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

Wie Abbildung 6 zeigt, wurde die *Gli1*-Expression in beiden Zelllinien durch die Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und CP im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Ethanol; EtOH) signifikant gehemmt. Dabei wurde die *Gli1*-Expression in der Zelllinie TP1588 durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  stärker gehemmt als unter CP-Behandlung. Bei der Zelllinie TP5014 war es umgekehrt.



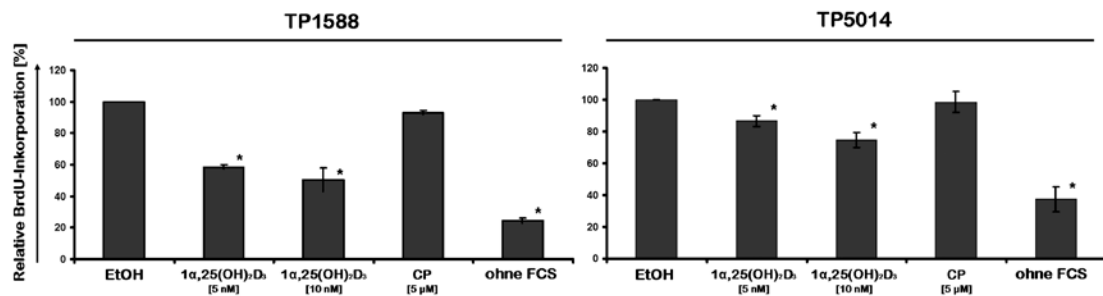
**Abbildung 6: Quantifizierung der *Gli1*- und der *Cyp24a1*-Expression zur Bestimmung der Aktivität des Hh- und Vdr-Signalwegs in den RMS-Zelllinien TP1588 und TP5014 nach Behandlung mit 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ .** Den Kulturmedien der Zellen wurde 10 nM 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  oder 5  $\mu$ M CP zugegeben. Nach 48 h wurde die RNA isoliert und revers transkribiert. Die *Gli1*- und *Cyp24a1*-Expression wurde auf die endogene Expression der 18S rRNA normalisiert. Die Werte sind in Relation zur entsprechenden Lösungsmittelkontrolle (Ethanol; EtOH; = 100 %) angegeben. Beide Zelllinien zeigen eine signifikante Reduktion der *Gli1*-Expression unter Behandlung mit 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  als auch mit CP, wogegen die *Cyp24a1*-Expression ausschließlich unter Behandlung mit 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  induziert wird. Die gegenüber der Lösungsmittelkontrolle signifikanten Werte ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Sternchen (\*) markiert. Abkürzungen: CP, Cyclopamin; EtOH, Ethanol.

Um die Aktivierung des Vdr-Signalweges durch 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  in den RMS-Zelllinien zu analysieren, wurde die Expression des Vdr-Zielgens *Cyp24a1* untersucht, welche durch eine aktive Vdr-Signalkaskade stimuliert wird (siehe Kapitel 1.5).

Abbildung 6 zeigt die Expressionsanalyse von *Cyp24a1*. Durch die Behandlung mit 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  wurde eine starke *Cyp24a1*-Expression sowohl in TP1588 als auch in TP5014 induziert. Dagegen wurde die Expression weder durch Behandlung mit dem Smo-Antagonisten CP noch mit dem Lösungsmittel EtOH beeinflusst. Dieses Ergebnis konnte in zwei weiteren Analysen bestätigt werden (nicht gezeigt).

Da eine aktive Hh-Signalkaskade die Zellproliferation fördert, sollte die 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ -vermittelte Hemmung der Hh-Signalkaskade antiproliferativ wirken. Um dies zu untersuchen, wurden BrdU-Inkorporationsassays durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen wie unter Kapitel 2.16.4 beschrieben mit 5 nM und 10 nM 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  bzw. 5  $\mu$ M CP kultiviert und mit BrdU (siehe Kapitel 2.16.5) inkubiert und analysiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit CP oder Lösungsmittel

behandelt, oder in FCS-freiem Medium kultiviert. Jedes Einzelexperiment wurde in Triplikaten durchgeführt. Insgesamt wurde das Proliferationsverhalten von der Zelllinie TP1588 in sechs und das von der Zelllinie TP5014 in vier unabhängigen Experimenten untersucht. In Abbildung 7 ist die Proliferationsrate im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Inkubation mit EtOH; = 100%) gezeigt.



**Abbildung 7: Bestimmung der Proliferationsrate der RMS-Zelllinien TP1588 und TP5014 in Gegenwart von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Den Kulturmedien der Zellen wurde 5 bzw. 10 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder 5  $\mu\text{M}$  CP zugegeben. Die Zugabe von BrdU erfolgte nach 26 h. Nach einer Gesamtinkubationszeit von 48 h wurde die BrdU-Inkorporation gemessen. Dargestellt ist die prozentuale BrdU-Inkorporation bezogen auf die mit Lösungsmittel (EtOH; = 100 %) behandelten Kontrollansätze. Die Kultivierung von Zellen ohne FCS wurde als Kontrolle (Proliferationshemmung) eingesetzt.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  hat einen deutlichen proliferationshemmenden Einfluss auf die analysierten Zellen, wogegen dies durch CP nicht zu beobachten ist. Die gegenüber der Lösungsmittelkontrolle signifikanten Werte ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Sternchen (\*) markiert. Abkürzungen: CP, Cyclopamin; EtOH, Ethanol; FCS, fötales Kälberserum.

Abbildung 7 zeigt, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die Proliferation beider RMS-Zelllinien signifikant inhibiert, während CP keine signifikante antiproliferative Wirkung auf die Zelllinien besitzt.

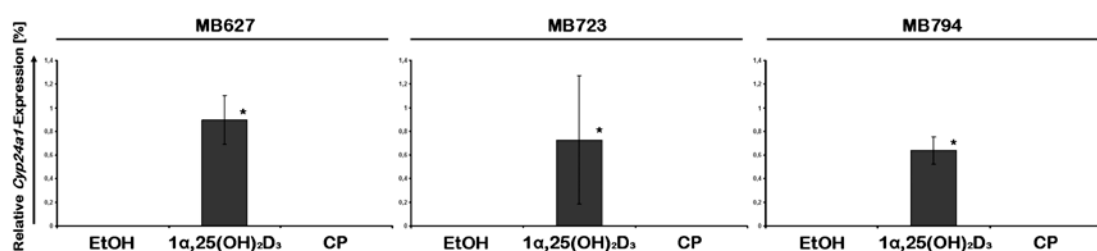
Die Proliferation der Zelllinie TP1588 wurde durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  stärker gehemmt als die der Zelllinie TP5014. Die Proliferationsrate von TP1588-Zellen sank unter Behandlung mit 5 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf 58 % des Kontrollwertes (EtOH) und nach Inkubation mit 10 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sogar auf 50 % des Kontrollwertes. Auch in den TP5014-Zellen fiel die Proliferationsrate unter der Behandlung mit 5 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf 87 % und mit 10 nM auf 75 % des Kontrollwertes (EtOH). Dagegen zeigte CP keine antiproliferative Wirkung auf die Zellen.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die Hh-Signalkaskade in beiden RMS-Zelllinien durch die Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inhibiert wird, wogegen der Vdr-Signalweg aktiviert wird. Dies geht mit einer Hemmung der Proliferation einher. CP

dagegen hat nur einen moderaten Einfluss auf die *Gli1*-Expression, nicht aber auf die Proliferation.

### 3.1.2 Analysen von murinen MB-Zelllinien

Zusätzlich zu den RMS-Zelllinien wurde die Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auch an den MB-Zelllinien MB627, MB723 und MB794 untersucht. Diese sind von P. Hernaiz Driever (Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie/Hämatologie, Charité Virchow) aus *Ptch*<sup>neo67/+</sup> *CD1*-Mäusen generiert worden. Für diese Analysen wurden die Zellen mit 10 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder mit 5  $\mu\text{M}$  CP für 48 h inkubiert. Wie Abbildung 8 zeigt, wurde durch die Gabe von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in allen Zelllinien die *Cyp24a1*-Expression induziert. Dagegen hatten sowohl CP als auch das Lösungsmittel EtOH keinen Effekt auf die *Cyp24a1*-Expression. Dieses Ergebnis war auch in einem Wiederholungsexperiment nachweisbar und zeigt, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in allen drei Zelllinien eine Aktivierung der Vdr-Signalkaskade hervorruft. Dagegen variierte das *Gli1*-Expressionslevel in den Einzelexperimenten unter  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  so stark, dass sich keine eindeutige Aussage über den Aktivierungszustand der Hh-Signalkaskade treffen ließ. Unter der Gabe von CP zeigten sich für MB723 und MB794 signifikant reduzierte *Gli1*-Expressionslevel (Daten nicht gezeigt).

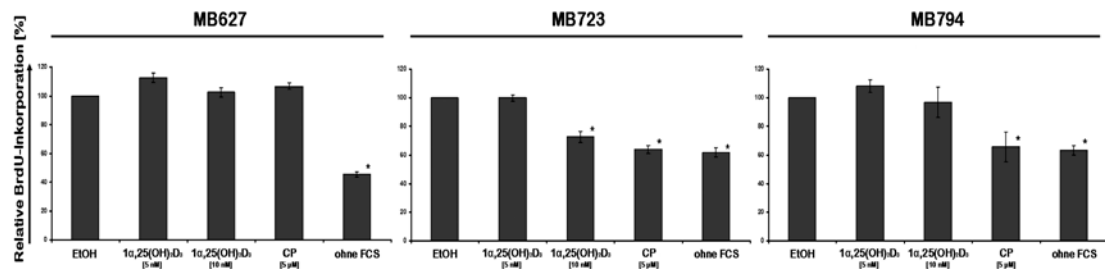


**Abbildung 8: Quantifizierung der *Cyp24a1*-Expression in den MB-Zelllinien MB627, MB723 und MB794 nach Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Nach einer Behandlung mit 10 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wiesen alle drei analysierten Zelllinien eine starke Expression von *Cyp24a1* auf. Dies ist nach Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  CP nicht zu beobachten. Die gemessenen Werte wurden auf die endogene Expression der *18S* rRNA normalisiert. Die Werte sind im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (EtOH; = 0) angegeben. Die gegenüber der Lösungsmittelkontrolle signifikanten Werte ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Sternchen (\*) markiert. Abkürzungen: CP, Cyclopamin; EtOH, Ethanol.

Als nächstes wurde untersucht, ob  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der MB-Zelllinien besitzt. Dazu wurden BrdU-

Inkorporationsassays an den Zellen nach Behandlung mit 5 oder 10 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder 5  $\mu\text{M}$  CP durchgeführt.

Abbildung 9 zeigt das Proliferationsverhalten der Zelllinien 48 h nach der Inkubation mit den Substanzen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (EtOH). Als Kontrolle für Proliferationshemmung wurden die Zellen auch in Medium ohne Zusatz von FCS kultiviert.



**Abbildung 9: Bestimmung der Proliferationsrate der MB-Zelllinien MB627, MB723 und MB794 in Gegenwart von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Dargestellt ist die prozentuale BrdU-Inkorporation bezüglich der mit Lösungsmittel (EtOH; = 100 %) behandelten Kontrollansätze nach 48 h Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder CP. Die Kultivierung von Zellen ohne FCS wurde als Kontrolle (Proliferationshemmung) eingesetzt.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  hemmt bei einer Konzentration von 10 nM nur die Proliferation der Zelllinie MB723. Dagegen hemmt CP die Proliferation von sowohl Zelllinie MB723 als auch MB794. Die gegenüber der Lösungsmittelkontrolle signifikanten Werte ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Sternchen (\*) markiert. Abkürzungen: CP, Cyclopamin, EtOH, Ethanol.

Abbildung 9 verdeutlicht, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  lediglich die Proliferation der Zelllinie MB723 signifikant hemmte. CP dagegen hatte einen signifikanten antiproliferativen Effekt auf die Zelllinien MB723 und MB794. In der Zelllinie MB627 wurde weder durch CP noch durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  eine Proliferationshemmung hervorgerufen. Diese Experimente wurden zweimal wiederholt und ergaben vergleichbare Ergebnisse.

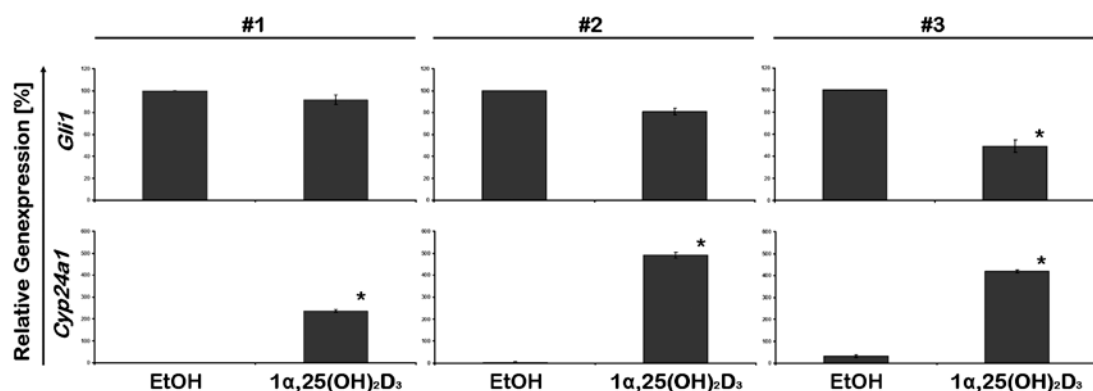
Diese Ergebnisse zeigen, dass die drei untersuchten MB-Zelllinien unterschiedlich auf  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und CP reagieren. So wird in allen drei Zelllinien der Vdr durch Inkubation mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aktiviert. Eine Aussage zur Hemmung der *Gli1*-Expression ist nicht möglich. Lediglich in der Zelllinie MB723 wird eine antiproliferative Wirkung durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  hervorgerufen. Eine Inkubation mit CP dagegen führte zur Hemmung der *Gli1*-Expression und Proliferation in den Zelllinien MB723 und MB794.

### 3.1.3 Analysen von MB-Primärkulturen aus *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen

Die Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf die Aktivität des Hh-Signalweges und die Expression des Vdr-Zielgens *Cyp24a1* wurde auch an MB-Primärkulturen aus *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen untersucht.

Zunächst wurden MB-Zellen, wie unter Kapitel 2.16.2 beschrieben, aus MB-tragenden *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen isoliert und kultiviert. Danach wurden die Zellen mit 10 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  für 48 h inkubiert. Insgesamt wurde die Analyse drei Mal an drei unabhängigen MB-Zellkulturen durchgeführt. Jedes Experiment wurde in Duplikaten durchgeführt und die jeweiligen Proben in Triplikaten vermessen.

Wie Abbildung 10 zeigt, konnte in den Einzelexperimenten eine Hemmung des Hh-Signalwegs (verminderte *Gli1*-Expression) beobachtet werden, welche im dritten Experiment signifikant war. Daneben wurde durch die  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung auch die *Cyp24a1*-Expression induziert (siehe Abbildung 10). Die Behandlung mit dem Lösungsmittel EtOH führte erwartungsgemäß zu keiner Induktion der *Cyp24a1*-Expression.

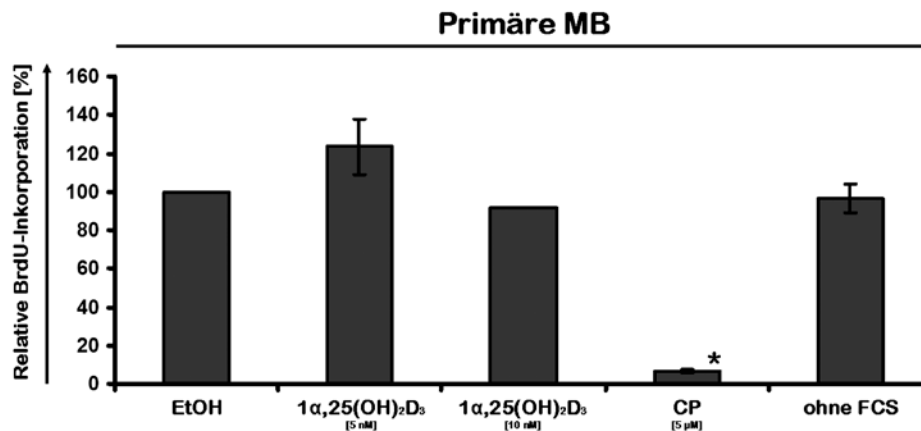


**Abbildung 10: Quantifizierung der *Gli1*- und *Cyp24a1*-Expression zur Bestimmung der Aktivität des Hh- und des Vdr-Signalweges in primär kultivierten MB-Zellkulturen nach Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Es wurden drei unabhängige primäre MB-Zellkulturen (#1, #2, #3) angelegt und analysiert. Den Kulturmedien der Zellen wurde 10 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zugegeben. Nach 48 h wurde die RNA isoliert und revers transkribiert. Die *Gli1*- und *Cyp24a1*-Expression wurde auf die endogene Expression der *18S* rRNA normalisiert. Die Werte sind in Relation zur entsprechenden Lösungsmittelkontrolle (EtOH; = 100 %) angegeben. Die gegenüber der Lösungsmittelkontrolle signifikanten Werte ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Sternchen (\*) markiert. Die *Gli1*-Expression wurde nur in der Zellkultur #3 durch 10 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  signifikant reduziert. Die *Cyp24a1*-Expression ist in allen drei Zellkulturen signifikant erhöht. Abkürzungen: EtOH, Ethanol.

Zusätzlich wurde das Proliferationsverhalten der MB-Primärkulturen nach  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung analysiert. Wie Abbildung 11 zeigt, hat  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle keinen eindeutigen antiproliferativen



Effekt. Ein Effekt blieb jedoch auch unter FCS-freien Bedingungen aus. Dagegen ließ sich die Proliferation durch CP sehr gut hemmen.



**Abbildung 11: Bestimmung der Proliferationsrate kultivierter MB-Zellen in Gegenwart von 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ .** Dargestellt ist die prozentuale BrdU-Inkorporation bezüglich der mit Lösungsmittel (EtOH; = 100 %) behandelten Kontrollansätze nach 48 h Behandlung. Die Kultivierung von Zellen ohne FCS wurde als Kontrolle für minimale Proliferation und BrdU-Inkorporation eingesetzt. Die gegenüber der Lösungsmittelkontrolle signifikanten Werte ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Sternchen (\*) markiert. 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  hat keinen signifikanten proliferationshemmenden Einfluss auf die analysierten Zellen. Dagegen blockt CP die Proliferation. Abkürzungen: CP, Cyclopamin, EtOH, Ethanol; FCS, fötales Kälberserum.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass sich in MB-Primärkulturen im allgemeinen der Hh-Signalweg durch die Gabe von 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  inhibieren, und der Vdr-Signalweg aktivieren lässt. Eine antiproliferative Wirkung wird jedoch nicht hervorgerufen.

Bei den Expressionsanalysen wurde aufgrund der geringen Zellzahlen, die nach Isolation aus den Tumoren zu Verfügung standen, auf Kontrollansätze mit CP-Behandlung verzichtet. Jedoch ist bekannt, dass CP die Hh-Signalkaskade von kultivierten MB-Zellen effektiv hemmt (Ecke *et al.* 2008). Dies geht – wie in Abbildung 11 gezeigt – mit einer antiproliferativen Wirkung einher.

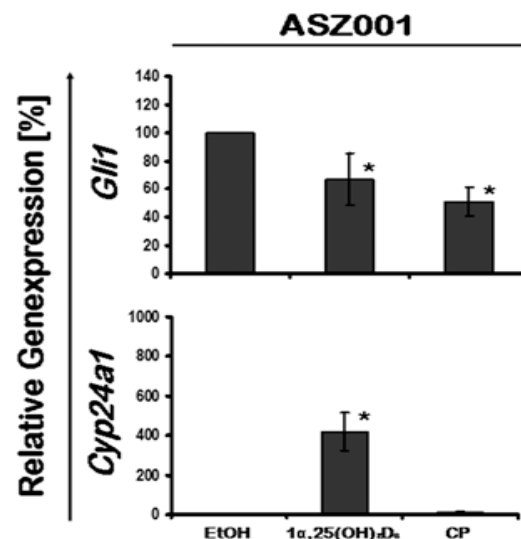
### 3.1.4 Analysen der BCC-Zelllinie ASZ001

Die Wirkung von 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  wurde auch an der stabilen BCC-Zelllinie ASZ001 aus *Ptch1*<sup>neo12/+</sup>-Mäusen (So *et al.* 2006) untersucht. Die Zellen wurden mit 10 nM 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  oder 5  $\mu$ M CP für 48 h inkubiert. Dann wurde die Expression von *Gli1* und *Cyp24a1* untersucht. Wie auch bei den vorangehenden Experimenten, wurde jedes Einzelexperiment in Duplikaten durchgeführt und die jeweiligen Proben

in Triplikate vermessen. Insgesamt wurde die Analyse in vier unabhängigen Experimenten durchgeführt.

Wie Abbildung 12 zeigt, wurde in den ASZ001-Zellen eine signifikante Hemmung der *Gli1*-Expression durch Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (EtOH) hervorgerufen. Die Behandlung mit CP führte ebenfalls zu einer signifikanten Hemmung der *Gli1*-Transkription.

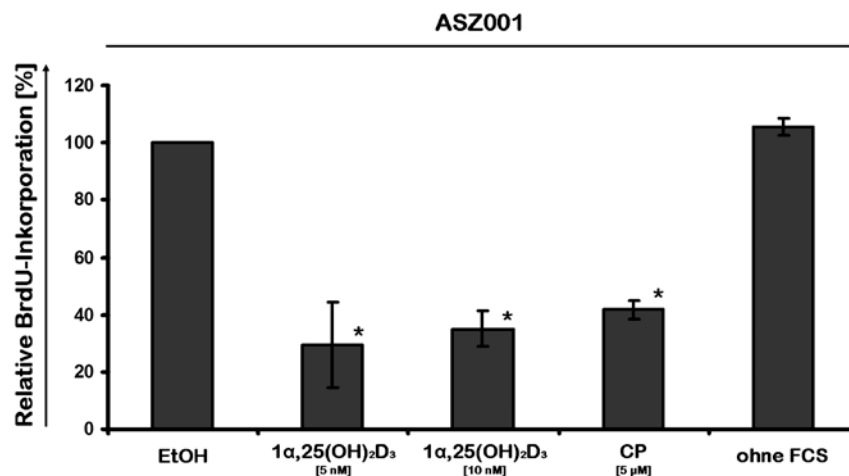
Darüber hinaus zeigten die gegenüber der Lösungsmittelkontrolle erhöhten Expressionslevel von *Cyp24a1*, dass die Gabe von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  den Vdr-Signalweg aktiviert. Mit CP dagegen konnte ein solcher Effekt nicht ausgelöst werden. Dieses Ergebnis war auch in drei Wiederholungsexperimenten nachweisbar.



**Abbildung 12: Quantifizierung der *Gli1*- und *Cyp24a1*-Expression zur Bestimmung der Aktivität des Hh- und des Vdr-Signalweges in der BCC-Zelllinie ASZ001 nach Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Den Kulturmedien der Zellen wurde 10 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder 5  $\mu\text{M}$  CP als Kontrollsubstanz zugegeben. Nach 48 h wurde die RNA isoliert und revers transkribiert. Die *Gli1*- und *Cyp24a1*-Expression wurde auf die endogene Expression der *18S* rRNA normalisiert. Die Werte sind in Relation zur entsprechenden Lösungsmittelkontrolle (EtOH; = 100 %) angegeben und signifikante Unterschiede durch Sternchen (\*) gekennzeichnet. Die Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  führt zu einer signifikanten Reduktion der *Gli1*-Expression begleitet von einer signifikant verstärkten *Cyp24a1*-Expression. Eine deutliche Reduktion der *Gli1*-Expression wird ebenfalls durch CP ausgelöst, welches jedoch keine signifikante Änderung der *Cyp24a1*-Expression hervorruft. Abkürzungen: CP, Cyclopamin; EtOH, Ethanol.

Um die Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf das Proliferationsverhalten von ASZ001-Zellen zu untersuchen, wurden BrdU-Inkorporationsassays durchgeführt. Hierzu wurden 5 bzw. 10 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder 5  $\mu\text{M}$  CP dem Kulturmedium zugefügt.

In Abbildung 13 ist die prozentuale BrdU-Inkorporation 48 h nach der Inkubation mit den Substanzen abgebildet. Die Proliferation der ASZ001-Zellen wurde durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  signifikant gehemmt. Dabei ist die Hemmung ähnlich derjenigen, die durch CP hervorgerufen wurde. Dagegen rief das Wachstum in FCS-freiem Medium keine Veränderung im Proliferationsverhalten hervor. Diese Analyse wurde viermal wiederholt und ergab vergleichbare Ergebnisse.



**Abbildung 13: Bestimmung der Proliferationsrate der BCC-Zelllinie ASZ001 in Gegenwart von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Dargestellt ist die prozentuale BrdU-Inkorporation bezüglich der mit Lösungsmittel (EtOH, = 100 %) behandelten Kontrollansätze nach 48 h Behandlung. Kultivierte Zellen ohne FCS-Zusatz wurden als Kontrolle (Proliferationshemmung) mitgeführt. Die gegenüber der Lösungsmittelkontrolle signifikanten Werte ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Sternchen (\*) markiert. Sowohl  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  als auch CP haben einen proliferationshemmenden Einfluss, wogegen die Zellen in FCS-freiem Medium keine Veränderung der Proliferationsrate zeigten. Abkürzungen: CP, Cyclopamin; EtOH, Ethanol; FCS, fötales Kälberserum.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die Hh-Signalkaskade in der BCC-Zelllinie ASZ001 hemmt und den Vdr-Signalweg aktiviert. Dies geht mit einer antiproliferativen Wirkung einher. Verglichen mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  hatte CP eine stärkere Wirkung auf die Hemmung der Hh-Signalkaskade, jedoch einen geringeren Effekt auf die Proliferationshemmung.

### 3.1.5 Analysen von murinen BCC-Hautkulturen

#### 3.1.5.1 Etablierung von *in-vitro*-Hautkulturen

Um die Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf BCC- und Normalhautstanzen in Zellkultur zu untersuchen, musste zunächst die Kultivierungsmethode etabliert werden. Hierzu wurde Haut von wt-Mäusen verwendet (siehe Kapitel 2.16.3). Die Schwanzhaut von zwei Mäusen wurde in 2 bis 4 mm große Stücke geschnitten und in Kultur genommen. Die Hautstücke wurden entweder in DMEM mit 2 % FCS oder in DMEM mit 10 % FCS kultiviert. Um festzustellen, wie lange die Hautstücke kultiviert werden können, wurden die Hautstücke nach 5, 8, 10, 12 oder erst nach 14 Tagen in 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Hautstücke in Paraffin eingebettet und mit HE gefärbt.

Durch die histologische Begutachtung der HE-gefärbten Schnitte wurde festgestellt, dass bei der Kultivierung der Stanzen in DMEM mit 2 % FCS für maximal 10 Tage keine Zelluntergänge und keine Hyperkeratosen auftreten. Diese Kultivierungsbedingungen wurden daher für nachfolgende Experimente beibehalten.

#### 3.1.5.2 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung von BCC- und Normalhautkulturen

Zur Induktion von BCC, wurden Mäuse der Linie *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2* im Alter von 10 Wochen mit einer Dosis von 100 µg Tamoxifen i.m. in den *Musculus soleus* injiziert (siehe Kapitel 2.18.2.2). Diese Mäuse entwickeln BCC an der unbehaarten Haut von Ohren und Schwanz. Schon 45 Tage nach der Injektion sind BCC-Vorläuferläsionen an der interfollikulären und follikulären Epidermis histologisch erkennbar. Innerhalb von weiteren 45 Tagen entwickeln sich diese Vorläuferläsionen zu vollausgebildeten BCC (siehe Abbildung 14 und 15; Zibat *et al.* 2009).

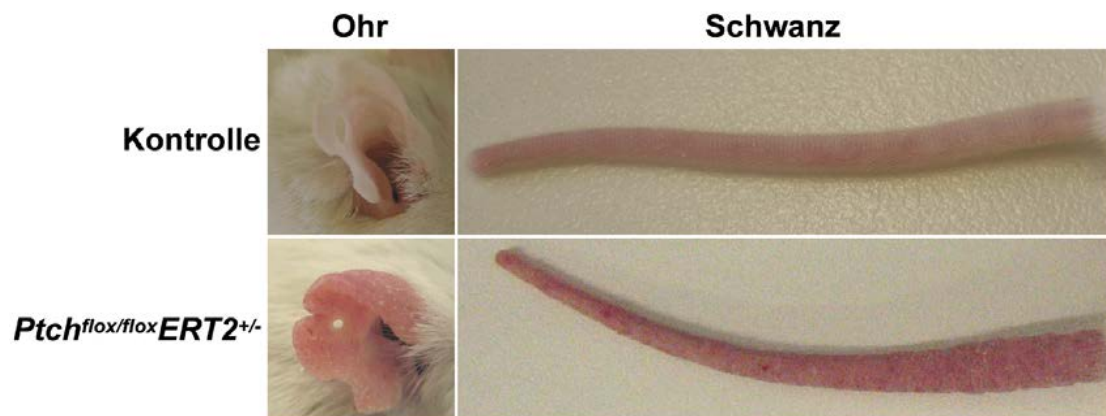
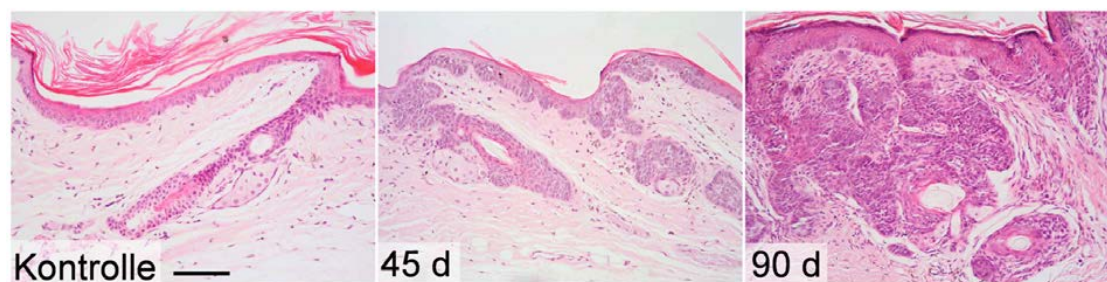


Abbildung 14: Induktion von BCC an Ohr- und Schwanzhaut in *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Mäusen nach i.m. Injektion von 100 µg Tamoxifen. Dargestellt sind die Ohren und Schwänze einer *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Maus zehn

Wochen nach der i.m. Injektion von 100 µg Tamoxifen und einer Lösungsmittel-behandelten Kontrollmaus. (aus: Nitzki 2008, Seite 86)



**Abbildung 15: Induktion von BCC in  $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ -Mäusen nach i.m. Injektion von 100 µg Tamoxifen.** Dargestellt sind HE-Färbungen der Schwanzhaut von  $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ -Mäusen 45 und 90 Tage nach der i.m. Tamoxifen-Injektion und einer Lösungsmittel-behandelten  $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ -Maus (Kontrolle). Der Balken entspricht 1 mm im Präparat. Abkürzung: d, Tage. (aus: Zibat *et al.* 2009, Seite 923)

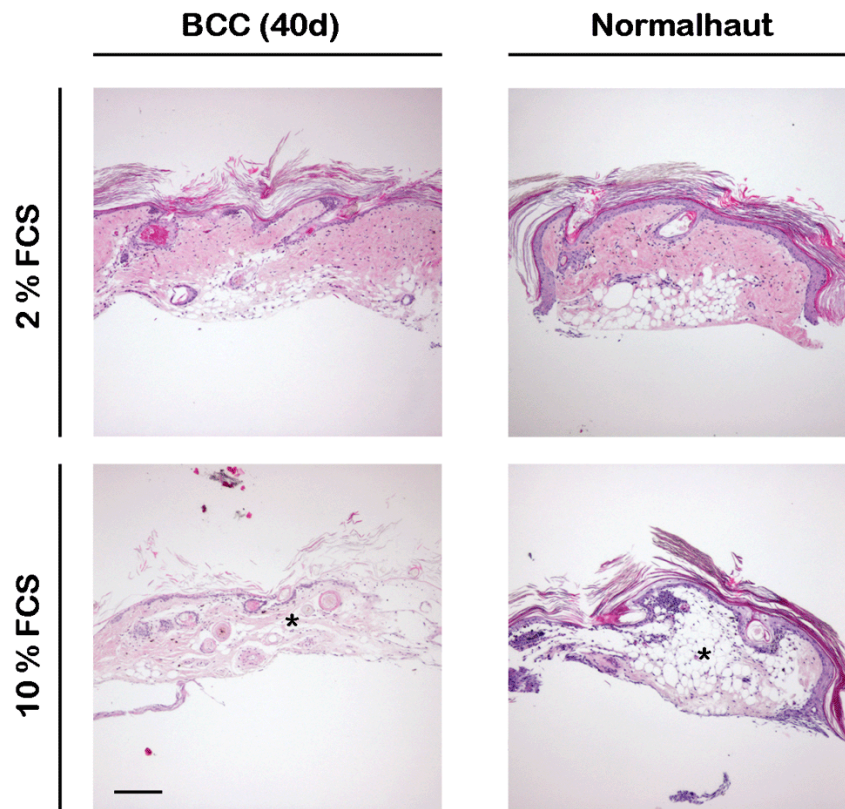
Für die Analyse der Effekte von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf BCC-Hautkulturen wurde die Schwanzhaut von BCC-tragenden Mäusen zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Induktion der BCC (siehe Tabelle 9) isoliert und für je 10 Tage kultiviert (siehe Kapitel 2.16.3). Während dieses Zeitraumes wurden die Stansen mit 10 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder 10 µM CP behandelt. Die Haut von wt-Mäusen des gleichen genetischen Hintergrundes diente als Normalhaut-Kontrolle. In Tabelle 9 ist die Einteilung der Kohorten dargestellt.

<b>Zeitpunkt der Kultivierung nach Induktion mit Tamoxifen</b>	<b>BCC-tragende Haut</b>	<b>Normalhaut</b>
30. Tag	2 Mäuse	2 Mäuse
40. Tag	3 Mäuse	3 Mäuse
60. Tag	2 Mäuse	2 Mäuse

**Tabelle 9: Aufteilung der Kohorten zur *in-vitro*-Behandlung von BCC-tragender Haut und Normalhaut mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Aufgeführt sind 6 Kohorten, zu jeweils 2 bis 3 Tieren unterteilt in BCC-tragende und Normalhaut-Kohorte. Die Kultivierung wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach der BCC-Induktion durch Tamoxifen vorgenommen.

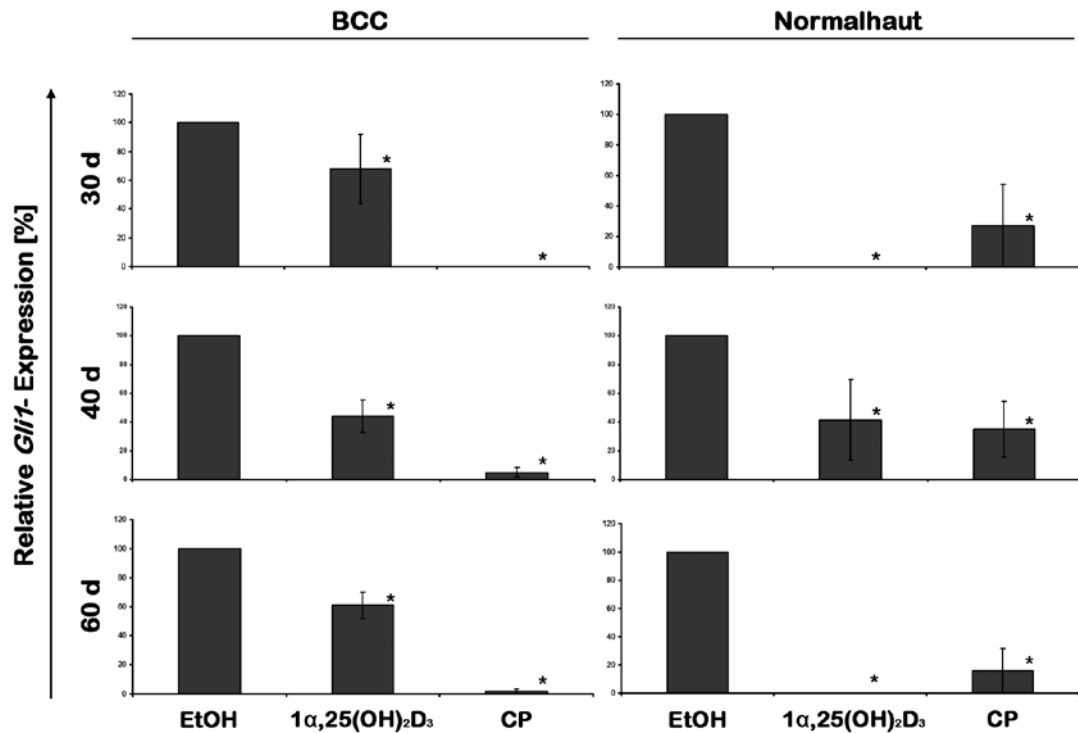
Anschließend wurde ein Teil der Hautstücke bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  für molekularbiologische Analysen eingefroren. Der andere Teil der Hautstücke wurden in 4 % PFA fixiert und für HE-Färbungen verwendet.

Durch histologische Begutachtung der HE-gefärbten Hautstücke wurde die Vitalität der Hautstücke nach der Kultivierung sichergestellt. Abbildung 16 zeigt, dass nach Kultivierung in 2 % FCS für 10 Tage sowohl BCC- als auch Normalhaut vital sind, wogegen die Kulturen in 10 % FCS Gewebeauflockerungen und Zelluntergänge aufweisen.



**Abbildung 16: HE-Färbungen von BCC- und Hautkulturen nach 10 Tagen Inkubation in DMEM mit unterschiedlichen FCS-Konzentrationen.** HE-gefärbte BCC-Kulturen einer *Ptch<sup>lox/lox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Maus 40 Tage nach der Induktion der BCC (links) und einer Kontrollhaut einer *Ptch<sup>lox/lox</sup>ERT2<sup>-/-</sup>*-Maus. Die Hautkulturen wurden für 10 Tage im Medium mit 2 % oder 10 % FCS kultiviert. Die Hautkulturen in 2 % FCS sind nach 10 Tagen Kultivierung vital, während die Kulturen in 10 % FCS Gewebeauflockerungen und Zelluntergänge (Sternchen; \*) aufweisen. Der Balken entspricht 1 mm im Präparat. Abkürzung: d, Tage; FCS, fötales Kälberserum.

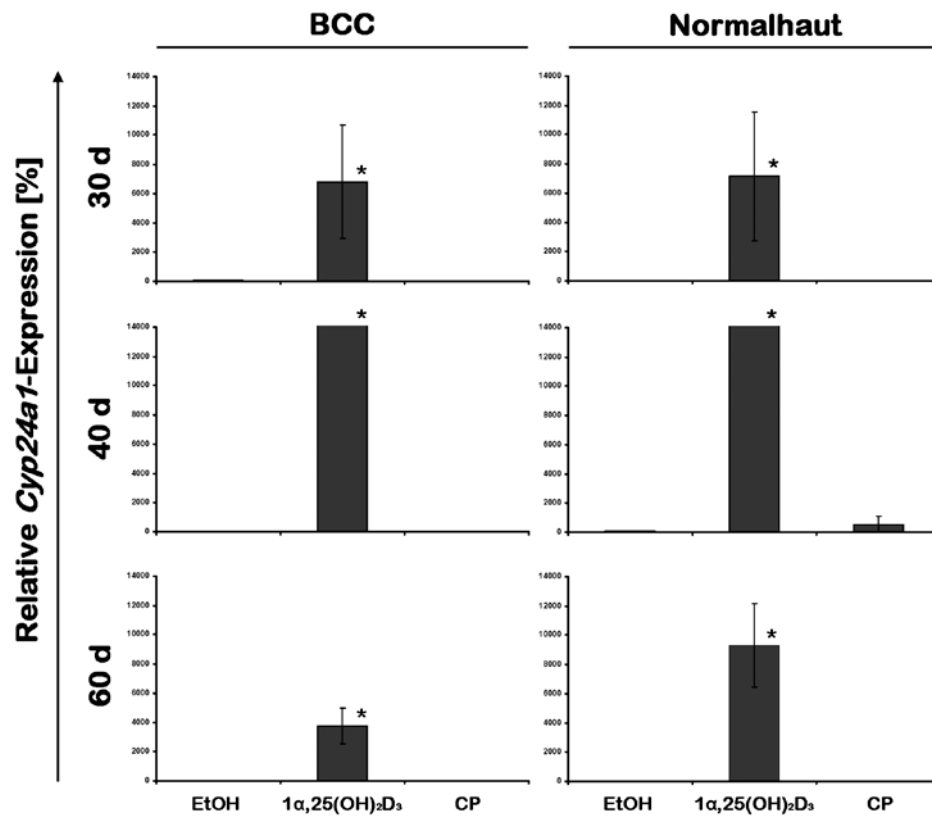
Anschließend wurde die RNA aus den eingefrorenen Hautstücken isoliert, revers transkribiert und die *Gli1*-Expression bestimmt. Abbildung 17 fasst die Ergebnisse zusammen. In allen drei analysierten Tumorstadien führte die Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zu einer signifikanten Hemmung der *Gli1*-Expression im Vergleich zu den Lösungsmittel-behandelten Proben. Die Hemmung ist jedoch schwächer ausgeprägt als unter CP-Behandlung. Im Gegensatz dazu wurde die *Gli1*-Expression in den Normalhautkulturen stärker durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  als durch CP gehemmt.



**Abbildung 17: Quantifizierung der *Gli1*-Expression zur Bestimmung der Aktivität des Hh-Signalweges in BCC- und Normalhautkulturen nach Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Den Kulturmedien der Hautkulturen wurden 10 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder 10  $\mu\text{M}$  CP zugegeben. Nach 10 Tagen wurde die RNA isoliert und revers transkribiert. Die *Gli1*-Expression wurde auf die endogene Expression der *18S* rRNA normalisiert. Die Werte sind in Relation zur entsprechenden Lösungsmittelkontrolle (EtOH; = 100 %) angegeben und die signifikanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Sternchen (\*) markiert. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse von BCC-Hautkulturen (links), die 30, 40, oder 60 Tage nach ihrer Induktion kultiviert wurden. Rechts sind die Ergebnisse der entsprechenden Normalhautkulturen gezeigt. Die Behandlung mit 10 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  führt zu einer deutlichen *Gli1*-Transkriptionshemmung, die in den BCC-Hautkulturen geringer ist als diejenige durch CP. In der Normalhaut ist die Hemmung durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  dagegen stärker als die durch CP. Abkürzungen: CP, Cyclopamin; d, Tage, EtOH, Ethanol.

Um die Aktivierung des Vdr-Signalweges durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in den BCC- und Normalhautkulturen zu analysieren, wurde die Expression des Vdr-Zielgens *Cyp24a1* untersucht. Abbildung 18 zeigt, dass die Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in allen Proben eine starke *Cyp24a1*-Expression induzierte. Die Behandlung mit dem Smo-Antagonisten CP bewirkte erwartungsgemäß keine Änderung der *Cyp24a1*-Expression.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in den BCC- und Normalhautkulturen die Aktivität des Hh-Signalweges effizient blockiert und den Vdr-Signalweg aktiviert. Die Hemmung der Hh-Signalkaskade ist jedoch nach einer Inkubation mit CP stärker.



**Abbildung 18:** Quantifizierung der *Cyp24a1*-Expression zur Bestimmung der Aktivität des Vdr-Signalweges in BCC- und Normalhautkulturen nach Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Die analysierten Proben entsprechen denjenigen aus Abbildung 17 (oben). Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Sternchen (\*) markiert. Nach einer Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wiesen alle analysierten Proben eine starke Expression von *Cyp24a1* auf, während in den mit CP bzw. dem Lösungsmittel (EtOH) behandelten Kulturen keine bzw. nur eine geringe *Cyp24a1*-Expression detektiert werden konnte. Abkürzungen: CP, Cyclopamin; d, Tage; EtOH, Ethanol.



### 3.2 *In-vivo*-Behandlung von RMS- oder BCC-tragenden Mäusen mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

#### 3.2.1 Bestimmung der Dosierung von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an *Mus musculus*

Um RMS in *Ptch*<sup>neo67/+</sup>C57BL/6xBALB/c-Mäusen therapeutisch mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandeln zu können, wurde von Niemann (AG Hahn) und mir eine Toxizitäts- und Dosisfindungsstudie für  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  an *Ptch*<sup>+/+</sup>-Mäusen durchgeführt.

Banach-Petrosky *et al.* beschrieben, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in einer Dosierung von 40 bis 50 ng/kg Körpergewicht als tägliche intraperitoneale (i.p.) Injektion über den Zeitraum von 1 bis 3 Monaten in Mäuse appliziert werden kann (Banach-Petrosky *et al.* 2006). Diese Angaben dienten als Orientierung für die Größenordnung der Dosierung in der Toxizitätsstudie. In Tabelle 10 sind die Dosisstufen für die Toxizitätsstudie, die von Niemann angefangen und von mir vervollständigt wurde, zusammengefasst. Als Lösungsmittelkontrolle wurde täglich 50  $\mu\text{l}$  einer EtOH/Sonnenblumenöl-Emulsion (siehe Kapitel 2.18.2.1) i.p. appliziert.

	Kohorte 1	Kohorte 2	Kohorte 3	Kohorte 4	Kontrolle
$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	40 ng/kg/d	40 ng/kg/d	50 ng/kg/d		Lösungsmittel
Behandlungszeitraum	4 Wochen	8 Wochen	8 Wochen	8 Wochen	8 Wochen
Beobachtungszeitraum nach Therapieende	-	-	-	5 Wochen	-
Tierzahl (n)	5	5	6	5	5
durchgeführt von	HN	HN	BL	BL	BL

**Tabelle 10: Schema für die Bestimmung der Dosierung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in *Ptch*<sup>+/+</sup>-Mäusen.** Aufgeführt sind die eingesetzten Konzentrationen von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und die Behandlungszeiträume mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder dem Lösungsmittel. Tiere der Kohorte 4 wurden zusätzlich 5 Wochen nach Therapieende beobachtet. Als Lösungsmittelkontrolle wurde täglich 50  $\mu\text{l}$  einer EtOH/Sonnenblumenöl-Emulsion appliziert. Abkürzungen: HN, Hannah Niemann; BL, Bérénice Lammering.

Aufgrund der bekannten hyperkalzämischen Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wurden die Mäuse eine Woche vor, während und eine Woche nach der Applikation von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  mit Vitamin-D<sub>3</sub>-freiem sowie kalzium- und phosphatreduziertem Futter (Banach-Petrosky *et al.* 2006) gefüttert. Zur Beurteilung der Toxizität wurden

die Tiere täglich beobachtet und wöchentlich gewogen. Eine eventuell auftretende Hyperkalzämie wurde alle zwei Wochen durch Bestimmung des Kalziumlevels im Serum überprüft (siehe Kapitel 2.18.2.3).

Tiere, die mit 50 ng/kg/d über 8 Woche behandelt worden sind (siehe Tabelle 9), wurden nach dem Behandlungszeitraum in zwei Kohorten (Kohorte 3 und 4) randomisiert. Eine Kohorte 3 wurde direkt am letzten Behandlungstag und Kohorte 4 nach einem injektionsfreien Beobachtungszeitraum von 5 Wochen präpariert. Aus jeder Maus wurde eine Niere präpariert und in 4 % PFA konserviert. Gewebeschnitte der Nieren wurden anschließend einem Nephrologen (Prof. Dr. med. Strutz) zur Beurteilung vorgelegt.

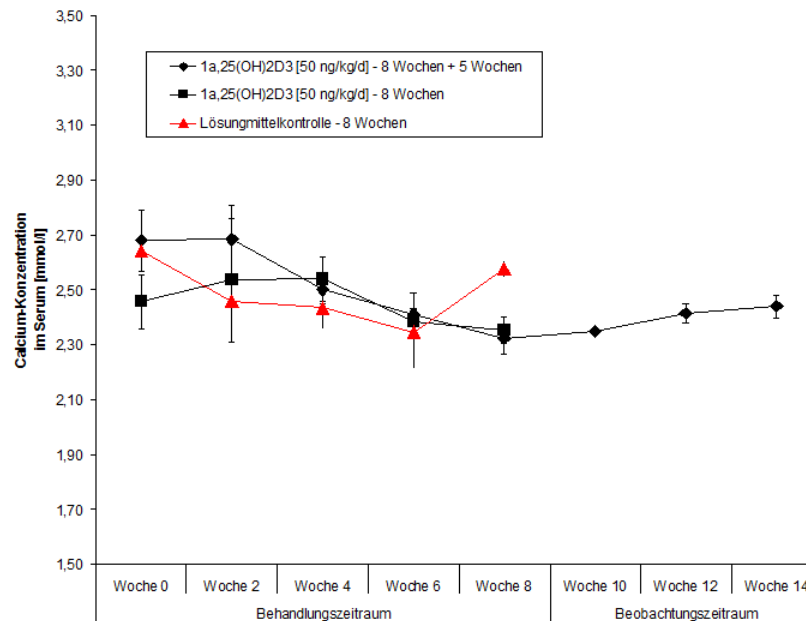
Bei den täglichen Beobachtungen konnten keine Verhaltensauffälligkeiten festgestellt werden. Das Körpergewicht der Tiere blieb während des gesamten Injektionszeitraumes stabil oder nahm zu. Eine histologische Untersuchung der Nieren ergab keine Hinweise auf Nierensteine, bedingt durch Kalzium-Ablagerungen, entzündliche Veränderungen oder sonstige Auffälligkeiten.

Die Serum-Kalzium-Konzentrationen, die unter Behandlung mit 50 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Kohorte 3 und 4; siehe Tabelle 10) und im medikationsfreien 5-wöchigen Beobachtungsintervall analysiert wurden (Kohorte 4), sind in Abbildung 19 im Vergleich zur Lösungsmittelkohorte zusammengefasst.

Die Serum-Kalzium-Konzentrationen sanken unter  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung von 2,68 mmol/l auf 2,32 mmol/l (Kohorte 4) bzw. von 2,46 mmol/l auf 2,35 mmol/l (Kohorte 3). Im nachfolgenden Beobachtungszeitraum von fünf Wochen in der Kohorte 4 stiegen die Spiegel jedoch wieder an. Ein ähnlicher Kurvenverlauf wurde auch bei der Lösungsmittelkohorte beobachtet. So fiel die Serum-Kalzium-Konzentration der Kontrollkohorte in den ersten sechs Wochen der Behandlung von 2,64 mmol/l auf 2,35 mmol/l, während sie in den weiteren zwei Behandlungswochen wieder auf 2,58 mmol/l anstieg.

Da sowohl in den  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  als auch in den Lösungsmittel-behandelten Mäusen im Laufe der Behandlung ein Absinken der Serum-Kalzium-Konzentration zu beobachten war, ist anzunehmen, dass dies durch die Umstellung auf das kalzium- und phosphatreduzierte Futter zurückzuführen ist. Da auch keine weiteren

Auffälligkeiten (z.B. Kalkablagerungen oder entzündliche Infiltrate der Nieren) in den Tieren detektiert wurden (siehe oben), wurde die Therapie von RMS-tragenden Mäusen mit einer Dosis von 50 ng/kg/d über 8 Wochen durchgeführt.



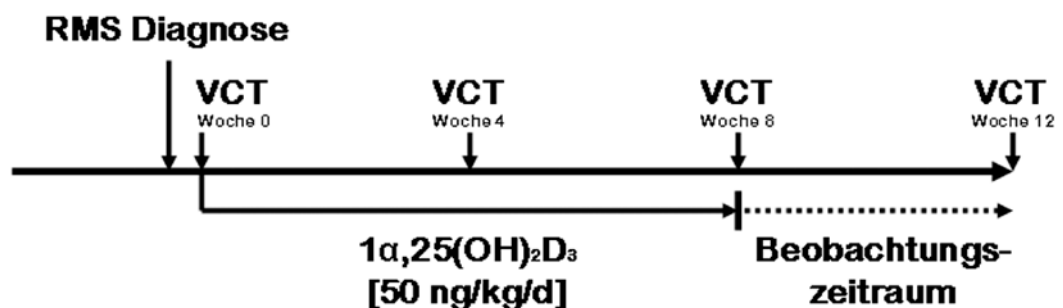
**Abbildung 19:** Untersuchung der Serum-Kalzium-Konzentration von *Ptch*<sup>+/+</sup>C57BL/6xBALB/c-Mäusen nach Injektion mit 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> wurde in der Konzentration von 50 ng pro kg Körpergewicht pro Tag über acht Wochen injiziert. Abgebildet sind die Werte für den achtwöchigen Injektionszeitraum, sowie den fünfjährigen Beobachtungszeitraum (siehe Kohorte 3 und 4 in Tabelle 9). Als Lösungsmittelkontrolle wurde EtOH/Sonnenblumenöl-Emulsion appliziert.

### 3.2.2 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Behandlung von RMS-tragenden Mäusen

*Ptch*-heterozygote Mäuse auf einem gemischten genetischen C57BL/6xBALB/c-Hintergrund entwickeln zu 60 % RMS (Hahn *et al.* 2004). Diese Tiere wurden durch eine Verpaarung von *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Männchen auf C57BL/6N Hintergrund mit BALB/c-wt-Weibchen generiert. Die Tiere wurden engmaschig auf die Entwicklung von RMS untersucht (siehe Kapitel 2.18.3). Ab dem Diagnosezeitpunkt wurden alle RMS-tragende *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäuse mit Vitamin-D<sub>3</sub>-freiem, sowie kalzium- und phosphat-reduziertem Spezialfutter ernährt. Vor Therapiebeginn wurde Blut für die Messung der Serum-Kalzium-Konzentration entnommen und die ersten VCT-Aufnahmen zur Bestimmung des Tumorumfanges durchgeführt. Die Therapie der RMS-tragenden Mäuse mit 50 ng/kg/d 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> oder Lösungsmittel wurde 1 Woche nach Diagnosestellung begonnen. Alle Mäuse wurden täglich beobachtet und wöchentlich

gewogen. Vier Wochen nach Behandlungsbeginn wurde eine zweite VCT-Untersuchung durchgeführt. Nach der Gesamtbehandlungsdauer von 8 Wochen erfolgten eine weitere Blutentnahme sowie eine VCT-Untersuchung. Sowohl behandelte Tiere als auch die Lösungsmittelkontrolle wurden zu Beginn der Behandlung nach dem Zufallsprinzip in je zwei Kohorten eingeteilt. Die eine Kohorte wurde direkt am letzten Behandlungstag präpariert, während die andere Kohorte für weitere vier Wochen beobachtet wurde. Die Mäuse der Beobachtungskohorte wurden eine Woche nach Abschluss der Behandlung wieder auf Normalfutter umgestellt und am Ende des Experiments nochmals computertomographisch und laborchemisch untersucht. Die Studienstruktur ist in Abbildung 20 dargestellt und alle verwendeten Tiere in Tabelle 11 aufgeführt.

Am Ende des jeweiligen Experiments wurden eine Niere sowie die Hälfte des RMS in 4 % PFA konserviert. Die andere Hälfte des RMS sowie normaler SM wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren, um anschließend molekularbiologische Untersuchungen vorzunehmen (siehe Kapitel 2.18.3).

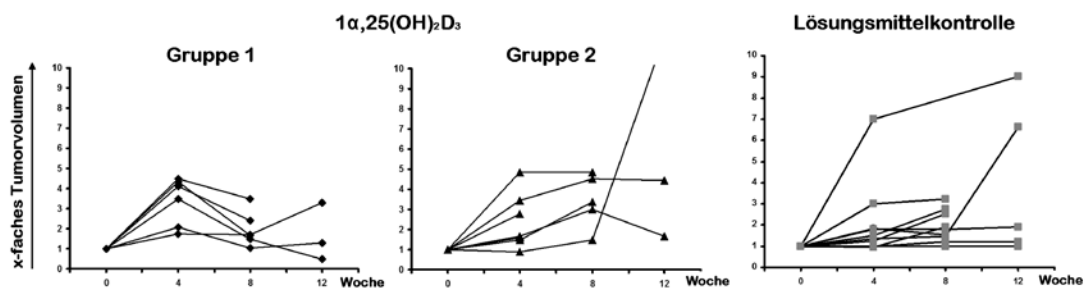


**Abbildung 20: Studienstruktur zur Behandlung von RMS-tragenden *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Die Therapie der RMS-tragenden Mäuse mit 50 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder Lösungsmittel wurde 1 Woche nach Diagnosestellung begonnen. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch die erste VCT-Untersuchung zur Bestimmung des Tumervolumens durchgeführt. Vier Wochen nach Behandlungsbeginn wurde die Tiere ein zweites Mal mittels VCT untersucht. Nach der Gesamtbehandlungsdauer von 8 Wochen erfolgte eine weitere VCT-Untersuchung. Sowohl behandelte Tiere als auch die Lösungsmittelkontrolle wurden zu Beginn der Behandlung nach dem Zufallsprinzip in je zwei Kohorten eingeteilt. Die eine Kohorte wurde direkt am letzten Behandlungstag präpariert, während die andere Kohorte für weitere vier Wochen beobachtet wurde. Die Mäuse, die weiter beobachtet worden sind, wurden am Ende des Experiments nochmals computertomographisch untersucht.

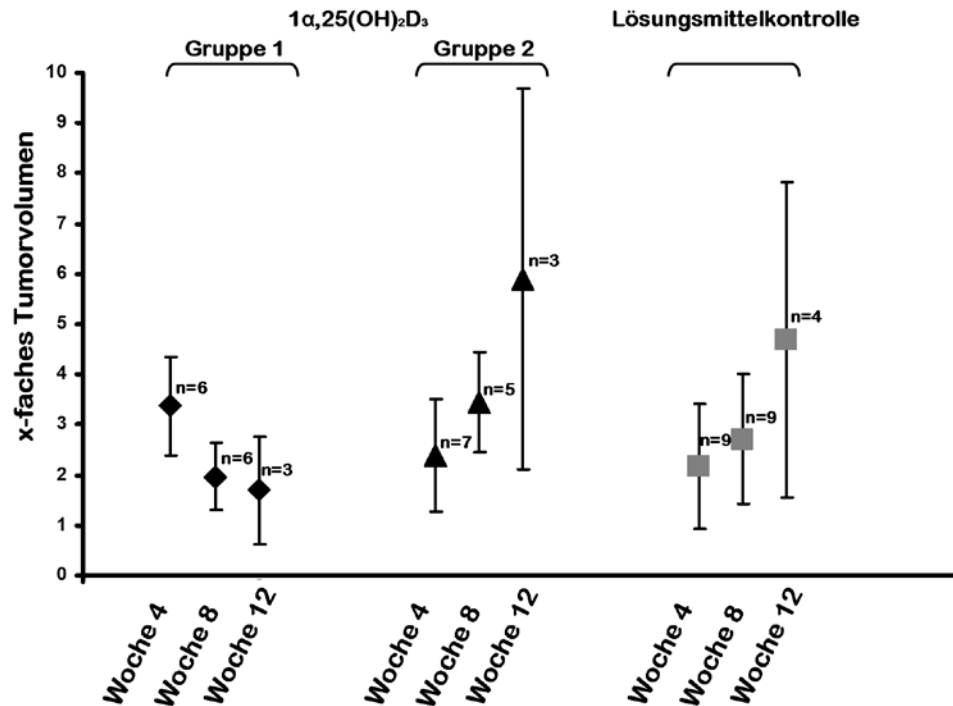
Behandlungszeitraum	Beobachtungszeitraum nach Therapieende	Behandlung mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [50 ng/kg/d]	Behandlung mit Lösungsmittel [EtOH]
8 Wochen	-	Kohorte 1: 7 Tiere	Kohorte 2: 3 Tiere
8 Wochen	4 Wochen	Kohorte 3: 6 Tiere	Kohorte 4: 6 Tiere

**Tabelle 11: Zusammensetzung der Kohorten zur Therapie von RMS mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  *in vivo*.** In die Studie wurden insgesamt 22 RMS-tragende Tiere aufgenommen, die in 4 Kohorten mit 3 bis 7 Tieren randomisiert wurden. Die Kohorten waren unterteilt in eine Behandlungs- und eine Lösungsmittelkohorte. Der Behandlungszeitraum betrug für alle Kohorten acht Wochen. Die Tiere der Kohorte 1, die mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelt wurden, und Kohorte 2, der Lösungsmittelkontrollen, wurden direkt nach der 8-wöchigen Behandlung getötet, wogegen die verbleibenden Tiere (Kohorte 3 und 4) für weitere vier Wochen beobachtet wurden.

Wie bereits erwähnt, wurde jede Maus zu Beginn der Behandlung (Woche 0), während (Woche 4) und am Ende der Therapie (Woche 8) und eventuell nach einer zusätzlichen behandlungsfreien Zeit von 4 Wochen (Woche 12) computertomographisch (siehe Kapitel 2.18.4) untersucht, um das Tumolvolumen zu ermitteln (Abbildung 21 A und B). Für zwei  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -behandelte Mäuse gab es keinen 8. Wochen-Wert, und für ein Tier der Lösungsmittelkohorte war die Analyse nach der 12. Woche nicht möglich.



**Abbildung 21 A: Individuelle Wachstumskurven der RMS der mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder Lösungsmittel (EtOH) behandelten *Ptch<sup>neo67/+</sup>*-Mäuse.** Das Tumolvolumen wurde vor Beginn der Behandlung (Woche 0), während (Woche 4) und am Ende der Therapie (Woche 8) sowie nach einer zusätzlichen behandlungsfreien Zeit von 4 Wochen (Woche 12) mittels VCT bestimmt. Das Tumolvolumen vor Beginn der Therapie wurde als 1 festgelegt. Gezeigt sind die individuellen Wachstumskurven der RMS von 13 mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  von 9 mit Lösungsmittel (EtOH) behandelten Mäusen. Die Tumoren, die einen Volumrückgang zeigten, sind in Gruppe 1 zusammengefasst, während die stagnierenden bzw. progredienten Tumoren in Gruppe 2 dargestellt sind (siehe Text für weitere Informationen).



**Abbildung 21 B: RMS-Tumorwachstum während und nach der Therapie.** Das Ausgangstumolvolumen vor Therapiebeginn wurde = 1 gesetzt. 8 Wochen nach der Behandlung zeigten 6/11 RMS, die mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelt worden waren, einen Volumentrückgang (Gruppe 1; therapiesensitiv), während die anderen 5/11 Tumore entweder an Volumen zunahmten oder in ihrem Wachstum stagnierten (Gruppe 2; therapieresistent). Abkürzungen: n, Anzahl der Tiere.

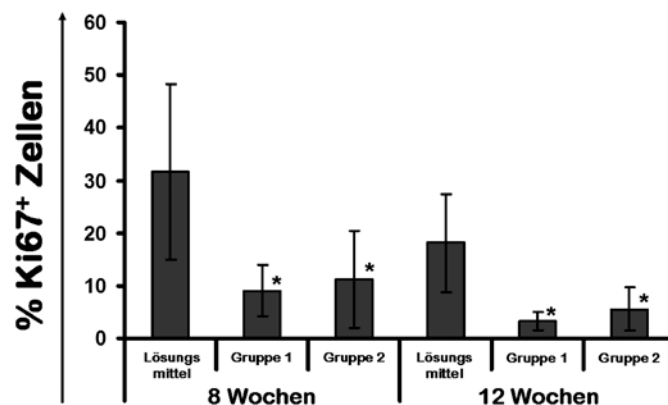
Während der ersten vier Wochen der Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zeigten alle RMS eine Volumenzunahme (Woche 4 in Abbildung 21 B, Gruppe 1, Gruppe 2 und Lösungsmittelkohorte; siehe Abbildung 21 A für die individuellen Wachstumskurven). Nach acht Wochen zeigten 6 von 11 RMS der mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten Kohorte einen Rückgang des Tumolvolumens. Diese „therapiesensitiven“ Tumore werden im Folgenden in Gruppe 1 zusammengefasst (Gruppe 1, Woche 8 in Abbildung 21 B; siehe Abbildung 21 A für die individuellen Wachstumskurven). Drei der regredienten Tumore der Gruppe 1 wurden für weitere vier behandlungsfreie Wochen beobachtet. Während dieser Zeit nahm ein Tumor weiter an Volumen ab, ein Tumor stagnierte in seinem Wachstum und der dritte nahm wieder an Volumen zu. Diese Daten weisen darauf hin, dass *Ptch*-assoziierte RMS auf die Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ansprechen können.

Jedoch zeigten 4 der 11 RMS der Behandlungskohorte eine stetige Volumenzunahme und 1 der 11 Tumore stagnierte in seinem Wachstum unter der Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Diese „therapieresistente“ Gruppe wird im Folgenden als Gruppe 2

bezeichnet (Gruppe 2, Woche 8 in Abbildung 21 B, siehe Abbildung 21 A für die individuellen Wachstumskurven). Drei RMS der Gruppe 2 wurden nach dem Ende der Therapie für weitere vier Wochen beobachtet: Ein Tumor stagnierte und ein weiterer nahm an Volumen ab, wogegen der dritte deutlich an Größe zunahm (Gruppe 2, Woche 12 in Abbildung 21 B, siehe Abbildung 21 A für die individuellen Wachstumskurven).

In der Lösungsmittelkohorte nahmen alle außer einem Tumor stetig an Volumen zu (Lösungsmittelkohorte, Woche 8 in Abbildung 21 B; siehe Abbildung 21 A für die individuellen Wachstumskurven). 4 der 9 Tumoren wurden für weitere 4 Wochen nach Behandlungsende weiter beobachtet. Von diesen stagnierte drei im Wachstum, wogegen sich ein RMS weiterhin vergrößerten (Lösungsmittelkohorte, Woche 12 in Abbildung 21 B; siehe Abbildung 21 A für die individuellen Wachstumskurven).

Obwohl die Änderung der RMS Volumina zwischen den Gruppen nicht-signifikant war, wurden molekulare Unterschiede der  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -sensitiven und -resistenten RMS und der Lösungsmittelkohorte festgestellt. Sowohl RMS der Gruppe 1 als auch der Gruppe 2 zeigten signifikant weniger Ki67-positive Zellen im Vergleich zu den Lösungsmittelkontrollen (siehe Kapitel 2.17.3). Dies gilt sowohl für den Behandlungs- als auch für den therapiefreien Beobachtungszeitraum. (siehe Abbildung 22). Diese Daten zeigen, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die Proliferation von *Ptch*-assoziierten RMS auch *in vivo* signifikant reduzieren kann.

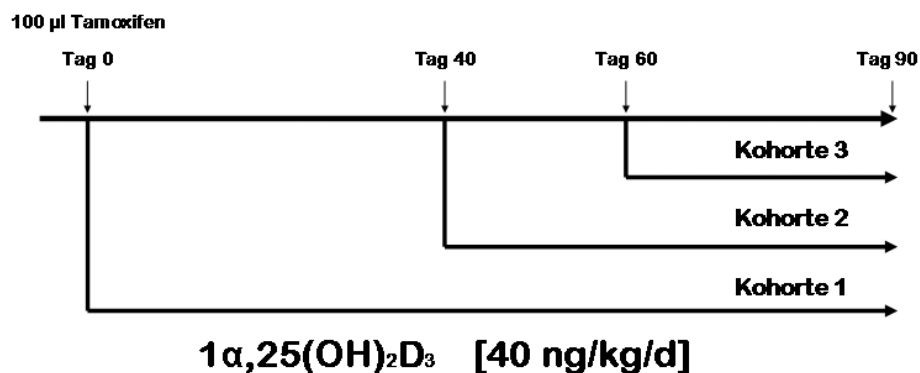


**Abbildung 22: Prozentuale Darstellung der Ki67-positiven RMS Zellen nach der Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Die immunhistologische Analyse wurde direkt nach 8 Wochen Behandlungszeit oder nach weiteren 4 Wochen therapiefreier Beobachtungszeit (12 Wochen) für alle Gruppen durchgeführt. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) der mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten RMS zur Lösungsmittelkontrolle sind mit einem Sternchen (\*) markiert. Sowohl Gruppe 1 (therapiesensitiv, siehe Abbildung 21 B) und 2 (therapieresistent, siehe Abbildung 21 B) zeigt zu beiden Zeitpunkten eine signifikante Reduktion der Ki67-positiven RMS Zellen im Vergleich zur Lösungsmittelkohorte.

### 3.2.3 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung von BCC-tragenden Mäusen

Um die Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf das BCC-Wachstum *in vivo* studieren zu können, wurden diese Tumoren in *Ptch<sup>fllox/fllox</sup>ERT2*-Tieren in der 10. Lebenswoche mit 100  $\mu\text{g}$  Tamoxifen (i.m.) induziert (siehe Kapitel 2.18.2.2). Die Tiere entwickeln dann alle innerhalb von 90 Tagen voll ausgeprägte BCC, daher kann in diesem Modell mit der Therapie in unterschiedlichen Tumorstadien begonnen werden.

Da diese Studie bereits vor der Toxizitätsstudie begonnen wurde, wurden die Tiere nur mit 40  $\text{ng/kg/d}$   $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelt. Der Gesundheitszustand der BCC-tragenden Versuchstiere wurde wie bei den Mäusen der Dosisfindungsstudie (siehe Kapitel 3.2.1) überprüft.



**Abbildung 23:** Studienstruktur zur Behandlung von BCC-tragenden *Ptch<sup>fllox/fllox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Die Therapie der BCC-tragenden Mäuse mit 40  $\text{ng/kg/d}$   $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder Lösungsmittel wurde in unterschiedlichen Tumorstadien begonnen. In Kohorte 1 wurde mit der  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung direkt nach Induktion der BCC mit 100  $\mu\text{l}$  Tamoxifen begonnen. Kohorte 2 wurde ab dem Tag 40, und Kohorte 3 ab dem Tag 60 nach BCC-Induktion mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelt. Alle Mäuse wurden bis zum Tag 90 behandelt und dann getötet.

Zeitpunkt des Behandlungsbeginns	Behandlung mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [40 $\text{ng/kg/d}$ ]	Behandlung mit Lösungsmittel [EtOH]
Am Tag der BCC-Induktion (= Kohorte 1)	5 Tiere	4 Tiere
40 Tage nach BCC-Induktion (= Kohorte 2)	4 Tiere	3 Tiere
60 Tage nach BCC-Induktion (= Kohorte 3)	5 Tiere	5 Tiere

**Tabelle 12:** Zusammensetzung der Kohorten zur Therapie von BCC mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  *in vivo*. Aufgeführt sind 6 Gruppen, zu jeweils 3 bis 5 Tieren unterteilt in Behandlungs- bzw. Lösungsmittelkohorten. Die Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder dem Lösungsmittel (EtOH) wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Tumorinduktion begonnen (siehe Abbildung 23 zur Studienstruktur).



Jeweils eine Woche vor Beginn der Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wurden die Mäuse auf Vitamin-D<sub>3</sub>-freies, sowie kalzium- und phosphatreduziertes Futter umgestellt. Weiterhin wurde das Körpergewicht bestimmt und Blut zur Bestimmung des Kalziumspiegels entnommen. Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde durch tägliches Beobachten und wöchentliches Wiegen überprüft.

In Kohorte 1 wurde mit der  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung direkt nach Induktion der BCC begonnen. Kohorte 2 wurde ab dem Tag 40, und Kohorte 3 ab dem Tag 60 nach BCC-Induktion mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelt.

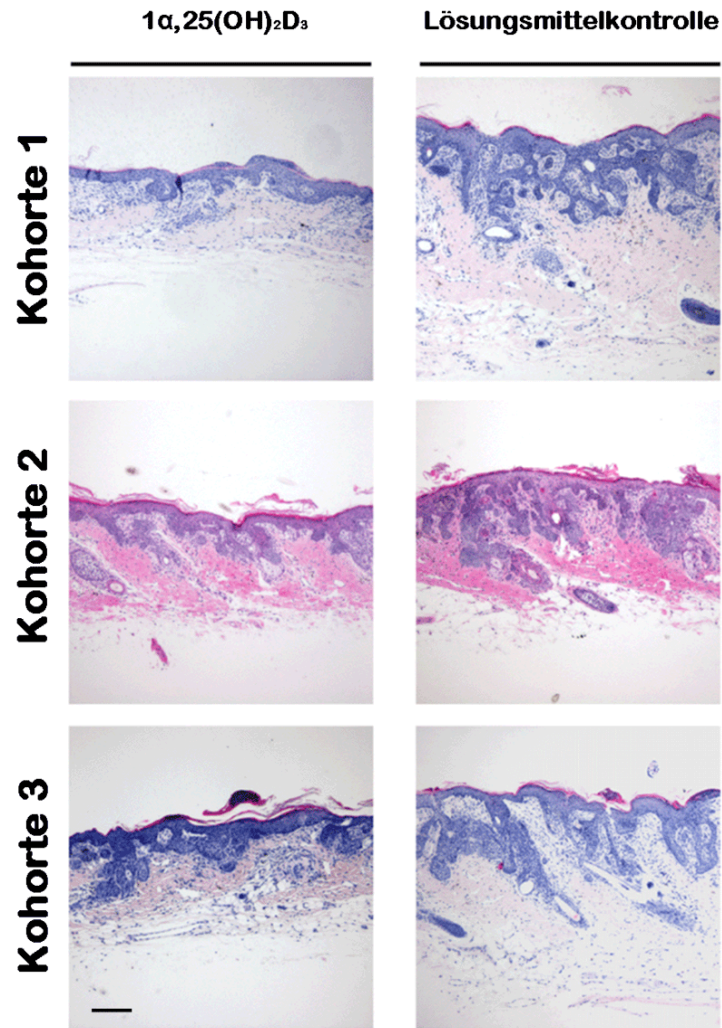
Alle Mäuse wurden am 90. Tag nach BCC-Induktion abgetötet. Am gleichen Tag wurde nochmals eine Blutentnahme durchgeführt und die Mäuse wie in Kapitel 2.18.2.4 beschrieben präpariert und mit 4 % PFA perfundiert. Ein definiertes Stück der BCC-tragenden Schwanzhaut wurde vor der Perfusion präpariert und bei -80 °C für eine spätere Genexpressionsanalyse eingefroren. Die Studienstruktur ist in Abbildung 23 dargestellt und alle verwendeten Tiere in Tabelle 12 aufgeführt.

Als Referenzgewebe wurden fünf Normalhautproben von wt-Mäusen des gleichen genetischen Hintergrundes hinzugezogen.

### 3.2.3.1 Makroskopische und histologische Analysen

Die Tumorgröße wurde an HE-Färbungen von Paraffinschnitten bewertet. BCC, die sofort nach ihrer Induktion mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelt worden sind (in Tabelle 12: Kohorte 1), waren auffällig kleiner als die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen. Die Tumore der Tiere, die ab dem Tag 40 und 60 nach Tumorinduktion (in Tabelle 12: Kohorte 2 und 3) mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelt worden sind, waren ebenfalls deutlich kleiner als die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen. Sie waren jedoch größer als die BCC, die direkt nach Tumorinduktion mit dem Medikament behandelt worden sind.

Die Abbildung 24 stellt die HE-Färbungen der genannten Tumore beispielhaft gegenüber.



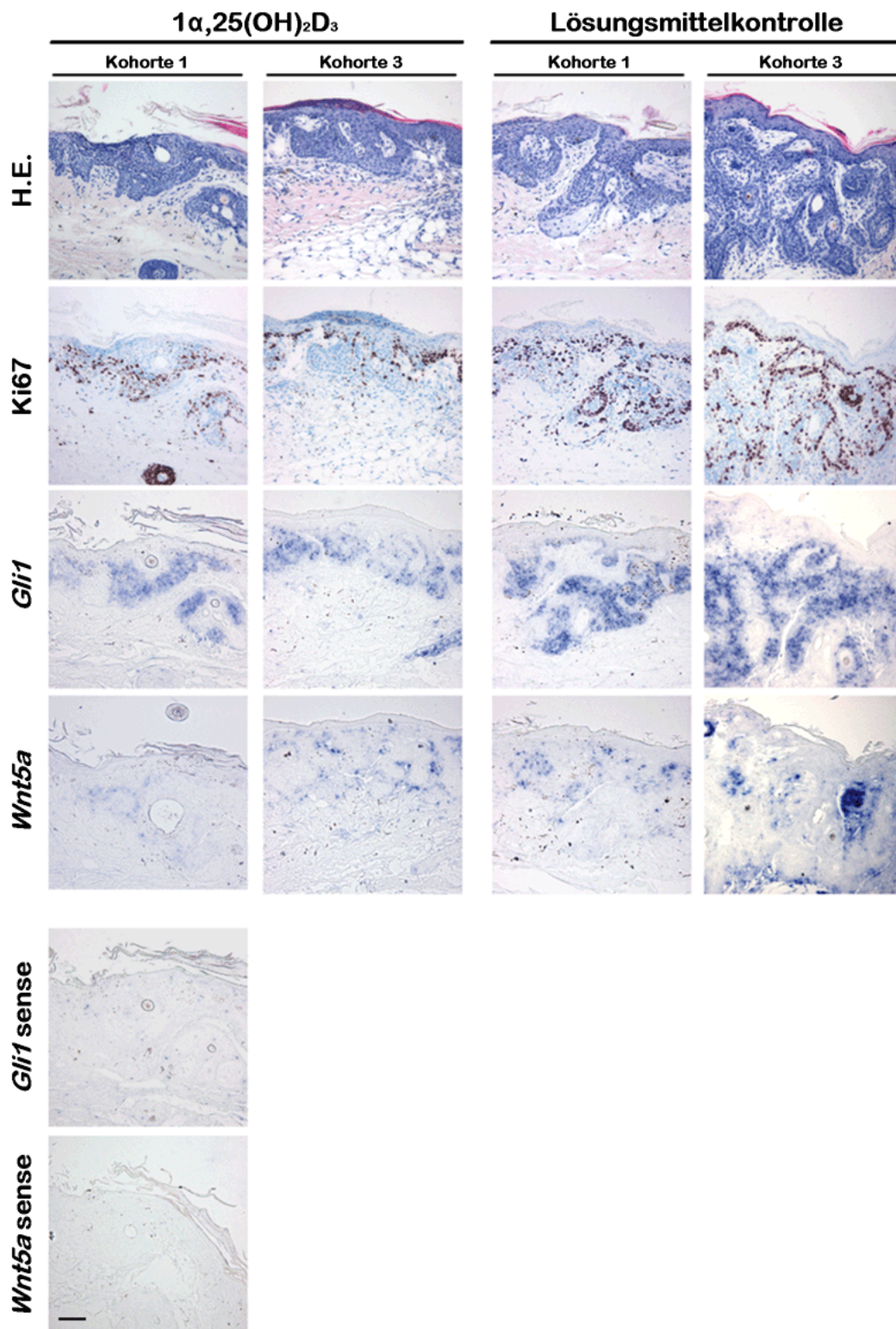
**Abbildung 24: BCC in *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT<sup>+/-</sup>*-Mäusen nach Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (40 ng/kg/d) bzw. Lösungsmittel (EtOH).** Dargestellt sind exemplarische HE-Färbungen der Schwanzhaut von *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT<sup>+/-</sup>*-Mäusen 90 Tage nach der i.m. Tamoxifen-Injektion. Die Mäuse wurden mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  bzw. Lösungsmittel (EtOH) sofort ab BCC-Induktion (Kohorte 1) oder 40 bzw. 60 Tage nach Induktion (Kohorte 2 bzw. 3) behandelt. Alle Tumoren wurden 90 Tage nach Induktion untersucht. Die mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -behandelten BCC der Kohorte 1 sind auffällig kleiner, als die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen. Die Tumore der Tiere aus Kohorte 2 und 3 sind ebenfalls deutlich kleiner als die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen, jedoch größer als die BCC, die direkt nach Tumorinduktion mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelt worden sind. Der Balken entspricht 1 mm im Präparat.

---

### 3.2.3.2 Expressions-, Proliferations- und Apoptoseanalysen mittels *in-situ*-Hybridisierungen und immunhistologischer Antikörperfärbungen

Um die Aktivität der Hh-Signalkaskade in den behandelten BCC zu untersuchen, wurde zunächst eine *Gli1*-ISH (siehe Kapitel 2.17.4) durchgeführt (siehe Abbildung 25). In allen BCC konnte die Expression von *Gli1* nachgewiesen werden. Ob die *Gli1*-Expression in den Tumoren durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  tatsächlich inhibiert wurde, war jedoch nicht eindeutig zu erkennen. Daher ist die *Gli1*-Expression noch mittels qRT-PCR Analyse quantifiziert worden (siehe Kapitel 3.2.3.3).

Darüber hinaus wurde eine ISH für *Wnt5a* durchgeführt. Diese Untersuchung basierte auf der Tatsache, dass stromal-exprimiertes *Wnt5a* eine Rolle bei der BCC Regression spielt (Nitzki *et al.* 2010). Wie in Abbildung 25 gezeigt wird, wird *Wnt5a* in Zellen des BCC-Stromas exprimiert. Da jedoch die durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  im Wachstum gehemmten BCC keine erhöhte Anzahl an *Wnt5a*-positiven Stromazellen aufweisen als entsprechende Lösungsmittelkontrollen (vergleiche Kohorte 1 und 3 in Abbildung 25), ist davon auszugehen, dass die *Wnt5a*-Expression nicht mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -vermittelter Hemmung des BCC-Wachstums in Verbindung steht.

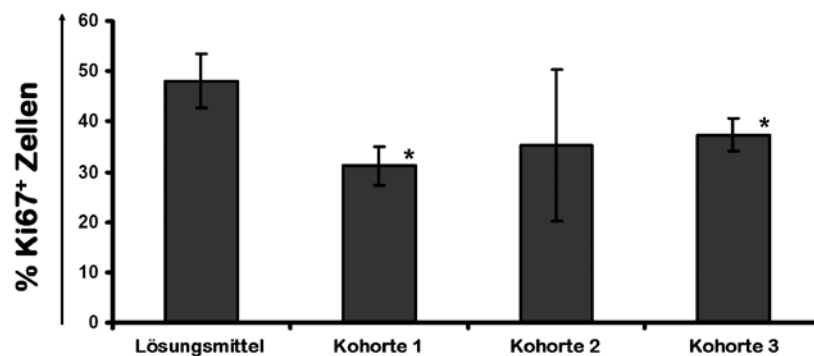


**Abbildung 25: Analysen von BCC in  $Ptch^{flox/flox}ERT^{+/-}$ -Mäusen nach Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Dargestellt sind exemplarische HE- und immunhistologische Färbungen (Ki67) sowie *in-situ*-Hybridisierungen (*Gli1* und *Wnt5a*) der Schwanzhaut von  $Ptch^{flox/flox}ERT^{+/-}$ -Mäusen. Die Mäuse wurden mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (40 ng/kg/d) bzw. dem Lösungsmittel (EtOH) sofort nach BCC-Induktion (Kohorte 1) oder 60 Tage nach Induktion (Kohorte 3) behandelt. Alle Tumore wurden 90 Tage nach Induktion untersucht. In allen BCC wurden Ki67-positive Zellen detektiert. Auch konnte eine Expression von *Gli1* und *Wnt5a* nachgewiesen werden. Der Balken entspricht 1 mm im Präparat. Abkürzungen: HE, Hämatoxylin-Eosin.

Um die mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten BCC näher zu charakterisieren, wurden zusätzlich dazu Analysen zur Bestimmung der Proliferations- und Apoptoseraten durchgeführt.

Zur Bestimmung der Proliferation wurde in den Tumoren mittels immunhistologischer Antikörperfärbungen (siehe Kapitel 2.17.3) die Expression von Ki67, einem Markerprotein für proliferierende Zellen, bestimmt (siehe Abbildung 25). Zur Ermittlung des Proliferationsindex wurden von jedem Tier zwischen 530 und 1350 Tumorzellen ausgezählt. Anhand des Anteils der Ki67-positiven Zellen an den ausgezählten Tumorzellen wurde der Proliferationsindex berechnet.

Abbildung 26 zeigt, dass der Proliferationsindex aller mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten Tumoren niedriger ist als der der Lösungsmittelkohorte. Der Unterschied ist hierbei für Kohorte 1 (Therapiebeginn mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  direkt nach BCC-Induktion) und Kohorte 3 (Therapiebeginn mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  60 Tage nach BCC-Induktion) signifikant.

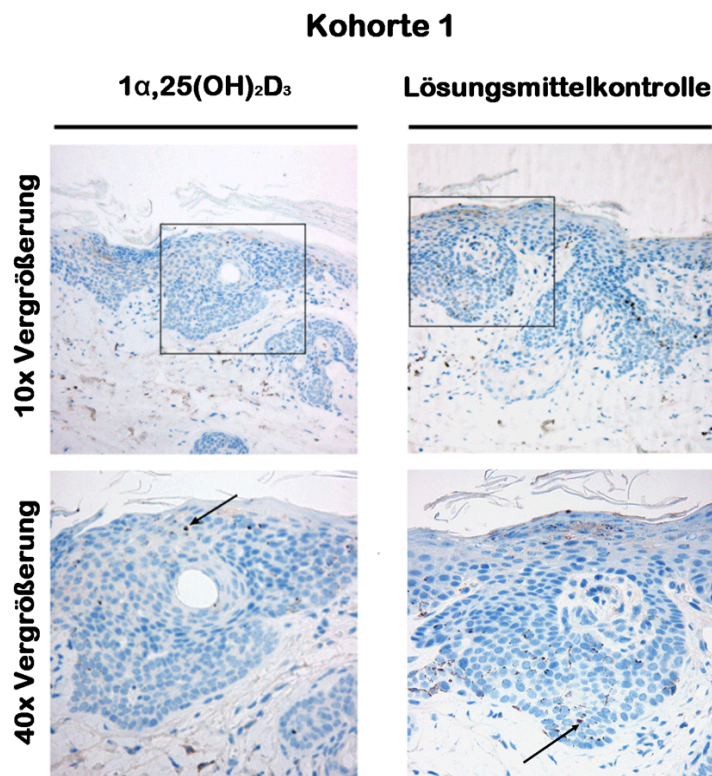


**Abbildung 26: Prozentuale Darstellung der Ki67-positiven BCC-Zellen nach der Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Die immunhistologische Analyse mit Ki67-Antikörper wurde in allen drei Kohorten (siehe Tabelle 12) sowie in den jeweiligen Lösungsmittelkontrollen durchgeführt. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) der mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten BCC zur Lösungsmittelkontrolle sind mit einem Sternchen (\*) markiert. In den Kohorten 1 und 3 zeigte sich eine signifikante Reduktion der Ki67-positiven BCC-Zellen im Vergleich zur Lösungsmittelkohorte.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Proliferation der BCC durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  gehemmt wird. Weiterhin scheint eine früh einsetzende Behandlung einen größeren Effekt zu erzielen.

Zusätzlich zur Proliferationsrate wurde die Apoptoserate der Tumoren ermittelt. Dies erfolgte durch immunhistologische Antikörperfärbungen zum Nachweis von aktiver

Caspase 3, einem zentralen Enzym der Apoptose (siehe Kapitel 2.17.3). Dazu wurden zunächst Caspase-3a-positive Zellen in BCC von jeweils zwei Mäusen nach  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ - bzw. Lösungsmittelbehandlung der Kohorte 1 ausgezählt (Abbildung 27). Diese Analysen zeigten, dass sich die Expression von aktiver Caspase 3 in den mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten BCC nicht signifikant von den mit Lösungsmittel behandelten BCC unterscheiden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde auf die Analyse der Kohorten 2 und 3 verzichtet.



**Abbildung 27: Caspase-3-Aktivität in BCC nach Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Dargestellt sind immunhistologische Antikörperfärbungen zum Nachweis der aktiven Caspase 3 in der BCC-tragenden Schwanzhaut von *Ptch<sup>fllox/fllox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen. Die Mäuse wurden sofort nach Induktion der BCC mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (40 ng/kg/d) oder dem Lösungsmittel (EtOH) für 90 Tage behandelt (Kohorte 1). Positiv gefärbte Zellen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. In den mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten Tieren zeigt sich keine signifikante Zu- oder Abnahme von Caspase-3a-gefärbten Zellen im Vergleich zu den mit Lösungsmittel behandelten Tieren.

### 3.2.3.3 Expressionsanalysen mittels qRT-PCR

Um die mittels ISH qualitativ nachgewiesene Expression von *Gli1* (siehe Kapitel 3.2.3.2) zu quantifizieren, wurden aus den BCC-tragenden Hautstücken RNA isoliert und qRT-PCR Analysen durchgeführt.

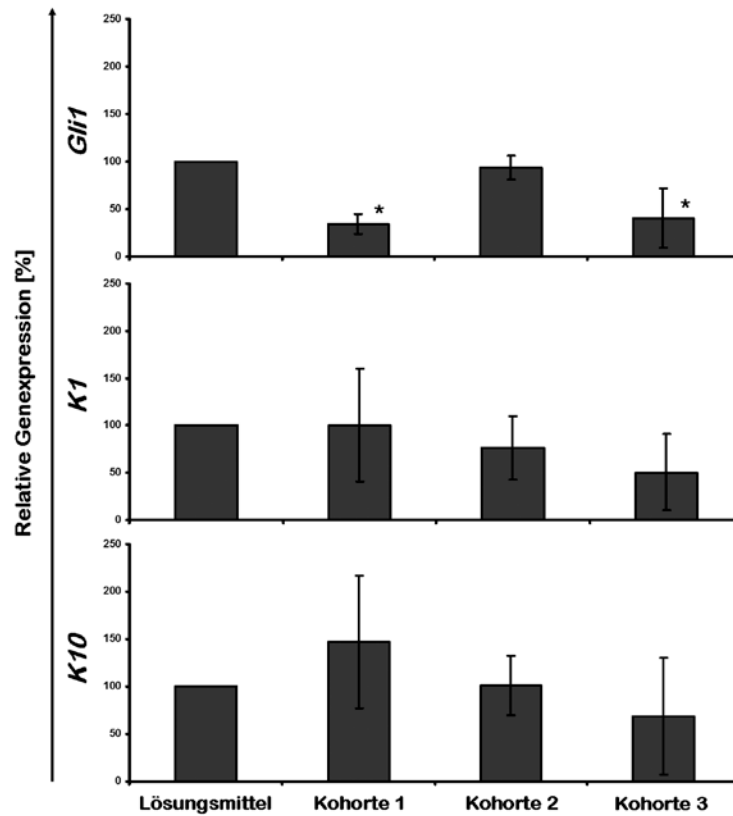
---

Wie Abbildung 28 zeigt, ist die *Gli1*-Expression in der Kohorte 1 und 3 signifikant gegenüber der Lösungsmittelkohorte verringert. Die BCC der Kohorte 2 zeigten dagegen keine signifikante niedrigere *Gli1*-Expression unter der Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .

Die Aktivierung des Vdr-Signalweges durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wurde ebenfalls analysiert, indem die Expression des Vdr-Zielgens *Cyp24a1* untersucht wurde. Jedoch konnte in keiner der Proben eine *Cyp24a1*-Expression detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, ob durch die Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  eine erhöhte Expression von Differenzierungsmarkern hervorgerufen wurde, wurden in den Proben zusätzlich Expressionsanalysen für *K1* und *K10* vorgenommen. Die Expression dieser Gene ist spezifisch für die suprabasalen, differenzierten Schichten der Epidermis (Fuchs 1993). Die Abbildung 28 stellt die Expressionsanalysen der mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten Tiere aller drei Kohorten in Relation zur Lösungsmittelkontrolle (= 100 %) dar. Eine signifikante Induktion der *K1*- und *K10*-Expression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle konnte jedoch in keiner der Kohorten detektiert werden.

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass die Hh-Signalkaskade in BCC durch die Behandlung mit 40 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  gehemmt, die Differenzierung jedoch nicht signifikant stimuliert wird.



**Abbildung 28: Relative Quantifizierung der *Gli1*-, *K1*- und *K10*-Expression BCC-tragender Haut nach Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Aus BCC-tragender Haut von den mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten *Ptch<sup>flx/flx</sup>ERT2*-Mäusen aus Kohorten 1-3 (siehe Tabelle 12) wurde die RNA isoliert und revers transkribiert. Die Genexpression wurde auf die endogene Expression der *18S* rRNA normalisiert. Die Werte sind in Relation zu dem Mittelwert der Lösungsmittelkontrollen (= 100 %) angegeben. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) der mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten BCC zur Lösungsmittelkontrolle sind mit einem Sternchen (\*) markiert. Eine signifikante Reduktion der *Gli1*-Expression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ist unter einer Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sowohl in Kohorte 1 als auch 3 sichtbar. In allen drei Kohorten wurde kein signifikanter Einfluss von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf die *K1*- oder *K10*- Expression detektiert.



#### 4. Diskussion

Die Grundlage dieser Arbeit ist die Annahme, dass Ptch normalerweise Vitamin-D<sub>3</sub>-Derivate sezerniert, die Smo und somit die Hh-Signalkaskade hemmen. Mutationen im *Ptch*-Gen sollten demnach in einer defekten Sekretion dieser Vitamin-D<sub>3</sub>-Derivate resultieren, was zur konstitutiven Aktivierung des Hh-Signalwegs und damit zur Tumorentstehung führen sollte. Falls diese Hypothese zutrifft, sollten Tumoren, die aufgrund von Ptch Mutationen entstehen, sensitiv auf eine Behandlung mit exogen zugeführten Vitamin-D<sub>3</sub>-Derivaten reagieren.

In Vorarbeiten zu diesem Projekt konnten Uhmann und Niemann (AG Hahn) mittels Mediumtransferexperimenten zeigen, dass Medium von *wt-Ptch*-Zellen eine signifikante Hemmung der *Gli1*-Expression in *Ptch*<sup>-/-</sup>-Fibroblasten bewirkt, wogegen Medium von *Ptch*-defizienten Zellen keine Wirkung auf die Aktivität der Hh-Signalkaskade hat. Dies lässt vermuten, dass Zellen mit *Ptch*-Mutationen tatsächlich eine defekte Sekretion von Hh-inhibierenden Molekülen aufweisen. *Gli1*-Expressionsanalysen haben weiterhin gezeigt, dass die Hh-Signalkaskade in RMS-Primärkulturen, *wt-Ptch* und *Ptch*<sup>-/-</sup>-Fibroblasten durch das physiologisch aktive Vitamin-D<sub>3</sub>-Derivat 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> inhibiert wird. Zusätzlich ist gezeigt worden, dass 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> die Proliferation von RMS-Primärkulturen hemmen kann. Diese Daten lassen vermuten, dass es sich bei dem von Ptch sezernierten Vitamin-D<sub>3</sub>-Derivat möglicherweise um 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> handelt.

Das Ziel dieser Arbeit war es nun herauszufinden, ob die exogene Gabe von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auch in MB und BCC zu einer Hemmung der Hh-Signalkaskade und der Zellproliferation führt. Zudem wurde die Wirkung von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> an zwei stabilen RMS-Zelllinien untersucht. Schließlich sollte die antiproliferative und Hh-inhibierende Wirkung von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in *Ptch*-assoziierten Tumoren *in vivo* im Mausmodell überprüft werden.

#### 4.1 Analysen zur Wirkung von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf RMS, MB und BCC *in vitro*

In Anlehnung an *in-vitro*-Analysen von kultivierten RMS-Primärkulturen von Niemann wurde in dieser Arbeit der Einfluss von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf die Aktivität des Hh-Signalweges in verschiedenen Tumorzellsystemen untersucht. Dazu wurden RMS-, BCC- und MB- Zelllinien als auch Kurzzeitkulturen von MB und BCC mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelt und dessen Einfluss auf die Aktivität des Hh- und des Vdr-Signalweges analysiert. Zusätzlich wurde untersucht, ob  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  antiproliferativ auf die Zellen wirkt.

Die Ergebnisse zeigten, dass der Hh-Signalweg in den beiden untersuchten RMS-Zelllinien durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  gehemmt wurde (siehe Kapitel 3.1.1). Diese Ergebnisse entsprechen der Hypothese, dass der Hh-Signalweg mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  gehemmt werden kann. Die Kultivierung mit dem bekannten Smo-Inhibitor CP führte jedoch in einer der beiden RMS-Zelllinien und in der BCC-Zelllinie zu einer stärkeren Hemmung der Hh-Signalwegsaktivität.

Außerdem wurde anhand einer BrdU-basierten Analyse gezeigt, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  eine antiproliferative Wirkung auf die RMS-Zelllinien TP1588 und TP5014 ausübte (siehe Kapitel 3.1.1). Interessanterweise reagierten die beiden Zelllinien kongruent zu dem Ergebnis der Aktivitätsanalyse der Hh-Signalkaskade: In TP1588 Zellen, in denen nach Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  im Vergleich zu TP5014 Zellen eine stärkere Reduktion der *Gli1*-Expression hervorgerufen wurde, wurde gleichzeitig eine stärkere Proliferationshemmung induziert. Dagegen war die Aktivierung der Vdr-Signalkaskade in beiden Zelllinien vergleichbar. Daher könnte man nun auf einen Zusammenhang zwischen antiproliferativer Wirkung und Hemmung der Hh-Signalkaskade schließen. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da der spezifische Hh-Antagonist CP, welcher in TP5014 eine sehr starke Inhibition der *Gli1*-Expression hervorruft, keine signifikante Auswirkung auf die Zellproliferation hatte. Um auszuschließen, dass die antiproliferative Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  durch die Aktivierung des Vdr-Signalweges hervorgerufen wird, könnte man z.B. den Vdr in den Tumorzellen mittels small interfering RNA (siRNA) herunterregulieren.

Wie oben geschildert wurde, reagierten die beiden Zelllinien TP1588 und TP5014, obwohl sie beide aus murinen RMS hervorgehen, unterschiedlich auf die Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Nun ist aus Arbeiten der AG Hahn bekannt, dass TP1588 und

---

TP5014 eine wesentlich geringere Expression der Hh-Markergene *Ptch*, *Gli1* und *Igf2* im Vergleich zu direkt isolierten RMS besitzen, was auf einen Aktivitätsverlust der Signalkaskade durch die *in-vitro*-Kultivierung schließen lässt. Ein solcher Effekt wurde bereits für *Ptch*-assoziierte MB-Zelllinien beschrieben (Romer *et al.* 2004; Sasai *et al.* 2006). Die Isolierung von Zellen aus ihrer natürlichen Umgebung ist immer mit der Veränderung des ursprünglichen umgebenden Zellkontextes verbunden. So ist ein Tumor ein Konglomerat unterschiedlicher Zelltypen, wie z. B. Tumorzellen im eigentlichen Sinne, Fibroblasten und Immunzellen, wogegen Tumorzelllinien nur aus Tumorzellen bestehen und im Idealfall monoklonal sind. Auch die aus dem tumorumgebenden Gewebe wichtigen Signale für das Tumorzellwachstum (Dalton 1999; Hofmeister *et al.* 2008) fehlen in der Zellkultur. Weiterhin wird das Überleben der Tumorzelllinien in der Kulturschale dadurch sichergestellt, dass man ihnen einen Überschuss an Nährstoffen anbietet. Dieses veränderte Milieu entspricht ebenfalls nicht den ursprünglichen Gegebenheiten *in vivo*. Daraus ergibt sich zwangsläufig eine Veränderung des Phänotyps der Tumorzellen in Kultur, der somit das unterschiedliche Ansprechen der Zelllinien TP1588 und TP5014 auf  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  erklären könnte.

Der Einfluss von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf den Hh-Signalweg und das Wachstum wurde auch an MB-Zelllinien und Kulturen von frisch isolierten MB aus *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen untersucht (siehe Kapitel 3.1.2).

Aufgrund der großen Schwankungen der *Gli1*-Expression in den Einzelexperimenten konnte leider keine Aussage über die Hemmung der Hh-Aktivität nach  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung für die MB-Zelllinien getroffen werden. Eine signifikante Proliferationshemmung wurde nach  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung nur in der MB723 Zelllinien beobachtet. Dagegen war die Proliferationshemmung nach CP-Behandlung zusätzlich zu MB723 auch in MB794 signifikant. Gerade in diesen MB-Zelllinien konnte eine signifikante Reduktion der *Gli1*-Expression unter CP-Behandlung detektiert werden. Da in allen MB-Zelllinien auch die Vdr-Signalkaskade durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aktiviert wurde, ist es möglich, dass die proliferationshemmenden Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  bei dieser Tumorentität derjenigen von CP unterlegen ist. Eventuell sollte man jedoch in Folgeexperimenten eine höhere Dosis von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  einsetzen, die den Hh-Signalweg dann möglicherweise in allen Zelllinien beeinflusst.

---

Die Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wurde auch an MB-Primärkulturen untersucht (siehe Kapitel 3.1.3). Hierzu wurden Kulturen von drei isolierten MB angelegt. Ecke (AG Hahn) zeigte bereits, dass eine Behandlung mit CP zu einer Senkung der Proliferationsrate um 50 % bzw. 75 % führte, welche von einer effizienten Hemmung der Hh-Signalkaskade auf Transkriptionsebene, in *Ptch*-assoziierten MB-Primärkulturen begleitet wurde (Ecke *et al.* 2008; Berman *et al.* 2002). Dagegen konnte durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  - trotz signifikanter Aktivierung des Vdr-Signalweges - der Hh-Signalweg nur ansatzweise gehemmt werden. Auch hatte die Substanz keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation. Da letzteres Experiment jedoch nur einmal durchgeführt wurde und die entsprechende MB-Kultur auch unter FCS-freien Bedingungen weiter proliferierte, sollten diese Analysen wiederholt werden. Trotzdem ist es wahrscheinlich, dass bei dieser Tumorentität  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  im Vergleich zu CP hinsichtlich der Hemmung der Hh-Signalkaskade als auch der antiproliferativen Wirkung unterlegen ist.

Abschließend wurde die Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf die BCC-Zelllinie (ASZ001) und Hautkulturen von BCC-tragenden Mäusen untersucht (siehe Kapitel 3.1.4 und 3.1.5). Die Aktivität der Hh-Signalkaskade wurde in ASZ001 Zellen durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  signifikant gehemmt und der Vdr-Signalweg aktiviert, was mit einer starken antiproliferativen Wirkung einherging. CP dagegen hatte eine wesentlich stärker inhibierende Wirkung auf die Hh-Signalkaskade, wogegen der antiproliferative Effekt geringer als von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  war. Da CP die Vdr-Aktivität nicht beeinflusste, lässt dieses Experiment vermuten, dass der antiproliferative Effekt von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  durch sowohl Hemmung der Hh-Signalkaskade als auch Aktivierung des Vdr-Signalweges zustande kommen könnte.

Auch in BCC- und Normalhautkulturen wurde die Aktivität des Hh-Signalweges sehr effizient durch die  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung gehemmt und die Vdr-Signalkaskade aktiviert. Dies gilt sowohl für frühe BCC (30 d Kohorte) als auch für fortgeschrittene BCC (60 d Kohorte). Leider konnten an den Hautkulturen keine Analysen zur Proliferation durchgeführt werden.

Wie bereits diskutiert, wurde in allen Zellsystemen neben der *Gli1*-Expression auch die Expression des Vdr-Zielgens *Cyp24a1* untersucht. Die Untersuchungen ergaben, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die Vdr-Signalkaskade in allen untersuchten Zellen aktiviert

---

wird. Dies zeigt erstens, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in die Tumorzellen aufgenommen wurde und dort seine Wirkung als Vdr-Stimulator entfaltet. Dies ist von großer Bedeutung für den therapeutischen Einsatz dieser Substanz, da die Substanz gewebeängig ist. Zweitens lassen die Analysen vermuten, dass möglicherweise die Aktivierung des Vdr-Signalweges zur antiproliferativen Wirkung in ASZ001 und RMS-Zelllinien beiträgt:  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zeigt in RMS- und BCC-Zelllinien eine sehr viel stärkere antiproliferative Wirkung als CP, obwohl die hemmende Wirkung auf die Hh-Signalkaskade schwächer ist als diejenige von CP.

Es ist seit längerem bekannt, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  antitumoral z.B. durch Inhibition der Angiogenese und Tumorprogression wirkt. So konnten Mantell *et al.* an murinen Brustkrebs-Zellen *in vitro* und *in vivo* zeigen, dass durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung die Funktion von VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) gehemmt wird. Dies führt zur Hemmung des Tumorwachstum auf Grund von verminderter Angiogenese (Mantell *et al.* 2000). Auch bei malignen Melanomen, Dickdarm- und Prostata-Karzinomen sind antiproliferative Effekte durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  beschrieben worden (Colston *et al.* 1981; Skowronski *et al.* 1993; Tangpricha *et al.* 2005). Shabahang *et al.* zeigten an Zelllinien aus verschiedenen Weichgewebssarkomen eine proliferationsinhibierende dosisabhängige Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Shabahang *et al.* 1996). Daher ist auch im Falle der  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -behandelten *Ptch*-defizienten Tumorzellen anzunehmen, dass die Vdr-Aktivierung eine Rolle bei der Proliferationshemmung spielen sollte.

Um diskriminieren zu können, ob die antiproliferative Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  nun stärker über den Hh- oder den Vdr-Signalweg vermittelt wird, könnte man Versuche an *Smo*<sup>-/-</sup> (*Smo* ist möglicherweise das Zielmolekül von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) und *Vdr*<sup>-/-</sup> Zellen durchführen.

Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Arbeit, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  eine Hemmung des Hh-Signalweges und der Proliferation in RMS- und BCC-Zelllinien bewirkt. Die antiproliferative Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wird hierbei höchstwahrscheinlich über das Zusammenspiel der Aktivierung der Vdr-Signalkaskade und der Hemmung des Hh-Signalweges vermittelt.

## 4.2 Behandlung von RMS- oder BCC-tragenden Mäusen mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

### 4.2.1 Dosisfindungsstudie für $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an *Mus musculus*

Aus der Literatur war bekannt, dass 40 bis 50 ng  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  pro kg Körpergewicht pro Tag über Zeiträume von 1 bis 3 Monaten intraperitoneal appliziert werden kann (Banach-Petrosky *et al.* 2006). Des Weiteren zeigten Toxizitätsstudien zu  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , dass der LD50-Wert für Mäuse und Ratten bei einer intraperitonealen Applikation bei 1,0 mg/kg (einmalige Dosis) liegt. Bei Ratten zeigte die chronische Exposition über 26 Wochen mit 20 ng/kg  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  nur leichte Verkalkungen der Nierenkanälchen und Herzmuskelfasern, sowie leichte Knochenveränderungen (Fachinformation zu Calcitriol [Rocatriol<sup>®</sup> von Roche] unter [www.fachinfo.de](http://www.fachinfo.de)).

In dieser Arbeit wurden daher 11 *Ptch*<sup>+/+</sup>-Mäuse über einen Zeitraum von acht Wochen täglich mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in einer Konzentration von 50 ng/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert und auf eventuell auftretende Nebenwirkungen hin untersucht (siehe Kapitel 3.2.1). Durch die tägliche Applikation sollten starke Schwankungen des Medikamentes im Plasma vermieden werden.

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ist essentiell für die Kalziumhomöostase des Körpers. Die vier wichtigen Zielorgane sind Darm, Nieren, Knochen und Nebenschilddrüsen.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  fördert die Absorption von Kalzium und Phosphat im Darm und die Resorption in den Nieren und ist für die Entwicklung und Erhaltung eines gesunden Skelettes durch Stimulierung der Mineralisierung verantwortlich. In hohen Konzentrationen kann  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auch Osteoklasten stimulieren, so dass die Kalzium- und Phosphatkonzentration im Blut steigt. An den Nebenschilddrüsen hemmt  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die Parathormonsynthese. Eine Überdosierung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  kann daher zu einer exzessiven Kalzium-Absorption im Darm und Kalzium-Freisetzung aus den Knochen führen und somit eine Hyperkalzämie und eine Hyperkalziurie verursachen. Erhöhte Serum-Kalzium-Konzentrationen können zu Kalziumeinlagerungen in verschiedenen Organen führen. In der Niere kann dies zu Nierensteinen führen und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) negativ beeinflussen. Beides bewirkt auf lange Sicht eine funktionelle Niereninsuffizienz. Auch Weichgewebe wie Blutgefäße, Herz, Lungen, Muskel und Sehnen können

durch die Kalziumkristalle in ihrer Funktion gestört werden. An den Knochen resultiert eine Überdosierung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in Osteoporose (Holick 2004). Weitere Symptome insbesondere bei chronischer Überdosierung sind: Anorexie und Gewichtsverlust, Erbrechen, Verstopfung und Bauchkrämpfe. Bei jungen Individuen kann es auch zur Wachstumsstörung kommen. Eine starke Überdosierung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  kann zum Tod führen (Fachinformation zu Calcitriol [Rocatriol<sup>®</sup> von Roche] unter [www.fachinfo.de](http://www.fachinfo.de)).

Um diese Nebenwirkungen zu vermeiden, wurden die Versuchstiere mit speziellem Vitamin-D<sub>3</sub>-freiem sowie kalzium- und phosphatreduziertem Trockenfutter ernährt. Die Mäuse wurden täglich auf allgemeine Krankheitszeichen hin untersucht und wöchentlich gewogen, um eine Ernährungs- oder Wachstumsstörung auszuschließen. Die Serum-Kalzium-Konzentration wurde jede zweite Woche bestimmt. Eine Bestimmung der Serum-Phosphat-Konzentration oder des Serum-Kreatinins, als Nierenfunktionsparameter, wäre darüber hinaus wünschenswert gewesen. Doch das maximal zu entnehmende Blutvolumen aus dem retrobulbären Plexus (ca. 500  $\mu\text{l}$ , entspricht 10 % des Gesamtblutvolumens einer Maus) reichte aufgrund der technischen Limitationen nur für die laborchemische Untersuchung der freien Kalzium-Konzentration aus. Eine größere Blutabnahme hätten die Mäuse nicht vertragen. Auch eine Urinkontrolle auf Hyperkalziurie gestaltete sich technisch zu aufwendig, sodass nach Beendigung der Studie eine histologische Kontrolle der Nieren auf Kalkablagerungen und Entzündungszeichen durchgeführt wurde.

Während des gesamten Injektionszeitraums von acht Wochen waren keine Einschränkungen der Gesundheit der behandelten Tiere festzustellen. Die Gewichtsentwicklung entsprach der Vergleichskohorte, die mit dem Lösungsmittel behandelt worden war. Auch waren keine Verhaltensauffälligkeiten der Mäuse zu beobachten.

Das Referenzintervall aus der Literatur für die Serum-Kalzium-Konzentration von C57BL6-Mäuse (Gewicht 20-30 g) liegt zwischen 1,88 und 2,33 mmol/l für männliche, und zwischen 1,79 und 2,29 mmol/l für weibliche Tiere (Boehm *et al.* 2007).

Zu Beginn des Behandlungszeitraums waren die Kalzium-Konzentrationen aller Tiere weit gestreut (zwischen 2,32 und 2,68 mmol/l). Die Kalziumkonzentrationen der mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten Tiere pendelte sich nach acht Wochen täglicher

---

Applikation auf einen Wert um 2,4 mmol/l mit einer geringen Standardabweichung unter den einzelnen Tieren ein. Die Lösungsmittelkohorte erreichte hingegen einen Mittelwert von 2,58 mmol/l (siehe Kapitel 3.2.1). Die tägliche Gabe von 50 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  schien somit die Serum-Kalzium-Konzentrationen auf den ersten Blick zu vermindern. Diese Beobachtung könnte auf die Umstellung auf das kalzium- und phosphatreduzierte Futter zurückzuführen sein. In jedem Fall kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei 50 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  noch nicht um eine toxische Dosis handelt, da keine Verkalkungen oder entzündliche Veränderungen der Nieren zu beobachten waren. Eine tägliche Dosis von 50 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  über 8 Wochen schien also eine gutverträgliche Dosis für eine *in-vivo*-Studie an Mäusen zu sein.

Die tägliche therapeutische Dosis von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  für den Menschen (z.B. bei renaler Osteodystrophie) wird dagegen von dem Fachinformationsverzeichnis der Roten Liste<sup>®</sup> mit 0,25 bis 1,0  $\mu\text{g}$  pro Tag per os angegeben. Bei einem durchschnittlichen menschlichen Körpergewicht von 70 kg entspricht das einer Dosis von 3,57 bis 14,29 ng/kg/d und ist damit wesentlich niedriger als die Dosis, die von Mäusen vertragen wird.

#### 4.2.2 Behandlung von RMS-tragenden Mäusen mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Da eine tägliche Dosis von 50ng  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  pro kg Körpergewicht über 8 Wochen keinerlei Nebenwirkungen hatte, wurden RMS-tragenden *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäuse nun mit dieser Dosis behandelt. Dies rief bei 50 % der RMS eine Wachstumshemmung hervor (siehe Kapitel 3.2.2).

Die antiproliferativen Eigenschaften von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wurden auch schon in anderen murinen Tumormodellen und einigen verschiedenen Zelllinien, einschließlich Plattenepithelkarzinomen sowie Tumoren der Prostata, Ovarien, Mamma und Lunge beobachtet (Deeb *et al.* 2007). Bislang wurde vermutet, dass diese antitumorale Eigenschaften von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf die Aktivierung der Vdr-Signalkaskade (z.B. durch die Induktion der *p21*<sup>WAF1</sup> (*CDKN1A*)-Transkription), die zum Zellzyklus Arrest führt (Thorne *et al.* 2010) oder auf Vdr-unabhängige, so genannte „nicht-genomische“, Prozesse (z.B. Kalziumanstieg durch die Aktivierung der Proteinkinase C) zurückzuführen sei (Deeb *et al.* 2007). Die Daten dieser Arbeit



deuten nun an, dass die antitumoralen Eigenschaften von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zusätzlich zur Aktivierung der oben genannten Prozesse auch in der Inhibition der Hh-Signalkaskade begründet liegen. Tatsächlich konnte im Anschluss an diese Arbeit von Henkel (AG Hahn) über qRT-PCR Analysen der Gene *Glil* und *Cyp24a1* gezeigt werden, dass die Tumorregression der therapiesensitiven RMS mit einer signifikanten Inhibition der Aktivität der Hh-Signalkaskade und einer signifikanten Aktivierung des Vdr-Signalwegs korreliert. Diese Effekte waren reversibel und waren nach dem therapiefreien Intervall nicht mehr zu beobachten. Welcher dieser Effekte (Aktivierung des Vdr- oder Hemmung des Hh-Signalwegs) hierbei wichtiger bei der antitumoralen Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ist, ist noch offen. Es ist möglich, dass bei RMS die Hemmung der Hh-Signalkaskade eine weniger bedeutende Rolle hat. Dies wird durch eine Behandlung von RMS mit dem spezifischen Smo-Antagonist CP deutlich. So wird die Hh-Signalkaskade *in vivo* in RMS von *Ptch*-mutanten Mäusen durch CP sehr stark inhibiert, dennoch hat die CP-Behandlung keinen Einfluss auf das Wachstum der Tumore (Ecke *et al.* 2008). Durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  werden hingegen 50 % der Tumoren im Wachstum gehemmt, obwohl die Hemmung der Hh-Signalkaskade durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  moderat ist. Da  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  im Gegensatz zu CP auch den Vdr-Signalweg aktiviert, kann vermutet werden, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  seine antitumoralen Eigenschaften bei *Ptch*-assoziierten RMS eher durch die Beeinflussung des Vdr-Signalwegs entfaltet. Nichtsdestotrotz könnte es auch möglich sein, dass der antitumorale Effekt von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf RMS auf einer gleichzeitigen Aktivierung der Vdr-Signalkaskade und einer Hemmung des Hh-Signalweges beruht. Dies ist bisher jedoch nur eine Vermutung.

In Experimenten, die auf diese Arbeit aufbauen, konnte Henkel (AG Hahn) weiterhin zeigen, dass die  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung von RMS-tragenden Mäusen auch zu einer Expression des Muskeldifferenzierungsmarkers *Myogenin* in den Tumoren führt. Da durch CP keine *Myogenin*-Expression induziert wird (Ecke *et al.* 2008), muss dies eine spezifische Hh-unabhängige Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sein. Da die Aktivierung des Vdr-Signalwegs die *Myogenin*-Expression eher hemmt (Endo *et al.* 2003), muss zudem angenommen werden, dass die durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  hervorgerufene *Myogenin*-Expression in RMS Vdr-unabhängig geschieht. Dies zeigt, dass neben den bereits beschriebenen genomischen (Vdr-vermittelten) Effekten wahrscheinlich andere „nicht-genomische“ Vorgänge durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in *Ptch*-

---

assoziierten Tumoren induziert werden, die möglicherweise ebenfalls antitumorale Effekte haben.

Wie bereits erwähnt wurde, war das Wachstum von etwa 50 % der mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten RMS progredient. Da in diesen Tumoren weder die Hh-Signalkaskade gehemmt, noch die Vdr-Signalweg oder die Expression der Muskeldifferenzierungsmarker aktiviert worden war, ist es denkbar, dass diese therapieresistenten Tumore Mutationen aufweisen, die eine Vdr- oder Hh-Signalweg unabhängige Proliferation bewirken.

Auf molekularer Ebene wurde jedoch auch in den  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -resistenten RMS eine signifikante Reduktion des Proliferationsmarkers Ki67 festgestellt (siehe Kapitel 3.2.2, Abbildung 22). Zu diskutieren ist nun, ob das mittels VCT dokumentierte Tumolvolumen tatsächlich mit der Proliferation der RMS korreliert. Die Volumenzunahme der Tumore könnte möglicherweise auch auf Einblutungen in nekrotisierende Areale im Tumor und zystische Veränderungen zurückzuführen sein, welche die VCT-Daten verfälscht haben könnten.

Obwohl viele Fragen noch offen sind, kann man zusammenfassend festhalten, dass eine Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  eine antiproliferative Wirkung auf RMS hat. In einer Folgestudie sollte man nun versuchen, durch Erhöhung der Dosis von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die Ansprechrate der Tumore zu erhöhen. Darüber hinaus wäre eine *in-vivo*-Studie mit einer Kombinationsbehandlung aus  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und z.B. Doxorubicin zu überlegen. Doxorubicin ist ein Anthracyclin und wird als Chemotherapeutikum bei RMS verwendet (Sandler *et al.* 2001). Jedoch schränken Nebenwirkungen wie Knochenmarksdepression und Kardiotoxizität den therapeutischen Einsatz von Doxorubicin häufig ein (Simůnek *et al.* 2009), so dass durch die Kombination beider Medikamente eventuell niedrigere Dosierungen eingesetzt werden könnten und dadurch die entsprechenden Nebenwirkungen begrenzt werden.

### 4.2.3 Behandlung von BCC-tragenden Mäusen mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Neben RMS wurde auch das *in-vivo*-Potential von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  für die Therapie von *Ptch*-assoziierten BCC untersucht (siehe Kapitel 3.2.3). Im Gegensatz zu RMS wurden die BCC-tragenden Mäuse mit einer geringeren Dosis von 40 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelt. Trotzdem bewirkte die  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Behandlung bei BCC eine deutliche Wachstumshemmung, die in HE-gefärbten Schnitten sichtbar war und durch Analyse von Ki67-positiven Zellen objektiviert werden konnte (siehe Kapitel 3.2.3, Abbildung 26).

Daneben induzierte  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  eine Hemmung der Hh-Signalkaskade, jedoch keine Induktion der Vdr-Aktivität. Dies deutet darauf hin, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  Vdr-unabhängig vermutlich über die Hemmung der Hh-Signalkaskade einen antiproliferativen Effekt auf murine BCC besitzt. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass das *Gli1*-Expressionsniveau positiv mit dem Ki67-Proliferationsindex korreliert: Je stärker die *Gli1*-Expression gehemmt wurde, desto geringer war der Proliferationsindex. So zeigte Kohorte 1 die stärkste Inhibition des Hh-Signalweges und ebenfalls den geringsten Proliferationsindex (siehe Kapitel 3.2.3, Abbildung 26 und 28). In der Kohorte 2 konnte hingegen keine signifikante *Gli1*-Expressionshemmung detektiert werden und auch der Proliferationsindex war nicht signifikant geringer als in der Kontrollkohorte.

Über die Pharmakokinetik und den Metabolismus von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in Mäusen gibt es bisher kaum veröffentlichte Untersuchungen, sodass anzunehmen ist, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in den BCC möglicherweise nicht die erforderliche intrazelluläre Konzentration erreichte um die Vdr-Signalkaskade zu aktivieren. Die Anflutung scheint hingegen ausreichend zu sein um Smo und damit den Hh-Signalweg zu blockieren. Um eine bessere intrazelluläre Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zu erzielen, sollte die Studie mit einer höheren Dosierung wiederholt werden. Möglicherweise könnte auch eine topische Applikation (z.B. mit einer  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -haltigen Salbe) sinnvoll sein, um höhere Konzentrationen in den BCC zu erreichen.

Das Fehlen einer signifikanten Induktion der *K10*- oder *K1*-Expression, welche beide Marker für den Differenzierungsgrad von Keratinozyten sind, könnte möglicherweise mit der fehlenden Aktivierung des Vdr-Signalweges in Verbindung stehen. Da eine Hemmung der Hh-Signalkaskade die Expression von *K10* aktiviert (Regl *et al.* 2004; Tamiji *et al.* 2005), ist es ebenfalls möglich, dass die inhibierende Wirkung von

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf den Hh-Signalweg nicht ausreichend war, um die *K10*-Expression in den Tumoren zu aktivieren. Durch eine erhöhte Dosis von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  könnte sich klären lassen, ob  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zu einer verstärkten Differenzierung der BCC führen kann.

### 4.3 Ausblick

Im Anschluss an diese Arbeit könnte nun die Fragestellung bearbeitet werden, ob es in den *Ptch*-defizienten Tumorzellen auf Grund der fehlenden Sekretion von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  durch *Ptch* (Bijlsma *et al.* 2006) zur intrazellulären Akkumulation dieser Substanz kommt und/oder die Synthese von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in diesen Zellen gehemmt wird. Darüber hinaus sollte auch die Frage aufgegriffen werden, ob *Ptch* weitere Sterole, die entweder Smo-aktivierend oder -inhibierend wirken, sezernieren kann.

Auf der Grundlage dieser Arbeit sollten unbedingt weitere *in-vivo*-Studien angeschlossen werden, die das hier entdeckte therapeutische Potential von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  bei *Ptch*-assoziierten RMS und BCC stärken und untermauern könnten.

So sollten die *in-vivo*-Experimente an RMS mit höheren  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Dosierungen wiederholt werden. Auch könnte man  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und z.B. Doxorubicin sowohl *in vitro* als auch *in vivo* kombinieren. Es ist möglich, dass hierdurch ein stärkerer antiproliferativer Effekt auf RMS hervorgerufen wird. Möglicherweise könnte durch die Kombinationsbehandlung auch die Progression von RMS gehemmt werden, die Resistenzen gegenüber  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zeigen. Diese Annahme basiert auf der Tatsache, dass die Wirkung von Doxorubicin auf der Interkalation in die DNA in schnell proliferierenden Zellen beruht und somit unabhängig von Signalwegen funktioniert.

*In-vivo*-Experimente an BCC sollten ebenfalls mit einer höheren  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Dosis durchgeführt werden. Auch sollte man versuchen, durch topische Applikation die lokale Dosis von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zu erhöhen.

## 5. Zusammenfassung

Der Hh-Rezeptor und Tumorsuppressor Ptch ist wahrscheinlich eine Oxysterolpumpe, die Vitamin-D<sub>3</sub>-Derivate in den extrazellulären Raum sezerniert. Diese Derivate hemmen den Signaltransduktionspartner von Ptch, Smo, und somit den Hh-Signalweg (Bijlsma *et al.* 2006). Tumore, die aufgrund von *Ptch*-Mutationen entstehen, sollten daher eine gestörte Homöostase dieser Vitamin-D<sub>3</sub>-Derivate aufweisen. Es ist anzunehmen, dass eine Substitution der entsprechenden Vitamin-D<sub>3</sub>-Derivate einen antiproliferativen Effekt auf *Ptch*-assoziierte Tumore hat.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, die aktive Form von Vitamin D<sub>3</sub>, für die Behandlung von *Ptch*-assoziierten Rhabdomyosarkomen (RMS), Basalzellkarzinomen (BCC) und Medulloblastomen (MB) geeignet ist. Hierzu wurden murine Tumorzelllinien eingesetzt, an denen die Wirkung von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auf den Hh-Signalweg, den Signalweg des Vitamin-D-Rezeptors (Vdr) und die Proliferation untersucht wurde. Zudem wurde der antiproliferative Effekt der Substanz *in vivo* im *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mausmodell für RMS und im *Ptch*<sup>fllox/fllox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>-Mausmodell für BCC überprüft.

Durch qRT-PCR Analysen des Hh-Zielgens *Gli1* wurde gezeigt, dass 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> die Aktivität der Hh-Signalkaskade in RMS-Zelllinien sowie in BCC-Zelllinien und in BCC-Hautkulturen signifikant hemmt. Da 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auch den Vdr-Signalweg aktiviert, wurde zusätzlich die Expression des Vdr-Zielgens *Cyp24a1* vermessen. In den genannten Zelllinien und den BCC-Hautkulturen war nach 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Behandlung ein Anstieg der *Cyp24a1*-Expression und damit eine Aktivierung des Vdr-Signalwegs zu verzeichnen. Zusätzlich wurde durch 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> die Proliferation in den untersuchten RMS- und BCC-Zelllinien gehemmt, was über BrdU-Inkorporationsassays ermittelt wurde. In den BCC-Hautkulturen war diese Untersuchung nicht möglich. Interessanterweise war der antiproliferative Effekt von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auf die RMS- und BCC-Zelllinien stärker als derjenige des spezifischen Smo-Antagonisten Cyclopamin, obwohl dieser einen stärkeren inhibierenden Effekt auf die Hh-Signalkaskade ausübte. Diese Daten lassen vermuten, dass der antiproliferative Effekt von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in diesen Zellen wahrscheinlich auch durch die Aktivierung des Vdr-Signalwegs zustande kommt.

Eine konkrete Aussage zur 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-vermittelten Proliferationshemmung von MB-Zelllinien und -Primärkulturen war nicht möglich.

*In vivo* wurden 50% der mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten RMS (50 ng/kg/d) in ihrem Wachstum gehemmt. Dies wurde durch computertomographische Vermessungen der Tumore ermittelt. Analysen des Proliferationsmarkers Ki67 bestätigten die Ergebnisse. Auch das Wachstum vom BCC *in vivo* wurde durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (40ng/kg/d) stark und eindeutig gehemmt. Dies ging mit einer signifikanten Hemmung der *Gli1*-Expression einher. Eine Aktivierung des Vdr-Signalwegs war mit dieser Konzentration jedoch nicht zu detektieren. Weiterführende Analysen konnten leider aufgrund der kurz bemessenen Zeit nicht durchgeführt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  als neues Medikament in der Behandlung von *Ptch*-assoziierten Tumoren Anwendung finden könnte. Wie in der Arbeit diskutiert wird, ist die antitumorale Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf *Ptch*-assoziierte RMS und BCC wahrscheinlich neben der Hemmung der Hh-Signalkaskade auch auf eine gleichzeitige Aktivierung des Vdr-Signalwegs zurückzuführen. Durch seine multimodale Funktion könnte  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  daher bisherigen Therapien von *Ptch*-assoziierten Tumoren, welche spezifische Hh-Antagonisten umfassen, überlegen sein.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	Calcitriol
25(OH)D <sub>3</sub>	Calcidiol
AG	<u>A</u> rbeitsgruppe
Bax	<u>B</u> cl-2- <u>a</u> ssociated <u>X</u> protein
BCC	<u>B</u> asal- <u>C</u> ell- <u>C</u> arcinoma(ta)
Bcl2	<u>B</u> - <u>c</u> ell lymphoma <u>2</u>
bp	<u>B</u> asenpaar
BrdU	5- <u>B</u> romo-2- <u>D</u> eoxyu <u>r</u> idin
BSA	<u>b</u> ovin <u>s</u> erum <u>a</u> lbumine (Rinderserumalbumin)
cDNA	<u>c</u> opy <u>D</u> NA
CP	<u>C</u> yclopamin
C-terminal	<u>c</u> arboxy <u>t</u> erminal
Ct-Wert	<u>c</u> ycle <u>t</u> reshold (Schwellenwert)
Cyp24a1	<u>C</u> ytochrom <u>P</u> 450 <u>24a1</u> : 25-HydroxyvitaminD <sub>3</sub> -24 Hydroxylase
Cyp27a1	<u>C</u> ytochrom <u>P</u> 450 <u>27a1</u> : 25-Hydroxylase
Cyp27b1	<u>C</u> ytochrom <u>P</u> 450 <u>27b1</u> : 1 $\alpha$ -Hydroxylase
Cyp2r1	<u>C</u> ytochrom <u>P</u> 450 <u>2r1</u> : 25-Hydroxylase
DAB	3,3' <u>D</u> iamino <u>b</u> enzidine
DBP	Vitamin- <u>D</u> - <u>b</u> indendes <u>P</u> rotein
DEPC	<u>D</u> iethylpyro <u>c</u> arbonat
<i>Dhh</i>	<i><u>D</u>esert <u>h</u>edge<u>h</u>og</i>
Dig	<u>D</u> igoxigenin
<i>Disp</i>	<i><u>D</u>ispatched</i>
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium
DMSO	N.N.- <u>D</u> imethylsulfoxid
DNA	<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ukleotid <u>t</u> riphosphate
DTT	<u>D</u> ithiothreitol
<i>E-cadherin</i>	<i><u>e</u>pthelia-<u>c</u>adherin</i>
EB 1089	Seocalcitol
EDTA	<u>E</u> thylen- <u>d</u> iamin- <u>t</u> etra <u>a</u> cetat
<i>ERT2</i>	<i><u>R</u>OSA26<u>C</u>re<u>E</u>RT2</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EtOH	<u>E</u> thanol
FCS	<u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum (fötales Kälberserum)



<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
gDNA	genomic <u>DNA</u>
GFR	glomeruläre <u>F</u> iltrationsrate
<i>Gli</i>	<i>Gliom-associated oncogene homolog</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
<i>Hh</i>	<i>Hedgehog</i>
HMG-CoA-Reduktase	3- <u>H</u> ydroxy-3- <u>m</u> ethylglutaryl- <u>C</u> oenzym- <u>A</u> - <u>R</u> eduktase
HRP	horse <u>r</u> adisch peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IHC	<u>I</u> mmun <u>h</u> istochemie
<i>Ihh</i>	<i>Indian hedgehog</i>
i.m.	<u>i</u> nter <u>m</u> uskulär
i.p.	<u>i</u> nter <u>p</u> eritoneal
ISH	<i>in-situ</i> - <u>H</u> ybridisierung
K1	Zyto <u>k</u> eratin <u>1</u>
K10	Zyto <u>k</u> eratin <u>10</u>
MB	<u>M</u> edulloblastom(a)
MBSTL	Maleinsäure/Natriumchlorid/Levamisol/Tween-20-haltiger Puffer
mRNA	<u>m</u> essenger <u>RNA</u>
NBT/BCIP	<u>N</u> itro <u>b</u> lue tetrazolium/5- <u>B</u> romo-4-chloro-3- <u>i</u> ndolyl phosphate
<i>neoR</i>	<i>Neomycin-Resistenzgen</i>
NT	<u>N</u> atriumchlorid/ <u>T</u> ris-haltiger Puffer
ntc	<u>n</u> o <u>t</u> emplate <u>c</u> ontrol
N-terminal	<u>a</u> mino <u>t</u> er <u>m</u> inal
NTM	<u>N</u> atriumchlorid/ <u>T</u> ris/ <u>M</u> agnesiumchlorid-haltiger Puffer
NTMLT	<u>N</u> atriumchlorid/ <u>T</u> ris/ <u>M</u> agnesiumchlorid/ <u>L</u> evamisol/ <u>T</u> ween-20-haltiger Puffer
PBS	<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline (Phosphat-gepufferte Natriumchlorid Lösung)
$p21^{WAF1}$ ( <i>CDKN1A</i> )	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
$p27^{kip1}$ ( <i>CDKN1B</i> )	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
PCR	polymerase <u>c</u> hain reaction, (Polymerasekettenreaktion)
p(dN) <sub>6</sub>	<u>P</u> rimers random: <u>D</u> eoxy <u>n</u> ukleotid- <u>H</u> examer
PFA	<u>P</u> araformaldehyd
P/S	<u>P</u> enicillin/ <u>S</u> treptomycin
<i>Ptch</i>	<i>Patched</i>
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> <u>P</u> CR

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
RMS	<u>R</u> habdomyosarkom(a)
RNA	<u>r</u> ibonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RND	<u>R</u> esistenz- <u>N</u> odulation- <u>D</u> ivision
rpm	<u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	<u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute medium
rRNA	<u>r</u> ibosomale <u>R</u> NA
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
RXR $\alpha$	<u>R</u> etinoid- <u>X</u> - <u>R</u> ezeptor- <u>\alpha</u>
<i>Shh</i>	<i><u>S</u>onic <u>h</u>edge<u>h</u>og</i>
siRNA	<u>s</u> mall <u>i</u> nterfering <u>R</u> NA
SM	<u>S</u> kelett <u>m</u> uskel
<i>Smo</i>	<i><u>S</u>moothened</i>
SSII	Reverse Transkriptase <u>S</u> uper <u>S</u> cript <u>I</u> I
SSC	<u>s</u> tandard <u>s</u> odium <u>c</u> hlorid solution (Standard Natriumchlorid Lösung)
SSD	<u>s</u> terol <u>s</u> ensing <u>d</u> omain
STE	<u>S</u> DS/ <u>T</u> ris/ <u>E</u> DTA-haltiger Puffer
Taq	<u>T</u> hermus <u>a</u> quaticus
TBE	<u>T</u> ris- <u>B</u> orsäure- <u>E</u> DTA Lösung
TBS	<u>t</u> ris- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline (Tris-gepufferte Natriumchlorid Lösung)
TP	<u>T</u> orsten <u>P</u> ietsch
<i>Trc8</i>	<i><u>T</u>ranslocation in <u>r</u>enal <u>c</u>arcinoma on <u>c</u>hromosome <u>8</u></i>
tRNA	<u>t</u> ransfer <u>R</u> NA
U	<u>u</u> nit (Enzymaktivitätseinheit)
UV-Licht	<u>u</u> ltraviolette <u>s</u> Licht
VCT	<u>v</u> olumetric <u>c</u> omputed <u>t</u> omography (Volumen Computertomographie)
Vdr	<u>V</u> itamin- <u>D</u> - <u>R</u> ezeptor
VDRE	<u>v</u> itamin <u>D</u> response element
VEGF	<u>v</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
Vitamin D <sub>3</sub>	Cholecalciferol
v/v	<u>v</u> olume/ <u>v</u> olume (Volumen/Volumen)
<i>Wnt</i>	<i><u>W</u>ingless</i>
wt	<u>W</u> ildtyp
w/v	<u>w</u> eight/ <u>v</u> olume (Gewicht/Volumen)
x g	fache Erdbeschleunigung

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung		Seite
Abbildung 1:	Schematische Darstellung des inaktiven und des physiologisch aktivierten sowie des pathologisch aktivierten Hh-Signalweges.	4
Abbildung 2:	Schematische Darstellung des <i>Ptch<sup>neo67</sup></i> -Lokus.	5
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Strategie zur Herstellung einer konditionellen <i>Ptch</i> -Deletion.	7
Abbildung 4:	Relative Quantifizierung der Expressionslevel der Vdr-Zielgene <i>p27<sup>kip1</sup></i> und <i>Myogenin</i> zur Bestimmung der Aktivität des Vdr-Signalweges in RMS und SM.	13
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der möglichen Verknüpfung zwischen der Vdr- und der Hh-Signalkaskade.	14
Abbildung 6:	Quantifizierung der <i>Gli1</i> - und der <i>Cyp24a1</i> -Expression zur Bestimmung der Aktivität des Hh- und Vdr-Signalweges in den RMS-Zelllinien TP1588 und TP5014 nach Behandlung mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .	53
Abbildung 7:	Bestimmung der Proliferationsrate der RMS-Zelllinien TP1588 und TP5014 in Gegenwart von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .	54
Abbildung 8:	Quantifizierung der <i>Cyp24a1</i> -Expression in den MB-Zelllinien MB627, MB723 und MB794 nach Behandlung mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .	55
Abbildung 9:	Bestimmung der Proliferationsrate der MB-Zelllinien MB672, MB723 und MB794 in Gegenwart von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .	56
Abbildung 10:	Quantifizierung der <i>Gli1</i> - und <i>Cyp24a1</i> -Expression zur Bestimmung der Aktivität des Hh- und des Vdr-Signalweges in primär kultivierten MB-Zellkulturen nach Behandlung mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .	57
Abbildung 11:	Bestimmung der Proliferationsrate kultivierter MB-Zellen in Gegenwart von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .	58
Abbildung 12:	Quantifizierung der <i>Gli1</i> - und <i>Cyp24a1</i> -Expression zur Bestimmung der Aktivität des Hh- und des Vdr-Signalweges in der BCC-Zelllinie ASZ001 nach Behandlung mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .	59
Abbildung 13:	Bestimmung der Proliferationsrate der BCC-Zelllinie ASZ001 in Gegenwart von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .	60
Abbildung 14:	Induktion von BCC an Ohr- und Schwanzhaut in <i>Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup></i> Mäusen nach i.m. Injektion von 100 $\mu\text{g}$ Tamoxifen.	61
Abbildung 15:	Induktion von BCC in <i>Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup></i> Mäusen nach i.m. Injektion von 100 $\mu\text{g}$ Tamoxifen.	62
Abbildung 16:	HE-Färbungen von BCC- und Hautkulturen nach 10 Tagen Inkubation in DMEM mit unterschiedlichen FCS-Konzentrationen.	63
Abbildung 17:	Quantifizierung der <i>Gli1</i> -Expression zur Bestimmung der Aktivität des Hh-Signalweges in BCC- und Normalhautkulturen nach Behandlung mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .	64
Abbildung 18:	Quantifizierung der <i>Cyp24a1</i> -Expression zur Bestimmung der Aktivität des Vdr-Signalweges in BCC- und Normalhautkulturen nach Behandlung mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .	65
Abbildung 19:	Untersuchung der Serum-Kalzium-Konzentration von <i>Ptch<sup>+/+</sup>C57BL/6xBALB/c</i> -Mäusen nach Injektion mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .	68
Abbildung 20:	Studienstruktur zur Behandlung von RMS-tragenden <i>Ptch<sup>neo67/+</sup></i> -Mäusen mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .	69

---

Abbildung	Seite
Abbildung 21 A: Individuelle Wachstumskurven der RMS der mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder Lösungsmittel (EtOH) behandelten <i>Ptch<sup>neo67/+</sup></i> -Mäuse.	70
Abbildung 21 B: RMS-Tumorwachstum während und nach der Therapie.	71
Abbildung 22: Prozentuale Darstellung der Ki67-positiven RMS-Zellen nach der Behandlung mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .	72
Abbildung 23: Studienstruktur zur Behandlung von BCC-tragenden <i>Ptch<sup>flax/flax</sup>ERT2<sup>+/-</sup></i> -Mäusen mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .	73
Abbildung 24: BCC in <i>Ptch<sup>flax/flax</sup>ERT<sup>+/-</sup></i> -Mäusen nach Behandlung mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (40 ng/kg/d) bzw. Lösungsmittel (EtOH).	75
Abbildung 25: Analysen von BCC in <i>Ptch<sup>flax/flax</sup>ERT<sup>+/-</sup></i> -Mäusen nach Behandlung mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .	77
Abbildung 26: Prozentuale Darstellung der Ki67-positiven BCC-Zellen nach der Behandlung mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .	78
Abbildung 27: Caspase-3-Aktivität in BCC nach Behandlung mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .	79
Abbildung 28: Relative Quantifizierung der <i>Gli1</i> -, <i>Kl1</i> - und <i>Kl0</i> -Expression BCC-tragender Haut nach Behandlung mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .	81

---

## 8. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle</b>		<b>Seite</b>
Tabelle 1:	Auflistung der verwendeten eukaryotischen Zellen.	24
Tabelle 2:	Auflistung der verwendeten DNA-Oligonukleotide für die Genotypisierung von Mäusen.	25
Tabelle 3:	Auflistung der für die qRT-PCR verwendeten DNA-Oligonukleotide.	26
Tabelle 4:	Auflistung der verwendeten primären Antikörper.	27
Tabelle 5:	Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper.	27
Tabelle 6:	Auflistung der verwendeten <i>in-situ</i> -Hybridisierungssonden.	28
Tabelle 7:	Auflistung der verwendeten Enzyme.	28
Tabelle 8:	Verwendete Gewebe zur Synthese der Standard-cDNA.	35
Tabelle 9:	Aufteilung der Kohorten zur <i>in-vitro</i> -Behandlung von BCC-tragender Haut und Normalhaut mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .	62
Tabelle 10:	Schema für die Bestimmung der Dosierung von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in <i>Ptch</i> <sup>+/+</sup> -Mäusen.	66
Tabelle 11:	Zusammensetzung der Kohorten zur Therapie von RMS mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ <i>in vivo</i> .	70
Tabelle 12:	Zusammensetzung der Kohorten zur Therapie von BCC mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ <i>in vivo</i> .	73

## 9. Formelverzeichnis

<b>Formel</b>		<b>Seite</b>
Formel 1:	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.	31
Formel 2:	Bestimmung der normalisierten Genexpression.	37
Formel 3:	Bestimmung der relativen Genexpression.	38

---

## 10. Literaturverzeichnis

Akutsu N, Lin R, Bastien Y, Bestawros A, Enepekides DJ, Black MJ, White JH (2001): Regulation of gene Expression by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and Its analog EB1089 under growth-inhibitory conditions in squamous carcinoma Cells. *Mol Endocrinol* 15, 1127-1139.

Albertson DG, Ylstra B, Seagraves R, Collins C, Dairkee SH, Kowbel D, Kuo WL, Gray JW, Pinkel D (2000): Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat Genet* 25, 144-146.

Apperley FL (1941): The relation of solar radiation to cancer mortality in North America. *Cancer Res* 1, 191-195.

Bai CB, Auerbach W, Lee JS, Stephen D, Joyner AL (2002): Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development* 129, 4753-4761.

Bai CB, Stephen D, Joyner AL (2004): All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3. *Dev Cell* 6, 103-115.

Banach-Petrosky W, Ouyang X, Gao H, Nader K, Ji Y, Suh N, DiPaola RS, Abate-Shen C (2006): Vitamin D Inhibits the Formation of Prostatic Intraepithelial Neoplasia in Nkx3.1; Pten Mutant Mice. *Clin Cancer Res* 12, 5895-5901.

Barnes EA, Kong M, Ollendorff V, Donoghue DJ (2001): Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *EMBO J* 20, 2214-2223.

Beer TM, Ryan CW, Venner PM, Petrylak DP, Chatta GS, Ruether JD, Redfern CH, Fehrenbacher L, Saleh MN, Waterhouse DM *et al.* (2007): Double-blinded randomized study of high-dose calcitriol plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel in androgen-independent prostate cancer: A report from the ASCENT. *Investigators J Clin Oncol* 25, 669-674.

Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN, Chen JK, Cooper MK, Taipale J, Olson JM *et al.* (2002): Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* 297, 1559-1561.

Bijlsma MF, Spek CA, Zivkovic D, van de Water S, Rezaee F, Peppelenbosch MP (2006): Repression of smoothened by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion. *PLoS Biol* 4, e232.

Boehm O, Zur B, Koch A, Tran N, Freyenhagen R, Hartmann M, Zacharowski K (2007): Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice. *Biol Chem* 388, 1255-1256.

---

Bridge JA, Liu J, Weibolt V, Baker KS, Perry D, Kruger R, Qualman S, Barr F, Sorensen P, Triche T *et al.* (2000): Novel genomic imbalances in embryonal rhabdomyosarcoma revealed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization: an intergroup rhabdomyosarcoma study. *Genes Chromosomes Cancer* 27, 337-344.

Burke R, Nellen D, Bellotto M, Hafen E, Senti KA, Dickson BJ, Basler K (1999): Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* 99, 803-815.

Campbell MJ, Elstner E, Holden S, Uskokovic M, Koeffler HP (1997): Inhibition of proliferation of prostate cancer cells by a 19-nor-hexafluoride vitamin D3 analogue involves the induction of p21waf1, p27kipl and E-cadherin. *J Mol Endocrinol* 19, 15-27.

Chamoun Z, Mann RK, Nellen D, von Kessler DP, Bellotto M, Beachy PA, Basler K (2001): Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal. *Science* 293, 2080-2084.

Chen TC (2008): 25-Hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase (CYP27B1) is a new class of tumor suppressor in the prostate. *Anticancer Res* 28, 2015-2017.

Cheng HT, Chen JY, Huang YC, Chang HC, Hung WC (2006): Functional role of VDR in the activation of p27Kip1 by the VDR/Sp1 complex. *J Cell Biochem* 98, 1450-1456.

Cheng JB, Motola DL, Mangelsdorf DJ, Russel DW (2003): De-orphanization of Cytochrome P450 2R1, a microsomal Vitamin D 25-Hydroxylase. *J Biol Chem* 278, 38084-38093.

Colston K, Colston MJ, Feldman D (1981): 1,25-dihydroxyvitamin D3 and malignant melanoma: the presence of receptors and inhibition of cell growth in culture. *Endocrinology* 108, 1083-1086.

Corcoran RB, Scott MP (2006): Oxysterols stimulate Sonic Hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8408-8413.

Dagher R, Helman L (1999): Rhabdomyosarcoma: an overview. *Oncologist* 4, 34-44.

Dalton WS (1999): The tumor microenvironment as a determinant of drug response and resistance. *Drug Resist Updat*, 2, 285-288.

Davies JP, Chen FW, Ioannou YA (2000): Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein. *Science* 290, 2295-2298.

Deeb KK, Trump DL, Johnson CS (2007): Vitamin D signaling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 7, 684-700.

DeLuca HF (2004): Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 80, 1689S-1696S.

- 
- Dullin C, Missbach-Guentner J, Vogel WF, Grabbe E, Alves F (2007): Semi-automatic classification of skeletal morphology in genetically altered mice using flat-panel volume computed tomography. *PLoS Genet* 3, e118.
- Duman-Scheel M, Weng L, Xin S, Du W (2002): Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature* 417, 299-304.
- Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP (1993): Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417-1430.
- Ecke I, Rosenberger A, Obenauer S, Dullin C, Aberger F, Kimmina S, Schweyer S, Hahn H (2008): Cyclopamine treatment of full-blown Hh/Ptch-associated RMS partially inhibits Hh/Ptch signaling, but not tumor growth. *Mol Carcinog* 47, 361-372.
- Endo I, Inoue D, Mitsui T, Umaki Y, Akaike M, Yoshizawa T, Kato S, Matsumoto T (2003): Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors. *Endocrinology* 144, 5138-5144.
- Fan H, Khavari PA (1999): Sonic hedgehog opposes epithelial cell cycle arrest. *J Cell Biol* 147, 71-76.
- Feldman D, Zhao XY, Krishnan AV (2000): Vitamin D and prostate cancer. *Endocrinology* 141, 5-9.
- Fletcher CDM: Diagnostic Histopathology of Tumors. Vol. 2 Churchill Livingstone, 1995.
- Frohlich L, Liu Z, Beier DR, Lanske B (2002): Genomic structure and refined chromosomal localization of the mouse Ptch2 gene. *Cytogenet Genome Res* 97, 106-110.
- Fuchs E (1993): Epidermal differentiation and keratin gene expression. *J Cell Sci Suppl* 17: 197-208.
- Gailani MR, Stähle-Bäckdahl M, Leffell DJ, Glynn M, Zaphiropoulos PG, Pressman C, Undén AB, Dean M, Brash DE, Bale AE, Toftgård R (1996): The role of the human homologue of *Drosophila* patched in sporadic basal cell carcinomas. *Nat Genet* 14, 78-81.
- Garland C, Shekelle RB, Barrett-Connor E, Criqui MH, Rossof AH, Oglesby P (1985): Dietary vitaminD and calcium and risk of colorectal cancer: a 19-year prospective study in men. *Lancet* 1985, 1, 307-309.
- Garland CF, Garland FC, Shaw EK, Comstock GW, Helsing KJ, Gorham ED (1989): Serum 25-hydroxyvitaminD and colon cancer: eight-year prospective study. *Lancet* 1989, 2: 1176-1178.



---

Garland FC, Garland CF, Gorham ED, Young JF (1990): Geographic variation in breast cancer mortality in the United States: a hypothesis involving exposure to solar radiation. *Prev Med* 19, 614-622.

Goodrich LV, Milenkovic L, Higgins KM, Scott MP (1997): Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* 277, 1109-1113.

Gorlin RJ (1987): Nevoid basal-cell carcinoma syndrome. *Medicine* 66, 98-113.

Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Uden AB, Gillies S *et al.* (1996): Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 85, 841-851.

Hahn H, Wojnowski L, Zimmer AM, Hall J, Miller G, Zimmer A (1998): Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlinsyndrome. *Nat Med* 4, 619-622.

Hahn H, Nitzki F, Schorban T, Hemmerlein B, Threadgill D, Rosemann M (2004): Genetic mapping of a *Ptch1*-associated rhabdomyosarcoma susceptibility locus on mouse chromosome 2. *Genomics* 84, 853-858.

Hameyer D, Loonstra A, Eshkind L, Schmitt S, Antunes C, Groen A, Bindels E, Jonkers J, Krimpenfort P, Meuwissen R *et al.* (2007): Toxicity of ligand-dependent Cre recombinases and generation of a conditional Cre deleter mouse allowing mosaic recombination in peripheral tissues. *Physiol Genomics* 31, 32-41.

Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hansen CM, Hamberg KJ, Binderup E, Binderup L (2000): Seocalcitol (EB 1089): a vitamin D analogue of anti-cancer potential. Background, design, synthesis, pre-clinical and clinical evaluation. *Curr Pharm Des* 6, 803-828.

Hofmeister V, Schrama D, Becker JC (2008): Anti-cancer therapies targeting the tumor stroma. *Cancer Immunol Immunother*, 57, 1-17.

Holick MF (2004): Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 80, 1678S-1688S.

Holick MF, Kleiner-Bossaller A, Schnoes HK, Kasten PM, Boyle IT, DeLuca HF (1973): 1,24,25-Trihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. A metabolite of vitamin D<sub>3</sub> effective on intestine. *J Biol Chem* 248, 6691-6696.

Hollis BW (2005): Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J Nutr* 135, 317-322.

Hooper JE, Scott MP (1989): The *Drosophila* patched gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning. *Cell* 59, 751-765.

---

Hooper JE, Scott MP (2005): Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 306-317.

Ingham PW, McMahon AP (2001): Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 15, 3059-3087.

Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein EH Jr *et al.* (1996): Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 272, 1668-1671.

Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF (1998): Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* 78, 1193-1231.

Kasper M, Regl G, Frischauf AM, Aberger F (2006): GLI transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signalling. *Eur J Cancer* 42, 437-445.

Katoh Y, Katoh M (2006): Hedgehog signaling pathway and gastrointestinal stem cell signaling network. *Int J Mol Med* 18, 1019-1023.

Knudson AG Jr (1971): Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 820-823.

Kuwabara PE, Labouesse M (2002): The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? *Trends Genet* 18, 193-201.

Lam CW, Xie J, To KF, Ng HK, Lee KC, Yuen NW, Lim PL, Chan LY, Tong SF, McCormick F (1999): A frequent activated smoothed mutation in sporadic basal cell carcinomas. *Oncogene* 18, 833-836.

Lechner D, Kallay E, Cross HS (2007): 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> downregulates CYP27B1 and induces CYP24A1 in colon cells. *Mol Cell Endocrinol* 263, 55-64.

Li P, Li C, Zhao X, Zhang X, Nicosia SV, Bai W (2004): p27(Kip1) stabilization and G(1) arrest by 1,25-dihydroxyvitamin D(3) in ovarian cancer cells mediated through down-regulation of cyclin E/cyclin-dependent kinase 2 and Skp1-Cullin-F-box protein/Skp2 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 279, 25260-25267.

Li YC, Pirro AE, Amling M, Delling G, Baron R, Bronson R, Demay MB (1997): Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9831-9835.

Lin R, Wang TT, Miller WH Jr, White JH, (2003): Inhibition of F-Box protein p45(SKP2) expression and stabilization of cyclin-dependent kinase inhibitor p27(KIP1) in vitamin D analog-treated cancer cells. *Endocrinology* 144, 749-753.

Lohnes D, Jones G (1992): Further metabolism of 1 alpha 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in target cells. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1992, No Special: 75-78.

---

Majewski S, Skopinska M, Bollag W, Jablonska S (1994): Combination of isotretinoin and calcitriol for precancerous and cancerous skin lesions. *Lancet* 344, 1510-1511.

Majewski S, Skopinska M, Marczak M, Szmurlo A, Bollag W, Jablonska S (1996): Vitamin D is a potent inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1, 97-101.

Makin G, Lohnes D, Byford V, Ray R, Jones G (1989): Target cell metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> to calcitroic acid. Evidence for a pathway in kidney and bone involving 24-oxidation. *Biochem J* 262, 173-180.

Mancuso M, Pazzaglia S, Tanori M, Hahn H, Merola P, Rebessi S, Atkinson MJ, Di Majo V, Covelli V, Saran A (2004): Basal cell carcinoma and its development: insights from radiation-induced tumors in Ptch1-deficient mice. *Cancer Res* 64, 934-941.

Mantell DJ, Owens PE, Bundred NJ, Mawer EB, Canfield AE (2000): 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circ Res* 87, 214-220.

Marigo V, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM, Tabin CJ (1996a): Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature* 384, 176-179.

Marigo V, Scott MP, Johnson RL, Goodrich LV, Tabin CJ (1996b): Conservation in hedgehog signaling: induction of a chicken patched homolog by Sonic hedgehog in the developing limb. *Development* 122, 1225-1233.

Mill P, Mo R, Fu H, Grachtchouk M, Kim PC, Dlugosz AA, Hui CC (2003): Sonic hedgehog-dependent activation of Gli2 is essential for embryonic hair follicle development. *Genes Dev* 17, 282-294.

Miller GJ (1999): Vitamin D and prostate cancer: biologic interactions and clinical potentials. *Cancer Metastasis Rev* 17, 353-360.

Missbach-Guentner J, Dullin C, Zientkowska M, Domeyer-Missbach M, Kimmina S, Obenauer S, Kauer F, Stühmer W, Grabbe E, Vogel WF *et al.* (2007): Flat-panel detector-based volume computed tomography: a novel 3D imaging technique to monitor osteolytic bone lesions in a mouse tumor metastasis model. *Neoplasia* 9, 755-765.

Mitschele T, Diesel B, Friedrich M, Meineke V, Maas RM, Gärtner BC, Kamradt J, Meese E, Tilgen W, Reichrath J (2004): Analysis of the vitamin D system in basal cell carcinomas (BCCs). *Lab Invest* 84, 693-702.

Monnier V, Dussillol F, Alves G, Lamour-Isnard C, Plessis A (1998): Suppressor of fused links fused and Cubitus interruptus on the hedgehog signalling pathway. *Curr Biol* 8, 583-586.

- 
- Mullor JL, Sanchez P, Altaba AR (2002): Pathways and consequences: Hedgehog signaling in human disease. *Trends Cell Biol* 12, 562-569.
- Munker R, Kobayashi T, Elstner E, Norman AW, Uskokovic M, Zhang W, Andreeff M, Koeffler HP (1996): A new series of vitamin D analogs is highly active for clonal inhibition, differentiation, and induction of WAF1 in myeloid leukemia. *Blood* 88, 2201-2209.
- Niemann H: Experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  bei *Ptch*-assoziierten Rhabdomyosarkomen. Med. Diss. Göttingen 2010.
- Nitzki F: Patched-assoziierte Tumore: Modifikatorgene und Pathogenese. Diss. Göttingen 2008.
- Nitzki F, Zibat A, König S, Wijgerde M, Rosenberger A, Brembeck FH, Carstens PO, Frommhold A, Uhmman A, Klingler S *et al.* (2010): Tumor stroma-derived Wnt5a induces differentiation of basal cell carcinoma of *Ptch*-mutant mice via CaMKII. *Cancer Res* 70, 2739-2748.
- Nusslein-Volhard C, Wieschaus E (1980): Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.
- Nybakken K, Perrimon N (2002): Hedgehog signal transduction: recent findings. *Curr Opin Genet Dev* 12, 503-511.
- Oikawa T, Yoshida Y, Shimamura M, Ashino-Fuse H, Iwaguchi T, Tominaga T (1991): Antitumor effect of 22-oxa-1  $\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, a potent angiogenesis inhibitor, on rat mammary tumors induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Anticancer Drugs* 2, 475-480.
- Pavletich NP, Pabo CO (1993): Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science* 261, 1701-1707.
- Pepinsky RB, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker DP, Williams KP, Bixler SA, Ambrose CM, Garber EA, Miatkowski K *et al.* (1998): Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem* 273, 14037-14045.
- Porter JA, Ekker SC, Park WJ, von Kessler DP, Young KE, Chen CH, Ma Y, Woods AS, Cotter RJ, Koonin EV *et al.* (1996): Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell* 86, 21-34.
- Prudencio J, Akutsu N, Benlimame N, Wang T, Bastien Y, Lin R, Black MJ, Alaoui-Jamali MA, White JH (2001): Action of low calcemic  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> analogue EB1089 in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 93, 745-753.

Regl G, Kasper M, Schnidar H, Eichberger T, Neill GW, Ikram MS, Quinn AG, Philpott MP, Frischauf AM, Aberger F (2004): The zinc-finger transcription factor GLI2 antagonizes contact inhibition and differentiation of human epidermal cells. *Oncogene* 23, 1263-1274.

Robbins DJ, Nybakken KE, Kobayashi R, Sisson JC, Bishop JM, Therond PP (1997): Hedgehog elicits signal transduction by means of a large complex containing the kinesin-related protein costal2. *Cell* 90, 225-234.

Roberts WM, Douglass EC, Peiper SC, Houghton PJ, Look AT (1989): Amplification of the gli gene in childhood sarcomas. *Cancer Res* 49, 5407-5413.

Rohatgi R, Scott MP (2007): Patching the gaps in Hedgehog signalling. *Nat Cell Biol* 9, 1005-1009.

Romer JT, Kimura H, Magdaleno S, Sasai K, Fuller C, Baines H, Connelly M, Stewart CF, Gould S, Rubin LL *et al.* (2004): Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in *Ptc1*<sup>(+/-)</sup>*p53*<sup>(-/-)</sup> mice. *Cancer Cell* 6, 229-240.

Ruiz i Altaba A (1997): Catching a Gli-mpse of Hedgehog. *Cell* 90, 193-196.

Ruiz i Altaba A (1999): Gli proteins and Hedgehog signaling: development and cancer. *Trends Genet* 15, 418-425.

Ruppert JM, Kinzler KW, Wong AJ, Bigner SH, Kao FT, Law ML, Seunanz HN, OBrien SJ, Vogelstein B (1988): The GLI-Kruppel family of human genes. *Mol Cell Biol* 8, 3104-3113.

Sandler E, Lyden, E, Ruymann F, Maurer H, Wharam M, Parham D, Link M, Crist W (2001): Efficacy of ifosfamide and doxorubicin given as a phase II "window" in children with newly diagnosed metastatic rhabdomyosarcoma: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group. *Med Pediatr Oncol* 37, 442-448.

Sasai K, Romer JT, Lee Y, Finkelstein D, Fuller C, McKinnon PJ, Curran T (2006): Shh pathway activity is down-regulated in cultured medulloblastoma cells: implications for preclinical studies. *Cancer Res* 66, 4215-4222.

Schwartz GG (2005): Vitamin D and the epidemiology of prostate cancer. *Semin Dial* 18, 276-289.

Scotting PJ, Thompson SL, Punt JA, Walker DA (2000): Paediatric brain tumours: an embryological perspective. *Childs Nerv Syst* 16, 261-268.

Shabahang M, Buffan AE, Nolla JM, Schumaker LM, Brenner RV, Buras RR, Nauta RJ, Evans SR (1996): The effect of 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on the growth of soft-tissue sarcoma cells as mediated by the vitamin D receptor. *Ann Surg Oncol* 3, 144-149.

Shimada T, Yamazaki Y, Takahashi M, Hasegawa H, Urakawa I, Oshima T, Ono K, Kakitani M, Tomizuka K, Fujita T *et al.* (2005): Vitamin D receptor-independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol* 289, F1088-1095.

Simůnek T, Stérba M, Popelová O, Adamcová M, Hrdina R, Gersl V (2009): Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep* 61, 154-171.

Skowronski RJ, Peehl DM, Feldman D (1993): Vitamin D and prostate cancer: 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors and actions in human prostate cancer cell lines. *Endocrinology* 132, 1952-1960.

Smyth I, Narang MA, Evans T, Heimann C, Nakamura Y, Chenevix-Trench G, Pietsch T, Wicking C, Wainwright BJ (1999): Isolation and characterization of human Patched 2 (PTCH2), a putative tumor suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32. *Hum Mol Gen* 6, 291-297.

So PL, Langston AW, Daniellina N, Hebert JL, Fujimoto MA, Khaimskiy Y, Aszterbaum M, Epstein EH Jr (2006): Long-term establishment, characterization and manipulation of cell lines from mouse basal cell carcinoma tumors. *Exp Dermatol* 15, 742-750.

Stone DM, Hynes M, Armanini M, Swanson TA, Gu Q, Johnson RL, Scott MP, Pennica D, Goddard A, Phillips H *et al.* (1996): The tumor-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic Hedgehog. *Nature* 384, 129-134.

Stumpf WE, Sar M, Reid FA, Tanaka Y, DeLuca HF (1979): Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. *Science* 206, 1188-1190.

Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA (2002): Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature* 418, 892-897.

Tamiji S, Beauvillain JC, Mortier L, Jouy N, Tual M, Delaporte E, Formstecher P, Marchetti P, Polakowska R (2005): Induction of apoptosis-like mitochondrial impairment triggers antioxidant and Bcl-2-dependent keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* 125, 647-658.

Tanaka H, Abe E, Miyaura C, Kuribayashi T, Konno K, Nishii Y, Suda T (1982): 1 alpha,25-Dihydroxycholecalciferol and a human myeloid leukaemia cell line (HL-60). *Biochem J* 204, 713-719.

Tangpricha V, Spina C, Yao M, Chen TC, Wolfe MM, Holick MF (2005): Vitamin D deficiency enhances the growth of MC-26 colon cancer xenografts in Balb/c mice. *J Nutr* 135, 2350-2354.

---

Thorne JL, Maguire O, Doig CL, Battaglia S, Fehr L, Sucheston LE, Heinaniemi M, ONeill LP, McCabe CJ, Turner BM *et al.* (2010): Epigenetic control of a VDR-governed feed-forward loop that regulates p21(waf1/cip1) expression and function in non-malignant prostate cells. *Nucleic Acids Res* [Epub ahead of print].

Tostar U, Malm CJ, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Toftgard R, Uden AB (2006): Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development. *J Pathol* 208, 17-25.

Uhmann A, Dittmann K, Nitzki F, Dressel R, Koleva M, Frommhold A, Zibat A, Binder C, Adham I, Nitsche M *et al.* (2007): The Hedgehog receptor Patched controls lymphoid lineage commitment. *Blood* 110, 1814-1823.

Uden AB, Holmberg E, Lundh-Rozell B, Stahle-Backdahl M, Zaphiropoulos PG, Toftgard R, Vorechovsky I (1996): Mutations in the human homologue of *Drosophila* patched (PTCH) in basal cell carcinomas and the Gorlin syndrome: different in vivo mechanisms of PTCH inactivation. *Cancer Res* 56, 4562-4565.

Wagner N, Wagner KD, Schley G, Badiali L, Theres H, Scholz H (2003): 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced apoptosis of retinoblastoma cells is associated with reciprocal changes of Bcl-2 and bax. *Exp Eye Res* 77, 1-9.

Wang G, Amanai K, Wang B, Jiang J (2000): Interactions with Costal2 and suppressor of fused regulate nuclear translocation and activity of cubitus interruptus. *Genes Dev* 14, 2893-2905.

Yang ES, Burnstein KL (2003): Vitamin D inhibits G1 to S progression in LNCaP prostate cancer cells through p27Kip1 stabilization and Cdk2 mislocalization to the cytoplasm. *J Biol Chem* 278, 46862-46868.

Zhao XY, Feldman D (2001): The role of vitamin D in prostate cancer. *Steroids* 66, 293-300.

Zibat A, Uhmann A, Nitzki F, Wijgerde M, Frommhold A, Heller T, Armstrong V, Wojnowski L, Quintanilla-Martinez L, Reifenberger J *et al.* (2009): Time-point and dosage of gene inactivation determine the tumor spectrum in conditional *Ptch* knockouts. *Carcinogenesis* 30, 918-926.

Zinser GM, Sundberg JP, Welsh J (2002): Vitamin D(3) receptor ablation sensitizes skin to chemically induced tumorigenesis. *Carcinogenesis* 23, 2103-2109.

Zinser GM, Suckow M, Welsh J (2005): Vitamin D receptor (VDR) ablation alters carcinogen-induced tumorigenesis in mammary gland, epidermis and lymphoid tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97, 153-164.

---

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Humangenetik (Leitung Herr Prof. Dr. med. Dr. h. c. Wolfgang Engel) der Universität Göttingen angefertigt.

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Heidi Hahn dafür, dass sie es mir ermöglicht hat, meine Doktorarbeit bei ihr anzufertigen, und mich dabei auch fortwährend und intensiv betreut hat.

Ebenso danke ich Dr. rer. nat. Anja Uhmann für die geduldige und unersetzbare Unterstützung und dafür, dass sie mich stets von ihren Erfahrungen profitieren ließ.

Mein Dank gilt außerdem Ina Heß und Anke Frommhold, für die unermüdliche Hilfsbereitschaft und die so angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich danke allen Labormitgliedern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Heidi Hahn für Hilfe und Unterstützung und dafür, dass ich so herzlich in die Arbeitsgruppe aufgenommen wurde.

Außerdem möchte ich mich bei dem gesamten Team des Tierstalls des Instituts für Humangenetik, insbesondere bei Stefan Wolf, für die zahlreichen Blutabnahmen, sowie bei der Abteilung für Klinische Chemie, Georg-August-Universität Göttingen, für die Bestimmung der Serum-Kalzium-Konzentrationen, bedanken.

Darüber hinaus gilt mein herzlichster Dank Prof. Dr. med Frank Strutz (ehemals Universitätsmedizin Göttingen, zurzeit Nierenzentrum Wiesbaden), Privatdozent Dr. med. Stefan Schweyer und Anke Klages (Abteilung Pathologie), sowie Herrn Albert Rosenberger (Genetische Epidemiologie) für ihren Rat und ihre tatkräftige Unterstützung, die maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Dem Team des VCT und besonders Christian Dullin und Dr. med. vet. Anke Schräpler danke ich für die tolle und problemlose Zusammenarbeit sowie ihre Geduld bei den unzähligen Scanterminen.



---

## Lebenslauf

Mein Name ist Iris Bérénice Lammering. Ich wurde am 12. März 1985 in Soest als Tochter von Iris Fischer und Reinhard Lammering geboren. Gemeinsam mit meiner jüngeren Schwester Nerissa Anabelle wuchs ich zunächst in Lippstadt-Hörste und später in Lippetal-Oestinghausen auf. Ich besitze die deutsche Staatsangehörigkeit.

Von 1991 bis 1992 besuchte ich die Grundschule in Hörste und von 1992 bis 1995 die katholische St. Stephanus Grundschule in Oestinghausen. Im Sommer 1995 wechselte ich in die Orientierungsstufe des städtischen Archigymnasiums in Soest, welches ich bis zum Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife 2004 besuchte. Das Schuljahr 2001/2002 verbrachte ich in New Hampshire, USA, und besuchte dort die Merrimack Valley High School in Penacook.

Im August 2004 begann ich das Studium der Humanmedizin (Pre-medical) am Eastern Nazarene College in Boston, USA, welches ich dann ab Oktober 2005 an der Georg-August-Universität Göttingen fortsetzte. Im Herbst 2007 absolvierte ich den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Nach dem zweiten klinischen Fachsemester begann ich meine Promotion mit dem Titel „ $1\alpha,25\text{-Dihydroxy-VitaminD}_3$  hemmt das Wachstum von *Patched*-assoziierten Rhabdomyosarkomen und Basaliomen“ unter der Schwerpunktprofessur Molekulare Entwicklungsgenetik der Abteilung Humangenetik an der Georg-August-Universität Göttingen (Prof. Dr. med. H. Hahn, Betreuung: Dr. rer. nat. A. Uhmann).

Im Februar 2011 habe ich das Praktische Jahr begonnen und werde voraussichtlich im Frühjahr 2012 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ablegen.