

Aus der Abteilung Humangenetik  
(Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Engel)  
Schwerpunktprofessur Molekulare Entwicklungsgenetik  
(Prof. Dr. med. H. Hahn)  
im Zentrum Hygiene und Humangenetik  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Analysen zu Interaktionen zwischen dem  
Vitamin-D-Rezeptor-Signalweg und der  
Hedgehog-Signalkaskade**

INAUGURAL – DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Anne Fritsch  
aus  
Zwenkau

**Göttingen 2013**

**Dekan:**

**Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer**

**I. Berichterstatterin:**

**Prof. Dr. med. H. Hahn**

**II. Berichterstatter/in:**

**III. Berichterstatter/in:**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Uhmann A, Niemann H, Lammering B, Henkel C, Hess I, Nitzki F, Fritsch A, Prufer N, Rosenberger A, Dullin C et al. (2011a): *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 (11) 2179-2188.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Der Hedgehog-Signalweg.....</i>	<i>1</i>
1.2	<i>Der Hh-Signalweg in der Entwicklung von Tumoren.....</i>	<i>3</i>
1.3	<i>Ptch-assoziierte Tumoren.....</i>	<i>4</i>
1.4	<i>Inhibitoren des Hh-Signalwegs.....</i>	<i>5</i>
1.5	<i>Vitamin D<sub>3</sub>.....</i>	<i>7</i>
1.5.1	<i>Der Vitamin D<sub>3</sub>-Metabolismus.....</i>	<i>7</i>
1.5.2	<i>Die Wirkungen von 1<math>\alpha</math>,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.....</i>	<i>9</i>
1.6	<i>Vitamin D und der Hh-Signalweg.....</i>	<i>10</i>
1.7	<i>Zielsetzung.....</i>	<i>12</i>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>13</b>
2.1	<i>Software.....</i>	<i>13</i>
2.2	<i>Datenbanken.....</i>	<i>13</i>
2.3	<i>Statistische Auswertung.....</i>	<i>13</i>
2.4	<i>Laborgeräte.....</i>	<i>13</i>
2.5	<i>Gebrauchswaren.....</i>	<i>15</i>
2.6	<i>Chemikalien und Reagenzien.....</i>	<i>17</i>
2.7	<i>Gebrauchsfertige Reaktionssysteme.....</i>	<i>18</i>
2.8	<i>Stammlösungen.....</i>	<i>18</i>
2.9	<i>Medien.....</i>	<i>19</i>
2.9.1	<i>Bakterienkultur.....</i>	<i>19</i>
2.9.2	<i>Kultur eukaryontischer Zellen.....</i>	<i>20</i>
2.10	<i>Biologisches Material.....</i>	<i>20</i>
2.10.1	<i>Bakterienstämme.....</i>	<i>20</i>
2.10.2	<i>Eukaryontische Zelllinien.....</i>	<i>20</i>
2.10.3	<i>Murine Zelllinien.....</i>	<i>20</i>
2.10.4	<i>Humane Zelllinien.....</i>	<i>21</i>
2.10.5	<i>Mauslinien.....</i>	<i>21</i>
	<i>Ptch<sup>neo67/+</sup> Mauslinie.....</i>	<i>22</i>
2.10.6	<i>Plasmide.....</i>	<i>23</i>
2.11	<i>Synthetische Oligonukleotide.....</i>	<i>23</i>
2.11.1	<i>DNA-Oligonukleotide zur Genotypisierung von Mäusen.....</i>	<i>23</i>

2.11.2 DNA-Oligonukleotide für die quantitative Real Time PCR an cDNA .....	24
2.12 <i>Enzyme</i> .....	25
2.13 <i>Molekularbiologische Methoden</i> .....	26
2.13.1 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren .....	26
2.13.1.1 Isolierung von DNA .....	26
2.13.1.1.1 Isolierung von DNA aus Schwanzbiopsien zur Genotypisierung ....	26
2.13.1.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA .....	26
2.13.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA .....	27
2.13.1.2.1 RNA-Isolierung aus Zellkultur .....	27
2.13.1.2.2 Behandlung der isolierten RNA mit DNase .....	28
2.13.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	28
2.13.3 Klonierungstechniken .....	29
2.13.3.1 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA .....	29
2.13.3.2 Restriktionshydrolyse von Plasmid-DNA .....	29
2.13.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	30
2.13.4.1 Semiquantitative PCR .....	30
2.13.4.2 Reverse Transkription .....	30
2.13.4.3 Real-Time quantitative PCR (qRT-PCR) .....	31
2.13.4.3.1 Relative Quantifizierung .....	31
2.13.4.3.2 Endogene Kontrolle .....	32
2.13.4.3.3 Ablauf und Aufbau der qRT-PCR .....	32
2.13.4.3.4 Auswertung nach der Standardkurvenmethode .....	35
2.13.5 Agarose-Gelelektrophorese .....	36
2.14 <i>Histologische Methoden</i> .....	37
2.14.1 Paraffineinbettung von Geweben und Anfertigung von Paraffinschnitten ....	37
2.14.2 Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung .....	37
2.14.3 Planimetrische Vermessung von HE-Schnitten .....	37
2.15 <i>Zellbiologische Methoden</i> .....	37
2.15.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen .....	37
2.15.2 Anlegen von RMS Primärkulturen .....	38
2.15.3 Transfektion eukaryotischer Zellen mit Expressionplasmid-DNA .....	38
2.15.4 <i>In vitro</i> -Proliferationsanalysen .....	38
2.15.4.1 5-Bromo-2-Desoxyuridin(BrdU)-Inkorporations-Untersuchung .....	38
2.15.4.2 Immunfluoreszenzanalysen .....	39
2.15.4.2.1 Durchflusszytometrie (engl. fluorescence activated cell sorting; FACS) 39	
2.16 <i>Tierexperimentelle Methoden</i> .....	40
2.16.1 Zucht und Haltung von Mus Musculus .....	40
2.16.2 Schwanzbiopsie und Ohrlochmarkierung .....	41
2.16.3 Genotypisierung .....	41
2.16.4 Injektionen .....	41
2.16.4.1 Intraperitoneale Injektion von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .....	41

2.16.4.2	Intramuskuläre Injektion von Tamoxifen .....	41
2.16.5	Sichtung und Präparation von Tumorgewebe.....	42
2.16.5.1	RMS.....	42
2.16.5.2	BCC .....	42
2.16.5.3	Perfusion von Mäusen mit Paraformaldehyd .....	42
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
3.1	<i>Analysen zum <math>1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3</math>-Metabolismus in <i>Ptch</i>-defizienten Zellen .....</i>	<i>43</i>
3.1.1	Die Synthese von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in <i>Ptch</i> -defizienten RMS Zellen.....	43
3.1.2	Wirkungen von Itraconazol auf den $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Metabolismus und den Hh-Signalweg in <i>Ptch</i> -defizienten Zellen.....	46
3.1.2.1	Die Wirkung von Itraconazol auf den Hh-Signalweg .....	47
3.1.2.2	Die Wirkung von Itraconazol auf den Abbau von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durch die 24-Hydroxylase.....	49
3.1.2.3	Die Wirkung von Itraconazol auf die Synthese von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durch die $1\alpha$ -Hydroxylase.....	51
3.2	<i>Untersuchungen zum Vergleich von <math>1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3</math> und Cyclopamin in der Hemmung des Hh-Signalwegs .....</i>	<i>53</i>
3.2.1	Die Wirkeffizienz von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und Cyclopamin in der Hemmung des Hh-Signalwegs .....	54
3.2.2	Das Zusammenwirken von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und Cyclopamin in der Hemmung der Hh-Signalkaskade .....	56
3.2.3	Die Wirkung von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und Cyclopamin auf die BrdU-Inkorporation in <i>Vdr</i> <sup>-/-</sup> , <i>Ptch</i> <sup>-/-</sup> , <i>Smo</i> <sup>-/-</sup> und <i>Sufu</i> <sup>-/-</sup> Zelllinien.....	59
3.2.4	Wirkung von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Aktivität des Hh- und des Vdr-Signalwegs in <i>Ptch</i> <sup>-/-</sup> , <i>Smo</i> <sup>-/-</sup> , <i>Sufu</i> <sup>-/-</sup> und <i>Vdr</i> <sup>-/-</sup> Zellen.....	62
3.3	<i>Analysen zur Gli-Abhängigkeit der Vdr-Expression .....</i>	<i>65</i>
3.3.1	Optimierung der Transfektionsbedingungen der <i>Gli</i> -defizienten Zellen.....	65
3.3.2	Einfluss der Gli-Faktoren auf die <i>Vdr</i> -Expression .....	67
3.3.3	Die Wirkung von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und Cyclopamin auf die BrdU-Inkorporation von <i>Gli</i> -defizienten Zelllinien.....	72
3.4	<i>Analysen zur Therapie von BCC mit <math>1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3</math> .....</i>	<i>74</i>
3.4.1	Planimetrische Vermessung von BCC nach <i>in vivo</i> $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Therapie 74	
3.4.2	Behandlung BCC-tragender Mäuse mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .....	76
3.4.2.1	Gesundheitszustand der Tiere.....	77
3.4.2.2	Histologische Untersuchungen.....	78
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>80</b>
4.1	<i>Die Synthese von <math>1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3</math> ist in primärkultivierten RMS Zellen gestört... 81</i>	
4.2	<i>Die Kombination von Itraconazol und <math>1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3</math> führt zu einer verstärkten Hemmung des Hh-Signalwegs .....</i>	<i>84</i>

4.3	<i>1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> und Cyclopamin im Vergleich</i> .....	87
4.3.1	Die duale Wirkung von 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ auf den Vdr- und den Hh-Signalweg 87	
4.3.2	Die Wirkung von 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ und Cyclopamin auf die BrdU- Inkorporation.....	89
4.3.3	1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ hemmt den Hh-Signalweg vermutlich durch Bindung an Smo 90	
4.4	<i>Gli3 aktiviert die Vdr-Expression in Gli-defizienten Zellen</i> .....	92
4.5	<i>Ein Therapiebeginn mit 1<math>\alpha</math>,25(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math> in einem frühen Tumorstadium hemmt das Wachstum von BCC schon bei kurzer Behandlungsdauer</i> .....	94
5	<b>Zusammenfassung</b> .....	97

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
14-LDM	Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase
1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> ; 1 $\alpha$ ,25D <sub>3</sub>	1 $\alpha$ ,25-Dihydroxy Vitamin D <sub>3</sub> , Calcitriol
25(OH)D <sub>3</sub> ; 25D <sub>3</sub>	25-Hydroxy Vitamin D <sub>3</sub> , Calcidiol
AG	<u>A</u> rbeits <u>g</u> ruppe
ARMS	<u>A</u> lveoläres <u>R</u> habdomyosarkom
BCC	<u>B</u> asal <u>C</u> ell <u>C</u> arcinoma (dt. Basalzellkarzinom)
BODIPY	<u>B</u> oron- <u>D</u> ipyrromethene
BrdU	<u>B</u> rom <u>d</u> esoxy <u>u</u> ridin
BSA	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin (dt. Bovines Serumalbumin)
cDNA	<u>C</u> omplementary <u>D</u> N <u>A</u> (dt. komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CMV	<u>C</u> ytomegalie <u>v</u> irus
CP	<u>C</u> yclopamin
Ct-Wert	<u>C</u> ycle <u>t</u> hreshold (dt. Schwellenwert)
Cyp24a1	<u>C</u> ytochrom <u>P</u> 450 <u>24A1</u>
Cyp27b1	<u>C</u> ytochrom <u>P</u> 450 <u>27B1</u>
ddH <sub>2</sub> O	<u>d</u> oppelt <u>d</u> estilliertes Wasser
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxide
DNA	<u>D</u> eoxyribonucleic <u>a</u> cid (dt. Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	<u>D</u> esoxynukleotidtriphosphate
dt.	<u>d</u> eutsch
DTT	<u>D</u> ithiotreiol
E. coli	<u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraacetat

## Abkürzungsverzeichnis VI

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
EGFP	<u>e</u> nanced <u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
engl.	<u>e</u> nglisch
ERMS	<u>E</u> mbryonales <u>R</u> habdomyosarkom
<i>ERT2</i>	<i>ROSA26Cre</i> <u>E</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>2</u>
EtOH	<u>E</u> thanol
FCS	<u>F</u> etal <u>C</u> alf <u>S</u> erum (dt. Fötales Kälberserum)
FITC	<u>F</u> luorescein <u>I</u> sothiocyant
Gli 1-3	<u>G</u> lioma-associated oncogene <u>1-3</u> (dt. Gliom-assoziiertes Onkogen)
HaCaT	<u>H</u> uman <u>a</u> ult low <u>C</u> alcium high <u>T</u> emperature keratinocytes
HE	<u>H</u> ämatoxylin- <u>E</u> osin
Hh	<u>H</u> edgehog
HPLC	<u>H</u> igh performance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography (dt. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Itra	<u>I</u> traconazol
Kif7	<u>K</u> inesin family member <u>7</u>
LOH	<u>L</u> oss of <u>h</u> eterozygosity (dt. Verlust der Heterozygotie)
Lsgmittel, Lsg	<u>L</u> ösungsmittel
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NBCCS	<u>N</u> evoid <u>B</u> asal <u>C</u> ell <u>C</u> arcinoma <u>S</u> ndrome (auch: Gorlin-Goltz-Syndrom)
NPC1L	<u>N</u> iemann- <u>P</u> ick <u>C</u> 1-like
NTC	<u>N</u> o template control
PBS	<u>P</u> hosphate buffered saline (dt. Phosphat-gepufferte Natriumchlorid Lösung)
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction (dt. Polymerase-Kettenreaktion)
PI	To- <u>P</u> ro-3- <u>I</u> odid

## Abkürzungsverzeichnis VII

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
PS	<u>P</u> enicillin/ <u>S</u> treptomycin
Ptch	<u>P</u> atched1
qRT-PCR	<u>Q</u> uantitative- <u>R</u> eal- <u>T</u> ime- <u>P</u> CR (dt. quantitative Echtzeit-PCR)
RMS	<u>R</u> habdom <u>y</u> osarkom
RMS-PK	<u>R</u> habdom <u>y</u> osarkom- <u>P</u> rimär <u>k</u> ultur
RNA	<u>R</u> ibonucleic <u>a</u> cid (dt. Ribonukleinsäure)
RND	<u>R</u> esistance- <u>N</u> odulation- <u>D</u> ivision
rpm	<u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute (dt. Umdrehungen pro Minute)
Shh, Ihh, Dhh	<u>S</u> onic <u>H</u> edge <u>h</u> og, <u>I</u> ndian <u>H</u> edge <u>h</u> og, <u>D</u> esert <u>H</u> edge <u>h</u> og
si-RNA	<u>s</u> mall <u>i</u> nterfering <u>R</u> NA
Smo	<u>S</u> moothened
STE	
STE	<u>S</u> odium/ <u>T</u> ris/ <u>E</u> DTA (dt. Natriumchlorid/Tris/EDTA)
Sufu	<u>S</u> uppressor of <u>F</u> used
Taq	<u>T</u> hermus <u>a</u> quaticus
TBE	<u>T</u> ris/ <u>B</u> orsäure/ <u>E</u> DTA
UV	<u>U</u> ltraviolett
Vdr	<u>V</u> itamin <u>D</u> <u>R</u> ezeptor
VDRE	<u>V</u> itamin <u>D</u> <u>R</u> esponse- <u>E</u> lements (dt. Vitamin D-empfindlicher Bereich)
wt	<u>W</u> ild <u>t</u> ype (dt. Wildtyp)
x g	faches der mittleren Erdbeschleunigung

# 1 Einleitung

Bei der Entstehung von Krebs ist die Balance der Zellproliferation, -differenzierung und -apoptose gestört. Durch Mutationen werden wichtige Regulatoren dieser Vorgänge geschädigt. Zwei Arten von Genen sind hauptsächlich dafür verantwortlich: Onkogene und Tumorsuppressorgene. Protoonkogene kodieren in der gesunden Zelle Proteine, die den Zellzyklus kontrollieren. Mutationen in Protoonkogenen führen zur Entstehung von Onkogenen. Dies führt über den Verlust der Zellzykluskontrolle zu ungehindertem Zellwachstum. Tumorsuppressorgene kodieren Proteine, die normalerweise durch Initiation der DNA-Reparatur oder Apoptose dafür sorgen, dass sich Zellen mit geschädigtem Erbgut nicht weiter vermehren. Mutationen, welche zu einem Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen führen, bewirken eine ungehinderte Vermehrung der betroffenen Zellen und fördern damit die Entstehung von Tumoren. Immer mehr Gene werden als Tumorsuppressorgene identifiziert, so dass auf dieser Grundlage neue Ansätze zur Diagnose und gezielten Behandlung von Krebserkrankungen erarbeitet werden (Dietel *et al.* 2012). Eines dieser Tumorsuppressorgene ist *Patched1* (*Ptch*), welches ein Schlüsselprotein im Hedgehog-Signalweg kodiert (Gailani *et al.* 1996; Hahn *et al.* 1996; Johnson *et al.* 1996).

## 1.1 Der Hedgehog-Signalweg

Die Gene *Hedgehog* (*Hh*) und *Ptch* wurden erstmals 1980 in *Drosophila Melanogaster* von Nüsslein-Volhard und Wieschaus beschrieben (Nüsslein-Volhard und Wieschaus 1980). Beide Proteine sind Komponenten des Hh-Signalwegs (Ingham *et al.* 1991; Marigo *et al.* 1996a; Stone *et al.* 1996). Dieser Signalweg reguliert vor allem die embryonale Entwicklung des Zentralnervensystems und der Extremitäten von Vertebraten (Ingham und McMahon 2001). Daneben ist er aber auch in adulten Zellen aktiv und steuert die Zellproliferation und -differenzierung sowie Vorgänge der Apoptose (Roy und Ingham 2002; Bigelow *et al.* 2004).

In Vertebraten sind 3 verschiedene Hh-Homologe bekannt: Sonic (*Shh*), Indian (*Ihh*) und Desert Hedgehog (*Dhh*) (Echelard *et al.* 1993). Diese werden vor ihrer Freisetzung in den Interzellularraum autokatalytisch gespalten und am amino- bzw. carboxyterminalen Ende mit Palmitinsäure bzw. Cholesterol modifiziert (Pepinsky *et al.* 1998; Buglino und Resh 2008). Nach seiner Freisetzung bindet *Shh* an *Ptch* (Marigo *et al.* 1996a; Stone *et al.* 1996)

Ptch ist ein Transmembranprotein mit 12 hydrophoben membranständigen Domänen. Es weist in seiner Struktur Homologien zum Niemann-Pick C1-like protein (NPC1L-) Cholesteroltransporter und zur RND (Resistance-Nodulation-Division)-Familie bakterieller Transporter auf (Davies *et al.* 2000; Ioannou 2000). Diese strukturellen Ähnlichkeiten haben zu der Annahme geführt, dass Ptch niedermolekulare Verbindungen (engl. small molecules), wie Lipide oder Oxysterole, transportiert. Dadurch reguliert es vermutlich die intra- und extrazelluläre Konzentration von Modulatoren der Hh-Signalwegsaktivität (Taipale *et al.* 2002; Rohatgi und Scott 2007; Robbins *et al.* 2012). Neben Ptch selbst ist ein Ptch-homologes Protein bekannt (Patched2; Ptch2) (Zaphiropoulos *et al.* 1999).

Die Expression von Ptch wird direkt durch Gli-Faktoren, Zielgene des Hh-Signalwegs, reguliert. Daher zählt es selbst zu den Hh-Zielgenen (Marigo *et al.* 1996a; Robbins *et al.* 2012). Daneben sind Ptch-Co-Rezeptoren bekannt, die essentiell für die Vermittlung des Hh-Signals sind. Dabei handelt es sich um Cdo (cell adhesion molecule down-regulated by oncogenes), Boc (brother of Cdo) und Gas1 (Growth arrest-specific gene 1) (Tenzen *et al.* 2006; Allen *et al.* 2011).

Physiologischerweise inhibiert Ptch Smoothened (Smo), ein Protein mit 7 Transmembrandomänen. Die Interaktion beider Proteine erfolgt katalytisch und nicht physikalisch (Taipale *et al.* 2002). Ptch hat somit eine duale Funktion als Hh-Rezeptor und als Inhibitor des Hh-Signalwegs (Ryan und Chiang 2012). Der genaue Mechanismus der Inhibierung ist bisher allerdings nicht bekannt. Smo kann in einem inaktiven und einem aktiven Zustand vorliegen. Die Aktivierung erfolgt in 2 Schritten: zuerst akkumuliert Smo in den primären Zilien an der Zelloberfläche und wird anschließend aktiviert (Rohatgi *et al.* 2009).

In Abwesenheit von Hh werden die Gli-Faktoren 1-3 (engl. für Glioma-associated oncogene homolog) durch Supressor of Fused (SuFu) im Zytoplasma gebunden und damit die Transkription der Hh-Zielgene verhindert (Evangelista *et al.* 2006; Ryan und Chiang 2012). Gleichzeitig fördert Sufu zusammen mit dem Kinesin-like Protein Kif7 die Phosphorylierung, die nachfolgende Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau zur Gli-Repressorform (Gli-R). Dies führt dazu, dass Gli2 und Gli3 als Repressoren im Zellkern die Transkription der Hh-Zielgene zusätzlich hemmen können (Robbins *et al.* 2012; Ryan und Chiang 2012). Daher gilt Sufu als negativer Regulator des Hh-Signalwegs. Ist der Signalweg aktiv, wird Ptch durch die Bindung von Hh inaktiviert und verliert seine inhibitorische Wirkung auf Smo. Anschließend fördern Smo und Kif7 die Freisetzung der

Gli-Transkriptionsfaktoren aus dem zytoplasmatischen Komplex, so dass diese nun aus den primären Zilien in den Zellkern wandern. Dort werden sie zu Aktivatoren (Gli-A) modifiziert und führen zur Transkription der Hh-Zielgene (Ryan und Chiang 2012).

Gli1 ist ein bekannter Aktivator von Hh-Zielgenen und gilt als zuverlässiger Marker für die Aktivität der Hh-Signalkaskade (Lipinski *et al.* 2006). Außer Gli1 wirkt auch Gli2 als Transkriptionsaktivator der Hh-Zielgene, während Gli3 vorwiegend als Repressor gilt (Kasper *et al.* 2006; Lipinski *et al.* 2006).

Neben dem beschriebenen kanonischen Hh-Signalweg existieren auch nicht-kanonische Wege. In diesen wird die *Gli1*-Transkription nicht über die Hh/Smo-Achse aktiviert sondern über andere Signalwege, wie z.B. die RAS (Rat Sarcoma)- oder die TGF  $\beta$  (Transforming Growth Factor Beta)-Signalkaskade. Diesen nicht-kanonischen Wegen ist gemeinsam, dass sie unterhalb von Smo mit dem Hh-Signalweg interagieren (Lauth und Toftgard 2007).

### 1.2 Der Hh-Signalweg in der Entwicklung von Tumoren

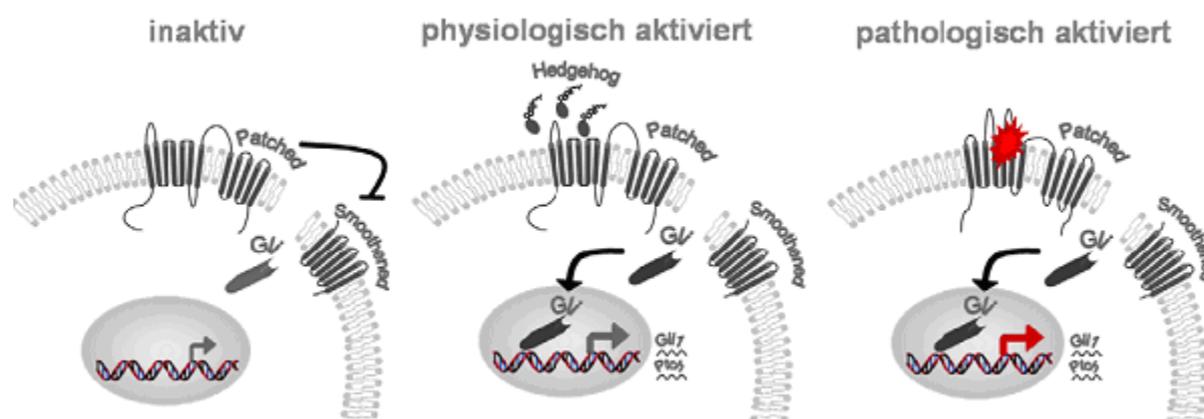
Durch den Hh-Signalweg werden wichtige Prozesse der Zelle gesteuert, die die Entstehung von Tumoren fördern. So wird beispielsweise der Zellzyklus über die Zykline D1 und B1 reguliert und damit der Übergang in die S(ynthese)- bzw. M(itose)-Phase des Zellzyklus gefördert, was die Zellproliferation erhöht (Adolphe *et al.* 2006). Auch das antiapoptotisch wirkende Bcl-2 (B-Cell Lymphoma 2) gehört zu den Zielgenen des Signalwegs (Bigelow *et al.* 2004).

Es gibt drei Typen der Aktivierung der Hh-Signalkaskade, die zur Entwicklung von Tumoren führen. Beim Typ I handelt es sich um einen Liganden-unabhängigen Weg. Dieser wird durch Signalweg-aktivierende Mutationen in verschiedenen Komponenten der Hh-Signalkaskade hervorgerufen. Die häufigsten Mutationen, die zu einer Aktivierung des Hh-Signalwegs führen, sind inaktivierende *Ptch*-Mutationen oder der Verlust der Heterozygotie (engl. Loss of heterozygosity; LOH) am *Ptch*-Lokus. Aus diesem Grund wurde geschlossen, dass *Ptch* ein Tumorsuppressorgen ist (Gailani *et al.* 1996; Hahn *et al.* 1996). *Ptch*-Mutationen wurden vor allem in Basalzellkarzinomen (engl. Basal Cell Carcinoma, BCC) und Medulloblastomen (MB) beobachtet.

Daneben gibt es die Typen II und III der Aktivierung des Hh-Signalwegs, die Liganden-abhängig durch auto- oder parakrine Signalvermittlung zu einer erhöhten Signalwegsaktivität führen. Diese sind vor allem in Pankreas-, Brust- (Typ II) oder in

Prostatatumoren (Typ III) zu beobachten (Rubin und de Sauvage 2006; Scales und de Sauvage 2009).

Die Untersuchungen dieser Arbeit beschäftigen sich vor allem mit dem Typ I der Signalwegsaktivierung, die durch inaktivierende Mutationen von *Ptch* hervorgerufen wird. Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung des Hh-Signalwegs in seinem inaktiven, aktiven und mutationsbedingt aktiven Zustand.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Hh-Signalwegs im inaktiven, physiologisch und pathologisch aktiven Zustand (nach A.Uhmann).**

Ist der Signalweg nicht aktiv, wird Smo von Ptch gehemmt und die Gli-Transkriptionsfaktoren verbleiben im Zytoplasma (linkes Bild). Bindet Hh an Ptch, wird dieses inaktiviert. Es kommt zur Aktivierung von Smo und infolgedessen zur Transkription von Hh-Zielgenen im Zellkern (Bild Mitte). Durch eine inaktivierende Mutation von Ptch (durch roten Stern dargestellt) liegt Smo in konstitutiv aktivierter Form vor, d.h. die Hh-Zielgene werden ständig transkribiert (dargestellt durch roten Pfeil, Bild rechts).

### 1.3 *Ptch*-assoziierte Tumoren

Das autosomal-dominant vererbte Gorlin-Goltz-Syndrom bzw. Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome (NBCCS) wird u.a. durch heterozygote Keimbahnmutationen von *Ptch* verursacht (Hahn *et al.* 1996; Johnson *et al.* 1996). Betroffene leiden neben Entwicklungsstörungen wie bspw. Kieferzysten und Skelettanomalien vor allem unter der frühen Entwicklung multipler BCC. Daneben treten auch andere Tumorentitäten wie MB und Rhabdomyosarkome (RMS) auf (Lo Muzio 2008).

Interessanterweise sind *Ptch*-Mutationen auch in sporadischen Fällen dieser drei Tumorentitäten und anderen Tumoren detektiert worden (Sheng *et al.* 2004; Yuan *et al.* 2007).

BCC sind die weltweit häufigsten Karzinome im Erwachsenenalter (Miller und Weinstock 1994). Sie entstehen aus Zellen der Epidermis oder der Haarfollikel. Die erhöhte

UV-Exposition an Kopf und Hals ist ein entscheidender Faktor der zur Entstehung von BCC, vor allem in dieser Körperregion, beiträgt. BCC sind niedrigmaligne Tumoren., d.h. sie metastasieren zwar äußerst selten (0,0028-0,1 %), wachsen aber lokal destruierend (Dietel *et al.* 2012). Annähernd alle sporadisch auftretenden BCC sind durch eine Aktivierung des Hh-Signalwegs charakterisiert. Es konnten in nahezu 90 % dieser Tumoren Mutationen in mindestens einem *Ptch*-Allel nachgewiesen werden (Epstein 2008). Da die BCC-Inzidenz weltweit jährlich erhöht, steigt auch die Relevanz der Frage nach einer geeigneten Therapie dieser Tumoren (Roewert-Huber *et al.* 2007).

MB sind die häufigsten malignen Hirntumoren im Kindesalter. Der Tumor kann zu einem obstruktiven Hydrocephalus und dadurch einen erhöhten Hirndruck verursachen. Zu den häufigsten Symptomen zählen daher Erbrechen, Kopfschmerzen und Ataxie (Halperin und Friedman 1996). Patienten, die an einem MB erkrankt waren, leiden oft an neurokognitiven Defiziten und anderen Langzeitschäden. Diese werden durch die multimodale Therapie aus Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie hervorgerufen. Bei rund 10 bis 30 % der sporadisch auftretenden MB liegt eine *Ptch*-Mutation oder eine andere Mutation vor, die zur Aktivierung des Hh-Signalwegs führt (Crawford *et al.* 2007).

RMS sind die häufigsten Weichteilsarkome im Kindesalter. Betroffen sind vor allem Kinder unter 6 Jahren. Zwei RMS Subtypen werden histologisch unterschieden: das alveoläre (ARMS) und das embryonale RMS (ERMS), welche ca. 60 % aller RMS ausmachen (Huh und Skapek 2010). 80 % der ARMS weisen eine Translokation auf, die zur Fusion des Forkhead Transkriptionsfaktors (FKHR/FOXO1) mit dem PAX3- oder PAX7-Transkriptionsfaktor führt (Galili *et al.* 1993; Davis *et al.* 1994; Sorensen *et al.* 2002). In ERMS sowie in ARMS ohne Fusionsprotein wurde hingegen eine erhöhte Expression von Hh-Zielgenen detektiert. Dies führte zu der Annahme, dass der Hh-Signalweg in die Pathogenese der ERMS involviert ist (Tostar *et al.* 2006; Zibat *et al.* 2010; Pressey *et al.* 2011). ERMS entstehen vor allem in der Kopf-Hals-Region. Orbitale Tumoren führen zu einem Exophthalmus und gelegentlich zur Ophthalmoplegie. Parameningeale Tumoren fallen häufig durch die Obstruktion umliegender Strukturen auf (Dagher und Helman 1999).

### **1.4 Inhibitoren des Hh-Signalwegs**

Aufgrund der Vielzahl der Tumorentitäten, in denen der Signalweg aktiv ist, stellt die Erforschung neuer Therapieansätze durch Inhibierung des Hh-Signalwegs einen wichtigen Gegenstand der heutigen Forschung dar. Bei den vorgestellten Tumorarten (BCC, MB und

RMS) liegt der Fokus der Forschung auf Ansätzen zur Inhibition von Smo, dem Aktivator der Hh-Signalkaskade und Interaktionspartner von Ptch.

Ein bekannter Inhibitor des Hh-Signalwegs ist das pflanzliche Alkaloid Cyclopamin (Cooper *et al.* 1998). Es wurde erstmals als Ursache teratogener Schäden in Form einer Holoprosenzephalie, in ausgeprägten Fällen sogar einer Zyklopie (Einäugigkeit), an Lämmern beschrieben. Diese traten auf, nachdem die Muttertiere von der Pflanze *Veratrum californicum* gefressen hatten (Binns *et al.* 1963). Cyclopamin inhibiert den Hh-Signalweg auf der Ebene von Smo, indem es dessen Konversion aus der inaktiven Form in die aktive Form hemmt (Taipale *et al.* 2000; Chen, J K *et al.* 2002a; Rohatgi *et al.* 2009). *In vivo* Studien zeigten, dass das Wachstum verschiedener Tumoren, z.B. MB, durch Cyclopamin gehemmt wird (Mas und Ruiz i Altaba 2010). Da Cyclopamin eine schlechte Bioverfügbarkeit besitzt und sehr säureempfindlich ist, stellt es keine praktikable Therapieoption dar (Lipinski *et al.* 2008b; Heretsch *et al.* 2010). Analoga mit besseren pharmakologischen Eigenschaften wurden synthetisiert, wovon IPI-926 (auch: Saridegib) die größte Potenz besitzt. Zurzeit wird IPI-926 in einer Phase-Ib/II-Studie in Kombination mit dem Zytostatikum Gemcitabin in der Behandlung von metastasierten Pankreaskarzinomen getestet (Cheng *et al.* 2011; Richards *et al.* 2012; Tokh *et al.* 2012). Das natürliche vorkommende Cyclopamin dient weiterhin als Hh-Inhibitor in präklinischen Studien und wird daher in den Untersuchungen dieser Arbeit als Modell eines Smo-Antagonisten, der eine effiziente Hemmung des Hh-Signalwegs vermitteln kann, genutzt (Lin, T L und Matsui 2012).

Eine weitere Substanz, die neuesten Erkenntnissen zufolge den Hh-Signalweg vermutlich ebenfalls durch Bindung an Smo inhibiert, ist das Antimykotikum Itraconazol (Kim *et al.* 2010). Itraconazol hemmt die Ergosterolsynthese in Pilzen durch die Inhibierung der 14- $\alpha$ -Lanosterol-Demethylase (14-LDM, *Cyp51a1*). Es wird vermutet, dass Itraconazol die zur Aktivierung von Smo notwendige Akkumulation von Smo im primären Zilium unterdrückt (Kim *et al.* 2010). Derzeit befindet sich Itraconazol in Phase-II-Studien für die Behandlung von BCC, metastasierten Prostatakarzinomen und Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Kasper *et al.* 2012; Lin, T L und Matsui 2012).

Ein weiterer Inhibitor des Hh-Signalwegs ist Vitamin D. Es wird vermutet, dass es wie Cyclopamin an Smo bindet und so die Aktivität des Signalwegs mindert. Dabei besitzt es *in vitro* eine größere Hh-antagonistische Wirksamkeit als Cyclopamin (Bijlsma *et al.* 2006). Der aktive Metabolit des Vitamins, 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>),

hemmt das Wachstum von BCC sowohl durch Inhibierung des Hh-Signalwegs als auch durch eine Aktivierung des Vitamin-D-Rezeptor (Vdr)-Signalwegs (Uhmann *et al.* 2011a). Aktuell wird topisch angewandtes Vitamin D<sub>3</sub> in Kombination mit antiinflammatorischen Substanzen im Rahmen einer Phase-III-Studie an nodulären BCC untersucht (Kasper *et al.* 2012). 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ist aufgrund seiner dualen antitumoralen Wirkungen eine besonders interessante Substanz für die Behandlung Hh-assoziiierter Tumoren und soll deshalb im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen.

### 1.5 Vitamin D<sub>3</sub>

#### 1.5.1 Der Vitamin D<sub>3</sub>-Metabolismus

Vitamin D<sub>3</sub> ist ein Steroidhormon und entsteht in der Haut unter Einwirkung von UV-B-Strahlen aus 7-Dehydrocholesterol (Prä-Vitamin D<sub>3</sub>) oder wird direkt als Vitamin D<sub>2</sub> oder D<sub>3</sub> aus der Nahrung aufgenommen. Danach zirkuliert es, gebunden an das Vitamin D-bindende Protein (DBP), im Blut und wird in der Leber durch die 25-Hydroxylase zu 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>) metabolisiert.

Die klassische endokrine Funktion von Vitamin D<sub>3</sub> besteht in der Regulation des Calcium- und Knochenstoffwechsels. Sinkt der Calciumspiegel im Serum, wird dies über Calcium-Sensing-Rezeptoren der Nebenschilddrüse registriert. Durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus wird Parathormon (PTH) freigesetzt und steigert die Aktivität der 1 $\alpha$ -Hydroxylase (*Cyp27b1*) in der Niere. Die 1 $\alpha$ -Hydroxylase wandelt die Speicherform 25(OH)D<sub>3</sub> in die aktive Form 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> um (Dietel *et al.* 2012). Eine Defizienz der 1 $\alpha$ -Hydroxylase ist ursächlich für die hereditäre Pseudo-Vitamin-D-Mangelrachitis Typ 1 (engl. Vitamin D dependent rickets Typ 1, VDDR) (Fraser *et al.* 1973). Mittlerweile ist bekannt, dass die 1 $\alpha$ -Hydroxylase auch in anderen Geweben, z.B. in Keratinozyten, Zellen der Prostata oder der Zervix exprimiert wird, so dass 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auch lokal synthetisiert werden kann (Schwartz *et al.* 1998; Zehnder *et al.* 2001; Friedrich *et al.* 2002).

1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> fördert die intestinale Calciumabsorption durch Induktion der Calciumtransporter TRPV5 und 6 (Transient Receptor Potential Vanilloid) sowie Calbindin<sub>9K</sub> im Dünndarm (Dietel *et al.* 2012). Daneben führt eine erhöhte Osteoklastenaktivität zur Freisetzung von Calcium aus den Knochen. Auch eine gesteigerte Calciumresorption im distalen Tubulus der Niere trägt zur Erhöhung des Calciumspiegels bei (Verstuyf *et al.* 2010).

Durch die Vitamin-D-24-Hydroxylase (*Cyp24a1*) wird  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  neben  $25(\text{OH})\text{D}_3$  zu  $1\alpha,24,25$ -Trihydroxy-Vitamin  $\text{D}_3$  ( $1\alpha,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ ) bzw.  $24,25$ -Dihydroxy-Vitamin  $\text{D}_3$  hydroxyliert. Die Hydroxylase vermittelt als multikatalytisches Enzym noch weitere Schritte, durch die das Vitamin inaktiviert wird und nach weiteren Umwandlungsschritten biliär ausgeschieden werden kann (Beckman *et al.* 1996). Dabei ist die Affinität der 24-Hydroxylase zu  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  als Substrat gegenüber  $25(\text{OH})\text{D}_3$  ca. 300mal höher (Omdahl *et al.* 2001). Das Enzym befindet sich vor allem in  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Zielzellen, bspw. Enterozyten, Osteoblasten oder Keratinozyten (Jones *et al.* 1998). Die Hydroxylase unterliegt einer sehr sensiblen, direkten positiven Regulation durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Diese wird vermutlich über Vitamin D Response-Elements (VDRE, dt. Vitamin D-empfindlicher Bereich) am *Cyp24a1*-Promotor vermittelt (Chen, K S und DeLuca 1995; Zierold *et al.* 1995). Da *Cyp24a1* ein sehr sensibles Zielgen des  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /Vdr-Signalwegs darstellt, dient seine Transkription als Marker der Signalwegsaktivität.

Der oben erwähnte Hh-Inhibitor Itraconazol (vgl. Kapitel 1.4) hemmt auch die Aktivität der am  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Metabolismus beteiligten Cytochrom-P450 (*Cyp*) Enzyme  $1\alpha$ -Hydroxylase und 24-Hydroxylase und damit den Auf- und Abbau des Vitamins (Vanden Bossche *et al.* 2004). Es ist daher denkbar, dass sich eine durch Itraconazol veränderte  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration auch auf den Hh-Signalweg auswirken könnte. Abbildung 2 stellt den  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Metabolismus, die beteiligten Hydroxlasen und die möglichen Interventionspunkte von Itraconazol graphisch dar.

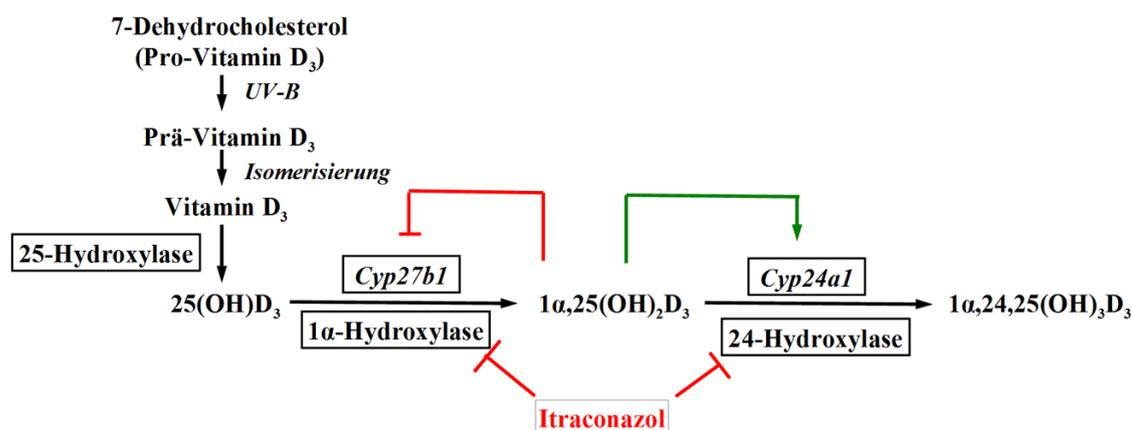


Abbildung 2: Schematische Darstellung des  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Metabolismus.

Vitamin  $\text{D}_3$  entsteht in der Haut durch UV-B-Strahlung und thermischer Isomerisierung aus 7-Dehydrocholesterol (Pro-Vitamin  $\text{D}_3$ ). Anschließend wird Vitamin  $\text{D}_3$  durch die 25-Hydroxylase zu  $25(\text{OH})\text{D}_3$  umgewandelt. Der aktive Metabolit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wird dann durch die  $1\alpha$ -Hydroxylase (*Cyp27b1*) aus  $25(\text{OH})\text{D}_3$  synthetisiert. Der Abbau erfolgt durch die Vitamin-D-24-Hydroxylase (*Cyp24a1*).

Die Enzyme unterliegen der Regulation durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , das seinen Aufbau autoregulatorisch hemmt und Abbau fördert (modifiziert nach (Deeb et al. 2007)). Die möglichen hemmenden Einflüsse auf verschiedene Hydroxylasen durch Itraconazol sind gekennzeichnet (Vanden Bossche et al. 2004).

### 1.5.2 Die Wirkungen von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Neben der beschriebenen Regulierung des Calciumhaushalts besitzt  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vielfältige nicht-klassische Funktionen. Diese vermittelt es überwiegend über den genomischen Signalweg, d.h. durch Bindung an den Vdr, einem Steroidhormonrezeptor aus der Familie der nukleären Rezeptoren mit einer DNA-bindenden und einer Ligandenbindenden Domäne (Evans 1988; Mangelsdorf et al. 1995). Aufgrund der  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Bindung ändert sich die Vdr-Konformation und es bilden sich Heterodimere aus dem  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /Vdr-Komplex und Retinoid X Rezeptoren (RXR) (MacDonald et al. 1993). Anschließend reguliert dieser Komplex die Transkription der  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /Vdr-Zielgene. Dazu bindet er an spezifische DNA-Bindestellen, den VDREs, und bildet zusammen mit weiteren Aktivatoren oder Repressoren einen Transkriptionskomplex (Haussler et al. 1998; Campbell et al. 2010).

Neben dem Vdr-abhängigen Weg vermittelt  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  seine Wirkungen auch über Rezeptor-unabhängige, „schnelle“ Signalwege. Über diese nicht-genomischen Wege werden zeitnahe Reaktionen innerhalb von Minuten ermöglicht (Mehta und Mehta 2002). Es wird vermutet, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  diese Effekte über membranständige Vitamin-D-Rezeptoren ( $\text{Vdr}_{\text{mem}}$ ) vermittelt (Nemere et al. 1994). Zu den nicht-genomisch vermittelten  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Effekten gehören bspw. die Aktivierung von Calciumkanälen und der Insulinsekretion durch Pankreaszellen (Civitelli et al. 1990; Kajikawa et al. 1999).

Über den genomischen Vdr-Signalweg reguliert  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  komplexe Vorgänge der Zelldifferenzierung, -proliferation und -apoptose. Beispielsweise induziert es die Expression des Zellzyklusinhibitors  $\text{p}21^{\text{WAF1}}$  (auch: Cdkn1a; cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) und stabilisiert  $\text{p}27^{\text{kip1}}$  (auch: Cdkn1b) (Liu et al. 1996; Hershberger et al. 1999; Lin, R et al. 2003). Das führt dazu, dass die Zellen in der G0/G1-Phase (für engl. Gap, dt. Lücke) des Zellzyklus arretieren und nicht in die S-Phase übergehen (Hager et al. 2001). Daneben reprimiert  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die Expression des antiapoptotisch wirkenden Bcl-2 (engl. B Cell Lymphoma 2) und aktiviert die Expression des proapoptotischen Bax (engl. Bcl-2-associated X protein) (Xu et al. 1993; Simboli-Campbell et al. 1997; Kizildag und Ates 2010). Durch die Aktivierung des Vdr-Signalwegs werden auch Prozesse der Zelldifferenzierung, bspw. in humanen Kolonkarzinomzelllinien, vermittelt (Palmer et al.

2001; Fernandez-Garcia *et al.* 2005). Zwar zeigen *Vdr* Knockout Mäuse keine erhöhte Inzidenz für sich spontan entwickelnde Tumoren, jedoch ist ihre Anfälligkeit für chemisch induzierte Tumoren gegenüber Wildtyp Mäusen erhöht (Zinser *et al.* 2002; Zinser *et al.* 2005). Dies spricht für die tumorprotektive Wirkung des aktiven  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /*Vdr*-Signalwegs.

Die vielfältigen differenzierungs- und apoptosefördernden sowie proliferationshemmenden Effekte von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  machen es als potentiellen Ansatz in der Tumorthherapie besonders interessant. Für Menschen mit Vitamin D-Mangel wurde ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Schilddrüsen- und Kolonkarzinomen nachgewiesen (Yin *et al.* 2009; Roskies *et al.* 2012). Durch die Einnahme von Vitamin D-Präparaten sank hingegen die Inzidenz für das Auftreten kolorektaler Tumoren in den untersuchten Gruppen (Gorham *et al.* 2007). In ersten Phase-II-Studien an Patienten mit Prostatakarzinomen konnte unter zusätzlicher Behandlung mit Vitamin  $\text{D}_3$ -Derivaten eine längere mittlere Überlebenszeit erreicht werden (Beer *et al.* 2007).

### **1.6 Vitamin D und der Hh-Signalweg**

Die antitumorale Wirkung von Vitamin D-Derivaten wird zumeist *Vdr*-abhängig vermittelt (vgl. Kapitel 1.5.2), so dass eine veränderte *Vdr*-Expression in Tumoren als Mechanismus zur Überwindung dieser antitumoralen Wirkungen denkbar wäre. Papilläre Schilddrüsenkarzinome und Tumore der Brust zeigen bspw. eine Überexpression des *Vdr* (Khadzkou *et al.* 2006; McCarthy *et al.* 2009). In anderen Tumorentitäten wurde hingegen eine geringere *Vdr*-Expression im Vergleich zu gesundem Gewebe beschrieben (Shabahang *et al.* 1993; Anderson *et al.* 2006).

Von besonderem Interesse ist jedoch, dass *Ptch*-assoziierte RMS und BCC eine *Vdr*-Überexpression zeigen und somit ein direkter Zusammenhang zwischen der *Vdr*-Expression und dem Hh-Signalweg vermutet werden kann (Uhmann *et al.* 2011a; Uhmann *et al.* 2012). Es wäre bspw. eine Hh-regulierte *Vdr*-Expression denkbar. Andererseits werden in der Epidermis *Vdr*-defizienter Mäuse verschiedene Komponenten des Hh-Signalwegs verstärkt exprimiert, so dass auch eine Regulation des Hh-Signalwegs über die  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /*Vdr*-Achse möglich wäre (Teichert *et al.* 2011).

Des Weiteren ist bekannt, dass Vitamin  $\text{D}_3$ , unabhängig vom *Vdr*-Signalweg, die Aktivität des Hh-Signalwegs hemmt (Bijlsma *et al.* 2006). Zwar ist der genaue Mechanismus der *Ptch*-abhängigen Hemmung von Smo derzeit noch ungeklärt. Durch die strukturelle Ähnlichkeit von *Ptch* mit Transportern der RND-Familie wird jedoch vermutet, dass es

physiologischerweise dazu dient, niedermolekulare Verbindungen in den Extrazellularraum zu transportieren. Diese binden an Smo und hemmen so den Hh-Signalweg (Taipale *et al.* 2002). Mediumtransferexperimente mit Wildtyp (wt) *Ptch* und *Ptch*-defizienten Zellen unterstützen diese Hypothese: die Aktivität des Hh-Signalwegs wurde durch konditioniertes Medium von wt *Ptch* Zellen gehemmt. Durch das von *Ptch*-defizienten RMS Zellen konditionierte Medium konnte hingegen keine Hemmung des Signalwegs erreicht werden. Es wird vermutet, dass es sich bei den durch *Ptch* transportierten Molekülen um Vitamin D<sub>3</sub>-Verbindungen handelt. Diese binden vermutlich nach ihrem Transport in das Extrazellularmedium an Smo-Moleküle (Bijlsma *et al.* 2006). Aus diesen Beobachtungen wurde die Hypothese dieser Arbeit abgeleitet, dass *Ptch*-Mutationen zu einer Störung seiner Pumpfunktion führen und zu einem verminderten oder fehlenden Export der Smo-inhibierenden Vitamin D<sub>3</sub>-Verbindung führen. Smo kann so nicht bzw. nicht suffizient gehemmt werden und die Hh-Signalkaskade ist kontinuierlich aktiv.

Tatsächlich bewirkt *in vitro* die exogene Vitamin D<sub>3</sub>-Zugabe eine Hemmung der Gli1-Reporteraktivität (Tang *et al.* 2007). *In vivo* resultiert die Gabe von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in einer Hemmung des Wachstums von *Ptch*-assoziierten RMS sowie *Ptch*-assoziierten BCC im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Uhmann *et al.* 2011a; Uhmann *et al.* 2012). Zudem zeigten die 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-behandelten BCC eine verminderte Proliferation, eine geringere Hh-Signalwegsaktivität, eine erhöhte Expression von Zelldifferenzierungsmarkern sowie eine Aktivierung des Vdr-Signalwegs (Uhmann *et al.* 2011a). Basierend auf einem Vergleich mit Cyclopamin zeigten die Daten, dass 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> seine antitumoralen Wirkungen in *Ptch*-assoziierten Tumoren dual durch die Aktivierung des Vdr- und gleichzeitiger Inhibierung des Hh-Signalwegs entfalten kann (Uhmann *et al.* 2011a; Kasper *et al.* 2012).

## 1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Interaktionen zwischen dem Hh- und dem Vdr-Signalweg zu überprüfen. Im Mittelpunkt standen dabei *in vitro* Analysen zum  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Metabolismus und der Vergleich von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  mit Cyclopamin bezüglich seiner Wirkung auf den Hh-Signalweg. Weiterhin wurde der Einfluß der Substanzen auf die Zellproliferation analysiert. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die *Vdr*-Expression durch den Hh-Signalweg reguliert wird.

Die Aktivität der  $1\alpha$ -Hydroxylase und der 24-Hydroxylase, sowie die Aktivierung des Vdr-Signalwegs wurden anhand von Real-Time quantitative PCR Analysen (qRT-PCR; dt. quantitative Echtzeit PCR) des  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /Vdr Zielgens *Cyp24a1* beurteilt. Zusätzlich wurde die Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Cyclopamin auf den Hh-Signalweg mittels der *Gli1*-Expression analysiert. Der Einfluss der Substanzen auf die Zellproliferation wurde mittels Bromdesoxyuridin (BrdU)-Inkorporationsassays bestimmt. Um die Wirkung der Hh-Signalkaskade auf die *Vdr*-Expression zu bestimmen, wurden *Gli*-defiziente Zelllinien mit verschiedenen *Gli*-exprimierenden Plasmiden transfiziert.

Schliesslich sollte die antitumorale Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  im Rahmen einer Kurzzeitbehandlung *in vivo* im Mausmodell für BCC überprüft werden. Dazu wurden in *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup> Tieren BCC induziert und die Tiere sofort nach Tumorinitiation über 45 oder 60 Tage mit 100 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelt. Im Anschluss an die jeweilige Behandlung wurde die Tumorgröße analysiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Software

Software	Bezugsquelle
BD Facs Diva	BD Biosystems, Bedford, USA
Cell F	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster
FlowJo	Tree Star Inc., Oregon, USA
Free Hand MX	Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA
Microsoft Office	Microsoft Co., Redmond, USA
Photoshop 6.0	Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA
SDS 2.1	Applied Biosystems, Darmstadt
Statistica	StatSoft GmbH, Hamburg

### 2.2 Datenbanken

Datenbank	URL
Mouse Genome Informatics	<a href="http://www.informatics.jax.org/">http://www.informatics.jax.org/</a>
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>

### 2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten der qRT-PCR erfolgte mit Hilfe der Software Statistica und GraphPad *Prism*®. Die Signifikanz der Unterschiede bzw. der Gleichheit der einzelnen Datengruppen wurde mit Hilfe des t-Tests für unabhängige Stichproben. **ANOVA und dem Tukey-Test überprüft.** P-Werte von  $p < 0,05$  wurden als signifikant und  $p$ -Werte  $> 0,05$  als nicht signifikant gewertet. Signifikante Werte wurden in allen Abbildungen einheitlich mit einem Stern (\*) oder einem Quadrat (□) gekennzeichnet.

### 2.4 Laborgeräte

Laborgerät	Bezugsquelle
-80 °C Schrank (MDF-U71V)	Sanyo Electric co., Ltd., Japan

## Material und Methoden 14

Agarosegelelektrophorese-Kammern	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Autoklav	W. Krannich GmbH & Co. K.G.
BD FACS Calibur	BD Biosystems, Bedford, USA
Brutschränke, Begasungsbrutschränke (6000, BBD 6220)	Kendro Laboratory Products , Hanau
BX60F5 Mikroskop	Olympus GmbH, Hamburg
<b>Laborgerät</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Einkanal-Pipetten	Sartorius AG, Göttingen
Feinwaagen (Satorius Basic plus)	Sartorius AG, Göttingen
Gewebeeinbett- und -entwässerungsautomat (TP 1020)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Heizblöcke (Thermomixer)	Eppendorf, Hamburg
Hybridisierungsöfen (HB-1000 Hybridizer)	UVP, Inc., Upland, USA
Inverses Mikroskop mit Fluoreszenzfilter (Axiovert 25, Filterset 43, 01, 09)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Luminometer (MPL-3 (2 Injektoren))	Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim
MilliQ-Anlage	MembraPure GmbH, Bodenheim
Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Multipette	Eppendorf, Hamburg
PA-Gelgießkammer (45-V10-SC2)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Paraffinspender, Ausgießstation (Dispenser PAG 12)	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
PCR-Gerät (Mastercycler epgradients)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe (Accu-Jet)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Photometer, Thermodrucker (Biophotometer 6131 Thermodrucker DPU-414)	Eppendorf, Hamburg
Schlittenmikrotom (HN 40)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Schwenktisch (Polymax 1040)	Heidolph Instruments, Schwabach

## Material und Methoden 15

---

Sterilbank (Euroflow Klasse IIA)	CleanAir Technik bv, Woerden, Niederlande
Stromquellen für Elektrophorese	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Synergy MX	Synergy MX
Tank für Flüssigstickstoff	L'air liquide S.A., Paris Cedax, Frankreich
TaqMan (AbiPrism 7900H)	Applied Biosystems, Darmstadt

---

<b>Laborgerät</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Tiefkühlschränke (-20°C)	Liebherr Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen; Robert Bosch GmbH, Stuttgart
UV-Dokumentation (digital monochrome printer P91D)	Mitsubishi, Ratingen
UV-Transilluminator/Software	Intas, Göttingen
Vortexer (Vortexer-Genie 2)	Scientific Industries, Inc., Wobum, USA
Zählkammer nach Neubauer	Omnilab-Krannich, Göttingen
Zentrifugen (Biofuge pico, fresco primo, Multifuge 3L-R)	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau

---

### 2.5 Gebrauchswaren

---

<b>Gebrauchsware</b>	<b>Bezugsquelle</b>
1,5 ml-Reaktionsgefäße	Ochs GmbH, Bovenden/Lenglern
13 ml-Röhrchen	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden
15 ml-Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
2,0 ml-Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
50 ml-Röhrchen	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
6-Loch-Platten (tissue-culture-plate 6-well)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
96-Loch Luminometer-Messplatten (96 well assay plate)	Costar, Corning Incorporated, Corning USA

## Material und Methoden 16

---

384-Loch-Platte (384-well Optical Reaction Plate)	Applied Biosystems, Darmstadt
Deckgläser	Menzel GmbH & Co.KG, Braunschweig
Dispensionspipetten (Combitips plus)	Eppendorf, Hamburg
Einwegspritzen (BD Plastipak)	BD GmbH, Heidelberg
Glaswaren	Schott AG, Mainz und Fisher Scientific GmbH, Schwerte

---

<b>Gebrauchsware</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Kanülen (Sterican Ø 0,45 x 12 mm)	B. Braun Medical AG, Emmenbrücke
Küvetten (Uvette)	Eppendorf, Hamburg
Milliporefilter (Nuclepore Track-Etch Membran)	Whatman GmbH, Dassel
Objektträger (SuperFrost Plus)	Menzel GmbH & Co.KG, Braunschweig
Objektträger-Kulturschalen (Culture slides)	BD Falcon, Heidelberg
Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße und Deckel (ThermoFast96)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Petrischalen	Ochs GmbH, Bovenden/Lenglern
Pipettenspitzen, gestopft (10 µl, 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., Nürnberg
Skalpelle	Aesulap AG & Co.KG, Tuttlingen
Sterilfilter	Omnilab-Krannich, Göttingen
Siegelfolie für 384-Loch-Platten	Applied Biosystems, Darmstadt
Zellkulturschalen; 100 mm, 35 mm (Nunclon Surface)	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden
Zellsiebe (BD Falcon™)	BD Biosystems, Bedford, USA

---

**2.6 Chemikalien und Reagenzien**

<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim
1 kb DNA, 50bp und 100bp DNA Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
25(OH)D <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim
Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim
Dithiotreiol (DTT)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Eosin G Certistain <sup>®</sup>	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 96 %ig	J.T.Baker, Darmstadt
Ethidiumbromid	inna-TRAIN-Diagnostics. Kronberg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	ICN Biochemicals Inc., Aurora, USA
First strand buffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Hämatoxylin	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Itrakonazol	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim
Ketanest (25 mg/ml)	Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd	Fluka Chemie GmbH, Buchs
PBS-Tabletten	GIBCO Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Pertex Mounting-Medium	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
Random Hexamer-Oligonukleotide	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ringer-Lactat (nach Hartman)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
RNase, DNase-freies destilliertes Wasser	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Rompun(2 %)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen

## Material und Methoden 18

Sonnenblumenöl	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim
Tamoxifen	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim
Transkriptionspuffer 5x	Promega GmbH, Mannheim
TRIzol <sup>®</sup> Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Wasser für Injektionszwecke (Ampuwa)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg

Chemikalie/Reagenz	Bezugsquelle
Xylol	J.T. Baker B.V., Deventer, Holland

Alle weiteren, nicht aufgelisteten, Chemikalien wurden von der Carl Roth GmbH, Karlsruhe oder von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, bezogen.

### 2.7 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Reaktionssystem	Hersteller
Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Roti <sup>®</sup> Fect	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SYBR <sup>®</sup> GreenER <sup>™</sup> qPCR SuperMix for ABI PRISM <sup>®</sup>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Quanti Tect SYBR-Green	Qiagen GmbH, Hilden

### 2.8 Stammlösungen

Stammlösung	Konzentration	Inhaltsstoffe
Cresol	0,1 % (w/v)	Cresol gesättigte Sukroslösung
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP-Mix)	10 mM	dATP
	10 mM	dTTP
	10 mM	dGTP
	10 mM	dCTP

## Material und Methoden 19

Eosin	1 % (w/v)	Eosin G (wasserlöslich)
	70 % (v/v)	Ethanol
Hämalaun nach Meyer	1 % (w/v)	Citronensäure
	5 % (w/v)	Trichloracetaldehydhydrat
	0,015 % (w/v)	Natriumjodat
	5 % (w/v)	Kaliumaluminiumsulfat
	0,1 % (w/v)	Hämatoxylin

Stammlösung	Konzentration	Inhaltsstoffe
Paraformaldehyd (PFA)	4 % (w/v)	Paraformaldehyd
	1x	PBS
Phosphat-gepufferte Natriumchlorid-Lösung 10x (PBS) Stammlösung, pH 7,4	1,4 M	NaCl
	27 mM	KCl
	15mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
STE-Puffer	65 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	10mN	Tris/HCl
	5 mM	EDTA
Tris-Borsäure-EDTA Lösung, 10x (TBE) (Stammlösung, die für alle Anwendungen 1:10 verdünnt wurde)	0,5 M	NaCl
	890 mM	Tris/HCl
	730 mM	Borsäure
	12,5 mM	EDTA

## 2.9 Medien

### 2.9.1 Bakterienkultur

Bakterien (E.coli) wurden in Lysogeny-Broth-Medium (LB-Medium) kultiviert. Die Transformation der Bakterien erfolgte in SOC-Medium (Super Optimal Broth Medium plus 20mM Glucose; Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Die Selektion der Bakterien, die nach

der Transformation ein Resistenz-vermittelndes Gen exprimierten, erfolgte durch die Zugabe von Ampicillin (50 µl/ml).

### 2.9.2 Kultur eukaryontischer Zellen

Für die Kultivierung der Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) verwendet, welchem 10 % fötales Kälberserum (engl. Fetal Calf Serum, FCS) und 1 % Antibiotika (Penicillin/Streptomycin, PS) zugesetzt wurden. Wenn bei der Durchführung von Experimenten mit abweichenden Serum- bzw. Antibiotikakonzentrationen gearbeitet wurde, ist dies bei der Beschreibung der einzelnen Versuch im Teil Ergebnisse (Kapitel 3) erwähnt.

Medium/Zusatz	Hersteller
Bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum, FCS)	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PBS Tabletten	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin (10000U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Trypsin/EDTA (TrypLE™ Express)	GIBCO Invitrogen™, Auckland, Neuseeland

## 2.10 Biologisches Material

### 2.10.1 Bakterienstämme

Für Transformation und Plasmidamplifikation wurde E.coli 5DH $\alpha$  verwendet.

### 2.10.2 Eukaryontische Zelllinien

Die eukaryontischen Zelllinien wurden bei 37°C in einer konstant CO<sub>2</sub>-haltigen Atmosphäre (5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt) bei 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

### 2.10.3 Murine Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft (Referenz)
<i>Gli1</i> <sup>-/-</sup>	<i>Gli1</i> -defiziente murine embryonale Fibroblasten (MEF),	(Lipinski <i>et al.</i> 2008a)

## Material und Methoden 21

<i>Gli1</i> <sup>-/-</sup> <i>Gli2</i> <sup>-/-</sup>	<i>Gli1</i> - und <i>Gli2</i> -defiziente MEF,	(Lipinski <i>et al.</i> 2008a)
<i>Gli2</i> <sup>-/-</sup> <i>Gli3</i> <sup>-/-</sup>	<i>Gli2</i> - und <i>Gli3</i> -defiziente MEF	(Lipinski <i>et al.</i> 2008a)
<i>Ptch</i> <sup>flox/flox</sup> <i>ERT2</i> <sup>+/-</sup>	Monoklonale, adulte Fibroblasten, die wt <i>Ptch</i> exprimieren	(Nitzki, Frauke <i>et al.</i> 2010)
<i>Ptch</i> <sup>-/-</sup>	<i>Ptch</i> -defiziente monoklonale, adulte Fibroblasten	(Uhmann <i>et al.</i> 2011a)
RMS Primärkulturen	Primärkultivierte RMS Zellen	(Ecke <i>et al.</i> 2008)
<i>Smo</i> <sup>-/-</sup>	<i>Smo</i> -defiziente MEF	(Varjosalo <i>et al.</i> 2006)
<b>Zelllinie</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Herkunft (Referenz)</b>
<i>Vdr</i> <sup>-/-</sup>	<i>Vdr</i> -defiziente MEF	(Sun <i>et al.</i> 2006)
wt MEF	wt MEF	zur Verfügung gestellt von Dr. Li (Universität Chicago, USA)

### 2.10.4 Humane Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft (Referenz)
HaCaT	Humane Keratinozyten aus histologisch normaler Haut	(Boukamp <i>et al.</i> 1988)

### 2.10.5 Mauslinien

Mauslinie	Genetischer Hintergrund	Beschreibung	Referenz
<i>Ptch</i> <sup>neo67/+</sup>	BALB/c/C57BL/6N	Heterozygote <i>Ptch</i> -Gendeletion (knockout)	(Hahn <i>et al.</i> 1998)
<i>Ptch</i> <sup>flox/flox</sup> <i>ERT2</i> <sup>+/-</sup>	C57BL/6	Tamoxifen-induzierbare konditionelle <i>Ptch</i> -Gendeletion	(Uhmann <i>et al.</i> 2007)

***Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mauslinie**

Die Untersuchungen *Ptch*-assoziierter RMS wurden mit Hilfe eines Mausmodells durchgeführt, welches ein Knockout von *Ptch* aufweist. In diesem sogenannten *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Modell sind die Exone 6 und 7 durch eine Neomycin-Resistenzkassette ersetzt. Die heterozygoten Mäuse zeigen Symptome des Gorlin-Goltz-Syndroms wie Skelettdefekte und entwickeln RMS und MB (Hahn *et al.* 1998). Durch UV-Bestrahlung können in diesen Tieren auch BCC hervorgerufen werden (Mancuso *et al.* 2004). Homozygote *Ptch*<sup>neo67/neo67</sup> Mäuse sterben dagegen schon intrauterin aufgrund von Neuralrohr- und Herzdefekten (Hahn *et al.* 1998).

Für die Herstellung von RMS-Primärkulturen wurden *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Tiere mit einem gemischten genetischen C57BL6/N x BALB/c Hintergrund verwendet (Hahn *et al.* 1998). Dazu erfolgte eine Verpaarung/Kreuzung männlicher *Ptch*<sup>neo67/+</sup> C57BL6/N Tiere mit weiblichen Tieren der Inzuchtlinie BALB/c (Charles River Laboratories, L'Arbresle, Frankreich). Tiere dieses Hintergrunds entwickeln nach spätestens 200 Tagen zu 21 % RMS (Zibat *et al.* 2009).

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

Um die Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf *Ptch*-assozierte BCC zu untersuchen, wurden Mäuse der Linie *Ptch*<sup>flox/flox</sup> *Rosa26ERT2*<sup>+/-</sup> genutzt. Dazu wurden *Ptch*<sup>flox/flox</sup> Mäuse mit *Rosa26ERT2*<sup>+/-</sup> (*ERT2*<sup>+/-</sup>) Mäusen verpaart. Die dabei entstandenen *Ptch*<sup>flox/+</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Nachkommen wurden mit *Ptch*<sup>flox/flox</sup> Tieren rückgekreuzt um *Ptch*<sup>flox/flox</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Mäuse zu erhalten (Uhmann *et al.* 2007).

Diese Mäuse exprimieren ein Fusionsprotein aus einer Cre-Rekombinase und einem modifizierten Östrogenrezeptor (CreERT2), der vom endogenen *Rosa26*-Promotor kontrolliert wird. Die Aktivität der Cre-Rekombinase wird durch die Bindung von Tamoxifen am Östrogenrezeptor CreERT2 ausgelöst, was eine gezielte Induktion der *Ptch*<sup>del</sup>-Mutation und damit die Induktion von *Ptch*-assozierten Tumoren in diesen Tieren ermöglicht.

Die Induktion von BCC in *Ptch*<sup>flox/flox</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Mäusen erfolgte durch die Gabe von 100 µg Tamoxifen i.m. im Alter von 8 Wochen. Die Mäuse entwickeln zu 100 % BCC, die nach 45 Tagen sichtbar werden und am 90. Tag ihre maximale Ausprägung erreichen (Zibat *et al.* 2009).

### 2.10.6 Plasmide

Bezeichnung	Klonierungsvektor	Referenz/Herkunft
pCR 3.1- <i>mGli1</i>	pCR3.1	(Bauer 2006)
pCMV/SV-Flag1- <i>mGli2</i>	pCMV	zur Verfügung gestellt von Dr. Y. Kamachi
pCR 3.1- <i>mGli3</i>	PCR3.1	(Bauer 2006)
pCR 3.1	pCR 3.1	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pEGFP-N1	pCMV	BD Bioscience Clontech, Heidelberg

### 2.11 Synthetische Oligonukleotide

DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Qiagen GmbH, Hilden bezogen. Sie wurden in doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) auf eine Stammlösung von 100 µM eingestellt. Bei der Durchführung von PCRs wurde mit einer 10 µM Stammlösung gearbeitet.

#### 2.11.1 DNA-Oligonukleotide zur Genotypisierung von Mäusen

Die Genotypisierung der Mäuse ist in Kapitel 2.13.1.1.1 beschrieben.

1	2	3	4	5
<i>Ptch</i> <sup>neo67</sup>	400 bp <sup>mut</sup>	<i>neo-L</i>	AGTGCCAGCGGGGCTGCTAAA	(Hahn <i>et al.</i> 1998)
	635 bp <sup>wt</sup>	<i>mPTC11R3</i>	CTGCCTGTTATGTGGTTCAAACCG	
		<i>Pst4KF</i>	GGGAGGGGATTTTCAGCAGAATGTT	
<i>Ptch</i> <sup>fllox</sup>	843 bp <sup>fllox</sup>	<i>p910F.4</i>	AGCACCTGGACGACATCCTAAA	(Uhmann <i>et al.</i> 2007)
		<i>Neo-R</i>	CATCAGAGCAGCCGATTGTCTG	
<i>Ptch</i> <sup>fllox</sup>	1735 bp <sup>fllox</sup>	<i>Neo-F</i>	CGTGATATTGCTGAAGAGCTTGG	(Uhmann <i>et al.</i> 2007)
		<i>p1011R.2</i>	TCTGTCCTGTTTCACTGAATGCATGG	
wt <i>Ptch</i>	1401 bp <sup>wt</sup>	<i>p910F.4</i>	AGCACCTGGACGACATCCTAAA	(Uhmann <i>et al.</i> 2007)
		<i>p1011R.2</i>	TCTGTCCTGTTTCACTGAATGCATGG	

<i>Ptch<sup>del</sup></i>	950 bp <sup>del</sup>	<i>Exon7-F</i>	AGGAAGTATATGCATTGGCAGGAG	(Uhmann <i>et al.</i> 2007)
		<i>Neo-R</i>	CATCAGAGCAGCCGATTGTCTG	
<i>ROSA26</i>		<i>RosCre</i>	ACCAGCCAGCTATCAACTC	(Hameyer <i>et al.</i> 2007)
<i>CreERT2</i>	269 bp <sup>T</sup>	<i>ER-F</i>		
		<i>RosCre</i>	TATACGCGTGCTAGCGAAGATCTCC	
		<i>ER-R</i>	ACTTCCAGCAG	

**Tabelle 1: DNA-Oligonukletide zur Genotypisierung**

**Spalte 1:** Bezeichnung des Genotypen, **Spalte 2:** Fragmentgröße des Amplifikats, **Spalte 3:** Bezeichnung des DNA-Oligonukleotids, **Spalte 4:** Sequenz des DNA-Oligonukleotids **Spalte 5:** Referenz;

**Abkürzungen:** <sup>wt</sup> Amplifikatlänge des Wildtyp Allels; <sup>mut</sup> Amplifikatlänge des mutanten Allels; <sup>T</sup> Amplifikatlänge des transgenen Allels; <sup>del</sup> Amplifikatlänge des Allels bei erfolgter Deletion durch Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination <sup>flox</sup> Allel mit integrierten <sup>loxP</sup>-Sequenzen.

### 2.11.2 DNA-Oligonukleotide für die quantitative Real Time PCR an cDNA

Die Durchführung der qRT-PCR ist in Kapitel 2.13.4.3 beschrieben. Die DNA-Oligonukleotide die dafür genutzt wurden sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Transkript	Primer-bezeichnung	Primersequenz	Referenz
<i>mCyp24a1</i>	Cyp24a1-F	GTGTGGCAAGCGCACACGCT	(Uhmann <i>et al.</i> 2011a)
	Cyp24a1-R	CCGTGACAGCAGCGTACAGT	
<i>hCyp24a1</i>	hCyp24a1-F	TGGTCACTCCAGTCGAGCTGCA	Diese Arbeit
	hCyp24a1-R	GGAAATCTGCACTAGGCTGCTG	
<i>mGli1</i>	mGli1-tq-F	TACATGCTGGTGGTGACATG	(Ecke <i>et al.</i> 2008)
	mGli1-tq-R	ACCGAAGGTGCGTCTTGAGG	
<i>hGli1</i>	hGli1-AU-F	GAAGGAGTTCGTGTGCCACTGG	Diese Arbeit

	hGli1-AU-R	GAGGCGTGAGTATGACTTCCG	
<i>mGli2</i>	Gli2-RT-PCR-F	GGTCATCTACGAGACCAACTGC	(Uhmann <i>et al.</i> 2011b)
	Gli2-RT-PCR-R	GTGTCTTCAGGTTCTCCAGGC	
<i>mGli3</i>	Gli3F2	GAAGGAACAACCCTAGTCAAGGAGGA	Diese Arbeit
	Gli3-sybrgree R	CCAGCGGCACACGAACTCCTTCT	
<i>mVdr</i>	Vdr-F	AGAACATGTGCTGCTCATGGC	(Uhmann <i>et al.</i> 2011a)
	Vdr-R2	TCATCTTGGCGTAGAGCTGGTTGGCT	
	Vdr-E2-F	CTGTGAGTCTTCCCAGGAGAGC	(Li <i>et al.</i> 1997)
	Vdr-E5-R	ACAGCTTGGGCCTCAGGAGAGC	
<i>Smo</i>	Smo-Geno-F	GGTCCCAGGGTTGAAGACA	(Varjosalo <i>et al.</i> 2006)
	Smo-Geno-R	CCCCTCGACTCCCAACTTT	
<i>Sufu</i>	F21	CCCTTTTTGTCAATAGTTCC	(Svard <i>et al.</i> 2006)
	R6	TGACAATAGACTCCGCCTCC	
	NeoF2	GCCTTCTATCGCCTTCTTGAC	
<i>18S rRNA</i>	18S fwd	CGCAAATTACCCACTCCCG	(Nitzki, F. 2008)
	18S rev2	TTCCAATTACAGGGCCTCGAA	

**Tabelle 2: Oligonukleotide, die als Primer für qRT-PCR und semiquantitative PCR verwendet wurden.**

**Abkürzungen:** m- murin, h-human.

## 2.12 Enzyme

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Collagenase H	Isolation von RMS Zellen	Roche Diagnostics GmbH,

		Mannheim
DNase	RNA-Isolation nach Transfektion	Promega GmbH, Mannheim
Proteinkinase K	DNA-Isolierung	Carl Roth, Karlsruhe
Restriktionsendonukleasen	Restriktionsanalyse	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<b>Bezeichnung</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller</b>
Reverse Transkriptase SuperScriptII	cDNA-Synthese	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Taq-DNA-Polymerase	PCR	MolzymGmbH Co.KG, Bremen

## **2.13 Molekularbiologische Methoden**

### **2.13.1 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren**

#### **2.13.1.1 Isolierung von DNA**

##### **2.13.1.1.1 Isolierung von DNA aus Schwanzbiopsien zur Genotypisierung**

Die frisch biopsierten Gewebeproben wurden in 400 µl 1 x STE Puffer und 20 µl Proteinase K (25 mg/ml) aufgenommen. Der Ansatz wurde über Nacht bei 55°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in 1 ml 99 % Ethanol (EtOH) überführt und für weitere 30 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 µl 70 % EtOH für 10 min bei 4°C und 13.000 rpm in der Zentrifuge gewaschen. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet bei 55°C getrocknet. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 125 µl doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) für 15 min bei 1400 rpm und 42°C gelöst. Für Genotypisierung mittels PCR wurden 50 bis 100 ng der isolierten DNA als Matrizen-DNA eingesetzt.

##### **2.13.1.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA**

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA in mittlerer Größenordnung wurden 3 ml Bakterienkulturernte in 100 ml LB-Medium und 50 µg/ml Ampicillin überführt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in 50

ml Röhrchen überführt und für 10 min bei 8000 x g und 4 C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde mit 4 ml Resuspensionspuffer (PureLink<sup>®</sup> HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit, Invitrogen) resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurde dem Ansatz 4 ml Lysepuffer beigemischt. Dann wurde das Gemisch 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur F llung der Proteine wurde 4 ml Präzipitations-Puffer zugegeben und 10 min bei 8000 x g, 4 C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine equilibrierte Säule gegeben und der Durchfluß verworfen. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 10 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte durch die Zugabe von 4 ml Elutions-Puffer. Zum Fällen wurde die Plasmid-DNA in mehrere 2 ml-Reaktionsgefäße mit Isopropanol im Verhältnis 1:1 überführt und über Nacht bei -20 C gelagert. Nach Zentrifugation für 30 min bei 13.000 rpm und 4 C wurde das DNA-Pellet in 70 % Ethanol gewaschen, erneut für 10 min zentrifugiert und anschließend getrocknet. Das Pellet wurde in 50 Öl ddH<sub>2</sub>O für 10 min bei 900 rpm und 42 C gelöst. Zur Verifizierung des aufgereinigten Plasmids wurde eine Restriktionshydrolyse (vgl. Kapitel 2.13.3.2) durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 C gelagert.

### 2.13.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA

#### 2.13.1.2.1 RNA-Isolierung aus Zellkultur

Das Medium der kultivierten Zellen wurde zunächst verworfen. Die Zellen wurden dann mit 1 x PBS gewaschen und anschließend in 1 ml TRIzol<sup>®</sup> Reagent aufgenommen. Die Proben wurden jeweils in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gelagert. Um die Zellen vollständig zu lysieren, wurden die Proben 2 min gevortext. Dann wurden sie für 10 min für 10.000 rpm bei 4 C zentrifugiert, der Überstand in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von Chloroform (200 Öl Chloroform pro ml TRIzol<sup>®</sup>) zur Trennung der Nukleinsäuren von Membranbestandteilen und Proteinen wurden die Ansätze nochmals gevortext und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte über 10 Min bei 10.000 rpm und 4 C. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß mit 500 Öl Isopropanol versetzt. Die F llung der RNA erfolgte über Nacht bei -20 C. Nach Zentrifugation für 30 min bei 12.000 rpm und 4 C wurde das RNA-Pellet mit 500 Öl 70 % Ethanol für 10 min bei 12.000 rpm und 4 C gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 10 bis 20

µl RNase-freiem Wasser für 10 min bei 56°C und 900 rpm gelöst. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

#### **2.13.1.2.2 Behandlung der isolierten RNA mit DNase**

Um Kontaminationen der RNA mit Plasmid-DNA nach der Transfektion von Expressionsplasmiden zu verhindern, wurde die isolierte RNA zusätzlich mit DNase behandelt.

Es wurde mit einem Ansatz von 10 µl gearbeitet:

3 µg RNA

1 µl DNase Puffer

3 U DNase

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 65°C über 15 min gestoppt. Die Ansätze wurden mit 90 µl RNase-freiem Wasser aufgestockt. Zur Fällung wurden 500 µl Isopropanol hinzugegeben und die Proben über Nacht bei -20°C gelagert. Die RNA wurde dann, wie in Kapitel 2.13.1.2.1 beschrieben, gewaschen und in RNase-freiem Wasser gelöst.

#### **2.13.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Mit Hilfe eines Spektralphotometers wurde die Konzentration von Nukleinsäuren ihrem Absorptionsmaximum von 260 nm bestimmt. Neben der Messung der optischen Dichte fließen noch weitere Variablen in die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration  $c$  ein: der Verdünnungsfaktor  $V$  und der Nukleinsäurespezifische Koeffizient  $C$ . Die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration ist in Formel 1 dargestellt.

$$c[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} * V * C$$

##### **Formel 1: Berechnung der Konzentration von Nukleinsäuren**

Abkürzungen:  $c$ : gemessene Konzentration in µg/µl,  $V$ : Verdünnungsfaktor,  $C$ : Nukleinsäurespezifischer Koeffizient (0,05µg/µl für DNA; 0,04 µg/µl für RNA)  $\text{OD}_{260}$ : Optische Dichte bei Wellenlänge  $\lambda=260$  nm

Die Reinheit der Nukleinsäuren wurde durch die gleichzeitige Messung der Absorptionsspektren von Proteinen (280 nm) und Salzen (230 nm) beurteilt. Die

Nukleinsäuren gelten als rein, wenn sie dem in Formel 2 angegebenen Verhältnis entsprechen.

$$\text{DNA: } OD_{260}/OD_{280} = 1,8$$

$$\text{RNA: } OD_{260}/OD_{230} = 2,0$$

**Formel 2: Bestimmung des Reinheitsgrades von Nukleinsäuren** Abkürzungen  $OD_{260}$ : Optische Dichte bei  $\lambda=260\text{nm}$ ;  $OD_{230}$ : Optische Dichte bei  $\lambda=230\text{nm}$ ;  $OD_{240}$ : Optische Dichte bei  $\lambda=240\text{nm}$

### 2.13.3 Klonierungstechniken

#### 2.13.3.1 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

50 ng des zu transformierenden Plasmids wurden zu 25  $\mu\text{l}$  DH5 $\alpha$  E.coli Bakterien gegeben. Dieser Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation der Bakterien erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42°C für 45 s. Danach wurde der Ansatz für 2 min auf Eis gelagert und anschließend 500  $\mu\text{l}$  SOC-Medium hinzugegeben. Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C und 900 rpm geschwenkt. Danach wurden 100  $\mu\text{l}$  des Transformationsansatzes auf eine LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin) zur Selektion der plasmidtragenden Bakterien ausgestrichen und im Brutschrank über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 2.13.3.2 Restriktionshydrolyse von Plasmid-DNA

Restriktionshydrolysen wurden in Volumina von 10  $\mu\text{l}$  mit folgenden Komponenten durchgeführt:

1 $\mu\text{l}$	DNA (500ng/ $\mu\text{l}$ )
1 $\mu\text{l}$	10x Puffer
0,4 $\mu\text{l}$	Restriktionsenzym 1
[0,4 $\mu\text{l}$	Restriktionsenzym 2]
add 10 $\mu\text{l}$	Wasser

Die Ansätze wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die simultane Restriktionshydrolyse mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen erfolgte in einem für beide Enzyme optimalen Puffer. War dies nicht möglich, erfolgte eine sequentielle Restriktionshydrolyse. Dazu wurde die DNA zunächst mit dem ersten Enzym hydrolysiert, danach wurde das zweite Enzym mit 2  $\mu\text{l}$  des entsprechend optimalen Puffers hinzugefügt

und der Ansatz mit ddH<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgt jeweils für eine Stunde bei 37°C.

#### **2.13.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

##### **2.13.4.1 Semiquantitative PCR**

Die Methode der PCR (engl. Polymerase Chain Reaction) dient zur *in vitro* Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte durch eine hitzestabile DNA-Polymerase. Bei dieser handelt es sich um die Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*. Sequenzspezifische Oligonukleotide an beiden DNA-Strängen dienen als Startpunkt für dieses Enzym, so dass das gewünschte Fragment amplifiziert werden kann.

Der Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

10-100 ng	Matrizen-DNA
0,5 µM	sequenzspezifisches Vorwärts-DNA-Oligonukleotid
0,5 µM	sequenzspezifisches Rückwärts-DNA-Oligonukleotid
0,2 mM	dNTP's (Desoxyribonukleosidtriphosphate)
1 x	Cresol
1 x	Polymerase-Puffer
1 U	Taq-Polymerase

Zunächst wird die DNA bei 95°C für 5 bis 10 min denaturiert. Anschließend wird ein Zyklus bestehend aus Denaturierung, DNA-Oligonukleotid-Anlagerung und Elongation 25- bis 40-mal durchlaufen. Diese Schritte benötigen verschiedene Temperaturoptima: der Denaturierungsschritt erfolgt bei 95°C für 30 bis 60 s, der Anlagerungsschritt bei 50 bis 65°C für 30 bis 60 s und der Elongationsschritt bei 68 bis 72°C für 1 bis 10 min. Beim letzten Schritt repliziert die Taq-Polymerase, ausgehend vom angelagerten Oligonukleotidprimer der das 5'-Ende bildet, den DNA-Strang in 3'-Richtung.

Nach der PCR wurden die Fragmente mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Fragmentlänge aufgetrennt (siehe Kapitel 2.13.5).

##### **2.13.4.2 Reverse Transkription**

Mit Hilfe der reversen Transkription wurde cDNA (complementaryDNA) an Matrizen-RNA synthetisiert. Für die Durchführung der reversen Transkription wurde je 2 µg RNA

mit (gegebenenfalls RNase-freiem) Wasser auf ein Volumen von 7  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Dann wurden pro Ansatz 5  $\mu\text{l}$  Hexamere (50 ng/ $\mu\text{l}$ ; Primer random p(dN)<sub>6</sub>, Roche Diagnostics) hinzugegeben und 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden folgende Reagenzien hinzugefügt:

4 $\mu\text{l}$	5x 1 <sup>st</sup> strand buffer
2 $\mu\text{l}$	0,1 M DTT
1 $\mu\text{l}$	10 mM dNTPs.

Der Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor er 2 min bei 42°C vorgewärmt wurde. Anschließend wurde 1  $\mu\text{l}$  (40 U/ $\mu\text{l}$ ) reverse Transkriptase Super Script II von Invitrogen zugegeben und die Ansätze für 60 min bei 42°C inkubiert. Durch Inkubation der Proben für 10 min bei einer Temperatur von 70°C wurde die Reaktion gestoppt.

Für die Kalkulation der cDNA-Konzentration wurde angenommen, dass die Transkriptionsrate 50 % beträgt. Damit lag die cDNA-Konzentration nach der Reaktion mit ein Ansatzvolumen von 20  $\mu\text{l}$  bei 50 ng/ $\mu\text{l}$ .

### 2.13.4.3 Real-Time quantitative PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ist eine Methode, um Expressionsprofile eines Gens in unterschiedlichen Proben zu quantifizieren. Dabei wird die Zunahme der Amplifikate durch ein Fluoreszenzsignal detektiert. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit SYBR-Green-basierten Untersuchungen gearbeitet.

#### 2.13.4.3.1 Relative Quantifizierung

Um die Expressionsniveaus eines Gens in unterschiedlichen Proben beurteilen und miteinander vergleichen zu können, wurde es relativ quantifiziert. Dafür wurde für jedes untersuchte Gen eine Standardkurve mit einer 1:5-Verdünnungsreihe erstellt. Die Normalisierung erfolgte mittels eines endogenen Kontrollgens.

Die mit SYBR-Green durchgeführte qRT-PCR basiert auf der Interkalierung dieses Farbstoffes in Doppelstrang-DNA und der Emittierung von Licht der Wellenlänge 521 nm durch den entstandenen DNA-Farbstoff-Komplex. Die Fluoreszenz wird über den gesamten Verlauf des PCR-Programms detektiert und korreliert exponentiell mit der Anzahl doppelsträngiger DNA-Amplifikate. Um die Bindung von SYBR-Green an unspezifische PCR-Produkte und Oligonukleotid-Dimere von der Bindung des spezifischen Amplifikats zu unterscheiden, wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt:

Die Temperatur wird kontinuierlich auf 95°C erhöht. Dadurch wird doppelsträngige zu einzelsträngiger DNA aufgeschmolzen. Durch dabei freigesetztes SYBR-Green kann eine Abnahme der Fluoreszenz beobachtet werden. Da spezifische Amplifikate eine höhere Schmelztemperatur als unspezifische Amplifikate und Oligonukleotid-Dimere besitzen, können diese voneinander unterschieden werden.

Während der gesamten PCR wird die Fluoreszenzemission ( $R_n$ ) detektiert und auf eine interne Referenz (ROX) normalisiert. Die normalisierte Fluoreszenz-Emission  $\Delta R_n$  wird gegen die Zykluszahl in einer sigmoiden Amplifikationskurve aufgetragen. Diese Kurve stellt die Korrelation zwischen der Fluoreszenz-Emission und der Zykluszahl dar.

Für die exponentielle Phase der Amplifikationskurve gilt, dass die Zunahme der Fluoreszenzintensität in jedem Zyklus direkt der Zunahme des spezifisch amplifizierten PCR-Produkts entspricht. Durch die Wahl einer Fluoreszenzemission (Schwellenwert) in der exponentiellen Phase wird jeder Probe eine Zykluszahl zugeordnet, bei der die Kurve den Schwellenwert schneidet (Ct-Wert, engl. Crossing Treshold). 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 in der Probe.

### **2.13.4.3.2 Endogene Kontrolle**

Also endogene Kontrolle diente die Amplifikation der *18S* rRNA (ribosomale RNA), die in allen Geweben gleichmäßig exprimiert wird und damit zur Normalisierung der Expression des jeweiligen Zielgens in unterschiedlichen Zellarten genutzt werden kann. Die verwendeten Oligonukleotide zur Amplifikation von *18S* rRNA detektieren sowohl murine als auch humane *18S* rRNA.

### **2.13.4.3.3 Ablauf und Aufbau der qRT-PCR**

Die Bestimmung der Expression verschiedener Zielgene erfolgte unter Verwendung von sequenzspezifischen DNA-Oligonukleotiden (siehe Tabelle 2) und des jeweiligen SYBR-Green Systems.

Jede qRT-PCR-Analyse wurde mittels eines einheitlichen Pipettierschemas mit je 3 Replikaten für jede Probe durchgeführt. Es wurde je eine Negativkontrolle ohne Zugabe von Matrizen-cDNA (NTC, no template control) und je 7 Verdünnungsstufen (1:5

Verdünnungen von S1 bis S7) zur Erstellung der Standardkurve sowie die jeweiligen cDNA-Proben gemessen.

Die cDNA, die für die Erstellung der Standardkurven verwendet wurde, wurde aus RNA von Geweben gewonnen, in denen die zu untersuchenden Gene bekanntermaßen endogen exprimiert werden. Die Verdünnungsreihe zur Erstellung der 18S rRNA-Standardkurve erfolgte aus cDNA mit einer Ausgangskonzentration (S1) von 25 pg/µl. Die S1-Konzentrationen der cDNA zur Erstellung der Standardkurven anderer Genuntersuchungen betragen 25 ng/µl bis 10 ng/µl (Tabelle 3: Verwendete cDNA zur Erstellung der Standardkurven

<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<i>18S</i>	Embryo	0,08	Invitrogen	3,2 pg
<i>hGli1</i>	Humane RMS-Zelllinie RD (ATCC No. CCL-136)	100	Qiagen	50 ng
<i>mGli1</i>	Embryo	20	Invitrogen	50ng bzw. 2,5 ng
<i>mGli2</i>	Embryo	20	Qiagen	50ng bzw. 2,5 ng
<i>mGli3</i>	Embryo	20	Invitrogen	50ng bzw. 2,5 ng
<i>mCYP24A1</i>	Niere	20	Qiagen	50 ng
<i>hCYP24A1</i>	HaCaT-Zelllinie mit 1α,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> behandelt	20	Qiagen	50 ng
<i>Vdr</i>	Niere	20	Qiagen	50 ng

**Tabelle 3: Verwendete cDNA zur Erstellung der Standardkurven**

**1:** qRT-PCR Zielgene, **2:**verwendetes Gewebe zur Synthese der cDNA für die Standardkurve, **3:** cDNA Konzentration der S1-Verdünnung der Standardkurve in ng/Loch, **4:** verwendetes SYBR-Green System, **5:** eingesetzte cDNA Konzentration der Proben in µg/Loch.

Pro Loch einer 384-Loch-Platte wurde ein 10 µl Ansatz bestehend aus folgenden Komponenten verwendet:

<b>Qiagen-SYBR</b>		<b>Invitrogen-SYBR</b>	
4 µl	SYBR <sup>®</sup> -Green (Qiagen)	5 µl	SYBR <sup>®</sup> GreenER <sup>™</sup> (Invitrogen)
0,4 µl	Rückwärts-DNA-Oligonukleotid (10	0,4 µl	Rückwärts-DNA-Oligonukleotid (10

$\mu\text{M}$ )	$\mu\text{M}$ )
0,4 $\mu\text{l}$ Vorwärts-DNA-Oligonukleotid (10 $\mu\text{M}$ )	0,4 $\mu\text{l}$ Vorwärts-DNA-Oligonukleotid (10 $\mu\text{M}$ )
3,2 $\mu\text{l}$ RNase-freies $\text{H}_2\text{O}$ (Invitrogen)	2,2 $\mu\text{l}$ RNase-freies $\text{H}_2\text{O}$ (Invitrogen)
2 $\mu\text{l}$ Matrizen-cDNA	2 $\mu\text{l}$ Matrizen-cDNA

Die Sybr-Reaktionssysteme bestehen aus den folgenden Komponenten:

<b>Qiagen-SYBR</b>	<b>Invitrogen-SYBR</b>
Hot Star Taq <sup>TM</sup> DNA Polymerase	Hot-Start Taq DNA-Polymerase
SYBR-Green I Fluoreszenzfarbstoff	SYBR <sup>®</sup> GreenER <sup>TM</sup> Fluoreszenzfarbstoff,
dNTP Mix inklusive dUTPs	dNTPs Mix mit dUTPs
ROX Referenzfarbstoff	ROX Referenzfarbstoff
MgCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>
	Uracil-DNA Glycosylase (UDG)

Mit einem Dispenser wurden 8  $\mu\text{l}$  des Ansatzes pro Loch einer 384-Loch-Platte vorgelegt und je 2  $\mu\text{l}$  der zu messenden cDNA hinzugegeben. Die Endkonzentration der cDNA betrug pro Loch 3,2 pg für das *18S* rRNA-Assay und 50 ng bzw. 2,5 ng pro Loch in den anderen Assays (Tabelle 3: Verwendete cDNA zur Erstellung der Standardkurven). Anschließend wurde die Platte mit einer Folie (Applied Biosystems, Darmstadt) versiegelt und abzentrifugiert.

Die Proben wurden im „ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System“ mit der SDS 2.1 Software (Applied Biosystems, Darmstadt) gemessen. Nach zwei initialen Schritten (je 2 min bei 50°C und 15 min (Qiagen) bzw. 2 min (Invitrogen) bei 95 °C) folgten 40 Zyklen mit jeweils folgender Temperaturabfolge:

<b>Qiagen-SYBR</b>	<b>Invitrogen-SYBR</b>
--------------------	------------------------

95°C	15 s	95°C	15 S
60°C	30 s	60°C	1 Min
72°C	30 s		

**Tabelle 4: Ablauf eines Zyklus bei Verwendung verschiedener SYBR-Green Systeme.**

Zur Qualitätssicherung wurde anschließend eine Schmelzkurve erstellt, bei der die Temperatur kontinuierlich auf 95°C angehoben wurde (siehe Kapitel 2.13.4.3.1).

#### **2.13.4.3.4 Auswertung nach der Standardkurvenmethode**

Die Daten der qRT-PCR wurden mit der Software Excel ausgewertet. Anhand der Verdünnungsreihe wurde zunächst die Standardkurve des Zielgens erstellt. Dafür wurde der Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge gegen die Zykluszahl aufgetragen, bei der die Amplifikationskurve den Schwellenwert (Ct-Wert) geschnitten hat. Der Ct-Wert entspricht der Zyklusanzahl, die jede Reaktion benötigt, um eine willkürlich festgelegte Fluoreszenzmenge zu erreichen. Der Ct-Wert wird in der initialen exponentiellen Phase der PCR gewählt, da in dieser Phase die vorhandenen Substrate noch keine Limitierung hervorrufen und die Produkte nicht degradieren.

Liegt der lineare Zusammenhang zwischen dem Ct-Wert und der Konzentration jeder Verdünnung bei über 99 % ( $R^2 > 0,99$ ), ist die Steigung der resultierenden Geraden Ausdruck der Amplifikationseffizienz. Die Effizienz der Reaktion liegt bei 100 %, d.h. in jedem Zyklus wird die Produktmenge verdoppelt. Somit liegt, bei einer seriellen Fünffach-Verdünnung, die Differenz zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen (S1-S7) bei 2,32 ( $2^{2,32} = 5$ ). Eine Steigung von  $m=2,32$  der Geraden entspricht somit einer Amplifikationseffizienz von 100 %.

Der Ct-Wert verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der eingesetzten Matrizenanzahl. Die lineare Regression mit Hilfe von Standardkurven unterschiedlicher Steigung ermöglicht die Quantifizierung der Konzentration von Matrizen-cDNA anhand des gemessenen Ct-Wertes jeder Probe und die Berechnung der ursprünglich enthaltenen Konzentration.

Um die Daten untereinander vergleichen zu können, erfolgte anschließend die Normalisierung der Quantität der Zielgenamplifikate auf die entsprechende Quantität der endogenen Kontrolle (18S rRNA).

Wie in Formel 3 dargestellt, entspricht die normalisierte Genexpression dem Quotienten aus der Expression des Zielgens und der Expression der endogenen Kontrolle (in den hier beschriebenen Versuchen immer *18S rRNA*).

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

**Formel 3: Die normalisierte Genexpression.** Die normalisierte Expression des Zielgens entspricht dem Quotienten aus der Expression des Zielgens und der Expression der endogenen Kontrolle.

Zur relativen Quantifizierung der Daten einer Messreihe wurde die normalisierte Expression der mit Lösungsmittel behandelten Probe dieser Messreihe (Kalibrator) verwendet. Die Lösungsmittel-Probe wurde dabei auf den Wert 1 normalisiert. Durch die Bildung des Quotienten aus der normalisierten Genexpression einer Probe und der normalisierten Genexpression des Kalibrators einer Messreihe wurden die Daten relativ quantifiziert.

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

**Formel 4: Die relative Genexpression** Die relative Genexpression ergibt sich aus dem Quotienten der normalisierten Genexpression und der normalisierten Genexpression des Kalibrators.

### 2.13.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Größenauftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Für diese wurden je nach Größe des DNA-Fragments 1,5-2 % Agarose in 1 x TBE-Puffer gelöst. Die Elektrophorese erfolgte in einer mit 1 x TBE gefüllten Gelelektrophoresekammer bei einer konstanten Spannung von 95 V. Zum Nachweis der DNA-Fragmente wurde dem noch flüssigen Gel unter Schwenken das mit DNA interkalierende Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,2 µg/ml) zugegeben. Im angelegten Spannungsfeld läuft die negativ geladene DNA von der Kathode (Minuspol) zur Anode (Pluspol). Kürzere Fragmente laufen dabei schneller als längere. Mit Hilfe des UV-Transilluminators wurde die Auftrennung der DNA-Fragmente visualisiert. Um die Größe

der Fragmente abschätzen zu können, wurden neben den Proben ein oder mehrere Längenstandards (engl. DNA-ladder 1 kb, 100 bp, 50 bp) parallel mitgeführt.

## **2.14 Histologische Methoden**

### **2.14.1 Paraffineinbettung von Geweben und Anfertigung von Paraffinschnitten**

Die Gewebe wurden zunächst für 2 bis 14 Tage in Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Anschließend wurden sie mit Hilfe eines Gewebeeinbett- und -entwässerungsautomaten entwässert und anschließend manuell in Paraffin eingegossen.

Am Schlittenmikrotom wurden ca. 3 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf Superfrost-Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden dann für 20 min bei 80°C getrocknet.

### **2.14.2 Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung**

Die Paraffinschnitte wurden zweimal 10 min in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Ethanol-Reihe (99 %, 96 %, 70 %) rehydriert. Nach kurzem Spülen in ddH<sub>2</sub>O wurden die Objektträger 10 min in einer Hämatoxylin-Lösung inkubiert und 5-10 min in warmem Leitungswasser gebläut. Danach wurden die Schnitte 20 s in Eosin-Lösung inkubiert und nach erneutem kurzem Waschen in ddH<sub>2</sub>O in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70 %, 96 %, 99 %) dehydriert. Im Anschluss wurden die Präparate in Xylol geschwenkt. Anschließend wurde ein Tropfen Pertex Mounting-Medium auf den Objektträger gegeben und das Deckgläschen blasenfrei auf den Schnitt gelegt. Die Härtung erfolgte für 15 min bei 55°C im Brutschrank.

### **2.14.3 Planimetrische Vermessung von HE-Schnitten**

Die HE-Schnitte wurden bei 100facher Vergrößerung mithilfe der Software CellF (*Olympus Soft Imaging Solutions GmbH; Hamburg*) vermessen. Hierzu wurden pro Schnitt je drei Gesichtsfelder analysiert und die Größe der tumorös veränderten Areale berechnet.

## **2.15 Zellbiologische Methoden**

### **2.15.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen**

Eukaryotische Zellen wurden in Zellkulturschalen mit DMEM, dem 10 % FCS und 1 % PS zugesetzt waren, kultiviert. Wenn in den einzelnen Untersuchungen dieser Arbeit mit abweichenden Serum- oder Antibiotikakonzentrationen gearbeitet wurde, ist dies in der Beschreibung der Experimente angegeben.

### **2.15.2 Anlegen von RMS Primärkulturen**

Um RMS Zellen kurzzeitig zu kultivieren, wurde zunächst ein RMS aus dem umgebenden Gewebe steril herauspräpariert und mit 1x PBS gewaschen. Ein Teil wurde zur histologischen Abklärung in 4 % PFA in 1x PBS konserviert. Anschließend wurde der Tumor mit einem Skalpell zerkleinert und die Zellen durch Inkubation mit Kollagenase H (2 mg/ml in Medium gelöst) für 50 min bei 1000 rpm und 37°C aus dem Gewebeverband gelöst. Mit Hilfe eines Zellsiebs wurde eine Einzellsuspension hergestellt. Nach wiederholtem Spülen mit 1x PBS wurde das Filtrat in ein steriles Gefäß überführt und 5 min bei 300 x g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in DMEM mit 10 % FCS und 1 % PS resuspendiert. Die RMS Zellen wurden auf eine kollagenbeschichtete 6-Loch-Platte ausgesät und für maximal 4 Tage kultiviert. Für die Beschichtung der Platten wurde Kollagen aus Rattenschwänzen gewonnen und in 0,05 % Essigsäure aufgenommen. Nach Beschichtung wurde die Platte mittels UV-Licht sterilisiert.

### **2.15.3 Transfektion eukaryotischer Zellen mit Expressionplasmid-DNA**

Die liposomenvermittelte Transfektion eukaryotischer Zelllinien erfolgte mit dem Transfektionsmedium Roti<sup>®</sup>Fect (Carl Roth GmbH, Karlsruhe). Pro Loch einer 6-Loch-Platte wurde 2 µg DNA mit 8 µl Roti<sup>®</sup>Fect (*Gli*-defiziente Zellen) bzw. 2 µg DNA mit 4 µl Roti<sup>®</sup>Fect (wt *Ptch* Zellen) transfiziert. Dafür wurden zunächst DNA und Roti<sup>®</sup>Fect durch Auf- und Abpipettieren in 200 µl DMEM gemischt und 40 min bei Raumtemperatur komplexiert. Danach wurde der Ansatz in 1,5 ml DMEM mit 10 % FCS überführt und die Zellen für 6 Stunden bei 37°C mit dem DNA-Roti<sup>®</sup>Fect-Komplex inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und das Medium durch DMEM mit 10 % FCS und 1 %PS ersetzt.

### **2.15.4 *In vitro*-Proliferationsanalysen**

#### **2.15.4.1 5-Bromo-2-Desoxyuridin(BrdU)-Inkorporations-Untersuchung**

Um das Proliferationsverhalten verschiedener Zelllinien beurteilen zu können, wurde ein ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-basierter BrdU-Assay verwendet. Wenn eine Zelle unter Inkubation mit BrdU DNA synthetisiert, wird BrdU anstelle von Thymidin in den neuen DNA-Strang inkorporiert. Mittels monoklonaler Peroxidase-konjugierter Anti-BrdU-Antikörper können die inkorporierten BrdU-Moleküle später detektiert und quantifiziert werden. Die Quantifizierung erfolgte im Luminometer, da die Peroxidase in

Anwesenheit von Peroxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) Luminol oxidiert. Wenn das Reaktionsprodukt in seinen Ursprungszustand zurückfällt, werden Photonen emittiert, die ein messbares Lichtsignal bilden. Das gebrauchsfertige ELISA-basierte Reaktionssystem wurde nach Herstellerangaben verwendet.

Pro Loch einer 96-Loch-Platte wurden 4000 Zellen in 100  $\mu\text{l}$  DMEM (10 % FCS und 1 % PS) kultiviert. Am folgenden Tag wurde das Medium durch serumreduziertes Medium (DMEM mit 2 % FCS und 1 % PS) ersetzt. Diesem wurde  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (10 nM) oder Cyclopamin (5  $\mu\text{M}$ ) zugefügt. Nach 26 Stunden Inkubation wurde dem Medium 1 mM BrdU in 1 x PBS zugegeben. Nach weiteren 22 Stunden wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und mit dem gebrauchsfertigen Reaktionssystem Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent) von Roche Diagnostics GmbH nach Herstellerangaben behandelt. Dazu wurden die Zellen zuerst für 30 Min bei Raumtemperatur fixiert. Die genomische DNA wurde dabei denaturiert, um das inkorporierte BrdU für die Detektion zugänglich zu machen. Die Fixationslösung wurde abgenommen und der Ansatz für 60 min mit je 100  $\mu\text{l}$  anti-BrdU-Antikörper (anti-BrdU-POD (mit Peroxidase konjugiert)) 1:100 in Antibody Dilution Solution inkubiert. Danach wurde der Ansatz drei Mal gewaschen (je 5 min mit 1x Waschpuffer) und der Waschpuffer sorgfältig entfernt. Anschließend erfolgte die Messung mithilfe des Peroxidase-Substrates aus den mitgelieferten Substratkomponenten A (Luminol/4-Iodophenol) und B (enthält eine stabilisierte Form von  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) im Verhältnis 100:1 im Synergy MX von BioTek (Luminometer).

Zur Versuchskontrolle wurden Zellen mit serumfreiem Medium (DMEM mit 1 % PS) inkubiert, da unter dieser Bedingung keine Proliferation möglich sein sollte. Außerdem wurden Zellen mit Lösungsmittel (Ethanol) in serumreduziertem Medium oder in serumreduziertem Medium inkubiert. Um unspezifische Hintergrundsignale zu detektieren wurden zusätzlich Ansätze ohne Zellen gemessen,.

### 2.15.4.2 Immunfluoreszenzanalysen

#### 2.15.4.2.1 Durchflusszytometrie (engl. fluorescence activated cell sorting; FACS)

Der Anteil apoptotischer Zellen einer Zellpopulation wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Mit dieser kann man Zellen nach ihrer Morphologie mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper für Oberflächenproteine analysieren. Um die Zellen zu beurteilen, wurde das fluoreszenzmarkierte Protein Annexin V (BD Biosciences) und To-Pro-3-Iodid (Invitrogen) verwendet. Annexin V bindet an das Phospholipid

Phosphatidylserin, welches sich an der Innenseite vitaler Zellen befindet. Apoptotische Zellen dagegen translozieren Phosphatidylserin an die extrazelluläre Membranseite, so dass es von Annexin V gebunden werden kann.

Da diese Vorgänge auch bei nekrotischen Zellen zu beobachten sind, wird zur weiteren Unterscheidung To-Pro-3-Iodid (PI) eingesetzt. Dieses kann bei bestehenden Membrandefekten in den Zellkern gelangen und dort in die DNA interkalieren. Gleichzeitig gelangt auch Annexin V durch die defekte Membran an Phosphatidylserin, welches an der Membraninnenseite liegt.

Da Membrandefekte kennzeichnend für die spätaoptotische und nekrotische Phase sind, können Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>, sowie Annexin V<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup> Zellen in diese Phasen eingeordnet werden. Die Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> Zellen können in die frühaoptotische Phase eingeordnet werden. Die V<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup> Zellen können als vital bezeichnet werden.

Es wurden 100.000 Zellen pro Loch ausgesät und über Nacht in serumhaltigen Medium (10 % FCS, 1 % PS) inkubiert. Dann wurde das Medium durch DMEM ohne Serum oder DMEM mit 2 % FCS bzw. 10 % FCS (jeweils mit 1 % PS) ersetzt. Das Zellmedium wurde nach 48 bzw. 72 h abgenommen, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und für 3 min mit Accutase inkubiert, um die Zellen von der Platte lösen zu können. Dann wurden die Zellen für 5 min abzentrifugiert (300 x g, 4°C), der Überstand abgenommen und die Zellen mit 5 ml 1x PBS nochmals 5 min zentrifugiert (300 x g, 4°C). Nach Abnahme des Überstands wurde dem Zellpellet 100 µl Bindungspuffer (10 x BD Binding Buffer, BD Biosciences) mit 2 µl FITC (Fluorescein Isothiocyanat) Annexin V hinzugefügt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde dem Ansatz 1 µl To-Pro-3-Iodid-Lösung (1mM) zugegeben. Der Ansatz wurde gevortext und weitere 5 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Bindungspuffer wurden die Proben innerhalb einer Stunde am BD FACSCalibur gemessen. Die Software BD FACS Diva (BD Biosystems) diente zur Aufnahme der Daten. Die Datenanalyse erfolgte mit der Software FlowJo (Tree Star) und Excel (Microsoft).

## 2.16 Tierexperimentelle Methoden

### 2.16.1 Zucht und Haltung von Mus Musculus

Die verwendeten Mauslinien wurde im institutseigenen Tierstall gezüchtet (Gentechnischer Arbeitsbereich S1; Institut für Humangenetik, Universität Göttingen). Die Tiere wurden in Makrokolonkäftigen Typ I und II, bei einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus (Hell-Periode: 6.00 Uhr - 18.00 Uhr), einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 +/-10 % und einer

Temperatur von 20 +/- 2 °C gehalten. Pelletiertes Trockenfutter (Alleinfutter für Mäusezucht, Sniff Spezialdiät GmbH, Soest) und Leitungswasser standen den Tieren ständig zur Verfügung.

### 2.16.2 Schwanzbiopsie und Ohrlochmarkierung

Im Alter von vier Wochen wurden vom Tierstallpersonal im institutseigenem Tierstall Schwanzbiopsien zur Genotypisierung entnommen (ca 0,2 cm der Schwanzspitze) und Ohrlochmarkierungen (Nummerierung der Mäuse) vorgenommen.

### 2.16.3 Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR an genomischer DNA aus Schwanzbiopsien. Die für die unterschiedlichen Mauslinien verwendeten PCR-Konditionen und DNA-Oligonukleotide sind in Tabelle 1 aufgeführt.

### 2.16.4 Injektionen

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

Aus  $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und 99 % Ethanol wurde eine 10  $\mu\text{M}$  Stocklösung hergestellt. Die Stocklösung wurde mit sterilem Sonnenblumenöl individuell so verdünnt, dass jedem Tier 50  $\mu\text{l}$  dieser Injektionslösung entsprechend 100 ng/kg Körpergewicht i.p. verabreicht werden konnte. Die Dosierung wurde wöchentlich an das Gewicht der Tiere angepasst. Die Lagerung der Lösung erfolgte bei  $-20^\circ\text{C}$ . Die Tiere der Kontrollkohorte erhielten Lösungsmittelinjektionen.

Die Mäuse wurden für die Injektion am Genick und Schwanz fixiert und die Lösung wurde in die Bauchhöhle verabreicht. Es wurden sterile Spritzen und Kanülen (Sterican  $\varnothing$  0,45 x 12 mm) verwendet.

#### 2.16.4.2 Intramuskuläre Injektion von Tamoxifen

Zur Induktion von BCC in *Ptch<sup>flox/flox</sup> ERT2* Mäusen wurde den Tieren 8 Wochen nach der Geburt Tamoxifen in den *Musculus soleus* injiziert. Eine Lösung von 100 mg Tamoxifen pro ml 96 % EtOH wurde mit sterilem Sonnenblumenöl (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim) 1:10 verdünnt, so dass die Tamoxifen-Endkonzentration 10 mg/ml betrug. Die Emulsion wurde bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Den Mäusen wurde durch eine intramuskuläre Injektion von 10  $\mu\text{l}$  der 10 mg/ml Emulsion somit eine Gesamtdosis von 100  $\mu\text{g}$  Tamoxifen injiziert.

## 2.16.5 Sichtung und Präparation von Tumorgewebe

### 2.16.5.1 RMS

*Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen wurde zweimal wöchentlich abgetastet und auf Tumoren hin überprüft. Hierdurch wurden RMS, deren häufigste Lokalisation an den Extremitäten zu finden ist, entdeckt und im weiteren Verlauf beobachtet. Um eine RMS-Kurzzeitkultur anlegen zu können, sollte der Tumor einen Durchmesser von 1 cm erreicht haben. Zur Präparation des Tumors wurden die Tiere durch zervikale Dislokation schmerzfrei getötet. Dann wurde das Tier auf dem Präparationstisch fixiert und die Haut mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die Haut über dem Tumor wurde entfernt und dieser aus dem umliegenden Gewebe präpariert.

### 2.16.5.2 BCC

Nach der Induktion der Tumoren durch die Injektion von Tamoxifen wurde den Tieren über 45 bzw. 60 Tage  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder Lösungsmittel injiziert. Nach dem Behandlungszeitraum wurden sie mit einer letalen Dosis Ketanest S (4 mg) und Rompun (0,9 mg) betäubt und mit Paraformaldehyd perfundiert (vgl. Kapitel 2.16.5.3).

Die BCC-tragende Schwanzhaut (Abstand von der Schwanzwurzel etwa 1 cm) wurde für molekularbiologische Analysen entnommen und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Außerdem wurde an der gleichen Stelle ein Stück Schwanzhaut für histologische Untersuchungen entnommen und in 4 % PFA fixiert.

Die histologische Abklärung aller Tumoren durch einen Pathologen erfolgte anhand von HE-gefärbten Gewebeschnitten.

### 2.16.5.3 Perfusion von Mäusen mit Paraformaldehyd

Zur Betäubung wurde den Mäusen eine letale Dosis Ketanest S (4 mg) und Rompun (0,9 mg) injiziert. Um das Herz freizulegen wurde der Brustraum eröffnet. Zur Eröffnung des Blutkreislaufes wurde der rechte Vorhof punktiert. Danach wurde die linke Herzkammer mit einem Blutentnahmeset punktiert und der Kreislauf für jeweils 10 min mit Ringer-Lactat und 4 % PFA gespült und fixiert. Die Tiere wurden für 2 Wochen in 50 ml Röhren bei  $4^\circ\text{C}$  in 4 % PFA nachfixiert und bis zur weiteren Verwendung in 1 x PBS gelagert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Analysen zum $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Metabolismus in *Ptch*-defizienten Zellen

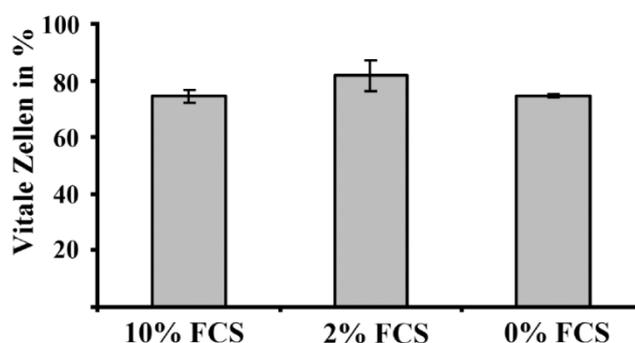
#### 3.1.1 Die Synthese von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in *Ptch*-defizienten RMS Zellen

Die  $1\alpha$ -Hydroxylase (Cyp27b1) bildet  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aus dessen Vorstufe  $25(\text{OH})\text{D}_3$ . Zunächst sollte untersucht werden, ob dieser Schritt in der Synthese des Vitamins in *Ptch*-defizienten Zellen gestört ist. Dazu wurden RMS Zellen unter Serumentzug mit  $25(\text{OH})\text{D}_3$  inkubiert und die Synthese von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in den Zellen anschließend anhand der Expression von *Cyp24a1* beurteilt. Die Synthese würde zu einem Anstieg der  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration, zur Aktivierung des Vdr-Signalwegs sowie der Expression seines Zielgens *Cyp24a1* führen. Gleichzeitig wurde die *Gli1*-Expression analysiert, da bei erfolgreicher  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese und einer anschließenden Sekretion in den extrazellulären Raum eine Inhibition des Hh-Zielgens zu erwarten ist.

Die RMS Zellen wurden aus *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen isoliert und in Kultur genommen. Da in diesen Tumoren ein *Ptch*-Allel mutiert und das andere epigenetisch abgeschaltet ist, besitzen RMS Zellen kein funktionelles *Ptch* (Calzada-Wack *et al.* 2002). Die ebenfalls untersuchten *Ptch*-defizienten (*Ptch*<sup>-/-</sup>) Fibroblasten sezernieren, ähnlich wie RMS Zellen, kein Smo-inhibitorisches Molekül. Dagegen sind wt *Ptch* Zellen hierzu in der Lage (Dr. A. Uhmann, unveröffentlichte Daten). Daher wurden *Ptch*<sup>-/-</sup> und wt *Ptch* Zellen als entsprechende Kontrollzellen mitgeführt. Von der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT ist bekannt, dass sie  $25(\text{OH})\text{D}_3$  zu  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  umsetzen kann. Dies wurde mittels HPLC- und Expressionsanalysen gezeigt (Lehmann 1997; Seifert *et al.* 2009). Deshalb dienten diese Zellen als Positivkontrolle für die Experimente.

Serumhaltiges Medium (Medium mit 10 % FCS und 1 % PS) könnte Vitamin  $\text{D}_3$ -Derivate enthalten, die bei der Analyse des  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Metabolismus zu falschpositiven Ergebnissen führen. Deswegen sollten die Experimente in serumfreiem Medium (Medium mit 1 % PS aber ohne FCS) durchgeführt werden. Daher musste zunächst überprüft werden, ob die verwendeten Zelllinien 48 h in serumfreiem Medium überleben. Sowohl für die wt *Ptch* als auch die HaCaT Zelllinie konnte dies bereits gezeigt werden. Für kultivierte RMS Zellen konnte eine erhöhte Apoptoserate der Zellen durch die Zugabe von 2 % Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA) zum Kulturmedium verhindert werden (C. Henkel, unveröffentlichte Daten).

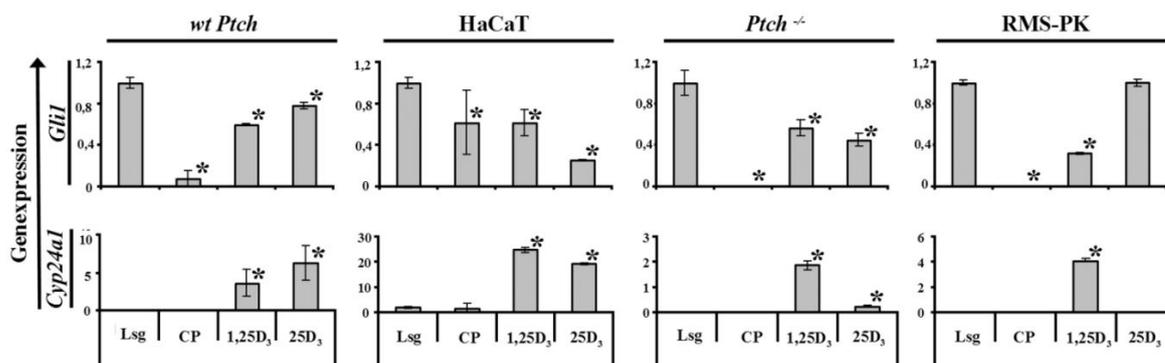
Da für die *Ptch*<sup>-/-</sup> Zelllinie keine Daten zur Überlebensfähigkeit in serumfreiem Medium vorlagen, wurden die Zellen für 48 h in Medium mit unterschiedlicher Serumkonzentration (10 %, 2 % und 0 %) und 1 % PS inkubiert. Danach wurden AnnexinV/PI-Färbungen durchgeführt und die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Grundlage und die Durchführung der AnnexinV/PI-Färbung ist im Teil Material und Methoden beschrieben (Kapitel 2.15.4.2). Bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurden frühapoptotische AnnexinV<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>, spätapoptotische AnnexinV<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> und nekrotische AnnexinV<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup> Zellen unterschieden. Als vitale Zellen galten AnnexinV<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup> Zellen.



**Abbildung 3: Anteil vitaler *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen nach Inkubation in serumfreiem Medium für 48 h.** Dargestellt ist der prozentuale Anteil vitaler (AnnexinV/PI<sup>-</sup>) Zellen nach Kultivierung für 48 h in DMEM mit 10 % FCS, 2 % FCS oder 0 % FCS.

Wie Abbildung 3 zeigt, tolerierten *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen die Kultivierung in serumfreiem Medium über einen Zeitraum von 48 h. Der Anteil vitaler Zellen in serumfreiem Medium unterschied sich nicht signifikant vom Anteil vitaler Zellen, welche unter Zugabe von FCS kultiviert wurden. In den nachfolgenden Experimenten wurden daher wt *Ptch*, HaCaT und *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen in serumfreiem Medium und RMS Zellen in BSA-haltigem Medium (2 % BSA, 1 % PS) kultiviert. Für die Expressionsanalysen des Vdr/1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Zielgens *Cyp24a1* nach Kultivierung mit 25(OH)D<sub>3</sub> wurden 100.000 Zellen/Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen für 24 h in serumfreiem bzw. BSA-haltigem Medium kultiviert (Huang *et al.* 2002; Diesel *et al.* 2005). Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 h in serumfreiem bzw. BSA-haltigem Medium unter Zugabe von 50 nM 25(OH)D<sub>3</sub>, 10 nM 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Positivkontrolle für die Aktivierung des Vdr-Signalwegs), 5  $\mu$ M Cyclopamin (Negativkontrolle für die Aktivierung des Vdr-Signalwegs und Positivkontrolle für die Inhibition des Hh-Signalwegs) oder Ethanol (Lösungsmittelkontrolle) inkubiert.

Danach wurden die Zellen in TRIzol<sup>®</sup>-Reagenz aufgenommen, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Abbildung 4 zeigt die qRT-PCR Expressionsanalysen von *Cyp24a1* und *Gli1* (als Marker für den Aktivitätsstatus der Hh-Signalkaskade). Das Experiment wurde zweimal unabhängig wiederholt. Beide Wiederholungen wurden in Duplikaten durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse eines Experiments spiegeln den Trend beider durchgeführten Experimente wider.



**Abbildung 4:** *Cyp24a1*- und *Gli1*-Expression in den Zelllinien *wt Ptch*, HaCaT, *Ptch*<sup>-/-</sup> sowie in kultivierten RMS Zellen nach Inkubation mit Lösungsmittel (Lsg), 5 µM Cyclopamin (CP), 10 nM 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (1,25D<sub>3</sub>) und 50 nM 25(OH)D<sub>3</sub> (25D<sub>3</sub>). Die *Gli1*-Expressionswerte wurden auf die Lösungsmittelkontrolle (Ethanol) relativiert. Die Werte der *Cyp24a1*-Expression sind in normalisierten Werten angegeben. Die Signifikanz wurde mittels t-Test für unabhängige Variablen bestimmt. Die signifikant zur Lösungsmittelkontrolle unterschiedlichen Werte (p < 0,05) wurden mit einem Stern (\*) markiert.

Wie Abbildung 4 zeigt, wurde in den *wt Ptch* und HaCaT Kontrollzelllinien die Expression von *Cyp24a1* durch 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und dessen Vorstufe 25(OH)D<sub>3</sub> aktiviert. Dies war, wenn auch in schwächerer Ausprägung, ebenfalls in den *Ptch*<sup>-/-</sup> Kontrollzelllinien nachweisbar. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass in diesen drei Zelllinien eine Synthese von 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> aus 25(OH)D<sub>3</sub> möglich ist. In den ebenfalls *Ptch*-defizienten RMS Zellen hingegen konnte die Expression von *Cyp24a1* zwar durch 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, nicht aber durch 25(OH)D<sub>3</sub>, induziert werden. Dies deutet darauf hin, dass in RMS Zellen 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> nicht synthetisiert wurde.

Weiterhin wird deutlich, dass nach Inkubation mit 25(OH)D<sub>3</sub> in allen Zelllinien, mit Ausnahme der RMS Zellen, die *Gli1*-Expression gehemmt wurde. Das könnte bedeuten, dass in den Kontrollzelllinien auch 25(OH)D<sub>3</sub>, neben 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und Cyclopamin, den Hh-Signalweg inhibiert hat. Dann aber wäre auch in den RMS Zellen eine Hemmung des

Signalwegs durch 25(OH)D<sub>3</sub> zu erwarten gewesen. In diesen wurde aber die Hh-Signalkaskade durch 25(OH)D<sub>3</sub> nicht gehemmt, obwohl der Signalweg in den RMS Zellen (wie auch in allen anderen Zelllinien) sehr gut auf Cyclopamin und 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ansprach. Da die Hemmung der *Gli1*-Expression in den untersuchten Zelllinien nach Inkubation mit 25(OH)D<sub>3</sub> mit der *Cyp24a1*-Induktion korrelierte, weisen die Ergebnisse insgesamt eher darauf hin, dass eine intakte Synthese von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> aus 25(OH)D<sub>3</sub> notwendig ist, um den Hh-Signalweg in den untersuchten Zellen zu inhibieren. Weiterhin könnte dieser Aspekt darauf hindeuten, dass lediglich 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, nicht aber 25(OH)D<sub>3</sub>, die Möglichkeit zur Hh-Blockade besitzt.

Zusammengefasst zeigten die Untersuchungen, dass die Synthese von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> aus 25(OH)D<sub>3</sub> in primärkultivierten RMS Zellen vermutlich gestört ist, was wiederum für die hohe Aktivität des Hh-Signalwegs in diesen Zellen mitverantwortlich sein könnte. Dies resultiert aus der Beobachtung, dass eine Inkubation dieser Zelllinie mit 25(OH)D<sub>3</sub> weder eine Induktion des Vdr-Signalwegs noch eine Repression des Hh-Signalwegs auslösen konnte, obwohl 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> einen inhibierenden Effekt auf den Hh-Signalweg hatte. Die Ursache dieser Störung scheint weiterhin nicht mit dem konstitutiv aktiven Hh-Signalweg der Zellen in Zusammenhang zu stehen, da in den *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen, die ebenfalls eine solche Aktivierung aufweisen, durch 25(OH)D<sub>3</sub> sowohl die *Cyp24a1*-Expression induziert als auch der Hh-Signalweg gehemmt wurde.

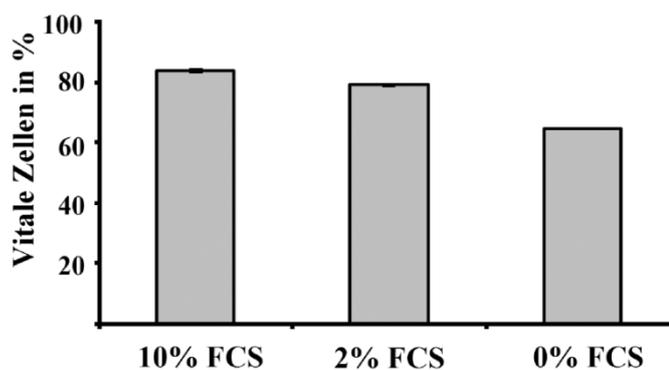
### **3.1.2 Wirkungen von Itraconazol auf den 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Metabolismus und den Hh-Signalweg in *Ptch*-defizienten Zellen**

Das Antimykotikum Itraconazol hemmt in Pilzen die für den Membranaufbau wichtige Ergosterolsynthese auf Ebene der Lanosterol-14 $\alpha$ -Demethylase (14-LDM) (Vanden Bossche 1985). Neuesten Erkenntnissen zufolge inhibiert es auch den Hh-Signalweg, vermutlich durch die Bindung an Smo (Kim *et al.* 2010). Weiterhin ist bekannt, dass Itraconazol die Aktivität des Enzyms 1 $\alpha$ -Hydroxylase (*Cyp27b1*), welches für den Aufbau von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> verantwortlich ist, inhibieren kann. Infolgedessen ist die Transkription des Vdr/1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Zielgens *Cyp24a1* (24-Hydroxylase) vermindert. Auch die Aktivität dieses Enzyms und damit der Abbau von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> wird durch Itraconazol gehemmt (Vanden Bossche *et al.* 2004). Daher sollte untersucht werden, ob für die von Kim *et al.* gezeigte Hh-inhibierende Wirkung von Itraconazol auch eine solche Modulierung des 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Metabolismus ursächlich sein könnte. So könnte Itraconazol die Synthese von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> durch die 1 $\alpha$ -Hydroxylase hemmen und zu

einer verminderten Hh-Inhibition führen. Es könnte aber auch durch die Hemmung des  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Abbaus zu einer längerfristig erhöhten  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration und damit zu einer stärkeren Hemmung des Hh-Signalwegs beitragen (vgl. Kapitel 1.5.1). Um dies zu untersuchen wurden  $Ptch^{-/-}$  Zellen verwendet, welche einen konstitutiv aktiven Hh-Signalweg aufweisen und wahrscheinlich in der Lage sind,  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aus seiner Vorstufe zu synthetisieren (vgl. Kapitel 3.1.1).

### 3.1.2.1 Die Wirkung von Itraconazol auf den Hh-Signalweg

Zunächst wurde untersucht, ob die Aktivität der Hh-Signalkaskade in den verwendeten  $Ptch$ -defizienten Zellen durch Itraconazol inhibiert werden kann. Da vermutet wurde, dass die Itraconazol-vermittelte Hemmung der Hh-Signalkaskade durch die Modulation des  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  Metabolismus hervorgerufen werden könnte, sollten alle nachfolgenden Experimente in serumfreiem Medium durchgeführt werden. In Anlehnung an Kim *et al.* sollten die Zellen, nach einer 24stündigen Vorinkubation, für 48 h in serumfreiem Medium mit den Substanzen inkubiert werden (Kim *et al.* 2010). Daher musste zunächst geprüft werden, ob  $Ptch^{-/-}$  Zellen diese insgesamt 72 h in serumfreiem Medium überleben. Die Untersuchung erfolgte wie in Kapitel 3.1.1 und 2.15.4.2.1 beschrieben. Danach wurden AnnexinV/PI-Färbungen durchgeführt und die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

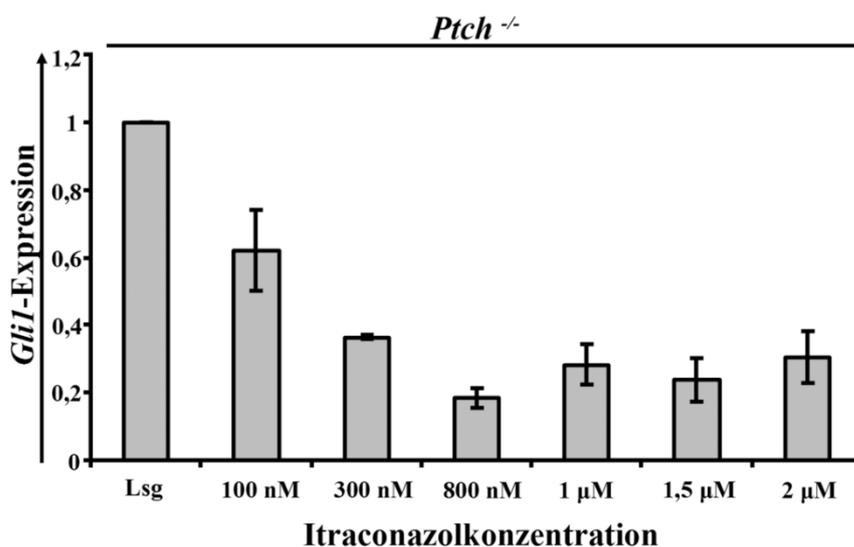


**Abbildung 5:** Anteil vitaler  $Ptch^{-/-}$  Zellen nach Inkubation in serumfreiem Medium für 72 h. Dargestellt ist der prozentuale Anteil vitaler (AnnexinV/PI) Zellen. Die Zellen wurden für 72 h in Medium mit unterschiedlichem Serumgehalt (10 % FCS, 2 % FCS und 0 % FCS) inkubiert und anschließend mit AnnexinV/PI gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Wie Abbildung 5 zeigt, tolerierten  $Ptch^{-/-}$  Zellen die Inkubation in serumfreiem Medium über 72 h. Der Anteil vitaler Zellen nach Inkubation in serumfreiem Medium lag bei 65 %

im Vergleich zu 84 % bzw. 79 % vitaler Zellen in 10 % bzw. 2 % FCS. Daher konnten die folgenden Experimente in serumfreiem Medium durchgeführt werden.

Für das Experiment wurden 100.000 *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte in serumhaltigem Medium ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 24 h in serumfreiem Medium vorinkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 48 h in serumfreiem Medium mit DMSO (Lösungsmittel) bzw. aufsteigenden Itraconazolkonzentrationen (100 nM, 300 nM, 500 nM, 800 nM, 1 µM, 1,5 µM und 2 µM) inkubiert. Die Itraconazolstockkonzentrationen wurden so gewählt, dass sie jeweils 1:5000 in Medium verdünnt werden konnten. Danach wurde die RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Die Aktivität des Hh-Signalwegs wurde anhand der Expressionslevel des Hh-Zielgens *Gli1* bestimmt.



**Abbildung 6: *Gli1*-Expression in *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen nach Inkubation mit ansteigenden Itraconazolkonzentrationen.** Relative Quantifizierung der *Gli1*-Expression in *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen nach Behandlung mit aufsteigenden Itraconazolkonzentrationen (100 nM, 300 nM, 500 nM, 800 nM, 1 µM, 1,5 µM und 2 µM). Die Werte wurden auf Lösungsmittelkontrolle relativiert.

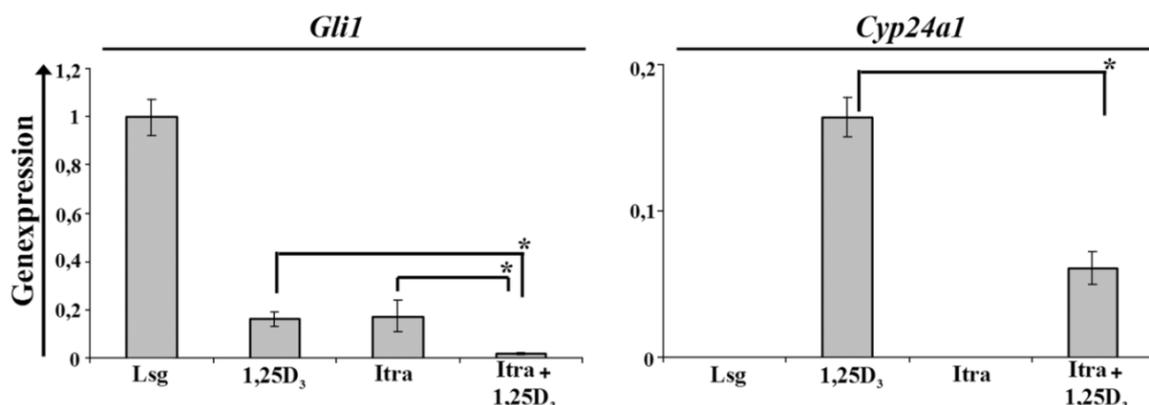
Wie Abbildung 6 zeigt, hemmte Itraconazol die Aktivität des Hh-Signalwegs in *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen. Die Hemmung erfolgte dabei dosisabhängig. Eine komplette Hemmung der *Gli1*-Expression konnte mit den verwendeten Itraconazolkonzentrationen nicht erreicht werden.

Im nächsten Schritt sollte analysiert werden, ob Itraconazol seine Hh-inhibierende Wirkung in *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen auch über die Modulation des 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Metabolismus in *Ptch*-defizienten Zellen entfalten kann.

### 3.1.2.2 Die Wirkung von Itraconazol auf den Abbau von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durch die 24-Hydroxylase

Hierzu wurde zunächst untersucht, ob Itraconazol die Aktivität der 24-Hydroxylase und damit den Abbau von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  hemmt. Sollte dies zutreffen, wäre eine dauerhaft erhöhte zelluläre  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration nach Behandlung mit Itraconazol zu erwarten. Dies sollte wiederum durch positives Feedback zur vermehrten Transkription des  $\text{Vdr}/1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Zielgens *Cyp24a1* führen (vgl. Abbildung 2). Außerdem sollte dann die Kombination von Itraconazol und  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  im Vergleich zu den Einzelsubstanzen eine verstärkte Hemmung des Hh-Signalwegs zur Folge haben. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , Itraconazol und der Kombination beider Substanzen behandelt. Die Fähigkeit der jeweiligen Substanz, den Hh-Signalweg zu hemmen, wurde anhand der *Gli1*-Expression beurteilt. Zusätzlich wurde die *Cyp24a1*-Expression analysiert.

Es wurden je 100.000 *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 24 h in serumfreiem Medium und anschließend für weitere 48 h mit 2  $\mu\text{M}$  Itraconazol, 10 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , beiden Substanzen zusammen und Ethanol/DMSO als Lösungsmittelkontrolle in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurden die *Gli1*- und die *Cyp24a1*- Expression bestimmt.



**Abbildung 7: *Gli1*- und *Cyp24a1*-Expression von *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen nach Inkubation mit 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, Itraconazol oder beiden Substanzen.** Relative Quantifizierung der *Gli1*- und *Cyp24a1*-Expression in *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen nach Behandlung mit Ethanol/DMSO (Lsg), 10 nM 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (1,25D<sub>3</sub>), 2  $\mu$ M Itraconazol (Itra) und der Kombination beider Substanzen (Itra+1,25D<sub>3</sub>). Die *Gli1*-Expressionswerte wurden auf die Lösungsmittelkontrolle relativiert. Die Expressionswerte von *Cyp24a1* sind als normalisierte Werte angegeben. Die signifikant zu den Einzelbehandlungen unterschiedlichen Werte der Kombinationsbehandlung (p < 0,05) wurden mit einem Stern gekennzeichneten Balken markiert.

Wie erwartet, wurde durch die Einzelbehandlungen mit 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und Itraconazol die *Gli1*-Expression signifikant gehemmt. Dies bestätigt bisherige Untersuchungen dieser Arbeit, in denen gezeigt wurde, dass sowohl 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> als auch Itraconazol den Hh-Signalweg in *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen unabhängig voneinander inhibieren (vgl. Abbildung 4 und Abbildung 6). Im Vergleich dazu führte die Kombinationsbehandlung zu einer verstärkten Hemmung der Hh-Signalwegsaktivität.

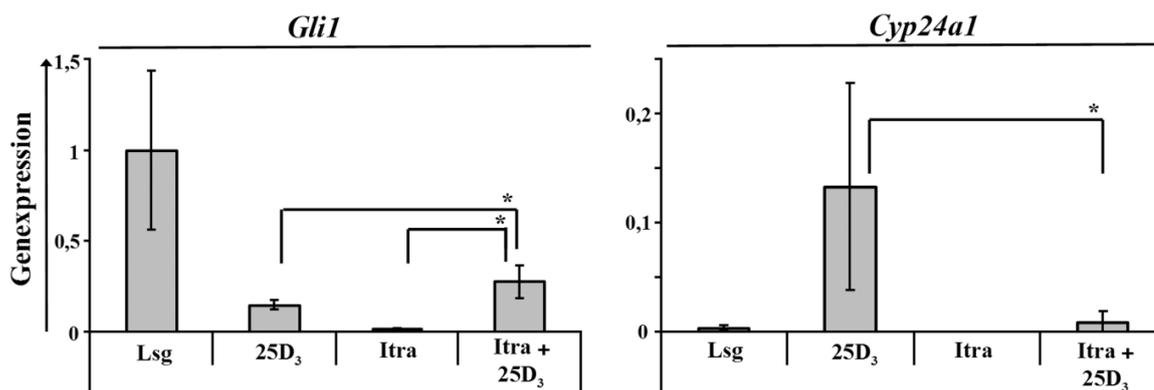
Wie Abbildung 7 weiterhin zeigt, wurde die *Cyp24a1*-Expression durch 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> aktiviert. Durch Itraconazol bzw. Lösungsmittel (Ethanol/DMSO) wurde erwartungsgemäß keine *Cyp24a1*-Expression induziert. Jedoch führte die Kombinationsbehandlung mit 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und Itraconazol im Vergleich zur Einzelbehandlung mit 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> zu einer niedrigeren *Cyp24a1*-Expression. Bei einer effizienten Hemmung der 24-Hydroxylaseaktivität wäre aber durch die langsamere Metabolisierung von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> eine zumindest gleich hohe oder erhöhte *Cyp24a1*-Expression wie nach der Inkubation mit 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> allein zu erwarten gewesen. Die Ergebnisse lassen daher vermuten, dass Itraconazol die Aktivität der 24-Hydroxylaseaktivität nur geringfügig oder gar nicht hemmte. Einen plausiblen Erklärungsansatz für die verminderte Expression von *Cyp24a1* bieten die Ergebnisse damit nicht.

Die signifikant stärkere Hemmung der Hh-Signalwegsaktivität durch die Kombinationsbehandlung im Vergleich zu den Einzelbehandlungen kann anhand der Ergebnisse nicht mit einer Itraconazol-vermittelten, verminderten 24-Hydroxylaseaktivität erklärt werden. Vielmehr kann vermutet werden, dass der kooperative Effekt von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Itraconazol auf die Aktivität des Hh-Signalwegs über 24-Hydroxylase-unabhängige Mechanismen vermittelt wurde.

### 3.1.2.3 Die Wirkung von Itraconazol auf die Synthese von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ durch die $1\alpha$ -Hydroxylase

Daneben bestand auch die Vermutung, dass die  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese durch die  $1\alpha$ -Hydroxylase (Cyp27b1) in *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen durch Itraconazol gehemmt werden könnte (Vanden Bossche et al. 2004; Hansdottir et al. 2008). Wie in Kapitel 3.1.1 anhand der *Cyp24a1*-Expression gezeigt wurde, scheinen *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen in der Lage zu sein,  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aus  $25(\text{OH})\text{D}_3$  zu synthetisieren. Daher kann angenommen werden, dass diese Zellen funktionelles *Cyp27b1* exprimieren. Um die Wirkung von Itraconazol auf die  $1\alpha$ -Hydroxylaseaktivität zu analysieren, wurden *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen mit Itraconazol,  $25(\text{OH})\text{D}_3$  und einer Kombination beider Substanzen behandelt. Wenn die Aktivität der  $1\alpha$ -Hydroxylase durch das Antimykotikum tatsächlich gehemmt wird, sollte es zu einem verminderten Umsatz von  $25(\text{OH})\text{D}_3$  zu  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in den Zellen kommen. Dies würde in einer verminderten Expression des Vdr/ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Zielgens *Cyp24a1* zum Ausdruck kommen. Die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.1 weisen darauf hin, dass nur  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , nicht aber  $25(\text{OH})\text{D}_3$  die Aktivität des Hh-Signalwegs hemmen kann. Das würde erwarten lassen, dass bei einer gehemmten Synthese von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auch die *Gli1*-Expression nach einer Kombinationsbehandlung höher ist als nach einer Einzelbehandlung mit  $25(\text{OH})\text{D}_3$ .

Es wurden 100.000 *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte in serumhaltigem Medium ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 24 h in serumfreiem Medium und anschließend für weitere 48 h in serumfreiem Medium mit DMSO (Lösungsmittel), 50 nM  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , 2  $\mu\text{M}$  Itraconazol und der Kombination beider Substanzen inkubiert. Nach 48 h wurde die RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Die Aktivität des Hh-Signalwegs wurde mittels Expressionsanalyse des Hh-Zielgens *Gli1* analysiert. Daneben wurde die Expression des Vdr/ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Zielgens *Cyp24a1* untersucht.



**Abbildung 8 *Gli*- und *Cyp24a1*- Expression in *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen nach Inkubation mit 50 nM 25(OH)D<sub>3</sub>, Itraconazol und beiden Substanzen zusammen.** Relative Quantifizierung der *Gli1*- und *Cyp24a1*-Expression in *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen nach Behandlung mit Ethanol/DMSO (Lsg), 50 nM 25(OH)D<sub>3</sub> (25D<sub>3</sub>), 2 μM Itraconazol (Itra) und der Kombination beider Substanzen (Itra + 25D<sub>3</sub>). Die zu den Einzelbehandlungen signifikant unterschiedlichen Werte der Kombinationsbehandlung ( $p < 0,05$ ) wurden mit einem Stern gekennzeichneten Balken markiert.

Wie Abbildung 8 zeigt, wurde die Aktivität des Hh-Signalwegs in *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen sowohl durch Itraconazol als auch durch 25(OH)D<sub>3</sub> gehemmt. Auch durch die Kombinationsbehandlung wurde eine Hemmung des Signalwegs erreicht, die jedoch im Vergleich zu den Einzelbehandlungen signifikant geringer ausfiel.

Erwartungsgemäß führte die Behandlung mit 25(OH)D<sub>3</sub> zur Induktion der *Cyp24a1*-Expression. Das bestätigt das Ergebnis vorangegangener Untersuchungen, wonach vermutlich 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in der verwendeten Zelllinie synthetisiert wird (vgl. Kapitel 3.1.1 Abbildung 4). Eine Behandlung mit Itraconazol oder Lösungsmittel hatte dagegen, wie schon in Abbildung 7 gezeigt, keinen Effekt auf die *Cyp24a1*-Expression. Durch die Inkubation mit 25(OH)D<sub>3</sub> und Itraconazol wurde eine, im Vergleich zur 25(OH)D<sub>3</sub>-Einzelbehandlung, schwächere *Cyp24a1*-Expression induziert.

Zusammen betrachtet lassen die schwächere *Cyp24a1*-Expression sowie die höhere Aktivität des Hh-Signalwegs nach der Behandlung mit 25(OH)D<sub>3</sub> in Kombination mit Itraconazol vermuten, dass Itraconazol die Aktivität der 1 $\alpha$ -Hydroxylase hemmt, wodurch die Synthese von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> aus 25(OH)D<sub>3</sub> herabgesetzt wird. Weiterhin ist interessant, dass Itraconazol - neben seiner hemmenden Wirkung auf die 1 $\alpha$ -Hydroxylase - zusätzlich einen inhibierenden Effekt auf die Hh-Signalwegsaktivität zu haben scheint. Diese Beobachtung ist besonders im Zusammenhang mit den Untersuchungen der 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Synthese in RMS Primärkulturen interessant (vgl. Kapitel 3.1.1). In diesen

konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine herabgesetzte  $1\alpha$ -Hydroxylaseaktivität mit einer erhöhten Aktivität des Hh-Signalwegs korreliert (vgl. Abbildung 4). Daher könnten die beiden Untersuchungen darauf hinweisen, dass eine intakte  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese für eine Hemmung der Hh-Signalwegsaktivität ausschlaggebend ist.

Um hierzu eine definitive Aussage treffen zu können, sollten die  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Metabolite ebenfalls mittels HPLC oder massenspektroskopischen Analysen untersucht werden. Daneben wäre ein siRNA-vermittelter Knock-down von *Cyp27b1* in den *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen hilfreich, um zu vergleichen welche Wirkung Itraconazol und  $25(\text{OH})\text{D}_3$  dann in diesen Zellen entfalten.

An dieser Stelle soll zusammengefasst werden, dass die Ergebnisse der Kapitel 3.1.2.2 und 3.1.2.3. darauf hindeuten, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Itraconazol einen kooperativen Effekt auf die Hemmung der Hh-Signalkaskade ausüben. Dieser Effekt macht diese Kombination interessant für weitere *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen. Die verstärkte Wirkung wird vermutlich unabhängig von einer Hemmung der 24-Hydroxylaseaktivität durch Itraconazol vermittelt. Das spricht für die Vermutung von Kim *et al.*, dass Itraconazol über einen anderen Mechanismus, z.B. die Bindung an Smo, auf den Signalweg wirkt (Kim *et al.* 2010).

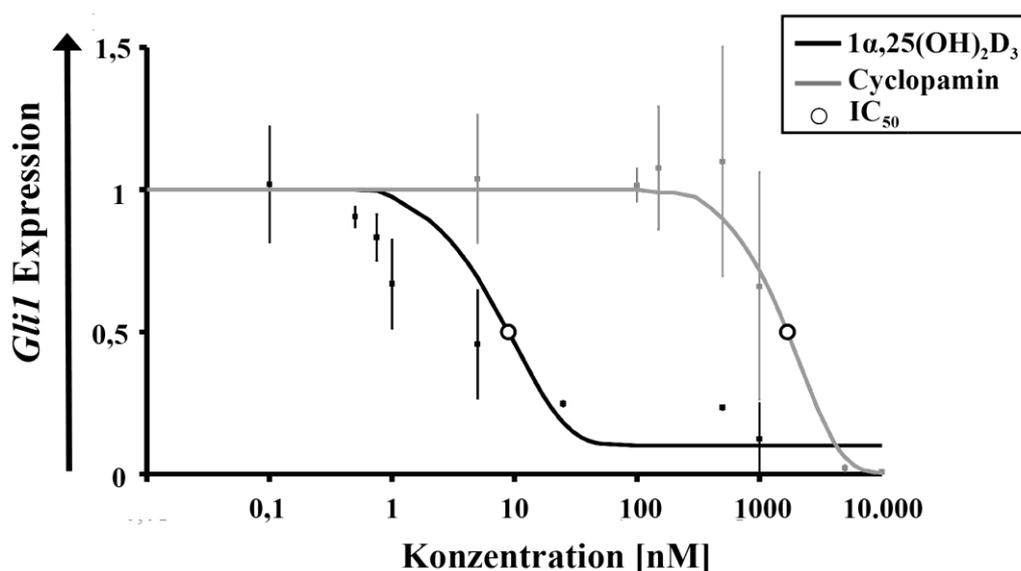
### **3.2 Untersuchungen zum Vergleich von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und Cyclopamin in der Hemmung des Hh-Signalwegs**

Der genaue Mechanismus, durch den  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die Aktivität des Hh-Signalwegs hemmt, ist bisher nicht bekannt. Es kann aber vermutet werden, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ähnlich wie Cyclopamin an Smo bindet und damit inaktiviert. Erste Hinweise auf einen solchen Wirkmechanismus wurden von Bijlsma *et al.* für Vitamin  $\text{D}_3$  publiziert (Bijlsma *et al.* 2006). In dem folgenden Teil der Arbeit wurde versucht, die Effizienz und den Wirkmechanismus von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  der Hh-Signalwegshemmung näher zu beleuchten. Hierzu wurde zunächst die *Ptch*-defiziente Zelllinie *Ptch*<sup>-/-</sup> mit ansteigenden  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ - und Cyclopaminkonzentrationen behandelt. Die Wirkung beider Substanzen auf den Hh-Signalweg wurde miteinander verglichen. An dieser Zelllinie wurde auch untersucht, ob die Substanzen bei der Hemmung des Hh-Signalwegs miteinander kooperieren. Zusätzlich wurde das Proliferationsverhalten von *Vdr*-, *Ptch*-, *Smo*- und *Sufu*-defizienten Zelllinien nach Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Cyclopamin untersucht. *Smo*-defiziente Zellen wurden eingesetzt, um zu untersuchen, ob  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

den Hh-Signalweg tatsächlich wie Cyclopamin auf der Ebene von Smo hemmt. Zusätzlich wurden *Sufu*-defiziente Zellen eingesetzt. In diesen ist eine Hemmung der Hh-Signalkaskade durch Cyclopamin nicht möglich, da die Kaskade unterhalb von Smo aktiviert ist (Svard *et al.* 2006). Weiterhin wurde an *Vdr*-defizienten Zellen analysiert, ob der Vdr-Signalweg an der inhibitorischen Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf den Hh-Signalweg beteiligt ist.

### 3.2.1 Die Wirkeffizienz von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und Cyclopamin in der Hemmung des Hh-Signalwegs

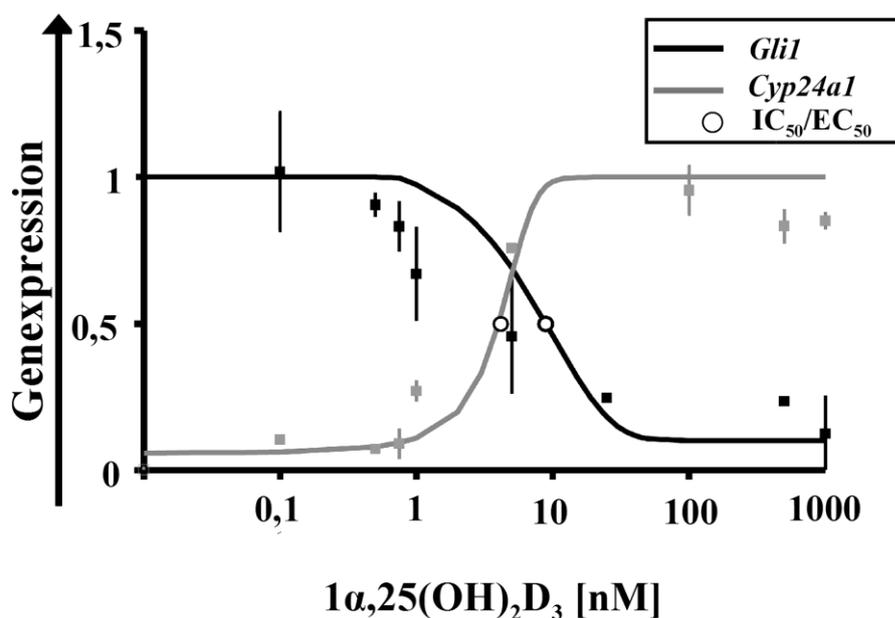
Um die Wirkeffizienz von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  mit der von Cyclopamin zu vergleichen, wurden *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen beider Substanzen behandelt. Dazu wurden 100.000 Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte gesät und über Nacht in serumhaltigem Medium inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in aufsteigenden Konzentrationen (0,1 nM, 0,5 nM, 0,75 nM, 1 nM, 5 nM, 25 nM, 500 nM und 1  $\mu\text{M}$ ) bzw. Cyclopamin in aufsteigenden Konzentrationen (5 nM, 100 nM, 150 nM, 500 nM, 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ) für 48 h in serumreduziertem Medium (2 % FCS, 1 % PS) inkubiert. Die RNA wurde isoliert und cDNA synthetisiert. Die Aktivität des Hh-Signalwegs wurde anhand der *Gli1*-Expression mittels qRT-PCR bestimmt. In Abbildung 9 ist die *Gli1*-Expression von *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen nach Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  bzw. Cyclopamin vergleichend dargestellt.



**Abbildung 9: Hh-Signalwegsaktivität in *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Cyclopamin.** Relative Quantifizierung der *Gli1*-Expression in *Ptch*<sup>-/-</sup> Fibroblasten nach Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (schwarze Kurve) und Cyclopamin (graue Kurve) zur Bestimmung der Aktivität des Hh-Signalwegs. Die Werte wurden auf die Lösungsmittelkontrolle (Ethanol) relativiert. Die halbmaximale inhibitorische Konzentration (half maximal inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ ) der beiden Substanzen ( $\text{IC}_{50}\text{Cyclopamin} \sim 1,7 \mu\text{M}$ ;  $\text{IC}_{50}1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3 \sim 9 \text{ nM}$ ) sind als weißer Punkt auf der jeweiligen Kurve markiert.

Die Daten zeigen, dass mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  schon bei einer Konzentration von 9 nM eine 50%ige Inhibition der Signalwegsaktivität erreicht wurde ( $\text{IC}_{50} \sim 9 \text{ nM}$ ), wohingegen mit Cyclopamin derselbe Effekt erst bei einer Konzentration von 1,7  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50} \sim 1,7 \mu\text{M}$ ) zu erkennen war. Interessanterweise wurde jedoch der Hh-Signalweg durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  im Gegensatz zu Cyclopamin selbst bei hohen Konzentrationen nicht vollständig gehemmt.

Um die Aktivierung des Vdr-Signalwegs durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zu beurteilen, wurde zusätzlich die Expression des Vdr-Zielgens *Cyp24a1* in den mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen quantifiziert. In Abbildung 10 sind die Expressionslevel von *Gli1* und *Cyp24a1* bei ansteigenden Konzentrationen von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (0,1 nM, 0,5 nM, 0,75 nM, 1 nM, 5 nM, 25 nM, 500 nM und 1  $\mu\text{M}$ ) dargestellt.



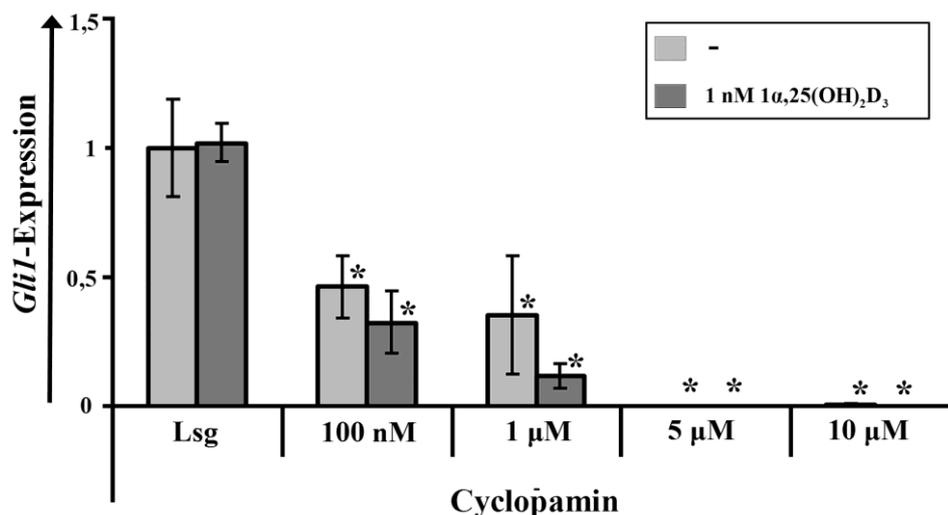
**Abbildung 10:** Expression des Vdr-Zielgens *Cyp24a1* (graue Kurve) und des Hh-Zielgens *Gli1* (schwarze Kurve) nach Behandlung von *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen mit ansteigenden Konzentrationen von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Die weißen Markierungen zeigen die  $\text{IC}_{50}$  der *Gli1*-Expression ( $\text{IC}_{50} \sim 9 \text{ nM}$ ) bzw. halbmaximale effektive Konzentration (half maximal effective concentration,  $\text{EC}_{50}$ ) der *Cyp24a1*-Expression ( $\text{EC}_{50} \sim 4,2 \text{ nM}$ ). Die *Gli1*-Expressionswerte entsprechen den für Abbildung 9 verwendeten Daten.

Der Vdr-Signalweg wurde durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  bei einer Konzentration von 4 nM halbmaximal aktiviert ( $\text{EC}_{50} \sim 4 \text{ nM}$ ) während eine halbmaximale Hemmung des Hh-Signalwegs bei 9 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ( $\text{IC}_{50} \sim 9 \text{ nM}$ ) erreicht wurde. Der Anstieg der *Cyp24a1*-Expression und die Hemmung der *Gli1*-Expression erfolgten etwa im gleichen Konzentrationsbereich (zwischen 1 und 10 nM). Dies könnte dafür sprechen, dass sich beide Signalwege in ihrer Aktivität gegenseitig beeinflussen. So könnte z.B. eine erhöhte Vdr-Signalwegsaktivität zu einer verstärkten Hemmung des Hh-Signalwegs führen.

### 3.2.2 Das Zusammenwirken von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und Cyclopamin in der Hemmung der Hh-Signalkaskade

Vermutlich bindet Vitamin  $\text{D}_3$  wie auch Cyclopamin an Smo und inaktiviert es (Bijlsma *et al.* 2006). Daher sollte das Zusammenwirken von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Cyclopamin hinsichtlich der Hemmung des Hh-Signalwegs untersucht werden. Dafür wurden *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen mit mit ansteigenden Konzentrationen  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder Cyclopamin behandelt und zusätzlich mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1nM) oder Cyclopamin (750 nM) inkubiert.

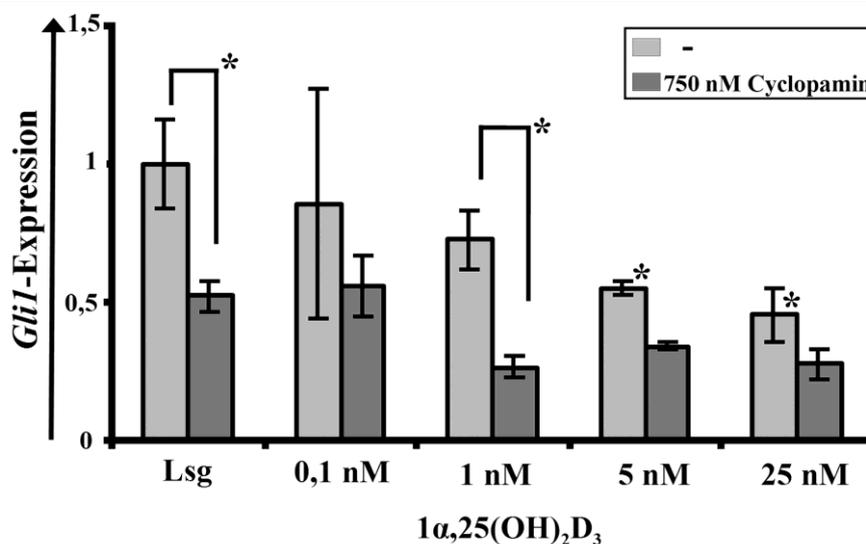
Zunächst wurden *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen mit 1 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und ansteigenden Konzentrationen Cyclopamin (100 nM, 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Die  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  -Konzentration von 1 nM wurde deshalb gewählt, weil sie die *Gli1*-Expression merklich, aber um weniger als 50 % inhibiert (vgl. Abbildung 9). Hierdurch sollte ein potentieller kooperativer Einfluss von Cyclopamin auf den Hh-Signalweg gut beurteilbar sein. Das Experiment wurde unter den gleichen Bedingungen, wie die Experimente in Kapitel 3.2.1 durchgeführt. Anschließend wurde die Aktivität des Hh-Signalwegs mittels Quantifizierung der *Gli1*-Expression bestimmt.



**Abbildung 11: *Gli1*-Expression in *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen nach Behandlung mit aufsteigenden Cyclopaminkonzentrationen mit oder ohne Zugabe von 1 nM 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.** Relative Quantifizierung der *Gli1*-Expression zur Bestimmung der Aktivität des Hh-Signalwegs in *Ptch*<sup>-/-</sup> Fibroblasten nach Behandlung mit Cyclopamin (hellgraue Balken) bzw. mit zusätzlich 1 nM 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (dunkelgraue Balken). Zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle (Lsg) signifikante Werte ( $p < 0,05$ ) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Abbildung 11 zeigt die Daten der durchgeführten *Gli1*-Expressionsanalysen. Durch die Inkubation mit 1 nM 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> konnte, verglichen mit der Inkubation mit Lösungsmittel (Ethanol), keine stärkere Hemmung des Hh-Signalwegs erreicht werden. Alle anderen eingesetzten Konzentrationen hemmten den Hh-Signalweg im Vergleich zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle signifikant stärker. Durch eine Kombinationsbehandlung mit 1 nM 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> wurde bei einer Konzentration von 100 nM und 1 µM Cyclopamin der Hh-Signalweg zwar stärker gehemmt als durch dessen alleinige Gabe, allerdings war dieser Effekt nicht signifikant. Ab einer Konzentration von 5 µM Cyclopamin wurde die *Gli1*-Expression sowohl von Cyclopamin einzeln als auch mit zusätzlich 1 nM 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vollständig gehemmt.

Zudem wurden *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen mit ansteigenden Konzentrationen 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> einzeln (0,1 nM, 1 nM, 5 nM, 25 nM) bzw. zusätzlich mit 750 nM Cyclopamin behandelt. Durch diese Konzentration wurde etwa die gleiche Hemmung des Hh-Signalwegs wie durch 1 nM 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in der vorhergehenden Untersuchung erwartet (vgl. Abbildung 9). Abbildung 12 zeigt die *Gli1*-Expressionswerte der Untersuchung.



**Abbildung 12** *Gli1*-Expression in *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen nach Behandlung mit aufsteigenden  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentrationen allein und in Kombination mit 750 nM Cyclopamin. Relative Quantifizierung der *Gli1*-Expression nach Behandlung von *Ptch*<sup>-/-</sup> Fibroblasten mit verschiedenen Konzentrationen  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ohne und mit je 750 nM Cyclopamin. Zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle (Lsg) signifikante Proben wurden mit einem Stern direkt am Balken gekennzeichnet. Waren die mit zusätzlich 750 nM Cyclopamin behandelten Proben gegenüber den mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  einzeln behandelten Proben signifikant ( $p < 0,05$ ), so ist dies mit einem Stern an einer Verbindungslinie überhalb der Balken gekennzeichnet.

Die Daten in Abbildung 12 zeigen zunächst, dass die Hemmung des Hh-Signalwegs durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , wie schon in Abbildung 9 gezeigt wurde, dosisabhängig erfolgte. Bei allen verwendeten  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentrationen konnte der Hh-Signalweg durch die zusätzliche Inkubation mit 750 nM Cyclopamin stärker inhibiert werden als durch eine  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Einzelbehandlung. Die Ergebnisse waren aber lediglich für die Lösungsmittelkontrolle und einer Konzentrationen von 1 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  signifikant.

Zusammen betrachtet lassen die Ergebnisse vermuten, dass Cyclopamin und  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  - bei den verwendeten Konzentrationen - hinsichtlich der Hemmung des Hh-Signalwegs kooperieren können. Daher könnten die Substanzen unterschiedliche Wirkorte haben. So könnten beide Stoffe z.B. an unterschiedliche Regionen von Smo binden. Um eine genaue Aussage dazu treffen zu können, ist aber eine Analyse mittels BODIPY(Boron-Dipyrrromethene)-markierten Substanzen und anschließenden Bindungsassays notwendig. Dabei könnten die *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen mit BODIPY-Cyclopamin und zusätzlich Cyclopamin bzw.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inkubiert werden. Wenn  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder Cyclopamin an der gleichen Stelle wie BODIPY-Cyclopamin binden, würde dessen Fluoreszenzintensität reduziert werden (Chen, J K *et al.* 2002a; Dwyer *et al.* 2007).

### 3.2.3 Die Wirkung von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und Cyclopamin auf die BrdU-Inkorporation in $Vdr^{-/-}$ , $Ptch^{-/-}$ , $Smo^{-/-}$ und $Sufu^{-/-}$ Zelllinien

Im nächsten Abschnitt sollte untersucht werden, ob Cyclopamin und  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  unterschiedlich starke Wirkungen über den Hh- und Vdr-Signalweg auf die BrdU-Inkorporation vermitteln. Dafür wurden unterschiedliche Zelllinien genutzt, die entweder eine Vdr-Defizienz oder eine Defizienz für unterschiedliche Komponenten des Hh-Signalwegs (*Ptch*, *Smo* und *Sufu*) aufweisen.

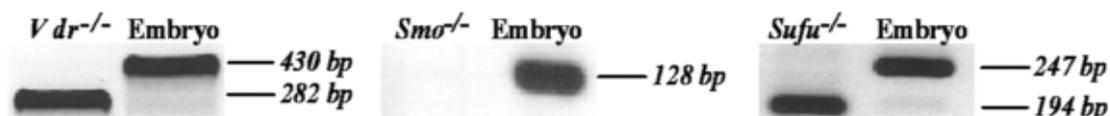
Vor der Behandlung mit Cyclopamin und  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wurde der Genotyp der verwendeten  $Vdr^{-/-}$ ,  $Smo^{-/-}$  und  $Sufu^{-/-}$  Zelllinien verifiziert. Dazu wurde an cDNA ( $Vdr^{-/-}$  und  $Smo^{-/-}$ ) bzw. an genomischer DNA ( $Sufu^{-/-}$ ) mittels PCR untersucht, ob die entsprechenden Gene exprimiert werden bzw. die Gene tatsächlich mutiert vorliegen. Die Durchführung der PCRs zur Verifizierung der Zellidentitäten ist im Teil Material und Methoden (Kapitel 2.13.4.1) beschrieben.

Die  $Vdr^{-/-}$  Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Yan Chun Li, Universität Chicago, USA zur Verfügung gestellt. Sie wurden aus  $Vdr^{-/-}$  Embryonen isoliert, in deren *Vdr*-Gen das Exon 3 durch eine Neomycinrestistenzkassette ausgetauscht worden war (Sun *et al.* 2006). Um in den  $Vdr^{-/-}$  Zellen die Expression des mutanten *Vdr*-Transkriptes nachzuweisen, wurde RNA aus den Zellen isoliert und cDNA synthetisiert. Anschließend wurden mit den DNA-Oligonukleotiden Vdr E2-F und Vdr E5-R, welche in Exon 2 bzw. Exon 5 des *Vdr*-Transkriptes binden, mittels PCR an cDNA wt bzw. mutante *Vdr*-Transkripte nachgewiesen (vgl. Tabelle 2 und Kapitel 2.13.4.1). Durch die Deletion von Exon 3 in den mutanten *Vdr*-Transkripten wird mit den verwendeten DNA-Oligonukleotiden ein Fragment von 282 bp amplifiziert (siehe Abbildung 13;  $Vdr^{-/-}$ ). An cDNA von wt *Vdr* Zellen dagegen wird ein Fragment von 430 bp amplifiziert (siehe Abbildung 13; Embryo).

Die  $Smo^{-/-}$  Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Jussi Taipale, National Public Health Institute, Helsinki, Finnland zu Verfügung gestellt. Die Generierung dieser Zellen aus  $Smo^{flox/flox}$  Embryonen und anschließender Cre-Rekombinase-Transfektion ist in Varjosalo *et al.* beschrieben (Varjosalo *et al.* 2006). In  $Smo^{-/-}$  Zellen ist Exon 1 inklusive des Startcodons deletiert. Der Verlust des Exon 1 wurde, wie bei Varjosalo *et al.* beschrieben, mit den DNA-Oligonukleotiden Smo-Geno-F und Smo-Geno-R nachgewiesen (Varjosalo *et al.* 2006). Bei Amplifikation von wt *Smo* cDNA wird ein 128 bp großes DNA-Fragment synthetisiert (vgl. Abbildung 13; Embryo). Da die DNA-Oligonukleotide in Exon 1 des

*Smo*-Gens/-Transkripts binden, wird bei Amplifikation von *Smo*<sup>-/-</sup> cDNA kein Fragment synthetisiert (Abbildung 13; *Smo*<sup>-/-</sup>).

Die *Sufu*<sup>-/-</sup> Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Stephan Teglund, Karolinska Institut, Stockholm, Schweden, zur Verfügung gestellt. Diese Zellen wurden aus *Sufu*<sup>-/-</sup> Embryonen, in denen Exon 1 des *Sufu*-Gens durch eine Neomycinresistenzkassette ausgetauscht wurde, isoliert. Durch Amplifikation mit den DNA-Oligonukleotiden F21, R6 und Neo F2 an genomischer DNA kann ein wt *Sufu* Fragment (247 bp, Embryo) von einem mutanten *Sufu* Fragment (194 bp; *Sufu*<sup>-/-</sup>) unterschieden werden (Svard *et al.* 2006). Abbildung 13 zeigt die Agarose-Gelelektrophorese der PCR Produkte. Als Kontrolle wurde cDNA bzw. DNA von wt Mausembryonen eingesetzt.



**Abbildung 13 Gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Amplifikate von *Vdr*<sup>-/-</sup>, *Sufu*<sup>-/-</sup> und *Smo*<sup>-/-</sup> Zellen.**

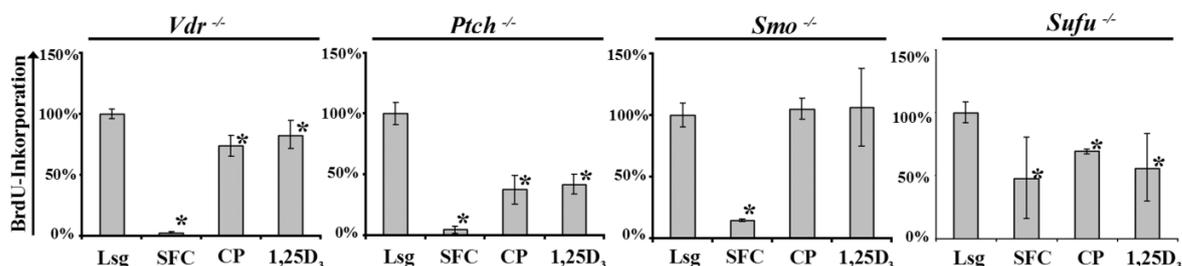
Als Kontrolle diente embryonale RNA bzw. embryonale genomische DNA (E12.5) von wt Mäusen. Die *Vdr*-Transkripte (Fragmentlänge wt 430 bp, mutant 282 bp) wurden mittels der DNA-Oligonukleotide *Vdr* E2-F und *Vdr* E5-R amplifiziert. Wt *Smo*-Transkripte wurden durch die DNA-Oligonukleotide *Smo*-Geno-F und *Smo*-Geno-R nachgewiesen (128 bp). Bei Deletion des Exon 1 in *Smo*<sup>-/-</sup> Zellen wird dieses Amplifikat nicht mehr amplifiziert. Zur Amplifikation des mutanten (194 bp) bzw. wt (247 bp) *Sufu*-Gens dienten die DNA-Oligonukleotide F21, R6 und Neo F2.

Nun wurde die Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Cyclopamin auf die BrdU-Inkorporation untersucht. Die Untersuchungen wurden wie im Teil Material und Methoden beschrieben durchgeführt (vgl. Kapitel 2.15.4.1). Unterschiede in der BrdU-Inkorporationsrate der Zelllinien nach Inkubation mit Cyclopamin und  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sollten Hinweise darauf liefern, welche antiproliferativen Kapazitäten die beiden Substanzen besitzen.

BrdU ist ein Thymidinanalogon, das während der DNA-Synthese in die DNA eingebaut wird. DNA-Synthese findet vornehmlich in der S-Phase des Zellzyklus, bevor die Zelle sich teilt, statt. Daher wird die BrdU-Inkorporation als Indikator für das Proliferationsverhalten von Zellen genutzt. Aber auch unabhängig von Zellteilungen findet in Zellen DNA-Synthese statt, bspw. während der DNA-Reparatur (Duque und Rakic 2011). Dies kann ebenfalls zu einer erhöhten BrdU-Inkorporation führen. Apoptotische sowie abgestorbene Zellen können andererseits eine niedrigere BrdU-Inkorporation zur

Folge haben, da in ihnen keine DNA-Synthese mehr stattfindet, in den Analysen jedoch die absolute Zellzahl nicht berücksichtigt wird. Ein zytotoxischer Effekt durch die hier verwendeten Substanzen  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Cyclopamin, der zu einer erhöhten Apoptoserate und damit zu verfälschten BrdU-Messwerten führt, ist unwahrscheinlich. Das zeigten von anderen Mitarbeitern der AG Hahn durchgeführte Analysen der Apoptosemarker Caspase3/7 an RMS Zellen, nachdem diese mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Cyclopamin inkubiert wurden (Uhmann *et al.* 2012). Daher kann für die Untersuchungen dieser Arbeit die BrdU-Inkorporation als Ausdruck der Zellproliferation angesehen werden.

Für die BrdU-Inkorporationsuntersuchungen wurden 4.000 Zellen pro Loch einer 96-Loch-Platte in serumhaltigem Medium ausgesät und am nächsten Tag für weitere 48 h in serumreduzierten Medium mit 10 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , 5  $\mu\text{M}$  Cyclopamin, Ethanol (Lösungsmittelkontrolle) oder serumfreiem Medium (Positivkontrolle) inkubiert. Die Zugabe von BrdU erfolgte 22 Stunden vor der Analyse der Zellen, die in Kapitel 2.15.4.1 beschrieben ist.



**Abbildung 14: BrdU-Inkorporation verschiedener Zelllinien nach Inkubation mit Cyclopamin und  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Relative BrdU-Inkorporation in *Vdr*<sup>-/-</sup>, *Ptch*<sup>-/-</sup>, *Smo*<sup>-/-</sup> und *Sufu*<sup>-/-</sup> Zellen nach Inkubation mit Ethanol (Lsg; Lösungsmittelkontrolle), serumfreiem Medium (SFC, Kontrolle für Proliferationshemmung), 5  $\mu\text{M}$  Cyclopamin (CP) und 10 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D<sub>3</sub>) über 48 h. Die gemessenen Werte wurden auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle relativiert, nachdem diese mit 100 % benannt wurde. Die Signifikanz von  $p < 0,05$  gegenüber der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle ist mit einem Stern markiert.

Wie Abbildung 14 zeigt, wurde die BrdU-Inkorporation in *Vdr*-defizienten *Vdr*<sup>-/-</sup> und *Vdr*-exprimierenden *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen sowohl von Cyclopamin als auch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  gehemmt. Die BrdU-Inkorporation der *Vdr*<sup>-/-</sup> Zellen wurde durch beide Substanzen jedoch nur um etwa 20 % vermindert. Da der *Vdr*-Signalweg bei der Regulation des Proliferationsverhaltens in *Vdr*<sup>-/-</sup> Zellen keine Rolle spielen kann, muss die nach Inkubation mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  verminderte BrdU-Inkorporation dieser Zelllinie durch andere

Signalwege oder Mechanismen wie z.B. Toxizität vermittelt worden sein. Auch in den *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen wurde die BrdU-Inkorporation durch Cyclopamin etwa genauso stark vermindert wie durch 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (etwa 60 %). Da in sowohl in den *Vdr*<sup>-/-</sup> Zellen als auch in den *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen durch beide Substanzen der gleiche proliferationshemmende Effekt erreicht wurde, kann keine gezielte Aussage über den Anteil der beiden Signalwege an der Regulation der Zellproliferation getroffen werden.

Die BrdU-Inkorporation der *Smo*<sup>-/-</sup> Zellen dagegen wurde weder durch Cyclopamin noch durch 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> beeinflusst. Der Smo-Inhibitor Cyclopamin kann in diesen Zellen nicht binden und daher den Hh-Signalweg und dessen proliferationsfördernden Wirkungen nicht hemmen (Varjosalo *et al.* 2006). Deswegen bekräftigt das Ergebnis die Vermutung, dass auch 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, ähnlich wie Cyclopamin, durch die Bindung an Smo wirkt (vgl. auch Abbildung 15).

Die Werte der BrdU-Inkorporation der *Sufu*<sup>-/-</sup> Zellen waren überraschend. Da Sufu im Hh-Signalweg unterhalb von Smo agiert, wäre zu erwarten gewesen, dass eine Proliferationshemmung durch Smo-Antagonisten, wie Cyclopamin, nicht vermittelt werden kann (Svard *et al.* 2006). Die BrdU-Inkorporation dieser Zellen wurde aber durch Cyclopamin effizient gehemmt. Das lässt vermuten, dass Cyclopamin entweder die BrdU-Inkorporation von *Sufu*<sup>-/-</sup> Zellen unabhängig vom Hh-Signalweg beeinflusst oder entgegen den Erwartungen durch zytotoxische Effekte zu einem Absterben dieser Zelllinie geführt hat. Dieser Cyclopamin-vermittelte Effekt ist jedoch spezifisch für *Sufu*<sup>-/-</sup> Zellen, da er in *Smo*<sup>-/-</sup> Zellen nicht zum Tragen kommt.

Da die Unterschiede der Wirkung von Cyclopamin und 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auf die BrdU-Inkorporation in den untersuchten Zelllinien zum Teil widersprüchlich sind und wahrscheinlich weitere Signalwege oder Mechanismen beteiligt sind, lassen die oben gezeigten Daten keine gerichtete Aussage über den Anteil des Hh- und des Vdr-Signalwegs an der Hemmung der Zellproliferation zu. Jedoch zeigen die Analysen, dass eine Proliferationshemmung durch beide Signalwege vermittelt werden kann.

#### **3.2.4 Wirkung von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auf die Aktivität des Hh- und des Vdr-Signalwegs in *Ptch*<sup>-/-</sup>, *Smo*<sup>-/-</sup>, *Sufu*<sup>-/-</sup> und *Vdr*<sup>-/-</sup> Zellen**

Um weiteren Aufschluss über die Wirkweise von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> zu erhalten, wurde zusätzlich dessen Wirkung auf die Aktivität des Vdr- und Hh-Signalwegs im Vergleich zu Cyclopamin an den oben genannten Zelllinien untersucht.

*Smo*<sup>-/-</sup> Zellen besitzen nur eine basale Aktivität des Hh-Signalwegs, da kein funktionales Smo-Protein in diesen Zellen exprimiert wird. Aufgrund des Fehlens von Smo kann Cyclopamin nicht binden und die basale Aktivität des Hh-Signalwegs in den Zellen nicht weiter hemmen (Varjosalo *et al.* 2006). Sollte der Wirkmechanismus bzw. -ort von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> demjenigen von Cyclopamin gleichen, sollte auch 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> keinen hemmenden Einfluss auf den Hh-Signalweg in diesen Zellen ausüben können.

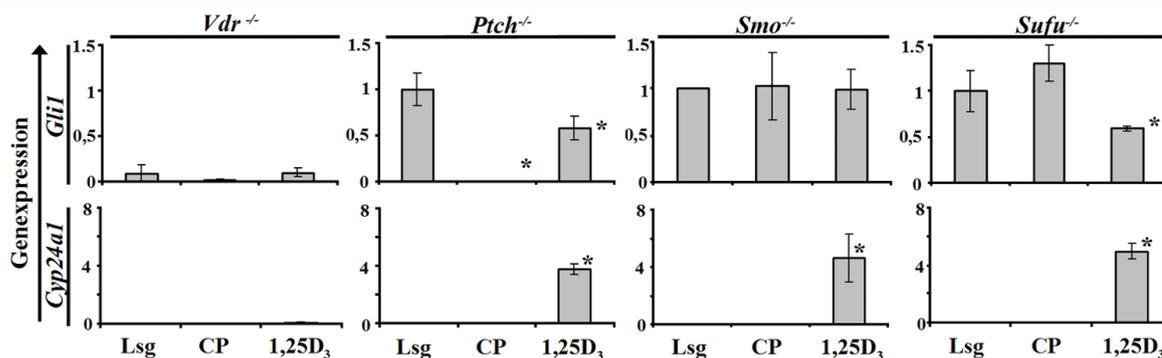
Der Einfluss von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und Cyclopamin auf die Aktivität der Hh-Signalkaskade wurde auch in *Sufu*-defizienten (*Sufu*<sup>-/-</sup>) Zellen untersucht. Das Tumorsuppressorgen *Sufu* hemmt normalerweise die Aktivität des Gli-Komplexes, sodass der Hh-Signalweg in *Sufu*<sup>-/-</sup> Zellen aktiv ist, was sich in einer starken Expression von *Gli1* widerspiegelt. *Sufu* reprimiert den Hh-Signalweg normalerweise unterhalb von Smo. Daher kann der Hh-Signalweg in den *Sufu*<sup>-/-</sup> Zellen nicht durch Smo-Inhibitoren wie bspw. Cyclopamin inhibiert werden (Svard *et al.* 2006). Sollte auch 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auf der Ebene von Smo auf die Hh-Signalkaskade wirken, sollte es in *Sufu*-defizienten Zellen keine Hemmung der Hh-Signalkaskade bewirken.

Zusätzlich wurden auch *Vdr*-defiziente (*Vdr*<sup>-/-</sup>) Zellen verwendet. Mit diesen sollte eine mögliche Beteiligung der *Vdr*/1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Achse an der Hemmung des Hh-Signalwegs untersucht werden.

Als Kontrolle wurden *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen eingesetzt, in denen Smo konstitutiv aktiv vorliegt, und in denen sich die Hh-Signalkaskade durch 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, wie schon mehrmals gezeigt, stark hemmen lässt (vgl. Abbildung 4, Abbildung 7, Abbildung 9 und Abbildung 10).

Um zu untersuchen, ob der Hh-Signalweg in den Zelllinien durch Kultivierung mit 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> gehemmt wird, wurden 100.000 Zellen je Zelllinie (*Ptch*<sup>-/-</sup>, *Vdr*<sup>-/-</sup>; *Smo*<sup>-/-</sup>; *Sufu*<sup>-/-</sup>) pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät und über Nacht in serumhaltigem Medium inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 48 h in serumreduziertem Medium (2 % FCS) mit 5  $\mu$ M Cyclopamin (Kontrolle zur Hemmung des Hh-Signalwegs), 10 nM 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> oder Ethanol (Lösungsmittelkontrolle) behandelt und im Anschluss die RNA isoliert und cDNA synthetisiert.

In Abbildung 15 ist die Expression von *Gli1* und *Cyp24a1* in den verschiedenen Zelllinien dargestellt.



**Abbildung 15: Quantifizierung der *Gli1*- und *Cyp24a1*-Expression in verschiedenen Zelllinien nach Inkubation mit dem Smo-Antagonisten Cyclopamin und  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Relative Quantifizierung der *Gli1*- und der *Cyp24a1*-Expression zur Bestimmung der Aktivität des Hh- und des Vdr-Signalwegs in *Vdr*<sup>-/-</sup>, *Ptch*<sup>-/-</sup>, *Smo*<sup>-/-</sup> und *Sufu*<sup>-/-</sup> Zellen nach Behandlung mit Lösungsmittel (Lsg), 5  $\mu\text{M}$  Cyclopamin (CP) oder 10 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25 D<sub>3</sub>). Die Werte der *Gli1*-Expression der *Ptch*<sup>-/-</sup>, *Smo*<sup>-/-</sup> und *Sufu*<sup>-/-</sup> Zellen wurden auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle relativiert. Die *Gli1*-Expressionswerte der *Vdr*<sup>-/-</sup> Zellen wurden aufgrund sehr geringer Werte der Lösungsmittelkontrolle nicht relativiert. Die Werte der *Cyp24a1*-Expression sind in normalisierten Werten angegeben. Gegenüber der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle signifikante Werte ( $p < 0,05$ ) wurde mit einem Stern markiert.

In den *Ptch*<sup>-/-</sup> Kontrollzellen wurde, wie schon mehrmals gezeigt, sowohl durch Cyclopamin als auch durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  eine effektive Hemmung des Hh-Signalwegs ausgelöst. Dies zeigt, dass beide Substanzen im Hh-Signalweg unterhalb von *Ptch* agieren. In den *Smo*<sup>-/-</sup> Zellen wurde die basale *Gli1*-Expression durch den Smo-Inhibitor Cyclopamin erwartungsgemäß nicht gehemmt. Auch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  hatte in diesen Zellen keine hemmende Wirkung auf die *Gli1*-Expression. Dies könnte dafür sprechen, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  den Hh-Signalweg wie auch Cyclopamin auf dem Level von Smo hemmt.

Erwartungsgemäß hatte Cyclopamin auch in *Sufu*<sup>-/-</sup> Zellen keinen Einfluss auf die *Gli1*-Expression. Interessanterweise wurde jedoch durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die Hh-Signalkaskade in *Sufu*<sup>-/-</sup> Zellen gehemmt. Auch die Proliferation der Zelllinie wurde durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  gehemmt (vgl. Abbildung 14). Dies könnte bedeuten, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die *Gli1*-Expression sowie die Zellproliferation über einen Signalweg reguliert, der von der kanonischen Hh-Signalkaskade abweicht.

In *Vdr*<sup>-/-</sup> Zellen ist der Hh-Signalweg nur sehr schwach aktiviert, so dass keine gerichtete Aussage über eine Hemmung der Hh-Signalwegsaktivität durch die verwendeten Substanzen getroffen werden kann.

Zusätzlich wurde die Aktivierung der Vdr-Signalkaskade anhand der *Cyp24a1*-Expression untersucht. Diese wurde durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in den Zelllinien *Ptch*<sup>-/-</sup>, *Smo*<sup>-/-</sup> und *Sufu*<sup>-/-</sup> aktiviert. In den *Vdr*<sup>-/-</sup> Zellen blieb die Aktivierung der *Cyp24a1*-Expression durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  erwartungsgemäß aus. Letzteres spricht für eine komplette *Vdr*-Defizienz in diesen Zellen. Neue Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Vdr-Signalwegs und der Hemmung des Hh-Signalwegs in den untersuchten Zelllinien lässt sich aus den Ergebnissen nicht ableiten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  den Hh-Signalweg unterhalb von Ptch, möglicherweise durch Bindung an Smo, blockiert. Weiterhin lassen sie vermuten, dass die Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zusätzlich über einen nicht-kanonischen Hh-Signalweg, welcher Sufu-unabhängig ist, vermittelt wird.

### 3.3 Analysen zur Gli-Abhängigkeit der Vdr-Expression

Vorarbeiten von Dr. A. Uhmann (AG Hahn) führten zu der Annahme, dass die *Vdr*-Expression durch den Hh-Signalweg negativ reguliert werden könnte. So wiesen die Untersuchungen darauf hin, dass die *Vdr*-Expression durch eine Überexpression von *Gli1* und der gleichzeitigen Überexpression von *Gli1* und *Gli2* in wt *Ptch* Fibroblastenzelllinien reprimiert wird. Im folgenden Teil dieser Arbeit sollte dies mit Hilfe von *Gli* Knock-out Zellen verifiziert werden.

Hierzu wurden *Gli1*<sup>-/-</sup>, *Gli1*<sup>-/-</sup>*Gli2*<sup>-/-</sup>, *Gli2*<sup>-/-</sup>*Gli3*<sup>-/-</sup> Fibroblasten, die freundlicherweise von M. Bijlsma, Universität Berkeley, USA, zur Verfügung gestellt wurden, eingesetzt. Für das Experiment wurden die Zelllinien mit dem jeweils fehlenden *Gli*-Faktor (*pGli1*, *pGli2* bzw. *pGli3*) bzw. mit der Kombination mehrerer *Gli*-Faktoren transfiziert. Anschließend wurden die Expressionniveaus der *Gli*-Faktoren und der *Vdr*-Expression mittels qRT-PCR bestimmt. Als Kontrolle dienten wt *Ptch* Fibroblasten.

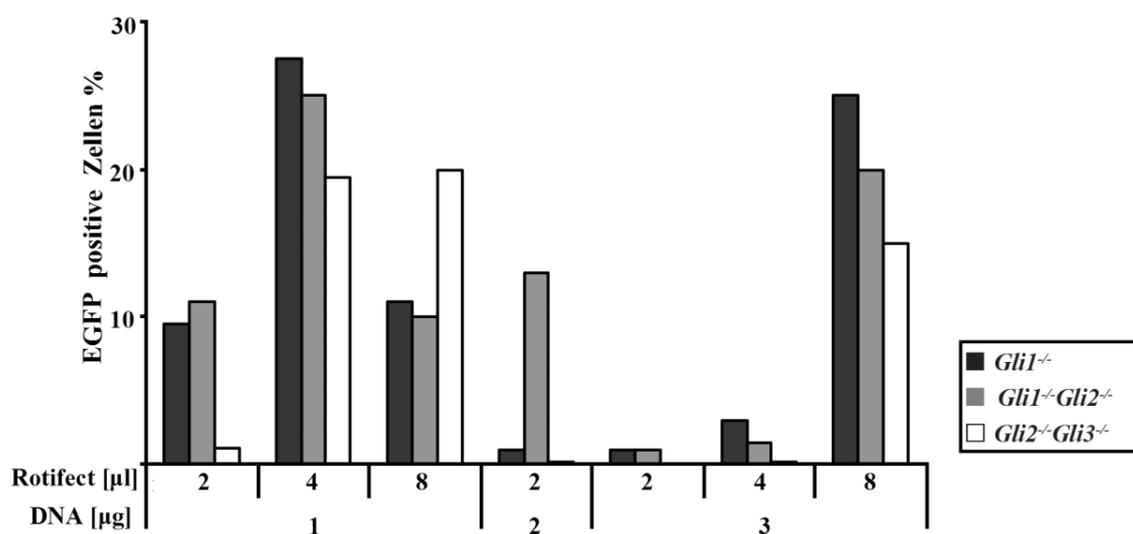
Zusätzlich wurden die *Gli*-defizienten Zelllinien mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Cyclopamin behandelt und anschließend die BrdU-Inkorporationsrate untersucht. Dieses Experiment sollte darüber Aufschluss geben, ob die antiproliferative Wirkung der beiden Substanzen abhängig vom Vorhandensein bestimmter *Gli*-Faktoren in den Zellen ist.

#### 3.3.1 Optimierung der Transfektionsbedingungen der Gli-defizienten Zellen

Da die optimalen Bedingungen des liposomenvermittelten Transfektionsverfahrens für die *Gli*-defizienten Zellen (*Gli1*<sup>-/-</sup>, *Gli1*<sup>-/-</sup>*Gli2*<sup>-/-</sup>, *Gli2*<sup>-/-</sup>*Gli3*<sup>-/-</sup>) nicht bekannt waren, wurden zu

Beginn der Untersuchungen verschiedene Bedingungen, insbesondere verschiedene Verhältnisse des Transfektionsreagents (Roti<sup>®</sup>Fect) und DNA, getestet.

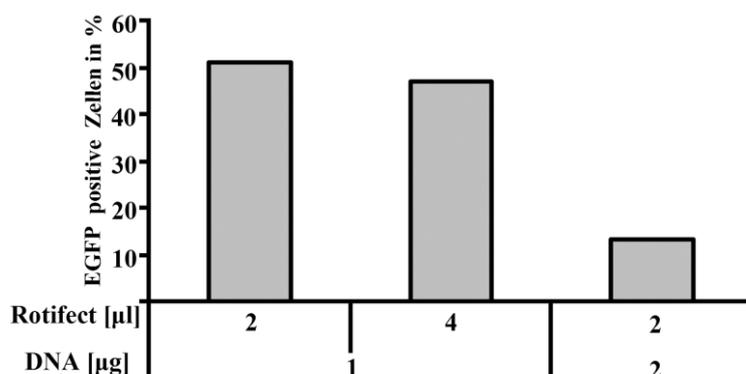
Dazu wurden die Zelllinien unter unterschiedlichen Konditionen mit dem Reporterplasmid *pEGFP-N1* (TakaraBioEurope/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) transfiziert. Dieses Plasmid exprimiert unter Kontrolle eines *CMV*-(Cytomegalievirus) Promoters das grün fluoreszierende Protein EGFP (enhanced green fluorescent protein). So kann die Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen als Maß für eine erfolgreiche Transfektion bewertet werden. Von jeder Zelllinie wurden je 100.000 Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät und in serumhaltigem Medium über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Reporterplasmid *pEGFP-N1* und Roti<sup>®</sup>Fect in den Verhältnissen 1 µg:2 µl, 1 µg:4 µl, 1 µg:8 µl, 2 µg:2 µl, 3 µg:2 µl, 3 µg:4 µl und 3 µg:8 µl, wie in Kapitel 2.15.3 beschrieben, über 6 h transfiziert. Nach Wechsel des Mediums und 48 h Inkubation wurde die Transfektionseffizienz bestimmt. Dazu wurde der Anteil transfizierter *EGFP*-positiver Zellen pro Gesamtzellzahl und pro Gesichtsfeld gezählt. Abbildung 16 zeigt den Anteil transfizierter Zellen pro Gesichtsfeld bei verschiedenen Verhältnissen von Roti<sup>®</sup>Fect und DNA.



**Abbildung 16: Transfektionseffizienz in *Gli*-defizienten Zelllinien.** Die Abbildung zeigt den Anteil EGFP-positiver Zellen pro Gesamtzellzahl pro Gesichtsfeld nach Transfektion der Zellen mit dem Reporterplasmid *pEGFP*. Auf der x-Achse sind die Verhältnisse von Reporterplasmid (DNA) in µg zu Roti<sup>®</sup>Fect in µl angegeben.

Der höchste Anteil transfizierter Zellen wurde durch das Verhältnis von 1 µg DNA zu 4 µl Roti<sup>®</sup>Fect (1:4) in allen drei untersuchten Zelllinien erreicht.

Daneben wurden auch optimale Transfektionsbedingungen für die wt *Ptch* Fibroblasten-Zelllinie gesucht. Da nach einer Transfektionsdauer von 6 h viele dieser Zellen abstarben, wurde die Transfektionsdauer für diese Zelllinie auf 3 h reduziert. In Abbildung 17 ist der Anteil transfizierter Zellen in der wt *Ptch* Kontrollzelllinie nach 48 h Inkubation dargestellt.

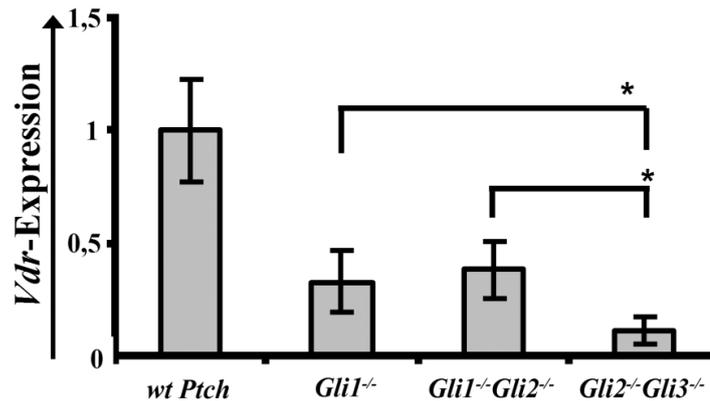


**Abbildung 17: Transfektionseffizienz in wt *Ptch* Zellen.** Gezeigt ist der Anteil EGFP-positiver Zellen pro Gesamtzellzahl pro Gesichtsfeld bei unterschiedlichen Verhältnissen von DNA in µg zu Roti®Fect in µl. Diese sind auf der x-Achse angegeben. Die Zellen wurden für 3 h transfiziert und danach für 48 h in serumhaltigem Medium inkubiert.

Aufgrund dieser Daten wurden in den anschließenden Experimenten die *Gli*-defizienten Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät und für 6 h mit DNA (µg)/Roti®Fect (µl) im Verhältnis 1:4 transfiziert. Die wt *Ptch* Fibroblasten wurden dagegen für 3 h im Verhältnis 1:2 transfiziert.

### 3.3.2 Einfluss der *Gli*-Faktoren auf die *Vdr*-Expression

Zunächst wurde untersucht, ob das Fehlen von *Gli*-Faktoren in den *Gli*-defizienten Zellen (*Gli1*<sup>-/-</sup>, *Gli1*<sup>-/-</sup>*Gli2*<sup>-/-</sup>, *Gli2*<sup>-/-</sup>*Gli3*<sup>-/-</sup>) per se schon einen Einfluss auf die *Vdr*-Expression ausübt. Dafür wurde die RNA von wt *Ptch* (Kontrollzelllinie) und den drei *Gli*-defizienten Zelllinien isoliert und zu cDNA umgeschrieben. In Abbildung 18 ist die relative *Vdr*-Expression der Zellen, die mittels RT-PCR ermittelt wurde, dargestellt.



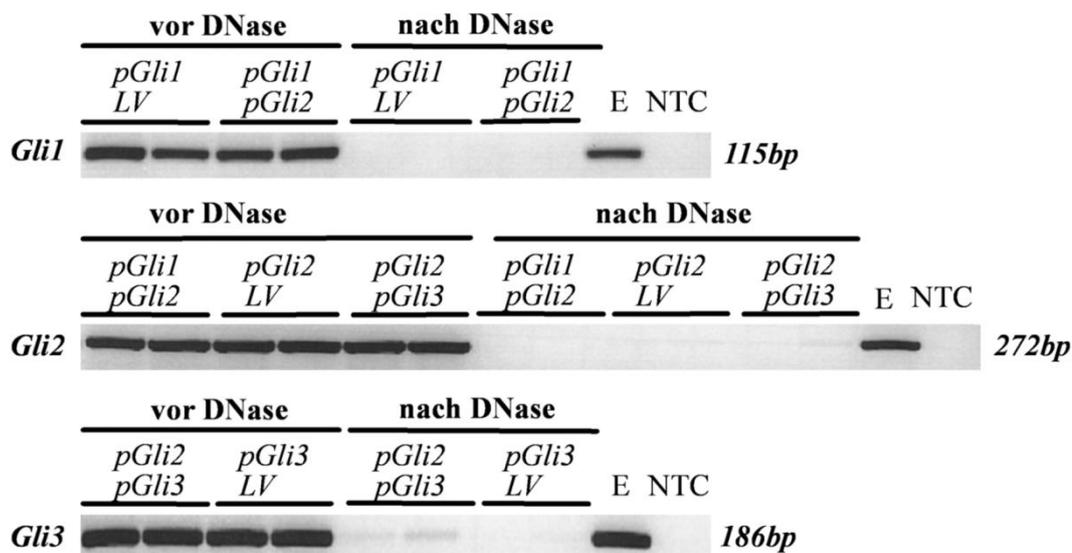
**Abbildung 18: Basale *Vdr*-Expression in wt *Ptch*, *Gli1*<sup>-/-</sup>, *Gli1*<sup>-/-</sup>*Gli2*<sup>-/-</sup> und *Gli2*<sup>-/-</sup>*Gli3*<sup>-/-</sup> Zellen.** Relative Quantifizierung der basalen *Vdr*-Expression. Die Expressionswerte der *Gli*-defizienten Zelllinien sind auf die *Vdr*-Expression der wt *Ptch* Zellen relativiert. P-Werte < 0,05 sind mit einem Stern gekennzeichnet.

In Abbildung 18 ist die relative Expression des *Vdr* in wt *Ptch* und *Gli*-defizienten Zelllinien dargestellt. Zunächst fällt auf, dass alle *Gli*-defizienten Zelllinien gegenüber der Kontrollzelllinie eine signifikant niedrigere *Vdr*-Expression zeigten. Da die *Gli*-defizienten Zelllinien jedoch aus Embryonen, die wt *Ptch* Zelllinie aber aus der Dermis der adulten Maus hervorgegangen sind, sind Schlussfolgerungen aufgrund der scheinbar niedrigeren *Vdr*-Expression der *Gli*-defizienten Zellen in Bezug auf die wt *Ptch* Zellen unzulässig. Da jedoch die Hh-Signalkaskade in den verwendeten wt *Ptch* Zellen normal stimuliert (durch Shh) und reprimiert (durch Cyclopamin) werden kann, diente die *Vdr*-Expression der wt *Ptch* Zellen als Bezugsgröße für die *Vdr*-Expression der anderen Zelllinien. So war es möglich, die *Vdr*-Expression zwischen den *Gli*-defizienten Zelllinien untereinander zu vergleichen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein oder mehrere *Gli*-Faktoren an der Regulation der *Vdr*-Expression beteiligt sein könnten, da sie sich in den untersuchten Zelllinien signifikant voneinander unterschieden. Da die *Vdr*-Expression in *Gli2*<sup>-/-</sup>*Gli3*<sup>-/-</sup> Zellen (durch das Fehlen von *Gli2* und *Gli3* wird in diesen Zellen auch kein *Gli1* exprimiert) signifikant niedriger war als in den *Gli1*<sup>-/-</sup> und *Gli1*<sup>-/-</sup>*Gli2*<sup>-/-</sup> Zelllinien (beide besitzen ein funktionales *Gli3*-Gen), lassen die Ergebnisse weiterhin vermuten, dass *Gli3* eine mögliche regulatorische Wirkung auf die Expression des Rezeptors ausüben könnte.

Um die *Gli*-vermittelte Regulation der *Vdr*-Expression weiter zu charakterisieren, wurden die *Gli*-defizienten Fibroblasten mit Expressionsplasmiden für die jeweils fehlenden *Gli*-Faktoren transfiziert. Zusätzlich dazu wurden auch in den wt *Ptch* Fibroblasten die *Gli*-

Faktoren einzeln oder in Kombination durch Transfektion der Expressionsplasmide überexprimiert.

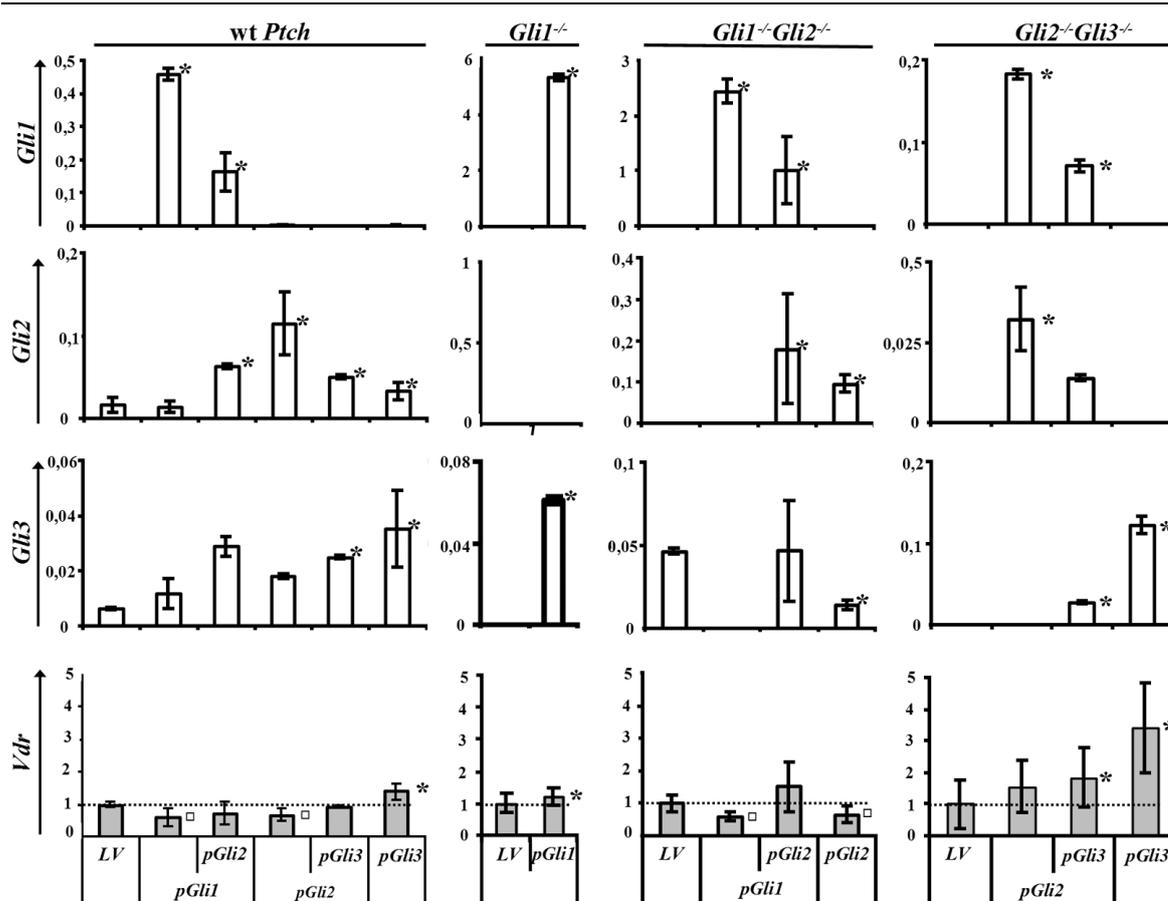
Dazu wurden jeweils 100.000 Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät und über Nacht in serumhaltigem Medium inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion unter den in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Bedingungen. 48 h nach der Transfektion wurde die RNA der Zellen isoliert. Danach wurde die RNA, um eine Kontamination der cDNA mit Plasmid-DNA zu vermeiden, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, mit DNase behandelt (vgl. Kapitel 2.13.1.2.2). Um den Erfolg der DNase-Behandlung zu überprüfen wurde mittels PCR überprüft, ob sich in der RNA vor und nach der DNase-Behandlung Plasmid-DNA mittels PCR nachweisen lässt (siehe Kapitel 2.13.4.1). Abbildung 19 zeigt die agarose-gelelektrophoretische Analyse der PCR an RNA Proben der wt *Ptch* Zellen vor und nach Behandlung mit DNase. Die RNA Proben der *Gli*-defizienten Zelllinien (*Gli1*<sup>-/-</sup>, *Gli1*<sup>-/-</sup>*Gli2*<sup>-/-</sup>, *Gli2*<sup>-/-</sup>*Gli3*<sup>-/-</sup>) wurden auf gleiche Art und Weise überprüft (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 19: Gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Amplifikate von RNA Proben der transfizierten wt *Ptch* Zellen vor und nach Behandlung mit DNase.** Dargestellt sind die gelelektrophoretisch aufgetrennten RNA-Proben der wt *Ptch* Zellen nach Transfektion mit verschiedenen *Gli*-Faktoren (pGli1-3) bzw. Leervektor (LV) vor und nach Behandlung mit DNase. Die *Gli1*-cDNA des Plasmids (Fragmentlänge 115 bp) wurden mittels der DNA-Oligonukleotide mGli1-tq-F und mGli1-tq-R amplifiziert. Zur Amplifikation der *Gli2*-cDNA des Plasmids dienten die DNA-Oligonukleotide Gli2 RTPCR-F und Gli2 RTPCR-R (Fragmentlänge 272 bp). Das *Gli3*-cDNA des Plasmids wurde durch die DNA-Oligonukleotide Gli3 F2 und Gli3 SyGr R amplifiziert (Fragmentlänge 186 bp). Als Positivkontrolle diente jeweils embryonale RNA (E; E12.5) von wt Mäusen. NTC, no template control (Negativkontrolle).

In Abbildung 19 ist der gelelektrophoretische Nachweis der erfolgreichen Elimination der Plasmid-DNA aus RNA von Plasmid-transfizierten wt *Ptch* Zellen dargestellt. Die cDNA der jeweils transfizierten *Gli*-kodierenden Plasmide wurde vor der Behandlung mit DNase in allen Proben amplifiziert. Nach Behandlung mit DNase waren in keiner Probe entsprechende Plasmide nachweisbar, d.h. die RNA war nicht mehr mit Plasmid-DNA kontaminiert.

Im Anschluss wurde cDNA aus der DNase-behandelten RNA synthetisiert und die Expression des *Vdr* sowie, zur Kontrolle der Transfektion, die Expression der *Gli*-Faktoren mittels qRT-PCR bestimmt. Das Experiment wurde dreimal unabhängig wiederholt. Die in Abbildung 20 dargestellten *Gli*-Expressionsdaten stammen aus einem Versuch und wurden exemplarisch für alle Durchführungen dargestellt. Die *Vdr*-Expressionsdaten entsprechen den Mittelwerten aus allen drei durchgeführten Experimenten.



**Abbildung 20: Vdr-, Gli1-, Gli2- und Gli3-Expression nach Transfektion der Gli-Faktoren in wt Ptch und Gli-defizienten Zellen.** Quantifizierung der Gli1-, Gli2-, Gli3- und Vdr-Expression nach Überexpression der Gli-Faktoren in Gli-defizienten ( $Gli1^{-/-}$ ,  $Gli1^{-/-}Gli2^{-/-}$ ,  $Gli2^{-/-}Gli3^{-/-}$ ) und wt Ptch Fibroblasten. Die Vdr-Expressionsniveaus wurden auf die jeweilige Leervektorkontrolle (LV) relativiert. Dieser Wert wurde zum besseren Vergleich mit einer unterbrochenen Linie in den Diagrammen gekennzeichnet. Signifikant höhere Werte im Vergleich zur Leervektorkontrolle ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet, signifikant niedrigere Werte mit einem Quadrat (□).

In Abbildung 20 sind die Expressionsanalysen der Gli-Faktoren und des Vdr für die untersuchten Zelllinien dargestellt. Die Daten zeigen zunächst, dass die transfizierten Gli-Plasmide in allen Zelllinien sehr gut exprimiert wurden. Daneben zeigen die Ergebnisse, dass wie bereits in der Literatur beschrieben,  $Gli2^{-/-}Gli3^{-/-}$  Zellen kein Gli1 exprimieren. Dies resultiert aus der Tatsache, dass Gli1 Gli2-abhängig exprimiert wird (Regl *et al.* 2002; Ikram *et al.* 2004). Dementsprechend ist die  $Gli2^{-/-}Gli3^{-/-}$  Zelllinie für alle drei Gli-Faktoren defizient. Wie die Abbildung 20 außerdem zeigt, wurde durch die Expression von Gli2 in  $Gli2^{-/-}Gli3^{-/-}$  Zellen tatsächlich auch die Gli1-Expression induziert. Die Expression von Gli3 allein hatte dagegen keinen aktivierenden Einfluss auf die Gli1-Expression dieser Zellen.

Die *Vdr*-Expression stieg durch die Überexpression von *Gli1* in *Gli1*<sup>-/-</sup> Zellen signifikant an, wogegen die *Gli1*-Transfektion in den *Gli1*<sup>-/-</sup>*Gli2*<sup>-/-</sup> Zellen und in den wt *Ptch* Kontrollzellen zu einer signifikanten Repression der *Vdr*-Expression führte. Diese Ergebnisse lassen daher vorerst keinen Schluss darüber zu, ob der *Vdr* *Gli1*-abhängig reguliert wird.

Die Überexpression von *Gli2* dagegen bewirkte eine signifikante Hemmung der *Vdr*-Expression in der wt *Ptch* Kontrollzelllinie sowie in den *Gli1*<sup>-/-</sup>*Gli2*<sup>-/-</sup> Zellen, jedoch nicht in den *Gli2*<sup>-/-</sup> *Gli3*<sup>-/-</sup> Zellen. In Anbetracht der sehr niedrigen basalen *Vdr*-Expression in *Gli2*<sup>-/-</sup> *Gli3*<sup>-/-</sup> Zellen ist es möglich, dass das basale *Vdr*-Expressionsniveau dieser Zellen durch *Gli2*-Überexpression nicht weiter reprimierbar war (vgl. Abbildung 18). Die kombinierte Transfektion von *Gli1/Gli2* zeigte jedoch weder in der wt *Ptch* Kontrollzelllinie noch in den *Gli1*<sup>-/-</sup>*Gli2*<sup>-/-</sup> Zellen eine Regulation der *Vdr*-Expression. Die Uneinheitlichkeit der Daten lässt somit über die Rolle von *Gli2* in der Regulation der Expression des *Vdr* keine gerichtete Aussage zu.

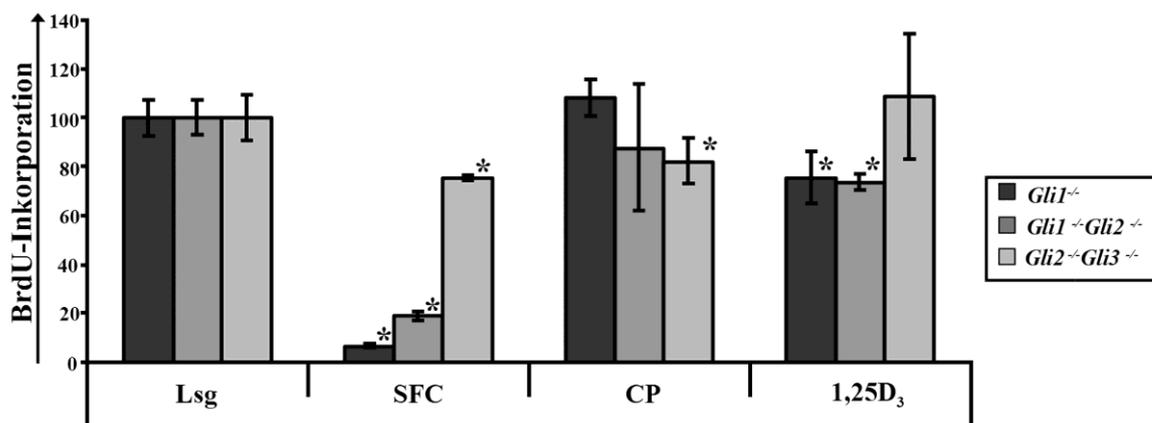
Die Überexpression von *Gli3* dagegen führte in den *Gli2*<sup>-/-</sup> *Gli3*<sup>-/-</sup> Zellen zu einem signifikanten Anstieg der *Vdr*-Expression. Dieser Anstieg war auch in Kombination mit *Gli2* zu sehen. Auch in der wt *Ptch* Kontrollzelllinie wurde durch die alleinige Überexpression von *Gli3* die *Vdr*-Expression signifikant induziert. Diese Daten weisen darauf hin, dass die *Vdr*-Expression positiv durch *Gli3* reguliert wurde.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass *Gli1* und *Gli2* höchstwahrscheinlich keinen Einfluss auf die Expression des *Vdr* haben. *Gli3* dagegen wirkt aktivierend auf die *Vdr*-Expression.

### **3.3.3 Die Wirkung von 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ und Cyclopamin auf die BrdU-Inkorporation von *Gli*-defizienten Zelllinien**

Die hemmende Wirkung von 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  auf die Zellproliferation wird wahrscheinlich sowohl durch die Aktivierung des *Vdr*-Signalwegs als auch durch die Hemmung des Hh-Signalwegs (und wahrscheinlich noch weiteren Signalwegen) vermittelt (siehe Kapitel 1.6 und 3.2.3). Um zu untersuchen, ob und welche *Gli*-Faktoren an der Vermittlung der Proliferationshemmung durch 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  beteiligt sind, wurde im nächsten Schritt die BrdU-Inkorporationsrate der *Gli*-defizienten Zelllinien nach Behandlung mit 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  im Vergleich mit Cyclopamin bestimmt. Das methodische Vorgehen ist im Teil Material und Methoden beschrieben (vgl. Kapitel 2.15.4.1).

Zunächst wurden 4.000 Zellen pro Loch einer 96-Loch-Platte in serumhaltigem Medium ausgesät und am nächsten Tag für weitere 48 h mit 10 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , 5  $\mu\text{M}$  Cyclopamin, Ethanol (Lösungsmittelkontrolle) in serumreduziertem oder serumfreiem Medium (Negativkontrolle) inkubiert. Nach 26 h wurde dem Medium 1 mM BrdU in 1 x PBS zugesetzt und für die verbleibenden 22 h der Inkubation belassen.



**Abbildung 21 BrdU-Inkorporation in *Gli*-defizienten Zelllinien nach Inkubation mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Cyclopamin.** Relative BrdU-Inkorporation von *Gli1*<sup>-/-</sup>, *Gli1*<sup>-/-</sup>*Gli2*<sup>-/-</sup> und *Gli2*<sup>-/-</sup>*Gli3*<sup>-/-</sup> Zellen nach Inkubation mit Lösungsmittel (Lsg), serumfreiem Medium (SFC), 5  $\mu\text{M}$  Cyclopamin (CP) und 10 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (1,25D<sub>3</sub>) für 48 h. Die Daten wurden auf die Messwerte der mit Lösungsmittel behandelten Zellen (mit 100 % benannt) relativiert. Gegenüber der Lösungsmittelkontrolle signifikante Werte ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Wie Abbildung 21 zeigt, wurde der BrdU-Einbau in die *Gli1*<sup>-/-</sup> und *Gli1*<sup>-/-</sup>*Gli2*<sup>-/-</sup> Zelllinien durch Cyclopamin nicht gehemmt. In den *Gli2*<sup>-/-</sup>*Gli3*<sup>-/-</sup> Zellen bewirkte Cyclopamin jedoch eine Hemmung. Da *Gli2*<sup>-/-</sup>*Gli3*<sup>-/-</sup> Zellen keine endogene *Gli1*-Expression aufweisen, kann eine *Gli1*-abhängige Proliferationskontrolle in diesen Zellen ausgeschlossen werden (vgl. Abbildung 20). Deswegen muss in den *Gli2*<sup>-/-</sup>*Gli3*<sup>-/-</sup> Zellen entweder von einem toxischen oder proapoptischen Effekt durch Cyclopamin oder aber von einem Hh-Signalweg-unabhängigen Wirkmechanismus ausgegangen werden.

Durch die Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wurde in den *Gli1*<sup>-/-</sup> und *Gli1*<sup>-/-</sup>*Gli2*<sup>-/-</sup> Zelllinien eine signifikante Reduktion der BrdU-Inkorporation erreicht. In *Gli2*<sup>-/-</sup>*Gli3*<sup>-/-</sup> Zellen wurden die Inkorporation dagegen durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  nicht gehemmt. Möglicherweise fehlt diesen Zellen neben der basalen *Gli1*-Expression aufgrund der fehlenden *Gli3*-Expression auch eine adäquate *Vdr*-Expression, so dass hierdurch weder die Hh-vermittelte noch die

Vdr-vermittelte Regulation der Proliferation durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  beeinflusst werden kann (vergleiche Kapitel 3.3.2, Abbildung 18 und Abbildung 20).

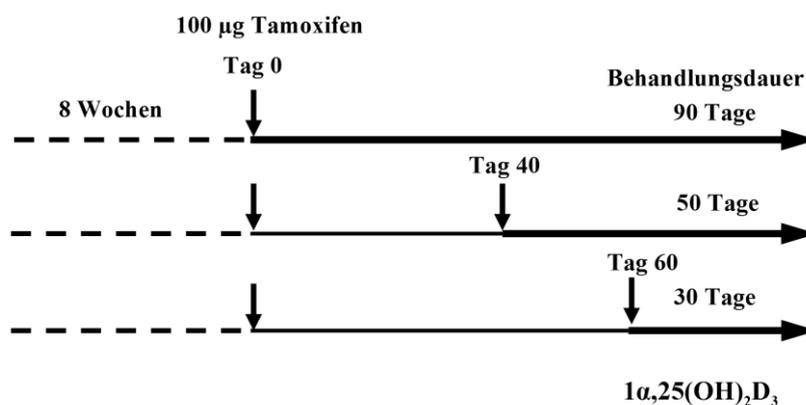
Zusammengefasst lassen diese Daten die Vermutung zu, dass die  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -vermittelte Proliferationshemmung in Abhängigkeit von *Gli3* über die Inhibierung der Hh-Signalkaskade und/oder die Aktivierung des Vdr-Signalwegs vermittelt wird.

### 3.4 Analysen zur Therapie von BCC mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

In einem weiteren Projekt der AG Hahn wird die Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf BCC-tragende Mäuse *in vivo* untersucht. Dazu wurden die tumortragenden Tiere mit unterschiedlichen Dosierungen und ab verschiedenen Zeitpunkten der Tumorentwicklung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Tumorgrößen bestimmt werden. Zusätzlich wurde eine Kurzzeittherapie mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  durchgeführt, die zeitgleich mit der Tumorinduktion begonnen wurde.

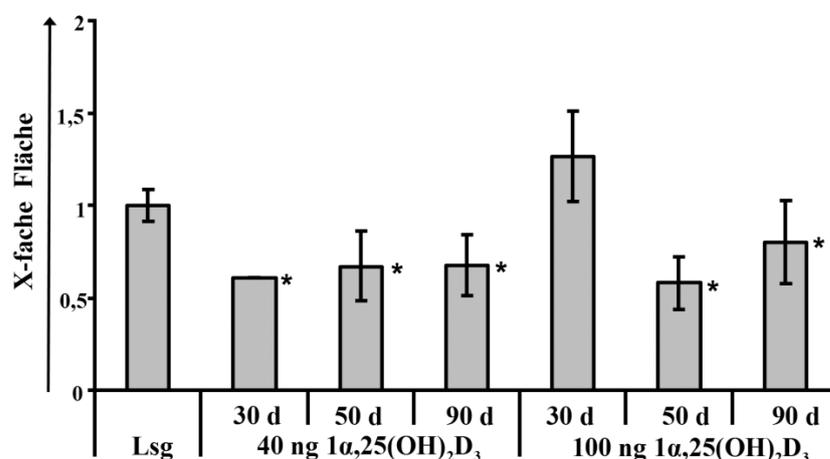
#### 3.4.1 Planimetrische Vermessung von BCC nach *in vivo* $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Therapie

Die Studien wurden an konditionellen *Ptch<sup>lox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>* Mäusen durchgeführt. In diesen Mäusen lässt sich durch die Gabe von Tamoxifen die ERT2 Cre-Recombinase induzieren. Dadurch ist es möglich, den Zeitpunkt der Tumorinduktion zu definieren (vgl. Kapitel 2.10.5 und 2.16.4.2). Nach der Tumorinduktion durch eine einmalige intramuskuläre Injektion von 100 µg Tamoxifen entwickeln die Tiere zu 100 % BCC (Zibat *et al.* 2009). Im Rahmen der durchgeführten Studien wurden die Tiere in unterschiedlichen Stadien der Tumorentwicklung (Tag 0, 40 bzw. 60) mit 40 bzw. 100 ng/kg /d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelt. Die Behandlung wurde dann jeweils bis Tag 90 nach Tumorinduktion fortgesetzt. Die Tiere wurden anschließend präpariert (siehe Kapitel 2.16.5.2) und die gewonnenen Hautproben den weiteren Analysen zugeführt. Abbildung 22 zeigt das Therapieschema der durchgeführten Studien.



**Abbildung 22** Behandlungsschema der *in vivo* Studien zur Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  an BCC-tragenden *Ptch*<sup>flx/flx</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup> Mäusen. Mittels der intramuskulären Injektion des Östrogenanalogs Tamoxifen wurde an Tag 0 die Entwicklung von BCC in den etwa 8 Wochen alten *Ptch*<sup>flx/flx</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup> Mäusen induziert. Die Therapie mit 40 bzw. 100 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wurde am Tag der Tumorinduktion, am Tag 40 bzw. an Tag 60 nach Tumorinduktion begonnen. Die Therapiedauer betrug somit 90, 50 bzw. 30 Tage. An Tag 90 nach Induktion wurden alle Tiere abgetötet um weitere Analysen vorzunehmen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden HE-Färbungen von Paraffinschnitten der BCC aus den beiden beschriebenen Studien planimetrisch vermessen. Neben den bereits durchgeführten immunhistologischen Proliferationsanalysen (anti-Ki67 immunhistologische Färbungen) sollte somit eine objektive Quantifizierung der Tumorgrößen der mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten Tieren erreicht werden. Mithilfe der Software *Cell F* wurden pro Schnitt und Tier jeweils 3 BCC-Areale mikroskopisch vermessen und ein Mittelwert gebildet (vgl. Kapitel 2.14). Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse der planimetrischen Vermessung der BCC-Areale.



**Abbildung 23: Planimetrische Vermessung von BCC aus *Ptch*<sup>flx/flx</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Mäusen nach Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .** Es wurden HE-gefärbte Schnitte von insgesamt 35 Tieren vermessen. Davon wurden 13 Tiere mit 40 ng  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  pro kg/d über 30d (1 Tier), über 50d (5 Tiere) und über 90d (7 Tiere) behandelt. 15 Tiere wurden mit 100 ng  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  pro kg/d über 30d (3 Tiere), 50 d (5 Tiere) und 90d (7 Tiere) behandelt. Als Kontrolle wurden HE-gefärbte Schnitte von 7 Tieren, welche 90 Tage mit Lösungsmittel behandelt wurden, genutzt. Pro Schnitt wurden 3 Messungen durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert aller Messungen der jeweiligen Kohorte.

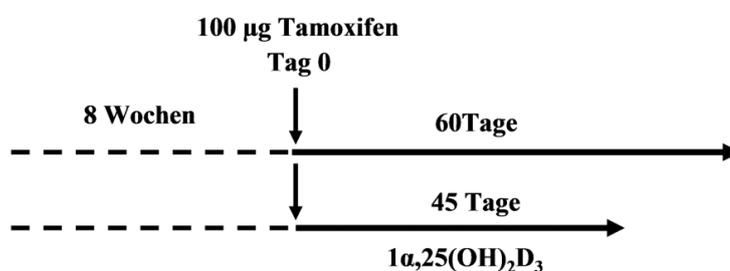
Abbildung 23 zeigt, dass die Tumorgrößen der mit 40 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten Tiere über alle drei untersuchten Behandlungszeiträume im gleichen Maße signifikant

kleiner sind als die der mit Lösungsmittel behandelten Tiere. Aus der Kohorte der Tiere, die über 30 Tage (ab Tag 60 nach Tumorinduktion) behandelt wurden, wurde allerdings nur die Tumorgroße eines Tieres analysiert. Die Behandlung mit 100 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  führte, mit Ausnahme der Tiere die nur über 30 Tage behandelt wurden, ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Tumorgroßen.

Zusätzlich führte die tägliche Behandlung der Tiere mit 100 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  über 50 Tage (Behandlung ab Tag 40 bis zu Tag 90 nach Tumorinduktion) bzw. 90 Tage (Behandlung sofort nach Tumorinduktion bis zu Tag 90 nach Tumorinduktion) zu einer Differenzierung der Tumorzellen. Dies wurde von Dr. A. Uhmann anhand von Expressionsanalysen verschiedener Differenzierungsmarker der Haut (*Tgm*, *K10*) gezeigt (Uhmann *et al.* 2011a).

### 3.4.2 Behandlung BCC-tragender Mäuse mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

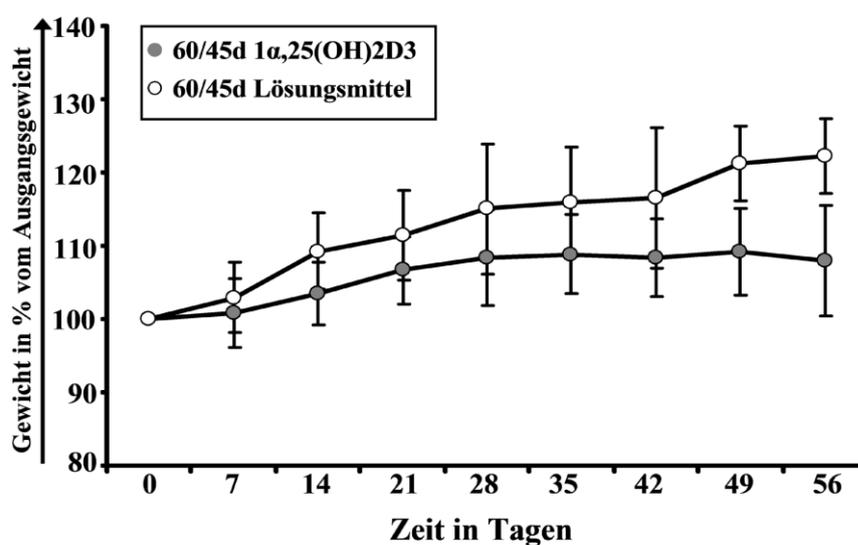
Die bereits durchgeführten Analysen zur Proliferation (*Ki67*-Färbung) und Differenzierung (*K10*-Expressionsanalyse) in den mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten BCC gaben Hinweise darauf, dass durch eine möglichst früh beginnende Behandlung der Tiere mit einer Dosis von 100 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sowohl ein verstärkter antiproliferativer als auch differenzierungsfördernder Effekt erreicht wird (Lammering 2011; Uhmann *et al.* 2011a). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine dritte *in vivo* Studie an BCC-tragenden *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>* Mäusen durchgeführt. In dieser sollte geprüft werden, ob bei einem frühen Therapiebeginn eine effektive Hemmung der Tumorproliferation auch durch eine Kurzzeitbehandlung erreicht werden kann. Hierzu wurden die Tiere bereits ab dem Tag der Tumorinduktion über 45 oder 60 Tage mit 100 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  bzw. Lösungsmittel (Kontrollgruppe) behandelt. In jeder Kohorte wurden je 5 Tiere behandelt. Abbildung 24 veranschaulicht schematisch den Aufbau der durchgeführten Studie.



**Abbildung 24: Behandlungsschema der *in vivo* Untersuchung zur Behandlung *Ptch*-assoziierter BCC in *Ptch*<sup>flax/flax</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup> Mäusen über unterschiedliche Zeiträume ab dem Tag der Tumorinduktion.** Im Alter von 8 Wochen wurde die Entwicklung von BCC durch die intramuskuläre Injektion von 100 µg des Östrogenanalogons Tamoxifen induziert. Am gleichen Tag wurde mit der Behandlung der Tiere mit 100 ng/kg/d 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> begonnen und bis Tag 60 bzw. 45 nach Induktion fortgesetzt. Als Kontrolle wurde Tieren über die entsprechenden Zeiträume jeweils Lösungsmittel (Emulsion aus Ethanol/Sonnenblumenöl) injiziert. Nach Beendigung der Behandlung wurden die Tiere abgetötet und Proben zur weiteren Analyse konserviert.

### 3.4.2.1 Gesundheitszustand der Tiere

Um einer Hyperkalziämie vorzubeugen, wurden die Tiere eine Woche vor und während des gesamten Behandlungszeitraums ausschließlich mit Vitamin D<sub>3</sub> freiem, Kalzium- und Phosphatreduziertem Futter ernährt. Um den Gesundheitszustand der Tiere zu überwachen, wurden sie täglich beobachtet und einmal wöchentlich gewogen. In Abbildung 25 ist die Entwicklung des Körpergewichts der Tiere über den Behandlungszeitraum von 60 bzw. 45 Tagen dargestellt.

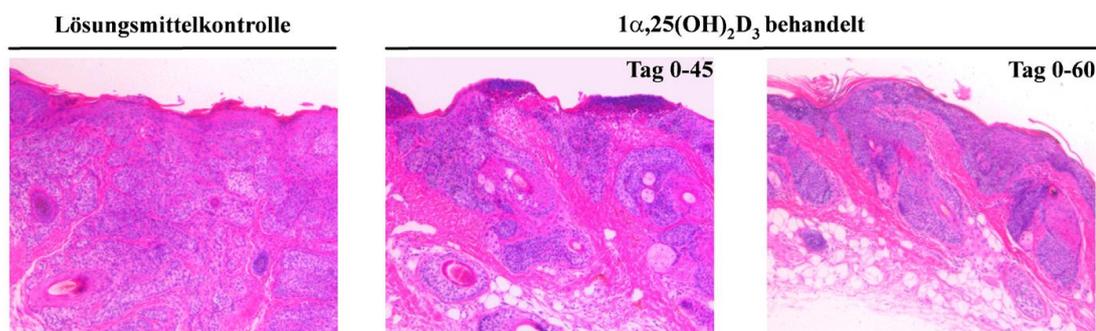


**Abbildung 25 Körpergewicht der BCC-tragenden *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>* Mäuse unter Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder Lösungsmittel.** Dargestellt ist die prozentuale Abweichung von Ausgangskörpergewicht der Tiere der Interventionsgruppe (grau) und der Kontrollgruppe (weiß) über den Behandlungszeitraum von 45 bzw. 60 Tagen. Die Werte sind auf den Ausgangswert (Gewicht am Tag der Tumorinduktion=100 %) relativiert. Sowohl in der Interventionsgruppe als auch in der Kontrollgruppe befanden sich jeweils 10 Tiere (je 5 Tiere pro Behandlungszeitraum).

Die Daten zeigen, dass das Gewicht der mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten Tiere im Studienverlauf über 45 bzw. 60 Tage insgesamt weniger stark anstieg als das Gewicht der mit Lösungsmittel behandelten Tiere. Dies lässt auf eine ungünstige Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf den Gesundheitszustand der Tiere schließen. Insgesamt war aber ein Gewichtsanstieg bzw. ein konstantes Gewicht auch in der Interventionsgruppe zu erkennen, was darauf hindeutet, dass die Tiere durch die Behandlung gesundheitlich nicht wesentlich eingeschränkt wurden. Auch die tägliche Beobachtung der Tiere ergab keine Auffälligkeiten.

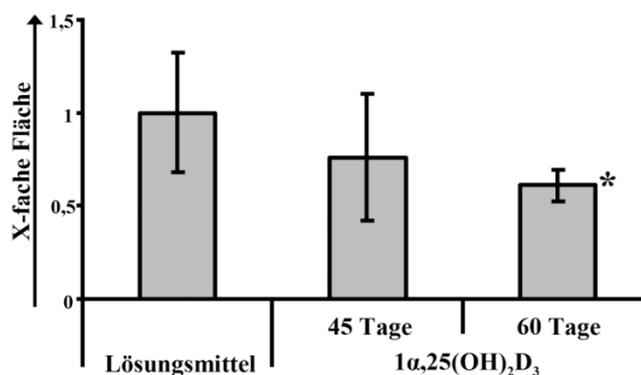
### 3.4.2.2 Histologische Untersuchungen

Nach Abschluss der Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wurden die BCC-tragenden Tiere narkotisiert, perfundiert und ein definiertes Stück Schwanzhaut für weitere histologische Untersuchungen entnommen (siehe Kapitel 2.16.5.2 und 2.16.5.3). Ein weiteres Stück Schwanzhaut wurde für spätere RNA-Analysen entnommen. Die Proben wurden in Paraffin eingegossen, Schnitte angelegt und anschließend die Zellkerne und das Zytoplasma der BCC-tragenden Haut mit einer HE-Färbung angefärbt. Abbildung 26 zeigt beispielhaft HE-gefärbte Schnitte der BCC tragenden Schwanzhaut von Tieren, die mit Lösungsmittel bzw.  $100\text{ng/kg/d } 1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelt wurden. Die Abbildung verdeutlicht die, im Vergleich zu beiden Interventionsgruppen, größeren BCC in der Kontrollgruppe.



**Abbildung 26** HE-gefärbte Paraffinschnitte von BCC aus *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/+</sup>* Mäusen nach Behandlung mit Lösungsmittel bzw. 100 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  über 45 bzw. 60 Tage. Die Tiere wurden nach dem in Abbildung 24 dargestellten Schema behandelt.

Anschließend wurden die Größen der BCC planimetrisch, wie bereits beschrieben, vermessen. Abbildung 27 stellt die Ergebnisse der planimetrischen Vermessung graphisch dar.



**Abbildung 27:** Planimetrische Vermessung von BCC in *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/+</sup>* Mäusen nach Behandlung mit 100 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  für 45 bzw. 60 Tage nach Tumorinduktion. Dargestellt sind die zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle relativierten BCC-Areale. Es wurde pro Tier ein HE-gefärbter Schnitt vermessen. Pro Schnitt wurden 3 Gesichtsfelder analysiert. Pro Gruppe wurden HE-gefärbte Schnitte von jeweils 5 Tieren vermessen. Aus den Messwerten einer Kohorte wurde der Mittelwert gebildet.

Wie Abbildung 27 zeigt, wurde das Wachstum der BCC durch Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  gehemmt. Dabei sind die Tumorareale nach einer 60tägigen Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  signifikant kleiner als die der Lösungsmittelkontrolle. Nach einer 45tägigen Behandlung wurde dagegen eine nur nicht signifikante Reduktion der Tumorareale erreicht. Diese Daten bestätigen zunächst, dass das Wachstum *Ptch*-assoziiertes BCC *in vivo* durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inhibiert wird. Insgesamt deuten die Ergebnisse aus den durchgeführten Studien (Kapitel 3.4.1 und 3.4.2.2) darauf hin, dass der wachstumshemmende Effekt von 100 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sowohl von einem frühzeitigem Behandlungsbeginn als auch von der Behandlungsdauer abhängt.

## 4 Diskussion

Grundlage dieser Arbeit ist die Vermutung, dass *Ptch*-defiziente (*Ptch*<sup>-/-</sup>) Zellen nicht dazu in der Lage sind, das Smo-inhibierende Vitamin D<sub>3</sub>-Derivat 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> abzugeben und die Aktivität des Hh-Signalwegs zu hemmen (Bijlsma *et al.* 2006). In Vorarbeiten der AG Hahn konnte durch Mediumtransferexperimente gezeigt werden, dass die *Gli1*-Expression und damit der Hh-Signalweg durch Transfer von Medium von *Ptch* wt Zellen gehemmt wird. Das Medium von *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen jedoch vermag eine solche Hemmung nicht zu vermitteln. Dies legt die Vermutung nahe, dass Wildtypzellen, nicht aber *Ptch*-defiziente Zellen, ein Molekül ins Medium abgeben, welches an Smo bindet und damit die Hemmung des Hh-Signalwegs vermittelt. Vorarbeiten von H. Niemann (AG Hahn) zeigten weiter, dass der Hh-Signalweg in *Ptch*-defizienten RMS und *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen durch die Applikation von 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> gehemmt werden kann. Die Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass *Ptch* physiologischerweise als Oxysterolpumpe dient und 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in den Extrazellularraum abgibt und damit Smo inhibiert (Bijlsma *et al.* 2006). Durch eine Mutation von *Ptch* wird diese Pumpfunktion vermutlich gestört, infolgedessen wird Smo nicht gehemmt und der Hh-Signalweg liegt in einem konstitutiv aktiven Zustand vor. Die Ursache einer verminderten Abgabe von 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ins Medium könnte neben der gestörten Sekretion auch in einer verminderten Synthese oder im erhöhtem Abbau des Vitamins in *Ptch*-defizienten Zellen liegen. Das würde zu einer verminderten intrazellulären Konzentration von 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> führen. Eine Abschwächung der Vdr-Signalwegsaktivität und die verminderte Expression von dessen Zielgenen, wie z.B. *Cyp24a1* in den betroffenen Zellen wäre die Folge, wie Abbildung 28 nochmals verdeutlicht. Sowohl die erhöhte Aktivität des Hh-Signalwegs als auch die verminderte Aktivität des Vdr-Signalwegs könnten die vermehrte Proliferation und die maligne Transformation von *Ptch*-defizienten Zellen fördern und zu einer Tumorentstehung beitragen (vgl. Kapitel 1.6). Ziel dieser Arbeit war es daher, direkte und indirekte Interaktionen der beiden Signalwege zu untersuchen.

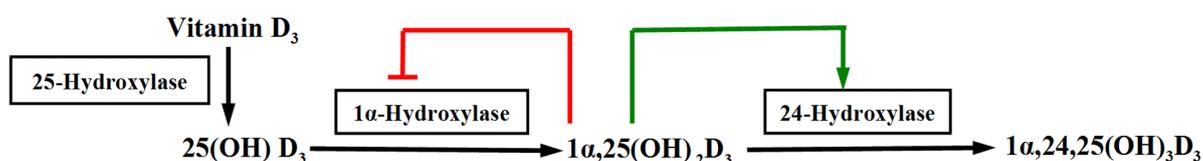


Abbildung 28: Darstellung des Metabolismus von 1α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und der beteiligten Enzyme (Vgl. auch

**Abbildung 2).** Durch die 25-Hydroxylase entsteht aus Vitamin D<sub>3</sub> 25(OH)D<sub>3</sub>. Ein weiterer Hydroxylierungsschritt wird durch die 1 $\alpha$ -Hydroxylase (*Cyp27b1*) vermittelt, wodurch der aktive Metabolit 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> entsteht. Dieser wird durch die 24-Hydroxylase (*Cyp24a1*) abgebaut. 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> reguliert durch einen Feedbackmechanismus über die Aktivität der Hydroxylasen seinen Aufbau negativ (rot) und seinen Abbau positiv (grüner Pfeil).

#### 4.1 Die Synthese von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ist in primärkultivierten RMS Zellen gestört

In dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, ob in primärkultivierten RMS Zellen 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> synthetisiert werden kann. Die verwendeten Zellen wurden aus RMS gewonnen, die von *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen stammen und eine *Ptch*-Defizienz aufweisen. Für die Untersuchungen wurden mittels qRT-PCR die *Gli1*- und *Cyp24a1*-Expressionslevel der RMS Zellen und der Kontrollzelllinien (wt *Ptch*, HaCaT und *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen) nach Kultivierung mit der 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Vorstufe 25(OH)D<sub>3</sub> bestimmt.

Normalerweise wird 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> durch das Enzym 1 $\alpha$ -Hydroxylase (*Cyp27b1*) aus der Vorstufe 25(OH)D<sub>3</sub> synthetisiert. Da *Cyp24a1* ein Zielgen des 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>/Vdr-Signalwegs ist, sollte es bei intakter 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Synthese vermehrt exprimiert werden. Weiterhin sollte die Synthese zur erhöhten Verfügbarkeit von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in den Zellen führen. Dadurch sollte der Hh-Signalweg gehemmt werden, was sich in einer verminderten *Gli1*-Expression ausdrücken würde. Dieses Verhalten - eine Induktion der *Cyp24a1*-Expression und eine verminderte *Gli1*-Expression - zeigten alle drei Kontrollzelllinien nach Inkubation mit 25(OH)D<sub>3</sub>. In der Hh-abhängigen Zelllinie C3H10T1/2 wurden die gleichen Beobachtungen gemacht (Banerjee *et al.* 2012).

Neue Literaturdaten zeigen, dass neben 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auch dessen Vorstufe 25(OH)D<sub>3</sub> an den Vdr binden und diesen und damit die Transkription von *Cyp24a1* aktivieren kann. Dabei hat 25(OH)D<sub>3</sub> aber eine weitaus geringere Affinität (~1/1000) zu dem Rezeptor und auch die Aktivierung der *Cyp24a1*-Transkription wird zur einem viel geringeren Prozentsatz als durch 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vermittelt (Ching *et al.* 2011; Wu-Wong *et al.* 2011). Daher kann davon ausgegangen werden, dass dieser Aspekt zu keiner relevanten Beeinflussung der Daten geführt hat.

Interessanterweise wurde beobachtet, dass 25(OH)D<sub>3</sub> in RMS Zellen weder die *Cyp24a1*-Expression induziert noch die *Gli1*-Expression gehemmt hat. Die 24-Hydroxylase (*Cyp24a1*) kann neben 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auch 25(OH)D<sub>3</sub> zu Abbauprodukten umsetzen (vgl. Kapitel 1.5.1). Dieser Aspekt spielt vor allem eine Rolle wenn, wie hier durch die Inkubation der Zellen mit 25(OH)D<sub>3</sub>, dem Enzym übermäßig viel 25(OH)D<sub>3</sub> als Substrat

zur Verfügung steht. Das könnte dazu führen, dass  $25(\text{OH})\text{D}_3$  nicht nur von der  $1\alpha$ -Hydroxylase zu  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  umgesetzt wird und dadurch zu einer erhöhten Transkription des  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{Vdr}$ -Zielgens *Cyp24a1* führt, sondern zusätzlich von der 24-Hydroxylase zu  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  abgebaut wird. Das Abbauprodukt  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  steigert wiederum durch einen Rückkopplungsmechanismus die Aktivität der  $1\alpha$ -Hydroxylase und damit die  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese (Deeb *et al.* 2007). Für die verwendeten Kontrollzelllinien stellt dies einen möglichen alternativen „Umweg“ nach Inkubation mit  $25(\text{OH})\text{D}_3$  dar, der aber genau wie der „direkte“ Weg (vgl. Abbildung 28), in der Synthese von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  mündet und damit zur Induktion der *Cyp24a1*-Expression sowie einer verminderten *Gli1*-Expression führen kann. Da in den untersuchten RMS Zellen aber nach Inkubation mit  $25(\text{OH})\text{D}_3$  keine Induktion der *Cyp24a1*-Expression detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass die Aktivität der  $1\alpha$ -Hydroxylase in diesen Zellen auch über diesen alternativen  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -abhängigen Weg nicht induziert werden konnte.

Daneben wäre als Ursache der ausgebliebenen *Cyp24a1*-Transkription auch ein Funktionsverlust der 24-Hydroxylase denkbar. Ein solcher Funktionsverlust ist in RMS Zellen aber unwahrscheinlich, weil in den Zellen durch Inkubation mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die Transkription von *Cyp24a1* induziert wurde. Diese aktivierende Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf den Vdr-Signalweg in RMS Zellen ist bereits aus Vorarbeiten bekannt (Uhmann *et al.* 2012).

Zusammenbetrachtet lässt dies vermuten, dass erstens nur das aktive Vitamin  $\text{D}_3$ -Derivat  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  den Hh-Signalweg hemmt und zweitens, dass die Synthese von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aus  $25(\text{OH})\text{D}_3$  durch das Enzym  $1\alpha$ -Hydroxylase in RMS Zellen gestört ist.

Regelmäßig kommt es bei maligner Entartung von Zellen zur Überwindung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -vermittelten Regulationsmechanismen. Durch eine reduzierte  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese bspw. wird die physiologische Regulation von Zellwachstum und Zelldifferenzierung unterbrochen (Hsu *et al.* 2001; Chen, T C *et al.* 2003). So ist in den proximalen Tubuli der Niere bei maligner Transformation in das klarzellige Nierenkarzinom eine verminderte Expression von *Cyp27b1* und des *Vdr* zu beobachten (Blomberg Jensen *et al.* 2010). In Zellen des Ovarialkarzinoms ist eine geringere Expression der  $1\alpha$ -Hydroxylase auf Proteinebene zu finden und Prostatakrebszellen zeigen eine herabgesetzte Aktivität des Enzyms im Vergleich zu gesundem Gewebe (Hsu *et al.* 2001; Fischer *et al.* 2009). Eine entscheidende Rolle hierbei könnte eine verstärkte NF- $\kappa$ B-

Expression spielen, die einen Aktivitätsverlust des *Cyp27b1*-Promotors bewirken kann (Ebert *et al.* 2004; Hobaus *et al.* 2013). *Cyp27b1* kann daher als Tumorsuppressorgen bezeichnet werden, welches eventuell auch bei der Entstehung von *Ptch*-assoziierten RMS beteiligt sein könnte (Chen, T C 2008).

Der Funktionsverlust der  $1\alpha$ -Hydroxylase scheint zudem spezifisch für die RMS Zellen zu sein, da *Ptch*<sup>-/-</sup> Fibroblasten, ähnlich wie wt *Ptch* und HaCaT Zellen, zur Synthese von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und damit auch zur Hemmung des Hh-Signalwegs befähigt sind. Eine mögliche Ursache für das unterschiedliche Verhalten der *Ptch*-defizienten RMS Zellen und *Ptch*<sup>-/-</sup> Fibroblasten könnte in verschiedenen Regulationsmechanismen des Vitamin D<sub>3</sub>-Metabolismus der beiden Zelllinien liegen. Beispielsweise liegt in den Primärkulturen der RMS neben den eigentlichen Tumorzellen zusätzlich Tumorstroma, bestehend aus inflammatorischen Zellen (Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen) und Fibroblasten vor. Im Gegensatz dazu besteht die kultivierte *Ptch*<sup>-/-</sup> Zelllinie aus monoklonalen Zellen. Das Tumorstroma vermittelt parakrine Signale, die proliferativ und antiapoptotisch wirken. Die Stromazellen können sogar dazu beitragen, den Phänotyp einer gesunden Zelle in den einer karzinogenen Zelle umzuwandeln (Tlsty 2001; Bhowmick und Moses 2005). Diese und andere Mechanismen könnten zur Herabsetzung der Aktivität der  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -synthetisierenden  $1\alpha$ -Hydroxylase in den RMS Zellen beigetragen haben.

$25(\text{OH})\text{D}_3$  hatte in *keiner* der untersuchten RMS Primärkulturen einen Effekt auf den Hh- oder Vdr-Signalweg. Da alle RMS aus unterschiedlichen Mäusen stammten, ist davon auszugehen, dass sich die Pathogenese dieser Tumoren immer nach einem ähnlichen Verlauf und einer damit verbundenen Deregulation des Vitamin D<sub>3</sub>-Metabolismus abspielt. Untersuchungen möglicher Mutationen, dem Vorliegen von Splicevarianten in *Cyp27b1* oder Untersuchungen, ob *Cyp27b1* in *Ptch*-assoziierten RMS stummgeschaltet ist, könnten hilfreich bei der weiteren Eingrenzung der Ursache für das Verhalten dieser Tumore sein.

Obwohl in RMS Zellen nach den hier gewonnenen Ergebnissen am ehesten von einer verminderten  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  Synthese auszugehen ist, die zur Aktivierung des Hh-Signalwegs trägt, sollten in diesen Zellen und auch in *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen in der Zukunft mögliche Sekretionsstörungen von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  mittels HPLC- und Massenspektroskopieanalysen der  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Metabolite im verwendeten Zellkulturmedium untersucht werden. Mit dieser Methode kann auch die Aktivität der  $1\alpha$ -Hydroxylase in den Zellen genauer bestimmt werden. Voruntersuchungen dazu wurden

im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit Prof. J. Adamski (Helmholtz Zentrum München) bereits durchgeführt.

#### **4.2 Die Kombination von Itraconazol und $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ führt zu einer verstärkten Hemmung des Hh-Signalwegs**

Der Hh-Signalweg spielt bei der Entstehung verschiedener Tumorentitäten eine Rolle. Daher wird mit Hochdruck nach einem potenten Inhibitor des Signalwegs gesucht. Bei einem Screening verschiedener Pharmaka entdeckte man die hemmende Wirkung des Antimykotikums Itraconazol auf den Hh-Signalweg. Itraconazol vermittelt seine Wirkung dabei vermutlich durch die direkte Bindung an Smo oder einen unbekanntem, indirekt Smo-antagonistischen Mechanismus (Kim *et al.* 2010). Zudem ist bekannt, dass Itraconazol die für den  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Metabolismus wichtigen Cyp-Enzyme in ihrer Aktivität hemmen kann (Vanden Bossche *et al.* 2004; Hansdottir *et al.* 2008). Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob Itraconazol seine Hh-inhibierende Wirkung auch indirekt, durch die Modulation der zellulären  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration, vermitteln könnte.

Für die Untersuchungen wurden *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen verwendet, die vermutlich dazu in der Lage sind,  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aus  $25(\text{OH})\text{D}_3$  zu synthetisieren. Diese wurden mit (ansteigenden Konzentrationen) von Itraconazol einzeln oder in Kombination mit  $25(\text{OH})\text{D}_3$  bzw.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inkubiert. Anschließend wurde die *Cyp24a1*-Expression als Indikator für die  $1\alpha$ -Hydroxylase- bzw. 24-Hydroxylaseaktivität sowie die Aktivität der Hh-Signalkaskade analysiert.

Die Ergebnisse zeigten zunächst, dass Itraconazol den Hh-Signalweg in den verwendeten *Ptch*-defizienten Zellen dosisabhängig hemmte. Dies wurde bereits von Kim *et al.* für die Zelllinien Shh-Light2 und *Ptch*<sup>-/-</sup> (eine andere als in dieser Arbeit verwendete *Ptch*<sup>-/-</sup> Zelllinie) beschrieben, in denen Itraconazol eine vollständige Hemmung des Hh-Signalwegs hervorrief (Kim *et al.* 2010). Dagegen konnte der Hh-Signalweg der in dieser Arbeit untersuchten *Ptch*-defizienten Zelllinie durch die verwendeten Itraconazolkonzentrationen nicht vollständig gehemmt werden.

Des Weiteren wurde die Wirkung von Itraconazol auf den Abbau von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  untersucht. Dabei konnte durch die Itraconazol/ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Kombinationsbehandlung von *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen eine signifikant stärkere - fast vollständige - Hemmung des Hh-Signalwegs im Vergleich zu den Einzelbehandlungen erreicht werden. Das weist auf einen kooperativen Effekt der beiden Substanzen hin. Durch die Einzelbehandlungen

konnte auch durch sehr hohe Konzentrationen von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder Itraconazol ein solcher Effekt hingegen nicht erzielt werden (vgl. Abbildung 6 und Abbildung 9).

Eine Hemmung der 24-Hydroxylaseaktivität durch Itraconazol wurde von Vanden Bossche *et al.* für das humane Plattenepithelkarzinom und Hepatom beschrieben (Vanden Bossche *et al.* 2004). Die starke Hemmung des Hh-Signalwegs durch die Itraconazol/ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Kombinationsbehandlung könnte daher durch eine verminderte Aktivität der 24-Hydroxylase vermittelt worden sein. Dies könnte zu einer verlängerten Halbwertszeit und erhöhten Konzentration von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  führen und dessen antitumorale Wirkung verstärken. Ähnliche Beobachtungen sind auch für andere Azole beschrieben worden. So verlängert Liarozol die Halbwertszeit von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und verbessert damit dessen wachstumshemmende Wirkung auf humane Prostatakarzinomzellen (Ly *et al.* 1999). Auch die kombinierte Behandlung mit Ketoconazol und  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  führte zu einer synergistischen Verstärkung der antiproliferativen und proapoptotischen  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Effekte *in vitro* und *in vivo* (Muindi *et al.* 2010).

Durch die verlängerte Halbwertszeit bzw. erhöhte Konzentration von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wäre jedoch im Rahmen eines positiven Feedbacks eine erhöhte Expression von *Cyp24a1* zu erwarten gewesen. Die *Cyp24a1*-Expression wurde aber durch die Kombinationsbehandlung weniger stark induziert als durch die Einzelbehandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Eine Aktivierung der 24-Hydroxylase durch Itraconazol als Ursache für die verminderte  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration und *Cyp24a1*-Expression ist unwahrscheinlich, da in der bisherigen Literatur ausschließlich eine Hemmung der Enzymaktivität durch Itraconazol in verschiedenen Zelllinien beschrieben wurde (Vanden Bossche *et al.* 2004). Das Ergebnis spricht daher für eine sehr geringe bzw. keine Hemmung der 24-Hydroxylaseaktivität durch Itraconazol.

Der kooperative Effekt durch die  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /Itraconazol-Kombination hinsichtlich der Hemmung des Hh-Signalwegs entsteht damit wahrscheinlich unabhängig von einer Regulation der 24-Hydroxylaseaktivität durch Itraconazol. Itraconazol könnte z.B. wie von Kim *et al.* vermutet, an Smo binden (Kim *et al.* 2010). Ob  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Itraconazol an unterschiedlichen Stellen oder an der gleichen Stelle an Smo binden, könnte beispielsweise mittels BODIPY-markiertem Substanzen und anschließenden Bindungsanalysen untersucht werden. Zur genauen Beurteilung der Wirkung von

Itraconazol auf die Aktivität der 24-Hydroxylase in diesen Zellen sind jedoch HPLC und massenspektroskopische Untersuchungen der  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Metabolite notwendig.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung von Itraconazol auf die Synthese von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aus  $25(\text{OH})\text{D}_3$  untersucht. Die Untersuchungen zeigten eine signifikant erhöhte Aktivität des Hh-Signalwegs nach Inkubation mit der  $25(\text{OH})\text{D}_3$ /Itraconazol-Kombination im Vergleich zur Einzelbehandlung mit  $25(\text{OH})\text{D}_3$ . Gleichzeitig wurde *Cyp24a1* schwächer exprimiert, was tatsächlich auf einen geringeren Umsatz von  $25(\text{OH})\text{D}_3$  zu  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und damit auf eine verminderte Aktivität der  $1\alpha$ -Hydroxylase hinweist. Damit können bereits veröffentlichte Daten bestätigt werden, die zeigten, dass Itraconazol die Aktivität der  $1\alpha$ -Hydroxylase und damit die Konversion von  $25(\text{OH})\text{D}_3$  zu  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inhibiert (Vanden Bossche *et al.* 2004; Hansdottir *et al.* 2008). Durch die verminderte Synthese könnte auch die Smo-inhibitorische Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und dadurch die Hemmung der *Gli1*-Expression abgeschwächt worden sein. Vergleicht man diese Daten mit den Untersuchungen zum  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Metabolismus in RMS Primärkulturen aus Kapitel 3.1.1, ist auch an dieser Stelle eine Korrelation der verminderten  $1\alpha$ -Hydroxylaseaktivität mit einer erhöhten Hh-Signalwegsaktivität zu erkennen (vgl. Abbildung 4).

Wie schon in den Versuchen zur  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese in primärkultivierten RMS ist wieder der mögliche Abbau von  $25(\text{OH})\text{D}_3$  zu  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  durch die 24-Hydroxylase bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten (vgl. Kapitel 4.1). Dieser „indirekte“ Weg nach Inkubation mit  $25(\text{OH})\text{D}_3$  führt, genau wie der „direkte“ Weg, zur Synthese von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aus  $25(\text{OH})\text{D}_3$  und zur vermehrten Transkription des Vdr-Zielgens *Cyp24a1*. Anhand der in Abbildung 8 dargestellten Ergebnisse zur *Cyp24a1*-Expression ist anzunehmen, dass auch dieser „indirekte“ Weg durch die Inkubation mit der  $25(\text{OH})\text{D}_3$ /Itraconazol-Kombination gehemmt wird und damit die Interpretation der Ergebnisse nicht beeinflusst. Die Ergebnisse bekräftigen daher die These, dass eine gestörte bzw. verminderte  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Synthese zur Aktivierung des Hh-Signalwegs in *Ptch*-defizienten Zellen beiträgt.

Zusammengefasst legen die Ergebnisse nahe, dass die Hh-inhibierende Wirkung von Itraconazol und  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  durch eine Kombinationsbehandlung mit beiden Substanzen verstärkt wird. Damit bietet die Kombination einen vielversprechenden Therapieansatz von *Ptch*-assoziierten Tumoren. Besonders interessant wäre dieser für die Behandlung von BCC, da sowohl die Therapie mit Itraconazol als auch mit Vitamin D bereits in klinischen

Studien der Phase II bzw. III untersucht wird (Kasper et al. 2012). Eine Kombination von Itraconazol mit 25(OH)D<sub>3</sub> ist dagegen laut der in dieser Arbeit erhobenen Daten für eine Therapie von Hh-assoziierten Tumoren nicht geeignet.

### 4.3 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und Cyclopamin im Vergleich

#### 4.3.1 Die duale Wirkung von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auf den Vdr- und den Hh-Signalweg

Es wird angenommen, dass das ein Vitamin D<sub>3</sub>-Derivat seine Hh-hemmende Wirkung ähnlich dem bekannten Smo-Inhibitor Cyclopamin entfaltet (Taipale *et al.* 2000; Bijlsma *et al.* 2006). Vorarbeiten der AG Hahn lassen vermuten, dass es sich bei diesem Vitamin D<sub>3</sub>-Derivat um 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> handeln könnte. Daher sollte die Wirkung von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und Cyclopamin auf den Hh-Signalweg von *Ptch*-defizienten Zellen miteinander verglichen und ein mögliches Zusammenwirken überprüft werden. Zunächst wurde die Hemmung des Hh-Signalwegs nach Inkubation mit ansteigenden 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>- und Cyclopaminkonzentrationen anhand der *Gli1*-Expression verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> den Hh-Signalweg in *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen potenter inhibierte als Cyclopamin, dabei konnte durch 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> aber keine vollständige Hemmung des Signalwegs erreicht werden konnte. Gleichzeitig wurde die Aktivität des Vdr-Signalwegs nach Inkubation mit 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> anhand der *Cyp24a1*-Expression untersucht. Dabei kam es, neben der dosisabhängigen Hemmung des Hh-Signalwegs, auch zu einer dosisabhängigen Aktivierung des Vdr-Signalwegs. Ein solcher, dualer Effekt von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auf den Vdr- und Hh-Signalweg wird ebenfalls für die Vermittlung der antiproliferativen und differenzierungsfördernden Wirkungen von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in der Behandlung von BCC vermutet (Uhmann *et al.* 2011a).

Ein möglicher Grund für die unvollständige Hemmung des Hh-Signalwegs durch 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> könnte in der erhöhten Aktivität oder autoregulatorischen Aktivierung der 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-abbauenden 24-Hydroxylase liegen. Eine verminderte bzw. nicht weiter ansteigende 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Konzentration in den Zellen wäre dann die Folge. Diese könnte verhindern, dass die für eine vollständige Hemmung des Hh-Signalwegs notwendige 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Konzentration in den Zellen erreicht wird. Für mehrere Tumorgewebe ist eine erhöhte *Cyp24a1*-Expression beschrieben worden, die dazu führt, dass 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> seine antitumoralen Wirkungen nur noch eingeschränkt entfalten kann (Friedrich *et al.* 2002; Fischer *et al.* 2009). *Cyp24a1* wird daher als potentiell Onkogen diskutiert (Albertson *et al.* 2000). Weiterhin ist die erhöhte Expression des Enzyms in

Tumorgewebe mit einer schlechteren Überlebenszeit von Krebspatienten verbunden (Mimori *et al.* 2004; Chen, G *et al.* 2011). Interessant wäre eine Analyse der 24-Hydroxylaseaktivität in den hier untersuchten *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen und in primärkultivierten RMS mittels Massenspektroskopie und HPLC. Eine erhöhte Aktivität der Hydroxylase könnte in diesen Zelllinien, neben der in den RMS Zellen vermuteten verminderten 1 $\alpha$ -Hydroxylaseaktivität, zu einer Herabsetzung der 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Konzentration und dadurch zu einer erhöhten Aktivität des Hh-Signalwegs in den Zellen beitragen.

Die in dieser Arbeit gewählten Konzentrationen von Cyclopamin und 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> erlaubten eine nur annähernde Darstellung der Wirkkurven und der IC<sub>50</sub>-Werte beider Substanzen. Auch die für die Erstellung der Kurven verwendete Software Excel (Microsoft) ist nicht für eine genaue Darstellung sigmoider Kurven geeignet. Daher sollten die in den Abbildung 9 und Abbildung 10 dargestellten Ergebnisse kritisch betrachtet werden. Um eine genauere Aussage treffen zu können, wäre es hilfreich, die Untersuchung um weitere Konzentrationen, die vor allem im Bereich der in dieser Arbeit berechneten IC<sub>50</sub>-Werte liegen, zu erweitern. Außerdem sollte eine andere Software zur Darstellung der Ergebnisse verwendet werden (z.B. SigmaPlot®).

Zusätzlich wurde das Zusammenwirken von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und Cyclopamin auf die Aktivität des Hh-Signalwegs untersucht. Durch die Inkubation der *Ptch*-defizienten Zellen mit verschiedenen Cyclopaminkonzentrationen in Kombination mit 1 nM 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> konnte für keine der untersuchten Konzentrationen eine signifikant stärkere Inhibierung als durch die Einzelbehandlung mit Cyclopamin erreicht werden. Ab einer Konzentration von 5  $\mu$ M Cyclopamin wurde eine vollständige Hemmung des Hh-Signalwegs sowohl durch die Einzel- als auch die Kombinationsbehandlung beobachtet. Durch die Kombination verschiedener 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Konzentrationen mit 750 nM Cyclopamin wurde der Hh-Signalweg bei einer Konzentration von 1 nM 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> signifikant stärker gehemmt als durch eine Einzelbehandlung mit 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass durch eine Kombination von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und Cyclopamin den Hh-Signalweg potenter inhibieren kann als die Einzelsubstanzen. Dieser kooperative Effekt der beiden Substanzen könnte beispielsweise zur Reduktion der zur Hemmung des Hh-Signalwegs benötigten Cyclopamindosis genutzt werden. Deswegen wäre es interessant zu untersuchen, ob eine 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Cyclopamin-Kombinationsbehandlung zu einer verminderten Proliferationsrate der *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen führt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ähnlich wie Cyclopamin an Smo bindet (vgl. Kapitel 3.2.2). Die verstärkte Hemmung des Hh-Signalwegs durch die Kombination beider Substanzen könnte dadurch zustande kommen, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Cyclopamin an unterschiedlichen Smo-Bindungsstellen ansetzen. Um den Mechanismus der kooperativen Interaktion beider Substanzen zu untersuchen, sind weitaus umfangreichere Untersuchungen notwendig. Zum Beispiel könnte man die Aktivität des Hh-Signalwegs messen, nachdem man die Zellen in parallelen Ansätzen mit ansteigenden Konzentrationen von Cyclopamin behandelt, wobei die Zellen pro Ansatz zusätzlich mit unterschiedlichen Konzentrationen  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  inkubiert werden. Dabei würde sich für jede verwendete  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration eine eigene Inhibitionskurve mit jeweils einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert ergeben. Bei der Beurteilung würde dann eine Verschiebung der Kurven nach rechts (also die Erhöhung ihrer  $\text{IC}_{50}$ -Werte) durch ansteigende  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentrationen für eine kompetitive Hemmung des Hh-Signalwegs sprechen. Findet keine Rechtsverschiebung der Inhibitionskurven statt, würde dies dafür sprechen, dass die Substanzen an unterschiedlichen Stellen binden, also nicht-kompetitiv wirken (Nachtergaele *et al.* 2012).

#### 4.3.2 Die Wirkung von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und Cyclopamin auf die BrdU-Inkorporation

Bisherige Untersuchungen führten zu der Vermutung, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  seine antiproliferative Wirkungen sowohl über die Aktivierung des Vdr- als auch durch Inhibierung des Hh-Signalweg entfaltet (Uhmann *et al.* 2011a). Deswegen sollte die antiproliferative Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  mit der von Cyclopamin an  $Vdr^{-/-}$ ,  $Ptch^{-/-}$ ,  $Smo^{-/-}$  und  $Sufu^{-/-}$  Zellen mittels BrdU-Inkorporations-Assays verglichen werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass die BrdU-Inkorporation der  $Vdr^{-/-}$ -,  $Ptch^{-/-}$ -, sowie  $Sufu^{-/-}$  Zellen sowohl durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  als auch durch Cyclopamin signifikant vermindert wurde. So hemmten sowohl Cyclopamin als auch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die BrdU-Inkorporation von  $Ptch$ -defizienten Zellen jeweils um ca. 60 %, diejenige von  $Vdr$ -defizienten Zellen um 20 %. Da  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in einer viel geringeren Konzentration (10 nM) als Cyclopamin (5  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt wurde, ist seine antiproliferative Wirkung bei gleichem Effekt stärker als die von Cyclopamin zu bewerten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen weiterhin im Einklang mit den von Dr. A. Uhmann durchgeführten BrdU-Analysen an RMS Primärkulturen, bei denen nach Inkubation mit 10 nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  etwa die gleiche proliferationshemmende Wirkung erreicht werden konnte, wie mit 5  $\mu\text{M}$  Cyclopamin. Die dabei durch Bestimmung der Caspase 3/7-Aktivität

analysierte Apoptoserate zeigte weiterhin, dass die Inkubation mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Cyclopamin in den untersuchten Zellen nicht zu einer erhöhten Apoptoserate führt (Uhmann *et al.* 2012). Diese Beobachtung spricht dafür, dass eine Abnahme der BrdU-Inkorporation auch in den hier untersuchten Zelllinien tatsächlich durch eine verminderte Proliferation der Zellen und nicht durch proapoptotische oder zytotoxische Effekte von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  oder Cyclopamin bedingt ist. Der Anteil apoptotischer Zellen bzw. die Zytotoxizität der verwendeten Substanzen wurden für die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien jedoch nicht untersucht (z.B. durch AnnexinV/PI-Färbungen oder MTT-Test). Weitere *in vitro* Untersuchungen der AG Hahn zeigten, dass die proliferationshemmende Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  stärker als die von Cyclopamin ist, obwohl die *Gli1*-Expression von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  schwächer gehemmt wurde als durch Cyclopamin (Uhmann *et al.* 2011a). Daher ist es möglich, dass die antiproliferativen Wirkungen von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vorrangig über die Aktivierung des Vdr-Signalwegs vermittelt werden.

Das Wachstumsverhalten der *Smo*<sup>-/-</sup> Zellen wurde von keiner der beiden untersuchten Substanzen beeinflusst. Da in den *Smo*<sup>-/-</sup> Zellen der Vdr-Signalweg durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  aktiviert wurde, hätte man in diesen Zellen einen wachstumshemmenden Effekt nach Inkubation mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  erwartet (vgl. Abbildung 15). Dies war jedoch nicht der Fall. Die Proliferation in *Sufu*<sup>-/-</sup> Zellen wurde sowohl durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  als auch durch Cyclopamin gehemmt. Da der Smo-Inhibitor den Hh-Signalweg in diesen Zellen nicht hemmen kann, weil Sufu unterhalb von Smo aktiv ist, weist das Ergebnis darauf hin, dass die beiden Substanzen eventuell über einen Sufu-unabhängigen Weg die Proliferation in diesen Zellen hemmen können.

#### 4.3.3 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hemmt den Hh-Signalweg vermutlich durch Bindung an Smo

Um zu untersuchen, ob auch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  den Hh-Signalweg über einen ähnlichen Mechanismus inhibiert wie Cyclopamin, wurde dessen Wirkung auf die *Gli1*-Expression von *Vdr*-, *Ptch*-, *Smo*- und *Sufu*-defizienten Zellen mit derjenigen von Cyclopamin verglichen.

Cyclopamin inhibierte erwartungsgemäß den Signalweg in *Ptch*<sup>-/-</sup>, nicht aber in *Smo*<sup>-/-</sup> und *Sufu*<sup>-/-</sup> Zellen (Chen, J K *et al.* 2002b; Svard *et al.* 2006; Varjosalo *et al.* 2006; Lauth *et al.* 2007).  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  hemmte den Hh-Signalweg in *Ptch*<sup>-/-</sup> und *Sufu*<sup>-/-</sup> Zellen, nicht aber in *Smo*<sup>-/-</sup> Zellen. Da die *Smo*<sup>-/-</sup> Zellen einen inaktiven Hh-Signalweg aufweisen, wurde die Aktivität der Kaskade in weiteren Untersuchungen der AG Hahn durch Transfektion des

hSMO Expressionsplasmids wiederhergestellt. Anschließend wurde die Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Cyclopamin erneut analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wie auch Cyclopamin nach Transfektion von hSMO den Hh-Signalweg in Smo-defizienten Zellen effektiv hemmen können. Das bekräftigt zunächst die Hypothese, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , ähnlich wie Vitamin  $\text{D}_3$  und Cyclopamin, an Smo binden und dadurch den Hh-Signalweg hemmen könnte (Uhmann *et al.* 2011a). Ob es tatsächlich an Smo bindet, sollte mittels BODIPY-markiertem  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und anschließenden Bindungsanalysen untersucht werden.

Interessanterweise weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  die *Gli1*-Expression zusätzlich über einen nicht-kanonischen und *Sufu*-unabhängigen Weg hemmen könnte. So konnte  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , nicht aber Cyclopamin, die *Gli1*-Expression in *Sufu*<sup>-/-</sup> Zellen signifikant senken. Das bedeutet, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  den Hh-Signalweg nicht nur auf der Ebene von Smo sondern auch unterhalb von Sufu hemmen könnte. Die Hemmung könnte über nicht-kanonische Wege, wie z.B. einer Vdr-unabhängigen Aktivierung der Proteinkinase C $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vermittelt werden. Eine solche Aktivierung ist in Osteoblasten und einer humanen Darmkrebszelllinie gezeigt worden (Khare *et al.* 1994; Wali *et al.* 2003). Da die PKC $\alpha$  auch einen inhibierenden Effekt auf die *Gli1*-mRNA und -Proteinlevel ausübt, wäre es möglich dass die  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -vermittelte Aktivierung dieser Proteinkinase in den *Sufu*<sup>-/-</sup> Zellen zu einer Hemmung von *Gli1* beigetragen hat (Neill *et al.* 2003).

Der Hh-Signalweg ist in den *Vdr*-defizienten Zellen nur sehr schwach aktiv (vgl. Abbildung 15). Der Anteil einer Vdr-abhängigen Hemmung des Hh-Signalwegs kann deswegen anhand der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse nicht abschließend beurteilt werden. In weiteren Untersuchungen der AG Hahn konnte jedoch gezeigt werden, dass der Hh-Signalweg in den *Vdr*<sup>-/-</sup> Zellen durch die Verwendung von Shh-konditioniertem Medium stimuliert werden kann. Die Aktivität des Signalwegs konnte dann sowohl durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  als auch durch Cyclopamin gehemmt werden. Nach einem Knockdown des Vdr durch si-RNA in *Ptch*-defizienten Zellen wurden ähnliche Ergebnisse erzielt: die *Gli1*-Expression wurde weiterhin durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  gehemmt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  den Hh-Signalweg Vdr-unabhängig hemmt (Uhmann *et al.* 2011a).

#### 4.4 Gli3 aktiviert die *Vdr*-Expression in *Gli*-defizienten Zellen

Ein mögliche Interaktion zwischen dem *Vdr*- und dem Hh-Signalweg ist die *Vdr*-vermittelte Inhibierung von Hh-Signalwegskomponenten durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Teichert *et al.* 2011; Bikle *et al.* 2012). Daneben ist aber auch eine Regulation der *Vdr*-Expression durch Zielgene des Hh-Signalwegs denkbar. Vorarbeiten der AG Hahn an wt *Ptch* Zelllinien wiesen darauf hin, dass die Überexpression der Hh-Zielgene *Gli1* bzw. *Gli1/Gli2* eine Repression der *Vdr*-Expression bewirken könnte (Dr. A. Uhmman, unveröffentlichte Daten). In dieser Arbeit sollte anhand *Gli*-defizienter Zelllinien geprüft werden, ob schon die endogene *Gli*-Expression einen Einfluss auf die Expression des *Vdr* ausübt. Zur Verfügung standen hierfür *Gli1*<sup>-/-</sup>, *Gli1*<sup>-/-</sup> *Gli2*<sup>-/-</sup> und *Gli2*<sup>-/-</sup> *Gli3*<sup>-/-</sup> Zelllinien.

Zunächst wurde die basale *Vdr*-Expression der Zelllinien beurteilt. Besonders auffällig war das signifikant niedrigere Expressionslevel der *Vdr*-Expression in den *Gli2*<sup>-/-</sup> *Gli3*<sup>-/-</sup> Zellen im Vergleich zu den *Gli1*<sup>-/-</sup> und *Gli1*<sup>-/-</sup> *Gli2*<sup>-/-</sup> Zelllinien. Das lässt vermuten, dass vor allem *Gli3* eine wichtige und vermutlich aktivierende Rolle bei der Regulation der *Vdr*-Expression spielen könnte.

Um diese Annahme zu bestätigen, wurden die *Gli*-defizienten Fibroblasten mit Expressionsplasmiden für die jeweils fehlenden *Gli*-Faktoren transfiziert. Dann wurde die Expression des *Vdr* mittels RT-PCR zu analysiert. Als Kontrolle dienten wt *Ptch* Zellen.

Aus den Analysen der *Gli*-Expressionslevel nach Transfektion der *Gli*-Faktoren geht zunächst hervor, dass *Gli2*<sup>-/-</sup> *Gli3*<sup>-/-</sup> Zellen neben der *Gli2*- und *Gli3*-Defizienz auch eine *Gli1*-Defizienz aufweisen. Dies wurde bereits in der Literatur beschrieben (Lei *et al.* 2004). Weiterhin konnte in diesen Zellen die *Gli2*-Abhängigkeit der *Gli1*-Expression bestätigt werden. Diese wird vermutlich durch die Bindung von *Gli2* an den *Gli1*-Promotor vermittelt (Regl *et al.* 2002; Ikram *et al.* 2004; Lipinski *et al.* 2006).

Die Analysen der *Vdr*-Expression nach der Transfektion der Faktoren *Gli1* und der Kombination *Gli1/Gli2* führten in den untersuchten Zelllinien zu keinem einheitlich signifikanten Ergebnis. Die vermutete Repression der *Vdr*-Expression durch *Gli1* bzw. *Gli1/Gli2* konnte daher nicht bestätigt werden.

Dagegen lassen die Ergebnisse eine hemmende Wirkung von *Gli2* auf die Rezeptorexpression vermuten. So zeigte sich nach Überexpression von *Gli2* in den wt *Ptch* und *Gli1*<sup>-/-</sup> *Gli2*<sup>-/-</sup> Zellen eine erniedrigte *Vdr*-Expression. In *Gli2*<sup>-/-</sup> *Gli3*<sup>-/-</sup> Zellen hingegen wurde die Expression des Rezeptors durch Transfektion von *Gli2* nicht gehemmt. Das

könnte allerdings durch das schon sehr niedrige basale *Vdr*-Expressionlevel in dieser Zelllinie bedingt sein, welches nicht weiter reprimiert werden kann (vgl. Abbildung 18).

Daneben weisen die Ergebnisse auf eine aktivierende Rolle von *Gli3* in der Regulation des *Vdr* hin. Die Überexpression von *Gli3* erhöhte die *Vdr*-Expression sowohl in den wt *Ptch* als auch in den *Gli2*<sup>-/-</sup> *Gli3*<sup>-/-</sup> Zellen. Auch durch die kombinierte Überexpression von *Gli2/Gli3* konnte in *Gli2*<sup>-/-</sup> *Gli3*<sup>-/-</sup> Zellen, jedoch nicht in den wt *Ptch* Zellen, eine signifikante Aktivierung erreicht werden. Diese Ergebnisse sind bemerkenswert, da *Gli3* vorrangig als Repressor von Hh-Zielgenen bekannt ist (Marigo *et al.* 1996b; Wang *et al.* 2000). Es sind jedoch auch einige aktivierende Funktionen von *Gli3* z.B. in der Neuralrohr-, Extremitäten- und Sklerotomentwicklung beschrieben (Buttitta *et al.* 2003; Bai *et al.* 2004; Bowers *et al.* 2012). Bisher ist der Mechanismus, mit dem *Gli3* seine aktivierende Wirkung entfaltet, allerdings unklar. Sie könnte durch eine direkte Aktivierung, das Zusammenspiel mit anderen Faktoren oder eine De-Repression der Zielgene vermittelt werden (Lipinski *et al.* 2006). Aus den im Rahmen dieser Arbeit gemachten Untersuchungen ist nicht ersichtlich, durch welchen Mechanismus *Gli3* zu einer erhöhten *Vdr*-Expression führt.

Ob eine erhöhte *Gli3*-Expression ursächlich für die beschriebene Überexpression des *Vdr* in *Ptch*-assoziierten BCC ist, könnte einen interessanten Aspekt weiterer Untersuchungen darstellen (Reichrath *et al.* 1999; Mitschele *et al.* 2004; Uhmman *et al.* 2011a). Die Erhöhung der *Vdr*-Expression auch auf Proteinebene mittels Western Blot Analysen zu prüfen, wäre ein mögliches Ziel anschließender Untersuchungen. Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass der *Vdr*-Promotor eine Bindestelle für *Gli*-Faktoren besitzt (A.Uhmman, unveröffentlichte Daten). Des Weiteren könnte mittels Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) geprüft werden, ob *Gli*-Transkriptionsfaktoren an der genomischen Region des *Vdr* binden.

Der Einfluss der Expression einzelner *Gli*-Faktoren auf proliferationshemmende Effekte von 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und Cyclopamin wurde mittels BrdU-Inkorporationsuntersuchungen der *Gli*-defizienten Zelllinien analysiert. Cyclopamin führte nur in den *Gli2*<sup>-/-</sup> *Gli3*<sup>-/-</sup> Zellen zu einer verminderten BrdU-Inkorporation. Da diese Zellen keinen der drei *Gli*-Transkriptionsfaktoren exprimieren und daher keine kanonische Hh-vermittelte Proliferationshemmung zu erwarten ist, kann vermutet werden, dass diese Hemmung, ähnlich wie schon für die *Sufu*<sup>-/-</sup> Zellen beschrieben, unabhängig vom kanonischen Hh-Signalweg vermittelt wurde (vgl. Kapitel 4.3.2).

Eine geringere BrdU-Inkorporation durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  konnte in  $\text{Gli1}^{-/-}$  und  $\text{Gli1}^{-/-} \text{Gli2}^{-/-}$  Zellen, nicht aber in  $\text{Gli2}^{-/-} \text{Gli3}^{-/-}$  Zellen, beobachtet werden. In letzterer ist, wie soeben beschrieben, eine Hh-vermittelte Proliferationshemmung nicht zu erwarten. Daneben führt die *Gli3*-Defizienz vermutlich auch - wie oben diskutiert - zur verminderten *Vdr*-Expression. Der *Vdr* ist aber für die Vermittlung der antiproliferativen Effekte von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  essentiell (Eelen *et al.* 2004; Wu *et al.* 2007). Daher ist eine Proliferationshemmung über den *Vdr*-Signalweg in dieser Zelllinie ebenfalls nicht möglich. Die Ergebnisse der BrdU-Inkorporationsanalysen weisen damit auf die wichtige Rolle von *Gli3* für eine adäquate *Vdr*-Expression und der daraus resultierenden  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /*Vdr*-vermittelten Regulation der Zellproliferation hin.

#### **4.5 Ein Therapiebeginn mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in einem frühen Tumorstadium hemmt das Wachstum von BCC schon bei kurzer Behandlungsdauer**

In der AG Hahn wurden *in vivo* Studien zur Untersuchung der Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf BCC durchgeführt. In verschiedenen Studien wurden die Effekte unterschiedlicher  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Dosierungen und eines Therapiebeginns in unterschiedlichen Tumorstadien auf die Proliferation, Differenzierung und Wachstum der BCC analysiert. In den durchgeführten Studien wurden die Tiere entweder direkt oder 40 bzw. 60 Tage nach Tumorinduktion mit 40 ng/kg/d oder 100 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelt. Alle Tiere wurden an Tag 90 nach Tumorinduktion abgetötet. Anschließend wurden die BCC histologisch und molekularbiologisch untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die entsprechenden BCC planimetrisch vermessen.

Die Messungen der mit 40 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten Tiere zeigten im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle signifikant kleinere Tumoren für alle untersuchten Behandlungszeiträume. Auch eine Behandlung mit 100 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  führte zur Reduktion der Tumorgroße, wenn die Therapie direkt nach Tumorinduktion oder 40 Tage danach begonnen wurde. Die Ergebnisse korrelieren mit, von anderen Mitarbeitern der AG Hahn parallel durchgeführten, anti-Ki67 immunhistologischen Färbungen die eine Abnahme der  $\text{Ki67}^+$ -Zellen in den behandelten Zellen zeigten (AG Hahn, unveröffentlichte Daten, (Uhmann *et al.* 2011a).

Aufgrund von in Vorarbeiten durchgeführten Expressionsanalysen des *Vdr*-Zielgens *Cyp24a1* muss davon ausgegangen werden, dass die Behandlung mit einer Konzentration von 40 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  für eine Aktivierung des *Vdr*-Signalwegs in den BCC nicht

ausreichend ist. Ebenso wenig wurde durch dieses Behandlungsschema eine Zelldifferenzierung, die ebenfalls über den Vdr-Signalweg vermittelt wird, induziert. Daher kann der antitumorale Effekt der mit 40 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten Tiere am ehesten auf eine Hemmung des Hh-Signalwegs zurückgeführt werden (Lammering 2011).

Weiterhin konnte in Vorarbeiten für die über 90 Tage (Behandlungsbeginn sofort nach Tumorinduktion) und 50 Tage (Behandlungsbeginn 40 Tage nach Tumorinduktion) mit 100 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten BCC eine Aktivierung des Vdr-Signalwegs nachgewiesen werden. Eine Hemmung des Hh-Signalwegs wurde nur für die über 90 Tage behandelten Tiere nachgewiesen. Daher kann angenommen werden, dass die signifikante Hemmung des Tumorwachstums in den entsprechenden Kohorten (Therapiebeginn sowohl sofort, als auch 40 Tage nach Tumorinduktion) maßgeblich über eine Vdr-vermittelte Proliferationshemmung vermittelt wird. Die beobachtete verstärkte Expression der Differenzierungsmarker und Vdr-Zielgene *Tgm1* und *K10* in den Hautproben spricht gleichermaßen für eine Vdr-vermittelte Wirkung (Uhmann *et al.* 2011a). Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die Verwendung einer Dosis von 100 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und ein Therapiebeginn in einem frühen Tumorstadium maßgeblich für die antiproliferativen und differenzierungsfördernden Wirkungen von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in BCC sind.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte zusätzlich untersucht werden, ob bei einem frühen Therapiebeginn kürzere Behandlungszeiträume ausreichen, um das Tumorwachstum zu hemmen. Hierzu wurden in *Ptch<sup>fllox/fllox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>* Tieren BCC induziert. Anschließend wurden die Tiere ab dem Tag der Tumorinduktion über 45 oder 60 Tage mit 100 ng/kg/d  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelt.

Der Gesundheitszustand der behandelten *Ptch<sup>fllox/fllox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>* Tiere wurde anhand der Gewichtsveränderungen im Verlauf der Studie beurteilt. Dabei fiel der Gewichtsanstieg über den gesamten Zeitraum in der Interventionsgruppe kleiner aus als in der Kontrollgruppe. In der Interventionsgruppe blieb das Gewicht ab Tag 35 der Behandlung in etwa konstant. Dies lässt auf eine geringe nachteilige Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  schließen. Im Rahmen einer ebenfalls durchgeführten *in vivo* Studie an *Ptch<sup>fllox/fllox</sup>* Tieren zur Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  auf Normalhaut wurde ebenfalls das Gewicht der Tiere über den Behandlungszeitraum beobachtet. Hierbei zeigte sich ein Anstieg des Gewichtes der mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten Tiere über den gesamten Zeitraum der Studie. Die mit

Lösungsmittel behandelten Tiere hingegen zeigten eine solche Gewichtszunahme nur bis etwa Tag 49 (Daten nicht gezeigt). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die geringere Gewichtszunahme der mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  behandelten *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup> Tiere tumor- und nicht  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -bedingt war.

Die anschließende Messung der Tumorareale an HE-Schnitten ergab eine Größenminderung der BCC für beide Zeiträume. Für die Behandlungsdauer von 60 Tagen, nicht aber von 45 Tagen, war diese im Vergleich zu den mit Lösungsmittel behandelten Tieren signifikant. Diese Daten führen zu der Annahme, dass die Dauer der Behandlung mit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  mit ausschlaggebend für den Erfolg der Therapie sein könnte.

Diese Beobachtungen sprechen insgesamt dafür, dass ein früher Therapiebeginn maßgeblich für die effektive antitumorale Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  in BCC ist. Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass auch schon kurze Behandlungszeiträume zu einer Wachstumshemmung der BCC führen. Es sind jedoch weitere histologische sowie molekularbiologische Analysen, wie bspw. die Bestimmung von Differenzierungs- und Apoptosemarkern und die Messung der Hh- und Vdr-Signalwegsaktivität in den dafür konservierten Hautproben nötig. Diese würden eine Aussage über die antitumoralen Wirkungen von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und einen detaillierten Vergleich mit den Ergebnissen der beiden anderen Studien zulassen.

## 5 Zusammenfassung

Der Hh-Signalweg ist an der Entstehung verschiedener Tumorentitäten beteiligt. Es wird vermutet, dass die Signalwegskomponente *Ptch* physiologischerweise als Oxysterolpumpe fungiert und ein Molekül, vermutlich ein Vitamin D<sub>3</sub>-Derivat, sezerniert und dadurch den Hh-Signalweg hemmt (Taipale et al. 2002; Bijlsma et al. 2006). Durch inaktivierende *Ptch*-Mutationen ist die Sekretion und damit die Hemmung des Hh-Signalwegs vermutlich gestört. Arbeiten der AG Hahn lassen vermuten, dass es sich bei dem sezernierten Vitamin D<sub>3</sub>-Derivat um 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> handeln könnte. Da 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> seine antitumorale Wirkung neben der Hemmung der Hh-Signalkaskade über die Aktivierung des Vdr-Signalwegs vermittelt, sollten in dieser Arbeit mögliche Schnittpunkte des Hh-, des Vdr-Signalwegs und des 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Metabolismus untersucht werden.

Zunächst ergaben die Untersuchungen, dass *Ptch*-defiziente RMS Zellen eine verminderte 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Synthese aufweisen könnten. Diese ist vermutlich durch eine herabgesetzte Aktivität der 1 $\alpha$ -Hydroxylase bedingt. Die dadurch verminderte 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Konzentration ist wahrscheinlich Ursache der gleichzeitig erhöhten Hh-Signalwegsaktivität in den Zellen. Dies bestätigten weitere Untersuchungen mit dem 1 $\alpha$ -Hydroxylaseinhibitor Itraconazol an *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen. Weiter konnte gezeigt werden, dass Itraconazol in Kombination mit 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> hinsichtlich der Hemmung des Hh-Signalwegs kooperiert. Die verstärkte Hemmung ist aber unabhängig von einer Itraconazol-abhängigen Minderung der 24-Hydroxylaseaktivität.

Zudem zeigten die Untersuchungen, dass 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> den Hh-Signalweg in *Ptch*<sup>-/-</sup> Zellen effizienter als Cyclopamin hemmt und gleichzeitig den Vdr-Signalweg aktiviert. Eine vollständige Hemmung der Hh-Signalkaskade wurde durch 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> jedoch nicht erreicht. Die Ursache dafür könnte in der erhöhten Aktivität der 24-Hydroxylase liegen, die zu einem erhöhten Abbau des Vitamins durch die 24-Hydroxylase führt.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auch mit Cyclopamin bezüglich der Hemmung der Hh-Signalkaskade kooperiert. Weitere Untersuchungen bekräftigen die Hypothese, dass 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, ähnlich wie Cyclopamin, an Smo bindet. Daneben weisen die Untersuchungen, dass 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> den Hh-Signalweg zusätzlich über einen nicht-kanonischen, Sufu-unabhängigen Weg hemmen könnte.

Transfektionsuntersuchungen an *Gli*-defizienten Zellen zeigten, dass Gli3 möglicherweise die *Vdr*-Expression reguliert.

Schließlich konnte im Tiermodell für BCC gezeigt werden, dass die antitumorale Wirkung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  am effektivsten ist, wenn die Substanz schon ab einem frühen Tumorstadium verabreicht wird.

## Literaturverzeichnis

- Adolphe C, Hetherington R, Ellis T, Wainwright B (2006): *Patched1 functions as a gatekeeper by promoting cell cycle progression* Cancer Res 66 (4) 2081-2088.
- Albertson D G, Ylstra B, Se Graves R, Collins C, Dairkee S H, Kowbel D, Kuo W L, Gray J W, Pinkel D (2000): *Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene* Nat Genet 25 (2) 144-146.
- Allen B L, Song J Y, Izzi L, Althaus I W, Kang J S, Charron F, Krauss R S, McMahon A P (2011): *Overlapping Roles and Collective Requirement for the Coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH Pathway Function* Dev Cell 20 (6) 775-787.
- Anderson M G, Nakane M, Ruan X, Kroeger P E, Wu-Wong J R (2006): *Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors* Cancer Chemother Pharmacol 57 (2) 234-240.
- Bai C B, Stephen D, Joyner A L (2004): *All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3* Dev Cell 6 (1) 103-115.
- Banerjee U, Ghosh M, Kyle Hadden M (2012): *Evaluation of vitamin D3 A-ring analogues as Hedgehog pathway inhibitors* Bioorg Med Chem Lett 22 (3) 1330-1334.
- Bauer R: *Untersuchung des transkriptionellen Mechanismus der Igf2- Überexpression in Patched-assoziierten Tumoren* Nat.Diss. Goettingen 2006
- Beckman M J, Tadikonda P, Werner E, Prahl J, Yamada S, DeLuca H F (1996): *Human 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase, a multicatalytic enzyme* Biochemistry 35 (25) 8465-8472.
- Beer T M, Ryan C W, Venner P M, Petrylak D P, Chatta G S, Ruether J D, Redfern C H, Fehrenbacher L, Saleh M N, Waterhouse D *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 (6) 669-674.
- Bhowmick N A, Moses H L (2005): *Tumor-stroma interactions* Curr Opin Genet Dev 15 (1) 97-101.
- Bigelow R L, Chari N S, Unden A B, Spurgers K B, Lee S, Roop D R, Toftgard R, McDonnell T J (2004): *Transcriptional regulation of bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through gli-1* J Biol Chem 279 (2) 1197-1205.

- Bijlsma M F, Spek C A, Zivkovic D, van de Water S, Rezaee F, Peppelenbosch M P (2006): *Repression of smoothened by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion* PLoS Biol 4 (8) e232.
- Bikle D D, Elalieh H, Welsh J, Oh D, Cleaver J, Teichert A (2012): *Protective role of vitamin D signaling in skin cancer formation* J Steroid Biochem Mol Biol.
- Binns W, James L F, Shupe J L, Everett G (1963): *A Congenital Cyclopien-Type Malformation in Lambs Induced by Maternal Ingestion of a Range Plant, Veratrum Californicum* Am J Vet Res 24 1164-1175.
- Blomberg Jensen M, Andersen C B, Nielsen J E, Bagi P, Jorgensen A, Juul A, Leffers H (2010): *Expression of the vitamin D receptor, 25-hydroxylases, 1alpha-hydroxylase and 24-hydroxylase in the human kidney and renal clear cell cancer* J Steroid Biochem Mol Biol 121 (1-2) 376-382.
- Boukamp P, Petrussevska R T, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig N E (1988): *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line* J Cell Biol 106 (3) 761-771.
- Bowers M, Eng L, Lao Z, Turnbull R K, Bao X, Riedel E, Mackem S, Joyner A L (2012): *Limb anterior-posterior polarity integrates activator and repressor functions of GLI2 as well as GLI3* Dev Biol 370 (1) 110-124.
- Buglino J A, Resh M D (2008): *Hhat is a palmitoylacyltransferase with specificity for N-palmitoylation of Sonic Hedgehog* J Biol Chem 283 (32) 22076-22088.
- Buttitta L, Mo R, Hui C C, Fan C M (2003): *Interplays of Gli2 and Gli3 and their requirement in mediating Shh-dependent sclerotome induction* Development 130 (25) 6233-6243.
- Calzada-Wack J, Kappler R, Schnitzbauer U, Richter T, Nathrath M, Rosemann M, Wagner S N, Hein R, Hahn H (2002): *Unbalanced overexpression of the mutant allele in murine Patched mutants* Carcinogenesis 23 (5) 727-734.
- Campbell F C, Xu H, El-Tanani M, Crowe P, Bingham V (2010): *The yin and yang of vitamin D receptor (VDR) signaling in neoplastic progression: operational networks and tissue-specific growth control* Biochem Pharmacol 79 (1) 1-9.
- Chen G, Kim S H, King A N, Zhao L, Simpson R U, Christensen P J, Wang Z, Thomas D G, Giordano T J, Lin *et al.* (2011): *CYP24A1 is an independent prognostic marker of survival in patients with lung adenocarcinoma* Clin Cancer Res 17 (4) 817-826.
- Chen J K, Taipale J, Cooper M K, Beachy P A (2002a): *Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened* Genes Dev 16 (21) 2743-2748.

- Chen J K, Taipale J, Young K E, Maiti T, Beachy P A (2002b): *Small molecule modulation of Smoothed activity* Proc Natl Acad Sci U S A 99 (22) 14071-14076.
- Chen K S, DeLuca H F (1995): *Cloning of the human 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements* Biochim Biophys Acta 1263 (1) 1-9.
- Chen T C (2008): *25-Hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase (CYP27B1) is a new class of tumor suppressor in the prostate* Anticancer Res 28 (4A) 2015-2017.
- Chen T C, Wang L, Whitlatch L W, Flanagan J N, Holick M F (2003): *Prostatic 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase and its implication in prostate cancer* J Cell Biochem 88 (2) 315-322.
- Cheng H, Merika E, Syrigos K N, Saif M W (2011): *Novel agents for the treatment of pancreatic adenocarcinoma. Highlights from the "2011 ASCO Annual Meeting". Chicago, IL, USA; June 3-7, 2011* JOP 12 (4) 334-338.
- Ching S, Kashinkunti S, Niehaus M D, Zinser G M (2011): *Mammary adipocytes bioactivate 25-hydroxyvitamin D and signal via vitamin D receptor, modulating mammary epithelial cell growth* J Cell Biochem 112 (11) 3393-3405.
- Civitelli R, Kim Y S, Gunsten S L, Fujimori A, Huskey M, Avioli L V, Hruska K A (1990): *Nongenomic activation of the calcium message system by vitamin D metabolites in osteoblast-like cells* Endocrinology 127 (5) 2253-2262.
- Cooper M K, Porter J A, Young K E, Beachy P A (1998): *Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling* Science 280 (5369) 1603-1607.
- Crawford J R, MacDonald T J, Packer R J (2007): *Medulloblastoma in childhood: new biological advances* Lancet Neurol 6 (12) 1073-1085.
- Dagher R, Helman L (1999): *Rhabdomyosarcoma: an overview* Oncologist 4 (1) 34-44.
- Davies J P, Chen F W, Ioannou Y A (2000): *Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein* Science 290 (5500) 2295-2298.
- Davis R J, D'Cruz C M, Lovell M A, Biegel J A, Barr F G (1994): *Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma* Cancer Res 54 (11) 2869-2872.
- Deeb K K, Trump D L, Johnson C S (2007): *Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics* Nat Rev Cancer 7 (9) 684-700.

- Diesel B, Radermacher J, Bureik M, Bernhardt R, Seifert M, Reichrath J, Fischer U, Meese E (2005): *Vitamin D(3) metabolism in human glioblastoma multiforme: functionality of CYP27B1 splice variants, metabolism of calcidiol, and effect of calcitriol* Clin Cancer Res 11 (15) 5370-5380.
- Dietel M, Suttorp N, Zeitz M H (Hrsg.): *Harrisons Innere Medizin*. 18. Auflage; ABW Verlag Berlin 2012.
- Duque A, Rakic P (2011): *Different effects of bromodeoxyuridine and [3H]thymidine incorporation into DNA on cell proliferation, position, and fate* J Neurosci 31 (42) 15205-15217.
- Dwyer J R, Sever N, Carlson M, Nelson S F, Beachy P A, Parhami F (2007): *Oxysterols are novel activators of the hedgehog signaling pathway in pluripotent mesenchymal cells* J Biol Chem 282 (12) 8959-8968.
- Ebert R, Jovanovic M, Ulmer M, Schneider D, Meissner-Weigl J, Adamski J, Jakob F (2004): *Down-regulation by nuclear factor kappaB of human 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase promoter* Mol Endocrinol 18 (10) 2440-2450.
- Echelard Y, Epstein D J, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon J A, McMahon A P (1993): *Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity* Cell 75 (7) 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 (5) 361-372.
- Eelen G, Verlinden L, van Camp M, van Hummelen P, Marchal K, de Moor B, Mathieu C, Carmeliet G, Bouillon R, Verstuyf A (2004): *The effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on the expression of DNA replication genes* J Bone Miner Res 19 (1) 133-146.
- Epstein E H (2008): *Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog* Nat Rev Cancer 8 (10) 743-754.
- Evangelista M, Tian H, de Sauvage F J (2006): *The hedgehog signaling pathway in cancer* Clin Cancer Res 12 (20 Pt 1) 5924-5928.
- Evans R M (1988): *The steroid and thyroid hormone receptor superfamily* Science 240 (4854) 889-895.
- Fernandez-Garcia N I, Palmer H G, Garcia M, Gonzalez-Martin A, del Rio M, Baretino D, Volpert O, Munoz A, Jimenez B (2005): *1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of Id1 and Id2 genes and the angiogenic phenotype of human colon carcinoma cells* Oncogene 24 (43) 6533-6544.

- Fischer D, Thome M, Becker S, Cordes T, Diedrich K, Friedrich M, Thill M (2009): *Expression of 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase in benign and malignant ovarian cell lines and tissue* Anticancer Res 29 (9) 3635-3639.
- Fraser D, Kooh S W, Kind H P, Holick M F, Tanaka Y, DeLuca H F (1973): *Pathogenesis of hereditary vitamin-D-dependent rickets. An inborn error of vitamin D metabolism involving defective conversion of 25-hydroxyvitamin D to 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D* N Engl J Med 289 (16) 817-822.
- Friedrich M, Villena-Heinsen C, Axt-Fliehdner R, Meyberg R, Tilgen W, Schmidt W, Reichrath J (2002): *Analysis of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in cervical tissue* Anticancer Res 22 (1A) 183-186.
- Gailani M R, Stahle-Backdahl M, Leffell D J, Glynn M, Zaphiropoulos P G, Pressman C, Uden A B, Dean M, Brash D E, Bale A E et al. (1996): *The role of the human homologue of Drosophila patched in sporadic basal cell carcinomas [see comments]* Nat Genet 14 (1) 78-81.
- Galili N, Davis R J, Fredericks W J, Mukhopadhyay S, Rauscher F J, 3rd, Emanuel B S, Rovera G, Barr F G (1993): *Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma* Nat Genet 5 (3) 230-235.
- Gorham E D, Garland C F, Garland F C, Grant W B, Mohr S B, Lipkin M, Newmark H L, Giovannucci E, Wei M, Holick M F (2007): *Optimal vitamin D status for colorectal cancer prevention: a quantitative meta analysis* Am J Prev Med 32 (3) 210-216.
- Hager G, Formanek M, Gedlicka C, Thurnher D, Knerer B, Kornfehl J (2001): *1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D3 induces elevated expression of the cell cycle-regulating genes P21 and P27 in squamous carcinoma cell lines of the head and neck* Acta Otolaryngol 121 (1) 103-109.
- Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos P G, Gailani M R, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Uden A B, Gillies S et al. (1996): *Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome* Cell 85 (6) 841-851.
- Hahn H, Wojnowski L, Zimmer A M, Hall J, Miller G, Zimmer A (1998): *Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome* Nature Med 4 619-622.
- Halperin E C, Friedman H S (1996): *Is there a correlation between duration of presenting symptoms and stage of medulloblastoma at the time of diagnosis?* Cancer 78 (4) 874-880.
- 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 (1) 32-41.

- Hansdottir S, Monick M M, Hinde S L, Lovan N, Look D C, Hunninghake G W (2008): *Respiratory epithelial cells convert inactive vitamin D to its active form: potential effects on host defense* J Immunol 181 (10) 7090-7099.
- Haussler M R, Whitfield G K, Haussler C A, Hsieh J C, Thompson P D, Selznick S H, Dominguez C E, Jurutka P W (1998): *The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed* J Bone Miner Res 13 (3) 325-349.
- Heretsch P, Tzagkaroulaki L, Giannis A (2010): *Modulators of the hedgehog signaling pathway* Bioorg Med Chem 18 (18) 6613-6624.
- Hershberger P A, Modzelewski R A, Shurin Z R, Rueger R M, Trump D L, Johnson C S (1999): *1,25-Dihydroxycholecalciferol (1,25-D3) inhibits the growth of squamous cell carcinoma and down-modulates p21(Waf1/Cip1) in vitro and in vivo* Cancer Res 59 (11) 2644-2649.
- Hobaus J, Thiem U, Hummel D M, Kallay E (2013): *Role of Calcium, Vitamin D, and the Extrarenal Vitamin D Hydroxylases during Carcinogenesis* Anticancer Agents Med Chem.
- Hsu J Y, Feldman D, McNeal J E, Peehl D M (2001): *Reduced 1alpha-hydroxylase activity in human prostate cancer cells correlates with decreased susceptibility to 25-hydroxyvitamin D3-induced growth inhibition* Cancer Res 61 (7) 2852-2856.
- Huang D C, Papavasiliou V, Rhim J S, Horst R L, Kremer R (2002): *Targeted disruption of the 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene in ras-transformed keratinocytes demonstrates that locally produced 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses growth and induces differentiation in an autocrine fashion* Mol Cancer Res 1 (1) 56-67.
- Huh W W, Skapek S X (2010): *Childhood rhabdomyosarcoma: new insight on biology and treatment* Curr Oncol Rep 12 (6) 402-410.
- Ikram M S, Neill G W, Regl G, Eichberger T, Frischauf A M, Aberger F, Quinn A, Philpott M (2004): *GLI2 is expressed in normal human epidermis and BCC and induces GLI1 expression by binding to its promoter* J Invest Dermatol 122 (6) 1503-1509.
- Ingham P W, McMahon A P (2001): *Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles* Genes Dev 15 (23) 3059-3087.
- Ingham P W, Taylor A M, Nakano Y (1991): *Role of the Drosophila patched gene in positional signalling* Nature 353 (6340) 184-187.
- Ioannou Y A (2000): *The structure and function of the Niemann-Pick C1 protein* Mol Genet Metab 71 (1-2) 175-181.

- Johnson R L, Rothman A L, Xie J, Goodrich L V, Bare J W, Bonifas J M, Quinn A G, Myers R M, Cox D R, Epstein E H, Jr.*et al.* (1996): *Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome* Science 272 (5268) 1668-1671.
- Jones G, Strugnell S A, DeLuca H F (1998): *Current understanding of the molecular actions of vitamin D* Physiol Rev 78 (4) 1193-1231.
- Kajikawa M, Ishida H, Fujimoto S, Mukai E, Nishimura M, Fujita J, Tsuura Y, Okamoto Y, Norman A W, Seino Y (1999): *An insulinotropic effect of vitamin D analog with increasing intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in pancreatic beta-cells through nongenomic signal transduction* Endocrinology 140 (10) 4706-4712.
- Kasper M, Jaks V, Hohl D, Toftgard R (2012): *Basal cell carcinoma - molecular biology and potential new therapies* J Clin Invest 122 (2) 455-463.
- Kasper M, Regl G, Frischauf A M, Aberger F (2006): *GLI transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signalling* Eur J Cancer 42 (4) 437-445.
- Khadzkou K, Buchwald P, Westin G, Dralle H, Akerstrom G, Hellman P (2006): *25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor expression in papillary thyroid carcinoma* J Histochem Cytochem 54 (3) 355-361.
- Khare S, Tien X Y, Wilson D, Wali R K, Bissonnette B M, Scaglione-Sewell B, Sitrin M D, Brasitus T A (1994): *The role of protein kinase-C alpha in the activation of particulate guanylate cyclase by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in CaCo-2 cells* Endocrinology 135 (1) 277-283.
- Kim J, Tang J Y, Gong R, Kim J, Lee J J, Clemons K V, Chong C R, Chang K S, Fereshteh M, Gardner Det *al.* (2010): *Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth* Cancer Cell 17 (4) 388-399.
- Kizildag S, Ates H (2010): *Treatment of K562 cells with 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> induces distinct alterations in the expression of apoptosis-related genes BCL2, BAX, BCLXL, and p21* Ann Hematol 89 (1) 1-7.
- Lammering I B: *1alpha,25-Dihydroxy-VitaminD<sub>3</sub> hemmt das Wachstum von Patched-assoziierten Rhabdomyosarkomen und Basaliomen*. Med. Diss. Göttingen 2011
- Lauth M, Bergstrom A, Toftgard R (2007): *Phorbol esters inhibit the Hedgehog signalling pathway downstream of Suppressor of Fused, but upstream of Gli* Oncogene 26 (35) 5163-5168.
- Lauth M, Toftgard R (2007): *Non-canonical activation of GLI transcription factors: implications for targeted anti-cancer therapy* Cell Cycle 6 (20) 2458-2463.

- Lehmann B (1997): *HaCaT cell line as a model system for vitamin D3 metabolism in human skin* J Invest Dermatol 108 (1) 78-82.
- Lei Q, Zelman A K, Kuang E, Li S, Matise M P (2004): *Transduction of graded Hedgehog signaling by a combination of Gli2 and Gli3 activator functions in the developing spinal cord* Development 131 (15) 3593-3604.
- Li Y C, Pirro A E, Amling M, Delling G, Baron R, Bronson R, Demay M B (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 (18) 9831-9835.
- Lin R, Wang T T, Miller W H, Jr., White J H (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 (3) 749-753.
- Lin T L, Matsui W (2012): *Hedgehog pathway as a drug target: Smoothened inhibitors in development* Onco Targets Ther 5 47-58.
- Lipinski R J, Bijlsma M F, Gipp J J, Podhaizer D J, Bushman W (2008a): *Establishment and characterization of immortalized Gli-null mouse embryonic fibroblast cell lines* BMC Cell Biol 9 49.
- Lipinski R J, Gipp J J, Zhang J, Doles J D, Bushman W (2006): *Unique and complimentary activities of the Gli transcription factors in Hedgehog signaling* Exp Cell Res 312 (11) 1925-1938.
- Lipinski R J, Hutson P R, Hannam P W, Nydza R J, Washington I M, Moore R W, Girdaukas G G, Peterson R E, Bushman W (2008b): *Dose- and route-dependent teratogenicity, toxicity, and pharmacokinetic profiles of the hedgehog signaling antagonist cyclopamine in the mouse* Toxicol Sci 104 (1) 189-197.
- Liu M, Lee M H, Cohen M, Bommakanti M, Freedman L P (1996): *Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937* Genes Dev 10 (2) 142-153.
- Lo Muzio L (2008): *Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome)* Orphanet J Rare Dis 3 32.
- Ly L H, Zhao X Y, Holloway L, Feldman D (1999): *Liarozole acts synergistically with 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 to inhibit growth of DU 145 human prostate cancer cells by blocking 24-hydroxylase activity* Endocrinology 140 (5) 2071-2076.
- MacDonald P N, Dowd D R, Nakajima S, Galligan M A, Reeder M C, Haussler C A, Ozato K, Haussler M R (1993): *Retinoid X receptors stimulate and 9-cis retinoic acid inhibits 1,25-*

- dihydroxyvitamin D3-activated expression of the rat osteocalcin gene* Mol Cell Biol 13 (9) 5907-5917.
- Mancuso M, Pazzaglia S, Tanori M, Hahn H, Merola P, Rebessi S, Atkinson M J, 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 (3) 934-941.
- Mangelsdorf D J, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P *et al.* (1995): *The nuclear receptor superfamily: the second decade* Cell 83 (6) 835-839.
- Marigo V, Davey R A, Zuo Y, Cunningham J M, Tabin C J (1996a): *Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor* Nature 384 (6605) 176-179.
- Marigo V, Johnson R L, Vortkamp A, Tabin C J (1996b): *Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development* Dev Biol 180 (1) 273-283.
- Mas C, Ruiz i Altaba A (2010): *Small molecule modulation of HH-GLI signaling: current leads, trials and tribulations* Biochem Pharmacol 80 (5) 712-723.
- McCarthy K, Laban C, Bustin S A, Ogunkolade W, Khalaf S, Carpenter R, Jenkins P J (2009): *Expression of 25-hydroxyvitamin D-1-alpha-hydroxylase, and vitamin D receptor mRNA in normal and malignant breast tissue* Anticancer Res 29 (1) 155-157.
- Mehta R G, Mehta R R (2002): *Vitamin D and cancer* J Nutr Biochem 13 (5) 252-264.
- Miller D L, Weinstock M A (1994): *Nonmelanoma skin cancer in the United States: incidence* J Am Acad Dermatol 30 (5 Pt 1) 774-778.
- Mimori K, Tanaka Y, Yoshinaga K, Masuda T, Yamashita K, Okamoto M, Inoue H, Mori M (2004): *Clinical significance of the overexpression of the candidate oncogene CYP24 in esophageal cancer* Ann Oncol 15 (2) 236-241.
- Mitschele T, Diesel B, Friedrich M, Meineke V, Maas R M, Gartner B C, Kamradt J, Meese E, Tilgen W, Reichrath J (2004): *Analysis of the vitamin D system in basal cell carcinomas (BCCs)* Lab Invest 84 (6) 693-702.
- Muindi J R, Yu W D, Ma Y, Engler K L, Kong R X, Trump D L, Johnson C S (2010): *CYP24A1 inhibition enhances the antitumor activity of calcitriol* Endocrinology 151 (9) 4301-4312.
- Nachtergaele S, Mydock L K, Krishnan K, Rammohan J, Schlesinger P H, Covey D F, Rohatgi R (2012): *Oxysterols are allosteric activators of the oncoprotein Smoothed* Nat Chem Biol 8 (2) 211-220.

- Neill G W, Ghali L R, Green J L, Ikram M S, Philpott M P, Quinn A G (2003): *Loss of protein kinase Calpha expression may enhance the tumorigenic potential of Gli1 in basal cell carcinoma* Cancer Res 63 (15) 4692-4697.
- Nemere I, Dormanen M C, Hammond M W, Okamura W H, Norman A W (1994): *Identification of a specific binding protein for 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in basal-lateral membranes of chick intestinal epithelium and relationship to transcaltachia* J Biol Chem 269 (38) 23750-23756.
- Nitzki F: *Patched-assoziierte Tumoren: Modifikatorgene und Pathogenese*. rer. nat. Diss. Goettingen 2008
- Nitzki F, Zibat A, König S, Wijgerde M, Rosenberger A, Brembeck F H, Carstens P-O, Frommhold A, Uhmann A, Klingler Set al. (2010): *Tumor stroma-derived Wnt5a induces differentiation of basal cell carcinoma of Ptch mutant mice via CaMKII* Cancer Res 70 (7) 2739-2748.
- Nusslein-Volhard C, Wieschaus E (1980): *Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila* Nature 287 (5785) 795-801.
- Omdahl J L, Bobrovnikova E A, Choe S, Dwivedi P P, May B K (2001): *Overview of regulatory cytochrome P450 enzymes of the vitamin D pathway* Steroids 66 (3-5) 381-389.
- Palmer H G, Gonzalez-Sancho J M, Espada J, Berciano M T, Puig I, Baulida J, Quintanilla M, Cano A, de Herreros A G, Lafarga Met al. (2001): *Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling* J Cell Biol 154 (2) 369-387.
- Pepinsky R B, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker D P, Williams K P, Bixler S A, Ambrose C M, Garber E A, Miatkowski Ket al. (1998): *Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog* J Biol Chem 273 (22) 14037-14045.
- Pressey J G, Anderson J R, Crossman D K, Lynch J C, Barr F G (2011): *Hedgehog pathway activity in pediatric embryonal rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma: A report from the Children's Oncology Group* Pediatr Blood Cancer 57 (6) 930-938.
- Regl G, Neill G W, Eichberger T, Kasper M, Ikram M S, Koller J, Hintner H, Quinn A G, Frischauf A M, Aberger F (2002): *Human GLI2 and GLI1 are part of a positive feedback mechanism in Basal Cell Carcinoma* Oncogene 21 (36) 5529-5539.
- Reichrath J, Kamradt J, Zhu X H, Kong X F, Tilgen W, Holick M F (1999): *Analysis of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptors (VDR) in basal cell carcinomas* Am J Pathol 155 (2) 583-589.

- Richards D A, Stephenson J, Wolpin B M, Becerra C, Turner Hamm J, Messersmith W A, Devens S, Cushing J, Schmalbach T, Fuchs C S (2012): *A phase Ib trial of IPI-926, a hedgehog pathway inhibitor, plus gemcitabine in patients with metastatic pancreatic cancer*. *J Clin Oncol* 30 (suppl 4) abstract 213.
- Robbins D J, Fei D L, Riobo N A (2012): *The Hedgehog signal transduction network* *Sci Signal* 5 (246) re6.
- Roewert-Huber J, Lange-Asschenfeldt B, Stockfleth E, Kerl H (2007): *Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma* *Br J Dermatol* 157 Suppl 2 47-51.
- Rohatgi R, Milenkovic L, Corcoran R B, Scott M P (2009): *Hedgehog signal transduction by Smoothed: pharmacologic evidence for a 2-step activation process* *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (9) 3196-3201.
- Rohatgi R, Scott M P (2007): *Patching the gaps in Hedgehog signalling* *Nat Cell Biol* 9 (9) 1005-1009.
- Roskies M, Dolev Y, Caglar D, Hier M P, Mlynarek A, Majdan A, Payne R J (2012): *Vitamin D deficiency as a potentially modifiable risk factor for thyroid cancer* *J Otolaryngol Head Neck Surg* 41 (3) 160-163.
- Roy S, Ingham P W (2002): *Hedgehogs tryst with the cell cycle* *J Cell Sci* 115 (Pt 23) 4393-4397.
- Rubin L L, de Sauvage F J (2006): *Targeting the Hedgehog pathway in cancer* *Nat Rev Drug Discov* 5 (12) 1026-1033.
- Ryan K E, Chiang C (2012): *Hedgehog secretion and signal transduction in vertebrates* *J Biol Chem* 287 (22) 17905-17913.
- Scales S J, de Sauvage F J (2009): *Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy* *Trends Pharmacol Sci* 30 (6) 303-312.
- Schwartz G G, Whitlatch L W, Chen T C, Lokeshwar B L, Holick M F (1998): *Human prostate cells synthesize 1,25-dihydroxyvitamin D3 from 25-hydroxyvitamin D3* *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7 (5) 391-395.
- Seifert M, Tilgen W, Reichrath J (2009): *Expression of 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase (1alphaOHase, CYP27B1) splice variants in HaCaT keratinocytes and other skin cells: modulation by culture conditions and UV-B treatment in vitro* *Anticancer Res* 29 (9) 3659-3667.

- Shabahang M, Buras R R, Davoodi F, Schumaker L M, Nauta R J, Evans S R (1993): *1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor as a marker of human colon carcinoma cell line differentiation and growth inhibition* *Cancer Res* 53 (16) 3712-3718.
- Sheng T, Li C, Zhang X, Chi S, He N, Chen K, McCormick F, Gatalica Z, Xie J (2004): *Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer* *Mol Cancer* 3 29.
- Simboli-Campbell M, Narvaez C J, van Weelden K, Tenniswood M, Welsh J (1997): *Comparative effects of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and EB1089 on cell cycle kinetics and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells* *Breast Cancer Res Treat* 42 (1) 31-41.
- Sorensen P H, Lynch J C, Qualman S J, Tirabosco R, Lim J F, Maurer H M, Bridge J A, Crist W M, Triche T J, Barr F G (2002): *PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group* *J Clin Oncol* 20 (11) 2672-2679.
- Stone D M, Hynes M, Armanini M, Swanson T A, Gu Q, Johnson R L, Scott M P, Pennica D, Goddard A, Phillips H *et al.* (1996): *The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog [see comments]* *Nature* 384 (6605) 129-134.
- Sun J, Kong J, Duan Y, Szeto F L, Liao A, Madara J L, Li Y C (2006): *Increased NF-kappaB activity in fibroblasts lacking the vitamin D receptor* *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291 (2) E315-322.
- Svard J, Heby-Henricson K, Persson-Lek M, Rozell B, Lauth M, Bergstrom A, Ericson J, Toftgard R, Teglund S (2006): *Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway* *Dev Cell* 10 (2) 187-197.
- Taipale J, Chen J K, Cooper M K, Wang B, Mann R K, Milenkovic L, Scott M P, Beachy P A (2000): *Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine* *Nature* 406 (6799) 1005-1009.
- Taipale J, Cooper M K, Maiti T, Beachy P A (2002): *Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed* *Nature* 418 (6900) 892-897.
- Tang J Y, So P L, Epstein E H, Jr. (2007): *Novel Hedgehog pathway targets against basal cell carcinoma* *Toxicol Appl Pharmacol* 224 (3) 257-264.
- Teichert A E, Elalieh H, Elias P M, Welsh J, Bikle D D (2011): *Overexpression of hedgehog signaling is associated with epidermal tumor formation in vitamin D receptor-null mice* *J Invest Dermatol* 131 (11) 2289-2297.

- Tenzen T, Allen B L, Cole F, Kang J S, Krauss R S, McMahon A P (2006): *The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of the Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice* Dev Cell 10 (5) 647-656.
- Tlsty T D (2001): *Stromal cells can contribute oncogenic signals* Semin Cancer Biol 11 (2) 97-104.
- Tokh M, Bathini V, Saif M W (2012): *First-line treatment of metastatic pancreatic cancer* JOP 13 (2) 159-162.
- Tostar U, Malm C J, Meis-Kindblom J M, Kindblom L G, Toftgard R, Uden A B (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 (1) 17-25.
- Uhmann A, Dittmann K, Nitzki F, Dressel R, Koleva M, Frommhold A, Zibat A, Binder C, Adham I, Nitsche Met al. (2007): *The Hedgehog receptor Patched controls lymphoid lineage commitment* Blood 110 (6) 1814-1823.
- Uhmann A, Niemann H, Lammering B, Henkel C, Hess I, Nitzki F, Fritsch A, Prufer N, Rosenberger A, Dullin Cet al. (2011a): *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 (11) 2179-2188.
- Uhmann A, Niemann H, Lammering B, Henkel C, Hess I, Rosenberger A, Dullin C, Schraepler A, Schulz-Schaeffer W, Hahn H (2012): *Calcitriol inhibits hedgehog signaling and induces vitamin d receptor signaling and differentiation in the patched mouse model of embryonal rhabdomyosarcoma* Sarcoma 2012 357040.
- Uhmann A, van den Brandt J, Dittmann K, Hess I, Dressel R, Binder C, Luhder F, Christiansen H, Fassnacht M, Bhandoola Aet al. (2011b): *T cell development critically depends on prethymic stromal patched expression* J Immunol 186 (6) 3383-3391.
- Vanden Bossche H (1985): *Biochemical targets for antifungal azole derivatives: hypothesis on the mode of action* Curr Top Med Mycol 1 313-351.
- Vanden Bossche H, Ausma J, Bohets H, Vermuyten K, Willemsens G, Marichal P, Meerpoel L, Odds F, Borgers M (2004): *The novel azole R126638 is a selective inhibitor of ergosterol synthesis in Candida albicans, Trichophyton spp., and Microsporum canis* Antimicrob Agents Chemother 48 (9) 3272-3278.
- Varjosalo M, Li S P, Taipale J (2006): *Divergence of hedgehog signal transduction mechanism between Drosophila and mammals* Dev Cell 10 (2) 177-186.

- Verstuyf A, Carmeliet G, Bouillon R, Mathieu C (2010): *Vitamin D: a pleiotropic hormone* *Kidney Int* 78 (2) 140-145.
- Wali R K, Kong J, Sitrin M D, Bissonnette M, Li Y C (2003): *Vitamin D receptor is not required for the rapid actions of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> to increase intracellular calcium and activate protein kinase C in mouse osteoblasts* *J Cell Biochem* 88 (4) 794-801.
- Wang B, Fallon J F, Beachy P A (2000): *Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb* *Cell* 100 (4) 423-434.
- Wu-Wong J R, Chen Y W, Nakane M, Wolf M (2011): *Differential effects of vitamin d receptor agonists on gene expression in neonatal rat cardiomyocytes* *Cardiovasc Drugs Ther* 25 (3) 215-222.
- Wu W, Zhang X, Zanello L P (2007): *1alpha,25-Dihydroxyvitamin D(3) antiproliferative actions involve vitamin D receptor-mediated activation of MAPK pathways and AP-1/p21(waf1) upregulation in human osteosarcoma* *Cancer Lett* 254 (1) 75-86.
- Xu H M, Tepper C G, Jones J B, Fernandez C E, Studzinski G P (1993): *1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> protects HL60 cells against apoptosis but down-regulates the expression of the bcl-2 gene* *Exp Cell Res* 209 (2) 367-374.
- Yin L, Grandi N, Raum E, Haug U, Arndt V, Brenner H (2009): *Meta-analysis: longitudinal studies of serum vitamin D and colorectal cancer risk* *Aliment Pharmacol Ther* 30 (2) 113-125.
- Yuan Z, Goetz J A, Singh S, Ogden S K, Petty W J, Black C C, Memoli V A, Dmitrovsky E, Robbins D J (2007): *Frequent requirement of hedgehog signaling in non-small cell lung carcinoma* *Oncogene* 26 (7) 1046-1055.
- Zaphiropoulos P G, Uden A B, Rahnema F, Hollingsworth R E, Toftgard R (1999): *PTCH2, a novel human patched gene, undergoing alternative splicing and up-regulated in basal cell carcinomas* *Cancer Res* 59 (4) 787-792.
- Zehnder D, Bland R, Williams M C, McNinch R W, Howie A J, Stewart P M, Hewison M (2001): *Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase* *J Clin Endocrinol Metab* 86 (2) 888-894.
- Zibat A, Missiaglia E, Rosenberger A, Pritchard-Jones K, Shipley J, Hahn H, Fulda S (2010): *Activation of the hedgehog pathway confers a poor prognosis in embryonal and fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma* *Oncogene* 29 (48) 6323-6330.
- Zibat A, Uhmann A, Nitzki F, Wijgerde M, Frommhold A, Heller T, Armstrong V, Wojnowski L, Quintanilla-Martinez L, Reifenberger *et al.* (2009): *Time-point and dosage of gene*

*inactivation determine the tumor spectrum in conditional Ptch knockouts* Carcinogenesis 30 (6) 918-926.

Zierold C, Darwish H M, DeLuca H F (1995): *Two vitamin D response elements function in the rat 1,25-dihydroxyvitamin D 24-hydroxylase promoter* J Biol Chem 270 (4) 1675-1678.

Zinser G M, 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 (1-2) 153-164.

Zinser G M, Sundberg J P, Welsh J (2002): *Vitamin D(3) receptor ablation sensitizes skin to chemically induced tumorigenesis* Carcinogenesis 23 (12) 2103-2109.

## **Danksagung**

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

Mein Dank gilt vor allem Frau Prof. Dr. med. Heidi Hahn dafür, dass sie mir die Anfertigung meiner Dissertation zu diesem interessanten Thema ermöglicht hat und mich dabei so engagiert und intensiv betreut hat.

Ebenso möchte ich Frau Dr. rer. nat. Anja Uhmann für die hervorragende, herzliche Betreuung sowie die unersetzbare, stets geduldige und verlässliche Unterstützung danken. Mein Dank gilt außerdem Ina Heß und Anke Frommhold, für die unermüdliche Hilfsbereitschaft und ihre Engelsgeduld während meiner Einarbeitungsphase und darüber hinaus.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. H. Hahn für ihre Herzlichkeit, ihre Hilfsbereitschaft, die netten Mittagspausen, die gemeinsamen Stadtläufe und den Austausch mit Ihnen bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei dem gesamten Team des Tierstalls des Instituts für Humangenetik, insbesondere bei Stefan Wolf und Susan Peter, für die hervorragende Tierhaltung bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt Anna Milena Euler, Simone Lang und Susanne Schmidt für ihre Unterstützung bei der Recherche und dem Verfassen dieser Arbeit.

Ich möchte Jan danken, der mich auf einem wichtigen Stück dieser Arbeit begleitet und mir den nötigen Rückhalt gegeben hat. Ihm danke ich auch für die wertvollen Gespräche über die ethischen Aspekte meiner Untersuchungen an Tieren.

Besonderen Dank gilt meiner Mutter und Frank sowie meinen Geschwistern Clara und Jacob für eure Unterstützung, eure Ratschläge und eure Hilfe, die mir das Schreiben dieser Arbeit ermöglicht haben und dafür, dass ihre meine „kleine“ Leipziger Familie seid.

## Lebenslauf

Ich wurde am 8. Januar 1984 als Tochter von Ute und Heiko Fritsch in Zwenkau geboren. Nach unserem Umzug nach Leipzig wuchs ich gemeinsam mit meinem jüngeren Bruder Jacob im Stadtteil Neustadt-Neuschönefeld auf. Dort besuchte ich von 1990 bis 1994 die August-Bebel-Grundschule Leipzig. Anschließend war ich Schülerin im vertieft mathematisch-naturwissenschaftlichen Profil des Wilhelm-Ostwald-Gymnasium Leipzig. Nach einem Schulwechsel 1999 legte ich 2002 am Immanuel-Kant-Gymnasium Leipzig mein Abitur ab.

Zunächst absolvierte ich einen einjährigen Freiwilligendienst in der Einrichtung „Les Sources“ für geistig behinderte Erwachsene in Orbey, Frankreich. Danach studierte ich von 2004 bis 2005 Rechtswissenschaft an der Universität Konstanz.

Im Frühjahr 2006 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. 2008 absolvierte ich den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Im Februar 2010 begann ich mit den Untersuchungen für meine Dissertation im Labor der AG Entwicklungsgenetik von Frau Prof. Dr. med. H. Hahn am Institut für Humangenetik Göttingen. Der praktische Teil der Arbeit unter der Betreuung von Dr. rer. nat. A. Uhmahm nahm insgesamt 9 Monate in Anspruch.

Nach meinem Praktischen Jahr legte ich im November 2012 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung erfolgreich ab. Voraussichtlich im April 2013 werde ich eine Stelle als Assistenzärztin in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin der Universitätsmedizin Rostock antreten.