Überprüfung neuer Therapieansätze für *Patched*-assoziierte Tumoren im Mausmodell

Von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Diplom-Ingenieurin für Biotechnologie

Ines Ecke

Promotionsausschuss:

Vorsitzender:	Herr Prof. U. Stahl
Erstgutachter:	Herr Prof. R. Lauster
Zweitgutachter:	Frau Prof. C. Lang
	Frau Prof. H. Hahn

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 15.07.2008

Berlin 2008

D 83

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2005 bis Juni 2008 am Institut für Humangenetik der Georg-August Universität Göttingen im Rahmen des Graduiertenkollegs 1034 „Die Bedeutung genetischer Polymorphismen in der Onkologie: Von den Grundlagen zur individualisierten Therapie“ durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht bzw. zum Druck eingereicht:

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); 361-72.

Ecke I, Petry F, Rosenberger A, Tauber S, Mönkemeyer S, Hess I, Dullin C, Kimmina S, Pirngruber J, Johnsen SA, Uhmann A, Wojnowski L, Schulz-Schaeffer W, Witt O, Hahn H: Antitumor effects of a combined 5-aza-2´-deoxycytidine and valproic acid treatment on rhabdomyosarcoma and medulloblastoma in *Ptch*-mutant mice, Eingereicht bei Cancer Research.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind.

Göttingen, 06.06.08

Ines Ecke

Dissertation eingereicht am: 09. Juni 2008

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 8
1.1 Der Sonic Hedgehog-Signalweg – Bedeutung und Mechanismen 8
1.2 *Ptch*-assoziierte Tumoren 10
1.2.1 Das Rhabdomyosarkom 10
1.2.2 Das Medulloblastom 12
1.2.3 Problematiken gegenwärtiger Therapieansätze für RMS und MB 13
1.3 Tiermodell für *Ptch*-assoziierte Tumoren zur Etablierung gerichteter Therapieansätze 14
1.3.1 Spezifische Inhibierung der Hh-Signalkaskade als Therapieansatz für *Ptch*-assoziierte RMS 15
1.3.2 Epigenetischer Therapieansatz für *Ptch*-assoziierte RMS und MB 17
1.3.2.1 Epigenetik: DNA-Methylierung und Histonmodifizierungen 19
1.3.2.2 Wechselwirkungen zwischen DNA-Methylierung und Histonmodifizierungen 20
1.3.2.3 Epigenetische Regulationsmechanismen und Krebs 21
1.3.2.4 Epigenetisch aktive Substanzen 22
1.4 Zielsetzungen der Arbeit 25
1.4.1 Cyclopamin zur Therapie von klinisch manifesten *Ptch*-assoziierten RMS im $Ptch^{neo67/+}$-Mausmodell 25
1.4.2 Epigenetische Therapie *Ptch*-assoziierter RMS und MB 25

2 MATERIAL 27
2.1 Laborgeräte 28
2.2 Gebrauchswaren 29
2.3 Chemikalien und Reagenzien 30
2.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme 31
2.5 Stammlösungen 32
2.6 Medien 35
2.6.1 Medien für die Bakterienkultur 35
2.6.2 Agarplatten 35
2.6.3 Medien für die Kultur eukaryontischer Zellen 35
2.7 Biologisches Material 36

2.7.1 Bakterienstämme ... 36
2.7.2 Eukaryontische Zelllinien ... 36
2.7.3 Verwendete Mauslinien ... 36
2.8 DNA-Oligonukleotide ... 37
2.8.1 DNA-Oligonukleotide zur Genotypisierung von Mäusen ... 37
2.8.2 DNA-Oligonukleotide für die Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) ... 38
2.8.3 DNA-Oligonukleotide für die quantitative *real time*-PCR ... 39
2.8.3.1 DNA-Oligonukleotide für die quantitative *real time*-PCR an genomischer DNA (qPCR) ... 39
2.8.3.2 DNA-Oligonukleotide und Sonden für die quantitative *real time*-PCR an cDNA (qRT-PCR) ... 39
2.8.4 DNA-Oligonukleotide für die Bisulfit-PCR und Bisulfit-DNA-Sequenzanalyse ... 41
2.9 Sonden für Southern Blot und *in situ*-Hybridisierung ... 41
2.10 Plasmide ... 42
2.11 Enzyme ... 42
2.12 Antikörper ... 43
2.12.1 Primäre Antikörper ... 43
2.12.2 Sekundäre Antikörper ... 44
2.13 Software ... 44
2.14 Datenbanken ... 44

3 METHODEN ... 45
3.1 Zellbiologische Methoden ... 45
3.1.1 Kultivierung von Zellen ... 45
3.1.2 Anlegen von RMS- und MB-Primärkulturen ... 46
3.1.3 Behandlung von Zellen mit Cyclopamin, 5-Aza und VPA ... 46
3.1.4 Transfektion von PC3-Zellen und Behandlung mit Cyclopamin ... 46
3.1.5 Gewinnung von Shh-N-konditioniertem Medium ... 47
3.1.6 Gewinnung von rekombinantem SHH-N aus Sf9-Zellen ... 47
3.1.7 Stimulation des Shh-Signalweges mittels Shh-N-konditioniertem Medium, Hh-Ag1.2 oder rekombinantem SHH-N ... 48
3.1.8 Proliferationsassay ... 48
3.1.9 Dualer Luziferaseassay ... 49

3.2 Tierexperimentelle Methoden 49
3.2.1 Maushaltung 49
3.2.2 Genotypisierung von Mäusen 49
3.2.3 Tumorsichtung 51
3.2.4 Implantation von Tumorzellen in Nacktmäuse 51
3.2.5 Applikation von Medikamenten 51
3.2.5.1 Systemische und lokale Applikation von Cyclopamin in (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$- und CD1-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse 51
3.2.5.2 Applikation von Cyclopamin in Nacktmäuse mit Transplantaten 52
3.2.5.3 Applikation von 5-Aza und VPA 53
3.2.5.4 Systemische Applikation von Doxorubicin 54
3.2.5.5 Bestimmung des Tumorvolumens mittels Volumencomputertomographie (VCT) 54
3.2.5.6 Statistische Auswertung der Spritzstudien 55
3.3 Molekularbiologische Methoden 55
3.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren 55
3.3.1.1 DNA-Isolierung aus murinen Geweben 55
3.3.1.2 DNA-Isolierung aus Geweben für Bisulfit-Behandlung 56
3.3.1.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen im kleinen Maßstab („Mini-Prep“) 56
3.3.1.4 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen im mittleren Maßstab („Midi-Prep“) 57
3.3.1.5 RNA-Isolierung aus Zellen und Geweben mit TriFast 57
3.3.1.6 RNA-Isolierung aus Primärkulturen 58
3.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 58
3.3.2.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung 58
3.3.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA mit PicoGreen 59
3.3.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA auf Agarosegelen 59
3.3.3 Einengen von DNA-Lösungen 59
3.3.4 Reverse Transkription (RT) 60
3.3.5 Polymerase Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) 60
3.3.5.1 Quantitative PCR (qPCR) an genomischer DNA 60
3.3.5.2 Semiquantitative Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) 60

3.3.5.3 Quantitative *real time*-PCR (qRT-PCR) ... 62
3.3.6 Aufreinigung von PCR-Fragmenten über Gelelution ... 65
3.3.7 Ligation von PCR-Fragmenten in das pGEM-T Easy Vektorsystem ... 65
3.3.8 Transformation von kompetenten Bakterienzellen mit Plasmid-DNA ... 65
3.3.9 Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA ... 66
3.4 Bisulfit-Sequenzierung zur Analyse des *Ptch*-Promotors ... 67
3.4.1 Behandlung der DNA mit Bisulfit ... 68
3.4.2 PCR an bisulfitbehandelter DNA ... 68
3.4.3 Sequenzierungs-PCR ... 70
3.4.4 Aufreinigung und Sequenzanalyse bisulfitbehandelter DNA ... 70
3.4.5 Ermittlung der Effizienz der Bisulfit-Behandlung und Auswertung der Sequenzen ... 70
3.5 Blottechniken ... 71
3.5.1 Southern Blot zur Abschätzung des DNA-Methylierungsstatus ... 71
3.5.1.1 Restriktionsverdau und Gelelektrophorese der DNA-Proben ... 72
3.5.1.2 DNA-Transfer auf Nylonmembranen (Southern Blot) ... 72
3.5.1.3 Herstellung der *pMR150*-Sonde ... 72
3.5.1.4 Hybridisierung der Membran ... 73
3.5.1.5 Autoradiographie ... 74
3.5.2 Proteinnachweis mittels Western Blot ... 74
3.5.2.1 Proteinisolierung aus Geweben ... 74
3.5.2.2 Proteinquantifizierung mittels BCA-Methode ... 74
3.5.2.3 Proteinauftrennung mittels Gelelektrophorese ... 75
3.5.2.4 Transfer der Proteine auf die Membran (Western Blot) und spezifischer Nachweis durch Antikörperfärbung ... 75
3.5.2.5 Entwicklung ... 76
2.5.2.6 Entfernen von Antikörpern von der Membran ... 76
3.6 Immunhistochemie und Immunzytochemie ... 76
3.6.1 Gewebeentnahme und -fixierung ... 76
3.6.2 Anfertigung von Kryo- und Paraffinschnitten ... 77
3.6.3 Hämalaun und Eosin Färbung (HE) von Geweben ... 77
3.6.4 Antikörperfärbung von Paraffinschnitten ... 77
3.6.5 Fluoreszenz-Antikörperfärbung von Zellen ... 78

3.6.6 *in situ*-Hybridisierung ... 79
3.6.6.1 Herstellung Digoxigenin-markierter *in situ*-Sonden ... 79
3.6.6.2 Vorbehandlung der Gebrauchsmaterialien, Lösungen und Küvetten ... 80
3.6.6.3 Vorbehandlung der Paraffinschnitte für die *in situ*-Hybridisierung ... 80
3.6.6.4 Hybridisierung ... 81
3.6.6.5 Posthybridisierung, anti-Dig-Antikörper-Färbung und Entwicklung ... 81

4 ERGEBNISSE ... 83
4.1 Einsatz von Cyclopamin zur Therapie von *Ptch*-assoziierten RMS ... 83
4.1.1 Funktionalitätsnachweis von Cyclopamin ... 83
4.1.1.1 Stimulation des Hh-Signalweges mit Shh-N-konditioniertem Medium oder Hh-Ag1.2 in der ShhLIGHT2-Zelllinie ... 83
4.1.1.2 Untersuchung der transkriptionellen Regulation von *Gli1* durch Cyclopamin *in vitro* ... 84
4.1.2.3 Untersuchung zum Einfluss von Cyclopamin auf die Gli-Funktion *in vitro* ... 86
4.1.2 Untersuchung der Effekte von Cyclopamin an RMS-Zelllinien und RMS-Primärkulturen ... 87
4.1.2.1 Effekte von Cyclopamin auf die RMS-Zellllinien TP5014 und TP1588 *in vitro* ... 87
4.1.2.2 Implantation der RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 in Nacktmäuse und Untersuchung des Aktivitätsstatus der Hh-Signalkaskade ... 89
4.1.2.3 Behandlung von implantierten RMS-Zelllinien in Nacktmäusen mit Cyclopamin ... 91
4.1.2.4 Untersuchung der Effekte von Cyclopamin auf RMS- und MB-Primärkulturen ... 93
4.1.3 *In vivo*-Applikation von Cyclopamin zur Behandlung von RMS in *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen ... 96
4.1.3.1 Einfluss einer systemischen Applikation von Cyclopamin auf die Hh-Signalkaskade und das Wachstum von *Ptch*-assoziierten RMS ... 97
4.1.3.2 Einfluss einer lokalen Applikation von Cyclopamin auf die Hh-Signalkaskade und das Wachstum von *Ptch*-assoziierten RMS ... 99
4.1.3.3 Untersuchung der Abhängigkeit der Therapieantwort auf Cyclopamin vom genetischen Hintergrund ... 101

4.1.3.4 Statistische Gesamtbetrachtung des Einflusses von Cyclopamin auf die Progression von *Ptch*-assoziierten RMS 103
4.1.3.5 Einfluss von Cyclopamin auf Proliferation, Differenzierungs- und Apoptosestatus von RMS in *Ptch*-heterozygoten Mäusen 104
4.2 Einsatz von Doxorubicin zur Therapie von *Ptch*-assoziierten RMS 106
4.3 Epigenetische Therapie von *Ptch*-assoziierten Tumoren mit 5-Aza und VPA 108
4.3.1 Untersuchung der Effekte von 5-Aza und VPA auf RMS-Zelllinien und RMS-Primärkulturen 108
4.3.2 Tumorprophylaxe mit 5-Aza und VPA in *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen (prophylaktische Studie) 110
4.3.2.1 Applikation von 5-Aza/VPA in (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse zur Prävention von RMS 110
4.3.2.2 Applikation von 5-Aza/VPA in B6-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse zur Prävention von MB 113
4.3.3 Therapeutische Behandlung von *Ptch*-assoziierten RMS in *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen mit 5-Aza/VPA (Therapiestudie) 114
4.3.4 Untersuchungen des Einflusses der 5-Aza- und VPA-Behandlung auf den DNA- Methylierungsstaus und die Histonacetylierung in RMS von *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen 115
4.3.5 Untersuchung der Modifizierungen der Genexpression in RMS von *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen durch eine Behandlung mit 5-Aza/VPA 117
4.3.5.1 Untersuchung zur Reaktivierung der *wtPtch*-Expression unter 5-Aza/VPA-Behandlung und Analyse der Aktivität des Hh-Signalweges 117
4.3.5.2 Untersuchung der Effekte der 5-Aza/VPA-Behandlung auf die Expression von Surrogatmarkern 119
4.3.6 Untersuchung zum Aktivitätsstatus des Hh-Signalweges in MB-Vorläuferläsionen und asymptomatischen MB nach 5-Aza/VPA-Behandlung oder nach genetischer Reduktion der Dnmt1-Aktivität 122
4.3.7 Bisulfit-Sequenzierung von CpG-reichen Regionen des *Ptch*-Promotors 125

5 DISKUSSION 130
5.1 Cyclopamin zur Therapie *Ptch*-assoziierter RMS 130
5.1.1 Cyclopamin inhibiert die Hh-Signalkaskade in etablierten *in vitro*-Assays 130

5.1.2 Die RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 sind kein geeignetes Modell zur Überprüfung neuer Therapien für *Ptch*-assoziierte Tumoren 131
5.1.3 Cyclopamin inhibiert die Hh-Markergenexpression und die Proliferation von RMS- und MB-Primärkulturen von *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen 133
5.1.4 Systemische Behandlung von *Ptch*-assoziierten RMS mit Cyclopamin inhibiert weder die Aktivität der Hh-Signalkaskade noch die Tumorprogression 134
5.1.5 Lokale Behandlung von *Ptch*-assoziierten RMS mit Cyclopamin inhibiert die Aktivität der Hh-Signalkaskade, nicht aber die Tumorprogression 135
5.1.6 Lokale Behandlung von *Ptch*-assoziierten RMS mit Cyclopamin hat keinen Einfluss auf Proliferations-, Apoptose- und Differenzierungsstatus 136
5.2 Epigenetische Therapie von *Ptch*-assoziierten Tumoren 138
5.2.1 Behandlung von RMS-Zelllinien und RMS-Primärkulturen mit epigenetisch aktiven Substanzen inhibiert die Proliferation 139
5.2.2 Chemopräventiver Effekt von 5-Aza/VPA auf Tumoren von *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen 140
5.2.3 Reaktivierung der *wtPtch*-Expression in *Ptch*-assoziierten RMS durch 5-Aza/VPA-Behandlung hat keinen Einfluss auf die Tumorprogression 142
5.2.4 Untersuchung von Surrogatmarkern einer Therapie mit 5-Aza/VPA 143
5.2.5 Detektion einer möglicherweise regulatorisch wirksamen CpG-reichen Region im *Ptch*-Promotor 146
5.2.6 Untersuchung des Aktivitätsstatus des Hh-Signalweges in MB-Vorläuferläsionen und asymptomatischen MB nach Behandlung mit 5-Aza/VPA oder genetischer Reduktion der Dnmt1-Aktivität 148
5.3 Doxorubicin inhibiert das Wachstum von *Ptch*-assoziierten RMS 149
5.4 Zusammenfassung und Ausblick 150

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 152

7 LITERATURVERZEICHNIS 157

8 DANKSAGUNG 177

9 LEBENSLAUF 178

1 EINLEITUNG

1.1 Der Sonic Hedgehog-Signalweg – Bedeutung und Mechanismen

Dem Sonic Hedgehog (Shh)-Signalweg kommt während der Embryogenese von Vertebraten und Insekten eine fundamentale Bedeutung bei der Regulation des Wachstums, der Musterbildung und der Morphogenese zu. So vermittelt die Shh-Signalkaskade z. B. die Ausbildung der positionellen Identität entlang der anterior-posterior Achse bei der Anlage der Extremitäten sowie die Ausbildung und das Schließen des Neuralrohrs [Ingham PW, McMahon AP, 2001]. Im adulten Organismus reguliert der Signalweg die Erhaltung von Stammzellpopulationen, die Gewebereparatur und die Geweberegeneration [Beachy PA *et al.*, 2004; Ruiz i Altaba A *et al.*, 2007].

1980 fanden Nüsslein-Volhard und Wieschaus das Gen *Hedgehog* (*Hh*), nach dem der Signalweg benannt wurde, bei einem Mutationsscreening in *Drosophila melanogaster* zur Identifizierung von Genen zur Steuerung der Körpersegmentausbildung [Nusslein-Volhard C, Wieschaus E, 1980]. Es wurden neben vielen anderen Phänotypen Larven entdeckt, die durch ihre gedrungene Form und ihr struppiges Erscheinungsbild auffielen und den Eindruck eines Igels (engl. *hedgehog*) vermittelten. In Vertebraten existieren drei *Hedgehog*-Gene, die für die sekretorischen Proteine Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog und Desert Hedgehog kodieren [Nieuwenhuis E, Hui CC, 2005]. Zur Aktivierung der Shh-Signalkaskade bindet sezerniertes Shh an den membranständigen Rezeptor Patched (Ptch). Ptch als negativer Regulator des Signalweges verliert dadurch seine inhibitorische Wirkung auf das Transmembranprotein Smoothened (Smo) [Goodrich LV, Scott MP, 1998; Ingham PW, 1998]. Der mechanistische Aspekt der Interaktion von Ptch und Smo ist bisher nicht vollständig verstanden. Nachgewiesen ist, dass es sich um keine physische oder stöchiometrische Regulation handelt [Denef N *et al.*, 2000; Ingham PW *et al.*, 2000; Taipale J *et al.*, 2002]. Im unstimulierten Zustand ist Ptch in der Zellmembran verankert und Smo intrazellulär in zytoplasmatischen Vesikeln lokalisiert. Die Bindung des Hh-Liganden an den Ptch-Rezeptor vermittelt die Internalisierung von Ptch in zytoplasmatische Vesikel und eine anschließendende Degradation von Hh [Capdevila J *et al.*, 1994; Incardona JP *et al.*, 2000]. Denef N *et al.* [2000] postulieren ein Modell, nach dem Ptch und Smo zwischen Plasmamembran und zytoplasmatischen Vesikeln in Abhängigkeit von der Shh-Präsenz entgegengesetzt pendeln. Die Aktivierung von Smo ist mit einer Konformationsänderung des Proteins verbunden und führt zur intrazellulären Weiterleitung des

extrazellulären Signals, an der eine Vielzahl von Molekülen beteiligt ist. Als entscheidende Vermittler des Signals gelten die Gli-Transkriptionsfaktoren (*glioma-associated oncogene homolog*). Die Familie der Gli-Transkriptionsfaktoren besteht aus drei Mitgliedern, Gli1, Gli2 und Gli3, deren Expression gewebespezifisch ist und die kontextabhängige Aktivator- und Repressorfunktionen ausüben [Cohen MM, Jr., 2003]. Gli1 ist im Wesentlichen ein Aktivator der Hh-Signalkaskade. Wie die Signalvermittlung von Smo über Gli in den Kern im Detail abläuft, ist noch nicht vollständig geklärt. Besser bekannt sind die Vorgänge in *Drosophila melanogaster*. Das Fliegenortholog Ci (*Cubitus interruptus*) wird im unstimulierten Zustand in einem Komplex aus Costal 2 (Cos2), Suppressor of Fused (SuFu) und Fused (Fu) an Mikrotubuli gebunden und proteolytisch in seine Repressorform gespalten, die in den Kern translokalisiert und die Transkription von Zielgenen, wie z. B. *Ptch*, reprimiert. Bei einer Aktivierung der Signalkaskade wird der Komplex aus Cos2, SuFu, Fu und Ci aufgelöst und die Aktivatorform von Ci freigesetzt [Cohen MM, Jr., 2003]. In Vertebraten wurde bisher nur SuFu als negativer Regulator der Hh-Signalkaskade nachgewiesen [Stone DM *et al.*, 1999]. Zu den Zielgenen eines aktiven Shh-Signalweges in Vertebraten gehören unter anderem *Ptch*, *Gli1* und *Igf2* (*insulin-like growth factor 2*) [Hahn H *et al.*, 1999; Corcoran RB, Scott MP, 2001; Cohen MM, Jr., 2003; Nieuwenhuis E, Hui CC, 2005]. Die gesteigerte *Ptch*-Expression vermittelt einen negativen Rückkopplungsmechanismus und trägt wesentlich zur Regulation der Signalkaskade bei. Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung der Shh-Signalkaskade.

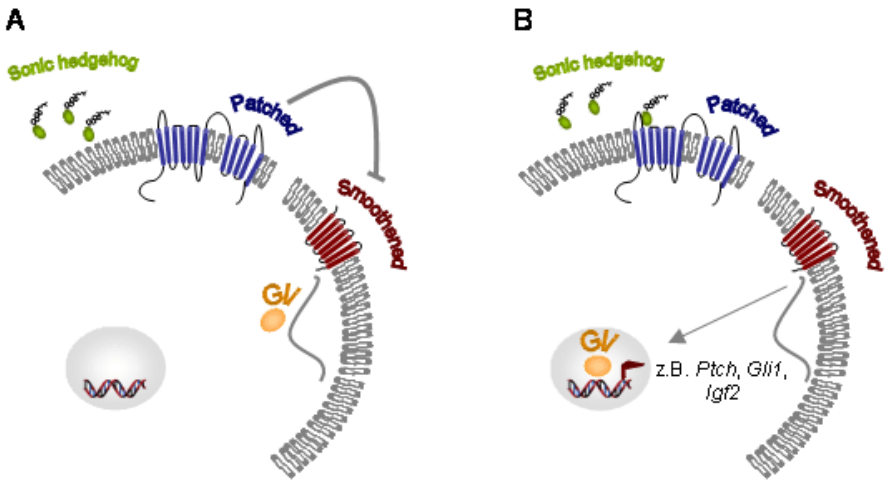


Abb. 1: Schema des Shh-Signalweges. A) In Abwesenheit des stimulierenden Liganden Shh inhibiert Ptch die Aktivität von Smo und somit den Signalweg. B) Durch die Bindung des Liganden Shh an den Rezeptor Ptch wird die inhibitorische Wirkung von Ptch auf Smo aufgehoben. Smo vermittelt die Aktivierung der Gli-Transkriptionsfaktoren, die in den Kern wandern und die Expression von Zielgenen wie *Ptch*, *Gli1* und *Igf2* vermitteln (Abbildung: A. Uhmann, AG Hahn).

1.2 *Ptch*-assoziierte Tumoren

Die aberrierende Aktivierung des Hh-Signalweges, z. B. durch inaktivierende *Ptch*-Mutationen, führt zu einem steten Proliferationssignal für die Zelle und damit zur Tumorentstehung. Eine Verbindung zwischen einer Mutation im Hh-Signalweg und Krebs wurde erstmals für das Gorlin-Syndrom (auch Nävoides Basalzell-Karzinom, NBCCS, engl. *nevoid basal cell carcinoma syndrome*) beschrieben. Diese Patienten sind Träger einer autosomal-dominanten Mutation im *PTCH*-Gen und weisen neben Entwicklungsdefekten, wie Großwuchs, Polydactylie und Rippenabnormalitäten, eine erhöhte Inzidenz für bestimmte Tumoren auf [Gorlin RJ, 1987; Hahn H *et al.*, 1996; Johnson RL *et al.*, 1996]. Dazu zählen vor allem Basalzellkarzinome (BCC, engl. *basal cell carcinoma*), Medulloblastome (MB) und Rhabdomyosarkome (RMS) [Hahn H *et al.*, 1999].

Auch eine Vielzahl sporadischer Tumoren weist eine pathologische Aktivität der Hh-Signalkaskade auf und bestätigt die Bedeutung des Signalweges bei der Entstehung von Krebs. So wurde eine Überexpression der Hh-Zielgene wie *Gli1* z. B. für Pankreas-Adenokarzinome [Thayer SP *et al.*, 2003], Brustkrebs [Kubo M *et al.*, 2004], Prostatakrebs [Karhadkar SS *et al.*, 2004; Sanchez P *et al.*, 2004], kleinzellige Lungenkarzinome [Watkins DN *et al.*, 2003], Glioblastome [Clement V *et al.*, 2007] und Melanome [Stecca B *et al.*, 2007] nachgewiesen. Alle sporadischen BCC sind durch die Expression der Hh-Signalwegeskomponenten *Ptch*, *Smo* und *Gli1* gekennzeichnet [Toftgard R, 2000]. Für 50-70 % der sporadischen BCC wurde der Verlust der Heterozygotie (LOH, engl. *loss of heterozygosity*) am *PTCH*-Lokus festgestellt [Unden AB *et al.*, 1996; Danaee H *et al.*, 2006]. Daher geht man davon aus, dass es sich bei *PTCH* um ein Tumorsuppressorgen handelt.

Weil der Fokus dieser Arbeit auf Therapiemöglichkeiten für *Ptch*-assoziierte RMS und MB liegt, wird auf den Zusammenhang zwischen *PTCH*-Mutationen in RMS und MB in Kapitel 1.2.1 bzw. 1.2.2 gesondert eingegangen.

1.2.1 Das Rhabdomyosarkom

RMS sind Tumoren der quergestreiften Skelettmuskulatur. Da 65 % aller sporadisch auftretenden RMS bei Kindern unter 6 Jahren festgestellt und die übrigen 35 % bei Jugendlichen bis zum 20. Lebensjahr diagnostiziert werden, zählen sie zu den pädiatrischen Tumoren [Dagher R, Helman L, 1999]. Diese Tumorart stellt das häufigste Weichteilsarkom im Kin-

desalter dar, allein in den USA werden jährlich 250 neue Fälle bei Kindern unter 15 Jahren festgestellt [Dagher R, Helman L, 1999].

Es werden zwei histologische Subtypen unterschieden. Embryonale RMS sind durch spindelförmige, stromareiche Zellen charakterisiert und machen etwa zwei Drittel der RMS aus [Merlino G, Helman LJ, 1999]. Sie treten vorzugsweise in der Hals- und Nackenregion auf und seltener an den Extremitäten. Der alveoläre Subtyp ist durch kleine, runde, dicht gepackte Zellen charakterisiert, die über Collagenfasern zusammengehalten werden und der zellulären Architektur Ähnlichkeit mit den Lungenalveolen verleihen. Dieser Subtyp wird häufiger bei älteren Kindern und an den Extremitäten diagnostiziert [Dagher R, Helman L, 1999]. Alveoläre RMS sind im Gegensatz zu embryonalen RMS durch eine Translokation zwischen dem *PAX3*-Gen (*paired box gene*) und dem *FKHR*-Gen (*fork head box O*1) bzw. dem *PAX*7-Gen und dem *FKHR*-Gen eindeutig definiert [Dagher R, Helman L, 1999]. Die *PAX*-Gene sind wichtige Regulatoren der embryonalen Myogenese und *FKHR* kodiert einen Transkriptionsfaktor. Das Fusionsprodukt *FKHR/PAX3* bewirkt eine gesteigerte Aktivierung der PAX3-vermittelten Transkription [Fredericks WJ *et al.*, 1995].

Wie oben erwähnt sind Gorlin-Patienten mit einer autosomal-dominanten Mutation im *PTCH*-Gen für die Entwicklung von RMS prädisponiert. Des Weiteren konnte für 33 % der embryonalen RMS ein Verlust des *PTCH*-Lokus nachgewiesen werden [Bridge JA *et al.*, 2000]. Tostar U *et al.* [2006] zeigten, dass *PTCH*-mRNA in allen und PTCH-Protein bei 74 % der untersuchten RMS nachweisbar sind. Neben der Assoziation mit Mutationen im *PTCH*-Gen wurden noch weitere Verbindungen mit der Fehlregulation des Hh-Signalweges in RMS detektiert. So ist die Region 12q23-15, die das Gen für den Transkriptionsfaktor *Gli1* beinhaltet, in vielen Fällen amplifiziert [Merlino G, Helman LJ, 1999] und RMS überexprimieren *Igf2* [El-Badry OM *et al.*, 1990], wofür häufig der Verlust der maternalen Prägung verantwortlich ist [Zhan S *et al.*, 1994].

RMS sind durch die Expression myogener Marker charakterisiert und legen eine Fehlregulation der Muskelausbildung als Entstehungsursache nahe [Anderson J *et al.*, 1999]. Die Ursprungszellen sind noch nicht definiert. Als Kandidaten gelten mesenchymale Stammzellen oder myogene Vorläufer. Die Ausbildung des Skelettmuskels aus den Somiten in der dritten Woche der embryonalen Entwicklung beim Menschen wird u. a. durch Shh gesteuert.

Die Standardtherapie besteht aus Resektion und anschließender Bestrahlung und Chemotherapie mit Vincristin, Actinomycin D, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Iphosphamid und/oder

Etoposid [Dagher R, Helman L, 1999]. Liegen zum Therapiezeitpunkt noch keine Metastasen vor, können 60-70 % der Patienten geheilt werden. Bei bereits metastasierenden RMS sprechen weniger als 20 % der Patienten auf die Therapie an, die Überlebensdauer sinkt dramatisch [Dagher R, Helman L, 1999].

1.2.2 Das Medulloblastom

MB sind vom Kleinhirn ausgehende, sogenannte primitive neuroektodermale Tumoren (PNET) und bilden mit 85 % der PNET den häufigsten bösartigen Hirntumor im Kindesalter. Das MB wächst lokal infiltrierend und wird in zwei histologische Subtypen unterteilt. Die klassische Form geht meist vom Kleinhirnwurm (Vermis) aus, die seltenere desmoplastische Variante häufig von den Kleinhirnhälften (Hemisphären).

Als Ursprung von MB werden granuläre Vorläufer der Körnerzellen (GCP, engl. *granule cell precursor*) diskutiert, deren Proliferation während der neonatalen Entwicklung des Kleinhirns durch den Hh-Signalweg reguliert wird [Wechsler-Reya RJ, Scott MP, 1999]. Die Körnerzellprogenitoren entstehen an der Außenseite des Kleinhirns und bilden die äußere granuläre Schicht (EGL, engl. *external granual layer*) (Abb. 2). Im neonatalen Kleinhirn wird durch von Purkinjezellen sezerniertes Shh eine exzessive Proliferation der GCP stimuliert.

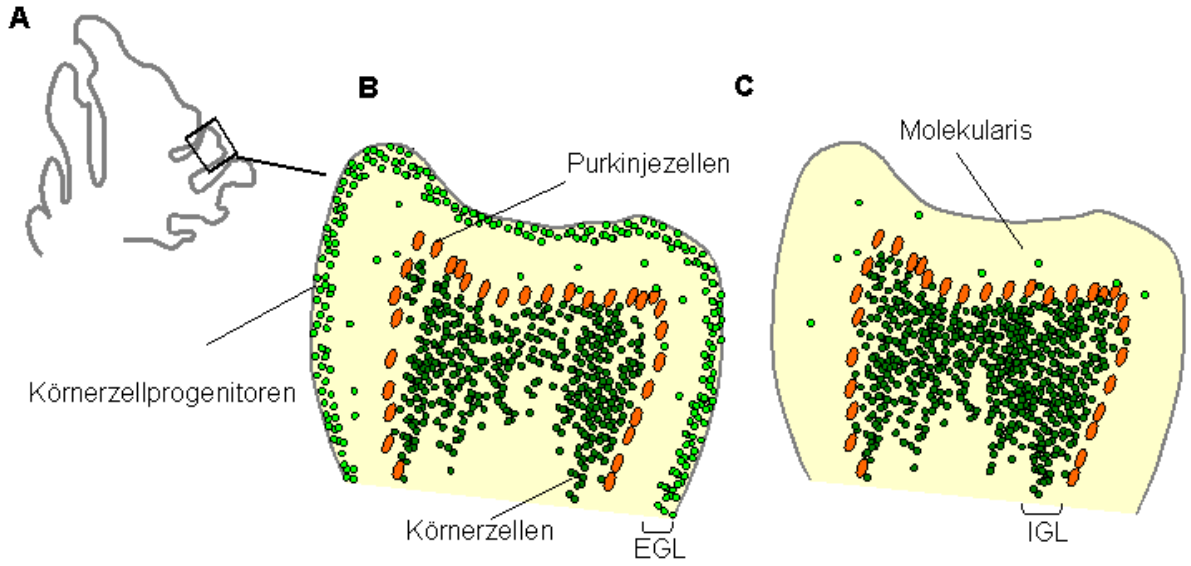


Abb. 2: Migration der Körnerzellprogenitoren im Kleinhirn von Mäusen. A) Sagitaler Schnitt durch das Kleinhirn. B) Stadium nach 7 Tagen: Massive Proliferation von Körnerzellprogenitoren in der äußeren granulären Schicht (EGL). C) Stadium nach 3 Wochen: Die Körnerzellprogenitoren sind fast vollständig in die innere Körnerzellschicht (IGL) migriert, die äußere granuläre Schicht ist nahezu aufgelöst.

Die Vorläufer migrieren schließlich durch die Purkinjezellschicht in die inneren Areale des Kleinhirns und differenzieren in der inneren Körnerzellschicht (IGL, engl. *internal granual layer*) aus. Es wird vermutet, dass Fehlregulationen des Migrationsverhaltens das Verbleiben von einigen GCP in der Molekularis bedingen und sich aus diesen Vorläuferzellen maligne Läsionen entwickeln.

Die entscheidende Bedeutung der Fehlregulation der Hh-Signalkaskade für die Ausbildung von MB zeigt sich bei Gorlin-Patienten. Etwa 3-5 % der Patienten mit NBCCS entwickeln ein MB [Evans DG *et al.*, 1991; Evans DG *et al.*, 1993] und mehr als 10 % der sporadisch auftretenden MB weisen *PTCH*-Mutationen auf [Raffel C *et al.*, 1997; Xie J *et al.*, 1997]. Des Weiteren sind Tumoren des desmoplastischen Subtyps durch die Expression der Hh-Markergene *PTCH*, *GLI1*, *IGF2* und *MYC* gekennzeichnet [Pomeroy SL *et al.*, 2002].

Die operative Entfernung des Tumorgewebes ist äußerst schwierig. Da eine sogenannte „Resektion im Gesunden“ nicht möglich ist, wird eine operationsmikroskopisch vollständige Entfernung des Tumors mit mikrochirurgischen Operationstechniken angestrebt. Aufgrund des infiltrativen Verhaltens von MB reicht eine lokale, postoperative Bestrahlung der Tumorregion nicht aus, eine vollständige kraniospinale Strahlentherapie (Gehirn und Rückenmark) ist unumgänglich. Die zugehörige Chemotherapie beinhaltet die Einnahme von zytotoxischen Substanzen, wie z. B. Vincristin, Cisplatin und/oder Lomustin. Mit diesen Therapieoptionen kann eine 5-Jahres-Überlebensrate von 50-85 % erreicht werden [Tomita T, McLone DG, 1986; Brand WN *et al.*, 1987; Hughes EN *et al.*, 1988; Evans AE *et al.*, 1990; Wara WM *et al.*, 1994]. Die kraniospinale Bestrahlungstherapie führt jedoch vor allem bei Kindern unter drei Jahren zu erheblichen psychomotorischen, kognitiven und mentalen Folgeschäden sowie zu Störungen in der Hormonbildung verbunden mit einer Verminderung des Körperlängenwachstums [Johnson DL *et al.*, 1994]. Deshalb wird versucht, durch Intensivierung der Chemotherapie auf eine Bestrahlung zu verzichten.

1.2.3 Problematiken gegenwärtiger Therapieansätze für RMS und MB

Mit den verwendeten Therapieoptionen Resektion, Bestrahlung und Chemotherapie werden bei lokal definierten RMS und MB akzeptable Ergebnisse erzielt. Für bereits metastasierende Tumoren allerdings ist die Prognose unter herkömmlicher Therapie schlecht. Die Möglichkeiten der Strahlen- und Chemotherapie scheinen in den diversen Kombinationen und Dosen ausgeschöpft. Hinzu kommt, dass Strahlen- und Chemotherapie eine wesentliche Ursache für

die Ausbildung sekundärer Tumoren darstellen, die sich erst Jahre nach der Behandlung der Primärerkrankung manifestieren [Dickerman JD, 2007; Soliman H, Agresta SV, 2008]. Vor allem bei der Therapie von pädiatrischen Tumoren stellen sekundäre Krebserkrankungen ein großes Problem dar. Mertens AC *et al.* [2001] untersuchten in einer retrospektiven Studie die Mortalitätsrate von Patienten, bei denen Krebs vor dem 21. Lebensjahr diagnostiziert wurde und welche die ersten fünf Jahre nach der Diagnose überlebten. Für diese Gruppe wurde ein 19fach gesteigertes Risiko festgestellt, an einer sekundären Krebserkrankung zu sterben.

Die genannten Probleme verdeutlichen die Notwendigkeit neuer gezielter Ansätze für die Therapie von pädiatrischen Tumoren. Da bekannt ist, dass der Hh-Signalweg aufgrund von *PTCH*-Mutationen in einer beträchtlichen Anzahl von pädiatrischen Tumoren dereguliert ist, wird heute versucht, dieser Deregulation gezielt entgegen zu wirken.

1.3 Tiermodell für *Ptch*-assoziierte Tumoren zur Etablierung gerichteter Therapieansätze

Die Generierung *Ptch*-defizienter Mäuse [Goodrich LV *et al*., 1997; Hahn H *et al*., 1998] ermöglicht die genaue Untersuchung der *Ptch*-assoziierten Tumorigenese im Tiermodell. Die homozygote Deletion von *Ptch* führt zu einem Absterben der Embryonen *in utero* am Tag 9,5 aufgrund von Defekten des Neuralrohrs [Goodrich LV *et al*., 1997; Hahn H *et al*., 1998]. *Ptch*-heterozygote Mäuse hingegen sind lebensfähig und entwickeln einen Phänotyp, der dem Krankheitsbild von NBCCS-Patienten entspricht. Neben Entwicklungsdefekten, wie Rippenabnormalitäten, Zysten und Polydactylie, weisen diese Mäuse eine Prädisposition für MB, RMS und unter Bestrahlung auch für BCC auf [Goodrich LV, Scott MP, 1998; Hahn H *et al*., 1998; Aszterbaum M *et al*., 1999]. Die Ausbildung der Tumoren wird stark vom genetischen Hintergrund bestimmt. $Ptch^{neo67/+}$-Mäuse, bei denen die Exone 6 und 7 des *Ptch*-Gens durch eine Neomycinkassette ersetzt sind, entwickeln auf einem C57BL/6-Hintergrund innerhalb von 300 Tagen in bis zu drei von vier Fällen ein MB, aber keine RMS. Tiere der F1-Generation aus der Kreuzung von C57BL/6 und BALB/c dagegen entwickeln im gleichen Zeitraum in bis zu drei von fünf Fällen ein RMS und nur in etwa jedem zwölften Fall ein MB [Hahn H *et al*., 2004].

Die RMS dieser Mäuse gleichen histologisch den humanen RMS vom embryonalen Subtyp und die MB aufgrund der Expression von molekularen Markern dem humanen desmoplastischen MB [Hahn H *et al.*, 1998; Pomeroy SL *et al.*, 2002]. In den Tumoren der $Ptch^{neo67/+}$-

Maus kann ebenso wie in den humanen *PTCH*-assoziierten Tumoren eine erhöhte *Ptch*- und *Gli1*-Expression im Vergleich zum Normalgewebe detektiert werden. Bemerkenswert sind Untersuchungsergebnisse über die Zusammensetzung der *Ptch*-Transkripte. Von dem mutanten *Ptch*-Lokus wird ein Transkript exprimiert, bei dem Exon 5 direkt an Exon 8 gespleißt wird [Calzada-Wack J *et al.*, 2002]. Während im gesunden Gewebe das Wildtyp-Allel (wt) und das mutante Δ67-Allel im gleichen Maß exprimiert werden, kommt es während der Tumorentstehung zu einer Verschiebung des Verhältnisses. Im Vergleich zum normalen Muskelgewebe ist im Tumor die Expression des Δ67-Allels deutlich erhöht, während die Transkriptmenge des wt-Allels unverändert bleibt bzw. verringert ist [Calzada-Wack J *et al.*, 2002; Uhmann A *et al.*, 2005]. Da es sich bei *Ptch* um ein Tumorsuppressorgen handelt und da nach der Zwei-Treffer-Hypothese [Knudson AG, Jr., 1971] beide Allele eines Tumorsuppressorgens für die Tumorentstehung ausgeschaltet sein müssen, besteht Grund zu der Annahme, dass das wt-Allel epigenetisch reprimiert wird.

Des Weiteren sind Tumoren der $Ptch^{neo67/+}$-Mäuse durch die Expression von *Igf2* gekennzeichnet. Aus Kreuzungsexperimenten zwischen *Igf2*-Nullmutanten und *Ptch*-heterozygoten Mäusen ist aus der signifikant geringeren Tumorinzidenz der F1-Generation ersichtlich, dass *Igf2* nicht nur ein Zielgen der Shh-Signalkaskade, sondern auch essentiell für die *Ptch*-assoziierte Tumorigenese ist [Hahn H *et al.*, 2000].

Die Übereinstimmung in der Expression der Hh-Markergene und die vergleichbare Histologie der Subpopulationen der humanen RMS und MB mit den murinen Tumoren, machen die $Ptch^{neo67/+}$-Maus zu einem idealen Modell für die Entwicklung und Evaluierung neuer Therapieansätze für *Ptch*-assoziierte Tumoren.

1.3.1 Spezifische Inhibierung der Hh-Signalkaskade als Therapieansatz für *Ptch*-assoziierte RMS

Die aberrierende Aktivität des Hh-Signalweges stellt die Ursache und das grundlegende Charakteristikum *Ptch*-assoziierter Tumoren dar. Mit der Isolierung des Alkaloids Cyclopamin aus *Veratrum californicum*, dessen Struktur in Abbildung 3 C dargestellt ist, wurde ein spezifischer Inhibitor des Hh-Signalweges entdeckt [Keeler RF, Binns W, 1968; Cooper MK *et al.*, 1998; Incardona JP *et al.*, 1998]. Der Name Cyclopamin leitet sich von dem Phänotyp von Lämmern ab, deren Mütter um den Tag 14 der Trächtigkeit beim Weiden *Veratrum californicum* aufnahmen [Binns W *et al.*, 1965]. Die teratogene Wirkung von Cyclopamin induziert

verschiedene kraniofaziale Defekte bis hin zu Cyclocephalie [Keeler RF, Binns W, 1964]. Die Ähnlichkeit von cyclopamininduzierten Fehlentwicklungen und Phänotypen, die durch einen Shh-Funktionsverlust in der Maus [Chiang C *et al.*, 1996] und im Menschen [Roessler E *et al.*, 1996] induziert werden, legte eine Verbindung zwischen Cyclopamin und der Regulation des Shh-Signalweges nahe. 2002 belegten Chen JK *et al.* [2002] die direkte Bindung von Cyclopamin an Smo und definierten endgültig die Wirkungsweise des Alkaloids als Hh-Signalwegantagonist (Abb. 3 A und B).

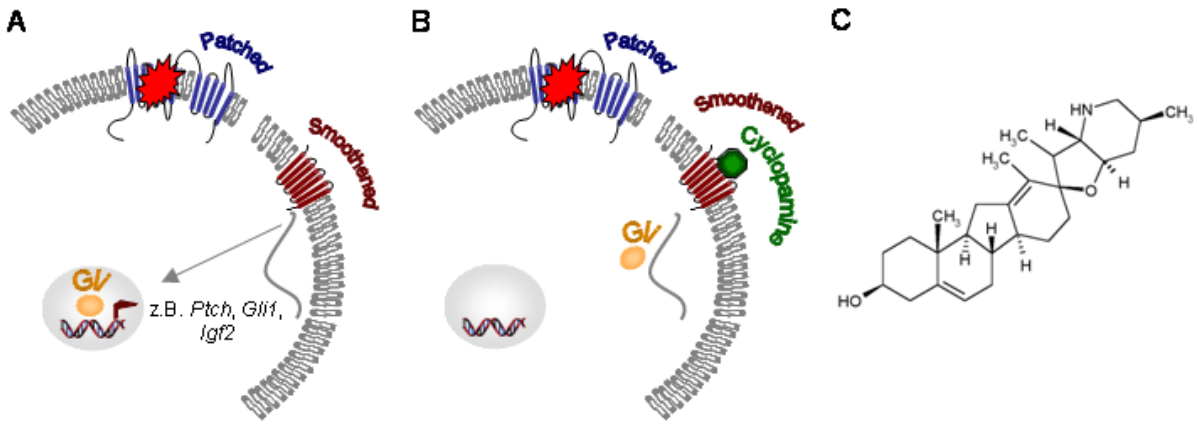


Abb. 3: Cyclopamin - Wirkungsweise auf den Hh-Signalweg und Struktur. A) Inaktivierende Mutationen im *Ptch*-Gen führen zu einer ligandenunabhängigen, konstitutiven Aktivierung der Hh-Signalkaskade. B) Cyclopamin inhibiert durch die Bindung an Smo den Hh-Signalweg. C) Struktur des Alkaloids Cyclopamin.

Damit war der Grundstein für den Einsatz von Cyclopamin in der Krebstherapie gegen *Ptch*-assoziierte Tumoren gelegt. Studien, die Cyclopamin eine antiproliferative Wirkungsweise gegenüber Tumorzelllinien *in vitro* bescheinigen, sind äußerst zahlreich. Z. B. inhibiert Cyclopamin die Proliferation von Brust- [Kubo M *et al.*, 2004], Pankreas- [Qualtrough D *et al.*, 2004], Prostata- [Sanchez P *et al.*, 2004] und kolorektalen Krebszelllinien [Thayer SP *et al.*, 2003] sowie von Melanom- [Stecca B *et al.*, 2007], Glioblastom- [Clement V *et al.*, 2007] und Medulloblastomzelllinien [Berman DM *et al.*, 2002; Sanchez P, Ruiz i Altaba A, 2005]. Der Großteil der *in vivo*-Ansätze macht sich Transplantationsmodelle zu Nutze, bei denen Tumorzelllinien in immundefiziente Mäuse implantiert werden. Auch in diesen Modellsystemen fungiert Cyclopamin als effektiver Inhibitor des malignen Zellwachstums und hemmt z. B. die Progression von Prostata- [Karhadkar SS *et al.*, 2004] und Pankreaskrebszellen [Thayer SP *et al.*, 2003; Feldmann G *et al.*, 2007] sowie von Glioblastomzellen [Clement V *et al.*, 2007] und Melanomzellen [Stecca B *et al.*, 2007].

Es gibt allerdings nur wenige Studien, welche die Wirkung von Cyclopamin in dem klinisch relevanten Szenario von spontanen, endogenen Tumoren untersuchen. Doppelmutante *Ptch*$^{neo12/+}$; *p53*$^{-/-}$-Mäuse entwickeln mit nahezu 100 %iger Inzidenz MB [Wetmore C *et al.*, 2001]. Eine prophylaktische Behandlung von symptomlosen Tieren mit Cyclopamin über einen Monat ab einem Alter von 28 Tagen führt zur Reduktion der MB-Größe und der *Ptch*-Expression im Tumor [Sanchez P, Ruiz i Altaba A, 2005]. Die Gabe von Cyclopamin verhindert die Induktion von BCC in *Ptch*$^{neo12/+}$-Mäusen nach UV-Bestrahlung bei etwa 66 % der Tiere [Athar M *et al.*, 2004]. Auch im *tyrNRAS*^{Q61K}; *Ink4a*$^{-/-}$-Mausmodell (*tyrosinase* → *neuroblastoma ras viral oncogene homolog; cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)*, das die Tiere zu Melanomen prädisponiert, führt Cyclopamin zum Rückgang von Tumoren [Stecca B *et al.*, 2007]. Tabs S und Avci O [2004] berichten über die Ergebnisse einer lokalen Applikation von Cyclopamin in Form einer Creme zur Behandlung fünf humaner BCC. In den BCC wurde durch diese Behandlung selektiv Apoptose und Differenzierung induziert. Es wurden jedoch keine Untersuchungen vorgenommen, die einen direkten Zusammenhang zwischen der Wirkung des Cyclopamins und dem Hh-Signalweg herstellen.

Die genannten Studien geben keinen vollständigen Überblick über alle Untersuchungen zum Einsatz von Cyclopamin wieder, verdeutlichen aber bereits das enorme Potential spezifischer Hh-Antagonisten in der Krebstherapie. Deshalb planen Genentech Inc. in Kooperation mit Curis Inc. für das Jahr 2008 den Beginn von drei klinischen Phase II Studien zur Behandlung metastasierender Kolonkarzinome, fortgeschrittener BCC und solider Epithelialtumoren mit GDC-0499, einem *small molecule inhibitor* der Hh-Signalkaskade. Diese Studien werden weiteren Aufschluss über die therapeutische Wirksamkeit von Inhibitoren der Hh-Signalkaskade und deren Einsatzmöglichkeiten in der Krebstherapie geben.

1.3.2 Epigenetischer Therapieansatz für *Ptch*-assoziierte RMS und MB

Ptch wird aufgrund seiner Rolle als negativer Regulator der Mitose zu der Gruppe der Tumorsuppressorgene gezählt [Hahn H *et al.*, 1996; Johnson RL *et al.*, 1996]. Da sich Mutationen in diesen Genen rezessiv verhalten, ist die Inaktivierung beider Allele eines Tumorsuppressorgens Voraussetzung für die Tumorentstehung [Knudson AG, Jr., 1971]. Das würde bedeuten, dass bei Patienten mit NBCCS, die eine Keimbahnmutation in einem *PTCH*-Allel aufweisen, erst eine zweite somatische Mutation im *PTCH*-Lokus zur malignen Transformation führt. Auch für die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens in sporadischen Tumoren sind zwei somatische Mutationen notwendig. Ein Verlust der Heterozygotie am *PTCH*-Lokus kann je-

doch in myogenen Tumoren von Gorlin-Patienten nur äußerst selten festgestellt werden [Tostar U *et al.*, 2006]. Die Angaben über einen LOH am *PTCH*-Lokus in MB von Gorlin-Patienten sind rar. Schofield D *et al.* [1995] stellten in beiden von ihnen untersuchten MB von Gorlin-Patienten einen LOH am *PTCH*-Lokus fest. Bei sporadischen MB liegen mit einer Häufigkeit von 10 % *PTCH*-Mutationen vor [Raffel C *et al.*, 1997; Xie J *et al.*, 1997], aber nur drei von fünf PNET mit Mutationen im *PTCH*-Gen weisen auch einen LOH am *PTCH*-Lokus auf [Vorechovsky I *et al.*, 1997]. Analysen von sporadischen BCC zeigen, dass ein LOH und ein mutationsbedingter Verlust beider *PTCH*-Allele nur bei ca. 50 % der BCC auftreten [Gailani MR *et al.*, 1996; Danaee H *et al.*, 2006].

Auch für das *Ptch*-heterozygote Tiermodell gibt es Hinweise, dass die Inaktivierung beider *Ptch*-Allele durch Mutationen keine Grundvoraussetzung für die Tumorigenese ist. So ist bspw. die Bedeutung des biallelischen Verlustes von *Ptch* in spontanen MB *Ptch*-heterozygoter Mäuse umstritten. Wetmore C *et al.* [2000] und Zurawel RH *et al.* [2000] postulierten mit dem Nachweis der *wtPtch*-Expression im MB-Gewebe, dass Haploinsuffizienz am *Ptch*-Lokus für die Tumorentstehung ausreichend ist. Eine Reihe darauf folgender Arbeiten verweist hingegen auf eine fehlende bzw. drastisch reduzierte *wtPtch*-Expression in MB *Ptch*-heterozygoter Mäuse [Berman DM *et al.*, 2002; Pazzaglia S *et al.*, 2002; Oliver TG *et al.*, 2005; Uziel T *et al.*, 2005; Pazzaglia S *et al.*, 2006] und bestätigt damit die Beobachtungen aus unserem Labor [Calzada-Wack J *et al.*, 2002; Uhmann A *et al.*, 2005]. In RMS von $Ptch^{neo67/+}$-Mäusen kann eine ungleiche Expression der beiden *Ptch*-Allele beobachtet werden. Der *Δ67Ptch*-Lokus wird stark transkribiert, während die Expression des wt-Allels im Vergleich zum Normalgewebe konstant bleibt oder schwächer ist. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an RMS *Ptch*-heterozygoter Mäuse schließen einen Verlust der Heterozygotie und zusätzliche somatische Mutationen im *wtPtch*-Allel aus [Calzada-Wack J *et al.*, 2002]. Dies wirft die Frage nach dem Entstehungsmechanismus dieser Tumoren auf.

Neben der Inaktivierung durch Mutationen bzw. durch LOH kommt eine epigenetische Modifizierung des *wtPtch*-Allels in Frage, die eine Transkription unterbindet. Tatsächlich gibt es Hinweise, dass der *wtPtch*-Promotor durch Methylierung inaktiviert wird: A) In Brustkrebsproben und *HH*-abhängigen Ovarialzysten konnte die Promotormethylierung von *PTCH* nachgewiesen werden [Cretnik M *et al.*, 2007; Wolf I *et al.*, 2007]. B) In MB-Zelllinien der $Ptch^{neo12/+}$-Mäuse kann die *wtPtch*-Expression durch die Behandlung mit dem DNA-demethylierenden Agenz 5-Azacytidin erreicht werden [Berman DM *et al.*, 2002]. C) Die Transkription von einem *Ptch*-Promotorkonstrukt wird durch Methylierung inhibiert [Uh-

mann A *et al.*, 2005]. Diese Daten sind Grundlage für den zweiten, in dieser Arbeit untersuchten Therapieansatz für *Ptch*-assoziierte Tumoren, dessen Ziel die Reaktivierung des epigenetisch reprimierten *wtPtch*-Allels mittels epigenetisch aktiver Substanzen war.

1.3.2.1 Epigenetik: DNA-Methylierung und Histonmodifizierungen

Die Regulation der Genexpression durch Packung und Modifizierung der DNA und durch Modifizierung der Histone wird als Epigenetik bezeichnet. Diese Mechanismen schließen eine Regulation der Genexpression aufgrund von Änderungen in der DNA-Basenabfolge aus. Sie sind reversibel und vererbbar. Zu den epigenetischen Regulationsmechanismen zählen die DNA-Methylierung, kovalente Histonmodifizierungen und damit verbundene Veränderungen in der Chromatinstruktur.

5-Methylcytosin (5-mC) wurde 1948 entdeckt [Hotchkiss RD, 1948]. Im Säugergenom tritt diese Base ausschließlich in der Paarung mit Guanidin in sogenannten CpG-Dinukleotiden auf. CpG-Dinukleotide kommen im Genom wesentlich seltener vor, als es die normale Wahrscheinlichkeitsverteilung vermuten lassen würde, weil 5-mC spontan zu Thymin deaminiert wird. Diese Umwandlung wird von der DNA-Reparaturmaschinerie nicht effizient erkannt und hatte einen Verlust von CpG-Dinukleotiden während der Evolution zur Folge [Gal-Yam EN *et al.*, 2008]. CpG-Dinukleotide finden sich hauptsächlich in der 5`-Promotorregion von Genen und in repetitiven Elementen der Zentromerregionen [Gal-Yam EN *et al.*, 2008].

Etwa 60 % aller humanen Gene weisen CpG-reiche Regionen in ihren Promotoren auf. Diese Regionen werden ab einer Größe von 500 bp, ab einem GC-Gehalt von mindestens 55 % und ab einem Verhältnis von 0,65 zwischen den in der Sequenz vorhandenen und den laut Verteilungsfunktion zu erwartenden CpG-Dinukleotiden als CpG-Inseln bezeichnet [Takai D, Jones PA, 2002]. Es wird angenommen, dass etwa 10 % dieser CpG-Inseln in somatischen Zellen methyliert vorliegen [Eckhardt F *et al.*, 2006]. Die Methylierung von CpG-Dinukleotiden in der Promotorregion von Genen ist mit einer transkriptionellen Repression verbunden. Die physiologische Bedeutung der DNA-Methylierung liegt in der Regulation der monoallelischen Expression geprägter Gene, in der Regulation von keimbahn- und gewebespezifischen Genen, in der Inaktivierung eines X-Chromosoms im weiblichen Organismus und in der Repression parasitärer DNA-Sequenzen.

Derzeit sind drei DNA-Methyltransferasen (Dnmt) charakterisiert, welche die Übertragung der Methylgruppen an die 5-Position des Cytosinrings katalysieren [Hermann A *et al.*, 2004;

Turek-Plewa J, Jagodzinski PP, 2005]. Als Methylgruppendonor dient S-Adenosyl-L-Methionin. Die Dnmt1 vermittelt die Methylierung von hemimethylierter DNA und dient somit zur Erhaltung des Methylierungsmusters während der Zellteilung. Deshalb wird sie auch als Erhaltungs-Methyltransferase (engl. *maintenance methyltransferase*) bezeichnet. Die Dnmt3a und Dnmt3b hingegen vermitteln vorrangig die *de novo*-Methylierung von DNA-Doppelsträngen, vor allem während der Embryogenese. Wie die Enzyme die entsprechenden Zielsequenzen erkennen, ist bisher nicht verstanden [Santos KF *et al.*, 2005].

Die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren und die Transkriptionsmaschinerie wird im Wesentlichen durch die Chromatinstruktur bestimmt. Chromatin wird strukturell in Euchromatin und Heterochromatin unterschieden. Euchromatin enthält aktiv transkribierte Gene und liegt in der Interphase dekondensiert vor. Heterochromatin hingegen ist transkriptionell inaktiv und bleibt auch in der Interphase hochkondensiert. Im Chromatin eukaryontischer Zellen ist die DNA um ein Rückgrat aus Histonen gewickelt und verdichtet. Chemische Modifikationen an definierten Aminosäuren des N-Terminus der Histone vermitteln die höhere Ordnung des Chromatins und werden in ihrer Gesamtheit als Histoncode bezeichnet [Jenuwein T, Allis CD, 2001].

Zu den wichtigsten kovalenten Modifikationen der Histone zählen die Acetylierung der Aminogruppen von Lysinresten, die zur Neutralisation der positiven Gesamtladung der Histone führt. Dies vermittelt eine Auflockerung der Bindung zur negativ geladenen DNA und eine offenere Chromatinstruktur, welche die Transkription begünstigt. Die Prozesse werden durch Histonacetyltransferasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC) katalysiert. Etwa 2-10 % der Gene werden über Acetylierung von Histonen reguliert.

Neben der Histonacetylierung spielt die Methylierung, Sumoylierung und Phosphorylierung von Histonen bei der Regulation der Genexpression eine entscheidende Rolle. Die Modifizierungen ergeben ein äußerst komplexes Regulationsmuster, bei dem die modifizierte Aminosäure, deren Lokalisation und deren Kombination mit anderen Resten von Bedeutung sind.

1.3.2.2 Wechselwirkungen zwischen DNA-Methylierung und Histonmodifizierungen

Die epigenetischen Mechanismen, DNA-Methylierung und Histonmodifizierung, werden auf vielfältige, häufig noch unverstandene Weise gemeinsam koordiniert (Abb. 4). So führt die Methylierung von DNA-Promtorregionen zur Rekrutierung von Methyl-CpG-

Bindungsproteinen (MeCP). Diese Bindungsproteine verhindern das Anheften von Transkriptionsfaktoren an die methylierte Promotorregion und bedingen die Bindung und die Aktivierung von HDAC [Jones PL *et al.*, 1998; Nan X *et al.*, 1998] sowie die Methylierung von H3 am Lysin 9 (H3K9) [Fuks F *et al.*, 2003]. Des Weiteren kann die Dnmt1 HDAC auch direkt binden [Fuks F *et al.*, 2000; Robertson KD *et al.*, 2000; Rountree MR *et al.*, 2000].

Vire E *et al.* [2006] erbrachten den Beweis, dass die Histonmethyltransferase EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*), die für die transkriptionell inaktivierende Methylierung von H3K9 verantwortlich ist, sowohl Dnmt1 als auch Dnmt3a und Dnmt3b binden kann, die wiederum die Methylierung der EZH2-Zielpromotoren vermitteln.

Zusammengefasst bestehen zwischen DNA-Methylierung und Histonmodifizierungen in beide Richtungen Rückkopplungsmechanismen, die zu einem sich selbst verstärkenden Kreislauf führen können [Fahrner JA *et al.*, 2002; Bachman KE *et al.*, 2003; Kondo Y *et al.*, 2003].

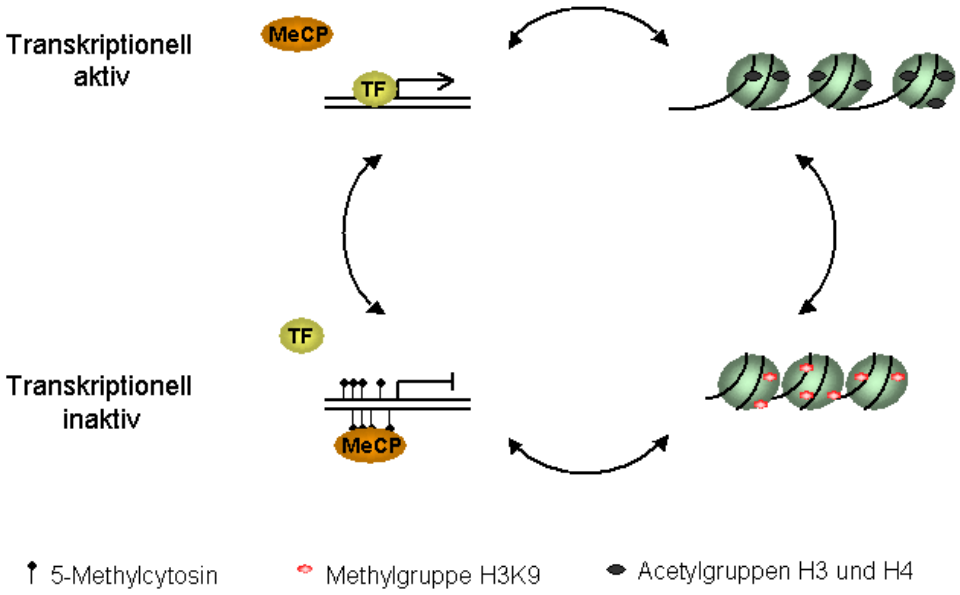


Abb. 4: Wechselwirkungen zwischen DNA-Methylierung und Histonmodifizierungen. Die Methylierung von Cytosinen in der Promotorregion von Genen führt zur Repression der Transkription. 5-Methylcytosine werden von MeCP erkannt, die zur Aktivierung von Histondeacetylasen beitragen. Die Deacetylierung von Histonen und die Methylierung spezieller Histonreste wie H3K9 führen zur Verdichtung des Chromatins und somit zur transkriptionellen Inaktivität. Alle Vorgänge sind durch Reversibilität gekennzeichnet (doppelköpfiger Pfeil). Abkürzungen: MeCP Methyl-CpG-Bindungsprotein, TF Transkriptionsfaktor.

1.3.2.3 Epigenetische Regulationsmechanismen und Krebs

Ein globaler Verlust an DNA-Methylierung war die erste epigenetische Veränderung, die in Tumoren festgestellt wurde [Feinberg AP, Vogelstein B, 1983]. Diese Hypomethylierung

betrifft vor allem repetitive DNA-Sequenzen, kodierende Regionen und Introns [Gal-Yam EN *et al.*, 2008]. Die Auswirkungen globaler Hypomethylierung umfassen den Verlust der Prägung und die Reaktivierung von Transposon-DNA-Sequenzen, zu denen endoparasitäre DNA-Elemente wie LINE- (engl. *long interspersed nuclear elements*) und Alu-Sequenzen zählen [Ehrlich M, 2002; Dunn BK, 2003; Eden A *et al.*, 2003]. Die Aktivierung solcher Elemente führt zur Translokation und Inaktivierung von Genen und damit zu genomischer Instabilität.

Interessanterweise wurde jedoch beobachtet, dass Promotorregionen einiger spezifischer Tumorsuppressorgene in Tumorzellen hypermethyliert sind. Dies wurde zuerst für das Retinoblastom-Suppressorgen (Rb) beschrieben [Greger V *et al.*, 1989] und wurde seitdem für eine Reihe von weiteren Tumorsuppressorgenen belegt [Esteller M, 2008]. Dabei ist jede Tumorart durch ihr eigenes Profil an methylierten CpG-Inseln in Tumorsuppressorgenen charakterisiert [Costello JF *et al.*, 2000]. Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Methylierung kann den zweiten Treffer repräsentieren, der laut Knudson [Knudson AG, Jr., 1971] zur malignen Transformation einer Zelle notwendig ist [Grady WM *et al.*, 2000; Esteller M *et al.*, 2001].

Die maßgebliche Bedeutung der DNA-Methylierung bei der Krebsentstehung wurde bereits mehrmals in genetischen Studien mit *Dnmt1*-mutanten Mäusen dokumentiert. Die Senkung der endogenen Dnmt1-Aktivität durch hypomorphe Allele führt sowohl in $Apc^{Min/+}$-Mäusen (*adenomatous polyposis of the colon*) [Laird PW *et al.*, 1995; Eads CA *et al.*, 2002; Yamada Y *et al.*, 2005] als auch in einem chemisch induzierten Lungenkrebsmodell [Belinsky SA *et al.*, 2003] zur Senkung der Tumorinzidenz. Diese *in vivo*-Daten bestätigen, dass die Methylierung von CpG-Dinukleotiden in der Promotorregion von Tumorsuppressorgenen ein grundlegendender Schritt in der Tumorigenese ist.

Die Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen ist direkt assoziiert mit Veränderungen der Histonmodifizierungen, wie z. B. Deacetylierung von H3 und H4, Verlust der Dreifachmethylierung am H3K4, Methylierung von H3K9 und Dreifachmethylierung von H3K37 [Esteller M, 2008; Gal-Yam EN *et al.*, 2008].

1.3.2.4 Epigenetisch aktive Substanzen

Die chemische Reversibilität epigenetischer Mechanismen macht diese zu einem vielversprechenden Ansatz für die Krebstherapie. So wurden DNA-demethylierende Substanzen und

Histondeacetylase-Inhibitoren (HDAC-I) erfolgreich *in vitro* und *in vivo* getestet und befinden sich in klinischen Phase I und II Studien, z. B. Garcia-Manero G *et al.* [2006] und Soriano AO *et al.* [2007]. Dabei wird für die Substanzen trotz ihrer globalen Wirkung auf die Organisation des Chromatins eine krebszellspezifische Wirkung angenommen [Brown R, Strathdee G, 2002; Goffin J, Eisenhauer E, 2002; Armeanu S *et al.*, 2005; Schmelz K *et al.*, 2005], welche die Nebenwirkungen im Vergleich zu herkömmlichen Chemotherapeutika verringert. Tatsächlich zeigen klinische Studien und Einzelfallberichte die relativ gute Verträglichkeit epigenetischer Therapeutika, z. B. Baker MJ *et al.* [2002], Witt O *et al.* [2004] und Garcia-Manero G *et al.* [2006].

Ein weiterer interessanter Aspekt epigenetisch aktiver Substanzen ist die Beobachtung, dass sie *in vitro*-behandelten Tumorzelllinien ihr tumorigenes Potential nehmen können [Li XN *et al.*, 2005; Cantor JP *et al.*, 2007], was die Hoffnung nahe legt, dass epigenetische Therapien die Krebsstammzellpopulation, so vorhanden, effektiv eliminiert.

Das Cytidinanalog 5-Aza-2´-Deoxycytidin (5-Aza) gehört zu den potentesten DNA-demethylierenden Reagenzien. Es wird während der Replikation in die DNA eingebaut und kann aufgrund des Stickstoffatoms in der Position 5 des Cytosin-Rings nicht methyliert werden. Die Bindung der Dnmt1 an integriertes 5-Aza führt zu einer kovalenten Bindung des Enzyms [Luczak MW, Jagodzinski PP, 2006] und entzieht der Zelle somit aktive Dnmt1. Neben diesem Wirkmechanismus bewirkt 5-Aza auch eine direkte Degradation der Dnmt1 über den proteasomalen Weg [Ghoshal K *et al.*, 2005] und greift in die Modifizierung von Histonen ein. So vermittelt 5-Aza die Demethylierung und Acetylierung von H3K9 [Fahrner JA *et al.*, 2002; Nguyen CT *et al.*, 2002; Kondo Y *et al.*, 2003; Wozniak RJ *et al.*, 2007]. Aufgrund der histonmodifizierenden Wirkung führt 5-Aza auch zur Reaktivierung von Genen, die nicht über Promotormethylierung reprimiert werden, wie z. B. *p21* in der humanen Lungenkrebszelllinie A549 oder *Apaf-1* (*apoptosis protease-activating factor-1*) in Melanomazelllinien [Milutinovic S *et al.*, 2000; Soengas MS *et al.*, 2001]. Des Weiteren wurde 5-Aza in klinischen Phase II und III Studien zur Behandlung des myelodysplastischen Syndroms sowie in Phase II Studien für chronische und akute myeloide Leukämie erfolgreich eingesetzt [Issa JP, 2003; Jabbour E *et al.*, 2008]. Frühe klinische Studien zur Therapie solider Tumoren mit hoch dosiertem 5-Aza waren jedoch wenig erfolgreich [Issa JP, 2003; Jabbour E *et al.*, 2008]. In hohen Konzentrationen wirkt die Substanz eher allgemein zytotoxisch als demethylierend. Zurzeit wird das Potential von niedrig dosiertem 5-Aza hinsichtlich der Möglichkeit zum kombinierten Einsatz mit z. B. konventioneller Chemotherapie reevaluiert [Jabbour E *et al.*,

2008]. Die zunehmenden Beweise für das klinische antineoplastische Potential von 5-Aza rückt die Frage nach dem idealen Kombinationspartner der Substanz für maximale Effektivität in den Vordergrund. So werden Kombinationen mit klassischen zytotoxischen Substanzen oder anderen Medikamenten wie Immunmodulatoren ausgetestet, in denen 5-Aza als Chemosensitizer fungiert [Issa JP, 2003]. Ein weiterer interessanter Ansatzpunkt ist die Kombination von 5-Aza mit anderen epigenetisch aktiven Substanzen wie z. B. mit HDAC-I.

Die kurzkettige Fettsäure Valproinsäure (VPA) gehört zu den am Besten untersuchten HDAC-I. Da die Substanz ursprünglich als Anti-Epileptikum und Stimmungsstabilisator eingesetzt wurde [Bowden CL, 2003; Gerstner T *et al.*, 2008], sind die pharmakokinetischen Eigenschaften ausführlich untersucht. VPA vermittelt über die Hemmung von HDAC [Gottlicher M *et al.*, 2001; Phiel CJ *et al.*, 2001] die Acetylierung der Histone H3 und H4 [Milutinovic S *et al.*, 2007]. Mit der Acetylierung von H3 ermöglicht VPA Demethylasen den Zugang zu methylierter DNA und so die Demethylierung von transkriptionell reprimierten Promotorregionen [Detich N *et al.*, 2003; Milutinovic S *et al.*, 2007]. VPA beeinflusst zusätzlich die Regulation einer Reihe von intrazellulären Prozessen, wie z. B. den MAPK-Signalweg (*mitogen-activated protein kinase*), den Wnt-Signalweg (*wingless*) und den Akt/GSK3β-Signalweg (Proteinkinase B/Glycogensynthase-Kinase 3β), und damit letztlich Zellzyklusarrest, Apoptose, Differenzierung und Angiogenese [Kostrouchova M *et al.*, 2007]. Viele dieser Mechanismen sind nicht direkt auf die Hemmung von HDAC zurückzuführen und in ihren Zusammenhängen noch nicht vollständig verstanden.

VPA wird in klinischen Studien zur Behandlung hämatologischer Tumoren [Kuendgen A, Gattermann N, 2007] und einer Reihe solider Tumoren, wie Brustkrebs und Gebärmutterhalskrebs [Duenas-Gonzalez A *et al.*, 2008] ausgetestet.

In vitro- und *in vivo*-Studien belegen für DNA-demethylierende Substanzen und HDAC-I einen synergistischen Effekt [Zhu WG *et al.*, 2001; Ghoshal K *et al.*, 2002; Shaker S *et al.*, 2003]. Shi H *et al.* [2003] zeigen dies eindrucksvoll mittels Microarrayanalysen, bei denen die Expressionsprofile von mit 5-Aza und/oder Trichostatin (HDAC-I) behandelten Krebszelllinien untereinander verglichen werden. Unter der jeweiligen Monotherapie werden etwa 1,1-1,9 % der untersuchten Gene stärker exprimiert, während die Kombinationstherapie zu einer Induktion von 10,4 % der untersuchten Gene führt. Die Kombination aus VPA und 5-Aza wurde erfolgreich in Phase I/II Studien an Patienten mit Leukämie [Garcia-Manero G *et*

al., 2006] getestet und wird derzeit in soliden Tumoren [Duenas-Gonzalez A *et al.*, 2008] evaluiert.

1.4 Zielsetzungen der Arbeit

Eine Vielzahl von malignen Erkrankungen ist mit der aberrierenden Aktivierung des Hh-Signalweges assoziiert. Therapieansätze, die eine spezifische Hemmung der Signalkaskade vermitteln, stellen somit eine weitläufig einsetzbare Option zur Behandlung dieser Tumoren dar. *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse entwickeln RMS und MB, die durch einen konstitutiv aktiven Hh-Signalweg gekennzeichnet sind und histologisch den entsprechenden humanen Tumorentitäten gleichen. Damit stellen diese Mäuse ein ideales Modell zur Evaluierung neuer Therapieansätze für *Ptch*-assoziierte Tumoren dar.

1.4.1 Cyclopamin zur Therapie von klinisch manifesten *Ptch*-assoziierten RMS im *Ptch*$^{neo67/+}$-Mausmodell

Das pflanzliche Alkaloid Cyclopamin inhibiert die Hh-Signalkaskade über die Bindung an das Transmembranprotein Smo und führt zur Wachstumsinhibierung *Hh/Ptch*-abhängiger Tumorzellen *in vitro*, in Transplantationsmodellen und von endogenen prämalignen MB- und BCC-Läsionen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Potential von Cyclopamin zur Behandlung voll ausgebildeter, klinisch relevanter *Ptch*-assoziierter RMS analysiert werden. Vor der Anwendung *in vivo* sollte die beschriebene Wirksamkeit der Substanz, die von der Firma Toronto Research gekauft wurde, zunächst an verschiedenen Zellkulturmodellen überprüft werden. Danach sollte die Substanz im Tiermodell zur Therapie von bereits fortgeschrittenen, klinisch manifesten Tumoren evaluiert werden. Hierzu sollte das Tumorvolumen, der Aktivitätsstatus der Hh-Signalkaskade und zusätzlich Veränderungen im Apoptose- und Differenzierungsstatus der RMS zwischen cyclopaminbehandelten Tieren und der Kontrollgruppe analysiert werden.

1.4.2 Epigenetische Therapie *Ptch*-assoziierter RMS und MB

Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, gibt es im *Ptch*$^{neo67/+}$-Mausmodell Hinweise, dass epigenetische Veränderungen wesentlich zur Tumorentstehung beitragen. Die Tumoren sind durch eine starke Expression des mutanten *Ptch*-Allels charakterisiert, wohingegen das wt-Allel schwächer oder im gleichen Maß wie im Kontrollgewebe exprimiert wird. Als Ursache für die

Inaktivierung des wt-Allels konnten Mutationen ausgeschlossen werden. Stattdessen zeigen Vorarbeiten, dass die Inaktivierung vielmehr durch epigenetisch bedingte Reprimierung der Expression vermittelt wird. Ziel dieser Arbeit war es, das Potential epigenetisch aktiver Substanzen für die Chemoprävention und Therapie von *Ptch*-assoziierten Tumoren zu untersuchen. Für die Behandlungen wurden das DNA-demethylierende Agenz 5-Aza und der HDAC-I VPA eingesetzt. 5-Aza wurde aufgrund seiner starken demethylierenden Eigenschaften und VPA wegen der umfassenden pharmakokinetischen Charakterisierung ausgewählt.

Zunächst sollten den Tieren vor dem Auftreten klinisch manifester Tumoren die Einzelsubstanzen oder die Kombination der Substanzen appliziert werden. Diese Studie sollte Aufschluss über die Effektivität der Substanzen hinsichtlich einer Prophylaxe von *Ptch*-assoziierten Tumoren geben und zeigen, ob mit der Kombinationstherapie (5-Aza/VPA) ein synergistischer Effekt erzielt werden kann. Weiterhin sollte der therapeutische Nutzen der Substanzen bei klinisch manifesten *Ptch*-assoziierten Tumoren überprüft werden. Hierzu wurden RMS-tragende $Ptch^{neo67/+}$-Mäuse verwendet. Zur Charakterisierung der 5-Aza/VPA-vermittelten Effekte sollte der Verlauf des Tumorvolumens ermittelt, der Transkriptionsstatus des *wtPtch*-Allels sowie des gesamten Hh-Signalweges untersucht und globale und spezifische Biomarker epigenetischer Therapien analysiert werden.

Mittels Bisulfit-Sequenzierung von CpG-reichen Abschnitten des *Ptch*-Promotors sollte der Methylierungsstatus des Gens im RMS im Vergleich zum Normalgewebe analysiert werden, um die für die transkriptionelle Repression verantwortlichen CpG-Dinukleotide zu identifizieren. Um die regulatorische Funktion dieser CpG-Dinukleotide zu bestätigen, sollten sie zusätzlich in 5-Aza-behandelten RMS untersucht werden.

2 MATERIAL

2.1 Laborgeräte

-80 °C Schrank (MDF-U71V)	Sanyo Electric Co., Ltd., Japan
Agarosegelelektrophorese-Kammern	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Autoklav	W. Krannich GmbH & Co. K.G., Göttingen
Blotapparaturen (Turboblotter, miniVE)	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Brutschränke, Begasungsbrutschränke (6000, BBD 6220)	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Crosslinker (Crosslinker CL-1)	Herolab GmbH, Wiesloch
Dampfgarer (multiGourmet FS20)	Braun, Kronberg
Digitale Fotokamera (PowerShot G2)	Canon Inc., Japan
Einkanal-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Entwicklermaschine (Curix 60)	AGFA Deutschland Vertriebsgesellschaft mbH & Co, Köln
Feinwaagen (Sartorius Basic plus)	Sartorius AG, Göttingen
Filmkassetten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fluorometer (Tecan Ultra)	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Gasbrenner (Gasprofi 2 scs)	WLD-TEC GmbH, Göttingen
Geiger-Zähler	Berthold detection systems GmbH, Pforzheim
Gewebeeinbett- und -entwässerungsautomat (TP 1020)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Heizblöcke (Thermomixer)	Eppendorf, Hamburg
Heizrührer (MR 3000/3001)	Heidolph Instruments, Schwabach
Homogenisator (Miccra D-1)	ART-moderne Labortechnik e. K., Mühlheim
Hybridisierungsofen (HB-1000 Hybridizer)	UVP, Inc., Upland, USA
Inverses Mikroskop mit Fluoreszenzfilter (Axiovert 25, Filter set 43, 01, 09)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Kaltlichtquelle (KL 200)	Schott Glas, Mainz
Kryostat (CM 1900-1-1)	Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Kühlplatte (EG1150C)	Leica, Nussloch
Luminometer (MPL-3, 2 Injektoren)	Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim
Messschieber	Barkey GmbH & Co. KG, Leopoldshöhe
Mikrowelle (Dimension 4)	Panasonic, Hamburg
MilliQ-Anlage	MembraPure GmbH, Bodenheim

Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Paraffinspender, Ausgießstation (Dispenser PAG 12)	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
Paraffinstreckbad	Medax GmbH & Co. KG, Rendsburg
PCR-Gerät	Eppendorf, Hamburg
PCR-Gerät (PrimusHT)	MWG AG Biotech, Ebersberg
PCR-Gerät (Robocycler Gradient 96 Combo)	Stratagene, Amsterdam Zuidoost, Niederlande
pH-Meter (inoLab pH Level 1)	WTW GmbH, Wien, Österreich
Photometer, Thermodrucker (Biophotometer 6131, Thermodrucker DPU-414)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe (Accu-jet)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Quecksilber-Kurzbogenlampe (HBO 50W/AC)	OSRAM, München
Schlittenmikrotom (HN 40)	Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Schüttelbrutschrank	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Schüttelwasserbad (1083)	GFL mbH, Burgwedel
Spectrophotometer (NanoDrop ND-1000)	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Sequenziergerät (ABI-Prism Genetic Analyzer 3100)	Applied Biosystems, Darmstadt
Stereomikroskop (Stemi 2000)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Sterilbank (Euroflow Klasse IIA)	Clean Air Techniek bv, Woerden, Niederlande
Stromquellen für Elektrophorese	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Tank für Flüssigstickstoff	L'air liquide S.A., Paris Cedax, Frankreich
TaqMan (ABI Prism 7900HT)	Applied Biosystems, Darmstadt
UV-Dokumentation (digital monochrome printer P91D)	Mitsubishi, Ratingen
UV-Transilluminator/Software	Intas, Göttingen
Vakuumpumpe	Schütt Labortechnik, Göttingen
Volumencomputertomograph (fpVCT, Prototyp), Auswertungsrechner (AW 4.2)	GE Global Research19, New York, USA
Vortexer (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
Wipp-Taumel-Tisch (Unimax 1010)	Heidolph Instruments, Schwabach
Zählkammer nach Neubauer (Assistent)	Omnilab-Krannich, Göttingen
Zentrifugen (Biofuge pico, fresco, primo, Multifuge 3L-R)	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Zwölfkanal-Pipette	Eppendorf, Hamburg

2.2 Gebrauchswaren

1,5 ml Reaktionsgefäße	Ochs GmbH, Bovenden/Lenglern
2,0 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
13 ml Röhrchen	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden
15 ml Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
50 ml Röhrchen	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
96-Loch Platten (Tissue culture plate 96-well)	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden
6-Loch Platten (Tissue culture plate 6-well)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Aufreinigungsplatte 96-Loch (MAHVN45)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Blotting-Papier (GB 33 B003)	Heinemann Labortechnik GmbH, Duderstadt
Deckgläser	Menzel GmbH & Co.KG, Braunschweig
Dispensionspipetten (Combitips plus)	Eppendorf, Hamburg
ECL-Filme (Hyperfilm ECL)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Einwegspritzen (BD Plastipak, BD Micro-Fine + Demi)	BD GmbH, Heidelberg
Filter (0,22 µm, 0,45 µm)	LLG Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim
Glaswaren	Schott AG, Mainz
Kanülen (Sterican Ø 0,45 x 12 mm)	B. Braun Medical AG, Emmenbrücke
Kryokonservierungsröhrchen (Cryo.S)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Küvetten (UVette)	Eppendorf, Hamburg
Luminometer Messplatten (96 well assay plate)	Costar, Corning Incorporated, Corning, USA
Nitrozellulose-Membran (Hybond-XL)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Objektträger (SuperFrost Plus, unbeschichtet)	Menzel GmbH & Co.KG, Braunschweig
Objektträger-Kulturschalen (Culture slides)	BD Falcon, Heidelberg
Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße und Deckel (ThermoFast 96, non-skirted, natural domed cap strips, natural, Framestar 384)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg 4titude Ltd., Ockley, Großbritannien
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
Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF, Immobilon-P Membran, 0,45 µM)	Millipore Corporation, Billerica, USA

Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Skalpelle	Aesulap AG & Co. KG, Tuttlingen
Sterilfilter	Omnilab-Krannich, Göttingen
TaqMan Platten und Folien (384-well optical reaction plate, optical adhesive covers)	Applied Biosystems, Darmstadt
Zellkulturschalen, 100 mm, 35 mm (Nunclon Surface)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden

2.3 Chemikalien und Reagenzien

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

1 kb, 50 bp und 100 bp DNA Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
[α^{32}P]-dCTP	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
BM purple	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Borsäure	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
Cryoblock Einbettmedium	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
Cyclopamin	Toronto Research Chemicals Inc., North York, Kanada
Deoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dig RNA Labeling Mix, 10x conc.	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Doxorubicin	Apotheke der Universitätsmedizin, Göttingen
Dulbecco´s PBS (DPBS)	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach
Ethanol, absolut	JT Baker, Mallinckrodt Baker, Griesheim
Ethanol, vergällt	GeReSo GmbH, Einbeck
Ethidiumbromid	inno-Train Diagnostik GmbH, Kronberg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	ICN Biochemicals Inc., Aurora, USA
Formamid	Acros Organics, Geel, Belgien
Glycergel Mounting Medium	Dako GmbH, Hamburg
Hämatoxylin	Merck KgaA, Darmstadt
Hexamere	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
I-Block (2 % Caseinlösung für Antikörperfärbungen)	Tropix, Bedford, USA
Immuno Mount	Shandon Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Isofluran (FORENE)	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden

Isovist 300	Schering, Berlin
Kaliumaluminiumsulfat	Merck KgaA, Darmstadt
Lachsspermien-DNA (10 mg/ml)	Stratagene, Amsterdam Zuidoost, Niederlande
Matrigel	BD-Bioscience, Heidelberg
Methanol	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumjodat	Merck KgaA, Darmstadt
Oligo(dT)-Nukleotide (50 ng/µl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Paraformaldehyd	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Pertex Mounting Medium	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
PicoGreen Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Rapid-hyb buffer	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
RNase-freies destilliertes Wasser	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNaseZap	Ambion Inc., Applied Biosystems, Darmstadt
Sephadex G-50 fine	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
S.O.C. Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe,
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
Tomatidin	Toronto Research Chemicals Inc., North York, Kanada
TransFectin Lipid Reagent	Bio-Rad, München
Trichloracetaldehydhydrat	Merck KgaA, Darmstadt
TriFast	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Tween-20	Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spanien
Vectrashield mounting medium mit DAPI	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Wasser für Injektionszwecke (Ampuwa)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg

2.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Soweit nicht anders im Text erwähnt, wurden gebrauchsfertige Reaktionssysteme nach den Angaben des Herstellers verwendet.

BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
BigDye Terminator v1.1 cycle sequencing kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Dual Glo Luciferase System	Promega GmbH, Mannheim
EpiTect Bisulfit Kit	Qiagen GmbH, Hilden

ExoSAP IT	USB, Cleveland, USA
HotStar High Fidelity Polymerase Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Microcon YM-30	Millipore Corporation, Billerica, USA
MicroSpin G.50 Columns	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
NBT/BCIP stock solution	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Perfectprep Gel Cleanup	Eppendorf, Hamburg
pGEM-T Easy TA-cloning Kit	Promega GmbH, Mannheim
Prime-It RmT Random Primer Labeling Kit	Stratagene, Amsterdam Zuidoost, Niederlande
PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuantiTect PCR probe Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuantiTect SYBR Green PCR	Qiagen GmbH, Hilden
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, USA

2.5 Stammlösungen

Soweit nicht anders erwähnt wurde zum Ansetzen und Verdünnen von Stammlösungen doppelt destilliertes Wasser verwendet.

Blockpuffer Western Blot	5 % (w/v) Milchpulver in PBST
Citratpuffer	3,6 % (v/v) 0,1 M Citronensäure 16,4 % (v/v) 0,1 M tri-Natriumcitrat
Cresol	0,1 % (w/v) Cresol in gesättigter Sukrose-Lösung
Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Deoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP-Mix)	10 mM dATP 10 mM dTTP 10 mM dGTP 10 mM dCTP
Eosin, 1 %	1 % (w/v) Eosin y (wasserlöslich) 80 % (v/v) Ethanol
Glutaraldehyd/1x PBS	0,2 % (v/v) Glutaraldehyd in 1x PBS
Hämalaun nach Meyer	0,1 % (w/v) Hämatoxylin 5 % (w/v) Kaliumaluminiumsulfat 0,015 % (w/v) Natriumjodat 5 % (w/v) Trichloracetaldehydhydrat 1 % (w/v) Citronensäure
High-Stringency Puffer	0,1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) in 0,2x Standard Natriumcitrat Lösung (SSC) pH 7,0

Hybridisierungspuffer-1	40 % (v/v) Formamid 10 % (w/v) Dextransulfat 4x SSC pH 6,4 1x Denhardt´s
Hybridisierungspuffer-2	50 % (v/v) Formamid 0,3 M NaCl 20 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM $NaPO_4$ pH 8,0 (93 % (v/v) 0,5 M Na_2HPO_4, 7 % (v/v) NaH_2PO_4) 10 % (w/v) Dextransulfat 1x Denhardt´s 0,5 mg/ml Hefe t-RNA
Laemmli, 6x	35 % (v/v) 1 M Tris pH 6,8 10 % (w/v) SDS 30 % (v/v) Glycerol 9,3 % (w/v) Dithiothreitol (DTT) 0,001 % (w/v) Bromphenolblau
Lysepuffer für Plasmid-DNA Isolierung	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
MBSTL-Puffer pH 7,5	0,15 M NaCl 0,1 M Maleinsäure 2 mM Levamisol 0,1 % Tween-20
Neutralisierungspuffer pH 5,5, Plasmid-DNA-Isolierung	3 M Kaliumacetat
Neutralisierungspuffer Southern Blot	0,5 M Tris/HCl pH 7,0 1,5 M NaCl
Low-Stringency Puffer	0,1 % SDS in 2x SSC pH 7,0
NT-Puffer	0,15 M NaCl 0,1 M Tris/HCl pH 7,5
NTM-Puffer	0,1 M NaCl 0,1 M Tris/HCl pH 9,5 50 mM $MgCl_2$
NTMLT-Puffer	0,1 M NaCl 0,1 M Tris/HCl pH 9,5 50 mM $MgCl_2$ 2 mM Levamisol 0,1 % Tween-20
Paraformaldehyd (PFA)	4 % (w/v) Paraformaldehyd in 1x PBS
PBST 10x, pH 7,4	8 % (w/v) NaCl 0,2 % (w/v) KCl 0,764 % (w/v) Na_2HPO_4 x $2H_2O$ 0,2 % (w/v) KH_2PO_4 1 % (v/v) Tween-20

phosphatgepufferte Natriumchlorid Lösung, 10x, pH 7,4 (PBS)	1,4 M NaCl 27 mM KCl 15 mM KH_2PO_4 65 mM Na_2HPO_4
Proteinase K-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0 5 mM EDTA 40 µg/ml Proteinase K
Puffer-1	100 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl
Resuspensionspuffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/µl RNase A
SDS-Laufpuffer Western Blot, 10x	3 % (w/v) Tris 14,4 % (w/v) Glycine 1 % (w/v) SDS
Standard Natriumcitrat Lösung (SSC) 20x, pH 7,0 und pH 6,4	0,3 M Natriumcitrat 3 M NaCl
STE-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % (w/v) SDS
STE-*in situ*-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 5 mM EDTA, pH 8,0 0,5 M NaCl
Stripping-Puffer, pH 2,2	1,5 % (w/v) Glycin 0,1 % (w/v) SDS 1 % (v/v) Tween-20
Transferpuffer 10x, pH 8,3	3 % (w/v) Tris 14,4 % (w/v) Glycine 0,02 % (w/v) Sodiumdodecylsulfat (SDS)
Transferpuffer 1x, pH 8,3	10 % (v/v) Transferpuffer 10x 15 % (v/v) Methanol
Stopp-Puffer für *in situ*-Hybridisierungen	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA
Tris-EDTA Puffer (TE), pH 9,0	10 mM Tris 1 mM EDTA
Tris-Borsäure-EDTA Lösung (TBE) 10x, pH 8,0	890 mM Tris 730 mM Borsäure 12,5 mM EDTA
Tris-gepufferte Natriumchlorid Lösung (TBS), 10x, pH 7,4	0,5 M Tris/HCl 1,5 M NaCl
X-Gal Stocklösung	40 mg/ml X-Gal 100 % N,N-Dimethylsulfoxid (DMSO)

2.6 Medien

2.6.1 Medien für die Bakterienkultur

Bakterienkulturen (*E. coli*) wurden mit LB-Medium (engl. *lysogeny broth*) kultiviert. Das LB-Medium wurde mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt, autoklaviert und bei 4 °C gelagert. Durch Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin bzw. 100 µg/ml Kanamycin unmittelbar vor Verwendung des Mediums erfolgte die Selektion auf das jeweilige resistenzvermittelnde Gen.

LB-Medium, pH 7,0	1 % (w/v) Bacto-Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl

2.6.2 Agarplatten

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde dem LB-Medium 1,5 % (w/v) Agar zugegeben, der Ansatz autoklaviert und auf etwa 55 °C abgekühlt. Nach Zugabe entsprechender Antibiotika wurde der warme LB-Agar in 10 cm Petrischalen gegossen und nach dem Erstarren bei 4 °C gelagert.

2.6.3 Medien für die Kultur eukaryontischer Zellen

Eukaryontische Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) oder in RPMI mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS, engl. *fetal calf serum*) und Antibiotika kultiviert. Die für die verschiedenen Zelllinien verwendeten Medien und Antibiotika sowie die eingesetzten Konzentrationen sind in Kapitel 3.1.1 angegeben. Abweichende Serumkonzentrationen in einzelnen Experimenten sind in der jeweiligen Beschreibung genannt.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Fötales Kälberserum (fetal calf serum, FCS)	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Geneticinsulfat (G418, 100 mg/ml)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PBS Tablets	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
RPMI 1640	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Zeocin (100 mg/ml)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.7 Biologisches Material

2.7.1 Bakterienstämme

Für die Transformation und Amplifikation von Plasmid-DNA wurde der chemisch kompetente Wirtsstamm *E. coli* DH5α (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet.

2.7.2 Eukaryontische Zelllinien

Tab. 1: Verwendete eukaryontische Zelllinien

Zellen	Beschreibung	Herkunft
B9	monoklonale, adulte Fibroblasten aus *Ptch$^{flox/flox}$; ERT2$^{+/-}$* Maus	F. Nitzki, AG Hahn
C3H10T1/2	murine embryonale Fibroblasten	ATCC LGC Promochem, Wesel; CRL-1573
HEK293	humane embryonale Leberzellen	ATCC LGC Promochem, Wesel; CRL-1573
HEK293 Shh-N	mit Shh-N Expressionsplasmid stabil transfizierte HEK293	P. Beachy, J. Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA
PC3	humane Prostatakrebszelllinie	ATCC LGC Promochem, Wesel; CRL-1740
ShhLIGHT2	mit Gli-BS-Firefly-Luziferase- und Renilla-Luziferase Reporterplasmiden stabil transfizierte NIH-3T3 (murine Fibroblasten)	P. Beachy, J. Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA
TP5014/TP1588	RMS-Zelllinien aus *Ptch$^{neo12/+}$* Maus	T. Pietsch, Universität Bonn

2.7.3 Verwendete Mauslinien

Wildtypmäuse der Inzuchtlinie C57BL/6N und Nacktmäuse (CD1 *nu/nu*) wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Balbc/J wurden bei Jackson Laboratories (Bar Harbor, USA) erworben. Die Wildtypmäuse der Auszuchtlinie CD1 wurden im Tierstall des Institutes für Humangenetik gezüchtet. Die *Ptch$^{neo67/+}$*-Mäuse wurden durch heterozygote Deletion der Exone 6 und 7 des *Ptch*-Gens generiert [Hahn H *et al.*, 1998] und durch Verpaarungen eines *Ptch*-heterozygoten mit einem entsprechenden Wildtyp-Elternteil erhalten. B6.129S4-*Dnmt1$^{tm1Jae/+}$*-Mäuse, die in dieser Arbeit als B6-*Dnmt1$^{N/+}$*-Mäuse bezeichnet werden, wurden von den Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA erworben.

Für die Experimente mit dem Smo-Antagonisten Cyclopamin wurden *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse auf CD1-Hintergrund bzw. einem gemischten C57BL/6N x Balbc/J-Hintergrund ((B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$) verwendet.

Die epigenetischen Studien wurden je nach Fragestellung an C57BL/6N-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen (im Weiteren als B6-*Ptch*$^{neo67/+}$ bezeichnet) oder an (C57BL/6NxBalbc/J)-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen (im Weiteren als (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$ bezeichnet) durchgeführt. Zusätzlich wurden Analysen an einer F1-Generation einer Kreuzung von B6-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen mit B6-*Dnmt1*$^{N/+}$-Mäusen durchgeführt.

2.8 DNA-Oligonukleotide

DNA-Oligonukleotide wurden von der Qiagen GmbH, Hilden, bezogen und auf eine Stammkonzentration von 100 µM mit Ampuwa eingestellt. Die Konzentration der Arbeitslösung für die PCR-Methoden betrug 10 µM.

2.8.1 DNA-Oligonukleotide zur Genotypisierung von Mäusen

Die Genotypisierung von Mäusen ist in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Hierzu wurde mit den in Tabelle 2 aufgelisteten Primern gearbeitet.

Tab. 2: DNA-Oligonukleotide für die Genotypisierungen von Mauslinien

Genotyp	Fragmentgröße	Primerbezeichnung (Vorwärts-, Rückwärtsprimer)	Primersequenz (5`-3`)	Referenz
Ptch$^{+/+}$	635 bp^{wt}	*neo-L*	AGTGCCAGCGGGGCTGCTAAA	Hahn H *et al.*, 1998
Ptch$^{neo67/+}$	400 bp^{mut}	*mPTC11R3* *Pst4KF*	CTGCCTGTTATGTGGTTCAAACCG GGGAGGGGATTTCAGCAGAATGTT	
Dnmt$^{+/+}$	334 bp^{wt}	*PGKPR1*	GGGAACTTCCTGACTAGGGG	Cormier RT, Dove WF, 2000
Dnmt$^{N/+}$	472 bp^{mut}	*exon1-1* *Nae 3*	GGGCCAGTTGTGTGACTTGG CTTGGGCCTGGATCTTGGGGATC	

Abkürzungen: wt Wildtypallel, mut mutantes Allel.

2.8.2 DNA-Oligonukleotide für die Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Der semiquantitative Nachweis von Transkripten erfolgte mittels RT-PCR an cDNA und den in Tabelle 3 aufgelisteten DNA-Oligonukleotiden.

Tab. 3: DNA-Oligonukleotide für die RT-PCR

Transkript	Primerbezeichnung (Vorwärts-, Rückwärtsprimer)	Primersequenz (5`-3`)	Referenz
Apaf1	*m-Apaf1-tq-F* *m-Apaf1-tq-R*	AGCCGTTCGAGATCACTCCC TGCAGTTTCATGAGAAGCCCA	diese Arbeit
Caspase 1	*m-Caspase1-tq-F* *m-Caspase1-tq-R*	TGATGGCATTAAGAAGGCCCA TGATGGCATTAAGAAGGCCCA	diese Arbeit
Caspase 8	*m-Caspase8-tq-F* *m-Caspase8-tq-R*	GAACTGTGTGACTCGCCAAGAGA GGCCTTGCTGAAATCATGATTGT	diese Arbeit
Dapk1	*m-DAPK-1-tq-F* *m-DAPK-1-tq-R*	GAGTGTCGCCAGGAGTGATGAT GGGCTGGTTGACGTCATAGCT	diese Arbeit
Gapd	*Gapd-F* *Gapd-R*	ATCTTCTTGTGCAGTGCCAG ATGACCACAGTCCATGCCAT	Uhmann A *et al.*, 2005
Gli1	*mGliF8* *mGliR9*	TGCACCAAGCGCTACACAGATCCCA AGCTGATGCAGCTGATCCAGCCTA	AG Hahn
Igf2	*Igf2 TaqManF* *Igf2 Exon6R*	TGTGCTGCATCGCTGCTTAC TTGCTGGACATCTCCGAAGAG	AG Hahn
Igfbp3	*m Igfbp3-tq-F* *m Igfbp3-q-R*	CAGCCAGCGCTACAAAGTTGA ATGTGGACGCCTCTGGGACT	diese Arbeit
Junb	*mJunb- tq-F* *mJunb-tq-R*	ACTCCTGAAACCCACCTTGGC TCCGTGGAGGCTAGCTTCAG	diese Arbeit
Kif5c	*mKif5c-tq-F* *mKif5c-tq-R*	AACATCACGCCTGTTGTGGAC GCTTCAGCTTTTGAGCCAGCT	diese Arbeit
Mageb2	*mMageb2-tq-F2* *mMageb2-tq-R2*	GAAATTGATCCCAGCACTCATTCC CACGGTTACCCTTCATGAAGATCA	diese Arbeit
Mmp2	*mMmp2-tq-F* *mMmp2-tq-R*	CAGCCCAAGTGGGACAAGAAC CGGAGTGACGTCGCTCCATA	AG Hahn
p15	*mp15-tq-F* *mp15-tq-R*	CAGATCCCAACGCCCTGAA TGGGTTCTGCTCCGTGGAG	diese Arbeit
p16	*mp16-tq-F1* *mp16-tq-R1*	GAGCTGCGCTCTGGCTTTC GCTACGTGAACGTTGCCCAT	diese Arbeit
p16	*mp16-tq-F2:* *mp16-tq-R2*	GGACATCAAGACATCGTGCGAT TTAGCTCTGCTCTTGGGATTGG	diese Arbei

Weiter Tab. 3: DNA-Oligonukleotide für die RT-PCR

Transkript	Primerbezeichnung (Vorwärts-, Rückwärtsprimer)	Primersequenz (5`-3`)	Referenz
p16	*mp16-tq-F3* *mp16-tq-R3*	CTCTTTCGGTCGTACCCCGA TCCTCGCAGTTCGAATCTGC	diese Arbei
Ptch	*mPtch F18* *mPtch R20*	TTCTGCTGCCTGTCCTCTTATC GCCAGAATGCCCTTCAGTAGAA	AG Hahn
Rassf1A	*mRassf1A-tq-F* *mRassf1A-tq-R*	GCGGAGCCAGAACTCATTGA GACGTGCTGCTGTGACGGAT	diese Arbeit
Socs3	*m-SOCS3-tq-F* *m-SOCS3-tq-R*	ACGTTGAGCGTCAAGACCCAG TACACAGTCGAAGCGGGGAAC	diese Arbeit
Wif1	*mWif1-tq-F* *mWif1-tq-R*	CGCCCATCAGGCTAGAGTGC GACAGGAATGGCTGGCATTCT	diese Arbeit

2.8.3 DNA-Oligonukleotide für die quantitative *real time*-PCR

2.8.3.1 DNA-Oligonukleotide für die quantitative *real time*-PCR an genomischer DNA (qPCR)

Zur Untersuchung einer *Gli1*-Amplifikation im RMS und im Skelettmuskel wurden die Primer *mGli1 gDNAtq F2* 5`-AAAGACCTGGCTCCAGCTGTCT-3`und *mGli1 gDNAtq R* 5`-CACC TTCTCCTGCAGAGCAAGT-3` in einem SYBR Green-basierten Assay (Kap. 3.3.6.1) verwendet. Zur Normalisierung wurde *Pelota* vermessen (*Pelo F1* 5`-CGGTCTGAGTGCTGGT AGGGA-3`, *Pelo R* 5`-TCTGCACCTTAGCGTGAAGCC-3`).

2.8.3.2 DNA-Oligonukleotide und Sonden für die quantitative *real time*-PCR an cDNA (qRT-PCR)

DNA-Oligonukleotide für die quantitative Bestimmung der Genexpression sind in Tabelle 4 aufgelistet. Ist keine Sondensequenz angegeben, handelt es sich um SYBR Green-basierte Assays.

Tab. 4: DNA-Oligonukleotide für die qRT-PCR

Transkript	Primerbezeichnung (Vorwärts-, Rückwärtsprimer)	Primersequenz (5`-3`)	Referenz
18S rRNA	*m18srRNA-F* *m18srRNA-R*	CGGCTTGGTGACTCTAGATAAC GACACTCAGCTAAGAGCATCGA	Ecke E *et al.*, 2008
Δ67Ptch	*mPtchmutF* *mPtchmutR* *probe_mPtchmut2*	CATTACACCTTTGGACTGCTTCTG AGTCATTAACTGGAACATGGTTTGC GGCGTGAGCGAGGAGGTATGCTG	Uhmann A *et al.*, 2005
Bcl-2	*Bcl2-F1* *Bcl2-R1*	GGACAACATCGCCCTGTGGATG AACAGAGGTCGCATGCTGGG	A. Uhmann, AG Hahn
Gli1	*mGli1-tq-f* *mGli1-tq-r*	TACATGCTGGTGGTGCACATG ACCGAAGGTGCGTCTTGAGG	A. Uhmann, AG Hahn
Igf2	*mIgf2 TaqManF1* *mIgf2 TaqManR1* *probe_mIgf2*	TGTGCTGCATCGCTGCTTAC CGGTCCGAACAGACAAACTGA CCCGGAGACTCTGTGCGGAGG	Hahn H *et al.*, 2000
Mageb2	*mMageb2-tq-F* *mMageb2-tq-R*	AGTTCAGCCCACTGCAGAGGA GTGCAGGATACACCTGCACCA	diese Arbeit
Mef2c	*Mef2c tq F* *Mef2c tq R*	CAGGACAAGGAATGGGAGGAT GCGGCATGTTATGTAGGTGCT	diese Arbeit
Myf6	*mMyf6 tq F* *mMyf6 R*	CAACCAGAGACTGCCCAAGGT GATCCGAAACACTTGGCCACT	diese Arbeit
MyoD1	*mMyoD1 tq F* *mMyoD1 tq R*	ACAGTGGCGACTCAGATGCAT GCCTCACTGTAGTAGGCGGTG	diese Arbeit
Myogenin	*mMyogenin tq F* *mMyogenin tq R*	CTGAAGAGGAGCACCCTGCTC GTCTGGGAAGGCAACAGACATATC	diese Arbeit
Myosin Heavy chain 1 (MHC1)	*MHC tq F* *MHC tq*	AACACGAAGCGTGTCATCCAGTA GTCTCGATGTCAGCAGATGCCAG	diese Arbeit
p21	*mp21 tq F* *mp21 tq R*	CCTTGTCGCTGTCTTGCACTC TCTCTTGCAGAAGACCAATCTGC	diese Arbeit
p27	*mp27 tq F* *mp27 tq R*	AACTCTGAGGACCGGCATTTG CGGGGAACCGTCTGAAACAT	diese Arbeit
Tropomyosin	*mTropo tq F* *mTropo tq R*	GAGGATGAACTAGCAACCATGCA CCAGCTCCTCTTCAACCAGCT	diese Arbeit
wtPtch	*mPtchwt F1* *mPtchwt R1* *probe_mPtchwt*	TACCGTCAAGAATGCCACTGG GTGTTCATACATTTGCTTGGGAGTC AAACTTGTCAGCGCTCA	Uhmann A *et al.*, 2005

2.8.4 DNA-Oligonukleotide für die Bisulfit-PCR und Bisulfit-DNA-Sequenzanalyse

Tab. 5: DNA-Oligonukleotide für die Bisulfit-PCR

Region	Primerbezeichnung (Vorwärts-, Rückwärtsprimer)	Primersequenz (5`-3`)	Referenz
A	*BiZe Af1*	GGTTTGGGATTTAGGATGGTAAG	S. Tauber, AG
	BiZe Ar1	ACTTCTCAACTACCAACCAATAACTAC	Hahn
D	*BiZe Df1*	GGGGTTTTGGGTAGGTAGG	S. Tauber, AG
	BiZe Dr1	ATACACCTTAAAAATCTACTCCAAAAC	Hahn
F	*BiZe Bf1*	TTTATTTATTGAGTTAAGGAGTTGTTG	S. Tauber, AG
	BiZe Cr1	CCCAAATCCCCCCCAAAC	Hahn
I	*Bi If2*	AGTAGATTATAGGGGAAG	diese Arbeit
	Bi Ir2	ACCCAACTATACAAAACCTCT	
L	*Bi Lf*	GGGGGTGGGGGAGATTTTA	diese Arbeit
	Bi Lr	AAACCTACTCCACCAC	

Für die Sequenzierung von PCR-Produkten, die in das Plasmid *pGEM-T Easy* kloniert wurden, diente der *SP6*-Primer 5`-TTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGC-3`.

2.9 Sonden für Southern Blot und *in situ*-Hybridisierung

Die *pMR150*-Sonde für den Southern Blot wurde aus dem pBluescript II KS+ mittels PCR amplifiziert. Die hierfür verwendeten Primer waren *pMR150* f 5`-ACACTCCTCGAGACTG AAAAACACATTCGT-3` und *pMR150* r 5`-CTCAAAGAATTCAGTGTGGTTTTCATCA TT-3`. Der pBluescript II KS+ und die Primer für die Sondenamplifikation wurden von J. Stempak, Abteilung für Medizin und Ernährungswissenschaften, Universität Toronto, Kanada, zur Verfügung gestellt.

Tab. 6: *in situ*-Hybridisierungssonden

Sonde	Plasmid	Restriktionsenzym	RNA-Polymerase	Referenz
67Ptch antisense	pCRIIEx6/7 5`-3`	BamH I	T7	H. Hahn, Institut für
67Ptch sense	pCRIIEx6/7 3`-5`	BamH I	T7	Humangenetik
Gli1 antisense	pmGli1	Not I	T7	M. Wijgerde, Rot-
Gli1 sense	pmGli1	Hind III	T3	terdam, Niederlande

2.10 Plasmide

Tab. 7: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Klonierungs-vektor	Insert	Verwendung	Referenz
pBBSTpMR150	pBBluescript II KS	*MR150*	*pMR150*-Sonde für Southern Blot	bereitgestellt durch J. Stempak, Unviversität Toronto, Kanada
pCMV5-mShhN	pCMV5	murines *Shh-N*	Transfektion	P. Kogerman, Karolinska Institut, Schweden
pCRIIEx6/7 3`-5`	pCRII	*Ptch* Exone 6, 7	*67Ptch* sense *in situ*-Sonde	U. Ferch, AG Hahn
pCRIIEx6/7 5`-3`	pCRII	*Ptch* Exone 6,7	*67Ptch* antisense *in situ*-Sonde	U. Ferch, AG Hahn
pCR3.1	pCR3.1	-	Transfektion	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pCR 3.1-Gli1	pCR3.1	*Gli1*	Transfektion	R. Toftgard, Karolinska Institut, Schweden
pGEM-T Easy	pGEM-T	-	Klonierung	Promega, Mannheim
pGL3 9xGli-BS-Firefly	pGL3	Firefly-Luciferase, 9 Gli-Bindungsstellen	Transfektion	C. Beer, HZI, Braunschweig
pmGli1	pBluescript	m*Gli1*	*Gli1 in situ*-Sonde	M. Wijgerde, Universität Rotterdam
pRL-CMV Luc	pRL	Renilla-Luciferase	Transfektion	Promega, Mannheim

2.11 Enzyme

Tab. 8: Verwendete Enzyme

Enzym	Anwendung	Hersteller
Collagenase H (Clostridiopepdidase A)	Kultivierung primärer RMS- und MB-Zellen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
HotStar Taq-Polymerase (aus HotStar High Fidelity Polymerase Kit)	Bisulfit-PCR	Qiagen GmbH, Hilden
Proteinase K	DNA-Isolierung, *in situ*-Hybridisierung	Carl Roth, Karlsruhe
Reverse Transkriptase SuperScript II	cDNA-Synthese	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Weiter Tab. 8: Verwendete Enzyme

Enzym	Anwendung	Hersteller
Restriktionsendonukleasen	Restriktionshydrolyse	Invitrogen GmbH, Karlsruhe New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
RNase A	*in situ*-Hybridisierung	Carl Roth, Karlsruhe
T3 RNA-Polymerase	Herstellung von Sonden für *in situ*-Hybridisierung	Promega GmbH, Mannheim
T4 DNA-Ligase	Ligation	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
T7 RNA-Polymerase	Herstellung von Sonden für *in situ*-Hybridisierung	Promega GmbH, Mannheim
Taq DNA-Polymerase	PCR und RT-PCR	Molzym GmbH & Co. KG, Bremen Bioline GmbH, Luckenwalde

2.12 Antikörper

2.12.1 Primäre Antikörper

Die für immunhistochemische Methoden und Western Blot verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 9 aufgelistet. Die jeweiligen Verdünnungsmedien der Antikörper sind der Beschreibung der jeweiligen Methode zu entnehmen.

Tab. 9: Verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Ursprung	Verwendung	Hersteller
anti-acetyliertes Histon H4	Kaninchen, polyklonal	WB	Upstate Biotechnology, Millipore, Dundee, UK
anti-aktive Caspase 3	Kaninchen, polyklonal	IHC	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
anti-Bcl-2	Kaninchen, polyklonal	IHC	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
anti-Desmin	Kaninchen, polyklonal	IHC, IF	Dianova GmbH, Hamburg
anti-Histon H2B	Kaninchen, polyklonal	WB	Upstate Biotechnology, Millipore, Dundee, UK
anti-Ki67	Maus, monoklonal	IHC	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
anti-Myogenin	Maus, monoklonal	IHC	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
anti-Pospho-Akt	Kaninchen, monoklonal	IHC	Cell Signaling Technology Inc, Danvers, USA

Abkürzungen: IHC Immunhistochemie, IF Immunfluoreszenz, WB Western Blot.

2.12.2 Sekundäre Antikörper

Tab. 10: Verwendete sekundäre Antikörper.

Antikörper	Ursprung	Verwendung	Hersteller
anti-Digoxigenin Fab AP-konjugiert	Schaaf	DB, ISH	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
anti-Kaninchen IgG (H+L) F(ab´)2, HRP-konjugiert	Esel	WB	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA
anti-Kaninchen, TRITC-konjugiert	Ziege	IF	Dianova GmbH, Hamburg
anti-Maus Ig HRP-konjugiert	Ziege	IHC	Dako GmbH, Hamburg (Teil des EnVision+ System HRP (DAB) Reaktionssystems)

Abkürzungen: AP alkaline Phosphatase, DB Dot Blot, HRP Meerrettich-Peroxidase (engl. *horse raddish peroxidase*), IHC Immunhistochemie, IF Immunfluoreszenz, WB Western Blot.

2.13 Software

ABI 3100 genetic analyzer data collection 1.0	Applied Biosystems, Darmstadt
Excel 200	Microsoft Co., Redmont, USA
FreeHand MX 11.0.2	Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA
Intas GDS	Intas, Göttingen
Microsoft Word Macro for Analysis of Cytosine Methylation	Singal R, Grimes SR, 2001
Photoshop 7.0	Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA
PowerPoint 2000	Microsoft Co., Redmont, USA
Scion Image	Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA
SDS 2.1	Applied Biosystems, Darmstadt
Staden-windows-1-6-0	SourceForge,Inc, Mountain View, USA
Statistica 8	StatSoft GmbH, Hamburg
voxtool 3.064 software	General Electric Medical Systems, Milwaukee, USA
Word 2000	Microsoft Co., Redmont, USA

2.14 Datenbanken

MGI_3.54-mouse genome informatics	http://www.informatics.jax.org/
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html

3 METHODEN

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von Zellen

Zellen wurden bei 37 °C, 5 % Kohlendioxid und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Nach Erreichen von 70-80 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dafür wurden sie zum Ablösen aus dem Kulturgefäß für 3-5 min bei 37 °C mit 2 ml Trypsin behandelt. Die Reaktion wurde mit FCS-haltigem Medium gestoppt und eine entsprechende Menge der Zellsuspension in frischem Medium neu ausgesät. Tabelle 11 gibt die verwendeten Zelllinien und die Zusammensetzung der entsprechenden Kultivierungsmedien wieder.

Zur Langzeitkonservierung wurden die Zellen in FCS-haltigem Medium mit 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert.

Tab. 11: Kultivierungsbedingungen verwendeter Zelllinien und Primärkulturen

Zellen	Beschreibung	Medium	Zusätze
B9	monoklonale, adulte Fibroblasten aus der *Ptch*$^{flox/flox}$*; ERT2*$^{+/-}$-Maus	DMEM	10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin
C3H10T1/2	murine embryonale Fibroblasten	DMEM	10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin
HEK293	humane embryonale Nierenzellen	DMEM	10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin
HEK293 Shh-N	mit Shh-N Expressionsplasmid stabil transfizierte HEK293	DMEM	10 % FCS 400 ng/ml G418 1 % Penicillin/Streptomycin
PC3	humane Prostatakrebszelllinie	DMEM	10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin
primäre RMS- und MB-Kulturen	RMS- oder MB-Zellen aus *Ptch*$^{neo67/+}$ Mäusen	DMEM	10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin
ShhLIGHT2	mit Gli1-BS Firefly-Luziferase- und Renilla-Luziferase Reporterplasmiden stabil transfizierte NIH-3T3 (murine Fibroblasten)	DMEM	10 % FCS 400 ng/ml G418 50 ng/ml Zeocin
TP5014/TP1588	RMS-Zelllinien aus *Ptch*$^{neo12/+}$-Maus	RPMI	10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin

3.1.2 Anlegen von RMS- und MB-Primärkulturen

Tumortragende Tiere wurden mittels Kohlendioxidinhalation getötet. RMS wurden sauber vom umliegenden Gewebe abgetrennt, während bei MB das gesamte Kleinhirn isoliert wurde. Von jedem Tumor wurde Material zur histologischen Abklärung durch den Pathologen für Kryo- oder Paraffineinbettung aufgehoben. Mittels einer Skalpellklinge wurde das Material zerkleinert und anschließend in 2 mg/ml Collagenase H in DMEM für 30 min (MB) bzw. für 60 min (RMS) bei 37 °C und 1000 rpm auf dem Schüttler hydrolysiert. Weiteres Dissoziieren der Gewebefragmente erfolgte durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 300 x g sedimentiert und in DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin aufgenommen und für Proliferationsanalysen in 96-Loch Platten bzw. für Expressionsanalysen in 6-Loch Platten ausgesät. Die Zellen wurden nicht länger als 4 Tage vor Versuchsstart kultiviert.

3.1.3 Behandlung von Zellen mit Cyclopamin, 5-Aza und VPA

Für den Einsatz in der Zellkultur wurde Cyclopamin in Ethanol (10 mM) gelöst und in Aliquots bei -20 °C gelagert. Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen mit 0,25-10 µM Cyclopamin unter serumreduzierten Bedingungen (0,5 % oder 2,5 % FCS) für 24-72 h inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem gleichem Volumen an Ethanol behandelt wurden. In Initialversuchen wurde z. T. das Cyclopaminderivat KAAD und das inaktive Strukturanalogon Tomatidin eingesetzt, die beide ebenfalls in Ethanol gelöst wurden.

5-Aza (500 µM) und VPA (200 mM) wurden in DPBS auf Eis gelöst und aliquotiert bei -80 °C gelagert. Aufgrund der Instabilität von 5-Aza wurde die überschüssige Lösung nach einmaligem Auftauen verworfen. Zellen wurden für Proliferationsanalysen 48 h und für Southern Blot Analysen 72 h mit 5 µM 5-Aza und/oder mit 2 mM VPA behandelt, wobei alle 24 h das Medium gewechselt wurde. Kontrollzellen wurden mit dem entsprechenden Volumen DPBS behandelt.

3.1.4 Transfektion von PC3-Zellen und Behandlung mit Cyclopamin

PC3-Zellen wurden mit einem Shh-Expressionplasmid, dem Gli-BS-Firefly-Luziferase-Reporterplasmid und dem Renilla-Luziferase-Expressionsplasmid transfiziert. Durch die Expression von Shh wurde der Shh-Signalweg in den Zellen initiiert und die Expression der *Gli*-Transkriptionsfaktoren vermittelt, was an der Aktivität der Firefly-Luziferase zu verfolgen ist.

Die spezifische Einflussnahme des Smo-Inhibitors Cyclopamin auf den Signalweg ist somit in der Reduktion der Luziferaseaktivität erkennbar.

Für diesen Versuch wurde nach dem Protokoll von Taipale J *et al.* [2000] verfahren. Die PC3-Zellen wurden in einer 96-Loch Platte ausgesät (7000 Zellen/Loch). Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit 40 ng Gli-BS-Reporterplamid, 10 ng Renilla-Luziferase-Expressionsplasmid und 50 ng Shh-Expressionsplasmid bzw. dem Leervektor pCR3.1 als Kontrolle transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurden den Angaben des Herstellers folgend 0,3 µl TransFectin in einem Gesamttransfektionsansatz von 50 µl pro Loch verwendet. Die Zellen wurden für 4 h bei 37 °C mit dem Transfektionsansatz inkubiert, gewaschen und in DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin bis zur Konfluenz für 1-2 Tage kultiviert. Anschließend erfolgten die Behandlung mit 5 µM Cyclopamin für 2 Tage unter serumreduzierten Bedingungen (0,5 % FCS) und die Duale Luziferasemessung.

3.1.5 Gewinnung von Shh-N-konditioniertem Medium

Zur Stimulation des Shh-Signalweges in ShhLIGHT2-Zellen wurde Shh-N-konditioniertes Medium von HEK293 Shh-N-Zellen gewonnen [Chen JK *et al.*, 2002]. Shh-N produzierende HEK293-Zellen wurden bis zum Erreichen von 70-80 % Konfluenz in DMEM mit 10 % FCS und 400 ng/ml G418 kultiviert. Zur Induktion der Shh-N-Produktion wurden die Zellen dann für einen Tag unter serumarmen Bedingungen (2 % FCS) ohne Antibiotikum kultiviert, das Medium abgezogen und durch eine 0,22 µm Membran filtriert. Shh-N-konditioniertes Medium ist für einige Wochen bei 4 °C lagerbar. Das konditionierte Medium kam 1:2 verdünnt in DMEM mit 0,5 % FCS zum Einsatz. Als Kontrollmedium diente nach dem gleichen Protokoll hergestelltes Medium von Wildtyp HEK293-Zellen.

3.1.6 Gewinnung von rekombinantem SHH-N aus Sf9-Zellen

Humanes rekombinantes SHH wurde von F. Aberger, Universität Salzburg, zur Verfügung gestellt. Die Herstellung wird hier nur kurz skizziert.

Die aminoterminale Region von SHH (Aminosäuren 1-197) wurde in den pBacPak8 kloniert. Zur Expression wurden Sf9-Zellen mit 4,8 x 10^7 pfu/ml pBacPakSHH2 für 72-96 h bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgezogen und in Sukrose (20 % w/v in PBS) durch Zentrifugation aufgereinigt. Rekombinantes SHH-N wurde bei -70 °C gelagert.

3.1.7 Stimulation des Shh-Signalweges mittels Shh-N-konditioniertem Medium, Hh-Ag1.2 oder rekombinantem SHH-N

Die Stimulation der ShhLIGHT2-Zellen erfolgte mit Shh-N-konditioniertem Medium im 96-Loch Format. 24 h nach dem Ausplattieren und der Kultivierung in DMEM mit 10 % FCS, G418 und Zeocin (Kap. 3.1.1) wurde das Medium abgezogen und die Zellen mit Shh-N-konditioniertem Medium für 30 h inkubiert. Das Shh-N-konditionierte Medium war 1:2 mit DMEM (0,5 % FCS) verdünnt.

Der Hh-Agonist Hh-Ag1.2 [Frank-Kamenetsky M *et al.*, 2002] wurde in DMSO gelöst und 200 nM unter serumreduzierten Bedingungen (0,5 % FCS) für 24 und 48 h eingesetzt, um in ShhLIGHT2-Zellen bzw. B9-Zellen den Hh-Signalweg zu aktivieren.

Humanes SHH-N-Protein (bereitgestellt von F. Aberger, Universität Salzburg, Österreich) wurde zur Stimulation von C3H10T1/2-Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden mit 5 % SHH-N für 48 h inkubiert.

Die Inkubation mit 5 µM Cyclopamin erfolgte jeweils zeitgleich mit der Induktion des Hh-Signalweges.

3.1.8 Proliferationsassay

Die Analyse des Proliferationsverhaltens von Zellen erfolgte im 96-Loch Format mit einem BrdU Chemilumineszenz Elisa. Das Pyrimidinanalog Bromdesoxyuridin (BrdU) wird an Stelle von Thymidin während der Replikation in DNA eingebaut. Die Menge an gebundenem BrdU ist somit proportional zur Proliferationsrate.

Die Zellen wurden entsprechend der Fragestellung mit verschiedenen Substanzen behandelt (Kap. 3.1.3). 24 h vor Abschluss der Inkubation wurde dem Medium BrdU (10 µM Endkonzentration) zugesetzt. Am Tag der Messung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 30 min mit 200 µl Fixierungspuffer, der sowohl die Zellen fixiert als auch die DNA denaturiert, inkubiert. Der mit der HRP gekoppelte anti-BrdU-Antikörper wurde 1:100 im zugehörigen Puffer verdünnt und für 60 min auf die Zellen gegeben. Nach dreimaligem Waschen erfolgten die Zugabe des Peroxidasesubstrates und die Messung der Chemilumineszenz im Luminometer.

3.1.9 Dualer Luziferaseassay

Das Gli-BS-Firefly-Luziferase Reporterplasmid besitzt die genetische Information für die Firefly-Luziferase aus *Photinus pyralis*. Im Fall eines aktiven Shh-Signalweges und nach Aktivierung der Gli-Transkriptionsfaktoren wird über die neun Bindungsstellen am Gli-BS-Firefly-Luziferase Reporterplasmid die Expression der Firefly-Luziferase vermittelt. Die Aktivität des Enzyms kann mittels Luziferaseassay bestimmt werden. Als Normalisierung dient die konstitutiv vom Renilla-Reporterplasmid exprimierte Renilla-Luziferase aus *Renilla reniformis*.

Für die Messungen wurden entweder ShhLIGHT2-Zellen eingesetzt, die stabil mit beiden Reporterplasmiden transfiziert sind, oder es wurden mit den entsprechenden Plasmiden transfizierte PC3-Zellen verwendet. Dem Protokoll des Herstellers (Promega, Dual Glo Luciferase System) folgend wurde nach der Behandlung der Zellen (Kap. 3.1.3) im 96-Loch Format das Medium entfernt, die Zellen gewaschen und durch Zugabe des Lysepuffers PLB aufgeschlossen. Zur Messung der Firefly-Aktivität wurden zu 20 µl der Zellsuspension in einem Luminometer 100 µl LAR II gegeben. Durch Zusetzen von 100 µl Stop & Glo wurde das Signal der Firefly-Luziferase unterdrückt und die Renilla-Luziferase aktiviert.

3.2 Tierexperimentelle Methoden

3.2.1 Maushaltung

Die Mauslinien B6-*Ptch*$^{neo67/+}$, CD1-*Ptch*$^{neo67/+}$, (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$ und B6-*Dnmt1*$^{N/+}$ wurden im institutseigenem Tierstall gehalten, die immundefizienten Nacktmäuse in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Göttingen. Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen Typ II und III bei einem zwölfstündigen Hell-Dunkelrhythmus, einer Temperatur von 20 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 ± 10 % gehalten. Pelletiertes Trockenfutter sowie Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

3.2.2 Genotypisierung von Mäusen

Die Genotypisierung der Tiere erfolgte mittels PCR (Tab. 12) an DNA, die aus einer Schwanzbiopsie gewonnen wurde. Die Biopsie wurde im Alter von 4-5 Wochen zeitgleich mit dem Absetzen von der Mutter entnommen.

Eine Ausnahme bildeten die B6-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse. Aufgrund der geringen Wurfgrößen und hohen Jungtiersterberate wurden 3-5 Tage alte Jungtiere durch Fußtätowierung markiert und der Schwanz biopsiert. Dies ermöglichte ein frühzeitiges Aussortieren der Wildtypen und erhöhte so die Überlebenschancen der *Ptch*-heterozygoten Nachkommen. Der Ablauf der DNA-Isolierung aus Mausschwänzen ist in Kapitel 3.3.1.1 beschrieben. *wtPtch*-Allele (635 bp) wurden mit der Primerkombination *Pst4KF* und *mPTC11R3* detektiert. Der Primer *mPTC11R3* liegt im Exon 6 des *Ptch*-Gens, das im mutanten Allel deletiert ist. Zur Erfassung der mutanten Allele (~400 bp) wurden die Primer *Pst4KF* und *neoL* verwendet [Hahn H *et al.*, 1998]. Alle drei Primer wurden in einen einzigen PCR-Ansatz gegeben. Der Primer *Pst4KF*, der sowohl den wt als auch den mutanten *Ptch*-Lokus detektiert, wurde in doppelter Konzentration eingesetzt.

Die *Dnmt1*$^{N/+}$-Mäuse wurden entsprechend Cormier RT und Dove WF [2000] mit den Primern *PGKPR1* und *Exon1-1* für das mutante Allel (472 bp), sowie den Primern *PGKPR1* und *Nae 3* für das Wildtypallel (334 bp) genotypisiert.

Tab. 12 A: Genotypisierungs-PCR für *Ptch*

Komponente	*Ptch*-Genotypisierung
dNTPs (10 mM)	0,2 µl
Pst4KF (10 µM)	1,0 µl
mPTC11R3 (10 µM)	0,5 µl
neoL (10 µM)	0,5 µl
10x Puffer	1,0 µl
Cresol (0,1 % w/v)	1,0 µl
MolTaq (5 U/µl)	0,2 µl
DNA	~100 ng
ad 10 µl ddH_2O	

Tab. 12 B: Genotypisierungs-PCR für *Dnmt1*

Komponente	*Dnmt1*-Genotypisierung
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Exon1-1 (10 µM)	0,4 µl
PGKPR1 (10 µM)	0,2 µl
Nae 3 (10 µM)	0,2 µl
10x Puffer	1 µl
Cresol (0,1 % w/v)	1 µl
MolTaq (5 U/µl)	0,1 µl
DNA	~100 ng
ad 10 µl ddH_2O	

PCR-Programm *Ptch*-Genotypisierung:

5 min	94 °C	
30 s	94 °C	35 Zyklen
1 min	60 °C	
1,5 min	60 °C	
7 min	72 °C	
∞	10 °C	

PCR-Programm *Dnmt1*-Genotypisierung:

5 min	94 °C	
1 min	94 °C	35 Zyklen
1 min	56 °C	
1 min	72 °C	
3 min	72 °C	
∞	10 °C	

3.2.3 Tumorsichtung

Alle Mauskohorten wurden täglich hinsichtlich des Auftretens von MB untersucht. Hierbei wurde auf die Ausprägung von spezifischen Symptomen geachtet, zu denen Ataxie, Apathie, ein gewölbter Schädel und ein schlechter Allgemeinzustand (Gewichtsabnahme, struppiges Fell) gehören. Die rasche Progression von MB erfordert eine schnellstmögliche Präparation der Tiere nach Erkennung der Symptome.

Zur Erfassung von RMS wurden die Tiere einmal wöchentlich manuell untersucht. Die Großzahl der RMS manifestiert sich an den Extremitäten und ist dadurch leicht zu sehen oder zu ertasten.

3.2.4 Implantation von Tumorzellen in Nacktmäuse

Nacktmäuse weisen eine homozygote Mutation im *Foxn1*-Gen auf [Nehls M *et al.*, 1994]. Sie sind phänotypisch durch das Fehlen jeglicher Behaarung und das Fehlen des Thymus gekennzeichnet [Pantelouris EM, 1968]. Da der Thymus für die Reifung von T-Zellen essentiell ist, besitzen diese Mäuse keine vollständig gereiften T-Zellen und keine Immunantwort gegenüber Fremdgewebe, was sie zu einem idealen Transplantationsmodell macht.

Die zu implantierenden Tumorzellen wurden mittels Trypsin aus den Kulturschalen gelöst, in PBS gewaschen und auf eine Konzentration von 1x 10^5 Zellen/µl in PBS eingestellt. 100 µl der Zellsuspension wurden mit 100 µl Matrigel gemischt und den kurzzeitig über Inhalation von Isofluran betäubten Tieren subkutan auf den Brustkorb gespritzt. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde an Hand des Körpergewichts und der Tumorgröße überwacht. Die Tiere wurden alle 2-3 Tage gewogen und der Tumor mit einem Messschieber vermessen.

3.2.5 Applikation von Medikamenten

3.2.5.1 Systemische und lokale Applikation von Cyclopamin in (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$- und CD1-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse

Für die Behandlung von tumortragenden Mäusen wurden 2 mg/ml Cyclopamin in 45 % 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin/PBS (HBC) für 1 h bei 65 °C gelöst [van den Brink GR *et al.*, 2001] und aliquotiert bei -20 °C gelagert. Die Tiere wurden hinsichtlich des Applikationsmodus in zwei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe erhielt über 28 Tage zweimal täglich 10 mg/kg KG Cyclopamin intraperitoneal (i. p., systemisch). Der zweiten Gruppe wurden

100 µg Cyclopamin in einem Volumen von 50 µl zweimal täglich über 7 Tage direkt in den Tumor (lokal) appliziert. Sowohl die systemischen als auch die lokalen Injektionen erfolgten im Abstand von 12 h, wodurch ein gleichbleibender Plasmaspiegel des Medikaments gewährleistet werden sollte. Die Tiere wurden dreimal wöchentlich gewogen.

Des Weiteren wurden die Kohorten hinsichtlich des Präparationszeitpunktes unterteilt. Eine Gruppe wurde direkt nach der letzten Medikamentengabe für molekulare Analysen getötet. In einer zweiten Gruppe wurde nach Absetzen des Medikaments das Tumorwachstum über 4 Wochen weiter beobachtet, um eine ggf. verzögerte Wirkung von Cyclopamin auf die Tumorprogression erfassen zu können. Dann wurden diese Tiere ebenfalls getötet und Gewebe für weiterführende Analysen asserviert. Tabelle 13 zeigt alle mit Cyclopamin behandelten *Ptch*$^{neo67/+}$-Tiere.

Tab. 13: *Ptch*$^{neo67/+}$ Tiere, die systemisch oder lokal mit Cyclopamin behandelt wurden

Linie	Substanz	Injektionsart	Anzahl der Tiere		
			Gesamtzahl	Präparation bei Therapieende	Präparation 4 Wochen nach Therapieende
(B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$	HBC	systemisch	7	2	5
(B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$	Cyclopamin	systemisch	7	2	5
(B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$	HBC	lokal	5	2	3
(B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$	Cyclopamin	lokal	9	3	6
CD1- *Ptch*$^{neo67/+}$	HBC	lokal	2	2	0
CD1- *Ptch*$^{neo67/+}$	Cyclopamin	lokal	4	3	1

3.2.5.2 Applikation von Cyclopamin in Nacktmäuse mit Transplantaten

Bei Nacktmäusen mit implantierten PC3-Zellen wurde ab Tag 21 nach der Implantation mit der subkutanen Applikation von täglich 50 mg/kg KG Cyclopamin in Ethanol:Triolein (1:4) nach Berman DM *et al.* [2002] begonnen. Da dieser Applikationsmodus sowohl in der mit Cyclopamin als auch in der mit Lösungsmittel behandelten Gruppe zu starken Ulzerationen der Haut an der Spritzstelle führte, wurde die Behandlung ab dem 7. Tag auf i. p. Injektionen von zweimal täglich 10 mg/kg KG Cyclopamin in HBC umgestellt. Es wurden zwei Tiere mit Cyclopamin und zwei mit Lösungsmittel über insgesamt 20 Tage behandelt.

Nacktmäuse, denen TP5014 Zellen implantiert worden waren, erhielten ab Tag 50 (Tumorgröße 90-180 cm^3) für 23 Tage i. p. zweimal täglich 10 mg/kg KG Cyclopamin in HBC. Es wurden zwei Tiere mit Cyclopamin und eines mit HBC behandelt.

3.2.5.3 Applikation von 5-Aza und VPA

Die maximal tolerierten Dosen (MTD) für 5-Aza und VPA wurden im Rahmen der Diplomarbeit von S. Tauber an Wildtyp B6xBalb-Mäusen und Wildtyp B6-Mäusen bestimmt. Die Toxizität der Medikamente wurde nach dem Einfluss auf den Allgemeinzustand, die Sterblichkeit und die Auswirkungen auf das Blutbild der behandelten Mäuse im Vergleich zu den PBS-Kontrollmäusen bewertet. Die Tiere wurden über 4 Wochen täglich mit verschiedenen Dosen der einzelnen Medikamente bzw. in Kombination behandelt. Die MTD wurde auf 0,1 mg/kg/d für 5-Aza und auf 400 mg/kg/d für VPA festgelegt. Da Tiere der Linie B6-*Ptch*$^{neo67/+}$ mit verstärkter Somnolenz auf die MTD der beiden Medikamente reagierten, wurde für diesen Stamm in allen folgenden Spritzstudien die Hälfte der maximal tolerierten Dosis (½ MTD) der Medikamente verwendet.

Zur Applikation der Medikamente wurden Stammlösungen von 120 µg/ml 5-Aza und 320 mg/ml VPA auf Eis hergestellt, die individuellen Applikationslösungen für jedes einzelne Tier nach Gewicht vorbereitet und bei -80 °C weggefroren. Die Tiere wurden wöchentlich gewogen. Die Substanzen wurden in jeweils 50 µl PBS verabreicht. Als Kontrollsubstanz diente PBS. Ein Teil der Tiere wurde 30-120 min nach Applikation der Medikamente für Expressionsanalysen und Proteinuntersuchungen getötet, andere bis zum 200. Lebenstag beobachtet (Tab. 14).

In der prophylaktischen Studie wurde überprüft, ob sich die Initiierung von Tumoren bzw. die Progression von klinisch unauffälligen Tumormikroläsionen durch die Medikamente 5-Aza und VPA hemmen lassen. Zu diesem Zweck wurde mit der Behandlung der Tiere gleich nach dem Absetzen von der Mutter im Alter von 25-30 Tagen, begonnen, da zu diesem Zeitpunkt makroskopisch keine Tumoren detektierbar sind. Gegenstand der Untersuchung waren RMS in (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen und MB in B6-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen. Tabelle 14 zeigt die Einteilung der Kohorten der prophylaktischen Studie.

In der therapeutischen Studie wurden RMS-tragende (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse mit der kombinierten MTD (cMTD) von 5-Aza/VPA (n=22) oder PBS (n=13) täglich i. p. behandelt. Die Tiere wurden nach der Therapie, sofern sie in einem guten Allgemeinzustand waren und

der Tumor eine Größe von etwa 1 cm^3 nicht überschritt, bis etwa zum 200. Lebenstag beobachtet.

Tab. 14: Einteilung der Kohorten für die prophylaktische Studie

Linie	Substanz	Anzahl der Tiere		
		Gesamtzahl	Präparation bei Therapieende	Präparation 4 Wochen nach Therapieende
(B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$	PBS	24	9	15
(B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$	5-Aza	21	21	0
(B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$	VPA	21	21	0
(B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$	5-Aza/VPA	47	30	17
B6-*Ptch*$^{neo67/+}$	PBS	7	7	0
B6-*Ptch*$^{neo67/+}$	5-Aza/VPA	34	34	0

3.2.5.4 Systemische Applikation von Doxorubicin

Doxorubicin wurde als 0,8 mg/ml Lösung in 0,9 % NaCl über die Apotheke des Universitätsklinikums Göttingen bezogen und aliquotiert bei -20 °C für höchstens 3 Wochen gelagert. Tumortragenden (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$-Tieren wurden, wie bei Wojnowski L *et al.* [2005] beschrieben, i. p. 3 mg/kg KG Doxorubicin pro Injektion an den Tagen 0, 7, 14 und 28 verabreicht. Es wurden sechs Tiere mit Doxorubicin behandelt und zwei mit dem Lösungsmittel NaCl.

3.2.5.5 Bestimmung des Tumorvolumens mittels Volumencomputertomographie (VCT)

Das Tumorvolumen der RMS wurde mittels eines Volumencomputertomographen für kleine Tiere wie Nager von GE Healthcare bestimmt. Die VCT ist eine nichtinvasive Methode, die mit einer Auflösung von 200 µm die exakte räumliche Darstellung eines Tumors und die Bestimmung des Tumorvolumens *in vivo* ermöglicht [Greschus S *et al.*, 2005]. Mit Isofluran narkotisierte Tiere wurden mit 125 Bildern/s gescannt [Dullin C *et al.*, 2007]. Zur Visualisierung der Weichgewebstumoren gegenüber dem umliegenden Gewebe wurde den Tieren 30 s vor der Bildaufnahme 200 µl des Kontrastmittels Isovist in die Schwanzvene verabreicht. Zur Bestimmung der Tumorwachstumsrate wurden die Tiere vor Therapiebeginn, am Ende des

Spritzzeitraumes und in den Beobachtungskohorten nach dem entsprechenden Beobachtungszeitraum aufgenommen.

3.2.5.6 Statistische Auswertung der Spritzstudien

Das Tumorwachstum wurde als Logarithmus der Tumorgröße am Ende des Spritz- oder Beobachtungszeitraums relativ zur Ausgangsgröße vor Therapiebeginn definiert. Der Effekt der applizierten Substanzen (Cyclopamin, Doxorubicin, 5-Aza, VPA oder Lösungsmittel) und des Behandlungsmodus (systemisch, lokal) auf die Genexpression wurden berechnet und innerhalb eines linearen Modells getestet. Signifikanzwerte (p-Werte) für die Gruppeneffekte wurden mit Multiplen Testen nach Dunnett adjustiert. Das Signifikanzniveau α wurde auf 5 % festgelegt. Die statistischen Analysen wurden von Herrn Rosenberger, Genetische Epidemiologie der Universität Göttingen, mit SAS 9.0 durchgeführt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

3.3.1.1 DNA-Isolierung aus murinen Geweben

DNA wurde sowohl aus Schwanzbiopsien als auch aus Organen gewonnen. Die DNA der Schwanzbiopsien wurde zur Bestimmung des Genotyps verwendet. Das Gewebe wurde in 250 µl STE-Puffer mit 12,5 µl Proteinase K (10 mg/ml) über Nacht bei 55° C verdaut. Unverdautes Gewebe wurde für 10 min bei 16.060 x g abzentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zur DNA-Fällung mit 99 %igem Ethanol versetzt. Nach intensivem Schütteln erfolgte für 20 min eine weitere Zentrifugation bei 16.060 x g und 4 °C. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet, in 50 bis 100 µl ddH_2O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

Zur DNA-Isolierung aus murinen Organen für qPCR und Southern Blot erfolgten zwei zusätzliche Aufreinigungsschritte der DNA. Zum Überstand des Verdaus wurden 400 µl Phenol:Chloroform (1:1) gegeben und gründlich geschüttelt. Zur Phasentrennung wurde für 10 min bei 16.060 x g und 4 °C zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Chloroform:Isoamylalkohol (50:1) versetzt und unter denselben Bedingungen nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 99 %igem Ethanol versetzt und wie bei der Isolieung von DNA aus Schwanzbiopsien fortgefahren.

3.3.1.2 DNA-Isolierung aus Geweben für Bisulfit-Behandlung

Zur DNA-Isolierung aus RMS und Skelettmuskel für die Bisulfit-Behandlung und die anschließende Sequenzierung wurde der DNeasy Blood and Tissue Kit von Qiagen nach den Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden 25 mg Gewebe in 180 µl ACT-Puffer und 20 µl Proteinase K (10 mg/ml) über Nacht bei 55 °C verdaut. Der Ansatz wurde für etwa 15 s kräftig geschüttelt (Vortexer) und mit 200 µl AL-Puffer versetzt. Nach erneutem Schütteln erfolgte die Zugabe von 200 µl 100 %igem Ethanol. Die gut gemischte Lösung wurde auf die DNeasy Mini Spin Säulchen pipettiert und für 1 min bei 6000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 500 µl AW1-Puffer auf die Säule gegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation unter denselben Bedingungen wurden 500 µl AW2-Puffer auf die Säule pipettiert und für 3 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule für 1 min bei 20.000 x g getrocknet. Zur Elution der DNA wurden 200 µl AE-Puffer auf die Säule gegeben und für 1 min bei 6000 x g zentrifugiert. Die Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösung erfolgte im Photometer, wie in Kapitel 3.3.2.1 ausgeführt.

3.3.1.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen im kleinen Maßstab („Mini-Prep“)

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen im kleinen Maßstab wurde zur Gewinnung der für die Sequenzierung vorgesehenen DNA eingesetzt. Für die Mini-Kulturen wurden 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin in ein 13 ml Reaktionsröhrchen vorgelegt, mit einer Bakterienkolonie von einer LB-Platte angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 170 rpm geschüttelt. 2 µl der Bakterienkultur wurden zur mittelfristigen Konservierung auf eine LB-Platte mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C erneut inkubiert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt. Die restliche Kultur wurde für 10 min bei 3220 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl Resuspensionspuffer resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, zur alkalischen Lyse der Bakterienzellen mit 250 µl Lysepuffer versetzt und geschüttelt. Anschließend wurden 350 µl Puffer zum Neutralisieren hinzu pipettiert und das Gemisch gründlich geschüttelt bevor Proteine durch Zentrifugation für 10 min bei 16.060 x g als weißer Niederschlag sedimentiert wurden. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Chloroform:Isoamylakohol (25:1) gemischt. Zur Phasentrennung wurde erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Die DNA-haltige obere Phase wurde abgenommen und mit 650 µl eiskaltem Isopropanol versetzt, gut gemischt und für 25 min bei 16.060 x g und 4 °C zentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde

mit 70 %igem Ethanol gewaschen, das Pellet bei 37 °C getrocknet und in 50 µl ddH_2O aufgenommen. Zur Kontrolle der aufgereinigten Plasmid-DNA wurde ein Restriktionsverdau wie in Kapitel 3.3.10 beschrieben durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.3.1.4 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen im mittleren Maßstab („Midi-Prep“)

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA im mittleren Maßstab wurden Übernachtkulturen in 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (100 µg/ml) angelegt und bei 37 °C geschüttelt. Die Kulturen wurden etappenweise in 50 ml Reaktionsgefäßen für 20 min bei 10.000 x g und 4 °C pelletiert und anschließend in 4 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Zur alkalischen Lyse wurden 5 ml Lysepuffer zugefügt und kräftig geschüttelt. Die Reaktion wurde mit 5 ml Neutralisationspuffer gestoppt und Proteine und Zellbestandteile für 20 min bei 10.000 x g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde auf Tip 100 Säulen, Qiagen, gegeben, die zuvor mit 5 ml Puffer equillibriert wurden. Nach dem Durchlaufen der Lösung wurde die Säule zweimal mit 10 ml Waschpuffer gespült. Die Elution der gebundenen Plasmid-DNA erfolgte mit 5 ml Elutionspuffer. Zum Fällen der DNA wurde die Lösung 1:1 mit 100 %igem Ethanol versetzt und für 30 min bei 16.060 x g und 4 °C sedimentiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und je nach Pelletgröße in 30-50 µl ddH_2O aufgenommen. Zur Kontrolle der aufgereinigten Plasmid-DNA wurde ein Restriktionsverdau wie in Kapitel 3.3.10 beschrieben durchgeführt. Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.3.1.5 RNA-Isolierung aus Zellen und Geweben mit TriFast

Zur Isolierung von RNA aus Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und in TriFast (1 ml pro Loch einer 6-Loch Platte) aufgenommen. Das Gemisch wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur vollständigen Lyse wurden die Zellen für 2 min auf höchster Stufe gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von Chloroform (200 µl Chloroform auf 1 ml TriFast) wurde erneut gemischt und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit Hilfe einer Zentrifugation für 10 min bei 14.000 x g und 4 °C erfolgte die Phasentrennung, bei der sich die RNA in der wässrigen oberen Phase konzentriert. Diese Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl eiskaltem Isopropanol zum Fällen der RNA versetzt. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde das Gemisch über Nacht bei -20 °C gela-

gert. Die RNA wurde für mindestens 20 min bei 14.000 x g und 4 °C sedimentiert, anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde in RNase-freiem Wasser aufgenommen, für 5-10 min bei 56 °C gelöst und bei -80 °C gelagert.

3.3.1.6 RNA-Isolierung aus Primärkulturen

Zur Isolierung von RNA aus RMS- und MB-Primärkulturen wurde der RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 600 µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol (1:100) aufgenommen, durch Vortexen auf höchster Stufe für 2 min aufgeschlossen und mit 600 µl 70 %igem Ethanol versetzt. Der Ansatz wurde auf eine RNeasy Mini-Säule pipettiert und für 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 700 µl RW-Puffer auf die Säule gegeben. Nach Zentrifugation unter denselben Bedingungen wurde zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Zum Trocknen der Säule erfolgte eine zusätzliche Zentrifugation für 1 min bei 8000 x g. Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.3.2.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Nukleinsäuren weisen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm auf. Die photometrische Konzentrationsbestimmung erfolgte daher bei der Messung der Extinktion bei 260 nm gegenüber einem Leerwert (ddH_2O). Die Extinktion bei 320 nm ist ein Maß für die Verunreinigung mit Schwebstoffen und sollte gegen Null gehen. Für die Konzentrationsbestimmung wurden die Nukleinsäuren 1:50 in ddH_2O verdünnt und 100 µl im Photometer vermessen. Die Nukleinsäurekonzentration C berechnet sich aus folgender Formel:

$$C\ [\mu g/\mu l] = (E260\text{-}E320) \cdot f \cdot c$$

mit:
C = gemessene Konzentration in µg/µl
E = Extinktion
f = Verdünnungsfaktor
c = nukleinsäurespezifischer Koeffizient in µg/µl
c_{DNA} = 0,05 µg/µl
c_{RNA} = 0,04 µg/µl

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

3.3.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA mit PicoGreen

Der Einsatz von PicoGreen erlaubt eine genauere Konzentrationsbestimmung von DNA als die photometrische Messung. Deshalb wurden DNA-Proben, die für die Southern Blot Analyse eingesetzt werden sollten, mittels PicoGreen quantifiziert.

PicoGreen ist ein Farbstoff, der durch Interkalation in doppelsträngige DNA mit einem Maximum bei 484 nm fluoresziert. Das Farbreagenz wurde 1:400 in TE-Puffer verdünnt und je 200 µl wurden pro Loch einer 96-Loch Platte vorgelegt. Ein Volumen von 5 µl Proben-DNA wurde hinzu pipettiert und der Ansatz für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, um die Interkalation des Farbstoffes zu ermöglichen. Anschließend wurde die Fluoreszenz (485 nm Anregung, 535 nm Emission) in einem Tecan Ultra Microplate Reader gemessen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die zur Quantifizierung notwendige Standardkurve umfasste einen Bereich von 0-50 ng DNA und wurde mit genomischer DNA erstellt.

3.3.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA auf Agarosegelen

Das Auftragen von DNA auf Agarosegele diente der Abschätzung der Konzentration. Diese Methode wurde für aufgereinigte PCR-Produkte (Kap. 3.3.7) verwendet, die für die Ligation (Kap. 3.3.8) vorgesehen waren. Zu diesem Zweck wurden 2 µl eines Geleluats und 1 µl des Ligationsvektors (pGEM-T Easy) aufgetragen und die Stärke der Banden optisch anhand eines mitgeführten, normierten DNA-Standards verglichen.

3.3.3 Einengen von DNA-Lösungen

Bei nicht ausreichender Konzentration einer DNA-Lösung, z. B. für die Behandlung mit Bisulfit, wurde diese mit Hilfe von Microcon Säulchen eingeengt. Dafür wurde die DNA-Lösung auf die Säule gegeben und bei 16.060 x g zentrifugiert. Die Dauer der Zentrifugation wurde durch die Ausgangskonzentration und die gewünschte Endkonzentration der Lösung

bestimmt. Um die auf der Säule zurückgehaltene DNA zu eluieren, wurde die Säule umgedreht, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 3 min bei 16.060 x g zentrifugiert.

3.3.4 Reverse Transkription (RT)

2 µg RNA wurden mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 7 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 5 µl Hexameren (50 ng/µl) wurde der Ansatz für 10 min bei 70 °C inkubiert, um die DNA zu denaturieren und eine Anlagerung der Hexamere zu gewährleisten. Anschließend wurden 4 µl 5x 1st Strand-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTPs hinzu pipettiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um das Temperaturoptimum der Reversen Transkriptase (Superscript II, 200 U/µl) einzustellen, wurde der Ansatz vor der Zugabe von 1 µl des Enzyms für 2 min auf 42 °C vorgewärmt. Die cDNA-Synthese erfolgte für 60 min bei 42 °C. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte für 10 min bei 70 °C. cDNAs wurden bei -20 °C gelagert.

3.3.5 Polymerase Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR)

Für die Amplifikation von doppelsträngigen DNA-Molekülen wurden verschiedene PCR-Techniken eingesetzt. Die PCR-Techniken an bisulfitbehandelter DNA (Bisulfit-PCR und Sequenzierungs-PCR an bisulfitbehandelter DNA) werden im Kapitel 3.4 erläutert.

3.3.5.1 Quantitative PCR (qPCR) an genomischer DNA

Zur Analyse der vorliegenden genomischen Kopienzahl des Transkriptionsfaktors *Gli1* in Tumorgewebe von *Ptch*-heterozygoten Mäusen wurde genomische DNA aus RMS und Skelettmuskeln isoliert (Kap. 3.3.1.1). Mittels SYBR Green-basierter Ansätze (Kap. 3.3.6.3) wurde *Gli1* und zur Normalisierung *Pelota* vermessen (Primersequenzen Kap. 2.8.3.1). Zur Erstellung der Standardkurven wurde DNA einer Schwanzbiopsie in seriellen, fünffachen Verdünnungen (1. Verdünnungsstufe 60 ng/µl) verwendet. Die Amplifikationsrate ergibt sich aus dem Verhältnis der normalisierten *Gli1*-Menge im RMS zu der normalisierten *Gli1*-Menge im korrespondierenden SM.

3.3.5.2 Semiquantitative Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Zur semiquantitativen Analyse der Expression von Genen wurden RT-PCR durchgeführt. Um die Amplifikatmengen miteinander vergleichen zu können, muss sichergestellt werden, dass

von allen Proben die gleiche Menge cDNA eingesetzt wird. Dies wurde über die zusätzliche Amplifikation eines Haushaltsgens erreicht, das in allen Geweben im gleichen Maß exprimiert wird.

RT-PCR in 10 oder 20 µl Ansätzen:	PCR-Programm RT-PCR:		
1-100 µg Matrizen-DNA	5 min	95 °C	
25-250 µM dNTPs	30 s	95 °C	⎫
0,4-0,5 µM Vorwärtsprimer	1 min	pAT	⎬ primerspezifische
0,4-0,5 µM Rückwärtsprimer	2 min	72 °C	⎭ Zyklenanzahl
1x PCR-Puffer	10 min	72 °C	
1,5-2,5 U Polymerase	∞	10 °C	

Tab. 15: Primer und Bedingungen für die RT-PCR

Transkript	Primerbezeichnung (Vorwärtsprimer, Rückwärtsprimer)	PCR-Bedingungen		Fragmentgröße [bp]
		Anlagerungstemperatur	Zyklenanzahl	
Apaf1	*m-Apaf1-tq-F* *m-Apaf1-tq-R*	62 °C	35	102
Caspase 1	*m-Caspase1-tq-F* *m-Caspase1-tq-R*	62 °C	35	92
Caspase 8	*m-Caspase8-tq-F* *m-Caspase8-tq-R*	62 °C	30	123
Dapk1	*m-DAPK-1-tq-F* *m-DAPK-1-tq-R*	62 °C	30	142
Gapd	*Gapd-F* *Gapd-R*	58 °C	22	576
Gli1	*mGliF8* *mGliR9*	58 °C	30	420
Igf2	*Igf2 TaqManF* *Igf2 Exon6R*	55 °C	30	400
Igfbp3	*m Igfbp3-tq-F* *m Igfbp3-q-R*	62 °C	32	164
Junb	*mJunb- tq-F* *mJunb-tq-R*	62 °C	32	160
Kif5c	*mKif5c-tq-F* *mKif5c-tq-R*	62 °C	32	136
Mageb2	*mMageb2-tq-F2* *mMageb2-tq-R2*	62 °C	35	129
Mmp2	*mMmp2-tq-F* *mMmp2-tq-R*	62 °C	32	124

Weiter Tab. 15: Primer und Bedingungen für die RT-PCR

Transkript	Primerbezeichnung (Vorwärtsprimer, Rückwärtsprimer)	PCR-Bedingungen		Fragmentgröße [bp]
		Anlagerungstemperatur	Zyklenanzahl	
p15	*mp15-tq-F* *mp15-tq-R*	62 °C	32	105
p16	*mp16-tq-F1* *mp16-tq-R*	62 °C	32	112
p16	*mp16-tq-F2* *mp16-tq-R2*	62 °C	32	165
p16	*mp16-tq-F3* *mp16-tq-R3*	62 °C	35	98
Ptch	*mPtch F18* *mPtch R20*	58 °C	30	496
Rassf1A	*mRassf1A-tq-F* *mRassf1A-tq-R*	62 °C	32	135
Socs3	*m-SOCS3-tq-F* *m-SOCS3-tq-R*	62 °C	30	120
Wif1	*mWif1-tq-F* *mWif1-tq-R*	62 °C	32	124

3.3.5.3 Quantitative *real time*-PCR (qRT-PCR)

Zur Quantifizierung der Genexpression kam die qRT-PCR in zwei Ausführungen zum Einsatz. Die Expression der Gene *wtPtch, Δ67Ptch* [Uhmann A *et al.*, 2005] und *Igf2* [Hahn H *et al.*, 2000] wurde mit TaqMan-Sonden ermittelt. Bei der TaqMan-Analyse wird neben den Primern für die Amplifikation ein sequenzspezifisches und beidseitig markiertes Oligonukleotid (Sonde) für die Detektion des gebildeten Produktes verwendet. Die Sonde bindet an die Ziel-cDNA in der von den Primern eingeschlossenen Region. Sie ist am 3`-Ende mit dem Quencher TAMRA (MGB, engl. *minor groove binder*) und am 5`-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxy-Fluorescin (FAM), der als Reporter fungiert, markiert. Während der PCR wird die Sonde durch die 5`-3`-Exonucleaseaktivität der eingesetzten Polymerase von der cDNA abgespalten und somit Quencher und Reporter voneinander getrennt. In der exponentiellen Phase der PCR korreliert der Anstieg des Fluoreszenzsignals direkt mit der Zunahme des Produktes. Tabelle 16 gibt die Zusammensetzung eines sondenbasierten TaqMan-Assays wieder.

Tab. 16: qRT-PCR Ansatz, sondenbasiert

Komponente	Volumen [µl]
QuantiTect Mastermix	5,0
Vorwärtsprimer (10 µM)	0,4
Rückwärtsprimer (10 µM)	0,4
Sonde (5 µM)	0,4
RNase-freies H_2O	1,8
cDNA	2,0

qRT-PCR-Programm, sondenbasiert:

10 min	95 °C	
15 s	95 °C	⎫ 40 Zyklen
60 s	60 °C	⎭

Die quantitativen Expressionsanalysen aller anderen Gene erfolgte über eine SYBR Green-basierte Methode. Diese Methode der Expressionsquantifizierung beruht auf der Messung der Fluoreszenz des Farbstoffs SYBR Green bei Interkalation in doppelsträngige DNA. Die am ABI Prism HT 7900 gemessene Fluoreszenzintensität ist demnach proportional zu der gebildeten Amplifikatmenge. Da der Farbstoff in jegliche Art von doppelsträngiger DNA interkaliert, wird die Stringenz der SYBR Green-basierten Assays allein über die Spezifität der Primer definiert. Um die Homogenität der PCR-Amplifikate zu prüfen, wurden Dissoziationskurven erstellt. Hierfür wurde nach erfolgter Produktamplifikation die Temperatur schrittweise auf 95 °C angehoben und die Fluoreszenzintensität gemessen. Dabei denaturieren die PCR-Produkte entsprechend ihrer Größe und die Fluoreszenz nimmt im gleichen Maß ab.

Tab. 17: qRT-PCR Ansatz, SYBR Green-basiert

Komponente	Volumen [µl]
SYBR Green QuantiTectMix	5,0
Vorwärtsprimer (10 µM)	0,4
Rückwärtsprimer (10 µM)	0,4
RNase-freies H_2O	2,2
cDNA	2,0

qRT-PCR Programm, SYBR Green-basiert:

2 min	50 °C	
15 min	95 °C	
15 s	95 °C	⎫
30 s	pAT	⎬ 40 Zyklen
30 s	72 °C	⎭
15 s	95 °C	
15 s	60 °C	
15 s	95 °C	

Sowohl bei sondenbasierten als auch SYBR Green-basierten Assays erfolgte der Vergleich der Expressionsniveaus von den untersuchten Genen in unterschiedlichem Probenmaterial

durch relative Quantifizierung. Für jedes Transkript wurde eine Standardkurve aus seriellen, fünffachen Verdünnungen erstellt (Tab. 18). Zur Normalisierung der Expression des Zielgens wurde die Expression eines endogenen Kontrollgens (*18S rRNA*) vermessen.

Die eingesetzte cDNA (Kap. 3.3.5) aus Geweben und Zellen wurde für die Vermessung der Zielgene 1:5 bzw. 1:3 verdünnt. Für die Bestimmung des endogenen Kontrollgens wurden die Proben 1:300.000 verdünnt eingesetzt. Alle Messungen erfolgten in Triplikaten.

Tab. 18: Standardkurven für qRT-PCR

Anwendung	Transkript	Standardkurve Matrize	erste Verdünnungsstufe (in DNA/µl)
Quantifizierung	*18S rRNA*	RMS	40 pg/µl
Aktivität Shh-Signalweg	*wtPtch*	Plasmid	30 pg/µl
	mutPtch	Plasmid	208,6 pg/µl
	Gli1	Mausembryo d12.5	10 ng/µl
	Gli2	Mausembryo d12.5	10 ng/µl
	Gli3	Mausembryo d12.5	10 ng/µl
	Igf2	RMS	10 ng/µl
Muskeldifferenzierung	*p21*	RMS	25 ng/µl
	p27	RMS	25 ng/µl
	Tropomyosin	RMS	25 ng/µl
	MyoD1	RMS	25 ng/µl
	Myogenin	RMS	25 ng/µl
	MHC	RMS	25 ng/µl
	Mef2c	RMS	25 ng/µl
	Myf6	RMS	25 ng/µl
	Bcl-2	RMS	25 ng/µl
Surrogatmarker 5-Aza/VPA-Behandlung	*Mageb2*	Testis	50 ng/µl
	Dapk-1	Mausembryo d12.5	10 ng/µl
	Socs3	Mausembryo d12.5	10 ng/µl

Die Auswertung der qRT-PCR-Daten erfolgte mit der SDS 2.1 Software von Applied Biosystems und mit Excel 2000 von Microsoft. Die statistische Analyse der Daten wurde von Herrn Rosenberger, Abteilung Genetische Epidemiologie der Universität Göttingen mit SAS 9.0, SAS Institute Inc., durchgeführt.

3.3.6 Aufreinigung von PCR-Fragmenten über Gelelution

Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und die Bande mit der entsprechenden Größe mit einem Skalpell ausgeschnitten. Das Gelstück wurde gewogen, mit dem Dreifachen an Binding Buffer (Perfect Gel Cleanup Kit, Eppendorf) versetzt und für 5-10 min bei 50 °C und 1200 rpm auf dem Schüttler vollständig gelöst. Nach Zugabe des einfachen Volumens (bezogen auf das Gelstück) an Isopropanol, wurden maximal 800 µl der Lösung auf die Säule gegeben und für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Betrug das Gesamtvolumen des Ansatzes mehr als 800 µl wurde dieser Vorgang wiederholt. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 750 µl Waschpuffer unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 30 µl ddH_2O die DNA eluiert. Zum Abschätzen der Konzentration wurden 2 µl des Eluats erneut auf ein Agarosegel aufgetragen (Kap. 3.3.3).

3.3.7 Ligation von PCR-Fragmenten in das pGEM-T Easy Vektorsystem

Klonierungen der über Gelelution aufgereinigten PCR-Fragmente erfolgten mit dem pGEM-T Easy Vektorsystem. Der bereits linearisiert vorliegende Klonierungsvektor zeichnet sich durch 3`-Thymidin-Überhänge an der Klonierungsstelle aus und ermöglicht so die direkte Ligation von PCR-Fragmenten mit 3`-Adenosin-Überhängen ohne zusätzliche Restriktionsverdaue zum Schaffen kompatibler Enden.

Um das Konzentrationsverhältnis zwischen Vektor und Insert abzuschätzen, wurde jeweils ein Aliquot auf ein Agarosegel aufgetragen (Kap. 3.3.3) und Vektor und Insert etwa im Verhältnis 1:1 in die Ligation eingesetzt. Der Ansatz bestand weiterhin aus 1 µl T4-DNA-Ligase, 4 µl 5 x Ligasepuffer und wurde mit ddH_2O auf 20 µl aufgefüllt und über Nacht bei 4 °C ligiert.

3.3.8 Transformation von kompetenten Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

Der chemisch-kompetente *E. coli* Stamm DH5α wurde für die Transformation und Amplifikation von Plasmid-DNA verwendet. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Handelte es sich um die Transformation eines Ligationsansatzes, wurden dem gesamten Ligationsansatz (20 µl) 100 µl DH5α zugefügt. Bei der Transformation von Expressions- oder Reporterplasmiden wurden 100 ng Plasmid und 50 µl kompetente Zellen eingesetzt. Die Ansätze wurden für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 45 s bei 37 °C. Nach 2 min

auf Eis wurden 500 µl S.O.C. Nährmedium zugefügt. Der Ansatz wurde für 60 min bei 37 °C geschüttelt (650 rpm). Anschließend wurden bei Reporter- oder Expressionsplasmiden 50 µl bzw. bei Ligationsansätzen 100 µl der Bakterienkultur auf vorgewärmte LB-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Bei der Transformation von Ligationsansätzen enthielten die LB-Platten neben 100 µg/ml Antibiotikum noch 40 µg/ml X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-Galaktosid) zur Blau-Weiß-Selektion der Klone. Die Blau-Weiß-Selektion ist eine einfache Methode zur Erkennung von positiven (inserttragenden) Klonen nach der Ligation und Transformation. Der verwendete Ligationsvektor pGEM-T Easy trägt die Information für das α-Peptid der β-Galaktosidase. Beim Einbau des Inserts wird diese genetische Information zerstört und das Plasmid kann keine Expression des Enzyms vermitteln. Die Zugabe des β-Galaktosidase-Substrates X-Gal zum Nährmedium führt zu einer Blaufärbung der Kolonien, die kein Insert sondern die aktive β-Galaktosidase enthalten. Klone mit Insert sind nicht in der Lage X-Gal zu verstoffwechseln und bleiben weiß.

3.3.9 Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA

Die Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA wurde zur Kontrolle von Plasmiden, z. B. zur Insertüberprüfung nach einer Klonierung, eingesetzt. Der Restriktionsverdau erfolgte in 10 µl Ansätzen mit 2,5 U Enzym und 1 µl entsprechendem Puffer für 60 min bei 37 °C. Verdaue mit mehreren Restriktionsenzymen wurden, soweit es die Pufferkompatibilität ermöglichte, gleichzeitig durchgeführt. Anderenfalls wurde nach der Hydrolyse durch das erste Enzym der Ansatz mit dem zweiten Enzym (2,5 U), 2 µl entsprechendem Puffer sowie ddH_2O auf 20 µl aufgefüllt und für 60 min bei 37 °C erneut inkubiert.

Für die Kontrolle von Expressions- und Reporterplasmiden wurden 100-500 ng Plasmid-DNA verwendet. Zur Überprüfung der Ligation eines PCR-Fragmentes in den pGEM-T Easy Vektor wurden 3 µl Plasmid-DNA aus dem 50 µl Gesamtansatz (Kap. 3.3.1.3) entnommen und *EcoR*I als Restriktionsenzym eingesetzt. Für die Größenbestimmung der Fragmente wurden die Ansätze anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen.

3.4 Bisulfit-Sequenzierung zur Analyse des *Ptch*-Promotors

Zur Untersuchung des Methylierungsstatus der *Ptch*-Promotorregion in RMS und im Skelettmuskel von *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen wurden fünf Bereiche der Promotorregion mit einer gehäuften CG-Basenabfolge (Abb. 5) mittels Bisulfit-Sequenzierung analysiert.

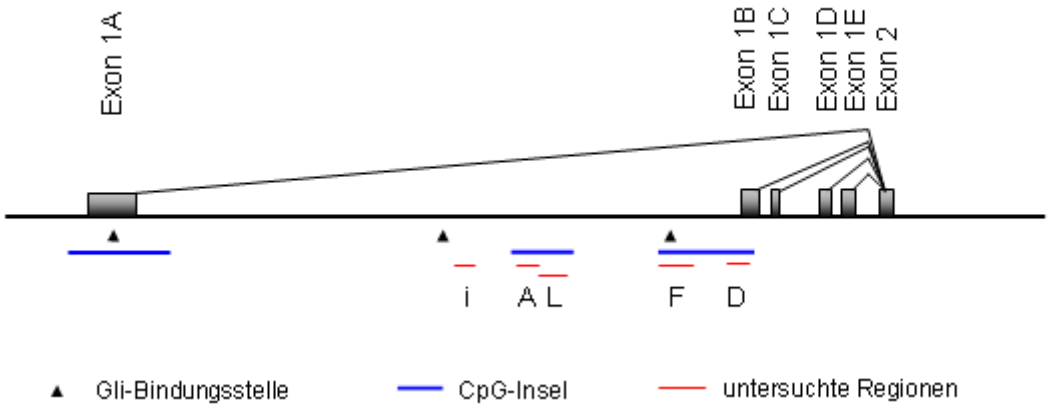


Abb. 5: Aufbau der *Ptch*-Promotorregion und Lage der untersuchten CpG-reichen Regionen.

Die Methode der Bisulfit-Sequenzierung beruht auf der selektiven Konversion von Cytosin zu Uracil durch Bisulfit [Shapiro R *et al.*, 1973]. 5-Methyl-Cytosin kann jedoch durch Bisulfit nicht desaminiert werden (Abb. 6) [Hayatsu H *et al.*, 1970; Wang RY *et al.*, 1980]. Bei einer anschließenden Amplifikation mittels PCR werden die Uracil-Reste als Thymine und 5-Methyl-Cytosine als Cytosine gelesen. Durch eine Sequenzierung der PCR-Produkte kann somit der Methylierungsstatus jedes einzelnen Cytosins festgestellt werden.

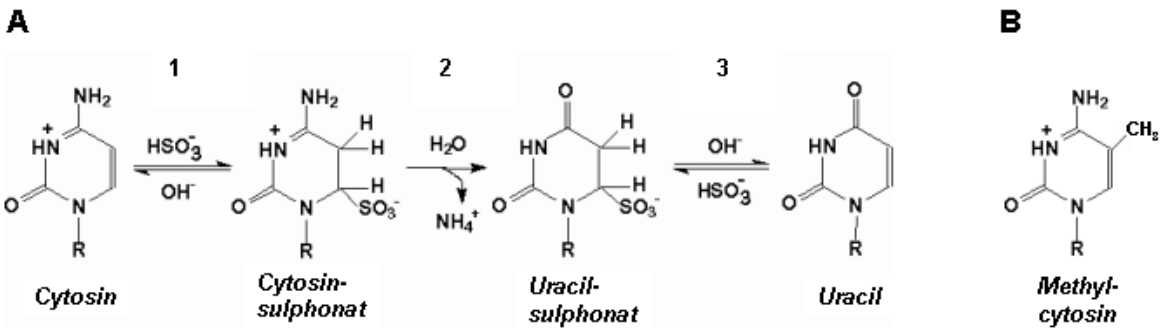


Abb. 6: Chemische Reaktion bei der Behandlung von DNA mit Bisulfit. A) Konvertierung von Cytosin durch Bisulfit zu Uracil. B) Strukturformel von Methylcytosin. Legende: 1 Sulphonierung, 2 Hydrolytische Desaminierung, 3 Alkalische Desulfonierung.

3.4.1 Behandlung der DNA mit Bisulfit

Die Bisulfit-Behandlung der DNA wurde mit dem Bisulfit Kit von Qiagen durchgeführt. Dazu wurde 1 µg DNA (Kap. 3.3.1.2) mit ddH_2O auf 20 µl aufgefüllt und 85 µl Bisulfit-Mix sowie 35 µl DNA-Protect Puffer zugegeben. Die Konvertierungsreaktion erfolgte im Thermocycler.

Temperaturprogramm Bisulfit-Behandlung:

5 min	99 °C	Denaturierung
25 min	60 °C	Inkubation
5 min	99 °C	Denaturierung
85 min	60 °C	Inkubation
5 min	99 °C	Denaturierung
175 min	60 °C	Inkubation
∞	20 °C	

Alle weiteren für die Aufreinigung benötigten Zentrifugationsschritte wurden für 1 min bei 16.060 x g durchgeführt. Nach kräftigem Schütteln der Reaktionsgefäße wurden 560 µl AVL-Puffer zugesetzt, gut gemischt und die Lösung auf eine Bisulfit-Säule pipettiert und zentrifugiert. Nach der Zugabe von 500 µl AW2-Puffer zum Entfernen von überschüssigem Natriumsulfit wurde ein weiteres Mal zentrifugiert. Zur Desulfonierung wurden 500 µl BD-Puffer für 15 min bei geschlossenem Deckel auf der Säule inkubiert und abzentrifugiert. Die Säule wurde zweimal mit 500 µl AW2-Puffer gewaschen und durch Zentrifugation getrocknet. Zur Elution wurden 20 µl Elutionspuffer eingesetzt. Die mit Bisulfit behandelte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.4.2 PCR an bisulfitbehandelter DNA

Die PCR an bisulfitbehandelter DNA diente zur Amplifikation von CpG-reichen Regionen aus dem *Ptch*-Promotorbereich, die anschließend subkloniert und zur Aufklärung des Methylierungsstatus sequenziert wurden. An die DNA-Polymerase waren damit zwei Anforderungen gestellt: A) eine hohe Synthesegenauigkeit für eine möglichst fehlerfreie Sequenzamplifikation und B) die Produktion von 3`-A-Überhängen für ein problemloses Klonieren in den pGEM-T Easy Vektor. Deshalb wurde für die PCR an bisulfitbehandelter DNA der HotStar Mastermix von Qiagen verwendet. Die HotStar Polymerase ist durch eine fehlende 5`-3`-Exonukleaseaktivität und eine Korrekturlesefunktion (3`-5`-Exonukleaseaktivität), die eine

etwa zehnmal geringere Fehlerrate als herkömmliche *Taq*-Polymerasen vermittelt, gekennzeichnet.

Um die spezifische Amplifikation von bisulfitbehandelter DNA zu gewährleisten, müssen in der Primersequenz Thymine enthalten sein, die aus Cytosinen konvertiert wurden. Die Auswahl der Primersequenzen erfolgte mit Hilfe des *Microsoft Word Macros for Analysis of Cytosine Methylation by the Bisulfite Deamination Reaction* [Singal R, Grimes SR, 2001]. Durch die Behandlung eines doppelsträngigen DNA-Fragmentes mit Bisulfit geht die Komplementarität zwischen den Strängen verloren. Deswegen müssen die Primersequenzen für die anschließende PCR separat entweder für den Plus-Strang oder für den Minus-Strang konzipiert werden. Tabelle 19 gibt die verwendeten Primer und PCR-Bedingungen und Tabelle 20 einen PCR-Ansatz für bisulfitbehandelte DNA wieder.

Tab. 19: Primer und Bedingungen für die PCR an bisulfitbehandelter DNA

Region	Primerbezeichnung (Vorwärtsprimer, Rückwärtsprimer)	PCR-Bedingungen		Fragmentgröße [bp]
		Anlagerungstemperatur	Zyklenanzahl	
A	BiZe Af1 BiZe Ar1	55 °C	45	252
D	BiZe Df1 BiZe Dr1	55 °C	45	141
F	BiZe Bf1 BiZe Cr1	55 °C	50	411
i	Bi If2 Bi Ir2	55 °C	45	267
L	Bi Lf Bi Lr	58 °C	45	438

Tab. 20: PCR-Ansatz für bisulfitbehandelte DNA

Komponente	Volumen [µl]
HotStar Mastermix	12,5
Vorwärtsprimer	1,0
Rückwärtsprimer	1,0
ddH_2O	7,5
bisulfitbehandelte DNA	3,0

PCR-Programm für bisulfitbehandelte DNA:

15 min	95 °C	
30 s	95 °C	⎫
30 s	pAT	⎬ primerspezifische
1 min	72 °C	⎭ Zyklenanzahl
5 min	72 °C	
∞	10 °C	

Zur Feststellung einer Methylierung von CpG-Inseln bei direkter Sequenzierung der PCR-Produkte müssen mindestens 25 % der Amplifikate methyliert sein [Myohanen S *et al.*, 1994]. Um diese Detektionsgrenze zu verringern, wurden die PCR-Produkte über Gelelution (Kap. 3.3.7) aufgereinigt und in den pGEM-T-Vektor subkloniert (Kap. 3.3.8).

3.4.3 Sequenzierungs-PCR

Zur Sequenzierung der klonierten PCR-Fragmente wurde ein Primer verwendet, der in der *SP6* RNA-Polymerase Promotorregion des pGEM-T Easy Vektors bindet (Kap. 2.8.4).

Tab. 21: Ansatz für eine Sequenzierungs-PCR

Komponente	Volumen [µl]
BigDye	1,0
SP6-Primer	0,5
DMSO	0,25
ddH_2O	0,25
Plasmid-DNA	3,0

PCR-Programm:

2 min	94°C	
15 s	96°C	24 Zyklen
15 s	56,5°C	
4 min	60°C	
7 min	72°C	
∞	20°C	

3.4.4 Aufreinigung und Sequenzanalyse bisulfitbehandelter DNA

Vor der Analyse der PCR-Produkte im ABI PRISM-3100 Genetic Analyzer wurden diese mittels Dextranpolymeren aufgereinigt. Sephadex G 50 von Sigma wurde auf eine 96-Loch Platte gegeben und der Überschuss abgestreift. Das Sephadex wurde in eine Millipore-MAHV N45 Platte überführt und durch Zugabe von 300 µl ddH_2O pro Loch für 3 h quellen gelassen. Dann wurde die Platte für 5 min bei 2150 x g zentrifugiert und 150 µl ddH_2O pro Loch zugefügt. Nach weiteren 30 min Quellzeit wurde unter denselben Bedingungen erneut zentrifugiert. Die PCR-Produkte wurden mit 40 µl ddH_2O aufgefüllt und auf die Sephadex-Platten überführt. Die gereinigten PCR-Produkte wurden für 5 min bei 2150 x g eluiert und im ABI 3100 (Applied Biosystems) der Klinischen Pharmakologie, Universität Göttingen, analysiert.

3.4.5 Ermittlung der Effizienz der Bisulfit-Behandlung und Auswertung der Sequenzen

Mit Hilfe eines Microsoft Word-gestützten Makro [Singal R, Grimes SR, 2001] konnte die Methylierung einer gegebenen DNA-Sequenz simuliert werden, die bei einer vollständigen

Konvertierung der Thymine durch Bisulfit erreicht wird. Diese theoretische Konvertierung der untersuchten Sequenz stellte die Grundlage für die Wahl der Bisulfit-Primer dar und wurde für die Bestimmung der Effizienz der Konvertierung genutzt. Für die Effizienzbestimmung wurde die Anzahl der Thymine in der bisulfitkonvertierten DNA auf die Anzahl der Cytosine in der Ausgangssequenz bezogen. Cytosine in CpG-Dinukleotiden wurden hierbei aufgrund des unklaren Methylierungsstatus nicht berücksichtigt.

Mit Hilfe des *Microsoft Word Macros for Analysis of Cytosine Methylation by the Bisulfite Deamination Reaction* wurde die Gesamtzahl und die Lage der CG-Dinukleotide innerhalb jedes untersuchten Fragmentes bestimmt. Zur vergleichenden Analyse der Sequenzen der einzelnen Klone jedes Fragmentes wurde das Staden Package verwendet. Cytosine innerhalb der CG-Dinukleotide, die nicht methyliert sind, werden nach Bisulfit-Behandlung und PCR-Amplifikation als Thymine sequenziert. 5-Methyl-Cytosine hingegen bleiben von der Bisulfit-Behandlung unbeeinflusst und werden bei der Sequenzierung als Cytosine erkannt.

3.5 Blottechniken

3.5.1 Southern Blot zur Abschätzung des DNA-Methylierungsstatus

Zur Analyse des allgemeinen Methylierungsstatus der genomischen DNA wurde die DNA mit den Restriktionsenzymen HpaII oder MspI, welche die Sequenz 5`-C^CGG-3` erkennen, verdaut. Die Sequenz kann bei Methylierung von dem methylierungssensitiven HpaII nicht geschnitten werden, wohingegen das Isoschizomer MspI die Sequenz unabhängig vom Methylierungsstatus erkennt. Die Proben wurden geblottet und mit der murinen Sonde *pMR150* (engl. *plasmid mouse repetitive*) [Chapman V *et al.*, 1984] hybridisiert. Bei der durch *pMR150* identifizierten Sequenz handelt es sich um Satelliten-DNA in der Zentromerregion, die als sich wiederholende Elemente von 120 bp mit einer Kopienzahl von $5x\ 10^4$ im Mausgenom vorliegen. Im adulten, somatischen Gewebe sind diese repetitiven Elemente stark methyliert. Ein Verdau mit dem methylierungssensitiven Enzym HpaII liefert daher nur wenige Fragmente. Bei einer Behandlung mit 5-Aza ist eine Demethylierung dieser Satelliten-DNA zu erwarten und der Restriktionsverdau mit HpaII ergibt eine DNA-Leiter.

3.5.1.1 Restriktionsverdau und Gelelektrophorese der DNA-Proben

Zur Qualitätskontrolle wurden 500 ng der genomischen DNA (Kap. 3.3.1.1) auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. 15 µg der mit PicoGreen vermessenen (Kap. 3.3.2.2) und auf Degradation getesteten DNA wurden über Nacht mit 50 U EcoRI in einem 20 µl Ansatz bei 37 °C verdaut. Anschließend erfolgte die Restriktion mit den Isochizomeren MspI und HpaII für jede Probe in parallelen Ansätzen für weitere 8 h bei 37 °C. Dazu wurden die Ansätze auf 30 µl aufgefüllt und jeweils 25 U Enzym zugesetzt. Die Proben wurden mit 20 µl Cresol versetzt und auf ein ethidiumbromidhaltiges, 1 %iges Agarosegel aufgetragen und über Nacht bei 35 V aufgetrennt.

3.5.1.2 DNA-Transfer auf Nylonmembranen (Southern Blot)

Da große DNA-Fragmente schwer aus einem Gel auf eine Membran zu transferieren sind, wurde die DNA durch partielles Depurinieren in kleinere Fragmente gespalten. Hierfür wurde das Gel für 30 min in 0,25 N HCl geschwenkt. Nach einmaligem Waschen in ddH_2O erfolgte die neutrale Denaturierung der DNA-Doppelstränge für 30 min unter Schwenken in Denaturierungspuffer. Nach erneutem Waschen wurde für weitere 30 min in Neutralisierungspuffer geschwenkt und im Anschluss wurde das Gel für 10 min in 20x SSC geschüttelt. Der Transfer der DNA erfolgte im Turbo-Blotter-System (Schleicher & Schuell) unter Ausnutzung der Kapillarkräfte über Nacht. Die Nylonmembran und die Filterpapiere wurden dabei in 20x SSC getränkt eingesetzt. Die transferierte DNA wurde durch UV-Licht (150 mJ/50 s) und durch Backen bei 80 °C für 2 h auf der Membran fixiert.

3.5.1.3 Herstellung der *pMR150*-Sonde

Die Sonde wurde mittels PCR aus dem pBluescript II KS+ (zur Verfügung gestellt von J. Stempak, Abteilung für Medizin und Ernährungswissenschaften, Universität Toronto, Kanada) amplifiziert (Tab. 22) und mit ExoSap-IT aufgereinigt. Hierzu wurde ExoSap-IT 1:4 in ddH_2O verdünnt und 8 µl zu dem 20 µl PCR-Ansatz pipettiert. Die Aufreinigung und Inaktivierung der Enzyme erfolgte für 15 min bei 37 °C und anschließend für 15 min bei 80 °C im Thermocycler. Zur Kontrolle der Amplifikation und der Konzentrationsabschätzung wurden 2 µl des gereinigten Produktes auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Sonden-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

Tab. 22:
PCR-Ansatz zur Herstellung der *pMR150*-Sonde

Komponente	Volumen [µl]
dNTPs (10 mM)	0,4
10x Puffer	2,0
$MgCl_2$ (50 mM)	0,6
Mango-Taq (1 U/µl)	1,0
pMR150 F (10 µM)	1,0
pMR150 R (10 µM)	1,0
100 ng Plasmid	
ad 20 µl ddH_2O	

PCR-Programm zur *pMR150*-Sondenamplifikation:

5 min	95 °C	
45 s	95 °C	⎫
45 s	54 °C	⎬ 35 Zyklen
45 s	72 °C	⎭
10 min	72 °C	
∞	4 °C	

Die radioaktive Markierung der *pMR150*-Sonde erfolgte mit dem Prime-IT RmT Random Primer Labeling Kit von Stratagene unmittelbar vor der Hybridisierung. Dazu wurden etwa 50 ng Sonde auf ein Endvolumen von 42 µl mit ddH_2O aufgefüllt und in die dem Kit beigefügten Reaktionsgefäße mit gefriergetrockneten Random Primern, dNTPs, Puffer und Kofaktoren überführt. Das Reaktionsgemisch wurde zur DNA-Denaturierung für 5 min bei 99 °C inkubiert und anschließend für 5 min auf Eis abgekühlt. Zur Synthese der radioaktiv markierten Sonde wurden dem Ansatz 50 µCi radioaktiv markiertes [α^{32}P]-dCTP und 8 U Magenta-DNA-Polymerase zugefügt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Aufreinigung der radioaktiv markierten Sonde erfolgte über MicroSpin G-50 Säulen von Amersham mit Hilfe von Sephadex. Die Säulchen wurden zunächst für 2 min bei 855 x g zentrifugiert, bevor der Markierungsansatz auf das Sephadex pipettiert wurde. Zur Elution der aufgereinigten Sonde wurde unter denselben Bedingungen ein weiteres Mal zentrifugiert. Zur Denaturierung der DNA wurde die Sonde nochmals bei 99 °C für 5 min gekocht und anschließend auf Eis abgekühlt.

3.5.1.4 Hybridisierung der Membran

Die Membran wurde in 2x SSC angefeuchtet, in ein Hybridisierungsglas überführt und für 1 h bei 65 °C mit 5 ml Hybridisierungslösung (Rapid-hyb buffer, Amersham) und 50 µl denaturierter Lachsspermien-DNA (100 µg/ml) vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde (Kap. 3.5.1.3) in 5 ml Hybridisierungslösung mit 50 µl denaturierter Lachsspermien-DNA (100 µg/ml) über Nacht bei 65 °C.

3.5.1.5 Autoradiographie

Um überschüssige, ungebundene Sonde zu entfernen wurde die Membran nach dem Abgießen der Hybridisierungslösung zunächst für zweimal 20 min in 100 ml Low-Stringency-Puffer bei 65 °C und anschließend für 60 min in 100 ml High-Stringency-Puffer bei 65 °C gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die Membran in Folie geschweißt und in eine Filmkassette gelegt. Die Exposition eines Autoradiographie-Filmes mit der Membran erfolgte in Abhängigkeit von der Signalstärke für 6-12 h bei -80°C. Die Entwicklung fand im Entwicklerautomaten statt.

3.5.2 Proteinnachweis mittels Western Blot

3.5.2.1 Proteinisolierung aus Geweben

Frisches oder bei -80 °C gelagertes Gewebe wurde mit einer Skalpellklinge auf Eis zerkleinert und mit einem Homogenisator in 10 mM Tris/HCl pH 7,4 homogenisiert. Zur Lyse wurden 1 % SDS und 1 mM Natriumvanadat (NaVa) zugegeben und für 15 min bei 99 °C und 1200 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Der Ansatz wurde für 10 min bei 6400 x g zentrifugiert und anschließend der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinlösungen wurden bei -80 °C gelagert.

3.5.2.2 Proteinquantifizierung mittels BCA-Methode

Die Quantifizierung von Proteinen mittels der BCA-Methode beruht auf der Reduktion von Cu^{2+}-Ionen durch Proteine im alkalischen Milieu. Die reduzierten Cu^{+}-Ionen bilden mit 2,2´-Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Komplex, dessen Absorptionsmaximum bei 652 nm liegt. Zur Proteinbestimmung wurde der BCA Protein Assay Kit von Pierce Biotechnology verwendet. Zur Herstellung der Arbeitslösung wurde Reagenz A im Verhältnis 50:1 mit Reagenz B gemischt. 200 µl der Arbeitslösung wurden vorgelegt, mit 10 µl der zu quantifizierenden Proteinlösung gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorptionsmessung wurde im NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer von Peqlab bei 562 nm durchgeführt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Standardkurve mit BSA (20-2000 µg/ml) angelegt.

3.5.2.3 Proteinauftrennung mittels Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 15 %igen Polyacrylamidgelen, deren Zusammensetzungen in den Tabellen 23 und 24 wiedergegeben sind. Acetyliertes Histon H4 weist ein Molekulargewicht von etwa 17 kDa auf. Zur Normalisierung wurde Histon H2B (~15 kDa) detektiert.

Tab. 23: Zusammensetzung des Trenngels

Komponente	Volumen
30 % Acrylamid	3,75 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	1,90 ml
10 % SDS	75 µl
ddH_2O	1,75 ml
TEMED	5 µl
10 % Ammoniumpersulfatlösung (APS)	50 µl

Tab. 24: Zusammensetzung des Sammelgels

Komponente	Volumen
30 % Acrylamid	850 µl
1 M Tris/HCl pH 6,8	512 µl
10 % SDS	50 µl
ddH_2O	3,4 ml
TEMED	10 µl
10 % Ammoniumpersulfatlösung (APS)	50 µl

Die Proben wurden mit 6x Laemmli-Probenpuffer versetzt und auf maximal 30 µl aufgefüllt. Proben und Proteinmarker wurden vor der Elektrophorese für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Gele wurden zunächst für 10 min bei 20 mA pro Gel gefahren, anschließend wurde die Stromstärke auf 25 mA pro Gel erhöht.

3.5.2.4 Transfer der Proteine auf die Membran (Western Blot) und spezifischer Nachweis durch Antikörperfärbung

Pro Gel wurden sechs Lagen Filterpapier und eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) für 15 min in Transferpuffer eingeweicht. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte für 3 h bei 1000 mA und 25 mV. Nach dem Transfer wurde die Membran in Blockpuffer (5 % Milchpulver in PBST) überführt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Nach dem Blocken wurde die Membran für dreimal 5 min in 1x PBST gewaschen. Die Antikörper anti-H4Ac (Upstate, 1:500) und anti-H2B (Upstate, 1:3000) wurden in Blockpuffer verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf der Membran inkubiert. Anschließend wurde die Membran weitere drei Mal für 5 min in 1x PBST gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde ein peroxidasekonjugierter Antikörper spezifisch für Kaninchen eingesetzt. Der Sekundärantikörper kam

1:10.000 in Blockpuffer verdünnt zum Einsatz. Die Membran wurde für 1 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert und anschließend wie oben beschrieben mit 1x PBST gewaschen.

3.5.2.5 Entwicklung

Zur Visualisierung wurde der SuperSignal West Dura (Pierce Biotechnology) eingesetzt. Die beiden Detektionslösungen wurden 1:1 gemischt und die Membran mit der Lösung gleichmäßig bedeckt. Nach 5 min wurde die Lösung durch Abtropfen entfernt und die Membran luftblasenfrei in Folie verpackt. Die Entwicklung erfolgte in Filmkassetten in der Dunkelkammer.

2.5.2.6 Entfernen von Antikörpern von der Membran

Die Proteine H4Ac und H2B weisen mit 17 und 15 kDa in etwa dieselbe Größe auf. Deshalb war zwischen den Nachweisen mittels Antikörpern auf der PVDF-Membran ein Strippen der Membran notwendig. Hierzu wurde die Membran für zweimal 10 min in Stripping-Puffer geschwenkt, anschließend für zweimal 10 min in PBS und für einmal 5 min in PBST gewaschen. Zur Rehydrierung der PVDF-Membran erfolgte eine Inkubation für 1 min in Methanol. Nach einem abschließenden Waschschritt für 5 min in PBST konnte mit dem Blockieren in PBST mit 5 % Milchpulver und der Antikörperinkubation fortgefahren werden (Kap. 3.5.2.4).

3.6 Immunhistochemie und Immunzytochemie

3.6.1 Gewebeentnahme und -fixierung

Unmittelbar nach der Entnahme der Gewebe wurden diese entweder auf Trockeneis für die Kryokonservierung weggefroren und bei -80 °C gelagert oder in 4 %igem, gepufferten Formalin mindestens 24 h für die Paraffineinbettung fixiert. Die weitere Fixierung für die Paraffineinbettung erfolgte maschinell in der Pathologie des Universitätsklinikums Göttingen. Anschließend wurde das Gewebe luftblasenfrei in eine Einbettungsform überführt und mit Hilfe einer erhitzten Pinzette ausgerichtet. Zum Auffüllen der Einbettungsform wurde Paraplast verwendet. Nach Erkalten des Paraplast konnten die Blöcke aus den Einbettungsformen gelöst und bei Raumtemperatur gelagert werden.

3.6.2 Anfertigung von Kryo- und Paraffinschnitten

Zum Anfertigen von Kryoschnitten wurde das Gewebe in Kryoeinbettmedium eingefroren. Am Kryostaten wurden bei -20 °C etwa 5 µm dicke Schnitte hergestellt und auf Objektträger aufgezogen.

Zum Herstellen von Paraffinschnitten wurden die Paraffinblöcke auf einer Kühlplatte gekühlt und anschließend Schnitte von etwa 4 µm Dicke am Schlittenmicrotom hergestellt. Die Schnitte wurden in einem 50 °C heißen Wasserbad gestreckt, auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37 °C getrocknet.

Für Übersichtsfärbungen wurden die Schnitte auf unbeschichtete Objektträger aufgezogen, während für Antikörperfärbungen und für *in situ*-Hybridisierungen Superfrost Objektträger verwendet wurden.

3.6.3 Hämalaun und Eosin Färbung (HE) von Geweben

Paraffinschnitte wurden in Xylol für zweimal 10 min und anschließender absteigender Ethanolreihe (je 2 min in 100 % (2x), 96 % (2x) und 70 % Ethanol) entparaffiniert. Nach 2 min in ddH_2O wurden die Schnitte für 10 min in Hämalaun nach Meyer inkubiert. Die Farbentwicklung fand unter fließendem, lauwarmen Leitungswasser für mindestens 5 min statt. Anschließend wurden die Schnitte für 15 s in 0,33 %ige Eosin-Lösung mit Eisessig (0,5 % v/v) getaucht. Die Schnitte wurden mit ddH_2O gewaschen, bis das Wasser klar war und anschließend über eine aufsteigende Ethanolreihe (je 1 min in 70 %, 96 % (2x), 100 % (2x) Ethanol) entwässert. Vor dem Eindeckeln mit Pertex wurden die Objektträger zur vollständigen Dehydrierung kurz in Xylol getaucht.

Die HE-Färbung von Kryoschnitten erfolgte nach demselben Protokoll ohne die Entparaffinierung in Xylol und ohne die Rehydrierung über die absteigende Ethanolreihe.

3.6.4 Antikörperfärbung von Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte wurden zunächst in Xylol für zweimal 10 min und anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe (Kap. 3.6.3) und Inkubation unter fließenden ddH_2O entparaffiniert und rehydriert. Zur Demaskierung der Oberflächenantigene erfolgte eine Vorbehandlung im Dampfgarer für 45 min in Citratpuffer. Dann wurden die Schnitte für 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt und für zweimal 2 min in TBS-Puffer gewaschen. Im SM- und RMS-Gewebe

ist die Aktivität der endogenen Peroxidasen sehr hoch. Da zur Entwicklung ein HRP-gekoppeltes System verwendet wurde, folgte die Inhibierung endogener Peroxidasen. Dafür wurden die Gewebe im Allgemeinen für 20 min mit 3 % H_2O_2 auf dem Schüttler inkubiert. Nur bei Verwendung des anti-Bcl-2-Antikörpers wurden die Peroxidasen für 45 min mit 3 % H_2O_2 geblockt. Die Reaktion wurde für 5 min unter fließendem ddH_2O gestoppt, die Schnitte anschließend in TBS gespült und für 20 min mit 5 % FCS/10 % BSA geblockt. Die verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 25 mit den jeweils eingesetzten Verdünnungen aufgeführt. Die primären Antikörper wurden in TBS verdünnt und die Schnitte für 1-1,5 h in einer feuchten Kammer mit der Antikörperlösung inkubiert. Zur Visualisierung wurde das Envision Polyclonal rabbit/mouse HRP von Dako verwendet. Die Schnitte wurden für 30 min mit dem Sekundärantikörper inkubiert, für zweimal 2 min in TBS gewaschen und für etwa 10 min mit 1:50 verdünntem DAB-Chromogen entwickelt. Zur besseren Übersicht wurde mit Hämalaun gegengefärbt.

Tab. 25: Primärantikörper zur Verwendung an Paraffinschnitten

Antikörper	eingesetzte Verdünnung	Gewebe-Positivkontrolle
anti-Ki67	1:50	MB
anti-aktive Caspase 3	1:500	MB, Thymus juvenile Ratte
anti-Bcl-2	1:2000	RMS
anti-Desmin	1:50	RMS
anti-Myogenin	1:50	RMS
anti-Pospho-Akt	1:50	RMS

3.6.5 Fluoreszenz-Antikörperfärbung von Zellen

Für die Fluoreszenz-Antikörperfärbung wurden die Zellen in Objektträger-Kulturschalen kultiviert. Zur Fixierung der Zellen wurde 4 % PFA in PBS für 15 min zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen für dreimal 5 min in PBS mit 100 mM Glycin gewaschen, für 4 min in PBS mit 0,1 % Triton X100 permeabilisiert, wiederum für dreimal 5 min in PBS gewaschen und abschließend für 1 h in PBS mit 1 % BSA/5 % Pferdeserum bei Raumtemperatur geblockt. Der primäre anti-Desmin-Antikörper wurde 1:200 in PBS mit 1 % BSA/5 % Pferdeserum verdünnt und die Zellen für 2 h bei Raumtemperatur mit dem Antikörper inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde für dreimal 10 min in PBS entfernt. Als sekundärer

Antikörper wurde ein TRITC-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper 1:200 in Blockpuffer verdünnt in PBS mit 1 % BSA/5 % Pferdeserum verwendet. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach erneutem Waschen für dreimal 10 min in PBS wurden die Zellen mit Vectrashield Dapi Mountingmedium eingedeckelt. Die Färbungen wurden bei -20 °C gelagert.

3.6.6 *in situ*-Hybridisierung

3.6.6.1 Herstellung Digoxigenin-markierter *in situ*-Sonden

Für die Herstellung Digoxigenin-markierter *in situ*-Sonden wurden 10 µg des als Sondenmatrize dienenden Plasmids mit 20 U eines geeigneten Restriktionsenzyms in einem 50 µl Ansatz für 2 h bei 37 °C linearisiert. Die DNA wurde mit dem Sechsfachen an 100 %igem Ethanol für 30 min bei 16.060 x g und 4 °C gefällt, das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 20 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Zur Konzentrationsabschätzung wurden 2 µl linearisierte Plasmid-DNA auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Markierungsreaktion mit Digoxigenin (Dig) erfolgte in zwei Stufen. Zunächst wurde etwa 1 µg linearisiertes Plasmid in einem 20 µl Ansatz mit 40 U der entsprechenden RNA-Polymerase, 10x Dig RNA Labelling Mix, 5x Transkriptionspuffer und 10 mM DTT in RNase-freiem Wasser für 2 h bei 37 °C in RNA umgeschrieben und markiert. Zur Erhöhung der Ausbeute wurden nochmals 20 U RNA-Polymerase zugesetzt, mit 10x Dig RNA Labelling Mix, 5x Transkriptionspuffer, 10 mM DTT und RNase-freiem Wasser auf 30 µl aufgefüllt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 1,5 µl 0,4 M EDTA, 3,75 µl 4 M LiCl und 112,5 µl 100 %igem Ethanol wurde die RNA für mindestens 30 min bei -80 °C oder über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Die durch Zentrifugation bei 16.060 x g und 4 °C gefällte RNA wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 110 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Mittels 12,5 µl 4 M LiCl und 250 µl 100 %igem Ethanol erfolgte ein zusätzlicher Fällungs- und Aufreinigungsschritt für mindestens 30 min bei -80 °C oder über Nacht bei -20 °C. Nach Zentrifugation bei 16.060 x g und 4 °C wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und das Pellet in 25 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Zur Überprüfung der Transkription der Plasmid-DNA wurde 1 µl Sonde für 45 min bei 37 °C mit 1 µl RNase A (10 mg/ml) verdaut und neben 1 µl unverdauter RNA-Sonde auf ein Agarosegel aufgetragen.

Um sicher zu stellen, dass die Markierungsreaktion mit dem Digoxigenin erfolgreich war, wurde ein Dot Blot durchgeführt. Hierfür wurde eine serielle, zehnfache Verdünnung der

Sonde (1 µl) mit 6x SSC (je 9 µl) hergestellt. Je 1 µl der Verdünnungen wurde auf eine Nylonmembran aufgetragen und mittels UV-Licht fixiert. Überschüssige Bindungsstellen der Membran wurden für 5 min in 55 °C warmen 4 % BSA in Puffer-1 blockiert. Nach kurzem Waschen der Membran in NT-Puffer erfolgte die Inkubation mit der anti-Dig/AP-Antikörperlösung (1:500 in NT-Puffer) für 7 min. Die Membran wurde dreimal für 2 min in NT-Puffer gewaschen und anschließend für 3 min in NTM-Puffer umgepuffert. Die Entwicklung erfolgte mit NBT/BCIP im Dunkeln bis zur gewünschten Farbintensität (10-20 min).

Nach erfolgreichem Testen wurde der Sondenansatz mit 100 µl RNase-freiem Wasser und 100 µl Formamid zur Stabilisierung aufgefüllt. Die verwendeten *in situ*-Sonden sind in Kapitel 2.9 aufgelistet.

3.6.6.2 Vorbehandlung der Gebrauchsmaterialien, Lösungen und Küvetten

Gebrauchsmaterialien und Lösungen wurden speziell behandelt, um Kontaminationen mit RNasen vorzubeugen. Alle verwendeten Puffer und Lösungen, mit Ausnahme von TEA, STE-*in situ*-Puffer, MBSTL und NTMLT, wurden mit 0,03 % DEPC versetzt, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und danach zur DEPC-Inaktivierung autoklaviert. Verwendete Pinzetten wurden mit RNaseZap behandelt und mit DEPC-H_2O gespült. Die für die *in situ*-Hybridisierung verwendeten Küvetten wurden vor dem ersten Gebrauch mit 0,3 %iger H_2O_2-Lösung in ddH_2O über Nacht inkubiert, mit reichlich ddH_2O gespült und für 4 h bei 180 °C gebacken. Die Küvetten wurden nach jedem Einsatz mit ddH_2O gespült und gebacken.

3.6.6.3 Vorbehandlung der Paraffinschnitte für die *in situ*-Hybridisierung

Zum Ablaufen überschüssigen Paraffins wurden die Objektträger für 30 min in einen 65 °C heißen Hybridisierungsofen gestellt. Vollständiges Entparaffinieren und Rehydrieren erfolgte für zweimal 10 min in Xylol, in einer absteigenden Ethanolreihe (für je 1 min in 100 %igem (2x), 95 %igem, 85 %igem, 70 %igem, 50 %igem und 30 %igem Ethanol) und anschließend für je 5 min in 0,83 % NaCl und in 1x PBS. In PBS mit 4 % PFA erfolgte die Fixierung des Materials für 20 min auf Eis. Nach zweimaligem Waschen in PBS für je 5 min wurden die Schnitte mit 200 µl Proteinase K (10 mg/ml) in 50 mM Tris/HCl pH 8,0 und 5 mM EDTA inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Schnitte in PBS gewaschen und nochmals für 5 min in 4 % PFA auf Eis fixiert. Zur Neutralisierung freier Aminogruppen, die ein unspezifisches Binden der Sonde durch elektrostatische Wechselwirkungen vermitteln können,

wurde Essigsäureanhydrid eingesetzt. Essigsäureanhydrid vermittelt die Acetylierung der Aminogruppen. Dazu wurden 0,25 % (v/v) Essigsäureanhydrid in 0,1 M TEA pH 8,0 gegeben und die Schnitte für 10 min in der Lösung inkubiert. Nach dem Waschen in PBS und 0,83 % NaCl erfolgte die Dehydrierung über eine aufsteigende Ethanolreihe (je 1 min in 30 %igem, 50 %igem, 70 %igem, 85 %igem, 95 %igem und in 100 %igem (2x) Ethanol). Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur getrocknet und am selben Tag hybridisiert.

3.6.6.4 Hybridisierung

Die Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers war abhängig von der verwendeten Sonde. Die *67Ptch*-Sonde wurden 1:1000 im Hybridisierungspuffer-1 eingesetzt, während die *Gli1*-Sonde 1:500 im Hybridisierungspuffer-2 verdünnt wurde. Die Hybridisierungslösungen wurden für 2 min bei 80 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf Raumtemperatur gebracht. Zu 100 µl Hybridisierungspuffer-1 wurden anschließend 5 µl denaturierte Lachsspermien-DNA (10 mg/ml) gegeben. 90 µl der jeweiligen Hybridisierungslösung wurden auf den Schnitt pipettiert, mit einem Deckgläschen versehen und über Nacht bei 59 °C in einer feuchten Kammer mit 50 % Formamid und 5x SSC inkubiert.

3.6.6.5 Posthybridisierung, anti-Dig-Antikörper-Färbung und Entwicklung

Ungebundene Sonde wurde in vorgewärmten 5x SSC für 30 min bei 55 °C entfernt. Anschließend wurde in 2x SSC mit 50 % Formamid für 30 min bei 63 °C, in STE-*in situ*-Puffer für 10 min bei Raumtemperatur und in STE-*in situ*-Puffer dreimal für 10 min bei 37 °C gewaschen. Für den Verdau einzelsträngiger RNA-Moleküle wurden die Schnitte mit 40 µl RNase A (10 mg/ml) auf 50 ml STE-*in situ*-Puffer für 30 min bei 37 °C behandelt. Nach erneutem Waschen in STE-*in situ*-Puffer für 15 min bei 37 °C, für 30 min bei 63 °C in 2x SSC mit 50 % Formamid, für 15 min bei Raumtemperatur in 2x SSC und für 10 min bei Raumtemperatur in NT-Puffer erfolgte die Blockierung endogener Phosphatasen mit Levamisol dreimal für 5 min in MBSTL. Proteine wurden mit 0,2 % Casein in PBS für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Der sekundäre Antikörper anti-Dig/AP von Roche wurde 1:500 mit 0,02 % Casein in MBSTL verdünnt eingesetzt. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4 °C mit dem Antikörper inkubiert. Durch sechsmaliges Waschen in MBSTL für jeweils 20 min wurde überschüssiger Antikörper entfernt. Zur Vorbereitung der Schnitte auf die Entwicklung mit BM-Purple erfolgte eine dreimalige Inkubation mit NTMLT für jeweils 5 min. Die Schnitte

wurden in eine feuchte Kammer überführt und mit der Färbelösung BM-Purple im Dunkeln und bei Raumtemperatur bis zur gewünschten Farbintensität inkubiert. Die Färbelösung wurde täglich erneuert. Die Farbreaktion wurde mit Stopp-Puffer inhibiert und die Schnitte zweimal für 5 min in 1x PBS gewaschen. Zum Fixieren wurden die Schnitte für 1-2 h mit 0,2 % Glutaraldehyd in PFA inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen und der Gewebeschnitt mit Dako Glycergel eingedeckt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Einsatz von Cyclopamin zur Therapie von *Ptch*-assoziierten RMS

4.1.1 Funktionalitätsnachweis von Cyclopamin

Vor dem Einsatz von Cyclopamin *in vivo* zur Therapie *Ptch*-assoziierter RMS wurde die Qualität der erworbenen Substanz in Zellkulturexperimenten überprüft. Da die Wirkungsmechanismen bei der Inhibierung des Hh-Signalweges bereits in vielen Arbeiten analysiert wurden, z. B. Incardona JP *et al.* [1998] und Chen JK *et al.* [2002], dienten die Experimente hier ausschließlich der Qualitätssicherung des verwendeten Cyclopamins und nicht der Aufklärung mechanistischer Prinzipien. Für die Untersuchung des inhibitorischen Potentials von Cyclopamin wurden Zelllinien verwendet, in denen sich der Hh-Signalweg stimulieren lässt.

4.1.1.1 Stimulation des Hh-Signalweges mit Shh-N-konditioniertem Medium oder Hh-Ag1.2 in der ShhLIGHT2-Zelllinie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Aktivierung des Hh-Signalweges in Zelllinien entweder 5 % Shh-N-Protein eingesetzt oder mit Shh-N-konditioniertem Medium bzw. dem Hh-Agonisten Hh-Ag1.2 gearbeitet. Die optimalen Konzentrationen für den Einsatz des Shh-N-konditionierten Mediums und des Hh-Agonisten Hh-Ag1.2 wurden an ShhLIGHT2-Zellen ausgetestet und über die Messung der Luziferaseaktivität bewertet. ShhLIGHT2-Zellen sind stabil transfizierte murine Fibroblasten. Sie exprimieren die Firefly-Luziferase unter einem mit Gli-Bindungsstellen versehenen Thymidinkinasepromotor und konstitutiv die Renilla-Luziferase zur Normalisierung. Eine Aktivierung des Hh-Signalweges und die damit verbundene gesteigerte *Gli*-Expression sind über die Messung einer erhöhten Firefly-Luziferaseaktivität detektierbar.

ShhLIGHT2-Zellen wurden für 30 h mit Shh-N-konditioniertem Medium in verschiedenen Verdünnungen inkubiert (Abb. 7 A). Durch eine 1:2 Verdünnung des konditionierten Mediums mit Normalmedium (DMEM 0,5 % FCS) wurde eine ausreichende Steigerung (~7fach) der Firefly-Luziferaseaktivität gegenüber dem Kontrollmedium erreicht. Diese Verdünnung kam daher für alle weiteren Experimente mit Shh-N-konditioniertem Medium zum Einsatz. Alternativ wurde der Hh-Agonist Hh-Ag1.2 in den Konzentrationen 50, 100, 200, 500 und 1000 nM für 24 h eingesetzt. Die stärkste Aktivierung des Hh-Signalweges (~6fach) wurde mit 200 nM Hh-Ag1.2 erreicht (Abb. 7 B).

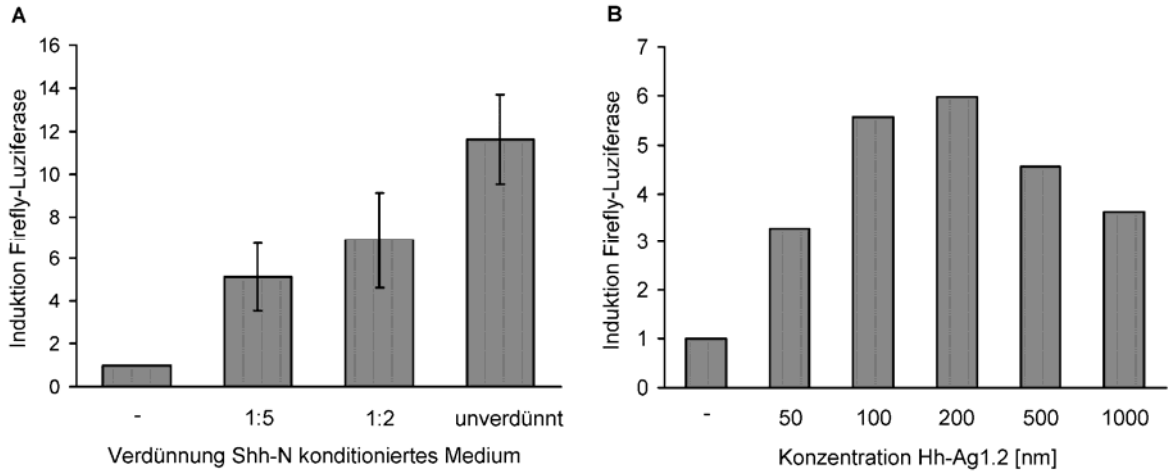


Abb. 7: Stimulation des Hh-Signalweges in ShhLIGHT2-Zellen. Angegeben ist jeweils die auf die Renilla-Luziferase normalisierte und auf die zugehörige Kontrolle bezogene Induktion der Firefly-Luziferase. A) Stimulation mit Shh-N-konditioniertem Medium in verschiedenen Verdünnungsstufen für 30 h. B) Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen des Hh-Agonisten Hh-Ag1.2 für 30 h.

Die Stimulation des Hh-Signalweges war mit dem natürlichen Liganden Shh effektiver als mit dem chemischen Agonisten Hh-Ag1.2. Da das Shh-N-konditionierte Medium zusätzlich einfach und kostengünstig in größeren Mengen herstellbar ist, wurde es für die meisten der folgenden Experimente verwendet.

4.1.1.2 Untersuchung der transkriptionellen Regulation von *Gli1* durch Cyclopamin *in vitro*

Die Expression des Transkriptionsfaktors *Gli1* als direktes Zielgen des Hh-Signalweges stellt ein Maß für die Aktivität der Signalkaskade dar [Hooper JE, Scott MP, 2005]. Der Einfluss von Cyclopamin auf die Expression von *Gli1* wurde *in vitro* an zwei unterschiedlichen Zelllinien untersucht.

Zunächst wurde die murine Embryofibroblasten-Zelllinie C3H10T1/2 mit 5 % SHH-N stimuliert und für 48 h mit 5 µM Cyclopamin, 1 µM KAAD oder dem inaktiven Strukturanalogon Tomatidin [Gaffield W, Keeler RF, 1996] inkubiert. Die qRT-PCR Analyse ergab, dass Cyclopamin im Vergleich zu Tomatidin die Transkription von *Gli1* etwa um das 20fache verringert (Abb. 8). Da das chemisch modifizierte Cyclopamin KAAD eine 10-20fach höhere Affinität zu Smo aufweist als Cyclopamin [Taipale J *et al.*, 2000], war es schon bei geringerer Konzentration (1 µM) in gleichem Maß wirksam.

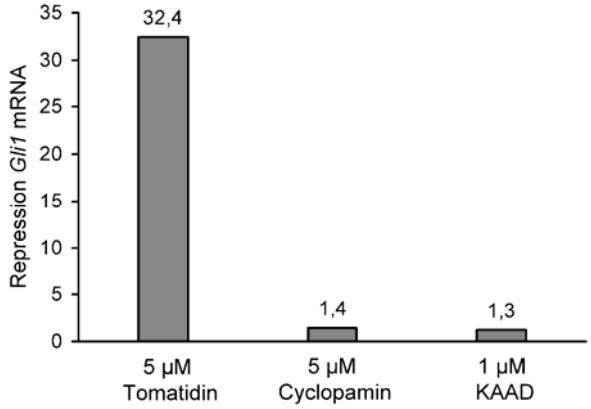


Abb. 8: Einfluss von Cyclopamin auf die *Gli1*-Transkription in C3H10T1/2. C3H10T1/2 wurden mit 5 % SHH-N stimuliert und mit 5 µM Cyclopamin, 1 µM KAAD bzw. 5 µM Tomatidin für 48 h inkubiert. Die Quantifizierung der *Gli1*-Expression erfolgte mittels qRT-PCR Analyse.

Der zweite Nachweis für die Inhibierung der *Gli1*-Transkription durch Cyclopamin wurde an der murinen Hautfibroblastenlinie B9 (F. Nitzki, Institut für Humangenetik) aus dem konditionellen *tPtch*$^{-/-}$-Mausmodell [Uhmann A *et al.*, 2007] durchgeführt. Zur Stimulierung wurden 200 nM Hh-Ag1.2 bzw. Shh-N-konditioniertes Medium für 48 h (Kap. 3.1.7) eingesetzt. Das konditionierte Shh-N-Medium führte zu einer deutlich stärkeren Induktion der *Gli1*-Expression als der Hh-Agonist. Bei zeitgleicher Behandlung der Zellen mit 5 µM Cyclopamin wurde die Aktivierung der *Gli1*-Transkription unabhängig vom gewählten Stimulus vollständig unterdrückt (Abb. 9).

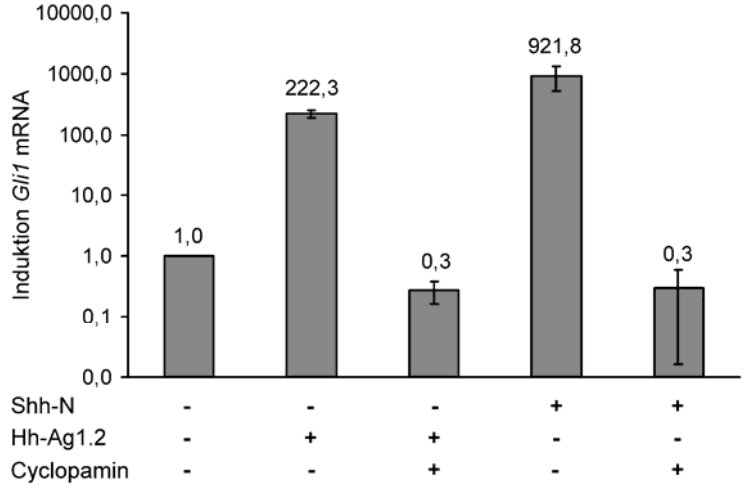


Abb. 9: Einfluss von Cyclopamin auf die *Gli1*-Transkription in murinen Hautfibroblasten. B9 Zellen wurden mit Shh-N-konditioniertem Medium oder dem Hh-Agonisten Hh-Ag1.2 (200 nM) für 48 h stimuliert und mit 5 µM Cyclopamin inkubiert.

In den beiden voneinander unabhängigen Zellkulturmodellen konnte die effektive Hemmung der transkriptionellen Regulation des Hh-Signalweges durch Cyclopamin nachgewiesen und somit die Funktionalität der Substanz bestätigt werden.

4.1.2.3 Untersuchung zum Einfluss von Cyclopamin auf die Gli-Funktion *in vitro*

Die Inhibierung der Gli-Funktion und damit die des Hh-Signalweges durch Cyclopamin auf Proteinebene wurde mit zwei etablierten Luziferaseassays [Taipale J *et al.*, 2000] geprüft. Zunächst wurden ShhLIGHT2-Zellen für 30 h mit Shh-N-konditioniertem Medium stimuliert. Die Behandlung mit 5 µM Cyclopamin führte zu einer Reduktion der Firefly-Luziferaseaktivität auf annähernd das Basalniveau von unstimulierten ShhLIGHT2-Zellen (Abb. 10 A). Weiterhin wurden PC3-Zellen nach Taipale *et al.* [2000] mit dem Shh-Expressionsplasmid, dem 9x Gli-BS-Firefly-Reporterplasmid und dem Renilla-Expressionsplasmid transfiziert und nach Erreichen der Konfluenz für 48 h mit 5 µM Cyclopamin behandelt. Auch in diesem Modellsystem inhibierte Cyclopamin die Aktivierung der Firefly-Luziferase effektiv (Abb. 10 B).

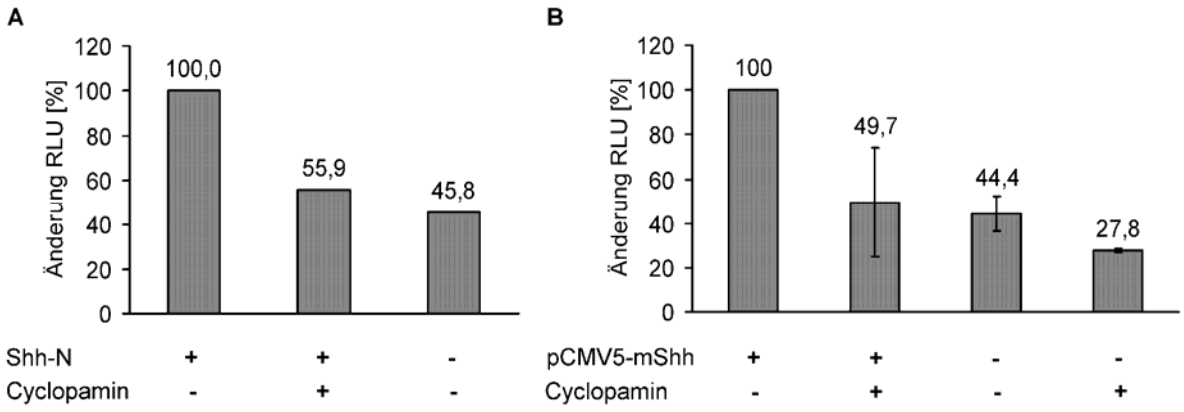


Abb. 10: Wirkung von Cyclopamin auf die Funktion von Gli im Luziferaseassay. A) ShhLIGHT2-Zellen wurden für 30 h mit Shh-N-konditioniertem Medium stimuliert und zeitgleich mit 5 µM Cylopamin behandelt. B) PC3-Zellen wurden mit einem Shh-Expressionsplasmid, dem 9x Gli-BS-Reporterplasmid und einem Renilla-Reporterplasmid transfiziert und nach Erreichen der Konfluenz mit 5 µM Cyclopamin für 48 h behandelt. Abkürzung: RLU relative Lichteinheiten (engl. *relative light units*).

Somit konnte in zwei unterschiedlichen Zelllinien die Hemmung der Gli-Funktion durch das erworbene Cyclopamin festgestellt werden. Die Ergebnisse aus beiden Luziferasereportergenassays stimmten mit Herstellerangaben und Angaben aus bereits veröffentlichten Studien überein. Folglich war das Cyclopamin für die *in vivo*-Versuche einsetzbar.

4.1.2 Untersuchung der Effekte von Cyclopamin an RMS-Zelllinien und RMS-Primärkulturen

4.1.2.1 Effekte von Cyclopamin auf die RMS-Zellllinien TP5014 und TP1588 *in vitro*

Vor der Anwendung von Cyclopamin im Tiermodell wurde die Tauglichkeit des Medikamentes zur Therapie von RMS *in vitro* an RMS-Zelllinien untersucht. Zunächst wurden die RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 verwendet, die von T. Pietsch (Institut für Neuropathologie, Universität Bonn) aus RMS von *Ptch*$^{neo12/+}$-Mäusen [Goodrich LV *et al.*, 1997] generiert wurden. KAAD, ein Cyclopamin-Derivat mit höherer Affinität zu Smo [Taipale J *et al.*, 2000], wurde in Konzentrationen von 0,25-10 µM für 72 h eingesetzt und die Proliferation der Zellen mittels BrdU-Einbau bestimmt. Um einen Rückgang der Proliferationsrate durch zytotoxische Effekte der eingesetzten KAAD-Konzentrationen auszuschließen, wurde als Kontrollsubstanz das Strukturanalogon Tomatidin verwendet. Tomatidin übt keinen inhibitorischen Einfluss auf den Hh-Signalweg aus [Gaffield W, Keeler RF, 1996].

Ab einer KAAD-Konzentration von ≥5 µM wiesen die RMS-Zelllinien eine um 10-20 % verringerte Proliferationsrate auf (Abb. 11 A). Kritisch anzumerken ist, dass der gleiche Effekt mit Tomatidin erreicht werden konnte.

Da Levitt RJ *et al.* [2007] eine Verminderung der Effektivität von Cyclopamin bezüglich der Hemmung des Hh-Signalweges bei FCS-Konzentrationen von 10 % festgestellt haben, wurden zusätzlich Experimente unter serumreduzierten Bedingungen (2,5 % FCS) durchgeführt (Abb. 11 B). Hier war schon ab einer KAAD-Konzentration von 0,25 µM ein starker antiproliferativer Effekt (20-40 %) zu verzeichnen, der aber auch mit Tomatidin erreicht wurde.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der antiproliferative Effekt von KAAD unter serumreduzierten Bedingungen stärker ausgeprägt war als in Vollmedium und bereits bei einer Konzentration von 0,25 µM zu einer Reduktion der proliferativen Zellen um 20-40 % führte. Das als inaktives Cyclopamin-Strukturanalogon geltende Tomatidin verursachte im verwendeten RMS-Zellkulturmodell ähnliche wachstumsinhibierende Effekte wie KAAD, was auf einen allgemeinen zytotoxischen Mechanismus für die Proliferationshemmung durch KAAD schließen lässt und eben nicht auf die spezifische Inhibierung der Hh-Signalkaskade.

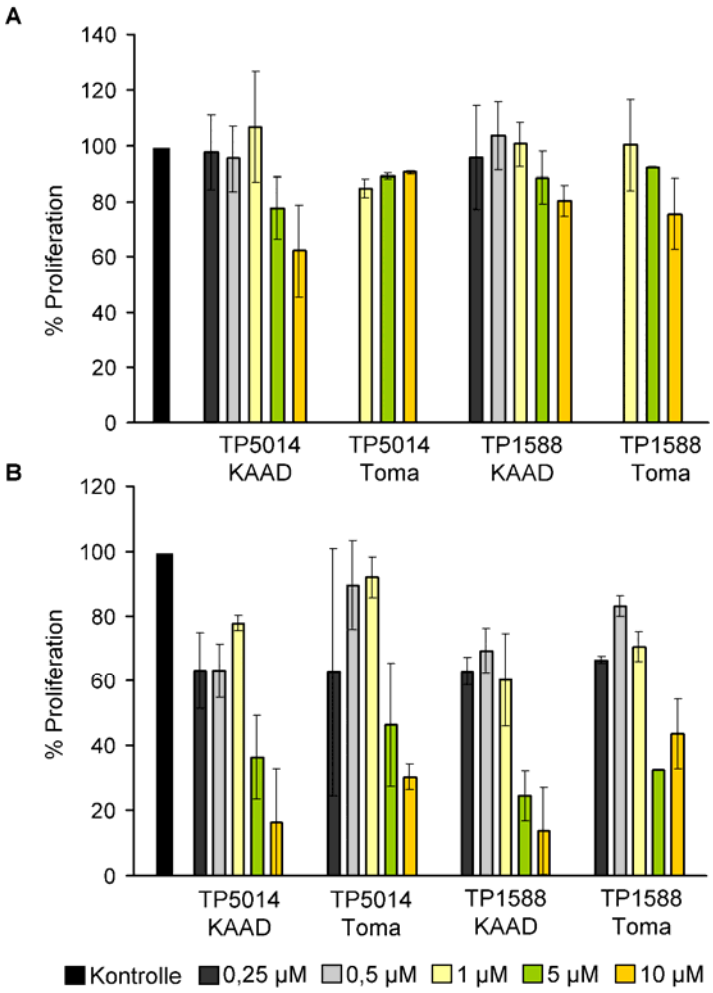


Abb. 11: Einfluss von Cyclopamin auf die Proliferationsrate von RMS-Zelllinien. Dargestellt ist die prozentuale Inhibierung der Proliferation im Vergleich zu mit Lösungsmittel behandelten Zellen. Die RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 wurden für 72 h mit KAAD oder Tomatidin behandelt. Für die letzten 24 h der Inkubation wurden 100 µM BrdU zu-gegeben. A) Vollmedium (10 % FCS). B) Serumreduzierte Bedingungen (2,5 % FCS). Abkürzung: Toma Tomatidin.

Die Ergebnisse aus den Experimenten zum Proliferationsverhalten der RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 unter KAAD-Behandlung ließen vermuten, dass der Hh-Signalweg in diesen Zellen inaktiv ist und sich nicht durch Cyclopamin blockieren lässt. Um dies zu prüfen, wurden RT-PCR Analysen für die Hh-Markergene *Ptch*, *Gli1* und *Igf2* an den Zelllinien durchgeführt und die Expressionslevel mit denjenigen von nativen RMS aus *Ptch*-heterozygoten Mäusen verglichen. Für RMS *Ptch*-heterozygoter Mäuse zeigte sich die hohe Expression der Hh-Markergene, während in den verwendeten RMS-Zelllinien ein deutlicher Rückgang der Expression dieser Marker zu verzeichnen war, was mit einer Abnahme der Aktivität des Hh-Signalweges gleichzusetzen ist (Abb. 12). Daher wurde versucht den Hh-Signalweg in den RMS-Zellen durch Implantation in Nacktmäuse zu restimulieren.

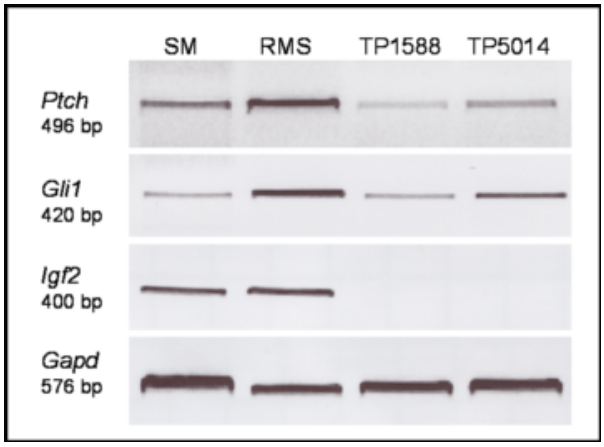


Abb. 12: Expressionsstatus der Hh-Markergene *Ptch*, *Gli1* und *Igf2* in den RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 im Vergleich zu Skelettmuskel und RMS aus $Ptch^{neo67/+}$-Mäusen. Abkürzung: SM Skelettmuskel.

4.1.2.2 Implantation der RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 in Nacktmäuse und Untersuchung des Aktivitätsstatus der Hh-Signalkaskade

Die Implantation von Tumorzelllinien in immundefiziente Mäuse führt zur Ausbildung der jeweiligen Tumorentität *in vivo* und wird weithin als legitimes Modell zum Testen von potentiellen Krebsmedikamenten angesehen. Um zu untersuchen, ob die RMS-Zelllinien nach Implantation in Nacktmäuse Tumoren ausbilden, die histologisch RMS aus *Ptch*-heterozygoten

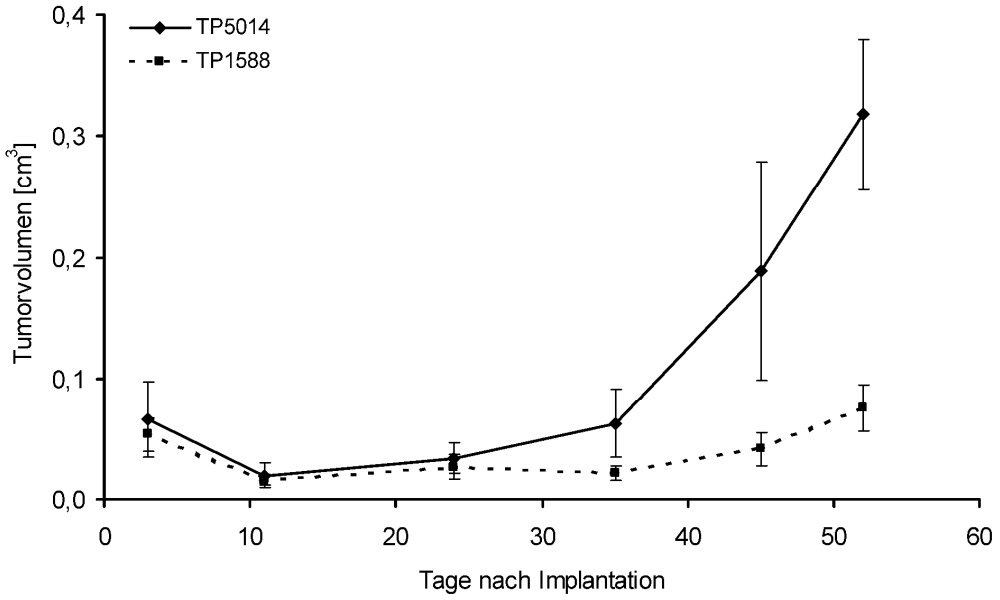


Abb. 13: Entwicklung der Tumorvolumina der RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 nach Implantation in Nacktmäuse. Jeweils 1x 10^6 Zellen wurden den Mäusen subkutan appliziert und das Tumorvolumen über einen Zeitraum von 52 Tagen mit einem Messschieber bestimmt.

Mäusen gleichen und einen aktiven Hh-Signalweg aufweisen, wurden je fünf *nu/nu*-Mäusen TP5014 bzw. TP1588 subkutan injiziert. In allen Tieren bildeten die applizierten Zellen Tumoren aus, die nach 24 Tagen ein Volumen von 20-50 mm^3 erreicht hatten (Abb. 13). Am Tag 52 nach der Implantation wurden die Tumoren entnommen, histologisch untersucht sowie Expressionsanalysen durchgeführt. Das Tumorvolumen lag zu diesem Zeitpunkt für die TP5014 Zellen zwischen 200-430 mm^3 und für die TP1588 zwischen 40-110 mm^3. Neun von zehn Tumoren wurden an Hand von HE-Färbungen durch einen Pathologen als RMS identifiziert. Die Tumoren wiesen einen aggressiveren Phänotyp auf als endogene RMS aus *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen.

In den isolierten Tumoren wurde mittels semiquantitativer RT-PCR der Aktivitätsstatus der Hh-Signalkaskade untersucht. Die Expression des Markergens *Ptch* blieb für beide Zelllinien in dieser *in vivo*-Situation deutlich unter dem Niveau der *Ptch*-Expression in RMS von *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen. In zwei der vier TP1588-Tumoren (für den fünften war die RNA-Isolierung nicht erfolgreich) konnte kaum eine *Ptch*-Expression nachgewiesen werden. Die Implantation hatte keinen entscheidenden Einfluss auf die Expression von *Gli1*, die sich nur marginal vom Expressionsniveau in der Ausgangszelllinie unterschied. Die Analysen ergaben allerdings eine starke Zunahme der *Igf2*-Expression nach der Transplantation im Vergleich zu der jeweiligen Ausgangszelllinie (Abb. 14). Die erhöhte Expression von *Igf2*, die dem Expressionsniveau in Orginaltumoren entsprach, könnte auf eine zumindest partielle Reaktivierung der Hh-Signalkaskade in beiden RMS-Zelllinien nach subkutaner Implantation in *nu/nu*-Mäuse hinweisen.

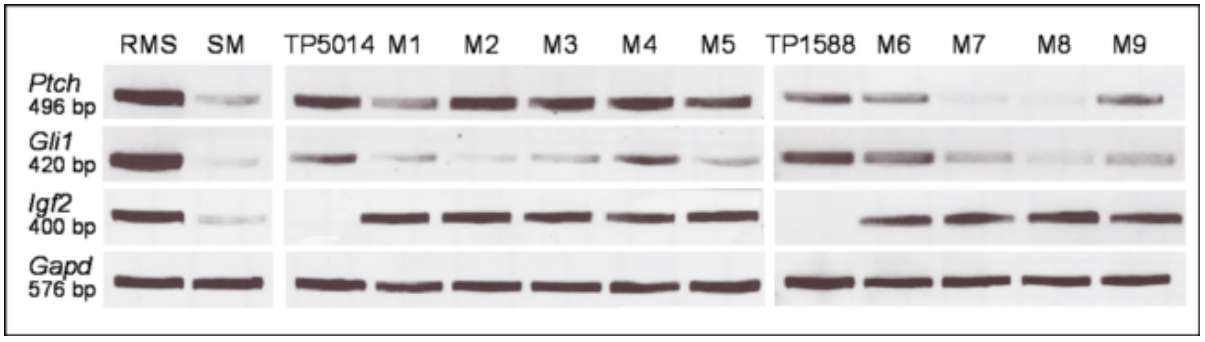


Abb. 14: RT-PCR Analyse der Hh-Markergene *Ptch, Gli1* und *Igf2* in Allotransplantaten von RMS-Zelllinien. Die RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 wurden in *nu/nu*-Mäuse implantiert und nach 52 Tagen der Tumor für die Expressionsanalyse entnommen. Zum Vergleich wurde die Expression von *Ptch*, *Gli1* und *Igf2* in je einem nativen RMS und Skelettmuskel und von *in vitro*-kultivierten RMS-Zelllinien bestimmt. Abkürzungen: M Maus, SM Skelettmuskel.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 aufgrund des Verlustes eines aktiven Hh-Signalweges kein geeignetes *in vitro*-Modell für das Testen von Cyclopamin darstellen. Die RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 wuchsen in Nacktmäusen nach subkutaner Implantation an, was zu einer starken Aktivierung der *Igf2*-Expression führte.

4.1.2.3 Behandlung von implantierten RMS-Zelllinien in Nacktmäusen mit Cyclopamin

Die Implantation der RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 in Nacktmäuse bedingte eine starke Reaktivierung der *Igf2*-Expression, die möglicherweise in Abhängigkeit zum Hh-Signalweg stand. Deshalb wurde in einem weiteren Experiment versucht, die Progression von subkutan implantierten RMS-Zellen mit Cyclopamin zu inhibieren. Für diesen Versuch wurde die RMS-Zelllinie TP5014 verwendet, da sie im Vorversuch schneller angewachsen war als die RMS-Zelllinie TP1588 und darüber hinaus eine stärkere Aktivität der Hh-Signalkaskade aufwies (Kap. 4.1.2.2). Als Kontrollzellen wurden humane Prostatakrebszellen PC3 in Nacktmäuse implantiert. Für die resultierenden Tumoren ist ein antitumoraler Effekt von Cyclopamin bereits beschrieben worden [Karhadkar SS *et al.*, 2004]. PC3- und TP5014-Zellen wurden in jeweils fünf Tiere implantiert. Nach Erreichen einer Tumorgröße von 90-180 mm^3 wurde mit der Therapie begonnen.

In vier von den fünf Tieren mit implantierten PC3-Zellen entstanden Tumoren. Die PC3-Zellen proliferierten im Allgemeinen wesentlich schneller als die TP5014-Zellen und es konnte früher mit der Therapie begonnen werden.

Zwei von diesen Mäusen mit implantierten PC3-Zellen wurden mit Cyclopamin behandelt und zwei mit Lösungsmittel. Zunächst wurde dem Protokoll von Berman DM *et al.* [2002] entsprechend Cyclopamin in Ethanol:Triolein 1:4 gelöst und 50 mg/kg KG täglich subkutan appliziert. Bereits am zweiten Tag der Behandlung waren sowohl bei den mit Lösungsmittel als auch bei den mit Cyclopamin behandelten Tieren an der Injektionsstelle Hautreizungen zu beobachten. Bis zum siebten Tag verstärkten diese Reizungen sich zu Hautnekrosen und erforderten eine Umstellung der Therapie auf 10 mg/kg KG Cyclopamin in HBC zweimal täglich i. p. Einer der mit Cyclopamin behandelten Tumoren schrumpfte unter Therapie auf etwa die Hälfte des Ausgangsvolumens, der andere wurde entsprechend den lösungsmittelbehandelten Tumoren nicht in der Progression gehemmt (Abb. 15 A). Bei der Entnahme der PC3-Tumoren wurde festgestellt, dass nur der Tumor, der auf die Behandlung mit Cyclopamin

angesprochen hatte, eine solide Tumormasse aufwies. Die anderen Tumoren waren mit Flüssigkeit gefüllt, was auf Probleme bei der Implantationsprozedur schließen lässt.

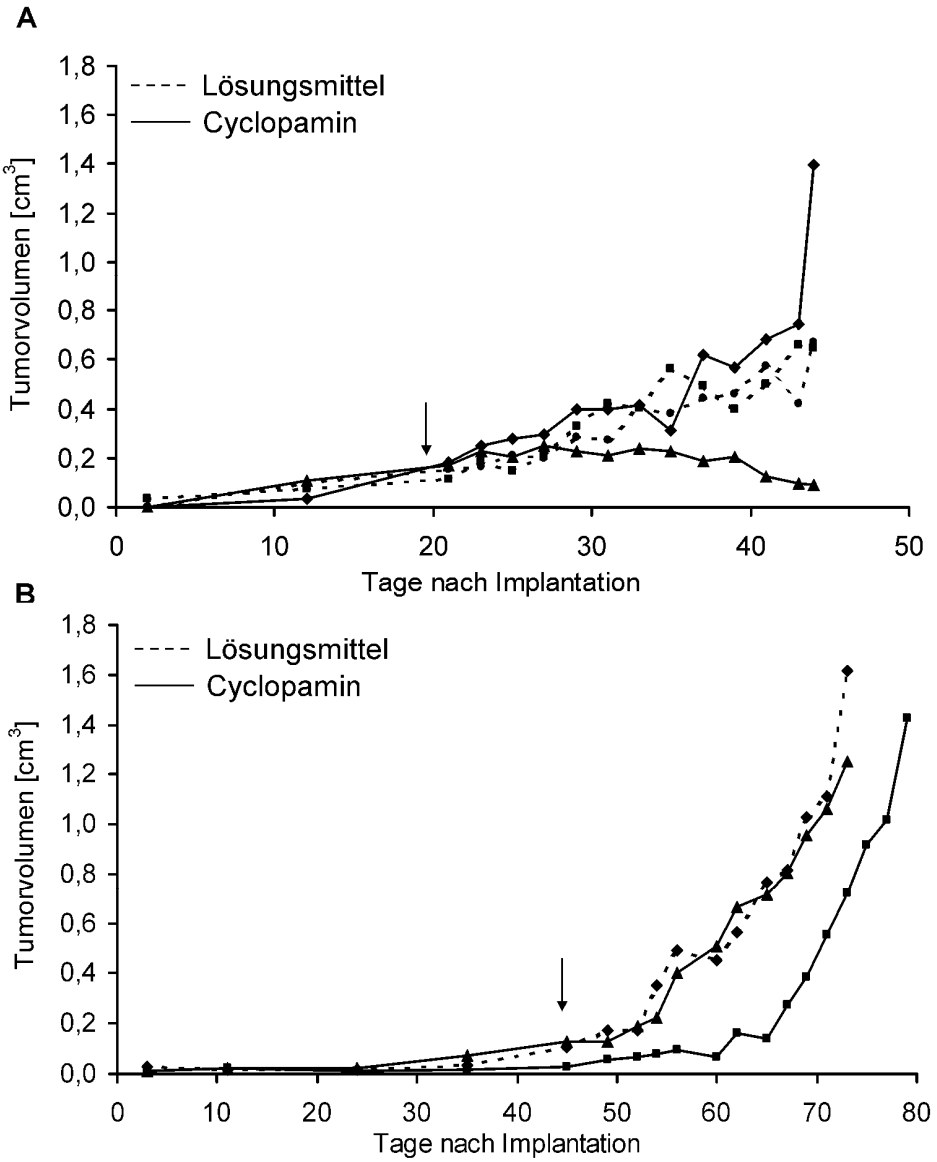


Abb. 15: Cyclopaminbehandlung von implantierten Zelllinien in Nacktmäusen. Der Therapiestart ist jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet. A) Implantation der humanen Prostatakrebszelllinie PC3. Am Tag 22 nach Implantation wurde mit der Cyclopaminapplikation begonnen. Wie bei Karhadkar SS *et al.* [2004] beschrieben, wurde das Medikament in Ethanol:Triolein 1:4 gelöst und subkutan in einer Dosis von 50 mg/kg KG appliziert. Aufgrund von Nekrosen musste die Behandlung mit Cyclopamin jedoch am 7. Tag nach Therapiebeginn auf die i. p. Applikation von zweimal täglich 10 mg/kg KG Cyclopamin in HBC gelöst umgestellt werden. B) Implantation der RMS-Zelllinie TP5014. Zwischen Tag 49 und 56 nach Implantation wurde mit der Applikation von Cyclopamin (zweimal täglich i. p. 10 mg/kg KG über 23 Tage) begonnen.

Von den fünf Tieren, denen TP5014 Zellen implantiert wurden, musste eines aufgrund eines schlechten Allgemeinzustandes und Diarrhoe vorzeitig präpariert werden und bei einem weiteren Tier wuchsen die Zellen nicht an. Von den übrigen drei Tieren wurden zwei mit Cyclopamin (10 mg/kg KG) und eines mit dem Lösungsmittel HBC zweimal täglich über 23 Tage i. p. behandelt. Das Tumorvolumen nahm unabhängig von der verabreichten Substanz in allen drei Tieren zu und betrug zum Abschluss der Therapie mindestens das 9fache des Ausgangsvolumens beim Spritzbeginn (Abb. 15 B). Alle entnommenen Tumoren wurden durch einen Pathologen als RMS klassifiziert. Die Analyse der HE-Färbung ergab keine Unterschiede in der Morphologie der mit Cyclopamin und mit Lösungsmittel behandelten Tumoren.

Abschließend ist festzuhalten, dass eine Behandlung der aus den RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 entstandenen Tumoren mit Cyclopamin im Hinblick auf eine Inhibierung der Tumorprogression nicht erfolgreich war. Dies deutet auf die Unabhängigkeit der RMS-Zelllinien vom Hh-Signalweg bei der Proliferation in den Nacktmäusen hin. Damit ist die Aktivierung der *Igf2*-Expression in den Tumoren eher als ein vom Hh-Signalweg unabhängiger Effekt zu betrachten.

4.1.2.4 Untersuchung der Effekte von Cyclopamin auf RMS- und MB-Primärkulturen

Tumorzelllinien stellen für das Austesten von Krebstherapeutika ein künstliches System dar, dessen Kapazität zur Widerspieglung der *in vivo*-Situation äußerst begrenzt ist. Deshalb wurde die antitumorale Wirkung von Cyclopamin auch an Primärkulturen von RMS und MB aus *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen untersucht, die ein geeignetes Modell für das Testen von Krebsmedikamenten im kleinen Maßstab sind.

In einer Reihe von humanen *HH*-assoziierten Tumoren konnte die erhöhte Aktivität des Hh-Signalweges auf die Amplifikation des *GLI1*-Lokus zurück geführt werden [Kinzler KW *et al.*, 1987; Wong AJ *et al.*, 1987; Roberts WM *et al.*, 1989; Ragazzini P *et al.*, 2004]. Da der Einsatz des Hh-Antagonisten Cyclopamin bei einer pathologischen Aktivierung der Signalkaskade unterhalb von Smo nicht wirksam ist, wurde zunächst an 14 RMS aus *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen der Amplifikationsstatus von *Gli1* mittels qPCR untersucht. Die relative Kopienzahl von *Gli1* betrug in allen analysierten RMS und korrespondierenden Skelettmuskeln ungefähr 1 und die Amplifikation des *Gli1*-Lokus konnte als Ursache für die Aktivität des Hh-Signalweges in Tumoren von *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen ausgeschlossen werden (Abb. 16). Damit ist

der Einsatz von Cyclopamin zur Modulation des Hh-Signalweges in dieser Tumorentität und zur Therapie sinnvoll.

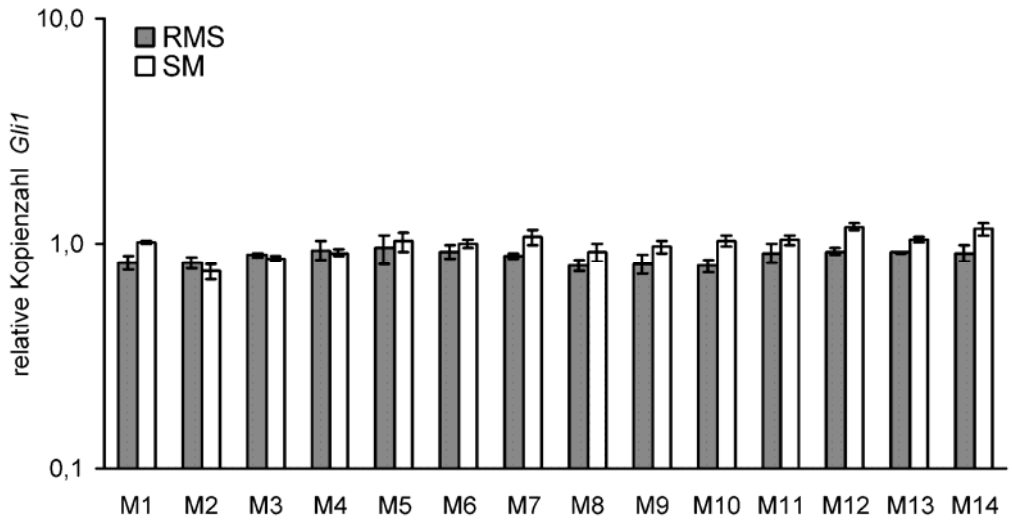


Abb. 16: Amplifikationsstatus des *Gli1*-Lokus in RMS von *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen. Untersucht wurden RMS und Skelettmuskel von 14 Mäusen mittels qPCR. Zur Normalisierung wurde *Pelota* vermessen. Abkürzungen: M Maus, SM Skelettmuskel.

Zur Gewinnung der Primärkulturen wurde frisches Tumormaterial mechanisch und enzymatisch dissoziiert und in Zellkulturschalen maximal 4 Tage vor Versuchsstart kultiviert. Dadurch wird gewährleistet, dass die dissoziierten Zellen den Ausgangstumorzellen im hohen Maß gleichen.

Um die Spezifität des Isolierungsprotokolls für RMS-Zellen zu überprüfen, wurden die Zellen einer immunhistochemischen Färbung für Desmin unterzogen. Der Muskelmarker wird im Skelettmuskel und in RMS exprimiert, aber nicht in Fibroblasten (Abb. 17).

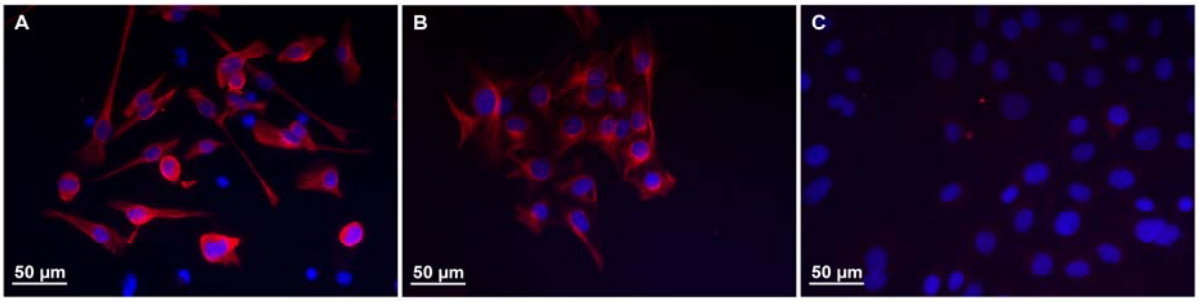


Abb. 17: Immunhistochemische Desminfärbung. A) RMS-Primärkulturen. B) C2C12 Myoblasten als Positivkontrolle. C) 3T3 Fibroblasten als Negativkontrolle für die Spezifität des Antikörpers.

Primärkulturen von RMS und MB wurden mit 5 µM Cyclopamin für 72 h behandelt und die Wirkung des Alkaloids auf die Aktivität des Hh-Signalweges mittels qRT-PCR sowie der Einfluss auf das Proliferationsverhalten mittels BrdU-Inkorporation bestimmt.

Aus der Expressionsanalyse von den Hh-Markergenen geht hervor, dass *Δ67Ptch*, *Gli1* und *Igf*2 sowohl in RMS- als auch in MB-Primärkulturen sehr effizient durch Cyclopamin inhibiert wurden (Abb. 18). Durch die Verwendung sondenbasierter Assays konnte zwischen dem mutanten *Δ67Ptch*-Allel und dem *wtPtch*-Allel unterschieden werden. Wie in der Einleitung erörtert (Kap. 1.3.5), ist im Tumorgewebe von $Ptch^{neo67/+}$-Mäusen die starke *Ptch*-Expression auf das mutante Allel zurückzuführen, während die Expression des wt-Allels vermutlich epigenetisch reguliert ist und im Vergleich zum Skelettmuskel konstant bleibt oder sogar reprimiert wird [Calzada-Wack J *et al.*, 2002; Uhmann A *et al.*, 2005]. Aufgrund der epigenetischen Repression des wt-Allels gibt nur der Expressionslevel des *Δ67Ptch*-Allels Aufschluss über die Aktivität der Hh-Signalkaskade und kann im Gegensatz zu derjenigen des *wtPtch*-Allels im Falle einer Inhibierung der Hh-Signalkaskade durch Cyclopamin reguliert werden. Deshalb wird im Folgenden nur die Expression des *Δ67Ptch*-Allels dargestellt.

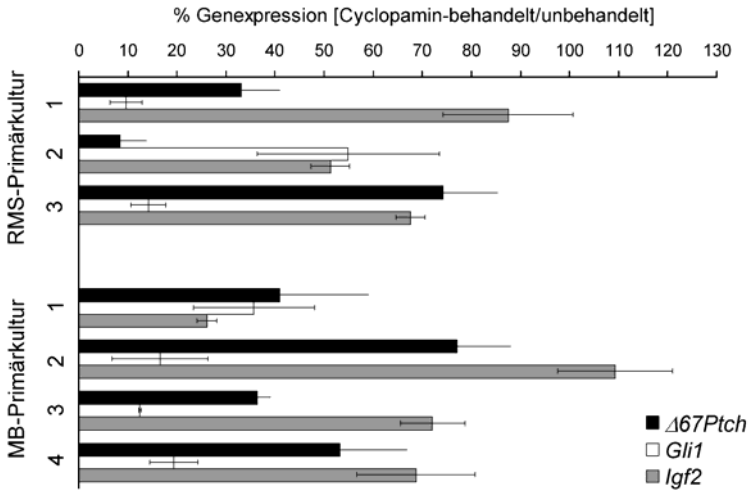


Abb. 18: Einfluss von Cyclopamin auf die Expression der Hh-Markergene in RMS- und MB-Primärkulturen von $Ptch^{neo67/+}$-Mäusen. Die Primärkulturen wurden für 72 h unter serumreduzierten Bedingungen mit 5 µM Cyclopamin inkubiert und die Expression von *Δ67Ptch*, *Gli1* und *Igf2* mittels qRT-PCR bestimmt. Zur Normalisierung wurde *18S rRNA* vermessen.

Neben der Aktivität der Hh-Signalkaskade wurde auch die Proliferationsrate von primären RMS-Zellkulturen um mehr als 50 % gegenüber den Kontrollzellen reduziert (Abb. 19). Der Effekt war vom verwendeten Lösungsmittel (Ethanol bzw. HBC) unabhängig. Ethanol wurde primär als Lösungsmittel für Cyclopamin in Zellkulturexperimenten verwendet, HBC kam als

Lösungsmittel für *in vivo*-Experimente zum Einsatz. Da ein proliferationshemmender Einfluss von Cyclopamin auf primäre MB-Kulturen bereits von Berman DM *et al.* [2002] beschrieben werden konnte, dienten die MB-Kulturen als Positivkontrolle für das Experiment. Wie bei Berman DM *et al.* [2002] konnte auch in unserem Experiment die Proliferationsrate der MB-Kulturen um etwa 75 % gehemmt werden (Abb. 19).

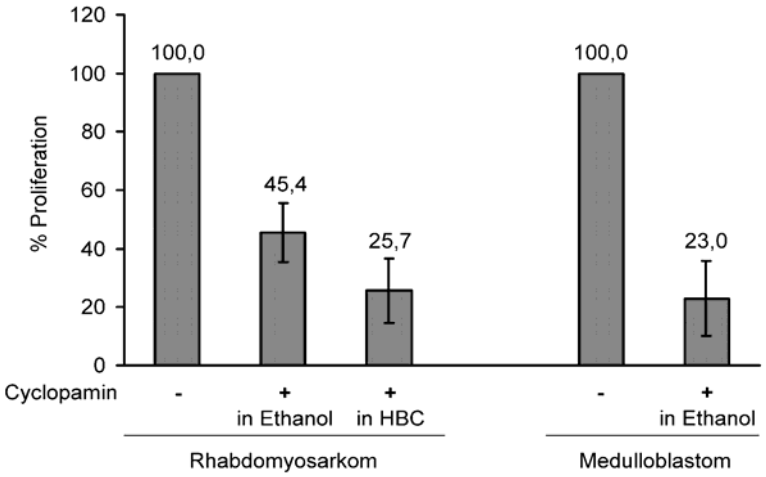


Abb. 19: Einfluss von Cyclopamin auf die Proliferation von RMS- und MB-Primärkulturen. Die Primärkulturen wurden von Tumoren aus *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen gewonnen und für 72 h mit 5 µM Cyclopamin behandelt. Cyclopamin kam in Ethanol oder HBC gelöst zum Einsatz. Für die letzten 24 h der Inkubation wurde 100 µM BrdU zugegeben.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass Cyclopamin den Hh-Signalweg und die Proliferation in Primärkulturen von RMS und MB aus dem *Ptch*$^{neo67/+}$-Mausmodell hemmt. Dadurch wird das Konzept des Einsatzes dieses Hh-Antagonisten bei der Therapie von *Ptch*-assoziierten Tumoren untermauert.

4.1.3 *In vivo*-Applikation von Cyclopamin zur Behandlung von RMS in *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen

Nach erfolgreichem Testen von Cyclopamin hinsichtlich der Inhibierung der Aktivität der Hh-Signalkaskade und der Proliferation von primären RMS-Kulturen wurde die Wirksamkeit *in vivo* an RMS in *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen untersucht. Dabei kamen zwei Therapiemodi zum Einsatz: A) 10 mg/kg KG Cyclopamin wurden zweimal täglich (kumulative Dosis 20 mg/kg KG) über 4 Wochen systemisch appliziert. B) 100 µg Cyclopamin wurden zweimal täglich lokal in den Tumor über 7 Tage injiziert. Zur Wertung des Therapieerfolges wurde die Expression der Hh-Markergene mittels qRT-PCR und das Tumorwachstum mittels VCT bestimmt.

4.1.3.1 Einfluss einer systemischen Applikation von Cyclopamin auf die Hh-Signalkaskade und das Wachstum von *Ptch*-assoziierten RMS

Zunächst wurde tumortragenden Tieren Cyclopamin systemisch in einer Dosis von 20 mg/kg KG/Tag über 4 Wochen verabreicht. Um einen möglichst gleichbleibenden Plasmaspiegel des Medikamentes zu gewährleisten, wurde die Dosis auf zwei Injektionen zu je 10 mg/kg KG morgens und abends verteilt. Insgesamt wurden sieben Tiere mit Cyclopamin behandelt. Von den sechs Tieren, die mit dem Lösungsmittel HBC behandelt wurden, wies ein Tier zwei RMS auf. Je zwei Tiere pro Gruppe wurden innerhalb von 4 Stunden nach der letzten Medikamentengabe präpariert. Die restlichen Tiere wurden für weitere 3-4 Wochen beobachtet, um einen eventuell verzögert auftretenden Effekt von Cyclopamin auf das Tumorwachstum erfassen zu können.

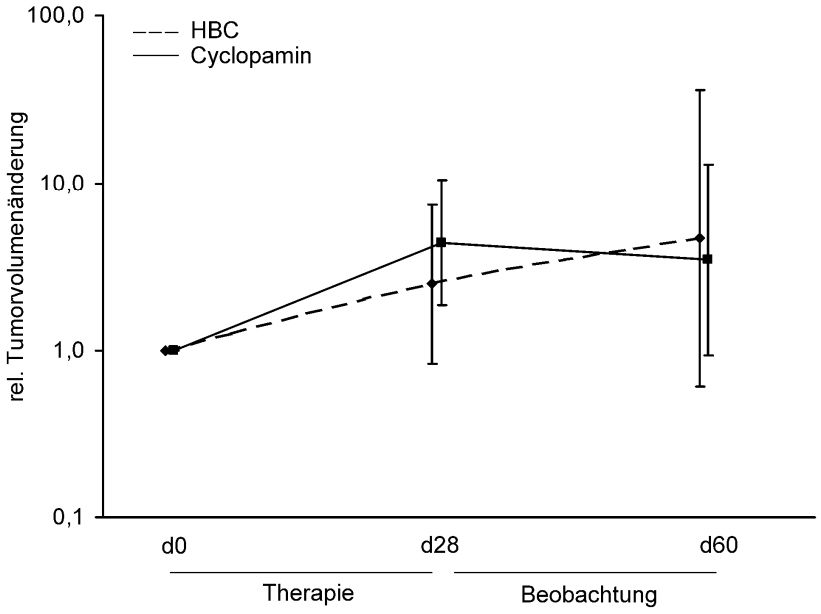


Abb. 20: Tumorprogression unter systemischer Cyclopaminapplikation in (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen. RMS-tragende Tiere wurden über 4 Wochen zweimal täglich i. p. mit 10 mg/kg KG Cyclopamin behandelt und die Tumorprogression durch VCT ermittelt. Das Volumen wurde vor Therapiestart (d0), nach Therapieabschluss (d28) und 30 Tage danach (d60) bestimmt. Abkürzung: d Tag.

Direkt nach der vierwöchigen Medikamentenapplikation konnten fünf Tumoren der Lösungsmittelgruppe und sechs Tumoren der mit Cyclopamin behandelten Gruppe erfolgreich im VCT vermessen werden. Drei Tumoren der Kontrollgruppe und fünf Tumoren der Cyclopamingruppe waren unter Behandlung um mehr als das Doppelte gewachsen (Abb. 20). In dem

Beobachtungszeitraum wuchsen zwei der vier verbliebenen Tumoren in der Kontrollgruppe weiter, einer blieb stabil und einer bildete sich leicht zurück. Von den fünf mit Cyclopamin behandelten RMS, die über 4 Wochen beobachtet worden waren, wuchsen drei weiter, einer blieb stabil und einer bildete sich zurück.

Für eine statistische Auswertung der Volumenentwicklung nach systemischer Applikation von Cyclopamin im Vergleich zu der mit HBC behandelten Gruppe war die Anzahl der vermessenen Tumoren zu gering. In Kapitel 4.1.3.4 erfolgt eine statistische Gesamtbetrachtung der Tumorvolumina aus der Cyclopaminstudie.

Quantitative Genexpressionsanalysen der RMS zeigten (Abb. 21), dass die i. p. Applikation von Cyclopamin keinen Einfluss auf die Expression der Markergene *Δ67Ptch*, *Gli1* und *Igf2* ausübte.

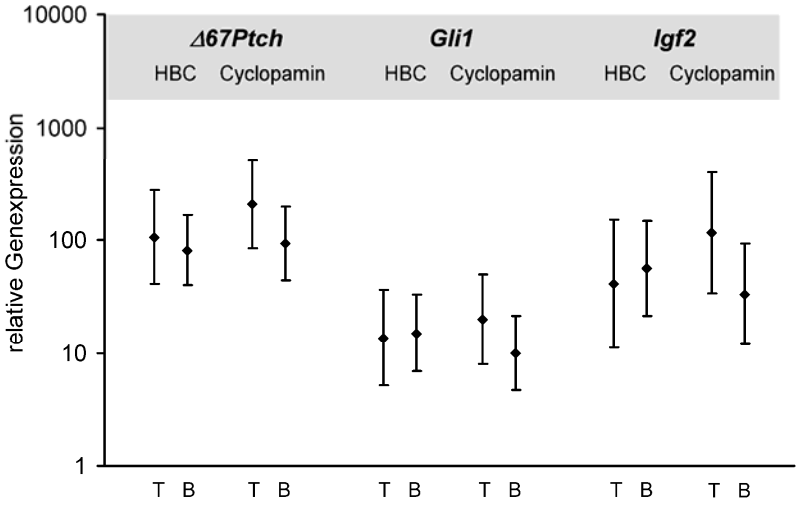


Abb. 21: Effekte der systemischen Cyclopaminapplikation auf den Hh-Signalweg in RMS aus *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen. Tumortragenden Tieren wurde zweimal täglich 10 mg/kg KG Cyclopamin verabreicht. Die Tumoren wurden nach vierwöchiger Behandlung oder nach einem anschließenden, therapiefreien Beobachtungszeitraum von 4 Wochen für qRT-PCR Analysen der Hh-Markergene *Δ67Ptch*, *Gli1* und *Igf2* entnommen. Abkürzungen: T unter Therapie, B Beobachtung.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die tägliche systemische Applikation von 20 mg/kg KG Cyclopamin über 4 Wochen keinen proliferationshemmenden Effekt auf RMS in *Ptch*-heterozygoten (B6xBalb)-Mäusen hatte. Eine Repression des Hh-Signalweges auf Transkriptionsebene war ebenfalls nicht zu beobachten.

4.1.3.2 Einfluss einer lokalen Applikation von Cyclopamin auf die Hh-Signalkaskade und das Wachstum von *Ptch*-assoziierten RMS

Chemotherapieresistenz von soliden Tumoren wird häufig durch fehlende Penetration der Medikamente in das Tumorgewebe bedingt [Tannock IF *et al.*, 2002]. Die Konzentration eines Medikamentes in solidem Tumorgewebe wird durch limitierte Resorption, ineffizienten Transport durch Blutgefäße zum Tumor und geringe Gängigkeit der Medikamente von den Blutgefäßen in das Tumorgewebe bestimmt. Eine Dosiseskalation bzw. Verlängerung des Behandlungszeitraumes im beschriebenen systemischen Behandlungsschema (Kap. 4.1.3.1) war aufgrund des Anschaffungspreises für Cyclopamin von 720 U$/10 mg nicht möglich. Um trotzdem eine zu geringe Dosierung von Cyclopamin als Ursache für die Chemoresistenz auszuschließen, wurde den Tieren zweimal täglich über 7 Tage 100 µg Cyclopamin direkt in den Tumor appliziert.

Neun tumortragende (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse wurden lokal mit Cyclopamin und fünf lokal mit Lösungsmittel behandelt. Von diesen Tieren wurden drei bzw. zwei direkt nach Behandlung getötet und die übrigen sechs bzw. drei Mäuse 4 Wochen beobachtet.

Nur bei den für 4 Wochen beobachteten Tieren wurden VCT-Untersuchungen zur Bestimmung der Tumorvolumina vorgenommen (Abb. 22).

Von den drei RMS aus der Lösungsmittelgruppe wuchs einer auf etwa die doppelte Größe und einer blieb bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes stabil. Für das dritte Tier war die VCT-Untersuchung 4 Wochen nach der Therapie nicht erfolgreich und es lagen nur das Ausgangsvolumen und das Volumen nach der siebentägigen Behandlung vor. In diesem Zeitraum schrumpfte das RMS um die Hälfte.

Von den sechs mit Cyclopamin behandelten RMS blieb einer in der Größe unverändert, zwei Tumoren wuchsen bis um das 1,5fache, die restlichen drei RMS um mehr als das Doppelte. Während der Beobachtungsphase musste ein Tier wegen eines MB präpariert werden. Von den fünf verbliebenen RMS konnten nach der Beobachtungszeit vier erfolgreich vermessen werden. Drei davon zeigten einen deutlichen Volumenzuwachs, und ein Tumor bildete sich im Vergleich zum Volumen direkt nach Therapieende leicht zurück. Die Verlaufskurven der Tumorvolumina (Abb. 22) zeigen, dass die RMS unter Cyclopaminbehandlung schneller wuchsen als unter Lösungsmittelapplikation. Dieses Phänomen traf vor allem auf Tumoren mit einem geringen Ausgangsvolumen zu. Die Fallzahlen waren für eine gesicherte statistische Aussage jedoch zu gering. In Kapitel 4.1.3.4 erfolgt eine statistische Gesamtbetrachtung aller Tumorvolumina aus der Cyclopaminstudie.

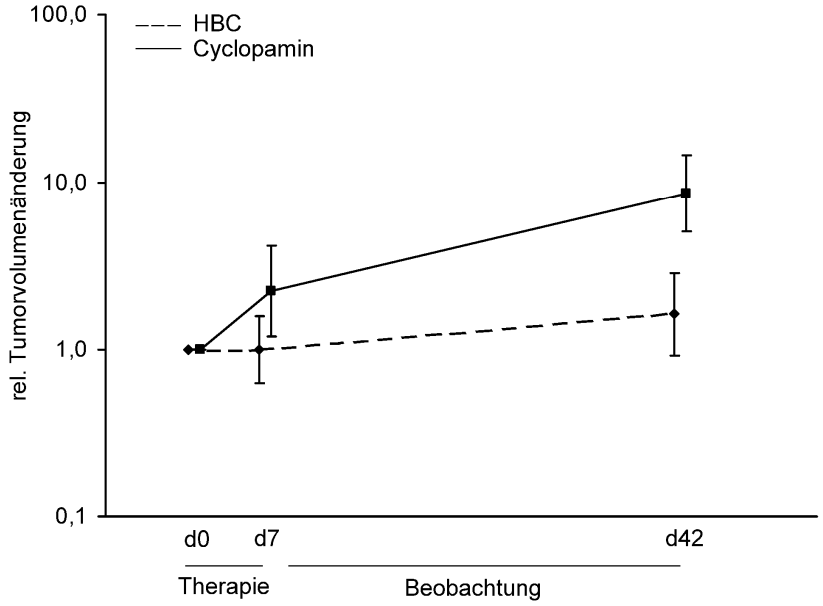


Abb. 22: Tumorprogression unter lokaler Cyclopaminapplikation in (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen. RMS-tragende Tiere wurde über 7 Tage zweimal täglich lokal mit 100 µg Cyclopamin behandelt und die Tumorprogression durch VCT ermittelt. Das Volumen wurde vor Therapiestart (d0), nach Therapieabschluss (d7) und 5 Wochen danach (d42) bestimmt. Abkürzung: d Tag.

Die Expressionsanalysen zeigten jedoch, dass alle Hh-Markergene unter lokaler Cyclopamingabe unabhängig vom Analysenzeitpunkt im Vergleich zu den Kontrollen reprimiert wurden (Abb. 23). Dieser Effekt war mit 76 % bzw. 88 % Expressionsverringerung für *Δ67Ptch* und *Igf2* signifikant (p=0,039 bzw. p=0,025). Auch für die Expression des Transkriptionsfaktors *Gli1* war eine inhibierende Wirkung von Cyclopamin deutlich zu erkennen, die mit 65 % aber nicht signifikant (p=0,139) war.

Bei getrennter Betrachtung der Zeitpunkte war der inhibierende Einfluss von Cyclopamin auf die Genexpression direkt nach Therapieabschluss im Vergleich zu der Kontrollgruppe deutlich sichtbar. Ein Signifikanzwert lässt sich aber aufgrund der geringen Fallzahl (drei RMS mit Cyclopamin, zwei RMS mit Lösungsmittel behandelt) und aufgrund der hohen interindividuellen Schwankungen nicht berechnen. Demgegenüber war die Reduzierung der Genexpression in den RMS signifikant, wenn die Expressionslevel zwischen mit Cyclopamin behandelten und mit Lösungsmittel behandelten Tumoren nach der injektionsfreien Beobachtungszeit verglichen wurde ($p_{\Delta 67Ptch}$=0,012; p_{Gli1}=0,036; p_{Igf2}=0,003; Abb. 23).

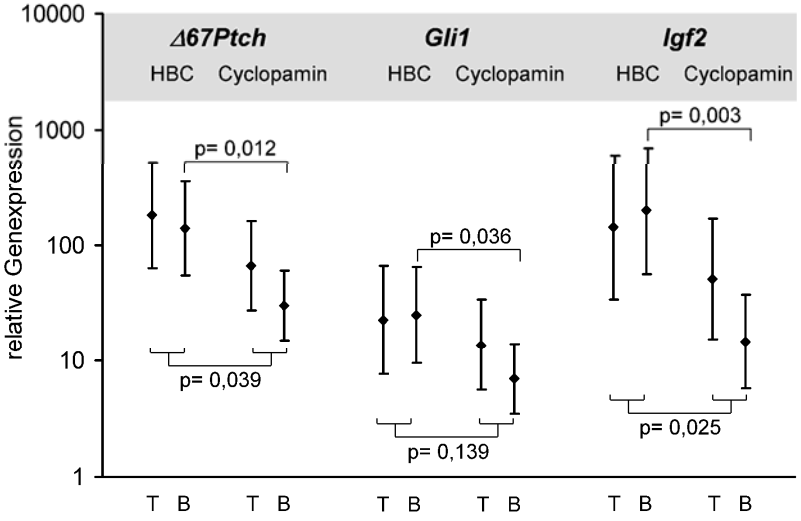


Abb. 23: Effekte der lokalen Cyclopaminapplikation auf den Hh-Signalweg in RMS von *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen. Tumortragenden Tieren wurde zweimal täglich 100 µg Cyclopamin verabreicht und die Tumoren nach siebentägiger Behandlung oder nach einem injektionsfreien Beobachtungsszeitraum von weiteren 5 Wochen für qRT-PCR Analysen der Hh-Markergene *Δ67Ptch*, *Gli1* und *Igf2* entnommen. Die Normalisierung erfolgte auf die *18S rRNA* Expression. Angegeben ist die Genexpression im RMS normalisiert auf den korrespondierenden Skelettmuskel. Abkürzungen: T unter Therapie, B Beobachtung.

Festzuhalten bleibt, dass die lokale Applikation von Cyclopamin in RMS von *Ptch*-heterozygoten (B6xBalb)-Mäusen zu einer ausgeprägten Repression des Hh-Signalweges führte, die über den gesamten Beobachtungszeitraum nachweisbar war. Dies zeigt, dass die fehlende Inhibierung des Tumorwachstums durch Cyclopamin nicht auf eine unzureichende Anflutung des Medikamentes in das Tumorgewebe zurückgeführt werden kann.

4.1.3.3 Untersuchung der Abhängigkeit der Therapieantwort auf Cyclopamin vom genetischen Hintergrund

Die lokale Applikation von Cyclopamin in RMS in (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen führt zu einer partiellen Inhibierung des Hh-Signalweges, ohne dabei Einfluss auf die Tumorprogression zu nehmen. Um auszuschließen, dass die Chemoresistenz durch den genetischen Hintergrund der Mauslinie bedingt wurde, wurden zusätzlich drei CD1-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse lokal mit Cyclopamin und zwei lokal mit Lösungsmittel behandelt. Bei allen Tieren wurde das Tumorvolumen vor und nach der Therapie ermittelt.

Die Tumorvolumina blieben in der mit HBC behandelten Gruppe über die 7 Tage relativ

konstant (Abb. 24). Einer der mit Cyclopamin behandelten Tumoren zeigte ein stabiles Volumen, ein Tumor wuchs um etwa das 1,5fache und ein RMS nahm um etwa das 3,5fache zu. In Kapitel 4.1.3.4 erfolgt eine statistische Gesamtbetrachtung aller Tumorvolumina aus der Cyclopaminstudie unter Einbeziehung dieser Daten.

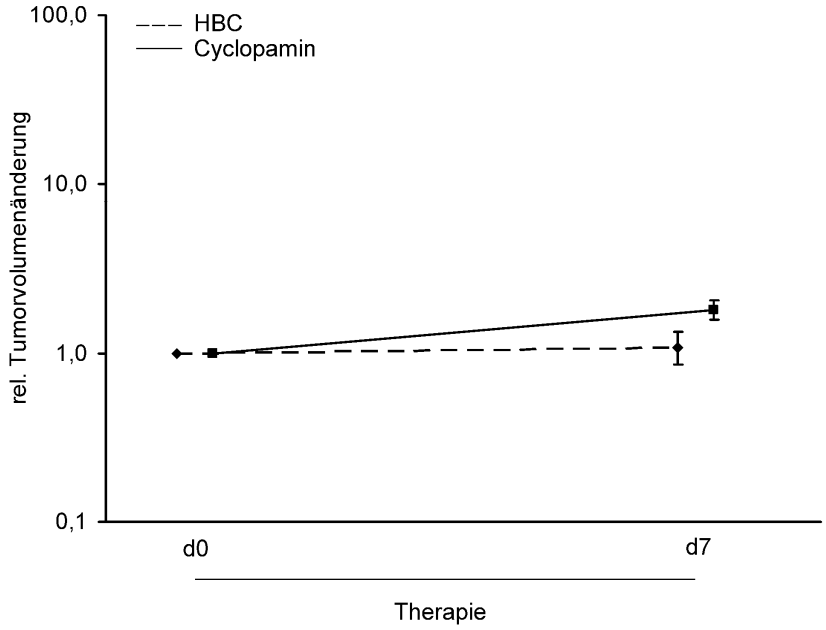


Abb. 24: Tumorprogression unter lokaler Cyclopaminapplikation in CD1-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen. RMS-tragende Tiere wurde über 7 Tage zweimal täglich lokal mit 100 µg Cyclopamin behandelt und die Tumorprogression durch VCT ermittelt. Das Volumen wurde vor Therapiestart und nach Therapieabschluss bestimmt. Abkürzung: d Tag.

Da nach der siebentägigen Therapie mit Cyclopamin anhand der Volumenentwicklung der Tumoren abzusehen war, dass Cyclopamin auch in diesem Modell keine Wachtumsinhibierung von *Ptch*-assoziierten RMS vermittelt, wurden die Tiere nach der letzten Injektion getötet und die Gewebe für Expressionsanalysen verwendet.

Die quantitative Bestimmung der Genexpression (Abb. 25) zeigte keine verringerte Expression der Hh-Markergene unter Cyclopamintherapie im Vergleich zu mit HBC behandelten RMS und steht damit im Kontrast zu den Expressionsdaten der (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse. Für eine abschließende Aussage über den Einfluss des genetischen Hintergrundes auf den Therapieerfolg sind die hier verwendeten Tierzahlen zu gering.

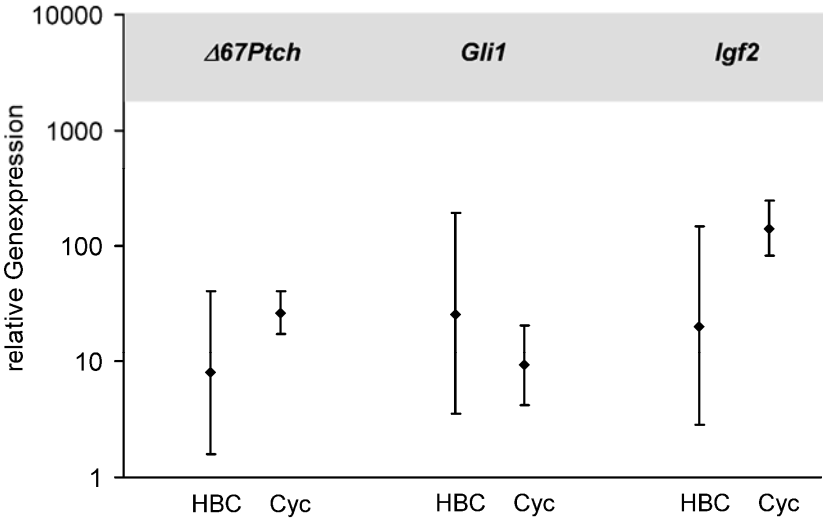


Abb. 25: Expressionsanalyse der Hh-Markergene in RMS von CD1-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen nach lokaler Cyclopaminapplikation. Tumortragenden Tieren wurde zweimal täglich 100 µg Cyclopamin verabreicht und die Tumoren nach siebentägiger Behandlung für qRT-PCR Analysen der Hh-Markergene *Δ*67*Ptch*, *Gli1* und *Igf2* entnommen. Die Normalisierung erfolgte auf die *18S rRNA* Expression. Angegeben ist die Genexpression in RMS normalisiert auf den korrespondierenden Skelettmuskel. Abkürzungen: Cyc Cyclopamin, HBC Lösungsmittel.

4.1.3.4 Statistische Gesamtbetrachtung des Einflusses von Cyclopamin auf die Progression von *Ptch*-assoziierten RMS

Um trotz der geringen Tierzahlen in den einzelnen Therapieansätzen eine statistische Auswertung der Effekte von Cyclopamin auf die Tumorprogression vornehmen zu können, wurde der Einfluss des Injektionsmodus (systemisch oder lokal) auf das Tumorvolumen in einem linearen Modell geschätzt und die Signifikanzwerte nach dem Verfahren von Dunett für Multiples Testen adjustiert.

Die Auswertung verdeutlicht zum einen, dass mit Cyclopamin behandelte Tumoren unabhängig vom Applikationsmodus signifikant stärker wuchsen als die Tumoren der mit Lösungsmittel behandelten Gruppe (p=0,0097).

Zum anderen besaß das Tumorvolumen zu Beginn der Therapie entscheidenden Einfluss. Besonders bei kleinen Tumoren war ein erhöhtes Wachstum durch die Gabe von Cyclopamin zu beobachten, das signifikant größer war als bei den unbehandelten (p=0,0025). So kann für kleine Tumoren (~7,4 mm³) unter Cyclopamintherapie eine Vergrößerung zum 3,4fachen (95%-CI: 1,4-8,3) erwartet werden. Dagegen bewirkte die Applikation des Lösungsmittels bei kleinen Tumoren eine Verkleinerung auf das 0,4fache (95%-CI: 0,2-1,1). Bei großen Tumoren

(~528 mm³) wurde unter beiden Behandlungen eine nicht signifikante Tumorvergrößerung um den Faktor 1,6 beobachtet.

4.1.3.5 Einfluss von Cyclopamin auf Proliferation, Differenzierungs- und Apoptosestatus von RMS in *Ptch*-heterozygoten Mäusen

Um zu überprüfen, ob die partielle Inhibierung der Hh-Signalkaskade nach lokaler Applikation von Cyclopamin den Differenzierungsstatus von RMS in (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen verändert, wurden qRT-PCR Analysen und immunhistochemische Färbungen an RMS und Skelettmuskeln von den direkt nach Therapieabschluss getöteten Tieren durchgeführt.

Die Spezifizierung, Proliferation und terminale Differenzierung von Skelettmuskelzellen wird durch die kombinatorische und aufeinanderfolgende Aktivität von verschiedenen Transkriptionsfaktoren reguliert. RMS *Ptch*-heterozygoter Mäuse weisen einen undifferenzierten Phänotyp auf, der sich in der stark erhöhten Expression der Myoblastenmarker *MyoD* und *Myogenin* gegenüber dem Muskel bestätigte (Abb. 26). Dagegen war die Transkription von Mediatoren der mittleren und der terminalen Phase der Muskeldifferenzierung wie *Tropomyosin*, *MHC1* (*myosin heavy chain 1*), *Myf6* (*myogenic factor 6*) und *Mef2c* (*myocyte enhancer factor 2c*) in

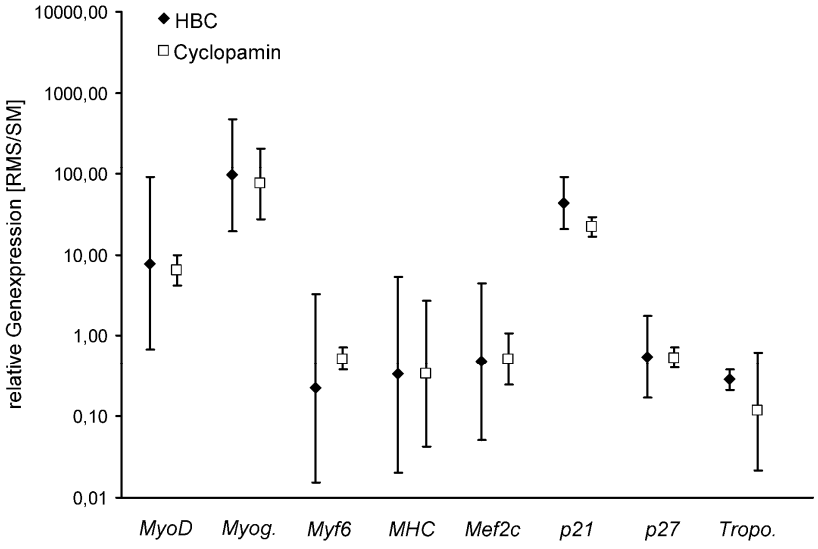


Abb. 26: qRT-PCR Analyse der Expression von Muskeldifferenzierungsmarkern in lokal mit Cyclopamin behandelten Tumoren von (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen. Die Gewebe wurden bis 2 h nach der letzten Cyclopaminapplikation isoliert. Die Normalisierung erfolgte auf die *18S rRNA* Expression. Angegeben ist die Genexpression im RMS normalisiert auf den korrespondierenden Skelettmuskel, d.h. relative Genexpressionen <1: das entsprechende Gen wird im Muskel stärker als im RMS exprimiert und relative Genexpression >1: *vice versa*. Abkürzungen: Myog. Myogenin, Tropo. Tropomyosin.

RMS im Vergleich zum Muskel reprimiert (Abb. 26). Den cyclinabhängigen Kinase-Inhibitoren (CDK-I) *p21* und *p27* wird eine Rolle in der Inhibierung der Zellzyklusprogression und der terminalen Differenzierung von Myoblasten zugeschrieben [Cabane C *et al.*, 2003]. Daher wurde eine schwächere Expression dieser Faktoren im RMS im Vergleich zum Skelettmuskel erwartet. Tatsächlich zeigten die qRT-PCR Analysen eine schwächere Expression von *p27* im RMS, *p21* wurde jedoch stark überexprimiert.

Abbildung 26 zeigt außerdem, dass die lokale Applikation von Cyclopamin die Expression der verwendeten Differenzierungsmarker im RMS nicht signifikant beeinflusste. Anzumerken ist, dass sich die Expression der Muskeldifferenzierungsmarker in den untersuchten RMS zwischen (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$- und CD1-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen nicht unterschied (Daten nicht gezeigt). Die Cyclopaminbehandlung blieb also auch bei CD1-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen ohne Einfluss auf den Differenzierungsstatus der RMS.

Mit immunhistochemischen Färbungen für Ki67, aktive Caspase 3 und Bcl-2 (*B-cell leukemia/lymphoma-2*) wurde der Proliferations- und Apoptosestatus der behandelten RMS näher charakterisiert (Abb. 27). Der Anteil proliferierender Zellen (Ki67-positiv) variierte von Tumor zu Tumor unabhängig vom Behandlungssmodus (Abb. 27 B). Die proliferierenden Zellen waren nicht gleichmäßig über das Tumorgewebe verteilt, sondern traten fokal auf. Alle RMS wiesen eine gleichmäßige cytoplasmatische Expression des antiapoptotisch wirksamen Bcl-2 vor allem in den Myotuben auf (Abb. 27 C). Unabhängig von der Behandlung konnte in keinem der RMS der (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$-Linie aktive Caspase 3 als Zeichen für Apoptose nachgewiesen werden. In zwei von drei mit Cyclopamin behandelten RMS aus der CD1-*Ptch*$^{neo67/+}$-Kohorte wurden im Randbereich der Tumoren vereinzelte Zellen mit aktiver Caspase 3 detektiert (Abb. 27 D).

Es lässt sich somit festhalten, dass RMS *Ptch*-heterozygoter Mäuse ein mäßig proliferatives Verhalten aufwiesen und ein hoher Zellumsatz durch Apoptose ausgeschlossen werden konnte. Die lokale Behandlung von *Ptch*-assoziierten RMS mit Cyclopamin bewirkte keine Induktion von Apoptose, weder über eine Suppression von Bcl-2, noch über eine Aktivierung der Caspase 3.

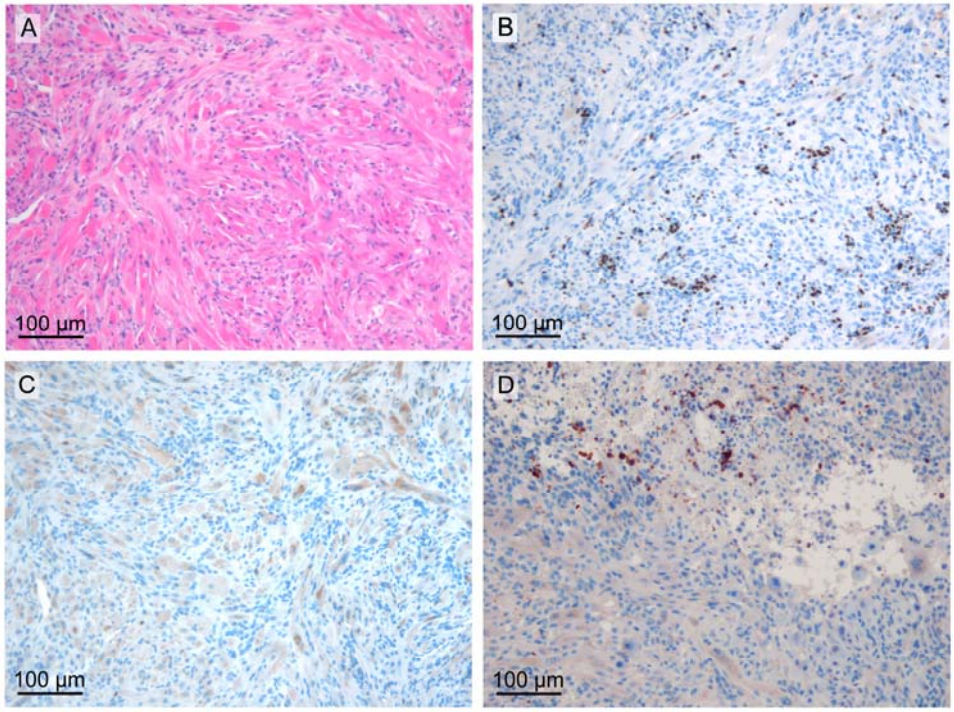


Abb. 27: Repräsentative Übersichts- und immunhistochemische Färbungen von RMS der lokal behandelten *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse. Positive Reaktionen der Immunhistochemie sind durch die Verwendung von DAB als Chromogen braun. A) HE-Färbung. B) Ki-67-Färbung. C) Bcl-2-Färbung. D) Aktive Caspase 3-Färbung.

4.2 Einsatz von Doxorubicin zur Therapie von *Ptch*-assoziierten RMS

Das Anthrazyklin Doxorubicin wird zur Therapie humaner RMS eingesetzt [Sandler E *et al.*, 2001; Meyer WH, Spunt SL, 2004]. Seine Wirkungsweise ist noch nicht vollständig verstanden, beruht aber zumindest teilweise auf der Hemmung der Topoisomerase II und der Störung der DNA-Replikation. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Hahn zeigen, dass eine an den Tagen 0, 7, 14 und 28 i. p. applizierte Dosis von 3 mg/kg KG Doxorubicin von (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen sehr gut und ohne Entwicklung einer Herzinsuffizienz vertragen wird [Wojnowski L *et al.*, 2005]. Aus diesem Grund wurde dieses Dosierungsschema auch zur Behandlung von RMS der *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse angewendet. Das Tumorvolumen wurde vor Therapiebeginn, am Ende der Therapie und 3 Wochen nach Therapieabschluss mittels VCT bestimmt (Abb. 28).

Zwei der fünf mit Doxorubicin behandelten Tumoren zeigten unter Therapie einen leichten Anstieg des Tumorvolumens, ein Tumor blieb in seinem Wachstum stabil und zwei Tumoren wurden kleiner. Nach der Beobachtungsphase wurde bei keinem der RMS ein Wachstum um mehr als das 1,5fache gegenüber dem Ausgangsvolumen festgestellt. Im Gegensatz dazu wurde

eine Volumenzunahme um mehr als das 1,5fache bei drei von acht Tumoren in der Kontrollgruppe direkt nach Therapieabschluss beobachtet. Nach dem Beobachtungszeitraum waren vier Tumoren der Kontrollgruppe um das 1,5fache gewachsen, einer blieb stabil und zwei schrumpften leicht im Vergleich zu ihrer Ausgangsgröße. Angaben über die Signifikanz dieser Beobachtungen sind aufgrund der geringen Tierzahlen nicht möglich.

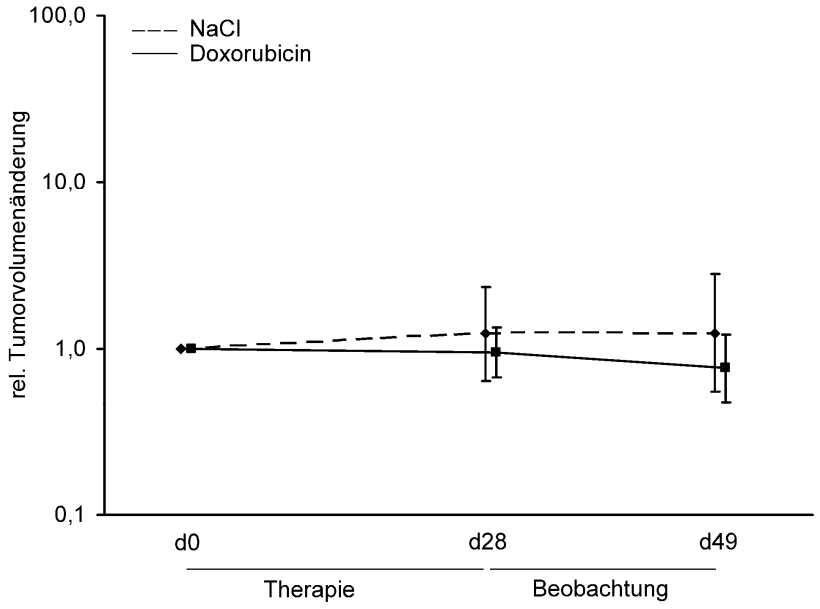


Abb. 28: Tumorprogression unter Doxorubicintherapie. Tieren mit voll ausgebildeten RMS wurden 4x 3 mg/kg KG Doxorubicin oder als Kontrollsubstanz physiologische Kochsalzlösung (NaCl) an den Tagen 0, 7, 14 und 28 verabreicht. Das Tumorvolumen wurde mittels VCT vor Therapiestart (d0), am Ende der Therapie (d28) und 3 Wochen später (d49) bestimmt. Abkürzung: d Tag.

Von jeweils drei Tumoren jeder Kohorte wurden nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes qRT-PCR Analysen für die Hh-Markergene *wtPtch*, *Δ67Ptch*, *Gli1* und *Igf2* durchgeführt. Wie erwartet, wurde die Aktivität der Hh-Signalkaskade in den Tumoren nicht von Doxorubicin beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse zeigen, dass Doxorubicin die Proliferation von RMS in *Ptch*-heterozygoten Mäusen effektiv inhibieren konnte, und stehen im Einklang mit der antitumoralen Wirkung des Anthrazyklins beim Menschen.

4.3 Epigenetische Therapie von *Ptch*-assoziierten Tumoren mit 5-Aza und VPA

4.3.1 Untersuchung der Effekte von 5-Aza und VPA auf RMS-Zelllinien und RMS-Primärkulturen

Zur epigenetischen Therapie von *Ptch*-assoziierten Tumoren wurden der DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza und der HDAC-I VPA ausgewählt. Der Einfluss der Substanzen auf die Proliferation von *Ptch*-assoziierten Tumorzellen wurde zunächst *in vitro* untersucht. Die RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 wurden mit 5 µM 5-Aza, 2 mM VPA oder der Kombination der beiden Substanzen (5-Aza/VPA) in Vollmedium (10 % FCS) oder in serumreduziertem Medium (0,5 % FCS) für 48 h behandelt und der Effekt auf die Proliferationsrate mittels BrdU-Einbau bestimmt. Unabhängig von der Serumkonzentration im Medium senkte 5 µM 5-Aza die Proliferation von TP5014- und TP1588-Zellen im Mittel um 30 bzw. 20 % (Abb. 29). Dagegen hatten 2 mM VPA keine proliferationshemmende Wirkung auf die verwendeten Zelllinien. Beim kombinierten Einsatz der beiden Substanzen wurde keine Verstärkung des Effektes von 5-Aza erzielt.

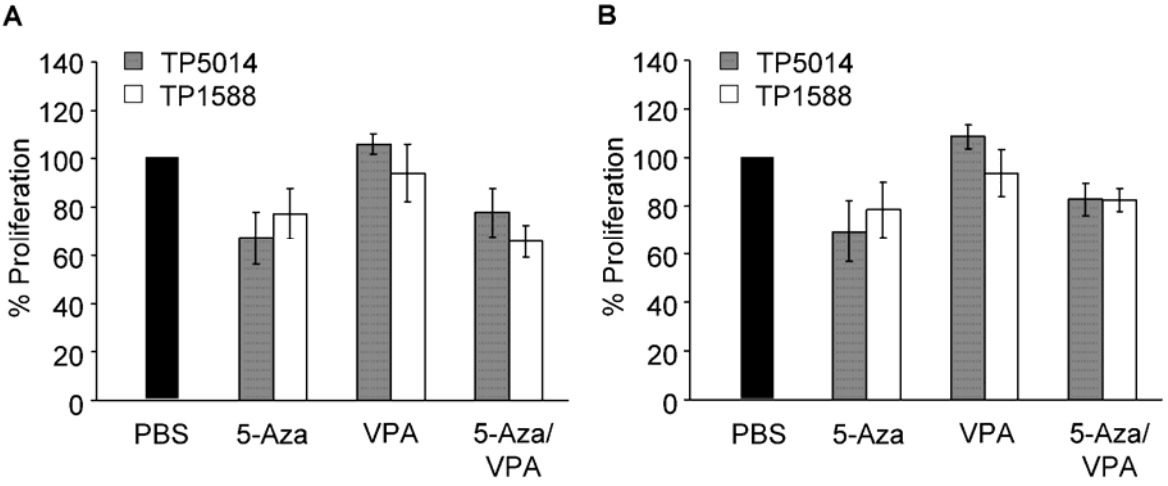


Abb. 29: Behandlung der RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 mit 5-Aza und/oder VPA *in vitro*. Die RMS-Zelllinien wurden mit 5 µM 5-Aza und/oder 2 mM VPA für 48 h behandelt Für die letzten 24 h der Inkubationszeit wurde 100 µM BrdU zugesetzt. A) Behandlung in Vollmedium mit 10 % FCS. B) Behandlung in serumreduziertem Medium (0,5 % FCS).

Die Spezifität der 5-Aza-Behandlung wurde mittels Southern Blot Analyse des globalen DNA-Methylierungsstatus überprüft. Hierzu wurden die Zellen 72 h mit 5 µM 5-Aza inkubiert, die genomische DNA isoliert und in Parallelansätzen mit dem methylierungssensitiven

Restriktionsenzym HpaII und dem methylierungsinsensitiven Restriktionsenzym MspI hydrolysiert. Zur Hybridisierung des Blots wurde die *pMR150*-Sonde verwendet, die an Satelliten-DNA in der Zentromerregion bindet. Diese Sequenzen sind im adulten Gewebe stark methyliert. Im methylierten Zustand können sie durch MspI gespalten werden, vor einer Restriktionsspaltung mit HpaII sind sie jedoch geschützt. Unter 5-Aza-Behandlung werden diese repetitiven Elemente demethyliert. Durch die *pMR150*-Sonde konnte nach HpaII-Verdau der mit 5-Aza behandelten DNA eine für den Verdau mit MspI charakteristische DNA-Leiter detektiert werden (Abb. 30). Demnach wurde durch 5-Aza eine ausgeprägte Demethylierung der genomischen DNA der RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 vermittelt.

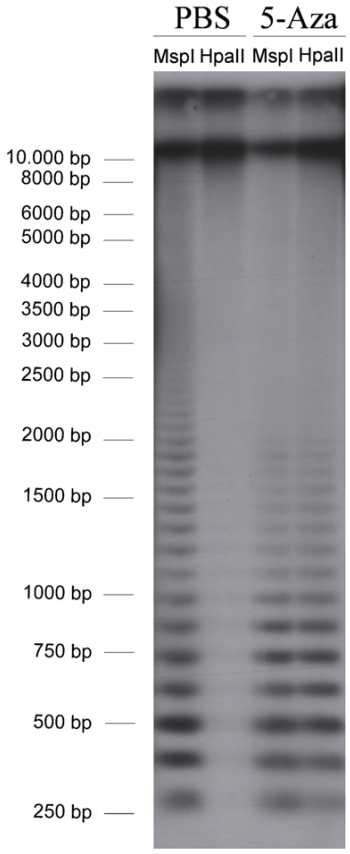


Abb. 30: DNA-Methylierungsstatus von TP5014-Zellen nach Behandlung mit 5-Aza. TP5014 wurden für 72 h mit 5 µM 5-Aza inkubiert und der Methylierungsstatus von repetitiven Zentromerregionen mittels Southern Blot untersucht. Als Sonde wurde *pMR150* verwendet.

An RMS-Primärkulturen wurde im Hinblick auf die vorhandene Literatur [Zhu WG *et al.*, 2001; Ghoshal K *et al.*, 2002; Shaker S *et al.*, 2003], in der ein synergistischer Effekt von HDAC-I und DNA-Methyltransferase-Inhibitoren nachgewiesen ist, ausschließlich die Kombination von 5-Aza und VPA untersucht. Die Behandlung der Zellen mit 5-Aza und VPA für 72 h führte zu einer drastischen Inhibierung der Proliferation um etwa 70 % (Abb. 31) und fiel damit stärker als in den RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 aus.

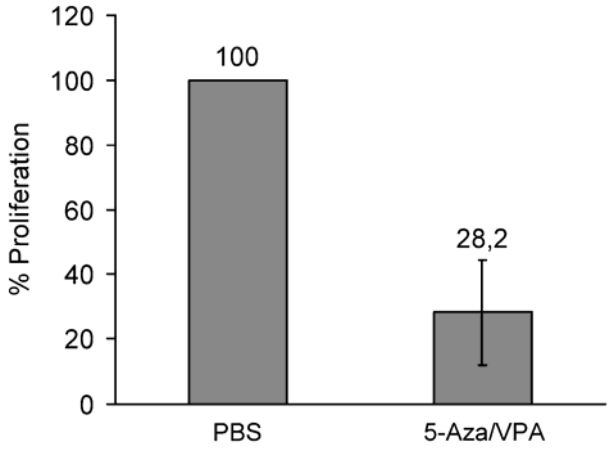


Abb. 31: Bestimmung der Proliferationsrate von RMS-Primärkulturen nach Behandlung mit 5-Aza/VPA. RMS-Primärkulturen wurden für 72 h mit 5 µM 5-Aza und 2 mM VPA behandelt und anschließend die Proliferationsrate mittels BrdU-Einbau bestimmt. Für die letzten 24 h der Inkubationszeit wurde 100 µM BrdU zugesetzt.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass in den verwendeten RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 der antiproliferative Effekt der Kombination von 5-Aza und VPA im Wesentlichen auf 5-Aza zurückzuführen war und dass 5-Aza eine ausgeprägte Demethylierung der genomischen DNA vermittelte. Die RMS-Primärkulturen sprachen mit einer stärkeren Proliferationshemmung auf eine Behandlung mit den gleichen Konzentrationen von 5-Aza und VPA als die RMS-Zelllinien an.

4.3.2 Tumorprophylaxe mit 5-Aza und VPA in *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen (prophylaktische Studie)

Um das chemopräventive Potential von 5-Aza und VPA in *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen hinsichtlich der Tumorigenese von RMS und MB zu untersuchen, wurden symptomfreie Tiere im Alter von etwa 28 Tagen täglich für 12 Wochen mit den Medikamenten behandelt. Dazu wurden die Substanzen in PBS gelöst und die entsprechenden Dosen in einem Volumen von 50 µl einzeln i. p. appliziert. Da die Tumorinzidenz in *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen vom genetischen Hintergrund abhängig ist, wurden Tiere der Linie (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$ auf das Auftreten von RMS und Tiere der Linie B6-*Ptch*$^{neo67/+}$ auf das Auftreten von MB hin beobachtet.

4.3.2.1 Applikation von 5-Aza/VPA in (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse zur Prävention von RMS

(B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse wurden in vier Kohorten eingeteilt und mit der MTD (Kap. 5.3.2.3) von 5-Aza (0,1 mg/kg/d), der MTD von VPA (400 mg/kg/d) oder der Kombination 5-Aza/VPA bzw. PBS behandelt. Die Tiere wurden während der Therapie manuell auf

das Auftreten von RMS untersucht und zum Abschluss des Spritzzeitraumes im VCT gescannt (Tab. 26).

Tab. 26: Prophylaxe von RMS in *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen. Die Tiere wurden ab einem Alter von 28 Tagen für 3 Monate mit 5-Aza, VPA oder deren Kombination behandelt. In der Spalte „vorzeitig ausgeschiedene Tiere" sind Tiere aufgelistet, die aufgrund eines schlechten Allgemeinzustandes vorzeitig präpariert wurden bzw. die vorzeitig verstarben und bei denen kein RMS festgestellt wurde.

Behandlung	Tieranzahl	Tiere mit tastbarem RMS		Tiere ohne tastbares RMS		vorzeitig ausgeschiedene Tiere	
		n	%	n	%	N	%
PBS	24	11	46	10	42	3	12
5-Aza	21	8	38	13	62	-	-
VPA	14	4	29	10	71	-	-
5-Aza/VPA	47	3	6	35	72	9	19

46 % der Tiere aus der Kontrollgruppe entwickelten unter Therapie ein manuell erfassbares RMS, während in der 5-Aza/VPA-Kohorte nur 6 % der Tiere ein tastbares RMS ausbildeten. Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen war statistisch hoch signifikant (Log-Rank-Test: p=0,0004). Auch bei den Einzeltherapien mit 5-Aza oder VPA war ein positiver Trend zu beobachten, die Verlängerung der tumorfreien Überlebenszeit war aber nicht signifikant (Abb. 32).

Neun der 47 mit 5-Aza/VPA behandelten Tiere sind gegenüber drei von 24 der mit PBS behandelten Tiere aus unbekannter Ursache verstorben. Obwohl die verstorbenen Tiere eindeutig kein tastbares RMS entwickelt hatten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere, makroskopisch unauffällige Tumoren für den Tod der Tiere verantwortlich waren. Dies wurde zum Anlass genommen, die Kaplan-Meier-Analyse mit einer veränderten Endpunktdefinition durchzuführen. Entsprechend einem klinischen Modell wurden alle tastbaren RMS und Todesfälle jeglicher Art als Ereignis gewertet. Auch in dieser Analyse war der Unterschied zwischen der mit 5-Aza/VPA und der mit PBS behandelten Gruppe signifikant (Log-Rank-Test: p=0,019).

Die VCT-Analyse der Tiere zum Abschluss des Spritzzeitraums ergab vier weitere nicht tastbare, histologisch bestätigte Tumoren in der 5-Aza-Kohorte, fünf in der VPA- und zwei in der 5-Aza/VPA-Gruppe, während in der Kontrollgruppe kein weiteres RMS detektiert werden konnte.

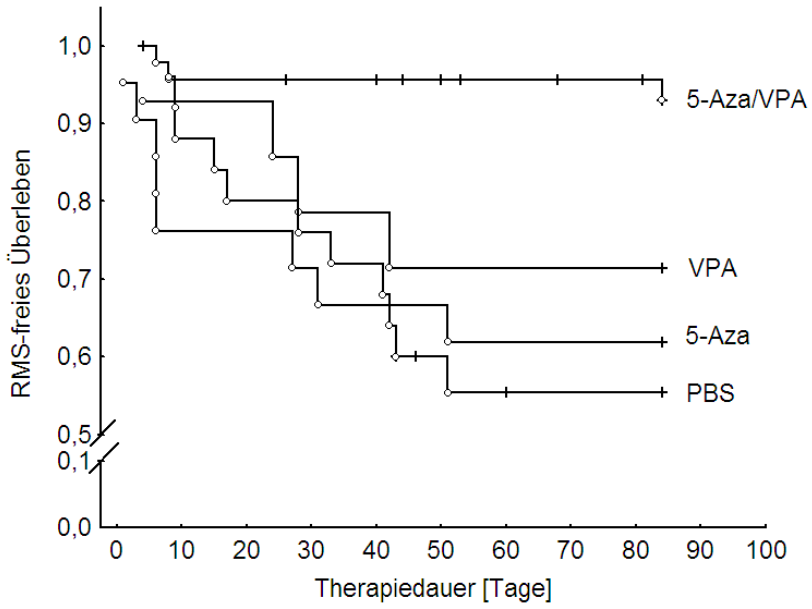


Abb. 32: Kaplan-Meier-Analyse der RMS-freien Überlebenszeit von *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen unter Applikation von 5-Aza, VPA oder der Kombination. Ab einem Alter von 28 Tagen wurden die Mäuse mit 5-Aza und/oder VPA für 3 Monate behandelt und regelmäßig auf das Entstehen von RMS durch Abtasten untersucht. Dargestellt sind alle unter Therapie entstandenen, tastbaren RMS.

Zur Untersuchung von Langzeiteffekten der epigenetischen Therapie wurden 15 Tiere der mit PBS behandelten Gruppe und 17 der mit 5-Aza/VPA behandelten Gruppe weitere 12 Wochen nach Therapieabschluss beobachtet. In dieser Zeit entwickelten sich bei 7 % der PBS- und bei 12 % der 5-Aza/VPA-Kohorte neue tastbare RMS. Zusätzlich wurden in 13 % der mit PBS und in 12 % der mit 5-Aza/VPA behandelten Tiere nicht tastbare, histologisch bestätigte Tumoren mit Hilfe der VCT-Untersuchung am Ende des Beobachtungszeitraumes festgestellt (Tab. 27).

Tab. 27: RMS-Entstehung während der Beobachtungszeit in prophylaktisch mit 5-Aza/VPA behandelten *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen. Die Tiere wurden ab einem Alter von 28 Tagen für 3 Monate behandelt und für 12 Wochen beobachtet. Es wurde zwischen manuell detektierten und im VCT festgestellten („nicht tastbaren“) RMS unterschieden. „Vorzeitig ausgeschiedene Tiere“ sind Tiere, die aufgrund eines schlechten Allgemeinzustandes vorzeitig präpariert wurden bzw. die vorzeitig verstarben und bei denen kein RMS festgestellt wurde.

Behandlung	Tieranzahl	Tiere mit tastbarem RMS		Tiere mit nicht tastbarem RMS		Tiere ohne RMS		vorzeitig ausgeschiedene Tiere	
		n	%	n	%	n	%	n	%
PBS	15	1	7	2	13	2	13	0	0
5-Aza/VPA	17	2	12	2	12	7	41	1	6

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass die Inzidenz für tastbare und damit klinisch auffällige RMS unter Kombinationstherapie mit 5-Aza/VPA gegenüber der Kontrollgruppe und gegenüber den Monotherapien signifikant verringert war. Die wenigen Tumoren, die unter Therapie mit 5-Aza/VPA auftraten, waren sehr klein und zum Großteil nur mit VCT detektierbar. Die Anzahl der RMS, die ein Tier innerhalb des Beobachtungszeitraums entwickelte, war unabhängig von der Medikation.

4.3.2.2 Applikation von 5-Aza/VPA in B6-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse zur Prävention von MB

Da sich bei der Chemoprävention von RMS in (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen die Kombinationstherapie mit 5-Aza/VPA effektiver als der Einsatz der Einzelsubstanzen erwiesen hatte (Kap. 4.3.2.1), wurden die Medikamente zur Untersuchung ihrer prophylaktischen Wirkung gegenüber MB in B6-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen nur noch in Kombination eingesetzt. Da B6-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse eine geringere Verträglichkeit für die Medikamente aufweisen, wurde die ½ cMTD von 5-Aza (0,05 mg/kg/d) und VPA (200 mg/kg/d) verabreicht. Die Tiere (n=34) wurden täglich für 3 Monate i. p. behandelt und täglich auf das Auftreten eines MB untersucht. Bis zum Ende des Spritzzeitraumes wurden zehn der mit 5-Aza/VPA behandelten Tiere

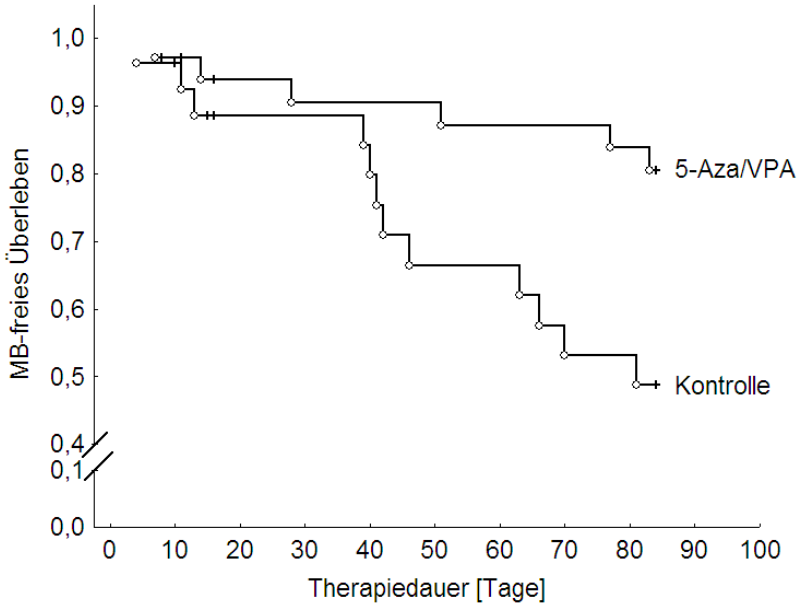


Abb. 33: Kaplan-Meier-Analyse der MB-freien Überlebenszeit von *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen unter Applikation von 5-Aza und/oder VPA. Ab einem Alter von 28 Tagen wurden die Mäuse für 3 Monate behandelt und täglich auf das Auftreten von MB-Symptomen untersucht. Dargestellt sind alle unter Therapie entstandenen symptomatischen MB. Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse.

wegen eines schlechten Allgemeinzustandes präpariert. Bei sechs von diesen Tieren wurde histologisch ein MB bestätigt. Von den am Ende des Behandlungszeitraumes verbliebenen 24 Mäusen wurde das Kleinhirn für die histologische Abklärung asserviert. Als Kontrollgruppe dienten 27 unbehandelte B6-*Ptch*$^{neo67/}$-Mäuse, von denen bis zum 115. Lebenstag zwölf ein symptomatisches MB aufwiesen. Die Kaplan-Meier-Kurve für das Auftreten eines symptomatischen MB während des Spritzzeitraumes (Abb. 33) verdeutlicht, dass die Behandlung mit 5-Aza/VPA das tumorfreie Überleben signifikant verlängerte (Log-Rank-Test: p=0,017).

4.3.3 Therapeutische Behandlung von *Ptch*-assoziierten RMS in *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen mit 5-Aza/VPA (Therapiestudie)

Um das therapeutische Potential der Kombinationstherapie mit 5-Aza und VPA für *Ptch*-assoziierte RMS zu untersuchen, wurden Tiere mit voll ausgebildeten Tumoren täglich über 30 Tage mit der cMTD behandelt. Das Tumorvolumen wurde mittels VCT vor dem Therapiestart (d=0), nach Therapieabschluss (d30) sowie 30 und 60 Tage nach der Therapie (d60, d90) bestimmt (Abb. 34). Wies ein Tier mehr als einen Tumor auf, wurde für jeden Tumor separat das Wachstum bestimmt. Innerhalb des Behandlungszeitraumes entwickelte keines der behandelten Tiere neue Tumoren. Dies war unabhängig davon, ob dem Tier 5-Aza/VPA oder PBS appliziert worden war. Die Wachstumskurven (Abb. 34) zeigen, dass 24 % der mit 5-Aza/

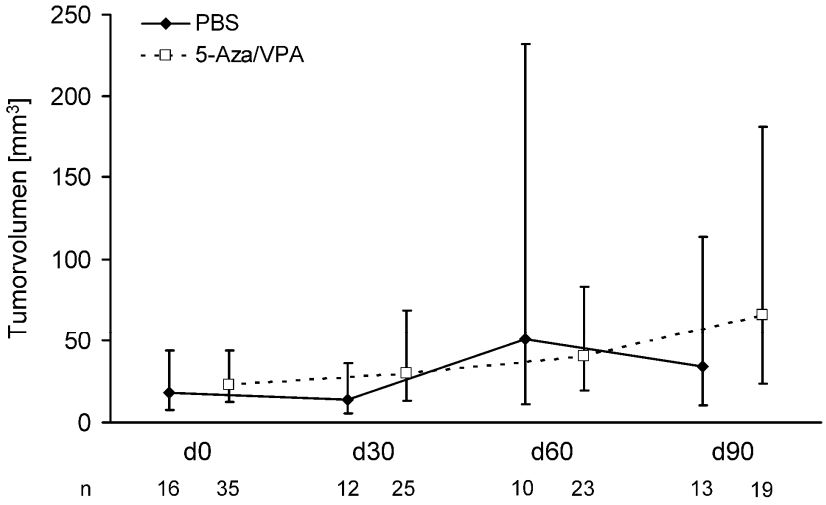


Abb. 34: Volumenentwicklung von RMS unter 5-Aza/VPA Therapie. RMS-tragenden Tieren wurde 5-Aza/VPA über 30 Tage täglich i. p. appliziert. Das Tumorvolumen wurde vor Therapiebeginn (d0), direkt nach Therapie (d30) sowie 1 und 2 Monate (d60, d90) später mittels VCT ermittelt. Abkürzungen: d Tag, n Anzahl der vermessenen Tumoren.

VPA und 35 % der mit PBS behandelten Tumoren deutlich an Größe zunahmen. Zu keinem Zeitpunkt der Analyse bestand ein signifikanter Unterschied in der Wachstumsrate der Tumoren zwischen den beiden Gruppen (p_{d30}=0,603; p_{d60}=0,832 und p_{d90}=0,537). Dementsprechend konnte auch im Verlauf über die Zeit kein signifikant unterschiedliches Wachstumsverhalten der RMS hinsichtlich der Behandlung beobachtet werden (p=0,1967).

Diese Daten zeigen, dass die Behandlung mit 5-Aza/VPA keinen wachstumshemmenden Effekt auf bereits existierende RMS von *Ptch*-heterozygoten Mäusen besaß.

4.3.4 Untersuchungen des Einflusses der 5-Aza- und VPA-Behandlung auf den DNA-Methylierungsstaus und die Histonacetylierung in RMS von *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen

Epigenetische Therapien wirken nicht spezifisch auf ein Gen, sondern führen zu globalen Veränderungen des epigenetischen Codes, zu denen die Demethylierung von CpG-Inseln in repetitiven Elementen und die Acetylierung des Histons H4 zählen. Diese allgemeinen Veränderungen können als Biomarker für eine erfolgreiche epigenetische Therapie herangezogen werden.

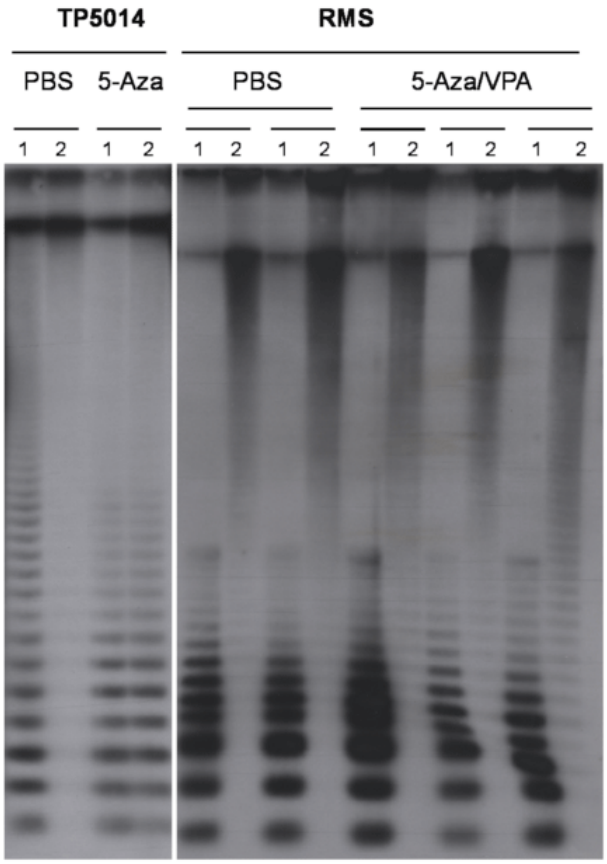


Abb. 35: Southern Blot Analyse des DNA-Methylierungsstatus in mit 5-Aza/VPA behandelten RMS. Gezeigt sind drei von fünf untersuchten RMS und zum Vergleich zwei mit PBS behandelte RMS und mit 5-Aza behandelte TP5014-Zellen. Die Gewebe wurden innerhalb von 30-120 min nach der letzten Injektion mit 5-Aza/VPA oder mit PBS isoliert. Legende: 1 MspI-Verdau, 2 HpaII-Verdau.

Der Einfluss von 5-Aza auf den DNA-Methylierungsstatus von RMS aus der therapeutischen Studie wurde mittels Southern Blot Technik untersucht. Bei keinem von fünf mit 5-Aza/VPA behandelten RMS konnte ein demethylierender Effekt nachgewiesen werden (Abb. 35). Der Verdau mit dem methylierungssensitiven Enzym HpaII lieferte für die Kontroll- und für die Behandlungsgruppe das gleiche Bandenmuster aus hochmolekularen Fragmenten. Es konnten keine kleinen Fragmente wie nach einem MspI-Verdau detektiert werden. Auch in der Milz wurde unter Therapie keine Demethylierung der DNA mittels Southern Blot detektiert (Daten nicht gezeigt).

Die Effektivität einer VPA-Behandlung wurde durch die Analyse des Acetylierungsstatus von Histon H4 mittels Western Blot überprüft. Bereits eine sechstägige Behandlung mit VPA (400 mg/kg KG) führte zur Acetylierung von H4 in der Milz (Abb. 36 A) und in RMS (Abb. 36 B). In Abbildung 36 B sind sowohl Proteinextrakte von RMS aus der prophylaktischen VPA-Studie als auch aus der Therapiestudie unter Kombinationstherapie zu sehen, in denen eine Steigerung der Acetylierung von H4 nachweisbar war. Dieser Effekt war auch in der Milz dieser Tiere zu beobachten.

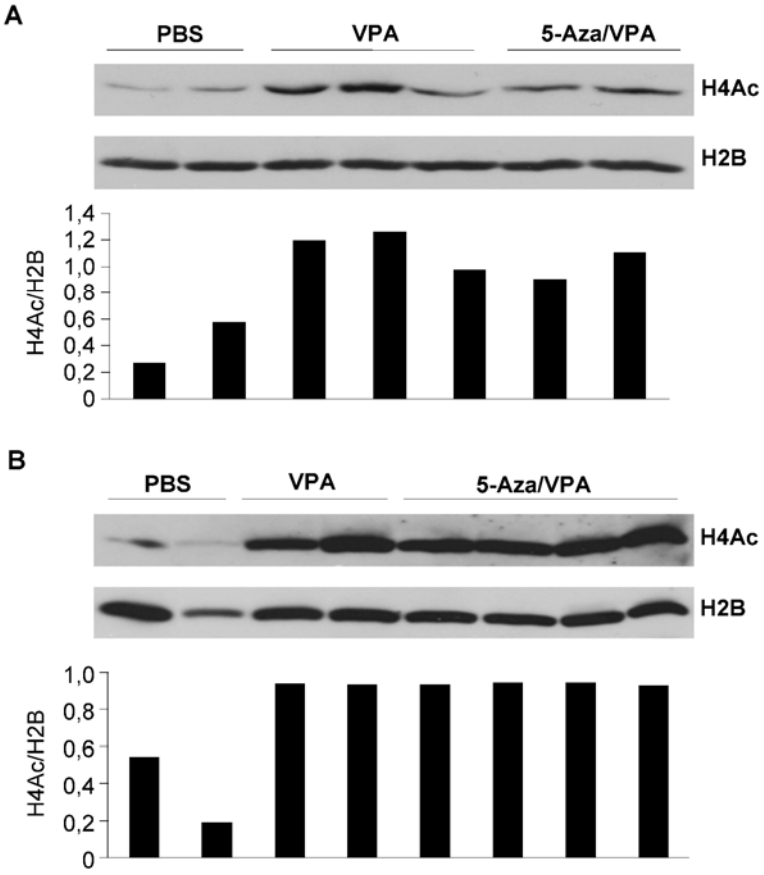


Abb. 36: Acetylierungsstatus des Histons H4 in Geweben nach Behandlung mit VPA bzw. 5-Aza/VPA. Zur Normalisierung wurde ein Antikörper gegen Histon H2B verwendet.
A) Milzen von Tieren nach sechstägiger Behandlung mit VPA, Milzen aus der therapeutischen Studie (30 Tage 5-Aza/VPA) und Milzen von mit PBS behandelten Kontrolltieren.
B) RMS von einem Tier, das 6 Tage mit VPA behandelt wurde, einem, das prophylaktisch VPA über 3 Monate erhalten hat, RMS von Tieren die therapeutisch 30 Tage mit 5-Aza/VPA behandelt wurden und zum Vergleich RMS von mit PBS behandelten Kontrolltieren.
Abkürzungen: H4Ac acetyliertes Histon H4, H2B Histon 2B

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass kein globaler DNA-demethylierender Effekt von 5-Aza in den untersuchten Tumor- und Milzproben nachgewiesen werden konnte. Dagegen zeigten Western Blot Analysen zum Abklären des Histonacetylierungsstatus, dass VPA bereits nach sechstägiger Behandlung H4 effektiv im Tumorgewebe acetyliert. Der acetylierende Effekt war nicht nur auf das Tumorgewebe beschränkt, sondern auch in der Milz nachweisbar.

4.3.5 Untersuchung der Modifizierungen der Genexpression in RMS von *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen durch eine Behandlung mit 5-Aza/VPA

Eine Analyse der Expression verschiedener Biomarker im Tumorgewebe nach 5-Aza/VPA-Behandlung sollte Aufschluss über die Effektivität der Medikamente im Tumorgewebe geben. Für diese Analysen standen RMS und Kontrollgewebe aus der therapeutischen Studie zur Verfügung, bei der Tiere mit voll ausgebildeten RMS über 30 Tage mit der cMTD von 5-Aza/VPA behandelt worden waren. Die Gewebe wurden 30-120 min nach der letzten Medikamentenapplikation oder nach dem Beobachtungszeitraum von 8 Wochen entnommen und die Expression der Markergene mittels qRT-PCR bestimmt. Gewebe von Tieren aus der prophylaktischen Studie wurden nicht analysiert, da diese Tiere nur wenige und kleine RMS entwickelten, die für die histologische Abklärung benötigt wurden.

4.3.5.1 Untersuchung zur Reaktivierung der *wtPtch*-Expression unter 5-Aza/VPA-Behandlung und Analyse der Aktivität des Hh-Signalweges

Im Tumorgewebe von *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen wird das *Δ67Ptch*-Allel im Vergleich zum Normalgewebe stark überexprimiert, während die Expression des *wtPtch*-Allels vermutlich aufgrund epigenetischer Mechanismen unverändert bleibt bzw. sinkt [Calzada-Wack J *et al.*, 2002; Uhmann A *et al.*, 2005]. Die übergeordnete Fragestellung des epigenetischen Projektes war, ob eine Aktivierung des *wtPtch*-Allels in Tumorgeweben von *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen ausreichend ist, um die Tumorprogression zu stoppen. Die VCT-Analysen ergaben für die *Ptch*-assoziierten RMS unter Therapie mit 5-Aza/VPA jedoch keine Hemmung der Tumorprogression. Die qRT-PCR Analysen sollten nun Aufschluss darüber geben, ob unter Therapie mit 5-Aza/VPA die *wtPtch*-Expression tatsächlich aktiviert worden war.

Es war eine signifikante Steigerung (p=0,012) der *wtPtch*-Expression in mit 5-Aza/VPA behandelten RMS gegenüber mit PBS behandelten RMS zu verzeichnen (Abb. 37), die von ei-

ner moderaten Hemmung der *Δ67Ptch*-Expression begleitet wurde. Dieser Effekt der epigenetischen Behandlung war reversibel. Nach dem Beobachtungszeitraum von 30 Tagen war kein signifikanter Unterschied mehr zwischen der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe nachweisbar. Die Aktivierung der *wtPtch*-Expression blieb ohne Einfluss auf die Expression des Hh-Markergens *Gli1*. Außerdem führte die Applikation von 5-Aza/VPA zu keiner Änderung der Expression der untersuchten Gene im Skelettmuskel.

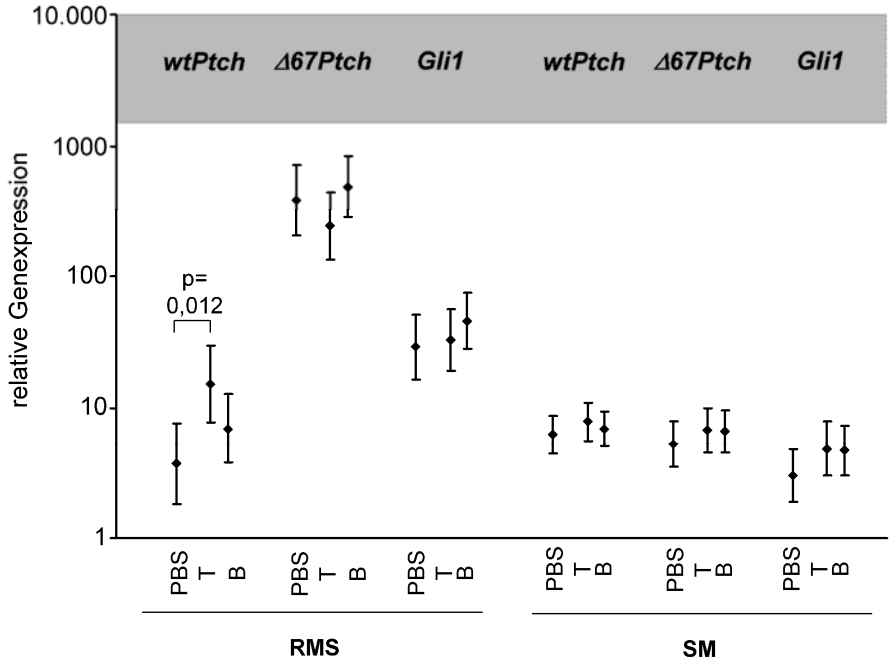


Abb. 37: qRT-PCR Analyse der Hh-Markergene nach Applikation von 5-Aza/VPA. Tiere mit voll ausgebildetem RMS wurden für 30 Tage behandelt und die Expression von *Δ67Ptch*, *Gli1* und *Igf2* direkt nach Therapie bzw. nach dem Beobachtungszeitraum von 4 Wochen im RMS und Skelettmuskel bestimmt. Zur Normalisierung der Genexpression wurde *18S rRNA* vermessen. Abkürzungen: B nach Beobachtung, T unter Therapie, SM Skelettmuskel.

Das Verhältnis von *Δ67Ptch*- zu *wtPtch*-Transkripten veranschaulicht die Effektivität der *wtPtch*-Aktivierung für die unterschiedlich behandelten Tumoren (Abb. 38). Im normalen Muskelgewebe lag dieser Wert direkt nach der Therapie zwischen 0,8 und 1,0 und war vom Behandlungsmodus unabhängig. In mit PBS behandelten RMS lag das Verhältnis bei 104 und wurde unter der Behandlung mit 5-Aza/VPA um das 7fache reduziert ($p<0,001$). Nach Abschluss der Therapie stieg das Verhältnis wieder an.

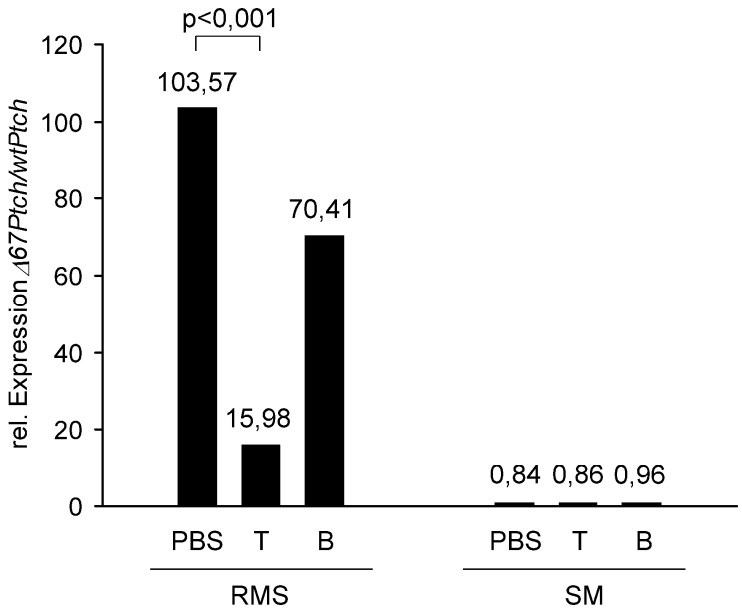


Abb. 38: Verhältnis von *Δ67Ptch*- zu *wtPtch*-Transkripten in RMS und Skelettmuskeln von mit 5-Aza/VPA behandelten Mäusen. Die Tiere wurden über 30 Tage behandelt und die Gewebe 30-120 min bzw. 4 Wochen nach der letzten Injektion isoliert. Abkürzungen: B nach Beobachtung, SM Skelettmuskel, T unter Therapie.

Die Daten belegen, dass die Aktivierung der *wtPtch*-Expression durch eine epigenetische Therapie in RMS *Ptch*-heterozygoter Mäuse möglich ist. Der hier verwendete Therapiemodus reichte jedoch nicht aus, die *wtPtch*-Expression so zu steigern, dass das Verhältnis der Expressionen zwischen dem mutanten und dem wt-Allel das Niveau des gesunden Vergleichsgewebes erreichte. Genauso hatte die Aktivierung der *wtPtch*-Expression keinen inhibierenden Einfluss auf die *Gli1*-Expression und somit auch keinen Effekt auf die Gesamtregulation der Hh-Signalkaskade.

4.3.5.2 Untersuchung der Effekte der 5-Aza/VPA-Behandlung auf die Expression von Surrogatmarkern

Die Effektivität von epigenetischen Therapieansätzen wird häufig an der transkriptionellen Regulation von sogenannten Surrogatmarkern bemessen, zu denen vor allem *p21*, *Dnmt1* und *Dnmt3a* zählen. *p21* ist in vielen Tumorentitäten im Vergleich zum Kontrollgewebe nicht oder nur im geringen Maß exprimiert und wird sowohl durch 5-Aza als auch durch VPA positiv reguliert [Catalano MG *et al.*, 2005; Schneider-Stock R *et al.*, 2005]. Die *Dnmt1* wird abhängig vom zellulären Kontext reguliert [Missiaglia E *et al.*, 2005; Schneider-Stock R *et al.*, 2005], während die *Dnmt3a* durch 5-Aza inhibiert wird [Schneider-Stock R *et al.*, 2005].

Die Expression dieser drei Surrogatmarker wurde mittels qRT-PCR analysiert (Abb. 39). Die Grundexpression von p21 war im RMS deutlich höher als im normalen Muskel (vgl. Abb. 26 in Kap. 4.1.3.5) und wurde durch die Applikation von 5-Aza/VPA nicht verändert. Die Transkription von p21 im Muskel hingegen unterlag einer signifikant positiven Regulation (p=0,0041) durch die epigenetische Therapie. Der expressionssteigernde Effekt der Therapie im Muskel war reversibel und nach dem Beobachtungszeitraum nicht mehr nachweisbar.

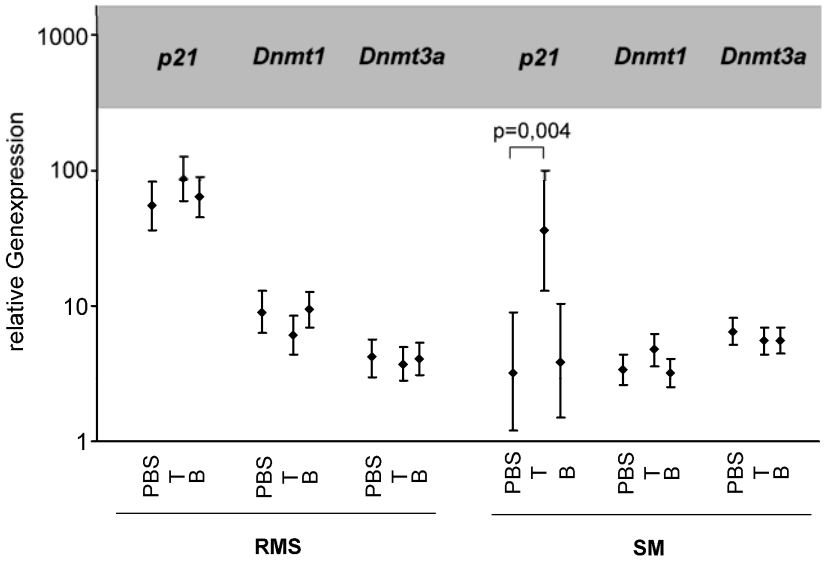


Abb. 39: qRT-PCR Analyse der Surrogatmarker *p21*, *Dnmt1* und *Dnmt3a* in RMS nach Behandlung mit 5-Aza/VPA. Tiere mit voll ausgebildetem RMS wurden für 30 Tage behandelt und die Expression von *p21*, *Dnmt1* und *Dnmt3a* direkt nach Therapie bzw. nach dem Beobachtungszeitraum von 4 Wochen im RMS und Skelettmuskel bestimmt. Zur Normalisierung der Genexpression wurde *18S rRNA* vermessen. Abkürzungen: B Beobachtung, SM Skelettmuskel, T unter Therapie.

Die Expression der *Dnmt1* im Muskel wurde durch eine 30-tägige 5-Aza/VPA-Behandlung nicht reguliert. Zwar war im Tumorgewebe eine leichte Repression der *Dnmt1*-Expression erkennbar, die aber nicht signifikant war. Die *Dnmt3a* wurde im RMS und im Muskel im gleichen Maß exprimiert. Die Applikation von 5-Aza/VPA hatte keinen Einfluss auf das Expressionsniveau in den verschiedenen Geweben.

Zusätzlich zu diesen häufig verwendeten Markern wurde der Expressionsstatus weiterer Gene, für die eine Regulation durch 5-Aza-Behandlung beschrieben ist, untersucht. Darunter befanden sich die *Matrix-Metallopeptidase 2* (*Mmp2*), *Melanoma Antigen Familie B, 2* (*Mageb2*) und *Kinesin family member 5c* (*Kif5c*) [Milutinovic S *et al.*, 2007], die Tumorsuppressorgene *Ras association domain familyprotein 1A* (*Rassf1A*) [Harada K *et al.*, 2002; Milutinovic S *et*

al., 2007], *p16* [Lee YY *et al.*, 1997; Gonzalgo ML *et al.*, 1998; Vogt M *et al.*, 1998], *p15* [Garcia-Manero G *et al.*, 2006], *WNT inhibitory factor 1* (*Wif1*) [Milutinovic S *et al.*, 2007], *Insulin-like growth factor binding protein 3* (*Igfbp3*) [Hellebrekers DM *et al.*, 2006] und *Suppressor of Cytokine Signalling 3* (*Socs 3*) [Isomoto H *et al.*, 2007] sowie die Apoptosevermittler *Caspase 1* [Ueki T *et al.*, 2001; Jee CD *et al.*, 2005], *Caspase 8* [Grotzer MA *et al.*, 2000; Casciano I *et al.*, 2004; Lindsey JC *et al.*, 2004; Fulda S, Debatin KM, 2006], *Death associated protein kinase-1* (*Dapk1*) [Katzenellenbogen RA *et al.*, 1999; Satoh A *et al.*, 2002; Pulling LC *et al.*, 2004; Tang X *et al.*, 2004; Christoph F *et al.*, 2006] und *Apoptosis protease-activating factor-1* (*Apaf-1*) [Soengas MS *et al.*, 2001; Fu WN *et al.*, 2003; Furukawa Y *et al.*, 2005].

Zunächst wurde die Expression dieser Kandidatengene mittels RT-PCR in unbehandelten RMS und MB sowie in den jeweiligen Kontrollgeweben, Skelettmuskel und Kleinhirn, bestimmt. Im Falle einer Regulation dieser Gene durch Promotormethylierung im Tumorgewebe sollte keine oder nur eine geringe Expression im unbehandelten RMS oder MB detektierbar sein. Dieses Kriterium erfüllte für das RMS nur *Mageb2* (Abb. 40). Da für dieses Gen also die Möglichkeit einer Aktivierung unter epigenetischer Therapie bestand, wurde ein SYBR Green-basierter Assay zur Quantifizierung etabliert. Die Analyse der Expression in RMS von therapeutisch mit 5-Aza/VPA behandelten Tieren ergab jedoch unter Therapie keine Aktivierung von *Mageb2* im Vergleich zu unbehandelten RMS (Daten nicht gezeigt). Im MB war keine Expression von *Dapk1*, *Wif1* und *Mmp2* und nur eine geringere Expression von *Mageb2* im Vergleich zum Kleinhirn zu detektieren (Abb. 40). Die epigenetische Regulation der Gene

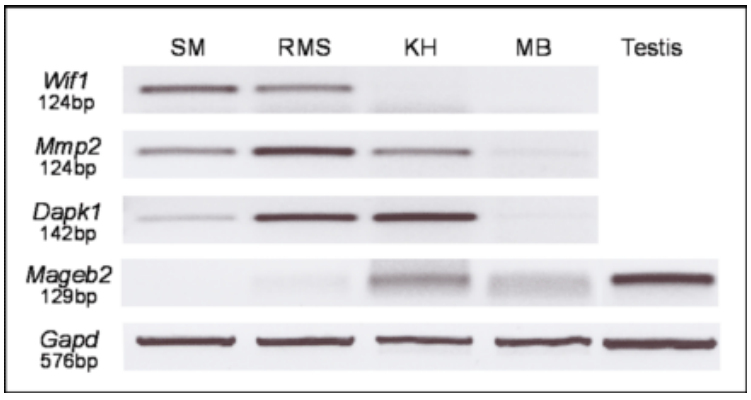


Abb. 40: Semiquantitative RT-PCR Analyse von Surrogatmarkern für eine epigenetische Therapie in RMS und MB und zugehörigem Kontrollgewebe. Testis diente als Positivkontrolle für die Expression von *Mageb2*. Zur Normalisierung wurde *Gapd* vermessen. Abkürzungen: KH Kleinhirn, SM Skelettmuskel.

in MB konnte nicht weiter verfolgt werden, da alle mit 5-Aza/VPA behandelten MB zur histologischen Abklärung in Paraffin eingebettet waren und somit kein Material für Expressionsanalysen zur Verfügung stand.

Abschließend ist festzuhalten, dass keines der untersuchten Gene einen geeigneten Surrogatmarker zur Überprüfung der epigenetischen Therapie von RMS von *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen mit 5-Aza/VPA darstellt. Lediglich die Expression von *p21* konnte im Skelettmuskel behandelter Tiere positiv reguliert werden. Eine Induktion im Tumorgewebe war aber, wahrscheinlich aufgrund der hohen Basisexpression, nicht zu beobachten.

4.3.6 Untersuchung zum Aktivitätsstatus des Hh-Signalweges in MB-Vorläuferläsionen und asymptomatischen MB nach 5-Aza/VPA-Behandlung oder nach genetischer Reduktion der Dnmt1-Aktivität

In Arbeiten von F. Petry (AG Hahn) konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der endogenen *Dnmt1* in B6-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen zu einer signifikant verlängerten MB-freien Überlebenszeit (p=0,021) führt. Für dieses genetische Experiment wurden B6-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse mit *Dnmt1*$^{N/+}$-Mäusen gekreuzt, die eine um 50 % reduzierte Dnmt1-Aktivität aufweisen [Li E *et al.*, 1992]. Die Nachkommen wurden bis zum 250. Lebenstag beobachtet. Von allen Tieren wurde das Kleinhirn für die histologische Abklärung konserviert.

Alle *Dnmt1*$^{+/+}$; *Ptch*$^{+/+}$- und *Dnmt1*$^{N/+}$; *Ptch*$^{+/+}$-Mäuse überlebten die Studie ohne das Auftreten von MB-Symptomen. Die histologischen Analysen der Kleinhirne durch HE-Färbung von Serienschnitten bestätigten den Gesundheitszustand der Hirne. Dagegen entwickelten 63 % der *Dnmt1*$^{+/+}$; *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse und 47 % der *Dnmt1*$^{N/+}$; *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse ein symptomatisches MB innerhalb des Beobachtungszeitraums, für 15 % bzw. für 3 % blieb die Todesursache ungeklärt, 22 % bzw. 50 % der Mäuse blieben gesund.

Die histologische Analyse der Kleinhirne der *Dnmt1*$^{+/+}$; *Ptch*$^{neo67/+}$-Kohorte ergab für alle Proben proliferative Veränderungen, die entweder als asymptomatische MB oder MB-Vorläuferläsionen klassifiziert wurden. Im Gegensatz dazu waren 13 % der Kleinhirne von MB-symptomlosen *Dnmt1*$^{N/+}$; *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen vollständig frei von proliferativen Abnormalitäten.

MB-Vorläuferläsionen und asymptomatische MB wurden auch in (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen der prophylaktischen Studie beobachtet. Diese Tiere wurden ab dem 28. Lebenstag

mit der ½ cMTD von 5-Aza/VPA für 3 Monate behandelt (Kap. 4.3.2.2). Von den 24 mit 5-Aza/VPA behandelten und zum Therapieabschluss präparierten Tieren wiesen sieben MB-Vorläuferläsionen und 15 asymptomatische MB auf, bei zwei Tieren konnte keine eindeutige Diagnose gestellt werden. Das jeweilige Entwicklungsstadium wurde durch HE-Färbung kenntlich gemacht. Abbildung 41 zeigt exemplarische Färbungen von den einzelnen Stadien eines MB.

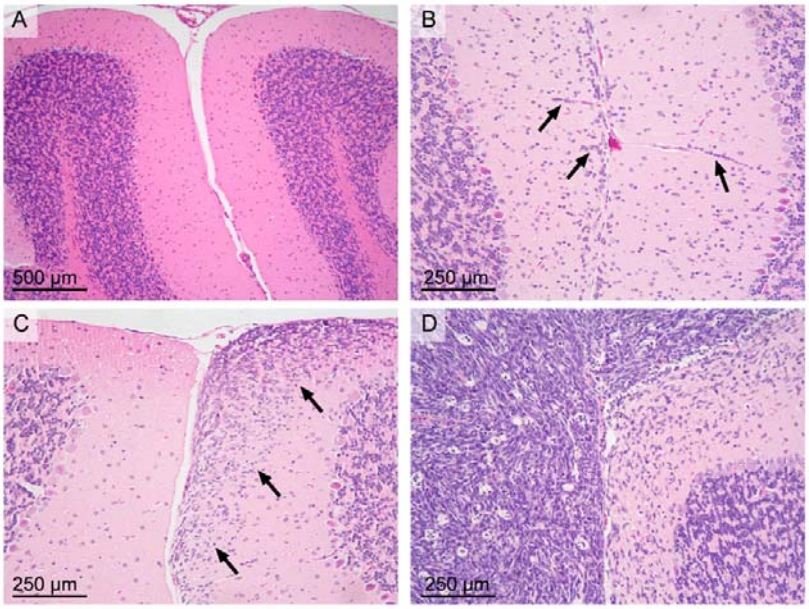


Abb. 41: Entwicklungsstadien eines MB. A) Gesundes Kleinhirn. B) Vorläuferläsionen mit Kennzeichnung der Vorläuferzellen in der Molekularis. C) Frühes Stadium eines MB. D) Vollständig ausgebildetes MB.

In dieser Arbeit sollte nun der Aktivitätsstaus der Hh-Signalkaskade in den Vorläuferläsionen und asymptomatischen MB der Mäuse untersucht werden. Wie beschrieben, verhindert der heterozygote *Dnmt1*-Verlust bzw. die prophylaktische Applikation von 5-Aza/VPA die Progression dieser Läsionen zu symptomatischen MB. Wenn dies durch die Hemmung der Repression des *wtPtch*-Allels hervorgerufen wird, müssen die Läsionen epigenetisch manipulierter Kleinhirne einen niedrigeren Aktivitätsstatus der Hh-Signalkaskade aufweisen als die nicht manipulierten. Da alle Gewebe in Paraffin eingebettet vorlagen und eine Makrodissektion mit anschließender qRT-PCR Analyse für die Vorläuferläsionen wegen des isolierten Auftretens der Voläuferzellen nicht sinnvoll erschien, wurden *in situ*-Hybridisierungen für *wtPtch* und *Gli1* durchgeführt.

Durch *in situ*-Hybridisierungen von Wallace VA [1999] und Dakubo GD *et al.* [2006] ist bekannt, dass *Ptch* und *Gli1* in der Körnerzellschicht mit Betonung auf der Bergman Glia im Kleinhirn von Mäusen exprimiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten diese Daten für *Gli1* bestätigt werden. Des Weiteren wiesen alle untersuchten, voll ausgebildeten MB eine starke *Gli1*-Färbung auf (Abb. 42). Die Ergebnisse mit der *67Ptch*-Sonde waren nicht verwendbar, da sowohl die beschriebene Anfärbung der Körnerzellen in der Bergman Glia normaler Kleinhirne ausblieb als auch *wtPtch*-Transkripte in MB detektiert wurden, obwohl das *wtPtch*-Allele in diesen Tumoren epigenetisch ausgeschaltet sein sollte [Hahn H, 2006].

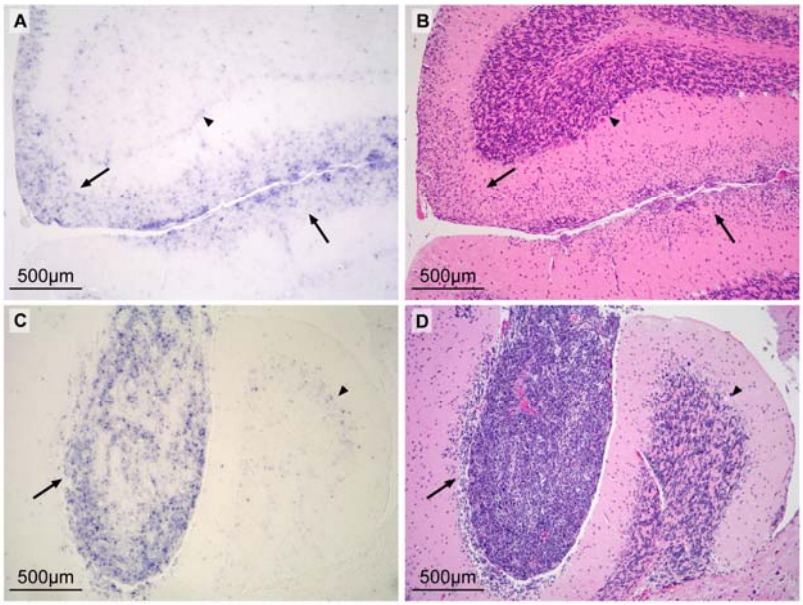


Abb. 42: *In situ*-Hybridisierungen für *Gli1* und vergleichende HE-Färbung von MB. A) und B) Frühes MB. C) und D) Vollständig ausgebildetes MB. Legende: ► Färbung der Körnerzellen in der Bergman Glia, ➡ MB

Deshalb wurde zur Untersuchung der Aktivität des Hh-Signalweges in den MB-Vorläuferläsionen mit der *Gli1*-Sonde weitergearbeitet. Die MB-Vorläuferläsionen von mit 5-Aza/VPA behandelten Tieren und *Dnmt1*$^{N/+}$; *Ptch*$^{neo67/+}$-Tieren wurden mit der *Gli1*-Sonde nicht detektiert. Über den Aktivitätsstatus der Hh-Signalkaskade in MB-Vorläuferläsionen der *Ptch*$^{neo67/+}$-Kontrollgruppe konnte wegen der geringen Probenanzahl bis zum Abschluss dieser Arbeit keine gesicherte Aussage getroffen werden. So wurde noch nicht geklärt, ob die Hemmung

der MB-Progression durch die 5-Aza/VPA-Behandlung oder die genetisch reduzierte *Dnmt1* tatsächlich mit einer verminderten Aktivität der Hh-Signalkaskade in Verbindung stehen.

4.3.7 Bisulfit-Sequenzierung von CpG-reichen Regionen des *Ptch*-Promotors

Da die Behandlung mit 5-Aza/VPA zu einer Aktivierung der *wtPtch*-Expression in RMS von *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen führte, wurde angenommen, dass die Promotormethylierung des *wtPtch*-Allels ein entscheidender Schritt bei der Tumorigenese ist. Zur Klärung des Methylierungsstatus des *Ptch*-Promotors wurde genomische DNA aus drei RMS und aus den korrespondierenden Skelettmuskeln isoliert und einer Bisulfit-Behandlung unterzogen. Im Anschluss wurden spezifische CpG-reiche Regionen amplifiziert und die resultierenden PCR-Fragmente subkloniert. Insgesamt wurden fünf CpG-reiche Regionen des *Ptch*-Promotors untersucht, deren Lage in Abbildung 5 (Kap. 3.4) dargestellt ist. Unter der Annahme, dass im Tumorgewebe nur das *wtPtch*-Allel methyliert ist und dass während der PCR-Reaktion sowohl das *wtPtch*-Allel als auch das *Δ67Ptch*-Allel gleichermaßen amplifiziert werden, sollte sich eine Gleichverteilung von methylierten und unmethylierten Klonen im RMS ergeben.

Von den analysierten Abschnitten wies aber nur Fragment i eine verstärkte Methylierung auf. Dieses Fragment beginnt 99 bp nach der 2. Gli-Bindungsstelle, endet etwa 4000 bp vor dem Start des Exons 1B [Nagao K *et al.*, 2005] und beinhaltet 13 CpG-Dinukleotide. Die CpG-Dinukleotide 1-4 waren in allen drei RMS und in den Skelettmuskeln bis zu 100 % methyliert, die CpG-Dinukleotide 10 und 11 hingegen nur in wenigen Klonen (Abb. 43 A). Bei Betrachtung aller Tumoren gegenüber den Muskeln konnte für die CpG-Dinukleotide 8, 9 und 11 eine signifikant stärkere Methylierung im RMS gegenüber dem normalen Muskel festgestellt werden (Chi-Quadrat-Test).

In den restlichen untersuchten Abschnitten A, D, F und L konnten in den jeweils 10-18 Klonen nur vereinzelt methylierte CpG-Dinukleotide detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Da insgesamt drei RMS und korrespondierende Muskel pro Fragment analysiert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass Methylierungsänderungen dieser Abschnitte des *Ptch*-Promotors keine Rolle für die Genexpression von *Ptch* in *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen spielen.

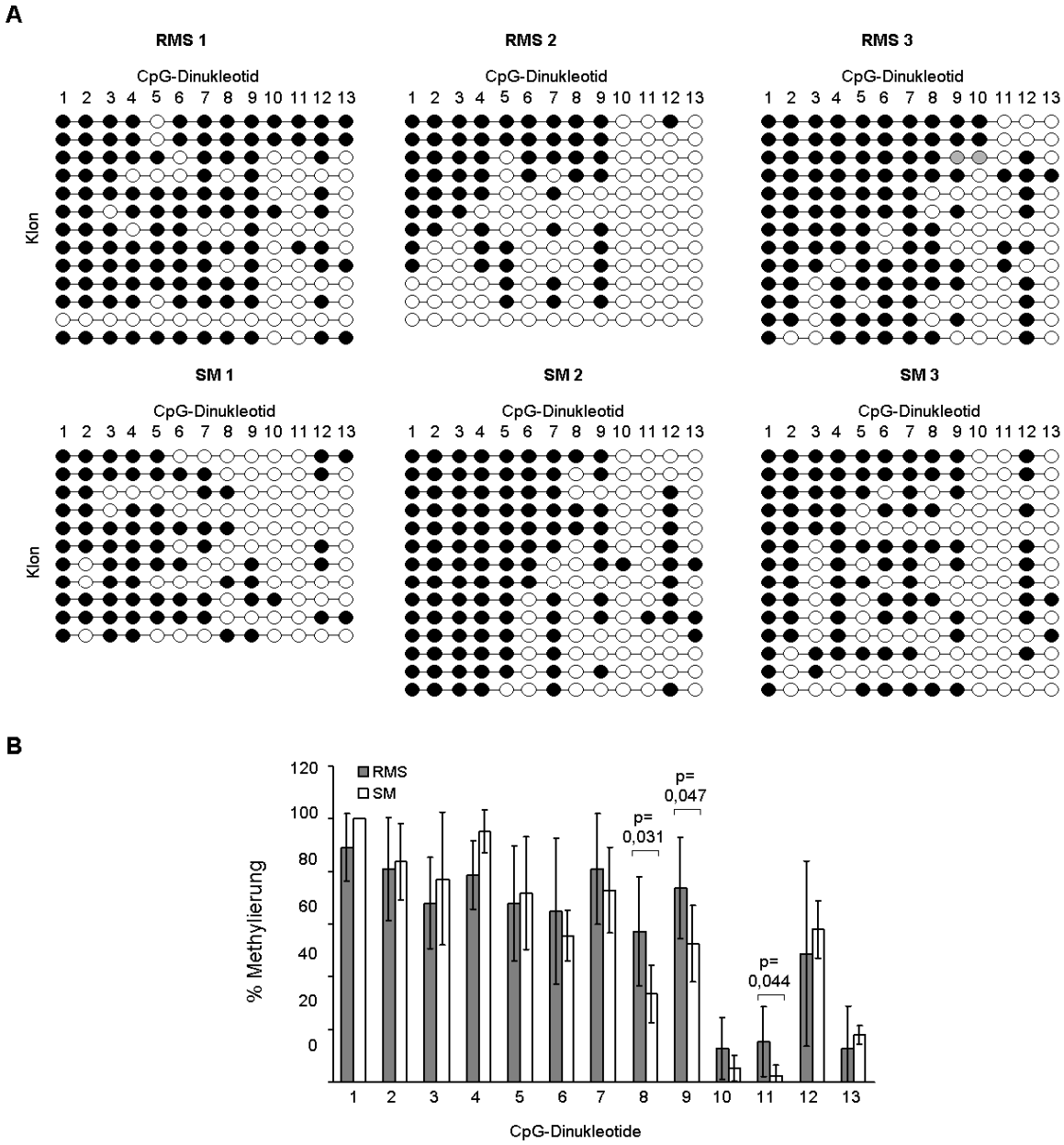


Abb. 43: Bisulfit-Sequenzierung des Fragmentes i des *Ptch*-Promotors mit 13 CpG-Dinukleotiden. Untersucht wurden drei RMS und die korrespondierenden Skelettmuskel. A) Methylierungsstatus der CpG-Dinukleotide in den einzelnen Klonen. B) Anteile an methylierten Klonen in den jeweiligen CpG-Dinukleotiden im RMS und Skelettmuskel. Abkürzung: SM Skelettmuskel.

Legende: ● Methylierte CpG-Dinukleotide,○ nichtmethylierte CpG-Dinukleotide,
○ CpG-Dinukleotide ohne Information über den Methylierungsstatus.

Um zu analysieren, ob die Region i mit vorliegender starker Methylierung entscheidend zur Regulation der Genexpression beiträgt, wurde diese Region zusätzlich in einem 5-Aza behandelten RMS und korrespondierenden Skelettmuskel untersucht (Abb. 44). Das RMS- tragende Tier erhielt fünf i. p. Bolusinjektionen von 10 mg/kg KG 5-Aza im Abstand von 7 Tagen.

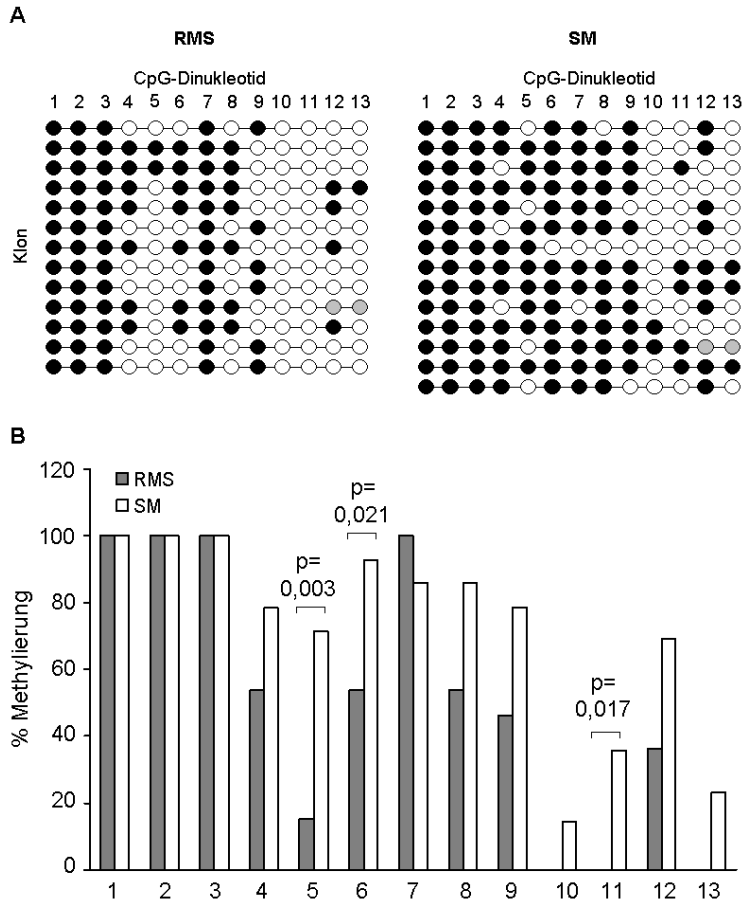


Abb. 44: Bisulfit-Sequenzierung von Fragment i des *Ptch*-Promotors in mit 5-Aza behandelten Geweben. Untersucht wurden jeweils mindestens 13 Klone von einem RMS und korrespondierendem Skelettmuskel eines mit fünf Bolusinjektionen (je 10 mg/kg KG 5-Aza) einmal wöchentlich i. p. behandelten Tieres. Das Fragment i umfasst 13 CpG-Dinukleotide. A) Methylierungsstatus der CpG-Dinukleotide in den einzelnen Klonen. B) Darstellung des prozentualen Anteils an methylierten Klonen in den jeweiligen CpG-Dinukleotiden im RMS und Skelettmuskel. Abkürzung: SM Skelettmuskel.

Legende: ● Methylierte CpG-Dinukleotide, ○ nichtmethylierte CpG-Dinukleotide,
⊙ CpG-Dinukleotide ohne Information über den Methylierungsstatus.

Die ersten drei CpG-Dinukleotide des Fragmentes i waren sowohl im RMS als auch im normalen Muskel der mit 5-Aza behandelten Maus vollständig methyliert. Bis auf das CpG-Dinukleotid 7 wiesen alle anderen CpG-Dinukleotide im normalen Muskel eine stärkere Methylierung als im RMS auf. Die CpG-Dinukleotide 5, 6 und 11 erreichten dabei Signifikanzniveau (Chi-Quadrat Test). Außerdem fällt auf, dass die CpG-Dinukleotide 10 und 11 im RMS vollständig unmethyliert waren, in einigen Klonen des Skelettmuskels aber eine Methylierung nachgewiesen wurde.

Der Vergleich der Methylierungsmuster des Fragmentes i in Abbildung 45 zwischen der mit 5-Aza behandelten Maus und den Kontrolltieren verdeutlicht den Einfluss der DNA-demethylierenden Substanz. Die CpG-Dinukleotide 5 und 9 waren im mit 5-Aza behandelten RMS signifikant schwächer methyliert als in den RMS der unbehandelten Tiere (Chi-Quadrat Test: p_{CpG5}=0,009; p_{CpG9}=0,0497). Der behandelte Skelettmuskel hingegen wies im Vergleich zu unbehandelten durchgehend eine verstärkte und bei den CpG-Dinukleotiden 3, 6, 8 und 11 eine signifikant verstärkte Methylierung auf (Chi-Quadrat Test: p_{CpG3}=0,0485; p_{CpG6}=0,0135; p_{CpG8}=0,0008; p_{CpG11}=0,0008).

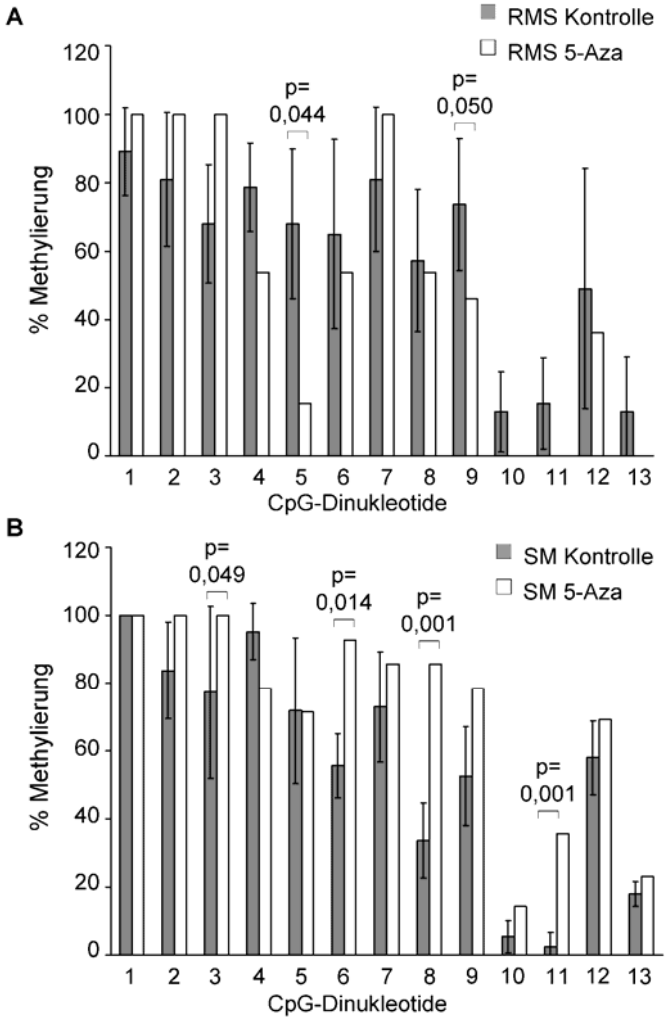


Abb. 45: Vergleich der Methylierungsmuster für das Fragment i zwischen mit 5-Aza behandelten und unbehandelten A) RMS und B) Skelettmuskeln. Angegeben ist jeweils der prozentuale Anteil an methylierten Klonen in den jeweiligen CpG-Dinukleotiden. Abkürzung: SM Skelettmuskel.

Abschließend ist festzuhalten, dass von den untersuchten Regionen des *Ptch*-Promotors nur in der Region i eine ausgeprägte Methylierung festgestellt wurde. Anhand der Analyse der Region i eines mit 5-Aza behandelten RMS konnte gezeigt werden, dass der Anteil methylierter CpG-Dinukleotide im RMS sinkt. Dieser Effekt war für die CpG-Dinukleotide 5 und 9 besonders ausgeprägt. Zur endgültigen Klärung, welchen Einfluss die Methylierung dieser CpG-Dinukleotide auf die Expression von *Ptch* ausübt, muss eine größere Anzahl mit 5-Aza behandelter Tiere analysiert werden.

5 DISKUSSION

5.1 Cyclopamin zur Therapie *Ptch*-assoziierter RMS

5.1.1 Cyclopamin inhibiert die Hh-Signalkaskade in etablierten *in vitro*-Assays

Anfang des 20. Jahrhunderts wiesen etwa 25 % der neugeborenen Lämmer in Idaho, USA, kraniofaziale Defekte auf, die von leicht deformierten Kiefern bis hin zu Holoprosenzephalie reichten [James LF, 1999]. Durch eine groß angelegte Kampagne zur Aufklärung der Ursache durch das US Ministerium für Landwirtschaft wurde die teratogene Wirkung der Pflanze *Veratrum californicum* aufgedeckt und 1964 das Alkaloid Cyclopamin als der eigentlich teratogene Bestandteil identifiziert [Keeler RF, Binns W, 1964]. Die genaue Wirkungsweise von Cyclopamin blieb aber noch lange unklar. Es wurde eine Verbindung zwischen Cyclopamin und dem Hh-Signalweg vermutet, da inaktivierende Mutationen im *Shh*-Gen auch zur Ausbildung von Holoprosenzephalie in Mausembryonen führen [Chiang C *et al.*, 1996]. Erst 1998 wiesen Incardona JP *et al.* [1998] und Cooper MK *et al.* [1998] nach, dass Cyclopamin spezifisch den Hh-Signalweg inhibiert. Den Nachweis für eine direkte Interaktion von Cyclopamin mit Smo erbrachten Chen JK *et al.* [2002]. Sie konnten zeigen, dass Cyclopamin an die heptahelikale Domäne des Transmembranproteins Smo bindet und so wahrscheinlich die Überführung in die inaktive Proteinkonformation bewirkt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Cyclopamin von Toronto Research zur *in vivo*-Therapie von *Ptch*-assoziierten RMS eingesetzt, die eine pathologisch aktive Hh-Signalkaskade aufweisen. Dies erforderte zunächst die Überprüfung der Aktivität der Substanz. Um die Funktionalität des Cyclopamins auf Transkriptions- und Proteinebene zu bestätigen, wurden verschiedene *in vitro*-Assays durchgeführt. Als Marker wurde die Transkription von *Gli1* vermessen, das als direktes Zielgen eines aktiven Hh-Signalweges gilt [Nieuwenhuis E, Hui CC, 2005; Stecca B, Ruiz i Altaba A, 2005]. Zusätzlich wurden Reportergenassays verwendet, mit denen die Aktivität der Gli-Proteine analysiert wurde. Zur Aktivierung der Hh-Signalkaskade wurde Shh-N-konditioniertes Medium oder Hh-Ag1.2 verwendet. Der synthetische Hh-Agonist Hh-Ag1.2 wurde von Frank-Kamenetsky M *et al.* [2002] identifiziert und charakterisiert. Er weist ein geringeres Potential bei der Aktivierung der Signalkaskade als rekombinantes Shh auf. Auch im Rahmen dieser Arbeit führte Shh-N-konditioniertes Medium zu einer stärkeren Aktivierung der Signalkaskade als das synthetische Molekül.

Es konnte gezeigt werden, dass Cyclopamin die *Gli1*-Transkription nach Stimulation des Hh-Signalweges in der murinen Embryofibroblasten-Zelllinie C3H10T1/2 und der murinen Hautfibroblastenlinie B9 inhibiert. Mittels Luziferasereportergenassays an stimulierten ShhLIGHT2- und PC3-Zellen wurde die Hemmung der Hh-Signalkaskade durch Cyclopamin auf Proteinebene belegt.

Die Daten bestätigten, dass das von Toronto Research erworbene Cyclopamin die Aktivität des Hh-Signalweges spezifisch hemmt und somit für einen *in vivo*-Einsatz zur Therapie *Ptch*-assoziierter Tumoren geeignet war.

5.1.2 Die RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 sind kein geeignetes Modell zur Überprüfung neuer Therapien für *Ptch*-assoziierte Tumoren

Vor dem Einsatz von Cyclopamin zur Behandlung *Ptch*-assoziierter RMS *in vivo* wurde die Antwort auf das Medikament *in vitro* evaluiert. Dazu wurden die RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 verwendet, die aus RMS einer $Ptch^{neo12/+}$-Maus [Goodrich LV *et al.*, 1997] generiert worden waren.

RT-PCR-Analysen der Hh-Markergene *Ptch, Gli1* und *Igf2* zeigten eine wesentlich geringere Expression in den RMS-Zelllinien im Vergleich zu Originaltumoren und lassen auf einen Aktivitätsverlust der Signalkaskade durch die *in vitro*-Kultivierung schließen. Ein solcher Effekt wurde bereits für *Ptch*-assoziierte MB-Zelllinien beschrieben [Romer JT *et al.*, 2004; Sasai K *et al.*, 2006].

Die Isolierung von Zellen aus ihrer natürlichen Umgebung ist immer mit der Veränderung der ursprünglichen räumlichen Struktur und mit einem Verlust an Interaktionsmöglichkeiten verbunden. Zelllinien sind im Idealfall monoklonal, während ein Tumor ein Konglomerat unterschiedlicher Zelltypen, wie z. B. Tumorzellen im eigentlichen Sinne, Fibroblasten und Immunzellen, ist. Zudem liefert das tumorumgebende Gewebe wichtige Signale [Dalton WS, 1999; Hofmeister V *et al.*, 2008], die in der Zellkultur fehlen. Um Tumorzelllinien am Leben zu erhalten, bietet man ihnen in der Kulturschale einen Überschuss an Nährstoffen. Daraus ergibt sich zwangsläufig eine Veränderung des Phänotyps der Tumorzellen in Kultur.

Trotz der geringen Aktivität der Hh-Signalkaskade in den RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 wurde überprüft, ob sich die Proliferation dieser Zellen durch die Behandlung mit dem Cyclopamin-Derivat KAAD blockieren lässt. Eine Behandlung der Zellen mit KAAD unter serumreduzierten Bedingungen (2,5 % FCS) zeigte bereits ab einer Konzentration von

0,25 µM einen proliferationshemmenden Einfluss. Eine antiproliferative Wirkung des inaktiven Strukturanalogons Tomatidin setzte jedoch ebenfalls ab dieser Konzentration ein. Es kann daher angenommen werden, dass die Proliferationsabnahme auf eine allgemeine Toxizität zurückzuführen ist und es sich nicht um einen spezifischen Effekt des KAAD handelt. Um diese Annahme zu verifizieren, könnte ein Zytotoxizitätsassay, z. B. ein MTT-Test, durchgeführt werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgt ist.

Des Weiteren ist es möglich, dass die wachstumsinhibierende Wirkung von KAAD auf die Tumorzelllinien durch Hh-unabhängige Mechanismen bedingt ist. Hinweise dazu liefert die Arbeit von Romer JT *et al.* [2004]. In dieser Studie wurde zunächst an MB-Tumorzellen die IC50 (Konzentration einer Substanz, welche die Proliferation der Zellen um 50 % senkt) für Cyclopamin ermittelt. Die IC50 wurde dann mit derjenigen Konzentration verglichen, die zur Halbierung einer Shh-stimulierten Gli-Luziferase-Reporteraktivität in transfizierten NIH3T3-Zellen notwendig war. Letztere lag um etwa das 100fache niedriger als die IC50. Daraus kann geschlossen werden, dass die Wachstumsinhibierung der MB-Zelllinien durch Cyclopamin unabhängig von der Aktivität der Hh-Signalkaskade war.

Die Charakterisierung von potentiellen Krebstherapeutika in Transplantationsmodellen ist ein gebräuchliches Verfahren. Mit der Idee einer Reaktivierung der Hh-Signalkaskade in den RMS-Zelllinien nach Implantation in Nacktmäuse wurden in einem weiteren Experiment die RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 in *nu/nu*-Mäuse transplantiert und nach ihrem Anwachsen mit Cyclopamin behandelt.

Vor der Transplantation der RMS-Zelllinien wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt. Hierbei wurden Nacktmäusen PC3-Zellen implantiert und Cyclopamin gemäß eines publizierten Behandlungsschemas eingesetzt [Karhadkar SS *et al.*, 2004]. Dabei wurde ein Ethanol-Triolein-Gemisch zum Lösen des Alkaloids verwendet. In unseren Experimenten führte diese Applikationsform des Medikamentes bereits am 2. Tag zu Hautreizungen an der Injektionsstelle, die sich bis zum 7. Tag zu Ulzerationen verstärkten. Da dieser Effekt sowohl in der Behandlungsgruppe als auch in der Lösungsmittelgruppe auftrat, handelte es sich um eine Nebenwirkung des Lösungsmittels und nicht um einen toxischen Effekt von Cyclopamin. Deshalb wurde HBC als Lösungsmittel für Cyclopamin ausgewählt und die Behandlung auf zweimal täglich 10 mg/kg KG Cyclopamin i. p. umgestellt. Das Lösungsmittel HBC wurde von den Mäusen sehr gut vertragen und deshalb für alle weiteren *in vivo*-Applikation von Cyclopamin zur Therapie von RMS verwendet.

Nach der Transplantation der Zelllinien TP5014 und TP1588 bildeten sich Tumoren, die innerhalb von 24 Tagen ein Volumen von 20-50 mm^3 erreicht hatten und morphologisch einen RMS-Phänotyp aufwiesen. Der Hh-Signalweg ließ sich durch die Transplantation nicht reaktivieren, da die *Gli1*- und *Ptch*-Expression der entstandenen Tumoren ähnlich niedrig war wie in den Zelllinien TP5014 und TP1588 und nicht derjenigen von Originaltumoren entsprach. Diese Daten stehen im Einklang mit Beobachtungen von Sasai K *et al.* [2006], die ein solches Phänomen für *Ptch*-assoziierte MB-Zelllinien beschrieben haben.

Jedoch wurde im Vergleich zu den Ausgangszelllinien TP5014 und TP1588 die Expression von *Igf2* sehr stark in den entsprechenden Tumoren reaktiviert. Der Wachstumsfaktor *Igf2* ist zwar ein Zielmolekül der Hh-Signalkaskade und unabdingbar für die Entstehung von Tumoren in $Ptch^{neo67/+}$-Mäusen [Hahn H *et al.*, 2000], er wird aber auch durch diverse andere Signale wie z. B. die differentielle Expression von Rezeptoren und Bindungsproteinen reguliert. Der starke Anstieg im Expressionslevel nach Transplantation der RMS-Zelllinien könnte daher durch Hh-unabhängige Signalwege ausgelöst worden sein. Für diese These spricht, dass das Tumorwachstum nicht durch das Medikament Cyclopamin beeinflusst wurde.

Zusammengefasst konnte somit gezeigt werden, dass die *in vitro*-Kultivierung der RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 einen Verlust der Aktivität der Hh-Signalkaskade bewirkt. Trotzdem wurde durch das Cyclopaminderivat KAAD eine Proliferationshemmung der RMS-Zelllinien *in vitro* hervorgerufen, die wahrscheinlich unabhängig von der Hh-Signalkaskade war. Die Implantation der RMS-Zellinien in Nacktmäuse führte zu keiner Restimulation des Hh-Signalweges und Cyclopamin zeigte keinen Effekt auf die Progression der durch diese Zelllinien hervorgerufenen Tumoren. Deshalb stellen diese Zelllinien kein geeignetes Modell dar, den Hh-Antagonisten Cyclopamin auf seine Wirksamkeit gegenüber *Ptch*-assoziierten RMS hin zu überprüfen.

5.1.3 Cyclopamin inhibiert die Hh-Markergenexpression und die Proliferation von RMS- und MB-Primärkulturen von $Ptch^{neo67/+}$-Mäusen

Cyclopamin wurde an RMS- und MB-Primärkulturen aus $Ptch^{neo67/+}$-Mäusen getestet. Primärkulturen sind ebenso wie die Originaltumoren durch eine aktive Hh-Signalkaskade mit starker Expression von *Gli1* und *Ptch* gekennzeichnet und stellen damit ein ideales Modellsystem der *in vivo*-Situation dar. Zur Herstellung der Primärkulturen wurde das Tumorgewebe dissoziiert und höchstens 4 Tage vor Behandlung kultiviert. Eine Behandlung mit Cyclopamin

führte zu einer Senkung der Proliferationsrate um 50 % bzw. 75 %, begleitet von einer effizienten Inhibierung der Hh-Signalkaskade auf Transkriptionsebene, sowohl in *Ptch*-assoziierten RMS- als auch in MB-Primärkulturen. Für MB-Primärkulturen ist ein solcher Effekt bereits bekannt [Berman DM *et al.*, 2002].

Diese Daten zeigen deutlich: A) Primärkulturen sind ein geeignetes Modell zum Testen von zielgerichteten Therapieansätzen von *Ptch*-assoziierten Tumoren und B) Cyclopamin ist ein vielversprechender Kandidat zur Behandlung *Ptch*-assoziierter RMS.

5.1.4 Systemische Behandlung von *Ptch*-assoziierten RMS mit Cyclopamin inhibiert weder die Aktivität der Hh-Signalkaskade noch die Tumorprogression

Nach der Bestätigung der Effektivität von Cyclopamin an RMS- und MB-Primärkulturen wurde das *in vivo*-Potential der Substanz für die Therapie *Ptch*-assoziierter RMS untersucht. Die gewählte Dosis betrug zweimal 10 mg/kg KG/Tag Cyclopamin (kumulative Dosis 20 mg/kg KG/Tag). Mit den Injektionen im 12 Stunden Abstand sollten starke Schwankungen des Medikamentes im Plasma vermieden werden. Die eingesetzte Dosis ist mit einem von Stecca B *et al.* [2007] eingesetzten Therapieschema vergleichbar, das in Melanoma-Xenotransplantaten nach 16 Tagen Behandlung zu einer Reduktion des Tumorvolumens um 33 % führte. Es wurde aber auch die Wirksamkeit geringerer Dosen beschrieben. So führte eine Applikation von 10 mg/kg KG Cyclopamin über 9 Tage in Prostata-Xenotransplantaten zur Hemmung der Tumorprogression [Karhadkar SS *et al.*, 2004]. Die hier gewählte Dosierung war auch viermal höher als die bei Sanchez P und Ruiz i Altaba A [2005] verwendete, mit der eine Verlängerung der MB-freien Überlebenszeit in $Ptch^{+/-}$; $p53^{-/-}$-Mäusen erreicht wurde.

Da die hier eingesetzte Dosis weder zu Änderungen der Expression der Hh-Markergene *Ptch*, *Gli1* und *Igf2*, noch zur Wachstumshemmung von RMS in $Ptch^{neo67/+}$-Mäusen führte, kann eine Unterdosierung des Cyclopamins bei der systemischem Applikation nicht ausgeschlossen werden. Beispielsweise ist es möglich, dass der verwendete Mausstamm (B6xBalb) das Medikament besser metabolisiert als andere Mausstämme. Über die Pharmakokinetik und den Metabolismus von Cyclopamin in Mäusen gibt es bisher kaum veröffentlichte Untersuchungen.

5.1.5 Lokale Behandlung von *Ptch*-assoziierten RMS mit Cyclopamin inhibiert die Aktivität der Hh-Signalkaskade, nicht aber die Tumorprogression

Um eine Unterdosierung als Grund für das fehlende Ansprechen der RMS unter der systemischen Applikation auszuschließen, wurde die Dosis in einem weiteren Experiment erhöht. Das Alkaloid mit seiner komplexen Struktur lässt sich derzeit aber nur aus *Veratrum californicum* gewinnen. Die Erträge sind dabei hoch variabel in Bezug auf Menge und Qualität, woraus sich hohe Anschaffungskosten für Cyclopamin ergeben. Deshalb wurde von einer Steigerung der systemischen Dosis abgesehen und stattdessen den RMS-tragenden Tieren täglich 200 µg Cyclopamin lokal in das Tumorgewebe verabreicht.

Bereits nach siebentägiger Behandlung mit Cyclopamin zeigte sich ein eindeutiger Trend zur Inhibierung des Hh-Signalweges. Dieser Effekt war jedoch erst 4 Wochen nach Therapieabschluss signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Die verzögerte Wirkung von Cyclopamin auf die Aktivität der Hh-Signalkaskade ist schwer zu interpretieren. Möglicherweise führt Cyclopamin zum Tod von Tumorzellen, die von einem aktiven Hh-Signalweg für die Proliferation abhängig sind, und verschafft somit Tumorzellen, die unabhängig von dieser Signalkaskade proliferieren einen Selektionsvorteil. Dieses Szenario beinhaltet einen sich selbst verstärkenden Mechanismus: Je mehr Hh-unabhängige Zellen vorhanden sind, desto größer wird der Selektionsdruck auf Hh-abhängige Zellen.

Trotz Inhibierung der Hh-Signalkaskade wurde die Progression der *Ptch*-assoziierten RMS durch die lokale Applikation von Cyclopamin nicht gehemmt. Dies wirft die Frage auf, ob auch die lokal applizierte Dosis und die damit induzierte Aktivitätsabnahme des Signalweges unzureichend für eine antitumorale Wirkung war. Die vergleichbare Inhibierung der Aktivität des Hh-Signalweges in RMS-Primärkulturen durch Cyclopamin, die für eine Wachstumshemmung ausreichte, spricht dagegen. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen der *in vivo*-Antwort der Tumoren nach lokaler Applikation von Cyclopamin ist die Bereitstellung protektiver Faktoren von der Tumorumgebung [Hofmeister V *et al.*, 2008], die eine Hh-unabhängige Proliferation der RMS ermöglichen. So vermittelt z. B. stromaproduzierter Hepatozyten-Wachstumsfaktor in humanen RMS Resistenz gegenüber Radiochemotherapien [Jankowski K *et al.*, 2003]. Weiterhin bewirken Stromafibroblasten in Pankreaskarzinomen durch die Sekretion von Stickstoffmonoxid eine Resistenz gegenüber Etoposid [Muerkoster S *et al.*, 2004]. Die Tatsache, dass der Hh-Signalweg durch Cyclopamin im Tumor etwa im gleichen Ausmaß wie in Primärkulturen gehemmt wurde, die Zellproliferation jedoch nur in den Primärkulturen

verringert wurde, stützt die These, dass die Resistenz der Tumoren durch die Tumorumgebung vermittelt wird.

Paradoxerweise wurde in dieser Studie vor allem für kleine RMS eine wachstumsfördernde Wirkung von Cyclopamin beobachtet. Da dieser Effekt nicht für die Tumoren der Kontrollgruppe beobachtet wurde, kann eine Größenzunahme aufgrund der täglichen Injektion des bloßen Volumens von 100 µl ausgeschlossen werden. Ein solcher adverser Effekt auf die Tumorprogression wurde für Cyclopamin noch nicht beschrieben. Als Ursache für adverse Medikamentwirkungen gelten unter anderem genetische Unterschiede oder Veränderungen in metabolisierenden Enzymen.

Um zu untersuchen, ob der genetische Hintergrund der gewählten Mauslinie das Ansprechen der Tumoren auf die Cyclopamintherapie verhinderte, wurden zusätzlich CD1-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse lokal mit Cyclopamin behandelt. Die Ermittlung der Tumorvolumina ergab auch für diese Linie einen wachstumsfördernden Einfluss von Cyclopamin und damit keinen Unterschied zu der Linie (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$. Im Gegensatz zur Linie (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$ ergaben die Expressionsanalysen keine Regulation der Genexpression nach siebentägiger Behandlung. Dieser Unterschied könnte neben dem genetischen Hintergrund auch durch die geringe Gruppengröße und starke interindividuelle Schwankungen bedingt sein. Um einen eindeutigen Zusammenhang zum genetischen Hintergrund herstellen zu können, müsste die Kohortengröße deutlich erhöht werden.

5.1.6 Lokale Behandlung von *Ptch*-assoziierten RMS mit Cyclopamin hat keinen Einfluss auf Proliferations-, Apoptose- und Differenzierungsstatus

Tumorgewebe von lokal behandelten Tieren, die nach der letzten Cyclopaminapplikation präpariert wurden, dienten zur immunhistochemischen Analyse des Proliferationsmarkers Ki67 und der Apoptosemarker Bcl-2 und Caspase 3.

Die Ki67-Färbung zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen auf, was die Daten zur Volumenentwicklung der Tumoren bestätigte. Die Beobachtung, dass die lokale Applikation von Cyclopamin bei kleinen Tumoren zu einem stärkeren Wachstum führte, war mit Hilfe der immunhistochemischen Färbungen aber nicht verifizierbar.

Für die cyclopaminbedingte Modulation des Apoptosestatus gibt es diverse *in vitro*-Belege, von denen sich die meisten Untersuchungen auf eine Endpunktbestimmung wie die PARP-Spaltung und DNA-Fragmentierung beschränken, z. B. Watkins DN *et al.* [2003], Qualtrough

D *et al.* [2004], Sheng T *et al.* [2004] und Mimeault M *et al.* [2006]. Als Mediator wird in einigen Fällen die Aktivierung von Caspase 3 genannt [Athar M *et al.*, 2004; Koleva M *et al.*, 2005]. In dieser Studie war keine Aktivierung der Caspase 3 unter Cyclopamintherapie zu beobachten. Weiterhin konnten keine Änderungen in der Expression des antiapoptotischen Bcl-2 detektiert werden. In RMS *Ptch*-heterozygoter Mäuse wird Bcl-2 vor allem in den Myotuben exprimiert. Der *Bcl-2*-Promotor weist Gli-Bindungsstellen auf, an die sowohl Gli1 als auch Gli2 binden und die Transkription von *Bcl-2* induzieren können [Louro ID *et al.*, 2002; Bigelow RL *et al.*, 2004; Regl G *et al.*, 2004]. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine Abnahme der *Gli1*-Expression zu einer verminderten *Bcl-2*-Expression führt. Tatsächlich haben Bar EE *et al.* [2007] kürzlich gezeigt, dass Cyclopamin in MB-Zelllinien die Expression von *Bcl-2* inhibiert und dass die durch Cyclopamin vermittelte Inhibierung durch Gli1 aufgehoben werden kann. In unseren Experimenten konnte trotz partieller *Gli1*-Inhibierung keine Veränderung der Bcl-2-Proteinexpression festgestellt werden. Dies kann an der unzureichenden Repression der *Gli1*-Expression unter Cyclopamintherapie liegen oder an der zu geringen Sensitivität der Immunfärbung zur Detektion von Expressionsunterschieden.

Für die Untersuchung des Differenzierungsstatus der RMS wurden verschiedene myogene Marker mittels qRT-PCR analysiert. Die Ausbildung der Muskeln beginnt in der Embryonalphase mit der Entstehung von Muskelvorläuferzellen aus pluripotenten mesodermalen Zellen. Diese Myoblasten beginnen in genau definierten Zeiträumen der Embryonalentwicklung regulatorische Faktoren zu exprimieren. Zu den ersten gehören *Myogenin*, *Myf6* (auch *MRF4* oder *Herculin* genannt) und *MyoD*, die dann während der gesamten Muskelentwicklung und auch im adulten Muskel exprimiert werden. Mit der Expression der Zellzyklusinhibitoren *p21* und *p27* wird die terminale Differenzierung der Myoblasten zu Myozyten eingeleitet. Die späte Phase der Differenzierung ist durch die Expression von *MHC* und *Mef2c* sowie durch abschließende Fusion der Myozyten zu mehrkernigen Myotuben gekennzeichnet. Die Interaktion zwischen Aktin und Myosin im reifen Muskel und somit die Muskelkontraktion selbst wird durch Tropomyosin reguliert [Gunning P *et al.*, 2008].

In allen RMS *Ptch*-heterozygoter Mäuse konnte eine gesteigerte Expression der frühen Myoblastenmarker *Myogenin* und *MyoD* gegenüber dem Muskel detektiert werden. Die Expression aller späteren Differenzierungsmarker war, mit Ausnahme von *p21*, im Tumor geringer als im Muskel. Die lokale Applikation von Cyclopamin hatte keinen Einfluss auf das Expressionsprofil der myogenen Marker und somit keinen auf den Differenzierungsstatus der Tumoren.

Die Funktionen von p21 in der Zelle sind sehr facettenreich [Dotto GP, 2000]. So kann p21, neben der klassischen Funktion als Zellzyklusinhibitor durch Vermittlung eines G1- und S-Phase Arrestes [Harper JW *et al.*, 1993], abhängig vom Expressionlevel auch die Proliferation aktivieren [Sherr CJ, Roberts JM, 1999] und vor Apoptose schützen [Suzuki A *et al.*, 1998; Suzuki A *et al.*, 1999; Gartel AL, Tyner AL, 2002]. Die hohe Expression von *p21* in RMS von $Ptch^{neo67/+}$-Mäusen lässt deshalb vermuten, dass dieses Protein eine wichtige Funktion bei der fehlenden Therapieantwort übernehmen könnte.

Die Beobachtung, dass eine lokale Behandlung *Ptch*-assoziierter RMS mit Cyclopamin trotz nachhaltiger Inhibierung des Hh-Signalweges keinen Einfluss auf den Proliferations-, Apoptose- und Differenzierungsstatus hatte, kann in zwei Richtungen interpretiert werden. Neben der Bedeutung des Tumorstromas bei der Vermittlung antiapoptotischer und zytoprotektiver Effekte (Kap. 5.1.8) ist auch ein von der Hh-Signalkaskade unabhängiges Wachstum von voll ausgebildeten *Ptch*-assoziierten RMS denkbar. Möglicherweise wird die Progression der RMS in $Ptch^{neo67/+}$-Mäusen eher durch Mutationen in anderen Genen, die sich im Laufe der Zellteilungen des Tumors anhäufen, oder durch andere Signalwege gesteuert.

5.2 Epigenetische Therapie von *Ptch*-assoziierten Tumoren

Wie in der Einleitung beschrieben wurde, ist in Tumoren von $Ptch^{neo67/+}$-Mäusen *Ptch* überexprimiert, wobei die Transkripte in erster Linie vom mutanten Allel stammen. Das Transkriptionslevel des wt-Allels bleibt dagegen konstant oder wird gegenüber dem Normalgewebe sogar reprimiert [Calzada-Wack J *et al.*, 2002; Uhmann A *et al.*, 2005]. Es liegt nahe, dass dieser Effekt durch Methylierung des *wtPtch*-Allels vermittelt wird. Diese These wird durch Untersuchungen von Wolf I *et al.* [2007] und Cretnik M *et al.* [2007] gestützt, die für *PTCH* eine Promotormethylierung in Brustkrebsproben und Zysten des Ovars nachgewiesen haben. Des Weiteren führt die Behandlung von MB-Zelllinien aus der $Ptch^{neo12/+}$-Maus mit 5-Azacytidin zu einer Aktivierung der Transkription von *wtPtch* [Berman DM *et al.*, 2002] und die *in vitro*-Methylierung eines *Ptch*-Promotorkonstruktes verhindert dessen Transkription vollständig [Uhmann A *et al.*, 2005].

Die Reversibilität epigenetischer Mechanismen stellt einen vielversprechenden Ansatz in der Krebstherapie dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Tumorentstehung durch die Inhibierung der DNA-Methylierung und der Histondeacetylierung in $Ptch^{neo67/+}$-Mäusen verhindert werden kann. Zusätzlich wurde geprüft, ob eine epigenetische Reaktivierung des

wtPtch-Allels in voll ausgebildeten Tumoren der *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse möglich ist und ob diese Reaktivierung ausreicht, um den Hh-Signalweg in Tumoren zu inhibieren und so die Tumorprogression zu unterbinden. Zur Reaktivierung des epigenetisch ausgeschalteten *wtPtch*-Allels wurden das DNA-demethylierende Agenz 5-Aza und der HDAC-I VPA ausgewählt.

5.2.1 Behandlung von RMS-Zelllinien und RMS-Primärkulturen mit epigenetisch aktiven Substanzen inhibiert die Proliferation

Es liegen zahlreiche Studien vor, welche die Wirkung von 5-Aza und VPA auf das Proliferationsverhalten von Zelllinien charakterisieren. Beiden Substanzen wird die Induktion einer Proliferationsinhibierung und des Zellzyklusarrest zugeschrieben.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von 5-Aza und VPA getrennt und in Kombination auf die RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 untersucht. Die demethylierende Wirkung von 5-Aza auf die DNA der RMS-Zelllinie TP5014 konnte zweifelsfrei im Southern Blot nachgewiesen werden. 5 µM 5-Aza führten nach 72 h zu einer Proliferationseinbuße von etwa 20-30 % für beide Zelllinien. Im Vergleich zu den Ergebnissen aus anderen Untersuchungen war dieser Effekt moderat. Bereits 25 nM 5-Aza inhibieren die Proliferation von Leukämiezellen um ~28 % [Dore BT *et al.*, 1998]. Reu FJ *et al.* [2006] weisen für Nierenkarzinomzelllinien und Melanomazelllinien mit 400 nM 5-Aza eine Proliferationseinbuße von 90 bzw. 60 % nach und 2 µM 5-Aza senken die Proliferationsrate von Pankreaskrebszellen um 40-80 % [Missiaglia E *et al.*, 2005]. Die Inkubationszeiten der einzelnen Zelllinien mit 5-Aza sind dabei sehr variabel und liegen zwischen 96 h und 6 Tagen, was auf eine zelltypspezifische Wirkung von 5-Aza schließen lässt.

Dagegen hatte VPA (2 mM) als Einzelkomponente keinen Einfluss auf die Proliferation der RMS-Zelllinien. In vielen Modellsystemen, wie z. B. Glioblastomzellen [Bacon CL *et al.*, 1997], Brustkrebszellen [Olsen CM *et al.*, 2004], endometrialen Krebszelllinien [Takai N *et al.*, 2004] und Medulloblastomzelllinien [Li XN *et al.*, 2005] reicht bereits eine Konzentration ≤ 1 mM VPA aus, um das Zellwachstum zu inhibieren. Die maximal erreichbare Serumkonzentration beim Menschen liegt bei 1 mM [Loscher W, 2002]. Das bedeutet, dass ein *in vitro*-Einsatz von Konzentrationen >2 mM VPA klinisch keine relevanten Effekte mehr liefert.

Die Kombination der beiden Substanzen bewirkte keine Steigerung des antiproliferativen Effektes von 5-Aza. Diese Daten weisen darauf hin, dass nur 5-Aza effizient in der Lage ist das Wachstum der RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 zu inhibieren.

Die Unzulänglichkeiten von Zelllinien als Modell zum Testen von signalwegsspezifischen Krebstherapeutika wurden bereits erläutert (Kap. 5.1.2). Daher sind die Ergebnisse aus der *in vitro*-Behandlung der RMS-Zelllinien TP5014 und TP1588 kritisch zu betrachten. Beispielsweise ist bekannt, dass die Isolierung von Zellen aus ihrer natürlichen Umgebung auch eine Veränderung des epigenetischen Codes verursacht. Eine Reihe von Studien belegen eine exzessive Hypermethylierung von CpG-Inseln in Krebszelllinien gegenüber den ursprünglichen Tumoren [Antequera F *et al.*, 1990; Smiraglia DJ *et al.*, 2001]. Daher wurde der antiproliferative Effekt der epigenetischen Therapie zusätzlich an Primärkulturen von RMS verifiziert. Hierbei wurde ausschließlich die Kombination von 5-Aza/VPA verwendet. In diesem Modell wurde die Proliferation in einem weit stärkeren Maß (~65 %) inhibiert als in den RMS-Zelllinien. Dieses Ergebnis bekräftigt die Aussage, dass durch *in vitro*-Kultivierung der DNA-Methylierungsgrad von Zellen verändert wird und dass die Applikation von epigenetisch aktiven Substanzen ein vielversprechender Ansatz zur Therapie *Ptch*-assoziierter Tumoren ist.

5.2.2 Chemopräventiver Effekt von 5-Aza/VPA auf Tumoren von *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen

Der Einfluss einer epigenetischen Behandlung auf die Tumorentstehung und -progression in *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen wurde durch die prophylaktische Applikation von 5-Aza, VPA oder deren Kombination untersucht. Für (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse, die für RMS prädisponiert sind, bestand am Ende der Behandlung ein hoch signifikanter Unterschied in der Anzahl der tastbaren RMS zwischen den mit 5-Aza/VPA behandelten Tieren (6 %) und der Kontrollgruppe (46 %). Die Monotherapien bewirkten zwar eine Verlängerung der tumorfreien Überlebenszeit, dieser Effekt erreichte aber kein Signifikanzniveau.

Epigenetische Änderungen, die durch DNA-Methylierung und Histonmodifizierungen hervorgerufen werden, können nicht als einzelne voneinander unabhängige Ereignisse betrachtet werden. Es gibt immer mehr Belege, dass diese Prozesse sich gegenseitig beeinflussen. So fungieren methylierte Cytosine als Bindungsplattform für Proteine mit speziellen Methyl-CpG-Bindungsdomänen, wie z. B. MeCP2 [Jones PL *et al.*, 1998; Nan X *et al.*, 1998]. Diese Proteine sind wiederum häufig Komponenten von größeren chromatinmodifizierenden Komplexen und beinhalten auch Histondeacetylasen. Neben dieser indirekten Verbindung zwischen DNA-Methylierung und Histondeacetylierung ist für die Dnmt1 eine direkte Interaktion mit Histondeacetylasen *in vivo* nachgewiesen worden [Fuks F *et al.*, 2000]. So vermittelt die Methylierung von CpG-Dinukleotiden in der Promotorregion von Genen auch die Deacetylierung von Histonen und damit eine Verdichtung der Chromatinstruktur und letztendlich die Inhibie-

rung der Transkription. *Vice versa* kann durch Veränderungen im Histoncode der Methylierungsstatus von Promotoren verändert werden. So katalysiert beispielsweise EZH2 (e*nhancer of zeste homolog 2*), welches zu der Familie der Polycomb-Proteine (transkriptionelle Repressorproteine) gehört, die Methylierung von Histon H3 am Lysin 27 (H3K27). Diese Histonmodifizierung ist in der Lage alle drei Dnmt zu mobilisieren. Für eine Methylierung der Promotorregionen von EZH2-Zielgenen durch die Dnmt ist EZH2 unabdingbar [Vire E *et al.*, 2006]. Somit lässt sich der synergistische Effekt von DNA-demethylierenden Reagenzien und HDAC-I erklären. Shi H *et al.* [2003] zeigten, dass in einer humanen epithelialen Ovarienkrebszelllinie unter der Behandlung mit 5-Aza oder dem HDAC-I Trichostatin A 1,9 % bzw. 1,1 % der untersuchten Gene positiv reguliert wurden, während beim Einsatz der Kombinationstherapie 10,4 % der Gene verstärkt exprimiert wurden. Auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie zum chemopräventiven Potential von 5-Aza, VPA bzw. deren Kombination bekräftigen ein Szenario mit intensiven Wechselwirkungen zwischen DNA-Methylierung und Histonmodifizierungen, da nur mit der Kombinationstherapie ein signifikanter Effekt auf die tumorfreie Überlebenszeit beobachtet wurde. Dass eine Kombinationstherapie aus HDAC-I und DNA-Methyltransferase-Blockern effektiver ist als der Einsatz der Einzelsubstanzen, zeigen auch Daten von anderen Arbeitsgruppen z. B. Cameron EE *et al.* [1999], Zhu WG *et al.* [2001], Ghoshal K *et al.* [2002], Belinsky SA *et al.* [2003], Shaker S *et al.* [2003], Karam JA *et al.* [2007] und Venturelli S *et al.* [2007].

Obwohl fast alle (B6xBalb)-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse nach der Behandlung mit 5-Aza/VPA frei von makroskopischen RMS waren, wurden bei einigen Tieren im VCT kleine Tumorläsionen festgestellt. Ob diese Läsionen unter Therapie entstanden sind oder bereits im Alter von 4 Wochen vorhanden waren, ist schwer zu beurteilen. Eine genaue Bestimmung des Zeitpunktes der Tumorentstehung könnte klären, ob eine Behandlung mit 5-Aza/VPA die Tumorinitiierung oder aber die Tumorprogression von bereits vorhandenen Mikroläsionen inhibiert. Anhand des vorliegenden *Ptch*$^{neo67/+}$-Tumormodells kann diese Frage nicht abschließend geklärt werden. Es liefert aber Anhaltspunkte, dass DNA-Methylierungs- und Histondeacetylierungsprozesse eher in die Tumorinitiierung als in die Tumorprogression involviert sind. Diese Hinweise stammen aus der prophylaktischen Studie an B6-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen und aus der genetischen Studie mit *Dnmt1*-defizienten Mäusen.

Die prophylaktische Applikation von 5-Aza/VPA führte in B6-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen ebenfalls zu einer signifikant verlängerten Überlebenszeit. Die histologische Analyse der Kleinhirne der

zum Therapieabschluss symptomfreien Tiere ergab für alle untersuchten Gewebe proliferative Veränderungen in Form von MB-Vorläuferläsionen oder stillen MB.

In dem genetischen Ansatz wurden B6-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse mit *Dnmt1*$^{N/+}$-Mäusen, die eine Reduktion der Dnmt1-Aktivität von 50 % aufweisen [Li E *et al.*, 1992], gekreuzt und die Nachkommen auf das Auftreten von MB für 250 Tage beobachtet. Auch die genetische Reduzierung der endogenen Dnmt1-Aktivität führte in den Mäusen zu einer signifikant verlängerten tumorfreien Überlebenszeit. Die histologische Analyse der Kleinhirne der symptomfreien Tiere am Ende der Beobachtungszeit ergab für alle Tiere des Genotyps *Dnmt1*$^{+/+}$; *Ptch*$^{neo67/+}$ proliferative Veränderungen in Form von MB-Vorläuferläsionen oder stillen MB, wohingegen 13 % der Kleinhirne aus der *Dnmt1*$^{N/+}$; *Ptch*$^{neo67/+}$-Kohorte pathologisch vollkommen unauffällig waren (Kap. 4.3.6).

Die Ergebnisse aus der genetischen Studie mit den *Dnmt1*$^{N/+}$-Mäusen und den mit 5-Aza/VPA behandelten B6-*Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen weisen darauf hin, dass eine pränatale Beeinflussung epigenetischer Regulationsmechanismen die Initiierung von MB verhindert, während die postnatale Modulation nur die Progression inhibieren bzw. verlangsamen kann. Demnach könnte zumindest für *Ptch*-assoziierte MB eine Initiierung bereits während der Embryonalentwicklung angenommen werden.

5.2.3 Reaktivierung der *wtPtch*-Expression in *Ptch*-assoziierten RMS durch 5-Aza/VPA-Behandlung hat keinen Einfluss auf die Tumorprogression

Das Wachstum von klinisch manifesten bzw. makroskopisch sichtbaren RMS konnte durch eine 30-tägige Behandlung mit 5-Aza/VPA nicht aufgehalten werden. qRT-PCR Analysen zeigten jedoch, dass die Expression des *wtPtch*-Allels unter der epigenetischen Therapie signifikant erhöht wurde. Die direkte Abhängigkeit zwischen der Induktion der *wtPtch*-Expression und der Applikation von 5-Aza/VPA zeigte sich in der Reversion der Induktion während der Beobachtungsphase.

Die erhöhte *wtPtch*-Expression vermittelte keine allgemeine Inhibierung der Hh-Signalkaskade, da weder die *Gli1*- noch die *Δ67Ptch*-Transkription reprimiert wurde. Letzteres hätte man bei einer Attenuierung der Hh-Signalkaskade erwartet, da *Ptch* genauso wie *Gli1* ein Zielgen des Hh-Signalweges ist. Zur Veranschaulichung der *wtPtch*-Reaktivierung wurde das Verhältnis der Transkriptmengen von *Δ67Ptch* und *wtPtch* zwischen mit 5-Aza/VPA therapierten und unbehandelten Tieren verglichen. Dabei ergab sich unter

Therapie im RMS durch eine gesteigerte *wtPtch*-Expression bei gleichbleibender *Δ67Ptch*-Expression eine signifikante Reduktion des Quotienten. Dennoch konnte das Verhältnis wie es im normalen Muskel vorlag (~1:1), nicht erreicht werden. Dies könnte das stetige Tumorwachstum erklären.

Neben einer unzureichenden Inhibierung der Hh-Signalkaskade ist es auch möglich, dass die Tumorprogression unter epigenetischer Therapie Hh-unabhängig ist. Diese These wird durch die Daten aus der Cyclopaminstudie unterstützt (Kap. 5.1.5). Cyclopamin vermittelte zwar eine markante Repression der Aktivität der Hh-Signalkaskade in *Ptch*-assoziierten RMS, führte aber zu keiner Inhibierung des Tumorwachstums. Daher ist es denkbar, dass die Tumoren der $Ptch^{neo67/+}$-Mäuse im fortgeschrittenen Tumorstadium bereits weitere Mutationen angehäuft haben, die das Tumorwachstum unabhängig von der Hh-Signalkaskade steuern.

Die Sensitivität von Tumoren gegenüber epigenetischen Therapien in Abhängigkeit vom Tumorstadium ist auch in $Apc^{Min/+}$-Mäusen beobachtet worden. $Apc^{Min/+}$-Mäuse, die eine Mutation im Tumorsuppressorgen *Apc* tragen, entwickeln interstinale Neoplasien, deren Entstehung zeitlich genau charakterisiert ist [Yamada Y, Mori H, 2007]. Eine prophylaktische Behandlung der Tiere mit 5-Aza ab dem 7. Lebenstag über einen Zeitraum von 100 Tagen führt zu einer signifikanten Inhibierung der Polypenbildung. Ein verzögerter Behandlungsstart ab dem 50. Lebenstag, d. h. wenn die Mehrheit der Polypen bereits sichtbar ist, bewirkt keine Änderung der Polypeninzidenz im Vergleich zu unbehandelten Tieren [Laird PW *et al.*, 1995]. 5-Aza erweist sich somit als chemopräventiv wirksam, hat aber keinen therapeutischen Effekt auf bereits ausgebildete Polypen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Therapie mit 5-Aza/VPA von makroskopisch sichtbaren RMS in $Ptch^{neo67/+}$-Mäusen zu einer signifikanten Induktion der *wtPtch*-Expression führte, die aber keine Stagnation des Wachstums oder Regression der Tumoren vermittelte. Es bleibt zu klären, ob die Induktion der *wtPtch*-Expression unzureichend war, um das Tumorwachstum zu blockieren, oder ob voll ausgebildete *Ptch*-assoziierte Tumoren unabhängig vom Signalweg wachsen.

5.2.4 Untersuchung von Surrogatmarkern einer Therapie mit 5-Aza/VPA

Um einen Einblick in die Effektivität der hier eingesetzten Therapieschemata zu gewinnen, wurden auch die globalen Veränderungen des DNA-Methylierungsstatus und des Histoncodes in den behandelten Tieren untersucht.

Western Blot Analysen von mit VPA behandelten Geweben zeigten eine starke Acetylierung des Histons H4 im Vergleich zu Kontrollgeweben und stehen im Einklang mit diversen Untersuchungen, wie z. B. von Gottlicher M *et al.* [2001] und Phiel CJ *et al.* [2001].

5-Aza führt durch die kovalente Bindung von DNA-Methyltransferasen auch zur Demethylierung von CpG-Nukleotiden in repetitiven Elementen [Stempak JM *et al.*, 2005]. Dieser Effekt war in der RMS-Zelllinie TP5014 nach 5-Aza-Behandlung nachweisbar, jedoch nicht in Geweben von Tieren, die therapeutisch mit 5-Aza/VPA behandelt worden waren.

Weiterhin wird die Effektivität von epigenetischen Therapien häufig über die Expression von verschiedenen Surrogatmarkern wie bspw. *Dnmt1*, *Dnmt3a* und *p21* evaluiert.

5-Aza nimmt nicht nur Einfluss auf Proteinmenge und Aktivität der Dnmt1, sondern reguliert auch deren Transkription, wobei die Mechanismen hierfür noch nicht vollständig verstanden sind. So zeigen Schneider-Stock R *et al.* [2005] und Missiaglia E *et al.* [2005] eine Repression der Transkription der *Dnmt1* und *Dnmt3a* in Darm- und Pankreaskrebszelllinien nach 5-Aza-Behandlung. Dabei handelt es sich aber eher um sekundäre als um von 5-Aza direkt vermittelte Effekte.

Die Expressionslevel der *Dnmt1* und *Dnmt3a* wurden mittels qRT-PCR in unbehandelten Tumoren und Muskeln sowie in mit 5-Aza/VPA behandelten RMS und Skelettmuskeln untersucht. In keinem der untersuchten Tumoren waren die Methyltransferasen im Vergleich zum Muskel vermehrt exprimiert. Die Daten stehen zunächst im Gegensatz zu humanen RMS vom embryonalen Subtyp, für die eine durchschnittliche Steigerung der *Dnmt1*-Expression um das 6,7fache gegenüber dem Skelettmuskel nachgewiesen wurde [Chen B *et al.*, 1999]. Diese Diskrepanz ist unter Umständen durch Interspezies-Unterschiede erklärbar. Die Expressionslevel der *Dnmt1* und *Dnmt3a* wurden durch die 5-Aza/VPA-Behandlung nicht beeinflusst. Diese Daten schließen eine Einflussnahme von 5-Aza auf die Dnmt1 und die Dnmt3a jedoch nicht vollständig aus. Western Blot Analysen könnten klären, ob 5-Aza die Proteinmengen der Dnmt1 und Dnmt3a beeinflusst.

p21 wird sowohl von 5-Aza als auch von VPA in seiner Expression positiv reguliert [Catalano MG *et al.*, 2005; Schneider-Stock R *et al.*, 2005]. Die Mechanismen der epigenetischen Regulation der *p21*-Expression sind umstritten. Während in einigen Modellsystemen und humanen Tumoren der *p21*-Promotor methyliert vorliegt, wurde für viele Tumorentitäten und auch für Normalgewebe eine *p21*-Genregulation über Promotormethylierung widerlegt [Ying J *et al.*, 2004] und stattdessen der Deacetylierung von Histonen eine übergeordnete Rolle bei der

transkriptionellen Repression zugeschrieben [Archer SY *et al.*, 1998; Blagosklonny MV *et al.*, 2002]. So wird für alle HDAC-I eine Aktivierung der *p21*-Transkription bestätigt [Blagosklonny MV *et al.*, 2002]. Für einige Modellsysteme, in denen keine *p21*-Promotormethylierung vorliegt, ist eine Aktivierung von *p21* durch 5-Aza gezeigt worden. Scott SA *et al.* [2006] untersuchten diesen Mechanismus in AML-Zelllinien (Akute Myeloide Leukämie) und beschreiben die Freisetzung von HDAC1 und eine Zunahme der Acetylierung von Histon H3.

Wie in Kapitel 1.3.5 beschrieben, überexprimieren RMS der *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse im Vergleich zum Muskel *p21*. Dies könnte erklären, warum keine weitere Induktion der Transkription durch die Behandlung mit 5-Aza/VPA detektiert werden konnte. Interessanterweise wurde aber für das Kontrollgewebe Muskel unter 5-Aza/VPA-Behandlung eine gesteigerte *p21*-Expression ermittelt. Dies macht deutlich, dass epigenetisch wirksame Therapieansätze nicht ausschließlich und spezifisch auf Tumorzellen wirken, sondern auch die Genexpression im Normalgewebe beeinflussen können.

Zusätzlich wurden weitere Gene untersucht, für die eine epigenetische Regulation in Tumoren beschrieben worden ist und die unter der Behandlung mit DNA-Methyltransferase-Inhibitoren bzw. HDAC-I aktiviert werden (Kap. 4.3.5.2). Bis auf *Mageb2* waren alle untersuchten Markergene bereits in unbehandelten RMS stark exprimiert und es konnte eine epigenetische Repression dieser in RMS von *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen ausgeschlossen werden. *Mageb2* dagegen wurde im RMS nicht exprimiert. Die Expression von *Mageb2* wird im somatischen Gewebe, außer im Testis, durch Promotor-Hypermethylierung reguliert und die Demethylierung unter epigenetischer Therapie ist ein oft beobachteter Effekt [Lurquin C *et al.*, 1997; De Smet C *et al.*, 1999]. Die quantitative Analyse der *Mageb2*-Expression nach der Therapie mit 5-Aza/VPA ergab jedoch keine Aktivierung der Expression im RMS.

Auffällig war die differentielle Expression von *Mmp2*, *Wif1* und *Dapk1* im RMS und im MB. Während im MB keines der Gene exprimiert wurde, zeigte sich eine ausgeprägte Expression aller drei Gene im RMS. Da den Tumorentitäten die gleiche Mutation zugrunde liegt, sind die unterschiedlichen Expressionsprofile möglicherweise auf die unterschiedlichen Charakteristika der Tumorursprungszellen zurückzuführen.

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass die Wirksamkeit der 5-Aza/VPA-Behandlung an *Ptch*-assoziierten RMS durch Acetylierung des Histons H4 nachgewiesen werden konnte. Da die Acetylierung von Histonen in erster Linie durch VPA vermittelt wird, kann von einer aus-

reichenden Anflutung von VPA im Tumorgewebe ausgegangen werden. Es konnte aber kein spezifischer Surrogatmarker für die 5-Aza-Wirkung identifiziert werden. Hierfür kommen zwei Ursachen in Frage: A) Die untersuchten Marker sind für die Tumorentität nicht aussagekräftig oder B) die Dosierung von 5-Aza war nicht ausreichend, um die Genexpression im Tumorgewebe zu manipulieren.

Gegen A) würde die sorgfältige Auswahl der untersuchten Kandidatengene sprechen, für die entweder in mehreren Studien eine Reaktivierung unter epigenetischer Therapie belegt ist oder die speziell in pädiatrischen Tumoren untersucht wurden. So konnte z. B. gezeigt werden, dass die Expression von *Rassf1A* in embryonalen RMS durch Promotormethylierung reprimiert wird und dass eine Reaktivierung unter Therapie mit 5-Aza möglich ist [Harada K *et al.*, 2002].

Gegen B) spricht der starke chemopräventive Effekt von 5-Aza in der prophylaktischen Studie. Da es sich bei RMS um sehr gut durchblutete Tumoren handelt, kann davon ausgegangen werden, dass das Medikament den Tumor tatsächlich erreicht hat. Nicht sicher ist, ob das Medikament dann in die Tumorzelle aufgenommen bzw. nicht sofort wieder aus der Zelle exportiert wurde. Eine Möglichkeit dem nachzugehen sind vergleichende Arrayanalysen, mit denen die Expression von einer größeren Anzahl an Genen überprüft werden kann. Diese Analysen könnten entweder an nativem RMS-Material oder an Primärkulturen von *Ptch*-assoziierten RMS durchgeführt werden. Das Primärkulturmodell birgt dabei zwei entscheidende Vorteile gegenüber Microarrays mit Zelllinien und dem direkten Einsatz von Gewebeproben. Zum einen handelt es sich um Zellen, die dem ursprünglichen Tumor weit mehr gleichen als eine Zelllinie. Zum anderen ist es möglich, die Genexpressionsprofile ein und desselben Tumors vor und nach seiner Behandlung miteinander zu vergleichen. Dadurch werden Effekte von interindividuellen Unterschieden weitestgehend ausgeschlossen.

Abschließend sei angemerkt, dass auch in anderen Studien mit 5-Aza und VPA ein positiver Therapieeffekt festgestellt wurde, jedoch ein spezifischer Effekt der einzelnen Substanzen nicht über die Analyse der gewählten Surrogatmarker belegt werden konnte [Garcia-Manero G *et al.*, 2006; Soriano AO *et al.*, 2007].

5.2.5 Detektion einer möglicherweise regulatorisch wirksamen CpG-reichen Region im *Ptch*-Promotor

Um zu überprüfen, ob das *wtPtch*-Allel in Tumorgeweben von *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen tatsächlich durch Methylierung reprimiert wird und die Aktivierung der *wtPtch*-Expression unter Therapie mit 5-Aza/VPA auf die Demethylierung der *Ptch*-Promotorregion zurückzuführen ist, wurden CpG-reiche Abschnitte des Promotors nach der Behandlung mit Bisulfit sequenziert. Mittels Bisulfit-Sequenzierung kann der Methylierungsstatus jedes einzelnen Cytosins bestimmt werden. Dies ist eine äußerst sensitive, wenn auch zeitintensive Methode zur Aufklärung des Methylierungsstatus von Genen. Unter Nutzung der CpG-Insel-Definition nach Takai D, und Jones PA, [2002] (Kap. 1.3.2.1) wurden drei CpG-Inseln in der *Ptch*-Promotorregion definiert (Abb. 5). Vier der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten fünf CpG-reichen Regionen (A, D, F, L und i) liegen innerhalb dieser CpG-Inseln. Für diese Regionen wurde keine Methylierung im RMS und im Skelettmuskel festgestellt. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate von S. Tauber (AG Hahn), die den Methylierungsstatus für die Regionen A, D und F analysiert hat. In ihrer Arbeit wurde allerdings auf das Subklonieren der PCR-Fragmente verzichtet und stattdessen eine direkte Sequenzierung der PCR-Fragmente durchgeführt, bei der nur Methylierungsunterschiede >30 % detektiert werden können [Myohanen S *et al.*, 1994].

Im Gegensatz zu den Fragmenten A, D, F und L weist das Fragment i, welches 99 bp stromabwärts der zweiten Gli-Bindungsstelle liegt [Nagao K *et al.*, 2005] und damit zu keiner der definierten CpG-Inseln zählt, eine substantielle Methylierung sowohl im RMS als auch im Skelettmuskel auf. Um das regulatorische Potential der Methylierung dieser CpG-reichen Region zu analysieren, wurde ihr Methylierungsstatus im RMS und im Muskel einer mit 5-Aza behandelten Maus untersucht. Die Bisulfit-Sequenzierung ergab nur für die CpG-Dinukleotide 5 und 9 des Fragmentes i unter 5-Aza-Behandlung eine signifikante Demethylierung im Vergleich zu unbehandeltem Tumorgewebe. Die erwartete differentielle Methylierung des *wtPtch*-Allels und des *Δ67Ptch*-Allels im Tumorgewebe erschwert die Detektion der Wirkung von 5-Aza auf den *Ptch*-Promotor. Deshalb ist für eine abschließende Analyse des regulatorischen Potentials der Region i des *Ptch*-Promotors die Bisulfit-Sequenzierung weiterer 5-Aza/VPA-behandelter Tumoren Voraussetzung.

Da in dieser Arbeit keine vollständige Sequenzierung des *Ptch*-Promotors vorgenommen wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Methylierung von CpG-Dinukleotiden in anderen nicht untersuchten Bereichen entscheidend zur Repression der *wtPtch*-Expression beiträgt. Es existiert keine exakte Definition der regulatorisch wirksamen CpG-Dinukleotide des *PTCH*-Promotors. Studien, die eine Methylierung von *PTCH* für humane Tumorentitäten

beschreiben, identifizieren unterschiedliche CpG-reiche Regionen, die für die epigenetische Regulation verantwortlich sind. Wolf I *et al.* [2007] detektierten eine substantielle Methylierung des *PTCH*-Promotors in Brustkrebsproben etwa 250 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts von Exon 1B, die durch eine Behandlung mit 5-Aza demethyliert werden. In Ovarialzysten wurde eine Region bis 1000 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts von Exon 1B untersucht und im Bereich der Gli-Bindungsstellen (etwa -700 bp) methylierte CpG-Dinukleotide detektiert [Cretnik M *et al.*, 2007]. Für MB und BCC wiederum konnten Pritchard JI und Olson JM [2008] sowie Cretnik M *et al.* [2007] keine Methylierung in diesem Bereich feststellen. Die vier *PTCH*-Transkripte unterscheiden sich in ihrem ersten Exon und werden durch verschiedene Promotoren reguliert [Kogerman P *et al.*, 2002]. Dies erschwert die Identifizierung von regulatorisch wirksamen CpG-reichen Regionen und kann eine Ursache für die Differenzen in den unterschiedlichen Studien sein.

5.2.6 Untersuchung des Aktivitätsstatus des Hh-Signalweges in MB-Vorläuferläsionen und asymptomatischen MB nach Behandlung mit 5-Aza/VPA oder genetischer Reduktion der Dnmt1-Aktivität

Die durchgeführten *wtPtch*- und *Gli1-in situ*-Hybridisierungen von Kleinhirnen, MB-Vorläuferläsionen, asymptomatischen und symptomatischen MB sollten Aufschluss über den Aktivitätsstatus und somit die Bedeutung der Hh-Signalkaskade in den einzelnen Stadien der MB-Entwicklung geben. Es wurden Kleinhirne von $Dnmt1^{N/+}$, $Ptch^{neo67/+}$-Tieren, von mit 5-Aza/VPA behandelten $Ptch^{neo67/+}$-Tieren und von unbehandelten Tieren analysiert. Ein Vergleich sollte zeigen, ob die Reaktivierung der *wtPtch*-Expression bzw. die Attenuierung der Aktivität der Hh-Signalkaskade unmittelbar mit der verminderten Progression der Tumoren in mit 5-Aza/VPA behandelten Tieren und in $Dnmt1^{N/+}$, $Ptch^{neo67/+}$-Mäusen in Verbindung steht.

Die *67Ptch*-Sonde lieferte ein starkes Signal in allen untersuchten MB, nicht aber in den Körnerzellen der Bergman Glia Dies führte zu der Annahme, dass die Ergebnisse der *in situ*-Hybridisierung mit der *67Ptch*-Sonde nicht verlässlich waren.

Die Hybridisierungen mit der *Gli1*-Sonde ergaben sowohl für die asymptomatischen als auch die symptomatischen MB eine starke Aktivität der Hh-Signalkaskade und zwar unabhängig vom Genotyp und der Behandlung. Die MB-Vorläuferläsionen in mit 5-Aza/VPA behandelten Tieren und $Dnmt1^{N/+}$, $Ptch^{neo67/+}$-Tieren wiesen keine *Gli1*-Expression auf, was bedeuten

kann, dass die Hh-Signalkaskade in diesen Zellen tatsächlich nicht aktiv war. Über den Expressionsstatus von *Gli1* in den Vorläuferläsionen der *Ptch*$^{neo67/+}$-Tiere konnte leider keine eindeutige Aussage getroffen werden. In einer anderen Studie wurden jedoch die Kleinhirne von *Ptch*$^{neo12/+}$-Mäusen untersucht [Oliver TG *et al.*, 2005]. Dort wurden in den Kleinhirnen von jungen Mäusen Körnerzellprogenitoren detektiert, die bei der Migration aus der äußeren in die innere Körnerzellschicht in der Molekularis verbleiben und wahrscheinlich MB-Vorläuferzellen darstellen. Das Expressionsprofil dieser Vorläufer ähnelte dem von MB-Zellen und ist durch eine starke Expression von *Gli1* gekennzeichnet.

Dies legt folgende Schlussfolgerung nah: Es ist anzunehmen, dass in Analogie zu *Ptch*$^{neo12/+}$-Mäusen auch die MB-Vorläuferläsionen von *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen eine Aktivierung der Hh-Signalkaskade zeigen. In MB-Vorläuferzellen der mit 5-Aza/VPA behandelten *Ptch*$^{neo67/+}$- und der *Dnmt1*$^{N/+}$, *Ptch*$^{neo67/+}$-Tiere ist die Hh-Signalkaskade dagegen nicht aktiv. Letzteres kann durch die epigenetische Regulation der *wtPtch*-Expression bedingt sein und dazu beitragen, dass diese Läsionen sich nicht in einen voll ausgebildeten Tumor weiterentwickeln können. Um dies eindeutig zu belegen, müssten die Beobachtungen mit einer weiteren experimentellen Methode z. B. mit Ki67-Färbungen oder qRT-PCR Analysen an makrodissektierten Vorläuferzellen belegt werden.

In allen voll ausgebildeten MB war die Hh-Signalkaskade dagegen aktiv und es waren keine Unterschiede zwischen den einzelnen Kohorten zu detektieren. Dies bedeutet, dass die 5-Aza/VPA-Behandlung oder der heterozygote *Dnmt1*-Verlust auf Dauer nicht ausreichend sind, um die Aktivität der Hh-Signalkaskade anhaltend in den MB-Vorläuferzellen zu hemmen und eine Progression zu MB zu verhindern. Dies könnte durch eine zu geringe Dosierung der epigenetisch aktiven Substanzen bzw. eine Kompensation des *Dnmt1*-Verlustes durch andere DNA-Methyltransferasen bedingt sein.

5.3 Doxorubicin inhibiert das Wachstum von *Ptch*-assoziierten RMS

Das Anthrazyklin Doxorubicin wird zur Therapie von Leukämien, Lymphomen und einer Reihe solider Tumoren wie RMS eingesetzt. Es inhibiert die Topoisomerase II, interkaliert in DNA und führt so zur Entspiralisierung der DNA und zu Doppelstrangbrüchen und verhindert letztlich die Replikation [Rabbani A *et al.*, 2005]. Darüber hinaus greift Doxorubicin in apoptotische Vorgänge ein und vermittelt die Freisetzung zellschädigender Radikale [Minotti G *et*

al., 2004]. Zusammengefasst bedeutet dies, dass Doxorubicin einen allgemein zytotoxischen Effekt vor allem auf proliferierendes Gewebe ausübt.

Die RMS der *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäuse sprachen mit einer Inhibierung des Wachstums auf die Behandlung mit Doxorubicin an. Eine vollständige Regression der Tumoren war jedoch mit der verwendeten Dosis von 4x 3 mg/kg KG nicht zu beobachten. Es ist jedoch anzunehmen, dass eine Tumorregression mit höheren Dosen des Medikamentes erzielt werden kann. Falls das zutreffen sollte, könnte versucht werden Doxorubicin in Kombination mit signalwegsspezifischen Krebstherapeutika einzusetzen. Dieser Ansatz ist für *Ptch*-assoziierte Tumoren besonders interessant, da sich diese, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, durch eine alleinige Inhibierung der Hh-Signalkaskade nicht im Wachstum hemmen lassen. Im Rahmen eines solchen Therapieschemas könnte Doxorubicin als Induktionstherapie für die Inhibierung des Tumorwachstums und die Reduktion der Tumormasse verwendet werden. Als Konsolidierungstherapie könnte dann eine zweite Medikation wie beispielsweise 5-Aza/VPA zur vollständigen Eliminierung des Tumors eingesetzt werden.

5.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Hh-Signalkaskade ist in vielen Tumoren aufgrund von *Ptch*-Mutationen konstitutiv aktiviert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei neue Therapieansätze für *Ptch*-assoziierte RMS und MB im *Ptch*$^{neo67/+}$-Mausmodell untersucht. Bei diesen Ansätzen wurden Cyclopamin, ein spezifischer Inhibitor des Hh-Signalweges, und die epigenetisch aktiven Substanzen 5-Aza und VPA eingesetzt.

Die chemopräventive Wirkung von Cyclopamin auf *Ptch*-assoziierte Tumoren wurde bereits in Studien anderer Labore belegt. Der Nachweis der Wirksamkeit des Alkaloids gegenüber voll ausgebildeten, endogenen Tumoren fehlte jedoch bisher. Die Daten der vorliegenden Studie zeigen, dass eine lokale Behandlung mit Cyclopamin zwar eine Hemmung der Hh-Signalkaskade bewirkte, jedoch keinen Effekt auf das Tumorwachstum hatte.

Die Tumorigenese im *Ptch*$^{neo67/+}$-Mausmodell geht mit einer Inaktivierung des *wtPtch*-Allels einher, wodurch die Tumoren einen biallelischen Verlust von *Ptch* aufweisen. In einem zweiten Therapieansatz sollte daher mittels der epigenetisch wirksamen Substanzen 5-Aza/VPA eine Reaktivierung der *wtPtch*-Expression erreicht werden, was zur Attenuierung der Aktivität der Hh-Signalkaskade führen und damit das Tumorwachstum stoppen sollte. Eine Behand-

lung von jungen, tumorfreien *Ptch*$^{neo67/+}$-Mäusen mit 5-Aza/VPA führte tatsächlich zu einer signifikant verlängerten tumorfreien Überlebenszeit der Mäuse. Ein ähnliches Ergebnis wurde durch die verminderte endogene Expression der *Dnmt1* erzielt. Obwohl ein Therapieversuch von klinisch manifesten, voll ausgebildeten Tumoren mit den Substanzen fehlschlug, konnte die Expression von *wtPtch* in diesen Tumoren reaktiviert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei *Ptch* tatsächlich um ein epigenetisch reguliertes Gen handelt und dass eine epigenetische Therapie zur Prophylaxe von *Ptch*-assoziierten Tumoren eingesetzt werden kann. Dagegen zeigten sich klinisch manifeste Tumoren resistent gegenüber einer epigenetischen Behandlung.

Die Daten aus den Cyclopamin- und 5-Aza/VPA-Studien lassen somit vermuten, dass zielgerichtete Therapien gegen *Ptch*-assoziierte Tumoren nur dann wirksam sind, solange sich die Tumoren in einem sehr frühen Stadium befinden. Während ihrer Progression werden die Tumoren zunehmend resistent gegen eine zielgerichtete Therapie, was auf die Aktivität anderer Signalwege in den fortgeschrittenen Tumorstadien hinweist. Für diese Hypothese spricht auch die Tatsache, dass eine konventionelle Chemotherapie mit dem Topoisomerase-Hemmer Doxorubicin die Progression von *Ptch*-assoziierten Tumoren effizient hemmt. Durch dieses Medikament wird die DNA-Replikation blockiert, nicht aber die Aktivität der Hh-Signalkaskade reguliert. Aufgrund dieser Daten sollte es möglich sein, eine effiziente antitumorale Wirkung gegen *Ptch*-assoziierte Tumoren durch die Kombination von Doxorubicin mit einer zielgerichteten Therapie hervorzurufen. Hierbei würden die Tumoren im Rahmen einer Induktionstherapie zunächst hochdosiert mit Doxorubicin behandelt werden, um den Großteil der Tumorzellen zu eliminieren. Im Anschluss würde versucht werden, die verbleibenden Zellen, aus denen sich wieder neue Tumoren entwickeln können, im Rahmen einer Konsolidierungstherapie mit einem signalwegspezifischen Medikament zu bekämpfen. Ob ein solcher Ansatz wirksam ist, könnte im *Ptch*$^{neo67/+}$-Mausmodell überprüft werden.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

½ MTD	Hälfte der maximal tolerierten Dosis
^{32}P	radioaktives Phosphorisotop
5-Aza	5-Aza-2´-Deoxycytidin
5-mC	5-Methylcytosin
Δ67Ptch	mutantes *Ptch*
AKT	*protein kinase B* (auch PKB)
AML	Akute Myeloide Leukämie
AP	alkalische Phosphatase
Apaf-1	*apoptosis protease-activating factor-1*
Apc	*adenomatous polyposis of the colon*
APS	Ammoniumpersulfatlösung
BCA	2,2´-Bicinchoninsäure
BCC	Basalzellkarzinom (engl. *basal cell carcinoma*)
Bcl-2	*B-cell leukemia/lymphoma-2*
BrdU	Bromdesoxyuridin
BS	Bindungsstelle
BSA	Rinderserumalbumin (engl. *bovine serum albumine*)
C	Nukleinsäurekonzentration
c	Nukleinsäurespezifische Koeffizient
CDK-I	cyclinabhängige Kinase-Inhibitoren
cDNA	engl. *copy DNA*
Ci	*Cubitus interuptus*
cMTD	kombinierte maximal tolerierte Dosis
CMV	Cytomegalievirus
Cos2	*costal2*
d	Tag
DAB	3,3’ Diaminobenzidine
Dapi	4`6-Diamino-2-Phenylindiol
Dapk1	death associated protein kinase-1
DB	Dor Blot

dCTP	Deoxycytosintriphosphat
ddH2O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxygenin
DMEM	Dulbecco`s Modiefied Eagle Medium
DMSO	N.N.-Dimethylsulfoxid
Dnmt	DNA-Methyltransferase
dNTPs	Deoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithhiotreitol
E	Extinktion
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EGL	äußere granuläre Schicht (engl. *external granule laye*r)
EZH2	*enhancer of zeste homolog 2*
f	Verdünnungsfaktor
FAM	6-Carboxy-Fluorescin
FCS	fötales Kälberserum (engl. *fetal calf serum*)
FKHR	*fork head box O1*
Fu	*fused*
G418	Geneticinsulfat 418
Gapd	Glycerinaldehyd-3-Phosphatase-Dehydrogenase
GCP	Körnerzellprogenitoren (engl. *granule cell precursor*)
Gli	*glioma-associated oncogene homolog*
GSK3b	Glycogensynthase-Kinase 3β
H	Histon
HAT	Histonacetyltransferase
HBC	45 % 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin/PBS
HDAC	Histondeacetylasen
HDAC-I	Histondeacetylase-Inhibitor
HE	Hämalaun und Eosin Färbung
Hek	humane embryonale Nierenzelllinie (engl. *human embryonal kidney cells*)
Hh	*hedgehog*
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl. *horse radish peroxidase*)

i. p.	intraperitoneal
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
IF	Immunfluoreszenz
Igf2	*insulin-like growth factor 2*
Igfbp3	*insulin-like growth factor binding protein 3*
IGL	innere Körnerzellschicht (engl. *internal granual layer*)
IHC	Immunhistochemie
Ink4a	*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (auch CDKN2A oder p16)
KAAD	3-Keto-N-aminoethyl-N'-Aminocaproyldihydrocinnamoyl-Cyclopamin
KG	Körpergewicht
Kif5c	*kinesin family member 5c*
LB	engl. *lysogeny broth*
LINE	engl. *long interspersed nuclear elements*
LOH	Verlust der Heterozygotie (engl. *loss of heterozygosity*)
m	murin
Mageb2	Melanoma Antigen Familie B, 2
MAPK	*mitogen-activated protein kinase*
MB	Medulloblastom
MeCP	Methyl-CpG-Bindungsprotein
Mef2c	*myocyte enhancer factor 2c*
MGB	engl. *minor groove binde*r
MGI	Mouse Genome Informatics
MHC1	*myosin heavy chain 1*
Mmp2	Matrix-Metallopeptidase 2
mRNA	engl. *messenger RNA*
MTD	maximal tolerierte Dosis
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mut	mutant
Myf6	*myogenic factor 6*, MRF4 oder Herculin
n	Anzahl
NaVA	Natriumvanadat
NBCCS	Nävoides Basalzell-Karzinom oder Gorlin-Syndrom (engl. *nevoid basal cell carcinoma*

	syndrome)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
neo	Neomycin
NRAS	*neuroblastoma ras viral oncogene homolog*
nu	*nude*
p	Signifikanzniveau
pAT	primerspezifische Anlagerungstemperatur
PAX	*paired box gene O1*
PBS	phosphatgepufferte Natriumchlorid Lösung
PBST	phosphatgepufferte Natriumchlorid Lösung mit Tween20
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*)
PFA	Paraformaldehyd
pMR	engl. *plasmid mouse repetitive*
PNET	primitiver neuroektodermaler Tumor
Ptch	*patched*
PVDF	Polyvinylidenfluorid
q	quantitativ
qRT-PCR	quantitative *real tim*e PCR
Rassf1A	*ras association domain familyprotein 1A*
Rb	*retinoblastom*
RLU	relative Lichteinheiten (engl. *relative light units)*
RMS	Rhabdomyosarkom
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
Shh	*sonic hedgehog*
Shh-N	aminoterminale Region von Shh
SM	Skelettmuskel
Smo	*smoothened*
Socs 3	*suppressor of cytokine signalling 3*
SuFu	*suppressor of fused*
Taq	*Thermus aquaticus*
TBS	Tris-gepufferte Natriumchloridlösung (engl. *tris-buffered saline*)

TK	Thymidinkinase
TRITC	Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate
tyr	*tyrosinase*
VCT	Volumencomputertomographie
VPA	Valproinsäure
WB	Western Blot
Wifl	*WNT inhibitory factor 1*
Wnt	*wingless*
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-Galaktosid

7 LITERATURVERZEICHNIS

Anderson J, Gordon A, Pritchard-Jones K, Shipley J; 1999: Genes, chromosomes, and rhabdomyosarcoma, *Genes Chromosomes Cancer*, 26 (4); 275-85.

Antequera F, Boyes J, Bird A; 1990: High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines, Cell, 62 (3); 503-14.

Archer SY, Meng S, Shei A, Hodin RA; 1998: p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (12); 6791-6.

Armeanu S, Pathil A, Venturelli S, Mascagni P, Weiss TS, Gottlicher M, Gregor M, Lauer UM, Bitzer M; 2005: Apoptosis on hepatoma cells but not on primary hepatocytes by histone deacetylase inhibitors valproate and ITF2357, *J Hepatol*, 42 (2); 210-7.

Aszterbaum M, Epstein J, Oro A, Douglas V, LeBoit PE, Scott MP, Epstein EH, Jr.; 1999: Ultraviolet and ionizing radiation enhance the growth of BCCs and trichoblastomas in patched heterozygous knockout mice, *Nat Med*, 5 (11); 1285-91.

Athar M, Li C, Tang X, Chi S, Zhang X, Kim AL, Tyring SK, Kopelovich L, Hebert J, Epstein EH, Jr., Bickers DR, Xie J; 2004: Inhibition of smoothened signaling prevents ultraviolet B-induced basal cell carcinomas through regulation of Fas expression and apoptosis, *Cancer Res*, 64 (20); 7545-52.

Bachman KE, Park BH, Rhee I, Rajagopalan H, Herman JG, Baylin SB, Kinzler KW, Vogelstein B; 2003: Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene, *Cancer Cell*, 3 (1); 89-95.

Bacon CL, O'Driscoll E, Regan CM; 1997: Valproic acid suppresses G1 phase-dependent sialylation of a 65kDa glycoprotein in the C6 glioma cell cycle, *Int J Dev Neurosci*, 15 (6); 777-84.

Baker MJ, Brem S, Daniels S, Sherman B, Phuphanich S; 2002: Complete response of a recurrent, multicentric malignant glioma in a patient treated with phenylbutyrate, *J Neurooncol*, 59 (3); 239-42.

Bar EE, Chaudhry A, Farah MH, Eberhart CG; 2007: Hedgehog signaling promotes medulloblastoma survival via Bc/II, *Am J Pathol*, 170 (1); 347-55.

Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM; 2004: Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis, *Nature*, 432 (7015); 324-31.

Belinsky SA, Klinge DM, Stidley CA, Issa JP, Herman JG, March TH, Baylin SB; 2003: Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer, *Cancer Res*, 63 (21); 7089-93.

Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN, Chen JK, Cooper MK, Taipale J, Olson JM, Beachy PA; 2002: Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade, *Science*, 297 (5586); 1559-61.

Bigelow RL, Chari NS, Unden AB, Spurgers KB, Lee S, Roop DR, Toftgard R, McDonnell TJ; 2004: Transcriptional regulation of bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through gli-1, *J Biol Chem*, 279 (2); 1197-205.

Binns W, Shupe JL, Keeler RF, James LF; 1965: Chronologic evaluation of teratogenicity in sheep fed Veratrum californicum, *J Am Vet Med Assoc*, 147 (8); 839-42.

Blagosklonny MV, Robey R, Sackett DL, Du L, Traganos F, Darzynkiewicz Z, Fojo T, Bates SE; 2002: Histone deacetylase inhibitors all induce p21 but differentially cause tubulin acetylation, mitotic arrest, and cytotoxicity, *Mol Cancer Ther*, 1 (11); 937-41.

Bowden CL; 2003: Acute and maintenance treatment with mood stabilizers, *Int J Neuropsychopharmacol*, 6 (3); 269-75.

Brand WN, Schneider PA, Tokars RP; 1987: Long-term results of a pilot study of low dose cranial-spinal irradiation for cerebellar medulloblastoma, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 13 (11); 1641-5.

Bridge JA, Liu J, Weibolt V, Baker KS, Perry D, Kruger R, Qualman S, Barr F, Sorensen P, Triche T, Suijkerbuijk R; 2000: Novel genomic imbalances in embryonal rhabdomyosarcoma revealed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization: an intergroup rhabdomyosarcoma study, *Genes Chromosomes Cancer*, 27 (4); 337-44.

Brown R, Strathdee G; 2002: Epigenomics and epigenetic therapy of cancer, *Trends Mol Med*, 8 (4 Suppl); S43-8.

Cabane C, Englaro W, Yeow K, Ragno M, Derijard B; 2003: Regulation of C2C12 myogenic terminal differentiation by MKK3/p38alpha pathway, *Am J Physiol Cell Physiol*, 284 (3); C658-66.

Calzada-Wack J, Kappler R, Schnitzbauer U, Richter T, Nathrath M, Rosemann M, Wagner SN, Hein R, Hahn H; 2002: Unbalanced overexpression of the mutant allele in murine Patched mutants, *Carcinogenesis*, 23 (5); 727-33.

Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB; 1999: Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer, *Nat Genet*, 21 (1); 103-7.

Cantor JP, Iliopoulos D, Rao AS, Druck T, Semba S, Han SY, McCorkell KA, Lakshman TV, Collins JE, Wachsberger P, Friedberg JS, Huebner K; 2007: Epigenetic modulation of endogenous tumor suppressor expression in lung cancer xenografts suppresses tumorigenicity, *Int J Cancer*, 120 (1); 24-31.

Capdevila J, Pariente F, Sampedro J, Alonso JL, Guerrero I; 1994: Subcellular localization of the segment polarity protein patched suggests an interaction with the wingless reception complex in Drosophila embryos, *Development*, 120 (4); 987-98.

Casciano I, Banelli B, Croce M, De Ambrosis A, di Vinci A, Gelvi I, Pagnan G, Brignole C, Allemanni G, Ferrini S, Ponzoni M, Romani M; 2004: Caspase-8 gene expression in neuroblastoma, *Ann N Y Acad Sci*, 1028 157-67.

Catalano MG, Fortunati N, Pugliese M, Costantino L, Poli R, Bosco O, Boccuzzi G; 2005: Valproic acid induces apoptosis and cell cycle arrest in poorly differentiated thyroid cancer cells, *J Clin Endocrinol Metab*, 90 (3); 1383-9.

Chapman V, Forrester L, Sanford J, Hastie N, Rossant J; 1984: Cell lineage-specific undermethylation of mouse repetitive DNA, *Nature*, 307 (5948); 284-6.

Chen B, Liu X, Savell VH, Dilday BR, Johnson MW, Jenkins JJ, Parham DM; 1999: Increased DNA methyltransferase expression in rhabdomyosarcomas, *Int J Cancer*, 83 (1); 10-4.

Chen JK, Taipale J, Cooper MK, Beachy PA; 2002: Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened, *Genes Dev*, 16 (21); 2743-8.

Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA; 1996: Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function, *Nature*, 383 (6599); 407-13.

Christoph F, Kempkensteffen C, Weikert S, Kollermann J, Krause H, Miller K, Schostak M, Schrader M; 2006: Methylation of tumour suppressor genes APAF-1 and DAPK-1 and in vitro effects of demethylating agents in bladder and kidney cancer, *Br J Cancer*, 95 (12); 1701-7.

Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, Radovanovic I, Ruiz i Altaba A; 2007: HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity, *Curr Biol*, 17 (2); 165-72.

Cohen MM, Jr.; 2003: The hedgehog signaling network, *Am J Med Genet A*, 123 (1); 5-28.

Cooper MK, Porter JA, Young KE, Beachy PA; 1998: Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling, *Science*, 280 (5369); 1603-7.

Corcoran RB, Scott MP; 2001: A mouse model for medulloblastoma and basal cell nevus syndrome, *J Neurooncol*, 53 (3); 307-18.

Cormier RT, Dove WF; 2000: Dnmt1N/+ reduces the net growth rate and multiplicity of intestinal adenomas in C57BL/6-multiple intestinal neoplasia (Min)/+ mice independently of p53 but demonstrates strong synergy with the modifier of Min 1(AKR) resistance allele, *Cancer Res*, 60 (14); 3965-70.

Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomaki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A,

Nishikawa R, Su Huang H, Petrelli NJ, Zhang X, O'Dorisio MS, Held WA, Cavenee WK, Plass C; 2000: Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns, *Nat Genet*, 24 (2); 132-8.

Cretnik M, Musani V, Oreskovic S, Leovic D, Levanat S; 2007: The Patched gene is epigenetically regulated in ovarian dermoids and fibromas, but not in basocellular carcinomas, *Int J Mol Med*, 19 (6); 875-83.

Dagher R, Helman L; 1999: Rhabdomyosarcoma: an overview, *Oncologist*, 4 (1); 34-44.

Dakubo GD, Mazerolle CJ, Wallace VA; 2006: Expression of Notch and Wnt pathway components and activation of Notch signaling in medulloblastomas from heterozygous patched mice, *J Neurooncol*, 79 (3); 221-7.

Dalton WS; 1999: The tumor microenvironment as a determinant of drug response and resistance, *Drug Resist Updat*, 2 (5); 285-288.

Danaee H, Karagas MR, Kelsey KT, Perry AE, Nelson HH; 2006: Allelic loss at Drosophila patched gene is highly prevalent in Basal and squamous cell carcinomas of the skin, *J Invest Dermatol*, 126 (5); 1152-8.

De Smet C, Lurquin C, Lethe B, Martelange V, Boon T; 1999: DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter, *Mol Cell Biol*, 19 (11); 7327-35.

Denef N, Neubuser D, Perez L, Cohen SM; 2000: Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothened, *Cell*, 102 (4); 521-31.

Detich N, Bovenzi V, Szyf M; 2003: Valproate induces replication-independent active DNA demethylation, *J Biol Chem*, 278 (30); 27586-92.

Dickerman JD; 2007: The late effects of childhood cancer therapy, *Pediatrics*, 119 (3); 554-68.

Dore BT, Chomienne C, Momparler RL; 1998: Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine and vitamin D3 analogs on growth and differentiation of human myeloid leukemic cells, *Cancer Chemother Pharmacol*, 41 (4); 275-80.

Dotto GP; 2000: p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta*, 1471 (1); M43-56.

Duenas-Gonzalez A, Candelaria M, Perez-Plascencia C, Perez-Cardenas E, de la Cruz-Hernandez E, Herrera LA; 2008: Valproic acid as epigenetic cancer drug: Preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors, *Cancer Treat Rev*, 34 (3); 206-22.

Dullin C, Missbach-Guentner J, Vogel WF, Grabbe E, Alves F; 2007: Semi-automatic classification of skeletal morphology in genetically altered mice using flat-panel volume computed tomography, *PLoS Genet*, 3 (7); e118.

Dunn BK; 2003: Hypomethylation: one side of a larger picture, *Ann N Y Acad Sci*, 983 28-42.

Eads CA, Nickel AE, Laird PW; 2002: Complete genetic suppression of polyp formation and reduction of CpG-island hypermethylation in Apc(Min/+) Dnmt1-hypomorphic Mice, *Cancer Res*, 62 (5); 1296-9.

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); 361-72.

Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, Rakyan VK, Attwood J, Burger M, Burton J, Cox TV, Davies R, Down TA, Haefliger C, Horton R, Howe K, Jackson DK, Kunde J, Koenig C, Liddle J, Niblett D, Otto T, Pettett R, Seemann S, Thompson C, West T, Rogers J, Olek A, Berlin K, Beck S; 2006: DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22, *Nat Genet*, 38 (12); 1378-85.

Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R; 2003: Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation, *Science*, 300 (5618); 455.

Ehrlich M; 2002: DNA methylation in cancer: too much, but also too little, *Oncogene*, 21 (35); 5400-13.

El-Badry OM, Minniti C, Kohn EC, Houghton PJ, Daughaday WH, Helman LJ; 1990: Insulin-like growth factor II acts as an autocrine growth and motility factor in human rhabdomyosarcoma tumors, *Cell Growth Differ*, 1 (7); 325-31.

Esteller M; 2008: Epigenetics in cancer, *N Engl J Med*, 358 (11); 1148-59.

Esteller M, Fraga MF, Guo M, Garcia-Foncillas J, Hedenfalk I, Godwin AK, Trojan J, Vaurs-Barriere C, Bignon YJ, Ramus S, Benitez J, Caldes T, Akiyama Y, Yuasa Y, Launonen V, Canal MJ, Rodriguez R, Capella G, Peinado MA, Borg A, Aaltonen LA, Ponder BA, Baylin SB, Herman JG; 2001: DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis, *Hum Mol Genet*, 10 (26); 3001-7.

Evans AE, Jenkin RD, Sposto R, Ortega JA, Wilson CB, Wara W, Ertel IJ, Kramer S, Chang CH, Leikin SL, et al.; 1990: The treatment of medulloblastoma. Results of a prospective randomized trial of radiation therapy with and without CCNU, vincristine, and prednisone, *J Neurosurg*, 72 (4); 572-82.

Evans DG, Ladusans EJ, Rimmer S, Burnell LD, Thakker N, Farndon PA; 1993: Complications of the naevoid basal cell carcinoma syndrome: results of a population based study, *J Med Genet*, 30 (6); 460-4.

Evans DG, Farndon PA, Burnell LD, Gattamaneni HR, Birch JM; 1991: The incidence of Gorlin syndrome in 173 consecutive cases of medulloblastoma, *Br J Cancer*, 64 (5); 959-61.

Fahrner JA, Eguchi S, Herman JG, Baylin SB; 2002: Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer, *Cancer Res*, 62 (24); 7213-8.

Feinberg AP, Vogelstein B; 1983: Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts, *Nature*, 301 (5895); 89-92.

Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, Bedja D, Beaty R, Mullendore M, Karikari C, Alvarez H, Iacobuzio-Donahue C, Jimeno A, Gabrielson KL, Matsui W, Maitra A; 2007: Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers, *Cancer Res*, 67 (5); 2187-96.

Frank-Kamenetsky M, Zhang XM, Bottega S, Guicherit O, Wichterle H, Dudek H, Bumcrot D, Wang FY, Jones S, Shulok J, Rubin LL, Porter JA; 2002: Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothened agonists and antagonists, *J Biol*, 1 (2); 10.

Fredericks WJ, Galili N, Mukhopadhyay S, Rovera G, Bennicelli J, Barr FG, Rauscher FJ, 3rd; 1995: The PAX3-FKHR fusion protein created by the t(2;13) translocation in alveolar rhabdomyosarcomas is a more potent transcriptional activator than PAX3, *Mol Cell Biol*, 15 (3); 1522-35.

Fu WN, Bertoni F, Kelsey SM, McElwaine SM, Cotter FE, Newland AC, Jia L; 2003: Role of DNA methylation in the suppression of Apaf-1 protein in human leukaemia, *Oncogene*, 22 (3); 451-5.

Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T; 2003: The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation, *J Biol Chem*, 278 (6); 4035-40.

Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T; 2000: DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity, *Nat Genet*, 24 (1); 88-91.

Fulda S, Debatin KM; 2006: 5-Aza-2'-deoxycytidine and IFN-gamma cooperate to sensitize for TRAIL-induced apoptosis by upregulating caspase-8, *Oncogene*, 25 (37); 5125-33.

Furukawa Y, Sutheesophon K, Wada T, Nishimura M, Saito Y, Ishii H, Furukawa Y; 2005: Methylation silencing of the Apaf-1 gene in acute leukemia, *Mol Cancer Res*, 3 (6); 325-34.

Gaffield W, Keeler RF; 1996: Induction of terata in hamsters by solanidane alkaloids derived from Solanum tuberosum, *Chem Res Toxicol*, 9 (2); 426-33.

Gailani MR, Leffell DJ, Ziegler A, Gross EG, Brash DE, Bale AE; 1996: Relationship between sunlight exposure and a key genetic alteration in basal cell carcinoma, *J Natl Cancer Inst*, 88 (6); 349-54.

Gal-Yam EN, Saito Y, Egger G, Jones PA; 2008: Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy, *Annu Rev Med*, 59 267-80.

Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Sanchez-Gonzalez B, Yang H, Rosner G, Verstovsek S, Rytting M, Wierda WG, Ravandi F, Koller C, Xiao L, Faderl S, Estrov Z, Cortes J, O'Brien S, Estey E, Bueso-Ramos C, Fiorentino J, Jabbour E, Issa JP; 2006: Phase 1/2 study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia, *Blood*, 108 (10); 3271-9.

Gartel AL, Tyner AL; 2002: The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis, *Mol Cancer Ther*, 1 (8); 639-49.

Gerstner T, Bell N, Konig S; 2008: Oral valproic acid for epilepsy--long-term experience in therapy and side effects, *Expert Opin Pharmacother*, 9 (2); 285-92.

Ghoshal K, Datta J, Majumder S, Bai S, Kutay H, Motiwala T, Jacob ST; 2005: 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal, *Mol Cell Biol*, 25 (11); 4727-41.

Ghoshal K, Datta J, Majumder S, Bai S, Dong X, Parthun M, Jacob ST; 2002: Inhibitors of histone deacetylase and DNA methyltransferase synergistically activate the methylated metallothionein I promoter by activating the transcription factor MTF-1 and forming an open chromatin structure, *Mol Cell Biol*, 22 (23); 8302-19.

Goffin J, Eisenhauer E; 2002: DNA methyltransferase inhibitors-state of the art, *Ann Oncol*, 13 (11); 1699-716.

Gonzalgo ML, Hayashida T, Bender CM, Pao MM, Tsai YC, Gonzales FA, Nguyen HD, Nguyen TT, Jones PA; 1998: The role of DNA methylation in expression of the p19/p16 locus in human bladder cancer cell lines, *Cancer Res*, 58 (6); 1245-52.

Goodrich LV, Milenkovic L, Higgins KM, Scott MP; 1997: Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants, *Science*, 277 (5329); 1109-13.

Goodrich LV, Scott MP; 1998: Hedgehog and patched in neural development and disease, *Neuron*, 21 (6); 1243-57.

Gorlin RJ; 1987: Nevoid basal-cell carcinoma syndrome, *Medicine (Baltimore)*, 66 (2); 98-113.

Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzel T; 2001: Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells, *Embo J*, 20 (24); 6969-78.

Grady WM, Willis J, Guilford PJ, Dunbier AK, Toro TT, Lynch H, Wiesner G, Ferguson K, Eng C, Park JG, Kim SJ, Markowitz S; 2000: Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer, *Nat Genet*, 26 (1); 16-7.

Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B; 1989: Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma, *Hum Genet*, 83 (2); 155-8.

Greschus S, Kiessling F, Lichy MP, Moll J, Mueller MM, Savai R, Rose F, Ruppert C, Gunther A, Luecke M, Fusenig NE, Semmler W, Traupe H; 2005: Potential applications of flat-panel volumetric CT in morphologic and functional small animal imaging, *Neoplasia*, 7 (8); 730-40.

Grotzer MA, Eggert A, Zuzak TJ, Janss AJ, Marwaha S, Wiewrodt BR, Ikegaki N, Brodeur GM, Phillips PC; 2000: Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression, *Oncogene*, 19 (40); 4604-10.

Gunning P, O'Neill G, Hardeman E; 2008: Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space, *Physiol Rev*, 88 (1); 1-35.

Hahn H; 2006: Mode of *PTCH1*/*Ptch1*-Associated Tumor Formation: Insights from Mutant *Ptch1* Mice, in: Hegehog-Gli Signaling in Human Disease by Ruiz i Altaba A; 2006, *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, 53-58.

Hahn H, Nitzki F, Schorban T, Hemmerlein B, Threadgill D, Rosemann M; 2004: Genetic mapping of a Ptch1-associated rhabdomyosarcoma susceptibility locus on mouse chromosome 2, *Genomics*, 84 (5); 853-8.

Hahn H, Wojnowski L, Specht K, Kappler R, Calzada-Wack J, Potter D, Zimmer A, Muller U, Samson E, Quintanilla-Martinez L, Zimmer A; 2000: Patched target Igf2 is indispensable for the formation of medulloblastoma and rhabdomyosarcoma, *J Biol Chem*, 275 (37); 28341-4.

Hahn H, Wojnowski L, Miller G, Zimmer A; 1999: The patched signaling pathway in tumorigenesis and development: lessons from animal models, *J Mol Med*, 77 (6); 459-68.

Hahn H, Wojnowski L, Zimmer AM, Hall J, Miller G, Zimmer A; 1998: Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome, *Nat Med*, 4 (5); 619-22.

Hahn H, Christiansen J, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Chidambaram A, Gerrard B, Vorechovsky I, Bale AE, Toftgard R, Dean M, Wainwright B; 1996: A mammalian patched homolog is expressed in target tissues of sonic hedgehog and maps to a region associated with developmental abnormalities, *J Biol Chem*, 271 (21); 12125-8.

Harada K, Toyooka S, Maitra A, Maruyama R, Toyooka KO, Timmons CF, Tomlinson GE, Mastrangelo D, Hay RJ, Minna JD, Gazdar AF; 2002: Aberrant promoter methylation and silencing of the RASSF1A gene in pediatric tumors and cell lines, *Oncogene*, 21 (27); 4345-9.

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ; 1993: The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases, *Cell*, 75 (4); 805-16.

Hayatsu H, Wataya Y, Kai K, Iida S; 1970: Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine, and their derivatives, *Biochemistry*, 9 (14); 2858-65.

Hellebrekers DM, Jair KW, Vire E, Eguchi S, Hoebers NT, Fraga MF, Esteller M, Fuks F, Baylin SB, van Engeland M, Griffioen AW; 2006: Angiostatic activity of DNA methyltransferase inhibitors, *Mol Cancer Ther*, 5 (2); 467-75.

Hermann A, Gowher H, Jeltsch A; 2004: Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases, *Cell Mol Life Sci*, 61 (19-20); 2571-87.

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

Hooper JE, Scott MP; 2005: Communicating with Hedgehogs, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6 (4); 306-17.

Hotchkiss RD; 1948: The Quantitative Separation of Purines, Pyrimidines, and Nucleosides by Paper Chromatography, *J. Biol. Chem.*, 175; 315-332.

Hughes EN, Shillito J, Sallan SE, Loeffler JS, Cassady JR, Tarbell NJ; 1988: Medulloblastoma at the joint center for radiation therapy between 1968 and 1984. The influence of radiation dose on the patterns of failure and survival, *Cancer*, 61 (10); 1992-8.

Incardona JP, Lee JH, Robertson CP, Enga K, Kapur RP, Roelink H; 2000: Receptor-mediated endocytosis of soluble and membrane-tethered Sonic hedgehog by Patched-1, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (22); 12044-9.

Incardona JP, Gaffield W, Kapur RP, Roelink H; 1998: The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction, *Development*, 125 (18); 3553-62.

Ingham PW, McMahon AP; 2001: Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles, *Genes Dev*, 15 (23); 3059-87.

Ingham PW, Nystedt S, Nakano Y, Brown W, Stark D, van den Heuvel M, Taylor AM; 2000: Patched represses the Hedgehog signalling pathway by promoting modification of the Smoothened protein, *Curr Biol*, 10 (20); 1315-8.

Ingham PW; 1998: Transducing Hedgehog: the story so far, *Embo J*, 17 (13); 3505-11.

Isomoto H, Mott JL, Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Haan S, Gores GJ; 2007: Sustained IL-6/STAT-3 signaling in cholangiocarcinoma cells due to SOCS-3 epigenetic silencing, *Gastroenterology*, 132 (1); 384-96.

Issa JP; 2003: Decitabine, *Curr Opin Oncol*, 15 (6); 446-51.

Jabbour E, Issa JP, Garcia-Manero G, Kantarjian H; 2008: Evolution of decitabine development: accomplishments, ongoing investigations, and future strategies, *Cancer*, 112 (11); 2341-2351.

James LF; 1999: Teratological research at the USDA-ARS poisonous plant research laboratory, *J Nat Toxins*, 8 (1); 63-80.

Jankowski K, Kucia M, Wysoczynski M, Reca R, Zhao D, Trzyna E, Trent J, Peiper S, Zembala M, Ratajczak J, Houghton P, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ; 2003: Both hepatocyte growth factor (HGF) and stromal-derived factor-1 regulate the metastatic behavior of human rhabdomyosarcoma cells, but only HGF enhances their resistance to radiochemotherapy, *Cancer Res*, 63 (22); 7926-35.

Jee CD, Lee HS, Bae SI, Yang HK, Lee YM, Rho MS, Kim WH; 2005: Loss of caspase-1 gene expression in human gastric carcinomas and cell lines, *Int J Oncol*, 26 (5); 1265-71.

Jenuwein T, Allis CD; 2001: Translating the histone code, *Science*, 293 (5532); 1074-80.

Johnson DL, McCabe MA, Nicholson HS, Joseph AL, Getson PR, Byrne J, Brasseux C, Packer RJ, Reaman G; 1994: Quality of long-term survival in young children with medulloblastoma, *J Neurosurg*, 80 (6); 1004-10.

Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein EH, Jr., Scott MP; 1996: Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome, *Science*, 272 (5268); 1668-71.

Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP; 1998: Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription, *Nat Genet*, 19 (2); 187-91.

Karam JA, Fan J, Stanfield J, Richer E, Benaim EA, Frenkel E, Antich P, Sagalowsky AI, Mason RP, Hsieh JT; 2007: The use of histone deacetylase inhibitor FK228 and DNA hypomethylation agent 5-azacytidine in human bladder cancer therapy, *Int J Cancer*, 120 (8); 1795-802.

Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM, Beachy PA; 2004: Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis, *Nature*, 431 (7009); 707-12.

Katzenellenbogen RA, Baylin SB, Herman JG; 1999: Hypermethylation of the DAP-kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies, *Blood*, 93 (12); 4347-53.

Keeler RF, Binns W; 1968: Teratogenic compounds of Veratrum californicum (Durand). V. Comparison of cyclopian effects of steroidal alkaloids from the plant and structurally related compounds from other sources, *Teratology*, 1 (1); 5-10.

Keeler RF, Binns W; 1964: Chemical Compounds Of Veratrum Californicum Related To Congenital Ovine Cyclopian Malformations: Extraction Of Active Material, *Proc Soc Exp Biol Med*, 116 123-7.

Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, O'Brien SJ, Wong AJ, Vogelstein B; 1987: Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma, *Science*, 236 (4797); 70-3.

Knudson AG, Jr.; 1971: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68 (4); 820-3.

Kogerman P, Krause D, Rahnama F, Kogerman L, Unden AB, Zaphiropoulos PG, Toftgard R; 2002: Alternative first exons of PTCH1 are differentially regulated in vivo and may confer different functions to the PTCH1 protein, *Oncogene*, 21 (39); 6007-16.

Koleva M, Kappler R, Vogler M, Herwig A, Fulda S, Hahn H; 2005: Pleiotropic effects of sonic hedgehog on muscle satellite cells, *Cell Mol Life Sci*, 62 (16); 1863-70.

Kondo Y, Shen L, Issa JP; 2003: Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer, *Mol Cell Biol*, 23 (1); 206-15.

Kostrouchova M, Kostrouch Z, Kostrouchova M; 2007: Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways, *Folia Biol (Praha)*, 53 (2); 37-49.

Kubo M, Nakamura M, Tasaki A, Yamanaka N, Nakashima H, Nomura M, Kuroki S, Katano M; 2004: Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer, *Cancer Res*, 64 (17); 6071-4.

Kuendgen A, Gattermann N; 2007: Valproic acid for the treatment of myeloid malignancies, *Cancer*, 110 (5); 943-54.

Laird PW, Jackson-Grusby L, Fazeli A, Dickinson SL, Jung WE, Li E, Weinberg RA, Jaenisch R; 1995: Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation, *Cell*, 81 (2); 197-205.

Lee YY, Kang SH, Seo JY, Jung CW, Lee KU, Choe KJ, Kim BK, Kim NK, Koeffler HP, Bang YJ; 1997: Alterations of p16INK4A and p15INK4B genes in gastric carcinomas, *Cancer*, 80 (10); 1889-96.

Levitt RJ, Zhao Y, Blouin MJ, Pollak M; 2007: The hedgehog pathway inhibitor cyclopamine increases levels of p27, and decreases both expression of IGF-II and activation of Akt in PC-3 prostate cancer cells, *Cancer Lett*, 255 (2); 300-6.

Li E, Bestor TH, Jaenisch R; 1992: Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality, *Cell*, 69 (6); 915-26.

Li XN, Shu Q, Su JM, Perlaky L, Blaney SM, Lau CC; 2005: Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC, *Mol Cancer Ther*, 4 (12); 1912-22.

Lindsey JC, Lusher ME, Anderton JA, Bailey S, Gilbertson RJ, Pearson AD, Ellison DW, Clifford SC; 2004: Identification of tumour-specific epigenetic events in medulloblastoma development by hypermethylation profiling, *Carcinogenesis*, 25 (5); 661-8.

Loscher W; 2002: Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy, *CNS Drugs*, 16 (10); 669-94.

Louro ID, Bailey EC, Li X, South LS, McKie-Bell PR, Yoder BK, Huang CC, Johnson MR, Hill AE, Johnson RL, Ruppert JM; 2002: Comparative gene expression profile analysis of GLI and c-MYC in an epithelial model of malignant transformation, *Cancer Res*, 62 (20); 5867-73.

Luczak MW, Jagodzinski PP; 2006: The role of DNA methylation in cancer development, *Folia Histochem Cytobiol*, 44 (3); 143-54.

Lurquin C, De Smet C, Brasseur F, Muscatelli F, Martelange V, De Plaen E, Brasseur R, Monaco AP, Boon T; 1997: Two members of the human MAGEB gene family located in Xp21.3 are expressed in tumors of various histological origins, *Genomics*, 46 (3); 397-408.

Merlino G, Helman LJ; 1999: Rhabdomyosarcoma--working out the pathways, *Oncogene*, 18 (38); 5340-8.

Mertens AC, Yasui Y, Neglia JP, Potter JD, Nesbit ME, Jr., Ruccione K, Smithson WA, Robison LL; 2001: Late mortality experience in five-year survivors of childhood and adolescent cancer: the Childhood Cancer Survivor Study, *J Clin Oncol*, 19 (13); 3163-72.

Meyer WH, Spunt SL; 2004: Soft tissue sarcomas of childhood, *Cancer Treat Rev*, 30 (3); 269-80.

Milutinovic S, D'Alessio AC, Detich N, Szyf M; 2007: Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes, *Carcinogenesis*, 28 (3); 560-71.

Milutinovic S, Knox JD, Szyf M; 2000: DNA methyltransferase inhibition induces the transcription of the tumor suppressor p21(WAF1/CIP1/sdi1), *J Biol Chem*, 275 (9); 6353-9.

Mimeault M, Moore E, Moniaux N, Henichart JP, Depreux P, Lin MF, Batra SK; 2006: Cytotoxic effects induced by a combination of cyclopamine and gefitinib, the selective hedgehog and epidermal growth factor receptor signaling inhibitors, in prostate cancer cells, *Int J Cancer*, 118 (4); 1022-31.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L; 2004: Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity, *Pharmacol Rev*, 56 (2); 185-229.

Missiaglia E, Donadelli M, Palmieri M, Crnogorac-Jurcevic T, Scarpa A, Lemoine NR; 2005: Growth delay of human pancreatic cancer cells by methylase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine treatment is associated with activation of the interferon signalling pathway, *Oncogene*, 24 (1); 199-211.

Muerkoster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse ML, Sebens T, Kloppel G, Kalthoff H, Folsch UR, Schafer H; 2004: Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta, *Cancer Res*, 64 (4); 1331-7.

Myohanen S, Wahlfors J, Janne J; 1994: Automated fluorescent genomic sequencing as applied to the methylation analysis of the human ornithine decarboxylase gene, *DNA Seq*, 5 (1); 1-8.

Nagao K, Toyoda M, Takeuchi-Inoue K, Fujii K, Yamada M, Miyashita T; 2005: Identification and characterization of multiple isoforms of a murine and human tumor suppressor, patched, having distinct first exons, *Genomics*, 85 (4); 462-71.

Nan X, Cross S, Bird A; 1998: Gene silencing by methyl-CpG-binding proteins, *Novartis Found Symp*, 214 6-16; discussion 16-21, 46-50.

Nehls M, Pfeifer D, Schorpp M, Hedrich H, Boehm T; 1994: New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations, *Nature*, 372 (6501); 103-7.

Nguyen CT, Weisenberger DJ, Velicescu M, Gonzales FA, Lin JC, Liang G, Jones PA; 2002: Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine, *Cancer Res*, 62 (22); 6456-61.

Nieuwenhuis E, Hui CC; 2005: Hedgehog signaling and congenital malformations, *Clin Genet*, 67 (3); 193-208.

Nusslein-Volhard C, Wieschaus E; 1980: Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila, *Nature*, 287 (5785); 795-801.

Oliver TG, Read TA, Kessler JD, Mehmeti A, Wells JF, Huynh TT, Lin SM, Wechsler-Reya RJ; 2005: Loss of patched and disruption of granule cell development in a pre-neoplastic stage of medulloblastoma, *Development*, 132 (10); 2425-39.

Olsen CM, Meussen-Elholm ET, Roste LS, Tauboll E; 2004: Antiepileptic drugs inhibit cell growth in the human breast cancer cell line MCF7, *Mol Cell Endocrinol*, 213 (2); 173-9.

Pantelouris EM; 1968: Absence of thymus in a mouse mutant, *Nature*, 217 (5126); 370-1.

Pazzaglia S, Tanori M, Mancuso M, Gessi M, Pasquali E, Leonardi S, Oliva MA, Rebessi S, Di Majo V, Covelli V, Giangaspero F, Saran A; 2006: Two-hit model for progression of medulloblastoma preneoplasia in Patched heterozygous mice, *Oncogene*, 25 (40); 5575-80.

Pazzaglia S, Mancuso M, Atkinson MJ, Tanori M, Rebessi S, Majo VD, Covelli V, Hahn H, Saran A; 2002: High incidence of medulloblastoma following X-ray-irradiation of newborn Ptc1 heterozygous mice, *Oncogene*, 21 (49); 7580-4.

Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS; 2001: Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen, *J Biol Chem*, 276 (39); 36734-41.

Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M, Sturla LM, Angelo M, McLaughlin ME, Kim JY, Goumnerova LC, Black PM, Lau C, Allen JC, Zagzag D, Olson JM, Curran T, Wetmore C, Biegel JA, Poggio T, Mukherjee S, Rifkin R, Califano A, Stolovitzky G, Louis DN, Mesirov JP, Lander ES, Golub TR; 2002: Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression, *Nature*, 415 (6870); 436-42.

Pritchard JI, Olson JM; 2008: Methylation of PTCH1, the Patched-1 gene, in a panel of primary medulloblastomas, *Cancer Genet Cytogenet*, 180 (1); 47-50.

Pulling LC, Vuillemenot BR, Hutt JA, Devereux TR, Belinsky SA; 2004: Aberrant promoter hypermethylation of the death-associated protein kinase gene is early and frequent in murine lung tumors induced by cigarette smoke and tobacco carcinogens, *Cancer Res*, 64 (11); 3844-8.

Qualtrough D, Buda A, Gaffield W, Williams AC, Paraskeva C; 2004: Hedgehog signalling in colorectal tumour cells: induction of apoptosis with cyclopamine treatment, *Int J Cancer*, 110 (6); 831-7.

Rabbani A, Finn RM, Ausio J; 2005: The anthracycline antibiotics: antitumor drugs that alter chromatin structure, *Bioessays*, 27 (1); 50-6.

Raffel C, Jenkins RB, Frederick L, Hebrink D, Alderete B, Fults DW, James CD; 1997: Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations, *Cancer Res*, 57 (5); 842-5.

Ragazzini P, Gamberi G, Pazzaglia L, Serra M, Magagnoli G, Ponticelli F, Ferrari C, Ghinelli C, Alberghini M, Bertoni F, Picci P, Benassi MS; 2004: Amplification of CDK4, MDM2, SAS and GLI genes in leiomyosarcoma, alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma, *Histol Histopathol*, 19 (2); 401-11.

Regl G, Kasper M, Schnidar H, Eichberger T, Neill GW, Philpott MP, Esterbauer H, Hauser-Kronberger C, Frischauf AM, Aberger F; 2004: Activation of the BCL2 promoter in response to Hedgehog/GLI signal transduction is predominantly mediated by GLI2, *Cancer Res*, 64 (21); 7724-31.

Reu FJ, Bae SI, Cherkassky L, Leaman DW, Lindner D, Beaulieu N, MacLeod AR, Borden EC; 2006: Overcoming resistance to interferon-induced apoptosis of renal carcinoma and melanoma cells by DNA demethylation, *J Clin Oncol*, 24 (23); 3771-9.

Roberts WM, Douglass EC, Peiper SC, Houghton PJ, Look AT; 1989: Amplification of the gli gene in childhood sarcomas, *Cancer Res*, 49 (19); 5407-13.

Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP; 2000: DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters, *Nat Genet*, 25 (3); 338-42.

Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Jay P, Berta P, Scherer SW, Tsui LC, Muenke M; 1996: Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly, *Nat Genet*, 14 (3); 357-60.

Romer JT, Kimura H, Magdaleno S, Sasai K, Fuller C, Baines H, Connelly M, Stewart CF, Gould S, Rubin LL, Curran T; 2004: Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in Ptc1(+/-)p53(-/-) mice, *Cancer Cell*, 6 (3); 229-40.

Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB; 2000: DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci, *Nat Genet*, 25 (3); 269-77.

Ruiz i Altaba A, Mas C, Stecca B; 2007: The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer, *Trends Cell Biol*, 17 (9); 438-47.

Sanchez P, Ruiz i Altaba A; 2005: In vivo inhibition of endogenous brain tumors through systemic interference of Hedgehog signaling in mice, *Mech Dev*, 122 (2); 223-30.

Sanchez P, Hernandez AM, Stecca B, Kahler AJ, DeGueme AM, Barrett A, Beyna M, Datta MW, Datta S, Ruiz i Altaba A; 2004: Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (34); 12561-6.

Sandler E, Lyden E, Ruymann F, Maurer H, Wharam M, Parham D, Link M, Crist W; 2001: Efficacy of ifosfamide and doxorubicin given as a phase II "window" in children with newly diagnosed metastatic rhabdomyosarcoma: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group, *Med Pediatr Oncol*, 37 (5); 442-8.

Santos KF, Mazzola TN, Carvalho HF; 2005: The prima donna of epigenetics: the regulation of gene expression by DNA methylation, *Braz J Med Biol Res*, 38 (10); 1531-41.

Sasai K, Romer JT, Lee Y, Finkelstein D, Fuller C, McKinnon PJ, Curran T; 2006: Shh pathway activity is down-regulated in cultured medulloblastoma cells: implications for preclinical studies, *Cancer Res*, 66 (8); 4215-22.

Satoh A, Toyota M, Itoh F, Kikuchi T, Obata T, Sasaki Y, Suzuki H, Yawata A, Kusano M, Fujita M, Hosokawa M, Yanagihara K, Tokino T, Imai K; 2002: DNA methylation and histone deacetylation associated with silencing DAP kinase gene expression in colorectal and gastric cancers, *Br J Cancer*, 86 (11); 1817-23.

Schmelz K, Sattler N, Wagner M, Lubbert M, Dorken B, Tamm I; 2005: Induction of gene expression by 5-Aza-2'-deoxycytidine in acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) but not epithelial cells by DNA-methylation-dependent and -independent mechanisms, *Leukemia*, 19 (1); 103-11.

Schneider-Stock R, Diab-Assef M, Rohrbeck A, Foltzer-Jourdainne C, Boltze C, Hartig R, Schonfeld P, Roessner A, Gali-Muhtasib H; 2005: 5-Aza-cytidine is a potent inhibitor of

DNA methyltransferase 3a and induces apoptosis in HCT-116 colon cancer cells via Gadd45- and p53-dependent mechanisms, *J Pharmacol Exp Ther*, 312 (2); 525-36.

Schofield D, West DC, Anthony DC, Marshal R, Sklar J; 1995: Correlation of loss of heterozygosity at chromosome 9q with histological subtype in medulloblastomas, *Am J Pathol*, 146 (2); 472-80.

Scott SA, Dong WF, Ichinohasama R, Hirsch C, Sheridan D, Sanche SE, Geyer CR, Decoteau JF; 2006: 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) can relieve p21WAF1 repression in human acute myeloid leukemia by a mechanism involving release of histone deacetylase 1 (HDAC1) without requiring p21WAF1 promoter demethylation, *Leuk Res*, 30 (1); 69-76.

Shaker S, Bernstein M, Momparler LF, Momparler RL; 2003: Preclinical evaluation of antineoplastic activity of inhibitors of DNA methylation (5-aza-2'-deoxycytidine) and histone deacetylation (trichostatin A, depsipeptide) in combination against myeloid leukemic cells, *Leuk Res*, 27 (5); 437-44.

Shapiro R, Braverman B, Louis JB, Servis RE; 1973: Nucleic acid reactivity and conformation. II. Reaction of cytosine and uracil with sodium bisulfite, *J Biol Chem*, 248 (11); 4060-4.

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.

Sherr CJ, Roberts JM; 1999: CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression, *Genes Dev*, 13 (12); 1501-12.

Shi H, Wei SH, Leu YW, Rahmatpanah F, Liu JC, Yan PS, Nephew KP, Huang TH; 2003: Triple analysis of the cancer epigenome: an integrated microarray system for assessing gene expression, DNA methylation, and histone acetylation, *Cancer Res*, 63 (9); 2164-71.

Singal R, Grimes SR; 2001: Microsoft Word macro for analysis of cytosine methylation by the bisulfite deamination reaction, *Biotechniques*, 30 (1); 116-20.

Smiraglia DJ, Rush LJ, Fruhwald MC, Dai Z, Held WA, Costello JF, Lang JC, Eng C, Li B, Wright FA, Caligiuri MA, Plass C; 2001: Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies, *Hum Mol Genet*, 10 (13); 1413-9.

Soengas MS, Capodieci P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C, Lowe SW; 2001: Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma, *Nature*, 409 (6817); 207-11.

Soliman H, Agresta SV; 2008: Current issues in adolescent and young adult cancer survivorship, *Cancer Control*, 15 (1); 55-62.

Soriano AO, Yang H, Faderl S, Estrov Z, Giles F, Ravandi F, Cortes J, Wierda WG, Ouzounian S, Quezada A, Pierce S, Estey EH, Issa JP, Kantarjian HM, Garcia-Manero G; 2007: Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome, *Blood*, 110 (7); 2302-8.

Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V, Beermann F, Ruiz IAA; 2007: Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (14); 5895-900.

Stecca B, Ruiz i Altaba A; 2005: Brain as a paradigm of organ growth: Hedgehog-Gli signaling in neural stem cells and brain tumors, *J Neurobiol*, 64 (4); 476-90.

Stempak JM, Sohn KJ, Chiang EP, Shane B, Kim YI; 2005: Cell and stage of transformation-specific effects of folate deficiency on methionine cycle intermediates and DNA methylation in an in vitro model, *Carcinogenesis*, 26 (5); 981-90.

Stone DM, Murone M, Luoh S, Ye W, Armanini MP, Gurney A, Phillips H, Brush J, Goddard A, de Sauvage FJ, Rosenthal A; 1999: Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli, *J Cell Sci*, 112 (Pt 23) 4437-48.

Suzuki A, Tsutomi Y, Miura M, Akahane K; 1999: Caspase 3 inactivation to suppress Fas-mediated apoptosis: identification of binding domain with p21 and ILP and inactivation machinery by p21, *Oncogene*, 18 (5); 1239-44.

Suzuki A, Tsutomi Y, Akahane K, Araki T, Miura M; 1998: Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP, *Oncogene*, 17 (8); 931-9.

Tabs S, Avci O; 2004: Induction of the differentiation and apoptosis of tumor cells in vivo with efficiency and selectivity, *Eur J Dermatol*, 14 (2); 96-102.

Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA; 2002: Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened, *Nature*, 418 (6900); 892-7.

Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang B, Mann RK, Milenkovic L, Scott MP, Beachy PA; 2000: Effects of oncogenic mutations in Smoothened and Patched can be reversed by cyclopamine, *Nature*, 406 (6799); 1005-9.

Takai N, Desmond JC, Kumagai T, Gui D, Said JW, Whittaker S, Miyakawa I, Koeffler HP; 2004: Histone deacetylase inhibitors have a profound antigrowth activity in endometrial cancer cells, *Clin Cancer Res*, 10 (3); 1141-9.

Takai D, Jones PA; 2002: Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (6); 3740-5.

Tang X, Wu W, Sun SY, Wistuba, II, Hong WK, Mao L; 2004: Hypermethylation of the death-associated protein kinase promoter attenuates the sensitivity to TRAIL-induced apoptosis in human non-small cell lung cancer cells, *Mol Cancer Res*, 2 (12); 685-91.

Tannock IF, Lee CM, Tunggal JK, Cowan DS, Egorin MJ; 2002: Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy, *Clin Cancer Res*, 8 (3); 878-84.

Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernandez-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M; 2003: Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis, *Nature*, 425 (6960); 851-6.

Toftgard R; 2000: Hedgehog signalling in cancer, *Cell Mol Life Sci*, 57 (12); 1720-31.

Tomita T, McLone DG; 1986: Medulloblastoma in childhood: results of radical resection and low-dose neuraxis radiation therapy, *J Neurosurg*, 64 (2); 238-42.

Tostar U, Malm CJ, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Toftgard R, Unden AB; 2006: Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development, *J Pathol*, 208 (1); 17-25.

Turek-Plewa J, Jagodzinski PP; 2005: The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression, *Cell Mol Biol Lett*, 10 (4); 631-47.

Ueki T, Takeuchi T, Nishimatsu H, Kajiwara T, Moriyama N, Narita Y, Kawabe K, Ueki K, Kitamura T; 2001: Silencing of the caspase-1 gene occurs in murine and human renal cancer cells and causes solid tumor growth in vivo, *Int J Cancer*, 91 (5); 673-9.

Uhmann A, Dittmann K, Nitzki F, Dressel R, Koleva M, Frommhold A, Zibat A, Binder C, Adham I, Nitsche M, Heller T, Armstrong V, Schulz-Schaeffer W, Wienands J, Hahn H; 2007: The Hedgehog receptor Patched controls lymphoid lineage commitment, *Blood*, 110 (6); 1814-23.

Uhmann A, Ferch U, Bauer R, Tauber S, Arziman Z, Chen C, Hemmerlein B, Wojnowski L, Hahn H; 2005: A model for PTCH1/Ptch1-associated tumors comprising mutational inactivation and gene silencing, *Int J Oncol*, 27 (6); 1567-75.

Unden AB, Holmberg E, Lundh-Rozell B, Stahle-Backdahl M, Zaphiropoulos PG, Toftgard R, Vorechovsky I; 1996: Mutations in the human homologue of Drosophila patched (PTCH) in basal cell carcinomas and the Gorlin syndrome: different in vivo mechanisms of PTCH inactivation, *Cancer Res*, 56 (20); 4562-5.

Uziel T, Zindy F, Xie S, Lee Y, Forget A, Magdaleno S, Rehg JE, Calabrese C, Solecki D, Eberhart CG, Sherr SE, Plimmer S, Clifford SC, Hatten ME, McKinnon PJ, Gilbertson RJ, Curran T, Sherr CJ, Roussel MF; 2005: The tumor suppressors Ink4c and p53 collaborate independently with Patched to suppress medulloblastoma formation, *Genes Dev*, 19 (22); 2656-67.

Van den Brink GR, Hardwick JC, Tytgat GN, Brink MA, Ten Kate FJ, Van Deventer SJ, Peppelenbosch MP; 2001: Sonic hedgehog regulates gastric gland morphogenesis in man and mouse, *Gastroenterology*, 121 (2); 317-28.

Venturelli S, Armeanu S, Pathil A, Hsieh CJ, Weiss TS, Vonthein R, Wehrmann M, Gregor M, Lauer UM, Bitzer M; 2007: Epigenetic combination therapy as a tumor-selective treatment approach for hepatocellular carcinoma, *Cancer*, 109 (10); 2132-41.

Vire E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F; 2006: The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation, *Nature*, 439 (7078); 871-4.

Vogt M, Haggblom C, Yeargin J, Christiansen-Weber T, Haas M; 1998: Independent induction of senescence by p16INK4a and p21CIP1 in spontaneously immortalized human fibroblasts, *Cell Growth Differ*, 9 (2); 139-46.

Vorechovsky I, Tingby O, Hartman M, Stromberg B, Nister M, Collins VP, Toftgard R; 1997: Somatic mutations in the human homologue of Drosophila patched in primitive neuroectodermal tumours, *Oncogene*, 15 (3); 361-6.

Wallace VA; 1999: Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum, *Curr Biol*, 9 (8); 445-8.

Wang RY, Gehrke CW, Ehrlich M; 1980: Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues, *Nucleic Acids Res*, 8 (20); 4777-90.

Wara WM, Le QT, Sneed PK, Larson DA, Prados MD, Levin VA, Edwards MS, Weil MD; 1994: Pattern of recurrence of medulloblastoma after low-dose craniospinal radiotherapy, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 30 (3); 551-6.

Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB; 2003: Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer, *Nature*, 422 (6929); 313-7.

Wechsler-Reya RJ, Scott MP; 1999: Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog, *Neuron*, 22 (1); 103-14.

Wetmore C, Eberhart DE, Curran T; 2000: The normal patched allele is expressed in medulloblastomas from mice with heterozygous germ-line mutation of patched, *Cancer Res*, 60 (8); 2239-46.

Wetmore C, Eberhart DE, Curran T; 2001: Loss of p53 but not ARF accelerates medulloblastoma in mice heterozygous for patched, *Cancer Res*, 61 (2); 513-6.

Witt O, Schweigerer L, Driever PH, Wolff J, Pekrun A; 2004: Valproic acid treatment of glioblastoma multiforme in a child, *Pediatr Blood Cancer*, 43 (2); 181.

Wojnowski L, Kulle B, Schirmer M, Schluter G, Schmidt A, Rosenberger A, Vonhof S, Bickeboller H, Toliat MR, Suk EK, Tzvetkov M, Kruger A, Seifert S, Kloess M, Hahn H, Loeffler M, Nurnberg P, Pfreundschuh M, Trumper L, Brockmoller J, Hasenfuss G; 2005: NAD(P)H

oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity, *Circulation*, 112 (24); 3754-62.

Wolf I, Bose S, Desmond JC, Lin BT, Williamson EA, Karlan BY, Koeffler HP; 2007: Unmasking of epigenetically silenced genes reveals DNA promoter methylation and reduced expression of PTCH in breast cancer, *Breast Cancer Res Treat*, 105 (2); 139-55.

Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B; 1987: Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84 (19); 6899-903.

Wozniak RJ, Klimecki WT, Lau SS, Feinstein Y, Futscher BW; 2007: 5-Aza-2'-deoxycytidine-mediated reductions in G9A histone methyltransferase and histone H3 K9 dimethylation levels are linked to tumor suppressor gene reactivation, *Oncogene*, 26 (1); 77-90.

Xie J, Johnson RL, Zhang X, Bare JW, Waldman FM, Cogen PH, Menon AG, Warren RS, Chen LC, Scott MP, Epstein EH, Jr.; 1997: Mutations of the PATCHED gene in several types of sporadic extracutaneous tumors, *Cancer Res*, 57 (12); 2369-72.

Yamada Y, Jackson-Grusby L, Linhart H, Meissner A, Eden A, Lin H, Jaenisch R; 2005: Opposing effects of DNA hypomethylation on intestinal and liver carcinogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (38); 13580-5.

Yamada Y, Mori H; 2007: Multistep carcinogenesis of the colon in Apc(Min/+) mouse, *Cancer Sci*, 98 (1); 6-10.

Ying J, Srivastava G, Gao Z, Zhang X, Murray P, Ambinder R, Tao Q; 2004: Promoter hypermethylation of the cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) gene p21WAF1/CIP1/SDI1 is rare in various lymphomas and carcinomas, *Blood*, 103 (2); 743-6.

Zhan S, Shapiro DN, Helman LJ; 1994: Activation of an imprinted allele of the insulin-like growth factor II gene implicated in rhabdomyosarcoma, *J Clin Invest*, 94 (1); 445-8.

Zhu WG, Lakshmanan RR, Beal MD, Otterson GA; 2001: DNA methyltransferase inhibition enhances apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors, *Cancer Res*, 61 (4); 1327-33.

Zurawel RH, Allen C, Wechsler-Reya R, Scott MP, Raffel C; 2000: Evidence that haploinsufficiency of Ptch leads to medulloblastoma in mice, *Genes Chromosomes Cancer*, 28 (1); 77-81.

8 DANKSAGUNG

Für die Bereitstellung des Promotionsthemas möchte ich Frau Prof. H. Hahn herzlich danken, die mit intensiver Betreuung und stetem Interesse immer Ansporn für Höchstleistungen gab.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. C. Lang für die externe Betreuung der Promotion und Herrn Prof. R. Lauster für die Übernahme des Erstgutachtens.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hahn danke ich für die unermüdliche Unterstützung in allen Laborfragen und die entspannte Zusammenarbeit. Und an die Damenrunde des Labors: Ihr habt meinen Horizont in viele Richtungen erweitert auch wenn ich manches nicht so genau wissen wollte. Ein besonderes Danke geht an Astrid für ihre ausdauernd offenen Ohren.

Dr. W. Schulz-Schaeffer, A. Rosenberger, Dr. S. Schweyer, Dr. M. Tzetkov, Dr. S. Johnsen, J. Pirngruber und K. Beyer möchte ich für ihr Engagement, ihren Rat und ihre tatkräftige Unterstützung danken, die maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Dem Team des VCT und besonders C. Dullin und Dr. S. Kimmina danke ich für ihre Geduld bei den unzähligen Scanterminen.

Ein ganz besonders großes Dankeschön an alle Korrekturleser: Den Spezialisten, die auch dem kleinsten Fehlerteufel auf die Spur gekommen sind und den Fachfremden, die sich mit vollem Einsatz durch das Fachchinesisch gekämpft haben.

Ein Gruß geht an Katrin und Barbara, die sich mit mir aufmachten die Welt zu retten. Wie weit seid Ihr gekommen?

Eine tiefe Verneigung für mein Mütterchen: Du hast mich immer unterstützt und mir meine Träume ermöglicht.

An Volker: Du hast immer den schmalen Grad zwischen geduldigem Mutmachen und auf den Tisch hauen gefunden, aber ein Monk bist Du doch!

9 LEBENSLAUF

Zu meiner Person

Ines Ecke
Geboren am 07.03.1979 in Görlitz
Ledig, kinderlos

Promotion

Feb 05 - Aug 08	Im Rahmen des Graduiertenkollegs 1034 der Georg-August-Universität Göttingen, Titel: Überprüfung neuer Therapieansätze für *Patched*-assoziierte Tumoren im Mausmodell

Studium

Okt 97 - Mrz 03	An der Technischen Universität Berlin im Fach Biotechnologie, Abschluss: Diplom-Ingenieur der Biotechnologie, Note 1,2

Laborerfahrungen

Sep 02 - Aug 03	Studienarbeit und Diplomarbeit an der Charité Berlin, Titel: Adenoviraler Transfer zytoprotektiver Gene in korneale Zellen
Mai - Sep 2000	National Water Research Institut, Saskatoon, Kanada
Feb/Mrz 98	MICROMUN, Privates Institut für Mikrobiologische Forschung GmbH, Greifswald
Mrz/Apr 99	Institut für Tierarzneimittel Berlin GmbH, IfTA

Schulbildung

1991 - 1997	Joliot-Curie-Gymnasium, Görlitz, Abschluss: Abitur, Note 1,6
1985 - 1991	Polytechnische Oberschule, Görlitz

Publikationen

Ecke I, Petry F, Rosenberger A, Tauber S, Mönkemeyer S, Hess I, Dullin C, Kimmina S, Pirngruber J, Johnsen SA, Uhmann A, Wojnowski L, Schulz-Schaeffer W, Witt O, Hahn H: Antitumor effects of a combined 5-aza-2´-deoxycytidine and valproic acid treatment on rhabdomyosarcoma and medulloblastoma in *Ptch*-mutant mice, Eingereicht bei Cancer Research.

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); 361-72.

Gong N, Ecke I, Mergler S, Yang J, Metzner S, Schu S, Volk HD, Pleyer U, Ritter T; 2007: Gene transfer of cyto-protective molecules in corneal endothelial cells and cultured corneas: analysis of protective effects *in vitro* and *in vivo*, *Biochem Biophys Res Commun*, 357(1):302-7.

Göttingen, 06.06.08